

T.SAKIN,2014



T.C  
NİĞDE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TAZE SIĞIR ETİNDE *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* O157:H7'YE  
KARŞI *Lactococcus lactis* spp. *lactis* BZ'NİN BİYOKORUYUCU KÜLTÜR  
OLARAK KULLANILMASI

NİĞDE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TUBA SAKİN

Temmuz 2014



T.C  
NİĞDE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

TAZE SIĞIR ETİNDE *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* O157:H7'YE  
KARŞI *Lactococcus lactis* spp. *lactis* BZ' NİN BİYOKORUYUCU KÜLTÜR  
OLARAK KULLANILMASI

TUBA SAKİN

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM

Temmuz 2014

**Tuba SAKİN** tarafından **Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM** danışmanlığında hazırlanan “Taze sığır etinde *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* O157:H7’ye karşı *Lactococcus lactis* spp. *lactis* BZ’nin biyokoruyucu kültür olarak kullanılması” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Gıda Mühendisliği** Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM  
Niğde Üniv., Mühendislik Fak., Gıda Mühendisliği Bölümü

Üye : Prof. Dr. Ayten ÖZTÜRK  
Niğde Üniv., Fen Edebiyat Fak., Biyoloji Bölümü

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ayşe ÖZBEY  
Niğde Üniv., Mühendislik Fak., Gıda Mühendisliği Bölümü

**ONAY:**

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından ....../...../20.... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu’nun ....../...../20.... tarih ve ..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

**Doç. Dr. Murat BARUT**  
**MÜDÜR**

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Tuba SAKİN

## ÖZET

### TAZE SIĞIR ETİNDE *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* O157:H7'ye KARŞI *Lactococcus lactis* spp. *lactis* BZ'NİN BİYOKORUYUCU KÜLTÜR OLARAK KULLANILMASI

SAKİN, Tuba

Niğde Üniversitesi

Fen Bilimleri

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Prof.Dr. Zeliha YILDIRIM

Temmuz, 2014, 62 sayfa

Bu çalışma bakteriyosin üreten *Lactococcus lactis* spp. *lactis* BZ'nin taze sığır etinin mikrobiyolojik kalitesine etkisi ile ete inoküle edilen *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* O157:H7'e karşı antimikrobiyal etkisini ortaya koymak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, et örneklerinin yüzeyi yaklaşık  $10^7$ - $10^8$  kob/g düzeyinde *Lactococcus lactis* spp. *lactis* BZ ile muamele edildikten sonra buzdolabı sıcaklığında (4-6°C) 12 gün süreyle depolanmıştır. Depolamanın belirli periyotlarında alınan et örneklerinde toplam psikrotrof aerobik bakteri ve toplam koliform bakteri sayımları yapılmıştır. Ayrıca et örneklerinin pH ile  $L^*$ ,  $a^*$  ve  $b^*$  değerleri de belirlenmiştir. *L. lactis* spp. *lactis* BZ'nin kontaminasyon esnasında, kontaminasyondan önce veya sonra *L. monocytogenes* (yaklaşık  $10^4$  kob/g) ve *E. coli* O157:H7 (yaklaşık  $10^4$  kob/g)'ye karşı antibakteriyal aktivitesi de belirlenmiştir. Bu amaçla *L. lactis* spp. *lactis* BZ, patojen bakteriler ile aynı anda veya patojen bakterilerin ilavesinden 24 saat önce veya sonra et örneklerine inoküle edilmiştir.

*L. lactis* spp. *lactis* BZ taze sığır etine 8,01 log kob/g düzeyinde uygulandığında toplam psikrotrof aerobik bakteri ve toplam koliform bakterilerin gelişimini yavaşlatarak taze sığır etinin mikrobiyolojik kalitesini iyileştirdiği belirlenmiştir. *L. lactis* spp. *lactis* BZ içeren ve içermeyen bütün örneklerin pH değerlerinin depolama süresince arttığı, renk (L\*, a\* ve b\*) değerlerinin ise azaldığı saptanmıştır. Ancak, *L. lactis* spp. *lactis* BZ içeren et örneklerinde pH değerlerinin kontrol örneğine göre daha yavaş bir şekilde arttığı, renk (L\*, a\* ve b\*) değerlerinin ise daha yavaş bir şekilde azaldığı gözlenmiştir.

*L. lactis* spp. *lactis* BZ, *L. monocytogenes* veya *E. coli* O157:H7'nin kontaminasyonu esnasında, kontaminasyonundan 24 saat önce veya sonra ete inokule edildiğinde patojen bakterilerin gelişimini önlediği belirlenmiştir. Buzdolabında muhafazanın 3. gününden itibaren *L. lactis* spp. *lactis* BZ ile muamele edilen bütün et örneklerinde *L. monocytogenes* sayısının sayılamayacak düzeyin altına düştüğü gözlenmiştir. *E. coli* O157:H7 sayısı ise kontaminasyondan 24 saat önce *L. lactis* spp. *lactis* BZ ile muamele edilen örnekte depolamanın 3'üncü, patojen bakteri ile aynı anda veya patojen bakteri ilavesinden 24 saat sonra *L. lactis* spp. *lactis* BZ uygulanan et örneklerinde depolamanın 5'inci gününden itibaren sayılamayacak düzeye indiği saptanmıştır.

Sonuç olarak, bakteriyosinjenik *L. lactis* spp. *lactis* BZ koruyucu kültür olarak kullanıldığında taze sığır etinin raf ömrünü, mikrobiyolojik kalitesi ve güvenliğini iyileştirdiği belirlenmiştir. Ayrıca, *L. monocytogenes* veya *E. coli* O157:H7'nin kontaminasyonu esnasında, kontaminasyonlarından 24 saat önce veya sonra ete uygulandığında patojen bakterilere karşı kuvvetli antibakteriyal aktivite gösterdiği de saptanmıştır.

*Anahtar Sözcükler* : Biyokoruyucu, *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, et, patojenler

## SUMMARY

APPLICATION OF *Lactococcus lactis* spp. *lactis* BZ AS A BIOPROTECTIVE CULTURE IN RAW BEEF MEAT AGAINST *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7

SAKIN, Tuba  
Nigde University

Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Food Engineering

Supervisor : Professor Dr. Zeliha YILDIRIM

July, 2014, 62 pages

The aims of this study were to determine the effect of bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* spp. *lactis* BZ on the microbiological quality of fresh beef meat and to investigate its antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* or *Escherichia coli* O157:H7 inoculated into beef meat. For this purpose, the surface of raw beef meat was inoculated with *L. lactis* spp. *lactis* BZ at the level of  $10^7$ - $10^8$  cfu/g and kept at refrigeration temperature for 12 days. Total psychrotrophic aerobic bacteria and total coliform bacteria counts were determined in beef meat samples at certain storage periods. Also, pH, L\*, a\* and b\* values of the meat samples were evaluated. Furthermore, antibacterial activity of *L. lactis* spp. *lactis* BZ on *L. monocytogenes* (approximately  $10^4$  cfu/g) or *E. coli* O157:H7 (approximately  $10^4$  cfu/g) during contamination, before or after contamination was examined. To this end, meat samples was inoculated with *L. lactis* spp. *lactis* BZ and *L. monocytogenes* or *E. coli* O157:H7 simultaneously and inoculated with *L. lactis* spp. *lactis* BZ 24 h before or after the pathogen addition.

It was found that application of *L. lactis* spp. *lactis* BZ at the level of 8.01 log cfu/g improved the microbiological quality of raw beef meat by reducing the growth of indigenous total psychrotrophic aerobic bacteria and total coliform bacteria. During storage period, pH values of all meat samples with or without *L. lactis* spp. *lactis* BZ were increased, but their color (L\*, a\* and b\*) values were decreased. However, pH and color (L\*, a\* and b\*) values of meat samples containing *L. lactis* spp. *lactis* BZ decreased or increased very slowly compared to the control sample, respectively.

The simultaneous inoculation of *L. lactis* spp. *lactis* BZ with pathogens or inoculation of *L. lactis* spp. *lactis* BZ 24 h before or after pathogens addition prevented the growth of *L. monocytogenes* or *E. coli* O157:H7 in the meat samples. The viable cells of *L. monocytogenes* were not detected at the 3<sup>rd</sup> day of refrigerator storage in all meat samples exposed to *L. lactis* spp. *lactis* BZ. The viable cells of *E. coli* O157:H7 decreased to non-detectable level at the 3<sup>rd</sup> day of refrigerator storage in the meat samples contaminated with the pathogen 24 h after addition of *L. lactis* spp. *lactis* BZ while *E. coli* O157:H7 viable cells were not detected at the 5<sup>th</sup> day of storage in meat samples inoculated with *L. lactis* spp. *lactis* BZ and the pathogen simultaneously or inoculated with *L. lactis* spp. *lactis* BZ 24 h after addition of the pathogen.

In conclusion, it was observed that the usage of bacteriocinogenic *L. lactis* spp. *lactis* BZ as a protective culture improved the storage life, the microbiological quality and safety of raw beef meat. In addition, *L. lactis* spp. *lactis* BZ showed strong antibacterial activity against *L. monocytogenes* or *E. coli* O157:H7 when applied during the contamination of both pathogens into meat samples or 24 h before or after contamination of the pathogens.

**Keywords:** Biopreservation, *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, meat, pathogens

## ÖN SÖZ

Tez çalışmam süresince rehberliğini, desteğini ve sabrını esirgemeyen tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM'a teşekkürü borç bilirim.

