

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FERMENTE SUCUK ÜRETİMİNDE FARKLI TUZ
ORANLARININ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*'UN
ENTEROTOKSİN ÜRETME YETENEĞİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

Gamze TURKAL

DOKTORA TEZİ

BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Yusuf DOĞRUEK

KONYA-2024

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FERMENTE SUCUK ÜRETİMİNDE FARKLI TUZ
ORANLARININ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*'UN
ENTEROTOKSİN ÜRETME YETENEĞİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

Gamze TURKAL

DOKTORA TEZİ

BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Yusuf DOĞRUER

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından 20212032 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2024

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması, deneysel olarak üretimi gerçekleştirilen fermente sucuklarda farklı tuz oranlarının *Staphylococcus aureus*'un enterotoksin üretme yeteneği üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla planlanmıştır.

Doktora eğitimim süresince bilimsel bilgi birikimini hiçbir zaman esirgemeyen, tez çalışma konumun seçimi ve yürütülmesinde göstermiş olduğu ilgi, sabır, anlayış ve katkılarından dolayı başta danışman hocam Prof. Dr. Yusuf DOĞRUEER olmak üzere Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı bütün öğretim üyelerine, tezimi maddi olarak destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, "Sağlıklı Beslenme ve Gıda Katkı Maddeleri" alanında beni destekleyen YÖK 100/2000 programına, her anımda, her zaman yanımda olan ve bütün aşamalarda kahrımı çeken Doç. Dr. A. Ezgi TELLİ'ye, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Doç. Dr. Nihat TELLİ, Doç. Dr. Yusuf BİÇER ve Dr. Öğr. Üyesi Gonca SÖNMEZ'e, tez suşlarının temininde yardımcı olan Doç. Dr. Erhan KEYVAN'a, tezimin istatistik analizlerinde büyük özveri gösterip yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Tuba BAYIR'a, bu günlere ulaşmamda büyük emekleri bulunan ve her zaman arkamda duran babam Vehbi KABAK, annem Arzu KABAK ve kardeşim Yusuf KABAK'a, destek ve yardımlarını her zaman hissettiğim değerli eşim Tamer TURKAL ile hayatıma ışık tutan biricik kızım Arya Melis TURKAL'a sonsuz teşekkür ederim.

Gamze TURKAL

Mayıs/2024

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ÖZET.....	xi
SUMMARY	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Et ve Et Ürünleri	3
1.2. Fermente Sucuk.....	4
1.2.1. Fermente Sucuk Üretim Teknolojisi.....	4
1.2.2. Hammadde	5
1.2.3. Katkı Maddeleri	6
1.3. Tuz ve Tuz Azaltma Stratejileri	8
1.3.1. Tuzun Özellikleri	8
1.3.2. Tuzun Etki Mekanizması	8
1.3.3. Tuz Azaltma Stratejileri.....	12
1.3.4. Tuz Azaltımının Kalite ve Gıda Güvenliği Üzerindeki Etkileri	13
1.4. Sucuk Hamurunun Hazırlanması ve Kılıflara Doldurulması	15
1.5. Sucuğun Fermantasyonu	16
1.6. Fermente Sucuk Üretiminde Engel Faktörler	18
1.7. Fermente Sucuğun Mikrobiyal Florası	19
1.8. <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>)	21
1.8.1. <i>S. aureus</i> 'un Sınıflandırılması	21
1.8.2. <i>S. aureus</i> 'un Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	22
1.8.3. <i>S. aureus</i> 'un Gıdalardaki Varlığı	23
1.8.4. <i>S. aureus</i> 'un Epidemiyolojisi.....	24
1.8.5. Stafilokokal Enterotoksinler (SE'ler)	26
1.9. Enterotoksin Üretiminin Düzenlenmesi.....	33
1.9.1. Klasik Enterotoksinlerin Düzenlenmesi (SEA-SEE).....	34

1.9.2. Klasik Olmayan Enterotoksinlerin Düzenlenmesi.....	36
1.9.3. Gıda ile İlgili Faktörlerin Enterotoksin Üretimine Etkisi	36
1.10. Hastalık ve Semptomlar	37
1.11. <i>S. aureus</i> ve SE'lerin Tespit Yöntemleri	38
1.11.1. <i>S. aureus</i> 'un Fenotipik Yöntemlerle Tanımlanması ve Karakterizasyonu	38
1.11.2. <i>S. aureus</i> 'un Genotipik Yöntemlerle Tanımlanması ve Karakterizasyonu	41
1.12. Önleme ve Kontrol Tedbirleri.....	43
1.13. Salgın Araştırmaları	44
2. GEREÇ VE YÖNTEM	47
2.1. Gereç	47
2.1.1. Mikrobiyolojik Analizlerde Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar	47
2.1.2. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Kimyasallar	49
2.1.3. PCR Analizinde Kullanılan Gereçler	49
2.1.4. Enterotoksin Üretiminin Tespit Edilmesinde Kullanılan Kimyasallar	50
2.1.5. Referans Suşlar	51
2.2. Yöntem.....	51
2.2.1. Deneysel Sucuk Üretimi.....	51
2.2.2. Numunelerin İnokülasyonu.....	53
2.2.3. Kimyasal Analizler.....	55
2.2.4. Mikrobiyolojik Analizler.....	55
2.2.5. <i>S.aureus</i> 'un İzolasyon ve İdentifikasyonu	56
2.2.6. DNA İzolasyonu.....	60
2.2.7. <i>S. aureus</i> Enterotoksin Genlerinin PCR Yöntemi ile Tespiti.....	60
2.2.8. Amplifiye Ürünlerin Görüntülenmesi	62
2.2.9. Enterotoksin Geni İçeren <i>S. aureus</i> İzolatlarının ELISA Tekniğiyle Toksin Üretiminin Tespiti.....	63

2.2.10. İstatistiksel Analizler.....	64
3. BULGULAR.....	65
3.1. Kimyasal Analiz Bulguları.....	65
3.1.1. Rutubet İçeriği.....	65
3.1.2. Su Aktivitesi Değeri	66
3.1.3. pH Değeri	68
3.2. <i>S. aureus</i> İnoküle Edilen Sucuklarda Sayım Sonuçları	70
3.3. <i>S. aureus</i> Enterotoksin Genlerinin PCR Görüntüleri	73
3.4. <i>S. aureus</i> Enterotoksin Genlerine Sahip İzolatların Toksin Oluşturma Yeteneğinin ELISA Sonuçları.....	76
4. TARTIŞMA	79
4.1. Kimyasal Analiz Sonuçları	79
4.2. <i>S. aureus</i> ve Enterotoksin Üretme Yeteneği	81
4.3. <i>S. aureus</i> Enterotoksin Gen Profilleri	87
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	88
6. KAYNAKLAR	89
7. EKLER.....	105
Ek-A: Etik Kurul Onayı	105
EK-B: Turnitin Raporu	106
8. ÖZGEÇMİŞ.....	107

SİMGELER VE KISALTMALAR

<	Küçük
>	Büyük
~	Yaklaşık
°C	Santigrad derece
%	Yüzde
α	Alfa
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AgNO ₃	Gümüş Nitrat
<i>agr</i>	Yardımcı Gen Düzenleyici
AIP	Otoindükleyici Peptid
APC	Antijen Sunan Hücreler
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
a _w	Su aktivitesi
β	Beta
BPA	Baird Parker Agar
bp	Baz Çifti (Base Pair)
C	Sitozin
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
CDC	Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri
CLSI	Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü
CO ₂	Karbondioksit
CoNS	Koagülaz Negatif Stafilokoklar
CoPS	Koagülaz Pozitif Stafilokoklar
dH ₂ O	Distile su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
ECDC	Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
Eh	Redoks Potansiyeli
ELFA	Enzime Bağlı Floresan Analizi
ELISA	Enzime Bağlı İmmünosorbent

ETA	Eksfoliyatif Toksinler A
ETB	Eksfoliyatif Toksinler B
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi
g	Gram
G	Guanin
GMP	İyi Üretim Uygulamaları
GHP	İyi Hijyen Uygulamaları
HACCP	Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları
HCl	Hidroklorik Asit
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
IgG	İmmünglobulin G
INCSS	Uluslararası Stafilokok Süperantijenleri İsimlendirme Komitesi
ISO	Uluslararası Standartlar Organizasyonu
kb	Kilobaz
KCl	Potasyum Klorür
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
kob	Koloni Oluşturan Birim
L	Litre
LAB	Laktik Asit Bakterileri
log	Logaritma
M	Molar
MALDI	Matris Destekli Lazer Desorpsiyonu/İyonizasyonu
mg	Miligram
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
MHC II	Majör Doku Uyumluluk Sınıfı
MIC	Minimal İnhibitör Konsantrasyon
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
MSA	Mannitol Salt Agar

mm	Milimetre
mM	Milimolar
MS	Kütle Spektrometresi
mV	Milivolt
N	Normal
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
nm	Nanometre
OD	Optik Dansite
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	Potansiyel Hidrojen (Power of Hdyrogen)
PVL	Panton-Valentine Lökositidin
QS	Çekirdek Algılama
Real-Time PCR	Gerçek Zamanlı Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribo Nükleik Asit
Rot	Toksin Baskılayıcı
RPLA	Ters Pasif Lateks Aglütinasyon
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı (Revolutions Per Minute)
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asid
σ	Sigma
SAg	Stafilokokal Süperantijen
SaPI	<i>Staphylococcus aureus</i> Patojenite Adası
SrrAB	Staphylococcal Respiratory Response AB
SE	Stafilokokal Enterotoksin
<i>sea</i>	Stafilokokal Enterotoksin A
<i>seb</i>	Stafilokokal Enterotoksin B
<i>sec</i>	Stafilokokal Enterotoksin C
<i>sed</i>	Stafilokokal Enterotoksin D
<i>see</i>	Stafilokokal Enterotoksin E
<i>SEI</i>	Stafilokokal Enterotoksin Benzeri (Staphylococcal Enterotoxin-like)
SFP	Stafilokokal Gıda Zehirlenmesi
sn	Saniye

TAE	Tris Asetik EDTA
TCR	T Hücresi Reseptörü
TOF	Uçuş süresi (Time-of-flight)
TSS	Toksik Şok Sendromu
TSST-1	Toksik Şok Sendromu Toksin-1
U	Unit
UV	Ultra Viyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
Zn ⁺²	Çinko



ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Fermente Sucuk Üretiminde Farklı Tuz Oranlarının *Staphylococcus aureus*'un Enterotoksin Üretme Yeteneği Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Gamze TURKAL

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2024

Bu çalışma, Türkiye’de en fazla üretimi yapılan et ürünlerinden biri olan fermente sucukta, farklı oranlardaki (%1, %1,5, %2, %2,5) tuz uygulamasının *S. aureus*’un enterotoksin üretme yeteneği üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapıldı. Deneysel olarak üretimi gerçekleştirilen sucuk numunelerine enterotoksin üretme yeteneğine sahip oldukları bilinen enterotoksijenik suşlar inoküle edildi. Sucuk numunelerinin kimyasal analizleri yapıldı. Kültürel ve moleküler yöntemlerle identifikasyonu doğrulandı. Enterotoksin üretme yeteneğinin belirlenmesinde ELISA, enterotoksin genlerinin tespiti amacıyla klasik PCR ve multipleks PCR kullanıldı.

Analiz sonuçlarına göre sucuk numunelerinin rutubet, a_w ve pH değerleri sırasıyla %38,80-61,48; 0,883-0,901; 5,41-6,33 arasında tespit edildi. En düşük pH değerlerine 14. günde, en yüksek pH değerlerine 21. günde ulaşıldığı gözlemlendi ($p<0,05$). Tuz oranlarına göre üretim gruplarında *S. aureus* sayım sonuçları 0. gün 4,59-6,52 log kob/g; 7. gün 6,41-8,92 log kob/g; 14. gün 7,23-8,91 log kob/g ve 21. gün 6,13-8,82 log kob/g olarak belirlendi. Tüm gruplarda bakteri sayılarının 7. günde (fermantasyon sonrası) en yüksek seviyelere ulaştığı tespit edildi ($p<0,05$). Sucuk numunelerinde *S. aureus* sayılarında gözlemlenen logaritmik artışa rağmen herhangi bir toksin üretimi belirlenemedi. Bu durum enterotoksin üretimi için gerekli çevresel koşulların oluşmaması, rekabetçi mikrofloranın varlığı, suşların enterotoksijenik olmasına karşın gıda matrisinde ekspresyona bağlı üretimin söz konusu olmaması, sucuktaki fermentasyon koşullarının enterotoksin üretimi için gerekli ortamı sağlamaması ile açıklanabilmektedir.

Sonuç olarak sucuk numunelerinde belirlenen yüksek bakteri sayıları halk sağlığı açısından potansiyel risk oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra enterotoksin üretiminin gerçekleşmemesi fermente sucuğun güvenilirliği açısından önem kazanmaktadır. Gıda intoksikasyonuna neden olan enterotoksijenik *S. aureus*’un varlığı, gıda üretim ve tüketim zincirindeki hijyen kurallarının özenle uygulanması gerekliliğini göstermektedir. Sucuk üretiminde yeterli hijyenin sağlanmasının yanı sıra HACCP, GMP gibi uygulamaların da dikkate alınması gerekmektedir.

Anahtar Sözcükler: Enterotoksin; fermente sucuk; *Staphylococcus aureus*; tuz

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY

SELCUK UNIVERSITY

HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Determination of the Effect of Different Salt Ratios on the Ability of *Staphylococcus aureus* to Produce Enterotoxin in Fermented Sausage Production

Gamze TURKAL

Department of Food Hygiene and Technology

PhD THESIS / KONYA-2024

This study was carried out to determine the effect of salt application at different rates (1%, 1,5%, 2%, 2,5%) on the ability of *S. aureus* to produce enterotoxin in fermented sausage, one of the most produced meat products in Turkey. Enterotoxigenic strains known to have the ability to produce enterotoxins were inoculated into experimentally produced sausage samples. Chemical analyzes of sausage samples were performed. Its identification was confirmed by cultural and molecular methods. ELISA was used to determine the ability to produce enterotoxin, and classical PCR and multiplex PCR were used to detect enterotoxin genes.

According to the analysis results, the moisture, a_w and pH values of the sausage samples were 38,80-61,48%; 0,883-0,901; 5,41-6,33, respectively. In production groups, *S. aureus* count was detected between 4,59-6,52 log cfu/g on day 0; 6,41-8,92 log cfu/g on day 7; 7,23-8,91 log cfu/g on day 14 and 6,13-8,82 log cfu/g on day 21. It was determined that bacterial counts reached the highest levels on the 7th day (after fermentation) in all groups ($p<0,05$). Despite the logarithmic increase observed in *S. aureus* numbers in sausage samples, no toxin production could be detected. This situation can explained by the lack of enviromental conditions required for enterotoxin production, the presence of competitive microflora, the fact of although the strains are enterotoxigenic, there is no expression-dependent production in the food matrix, and the fermentaton conditions in sausage do not provide the neccessary enviroment for enterotoxin production.

As a result, the high bacterial counts detected in sausage samples pose a potential risk to public health. In addition, the absence of enterotoxin production is important for the safety of fermented sausage. There existence of enterotoxigenic *S. aureus*, which causes food intoxication, shows the neccessity of careful implementation of hygiene rules in the food production and ensuring adequate hygiene in sausage production and consumption chain. In addition to ensuring adequate hygiene in sausage production, practices such as HACCP and GMP must also br takein into account.

Key Words: Enterotoxin; fermented sausage; *Staphylococcus aureus*; salt

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızla artışıyla birlikte bireylerin yeterli ve dengeli beslenmesi, ülkelerin toplumsal bir problemi olarak ortaya çıkmaktadır. Yeterli ve dengeli beslenme, bir ülkenin sosyoekonomik olarak gelişmişliğini göstermesi bakımından önemli bir kriter olup yeterli miktarda protein tüketimiyle ilişkilendirilmektedir. Bir insanın günlük protein ihtiyacı 65-70 g olup bunun yarısının hayvansal proteinlerle karşılanması gerekmektedir. Canlının gelişimi için gerekli olan temel amino asitler, biyolojik değeri yüksek proteinlerde yeterli ve dengeli bir şekilde bulunmaktadır. Bu bakımdan et, içerisinde biyolojik değeri yüksek proteinler, vitaminler ve bazı mineraller yönünden zengin, lezzetli, doyurucu ve üretimi nispeten kolay bir gıdadır. Taze olarak tüketilebildiği gibi çeşitli et ürünlerine işlenerek de değerlendirilmektedir.

Temel besin gruplarından olan et ve et ürünleri birçok faktöre bağlı olarak insan sağlığına yönelik tehlikelerin potansiyel kaynağı olabilmektedir (Dixon ve ark 2024). Et ürünlerinde bulunabilecek tehlikeler fiziksel, kimyasal ve biyolojik tehlikeler olarak sınıflandırılmaktadır. Bunlar içerisinde ciddi gıda güvenliği sorunlarına yol açan ve tüketici sağlığını tehdit eden tehlikeler biyolojik nitelikte olanlardır. Et ve et ürünlerinin mikrobiyolojik kalitesi hayvansal gıda üretimi, ürün işleme ve dağıtımı, tüketime hazırlanması sırasındaki kontaminasyonlardan etkilenmektedir. Et ürünlerinde mikrobiyal kontrol; tehlikeleri önleyen, ortadan kaldıran veya kabul edilebilir bir seviyeye getiren önlemlerin uygulanmasıyla gerçekleşmektedir (CAC 2020). Et ve et ürünlerinde üreticilerden tüketicilere, tedarik zincirinin her aşamasında bütüncül bir önleme yöntemi uygulanmalıdır. Bu yaklaşım, işleyicilerden perakendecilere ve gıda hizmetlerine kadar olan herkesi kapsamaktadır (Das ve ark 2019, Dixon ve ark 2024).

Başta et ve et ürünleri olmak üzere birçok gıda özellikle mikrobiyal gelişim nedeniyle kısa zamanda bozulabilmektedir. Farklı muhafaza yöntemleri ve katkı maddelerinin kullanımı bu durumu önlemek amacıyla tercih edilmiştir. Bunlar içerisinde öncül olanlar tuzun kullanıldığı yöntemlerdir.

Dünyanın dört bir yanında insanlar fizyolojik gereksinimleri aşan yüksek miktarlarda tuz tüketmektedir (Webster ve ark 2011). Değişen yaşam tarzları, beslenme şekilleri ve gıda işleme yöntemlerindeki gelişmeler, tuz tüketiminin

artmasındaki başlıca faktörlerdir. Tuz tüketimi ve yüksek tansiyon arasındaki ilişki göz önüne alındığında, diyetle tuz alımı önemli bir halk sağlığı sorunu olarak ortaya çıkmaktadır. Bu anlamda tuz alımının sınırlandırılmasının önemi de her geçen gün artmaktadır. Tuza tolerans gösteren bakteriler arasında intoksikasyona neden olup halk sağlığını tehdit eden, sucuk ve diğer fermente et ürünlerinde en önemli patojen olarak ifade edilen *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)’tur (Kang ve Fung 2000, Attien ve ark 2014).

Bu çalışmada, Türklere özgü geleneksel bir et ürünü olan fermente Türk tipi sucukta tuzun farklı oranlarda azaltılarak *S. aureus*’un enterotoksin üretimine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



1.1. Et ve Et Ürünleri

Soğutma ve dondurma gibi fiziksel temel işlemler uygulanarak dayanıklılığı arttırılmış taze etler dışında bir veya birden fazla teknolojik işlemle geçirilerek yeni tat-koku, yapı, renk ve dış görünüş kazandırılmış, dayanıklılığı arttırılmış ürünlere “et ürünü” adı verilmektedir. Aynı zamanda tuzlama ve kürlleme, parçalama, emülsifikasyon, dumanlama, pişirme ya da fermentasyon işlemlerinden bir veya birkaçının ete uygulanması sonucu elde edilen taze etten farklı niteliklere sahip ürünler de “et ürünü” olarak tanımlanmaktadır (Tekinşen ve ark 2000, Anar 2010). Türk Gıda Kodeksi Et, Hazırlanmış Et Karışımları ve Et Ürünleri Tebliği’nde et ürünlerinin tanımı “etin işlenmesinden veya işlenmiş ürünlerin daha ileri düzeyde işlenmesiyle elde edilen ve kesit yüzeyi çiğ etin karakteristik özelliklerini göstermeyen ürünler” olarak ifade edilmektedir (TGK 2019).

Et ve et ürünleri önemli bir besin kaynağıdır. Açlık hissini gidermesi, iştah açıcı özelliğinin bulunması, yüksek protein içeriği, tüm temel amino asitlere yeterli ve dengeli düzeyde sahip olması, mineraller (özellikle demir ve çinko) ve B vitaminlerinin varlığı etin beslenme açısından önemli bir gıda olmasını sağlamaktadır (Gürbüz 2023, Munekata ve ark 2023). Et ürünleri genellikle kullanılan et parçalarının boyutlarına göre iki ana kategoride sınıflandırılmaktadır. Birinci grupta, jambon gibi büyük parça etlerden yapılan ve birinci kalite etlerin kullanıldığı ürünler bulunurken ikinci grupta ise çok küçük parçalara ayrılmış veya emülsifiye edilmiş, ikinci kalite etlerin kullanıldığı sucuk, sosis ve salam gibi ürünler yer almaktadır (Ockerman ve Basu 2015, 2017). Et ürünlerinin diğer bir sınıflandırma şekli ise işlenmeleri sırasında gerçekleştirilen ısı uygulamasına göre, ısıl işlem görmeyen (örn., fermente sucuk, pastırma), belirli ölçüde ısıl işlemi gören (örn., salam, sosis) ve tamamen pişmiş et ürünleri (örn., kavurma, et konserve) şeklindedir (Tekinşen ve ark 2000).

Fermente et ürünleri, tarihsel olarak etin muhafaza edilme süreciyle ilişkilendirilmektedir (Fraqueza ve Patarata 2020). Bu anlamda da Türkiye’de fermente et ürünleri denilince ilk akla gelen geleneksel Türk tipi fermente sucuktur (Konuray ve Erginkaya 2020). Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliği’nde fermente sucuk “büyükbaş ve küçükbaş hayvan etlerinin ve yağlarının kıyılarak lezzet vericiler ile karıştırıldıktan sonra doğal veya yapay kılıflara doldurularak belirli koşullarda fermentasyon ve kurutma işlemleri uygulanarak nem oranı %40 ve altına

düşürülmüş, kesit yüzeyi mozaik görünümünde olan ısıt işlem uygulanmamış fermente et ürünü” olarak tanımlanmaktadır (TGK 2012). Sucuklar, kuru kürlenmiş/fermente edilmiş ve ısıt işlem görmüş olarak sınıflandırılmaktadır (TGK 2012, Munekata 2023). Her bir kategori bileşimsel, fizikokimyasal ve duyuşal özelliklerdeki farklılıklar ile formülasyon ve işleme koşulları açısından değışiklik göstermektedir (Munekata ve ark 2023).

1.2. Fermente Sucuk

Türkiye’de en çok üretimi gerçekleştirilen et ürünü olan sucuk, çok eski çağlardan beri Anadolu’nun çeşitli bölgelerinde yapılan en popüler yarı kuru fermente bir et ürünüdür (Ercoşkun ve Özkal 2011). Sucuk, doğal fermentasyon yoluyla üretilmekte, pişirilerek veya pişirilmeden tüketilmektedir (Şanlıbaba ve Tezel 2023).

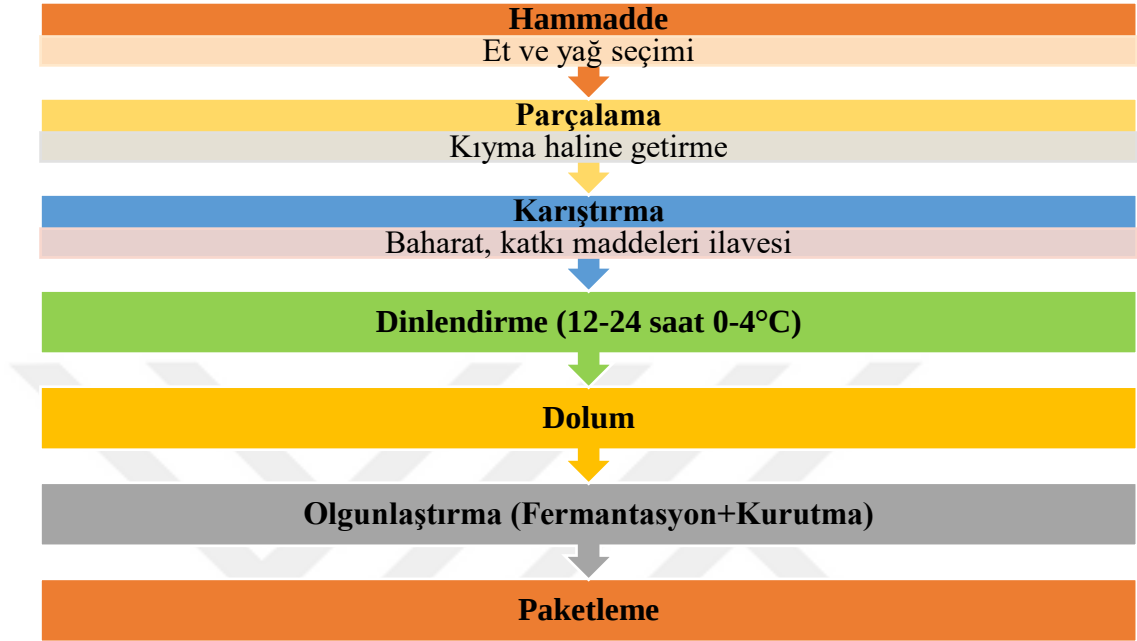
Sucuk üretimi geleneksel ve endüstriyel ölçekte gerçekleştirilmektedir. Geleneksel ölçekte sucuk üretiminde genellikle sığır ve manda etleri ile hayvansal yağlar kullanılmaktadır. Bunlara, çeşitli katkı maddeleri ve baharatlar eklenerek elde edilen sucuk hamuru, doğal bağırsaklara doldurularak sonrasında tercihen sonbahar mevsiminde 15-20 gün süre ile açık havada fermentasyona tabi tutulmaktadır (Kaban ve Bayrak 2015, Pehlivanoğlu ve ark 2015). Geleneksel üretimde ürünlere genellikle starter kültür ilavesi yapılmamakta, fermentasyon doğal mikrobiyotaya dayanmaktadır (Leroy ve ark 2015).

Endüstriyel üretimde hammadde olarak sıklıkla sığır eti kullanılmaktadır (Kaban ve ark 2022). Geleneksel üretimden farklı olarak nitrat ve/veya nitrit gibi katkı maddeleri ve starter kültürler kullanılabilmekte, doğal kılıfların dışında sentetik kılıflara da dolum yapılmakta, iklimlendirme odalarında fermentasyon ve kurumaya bırakılmaktadır (Bilge 2010). Doğal fermentasyon yoluyla üretilen ve ısıt işlem görmeyen sucuk, içerdığı yüksek kaliteli protein, B grubu vitaminleri, mineraller, iz elementler ve diğer biyoaktif bileşikler nedeniyle önem arz etmektedir (Şanlıbaba ve Tezel 2023). Ayrıca günümüzde doğal fermentasyon uygulamaları ısıt işlem ile kombine edilerek üretim yapılmaktadır.

1.2.1. Fermente Sucuk Üretim Teknolojisi

Fermente sucuk üretim teknolojisi, et ve hayvansal yağ kıyma haline getirildikten sonra tuz, şeker, sarımsak, çeşitli baharatlar ve katkı maddeleri eklenerek

oluşturulan hamurun doğal veya yapay kılıflara doldurulması, belirli sıcaklık ve bağıl nem koşullarında fermente edilmesi ve olgunlaştırılması/kurutulması aşamalarını içermektedir (Stajić ve ark 2013, Sucu ve Turp 2018, Armutcu ve ark 2020). Fermente sucuk üretim akış şeması Şekil 1.1.'de özetlenmektedir.



Şekil 1.1. Fermente sucuk üretim akış şeması (Tekinşen ve Doğruer 2000).

1.2.2. Hammadde

Hammadde olarak sucuk üretiminde et ve yağ kullanılmaktadır (Tekinşen ve Doğruer 2000). Uygun hammadde seçimi, ürün kalitesi üzerinde en etkili faktörlerden biridir (Fraqueza ve Patarata 2020). Sucuk üretiminde rigor mortis aşamasını tamamlamış, orta yaşlı kesim hayvanlarından elde edilen etler kullanılmaktadır. Sucuk haline getirilecek etin fazla yağı alındıktan sonra kaba bağ dokuları mümkün olduğunca ayrıştırılmakta ve pH değeri yüksek olan etler hammadde olarak kullanılmamaktadır (Kaban ve ark 2022). Bu anlamda kullanılacak olan etin pH değeri 5,4-5,8 arasında olmalıdır (Soncu 2019).

Yağ, sucuğun önemli bir bileşenidir. Kullanılan yağ türü, sucukta lezzet gelişimi, tekstür ve genel kabul edilebilirlik üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Üretimde yağ olarak genellikle sığır yağı ve/veya koyun kuyruk yağı formülasyona dahil edilmektedir. Hamurun yağ oranı da %20 olarak ayarlanmaktadır (Kaban ve ark 2022). Fermente sucuk üretiminde uzun süre depo edilmiş ve yumuşak kıvamdaki

yağlar kullanılmamalıdır (Tayar ve Yıldırım 2020). Yumuşak yağlar, teknolojik olarak işleme sırasında problemlere sebep olur. Ayrıca ihtiva ettikleri doymamış yağ asitleri içeriğinin yüksek olmasından dolayı oksidatif reaksiyonlara daha duyarlıdır (Özer ve Topçu 2020).

1.2.3. Katkı Maddeleri

Gıdalara üretim aşamalarında duyuşal özelliklerinin iyileştirilmesi, besleyici değeriinin korunması ve raf ömrünün uzatılması gibi amaçlarla bilinçli olarak ilave edilen maddeler “gıda katkı maddeleri” olarak adlandırılmaktadır (Biçer ve Uçar 2016, Telli 2016). Sucukta kullanılan başlıca katkı maddeleri; nitrat/nitrit, şeker, askorbik asit/askorbat, baharat ve tuzdur.

Nitrat/Nitrit

Nitrat pasif bir kürlleme ajanı olup uzun olgunlaşma sürecine sahip olan et ürünlerinde kullanılmaktadır (Sindelar ve Milkowski 2011, Terns ve ark 2011). Bu yüzden et ürünlerinde kürlleme reaksiyonlarının gerçekleşebilmesi için nitratin daha aktif formda olan nitrite indirgenmesi gerekmektedir. Bu indirgeme işlemi etin doğal florası tarafından veya nitrat redüktaz aktivitesi içeren bakterilerin ilavesi ile gerçekleşebilmektedir (Turkal ve Doğruer 2020).

Nitrit et ürünleri üretiminde kullanılan en önemli katkı maddesidir (Fraqueza ve Patarata 2020). Nitritin sodyum veya potasyum tuzları, başta *Clostridium botulinum* olmak üzere spor oluşturan mikroorganizmaların gelişimini engellemek, renk ve lezzeti stabilize etmek amacıyla kullanılmaktadır (Leroy ve ark 2024, Mills 2024). Aynı zamanda bir antioksidan görevi gören nitrit, oksidatif ürünlerin oluşumunu da engellemektedir (Turkal ve Doğruer 2020).

Uygulanan fermentasyon koşullarına göre sucukta kürlleme maddesi olarak nitrat ve/veya nitrit kullanılmaktadır (Kaban ve ark 2022). Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği’nde yapılan değişiklikle nitrit kullanım oranı azaltılarak 150 mg/kg ile sınırlandırılmıştır. Sucuk üretiminde nitratin kullanım oranı da 150 mg/kg’dır (TGK 2023). Ancak günümüzde kürlleme maddesi olarak nitrit tercih edilmektedir (Kaban ve ark 2022).

Şeker

Fermente sucuk üretiminde karbonhidrat kaynağı olarak değişen miktarlarda (%0,4-1) sakkaroz kullanılmaktadır. Glikoz kullanımı ise endüstriyel üretimde tercih edilmektedir (Kaban ve ark 2022). Glikoz gibi şekerler, tüm laktik asit bakterileri (LAB) tarafından kolaylıkla kullanılabilen fermantasyon substratıdır. Kullanılan şeker miktarı ve türü, sucukta asitleşme derecesinin kontrolü açısından önemlidir. Aynı zamanda tat, tekstür ve ürün verim özelliklerine de katkıda bulunmaktadır (Ockerman ve Basu 2017).

Askorbik asit/Askorbat

Sodyum askorbat veya askorbik asit, rengin iyileştirilmesi, stabilitesi ve oksidasyonun geciktirilmesi için kullanılmaktadır (Ockerman ve Basu 2017). Geleneksel üretimde kullanılmamasına rağmen endüstriyel üretimde kür rengini ve aromasını iyileştirmek için genellikle nitritle birlikte formülasyona (300-500 mg/kg) dahil edilmektedir (Kaban ve ark 2022).

Baharat

Baharat, öncelikle gıdalarda lezzetin iyileştirilmesi ve değiştirilmesi için kullanılan genel bir terim olup ürün rengine de fayda sağlamaktadır. Lezzet ve aroma katkılarının yanı sıra bazı baharatlar su bağlayıcı veya emülsifiye edici özellikleri nedeniyle tercih edilmektedir (Mills 2024). Fermente et ürünlerinin üretiminde kırmızı biber, karabiber, kimyon, yenibahar gibi çeşitli baharatlar kullanılmaktadır (Tekinşen ve Doğruer 2000). Aromanın gelişmesine yönelik baharatlar arasında sarımsak, biber, defne yaprağı, karanfil bulunabilmektedir (Fraqueza ve Patarata 2020).

Tuz

Tuz, işlenmiş et ürünlerinde en yaygın kullanılan bileşenlerden biri olup sucuk hamuruna %2-2,5 oranında ilave edilmektedir. Çok eski çağlardan günümüze kadar geleneksel olarak gıdaların muhafazası ve etlerin raf ömrünün uzatılması amacıyla kullanılmaktadır (Sebranek 2009, Pegg ve Honikel 2015). Günümüzde de modern et endüstrisinde tuz, aroma verici ve lezzet arttırıcı olarak kullanılmakta, işlenmiş etlerde ürüne özgü tekstürel özelliklerin kazandırılmasında rol oynamaktadır (Desmond ve Vasilopoulos 2019).

1.3. Tuz ve Tuz Azaltma Stratejileri

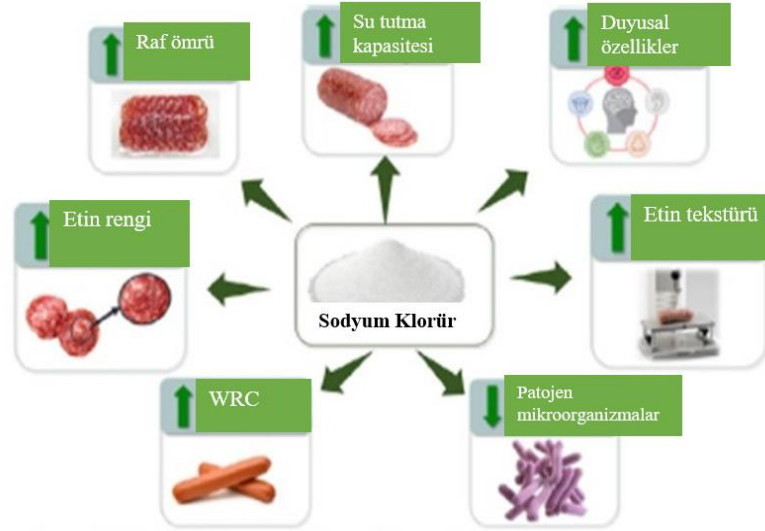
1.3.1. Tuzun Özellikleri

Gıdalara lezzet verici ve raf ömrünü uzatma gibi amaçlarla ilave edilen tuz, doğada tuzlu yüzey suları, kaya tuzları ve yer altındaki tuz kaynaklarından temin edilmektedir (Anar 2010). Kullanılacak tuzun mikrobiyolojik kalitesi ile saflık derecesi çok önemlidir. Tuz, Ca, Cu, Mg, Fe, Mo, S gibi metal ve tuzları bakımından temiz olmalıdır. Bu mineraller üründe renk değişimi ve otooksidasyon gibi çeşitli kimyasal bozulmalara neden olabilmektedir. Kürlemede iyotlu tuzlar kullanılmamalıdır. Çünkü iyot ile nitrat kompleks oluşturarak nitratin nitrite indirgenmesini engellemektedir. Güneş tuzu olarak da adlandırılan göl veya deniz tuzu, yüksek oranda halofilik mikroorganizma içermektedir. Bu nedenle bu tuzlar, rafine edildikten sonra kullanılmalıdır. Ayrıca et ürünleri üretiminde kaya tuzu da tercih edilebilmektedir (Tekinşen ve Doğruer 2000, Arslan 2020, Tayar ve Yıldırım 2020). Tuz tek başına ya da diğer katkı maddeleri ile kullanılabilir (Anar 2010).

1.3.2. Tuzun Etki Mekanizması

Tuzun genel olarak etki mekanizması belirli faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Tuzun koruyucu etkisinin prensibi ortamın ozmotik basıncını arttırmasından kaynaklanmaktadır (Kameník 2017). Klor iyonlarının etkisi ile bakteri hücreleri CO₂'e hassas duruma gelmektedir. Rutubette bulunan ve eriyebilen O₂'i azaltmakta, proteolitik enzimlerin aktivitesine de engel olmaktadır (Anar 2010).

Tuz kısmi bakteriyostatik aktiviteye sahip olup formülasyondaki yağ içeriğine bağlı olarak sucuk hamurunun su aktivitesini (activity of water, a_w) azaltmaktadır. Böylece bazı istenilmeyen veya patojenik mikroorganizmaların gelişimini sınırlamakta veya engellemektedir. Aynı zamanda tuz, protein çözünürlüğünü arttırarak ürüne tipik bir tat vermektedir (Medić 2017, Kaban ve ark 2022). Tuz ilavesi teknolojik avantajlarının (miyofibriler proteinlerin parçalanması ve etin su bağlama kapasitesine etkisi) dışında, fermente sucuk üretiminde raf ömrü ve ürün güvenliği açısından da önemlidir (Kameník 2017). Et ürünlerinde kullanılan tuzun temel etkileri Şekil 1.2.'de belirtilmektedir.



Şekil 1.2. Et ürünlerinde kullanılan tuzun temel etkileri (dos Santos ve ark 2023).

Mikrobiyal stabilite üzerindeki etkisi

Gıda muhafazasına yönelik geleneksel teknikler mikrobiyal stabilite üzerine etki göstermektedir. Bu etki sıcaklık, a_w , pH, redoks potansiyeli (Eh) ve koruyucular gibi faktörler aracılığıyla mikrobiyal gelişimin sınırlanması ve/veya önlenmesi şeklinde gerçekleşmektedir (Leistner 2000).

Fermente etlerdeki tuz, mikrobiyal stabilite ile ilgili önemli bir faktördür (Desmond 2006). Çiğ etin a_w değeri 0,99'dur. Bu değer, mikroorganizmaların üremesi için oldukça elverişli bir ortam sağlamaktadır (Simpson ve Sofos 2009). Tuz, fermente etlerin a_w değerini düşürerek mikrobiyal stabilitelerine katkıda bulunmaktadır (Samapundo ve ark 2010).

Et teknolojisi açısından bakıldığında, tuzun mikrobiyal stabilite üzerindeki etkisi ve muhafaza özelliklerinden faydalanmak için ürünün su fazındaki tuz içeriğinin hesaplanması gerekmektedir. Su fazındaki NaCl'nin toplam konsantrasyonu mikrobiyal gelişim için engelleyici bir faktör olarak belirtilmektedir (Desmond ve Vasilopoulos 2019). Yağsız bir et ürünü ile yağ değeri %24'ten fazla olan et ürünlerinde (örn., Frankfurter) farklı su fazındaki tuz konsantrasyonlarının inhibisyon etkileri de değişiklik göstermektedir. Gram negatif bakteriler, Gram pozitif bakterilere kıyasla tuza daha duyarlıdır (Cebrián ve ark 2014). Dolayısıyla bu durum özellikle tuza daha fazla tolerans gösteren bakterilerin starter kültür olarak seçiminde önemlidir

ve LAB tarafından indüklenen asitlenmeden etkilenmektedir (Blesa ve ark 2008). Günümüzde et ürünlerinde NaCl düzeyinin başka bir koruyucu önlem alınmadan azaltılması ürünün raf ömrünün kısılmasına sebep olarak olumsuz etki göstermektedir. Bu durumun önüne geçmek için NaCl seviyelerinin azaltıldığı ürünlerde mikrobiyal stabilitenin sağlanması için laktat ve asetat tuzları kullanılmaktadır (Desmond ve Vasilopoulos 2019).

Su tutma kapasitesi üzerine etkisi

Etin bünyesinde bulunan suyu kesme, parçalama, kıyma ve basınç gibi çeşitli işlemler sonucunda tutabilme yeteneği “su tutma kapasitesi” olarak tanımlanmaktadır (Gürbüz 2023). Özellikle işleme açısından önemli olan su tutma kapasitesi, etin fire oranının azalmasına yardımcı olarak istenilen duyuşal özelliklerin kazanılmasına da katkıda bulunmaktadır (Tayar ve Yıldırım 2020).