Çalışmamın çeşitli aşamalarında bana samimiyetle yardımcı olan değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Ezgi DEMİR ÖZER'e, Yrd. Doç. Dr. Hakan ERİNÇ'e, Arş. Gör. Asiye ULAŞ'a ve ismini burda sayamadığım diğer arkadaşlarıma teşekkür ediyorum. Son olarak elbette her mücadelede en önemli güç kaynağım olan aileme sonsuz teşekkürler.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
SUMMARY .....	vi
ÖN SÖZ .....	viii
İÇİNDEKİLER .....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xii
BÖLÜM I GİRİŞ .....	13
BÖLÜM II KAYNAK ÖZETLERİ .....	17
2.1. Laktik Asit Bakterileri.....	18
2.2. Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Bakteriyosinlerin Genel Özellikleri.....	19
2.3. <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> BZ ve laktokoksin BZ .....	20
2.4. Et Endüstrisinde Laktik Asit Bakterilerin Önemi .....	23
2.5. Et ve Et Ürünlerinde Biyokoruyucu Olarak Laktik Asit Bakterileri Kullanımıyla İlgili Yapılan Çalışmalar.....	23
BÖLÜM III MATERYAL ve METOT.....	32
3.1. Bakteri Suşları ve Kültür Koşulları.....	32
3.2. Taze Sığır Etinin Hazırlanması .....	32
3.3. Sığır Etlerinin Koruyucu Kültür ve Test Bakterileri İle İnokulasyonu .....	32
3.4. Mikrobiyolojik Analizler .....	33
3.5. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi.....	33
3.6. Et Örneklerinin pH Değerlerinin Belirlenmesi .....	34
3.7. Et örneklerinin Renk Değerlerinin Belirlenmesi.....	34
3.8. İstatistiksel Analiz.....	34
BÖLÜM IV BULGULAR ve TARTIŞMA .....	35
4.1. <i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i> BZ'nin Buzdolabı Sıcaklığında Taze Sığır Etinde Gelişimi ve Bakteriyosin Üretimi.....	35
4.2. Taze Etin Toplam Psikrofil Aerobik Bakteri İçeriği Üzerine <i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i> BZ'nin Etkisi .....	36
4.3. Taze Etin Toplam Koliform Bakteri İçeriği Üzerine <i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i> BZ'nin Etkisi .....	38
4.4. <i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i> BZ'nin Taze Ette Gıda Kaynaklı Patojen Bakterilerin Gelişimi Üzerine Etkisi .....	40
4.4.1. <i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i> BZ'nin Taze Ette <i>L. monocytogenes</i> 'in Gelişimi Üzerine Etkisi ...	40
4.4.2. <i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i> BZ'nin Taze Ette <i>E. coli</i> O157:H7'nin Gelişimi Üzerine Etkisi....	43

BÖLÜM V SONUÇLAR.....	50
KAYNAKLAR .....	52
ÖZ GEÇMİŞ .....	62

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Et örneklerinin pH değerleri.....	46
--	----

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin antibakteriyel et mekanizmaları.....	21
Şekil 4.1. <i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i> BZ'nin buzdolabı koşullarında taze ette gelişim profili.....	36
Şekil 4.2. Taze ette gelişen <i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i> BZ'nin <i>L. monocytogenes</i> 'e karşı inhibitör aktivitesi.....	36
Şekil 4.3. <i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i> BZ'nin taze etin toplam psikrotrof aerobik bakteri içeriği üzerine etkisi.....	37
Şekil 4.4. <i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i> BZ'nin taze etin toplam koliform bakteri içeriği üzerine etkisi..	39
Şekil 4.5. <i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i> BZ'nin taze ette <i>L. monocytogenes</i> gelişimi üzerine etkisi.....	41
Şekil 4.6. <i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i> BZ'nin taze ette <i>E. coli</i> O157:H7'nin gelişimi üzerine etkisi....	44
Şekil 4.7. Et örneklerinin L*, a* ve b* değerleri.....	48

## BÖLÜM I

### GİRİŞ

Sığır eti, kasaplık hayvanların iskelet kaslarından elde edilen bir gıda maddesi olup, gerek besin değeri gerekse özel tat ve kokusu ile insan beslenmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Etin raf ömrü üzerinde; depolama sıcaklığı, oksijen varlığı, nem, endojen enzimler, ışık ve en önemlisi mikroorganizmalar etkili olmaktadır (Zhou vd., 2010).

Et kimyasal bileşiminden dolayı mikroorganizmaların gelişmesi için mükemmel bir ortam oluşturmaktadır. Dolayısıyla taze et mikrobiyolojik bozulmalara karşı en duyarlı gıdalar arasında yer almaktadır. Etin başlangıç mikroorganizma sayısı ve türü hayvan sağlığına, kesim sırasında hayvanın fizyolojik durumuna, kesim ve işlenmesi sırasındaki koşullara (kontaminasyon düzeyine) bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Kesim ve karkasın işlenmesi sırasında hijyene dikkat edilmesi ve yeterli soğutma yapılması et kalitesi ve güvenliğine katkı sağlamaktadır. Karkas kesim işleminden sonra taze ette patojen ve bozulma etmeni mezofil, psikrofil ve psikrotrof mikroorganizmalar bulunabilmektedir. Patojen bakterilerin çoğu mezofil olduğu için yapılan ön soğutma işlemiyle bunların ette risk oluşturması önlenmektedir. Ancak, psikrofil olan patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaların risk oluşturması soğutma işlemi ile önlenememektedir. Bundan dolayı mikrobiyal gelişimi önlemek veya kontrol altına almak için iyi üretim uygulamaları ile uygun muhafaza yöntemlerinin birlikte kullanılması gerekmektedir (Fiorentini vd., 2001; Castellano vd., 2008; Nychas vd., 2008; Fung, 2010).

Yeterli hijyen önlemleri alınmadığında taze sığır etinde *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringenes*, *Staphylococcus aureus* ve *Aeromonas hydrophila* gibi patojen bakterilerin bulunması söz konusudur. Ete bulaşan mikroorganizmalar hızla çoğalırlar ve et ürünlerinin gerçek florasını oluştururlar. Böylece insan sağlığını tehdit edebilmekteler ve hatta ölümlerle sonuçlanan vakalara neden olabilmektedirler. Gıdaların neden olduğu hastalıklar arasında et ve et ürünleri % 70'lik paya sahiptir (Mbandi ve Shelef, 2002; Datta vd., 2012).

Gram-pozitif, çubuk şeklinde, spor oluşturmeyen, psikrofil, intraselüler ve gıda kaynaklı fırsatçı patojen bir bakteri olan *Listeria monocytogenes*, listerioz adı verilen gıda enfeksiyonuna neden olmaktadır. Listerioz hastalığı beyin zarı iltihabına veya kan zehirlenmelerine yol açabilmektedir. Listerioz açısından yüksek risk altındaki gruplar hamile kadınlar, yeni doğan bebekler, yaşlılar ve bağışıklık sistemi zayıf olan insanlardır. Listerioz vakalarının %25-30'unun ölümlle sonuçlandığı belirlenmiştir. Listeriozinin belirtileri menenjit, septisemi, gebelerde düşük veya ölü doğum ve lokal enfeksiyonlardır (McLauchlin vd., 2004; Liu, 2006; Orsi vd., 2011). *L. monocytogenes* gıda zincirine taşıyıcı hayvanların ürünleri ve dışkıları ile girebilmektedir (Denny ve McLauchlin, 2008). Listerioz enfeksiyonlarında en çok rol oynayan gıdalar taze et ve et ürünleri, çiğ süt ve süt ürünleri, sebzeler ve deniz ürünleridir. Bu ürünlerde düşük sıcaklıklarda bile gelişebildiğinden imhası için hızlı ve uygun bir metot uygulanmadığı sürece özellikle et endüstrisi için bir tehdit oluşturmaktadır. *L. monocytogenes* spor oluşturmeyen bakteriler içinde dondurma, kurutma ve ısıtma işlemlerin yok edici etkilerine karşı oldukça dirençli olduğundan gıda işlenmesi sırasında çevresel ve gıda kaynaklı faktörlerle kontrolü ve imhası biraz daha zordur (Chaturongakul ve Boor 2006; Chan vd., 2007). Diğer gıda kaynaklı patojen bakterilerle karşılaştırıldığında *L. monocytogenes*'in pastörizasyon sıcaklığı ile imha olduğu belirtilmesine karşın son zamanlarda bu bakterinin ısıtma dayanıklılığı hususunda çelişkiler bulunmaktadır. Bazı kaynaklarda spor oluşturmeyen bakteriler içinde en yüksek termotolerant bakteri olduğu belirtilmektedir (Jemmi ve Stephan, 2006).

Enterobacteriaceae familyasının *Escherichia* cinsi içerisinde yer alan *Escherichia coli*, gram negatif, katalaz pozitif, oksidaz negatif, fakültatif anaerobik, kısa çubuk şekilli, hareketli ve hareketsiz suşları da olan bir bakteridir. *E. coli* insan bağırsak sisteminde baskın olarak bulunan patojen olmayan fakültatif florayı oluşturmaktadır. Ancak, bazı *E. coli* suşları gastrointestinal, idrar yolları ve merkezi sinir sisteminde hastalıklara ve septisemiye neden olmaktadır. *E. coli* serotiplerinden patojenitesi en yüksek olan enterohemorajik (EHEC) grupta yer alan *E. coli* O157:H7'dir. *E. coli* O157:H7 hem çok düşük dozlarda insanlarda akut hastalıklara neden olduğundan hem de doğada çok yaygın olarak (hayvanlar, toprak, su) bulunduğundan gıda endüstrisinde en çok karşılaşılan mikrobiyolojik problemlerden birisidir. *E. coli* O157:H7'nin ekolojisi tam olarak bilinmemesine karşın insan *E. coli* enfeksiyonları direkt olarak hayvanlardan,

insandan insana ve kontamineli gıdalardan geçebilmektedir (Bell, 2002). Gıdalarda *E. coli* O157:H7'nin kontrolü spesifik özelliklerinden dolayı oldukça zordur. Isıl işleme duyarlılığı diğer enterobakterilere benzemesine karşın asidik pH'lara karşı oldukça toleranslı bir patojendir (Leyer vd., 1995; Jordan vd., 1999). EHEC açısından riskli gıdalar çiğ veya yeterli ısıl işlem uygulanmamış süt ve süt ürünleri, et ve et ürünleri ile elma suyudur (Steele vd., 1982; Besser vd., 1993; Zhao vd., 1993; Mead vd., 1999).

Özetle, *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 doğada yaygın olarak bulduklarından, düşük sıcaklıkta gelişebildiklerinden, gıda ve gıdanın temas ettiği yüzeylere tutunabildiklerinden gıda endüstrisi için önemli sorunların kaynağı konumundadırlar. Ayrıca patojenitesi ve mortalite oranları yüksek olduğundan birçok ülke dahil olmak üzere bizim ülkemizde de sıfır toleranslı bakteriler olarak değerlendirilmektedirler (Thevenot vd., 2006; Orsi vd., 2011).

Bilinçli tüketici sayısının giderek arttığı bu günlerde tüketiciler az işlenmiş ve kimyasal koruyucu içermeyen gıdalara yönelmiştir. Dolayısıyla tüketiciler et ürünlerinde yüksek kalite, güvenlik, uzun raf ömrü, doğal tat ve aroma talep etmektedirler. Bu talepleri gıda güvenliğinden ödün vermeden karşılamak için et ürünleri üretiminde alternatif teknolojiler geliştirmek önemli bir araştırma konusudur. Gıda güvenliği ile ilgili yeni modern teknolojiler tanıtılmasına karşın gıda kaynaklı hastalıkların sayısı artış göstermektedir. Bu durumda karmaşık mikrobiyal etkileşimleri anlamak ve biyokoruyucu kültürler ya da onların enzim, bakteriyosin gibi antimikrobiyal aktiviteye sahip metabolitlerini doğal koruyucular olarak kullanmak daha önemli hale gelmiştir (Aymerich vd., 2008). Buna paralel olarak gıda endüstrisinde; gıda güvenliğini tehlikeye atmadan, gıdanın besin ve vitamin değerlerini, organoleptik özellikleriyle birlikte koruyarak raf ömrünü uzatan biyokoruyucuların kullanımına ilgi artmıştır. Gıdaların hem raf ömrünü hem de güvenliğini artırmak amacıyla laktik asit bakterileri (LAB) veya bunların ürettiği antimikrobiyal maddelerin kullanılmasına biyokoruma tekniği denilmektedir (Devlieghere vd., 2004).