Tuz, etin su tutma kapasitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Aslında tuz kullanımının ana nedenlerinden biri et ürünlerinin su tutma kapasitesi ile proses verimini arttırmak ve tuzlu bir lezzetin kazandırılmasını sağlamaktır. Bu etkinliğin artırılması için bazı alternatif yollara ihtiyaç duyulmaktadır (Toldrá ve Barat 2015). Bunun en geçerli yolu ürünün pH’sının etin izoelektrik noktasından uzak değerlere doğru değiştirilmesi ile söz konusu olmaktadır. Çünkü izoelektrik noktasına yakın değerlerde et minimum su tutma kapasitesine sahiptir (Puolanne ve ark 2001, Hultin ve ark 2010, Toldrá ve Barat 2015). Ürünün pH’sının izoelektrik noktadan uzak değerlere doğru değiştirilmesi işlemi, laktik veya sitrik asit gibi asitlerin ilavesiyle yapılabilmektedir (Medynski ve ark 2000, Sawyer ve ark 2008, Ke ve ark 2009). Diğer bir yol ise farklı tuzlar, fosfatlar, modifiye gıda nişastaları, düşük dekstroz eşdeğeri mısır şurubu katkıları, maltodekstrinler, zamlar (örn., karragenanlar), buğday veya çeşitli unların yanı sıra yenilebilir deniz yosunları, peynir altı suyu veya soya proteini izolatları gibi suyu bağlayabilen maddelerin eklenmesidir (Schilling ve ark 2004, Ruusunen ve ark 2005, Imer 2007, Cofrades ve ark 2008, Wang ve ark 2009). Kullanılan tuzun türüne bağlı olarak su tutma kapasitesinde önemli farklılıkların oluşabileceği de dikkate alınmalıdır (Puolanne ve Halonen 2010). Ayrıca, yüksek basınç teknolojisi gibi fiziksel işlemler de su tutma kapasitesinin artırılmasına katkıda bulunmaktadır (Crehan ve ark 2000, Sikes ve ark 2009).

Protein çözünürlüğü ve tekstür üzerindeki etkisi

Protein, ette kuru madde içeriğinin en önemli kısmını oluşturmaktadır. Beslenmede büyük öneme sahip olan proteinler, kaslarda fizyokimyasal reaksiyonların gerçekleşmesinde büyük bir rol üstlenmektedir. Kas proteinleri sarkoplazmik, miyofibriller ve bağ doku proteinleri olmak üzere üç ana gruptan oluşmaktadır. Canlı yaşamda kas kontraksiyonlarında görev alan miyofibriller proteinler, kesim sonrasında da rigor mortisin oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Tayar ve Yıldırım 2020, Gürbüz 2023). Miyofibriller et proteinleri, tuzun su fazında çözünmesine etki ederek et hamurunun viskozitesini arttırmaktadır (Desmond 2006, Toldrá ve Barat 2015). Bu durum düşük NaCl konsantrasyonunda artan kas katepsin sistemiyle ilgili olup yumuşak jambon oluşumuna neden olmaktadır (Toldrá 2006, 2007). Tuz proteinlerin yapısında kısmen helikslerin açılmasına, proteinlerin daha fazla suyu bağlamasına neden olarak etin su tutma kapasitesini ve proteinlerin çözünürlüklerini arttırmaktadır (Arslan 2020).

Sodyum klorür yerine kalsiyum, magnezyum veya potasyum klorür gibi diğer tuzlar kullanıldığında protein ekstraksiyonu ve çözünürlüğü ile emülsiyon stabilitesinin arttığı bildirilmiştir (Nayak ve ark 1998a, Nayak ve ark 1998b, Piggot ve ark 2000).

Lezzet üzerindeki etkisi

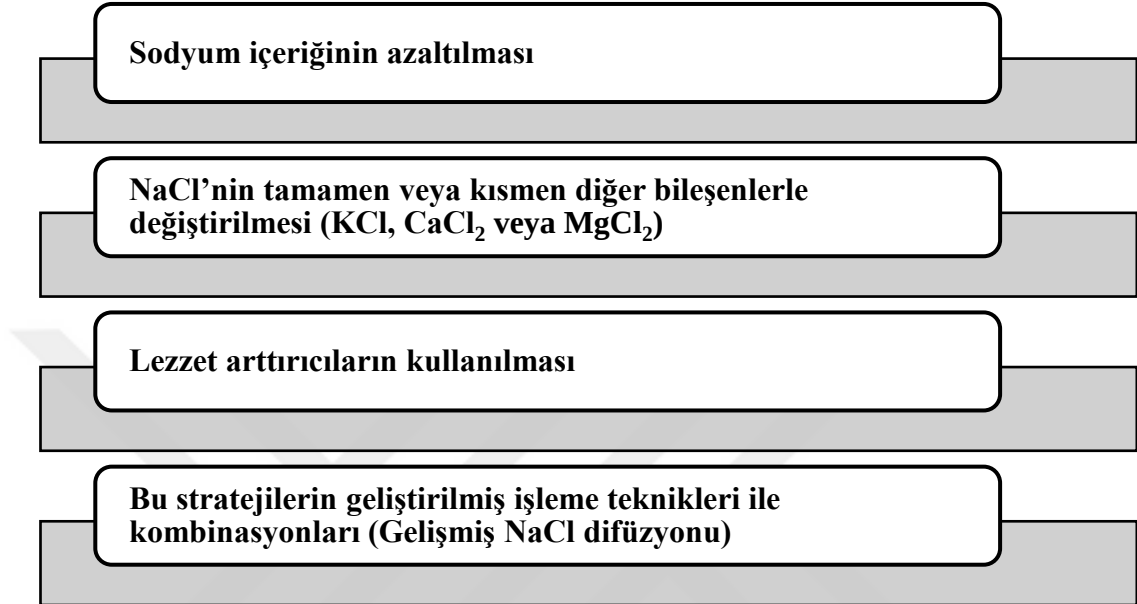
Tuz, fermente ve kürlenmiş et ürünlerinde lezzet verici bir etkiye sahiptir. En belirgin etki, temelde Na⁺ katyonuna bağlı olarak algılanan tuzluluktur (Ruusunen ve Puolanne 2005). Ürünün kimyasal bileşimi tuzluluğun algılanmasında önemli bir etkiye sahiptir. Yüksek yağ içeriğine sahip et ürünlerinde tuzluluk daha fazla algılanırken yüksek protein içeriğine sahip ürünlerde daha az algılandığı ifade edilmektedir (Matulis ve ark 1995, Ruusunen ve ark 2005).

Enzim aktivitesine etkisi

Tuzun farklı enzimler için inhibitör etki göstererek kas enzim aktivitesini (özellikle katepsinler, dipeptidilpeptidazlar ve aminopeptidazlar gibi kas peptidazlarının aktivitesi) kontrol ettiği belirtilmiştir. Bu inhibitör etkiler fermentasyon, olgunlaşma ve kurutma sırasında meydana gelen proteoliz olaylarını kontrol etmektedir (Toldrá ve Barat 2015).

1.3.3. Tuz Azaltma Stratejileri

Tuz, et ürünlerinde kullanılan çok fonksiyonlu temel bir bileşendir (dos Santos ve ark 2023). Et endüstrisinde et ürünlerindeki sodyumu azaltmak için kullanılan bir dizi yaklaşım bulunmaktadır. Bunlar Şekil 1.3.'de özetlenmektedir.



Şekil 1.3. Et ürünlerindeki sodyumu azaltmak için kullanılan yaklaşımlar (Desmond ve Vasilopoulos 2019).

NaCl'nin diğer bileşenlerle değiştirilmesi oranına bağlı olarak acılık ve metalik tat gibi istenilmeyen duysal etkiler ortaya çıkarabilmektedir. Bu da yapılan çalışmalarda her bir tuz için doğru oranların belirlenmesi gerektiği anlamına gelmektedir (Bou ve ark 2017). Inguglia ve ark (2017), NaCl'nin azaltılmasının ürün lezzetini olumsuz etkilediğini ve bu nedenle kademeli olarak azaltma ihtiyacı gerektirdiğini belirtmiştir.

Gıdalarda tuzun azaltılmasına yönelik en basit strateji, eklenen tuz miktarının doğrudan azaltılmasıdır (Samapundo ve ark 2010). Formüle edilmiş ürünlerde bu azaltma, karışımındaki tuz miktarının azaltılmasıyla (Aaslyng ve ark 2014), tuzun kasın içine nüfuz ettiği et ürünlerinde ise tuzlama süresinin azaltılmasıyla veya enjeksiyon uygulanan ürünlerde salamuradaki tuz miktarının azaltılmasıyla gerçekleştirilmektedir (Aliño ve ark 2009). Örneğin, İspanyol kuru kürlenmiş jambonda elde edilebilecek maksimum tuz azaltımı, yumuşak tekstürlü ürün oluşumuna ve artan mikrobiyal

gelişim riskine yol açan aşırı enzimatik aktiviteye sebep olmaktadır (Ventanas ve ark 2007, Barat ve Toldrá 2012).

1.3.4. Tuz Azaltımının Kalite ve Gıda Güvenliği Üzerindeki Etkileri

Fiziksel özelliklere etkisi

Tuz, et ürünlerinin tekstür, su tutma kapasitesi ve renk gibi özelliklerini etkilemektedir (Ruusunen ve ark 2005, Desmond 2006, Puolanne ve Halonen 2010). Bu nedenle, tuzun tür ve miktarındaki değişiklikler fiziksel özelliklere etki edebilmektedir. Tuz miktarının azalması, proteolitik enzim aktivitesinde artışa sebep olmaktadır. Proteolitik enzim aktivitesindeki artış, etin tekstürü üzerinde aşırı yumuşamaya sebep olarak tüketicinin beğeni düzeyini olumsuz yönde etkilemektedir (Morales ve ark 2007, Barat ve Toldrá 2012).

Tuz türünün değiştirilmesi de dikkate değer başka bir etki faktörüdür. Tuz türündeki farklılıklar tuzun ete nüfuzunu da etkilemektedir. Bu durum değişik pH değerlerinin oluşmasına neden olabilmektedir. pH değerindeki değişiklikler etin su tutma kapasitesini ve proteinlerin çözünürlüklerini etkilemektedir (Huff-Lonergan ve Lonergan 2005).

Taşıma/difüzyon olayları üzerindeki etkisi

Fermente et ürünlerinde tuz içeriğinin azaltılması, taşıma/difüzyon olayları sırasında meydana gelen şişme basıncının büyüklüğündeki değişikliklerle su tutma kapasitelerini etkileyebilmektedir. Şişme basıncı, tuzlama sırasında kütle taşınımını ve tuzlama işleminin sonuçlarını etkilemektedir (Barat ve ark 2009, Aliño ve ark 2010a). Öte yandan, NaCl ikame maddelerinin kullanımı, tuzlama işleminin kinetiğini etkileyerek işlem değişkenlerinin yeniden tanımlanmasını gerektirebilmektedir. Aliño ve ark (2010b), NaCl ikame maddelerinin kullanımının, tuzlama ortamının pH'sındaki değişikliği etkileyebildiğini bunun yanı sıra etin su tutma kapasitesindeki değişiklikten tuzlama kinetiğinin de etkilenebileceğini gözlemlemiştir. Barat ve ark (2011) yaptıkları çalışmada ise tuzlama ortamındaki değişikliklerle iyonların yayılımının etkilendiğini ifade etmişlerdir. İyonların yük yoğunluğu difüzyonlarını etkilemektedir. Yük yoğunluğu ne kadar yüksek olursa iyonların kas içerisine nüfuz etmesi de o kadar zor olmaktadır (Aliño ve ark 2010c).

Kas enzim aktivitesine etkisi

KCl, MgCl₂ ve CaCl₂ gibi farklı klorür tuzlarının kas peptidazları üzerindeki etkisi, NaCl ile ilişkili olarak incelenmiştir (Armenteros ve ark 2009). NaCl, fermentasyon, olgunlaşma ve kuruma sırasında bir tür proteoliz kontrolü sağlamaktadır. KCl de benzer bir etki göstermektedir. İki değerlikli tuzlar (CaCl₂ ve MgCl₂) ve düşük miktarlarda NaCl ile KCl belirgin bir inhibitör etkiye sahiptir (Armenteros ve ark 2009).

Lezzet algısına etkisi

Tuz içeren et ürünlerinin tuzlu tadı ağırlıklı olarak negatif yüklü Cl⁻ iyonlarından, az miktarda da pozitif yüklü Na⁺ iyonlarından kaynaklanmaktadır (Feiner 2006). Lezzet algısı temel olarak uçucu bileşiklerin konsantrasyonuna, koku eşliğine ve bunların gıda matrisi ile etkileşimlerine bağlıdır (Guichard 2002). Bu, genellikle kuru fermente sucuklar ve kuru kürlenmiş jambon gibi çok çeşitli uçucu bileşiklerin rapor edildiği ürünler için önemlidir (Flores ve Hernández 2007, Toldrá ve Aristoy 2010). Pérez-Juan ve ark (2007) yaptıkları çalışmada, tuz ikame maddelerinin etkisini, su çözeltilerindeki uçucu bileşik konsantrasyonunun analiz edilmesiyle belirlemişlerdir. KCl'de de NaCl'de olduğu gibi benzer tuz giderme etkileri gözlemlenmiş olup MgCl₂ veya CaCl₂ için böyle bir etki söz konusu olmamıştır. Aynı zamanda NaCl ve KCl'nin sarkoplazmik proteinlerin temel uçucu bileşiklere (dallı aldehytler, heksanal ve metiyonal) bağlanma kabiliyetinde önemli bir azalma meydana getirdiği, diğer önemli uçucu bileşikler (oktanal ve metiyonal, 2-pentanon) için ise herhangi bir etki oluşturmadığı rapor edilmiştir. 1.0 iyonik kuvvette MgCl₂ varlığında tamamen salınan dallanmış aldehytler hariç, iki değerlikli MgCl₂ ve CaCl₂ tuzları için çok daha düşük etkiler belirlenmiştir (Pérez-Juan ve ark 2006). Corral ve ark (2013) yaptıkları çalışmada, tuzun %16 oranında azaltıldığında aroma, tat, sululuk ve genel kalitesinin daha düşük kabul edildiğini belirlemişlerdir. Bunun yanı sıra aroma algısını iyileştirmemesine rağmen KCl ile ikame edilmesinin yüksek tuz içeriğine benzer bir kabul sağladığını bildirmişlerdir.

Gıda güvenliğine etkisi

Fermente et ürünlerinin güvenliği açısından eklenen tuzun toplam miktarındaki azalma, ürünün a_w'sinde artışa neden olmaktadır. Dolayısıyla mikrobiyal gelişimin engellenmesinde azalma anlamına da gelmektedir (Toldrá ve Barat 2015). Tuz

seviyelerinin azaltımının gıda güvenliği üzerindeki etkisi, ilgili mikroorganizmaya bağlı olmaktadır (Everis ve Betts 2019). Blesa ve ark (2008), tuzlama sonrası dönemin sonunda kuru kürlenmiş İspanyol jambonunun mikrobiyal yükü üzerinde tuz tipinin etkisini araştırmışlardır. İncelenen tuz karışımları ağırlıkça %55 NaCl, %25 KCl, %15 CaCl₂ ve %5 MgCl₂ içermektedir. Araştırma sonuçları, incelenen gruplar arasında mikrobiyal sayımlarda farklılık olmadığını göstermiştir.

1.4. Sucuk Hamurunun Hazırlanması ve Kılıflara Doldurulması

Sucuk hamurunun hazırlanmasına ilk olarak et ve yağın kıyma makinesinden çekilerek boyutlarının küçültülmesi ile başlanır (Özer ve Topçu 2020). Sucuk hamuru kıyma makinesi veya kuterde hazırlanır. Kıyma makinesi yardımıyla sucuk hamuru hazırlanacaksa etlerden tendo, kıkırdak, fascia, lenf yumruları, damar ve sinirler uzaklaştırılır (Anar 2010). İyi soğutulmuş etler genellikle 3-4 mm çaplı kıyma makinesinin aynasından; yağ ise etin çekildiği aynadan daha büyük bir aynadan (4 mm) çekilir. Daha sonra bu hamur üzerine çekilmiş sarımsak, baharat, tuz ve diğer katkı maddeleri ilave edilerek karıştırma makinesinde homojen bir şekilde karıştırılır (Arslan 2020, Özer ve Topçu 2020). Bu karışım soğuk depoya (2-4°C) alınarak 12-24 saat bekletilir ve dinlendirilen karışım doluma hazır hale getirilir (Tayar ve Yıldırım 2020). Bu işlemler sırasında sucuk hamuru sıcaklığının 4°C'yi geçmemesi gerekir (Tekinşen ve Doğruer 2000).

Günümüzde kıyma makinelerine göre kuter daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Tekinşen ve Doğruer 2000). Et ve yağ kuterde 1,5-2,5 cm çapında kuşbaşı büyüklüğünde parçalanır. Parçalanan bu karışım üzerine çekilmiş sarımsak ilave edilip karıştırıldıktan sonra tuz, baharatlar, diğer katkı maddeleri de eklenerek kuterde homojen bir karışım elde edilir (Arslan 2020, Özer ve Topçu 2020). Kuterdeki hamurun sıcaklığının 6°C'yi geçmemesine dikkat edilmelidir. Daha sonra hazırlanan hamur dolum makinesine alınır (Anar 2010).

Sucuk hamur karışımı doğal veya yapay kılıflara doldurulur. Sığır ince bağırsağı doğal bir kılıftır. Yapay kılıflar kolajen orijinlidir. Mikrobiyal yükün daha az olması ve basınca karşı dirençlilik göstermesi sebebiyle doğal olanlara göre avantajlıdır (Tayar ve Yıldırım 2020). Sucuk hamurunun doldurulduğu kılıflar su ile birkaç kez muamele edilerek ıslatılıp belirli solüsyonlarda (örn., %5-6 laktik asit, %1'lik potasyum sorbat çözeltileri) bekletildikten sonra kullanılır. Böylece bağırsaklar

eski genişliklerini, kayganlıklarını ve elastikiyetlerini tekrar kazanır (Tekinşen ve Doğruer 2000, Arslan 2020).

Dolum işlemi sırasında bağırsaklarda hava kalmamasına özen gösterilmelidir. Aşırı derece gevşek veya sıkı bir şekilde doldurulmamalıdır. Gevşek doldurulan sucuklarda boşluklar oluşmakta, renk kusurlarıyla birlikte küflenmeler oluşmaktadır. Çok sıkı doldurulanlarda ise özellikle bağırsak yırtılmaları görülmektedir (Tekinşen ve Doğruer 2000). Dolum işleminin ideal bir şekilde yapılması, fermentasyon ve olgunlaştırma işlemini olumlu yönde etkilemektedir (Özer ve Topçu 2020). Dolumdan sonra sucuklar ipe dizilerek birbirine fazla değmeyecek şekilde asılmaktadır. Yüzeyleri basınçlı su ile yıkandıktan sonra da olgunlaştırılmak üzere iklimlendirme odalarına alınmaktadır (Özer ve Topçu 2020, Tayar ve Yıldırım 2020).

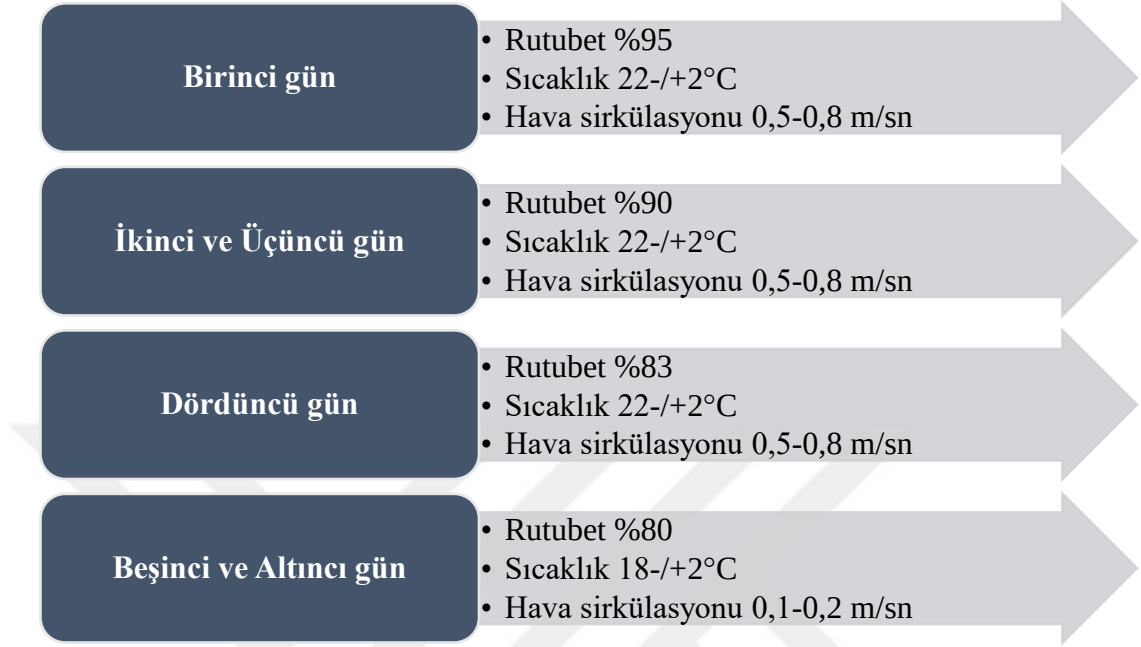
1.5. Sucuğun Fermantasyonu

Fermantasyon veya olgunlaştırma aşaması fermente sucuğun kendine özgü tat, aroma, renk ve kıvamının oluştuğu, başta mikrobiyolojik olmak üzere birçok enzimatik, biyokimyasal ve fizikokimyasal reaksiyonun bir arada gerçekleştiği kritik bir aşama olarak ifade edilmektedir (Özer ve Topçu 2020).

Sucuk farklı şekillerde olgunlaştırma işlemine tabi tutulmaktadır. İşletmenin şartlarına göre doğal, yavaş veya çabuk olgunlaştırma yöntemlerinden biri uygulanarak bu işlem gerçekleştirilmektedir. Çoğunlukla küçük işletmelerde veya evlerde yapılan doğal olgunlaştırma iklim koşullarına bağlı olarak özellikle sıcaklık, hava sirkülasyonu ve rutubetin uygun olduğu sonbaharda yapılmaktadır. Bu yöntemde, kılıflara doldurulan sucuklar ya dolumu takiben ya da serin bir yerde bir gece bekletildikten sonra askılara asılır. Rutubet oranının düşük olduğu durumlarda sucuklara günde birkaç kez su püskürtülerek gerekli olan bağıl nem oranı sağlanmaya çalışılmaktadır (Tekinşen ve Doğruer 2000, Arslan 2020).

Yavaş yöntemde sucuklar, sıcaklık, hava sirkülasyon hızı, rutubeti kontrol edilen ve ayarlanabilen odalarda birkaç hafta içerisinde olgunlaştırılmaktadır. Mikrobiyal gelişim riski açısından sıcaklık bu yöntemde 18°C'yi geçmemelidir. Rutubet ilk 3-4 gün %95 düzeylerindeyken sonraki günlerde %85'e kadar düşürülmektedir (Tekinşen ve Doğruer 2000).

Günümüzde fermente sucuklar sıcaklık, hava sirkülasyonu ve bağıl nemi ayarlanarak yılın her mevsiminde üretilabilmektedir. Olgunlaştırma aşaması Şekil 1.4.'te özetlenmektedir.



Şekil 1.4. Sucuk olgunlaştırma koşulları (Tekinşen ve Doğruer 2000).

Olgunlaştırma kabinlerinde bağıl nem, sürecin başlangıcında sucuk hamurunun kılıfa doldurulması ve kılıfın hamuru tam olarak sarması için yüksek seviyelerde (>%90) uygulanmaktadır. Bu bağıl nem seviyesinde üründe kuruma gerçekleşmediği için bu süreç kısa tutulmakta, bağıl nem kademeli olarak düşürülerek kuruma başlatılmaktadır. Bu aşamada sucuk yüzeyindeki su, kılıftan geçerek bağıl neme sahip havaya karışmakta, iç kısımlarındaki su ise kenar kısımlara taşınarak buradan ürünü terk etmektedir. Ortam bağıl neminin düşürülmesi ile sürekli hava ve su arasında gerçekleşen su alışverişi ile üründe kuruma gerçekleşmektedir (Zukál ve Incze 2010, Medić 2017). Olgunlaştırma periyodunun başında hızlı olan kuruma, sürecin sonuna doğru yavaşlamaktadır. Olgunlaştırmının başında çok düşük bağıl nem seviyesinin uygulanması veya bağıl nemin hızlı bir şekilde düşürülmesi sucuk kılıfında büzülme ve sucuğun dış kısımlarında kabuk oluşumu gibi olumsuzluklara neden olarak kuruma problemleri oluşturmaktadır (Medić 2017). Olgunlaştırma periyodunda sıcaklık kontrolü hem ürün güvenliğinin sağlanması hem de arzu edilen tekstür ve lezzetin oluşması için önemlidir. Sıcaklık ve kuruma hızının kontrol edilmesi, istenilmeyen mikroorganizmaların gelişimini engelleyerek gıda güvenliğinde önemli bir rol

oynamaktadır. Aynı zamanda bu kontrol, duyu kalite için olgunlaşma sırasında da gereklidir. Uzun süre kurutulup olgunlaştırılan sucuklarda bozulmaya neden olan mikroorganizmalar gelişim gösterememektedir (Incze 2012).

Kurutma aşamasından sonra yağ içeriğinin %40 ve pH değerinin 5,4'ten düşük olması gerekmektedir (Altun ve ark 2015, TKG 2019). Bu durum, mikroorganizmalar, aroma oluşumu, pH, stabilite ve ürün güvenliği üzerindeki etkisi nedeniyle sucuk kalitesinde önemli rol oynamaktadır (Konuray ve Erginkaya 2020).

Olgunlaşma aşaması tamamlanmış olan sucuğun bileşimi, olgunlaşma süreci sırasında karmaşık biyokimyasal reaksiyonlar nedeniyle sürekli olarak değişmekte ve çok çeşitli bileşikler üretilmektedir. Amino asitler, aminler ve uzun zincirli yağ asitleri ürünlerin tadına, kısa zincirli yağ asitleri ise tat ve/veya kokuya katkıda bulunmaktadır. Diğer bileşikler aromatik maddelere (aldehitler, ketonlar, ikincil alkoller) dönüşmektedir. Tüm bu bileşikler nihai ürünün aromasından sorumludur. Bunlardan bazıları mikrobiyal metabolizmanın sonucu olarak ortaya çıkarken, bir kısmı endojen lipoliz ve proteolizden, diğerleri nitrik oksit reaksiyonlarından, lipid otooksidasyonundan ve son olarak baharatlardan kaynaklanmaktadır (Marušić ve ark 2014).

Kurutma ve olgunlaştırma aşamasında, endojen enzimlerin aktivitesi de kuru kürlenmiş/fermente edilmiş bir sucukta beklenen özellikleri elde etmek için büyük önem taşımaktadır. Katepsinler, kalpainler ve peptidazlar gibi proteazlar sucuk tekstüründeki yapısal proteinlerin peptitlere kademeli olarak parçalanmasında rol oynamaktadır. Bir diğer önemli enzim sistemi de lipolitik enzimlerdir. Trigliseritlerin bozunması, serbest yağ asitlerinin mikrobiyal aktiviteye ve çevresel faktörlere (özellikle atmosferik oksijen) maruz kalması, kuru kürlenmiş/fermente edilmiş sucukların karakteristik kokusunu ve lezzetini oluşturacak uçucu bileşiklerin oluşmasına yol açmaktadır (Shiling ve ark 2017, Muneke ve ark 2023).

1.6. Fermente Sucuk Üretiminde Engel Faktörler

Gıdaların işlenmesinde mevcut mikroorganizma popülasyonunu yok eden veya azaltan çeşitli teknolojik adımlar veya bunların unsurları kullanılabilmektedir. Bu anlamda engel teknolojisi olarak bilinen faktörlerin aşamalı olarak uygulanmasını

içeren ve gıdaların mikrobiyal stabilitesini, güvenliğini, duyuşal özelliklerini ve besin değeriini belirleyen üretim prosedürleri önem kazanmaktadır (Kameník 2017).

Fermente sucuk üretiminde, kalite kriterlerinin oluşmasında engel faktörler teknoloşisi, iç ve dış faktörler olarak etki göstermektedir (Dertli ve ark 2016). İç faktörler arasında koruyucu etkiye sahip maddeler (özellikle tuz ve nitrit), Eh, rekabetçi mikroflora, düşük pH ve a_w değeri bulunmaktadır (Tablo 1.1.). Başlıca dış faktörler arasında ise bağıl nem, hava sirkülasyon hızı ve sıcaklık yer almaktadır (Arslan 2020, Özer ve Topçu 2020). Tuz ilavesi ve Eh değeriinin azaltılması, üretimin ilk aşamalarında belirleyici olarak önem kazanmaktadır. Son ürünlerin mikrobiyal stabilitesi ve özellikle de güvenliğı açısından önemli olan faktörler ise pH ve a_w değeri şeklinde ifade edilmektedir (Kameník 2017).

Tablo 1.1. Fermente sucuk üretiminde uygulanan iç engel faktörler (Kameník 2017).

Engel	Eylem modu	Uygulama kuvveti	Gelişim inhibisyonu
NaCl	↑Ozmotik basınç	+	Aerobik bozulma bakterileri, <i>Enterobacteriaceae</i>
NaNO ₂	NO*, ONOO ⁻	+	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Clostridium botulinum</i>
Eh değeri	↓O ₂ içeriğı	+	Aerobik bozulma bakterileri
Starter kültürler (LAB)	Rekabet, Amensalizm	++	Gıda kaynaklı ajanlar, <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Clostridium</i>
pH değeri	↑Protonlar (H ⁺)	++	<i>Enterobacteriaceae</i>
a_w değeri	↑Ozmotik basınç, ↓Serbest su içeriğı	+++	Genel olarak bakteriler, bir dereceye kadar küfler ve mayalar

1.7. Fermente Sucuğun Mikrobiyal Florası

Fermente et ürünlerinin temel bileşeni olan et, kesim aşamasından başlayarak bütün işlem basamaklarında çeşitli mikroorganizmalarla kontamine olabilmektedir. Sucuk hamurunun başlangıçtaki mikroorganizma yükü genellikle 10^5 - 10^7 kob/g arasında olup hazırlanan hamurun mikroflorası fermente edici ve fermente edici olmayan mikroorganizmaları bir arada bulundurmaktadır (dos Santos Cruxen ve ark 2019, Ulusoy ve Ergün 2020).

Fermantasyon, çoğunlukla LAB, küf ve mayalardan oluşan geleneksel sucuk mikroflorası etkisiyle kendiliğinden gerçekleşmektedir. *Lactobacillus*, *Staphylococcus* ve *Micrococcus* türleri sucuk fermantasyonu ve olgunlaşmasında en önemli rolü oynamaktadır (Nazlı ve ark 2017). LAB, bazı patojenik ve bozulmaya neden olan mikroorganizmaların (örn., *Listeria monocytogenes* ve *S. aureus*) gelişimini engellemek gibi çeşitli yararlı özelliklere sahip olan laktik asit ve bakteriyosinler üreterek pH'yı düşürmektedir. Aynı zamanda ham maddenin modifikasyonu ile tat, renk ve tekstür gelişiminin sağlanması gibi çeşitli duyuşal özellikler sağlamaktadır. Bunun yanı sıra nihai ürünlerin genel kalitesinin ve raf ömrünün iyileştirilmesi için katkıda bulunmaktadır (Özdağ 2020).

Üretim süresince gelişen mikrofloranın bileşimi, çoğunlukla kullanılan olgunlaşma tekniğı ile yakından ilişkilidir. Olgunlaşma süresi kısa olan sucuklarda fermantasyonun erken aşamalarında laktobasiller hakim florayı oluştururken, olgunlaşma süresi uzun olan sucuklarda fermantasyonun erken aşamalarında mikrokoklar hakim florayı oluşturmaktadır (Cocolin ve ark 2001).

Birçok mikroorganizma grubu uygun koşullar altında ette gelişebilmektedir. Yapılan çalışmalarda et ürünlerinde *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* ve *Salmonella* spp. gibi gıda kaynaklı patojenlerin varlığı tespit edilmiştir (CDC 2022). Et ürünleri, üretim, paketlenme ve pazarlama süreçleri sırasında patojen mikroorganizmaları taşıyan et işleyicilerinden kaynaklanan mikroorganizmalarla kontamine olabilmektedir. Gıda kontaminasyonunun en büyük risklerinden biri, gıda işleyicilerinden işleme süresi sırasında gıdaya geçerek hastalığa neden olan mikroorganizmalardan kaynaklanmaktadır. Gıda işleminde personel hijyeni çok önemli olup *S. aureus*'un neden olduğı gıda intoksikasyonunda başlıca kontaminasyon kaynağı olduğı belirtilmektedir (Aiyegoro 2024). Bu anlamda florada özellikle çiğ ette mevcut olarak bulunabilecek ve işlenmiş et ürünlerinde problem oluşturan *S. aureus*'a dikkat edilmesi önemlidir. *S. aureus*, bakteriyel gıda zehirlenmesi salgınlarında en sık görülen etkenlerden biri olarak ifade edilmektedir. *S. aureus*, çok çeşitli ekzotoksinler ve diğerk virölans faktörlerini üretme kabiliyeti nedeniyle dünya çapında bakteriyel hastalıkların en yaygın etiyolojik ajanlarından biridir (Aiyegoro 2024). Bu mikroorganizma, uygun koşullar altında ısıya dayanıklı enterotoksinler üretebilmektedir (Terrell ve Hernandez-Jover 2023).

1.8. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

S. aureus önemli bir zoonotik patojendir. İnsanlarda yaygın olarak gıda kaynaklı intoksikasyonlar ve bakteriyemi başta olmak üzere çok çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir (Narayan ve ark 2023). Bakteriyel toksinler, dünya çapında gıda kaynaklı salgınların en yaygın üçüncü nedeni olarak kabul edilmektedir (Grispoldi ve ark 2021). Stafilokokal enterotoksinler (SE'ler), 2015 yılında Avrupa Birliği'nde bakteriyel toksinlerle bağlantılı tüm gıda kaynaklı salgınların yaklaşık yarısından sorumlu olarak ifade edilmiştir (EFSA 2016). Normalde *Staphylococcus* spp. sıcakkanlı hayvanlarda kolonize olmakta ve bir türden diğerine aerosol yolla ya da enfekte bireyler arasında doğrudan temas yoluyla bulaşabilmektedir (Rossi ve ark 2016). İnsanlarda *S. aureus* deride, mukoza zarlarında (burun, ağız ve boğaz), bağırsak yolu ve meme bezleri gibi diğer vücut bölgelerinde bulunabilen yaygın bir kommensaldir. *S. aureus* için en iyi habitat, sıcak ve nemli bir ortam sağlayan burun deliklerinin skuamöz epitelidir. *S. aureus*'un, popülasyonun %20'sinde kolonize olduğu, %60'ında mikroorganizmanın aralıklı taşıyıcılarından oluştuğu ve kalan %20'sinde tespit edilemediği ifade edilmektedir (Milani ve ark 2023).

1.8.1. *S. aureus*'un Sınıflandırılması

Staphylococcus adı (staphyle=üzüm salkımı) 1883 yılında Ogston tarafından ortaya atılmıştır. Rosenbach ise terimi taksonomik anlamda kullanmış ve *Staphylococcus* cinsinin ilk tanımını 1884 yılında yapmıştır. Taksonomik olarak stafilokoklar *Micrococcaceae* familyasına yerleştirilmiştir (Argaw ve Addis 2015). Baird Parker (1963), belirli fizyolojik ve biyokimyasal testlere dayalı olarak mikrokoklar ve stafilokoklar için bir sınıflandırma sistemi önermiştir. *Micrococcaceae* familyasını Grup I (*Staphylococcus* Rosenbach emend. Evans) ve Grup II (*Micrococcus* Cohn emend. Evans) olarak ikiye ayırmıştır. Daha sonra yapılan moleküler analizler, filogenetik ve kemotaksonomik veriler stafilokoklar ile mikrokokların yakından ilişkili olmadığını ortaya çıkarmıştır (Gherardi ve ark 2018). Bu gruplar pigment üretimi, koagülaz-fosfataz reaksiyonları, aseton üretimi, glikoz (hem aerobik hem de anaerobik olarak) ve diğer şekerlerden asit oluşumu temel alınarak alt gruplara ayrılmıştır. *Staphylococcus*, ailenin diğer üç üyesinden (*Micrococcus*, *Stomatococcus* ve *Planococcus*) DNA'nın G+C içeriği, hücre duvarı

bileşimi, glikozun anaerobik olarak kullanımı ve fermente etme yeteneği temelinde ayırt edilebilmektedir (Argaw ve Addis 2015).

Staphylococcus cinsi, kromozomal DNA’da düşük G+C içeriğine sahip Gram pozitif bakterilerden oluşan *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* kümesine aittir. Aynı zamanda *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus*, *Salinicoccus* ve *Gemella* cinsleriyle birlikte *Staphylococcaceae* adlı yeni bir ailede yeniden sınıflandırılmıştır (Garrity ve ark 2004, Ludwig ve ark 2009). *Staphylococcaceae* familyası, *Bacillaceae*, *Planococcaceae*, *Listeriaceae* ve diğer familyalarla birlikte *Bacillales* takımının bir parçasıdır (Gherardi ve ark 2018). *Staphylococcus*’un yalnızca üç türü (*S. aureus*, *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus*) 1974 yılında cinse dahil edilmiştir. Bunlar öncelikle koagülaz üretme, mannitolü fermente etme (hem aerobik hem de anaerobik olarak), ısıya dayanıklı endonükleaz üretme yeteneklerine ve hücre duvarı bileşimine göre farklılaştırılmıştır (Argaw ve Addis 2015).

1.8.2. *S. aureus*’un Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Staphylococcus cinsindeki 36’dan fazla türden biri olan *S. aureus*, üzüm salkımına benzeyen, yaklaşık 0,5–1,5 µm çapında, fakültatif anaerobik, spor oluşturmeyen Gram pozitif bir koktur (Milani ve ark 2023, Narayan ve ark 2023). Mikroskopik incelemede teikoik asit ve peptidoglikan içeren, Gram pozitif bakterilerden oluşan tipik hücre duvarına sahip kümeler halinde görünürler (Gherardi ve ark 2018). Stafilokokların hücre duvarı lizozime karşı dirençlidir ve özellikle *Staphylococcus* spp.’nin pentaglisin köprülerini parçalayan lizostafine duyarlıdır. *S. aureus* katalaz ve koagülaz üretmektedir. Stafilokoklar geniş bir sıcaklık aralığı (7-48°C, optimum 30°C ile 37°C), pH (4,2-9,3, optimum 7,0 ile 7,5) ve sodyum klorür konsantrasyonlarında (%15’e kadar NaCl) gelişim gösterebilmektedir (Argaw ve Addis 2015). Bu özellikler bakterilerin, özellikle işleme sırasında farklı uygulamalar gerektiren ve peynir gibi fermente gıda ürünleri de dahil olmak üzere çok çeşitli gıdalarda canlı kalmasını sağlamaktadır (Aycicek ve ark 2005, Argaw ve Addis 2015).

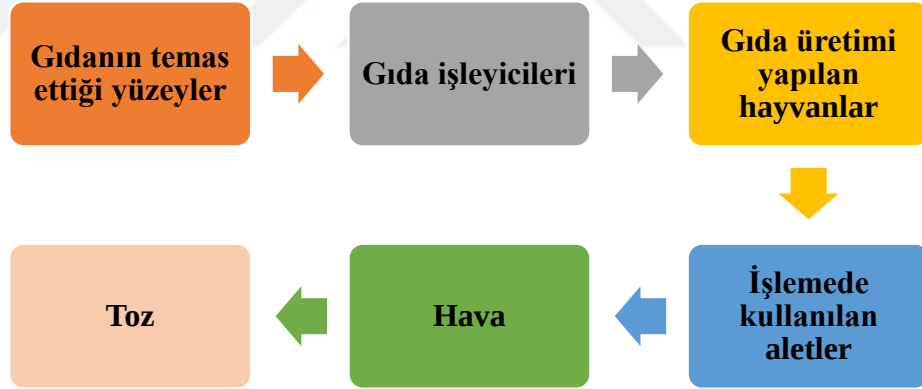
Koagülaz pozitif stafilokoklar (CoPS), cins içerisindeki ana patojenik türleri temsil etmektedir. Fibrinojeni fibrine dönüştürerek tavşan plazmasını pıhtılaştırabilen bir enzim olan koagülaz sentezlerler. Koagülaz içermeyenler koagülaz negatif stafilokoklar (CoNS) olarak sınıflandırılır ve genellikle risk altındaki konakçılarda

fırsatçı enfeksiyonlara neden olarak daha az sıklıkta hastalık etkeni olarak kabul edilen patojenler arasında belirtilir (Gherardi ve ark 2018).

1.8.3. *S. aureus*'un Gıdalardaki Varlığı

Özellikle protein ve nişasta içeriği fazla olan gıdalarda gelişen *S. aureus*, genellikle et ve süt ürünlerinde yaygın olarak görülmekte, üretimi ve muhafazası yeterince hijyenik koşullarda yapılmayan, açıkta muhafaza edilen ve işlenmiş gıdalarda stafilokokal zehirlenme bakımından tehlike oluşturmaktadır (Normanno ve ark 2005, Küçükçetin ve Milci 2008).

Süt, süt ürünleri, çiğ et/et ürünleri, yumurta/yumurta ürünleri ve su ürünleri yaygın olarak *S. aureus* ile kontamine olmaktadır (Can ve ark 2017). *S. aureus* ile kontamine olmuş gıdalar, enterotoksijenik *S. aureus*'un insanlara bulaşması için potansiyel bir araçtır. Bu kontaminasyon kaynakları Şekil 1.5.'de gösterilmektedir. Bunlar arasında gıda kontaminasyonunun birincil kaynağı, burunlarında veya ellerinde enterotoksin üreten *S. aureus* taşıyan gıda işleyicilerinin neden olduğu doğrudan temas veya solunum sistemi salgıları olmaktadır (Chaalal ve ark 2018).



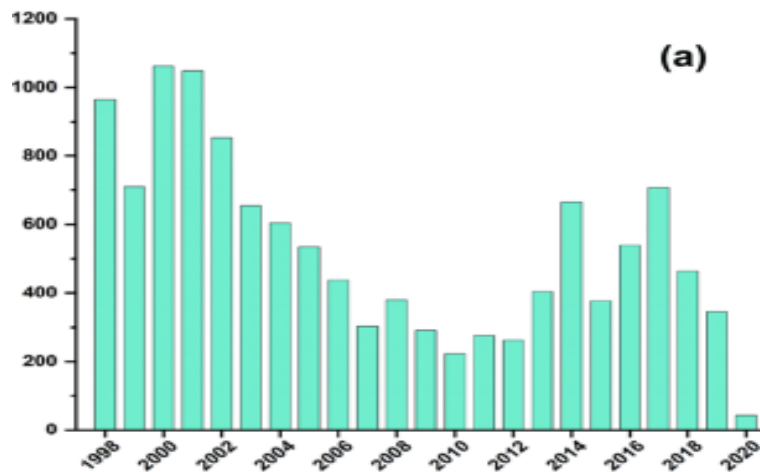
Şekil 1.5. *S. aureus* ile kontaminasyon kaynakları (Chaalal ve ark 2018).

Araştırılan çeşitli gıdalar arasında et ve et bazlı ürünler, *S. aureus* için ortak ana rezervuar olarak kabul edilmektedir (Wu ve ark 2018). Et ürünlerinin kontaminasyonu, işleme ve depolama sırasındaki kötü hijyen uygulamalarından kaynaklanmaktadır (Pérez-Boto ve ark 2023). Çiğ kanatlı etinde mikrobiyal kontaminasyon, kesim, tüy ıslatma, tüy yolma, iç organ çıkarma, dağıtım ve depolama dahil işlemenin herhangi bir aşamasında meydana gelebilmektedir (Darwish ve ark 2018). Gıda işleme sırasında yeterli bir ısı işlem uygulaması genellikle tüm vejetatif *S. aureus* suşlarını yok edebilmektedir. Ancak SE'ler, termostabil oldukları ve

gastrointestinal proteazlara karşı direnç gösterdikleri için ısıt işlemler ile yok edilememektedir (Alves ve ark 2018).

1.8.4. *S. aureus*'un Epidemiyolojisi

Stafilokoklar sağlıklı bireylerin deri ve mukoza zarlarında kolonize oldukları için birçok hayvan türünden izole edilebilmektedir (Kosecka-Strojek ve ark 2018). *S. aureus*'un her yerde bulunabilme başka bir deyişle ubiquiter doğası, çevreden eradikasyonunu imkansız kılmaktadır. İnsan nüfusunun önemli bir kısmı *S. aureus* taşımaktadır (Thapaliya 2019). Stafilocokal gıda zehirlenmesi (Staphylococcal Food Poisoning, SFP) dünya çapında yaygın bir gıda kaynaklı hastalıktır. Et, tespit edilen tüm SFP vakalarının yaklaşık yarısından sorumlu gıdalar arasında yer almaktadır. Yumurta ürünleri, süt ve süt ürünleri, salatalar, unlu mamuller sıklıkla SFP vakalarıyla ilişkilendirilmektedir. SFP, tipik olarak kontamine gıdalarda gelişen bakteriler tarafından üretilen enterotoksinlerin tüketimiyle ortaya çıkan bir zehirlenmedir (Stewart 2017). Stafilocoklar ve gıda zehirlenmesi arasındaki ilişki ilk olarak 1884 yılında Vaughan ve Sternberg tarafından peynir, 1894 yılında Denys tarafından kontamine etle ilişkilendirilerek ortaya konulmuştur (Bergdoll ve Lee Wong 2006). Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri'nin (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) istatistiklerine göre, 1998'den 2020'ye kadar Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde *S. aureus*'un neden olduğu hastalıkların sayısı Şekil 1.6.'da gösterilmektedir.



Şekil 1.6. 1998'den 2020'ye kadar ABD'de gıda kaynaklı *S. aureus*'un neden olduğu hastalıkların sayısı (CDC 2021).

SFP salgınları ile ilgili 1968-2014 yılları arasındaki örnekler Tablo 1.2.'de özetlenmektedir.

Tablo 1.2. SFP salgınları ile ilgili örnek vakalar.

Yıl	Yer	Gıda	Vaka sayısı	Kaynaklar
1968	Teksas, okul çocukları	Tavuk salatası	1300	Hennekinne ve ark (2018)
1971	Birleşik Krallık ordusu	Sosis ruloları, jambonlu sandviçler	100	Hennekinne ve ark (2018)
1980	Kanada	Lor peyniri	62	Hennekinne ve ark (2018)
1983	Karayip yolcu gemisi	Kremalı pasta	215	Hennekinne ve ark (2018)
1984	İskoçya	Koyun peyniri	27	Hennekinne ve ark (2018)
1985	Kentucky, okul çocukları	Çikolatalı süt	>1000	Hennekinne ve ark (2018)
1989	ABD eyaletleri	Konserve mantarlar	102	Hennekinne ve ark (2018)
1992	Teksas, ilkokul	Tavuk salatası	1364	Hennekinne ve ark (2018)
1998	Minas Gerais, Brezilya	Tavuk, kavrulmuş sığır eti, pilav ve fasulye	4000	Hennekinne ve ark (2018)
2000	Osaka, Japonya	Az yağlı süt	13420	Hennekinne ve ark (2018)
2007	Avusturya, ilkokul	Süt, kakaolu ve vanilyalı süt	166	Schmid ve ark (2009)
2009	Fransa	Çiğ süt peyniri	23	Ostyn ve ark (2010)
2011	Torino, İtalya	Deniz ürünleri salatası	26	Hennekinne ve ark (2018)
2012	Avustralya, spor etkinliği	Pilav, tavuklu kızartma	22	Hennekinne ve ark (2018)
2013	Freiburg, Almanya	Dondurma	13	Hennekinne ve ark (2018)
2014	İsviçre, yatılı okul	Tomme peyniri	13	Johler ve ark (2015a)
2014	Zimbabve, çalıştay	Haşlanmış tavuk	53	Hennekinne ve ark (2018)

1.8.5. Stafilokokal Enterotoksinler (SE'ler)

S. aureus çok çeşitli enfeksiyonlara, gıda zehirlenmesine ve toksik şok sendromuna (TSS) neden olmaktadır. *S. aureus*'un neden olduğu hastalıkların çoğunda patogeneze bir dizi virülans faktörüyle ilişkilidir. Bununla birlikte, belirli hastalıklardan izole edilen suşlar ile belirli virülans belirleyicilerinin ekspresyonu arasında da korelasyonlar vardır (Hu ve ark 2018). *S. aureus*, patojenitesine farklı şekillerde katkıda bulunan ve SE, eksfoliyatif toksinler A (ETA), eksfoliyatif toksinler B (ETB), hemolizin, toksik şok sendromu toksin-1 (TSST-1) ve Panton-Valentine Lökositidin (PVL) ile ilgili olan çeşitli hücre dışı protein toksinleri ve virülans faktörleri üretmektedir (Wang ve ark 2014). Ayrıca SE'ler ve SE benzeri toksinlerin (SEI'ler), özellikle gıda güvenliği açısından *S. aureus*'un ana virülans faktörleri olduğu kabul edilmektedir (Hu ve ark 2018). Bu toksinler SE'ler ve SEI'ler de dahil olmak üzere 27 tipten oluşan bir süper aileyi oluşturmaktadır. Bunlar içerisinde, 19 tane SE (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SES, SET, SEY) emetik aktivite gösterirken 8 tane SEI'nin (SEI/J, SEI/U, SEI/V, SEI/W, SEI/X, SEI/Z, SEI/26, SEI/27) henüz emetik aktiviteleri doğrulanmamıştır (Féraudet Tarris ve ark 2021, Lefebvre ve ark 2022). SE ve SEI'lerin genleri, çeşitli yardımcı genetik elementler tarafından kodlanır ve toksinlerin molekülleri belirli yapısal ve biyolojik özellikleri paylaşır. SE'ler ve SEI'ler aynı zamanda gıda zehirlenmesi salgınlarına neden olan, pirojeniteyi, süperantijenliği ve endotoksine karşı ölümcül aşırı duyarlılığı başlatma kapasitesine sahip ısıya dayanıklı ve çok işlevli proteinlerdir. SEI'ler, SE'lerle karşılaştırıldığında çok benzer fizikokimyasal özelliklere sahip olmakla birlikte herhangi bir emetik aktiviteye neden olmayan yeni tanımlanmış toksinler olarak ifade edilmektedir (Salgado-Pabón ve Tran 2021). Hem SE'ler hem de SEI'ler süperantijenik aktiviteye sahip olup geniş bir bakteriyel stafilokokal süperantijen (SAg) ekzotoksin ailesine aittir (Hu ve ark 2018).

SE'ler, büyümenin eksponansiyel fazı (logaritmik faz, üstel faz) boyunca veya eksponansiyel fazdan durağan faza geçiş sırasında *S. aureus* tarafından gıdalarda üretilen ve insanlar tarafından tüketildiğinde akut gastroenterit semptomlarına yol açan SFP'den sorumlu ekzoproteinlerdir (Argudín ve ark 2010, Argaw ve Addis 2015). Toksinlerin düşük molekül ağırlıklı (yaklaşık 27-31 kDa), sadece amino asitlerden oluşan proteinler olduğu ve genellikle CoPS türleri tarafından üretildiği belirtilmektedir (Chiang ve ark 2008). SE'ler, faj, kromozom veya plazmid genleri

tarafından kodlanan ve ortamda salgılanan bir disülfid köprüsüne sahip suda ve tuzlu çözeltilerde çözünebilen geniş bir pirojenik toksin süper ailesine ait kısa proteinlerdir. Lizin, aspartik asit, glutamik asit ve tirozin bakımından zengindir. Pepsin ve tripsin gibi sindirim sisteminde bulunanlar dahil olmak üzere çoğu proteolitik enzime dirençli olarak belirtilir (Landgraf ve Destro 2013, Argaw ve Addis 2015). Çoğu uygun konformasyon için gerekli olan ve emetik aktivitede rol oynayan bir sistin döngüsüne sahiptir (Argaw ve Addis 2015). Toksinler, sıcaklık, tuz konsantrasyonu, pH değeri gibi gıdaya ilişkin ortam özelliklerinden etkilenmektedir (Landgraf ve Destro 2013). SE'ler sıcaklığa son derece dayanıklı olup 100°C'de en az 30 dakika ve daha uzun süre dayanabilmektedirler. Pastörizasyon ve pişirme sıcaklığına duyarlı stafilokok hücrelerini yok etmektedir. Ancak sıcaklığa dayanıklı SE'ler genellikle biyolojik aktivitelerini koruyarak şüpheli gıdadan canlı bakteri izole edilemese de intoksikasyon vakaları ortaya çıkabilmektedir. Nitekim, bir gıda test edildiğinde negatif kültür sonuçları oluşabileceği gibi pozitif SE testlerini elde etmek de mümkün olabilmektedir (Soejima ve ark 2007). SE üretimi için koagülaz pozitif *S. aureus* suşunun kontaminasyon seviyesinin 10⁵ kob/g-ml'den daha yüksek olması gerekmektedir (Bulajic ve ark 2017).

SE'ler ve SEI'lerin Üst Ailesi

S. aureus, süperantijenik toksinleri temsil eden gıda zehirlenmesinin önemli toksinleri olan SE'lerin geniş bir çeşidini "süper aile" üretmektedir. SE'ler ve SEI'ler ortak filogenetik ilişkileri, yapıları, işlevleri ve dizi homolojilerini paylaşmaktadır. Bu toksinler, yaklaşık 168-261 amino asitten oluşan basit proteinlerdir. Genel olarak SE'ler, klasik enterotoksinler (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) ve klasik olmayan (yeni) enterotoksinler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Fisher ve ark 2018). *S. aureus*, klasik SE'ler olarak adlandırılan ve genellikle en sık görülen SEA-SEE'yi yaygın olarak üretmektedir (Mehli ve ark 2017, Nossair ve ark 2018, Wu ve ark 2019). Bir veya birden fazla klasik SE'nin gıdalar yoluyla tüketilmesi de insanlarda SFP'ye neden olmaktadır (Gonzalez ve ark 2017). SE ve SEI'lerin biyolojik özellikleri Tablo 1.3.'de gösterilmektedir.

Tablo 1.3. SE'ler ve SEI'lerin biyolojik özellikleri (Fisher ve ark 2018).

SE'ler ve SEI'ler	Uzunluk (aa)	Moleküler Ağırlığı (kDa)	Süperantijenik Aktivite	Emetik Aktivite		Genetik Elementler
				Maymun ^b	Fare ^c	
SEA	233	27,1	+	5 (ED ₅₀)	0,3	Profaj
SEB	239	28,4	+	5 (ED ₅₀)	10	Kromozom, SaPI3, plazmid (pZA10)
SEC1	239	27,5	+	5 (ED ₅₀)	nd ^d	SaPI
SEC2	239	27,6	+	5 (ED ₅₀)	1000	SaPI
SEC3	239	27,6	+	5 (ED ₅₀)	nd	SaPI
SED	233	26,9	+	5 (ED ₅₀)	40	Plasmid (pIB485)
SEE	230	26,4	+	10-20 (ED ₅₀)	10	Profaj (Varsayımsal konum)
SEG	233	27,0	+	160-320	200	<i>egc1</i> , <i>egc2</i> , <i>egc3</i> , <i>egc4</i>
SEH	217	25,1	+	30	1000	Transpozon (MGE _{mw2} / mssa476 <i>seh</i> /Δ <i>seo</i>)
SEI	218	24,9	+	300-600	1	<i>egc1</i> , <i>egc2</i> , <i>egc3</i>
SEI/J	245	28,6	+	nd	nd	Plasmid (pIB485, pF5)
SEN	227	26,1	+	100 (1/8)	nd	<i>egc1</i> , <i>egc2</i> , <i>egc3</i> , <i>egc4</i>
SEO	232	26,8	+	100 (2/6)	nd	<i>egc1</i> , <i>egc2</i> , <i>egc3</i> , <i>egc4</i> , Transpozon
SEP	233	26,7	+	100 (3/6)	50	Profaj (Sa3n)
SEQ	216	25,2	+	100 (2/6)	nd	SaPI1, SaPI3, SaPI5, Profaj
SER	233	27,0	+	<100	<1000	Plasmid (pIB485, pF5)
SES	257	26,2	+	<100	20	Plasmid (pF5)
SET	216	22,6	+	<100	1000	Plasmid (pF5)
SE/U	261	27,1	+	nd	nd	<i>egc2</i> , <i>egc3</i>
SE/V	239	27,6	+	nd	nd	<i>egc4</i>
SE/W	256	26,7	+	nd	nd	<i>egc4</i>
SE/X	168	19,3	+	nd	nd	Kromozom
SE/Y	221	22,5	+/-	nd	500	Kromozom

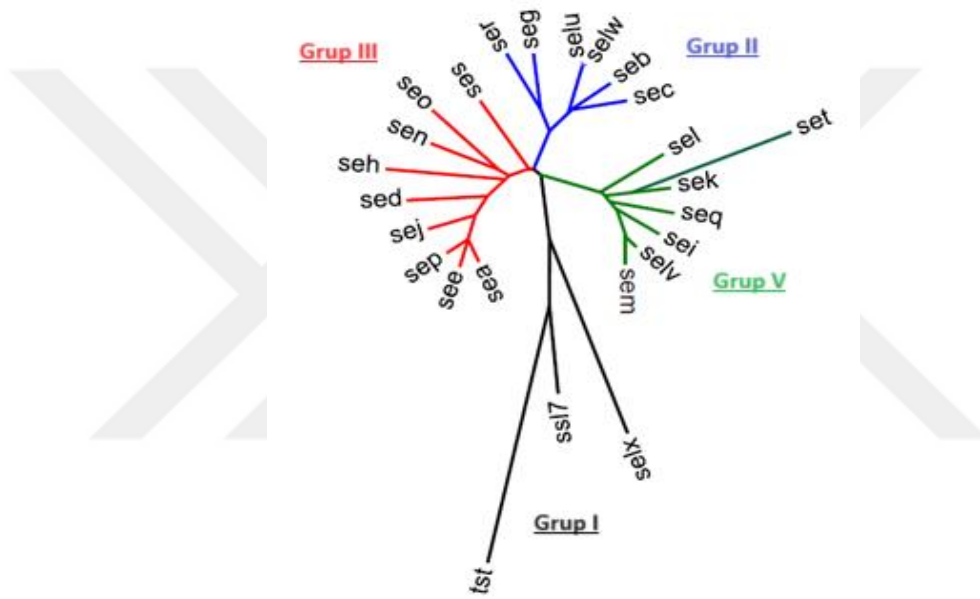
^a µg/hayvan, ^b Oral uygulama, ^c İntraperitoneal uygulama, ^d İncelenmedi, nd: Gösterilemedi.

ED₅₀: Etkin Doz 50

Stafilokokal enterotoksin C (SEC); SEC1, SEC2 ve SEC3 olmak üzere üç antijenik alt tipe ayrılmıştır (Balaban ve Rasooly 2000). Todd ve ark (1978), *S. aureus* enfeksiyonunun neden olduğu TSS'yi indükleyen bir toksinin olduğunu bildirmiş ve toksini stafilokokal enterotoksin F (SEF) olarak nitelemiştir. SEF'in emetik aktivitesi olmadığı için daha sonra TSST-1 olarak yeniden adlandırılmıştır. 1990'lı yıllardan itibaren ilave SE'lerin varlığı ortaya konulmuş, 2001 yılından sonra ise pek çok yeni SE türü keşfedilmiştir (Omoe ve ark 2003, Thomas ve ark 2006, Thomas ve ark 2007, Ono ve ark 2008, Wilson ve ark 2011, Ono ve ark 2015). Günümüze kadar toplam 23 farklı SE ve SEI'nin varlığı rapor edilmiştir. Bu toksinler SEA'dan SEE'ye, SEG'den SET'e ve stafilokokal enterotoksin benzeri toksin U'dan (SE/U) SE/Y'ye kadar sınıflandırılmıştır. Uluslararası Stafilokok Süperantijenleri İsimlendirme Komitesi (INCSS), yeni keşfedilen toksinler için standart isimlendirmeyi önermiştir (Lina ve ark 2004, Thomas ve ark 2007). INCSS adlandırma kuralının amacı, gıda zehirlenmesinde emetik aktivitenin önemini vurgulamaktır. SE'in isimlendirilmesinde, emetik aktivitenin bir primat modeline oral uygulama yoluyla kanıtlanması temel ölçüttür. Primat modelinde uygulanan emetik aktivite deneylerinde negatif emetik potansiyel tespit edilmiş veya emetik aktivite deneyleri henüz yapılmamışsa, SAg'nin SE yapısıyla yakından ilişkili olduğu düşünülse bile bu toksine "SEI" adı verilmelidir. Omoe ve ark (2013), bir maymun besleme analizini kullanarak SE/K, SE/L, SE/M, SE/N, SE/O, SE/P ve SE/Q dahil olmak üzere yeni keşfedilen bazı SEI'lerin emetik potansiyellerini değerlendirmiştir. Test edilen tüm SEI'lerin, 100 µg/kg'lık bir dozda maymunlarda kusturucu yanıtları indüklediği, ancak etkilenen maymunların sayısının SEA veya SEB tüketildikten sonra etkilenen maymun sayılarından daha az olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar, yeni tanımlanan SEI'lerin, INCSS adlandırma kuralına göre sırasıyla SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP ve SEQ olarak yeniden adlandırılmasına izin veren emetik toksinler olduğunu göstermiştir (Lina ve ark 2004). Ono ve ark (2015) yaptıkları çalışmada, ev misk farelerinin kullanıldığı emetik hayvan modelinde güçlü kusturucu aktiviteye sahip yeni bir stafilokokal emetik toksin olan SE/Y'yi rapor etmiştir.

SE ve SEI'lerin Moleküler Yapıları

SE ve SEI'ler, molekül ağırlıkları 19 ile 29 kDa arasında değişen küresel, tek zincirli proteinlerdir. Bu toksinler, proteinlerin birincil dizileri farklı olmasına rağmen yapısal olarak homologdur. Hizalanmış dizilerin incelenmesi, SE'ler, SEI'ler ve diğer SAg toksinleri arasında daha benzer olan amino asitlerin birkaç doğrusal uzantısının olduğunu göstermektedir (McCormick ve ark 2001). Süperantijenik toksinler nükleotid ve amino asit dizilerinin homolojisine göre beş gruba ayrılabilir (Şekil 1.7.). Tablo 1.4.'te amino asit sekansı karşılaştırmalarına dayalı olarak SE'lerin ve SEI'lerin gruplandırılması gösterilmektedir.



Şekil 1.7. Amino asit dizisi homolojisine göre SE ve SEI toksinlerin gruplandırılması (Wilson ve ark 2011).

Tablo 1.4. Amino asit sekansı karşılaştırmalarına dayalı olarak SE'lerin ve SEI'lerin gruplandırılması (Argudín ve ark 2010).

Gruplar	SE ve SEI
Grup 1	SEA, SED, SEE, SES, SE/I, SE/IN, SE/O, SE/P
Grup 2	SEB, SEC, SEG, SER, SE/U, SE/U2
Grup 3	SEI, SE/K, SE/L, SE/M, SE/Q, SE/V
Grup 4	SEF (TSST-1)
Grup 5	SEH

Grup I toksinleri arasında TSST-1, stafilokok süperantijen benzeri protein (SSL7) ve SE/X bulunmaktadır (Acharya ve ark 1994, Mitchell ve ark 2000, Brosnahan ve Schlievert 2011, Wilson ve ark 2011, Hu ve ark 2018). Bu grup birincil amino asit dizilerine sahip olmakla birlikte SE'lerin emetik sistin döngüsünden yoksundur (McCormick ve ark 2001). Grup I, O/B katlarında, MHC II (Major Histocompatibility Complex, Majör Doku Uyumluluk Sınıfı) moleküllerinin α -zincirleri ile etkileşime giren yalnızca düşük afiniteli MHC II bağlanma bölgesini içermektedir (Kim ve ark 1994).

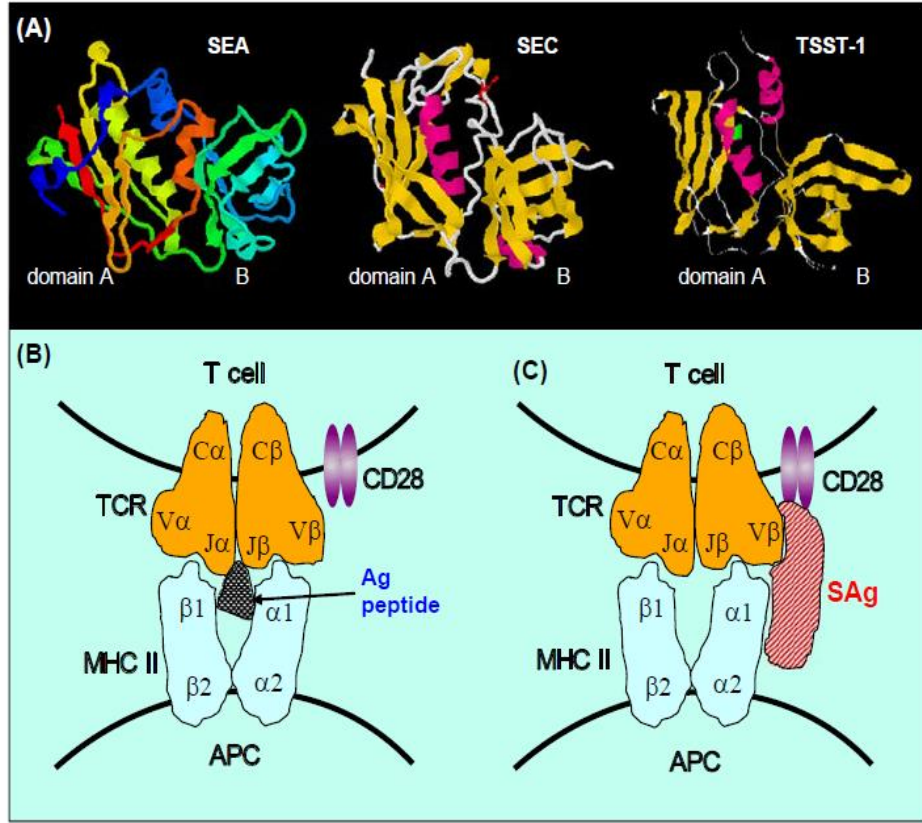
Grup II toksinleri (SEB grubu); SEB, SEC, SEG, SE/U ve SE/W'den (SE/U2) oluşmaktadır (Hovde ve ark 1994, Fitzgerald ve ark 2003). Bu toksinler çekirdek SAg yapısını ve sistein kalıntılarını ayıran 10-19 amino asit dizisine sahip bir sistin halkasını içerir (Hovde ve ark 1994, Schlievert ve ark 2000). Grup II SAg'ler ayrıca bir MHC II bölgesi, α -zincirli MHC II bağlanma bölgesi içerir ve bu etkileşim, MHC II peptid bağlama oluğu içindeki antijenik peptit ile etkileşime bağlı değildir (Jardetzky ve ark 1994, Letertre ve ark 2003). Grup II SAg toksininin V β -TCR (T hücresi reseptörü) bağlanma bölgesi, moleküllerin üst ön kısmında bulunur (Leder ve ark 1998, Li ve ark 1998, Letertre ve ark 2003).

Grup III toksinleri (SEA grubu); SEA, SED, SEE, SEH, SE/IJ, SEN ve SEP'i içerir. Farklı SE tipleri arasında SEA, SEE, SEP ve SE/IJ, %65 ile %83 arasında değişen en yüksek amino asit dizisi homolojisini paylaşmaktadır. Grup II SAg gibi bir sistin döngüsü içerir ancak döngü her zaman dokuz amino asit uzunluğundadır (Fitzgerald ve ark 2003, Spaulding ve ark 2013). Önemli olarak Grup III SAg toksinleri, β -kavrama alanlarında düşük afiniteli α -zincirli MHC II bağlanma bölgesini ve Zn²⁺ bağımlı β -zincirli MHC II bağlanma bölgesi olarak adlandırılan yüksek afiniteli bölgeyi içerir (Petersson ve ark 2002, Fitzgerald ve ark 2003). İki MHC II bölgesinin varlığı, SE'lerin antijen sunan hücreler (APC'ler) üzerindeki MHC II moleküllerini çaprazlamasına, köprü kurmasına ve SAg aktivitesini arttırmasına olanak tanır (Kozono ve ark 1995). Bu SAg'ler üzerinde Zn²⁺ya bağımlı yüksek afiniteli bölgenin varlığı, onları yalnızca düşük afiniteli bir MHC II bağlama alanına sahip diğer SAg'lere göre T hücrelerinden ve APC'lerden sitokin üretimine neden olma konusunda genel olarak 10 ile 100 kat daha aktif hale getirir.

Grup IV süperantijenik toksinler *S. aureus* tarafından değil, Streptococci tarafından üretilir. Bu SAg'ler, SEA'da bulunan bölgeye benzer şekilde hem düşük (α -

zincir) hem de yüksek (β -zincir) afiniteli MHC II bağlanma bölgelerini içerir. Grup IV SAg'ler emetik aktivite için gerekli olan sistin döngüsünden yoksundur.

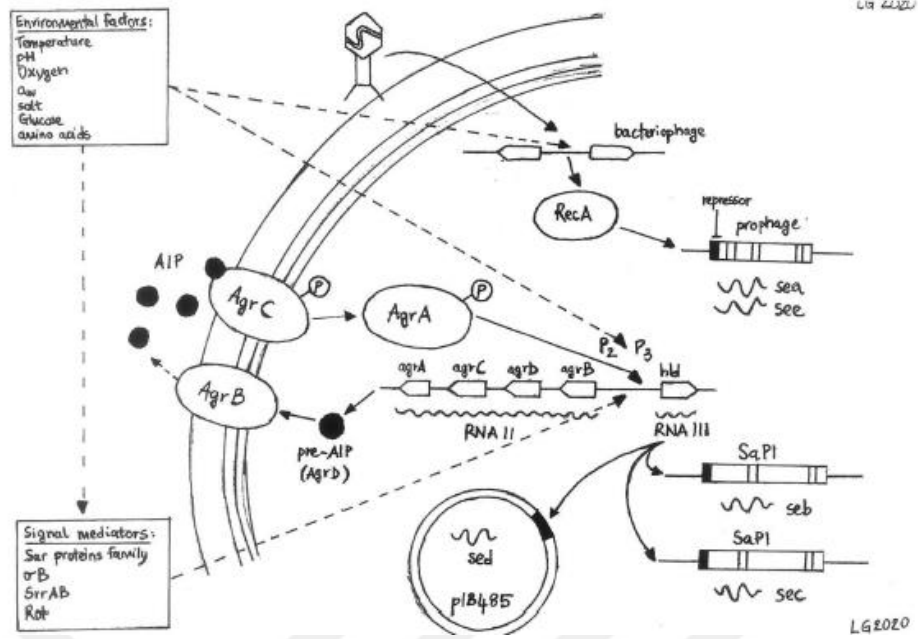
Grup V (SEI grubu) tanımı yapılan son gruptur ve SEI, SEK, SEL, SEM, SEQ, SET ve SE/V gibi yakın zamanda keşfedilen SAg'lerin çoğunu içerir (Su ve Wong 1995, Orwin ve ark 2001, Orwin ve ark 2002, Orwin ve ark 2003, Hu ve ark 2018). Grup V toksinleri hem düşük hem de yüksek afiniteli MHC II bağlanma bölgelerini içerir. Ancak, SAg'lerin ilgili V β -TCR'lerle etkileşiminin spesifikliği için kritik görünen sistin döngüsünü içermemektedir (Günther ve ark 2007). Her ne kadar bu toksinler amino asit dizilimlerinde farklı homolojiye sahip olsa da ikincil yapı, α -sarmal ve β -katman bileşenlerinin bir karışımıdır ve üç boyutlu yapılar çok benzer konformasyon gösterir (Swaminathan ve ark 1992, 1995). Kanonik yapı bir A alanı, bir B alanı, yapının merkezini kapsayan ve A, B alanlarını birbirine bağlayan bir α sarmalından oluşur (Şekil 1.8.). SEA, SEC ve TSST-1'in üç boyutlu yapıları bunu doğrulamaktadır. A alanı hem amino hem de karboksil terminallerinin yanı sıra bir β -kavrama motifini içerir. Amino-terminal kalıntıları, gevşek bir şekilde bağlanmış bir yapıda β -katmanının kenarı boyunca uzanır. A ve B alanları arasındaki arayüzler, molekülün arka tarafında uzun bir oyuk ve üst kısmında sık bir boşluk oluşturan bir dizi α -helis ile işaretlenmiştir (Şekil 1.8.).



Şekil 1.8. Süperantijenik toksinlerin (A) temsilcisi olarak stafilokokal enterotoksin A (SEA), stafilokokal enterotoksin C (SEC) ve toksik şok sendromu toksini 1'in (TSST-1) üç boyutlu yapısı. Normal antijen (B) ve süper antijenin (C) T hücresi reseptörüne, CD28 moleküllerine ve antijen sunan hücrenin (APC) majör doku uyumluluk sınıfı (MHC) II'ye bağlanmasını gösteren diyagram (Hu ve ark 2018).

1.9. Enterotoksin Üretiminin Düzenlenmesi

Enterotoksin üretiminin düzenlenmesine ilişkin mevcut bilgiler yetersiz olmakla birlikte *S. aureus*'un, çekirdek algılama (Quorum Sensing, QS) ile 16 farklı iki bileşenli sistem ve birçok trans etkili düzenleyici proteinin bir kombinasyonunu kullanarak çevresel değişikliklere yanıt verebildiği bilinmektedir (Haag ve Bagnoli 2016). Tüm bu sistemler, enterotoksin üretimi de dahil olmak üzere önemli fizyolojik özelliklerle ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenleyerek bakterilerin stres faktörlerine hızlı bir şekilde uyum sağlamasına olanak tanımaktadır. Her sistem, belirli gen gruplarının transkripsiyonunu doğrudan veya dolaylı olarak kontrol edebilmekte ve tek bir gen, birden fazla sistemden etkilenebilmektedir. Bu da birçok düzenleme katmanına yol açabilmektedir (Fisher ve ark 2018, Şekil 1.9.).



Şekil 1.9. SE transkripsiyonunun düzenlenmesinin doğrudan ve potansiyel düzenleyici yolları (Fisher ve ark 2018).

1.9.1. Klasik Enterotoksinlerin Düzenlenmesi (SEA-SEE)

Literatürde düşük ve yüksek seviyelerde belirgin SEA üretimine sahip suşlar tanımlanmış olmasına rağmen bakteriyofajla ilişkili enterotoksinlerin (SEA ve SEE) üretimi genellikle yapısaldır (Thomas ve ark 2007, Wallin-Carlquist ve ark 2010a). *sea* geni, bakteri genomuna yerleştirilen ve genellikle profaj gibi davranan polimorfik bir ılıman (temperate) bakteriyofaj ailesi tarafından taşınmaktadır (Grispoldi ve ark 2021). *sea* transkripsiyonunun, kodlayan profajın yaşam döngüsüne bağlı olduğu (Cao ve ark 2012) ve bakteriyel stres tarafından tetiklenebildiği belirtilmiştir (Zeaki ve ark 2015). *sea*'da taşınan altı farklı profaj (ϕ 252B, ϕ Mu3, ϕ Mu50A, ϕ NM3, ϕ Sa3ms ve ϕ Sa3mw) tanımlanmış ve bunların hepsi sıklıkla enterotoksin A, stafilokinaz ve kompleman inhibitörü genlerine sahiptir (Goerke ve ark 2009). Farklı profajlar, farklı seviyelerde SEA üretimine yol açmaktadır (Borst ve Betley 1994). Nükleotid sekansının ve komşu bölgelerin analizi, SEA üreten suşların SEA1 ve SEA2 olmak üzere iki ana gruba ayrılabilirliğini (Wallin-Carlquist ve ark 2010a) ve iki promoter bölgesinin (P1 ve P2) bulunduğunu göstermiştir. P1, her iki grupta da *sea*'nın hemen yukarısında bulunmaktadır (Borst ve Betley 1994). Fajla ilişkili gizli promoter P2'nin ise *sea* üretiminde stres kaynaklı bir artışla bağlantılı olduğu belirtilmektedir (Sumby ve Waldor 2003). *see* geni bunların aksine, kusurlu bir profaj üzerinde yer almaktadır

ve ekspresyonunun bakteriyel gelişimle bağlantılı olmadığı belirlenmiştir (Derzelle ve ark 2009). Farklı genetik temellere rağmen fajla ilişkili olmayan üç klasik enterotoksinin (SEB, SEC ve SED) üretimi genellikle bakteriyel gelişimin eksponansiyel ve sabit fazları arasında meydana gelmekte, yardımcı gen düzenleyici (accessory gene regulator, *agr*) sistem tarafından düzenlenmektedir (Betley ve Mekalanos 1985, Regassa ve ark 1991, Zhang ve Stewart 2000, Derzelle ve ark 2009). *seb* geni, *S. aureus*'un SaPI3 patojenite adasında bulunmaktadır (Novick ve ark 2001). *sec*, farklı patojenite adalarında (sırasıyla SaPI4, SaPI_{n1/m1} ve SaPI_{bov}) bulunan birden fazla varyantta (C1, C3, C_{bov}) yer almaktadır (Novick 2003). Öte yandan *sed* geni 27,6 kb'lık bir penisilinaz plazmidi üzerinde yer almaktadır (pIB485; Bayles ve Iandolo 1989). *agr* sistemi, yüksek hücre yoğunluklarında etkinleştirilen bir çekirdek algılama sistemidir. Sistem; *agrA*, *agrB*, *agrC* ve *agrD* yapısal genlerini kodlayan RNAII ve düzenleyici bir RNA olan RNAIII olmak üzere iki farklı transkriptten oluşmaktadır. Bu iki transkripsiyonel ünite sırasıyla P2 ve P3 promotörleri tarafından çalıştırılmakta ve zıt yönlerde kopyalanmaktadır (Novick ve ark 1995). *agrD*, membranla ilişkili bir taşıyıcı protein olan *agrB* tarafından hücre dışına taşınan AIP (Otoindükleyici Peptid) dizisini içerir (Kavanaugh ve ark 2007). AIP, *agrA*'nın fosforilasyonuna yol açan, membrana bağlı bir histidin kinaz olan *agrC*'nin ligandıdır. *agrA*'nın aktifleştirilmiş formu, P2 ve P3 promotörlerini yukarı regüle ederek, *S. aureus*'ta gen düzenlemesinin hücre içi efektörü olan daha fazla RNAII ve RNAIII'ün üretilmesine yol açarak olumlu bir geri bildirim döngüsüne neden olmaktadır (Koenig ve ark 2004). *agr*'nin ekspresyonu birçok trans aktive edici modülatör [Sar protein ailesi, σ B, SrrAB (Staphylococcal respiratory response AB) ve *rot* (repressor of toxins, toksin baskılayıcı; Sar ailesinin bir üyesi)] tarafından modüle edilmektedir (Pragman ve ark 2004). *agr* sistemi uyarıldığında RNAIII, *rot*'un translasyonel baskılanmasına aracılık etmektedir (Boisset ve ark 2007). Daha da önemlisi, tüm bu düzenleyici unsurlar çeşitli çevresel streslere ve uyaranlara (yüksek sıcaklık, alkali pH, yüksek tuzluluk, katabolitler, anaerobik ve hipoksik koşullara) yanıt vermektedir (Mashruwala ve Boyd 2017). Tüm bu mekanizmalar, enterotoksinler gibi salgılanan virülans faktörlerin transkripsiyonunun artmasına ve hücre duvarı proteinlerini kodlayan bir dizi genin transkripsiyonunun azalmasına yol açmaktadır (Dunman ve ark 2001). SEB, SEC ve SED'in *agr* sistemi tarafından kısmen düzenlendiği ve ayrıca bağımsız olarak da üretilbildiği ifade edilmektedir (Yarwood ve Schlievert 2003).

1.9.2. Klasik Olmayan Enterotoksinlerin Düzenlenmesi

Klasik enterotoksinlerin çoğundan farklı olarak, SEH ve SE/J haricinde yeni enterotoksinlerin düzenlenmesinin genellikle *agr*'den bağımsız olduğu ifade edilmektedir (Derzelle ve ark 2009). *ecg* operonunda (SEG, SEI, SEM, SEN, SEO ve SE/U) kodlanan enterotoksinlerin üretimi, eksponansiyel büyüme fazının ilk aşamalarında en yüksektir ve σB 'ye bağlıdır (Kusch ve ark 2011). Bunun yanında SEH üretimi bakteri gelişiminin post eksponansiyel aşamasında baskın ve *seh* promotörüne, σB 'ye, birkaç *Sar* homologuna ve *SaeR*'ye doğrudan bağlanma yoluyla toksin *rot* tarafından pozitif olarak düzenlendiği görülmektedir (Sato'o ve ark 2015). *SaeRS*'in SE/X üretimi üzerinde de olumlu bir etkisi olduğu belirtilmektedir (Langley ve ark 2017).

1.9.3. Gıda ile İlgili Faktörlerin Enterotoksin Üretimine Etkisi

Stafilokokal gıda zehirlenmesinde, genellikle *S. aureus*'un canlılığını koruyabilmesi ve gelişimini destekleyen amino asitlerin, düşük molekül ağırlıklı peptitlerin aracı olan et ürünleri, kremalar ve süt ürünleri gibi protein açısından zengin, işlenmiş gıdaların tüketimi ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (De Buyser ve ark 2001, Peles ve ark 2007).

Sıcaklığın jambon, süt ve yumurta ürünlerinde bakteriyel gelişimden ziyade hem profaj ilişkili hem de profaj ilişkili olmayan enterotoksin sentezini etkilediği belirtilmektedir (Schelin ve ark 2011). Sıcaklığın, SEA üretimi üzerindeki etkisinin, mevcut profaj varyantına bağlı olarak değişebileceği ifade edilmiştir. Genel olarak, gıdalarda SEA üretimi 10°C ile 45°C arasında gerçekleşmektedir. Bu sıcaklık aralığında sıcaklığın yükselmesiyle birlikte toksin üretimi de artış göstermektedir (Tsutsuura ve ark 2013).

S. aureus'un, anaerobik gelişme koşullarıyla karşılaştırıldığında aerobik koşullar altında pH değişimine karşı daha yüksek bir toleransa sahip olduğu görülmektedir. Gıdalarda SE üretimi için pH aralığı 5-9,6 olup optimum pH değeri 7 ile 8 arasındadır. Laktik asidin özellikle *agr*'ye bağımlı toksinlerin (SEB, SEC ve SED) oluşumunu engellediği ifade edilmektedir (Schelin ve ark 2011).

S. aureus'un gıdalardaki enterotoksin üretimi için gerekli optimum a_w 'nin alt limiti 0,86'dır. SEB ve SEC bu parametreye daha duyarlıdır. Bunun yanında NaCl

konsantrasyonunun üst sınırı %12'dir (Schelin ve ark 2011). Hafif NaCl stresi (%2) faj indüksiyonuna ve bunun sonucunda gıdada SEA üretiminde artışa yol açabilmektedir. Tablo 1.5.'te *S. aureus* gelişimi ve enterotoksin üretimini etkileyen faktörler özetlenmektedir.

Tablo 1.5. *S. aureus* gelişimi ve SE üretimini etkileyen faktörler.

Faktörler	S. aureus Gelişimi		SE Üretimi		Kaynaklar
	Optimum	Aralık	Optimum	Aralık	
Sıcaklık	35-41°C (37°C)	6-48°C ^a	34-40°C	10-46°C	Schelin ve ark 2011, Le Loir ve ark 2003
pH	6,0-7,5 ^b	4,2-9,8	7,0-8,0	5,0-9,6	Schelin ve ark 2011, Le Loir ve ark 2003
a _w	0,98	0,83 ile >0,99 (a)	0,98 ile >0,99	0,86 ile >0,99	Anonim 2011, Baird Parker 2000, Jay ve ark 2005
		0,90 ile >0,99 (an)		0,92 ile 0,99 (an)	Anonim 2011, Baird Parker 2000
Tuz (%)	0	0-20	0	0-12	Le Loir ve ark 2003
Eh	>+200mV	-200 ile >+200 mV	>+200m	+100 ile >200 mV	Anonim 2011
Atmosfer	Aerobik	Aerobik/anaerobik ^c	Aerobik (%5-20 O ₂)	Anaerobik/aerobik ^c	Anonim 2011

(a) aerobik, (an) anaerobik

^a NaCl, monosodyum glutamat ve soya sosu üst gelişim limitini 44°C'nin üzerine çıkarır.