Biyokoruma tekniği buzdolabı koşullarında soğukta muhafaza edilen ürünlerde patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaların gelişimlerinin kontrol edilmesinde doğal bir metot olduğundan en çok tercih edilen yöntemlerden birisidir. Biyokoruma yöntemi ette

doğal olarak bulunan veya bilinçli olarak katılan mikroorganizmalar veya bu mikroorganizmaların ürettiği antimikrobiyal ürünler vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Ette ve diğer gıdalarda bulunan LAB'lerinden bazıları bakteriyosin olarak bilinen antimikrobiyal peptitler/proteinler üretmektedirler. Etin doğal florasında bulunan LAB'leri *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* ve diğer cinslerdir. Bakteriyosin üretici LAB'leri *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* ve *Carnobacterium*'dur. Gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni bakterileri imha ettiklerinden bakteriyosin üreticisi olan LAB'leri gıda muhafaza sistemlerinde biyolojik koruyucu olarak büyük bir kullanım potansiyeline sahiptir (Liu vd., 2010; Sparo vd., 2013).

Bu projenin amacı daha önce tarafımızca bozadan izole edilip tanımlanan bakteriyosin üreticisi olan *Lactococcus lactis* spp. *lactis* BZ'nin (Şahingil vd., 2011) taze sığır etinde gıda kaynaklı patojen bakterilerden *Listeria monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 üzerine antibakteriyal etkisini ve biyokoruyucu olarak kullanım olanağını tespit etmektir. *Lactococcus lactis* spp. *lactis* BZ'nin ürettiği laktokoksin BZ bakteriyosinin Gram pozitif bakterilerden *Listeria monocytogenes*, *L. ivonovi*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis* ve *B. treungensis* ssp. *plasteni*, *L. plantarum*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *Leuconostoc mesenteraeoides*, *Leu. cremoris* ile Gram negatif bakterilerden *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *Rhodococcus equi*, *Salmonella* spp., *Salmonella* Enteritidis, *Yersinia enterocolitica* O:9 ve *Citrobacter freundii*'ye karşı inhibitör aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Şahingil vd., 2011).

## **BÖLÜM II**

### **KAYNAK ÖZETLERİ**

Yüksek besin içeriğinden dolayı sığır eti, insan beslenmesinde önemli bir gıda maddesi olarak rol oynamaktadır. Ancak, yüksek besin içeriği mikrobiyal gelişimi de teşvik ettiğinden gıda kaynaklı bozulma ve patojen mikroorganizmaların gelişmesi için mükemmel bir ortam oluşturmaktadır. Ette mikrobiyal bozulma mikroorganizmaların gelişmesine bağlı olarak gerçekleşen biyokimyasal değişimler sonucunda oluşmaktadır. İstenmeyen mikroorganizmaların biyokimyasal aktiviteleri sonucunda gıdanın görünüşü, rengi, yapısı, tadı ve kokusu istenmeyen yönde değişebilmektedir. Bozulma etmeni mikroorganizmaların gıdaların organoleptik özelliklerinde yaptığı bu değişimler tüketiciyi gıdanın güvenli olmadığı şeklinde uyarmasına karşın birçok gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalar böyle bir organoleptik belirti göstermediklerinden gıda kaynaklı enfeksiyonlara neden olabilmektedirler (Nychas vd., 2008; Fung, 2010; Amin, 2012).

Günümüzde modern teknikler geliştirilmesine karşın gıdalarda bozulma etmeni ve patojen mikroorganizmaların gelişmelerini önlemek veya kontrol altına almak amacıyla yönelik yeni muhafaza teknikleri geliştirmek veya mevcut teknikleri iyileştirmek için çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Son zamanlarda bilim insanları biyolojik antimikrobiyal sistemlerin gıda muhafazasında uygulanması üzerinde durmakta ve bu konuda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Gıdaların kalitesi, raf ömrü ve güvenliğinin iyileştirilmesi amacıyla biyolojik antimikrobiyal sistemlerin kullanılması tekniğine biyokoruma denilmektedir. Diğer bir ifade ile gıdalarda istenmeyen patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaları imha etmek ya da gelişmelerini durdurmak amacıyla antagonistik mikroorganizmaların koruyucu kültür veya bunların ürettiği antimikrobiyal metabolitlerin doğal koruyucu madde olarak kullanılmasına biyokoruma yöntemi denilmektedir. Biyokoruma doğal bir yöntem olduğundan çok kabul gören bir muhafaza tekniğidir. Biyokoruma amacıyla en çok kullanılan mikroorganizmalar laktik asit bakterileri ve metabolitleridir (Dortu ve Thonart, 2009; Liu vd., 2010).

## 2.1. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB) Gram-pozitif, hareketsiz, spor oluşturmeyen, çubuk ve kok şeklinde, katalaz negatif, mikroaerofilik veya fakültatif anaerobik, aside dayanıklı, nitrata indirgemeyen, kuvvetli fermantatif olup karbonhidratları ve yüksek alkollerini fermente ederek başlıca son ürün olarak laktik asit üreten bir bakteri grubudur. LAB terimi *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus* ve *Weissella* cinslerini içeren geniş bir bakteri grubunu ifade etmektedir. Genellikle mezofilik olan bu bakteri grubu 5°C'de de gelişme gösterebilmektedir. LAB'leri doğada oldukça yaygın olup toprak, su, bitki, insan ve hayvanların bağırsak ve solunum sistemlerinde, süt ve et ürünlerinde, meyve ve sebzelerde doğal olarak bulunurlar (Thevenot vd., 2006; Holzapfel vd., 2001).

LAB'leri pek çok gıdada doğal olarak bulduklarından, yüz yıllardır fermente gıdalarda arzu edilen tat, aroma ve tekstürün oluşması için starter kültür olarak kullanıldıklarından ve çoğu "GRAS" (genellikle güvenli kabul edilen) statüsünde oldukları için biyokoruyucu olarak kullanıma uygundur (Castellano vd., 2008). Ayrıca son yıllarda LAB'lerin probiyotik kültür, yardımcı kültür, koruyucu kültür veya fonksiyonel kültür olarak kullanımları da yaygınlaşmıştır (Cintas vd., 2001). LAB'lerinin koruyucu kültür veya biyokoruyucu olarak kullanılmalarının temel nedeni göstermiş oldukları güçlü antagonistik veya antimikrobiyal aktivitelerinden kaynaklanmaktadır. LAB'leri antimikrobiyal aktivitelerini, ortamda besin maddeleri için rekabet ederek ya da ortama salgıladıkları laktik ve asetik asit gibi organik asitler, hidrojen peroksit, karbondioksit, diasetil, asetaldehit, yağ asitleri, etanol, enzimler, reuterin ve bakteriyosinler gibi metabolitleriyle sağlamaktadırlar (Soomro vd., 2002). LAB'lerinin sentezledikleri bakteriyosin ve reuterin gibi antimikrobiyal metabolitlerin gıdalarda kullanımları yasal düzenlemeler gerektirdiğinden LAB'lerinin direkt olarak koruyucu kültür olarak kullanılmaları daha çok tercih edilmektedir.

## 2.2. Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Bakteriyosinlerin Genel Özellikleri

LAB'leri tarafından salgılanan bakteriyosinler, ribozomal olarak sentezlenen, ekstraselüler, katyonik, hidrofobik ve/veya amfifilik karakterli, bakteriyosidal veya bakteriyostatik mekanizma ile yakın tür veya suşlara, gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite gösteren proteinlerdir. LAB grubu içerisinde yer alan *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ve *Carnobacterium* cinslerinin bakteriyosin üretme yeteneğine sahip olduğu bildirilmektedir (Cleveland vd., 2001; Rodriguez vd., 2003).

LAB'leri tarafından üretilen bakteriyosinler yapısal, fizikokimyasal ve moleküler özellikleri temel alınarak yapılan sınıflandırmada başlıca 4 ana grup altında toplanmaktadır. Sınıf I bakteriyosinleri veya lantibiyotikler ribozomda sentezlendikten sonra sitoplazmada dehidrasyon gibi modifikasyon reaksiyonlarına uğrarlar ve bunun sonucunda lanthionin, metil-lanthionin gibi anormal amino asitleri içerirler. Molekül ağırlıkları düşüktür (5 kDa'dan küçük) ve ısıya dayanıklıdır. Bu gruba örnek olarak nisin verilebilir. Sınıf II bakteriyosinleri sınıf I bakteriyosinleri gibi düşük moleküler ağırlığa sahip ve ısıya dayanıklı olmalarına karşın anormal amino asitleri içermemektedirler. Bu sınıfa örnek olarak da pediosin AcH verilebilir. Sınıf III bakteriyosinleri büyük molekülü olup ısıya karşı dayanıklılıkları değişken olup genellikle duyarlıdır. Sınıf IV bakteriyosinleri proteine ilave olarak esansiyel lipit ve karbonhidrat içerirler ve dolayısıyla kompleks ve halkalı peptitlerdir (Klaenhammer, 1993; Cotter vd., 2005).

LAB'leri tarafından üretilen bakteriyosinlerin büyük bir kısmı duyarlı bakterilerin hücre membranında gözenekler oluşturarak ATP, amino asit, potasyum ve inorganik fosfat sızmasına ve buna paralel olarak membran iyonik dengesinin bozulmasına ve proton itici gücün yok olmasına neden olarak antimikrobiyal aktivitelerini göstermektedirler. Proton itici gücün ortadan kalkması veya bozulması direkt olarak hücrenin lize olmasına neden olmaktadır (McAuliffe vd., 2001; Papagianni, 2003; Chen ve Hoover, 2003). Hücre membranında gözenekler oluşturarak antimikrobiyal aktivite gösteren bakteriyosinlere örnek olarak sınıf I (nisin) ve sınıf II bakteriyosinleri (pediosin) verilebilir. Bu mekanizmaya ilave olarak bazı bakteriyosinler (sınıf I) hücre duvarı

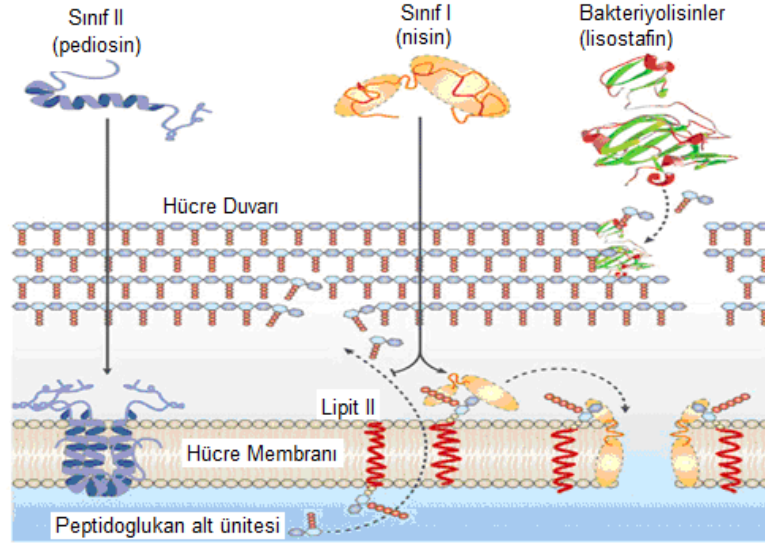
(peptidoglukan) sentezini önleyerek, bazıları (sınıf III bakteriyosinleri) ise hücre duvarını parçalayarak antimikrobiyal etkilerini göstermektedirler. Sınıf I bakteriyosinlerinden biri olan nisin antibakteriyal etki mekanizmasını hem hücre duvarı (peptidoglukan) sentezini önleyerek hem de membran da gözenekler oluşturarak sergileyebilmektedir (Şekil 2.1) (Cotter vd., 2005; Lopez ve Beloso, 2008).

LAB'leri tarafından üretilen bakteriyosinler genellikle *Listeria*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* gibi Gram-pozitif bakteriler üzerinde inhibitör aktiviteye sahiptirler. Ancak, son yıllarda *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* ve *Leuconostoc* suşları tarafından üretilen bazı bakteriyosinlerin Gram-pozitif bakterilerin yanı sıra Gram-negatif bakterilere karşı da antibakteriyal aktivite gösterdikleri bir çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Ivanova vd., 2000; Lee ve Paik, 2001; de Kwaadsteniet vd., 2005; Todorov ve Dicks, 2006; von Mollendorff vd., 2006; Todorov vd., 2007; Şahingil vd., 2011).

Doğal kaynaklı olmaları, toksik olmamaları, protein yapılarından dolayı insan ve hayvan bağırsak sisteminde kolayca parçalanmaları ve korunacak gıdaların fizikokimyasal yapılarında herhangi bir değişime neden olmaksızın bozulma ve hastalık etmeni mikroorganizmaları imha etme özelliklerinden dolayı bakteriyosinler ve dolayısıyla bakteriyosin üretici LAB'leri en çok ilgi gören ve araştırma yapılan konulardan birisidir (Drider vd., 2006).

### **2.3. *Lactococcus lactis* spp. *lactis* BZ ve laktokoksin BZ**

*Streptococcaceae* familyası içinde yer alan *Lactococcus* cinsi *Lc. garvieae*, *Lc. piscium*, *Lc. plantarum*, *Lc. raffinolactis* ve *Lc. lactis* olmak üzere 5 farklı tür içermektedir. *Lc. lactis* türünün altında ise *Lc. lactis* spp. *cremoris*, *Lc. lactis* spp. *hordniae*, *Lc. lactis* spp. *lactis* ile *Lc. lactis* spp. *lactis* biovar. *diacetylactis* suşları yer almaktadır. *L. lactis* spp. *lactis* sadece bitki materyalleri ve sebzelerden izole edilmiştir. *Lc. lactis* spp. *cremoris*, *Lc. lactis* spp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ve *Lc. lactis* spp. *lactis* suşları süt endüstrisinde starter kültür olarak kullanılmaktadır (Sakala vd., 2002). Ayrıca *Lc. lactis* spp. *lactis* et dahil birçok gıdada koruyucu kültür olarak kullanılmaktadır.



**Şekil 2.1.** Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin antibakteriyal etki mekanizmaları (Cotter vd., 2005).

Lactococcus cinsi içinde yer alan bakterilerin bakteriyosin üretme yeteneğine sahip olduğu ve ürettikleri bakteriyosinlerin genellikle sınıf I ve sınıf II bakteriyosinleri içinde yer aldığı araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur. *Lc. lactis* spp. *lactis* tarafından üretilen bakteriyosinlere örnek olarak nisin, lactococcin 140, 972, R and MMFII, lacticin 481 and 3147; *L. lactis* spp. *cremoris* tarafından salgılanan bakteriyosinlere örnek olarak da diplococcin, lactococcin A, B, G ve M verilebilir (Hurst, 1981; Piard vd., 1992; Yıldırım ve Johnson 1998; Hill vd., 1999; Ghrairi vd., 2005). Laktokoklar tarafından üretilen bakteriyosinler içinde en iyi tanımlanmış ve en yaygın kullanım alanına sahip olanı *L. lactis* spp. *lactis*'in bazı suşları tarafından üretilen nisindir. Nisinin antimikrobiyal spektrumu oldukça geniş olup *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium* ve *Listeria* cinslerinin birçok türü ve suşu üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahiptir ve ülkemiz de dahil olmak üzere 50'den fazla ülkede yasal olarak kullanımına izin verilen bir bakteriyosindir (Chen ve Hoover, 2003; Amenu, 2013).

Tarafımızca Tokat piyasasında satışa sunulan bozadan izole edilen *L. lactis* spp. *Lactis* BZ'nin tek, ikili ve kısa zincirler halinde kok şeklinde ve hareketsiz olduğu, pigment ve spor oluşturmadığı, hemoliz, katalaz, jelatin, indol ve Voges-Proskauer negatif olduğu, %3,0-4,0 tuz, 4,4-9,6 pH ve 10-45°C sıcaklık aralığında gelişebildiği, laktoz, glukoz, fruktoz, maltoz, mannitol gibi şekerleri fermente ettiği belirlenmiştir (Sahingil vd.,

2011). *L. lactis* spp. *lactis*'in ürettiği laktokoksin BZ bakteriyosinin pepsin, tripsin, papain enzimlerine ve  $\beta$ -merkaptetanole karşı duyarlı, ancak katalaz, amilaz ve lipaz enzimlerine, organik çözücülerden etanol, metanol, hekzan, kloroform, aseton, etil eter, isopropil alkol ve formaldehit, deterjanlardan sodyumdodesil sülfat, üre, tween 80 ile triton X-100 ve EDTA'ya karşı dayanıklı olduğu bildirilmiştir. Laktokoksin BZ'nin yüksek ısı işleme (90°C'de 30 dk), asidik ve nötral pH'lara (pH 2,0-9,0) karşı dayanıklı olup biyolojik aktivitesini koruduğu belirtilmiştir. Laktokoksin BZ'nin Gram-pozitif bakterilerden *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria* ile *Bacillus*; Gram-negatif bakterilerden *Enterobacter*, *Esherichia*, *Rhodococcus*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Camphylobacter* ve *Citrobacter*'inin bazı şuşlarına karşı inhibitör aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Laktokoksin BZ'nin molekül ağırlığının yaklaşık 5500 Da olduğu ve besiyeri olarak MRS, inokülüm miktarı % 0,1, besiyeri başlangıç pH'sı 6,0-7,0 ve inkübasyon sıcaklığı 25°C olduğu zaman *L. lactis* spp. *lactis* BZ tarafından maksimum düzeyde üretildiği belirlenmiştir. *L. lactis* spp. *lactis* BZ'nin laktokoksin BZ'yi logaritmik gelişme fazında üretmeye başladığı ve durgun fazın başında ise maksimum düzeyde ürettiği saptanmıştır (Sahingil vd., 2011). Gıda sistemlerinde yapılan çalışmalarda *L. lactis* spp. *lactis* BZ'nin yağsız sütte gelişerek laktokoksin BZ ürettiği belirlenmiştir. Ayrıca laktokoksin BZ'nin (400-2500 AU/mL)  $10^2$ - $10^6$  kob/mL düzeyinde *Listeria monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 ile inoküle edilen ve 4 ile 20°C'de bekletilen yağsız, yarım ve tam yağlı UHT sütlerde her iki patojen bakteriyi çok etkili bir şekilde inhibe ettiği belirlenmiştir (Öncül, 2010). Yapılan başka bir çalışmada da laktokoksin BZ'nin taze sığır etinin mikrobiyolojik kalitesini toplam mezofilik aerobik bakteri, toplam psikrotrof aerobik bakteri, toplam koliform, fekal koliform ve laktik asit bakteri sayılarında azalmaya neden olarak iyileştirdiği saptanmıştır. Ayrıca taze sığır et örnekleri *L. monocytogenes* ile 4,71 veya 7,92 log kob/g düzeyinde inoküle edilip ete tutunması sağlandıktan sonra laktokoksin BZ (200-2500 AU/g) ile muamele edildiğinde uygulamanın ilk 5 dakikası içerisinde konsantrasyona bağlı olarak, tutunmuş listeria sayısında sırasıyla 1,11-4,71 ve 0,90-7,92 log kob/g düzeyinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Et örnekleri *L. monocytogenes* ve laktokoksin BZ ile aynı anda muamele edildiklerinde, konsantrasyona bağımlı bir şekilde, laktokoksin BZ'nin düşük tutunmamış listeria içerikli (5,00 log kob/g) et örneklerin ilk 10 dakikası içerisinde 1,93-5,00 log kob/g,

yüksek listeria içerikli (7,99 log kob/g) örneklerde ise 1,35-7,99 log kob/g seviyesinde bir azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (Battal, 2012).

#### **2.4. Et Endüstrisinde Laktik Asit Bakterilerin Önemi**

LAB'leri et ve et ürünlerinde bozulmaya neden oldukları gibi fermente et ürünlerinde starter, probiyotik ve koruyucu kültür olarak kullanıldıklarından son ürünün duyuşal özelliklerini ve güvenilirliğini iyileştirmede önemli rol oynamaktadırlar. LAB'leri fermente et ürünlerinde olgunlaşma süresini kısaltmak, raf ömrünü arttırmak ve duyuşal özelliklerini iyileştirmek amacıyla kullanılmaktadırlar. Ticari et starter kültürlerinde yer alan LAB türleri; *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Pediococcus acidilactici*'dir. Fermente et ürünleri üretiminde fermantasyon işleminin sonucunda oluşan asitlik ve diğer antimikrobiyal bileşenler patojen ve bozulma etmeni mikrofloranın gelişimini önleyici etkiye sahiptir. Ayrıca gelişen asitlik rengin stabilizasyonunda önemli rol oynadığı gibi tekstürü iyileştirici etkiye de sahiptir. LAB'leri fermantasyon sırasında oluşturdukları organik asitler, uçucu (alkol, keton, aldehit ve furanlar) ve uçucu olmayan bileşikler (amino asitler, peptitler) ile ürünün lezzet, tat ve kokusu üzerinde etkilidirler (Hugas ve Monfort, 1997; Lücke, 2000; Ammor ve Mayo, 2007; Olaoye ve Onilude, 2009).