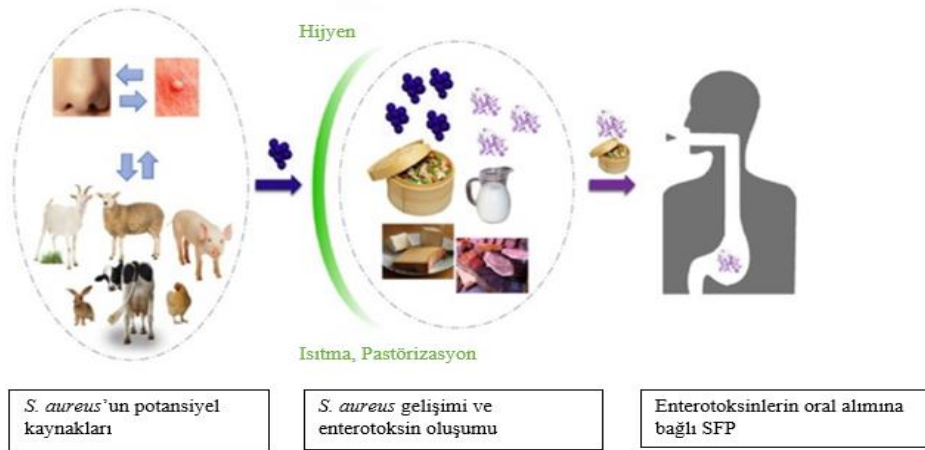
^b *S. aureus*'un gelişimi laktik fermantasyon sırasında laktik asit, hidrojen peroksit ve bakteriyosin üretimi nedeniyle engellenebilir.

^c Yüksek CO₂ konsantrasyonları hücre gelişimini azaltır, yüksek oksijen konsantrasyonları toksin üretimini artırır.

1.10. Hastalık ve Semptomlar

SFP, mikroorganizmanın gelişimi sırasında gıdada önceden oluşan bir veya daha fazla stafilokok enterotoksininin yeterli miktarda tüketilmesinden kaynaklanmaktadır (Fetsch ve Johler 2018). Stafilokok toksini enterotoksindir ve gastroenteritise sebep olmaktadır. Sağlıklı bir insanda toksinin etkisinin görülebilmesi için bir gram veya mililitresinde 10⁶ veya 10⁷ canlı bakteri hücrelerinin gelişim göstermiş olduğu 100-200 ng toksin içeren gıdayı tüketmesi gerekmektedir. Çocuk, yaşlı ve hasta bireyler gibi predispoze gruplarda daha az düzeylerdeki toksin maruziyeti de klinik bulguların ortaya çıkmasına yeterli olabilmektedir. Toksin bu şekilde alındıktan sonra midedeki vagus sinirlerini uyararak şiddetli şekilde kusmaya neden olmaktadır (Ray ve Bhunia 2016).

Semptomların ortaya çıkış süresi 30 dakika ile sekiz saat aralığında görülmektedir. Bu süre, tüketilen toksin miktarına, etki derecesine ve kişinin direncine bağlı olarak değişmektedir. Semptomlar bir veya iki gün içerisinde sona ermektedir. SFP, genellikle ölümcül olmamaktadır. En yaygın semptomlar toksinin otonom sinir sistemini uyarması ile ağızda sulanma, mide bulantısı, kusma, karın krampları ve ishaldir. Baş ağrısı, ürperme, terleme ve su kaybı ise ikincil semptomlar olarak ortaya çıkmaktadır (Ray ve Bhunia 2016, Bhunia 2018). Stafilokokal intoksikasyon; apse, stafilokokal haşlanmış deri sendromu, impetigo ve selülit gibi cilt enfeksiyonlarına; şiddetli enfeksiyonlarda ise yaşamı tehdit edebilen endokardit, osteomyelit, toksik şok sendromu, sepsis, yüksek ateş, zatürre ve ani bebek ölümü sendromuna neden olmaktadır. Hastalık kendi kendini sınırlayarak 24-48 saat içerisinde düzelebilmektedir. Enterotoksinin aerosol maruziyetinde ise ani ateş, titreme, baş ağrısı ve öksürük ortaya çıkmaktadır. Ateş birkaç gün, öksürük 10-14 gün sürebilmektedir (Bhunia 2018). Stafilokokal gıda intoksikasyonu Şekil 1.10.'da belirtilmektedir.



Şekil 1.10. Stafilokokal gıda intoksikasyonuna genel bakış (Fetsch ve Johler 2018).

1.11. S. aureus ve SE'lerin Tespit Yöntemleri

1.11.1. S. aureus'un Fenotipik Yöntemlerle Tanımlanması ve Karakterizasyonu

Kültüre Dayalı Yöntemler ve Biyokimyasal Testler

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında bakteriyel tanımlama genel olarak mikroorganizmanın izolasyonu ve özelliklerinin fenotipik analizi ile

gerçekleştirilmektedir. Stafilocoklar, Baird Parker Agar (BPA) ve Mannitol Salt Agar (MSA) gibi *Staphylococcus* cinsinin üyelerini seçmek için seçici ve diferansiyel besiyerleri kullanılarak gıdalardan izole edilebilmektedir (da Cunha 2018).

BPA, Baird Parker tarafından geliştirilmiş olup lityum klorür, potasyum tellürit ve yumurta sarısı içermektedir (Baird Parker 1962, Baird Parker ve Davenport 1965). Tuz ve potasyum tellüritin varlığı, tellüriti azaltarak siyah koloniler oluşturan *Staphylococcus* cinsini seçmektedir. Besiyeri, yumurta sarısındaki lipitleri ve lesitini parçalayan koagülaz pozitif stafilocok suşları tarafından lipaz ve lesitinaz üretiminden kaynaklanan ikili bir hale oluşumuyla farklılaşmaktadır. Gıdalardaki stafilocokların sayımı için BPA'nın kullanıldığı bir ISO (International Organization for Standardization, Uluslararası Standartlar Organizasyonu) yöntemi bulunmaktadır (ISO 6888-1, 2021).

S.aureus'un izolasyonu için yaygın kullanılan bir diğer besiyeri de %7,5 NaCl varlığı nedeniyle diğer bakterilerin üremesini engelleyen MSA'dır. *S. aureus*, mannitolü fermente ederek besiyerinde sarı koloniler oluşturmaktadır. Aynı zamanda kanlı agar, *Staphylococcus* spp. izolasyonu için sıklıkla kullanılmaktadır. *S. aureus* kanlı agarda hemolitik aktiviteyi gösteren bir hale ile çevrelenmiş sarı, dairesel ve orta büyüklükte koloniler oluşturmaktadır. Besiyerlerinde elde edilen tipik koloniler, saflıklarını belirlemek, morfolojilerini ve spesifik renklerini gözlemek için Gram boyamasına tabi tutulmaktadır. Bu özelliklerinin doğrulanmasının ardından izolatlara katalaz ve koagülaz testleri uygulanmaktadır (da Cunha 2018).

Serbest koagülazın saptanmasına yönelik tüp koagülaz testi, *S.aureus* ve diğer koagülaz pozitif stafilocokların tanımlanmasında altın standart olmaya devam etmektedir. Tüp koagülaz testi, *S.aureus*'u tanımlamak için yeterli olmakla birlikte *S.aureus*'un diğer koagülaz pozitif stafilocokların da bulunabileceği hayvansal kaynaklı gıdalardan izole edilen türlerden ayrımının yapılmasında suşların şeker fermantasyonu (trehaloz, maltoz, mannitol, ksiloz) ve aseton üretimi gibi biyokimyasal özelliklerinin test edilmesi de önemlidir (da Cunha 2018).

Otomatik Sistemler

Biyokimyasal testlere dayalı otomatik sistemler ve ticari kitler günümüzde hem rutin analizlerde hem de araştırma laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ticari API Staph sistem kiti (bioMérieux) *Micrococcus* spp. ve *Staphylococcus* spp.

tanımlanması için kullanılmaktadır. Kitte biyokimyasal reaksiyonlar 37°C’de 18-24 saat inkübasyondan sonra okunmaktadır. Her bir mikroorganizma için yedi haneli bir profil numarası oluşturulmakta ve bu numara daha sonra veri tabanında tanımlanabilmektedir. Bununla birlikte, kitin koagülaz reaksiyonunu test etmemesi sebebiyle suşların *S.aureus* olarak yanlış pozitif sınıflandırılması da oluşabilmektedir (da Cunha 2018).

Mikroorganizmaların tanımlanması ve duyarlılık testi için 1970’lerde ortaya çıkan diğer bir otomatik sistem de VITEK1 sistemidir (bioMérieux). VITEK1 sistemi kullanılarak *Staphylococcus* spp. tanımlanmasına ilişkin yapılan bir çalışmada, duyarlılık %84,2 ve özgüllük %100 olarak tespit edilmiştir. Tüm *S. aureus* izolatlarının doğru tanımlanmasına rağmen, VITEK1 sisteminin CoNS türlerini tanımlamada başarısız olduğu bildirilmektedir (Ferreira ve ark 2012).

Matris Destekli Lazer Desorpsiyonu/İyonizasyonu Uçuş Süresi (MALDI-TOF)

Mikroorganizmaların tanımlanması amacıyla protein profil analiz tekniklerinin son yıllarda sıklıkla kullanılmaya başlandığı bilinmektedir. Kütle spektrometrisi, bilinmeyen bileşiklerin tanımlanmasında, bilinen bileşiklerin miktarının belirlenmesinde, moleküllerin yapı ve kimyasal özelliklerinin aydınlatılmasında kullanılan etkin bir analitik tekniktir. Temel olarak bu teknik, bir numunenin atomlarının veya moleküllerinin iyonlaştırılması, bunların kütle-yük oranlarına göre ayrılması, tanımlanması ve miktarının belirlenmesinden oluşmaktadır. Günümüzde biyomoleküllerin analizi için en yaygın kullanılan yöntemlerden biri Matris Destekli Lazer Desorpsiyonu/İyonizasyonu (MALDI), kütle spektrometresi (Mass spectrometry, MS) ve ardından TOF (uçuş süresi, time-of-flight) kütle analizöründe tespittir (Croxatto ve ark 2012). Ekipman maliyetleri yüksek olsa da MALDI-TOF MS düşük işletme maliyetleri ve kısa numune işleme süreleri sunmaktadır (da Cunha 2018).

MALDI-TOF MS yöntemiyle elde edilen veriler ile polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) ve dizileme gibi referans tanımlama teknikleri verileri arasında yüksek oranda uyumluluk belirlenmiştir. (Carbonnelle ve ark 2007, Dubois ve ark 2010). MALDI-TOF MS kullanımı zaman ve iş gücü açısından daha ekonomik ve kolaydır (da Cunha 2018).

Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

S. aureus'un antimikrobiyal duyarlılık testinde enfeksiyonların tedavisi için tercih edilen ilaçlara karşı duyarlılık söz konusudur. En yaygın kullanılan test yöntemleri arasında broth mikrodilüsyon veya ticari olarak pazarlanan malzeme ve cihazları kullanan hızlı otomatik cihaz yöntemleri yer almaktadır. Bunun yanında disk difüzyon yöntemleri de yaygın olarak kullanılmaktadır (Reller ve ark 2009). Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical And Laboratory Standards Institute, CLSI) tarafından *S. aureus*'ta direncin saptanması için önerilen referans yöntemler arasında agar veya broth dilüsyon yöntemi ve disk difüzyon yöntemi ile minimal inhibitör konsantrasyonlarının (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) belirlenmesi yer almaktadır (CLSI 2024).

1.11.2. *S. aureus*'un Genotipik Yöntemlerle Tanımlanması ve Karakterizasyonu

Moleküler teknikler, yüksek özgüllük ve duyarlılıkları nedeniyle mikroorganizmaların tanımlanmasında tercih edilen yöntemlerdir. Son yıllarda bu teknikler, daha kolay, ucuz ve hızlı testler olarak belirtilmektedir. Bazı durumlarda test sonuçları bir saat gibi kısa bir sürede alınabilmektedir. Tür düzeyinde tanımlanamayan veya fenotipik testlerle hatalı tanımlanan stafilokok suşları PCR, multipleks PCR, gerçek zamanlı PCR, DNA-DNA hibridizasyonu ve sekans tabanlı tanımlama sistemleri gibi genotipik tekniklerle doğru bir şekilde tanımlanabilmektedir (da Cunha 2018).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)/Gerçek Zamanlı Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR) Temelli Yöntemler

PCR'ın tanı laboratuvarlarında kullanılmaya başlanması önemli bir gelişme olmuştur. PCR temelli analizler, laboratuvar personelinin kültürü yapılamayan mikroorganizmaların yanı sıra hızlı veya yavaş üreyen organizmaları da tespit etmesine olanak sağlamaktadır (da Cunha 2018).

Multipleks PCR, tek bir reaksiyonda birden fazla patojenin tespit edilmesi için alternatif bir yöntemdir. Bu teknikte tek bir reaksiyonda her biri hedef olarak belirli bir patojene sahip birden fazla primer seti kullanılmaktadır. Nükleik asitlerin gerçek zamanlı olarak çoğaltılması, özellikle Real-Time PCR ile çeşitli mikroorganizmaların

analizlerine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Bunun yanı sıra kantifikasyona izin vererek daha hızlı sonuçlar ortaya konulmaktadır (da Cunha 2018).

SE'lerin Tespiti

SE'ler, hayvan besleme analizleri ile 200 ng veya daha fazla miktarlarda tespit edilebilse de daha düşük miktarlarda SE'lerin insanlarda emetik bir tepki ortaya çıkardığı rapor edilmiştir (Hennekinne ve ark 2010). Bu nedenle, salgın araştırmalarında düşük ancak klinik olarak anlamlı miktarda SE'yi tespit edebilmek için daha hassas analizlere ihtiyaç duyulmaktadır. Ticari olarak temin edilebilen ters pasif lateks aglütinasyon (Reversed Passive Latex Agglutination, RPLA) ve enzime bağlı immünosorbent (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) veya enzime bağlı floresan analiz (Enzyme Linked Fluoroimmuno Assay, ELFA) kitleri, SEA-SEE'yi taramak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Tablo 1.6.).

Tablo 1.6. SE tespiti için ticari olarak yaygın kullanılan ve temin edilebilen kitler (Fetsch ve Johler 2018).

Yaklaşım	Deneme Kiti	SE'lerin belirlenmesi ^a	Zaman ^b (saat)	Duyarlılık ^c (ng/mL)	Firma
RPLA	SET RPLA	SEA, SEB, SEC, SED	24	0,5	Oxoid
ELISA	RIDASCREEN® SET	SEA, SEB, SEC, SED, SEE	3	0,25	R-Biopharm
	3 M® TECRA® Staph Enterotoxins	SEA-SEE	4	0,5	3 M®
	Transia® plate SET	SEA-SEE	1,5	0,2	Raisio diagnostics
ELFA	VIDAS® SET2	SEA-SEE	1,5	0,25	bioMérieux

^a Bazı kitler klasik enterotoksinlerin (SEA-SEE) varlığına yalnızca evet/hayır yanıtı verirken, diğerleri örnekte hangi enterotoksinin mevcut olduğunu belirleyebilir.

^b Halihazırda ekstrakte edilmiş bir numunenin analizi için harcanan zaman

^c Hassasiyet, test edilen matrise ve kullanılan ekstraksiyon tekniğine bağlı olarak değişir.

Bu hızlı immünolojik testler, numunenin yalnızca sınırlı bir ön işleme tabi tutulmasını gerektirmekte, gözle veya bir fotometre kullanılarak kolayca okunmasına olanak tanımaktadır. Bununla birlikte, gıda matrislerinde ve özellikle peynirde tespit, düşük özgüllük ve duyarlılığın yanı sıra fosfataz ve peroksidaz gibi matris bileşenleri veya IgG'nin protein A tarafından spesifik olmayan bağlanması nedeniyle yanlış

pozitif sonuçlardan dolayı sorun oluşturmaktadır. Belirli bir numunedeki toksinin saflaştırılması ve konsantrasyonu afinite kromatografisi ve diyaliz yoluyla sonuçları iyileştirmek için de kullanılabilmektedir (Fetsch ve Johler 2018). Son zamanlarda gıdalarda SE taramasına yönelik bir ISO yöntemi (ISO 19020, 2017) yayımlanmıştır. Yöntem; bir ekstraksiyon aşamasını, ardından diyaliz yoluyla konsantrasyonu ve SEA-SEE'nin immünoenzimatik tespitini içermektedir. SE genlerinin tespiti, SE'lerin gıda matrisindeki ekspresyonu hakkında bilimsel bir veri sunmazken, sıklıkla immünolojik testleri tamamlamak için kullanılmaktadır. Ticari olarak temin edilebilen immünolojik sistemler şu anda yalnızca SEA-SEE taramasını mümkün kılmakta ve yeni tanımlanan SE'leri tespit edememektedir (Fetsch ve Johler 2018). SE genlerinin PCR, tüm genom dizilimi veya DNA mikrodizi analizi ile saptanması son derece yararlı araçlar olabilmektedir. Japonya'da sütlerin neden olduğu büyük bir SFP salgınında gösterildiği gibi mikroorganizmanın kendisi ısıl işlemle etkisiz hale getirilmiş olsa bile, doğrudan gıdadan ekstrakte edilen DNA'yı kullanan PCR hala başarılı olabilmektedir (Ikeda ve ark 2005). Bununla birlikte, bir SE geninin varlığı gıda matrisinde SE oluşumunu kanıtlamadığı için sonuçların dikkatli bir şekilde ele alınması gerekmektedir. Aynı zamanda SE genleri, hedef genin tüm alelik varyantlarına bağlanabilen primerlerin aranmasını zorlaştıran yüksek derecede dizi varyasyonu sergilemektedir (Johler ve ark 2016a).

1.12. Önleme ve Kontrol Tedbirleri

Stafilokoklar her yerde bulunabilen ve çevreden elimine edilemeyen organizmalardır (Bergdoll ve Lee Wong 2006). Stafilokokal gıda zehirlenmesine neden olan faktörler arasında yetersiz soğutma veya ısıl işlem; personel kaynaklı kontaminasyon ve gıdaları bakteri gelişim sıcaklıklarında tutma yer almaktadır (Landgraf ve Destro 2013).

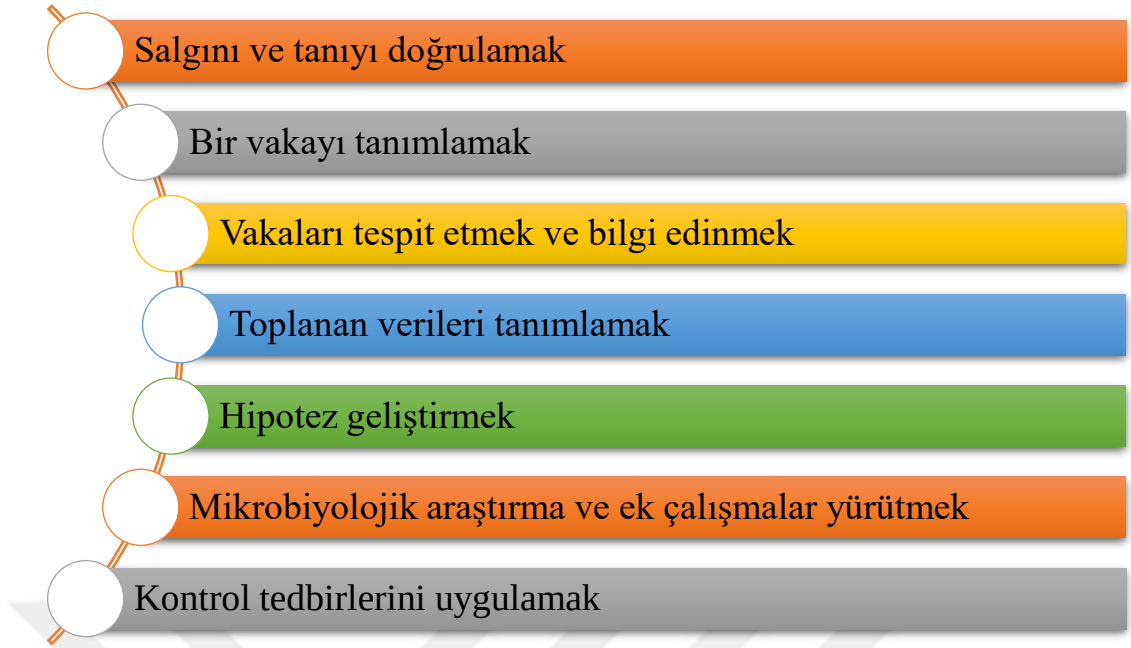
Gıda kaynaklı hastalıkların önlenmesinde tüm gıda işleme personelinin iyi hijyen uygulamaları konusunda eğitimlerinin sağlanması büyük önem taşımaktadır (Argaw ve Addis 2015). Stafilokokal intoksikasyonların önlenmesi, çeşitli kontaminasyon yollarının engellenmesine yönelik stratejiler gerektirmektedir. Temel olarak bu kontrol programları, *S. aureus* başlangıç sayısının azaltılmasını gerektirmektedir. Bu amaçla, kalitesi yüksek hammadde ve katkı maddelerini kullanmak, gıda hazırlama yerlerinde temizliğe dikkat etmek ve gıdaları hazırlayan

kişilerin hijyene önem vermeleri gerekmektedir (Kadariya ve ark 2014, Ray ve Bhunia 2016). Aynı zamanda sağlık çalışanları ve gıda işleyicileri arasındaki kişisel hijyen uygulamalarının iyileştirilmesini, ekipmanların, yüzeylerin ve giysilerin dekontaminasyonunu, antibiyotiklerin etkin kullanımını, gıdaların uygun şekilde pişirilmesini, saklanması ve tarama programlarını içermektedir (Pinchuk ve ark 2010). Gıda işleme, pişirme, depolama ve servis sırasında önleyici tedbirlerin alınması kontaminasyonun önlenmesine veya bakteri yükünün azaltılmasına yardımcı olmaktadır (Thapaliya 2019).

S. aureus spor oluşturmadığı için gıdaların ısıtılma tabi tutulması etken eliminasyonunda önemlidir (Le Loir ve ark 2003). *S. aureus*'un gelişim sıcaklığı 6°C ile 46°C arasında olduğu için gıdalar 60°C'nin üzerinde pişirilmeli, 5°C'nin altında saklanmalı ve hızlı bir şekilde servis edilmelidir (Thapaliya 2019). Gıdalar tüketilinceye kadar mikroorganizmaların gelişim göstereceği sıcaklıkta uzun süre bekletilmemelidir. Toksin oluşumu gerçekleşikten sonra uygulanacak ısıtma işlemlerin, ilgili gıda kaynaklı intoksikasyon tablosunu ve potansiyel zararı önleyemeyeceğinin bilinmesi gerekmektedir (Argaw ve Addis 2015, Ray ve Bhunia 2016). SE'ler yeniden aktif hale gelebildiği için soğuk zincir veya tam ısı inaktivasyonunun sürdürülmesi bu açıdan önem kazanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) ve ABD Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) tarafından oluşturulan tehlike analizi ve kritik kontrol noktaları (Hazard Analysis Critical Control Point, HACCP), iyi üretim uygulamaları (Good Manufacturing Practice, GMP) ve iyi hijyen uygulamaları (Good Hygiene Practices, GHP) gibi mikrobiyolojik kılavuzların uygulanması, gıdalarda *S. aureus* kontaminasyonunun önlenmesinde fayda sağlamakta ve koruyucu hekimliğe hizmet etmektedir (Syne ve ark 2013, Kadariya ve ark 2014, Thapaliya 2019).

1.13. Salgın Araştırmaları

Genel olarak, Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) tarafından önerilen bir salgın araştırmasının on adımı gibi köklü yaklaşımlar, SFP salgınlarına uygulanabilmektedir (Anonim 2017). Salgın araştırma adımları Şekil 1.11.'de gösterilmektedir.



Şekil 1.11. Salgın araştırmasının adımları (Anonim 2017).

SFP salgınları, bakterilerin ısı ile inaktive edilmesinden sonra SE'lerle kontamine olmuş gıdaların tüketilmesinden kaynaklanmaktadır. SE'lerin üretiminin kontrol altına alınması SFP'nin önlenmesinde kritik öneme sahiptir (Salgado-Pabón ve Tran 2021). Bununla birlikte, SFP salgınları çoğu zaman dikkate alınması gereken belirli zorluklarla birlikte ortaya çıkmaktadır. Karakteristik klinik semptomlar nedeniyle şüpheli bir SFP salgınında yetkili makamlar, gıda, gıda personeli ve hastalardan alınacak numunelerin yanı sıra hasta ve hasta olmayan kişiler hakkında da veri sağlayan kapsamlı anketler uygulamalıdır. Bakteriyel izolasyon ve tanımlamayı, örneğin tam genom dizilimi, DNA mikrodizi profili oluşturma veya Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi kullanılarak hızlı ve kapsamlı tür tanımlaması ve karakterizasyonu sağlanmalıdır (Johler ve ark 2013, Mossong ve ark 2015, Johler ve ark 2016b). En basit yöntem olarak gıdada $\geq 10^5$ kob/g-ml sayılarında bulunan bir enterotoksijenik *S. aureus* suşu, bir hasta numunesinden alınan bir izolatla eşleştirilebilmekte ve yüksek düzeyde SE'lerin tespit edilmesiyle salgının nedeni olduğu ilgili gıdanın yanı sıra uygun anket sonuçlarıyla doğrulanmaktadır. SFP salgın araştırmaları çoğu zaman çok daha zor olmaktadır. Anket verileri eksik, güvenilir (örn., hatırlama yanlılığı) veya kullanılamaz durumdadır. Stafilocokların hasta örneklerinden izolasyonu başarısız olabilmekle birlikte örnekleme için yeterli gıda örneği de bulunamayabilmektedir. Isıtılmış gıdalar veya uzun süre olgunlaşmış

peynirlerle ilişkili salgınlarda, mikroorganizmanın kendisini inaktive eden sonraki gıda işleme adımlarından önce gıdada yüksek miktarda oldukça stabil SE'ler üretilmiş olabilmektedir (Asao ve ark 2003, Ostyn ve ark 2010, Johler ve ark 2015b). Bu nedenle, emetik olarak aktif SE'lerin yüksek seviyeleri, neden olan suşun izolasyonuna izin vermeyen gıdalarda hala mevcut olabilir. Bununla birlikte, *S. aureus* sıklıkla enterotoksin genleri taşıdığından, gıda örneklerinden ve nazal sürüntülerden çok sayıda farklı enterotoksijenik *S. aureus* suşunun izolasyonu mümkündür. Aynı zamanda *S. aureus* dışında enterotoksijenik stafilokoklar da tespit edilebilmektedir. Son teknoloji ekipmanların yardımıyla bile bu suşlardan hangisinin veya hangi kombinasyonunun SFP'ye yol açan bir veya daha fazla SE üretilmesine katkıda bulunduğunu belirlemek oldukça zor veya imkansızdır. Kısıtlı kaynaklarda suşları ayırt etmek için koagülaz pozitif izolatların *spa* tiplmesi kullanılabilmektedir (Frenay ve ark 1996, Aires-de-Sousa ve ark 2006). Enterotoksin gen profili daha sonra PCR ile belirlenebilmekte ve mümkünse gıdadaki SE tespit sonuçlarıyla eşleştirilmektedir. Birçok salgında, hem klasik hem de yeni tanımlanmış enterotoksin genlerini barındıran suşlar tespit edilebilmektedir. Yeni tanımlanan SE'ler için ise günümüzde ticari olarak temin edilebilen immünolojik tespit yöntemleri bulunmamakta, SE tespiti yalnızca klasik SE'ler için mümkün olmaktadır. Bu nedenle, gıdada/dışkıda küçük miktarlarda klasik SE tespit edilse ve yeni tanımlanan SE'leri kodlayan genler mevcut olsa bile muhtemelen bu enterotoksinlere bir salgın adı verilecektir. Bununla birlikte, hiçbir klasik SE tespit edilmezse, birçok araştırmacı yeni tanımlanan SE'lerin SFP salgınları ile ilgisini sorguladığından, salgın muhtemelen rapor edilmeyecektir. Bu zorluklara ilişkin artan farkındalık, salgın raporlamasının iyileştirilmesini sağlamakta ve SFP salgınlarına ilişkin sınırlı mevcut bilgiyi önemli ölçüde genişletebilmektedir (Fetsch ve Johler 2018).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Araştırmada, deneysel olarak üretimi gerçekleştirilen sucuklarda hammadde olarak kullanılan et ve yağ Konya’da faaliyet gösteren bir kasaptan; baharatlar ve sucuk kılıfları ise Prof. Dr. O. Cenap TEKİNŞEN Et ve Süt Ürünleri Araştırma-Geliştirme-Uygulama Ünitesi’nden temin edildi.

2.1.1. Mikrobiyolojik Analizlerde Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar

Araştırmada mikrobiyolojik analizler için kullanılan besiyerleri Tablo 2.1.’de verilmektedir.

Tablo 2.1. Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan besiyerleri.

• Maximum Recovery Diluent (MRD, Merck, 1.12535.0500) • Baird Parker Agar Base (BPA, Merck, 1.05406.0500) • Brain Heart Infusion Broth (Merck, 1.10493.0500) • Tryptic Soy Broth (Merck, 1.05459.0500) • Tryptic Soy Agar (Merck, 1.05458.0500) • DNase Agar (Oxoid, CM0321) • Mannitol Salt Agar (Merck, 1.05404.0500)

Maximum Recovery Diluent (MRD, Merck, 1.12535.0500)

MRD, 9,5 g hassas terazide (AND EK-600H) tartılarak 1 L distile su içerisinde çözündürüldükten sonra pyrex şişelere porsiyonlandı. 121°C’de 15 dk otoklavda (WiseClave, Daihan Scientific, DH-WAC 010080) sterilize edildikten sonra kullanıldı.

Baird Parker Agar Base (BPA, Merck, 1.05406.0500)

Besiyerinden 58 g alınarak 950 ml distile su içerisinde çözündürüldü. 121°C’de 15 dk otoklavda sterilize edildikten sonra 50°C’ye kadar soğutularak üzerine 50 ml Egg Yolk Tellürite Emulsion (Merck, 1.03785.0001) ilave edilerek karıştırıldı. Besiyeri steril petrilerdeki 1 ml örnek üzerine 10-15 ml miktarında dökülerek hazırlandı.

Egg Yolk Tellurite Emulsion (Merck, 1.03785.0001)

Petrilere dökülmeden önce yaklaşık 50°C'ye soğutulmuş 950 ml BPA'a 50 ml ilave edildi.

Brain Heart Infusion Broth (BHI, Merck, 1.10493.0500)

Stok yapmak için kullanılan Broth'tan 37 g alınarak 1 L distile su ile çözündürüldü. Cryotüplere porsiyonlayıp 121°C'de 15 dk otoklavda sterilize edildikten sonra kullanıldı.

Tryptic Soy Broth (TSB, Merck, 1.05459.0500)

Tryptic Soy Broth'tan 30 g tartılarak 1 L distile suda çözündürüldü. Tüplere porsiyonlanarak 121°C'de 15 dk otoklavda sterilize edilerek kullanıldı.

Tryptic Soy Agar (TSA, Merck, 1.05458.0500)

Besiyerinden 40 g tartılarak 1 L distile su ile çözündürüldükten sonra 121°C'de 15 dk otoklavda sterilize edilerek petrilere döküldü. Şüpheli olarak kabul edilen *S. aureus* kolonileri Tryptic Soy Agar'a geçilerek 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası gelişen koloniler morfolojik ve biyokimyasal testler yapılarak tanımlandı.

DNase Agar (Oxoid, CM0321)

DNase agar besiyerinden hassas terazide 39 g tartılarak 1 L distile su ile çözündürüldü. 121°C'de 15 dk otoklavda sterilize edildikten sonra 50°C'ye kadar soğutularak petrilere 15-20 ml olacak şekilde döküldü.

Mannitol Salt Agar (MSA, Merck, 1.05404.0500)

Besiyerinden 108 g tartılarak 1 L distile su ile çözündürüldü. 121°C'de 15 dk otoklavda sterilize edildikten sonra 50°C'ye kadar soğutularak petrilere 15-20 ml olacak şekilde döküldü.

Coagulase Rabbit Plasma with EDTA (Merck, 1.13306.0001)

Bir kutuda 6 şişe bulunmaktadır. Her bir şişe 3-5 ml steril distile su kullanılarak çözündürüldü. Daha sonra kullanıma hazır hale gelen plazmalar ile saf broth kültür karıştırılarak tüpte koagülaz testi uygulandı.

Hidrojen Peroksit %30 (H₂O₂, Merck, 1.08597.1000)

Katalaz testi için gerekli olan %3'lük H₂O₂ hazırlanması için kullanıldı. Bunun için %30'luk H₂O₂'den 10 ml alınıp 90 ml steril distile su ile sulandırıldı.

Gliserol (VWR, 24388.320)

Fermente sucuklardan izole edilen suşların -20°C'de saklanması için %20'lik gliserol+BHI Broth hazırlandı.

2.1.2. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Kimyasallar

DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallar Tablo 2.2.'de gösterilmektedir.

Tablo 2.2. DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallar.

•	EDTA (VWR Chemicals, Leuven, Belgium, 20302.293 pH 8)
•	Tris-EDTA (TE; Sigma-Aldrich, 77-86-1, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)
•	Lizis tamponu (100 mM Tris-HCl pH 8, 200 mM NaCl, %0,1 sodyum dodesil sülfat, %1 Triton X-100, 5 mM EDTA pH 8)
•	Proteinaz K (Zymo, D3001-2; 20 mg/ml, Zymo Research, Irvine, CA, USA)
•	Fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1, SigmaAldrich, A2279, St Louis, MO, USA)
•	Sodyum asetat (3M, pH 5,2)

2.1.3. PCR Analizinde Kullanılan Gereçler

Primerler

Liyofilize olarak gelen primerler firma tarafından belirlenen hacimlerde DNase, RNase free steril su ile sulandırıldı. Tez çalışmasında kullanılan primerler Tablo 2.3.'te verilmektedir.

Tablo 2.3. Tez çalışmasında kullanılan primerler.

Gen	Primer sekansı (5' - 3')	Amplikon büyüklüğü (bp)	Kaynak
<i>sea</i>	F: TTGGAAACGGTAAAACGAA R: GAACCTTCCCATCAAAAACA	120	Johnson ve ark (1991)
<i>seb</i>	F: TCGCATCAAACGACAAACG R: GCAGGTACTCTATAAGTGCC	478	Johnson ve ark (1991)
<i>sec</i>	F: GACATAAAAGCTAGGAATTT R: AAATCGGATTAACATTATCC	257	Johnson ve ark (1991)
<i>sed</i>	F: CTAGTTTGGTAATATCTCCT R: TAATGCTATATCTTATAGGG	317	Johnson ve ark (1991)
<i>see</i>	F: TAGATAAAGTTAAAACAAGC R: TAACTTACCGTGGACCCTTC	170	Johnson ve ark (1991)
<i>seg</i>	F: AAGTAGACATTTTGGCGTTCC R: AGAACCATCAAACCTCGTATAGC	287	Omoe ve ark (2002)
<i>seh</i>	F: GTCTATATGGAGGTACAACACT R: GACCTTTACTTATTTGCTGTC	213	Omoe ve ark (2002)
<i>sei</i>	F: GGTGATATTGGTGTAGGTAAC R: ATCCATATTCTTTGCCTTTACCAG	454	Omoe ve ark (2002)

Tris Asetik EDTA (TAE) Tamponu

PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde tampon sıvısı olarak Tris Asetik EDTA (TAE) kullanıldı. TAE tamponunun hazırlanmasında kullanılan kimyasallar Tablo 2.4.'te gösterilmektedir.

Tablo 2.4. TAE tamponunda kullanılan kimyasallar.

-
- Trizma Base (Applchem 2264.1000)
 - Glasiyel Asetik Asit (Merck 1.00063)
 - 0,5 M Ethylenedinitrilo tetraacetic acid (EDTA) (VWR, 20302.293)
 - 10 M Sodyum hidroksit (NaOH)
-

Kimyasallar karıştırılarak solüsyonun pH'sı 10 M NaOH ile 8,0'e ayarlandı. Elde edilen 50X konsantrasyonundaki TAE tamponu, 50 kat distile su ile sulandırılarak 1X konsantrasyonu elde edildi.

Jel Yükleme Solüsyonu (6X Loading Dye, Thermo Scientific, R1161)

Agaroz jel üzerine PCR ürünlerini yüklemek için kullanıldı. Kullanılincaya kadar -20°C'de saklandı.

100 bp DNA Ladder (Solis Biodyne, 0711800.2)

Elektroforez sonucu oluşan bantların uzunluğunun belirlenmesinde kullanıldı. Kullanılincaya kadar -20°C'de saklandı.

Agaroz (Sigma, A9539)

Hazır kimyasaldan %1,5'luk agaroz jel hazırlamak için 1,5 g agaroz (Sigma-Aldrich A9539) üzerine 100 ml 1X TAE ilave edildi ve mikrodalga fırında (Beko MD1505) tamamen çözününceye kadar ısıtıldı. Daha sonra sıvı durumdaki jel solüsyonu 50°C'ye soğutulduğunda 5 µl Ethidium Bromide (Sigma Life Science E7637-1G) ilave edildi.

2.1.4. Enterotoksin Üretiminin Tespit Edilmesinde Kullanılan Kimyasallar

ELISA test kiti, enterotoksijenik *S. aureus* toksinlerinin varlığı araştırılincaya kadar üretici firma direktiflerine uygun olarak 4°C'de muhafaza edildi. Kit içeriği Tablo 2.5.'te gösterilmektedir.

Tablo 2.5. ELISA kit içeriği.

İçerik	Hacim
Mikrotitre Plaka (Mikropleyt)	96 Kuyucuk
Pozitif Kontrol	2 ml
Yıkama solüsyonu (10X Konsantre) *	100 ml
Konjugat 1	11 ml
Konjugat 2	11 ml
Substrat/Kromojen	13 ml
Stop solüsyonu	14 ml

*: 10X Konsantre yıkama solüsyonu kullanımdan önce steril distile su ile 10 kat seyreltildi.

2.1.5. Referans Suşlar

Bu çalışmada, referans suş olarak SEA *S. aureus* ATCC 29213, enterotoksijenik özellikleri bilinen SEB *S. aureus* NCTC 10654 FDA 243, SEC *S. aureus* NCTC 10655 137, SED *S. aureus* NCTC 10656 494, SEE *S. aureus* FRI 918 suşları kullanıldı.

2.2. Yöntem

Bu çalışmada, deneysel olarak farklı oranlarda (%1, %1,5, %2, %2,5) tuz ilavesi yapılarak üretilen fermente sucuk numunelerinden alınan örnekler kullanıldı.

2.2.1. Deneysel Sucuk Üretimi

Sucuk üretim teknolojisinde ilk, hammadde olarak kullanılan etler *S. aureus* yönünden analize alındı. BPA besiyerinde ekimleri gerçekleştirilen etlerde herhangi bir üremenin olmadığı kontrol edildi. Toksin oluşturma yeteneğinin tespit edilmesi amacıyla farklı tuz oranları kullanılarak sucuk üretimleri gerçekleştirildi. Deneysel sucuk üretiminin formülasyonu Tablo 2.6.'da gösterildiği üzere ayarlandı. Üretimler 3 tekrar şeklinde yapıldı.

Tablo 2.6. Formülasyon (Tekinşen ve Doğruer 2000).

Et+Yağ Karışımı	88+12 kg
Sodyum nitrit	%0,015
Askorbik asit	%0,5
Şeker	%0,5
Sarımsak	%1,5
Kimyon	%1,5
Kırmızı biber (Acı)	%0,5
Kırmızı biber (Tatlı)	%1
Karabiber	%0,5
Yenibahar	%0,6

Sucuk hamuru hazırlandıktan sonra vakum poşetlere alınarak tuz oranları ve *S. aureus* enterotoksijenik suş ayırımına göre gruplandırıldı. Bir kontrol (K), beş deneme grubu (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) olmak üzere 6 grup sucuk numunesi hazırlandı. Her bir grup kendi içerisinde 4 farklı tuz oranı (%1, %1,5, %2, %2,5) içeren alt gruplara ayrılarak 0., 7., 14. ve 21. günlerde analizlere tabi tutuldu. Her bir grup için 4 numune 4 farklı günde (4*4) 16; 6 grup için toplam (16*6) 96 numune hem kimyasal hem de mikrobiyolojik yönden incelendi. Numunelerin sınıflandırılması Tablo 2.7.'de verilmektedir.

Tablo 2.7. Numunelerin sınıflandırılması.

Grup	Tuz Oranı (%)
Kontrol	1, 1,5, 2, 2,5
SEA	1, 1,5, 2, 2,5
SEB	1, 1,5, 2, 2,5
SEC	1, 1,5, 2, 2,5
SED	1, 1,5, 2, 2,5
SEE	1, 1,5, 2, 2,5

Farklı oranlarda ilave edilen tuz oranlarına göre oluşturulan deneme düzeneği Şekil 2.2.'de gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Sucuk hamurunun deneme düzeneği.

2.2.2. Numunelerin İnokülasyonu

Numunelere referans suşların inokülasyonu Yamazaki ve ark (2008)'nin prosedürünün modifikasyonu ile gerçekleştirildi. Hazırlanan sucuk numunelerinden 250 g steril stomacher poşetine alındı. Suşların 37°C'de 18-24 saatlik kültürlerinden TSB'ye geçilerek taze eksponansiyel üreme fazı yakalanmaya çalışıldı. McFarland değerlerine göre her suşun μ l olarak bakteri sayı değerleri ayarlandı.

Ekspansiyel üreme fazında bulunan yaklaşık 10^6 kob/g bakteri içeren kültür süspansiyonundan steril eppendorf tüplerine aktarıldı. 991 μ l MRD+9 μ l referans suş olacak şekildi her bir grup biyogüvenlik kabininde kontamine edildi. İnokülasyon gerçekleştirildikten sonra sucukların kılıflara dolumu gerçekleştirildi.

Sucuk üretiminde uygulanan işlem prosesleri Tablo 2.8.'de, üretimi gerçekleştirilen sucukların kabin içerisindeki görünümü ise Şekil 2.3.'te gösterilmektedir.

Tablo 2.8. Proseste uygulanan işlemler (Tekinşen ve Doğruer 2000).

	Sıcaklık	Rutubet	Hava Sirkülasyonu
0. gün	22-/+2°C	%95	0,5-0,8 m/sn
1. ve 3. gün	22-/+2°C	%90	0,5-0,8 m/sn
4. gün	22-/+2°C	%83	0,5-0,8 m/sn
5. ve 6. gün	18-/+2°C	%80	0,1-0,2 m/sn

Sonraki günlerde numuneler +4°C’de kabinde muhafaza edildi.



Şekil 2.3. Üretimi gerçekleştirilen sucukların kabindeki görünümü.

2.2.3. Kimyasal Analizler

Rutubet içeriği

Numunelerin rutubet miktarlarının tayini için nikel kaplarda tartılan 5 g sucuk numunesi 2 saat $105\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de etüvde kurutulduktan sonra desikatörde soğumaya bırakıldı. Soğuduktan sonra % rutubet değerleri hesaplandı (AOAC 2000, TSE 2001).

Su aktivitesi değeri

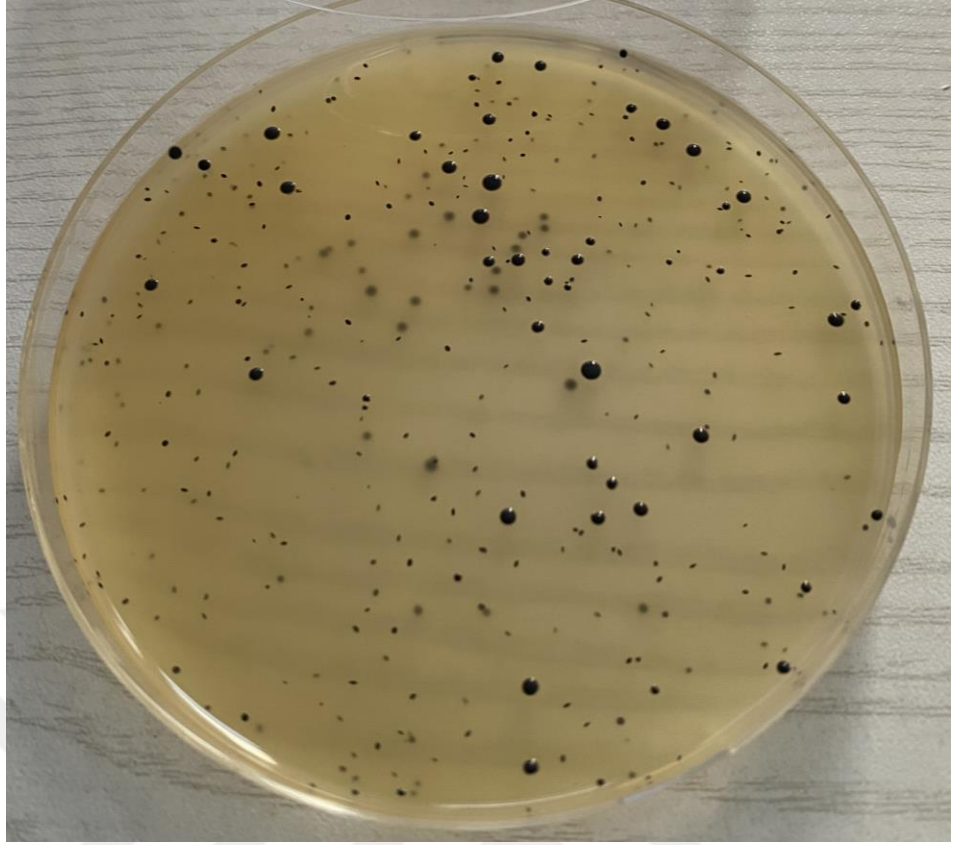
Örneklerin a_w değeri, a_w cihazı (Novacina, Labswift-aw) kullanılarak belirlendi. Cihaz kullanılmadan önce çözeltileri ile kalibre edildi. Örneklerin bulunduğu özel plastik kaplar cihazın ölçme kabineye yerleştirildikten sonra ölçüm gerçekleştirildi (Troller ve Christian 1978).

pH değeri

Homojen hale getirilmiş örneklerden 10 g tartılıp üzerine 100 ml saf su ilave edilerek homojenize edildikten sonra pH değerleri pH-metre (WTW, inolab 720) ile ölçüldü. pH metre kullanılmadan önce uygun tampon çözeltiler (pH 4.0 ve pH 7.0) ile kalibre edildi (AOAC 2000, TSE 2002).

2.2.4. Mikrobiyolojik Analizler

Üretimi gerçekleştirilen sucuk hamurundan aseptik koşullarda 10 g örnek alınarak 90 ml MRD solüsyonu eklendikten sonra 2 dk stomacher yardımıyla homojenize edildi. Bu homojenattan 1 ml alınarak 10^{-1} 'den 10^{-8} 'e kadar seri dilüsyonlar hazırlanarak BPA'a dökme plak yöntemiyle ekimler gerçekleştirildi. 37°C 'de 24-48 saat inkübasyona tabi tutuldu (Normanno ve ark 2005). Agar yüzeyinde 2-3 mm çapında gri-siyah etrafında zonlar bulunan koloniler *S. aureus* şüpheli olarak değerlendirildi (Şekil 2.4.).

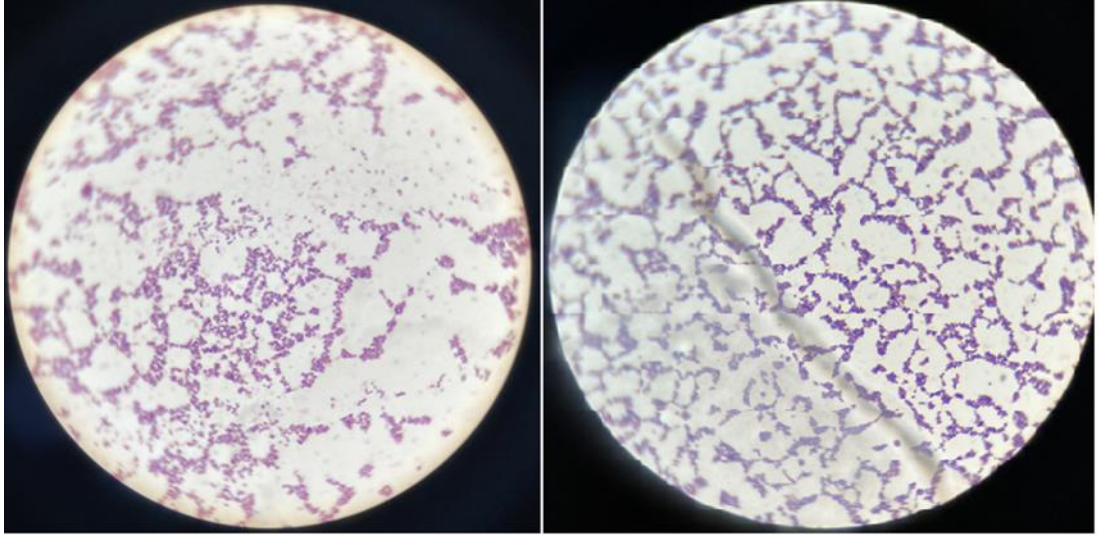


Şekil 2.4. *S. aureus*'un BPA'daki koloni formasyonu.

2.2.5. *S.aureus*'un İzolasyon ve İdentifikasyonu

Gram boyama

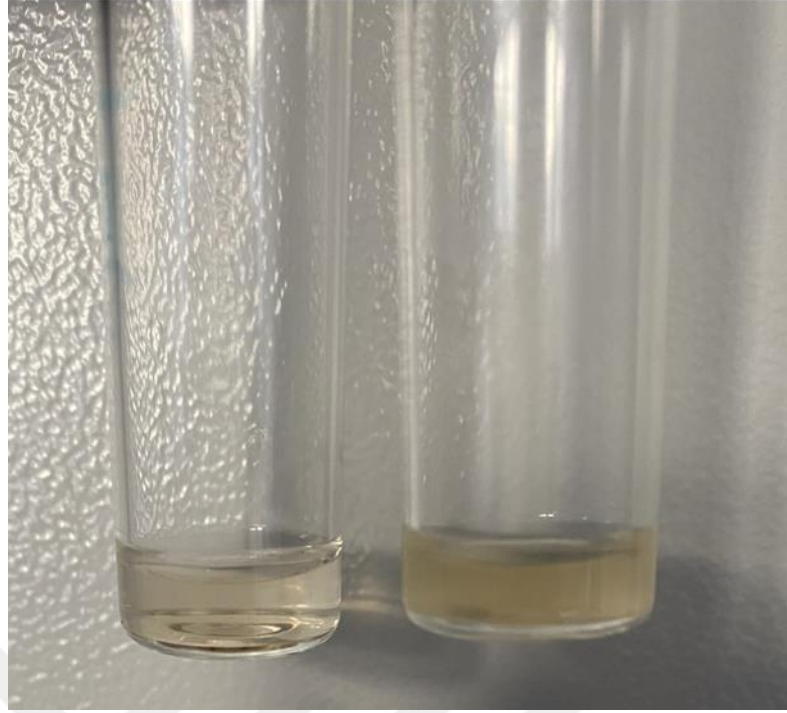
Lam üzerine distile su damlatılıp izolatlardan iğne uçlu özeye alınarak karıştırmak suretiyle preparat elde edildi. Preparat havada kurutulduktan sonra üç kez bek alevinden geçirilerek tespit edildi. Üzerine kristal violet boyası dökülerek 1-2 dk bekletilip distile su ile yıkama yapıldı. Daha sonra lügol çözeltisi dökülerek 1-2 dk bekletilip distile su ile yıkandı. Preparatın üzerine %96'lık etil alkol dökülerek 10 sn bekletilip dekolore olması sağlandı ve yine distile su ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra karbol fuksin boyasıyla 1 dk muamele edildi. Preparat distile su ile yıkanıp kurutuldu. İmmersiyon yağı damlatılarak mikroskop altında 100'lük objektifte incelendi. Üzüm salkımı görünümünde mavi-mor renkte görünen bakteriler şüpheli olarak değerlendirildi (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. *S. aureus*'un Gram boyama sonrası mikroskopik görüntüsü.

Tüpte koagülaz testi

Koagülaz testi için seçilen koloniler BHI Broth'a inoküle edilerek 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Bennett ve Lancette (1998) tarafından belirtilen yöntemle göre koagülaz testi yapıldı. Bu amaçla, öncelikle plazma (Lyophilized Coagulase Rabbit Plasma with EDTA, (Merck, 1.13306.0001) 3 ml steril distile su ile sulandırıldıktan sonra steril koagülasyon tüplerine 0,3'er ml aktarıldı. Daha sonra plazmaların üzerine test edilecek suşların 18-24 saatlik sıvı kültürlerinden 0,1 ml ilave edilip 37°C'de aerob koşullarda inkübasyona bırakıldı. İlk altı saat boyunca her 30 dk süre ile kontroller yapıldı ve pıhtılaşma oranları +1, +2, +3 ve +4 olarak değerlendirildi. Pıhtı gözlenen ve +3, +4 olarak değerlendirilen tüpler koagülaz pozitif olarak belirlendi. Koagülasyon olmayan veya yeterli oranda pıhtı şekillenmeyen tüpler ise inkübasyona bırakılarak 24 saat sonra tekrar kontrol edildi (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. *S. aureus*'un koagülaz pozitif görüntüsü.

Katalaz testi

Şüpheli koloni lam üzerine steril öze yardımıyla alındı. Kültür üzerine bir damla %3'lük H_2O_2 ilave edildi. Hava kabarcıklarının varlığı katalaz enziminin göstergesi olarak kabul edildi (Şekil 2.7., Amini ve ark 2011).

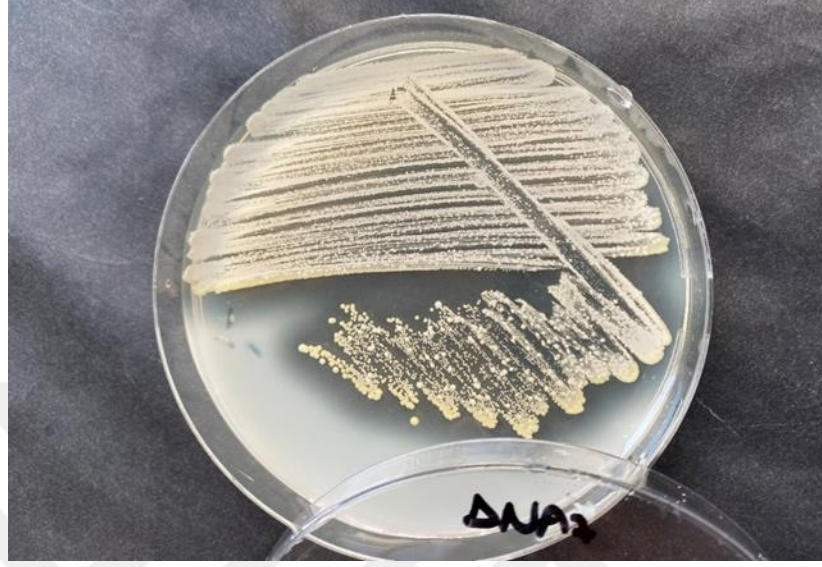


Şekil 2.7. *S. aureus*'un katalaz pozitif görüntüsü.

DNase testi

Bu test DNA'yı parçalayan DNase enzimi üreten *S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırmak için yapılmaktadır. Bu enzimin varlığını saptamak için DNA içeren DNase agar kullanılmaktadır. Bu amaçla öze yardımıyla TSA'da bulunan kültürden 9 ml BHI Broth içeren tüplere alınarak $37^{\circ}C$ 'de 18-24 saat inkübe edildi. Broth kültürden bir öze dolusu alınarak DNase agar içeren petrilere yayma plak yöntemiyle ekimler gerçekleştirilerek $37^{\circ}C$ 'de 24 saat inkübasyona bırakıldı.

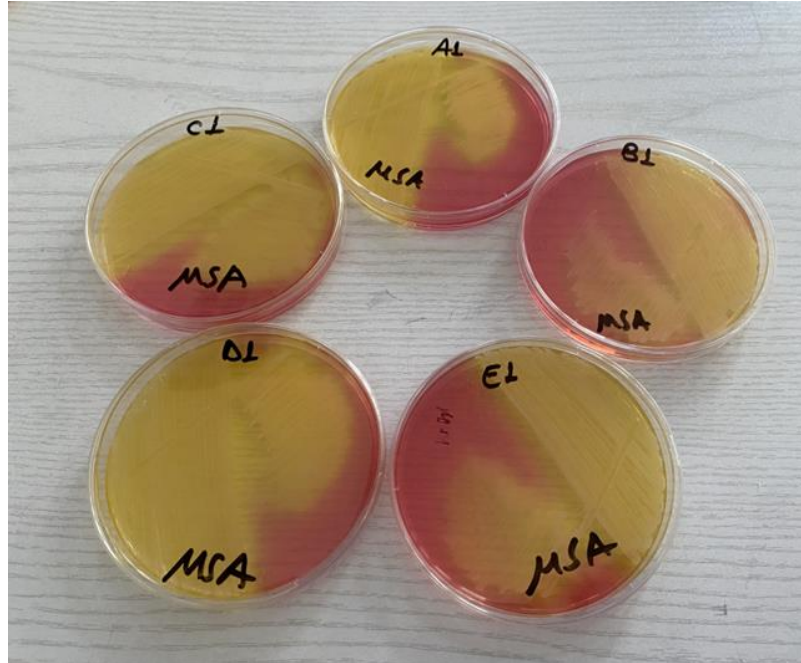
İnkübasyon sonrası üreyen koloniler üzerine besiyerinin üzerini tamamen kapatacak şekilde 1N HCl çözeltisi ilave edildi. Reaktifin besiyerinde emilmesi için beş dakika beklendi. Kolonilerin etrafında oluşan şeffaf zonlar pozitif, opak olanlar ise negatif olarak değerlendirildi (Şekil 2.8., Kateete ve ark 2010).



Şekil 2.8. *S. aureus*'un DNase agardaki görünümü.

Mannitol fermantasyon testi

BPA'da gelişen *S. aureus* izolatları MSA'a geçilerek 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Besiyerinin fenol kırmızısı renginin sarıya dönüşmesi mannitol fermantasyonu açısından pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. *S. aureus*'un MSA'daki görünümü.

2.2.6. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu Murphy ve ark (2002) protokolünün modifikasyonu ile yapıldı. 18 ml etilendiamintetraasetik asit (EDTA; VWR Chemicals, Leuven, Belgium, 20302.293, 0,5 M, pH 8) ve 12 ml Tris-EDTA (TE; Sigma-Aldrich, 77–86–1, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) 2 ml sucuk numunesi süzütüsüne ilave edilerek 15 dk oda sıcaklığında çalkalandı. Sonrasında 4,000 rpm’de 20 dk santrifüjlendi. Pelet 1 ml lizis tamponu (100 mM Tris-HCl pH 8, 200 mM NaCl, %0,1 sodyum dodesil sülfat, %1 Triton X-100, 5 mM EDTA pH 8) ve 15 µl Proteinaz K (Zymo, D3001–2; 20 mg/ml, Zymo Research, Irvine, CA, USA) içerisinde çözündürüldü ve gece boyunca 55°C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası çözeltiye 1 ml fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1, SigmaAldrich, A2279, St Louis, MO, USA,) ilave edildi ve 12,500 rpm’de 10 dk santrifüjlendi. Faz ayrımı sonrası üst faza 150 µl sodyum asetat (3M, pH 5,2) ve 400 µl etanol eklenerek santrifüj işlemi ile DNA’lar çöktürüldü. Çöken DNA’lar %70 alkolde yıkandı. Kurutulduktan sonra 40 µl TE içinde çözüldü. İzole edilen DNA’lar analiz edilene kadar -20°C’de saklandı.

2.2.7. *S. aureus* Enterotoksin Genlerinin PCR Yöntemi ile Tespiti

sea geninin tespiti

sea geninin tespiti için 13,75 µl dH₂O, 5 µl MyTaq Reaction Buffer (Bioline BIO-21126), 1 µl forward primer (10mM), 1 µl revers primer (10mM), 1,5 U Taq DNA polimeraz, 5 µl DNA ilave edilerek 25 µl’lik karışım elde edildi. PCR tüpleri thermal cycler’a yerleştirilerek Johnson ve ark (1991)’nın bildirdiği primer dizileri ile aşağıda belirtilen PCR protokolü uygulandı.

sea amplikon büyüklüğü 120 bp

Başlangıç denatürasyon	94°C 2 dk	} 40 döngü
Denatürasyon	94°C 30 sn	
Bağlanma	52°C 30 sn	
Uzama	72°C 45 sn	
Son uzama	72°C 7 dk	

seb geninin tespiti

seb geninin tespiti için 13,75 µl dH₂O, 5 µl MyTaq Reaction Buffer (Bioline BIO-21126), 1 µl forward primer (10mM), 1 µl revers primer (10mM), 1,5 U Taq DNA polimeraz, 5 µl DNA ilave edilerek 25 µl’lik karışım elde edildi. PCR tüpleri

thermal cycler'a yerleştirilerek Johnson ve ark (1991)'nın bildirdiği primer dizileri ile aşağıda belirtilen PCR protokolü uygulandı.

seb amplikon büyüklüğü 478 bp

Başlangıç denatürasyon	94°C 2 dk	
Denatürasyon	94°C 30 sn	} 40 döngü
Bağlanma	54°C 30 sn	
Uzama	72°C 45 sn	
Son uzama	72°C 7 dk	

***sec* geninin tespiti**

sec geninin tespiti için 13,75 µl dH₂O, 5 µl MyTaq Reaction Buffer (Bioline BIO-21126), 1 µl forward primer (10mM), 1 µl revers primer (10mM), 1,5 U Taq DNA polimeraz, 5 µl DNA ilave edilerek 25 µl'lik karışım elde edildi. PCR tüpleri thermal cycler'a yerleştirilerek Johnson ve ark (1991)'nın bildirdiği primer dizileri ile aşağıda belirtilen PCR protokolü uygulandı.

sec amplikon büyüklüğü 257 bp

Başlangıç denatürasyon	94°C 2 dk	
Denatürasyon	94°C 30 sn	} 40 döngü
Bağlanma	48°C 30 sn	
Uzama	72°C 45 sn	
Son uzama	72°C 7 dk	

***sed* geninin tespiti**

sed geninin tespiti için 13,75 µl dH₂O, 5 µl MyTaq Reaction Buffer (Bioline BIO-21126), 1 µl forward primer (10mM), 1 µl revers primer (10mM), 1,5 U Taq DNA polimeraz, 5 µl DNA ilave edilerek 25 µl'lik karışım elde edildi. PCR tüpleri thermal cycler'a yerleştirilerek Johnson ve ark (1991)'nın bildirdiği primer dizileri ile aşağıda belirtilen PCR protokolü uygulandı.

sed amplikon büyüklüğü 317 bp

Başlangıç denatürasyon	94°C 2 dk	
Denatürasyon	94°C 30 sn	} 40 döngü
Bağlanma	48°C 30 sn	
Uzama	72°C 45 sn	
Son uzama	72°C 7 dk	

***see* geninin tespiti**

see geninin tespiti için 13,75 µl dH₂O, 5 µl MyTaq Reaction Buffer (Bioline BIO-21126), 1 µl forward primer (10mM), 1 µl revers primer (10mM), 1,5 U Taq DNA polimeraz, 5 µl DNA ilave edilerek 25 µl'lik karışım elde edildi. PCR tüpleri thermal cycler'a yerleştirilerek Johnson ve ark (1991)'nın bildirdiği primer dizileri ile aşağıda belirtilen PCR protokolü uygulandı.

***see* amplikon büyüklüğü 170 bp**

Başlangıç denatürasyon	94°C 2 dk	
Denatürasyon	94°C 30 sn	} 40 döngü
Bağlanma	48°C 30 sn	
Uzama	72°C 45 sn	
Son uzama	72°C 7 dk	

***seg, seh ve sei* genlerinin tespiti**

seg, seh ve sei genlerinin tespitinde 4 µl dH₂O, 12,5 µl mastermix (2X, Thermo Fisher, K0171) her bir primer için 0,5 µl forward primer+revers primer (10mM), 2 µl DNA ilave edilerek 20 µl'lik karışım elde edildi. PCR tüpleri thermal cycler'a yerleştirilerek Omoe ve ark (2002)'in bildirdiği primer dizileri ile aşağıda belirtilen PCR protokolü uygulandı.

***seg, seh, sei* amplikon büyüklükleri (287 bp, 213 bp, 454 bp)**

Başlangıç denatürasyon	95°C 3 dk	
Denatürasyon	94°C 30 sn	} 30 döngü
Bağlanma	55°C 30 sn	
Uzama	72°C 60 sn	
Son uzama	72°C 7 dk	

2.2.8. Amplifiye Ürünlerin Görüntülenmesi

PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen ürünlerin agar jel elektroforezi, güç ünitesine (Thermo Scientific EC 300 XL) bağlı jel tankı (Thermo Scientific OWL EasyCast B2) içerisinde gerçekleştirildi. PCR elektroforez ürünlerinin görüntülenmesi amacıyla UV transillüminatör (DNR Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro) kullanılarak amplifiye ürünler görüntülendi.

2.2.9. Enterotoksin Geni İçeren *S. aureus* İzolatlarının ELISA Tekniğiyle Toksin Üretiminin Tespiti

Toksin genlerine sahip olan *S. aureus* izolatlarının enterotoksin oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi intoksikasyon riski açısından önem taşımaktadır. Bu çalışmada, bugüne kadar ticari kit ile tespiti yapılabilen beş enterotoksinin (SEA, SEB, SEC, SED ve SEE) saptanması amacıyla R-Biopharm RIDASCREEN SET A, B, C, D, E kiti kullanıldı. Her bir ELISA kiti içerisinde 12 test şeridi bulunmaktadır. Bu şeritlerden beş tanesinde (A-E) stafilokokkal enterotoksinlere karşı özel antikorların olduğu kuyucuklar mevcuttur. Geri kalan kuyucukların iki tanesi non immunize hayvan antikorları içeren negatif kontrol kuyucukları olup (F-G), son kuyucuk (H) ise pozitif kontrol olarak ayrılmıştır.

Bakteri kültürleri öncelikle BHI Broth'da 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra tüplerden 1000'er µl sıvı eppendorf tüplerine aktarıldı. Tüpler 7 dk boyunca 15°C'de 3,500 rpm devirde santrifüj edildi. Yüzeylerinde kalan süpernatant kısmı steril enjektör vasıtası ile çekildikten sonra 0,22 µm çaplı filtrelerden geçirilerek yeni eppendorf tüplerine aktarıldı. Tüplerdeki sıvı kısım ELISA kuyucuklarına (H hariç), her birinde 100 µl olacak şekilde eklendi. H kuyucuğuna da pozitif kontrol eklendikten sonra kuyucukların içerisindeki sıvıların homojenizasyonu sağlanıp 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresi sonunda dört kez yıkama işlemi uygulandı. Yıkama işleminde her kuyucuğa, kullanım talimatlarına göre hazırlanmış olan yıkama solüsyonundan 300 µl konularak her işlem sonrasında bu sıvı tamamen boşaltıldı. Yıkama yapılan kuyucukların üzerine 100'er µl konjugat-1 ilave edilerek tekrar 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Kullanılan konjugat kuyucuklara tutunmuş olan enterotoksinlere bağlanma görevi görmektedir. Süre sonunda yıkama işlemi yine dört kez tekrarlandı. Kuyucuklara 100 µl konjugat-2 eklendi ve 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Yıkama işlemi dört kez tekrarlandı ve kuyucuklar boşaltılıp her bir kuyucuğa substrat-kromojen karışımından 100'er µl ilave edilerek 37°C'de 15 dk son inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrasında kuyucuklara 100'er µl stop solüsyonu ilave edilip son olarak 450/620 nm dalga boyunda ELISA cihazı okuyucusunda okuma işlemi gerçekleştirildi.

Cut-Off Değerinin Belirlenmesi

Her bir örnek için F ve G kuyucuklarında bulunan negatif kontrollerin Optik Dansite (OD) değerlerinin aritmetik ortalamasına 0,15 ekleyerek cut-off değeri belirlendi.

Sonuçların Değerlendirilmesi

Sonuçların değerlendirilmesinde, pozitif kontrol değerinin 1,0'den büyük ya da eşit olmasına, negatif kontrol değerinin 0,2'den küçük ya da eşit olmasına dikkat edildi. Bu sınırlara uygun olmayan denemeler hatalı olarak değerlendirilerek işlem tekrarlandı. Negatif ve pozitif örneklerde optimum değerlerin elde edildiği testlerde örneklerin 450 nm'deki absorbans değeri cut-off değerinin altında ise negatif, eşit veya yüksek ise pozitif olarak kabul edildi.

2.2.10. İstatistiksel Analizler

Çalışmada, ölçümü yapılan sucuk numuneleri için tanımlayıcı istatistikler yapılarak Aritmetik Ortalama $\pm$ Standart Hata şeklinde gösterildi. Anlamlılık testi öncesinde veriler parametrik test varsayımlarından normal dağılıma uygunluk açısından Shapiro Wilk, varyansların homojenliği açısından ise Levene testi ile kontrol edildi. Çalışmanın 0., 7., 14. ve 21. günleri arasında sucuk numunelerinde *S. aureus* bakteri sayım sonuçları log kob/g olarak verildi. Kontrol gruplarının bakteri sayım sonuçları olmadığı için ve kimyasal analiz sonucu diğer numunelere benzer olduğu için istatistiksel analizlere dahil edilmedi. Bakteri sayımı değişkenlerine ait ölçütlerin zaman içerisindeki değişiminin suş ve oran arası farklılıklarının incelenmesinde, genel doğrusal modelleme tekniğinden yararlanılarak üç yönlü varyans analizi uygulandı. Modelde zaman (grup içi-within subjects), oran (gruplar arası-between subject) ve suş*oran, zaman*suş, zaman*oran, zaman*suş*oran etkileşim terimlerine yer verildi. Anlamlı bulunan etkileşim terimlerinin çözümlenmesi için Bonferroni düzeltmesi uygulanarak basit etkiler (simple effects) analizi yapıldı. Verilerin analizi için SPSS-29 paket programından yararlanıldı. Tüm istatistiksel kararlarda minimum %5 hata payı esas alındı. Gruplar arasındaki farklılığın $p < 0,05$ olması durumunda istatistiksel olarak önem taşıdığı belirlendi.

3. BULGULAR

Türklere özgü geleneksel bir et ürünü olan fermente sucukta tuzun farklı oranlarda azaltılarak *S. aureus*'un enterotoksin üretimine etkisinin tespit edilmesi ve enterotoksin gen profillerinin belirlenmesi amacıyla farklı *S. aureus* suşları inoküle edilerek üretimler gerçekleştirildi. Bu çalışmada numunelerin rutubet, pH, a_w , *S. aureus* gelişimi ve toksin üretiminin belirlenmesi için 0., 7., 14. ve 21. günlerde analizleri yapıldı.

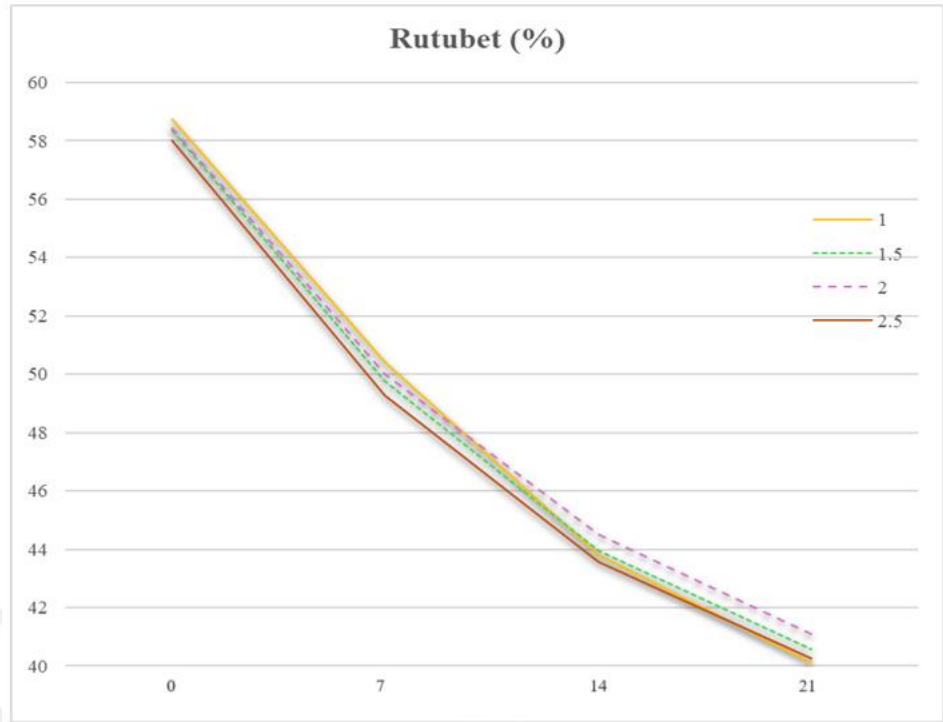
3.1. Kimyasal Analiz Bulguları

3.1.1. Rutubet İçeriği

Üretilen sucuk numunelerinin 0., 7., 14. ve 21. günlerde yapılan rutubet analiz sonuçları Tablo 3.1. ile Şekil 3.1.'de gösterilmektedir.

Tablo 3.1. Sucuk numunelerinin rutubet içeriklerinin günlere göre değişimi (%).

Grup	Tuz Oranı (%)	Örnekleme Zamanı			
		0. gün	7. gün	14. gün	21. gün
SEA	1	58,85 ± 0,39	50,89 ± 0,60	46,13 ± 1,70	42,27 ± 1,97
	1,5	58,32 ± 0,54	49,11 ± 1,01	45,30 ± 1,71	41,35 ± 1,98
	2	58,87 ± 0,50	50,68 ± 0,47	46,05 ± 1,71	42,35 ± 1,94
	2,5	58,28 ± 0,32	50,03 ± 1,11	44,23 ± 1,59	39,95 ± 1,24
SEB	1	61,48 ± 0,93	53,43 ± 0,95	43,52 ± 0,25	39,04 ± 0,59
	1,5	59,77 ± 0,29	51,63 ± 0,49	45,20 ± 0,47	41,41 ± 1,10
	2	59,17 ± 0,33	49,91 ± 0,61	44,23 ± 1,57	40,43 ± 1,80
	2,5	57,94 ± 0,51	49,08 ± 0,50	43,83 ± 1,25	40,08 ± 1,28
SEC	1	59,34 ± 0,13	50,75 ± 0,30	44,40 ± 2,50	40,73 ± 3,03
	1,5	59,65 ± 0,29	50,53 ± 0,48	44,10 ± 1,69	40,97 ± 2,41
	2	58,72 ± 0,14	50,42 ± 0,13	44,41 ± 2,58	40,67 ± 3,46
	2,5	58,29 ± 0,37	49,20 ± 0,72	43,16 ± 2,59	39,61 ± 2,90
SED	1	55,39 ± 0,65	47,26 ± 0,36	42,07 ± 2,08	38,80 ± 2,68
	1,5	55,19 ± 1,02	48,37 ± 0,27	43,12 ± 2,26	40,05 ± 2,95
	2	56,27 ± 1,15	48,12 ± 1,35	43,32 ± 2,46	40,20 ± 3,33
	2,5	57,00 ± 1,32	48,42 ± 2,03	42,75 ± 3,43	40,42 ± 4,28
SEE	1	58,63 ± 0,91	49,79 ± 0,62	42,87 ± 2,86	39,83 ± 3,17
	1,5	58,93 ± 0,90	49,19 ± 0,72	42,11 ± 2,57	39,05 ± 3,06
	2	59,17 ± 0,06	50,83 ± 0,06	44,55 ± 2,62	41,81 ± 3,08
	2,5	58,55 ± 0,31	49,65 ± 0,74	43,86 ± 1,79	41,31 ± 2,60



Şekil 3.1. Sucuk numunelerinin günlere göre rutubet içerik değişimleri.

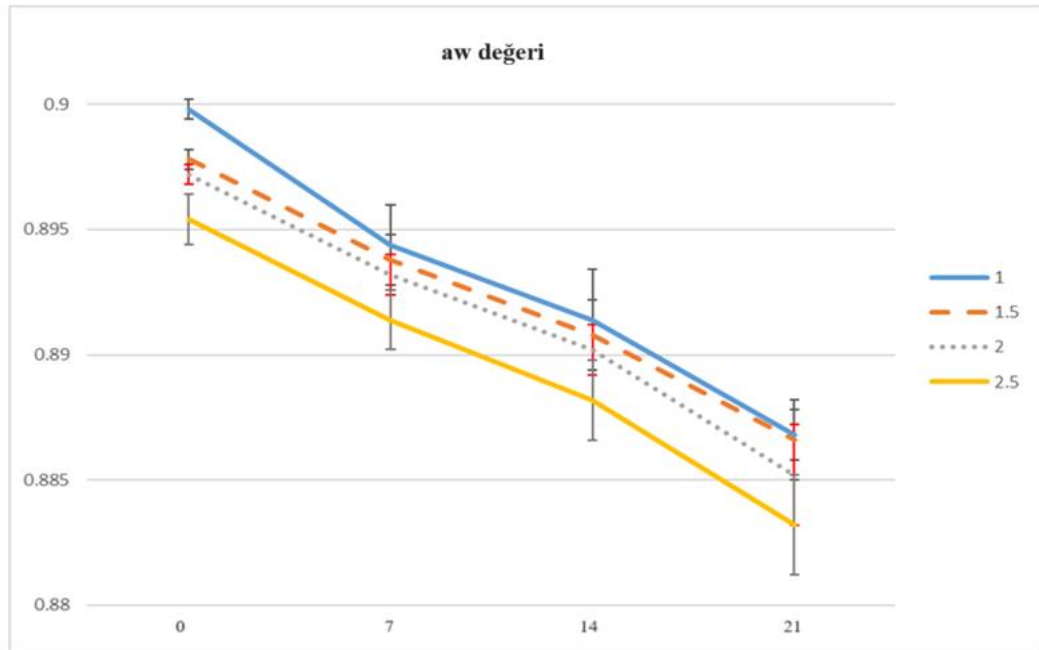
Sucuk numunelerinin rutubet içerikleri sırasıyla 0. günde %55,19-61,48; 7. günde %47,26-53,43; 14. günde %42,11-46,13 ve 21. günde %38,80-42,35 değerleri arasında tespit edildi. Herhangi bir istatistiksel anlamlılık belirlenemedi.

3.1.2. Su Aktivitesi Değeri

Üretilen sucuk numunelerinin 0., 7., 14. ve 21. günlerde yapılan a_w analizlerinin günlere göre değişimi Tablo 3.2. ve Şekil 3.2.'de gösterilmektedir.

Tablo 3.2. Sucuk numunelerinin a_w değerlerinin günlere göre değişimi.

Grup	Tuz Oranı (%)	Örnekleme Zamanı			
		0. gün	7. gün	14. gün	21. gün
SEA	1	$0,898 \pm 0,001$	$0,894 \pm 0,001$	$0,891 \pm 0,002$	$0,889 \pm 0,000$
	1,5	$0,897 \pm 0,001$	$0,893 \pm 0,001$	$0,890 \pm 0,002$	$0,886 \pm 0,001$
	2	$0,896 \pm 0,000$	$0,892 \pm 0,001$	$0,890 \pm 0,001$	$0,884 \pm 0,002$
	2,5	$0,894 \pm 0,001$	$0,890 \pm 0,002$	$0,887 \pm 0,002$	$0,882 \pm 0,003$
SEB	1	$0,900 \pm 0,001$	$0,893 \pm 0,003$	$0,890 \pm 0,003$	$0,881 \pm 0,001$
	1,5	$0,898 \pm 0,000$	$0,894 \pm 0,001$	$0,891 \pm 0,001$	$0,886 \pm 0,003$
	2	$0,898 \pm 0,000$	$0,894 \pm 0,000$	$0,890 \pm 0,001$	$0,885 \pm 0,003$
	2,5	$0,897 \pm 0,000$	$0,893 \pm 0,000$	$0,889 \pm 0,001$	$0,884 \pm 0,003$
SEC	1	$0,900 \pm 0,000$	$0,896 \pm 0,000$	$0,893 \pm 0,001$	$0,890 \pm 0,000$
	1,5	$0,898 \pm 0,000$	$0,894 \pm 0,001$	$0,891 \pm 0,001$	$0,888 \pm 0,001$
	2	$0,897 \pm 0,001$	$0,893 \pm 0,001$	$0,890 \pm 0,001$	$0,886 \pm 0,001$
	2,5	$0,896 \pm 0,001$	$0,892 \pm 0,000$	$0,889 \pm 0,000$	$0,883 \pm 0,001$
SED	1	$0,901 \pm 0,000$	$0,893 \pm 0,003$	$0,890 \pm 0,003$	$0,886 \pm 0,003$
	1,5	$0,899 \pm 0,000$	$0,895 \pm 0,001$	$0,892 \pm 0,001$	$0,887 \pm 0,001$
	2	$0,898 \pm 0,000$	$0,894 \pm 0,001$	$0,891 \pm 0,001$	$0,886 \pm 0,002$
	2,5	$0,895 \pm 0,002$	$0,891 \pm 0,002$	$0,888 \pm 0,003$	$0,884 \pm 0,002$
SEE	1	$0,900 \pm 0,000$	$0,896 \pm 0,001$	$0,893 \pm 0,001$	$0,888 \pm 0,001$
	1,5	$0,897 \pm 0,001$	$0,893 \pm 0,001$	$0,890 \pm 0,002$	$0,886 \pm 0,002$
	2	$0,897 \pm 0,001$	$0,893 \pm 0,001$	$0,890 \pm 0,001$	$0,885 \pm 0,002$
	2,5	$0,895 \pm 0,001$	$0,891 \pm 0,002$	$0,888 \pm 0,002$	$0,883 \pm 0,004$



Şekil 3.2. Sucuk numunelerinin günlere göre a_w değişimleri.

Sucuk numunelerinin a_w değerleri sırasıyla 0. günde 0,901-0,894; 7. günde 0,896-0,890; 14. günde 0,893-0,887 ve 21. günde 0,890-0,881 değerleri arasında bulundu. Herhangi bir istatistiksel anlamlılık belirlenemedi.