Buzdolabında muhafaza edilen taze etler ile vakum ambalajlanmış etlerde bozulma etmeni olarak karşımıza çıkan LAB'lerine örnek olarak *Lactobacillus sakei*, *L. curvatus*, *L. fuchuensis*, *Carnobacterium divergens*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae* ve *Leuconostoc mesenteriodis* verilebilir (Dave ve Ghaly, 2011; Doulgeraki vd., 2012).

#### **2.5. Et ve Et Ürünlerinde Biyokoruyucu Olarak Laktik Asit Bakterileri Kullanımıyla İlgili Yapılan Çalışmalar**

Sonradan oluşan kontaminasyon üzerine etten izole edilen bakteriyosinogenik LAB'lerinin etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, pişirilmiş jambon steril koşullarda yaklaşık 30 g'lık dilimler halinde kesildikten sonra 5 farklı

laktik asit bakterisi ile ayrı ayrı ( $10^4$  ve  $10^6$  kob/g) ve *L. monocytogenes* ( $10^3$  kob/g) veya *E. coli* O157:H7 NAS mutant suşu ( $10^2$ - $10^3$  kob/g) ile inokule edildikten sonra vakum ambalajlanıp buzdolabı sıcaklığında 28 gün muhafaza edilmiştir (Bredholt vd., 1999). Deneme sonucunda LAB'lerinin jambonda depolama süresince geliştiği ve depolamanın sonunda sayılarının  $10^4$  kob/g'dan  $10^8$ - $10^9$  kob/g'a,  $10^6$  kob/g'dan  $10^8$ - $10^9$  kob/g'a yükseldiği ve *L. monocytogenes* ve *E. coli*'nin gelişimini inhibe ettiği belirlenmiştir. Sadece *L. monocytogenes* içeren jambon örneklerinde ise listeria sayısının  $10^8$ - $10^9$  kob/g'a ulaştığı belirlenmiştir. LAB ve patojen bakteri uygulanmayan jambon örneklerinde LAB sayısının başlangıçta belirlenemeyecek seviyenin altında olduğu, ancak depolamanın sonunda sayısının  $10^8$ - $10^9$  kob/g'a yükseldiği belirlenmiştir. Sadece *E. coli* O157:H7 içeren jambon örneklerinde ise depolamanın sonunda *E. coli* sayısının  $10^5$ - $10^6$  kob/g'a çıktığı belirlenmiştir. İzole edilen LAB'lerinin *Lactobacillus sakei* olduğu belirlenmiştir.

Aynı araştırmacılar *Lactobacillus sakei*'yi pişirilmiş, dilimlenmiş ve vakum ambalajlanmış et ürünlerin (jambon ve sosis) fabrika düzeyinde üretimi sırasında koruyucu bakteri olarak *L. monocytogenes*'e karşı kullanmışlardır (Bredholt vd., 2001). *L. sakei*  $10^5$ - $10^6$  kob/g düzeyinde dilimleme ve vakum paketleme işlemlerinden önce ısı işlem uygulanmış et ürünlerine elle çalışan spreyleme şişesi ile uygulanmıştır. Rifampisine dayanıklı üç farklı *L. monocytogenes* (2230r92 serotip 1, 167 serotip 4b, 187 serotip 4b) suşlarından oluşan kokteylden  $10^3$  kob/g düzeyinde dilimlenerek vakum paketlenen ürünlere enjekte edilmiş ve yeniden paketlenerek 4 ve 8°C'de 28 gün muhafaza edilmişlerdir. Araştırma sonucunda *L. sakei*'nin bakteriyostatik etki ile *L. monocytogenes* suşlarının gelişimini her iki depolama koşullarında kontrol altına aldığı belirlenmiştir. *L. sakei* içermeyen kontrol örneklerinde *L. monocytogenes*'in geliştiği ve sayısının 8°C'de depolanan örnekte 5,8 log kob/g, 4°C'de tutulan örnekte 4 log kob/g'a ulaştığı saptanmıştır. *Lactobacillus sakei*'nin de et ürünlerinde depolama süresince geliştiği ve sayısının 9 log kob/g'a çıktığı gözlenmiştir. Ayrıca *L. sakei* içeren sosis örneklerinde pH değerinin 6,3'ten 5,0'e düştüğü, kontrol örneklerinde ise depolama süresince pH değerlerinin değişmediği gözlenmiştir. Araştırmacılar *Lactobacillus sakei*'nin bakteriyosin üreticisi olmadığı, inhibitör aktivitesinin hızlı gelişmesi ve buna paralel olarak besin maddelerine karşı rekabetinin yüksek olması, pH değerini düşürmesi ve dissosiyeye olmamış laktik asitten kaynaklandığını belirtmişlerdir.

*L. monocytogenes* (yaklaşık  $10^2$  kob/g) ile kontamine edilmiş dilimlenmiş tavuk et örnekleri, *Lactobacillus sakei* Lb790 (yaklaşık  $10^4$  cfu/g) ve bakteriyosini olan sakasin P (3,5 µg/g, 0,6 µg/g, 12 ng/g) ile muamele edilip  $10^\circ\text{C}$ 'de 28 gün muhafaza edildiğinde depolama süresince *L. monocytogenes* gelişimini önledikleri belirlenmiştir (Katla vd., 2002). *Lactobacillus sakei* Lb790 ve sakasin P birlikte uygulandığında *L. monocytogenes* gelişiminin tamamen önlediği gözlenmiştir. Araştırmacılar *Lactobacillus sakei* Lb790 et ortamında  $10^\circ\text{C}$ 'de çok iyi bir şekilde geliştiğini, hücre sayısında 4 log'luk bir artışın olduğunu ve ayrıca depolama süresince sakasin P'yi ürettiğini de saptamışlardır.

Yapılan bir başka çalışmada domuz etinden üretilen sosisler dilimlendikten sonra bakteriyosin üreticisi *Leuconostoc carnosum* 4010 ile  $1,2 \times 10^5$  ve  $6,3 \times 10^6$  kob/g ve beş farklı *L. monocytogenes* suşunu eşit oranda içeren kültür karışımı (*L. monocytogenes* DMRICC 4125, DMRICC 4124 DMRICC 4126, DMRICC 4127 ve DMRICC 4128) ile  $10^4$  kob/g düzeyinde inoküle edilmişlerdir (Budde vd., 2003). Sosis örnekleri vakum pakatlendikten sonra  $5^\circ\text{C}$ 'de 28 gün depolanmışlardır. Araştırma sonucunda,  $1,2 \times 10^5$  kob/g düzeyinde koruyucu kültür içeren sosis örneklerinde depolamanın 1 haftasında *L. monocytogenes*'e karşı inhibitör etki göstermediği, ancak depolama süresinin uzamasıyla birlikte listeria sayısının azaldığı ve depolamanın sonunda 10 kob/g'ın altına düştüğü belirlenmiştir. Kontrol örneğinde ise *L. monocytogenes* sayısının  $10^8$  kob/g'a yükseldiği bildirilmiştir. Yüksek konsantrasyonda *Leuconostoc carnosum* ( $6,3 \times 10^6$  kob/g) içeren sosis örneklerinde *L. monocytogenes* sayısının depolamanın başında hemen azaldığı ve depolamanın 21. gününde 10 kob/g'ın altına düştüğü belirtilmiştir.

Domuz etinden üretilen yağsız sosis dilimleri üretiminde biyokoruyucu olarak *Leuconostoc carnosum* 4010 ve bakteriyosini olan leukosinin *L. monocytogenes* gelişimi üzerine inhibitör etkisini belirlemek üzere yapılan çalışmada, koruyucu kültür ve leukosin fermantasyon aşamasında, ısı işlem öncesi ve sonrası ilave edilmiş ve listeria hücreleri üzerine inhibitör etkisi saptanmıştır. Sosis üretimi sırasında *Leuconostoc carnosum* 4010 yaklaşık  $10^6$  kob/g, kısmen saflaştırılmış leukosin ise 20 mL/kg düzeyinde katılmıştır. Üretim sonrası denemede sosis dilimlerine (her bir dilim 20 g)  $10^8$  kob/mL canlı bakteri içeren *Leuconostoc carnosum* 4010 kültüründen 100 µL,

leukosinden ise 200 µg/20 g düzeyinde uygulanmıştır. Sosis dilimlerinin her bir yüzeyine 89±37 kob/g düzeyinde 5 farklı *L. monocytogenes* suşu içeren kokteylden uygulanmıştır. Araştırma sonucunda 15 veya 20°C’de 18 saat gerçekleştirilen fermantasyon işlemi süresince *Leuconostoc carnosum* 4010’un sosis hamurunda gelişerek leukosin ürettiği ve *Leuconostoc carnosum* 4010’un kendi bakteriyosinine göre daha yüksek antilisterial aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Jacobsen vd., 2003).

Bakteriyosinogenik *Lactobacillus casei* CRL705’in parçalanarak kıyma haline getirilmiş ette koruyucu kültür olarak kullanım olanağını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, et örnekleri *Lactobacillus casei* CRL705 ( $1,8 \times 10^6$  kob/g), *Listeria innocua* 7 ( $1,0 \times 10^3$  kob/g) ve *Lactobacillus sakei* CRL1424 ( $5,5 \times 10^3$  kob/g) ile ayrı ayrı ve birlikte inoküle edilmiş ve 4°C’de 21 gün depolanmıştır (Castellano vd., 2004). *Lactobacillus casei* CRL705’in depolama süresince et örneklerinde geliştiği, sayısının 12 log kob/g’a ulaştığı ve ayrıca depolama süresince bakteriyosin ürettiği gözlenmiştir. *Lactobacillus casei* CRL705’in ette *Listeria innocua*’nın gelişimini bakteriyostatik mekanizmayla durdurduğu, *Lactobacillus sakei*’nin gelişimini ise bakterisidal etki göstererek sayısında yaklaşık 1,5 log kob/g azalmaya neden olduğu belirtilmiştir. Bunlara ilaveten koruyucu kültür olarak katılan *Lactobacillus casei* CRL705’in et örneklerin pH değerinde önemli bir değişime neden olmadığı da tespit edilmiştir. Koruyucu kültür içeren et örneğinde pH değerinin depolamanın sonunda 5,45’den 5,06’ya, kontrol örneğinde ise 5,39’dan 5,25’e düştüğünü belirlemişlerdir.