3.1.3. pH Değeri

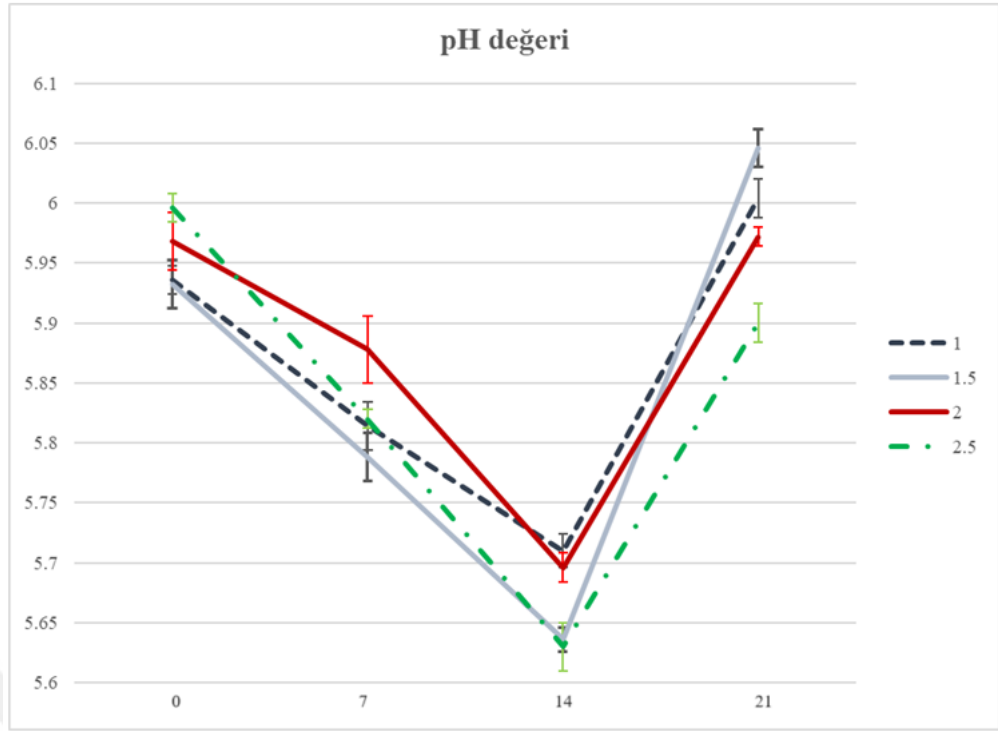
Üretilen sucuk numunelerinin 0., 7., 14. ve 21. günlerde yapılan pH analiz değerleri ile istatistik sonuçları Tablo 3.3., Şekil 3.3.'de gösterilmektedir.



Tablo 3.3. Sucuk numunelerinin pH değerlerinin değişimi.

Grup	Tuz Oranı (%)	Örnekleme Zamanı				Zaman	Suş	Oran	Suş* Oran	Zaman *Suş	Zaman *Oran	Zaman*Suş* Oran
		0.gün	7.gün	14.gün	21.gün							
SEA	1	6,04 ± 0,00 ^{ab, β, B}	5,96 ± 0,03 ^{b, γ, A}	5,91 ± 0,01 ^{b, δ, A}	6,18 ± 0,01 ^{c, γ, C}	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	1,5	5,98 ± 0,01 ^{a, β, C}	5,85 ± 0,03 ^{a, β, B}	5,77 ± 0,00 ^{a, γ, A}	6,09 ± 0,02 ^{b, γ, D}							
	2	6,05 ± 0,02 ^{b, β, C}	5,97 ± 0,04 ^{b, β, B}	5,85 ± 0,02 ^{b, β, A}	6,11 ± 0,01 ^{b, γ, C}							
	2,5	6,06 ± 0,01 ^{b, β, C}	5,96 ± 0,01 ^{b, β, B}	5,73 ± 0,07 ^{a, γ, A}	5,93 ± 0,01 ^{a, β, B}							
SEB	1	5,74 ± 0,04 ^{a, α, C}	5,61 ± 0,04 ^{a, α, B}	5,50 ± 0,02 ^{a, α, A}	5,54 ± 0,01 ^{a, α, AB}							
	1,5	5,86 ± 0,02 ^{b, α, B}	5,80 ± 0,01 ^{b, αβ, B}	5,67 ± 0,02 ^{c, βγ, A}	6,14 ± 0,02 ^{c, γδ, C}							
	2	5,97 ± 0,03 ^{c, β, B}	5,91 ± 0,01 ^{c, αβ, AB}	5,83 ± 0,01 ^{d, β, A}	5,99 ± 0,01 ^{b, β, B}							
	2,5	5,95 ± 0,01 ^{c, α, C}	5,82 ± 0,00 ^{bc, αβ, B}	5,59 ± 0,01 ^{b, β, A}	5,94 ± 0,04 ^{b, β, C}							
SEC	1	6,02 ± 0,01 ^{a, β, C}	5,93 ± 0,01 ^{b, γ, B}	5,74 ± 0,01 ^{b, γ, A}	6,33 ± 0,03 ^{d, δ, D}							
	1,5	5,97 ± 0,01 ^{a, β, C}	5,75 ± 0,02 ^{a, α, B}	5,59 ± 0,01 ^{a, β, A}	5,98 ± 0,02 ^{a, β, C}							
	2	6,01 ± 0,01 ^{a, β, C}	5,82 ± 0,01 ^{ab, α, B}	5,63 ± 0,01 ^{a, α, A}	6,20 ± 0,01 ^{c, δ, D}							
	2,5	6,10 ± 0,01 ^{b, β, C}	5,73 ± 0,01 ^{a, α, B}	5,60 ± 0,00 ^{a, β, A}	6,05 ± 0,01 ^{b, γ, C}							
SED	1	6,07 ± 0,01 ^{b, β, B}	5,83 ± 0,01 ^{a, β, A}	5,77 ± 0,02 ^{b, γ, A}	6,13 ± 0,01 ^{b, γ, B}							
	1,5	6,00 ± 0,05 ^{ab, β, C}	5,88 ± 0,03 ^{a, β, B}	5,74 ± 0,01 ^{b, γ, A}	6,16 ± 0,01 ^{b, δ, D}							
	2	5,95 ± 0,03 ^{a, β, C}	5,86 ± 0,06 ^{a, α, B}	5,59 ± 0,01 ^{a, α, A}	5,93 ± 0,00 ^{a, β, BC}							
	2,5	5,95 ± 0,01 ^{a, α, B}	5,90 ± 0,01 ^{a, β, B}	5,79 ± 0,01 ^{b, γ, A}	5,87 ± 0,01 ^{a, β, B}							
SEE	1	5,81 ± 0,00 ^{a, α, C}	5,74 ± 0,01 ^{a, β, B}	5,63 ± 0,01 ^{b, β, A}	5,84 ± 0,02 ^{c, β, C}							
	1,5	5,85 ± 0,01 ^{ab, α, C}	5,66 ± 0,01 ^{a, α, B}	5,41 ± 0,01 ^{a, α, A}	5,86 ± 0,01 ^{c, α, C}							
	2	5,86 ± 0,03 ^{ab, α, B}	5,83 ± 0,02 ^{b, α, B}	5,58 ± 0,01 ^{b, α, A}	5,63 ± 0,01 ^{a, α, A}							
	2,5	5,92 ± 0,02 ^{b, α, C}	5,69 ± 0,01 ^{a, α, B}	5,44 ± 0,01 ^{a, α, A}	5,71 ± 0,01 ^{b, α, B}							

ABC: Aynı satır, abc: Aynı sütun, αβγ: Tuz oranı aynı olduğunda her bir toksin suşu için aynı sütundaki farklı harfler istatistiki açıdan önemlidir (p<0,05).



Şekil 3.3. Sucuk numunelerinin günlere göre pH değişimleri.

Numunelerin pH değerleri dikkate alındığında günler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunurken, suş, oran, suş*oran, zaman*suş, zaman*oran ve zaman*suş*oran etkileşimleri anlamlı bulundu ($p<0,05$; Tablo 3.3.). Sucuk numunelerinin pH değerleri sırasıyla 0. günde 5,74-6,10; 7. günde 5,61-5,96; 14. günde 5,41-5,91 ve 21. günde 5,54-6,33 arasında bulundu.

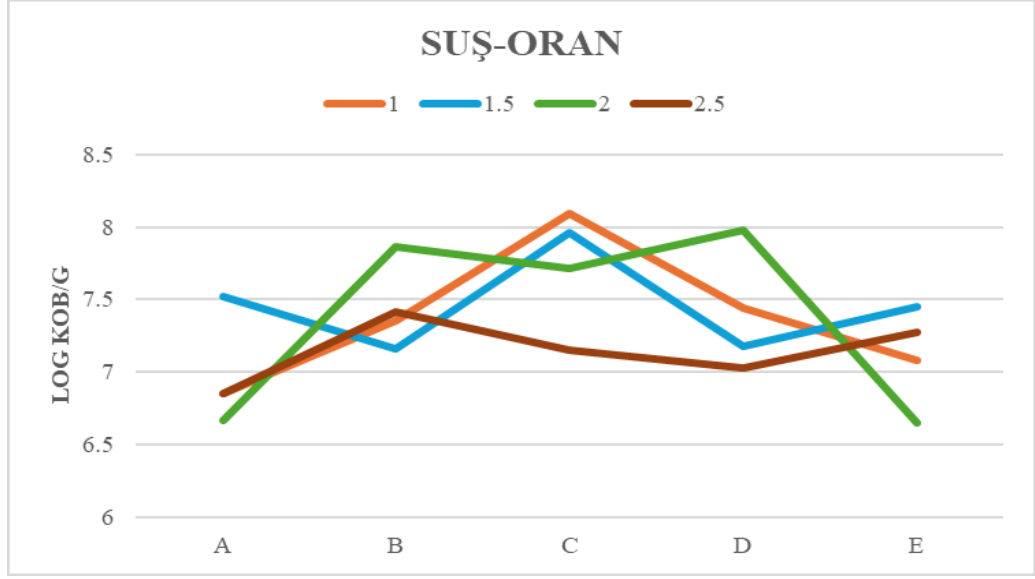
3.2. *S. aureus* İnoküle Edilen Sucuklarda Sayım Sonuçları

Üretilen sucuk numunelerinin 0., 7., 14. ve 21. günlerde *S. aureus* sayımlarının istatistiksel sonuçları Tablo 3.4.'te, suşların oranlara, zamanların suşlara ve zamanların oranlara göre ortalamaları grafik olarak Şekil 3.4., Şekil 3.5. ve Şekil 3.6.'da gösterilmektedir.

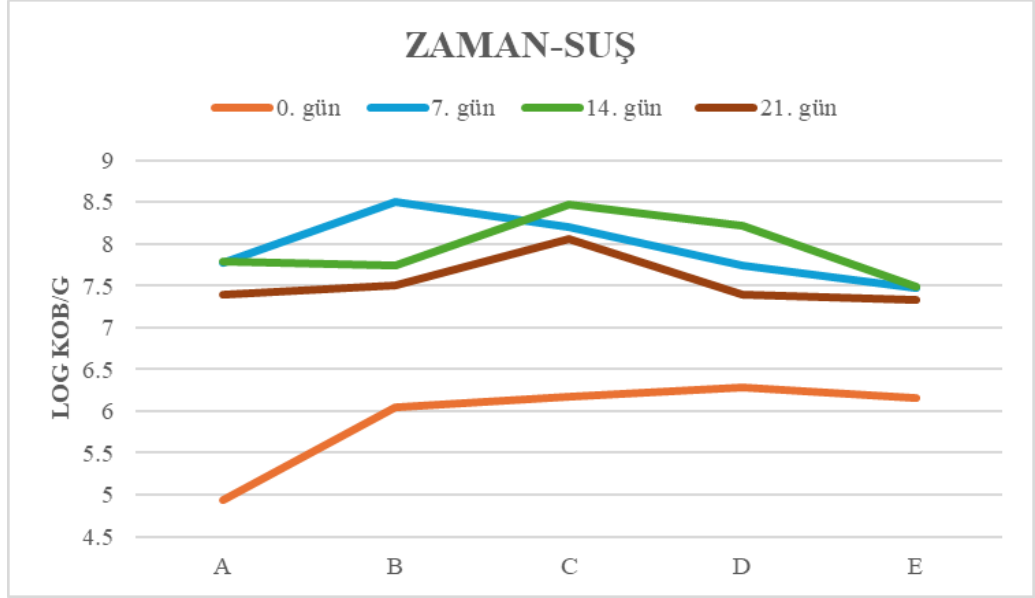
Tablo 3.4. İnokülasyonu yapılan sucuk numunelerinde *S. aureus* sayısının değişimi (log kob/g).

Grup	Tuz Oranı (%)	Örneklem Zamanı				Zaman	Suş	Oran	Suş* Oran	Zaman* Suş	Zaman* Oran	Zaman* Suş* Oran
		0.gün	7.gün	14.gün	21.gün							
SEA	1	4,63 ± 0,27 ^{a, x, A}	7,76 ± 0,57 ^{a, x, B}	7,53 ± 0,20 ^{a, x, B}	7,49 ± 0,40 ^{a, xy, B}	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	1,5	5,36 ± 0,35 ^{a, x, A}	8,81 ± 0,04 ^{b, y, C}	8,19 ± 0,01 ^{b, y, BC}	7,73 ± 0,33 ^{a, xy, B}							
	2	4,59 ± 0,14 ^{a, x, A}	7,34 ± 0,06 ^{a, x, B}	7,52 ± 0,12 ^{a, x, B}	7,24 ± 0,05 ^{a, xy, B}							
	2,5	5,17 ± 0,37 ^{a, x, A}	7,21 ± 0,02 ^{a, x, B}	7,94 ± 0,01 ^{ab, x, C}	7,09 ± 0,05 ^{a, x, BC}							
SEB	1	6,32 ± 0,03 ^{a, y, A}	8,73 ± 0,02 ^{a, y, B}	7,36 ± 0,22 ^{a, x, AB}	7,01 ± 0,36 ^{a, xy, AB}							
	1,5	6,01 ± 0,08 ^{a, xy, A}	7,94 ± 0,36 ^{a, y, B}	7,86 ± 0,03 ^{a, xy, B}	6,82 ± 0,11 ^{a, x, A}							
	2	6,13 ± 0,01 ^{a, y, A}	8,60 ± 0,01 ^{a, y, C}	7,89 ± 0,01 ^{a, x, B}	8,82 ± 0,60 ^{b, z, C}							
	2,5	5,69 ± 0,11 ^{a, x, A}	8,71 ± 0,02 ^{a, y, C}	7,91 ± 0,09 ^{a, x, B}	7,35 ± 0,33 ^{a, x, B}							
SEC	1	6,50 ± 0,14 ^{a, y, A}	8,79 ± 0,01 ^{b, y, B}	8,57 ± 0,05 ^{a, y, B}	8,50 ± 0,19 ^{a, y, B}							
	1,5	6,50 ± 0,44 ^{a, y, A}	8,85 ± 0,32 ^{b, y, B}	8,25 ± 0,15 ^{a, y, B}	8,24 ± 0,09 ^{a, y, B}							
	2	6,23 ± 0,17 ^{a, y, A}	8,05 ± 0,36 ^{b, xy, B}	8,72 ± 0,32 ^{a, y, C}	7,83 ± 0,24 ^{a, yz, B}							
	2,5	5,48 ± 0,10 ^{a, x, A}	7,16 ± 0,03 ^{a, x, B}	8,32 ± 0,12 ^{a, x, C}	7,65 ± 0,09 ^{a, x, BC}							
SED	1	6,50 ± 0,05 ^{a, y, A}	8,78 ± 0,02 ^{b, y, B}	7,55 ± 0,13 ^{a, x, AB}	6,95 ± 0,18 ^{a, x, A}							
	1,5	6,41 ± 0,15 ^{a, y, A}	6,41 ± 0,21 ^{a, x, A}	8,33 ± 0,14 ^{ab, y, B}	7,59 ± 0,22 ^{a, xy, B}							
	2	6,52 ± 0,27 ^{a, y, A}	8,92 ± 0,00 ^{b, y, C}	8,91 ± 0,01 ^{b, y, C}	7,57 ± 0,33 ^{a, y, B}							
	2,5	5,71 ± 0,06 ^{a, x, A}	6,86 ± 0,29 ^{a, x, B}	8,09 ± 0,32 ^{a, x, C}	7,48 ± 0,16 ^{a, x, BC}							
SEE	1	5,77 ± 0,16 ^{a, y, A}	7,31 ± 0,24 ^{a, x, B}	7,23 ± 0,04 ^{a, x, B}	8,04 ± 0,54 ^{b, xy, B}							
	1,5	6,46 ± 0,53 ^{a, y, A}	8,61 ± 0,01 ^{b, y, B}	7,40 ± 0,38 ^{ab, x, AB}	7,33 ± 0,17 ^{b, xy, A}							
	2	6,28 ± 0,03 ^{a, y, A}	6,86 ± 0,15 ^{a, x, AB}	7,33 ± 0,17 ^{a, x, B}	6,13 ± 0,09 ^{a, x, A}							
	2,5	6,10 ± 0,01 ^{a, x, A}	7,15 ± 0,08 ^{a, x, B}	8,00 ± 0,05 ^{b, x, C}	7,83 ± 0,31 ^{b, x, BC}							

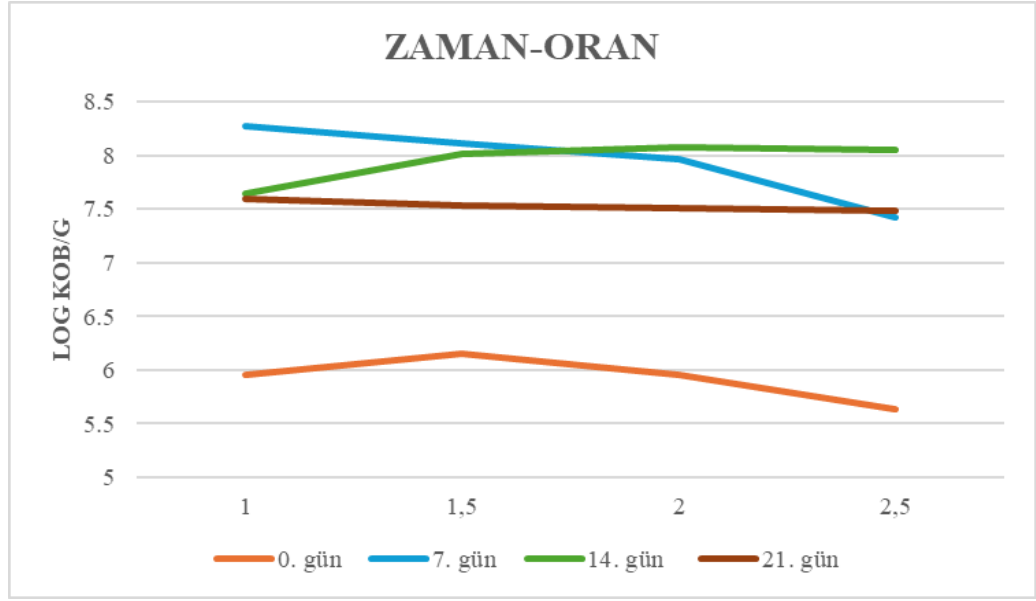
ABC: Aynı satır, abc: Aynı sütun, xyz: Tuz oranı aynı olduğunda her bir toksin suşu için aynı sütundaki farklı harfler istatistiki açıdan önemlidir (p<0,05).



Şekil 3.4. Suşların oranlara göre ortalamaları.



Şekil 3.5. Zamanların suşlara göre ortalamaları.

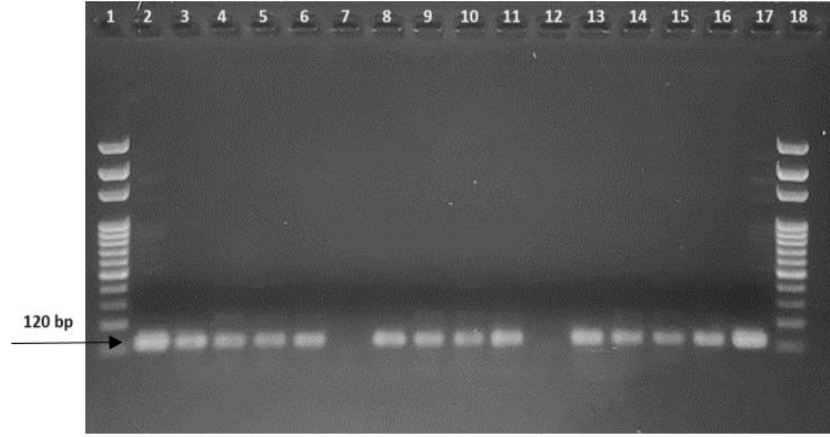


Şekil 3.6. Zamanların oranlara göre ortalamaları.

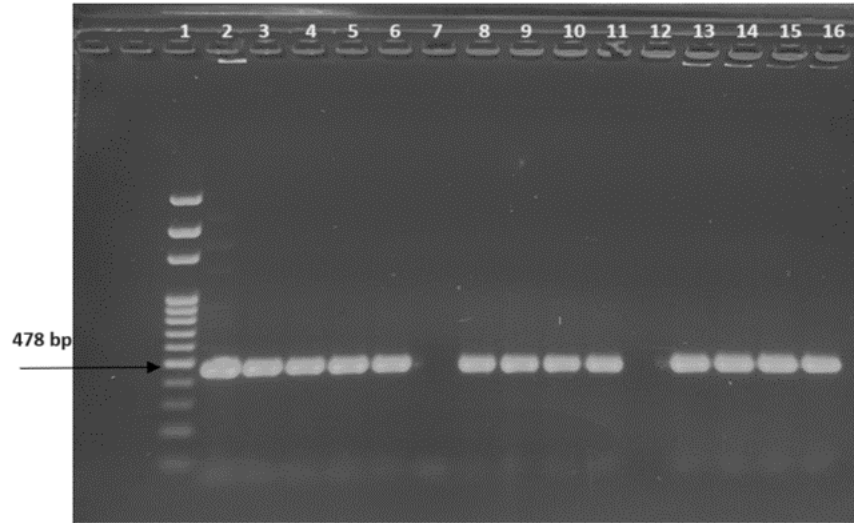
S. aureus sayısındaki değişim göz önüne alındığında, günler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunurken, suş, oran, suş*oran, zaman*suş, zaman*oran ve zaman*suş*oran etkileşimleri anlamlı bulundu ($p < 0,05$). SEA, SEB, SEC, SED ve SEE suşu inoküle edilen sucuk numunelerinde *S. aureus* sayıları sırasıyla 4,59-8,81 log kob/g; 5,69-8,82 log kob/g; 5,48-8,72 log kob/g; 5,71-8,92 log kob/g ve 5,77-8,61 log kob/g değerleri arasında tespit edildi.

3.3. *S. aureus* Enterotoksin Genlerinin PCR Görüntüleri

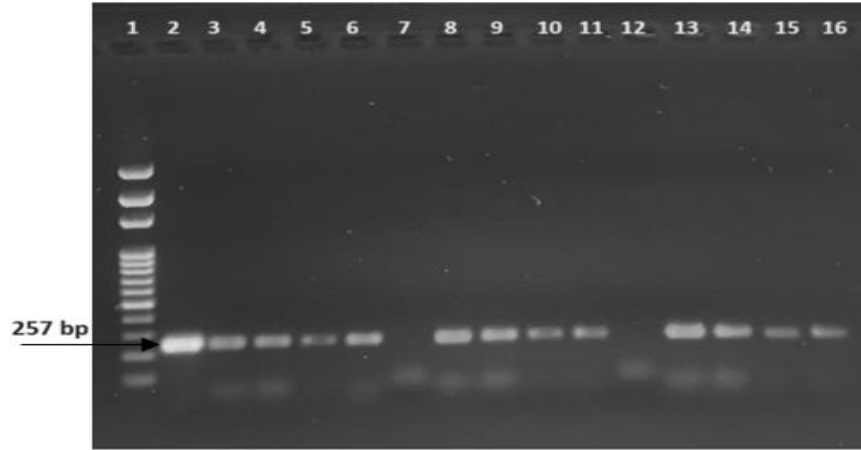
Farklı *S. aureus* suşları inoküle edilen sucukta enterotoksin genlerinin varlığı PCR ile tespit edildi. *S. aureus sea, seb, sec, sed, see, seg* ve *sei* enterotoksin geninin PCR görüntüleri Şekil 3.7., Şekil 3.8., Şekil 3.9., Şekil 3.10., Şekil 3.11. ve Şekil 3.12.'de gösterilmektedir. *seh* geni hiçbir numunede tespit edilemedi.



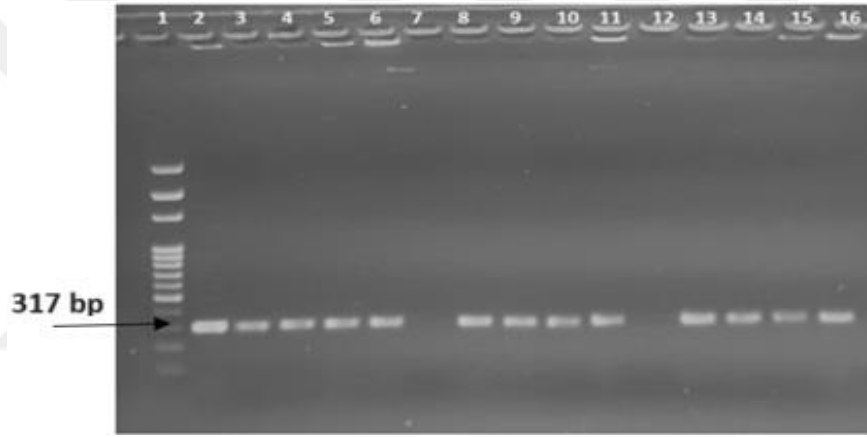
Şekil 3.7. *sea* genlerinin agaroz jel görüntüsü (1, 18: 100 bp Ladder, 2, 17: *sea* Pozitif kontrol ATCC 29213, 3, 8, 13: A1; 4, 9, 14: A1,5; 5, 10, 16: A2; 6, 11, 16: A2,5; 7, 12: Negatif kontrol).



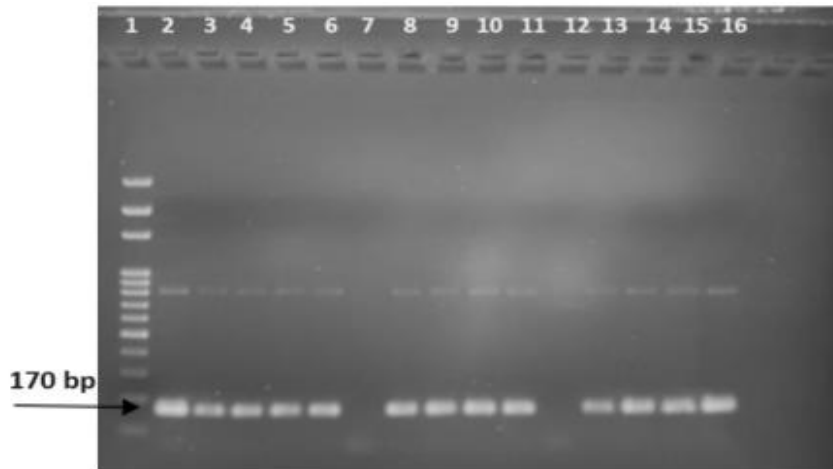
Şekil 3.8. *seb* genlerinin agaroz jel görüntüsü (1: 100 bp Ladder, 2: *seb* Pozitif kontrol NCTC 10654, 3, 8, 13: B1; 4, 9, 14: B1,5; 5, 10, 15: B2; 6, 11, 16: B2,5; 7, 12: Negatif kontrol).



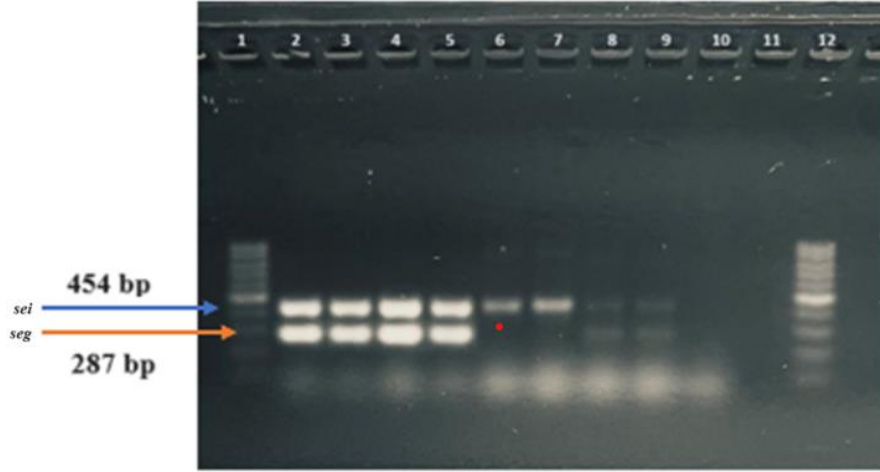
Şekil 3.9. *sec* genlerinin agaroz jel görüntüsü (1: 100 bp Ladder, 2: *sec* Pozitif kontrol NCTC 10655, 3, 8, 13: C1; 4, 9, 14: C1,5; 5, 10, 15: C2; 6, 11, 16: C2,5; 7, 12: Negatif kontrol).



Şekil 3.10. *sed* genlerinin agaroz jel görüntüsü (1: 100 bp Ladder, 2: *sed* Pozitif kontrol NCTC 10656, 3, 8, 13: D1; 4, 9, 14: D1,5; 5, 10, 15: D2; 6, 11, 16: D2,5; 7, 12: Negatif kontrol).



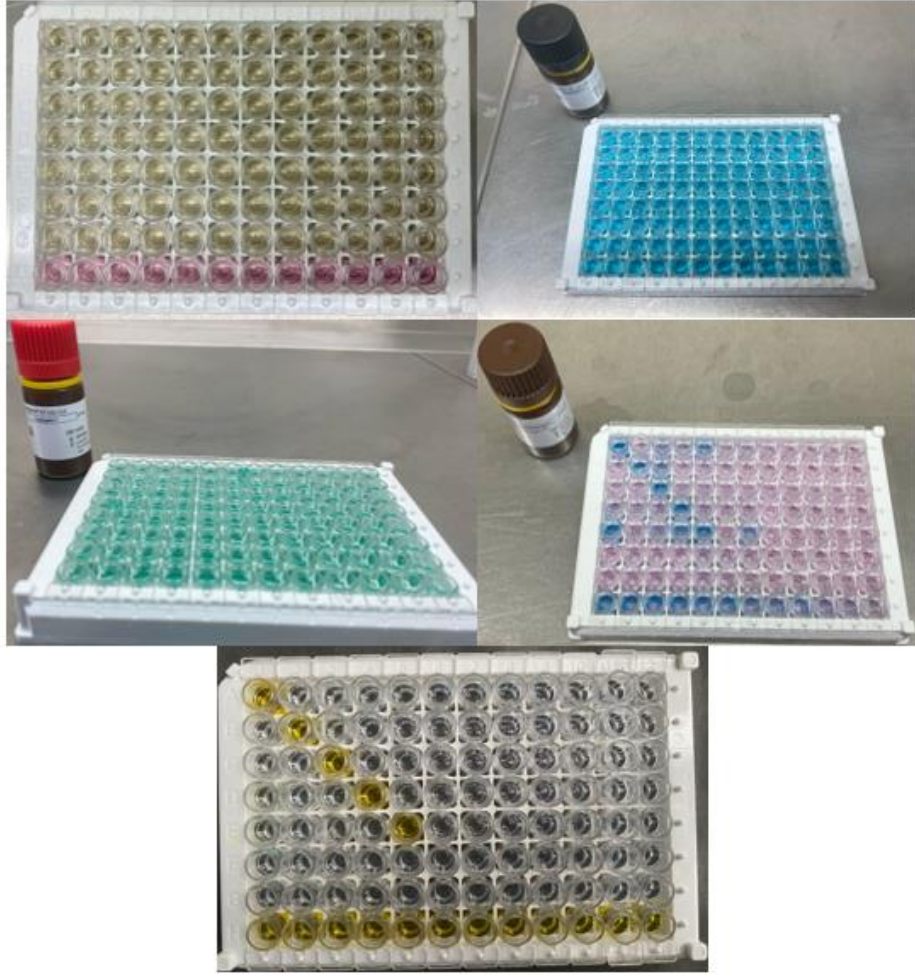
Şekil 3.11. *see* genlerinin agaroz jel görüntüsü (1: 100 bp Ladder, 2: *see* Pozitif kontrol, 3, 8, 13: E1; 4, 9, 14: E1,5; 5, 10, 15: E2; 6, 11, 16: E2,5; 7, 12: Negatif kontrol).



Şekil 3.12. *seg* ve *sei* genlerinin agaroz jel görüntüsü (1, 12: 100 bp Ladder, 2: A1; 3: A1,5; 4: A2; 5: A2,5; 6: C1; 7: C1,5; 8: E1; 9: E1,5; 10, 11: Negatif kontrol).

3.4. *S. aureus* Enterotoksin Genlerine Sahip İzolatların Toksin Oluşturma Yeteneğinin ELISA Sonuçları

S. aureus'un klasik enterotoksin üreten suşlarının inoküle edildiği sucuk numunelerinden yapılan ELISA sonuçlarında herhangi bir SE üretimi tespit edilemedi. ELISA yapılırken eklenen solüsyonlarda gözlemlenen renk değişimlerinin ve referans suşların enterotoksijenik özellikte olduğunun mikrotitre plakada görünümü Şekil 3.7.'de gösterilmektedir.



Şekil 3.7. ELISA yapım aşamasında gözlemlenen renk değişimleri ve suşların enterotoksijenik özelliği.

Tablo 3.5. Spektrofotometre cihazında 450 nm dalga boyunda belirlenen klasik enterotoksinlerin değerleri.

Toksin Tipi	Kuyucuk	Referans Suşlar					Sucuk İzolatları						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
SEA	A	3,390	0,109	0,064	0,043	0,085	0,117	0,046	0,045	0,054	0,060	0,050	0,041
SEB	B	0,055	2,059	0,097	0,040	0,115	0,073	0,066	0,033	0,040	0,045	0,043	0,039
SEC	C	0,069	0,078	2,498	0,081	0,096	0,072	0,049	0,039	0,037	0,039	0,040	0,045
SED	D	0,036	0,196	0,156	2,956	0,211	0,094	0,129	0,047	0,063	0,055	0,058	0,048
SEE	E	0,079	0,096	0,058	0,074	2,651	0,074	0,187	0,043	0,044	0,045	0,041	0,043
NK	F	0,049	0,065	0,061	0,051	0,095	0,084	0,043	0,039	0,044	0,042	0,039	0,046
NK	G	0,051	0,065	0,061	0,055	0,142	0,084	0,045	0,037	0,042	0,038	0,038	0,040
PK	H	2,241	2,007	2,126	2,265	2,381	1,783	1,852	1,840	1,446	1,465	1,648	1,481
Cut-off Değeri		0,200	0,215	0,211	0,203	0,268	0,234	0,194	0,188	0,193	0,190	0,188	0,193

1: SEA, 2: SEB, 3: SEC, 4: SED, 5: SEE suşlarının izolat numaralarına ait optik dansite (OD) değerleridir. 6-12 arası suş inoküle edilen sucuk numunelerinin bir kısmının OD değerleridir.

4. TARTIŞMA

Geleneksel Türk tipi fermente sucukta tuzun farklı oranlarda azaltılarak *S. aureus*'un enterotoksin üretme yeteneği üzerine etkisinin ve enterotoksin gen profillerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bu araştırma kapsamında, fermente sucuklara enterotoksijenik *S. aureus* inokülasyonları gerçekleştirildi. Sucuklara 0., 7., 14. ve 21. gün örneklemeler yapılarak enterotoksin üretme yetenekleri ve enterotoksin genlerinin varlığı belirlendi.

4.1. Kimyasal Analiz Sonuçları

Araştırmada incelenen sucuk numunelerinin rutubet içerikleri sırasıyla 0. günde %55,19-61,48; 7. günde %47,26-53,43; 14. günde %42,11-46,13 ve 21. günde %38,80-42,35 değerleri arasında bulundu. Su aktivitesi değerleri ise sırasıyla 0. günde 0,901-0,894; 7. günde 0,896-0,890; 14. günde 0,893-0,887 ve 21. günde 0,890-0,881 arasında belirlendi. Günler arasında ölçülen değerlerde hem rutubet içeriği hem de a_w değerlerinin farklı olmadığı tespit edildi (Tablo 3.1., Tablo 3.2.).

Araştırmada elde edilen kimyasal özelliklere ait bulgular birçok araştırmacının (Pehlivanoğlu ve ark 2015, Şimşek 2016, İnce ve ark 2018, Yeşilırmak 2019, Keskin ve Uçar 2023) saha çalışmasında elde ettiği bulgularla uyum içerisindedir. Kimyasal özellikler bir bütün olarak ele alındığında (rutubet, a_w , pH), farklı tuz seviyelerine (%2,5, %2,0, %1,5 ve %1,0) sahip kuru fermente sucuk numunelerinde Hu ve ark (2020) tarafından yürütülen araştırma bulgularının, bu çalışma verilerini destekler nitelikte olduğu saptanmıştır. Bu araştırmada günler dikkate alındığında kimyasal özelliklerdeki azalmalar uygulanan kurutma işlemine bağlı olarak meydana gelmektedir.

İncelenen sucuk numunelerinin pH değerleri 0. gün 5,74-6,10; 7. gün 5,61-5,96; 14. gün 5,41-5,91 ve 21. gün 5,54-6,33 arasında bulundu ($p<0,05$; Tablo 3.3.).

SEA suşu inoküle edilen sucuk numunelerinde pH değerlerinin 5,73-6,18 arasında olduğu belirlendi. Günlere göre pH değişimleri sırasıyla 0. gün 5,98-6,06; 7. gün 5,85-5,97; 14. gün 5,73-5,91 ve 21. gün 5,93-6,18 değerleri arasında tespit edildi. Tespit edilen en düşük değer %2,5 tuz ilaveli sucukta 14. günde (5,73), en yüksek değer ise %1 tuz ilavesi yapılan sucukta 21. günde (6,18) olduğu saptandı.

SEB suşu inoküle edilen sucuk numunelerinde pH değerlerinin 5,50-6,14 arasında olduğu tespit edildi. Günlere göre pH değişimleri sırasıyla 0. gün 5,74-5,97; 7. gün 5,61-5,91; 14. gün 5,50-5,83 ve 21. gün 5,54-6,14 değerleri arasında bulundu. Tespit edilen en düşük değer %1 tuz ilaveli sucukta 14. günde (5,50), en yüksek değer ise %1,5 tuz ilavesi yapılan sucukta 21. günde (6,14) olduğu gözlemlendi.

SEC suşu inoküle edilen sucuk numunelerinde pH değerlerinin 5,59-6,33 arasında olduğu belirlendi. Günlere göre pH değişimleri sırasıyla 0. gün 5,97-6,10; 7. gün 5,73-5,93; 14. gün 5,59-5,74 ve 21. gün 5,98-6,33 değerleri arasında bulundu. Tespit edilen en düşük değer %1,5 tuz ilaveli sucukta 14. günde (5,59), en yüksek değer ise %1 tuz ilavesi yapılan sucukta 21. günde (6,33) olduğu saptandı.

SED suşu inoküle edilen sucuk numunelerinde pH değerlerinin 5,59-6,16 arasında olduğu gözlemlendi. Günlere göre pH değişimleri sırasıyla 0. gün 5,95-6,07; 7. gün 5,83-5,90; 14. gün 5,59-5,79 ve 21. gün 5,87-6,16 değerleri arasında bulundu. Tespit edilen en düşük değer %2 tuz ilaveli sucukta 14. günde (5,59), en yüksek değer ise %1,5 tuz ilavesi yapılan sucukta 21. günde (6,16) olduğu tespit edildi.

SEE suşu inoküle edilen sucuk numunelerinde pH değerlerinin ise 5,41-5,92 arasında olduğu belirlendi. Günlere göre pH değişimleri sırasıyla 0. gün 5,81-5,92; 7. gün 5,66-5,83; 14. gün 5,41-5,63 ve 21. gün 5,63-5,86 değerleri arasında bulundu. Tespit edilen en düşük değer %1,5 tuz ilaveli sucukta 14. günde (5,41), en yüksek değer ise %1 tuz ilavesi yapılan sucukta 0. günde (5,92) olduğu saptandı.

İstatistiksel analizler sonucunda, incelenen numunelerin pH değerlerinde uygulanan faktörler dikkate alındığında zaman, suş ve oran bakımından gruplar arasındaki fark önemli bulundu ($p<0,05$). Ayrıca suş*oran, zaman*suş, zaman*oran ve zaman*suş*oran arasındaki etkileşimler anlamlı bulundu ($p<0,05$; Tablo 3.3.).

Genel olarak gruplar değerlendirildiğinde en düşük pH değerlerine 14. günde, en yüksek pH değerlerine 21. günde ulaşıldığı gözlemlenmektedir. Sucuklarda gözlemlenen pH yükselmesini, Kumar ve ark (2017) fermente et ürünlerindeki tuzun varlığı ile açıklamışlardır. Ayrıca Kaya ve Kaban (2013) pH değerinin proteolizis sonucu oluşan amino asitlerin dekarboksilasyon ve deaminasyon reaksiyonları veya ileri metabolizmaları ile oluşan amonyak ve aminler nedeniyle artış gösterdiğini ifade etmiştir. Benzer nitelikte yürütülen çalışmalarda (Lücke 1994, González-Fernández ve ark 2006, Campagnol ve ark 2011) pH değerlerinin 21. günde yükselmesinin sebebi

olgunlaşma sırasındaki enzim aktivitesi (proteoliz), tampon maddelerin artması ve elektrolitlerin azalması nedeniyle amonyak üretiminden kaynaklandığı bildirilmiştir. Bu araştırmada numunelere ait pH değerlerinin yapılan çalışmalarda (Atasever ve ark 1998, Barutçu 2018, Yeşilırmak 2019, Keskin ve Uçar 2023) elde edilen bulgularla benzer olduğu gözlemlenmiştir.

4.2. *S. aureus* ve Enterotoksin Üretme Yeteneği

İncelenen sucuk numunelerinin *S. aureus* sayım sonuçları 0. gün 4,59-6,52 log kob/g; 7. gün 6,41-8,92 log kob/g; 14. gün 7,23-8,91 log kob/g ve 21. gün 6,13-8,82 log kob/g olarak tespit edildi. Zaman, suş ve oran kendi içerisinde değerlendirildiğinde istatistiksel olarak önemlilik arz ederken suş*oran, zaman*suş, zaman*oran ve zaman*suş*oran etkileşimleri anlamlı bulundu ($p<0,05$; Tablo 3.4., Şekil 3.4., Şekil 3.5., Şekil 3.6.).

SEA suşu inoküle edilen sucuk numunelerinde *S. aureus* sayısı 4,59-8,81 log kob/g değerleri arasında bulundu. İnoküle edilen SEA suşuna ait bakteri sayılarının günlere göre sırasıyla 0. gün 4,59-5,36 log kob/g; 7. gün 7,21-8,81 log kob/g; 14. gün 7,52-8,19 log kob/g ve 21. gün 7,09-7,73 log kob/g değerleri arasında olduğu belirlendi. Tespit edilen en düşük değer %2 tuz ilaveli sucukta inokülasyon gününde (0. gün, 4,59 log kob/g), en yüksek değer ise %1,5 tuz ilavesi yapılan sucukta 7. günde (8,81 log kob/g) olduğu gözlemlendi. SEA suşu inoküle edilen sucuk numunelerinde tuz oranları genel olarak değerlendirildiğinde 7. ve 14. günlerde gruplar arasında ortaya çıkan farkın önemli olduğu tespit edildi ($p<0,05$; Tablo 3.4.).

SEB *S. aureus* sayısının 5,69-8,82 log kob/g değerleri arasında olduğu saptandı. İnoküle edilen SEB suşuna ait bakteri sayıları günlere göre sırasıyla 0. gün 5,69-6,32 log kob/g; 7. gün 7,94-8,73 log kob/g; 14. gün 7,36-7,91 log kob/g ve 21. gün 6,82-8,82 log kob/g değerleri arasında tespit edildi. Tespit edilen en düşük değer %2,5 tuz ilaveli sucukta inokülasyon gününde (0. gün, 5,69 log kob/g), en yüksek değer ise %2 tuz ilavesi yapılan sucukta 21. günde (8,82 log kob/g) olduğu bulundu. SEB suşu inoküle edilen sucuk numunelerinde tuz oranları değerlendirildiğinde 21. günde %2 tuz oranı ihtiva eden sucukta ortaya çıkan farkın önemli olduğu gözlemlendi ($p<0,05$; Tablo 3.4.).

SEC suşu inoküle edilen sucuk numunelerinde *S. aureus* sayısı 5,48-8,85 log kob/g değerleri arasında tespit edildi. İnoküle edilen SEC suşuna ait bakteri sayıları günlere göre sırasıyla 0. gün 5,48-6,50 log kob/g; 7. gün 7,16-8,85 log kob/g; 14. gün 8,25-8,72 log kob/g ve 21. gün 7,65-8,50 log kob/g değerleri arasında olduğu belirlendi. Tespit edilen en düşük değer %2,5 tuz ilaveli sucukta inokülasyon gününde (0. gün, 5,48 log kob/g), en yüksek değer ise %1,5 tuz ilavesi yapılan sucukta 7. günde (8,85 log kob/g) olduğu tespit edildi. Tuz oranları baz alındığında SEC suşu inoküle edilen sucuk numunelerinde 7. günde %2,5 tuz oranı içeren grupta ortaya çıkan fark önemli bulundu ($p<0,05$; Tablo 3.4.).

SED suşu inoküle edilen sucuk numunelerinde *S. aureus* sayısı 5,71-8,92 log kob/g değerleri arasında olduğu gözlemlendi. İnoküle edilen SED suşuna ait bakteri sayıları günlere göre sırasıyla 0. gün 5,71-6,52 log kob/g; 7. gün 6,41-8,92 log kob/g; 14. gün 7,55-8,91 log kob/g ve 21. gün 6,95-7,59 log kob/g değerleri arasında bulundu. Tespit edilen en düşük değer %2,5 tuz ilaveli sucukta inokülasyon gününde (0. gün, 5,71 log kob/g), en yüksek değer ise %2 tuz ilavesi yapılan sucukta 7. günde (8,92 log kob/g) olduğu belirlendi. SED suşu inoküle edilen sucuk numunelerinde tuz oranları genel olarak değerlendirildiğinde hepsinde 7. ve 14. günlerde gruplar arasında ortaya çıkan farkın önemli olduğu tespit edildi ($p<0,05$; Tablo 3.4.).

SEE suşu inoküle edilen sucuk numunelerinde *S. aureus* sayısı 5,77-8,61 log kob/g değerleri arasında saptandı. İnoküle edilen SEE suşuna ait bakteri sayıları günlere göre sırasıyla 0. gün 5,77-6,46 log kob/g; 7. gün 6,86-8,61 log kob/g; 14. gün 7,23-8,00 log kob/g ve 21. gün 6,13-8,04 log kob/g değerleri arasında olduğu belirlendi. Tespit edilen en düşük değer %1 tuz ilaveli sucukta inokülasyon gününde (0. gün, 5,77 log kob/g), en yüksek değer ise %1,5 tuz ilavesi yapılan sucukta 7. günde (8,61 log kob/g) olduğu gözlemlendi.

Tuz oranları bakımından 7., 14. ve 21. günlerde gruplar arasındaki fark önemli bulundu ($p<0,05$). Tahmini marjinal ortalamalar (Estimated Marjinal Means) dikkate alındığında suşlar arasında SEA ve SEE; SEB ve SED'nin birbirleriyle benzer SEC'nin hepsinden farklı olduğu tespit edildi. Bu enterotoksijenik suşlarla ilgili yapılan literatür taramasında (Balaban ve Rasooly 2000, Erol ve İşeri 2004, Duyuk 2015) SEA'nın SEE de üretebildiği ya da yakın özelliklere sahip olduğu belirlendi (Tablo 3.4., Şekil 3.4., Şekil 3.5., Şekil 3.6.).

Tuz oranı dikkate alındığında %1 tuz oranına sahip olan sucuk numunelerinde 7. günde SEA ve SEE suşu inoküle edilen sucuk numunelerinin *S. aureus* sayısının benzer olduğu gözlemlendi. SEC suşu inoküle edilen numunelerdeki bakteri sayısı, 14. günde hepsinden farklı olarak tespit edildi. Bakteri sayısı yönünden 21. günde SEC ve SED suşu inoküle edilen numunelerin farklı, diğerlerinin benzer olduğu görüldü.

İçeriğinde %1,5 tuz oranı bulunan sucuk numunelerinde inokülasyon günü (0. gün) SEA suşu inoküle edilen numunelerdeki bakteri sayısının hepsinden farklı olduğu SEB suşu inoküle edilen numunelerin ise bütün gruplarla benzerlik gösterdiği saptandı. SED suşu inoküle edilen numuneler 7. günde bütün gruplardan farklı olarak belirlenirken, 14. gün SEE suşu inoküle edilen numunelerin hepsinden farklı SEB suşu inoküle edilen numunelerin yine bütün gruplarla benzerlik gösterdiği bulundu. Son olarak 21. günde ise SEB ve SEC suşu inoküle edilen numuneler bütün gruplardan farklı olarak tespit edildi.

Sucuk numunelerinden %2 tuz oranı ihtiva edenlerde SEA suşu inoküle edilen numuneler inokülasyon günü (0. gün) yine hepsinden farklı, 7. gün SEA ile SEE suşu inoküle edilen numuneler, SEB ile SED suşu inoküle edilen numunelerin birbirleriyle benzerlik gösterdiği belirlendi. SEA, SEB ve SEE ile SEC ve SED'nin 14. günde birbirleriyle benzer olduğu gözlemlenirken 21. günde bu durumun SEB, SED ve SEE'nin bütün gruplardan farklılık göstermesiyle değiştiği tespit edildi.

Tuz oranı %2,5 olan sucuk numunelerinde ise inokülasyon gününde (0. gün) suşlar arası herhangi bir değişiklik saptanmadı. SEB suşu inoküle edilen sucuk numuneleri 7. günde bütün gruplardan farklı olarak tespit edilirken 14. ve 21. günlerde herhangi bir değişiklik gözlemlenmediği belirlendi. Tahmini marjinal ortalamalara göre tuz oranları %2,5 olan sucuk numunelerinin hepsinden farklı olduğu tespit edildi.

Genel olarak bütün toksin grupları incelendiğinde 7. ve 14. günlerde gruplar arasında farklılıklar önemli bulunurken, 21. günde sadece SEB suşu inoküle edilen numunelerde ortaya çıkan fark dikkate değer bulunmuştur (Tablo 3.4.). Bu durum enterotoksijenik özelliğe sahip *S. aureus* suşlarının 7. ve 14. günlerde gelişimlerinin yüksek seviyelerde seyretmesiyle açıklanabilmektedir. SEA, gelişimin eksponansiyel fazı boyunca üretilmektedir. SEB, SEC ve SED'in en yüksek konsantrasyonu gelişimin eksponansiyel aşamasından durağan aşamasına geçişi sırasında

üretilmektedir. Bu da *agr* sistemi tarafından düzenlenmelerinin bir özelliği olarak ifade edilmektedir (Derzelle ve ark 2009).

Yapılan çalışmada sucuk numunelerinde *S. aureus* sayılarında gözlemlenen logaritmik artışa rağmen herhangi bir toksin üretimi belirlenemedi. *S. aureus*'un gıdalarda tespit edilebilir miktarda enterotoksin üretme yeteneği, suşun enterotoksijenik olup olmasına ve enterotoksin sentezi için gerekli çevresel koşulların mevcudiyetine bağlıdır (Paulin ve ark 2011). Bunun yanı sıra enterotoksin genlerinin eksprese edilmemesi ile de ilgili olduğu belirtilmektedir (Gajewska ve ark 2023). Yaklaşık 10^5 - 10^6 kob/g düzeyinde bulunan *S. aureus*'un gıdalarda SE'nin tespit edilebilmesi için gerekli minimum değer olduğu ifade edilmektedir (Paulin ve ark 2011). Bazı SE'lerin (SEB, SEC, SED) üretimi *agr* sistemi aracılığıyla QS ile bağlantılıdır (Ortega ve ark 2010). Bu nedenle, enterotoksin üretiminin gerçekleşmesi için bakterilerin yüksek konsantrasyonlarda bulunması gerektiği ifade edilmektedir (Paulin ve ark 2011). Ancak konuya ilişkin güncel araştırmalar (Johler ve ark 2015a, Schwendimann ve ark 2021), bu sayının daha düşük olduğu durumlarda bile enterotoksinlerin varlığının tespit edilebileceğini göstermektedir. Özellikle *S. aureus*'un gelişimi sırasında enterotoksinler ekspanansiyel aşamada düşük miktarlarda üretilirken post-ekspanansiyel ve durağan aşamalarda üretimlerinde artma söz konusu olabilmektedir. Bang ve ark (2008), ilave tuz (%1,76; %2,24; %3,64) ve sodyum nitrit (ilavesiz ve 154 ppm ilaveli) ekleyerek ürettikleri domuz sucuklarında, 10^9 - 10^{10} kob/g *S. aureus* sayısına sahip numunelerde enterotoksin tespit edilmediğini bildirmiştir. Araştırmacılar, sucuğun olgunlaşma sürecinde *S. aureus* sayısında 2-3 log düzeyinde artış görülmesinin gıdalarda arzu edilen bir durum olmadığını ifade etmişlerdir. Bu durum SE oluşumunda çevresel faktörlerin (örn., kurutma ve sıcaklık gibi) etkili olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada elde edilen bulgular Bang ve ark (2008)'nın sonuçlarıyla uyum içerisindedir. Üründe yüksek *S. aureus* sayılarına ulaşılması mikroorganizmanın mutlak biçimde enterotoksin üretebileceği anlamına gelmemektedir.

Paulin ve ark (2011), enterotoksin üretiminin patojenle rekabet eden türe göre değiştiğini ifade etmiştir. SEA, bazı LAB (*Lactobacillus*, *Streptococcus* ve *Leuconostoc*) tarafından parçalanırken, LAB dışında sınırlı sayıda mikroorganizma (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia* ve *Saccharomyces*) tarafından parçalanmamıştır. Patojen rekabet halindeyken enterotoksin üretiminin azaldığı,

mikroorganizma rekabet halindeyken de enterotoksin oluşumu için daha yüksek bir *S. aureus* konsantrasyonuna ihtiyaç duyulabileceği öne sürülmüştür. Aynı çalışmada 3×10^6 kob/ml konsantrasyonunda broth kültüründe enterotoksin üretilirken $7-8 \times 10^6$ kob/ml konsantrasyonunda ticari peynirlerde enterotoksin oluşturmadığı bildirilmiştir. Stafilokokların enterotoksin üretmeden de yüksek konsantrasyonlarda gelişebileceği belirtilmiştir. Cretenet ve ark (2011) enterotoksin oluşumu için yüksek konsantrasyonlarda enterotoksijenik *S. aureus* bulunmasının gerektiğini ancak pH, a_w gibi diğer faktörlerin de enterotoksin üretiminde önemli olduğunu belirtmişlerdir.

Bakterilerin toksin üretiminde bulundukları ortama göre değişiklik görülebilmektedir (Márta ve ark 2011). *S. aureus* suşlarının enterotoksin üretme yeteneğinin tespit edilmesinde laboratuvar ortamı yerine gıda matrislerinin kullanılmasına ilişkin çeşitli çalışmalar (Derzelle ve ark 2009, Even ve ark 2009, Wallin-Carlquist ve ark 2010b, Cretenet ve ark 2011, Valihrach ve ark 2014) bulunmaktadır. İşlenmiş et ürünleri yaygın olarak *S. aureus* tarafından kontamine edilmektedir. Ancak enterotoksin üretimi ve ekspresyonu hakkında yapılan literatür taramasında yeterli sayıda bilimsel literatür tespit edilememiştir. Bununla birlikte, işlenmiş domuz etlerinde enterotoksin A ve D üretimi ile ilgili çalışmalar (Wallin-Carlquist ve ark 2010b, Márta ve ark 2011, Zeaki ve ark 2014) bulunmaktadır. Alibayov ve ark (2015) yaptıkları çalışmada, farklı et türlerinin enterotoksin oluşumu ve ekspresyonu üzerindeki etkisini incelemiştir. Çalışmada, *S. aureus* suşlarının gelişimi ile et örneklerinde enterotoksin ekspresyonu ve üretimi arasında düşük düzeyde bir korelasyon bulunmuştur. Enterotoksin ekspresyonu genellikle hem et ürünlerinde hem de et suyu kültürlerinde bakteriyel gelişimle bağlantılıdır (Zeaki ve ark 2014). Alibayov ve ark (2015) aynı zamanda BHI'daki sec ekspresyon seviyesinin geç ekspanansiyel fazda en üst düzeye ulaştığını ve daha sonra Wallin-Carlquist ve ark (2010b)'nın bulgularıyla uyumlu olarak azaldığını ifade etmiştir. Derzelle ve ark (2009) tarafından da benzer sonuçlar tespit edilmiştir. Nitekim araştırmacılar, sec ve diğer toksinlerin ekspresyonu, bakteri konsantrasyonu 4×10^8 kob/ml ile 2×10^9 kob/ml'ye ulaştığında laboratuvar ortamında planktonik büyüme koşulları altında post-ekspanansiyel büyüme fazında artış gözlemlendiğini ileri sürmüşlerdir. Gıdadaki *S. aureus* suşlarının gelişim fazı toksin üretimini (Hunt ve ark 2014) ve analiz edilen sıcaklık/pH bağımlılığını etkilemiştir. SEC'in en yüksek konsantrasyonu, tüm et ürünlerinde $4,61 \pm 0,05 - 8,1 \pm 0,27$ log kob/cm² arasında artarken toksin üretiminin

eksponansiyel büyüme fazının sonunda gerçekleştiği belirtilmiştir. Bakteriyel gelişimin SEC üretimine bağlı olmadığı ve tespit edilebilir konsantrasyonlarda toksin üretiminden önce kritik bir hücre kütlelerinin gerekli olduğu düşünülmektedir (Hunt ve ark 2014). Ayrıca, ette *S. aureus* gelişiminin olmaması enterotoksin üretilmediğinin kanıtı olmamaktadır. Bu durum hem bakterilerin hem de enterotoksin konsantrasyonlarının değerlendirilmesinin önemini vurgulamaktadır.

Etin kendine has özellikleri, gıda kaynaklı patojenlerin özellikle de *S. aureus* suşlarının gelişimi için ideal bir ortam sağlamasına rağmen enterotoksin üretimini engellemektedir (Rajkovic 2012). SEC'deki düşüş, LAB'nin proteazlar aracılığıyla SE'lerini parçalamış olabilmesinden kaynaklanmaktadır (Chordash ve Potter 1976, Even ve ark 2009). Kontrolsüz koşullar altında pH değişimi toksin üretimini engelleyebilmektedir (Even ve ark 2009, Cretenet ve ark 2011, Hunt ve ark 2014). Alibayov ve ark (2015), gıda matrislerinin *S. aureus*'un gelişimi ve enterotoksin üretimini etkilediğini ifade etmiştir. Sucuk örnekleri ile yapılan çalışmada hızlı bir asitleşmenin *S. aureus*'un gelişimini ve toksin üretimini engellediği belirtilmiştir (Kaban ve Kaya 2006).

Attien ve ark (2014) tarafından perakende satış noktalarında elde edilen numunelerle gerçekleştirilen çalışmada, *S. aureus* tespit edilmesine rağmen enterotoksin üretimi söz konusu olmamıştır. Bu durum dikkate alındığında ilgili bulguların bu çalışma verileri ile uyum içerisinde olduğu gözlemlenmiştir. Enterotoksin üretiminin tespit edildiği çalışmaların (Asgarpoor ve ark 2018, Yalçın ve Can 2013) da mevcut olmasının, son üründe personel hijyeni de dahil olmak üzere çok çeşitli kontaminasyon kaynaklarından oluşabileceği düşünülmektedir.

S. aureus'un gelişimi ve enterotoksin üretimi, *S. aureus*'un popülasyon yoğunluğu, rekabetçi mikrofloranın varlığı, starter kültür olarak LAB'nin kullanımı, gıdanın depolama ortamı, sıcaklık, pH, tuz, a_w değerleri ve oksijen varlığı gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. *S. aureus* için 10^6 kob/g düzeyi toksin üretimi açısından önemlidir. Bu çalışmada, asitliği düşürmek için herhangi bir starter kültür kullanılmadığından fermentasyon doğal olarak bulunan LAB florası tarafından başlatılmıştır. Bu durumun fermentasyonun daha yavaş ilerlemesine ve bu nedenle pH değerinin *S. aureus* gelişimi ve toksin üretimini engellediği noktaya kadar düşmemesine neden olabileceği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra, bakteri sayıları ve

gen ekspresyonu dikkate alındığında enterotoksin tespitinin sucuktaki engel faktörlere göre değişiklik gösterebileceği ifade edilebilmektedir.

4.3. *S. aureus* Enterotoksin Gen Profilleri

Enterotoksijenik suşların inoküle edilmesiyle üretimi gerçekleştirilen sucukların hepsinde enterotoksin genlerinin bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.7., Şekil 3.8., Şekil 3.9., Şekil 3.10., Şekil 3.11.). Bunlar arasında SEA, SEC ve SEE suşlarının inoküle edildiği örneklerde *sea*, *sec* ve *see* genleri dışında *sei* ve *seg* genlerinin de bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 3.12.).

Yapılan literatür taramalarında, üretim periyodunda toksin genleriyle ilgili çalışmalara ulaşılamamıştır. Bu anlamda sahada son ürüne yönelik bazı çalışmalarda (Gencay ve ark 2010, Moustafa ve ark 2016, Eid ve ark 2018, EL-Maghraby ve ark 2018, Mahfoozi ve ark 2019, Savariraj ve ark 2019, Sahin ve ark 2020) gen profilleri belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmalar değerlendirildiğinde, sıklıkla yeni enterotoksin genlerinin saptandığı ve SE genlerinden en fazla *sea*'nın tespit edildiği belirlenmiştir. *S. aureus* izolatlarında *seg* ve *sei*'nin yüksek oranda bir arada bulunmasının bu genlerin çoğunun pozitif izolatta *egc*'nin üyeleri olarak var olabileceğini düşündürmektedir. *S. aureus* izolatlarında SE genlerinin varlığı, bu suşların gıda zehirlenmesine veya diğer hastalıklara neden olması için gerekmektedir. Ancak bu yeni bildirilen SE genlerini barındıran suşlar tarafından hastalıklara neden olmaya yetecek seviyelerde toksin üretiminin gösterilmesi önemlidir (Omoe ve ark 2002).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Başta et ve et ürünleri olmak üzere birçok gıda özellikle mikrobiyal gelişim nedeniyle çok çabuk bozulabilmektedir. Bunun önlenmesinde katkı maddeleri ve gıda muhafaza yöntemleri kullanılmıştır. Bu açıdan da yüksek miktarlarda tuz tüketimi, önemli bir halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Tuz alımının sınırlandırılması, tuza tolerans gösteren bakteriler arasında intoksikasyona neden olup halk sağlığını tehdit eden, sucuk ve diğer fermente et ürünlerinde en önemli patojen olarak ifade edilen *S. aureus* için dikkat edilmesi gereken önemli bir faktördür. Sucukta *S. aureus*'un gelişimini belirleme ve fermentasyon sürecinde çeşitli faktörlerin stafilocokların gelişimi üzerindeki etkilerini tespit etme konusunda yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Geleneksel Türk tipi fermente sucuğun *S. aureus* ile olası kontaminasyonu dikkate alındığında üretim sürecinde yeterli hijyenin sağlanması hususunda problemler yaşanmaktadır. Bu anlamda *S. aureus* gelişimi ve toksin üretimi, halk sağlığı için son derece önemli bir risk potansiyeline sahiptir. *S. aureus* kontaminasyonunun önlenmesi, LAB'nin başlangıç sayısı, pH değerlerinin hızlı bir şekilde düşmesi ve yeterli fermentasyonun sağlanması sucuk üretim sürecinde kritik noktalar olarak değerlendirilmelidir. Aynı zamanda, *S. aureus*'un çiğ ette bulunması muhtemel olduğundan bu patojenin başlangıç sayısının da kritik rol oynadığı unutulmamalıdır. Sucuk üretiminde, yeterli hijyenin sağlanmasının yanı sıra tarladan sofraya kadar HACCP, GMP ve GHP hayata geçirilmelidir. *S. aureus* ve gıda matrisi arasındaki etkileşimlerin ve gıdalarda SE üretim mekanizmalarının daha iyi anlaşılması için çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Gıdalarda SE tespiti için yeni ve daha hassas yöntemlerin geliştirilmesi de bu anlamda önem arz etmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Aaslyng MD, Vestergaard C, Koch AG, 2014. The effect of salt reduction on sensory quality and microbial growth in hotdog sausages, bacon, ham and salami. *Meat Science*, 96(1), 47-55.
- Acharya KR, Passalacqua EF, Jones EY, Harlos K, Stuart DI, Brehm RD, Tranter HS, 1994. Structural basis of superantigen action inferred from crystal structure of toxic-shock syndrome toxin-1. *Nature*, 367(6458), 94-97.
- Aires-de-Sousa M, Boye K, De Lencastre H, Deplano A, Enright MC, Etienne J, Friedrich A, Harmsen D, Holmes A, Huijsdens XW, Kearns AM, Mellmann A, Meugnier H, Rasheed JK, Spalburg E, Strommenger B, Struelens MJ, Tenover FC, Thomas J, Vogel U, Westh H, Xu J, Witte W, 2006. High interlaboratory reproducibility of DNA sequence-based typing of bacteria in a multicenter study. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(2), 619-621.
- Aiyegoro OA, 2024. Microbial contamination of processed meat. In: *Encyclopedia of Meat Sciences*, Volume 2. Eds: Dikeman M, Lutz G, Dickson J, Sebranek J, Smith S, 3rd edition. United Kingdom: Elsevier, p. 484-490.
- Alibayov B, Karamonova L, Hollerova R, Zdenkova K, Demnerova K, 2015. Differences in transcription and expression of staphylococcal enterotoxin C in processed meat products. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 578-585.
- Aliño M, Grau R, Baigts D, Barat JM, 2009. Influence of sodium replacement on the salting kinetics of pork loin. *Journal of Food Engineering*, 95(4), 551-557.
- Aliño M, Grau R, Fernández-Sánchez A, Arnold A, Barat JM, 2010a. Influence of brine concentration on swelling pressure of porkmeat throughout salting. *Meat Science*, 86(3), 600-606.
- Aliño M, Grau R, Fuentes A, Barat JM, 2010b. Influence of low-sodium mixtures of salts on the post-salting stage of dry-cured ham process. *Journal of Food Engineering*, 99(2), 198-205.
- Aliño M, Grau R, Fuentes A, Barat JM, 2010c. Characterisation of pile salting with sodium replaced mixtures of salts in dry-cured loin manufacturing. *Journal of Food Engineering*, 97(3), 434-439.
- Altun SK, Temur A, Harem İŞ, 2015. Erzurum ilinde satışa sunulan fermente sucuk ve sosislerin histolojik muayenesi. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 4(2), 73-79.
- Alves VF, Nino-Arias FC, Pitondo-Silva A, de Araújo Frazilio D, de Oliveira Gonçalves L, Toubas LC, Sapateiro Torres IM, Oxaran V, Dittmann KK, De Martinis ECP, 2018. Molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* from some artisanal Brazilian dairies. *International Dairy Journal*, 85, 247-253.
- Amini R, Abdulmir AS, Ling BP, Jahanshahi F, Hematian A, Zargar M, Sekawi Z, Jalilian FA, 2011. Isolation and identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from keys of college students using different detection methods. *British Biotechnology Journal*, 2(1), 13-25.
- Anar Ş, 2010. Et ve Et Ürünleri Teknolojisi. Dora Basım-Yayın Dağıtım Ltd. Şti., Bursa.
- Anonim, 2011. Food Safety Authority of Ireland. *Staphylococcus aureus*. Microbial fact sheet series, 1, 1-5. Erişim tarihi, 04.10.2023. Erişim adresi, <https://www.fsai.ie/getmedia/ae5bbe29-ecce-44a9-b75f-6ff61e14f37f/staphylococcus-factsheet-final.pdf?ext=.pdf>
- Anonim, 2017. Toolkit for investigation and response to food and waterborne disease outbreaks with a European dimension. European Centre for Disease Prevention and Control. Erişim tarihi, 04.10.2023. Erişim adresi, <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/toolkit-investigation-and-response-food-and-waterborne-disease-outbreaks-eu>
- AOAC, 2000. Official Methods of Analysis of AOAC International (17.Edition). USA.
- Argaw S, Addis M, 2015. A review on staphylococcal food poisoning. *Food Science and Quality Management*, 40, 59-72.
- Argudín MÁ, Mendoza MC, Rodicio MR, 2010. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 2(7), 1751-1773.
- Armenteros M, Aristoy MC, Toldrá F, 2009. Effect of sodium, potassium, calcium and magnesium chloride salts on pork muscle proteases. *European Food Research and Technology*, 229, 93-98.

- Armutcu Ü, Hazar FY, Yılmaz Oral ZF, Kaban G, Kaya M, 2020. Effects of different internal temperature applications on quality properties of heat-treated sucuk during production. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(6), e14455.
- Arslan A, 2020. Et Muayenesi ve Et Ürünleri Teknolojisi, 3. Baskı. Medipres Matbaacılık Ltd. Şti., Malatya.
- Asao T, Kumeda Y, Kawai T, Shibata T, Oda H, Haruki K, Nakazawa H, Kozaki S, 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology and Infection*, 130(1), 33.
- Asgarpoor D, Haghi F, Zeighami H, 2018. Frequency of enterotoxin producing *Staphylococcus aureus* and toxin genes in raw and cooked meat samples. *Infection, Epidemiology and Microbiology*, 4, 53-58.
- Atasever M, Keleş A, Güner A, Uçar G, 1998. Konya'da tüketime sunulan fermente sucukların bazı kalite nitelikleri. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 14(2), 27-32.
- Attien P, Sina H, Moussaoui W, Zimmermann-Meisse G, Dadié T, Keller D, Riegel P, Edoh V, Kotchoni SO, Dje M, Prevost G, Baba-Moussa L, 2014. Mass spectrometry and multiplex antigen assays to assess microbial quality and toxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical and food samples. *BioMed Research International*, 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/485620>
- Aycicek H, Cakiroglu S, Stevenson TH, 2005. Incidence of *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat meals from military cafeterias in Ankara, Turkey. *Food Control*, 16(6), 531-534.
- Aydin A, Sudagidan M, Muratoglu K, 2011. Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. *International Journal of Food Microbiology*, 148(2), 99-106.
- Baird Parker AC, 1962. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. *Journal of Applied Microbiology*, 25(1), 12-19.
- Baird Parker AC, 1963. A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests. *Microbiology*, 30(3), 409-427.
- Baird Parker TC, 2000. *Staphylococcus aureus*. In: The microbiological safety and quality of food. Eds: Lund BM, Baird Parker TC, Gould GW. Gaithersburg: Aspen Publishers, p. 1317-35.
- Baird Parker A, Davenport E, 1965. The effect of recovery medium on the isolation of *Staphylococcus aureus* after heat treatment and after the storage of frozen or dried cells. *Journal of Applied Microbiology*, 28(3), 390-402.
- Balaban N, Rasooly A, 2000. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 61(1), 1-10.
- Bang W, Hanson DJ, Drake MA, 2008. Effect of salt and sodium nitrite on growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the production of air-dried fresh pork sausage. *Journal of Food Protection*, 71(1), 191-195.
- Barat JM, Aliño M, Fuentes A, Grau R, Romero JB, 2009. Measurement of swelling pressure in pork meat brining. *Journal of Food Engineering*, 93(1), 455-459.
- Barat JM, Baigts D, AliñoM, Fernández FJ, Pérez-García VM. 2011. Kinetics studies during NaCl and KCl pork meat brining. *Journal of Food Engineering*, 106(1), 102-110.
- Barat JM, Toldrá F, 2012. Reducing salt in processed meat products. In: *Processed Meats: Improving Safety, Nutrition and Quality*. Eds: Kerry JP, Kerry JF. Cambridge: Woodhead, p. 331-345.
- Barutçu E, 2018. Adana ili'nde üretilen bazı sucuklarda elisa ve gerçek zamanlı pcr teknikleri kullanılarak tavuk eti varlığının incelenmesi ve sucukların bazı fizikokimyasal özelliklerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Bayles KW, Iandolo JJ, 1989. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *Journal of Bacteriology*, 171(9), 4799-4806.
- Bennett RW, Lancette GA, 1998. *Staphylococcus aureus*. Chapter 12. In: *FDA's Bacteriological Analytical Manual*, 8th ed, Revision A.

- Bergdoll MS, Lee Wong AC, 2006. Staphylococcal intoxications. In: Foodborne infections and intoxications. Eds: Riemann HP, Cliver DO, 3rd edition. USA: Academic Press, p. 523-562.
- Betley MJ, Mekalanos JJ, 1985. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. *Science*, 229(4709), 185-187.
- Bhunia AK, 2018. *Staphylococcus aureus*. In: Foodborne Microbial Pathogens Mechanisms and Pathogenesis, Second Edition. USA: Springer Science+Business Media, LLC, p. 181-192.
- Biçer Y, Uçar G, 2016. Gıda katkı maddeleri ve raf ömrü ilişkisi. *Türkiye Klinikleri/J Food Hyg Technol-Special Topics*, 2(2), 30-39.
- Bilge G, 2010. Sucukta üretim sırasında meydana gelen mikrobiyolojik ve biyokimyasal değişmelere üretim sıcaklığının ve starter kültürün etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Blesa E, Aliño M, Barat JM, Grau R, Toldrá F, Pagán MJ, 2008. Microbiology and physico-chemical changes of dry-cured ham during the post-salting stage as affected by partial replacement of NaCl by other salts. *Meat Science*, 78(1-2), 135-142.
- Boisset S, Geissmann T, Huntzinger E, Fechter P, Bendridi N, Possedko M, Chevalier C, Helfer AC, Benito Y, Jacquier A, Gaspin C, Vandenesch F, Rombly P, 2007. *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes & Development*, 21(11), 1353-1366.
- Borst DW, Betley MJ, 1994. Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression correlate with sea allele class. *Infection and Immunity*, 62(1), 113-118.
- Bou R, Cofrades S, Jiménez-Colmenero F, 2017. Fermented meat sausages. In: Fermented Foods in Health and Disease Prevention. Eds: Frias J, Martinez-Villaluenga C, Peñas E. United Kingdom: Academic Press, p. 203-235.
- Brosnahan AJ, Schlievert PM, 2011. Gram-positive bacterial superantigen outside-in signaling causes toxic shock syndrome. *The FEBS Journal*, 278(23), 4649-4667.
- Bulajic S, Colovic S, Misic D, Djordjevic J, Savic-Radovanovic R, Asanin J, Ledina T, 2017. Enterotoxin production and antimicrobial susceptibility in *Staphylococci* isolated from traditional raw milk cheeses in Serbia. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 52(12), 864-870.
- Codex Alimentarius Commission (CAC), 2020. General Principles of Food Hygiene CXC-1 1969. Adopted in 1969. Amended in 1999. Revised in 1997, 2003, 2020. Editorial Corrections in 2011. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Erişim tarihi, 21.11.2023. Erişim adresi, http://www.correctfoodsystems.com.au/uploads/3/8/9/4/38945605/codex_standards_cxc-1-1969_2021.pdf
- Campagnol PCB, dos Santos BA, Wagner R, Terra NN, Pollonio MAR, 2011. The effect of yeast extract addition on quality of fermented sausages at low NaCl content. *Meat science*, 87(3), 290-298.
- Can HY, Elmalı M, Karagöz A, 2017. Molecular typing and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk, cheese, minced meat, and chicken meat samples. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 37(2), 175.
- Cao R, Zeaki N, Wallin-Carlquist N, Skandamis PN, Schelin J, Rådström P, 2012. Elevated enterotoxin A expression and formation in *Staphylococcus aureus* and its association with prophage induction. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(14), 4942-4948.
- Carbonnelle E, Beretti JL, Cottyn S, Quesne G, Berche P, Nassif X, Ferroni A, 2007. Rapid identification of *Staphylococci* isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(7), 2156-2161.
- Cebrián G, Arroyo C, Mañas P, Condón S, 2014. Bacterial maximum non-inhibitory and minimum inhibitory concentrations of different water activity depressing solutes. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 67-74.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2021. National Outbreak Reporting System. Erişim tarihi, 11.03.2024. Erişim adresi, <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>.

- CDC, 2022. CDC and Food Safety- National Centre for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED). Erişim tarihi, 07.12.2023. Erişim adresi, <https://www.cdc.gov/foodsafety/cdc-and-food-safety.html#:~:text=CDC%20estimates%20that%20each%20year,than%20%2415.6%20billi on%20each%20year.>
- Chaalal W, Chaalal N, Bourafa N, Kihal M, Diene SM, Rolain JM, 2018. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from food products in Western Algeria. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(6), 353-360.
- Chiang YC, Liao WW, Fan CM, Pai WY, Chiou CS, Tsen HY, 2008. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology*, 121(1), 66-73.
- Chordash RA, Potter NN, 1976. Stability of staphylococcal-enterotoxin a to selected conditions encountered in foods. *Journal of Food Science*, 41, 906-909.
- Clinical, Laboratory Standards Institute (CLSI), 2024. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (CLSI M100™). 34th edition. Erişim tarihi, 01.03.2024. Erişim adresi, https://clsi.org/media/pjfbvql/m100ed34e_sample.pdf.
- Cocolin L, Manzano M, Cantoni C, Comi G, 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Applied Environmental Microbiology*, 67(11), 5113-5121.
- Cofrades S, López-López I, Solas MT, Bravo L, Jiménez-Colmenero F, 2008. Influence of different types and proportions of added edible seaweeds on characteristics of low-salt gel/emulsion meat systems. *Meat Science*, 79, 767-776.
- Corral S, Salvador A, Flores M, 2013. Salt reduction in slow fermented sausages affects the generation of aroma active compounds. *Meat Science*, 93(3), 776-785.
- Cretenet M, Even S, Le Loir Y, 2011. Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. *Dairy Science and Technology*, 91, 127-150.
- Croxatto A, Prod'homme G, Greub G, 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), 380-407.
- Crehan M, Troy DJ, Buckley DJ, 2000. Effects of salt level and high hydrostatic pressure processing on frankfurters formulated with 1.5 and 2.5% salt. *Meat Science*, 55(1), 123-130.
- da Cunha MLRS, 2018. Methods for the identification, characterization, and tracking the spread of *Staphylococcus aureus*. In: *Staphylococcus aureus*. Ed: Fetsch A. United Kingdom: Academic Press, p. 105-125.
- Darwish WS, Atia AS, Reda LM, Elhelaly AE, Thompson LA, Saad Eldin WF, 2018. Chicken giblets and wastewater samples as possible sources of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Prevalence, enterotoxin production, and antibiotic susceptibility. *Journal of Food Safety*, 38(4), e12478.
- Das AK, Nanda PK, Das A, Biswas S, 2019. Hazards and safety issues of meat and meat products. In: *Food Safety and Human Health*. Eds: Singh RL, Mondal S. UK: Academic Press, p. 145-168.
- De Buyser ML, Dufour B, Maire M, Lafarge V, 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *International Journal of Food Microbiology*, 67(1-2), 1-17.
- Dertli E, Yilmaz MT, Tatlisu NB, Toker OS, Cankurt H, Sagdic O, 2016. Effects of in situ exopolysaccharide production and fermentation conditions on physicochemical, microbiological, textural and microstructural properties of Turkish-type fermented sausage (sucuk). *Meat Science*, 121, 156-165.
- Derzelle S, Dilasser F, Duquenne M, Deperrois V, 2009. Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. *Food Microbiology*, 26(8), 896-904.
- Desmond E, 2006. Reducing salt: a challenge for the meat industry. *Meat Science*, 74, 188-196.

- Desmond E, Vasilopoulos C, 2019.Reducing salt in meat and poultry products. In: Reducing salt in foods. Eds: Beeren C, Groves K, Titoria PM. United Kingdom: Woodhead Publishing, p. 159-183.
- Dixon M, James M, Leathers R, Smithers GW, 2024. Meat and Meat Products. In: Encyclopedia of Food Safety. Ed: Smithers GW, 2nd ed. UK: Academic Press, p. 108-120.
- dos Santos Cruxen CE, Funck GD, Haubert L, da Silva Dannenberg G, de Lima Marques J, Chaves FC, da Silva WP, Fiorentini ÂM, 2019. Selection of native bacterial starter culture in the production of fermented meat sausages: Application potential, safety aspects, and emerging technologies. Food Research International, 122, 371-382.
- dos Santos JM, Bellucci ERB, Carvalho LT, Bis-Souza CV, Lorenzo JM, da Silva-Barretto AC, 2023. Reduced fat-reduced sodium fermented meat products: a review of reformulation strategies. Food Science and Technology, 43.
- Dubois D, Leyssene D, Chacornac JP, Kostrzewa M, Schmit PO, Talon R, Bonnet R, Delmas J, 2010. Identification of a variety of *Staphylococcus* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Journal of Clinical Microbiology, 48(3), 941-945.
- Dunman PÁ, Murphy E, Haney S, Palacios D, Tucker-Kellogg G, Wu S, Borwn EL, Zagursky RJ, Shlaes D, Projan SJ, 2001. Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the agr and/or sarA loci. Journal of Bacteriology, 183(24), 7341-7353.
- Duyuk G, 2015. Çiğ sütlerde *Staphylococcus aureus* ve stafilokokal enterotoksin varlığının belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- EFSA, 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. EFSA Journal, 14(12), 4634.
- Eid H, Mohamed G, El Borolos I, 2018. Phenotypic and genotypic detection of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and meat products. Suez Canal Veterinary Medical Journal, 23(2), 59-79.
- EL-Maghraby MS, Hassan MA, Hassanin FS, Shawky NA, 2018. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in meat product sandwiches using multiplex PCR. Benha Medical Journal, 35, 190-196.
- Ercoşkun H, Özkal SG, 2011. Kinetics of traditional Turkish sausage quality aspects during fermentation. Food Control, 22(2), 165-172.
- Erol İ, İşeri Ö, 2004. Stafilokokal enterotoksinler. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 51, 239-245.
- Even S, Charlier C, Nouaille S, Zakour NLB, Cretenet M, Cousin FJ, Gautier M, Coccagn-Bousquet M, Loubière P, Le Loir Y, 2009. *Staphylococcus aureus* virulence expression is impaired by *Lactococcus lactis* in mixed cultures. Applied and Environmental Microbiology, 75, 4459-4472.
- Everis LK, Betts G, 2019. Microbial issues in salt reduction. In: Reducing salt in foods. Eds: Beeren C, Groves K, Titoria PM. United Kingdom: Woodhead Publishing, p. 129-155.
- Feiner G, 2006. Additives: phosphates, salts (sodium chloride and potassium chloride, citrate, lactate) and hydrocolloids. In: Meat products handbook practical science and technology. Boca Raton: Woodhead Publishing, p. 72-88.
- Féraudet Tarris C, Goulard-Huet C, Nia Y, Devilliers K, Marcé D, Dambrune C, Lefebvre D, Hennekinne JA, Simon S, 2021. Highly sensitive and specific detection of staphylococcal enterotoxins SEA, SEG, SEH, and SEI by immunoassay. Toxins, 13(2), 130.
- Ferreira AM, Bonesso MF, Mondelli AL, de Souza MDLR., 2012. Identification of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from patients with urinary tract infection using a simple set of biochemical tests correlating with 16S–23S interspace region molecular weight patterns. Journal of Microbiological Methods, 91(3), 406-411.
- Fetsch A, Johler S, 2018. *Staphylococcus aureus* as a foodborne pathogen. Current Clinical Microbiology Reports, 5, 88-96.
- Fisher EL, Otto M, Cheung GY, 2018. Basis of virulence in enterotoxin-mediated staphylococcal food poisoning. Frontiers in Microbiology, 9, 436.