Djenane vd., 2005, dana biftekte bakteriyosin üreticisi *Lactobacillus sakei* CTC 372 ve karakterize edilmeyen *Lactobacillus* CTC 711’in koruyucu kültür olarak kullanım olanaklarını ortaya koymak amacıyla bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Koruyucu bakteriler etin yüzeyine 4-5 log kob/cm<sup>2</sup> düzeyinde spreyleme yöntemi ile inoküle edilmişlerdir. Araştırmanın sonucunda, *Lactobacillus sakei* CTC 372 ve *Lactobacillus* CTC 711 ile inoküle edilen dana biftek örneklerinde bozulma etmeni bakterilerden *Pseudomonas* spp. ve *Brochothrix thermosphacta*’nın gelişimlerinin sırasıyla 10 ve 9 gün geciktiği ve kontrol örneği ile kıyaslandığında bu örneklerde her iki bakterinin gelişimlerinin kontrol altına alındığı belirlenmiştir. Depolamanın sonunda (28 gün) kontrol, *Lactobacillus sakei* CTC 372 ve *Lactobacillus* CTC 711 içeren et örneklerinde *Pseudomonas* spp. sayısının sırasıyla 2,8, 1,2, 2,2 log kob/cm<sup>2</sup>, *Brochothrix*

*thermosphacta* sayısının ise 4,6, 2,0 ve 2,5 log kob/cm<sup>2</sup> olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca araştırmacılar bakteriyosinjenik bakteriler modifiye atmosferde paketleme ile birlikte kullanıldığında depolama işleminin sonunda *Brochothrix thermosphacta* sayısının belirlenemeyecek seviyenin altına düştüğünü belirtmişlerdir.

Laktik asit ve laktik asit bakterilerinin vakum paketlenmiş sığır etinde bozulma etmeni mikroorganizmalar üzerine etkilerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, biyokoruyucu olarak *Lactobacillus carnis* MXVK76, *Lactobacillus pentosus* LP1-31035 ve *Staphylococcus carnosus* MC1-02055 starter bakteriler kullanılmıştır (Signorini vd., 2006). Koruyucu bakteriler ayrı ayrı 10<sup>5</sup> kob/g, laktik asit 200 mg/100 g, bozulma etmeni *Pseudomonas fluorescens* B52 ile *Brochothrix thermosphacta* NCIB-10018 ise yaklaşık 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> kob/g düzeyinde ete uygulanmışlardır. Çalışmanın sonucunda 20°C’de muhafaza edilen et örneklerinde koruyucu suşların *Pseudomonas* sayısında 1-2 log, *Brochothrix thermosphacta* sayısında ise 1,5-2,0’luk azalmaya neden olduğu bulunmuştur. Laktik starterlerin uygulandığı et örneklerinde depolamanın ilk 2 gününde pH değerinde 0,6 ünitelik azalma, bundan sonraki günlerde ise pH’da artış olduğu saptanmıştır. Laktik asit uygulanan ve 20°C’de muhafaza edilen et örneklerinde toplam aerobik bakteri, enterobakteri, LAB ve *Pseudomonas* sayısının kontrol ve biyokoruyucu olarak starter kültür kullanılan örneklere göre daha düşük olduğu belirtilmiştir.

Başka bir çalışmada bakteriyosin üreticisi *Enterococcus faecium* PCD71 (7,3 log kob/g) ve *Lactobacillus fermentum* ACA-DC179 (6,9 log kob/g), çiğ tavuk etinde *Listeria monocytogenes* (5,0 log cfu/g) ve *Salmonella enteritidis*’e (5,0 log cfu/g) karşı koruyucu kültür olarak kullanılmıştır (Maragkoudakis vd., 2009). Buzdolabında 7 günlük depolama süresince her iki koruyucu kültürün *Enterococcus faecium* PCD71 (7,2±0,20 log kob/g) ve *Lactobacillus fermentum* ACA-DC179 (7,2±0,31 log kob/g) sayısının tavuk etinde değişmeden kaldığı bulunmuştur. Ayrıca koruyucu kültürlerin sayısının ortama katılan patojen bakteri varlığından da etkilenmediği belirlenmiştir. Gıda kaynaklı patojen bakterilerin ette gelişimlerinin koruyucu kültür varlığında olumsuz yönde etkilendiği belirtilmiştir. *Enterococcus faecium* PCD71’in 7 günlük depolama sonunda *L. monocytogenes* sayısında 0,7 log kob/g (P<0,001), *Lactobacillus fermentum* ACA-DC179’un depolamanın 2, 4 ve 7. günlerinde *Salmonella* Enteritidis sayısında

sırasıyla 0,5, 1,3 ve 1,2 log kob/g ( $P<0,0001$ )'lık azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca koruyucu kültürlerin etin biyokimyasal özelliklerinden protein içeriği, antioksidan kapasite ve pH değerinde önemli bir değişime neden olmadıkları da belirlenmiştir.

Castellano vd. (2010), taze ete  $10^6$  kob/g düzeyinde biyokoruyucu olarak laktosin 705 ve laktosin AL705 bakteriyosinlerini üreten *Lactobacillus curvatus* CRL705'i uyguladıktan sonra vakum ambalajlayıp 2°C'de 60 gün depolamışlardır. Araştırma sonucunda 60 günlük depolama sırasında *Lactobacillus curvatus* CRL705'in baskın florayı oluşturduğunu ve canlı hücre sayısının 7,40 log kob/g'a ulaştığını belirlemiştir. *Lactobacillus curvatus* CRL705'un koliform bakteriler ile *Pseudomonas*'lar üzerinde önemli bir inhibitör etkiye sahip olmadığı, dolayısıyla kontrol ve koruyucu kültür içeren et örneklerinin koliform bakteri ile *Pseudomonas* sayıları arasında önemli bir farkın olmadığını bildirmişlerdir. Depolama işleminin sonunda (60 gün) kontrol ve *Lactobacillus curvatus* CRL705 içeren et örneklerinde koliform bakteri sayısının 4,68 ile 4,50 log kob/g; *Pseudomonas* sayısının ise her iki örnekte yaklaşık 3,30 log kob/g olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar *Lactobacillus curvatus* CRL705'in ette bozulma etmeni *Brochothrix thermosphacta*'nın gelişimini önlediğini belirlemiştir. Depolama süresince kontrol örneğinde *Brochothrix thermosphacta* sayısının 2,5'log'luk artmasına karşın koruyucu kültür içeren et örneğinde artmadığı ve gelişiminin önlediği belirlenmiştir. *Lactobacillus curvatus* CRL705 uygulanan et örneklerinin pH değerinin depolama sürecinde 5,55'ten 5,45'e düştüğü, kontrol örneğinin pH değerinin ise 5,55'ten 5,60'a yükseldiği saptanmıştır. Koruyucu kültür içeren et örneğinde pH değerinde görülen azalmanın nedeni *Lactobacillus curvatus* CRL705'in gelişimine paralel olarak metabolik aktivitesi sonucunda oluşan asitlikten kaynaklandığı belirtilmiştir. Kontrol örneğine göre koruyucu kültür içeren et örneğinde doku parçalanmasının 10 gün geciktiği, hafif asitlik dışında etin duyuşsal ve yapısal özelliklerini olumsuz yönde etkilemediği ve kötü koku oluşumuna neden olmadığı ortaya konmuştur.

Aynı araştırmacılar başka bir çalışmada bakteriyosin üreticisi *Lactobacillus curvatus* CRL705 ve *Lactococcus lactis* CRL1109'un  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (şelatlayıcı madde) ile birlikte

kullanımının dondurulmuş sığır eti köftesinde *E. coli* O157:H7'nin gelişimi üzerine inhibitör aktivitesini 5°C'de 9 gün incelemiştir (Castellano vd., 2011). Çalışmanın sonucunda, koruyucu kültürler (yaklaşık  $10^7$  kob/g) ve Na<sub>2</sub>EDTA (48 mM) birlikte kullanıldıkları zaman *E. coli* O157:H7 ve ette bulunan koliform bakteri sayısında depolamanın 0'ncı gününde 1 log kob/g azalmaya neden olduğunu bulmuşlardır. Koruyucu kültürler ve şelatlayıcı madde tek başlarına kullanıldıklarında *E. coli* O157:H7 ve koliform bakteri sayısında önemli bir azalmaya neden olmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca bakteriyosin bakterilerin köftede canlılıklarını koruyup geliştirdikleri, depolamanın 48'inci saatinden sonra bakteriyosin üretmeye başladıkları ve bakteriyosin üretiminin depolama işleminin sonuna kadar devam ettiğini de belirlemişlerdir. Na<sub>2</sub>EDTA içeren et örneklerinde rengin koyulaştığı, ancak biyokoruyucu kültürleri içeren et örneklerinin L\*, a\* ve b\* değerlerinde depolamanın 6'ncı gününe kadar önemli bir değişimin olmadığı, ancak depolamanın 6 ile 9'uncu günlerinde bütün örneklerin renk değerleri arasında önemli bir farkın olmadığını tespit etmişlerdir.

Kouakou vd. (2010), sakasin P üreticisi *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28wt ile pediosin AcH üreticisi *Pediococcus acidilactici* H'nin *L. monocytogenes* ile  $10^2$  kob/g düzeyinde kontamine edilmiş çiğ domuz etinde koruyucu kültür olarak tek başlarına ve birlikte kullanım potansiyellerini ortaya koymak amacıyla bir araştırma gerçekleştirmişlerdir. *L. monocytogenes* ve koruyucu bakteriler aynı anda ete inokule edilmiştir. *Lactobacillus curvatus* ve *Pediococcus acidilactici* tek başlarına ve kombine uygulamalarda  $10^3$  kob/g düzeyinde kullanılmışlardır. Sadece *Pediococcus acidilactici* veya *Lactobacillus curvatus* ile inokule edilen et örneklerinde listeria sayısının sırasıyla 4°C'de yapılan depolama işleminin 1'inci ve 2'nci haftasından sonra belirlenemeyecek seviyenin altına düştüğü, daha sonra ise listeria sayısının arttığı ve 6 haftalık depolama işleminin sonunda 3 ve 2 log kob/g'a yükseldiği belirtilmiştir. Her iki bakterinin kombine kullanıldığı et örneğinde listeria sayısının depolamanın 1'inci haftasında belirlenemeyecek düzeye düştüğü ve 4 hafta depolama süresince bu düzeyde kaldığı, ancak depolamanın 6'ncı haftasının sonunda listeria sayısının çok düşükte ( $10$  kob/g'dan az) olsa yeniden artmaya başladığı saptanmıştır. Bakteriyosin bakterileri tek başlarına ve özellikle kombine olarak içeren et örneklerinin pH değerlerinin depolamanın 3'ncü haftasına kadar azaldığı ve daha sonra yeniden arttığı

belirlenmiştir. Depolamanın sonunda sadece *Lactobacillus curvatus* veya *Pediococcus acidilactici* veya her iki bakteriyi içeren et örneklerinde pH değerinin sırasıyla 6,1, 5,9 ve 5,7'ye ulaştığı bildirilmiştir. *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* ve *Pediococcus acidilactici*+*Lactobacillus curvatus* içeren et örneklerinde bakteriyosin üretiminin depolamanın 2'nci haftasının sonunda maksimum seviyeye, sırasıyla 1066, 2133 ve 4266 AU/g ulaştığı bulunmuştur. Sadece *Lactobacillus curvatus* ve *Pediococcus acidilactici*'yi içeren et örneklerinde bakteriyosin aktivitesinin depolamanın 2'nci haftasından sonra çok keskin bir şekilde azaldığı ve depolamanın işleminin sonunda bakteriyosin aktivitesinin sırasıyla 500 ve 200 AU/g'ın altına indiği belirlenmiştir. Her iki bakteriyi birlikte içeren örnekte bakteriyosin aktivitesinin depolama işleminin 4'ncü haftasının sonuna kadar stabil kaldığı, ancak depolamanın 6'ncı haftasında 500 AU/g'a düştüğü saptanmıştır.