- Fitzgerald JR, Reid SD, Ruotsalainen E, Tripp TJ, Liu M, Cole R, Kuusela P, Schlievert PM, Järvinen A, Musser JM, 2003. Genome diversification in *Staphylococcus aureus*: molecular evolution of a highly variable chromosomal region encoding the staphylococcal exotoxin-like family of proteins. *Infection and Immunity*, 71(5), 2827-2838.
- Flores M, Hernández D, 2007. Optimization of multiple headspace solid-phase microextraction for the quantification of volatile compounds in dry fermented sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8688-8695.
- Fraqueza MJ, Patarata L, 2020. Fermented Meat Products: From the Technology to the Quality Control. In: *Fermented Food Products*. Eds: Sankaranarayanan A, Amaesan N, Dhanasekaran D. Boca Raton: CRC Press, p. 197-237.
- Frenay HME, Bunschoten AE, Schouls LM, Van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Verhoef J, Mooi FR, 1996. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15, 60-64.
- Gajewska J, Zakrzewski AJ, Chajęcka-Wierzchowska W, Zadernowska A, 2023. Impact of the Food-Related Stress Conditions on the Expression of Enterotoxin Genes among *Staphylococcus aureus*. *Pathogens*, 12(7), 954.
- Garrity GM, Johnson KL, Bell J, Searles DB, 2004. Taxonomic outline of the procaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd ed. New York: Springer.
- Gencay YE, Ayaz ND, Doğru AK, 2010. Enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* and other Staphylococcal isolates from various foods and food ingredients. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 7(2), 75-80.
- Gherardi G, Di Bonaventura G, Savini V, 2018. Staphylococcal Taxonomy. In: *Pet-to-Man Travelling Staphylococci A World in Progress*, UK: Academic Press, p. 1-10.
- Goerke C, Pantucek R, Holtfreter S, Schulte B, Zink M, Grumann D, Bröker BM, Doskar J, Wolz C, 2009. Diversity of prophages in dominant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *Journal of Bacteriology*, 191(11), 3462-3468.
- Gonzalez AGM, Marques LMP, Gomes MDSA, Beltrão JCDC, Pinheiro MG, Esper LMR, de Paula GR, Teixeira LA, Aguiar-Alves F, 2017. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in minas frescal cheese: evaluation of classic enterotoxin genes, antimicrobial resistance and clonal diversity. *FEMS Microbiology Letters*, 364(23), fnx232.
- González-Fernández C, Santos EM, Rovira J, Jaime I, 2006. The effect of sugar concentration and starter culture on instrumental and sensory textural properties of chorizo-Spanish dry-cured sausage. *Meat Science*, 74(3), 467-475.
- Grispoldi L, Karama M, Armani A, Hadjicharalambous C, Cenci-Goga BT, 2021. *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food of animal origin and staphylococcal food poisoning risk assessment from farm to table. *Italian Journal of Animal Science*, 20(1), 677-690.
- Guichard E, 2002. Interactions between flavor compounds and food ingredients and their influence on flavor perception. *Food Reviews International*, 18(1), 49-70.
- Günther S, Varma AK, Moza B, Kasper KJ, Wyatt AW, Zhu P, Rahman AK, Li Y, Mariuzza RA, McCormick JK, Sundberg EJ, 2007. A novel loop domain in superantigens extends their T cell receptor recognition site. *Journal of Molecular Biology*, 371(1), 210-221.
- Gürbüz Ü, 2023. Mezbaha Bilgisi ve Pratik Et Muayenesi. Nobel & Atlas Akademi, Konya.
- Haag AF, Bagnoli F, 2017. The role of two-component signal transduction systems in *Staphylococcus aureus* virulence regulation. *Staphylococcus aureus: Microbiology, Pathology, Immunology, Therapy and Prophylaxis*, 145-198.
- Hennekinne JA, Ostyn A, Guillier F, Herbin S, Prufer AL, Dragacci S, 2010. How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized?. *Toxins*, 2(8), 2106-2116.
- Hennekinne JA, 2018. *Staphylococcus aureus* as a leading cause of foodborne outbreaks worldwide. In: *Staphylococcus aureus*. Ed: Fetsch A. United Kingdom: Academic Press, p. 129-146.

- Hunt K, Butler F, Jordan K, 2014. Factors affecting staphylococcal enterotoxin C-bovine production in milk. *International Dairy Journal*, 39, 41-46.
- Hovde CJ, Marr JC, Hoffmann ML, Hackett SP, Chi YI, Crum KK, Stevens DL, Stauffacher CV, Bohach GA, 1994. Investigation of the role of the disulphide bond in the activity and structure of staphylococcal enterotoxin C1. *Molecular Microbiology*, 13(5), 897-909.
- Hu DL, Wang L, Fang R, Okamura M, Ono HK, 2018. *Staphylococcus aureus* enterotoxins. In: *Staphylococcus aureus*. Ed: Fetsch A. UK: Academic Press, p. 39-55.
- Hu Y, Zhang L, Zhang H, Wang Y, Chen Q, Kong B, 2020. Physicochemical properties and flavour profile of fermented dry sausages with a reduction of sodium chloride. *LWT*, 124, 109061.
- Huff-Lonergan E, Lonergan SM, 2005. Mechanisms of water-holding capacity of meat: the role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science*, 71(1), 194-204.
- Hultin HO, Ke S, Huang Y, Imer S, Vareltzis P, 2010. Process for improving water holding capacity and tenderness in cooked protein food products. USPTO Application 20100009048, Class: 426281 (USPTO).
- Ikeda T, Tamate N, Yamaguchi K, Makino SI, 2005. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2793-2795.
- Imer S, 2007. Increasing water holding capacity of muscle foods: protein isolate effect. Erişim tarihi, 05.10.2023. Erişim adresi, <http://scholarworks.umass.edu/dissertations/AAI3254954>
- İnce E, Özfiliz N, Efil MM, 2018. Ülkemizdeki süpermarketlerde satışa sunulan sucuklarda kimyasal incelemeler. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 37(2), 127-131.
- Incze K, 2012. Mold-ripened sausages. In: *Handbook of meat and meat processing*. Ed: Hui YH. Boca Raton: CRC Press, p. 647-662.
- Inguglia ES, Zhang Z, Tiwari BK, Kerry JP, Burgess CM, 2017. Salt reduction strategies in processed meat products—A review. *Trends in Food Science and Technology*, 59, 70-78.
- ISO 19020, 2017. Microbiology of the food chain-horizontal method for the immunoenzymatic detection of staphylococcal enterotoxins in foodstuffs. Erişim tarihi, 04.10.2023. Erişim adresi, <https://www.iso.org/standard/63747.html>.
- ISO 6888-1, 2021. Microbiology of the food chain. Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). Part 1: Method using Baird Parker agar medium. Erişim tarihi, 10.03.2024. Erişim adresi, <https://www.iso.org/standard/76672.html>.
- Jardetzky TS, Brown JH, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Chi YI, Stauffacher C, Strominger JL, Wiley DC, 1994. Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature*, 368(6473), 711-718.
- Jay JM, Loessner MJ, Golden DA, 2005. Staphylococcal gastroenteritis. In: *Modern food microbiology*. Eds: Jay M, Loessner MJ, Golden DA. New York: Springer, p. 545-566.
- Johler S, Tichaczek-Dischinger PS, Rau J, Sihto HM, Lehner A, Adam M, Stephan R, 2013. Outbreak of Staphylococcal food poisoning due to SEA-producing *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(9), 777-781.
- Johler S, Weder D, Bridy C, Huguenin MC, Robert L, Hummerjohann J, Stephan R, 2015a. Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. *Journal of Dairy Science*, 98(5), 2944-2948.
- Johler S, Giannini P, Jermini M, Hummerjohann J, Baumgartner A, Stephan R, 2015b. Further evidence for staphylococcal food poisoning outbreaks caused by egc-encoded enterotoxins. *Toxins*, 7(3), 997-1004.
- Johler S, Sihto HM, Macori G, Stephan R, 2016a. Sequence variability in staphylococcal enterotoxin genes seb, sec, and sed. *Toxins*, 8(6), 169.

- Johler S, Stephan R, Althaus D, Ehling-Schulz M, Grunert T, 2016b. High-resolution subtyping of *Staphylococcus aureus* strains by means of Fourier-transform infrared spectroscopy. *Systematic and Applied Microbiology*, 39(3), 189-194.
- Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR, 1991. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(3), 426-430.
- Kaban G, Bayrak D, 2015. The effects of using Turkey meat on qualitative properties of heat-treated sucuk. *Czech Journal of Food Sciences*, 33(4), 377-383.
- Kaban G, Kaya M, 2006. Effect of starter culture on growth of *Staphylococcus aureus* in sucuk. *Food Control*, 17, 797-801.
- Kaban G, Yılmaz Oral ZF, Kaya M, 2022. Sucuk. In: *Production of Traditional Mediterranean Meat Products*. Eds: Lorenzo JM, Domínguez R, Pateiro M, Munekata PE. New York: Springer, p. 133-141.
- Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D, 2014. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *BioMed Research International*, 2014.
- Kameník J, 2017. Hurdle Technologies in Fermented Meat Production. In: *Fermented Meat Products Health Aspects*. Ed: Zdolec N. Boca Raton: CRC Press, p. 95-126.
- Kang DH, Fung DY, 2000. Stimulation of starter culture for further reduction of foodborne pathogens during salami fermentation. *Journal of Food Protection*, 63(11), 1492-1495.
- Kateete DP, Kimani CN, Katabazi FA, Okeng A, Okee MS, Nanteza A, Joloba ML, Najjuka FC, 2010. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9(1), 1-7.
- Kavanaugh JS, Thoendel M, Horswill AR, 2007. A role for type I signal peptidase in *Staphylococcus aureus* quorum sensing. *Molecular Microbiology*, 65(3), 780-798.
- Kaya M, Kaban G, 2013. Fermente et ürünleri. In: *Gıda biyoteknolojisi*. Ed: Aran N. Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık, p. 157-195.
- Ke S, Huang Y, Decker EA, Hultin HO, 2009. Impact of citric acid on the tenderness, microstructure and oxidative stability of beef muscle. *Meat Science*, 82(1), 113-118.
- Keskin T, Uçar G, 2023. Sucuk, salam, sosis ve pastırmalarda *Salmonella* spp. ve *Listeria monocytogenes* varlığı ile kimyasal kriterlerinin belirlenmesi. In: *Sağlık perspektifleri: güncel yaklaşımlar ve multidisipliner stratejiler*. Ed: İrak K. Ankara: İksad Publishing House, p. 37-90.
- Kim J, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC, 1994. Toxic shock syndrome toxin-1 complexed with a class II major histocompatibility molecule HLA-DR1. *Science*, 266(5192), 1870-1874.
- Koenig RL, Ray JL, Maleki SJ, Smeltzer MS, Hurlburt BK, 2004. *Staphylococcus aureus* AgrA binding to the RNAPIII-agr regulatory region. *Journal of Bacteriology*, 186(22), 7549-7555.
- Konuray G, Erginkaya Z, 2020. Traditional Fermented Food Products of Turkey. In: *Fermented Food Products*. Eds: Sankaranarayanan A, Amaesan N, Dhanasekaran D. Boca Raton: CRC Press, p. 55-65.
- Kosecka-Strojek M, Buda A, Międzobrodzki J, 2018. Staphylococcal Ecology and Epidemiology. In: *Pet-to-Man Travelling Staphylococci A World in Progress*, UK: Academic Press, p. 11-24.
- Kozono H, Parker D, White J, Marrack P, Kappler J, 1995. Multiple binding sites for bacterial superantigens on soluble class II MHC molecules. *Immunity*, 3(2), 187-196.
- Kumar P, Chatli MK, Verma AK, Mehta N, Malav OP, Kumar D, Sharma N, 2017. Quality, functionality, and shelf life of fermented meat and meat products: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(13), 2844-2856.
- Kusch K, Hanke K, Holtfreter S, Schmudde M, Kohler C, Erck C, Wehland J, Hecker M, Ohlsen K, Bröker B, Engelmann S, 2011. The influence of SaeRS and σ_B on the expression of superantigens in different *Staphylococcus aureus* isolates. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(6), 488-499.

- Küçükçetin A, Milci S, 2008. Food poisonings by cheese contaminated with *Staphylococcus aureus*. *Gıda*, 33, 129-135.
- Landgraf M, Destro MT, 2013. Staphylococcal Food Poisoning. In: Foodborne Infections and Intoxications. Eds: Morris Jr JG, Potter M, 4th ed. USA: Academic Press, p. 389-400.
- Langley RJ, Ting YT, Clow F, Young PG, Radcliff FJ, Choi JM, Sequeira RP, Holtfreter S, Baker H, Fraser JD, 2017. Staphylococcal enterotoxin-like X (SELX) is a unique superantigen with functional features of two major families of staphylococcal virulence factors. *PLoS Pathogens*, 13(9), e1006549.
- Leder L, Llera A, Lavoie PM, Lebedeva MI, Li H, Sekaly RP, Bohach GA, Gahr PJ, Schlievert PM, Karjalainen K, Mariuzza RA, 1998. A mutational analysis of the binding of staphylococcal enterotoxins B and C3 to the T cell receptor beta chain and major histocompatibility complex class II. *The Journal of Experimental Medicine*, 187(6), 823-833.
- Lefebvre D, Blanco-Valle K, Hennekinne JA, Simon S, Fenaille F, Becher F, Nia Y, 2022. Multiplex detection of 24 staphylococcal enterotoxins in culture supernatant using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Toxins*, 14(4), 249.
- Leistner L, 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1-3), 181-186.
- Le Loir Y, Baron F, Gautier M, 2003. [i] *Staphylococcus aureus* [/i] and food poisoning. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 2(1), 63-76.
- Leroy S, Lebert I, Talon R, 2015. Microorganisms in Traditional Fermented Meats. In: Handbook of Fermented Meat and Poultry. Eds: Toldrá F, Hui YH, Astiasarán I, Sebranek JG, Talon R, 2nd ed. USA: Wiley Blackwell, p. 99-105.
- Leroy F, De Smet S, Toldrá F, 2024. Fermentation. In: Encyclopedia of Meat Sciences, Volume 2. Eds: Dikeman M, Lutz G, Dickson J, Sebranek J, Smith S, 3rd edition. United Kingdom: Elsevier, p. 475-483.
- Letertre C, Perelle S, Dilasser F, Fach P, 2003. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, 95(1), 38-43.
- Li H, Llera A, Tsuchiya D, Leder L, Ysern X, Schlievert PM, Karjalainen K, Mariuzza RA, 1998. Three-dimensional structure of the complex between a T cell receptor beta chain and the superantigen staphylococcal enterotoxin B. *Immunity*, 9(6), 807-816.
- Lina G, Bohach GA, Nair SP, Hiramatsu K, Jouvin-Marche E, Mariuzza R, 2004. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *The Journal of Infectious Diseases*, 189(12), 2334-2336.
- Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB, 2009. Class I. Bacilli class nov. In: Bergey's manual of systematic bacteriology: vol. 3: the firmicutes. Eds: Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB, 2nd ed. New York: Springer, p. 19-20.
- Lücke FK, 1994. Fermented meat products. *Food Research International*, 27(3), 299-307.
- Mahfoofi A, Shirzad-Aski H, Kaboosi H, Ghaemi EA, 2019. Identification of the classical enterotoxin genes of *Staphylococcus aureus* in various foods by multiplex PCR assay. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 20(3), 209.
- Márta D, Wallin-Carlquist N, Schelin J, Borch E, Rådström P, 2011. Extended staphylococcal enterotoxin D expression in ham products. *Food Microbiology*, 28(3), 617-620.
- Marušić N, Vidaček S, Janči T, Petrak T, Medić H, 2014. Determination of volatile compounds and quality parameters of traditional Istrian dry-cured ham. *Meat Science*, 96(4), 1409-1416.
- Mashruwala AA, Boyd JM, 2017. The *Staphylococcus aureus* SrrAB regulatory system modulates hydrogen peroxide resistance factors, which imparts protection to aconitase during aerobic growth. *PLoS One*, 12(1), e0170283.
- Matulis RJ, McKeith FK, Sutherland JW, Brewer MS, 1995. Sensory characteristics of frankfurters as affected by fat, salt and pH. *Journal of Food Science*, 60(1), 42-47.

- Medynski A, Pospiech E, Kniat R, 2000. Effect of various concentrations of lactic acid and sodium chloride on selected physico-chemical meat traits. *Meat Science*, 55(3), 285-290.
- McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM, 2001. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 77-104.
- Medić H, 2017. Technology of Fermented Meat Products. In: *Fermented Meat Products Health Aspects*. Ed: Zdolec N. Boca Raton: CRC Press, p. 27-48.
- Mehli L, Hoel S, Thomassen GMB, Jakobsen AN, Karlsen H, 2017. The prevalence, genetic diversity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* in milk, whey, and cheese from artisan farm dairies. *International Dairy Journal*, 65, 20-27.
- Milani M, Curia R, Shevlyagina NV, Tatti F, 2023. Bacterial Degradation of Organic and Inorganic Materials: *Staphylococcus aureus* Meets the Nanoworld. Springer Nature.
- Mills E, 2024. Additives: Functional. In: *Encyclopedia of Meat Sciences*, Volume 2. Eds: Dikeman M, Lutz G, Dickson J, Sebranek J, Smith S, 3rd edition. United Kingdom: Elsevier, p. 360-367.
- Mitchell DT, Levitt DG, Schlievert PM, Ohlendorf DH, 2000. Structural evidence for the evolution of pyrogenic toxin superantigens. *Journal of Molecular Evolution*, 51, 520-531.
- Monday SR, Bohach GA, 1999. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(10), 3411-3414.
- Morales R, Serra, X, Guerrero L, Gou P, 2007. Softness in dry-cured porcine biceps femoris muscles in relation to meat quality characteristics and processing conditions. *Meat Science*, 77(4), 662-669.
- Mossong J, Decruyenaere F, Moris G, Ragimbeau C, Olinger CM, Johler S, Perrin M, Hau P, Weicherding P, 2015. Investigation of a staphylococcal food poisoning outbreak combining case-control, traditional typing and whole genome sequencing methods, Luxembourg, June 2014. *Eurosurveillance*, 20(45), 30059.
- Moustafa NY, Deeb A, Homouda S, El-Bar A, Shima M, 2016. Detection of *Staphylococcus aureus* classic enterotoxin genes in some meat products using multiplex PCR. *Kafrelsheikh Veterinary Medical Journal*, 14, 47-58.
- Munekata PES, Domínguez R, Pateiro M, Andrés SC, Santos EM, Fraqueza MJ, Bastianello Campagrol PC, Lorenzo JM, 2023. Meat and meat products: animal species, products, processing, quality, and shelf life. In: *Meat and meat replacements an interdisciplinary assessment of current status and future directions*. Eds: Meiselman HL, Lorenzo JM. United Kingdom: Woodhead Publishing, p. 45-76.
- Murphy AM, Shariflou MR, Moran C, 2002. High quality genomic DNA extraction from large milk samples. *Journal of Dairy Research*, 69(4), 645-649.
- Narayan KG, Sinha DK, Singh DK, 2023. *Staphylococcus aureus*. In: *Veterinary public health & epidemiology: veterinary public health-epidemiology-zoonosis-one health*. Singapore: Springer, p. 301-308.
- Nayak R, Kenney PB, Slider S, Head MK, Killefer J, 1998a. Cook yield, texture and gel ultrastructure of model beef batters as affected by low levels of calcium, magnesium and zinc chloride. *Journal of Food Science*, 63(6), 945-950.
- Nayak R, Kenney PB, Slider S, Head MK, Killefer J, 1998b. Myofibrillar protein solubility affected by low levels of calcium, magnesium and zinc chloride, *Journal of Food Science*, 63(6), 951-954.
- Nazlı B, Pehlivanoglu H, Çağlar MY, 2017. Characteristics of traditional Turkish fermented soudjouk and current situation. *International Journal of Veterinary Science and Technology*, 1(1), 13-19.
- Normanno G, Firinu A, Virgilio S, Mula G, Dambrosio A, Poggiu A, Decastelli L, Mionid R, Scuotae S, Bolzonif G, Di Giannataleg E, Sallinettih AP, La Salandrai G, Bartolij M, Zucconb F, Pirinob T, Siasb S, Parisii A, Quagliaa NC, Celano GV, 2005. Coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 15, 73-79.
- Nossair MA, Ibrahim HA, Khalifa E, Yussef HA, 2018. *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat products and food handlers: prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular characterization. *Life Science Journal*, 15(6).

- Novick RP, 2003. Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid*, 49(2), 93-105.
- Novick RP, Projan SJ, Kornblum J, Ross HF, Ji G, Kreiswirth B, Vandenesch F, Moghazeh S, Novick RP, 1995. The agr P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Molecular and General Genetics MGG*, 248, 446-458.
- Novick RP, Schlievert P, Ruzin A, 2001. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. *Microbes and Infection*, 3(7), 585-594.
- Ockerman HW, Basu L, 2015. Production and consumption of fermented meat products. In: *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. Ed: Toldrá F, 2nd ed. UK: John Wiley & Sons, p. 7-11.
- Ockerman LW, Basu L, 2017. Current status of fermented meat production. In: *Fermented Meat Products Health Aspects*. Ed: Zdolec N. Boca Raton: CRC Press, p. 15-26.
- Omoe K, Ishikama M, Shimoda Y, Hu DL, Ueda S, Shinagawa K, 2002. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh* or *sei* genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(3), 857-862.
- Omoe K, Hu DL, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Shinagawa K, 2003. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infection and Immunity*, 71(10), 6088-6094.
- Omoe K, Hu DL, Ono HK, Shimizu S, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Uchiyama T, Shinagawa K, Imanishi KI, 2013. Emetic potentials of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxins. *Infection and Immunity*, 81(10), 3627-3631.
- Ono HK, Omoe K, Imanishi KI, Iwakabe Y, Hu DL, Kato H, Saito N, Nakane A, Uchiyama T, Shinagawa K, 2008. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. *Infection and Immunity*, 76(11), 4999-5005.
- Ono HK, Sato'o Y, Narita K, Naito I, Hirose S, Hisatsune J, Asano K, Hu DL, Omoe K, Sugai M, Nakane A, 2015. Identification and characterization of a novel staphylococcal emetic toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(20), 7034-7040.
- Ortega E, Abriouel H, Lucas R, Gálvez A, 2010. Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. *Toxins*, 2(8), 2117-2131.
- Orwin PM, Leung DY, Donahue HL, Novick RP, Schlievert PM, 2001. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infection and Immunity*, 69(1), 360-366.
- Orwin PM, Leung DY, Tripp TJ, Bohach GA, Earhart CA, Ohlendorf DH, Schlievert PM, 2002. Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins. *Biochemistry*, 41(47), 14033-14040.
- Orwin PM, Fitzgerald JR, Leung DY, Gutierrez JA, Bohach GA, Schlievert PM, 2003. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. *Infection and Immunity*, 71(5), 2916-2919.
- Ostyn A, De Buyser ML, Guillier F, Groult J, Felix B, Salah S, Delmas G, Hennekinne JA, 2010. First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2009. *Eurosurveillance*, 15(13).
- Özdal T, 2020. Changes in physicochemical, microbiological and sensory characteristics of traditionally produced Turkish sucuk during ripening and storage: natural or synthetic additives? *Gıda*, 45(2), 329-339.
- Özer CO, Topçu İ, 2020. Sucuk ve Sosis Üretimi. In: *Fermente Ürünler Teknolojisi ve Mikrobiyolojisi*. Eds: Erkmen O, Erten H, Sağlam H. Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık, p. 227-245.
- Paulin S, Horn B, Hudson JA, 2011. Factors influencing staphylococcal enterotoxin production in dairy products. Wellington, New Zealand: Ministry for primary industries.
- Pegg RB, Honikel KO, 2015. Principles of curing. In: *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. Eds: Toldrá F, Hui YH, Astiasarán I, Sebranek JG, Talon R, 2nd ed. USA: Wiley Blackwell, p. 19-30.

- Pehlivanoglu H, Nazli B, Imamoğlu H, Çakır B, 2015. Piyasada fermente sucuk olarak satılan ürünlerin kalite özelliklerinin saptanması ve geleneksel Türk fermente sucuğu ile karşılaştırılması. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 41(2), 191-198.
- Peles F, Wagner M, Varga L, Hein I, Rieck P, Gutser K, Keresztúri P, Kardos G, Turcsányi I, Béri B, Szabó A, 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. International Journal of Food Microbiology, 118(2), 186-193.
- Pérez-Boto D, D'Arrigo M, García-Lafuente A, Bravo D, Pérez-Baltar A, Gaya P, Medina M, Arqués JL, 2023. *Staphylococcus aureus* in the processing environment of cured meat products. Foods, 12(11), 2161.
- Pérez-Juan M, Flores M, Toldrá F, 2006. Model studies on the efficacy of protein homogenates from raw pork muscle and dry-cured ham in binding selected flavor compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(13), 4802-4808.
- Pérez-Juan M, Flores M, Toldrá F, 2007. Effect of ionic strength of different salts on the binding of volatile compounds to porcine soluble protein extracts in model systems. Food Research International, 40(6), 687-693.
- Petersson K, Thunnissen M, Forsberg G, Walse B, 2002. Crystal structure of a SEA variant in complex with MHC class II reveals the ability of SEA to crosslink MHC molecules. Structure, 10(12), 1619-1626.
- Piggot RS, Kenney PB, Slider S, Head MK, 2000. Formulation protocol and dicationic salts affect protein functionality on model systems beef batters. Journal of Food Science, 65(7), 1151-1154.
- Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE, 2010. Staphylococcal enterotoxins. Toxins, 2(8), 2177-2197.
- Pragman AA, Yarwood JM, Tripp TJ, Schlievert PM, 2004. Characterization of virulence factor regulation by SrrAB, a two-component system in *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology, 186(8), 2430-2438.
- Puolanne EJ, Ruusunen MH, Vainionpää JI, 2001. Combined effects of NaCl and raw meat pH on water-holding in cooked sausage with and without added phosphate. Meat Science, 58, 1-7.
- Puolanne E, Halonen M, 2010. Theoretical aspects of water-holding in meat. Meat Science, 86, 151-165.
- Rajkovic A, 2012. Incidence, growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in insufficiently dried traditional beef ham "govedja prsuta" under different storage conditions. Food Control, 27, 369-373.
- Ray B, Bhunia A, 2016. Gıda Kaynaklı Zehirlenmeler (İntoksikasyonlar). In: Temel Gıda Mikrobiyolojisi, Beşinci Basımdan Çeviri. Ed: Heperkan D. Boca Raton: CRC Press. p. 323-335.
- Regassa LB, Couch JL, Betley MJ, 1991. Steady-state staphylococcal enterotoxin type C mRNA is affected by a product of the accessory gene regulator (agr) and by glucose. Infection and Immunity, 59(3), 955-962.
- Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ, 2009. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. Clinical Infectious Diseases, 49(11), 1749-1755.
- Rossi G, Cerquetella M, Attili AR, 2016. Amphixenotic aspects of *Staphylococcus aureus* infection in man and animals. In: *Staphylococcus aureus* microbiology, pathology, immunology, therapy and prophylaxis, Eds: Bagnoli F, Rappuoli R, Grandi G, Vol 409. Switzerland: Springer, p. 297-323.
- Ruusunen M, Puolanne E, 2005. Reducing sodium intake from meat products. Meat Science, 70(3), 531-541.
- Ruusunen M, Vainionpää J, Lyly M, Lähteenmäki L, Niemistö M, Ahvenainen R, Puolanne E, 2005. Reducing the sodium content in meat products: The effect of the formulation in low-sodium ground meat patties. Meat Science, 69(1), 53-60.
- Sahin S, Mogulkoc MN, Kalin R, Karahan M, 2020. Determination of the important toxin genes of *Staphylococcus aureus* isolated from meat samples, food handlers and food processing surfaces in Turkey. Israel Journal of Veterinary Medicine, 75(2), 42-49.

- Salgado-Pabón W, Tran PM, 2021. Staphylococcal food poisoning. In: Foodborne Infections and Intoxications. Eds: Morris JG, Vugia DJ, Fifth Edition. United Kingdom: Academic Press, p. 417-430.
- Samapundo S, Ampofo-Asiama J, Anthierens T, Xhaferi R, Van Bree I, Szczepaniak S, Goemaereb O, Steen L, Dhooge M, Paelinck H, Dewettinck K, Devlieghere F, 2010. Influence of NaCl reduction and replacement on the growth of *Lactobacillus sakei* in broth, cooked ham and white sauce. *International Journal of Food Microbiology*, 143(1-2), 9-16.
- Sato'o Y, Hisatsune J, Nagasako Y, Ono HK, Omoe K, Sugai M, 2015. Positive regulation of staphylococcal enterotoxin H by Rot (repressor of toxin) protein and its importance in clonal complex 81 subtype 1 lineage-related food poisoning. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(22), 7782-7790.
- Savariraj WR, Ravindran NB, Kannan P, Paramasivam R, Senthilkumar TMA, Kumarasamy P, Rao VA, 2019. Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from pork meat in retail outlets in India. *Journal of Food Safety*, 39(1), e12589.
- Sawyer JT, Apple JK, Johnson ZB, 2008. The impact of lactic acid concentration and sodium chloride on pH, water-holding capacity, and cooked color of injection-enhanced dark-cutting beef. *Meat Science*, 79, 317-325.
- Schelin J, Wallin-Carlquist N, Thorup Cohn M, Lindqvist R, Barker GC, 2011. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*, 2(6), 580-592.
- Schilling MW, Marriott NG, Acton JC, Anderson-Cook C, Alvarado CZ, Wang H, 2004. Utilization of response surface modeling to evaluate the effects of non-meat adjuncts and combinations of PSE and RFN pork on water holding capacity and cooked color in the production of boneless cured pork. *Meat Science*, 66, 371-381.
- Schlievert PM, Jablonski LM, Roggiani M, Sadler I, Callantine S, Mitchell DT, Ohlendorf DH, Bohach GA, 2000. Pyrogenic toxin superantigen site specificity in toxic shock syndrome and food poisoning in animals. *Infection and Immunity*, 68(6), 3630-3634.
- Schmid D, Fretz R, Winter P, Mann M, Höger G, Stöger A, Ruppitsch W, Ladstätter J, Mayer N, de Martin A, Allerberger F, 2009. Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Austria. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 121(3-4), 125-131.
- Schwendimann L, Merda D, Berger T, Denayer S, Feraudet-Tarisse C, Kläui AJ, Messio S, Mistou MY, Nia Y, Hennekinne JA, Graber HU, 2021. Staphylococcal enterotoxin gene cluster: prediction of enterotoxin (SEG and SEI) production and of the source of food poisoning on the basis of v Saß typing. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(5), e02662-20.
- Sebranek JG, 2009. Basic curing ingredients. In: *Ingredients in meat products: Properties, functionality and applications*. Ed: Tarté R. New York: Springer Science + Business Media, p. 1-23.
- Shiling L, Xianna H, Yanbin Y, Baokun L, Chengjian X, Qingling W, 2017. Proteolytic effect of starter culture during ripening of smoked horse sausage. *Food Science and Biotechnology*, 26, 1363-1369.
- Sikes AL, Tobin AB, Tume RK, 2009. Use of high pressure to reduce cook loss and improve texture of low-salt beef sausage batters. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 405-412.
- Simpson CA, Sofos JN, 2009. Antimicrobial ingredients. In: *Ingredients in meat products: Properties, functionality and applications*. Ed: Tarté R. New York: Springer Science + Business Media, p. 301-377.
- Sindelar JJ, Milkowski AL, 2011. Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: a review of curing and examining the risk/benefit of its use. *American Meat Science Association White Paper Series*, 3, 1-14.
- Soejima T, Nagao E, Yano Y, Yamagata H, Kagi H, Shinagawa K, 2007. Risk evaluation for staphylococcal food poisoning in processed milk produced with skim milk powder. *International Journal of Food Microbiology*, 115(1), 29-34.

- Soncu ED, 2019. Sucuk. In: Fermente gıdalar: mikrobiyoloji, teknoloji ve sağlık. Eds: Anlı E, Şanlıbaba P. Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık, p. 271-293.
- Spaulding AR, Salgado-Pabón W, Kohler PL, Horswill AR, Leung DY, Schlievert PM, 2013. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), 422-447.
- Stajić S, Perunović M, Stanišić N, Žujović M, Živković D, 2013. Sucuk (Turkish-style dry-fermented sausage) quality as an influence of recipe formulation and inoculation of starter cultures. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37(5), 870-880.
- Stewart GC, 2017. Staphylococcal food poisoning. In: *Foodborne Diseases*. Eds: Dodd CER, Aldsworth T, Stein RA, Cliver DO, Riemann HP, Third Edition. United Kingdom: Academic Press. p. 367-380.
- Su YC, Wong AC, 1995. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1438-1443.
- Sucu C, Turp GY, 2018. The investigation of the use of beetroot powder in Turkish fermented beef sausage (sucuk) as nitrite alternative. *Meat Science*, 140, 158-166.
- Sumby P, Waldor MK, 2003. Transcription of the toxin genes present within the staphylococcal phage ϕ Sa3ms is intimately linked with the phage's life cycle. *Journal of Bacteriology*, 185(23), 6841-6851.
- Swaminathan S, Furey W, Pletcher J, Sax M, 1992. Crystal structure of staphylococcal enterotoxin B, a superantigen. *Nature*, 359(6398), 801-806.
- Swaminathan S, Furey W, Pletcher J, Sax M, 1995. Residues defining V β specificity in staphylococcal enterotoxins. *Nature Structural Biology*, 2(8), 680-686.
- Syne SM, Ramsubhag A, Adesiyun AA, 2013. Microbiological hazard analysis of ready-to-eat meats processed at a food plant in Trinidad, West Indies. *Infection Ecology and Epidemiology*, 3(1), 20450.
- Şanlıbaba P, Tezel BU, 2023. Traditional fermented foods in Anatolia. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 22(2), 193-215.
- Şimşek D, 2016. Sucuk üretiminde farklı klorür tuzlarının kullanım imkanları. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Thapaliya D, 2019. *Staphylococcus*. In: *Handbook of Foodborne Diseases*. Ed: Liu D. Boca Raton: CRC Press, p. 215-222.
- Tayar M, Yıldırım Y, 2020. Et Endüstrisi. DORA Basım-Yayın Dağıtım Ltd. Şti., Bursa.
- Tekinşen OC, Doğruer Y, 2000. Her yönüyle pastırma. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.
- Tekinşen OC, Doğruer Y, Güner A, 2000. Et ve ürünleri: Hijyen ve üretim teknolojisi. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.
- Telli N, 2016. Gıda katkı maddelerinde risk analizi. *Türkiye Klinikleri/J Food Hyg Technol-Special Topics*, 2(2), 23-29.
- Terns MJ, Milkowski AL, Claus JR, Sindelar JJ, 2011. Investigating the effect of incubation time and starter culture addition level on quality attributes of indirectly cured, emulsified cooked sausages. *Meat Science*, 88(3), 454-461.
- Terrell GC, Hernandez-Jover M, 2023. Meat and Meat Products. In: *Food Safety Management A Practical Guide for the Food Industry*. Eds: Andersen V, Lelieveld H, Motarjemi Y. United Kingdom: Academic Press, p. 141-184.
- Thomas DY, Jarraud S, Lemerrier B, Cozon G, Echasserieau K, Etienne J, Gougeon ML, Lina G, Vandenesch F, 2006. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. *Infection and Immunity*, 74(8), 4724-4734.
- Thomas D, Chou S, Dauwalder O, Lina G, 2007. Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Superantigens and Superallergens, 93, 24-41.

- Todd J, Fishaut M, Kapral F, Welch T, 1978. Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I Staphylococci. The Lancet, 312(8100), 1116-1118.
- Toldrá F, 2006. Meat: chemistry and biochemistry. In: Handbook of Food Science, Technology and Engineering, Volume 1. Ed: Hui YH. Boca Raton: CRC Press, p. 28-1–28-18.
- Toldrá F, 2007. Biochemistry of muscle and fat. In: Handbook of Fermented Meat and Poultry. Eds: Toldrá F, Hui YH, Astiasarán I, Nip WK, Sebranek JG, Silveira ETF, Stahnke LH, Talon R, 1 edn. Ames: Blackwell, p.51-58.
- Toldrá F, Aristoy MC, 2010. Dry-cured ham. In: Handbook of meat processing. Ed: Toldrá F. Ames: Wiley-Blackwell, p. 351-362.
- Toldrá F, Barat JM, 2015. Low-Sodium Products. In: Handbook of fermented meat and poultry. Eds: Toldrá F, Hui YH, Astiasarán I, Sebranek JG, Talon R, 2nd ed. USA: Wiley Blackwell, p. 251-257.
- Troller JA, Christian JHB, 1978. Water activity and food. New York: Academic Press.
- TSE, 2001. Türk Standartları Enstitüsü TS 1743 ISO 1442 Et ve Et Mamülleri- Nem Muhtevası Tayini. Nisan 2001, Ankara.
- TSE, 2002. Türk Standartları Enstitüsü TS 3136 ISO 2917 Et ve Et Ürünleri- pH Ölçülmesi-Referans Yöntem. Aralık 2002, Ankara.
- Tsutsuura S, Shimamura Y, Murata M, 2013. Temperature dependence of the production of staphylococcal enterotoxin A by Staphylococcus aureus. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 77(1), 30-37.
- Turkal G, Doğruer Y, 2020. Et ürünlerinde nitrat ve nitrit kullanımı ile alternatifleri. 2. Uluslararası Gıda, Tarım ve Veteriner Bilimleri Kongresi Tam Metin Kitabı, p. 72-89, 29 Şubat-1 Mart 2020, Konya, Türkiye.
- Türk Gıda Kodeksi (TGK), 2012. Et ve Et Ürünleri Tebliği. Türkiye Cumhuriyeti Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. Resmi Gazete Tarihi ve Sayısı: 05.12.2021-28488. Ankara, Türkiye.
- Türk Gıda Kodeksi (TGK), 2019. Türk Gıda Kodeksi Et, Hazırlanmış Et Karışımları ve Et Ürünleri Tebliği. Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Orman Bakanlığı. Resmi Gazete Tarihi ve Sayısı: 29.01.2019-30670. Ankara, Türkiye.
- Türk Gıda Kodeksi (TGK), 2023. Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği. Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Orman Bakanlığı. Resmi Gazete Tarihi ve Sayısı: 13.10.2023-32338. Ankara, Türkiye.
- Ulusoy B, Ergün Ö, 2020. Kefir kültürü ile fermente sucuk üretimi. International Conference on Research in Health Sciences (ICRHS 2020), p. 58-73, 14-15 November 2020, Konya, Türkiye.
- Valihrach L, Alibayov B, Zdenkova K, Demnerova K, 2014. Expression and production of staphylococcal enterotoxin C is substantially reduced in milk. Food Microbiology, 44, 54-59.
- Ventanas S, Ventanas J, Tovar J, García C, Estévez M, 2007. Extensive feeding versus oleic acid and tocopherol enriched mixed diets for the production of Iberian dry-cured hams: effect on chemical composition, oxidative status and sensory traits. Meat Science, 77(2), 246-256.
- Wallin-Carlquist N, Cao R, Márta D, da Silva ASA, Schelin J, Rådström P, 2010a. Acetic acid increases the phage-encoded enterotoxin A expression in Staphylococcus aureus. BMC Microbiology, 10(1), 1-10.
- Wallin-Carlquist N, Márta D, Borch E, Rådström P, 2010b. Prolonged expression and production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in processed pork meat. International Journal of Food Microbiology, 141, S69-S74.
- Wang P, Xu X-L, Zhou GH, 2009. Effects of meat and phosphate level on water-holding capacity and texture of emulsion-type sausage during storage. Agricultural Sciences in China, 8, 1475-1481.
- Wang X, Wang X, Wang Y, Guo G, Usman T, Hao D, Tang X, Zhang Y, Yu Y, 2014. Antimicrobial resistance and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* strains from Holstein milk. Letters in Applied Microbiology, 58(6), 527-534.

- Webster JL, Dunford EK, Hawkes C, Neal BC, 2011. Salt reduction initiatives around the world. *Journal of Hypertension*, 29(6), 1043-1050.
- Wilson GJ, Seo KS, Cartwright RA, Connelley T, Chuang-Smith ON, Merriman JA., Guinane CM, Park JY, Bohach GA, Schlievert PM, Morrison WI, Fitzgerald JR, 2011. A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of community-associated MRSA necrotizing pneumonia. *PLoS Pathogens*, 7(10), e1002271.
- Wu S, Huang J, Wu Q, Zhang J, Zhang F, Yang X, Wu H, Zeng H, Chen M, Ding Y, Wang J, Lei T, Zhang S, Xue L, 2018. *Staphylococcus aureus* isolated from retail meat and meat products in China: incidence, antibiotic resistance and genetic diversity. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2767.
- Wu S, Huang J, Zhang F, Wu Q, Zhang J, Pang R, Zeng H, Yang X, Chen M, Wang J, Dai J, Xue L, Lei T, Wei X, 2019. Prevalence and characterization of food-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in China. *Frontiers in Microbiology*, 10, 304.
- Yalçın H, Can ÖP, 2013. Geleneksel yöntemle üretilen sucuklarda *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve koliform varlığının araştırılması. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(4), 705-708.
- Yamazaki W, Ishibashi M, Kawahara R, Inoue K, 2008. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Microbiology*, 8, 1-7.
- Yarwood JM, Schlievert PM, 2003. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(11), 1620-1625.
- Yeşilırmak H, 2019. Afyonkarahisar bölgesinde üretilip satışa sunulan sucukların bazı kalite özellikleri üzerine araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon.
- Zeaki N, Cao R, Skandamis PN, Rådström P, Schelin J, 2014. Assessment of high and low enterotoxin A producing *Staphylococcus aureus* strains on pork sausage. *International Journal of Food Microbiology*, 182, 44-50.
- Zeaki N, Budi Susilo Y, Pregiel A, Rådström P, Schelin J, 2015. Prophage-encoded staphylococcal enterotoxin a: regulation of production in *Staphylococcus aureus* strains representing different sea regions. *Toxins*, 7(12), 5359-5376.
- Zhang S, Stewart GC, 2000. Characterization of the promoter elements for the staphylococcal enterotoxin D gene. *Journal of Bacteriology*, 182(8), 2321-2325.
- Zukál E, Incze K, 2010. Drying. In: *Handbook of meat processing*. Ed: Toldrá F, Iowa: Blackwell Publishing Professional, p. 219-229.

7. EKLER

Ek-A: Etik Kurul Onayı



EK-B: Turnitin Raporu

Fermente Sucuk Üretiminde Farklı Tuz Oranlarının Staphylococcus aureus'un Enterotoksin Üretme Yeteneği Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

ORJİNALLİK RAPORU

% 11	% 11	% 6	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	% 1
2	acikarsiv.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
4	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
6	cloudflare-ipfs.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
8	fb8968c5-502d-436c-a825- c7c279e8e4aa.filesusr.com İnternet Kaynağı	<% 1

8. ÖZGEÇMİŞ