Nisin (200 ppm nisaplin) ve *Lactobacillus acidophilus* ( $10^7$  kob/g) ayrı ayrı ve birlikte taze sığır etine uygulanarak etin duyuşal, kimyasal ve bakteriyolojik kalitesi (toplam canlı bakteri, Enterobacteriaceae ve toplam koliform) ile patojen bakterilerden *Staphylococcus aureus* üzerine inhibitör etkisi üzerine (Amin, 2012) bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan et örnekleri 4°C'de muhafaza edilmişlerdir. Araştırma sonucunda nisin ve *Lactobacillus acidophilus*'un ayrı ayrı uygulandıkları et örneklerinin pH, toplam uçucu nitrojenli bileşikler ve tiyobarbütirik asit (TBA) değerlerinin, toplam canlı bakteri, Enterobacteriaceae ve koliform sayılarının depolama süresince azaldığı, ancak nisin ve *Lactobacillus acidophilus* birlikte uygulandıklarında inhibitör etkinin daha çok arttığı belirlenmiştir. Nisin, *Lactobacillus acidophilus* ve nisin+*Lactobacillus acidophilus* ile muamele edilen et örneklerinin raf ömürlerinin kontrol örneğine göre sırasıyla 6, 3 ve 5 gün arttığı bulunmuştur. Kontrol örneğinin raf ömrü 2 gün olarak belirlenmiştir. *Staphylococcus aureus* başlangıç sayısı 8,54 log kob/g olan et örneklerinde nisin depolamanın 3. gününde 3,69 log kob/g (43,21%), *Lactobacillus acidophilus* depolamanın 2. gününde 4,87 log kob/g (57,03%), nisin+*Lactobacillus acidophilus* kombinasyonunun ise depolamanın 1. gününde 3,87 log kob/g'lık azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Nisin, *Lactobacillus acidophilus* ve nisin+*Lactobacillus acidophilus* uygulanan et örneklerinde *Staphylococcus aureus* sayısının sırasıyla depolamanın 4., 3. ve 2. gününde belirlenemeyecek seviyenin altına düştüğü belirlenmiştir. Araştırmacılar etin raf ömrünün iyileşmesi üzerine nisinin,

*Staphylococcus aureus*'un gelişiminin inhibisyonu üzerine nisin+*Lactobacillus acidophilus* kombinasyonunun daha etkili olduğunu vurgulamışlardır. Et örneklerinin pH değerinin depolama süresince arttığı, ancak nisin, *Lactobacillus acidophilus* ve nisin+*Lactobacillus acidophilus* içeren et örneklerinde pH değerinde olan artışın daha yavaş olduğu belirlenmiştir. Kontrol örneğinin pH değerinin 5,82'den depolamanın 2. gününde 6,92'ye, nisin içeren örnekte depolamanın 7. gününde 6,74'e, *Lactobacillus acidophilus*'lu örnekte depolamanın 3. gününde 7,01'e, nisin+*Lactobacillus acidophilus* içeren örnekte ise depolamanın 5. gününde 6,94'e ulaştığı belirtilmiştir. Toplam bakteri ve koliform bakteri sayısının nisin içeren örnekte depolamanın 6. gününde 11,73 ve 7,32 log kob/g, *Lactobacillus acidophilus*'lu örnekte ise depolamanın 3. gününde 9,67 ve 7,33 log kob/g'a ulaştığı belirlenmiştir. Kontrol örneğinde ise depolamanın 2. gününde söz konusu bakterilerin sayısının sırasıyla 11,67 ile 7,33'e yükseldiği bildirilmiştir.

Sparo vd. (2013) yaptıkları çalışmada bakteriyosin üreticisi *Enterococcus faecalis* CECT7121'nin gıda patojenlerinden *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* ve *L. monocytogenes*'e karşı inhibitör etkisini incelemişlerdir. *E. faecalis* CECT7121  $10^4$  kob/g, *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *C. perfringens* ve *L. monocytogenes* ise  $10^5$  kob/g düzeyinde kullanılmıştır. Araştırma sonucunda, *E. faecalis* CECT7121 ( $10^4$  kob/g) ve *E. coli* O157:H7 ( $10^5$  kob/g) aynı anda ete ilave edildiklerinde depolamanın 72. saatinden sonra *E. coli* O157:H7 sayısının belirlenemeyecek seviyenin altına düştüğünü saptamışlardır. *Enterococcus faecalis* CECT7121 inokülasyonundan 24 saat önce veya sonra *E. coli* O157:H7 katılan et örneklerinde patojen bakteri sayısının depolamanın 24. ve 48. saatlerinde tespit edilemeyecek düzeye indiğini belirlemişlerdir. *Enterococcus faecalis* CECT7121'in bütün et örneklerinde *S. aureus* ve *C. perfringens* sayısını depolamanın 48. saatinde belirlenemeyecek düzeye düşürdüğü bulunmuştur. Araştırmada ayrıca *Enterococcus faecalis* CECT7121'e karşı en duyarlı patojen bakterinin *L. monocytogenes* olduğu ifade edilmiştir. Bütün et örneklerinde *L. monocytogenes* sayısının depolama işleminin 24. saatinden itibaren belirlenemeyecek seviyeye indiği belirlenmiştir.

## BÖLÜM III

### MATERYAL ve METOT

#### 3.1. Bakteri Suşları ve Kültür Koşulları

Daha önceki çalışmamızda bakteriyosin (laktokoksin BZ) üreticisi olarak bozadan izole edilen (Şahingil vd., 2011) *Lactococcus lactis* spp. *lactis* BZ koruyucu kültür olarak kullanılmıştır. Koruyucu kültürün antibakteriyal aktivitesinin belirlenmesinde *Lactobacillus plantarum* DSM 2601, *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 de test bakterisi olarak kullanılmıştır. *L. lactis* spp. *lactis* BZ ve *Lactobacillus plantarum* %20 gliserol içeren de Mann Rogosa and Sharpe (MRS) besiyerinde, *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 %20 gliserol içeren Brain Hearth Infusion (BHI) besiyerinde -80°C’de muhafaza edilmiştir.

#### 3.2. Taze Sığır Etinin Hazırlanması

Hijyenik koşullarda çalışan bir kasaptan alınan yeni kesilmiş taze sığır eti aseptik koşullarda Gıda Mühendisliği Bölüm laboratuvarına getirilmiştir. Yüzeysel kontaminasyonu minimum düzeye indirmek için et örneklerinin bütün yüzeyleri 2 cm kalınlığında kesilip atılmıştır. Geriye kalan etler aseptik koşullar altında 5 gram olarak kesilip polietilen stomacher plastik poşetlere konulmuş ve -80°C’de muhafaza edilmişlerdir. Denemeler sırasında et örnekleri ultra dondurucudan alınıp çözündürüldükten sonra kullanılmıştır. Taze etlerde başlangıç toplam psikrofil/psikrotrof aerobik bakteri sayımı 5-8°C’de Plate Count Agar, toplam koliform bakteri sayıları ise 35-37°C’de Violet Red Bile Agar kullanılarak belirlenmiştir.

#### 3.3. Sığır Etlerinin Koruyucu Kültür ve Test Bakterileri İle İnokulasyonu

Taze sığır etlerinden (5 g) rastgele örnekler alınıp üç gruba bölünmüştür. Birinci grup et örneklerinden birisi aynı anda *L. lactis* spp. *lactis* BZ ( $10^7$  kob/g) ve *L. monocytogenes* ( $10^4$  kob/g), diğeri ise *L. lactis* spp. *lactis* BZ ( $10^7$  kob/g) ve *E. coli* O157:H7 ( $10^4$  kob/g) ile inokule edilmiştir. İkinci grup et örneklerinin her ikisi de *L. lactis* spp. *lactis* BZ ( $10^7$  kob/g) ile inokule edilip buzdolabında 24 saat bekletilmiş ve bu sürenin

sonunda et örneklerinden birisi *L. monocytogenes* ( $10^4$  kob/g), diğeri ise *E. coli* O157:H7 ( $10^4$  kob/g) inoküle edilmiştir. Üçüncü grup et örneklerinden biri *L. monocytogenes* ( $10^4$  kob/g), diğeri *E. coli* O157:H7 ( $10^4$  kob/g) ile kontamine edilip buzdolabında 24 saat bekletilmiştir. Daha sonra her bir et örneğine *L. lactis* spp. *lactis* BZ ( $10^7$  kob/g) ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan et örnekleri buzdolabı koşullarında (4-6°C'de) 12 gün muhafaza edilmişlerdir. Ayrıca sığır etlerinden örnekler alınarak pozitif ve negatif kontrol olarak kullanılmışlardır. Negatif kontrol olarak bakteri inoküle edilmemiş et örneği, pozitif kontrol örneği olarak sadece *L. lactis* spp. *lactis* BZ ( $10^7$  kob/g), *L. monocytogenes* ( $10^4$  kob/g) ve *E. coli* O157:H7 ( $10^4$  kob/g) içeren et örnekleri kullanılmıştır.

### **3.4. Mikrobiyolojik Analizler**

Buzdolabı koşullarında muhafaza edilen et örneklerinden depolamanın 0., 1., 3., 7., 9. ve 12. günlerinde rastgele örnekler alınıp mikrobiyolojik analizlere tabi tutulmuştur. Et örnekleri 1:5 oranında steril peptonlu su (%0,1) ile seyreltilip stomacher'da 4-5 dakika homojenize edilmiş ve dilüsyonlar hazırlanmıştır. *L. lactis* spp. *lactis* BZ sayımı 30°C'de 24-48 saat M17 agar, *L. monocytogenes* 35-37°C'de 24-48 saat Listeria supplement içeren Oxford agar, *E. coli* O157:H7 35-37°C'de 24-48 saat Sorbitol MacConkey (SMAC) agar kullanılarak yapılmıştır. Bakteri ilave edilmemiş taze et örneği ile *L. lactis* spp. *lactis* BZ ( $10^7$  kob/g) içeren et örneklerinde depolama süresince toplam psikrofil/psikrotrof aerobik bakteri ile toplam koliform bakteri sayımları da yapılmıştır. Toplam psikrofil/psikrotrof aerobik bakteri sayımı 5-8°C'de Plate Count Agar, toplam koliform bakteri sayımı ise 35-37°C'de Violet Bile Red Agar kullanılarak belirlenmiştir.

### **3.5. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi**

Antimikrobiyal aktivite testi sadece bakteri inoküle edilmeyen et örneği (kontrol) ile *L. lactis* spp. *lactis* BZ içeren et örneklerinde yapılmıştır. Buzdolabı koşullarında muhafaza edilen taze et örneklerinden depolamanın 0., 1., 3., 7. ve 9. günlerinde alınan et örnekleri 1:1 oranında steril peptonlu su (%0,1) ile seyreltilip stomacher'da 4-5 dakika homojenize edilmiştir. Bu işlemi takiben et örnekleri 4000 g'de 20 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Üst kısmı steril şırınga membran filtreden (0,45 µm

gözenekli) geçirilerek steril edildikten sonra antimikrobiyal aktivite testinde kullanılmıştır. Steril antimikrobiyal diskler hazırlanan sıvının içene daldırılıp 15 dakika bekletildikten sonra indikatör olarak *L. monocytogenes* içeren BHI yumuşak agarın üzerine konulmuştur. İnkübasyon işleminden (30°C’de 24 saat) sonra disk etrafında inhibisyon alanı oluşup oluşmadığı kontrol edilmiştir.

### **3.6. Et Örneklerinin pH Değerlerinin Belirlenmesi**

Depolamanın 0., 1., 3., 7. ve 9. günlerinde et örneklerinin pH değerleri de Hanna Marka pH metre kullanılarak belirlenmiştir (AOAC, 2002).

### **3.7. Et örneklerinin Renk Değerlerinin Belirlenmesi**

Renk analizi sadece bakteri inokule edilmeyen et örneği (kontrol) ile *L. lactis* spp. *lactis* BZ içeren et örneği üzerinde en az 3 farklı noktadan Konica Minolta Chrometer CR400 (Japonya) kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler CIE renk sistemine göre L\*, a\* ve b\* değerleri tespit edilerek gerçekleştirilmiştir. CIE renk sisteminde L\* parlaklığı ifade etmekte olup değeri 0 (siyah) ile 100 (beyaz) arasındadır. a\* değeri kırmızı-yeşil, b\* değeri ise sarı-mavi renk değerlerini ifade etmektedir (Luo, 2005). Ölçümler öncesi cihaz kendi standardı olan beyaz renk plakası kullanılarak kalibre edilmiştir.

### **3.8. İstatiksel Analiz**

Deneme üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Araştırma sonucunda elde edilen tüm veriler SPSS 10 (Anonim, 1999) paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Ortalamaların karşılaştırılması için Duncan testi kullanılmıştır.

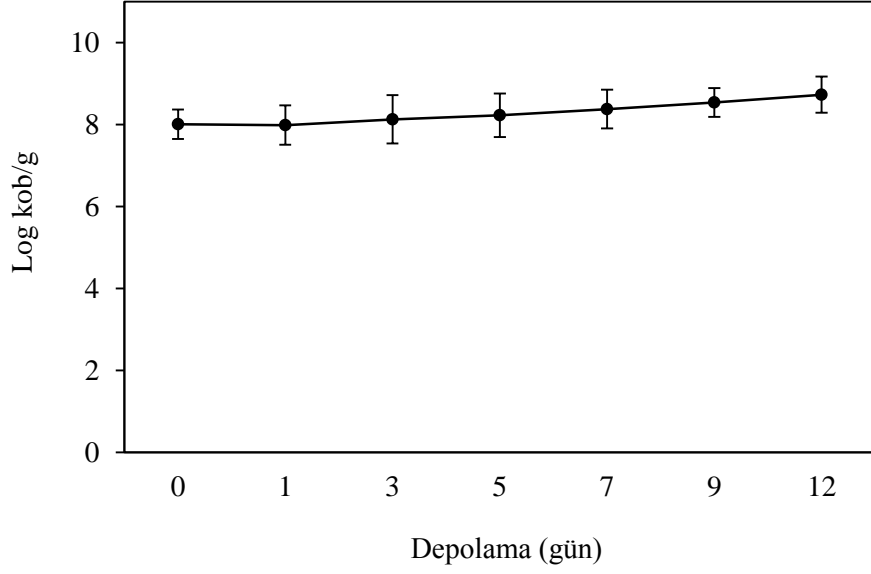
## BÖLÜM IV

### BULGULAR ve TARTIŞMA

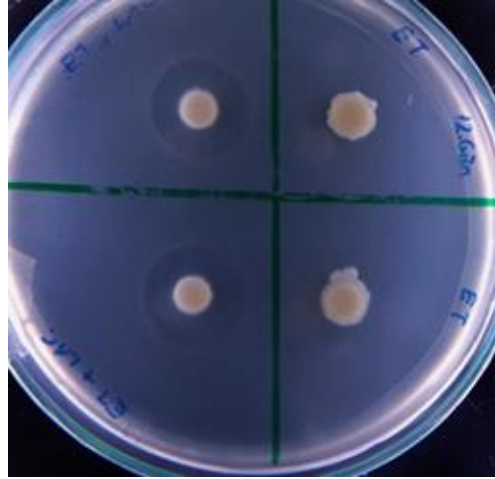
#### 4.1. *L. lactis* spp. *lactis* BZ'nin Buzdolabı Sıcaklığında Taze Sıyr Etinde Gelişimi ve Bakteriyosin Üretimi

*L. lactis* spp. *lactis* BZ ile 8,01 log kob/g düzeyinde inokule edilen et örnekleri 12 gün buzdolabı sıcaklığında muhafaza edilmişlerdir. Analiz sonucunda *L. lactis* spp. *lactis* BZ'nin depolama süresince et örneklerinde istatistiksel olarak önemli olmasa da ( $P>0,05$ ) geliştiği belirlenmiştir (Şekil 4.1). Depolama işleminin sonunda *L. lactis* spp. *lactis* BZ sayısının 8,73 log kob/g'a ulaştığı belirlenmiştir. *L. lactis* spp. *lactis* BZ'nin gelişimi sırasında bakteriyosini olan laktokoksin BZ'yi üretip üretmediği *Listeria monocytogenes*'e karşı test edilerek belirlenmiştir. Yapılan aktivite testi sonucunda depolama süresi boyunca *L. lactis* spp. *lactis* BZ'nin bakteriyosin ürettiği belirlenmiştir. Depolamanın 1, 3, 5, 7, 9 ve 12'inci günlerinde *Listeria monocytogenes*'e karşı gösterdiği inhibitör zonun büyüklüğü sırasıyla 8, 10, 16, 17, 18, 18 ve 20 cm olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2). Gıda kaynaklı patojen bakterilerden *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 varlığında *L. lactis* spp. *lactis* BZ'nin gelişiminin ve bakteriyosin üretme yeteneğinin olumsuz yönde etkilenmediği gözlenmiştir.

Bakteriyosin üretici *Lactobacillus sakei* (Bredholt vd.,1999 ve 2001), *Lactobacillus sakei* Lb790 (Katla vd., 2002), *Leuconostoc carnosum* 4010 (Jacobsen vd., 2003), *Lactobacillus casei* CRL705 (Castellano ve ark., 2004), *Lactobacillus curvatus* CRL705 (Castellano vd., 2010), *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28wt ile *Pediococcus acidilactici* H (Kouakou vd., 2010)'nin depolama süresince et örneklerinde gelişerek sayılarının arttığı ve bakteriyosin ürettikleri belirtilmiştir. Tavuk etine koruyucu kültür olarak uygulanan *Enterococcus faecium* PCD71 ve *Lactobacillus fermentum* ACA-DC179'un buzdolabında 7 günlük depolama süresince sayıların değişmeden kaldığı ifade edilmiştir (Maragkoudakis vd., 2009).



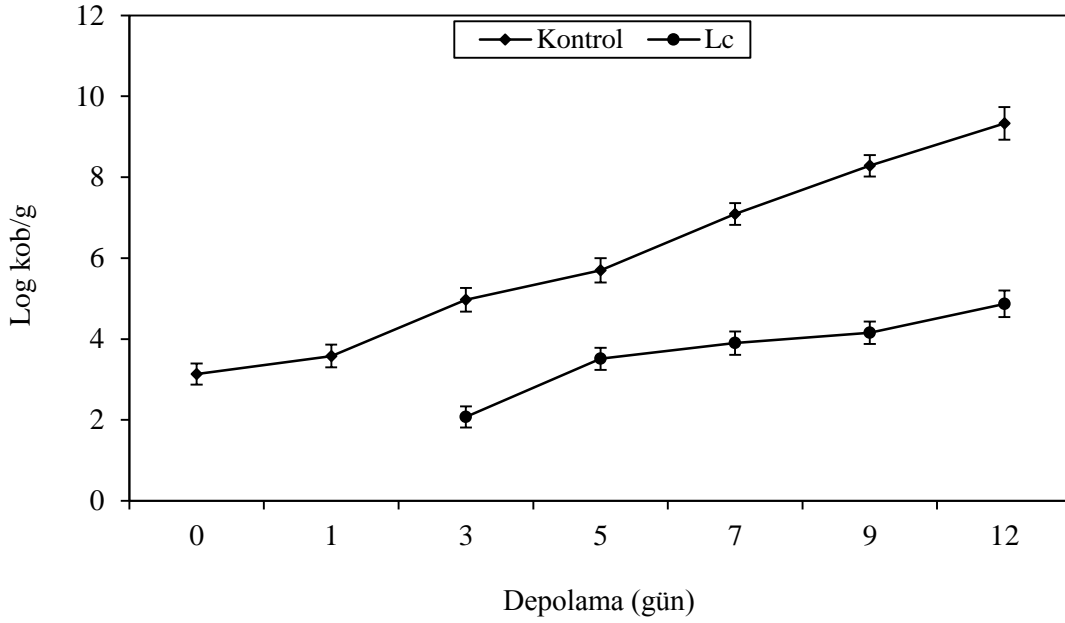
**Şekil 4.1.** *L. lactis spp. lactis* BZ'nin buzdolabı koşullarında taze ette gelişim profili



**Şekil 4.2.** Buzdolabı koşullarında muhafaza edilen ette gelişen *L. lactis spp. lactis* BZ'nin *Listeria monocytogenes*'e karşı inhibitör aktivitesi (depolamanın 12'nci günü).

#### **4.2. Taze Etin Toplam Psikrofil Aerobik Bakteri İçeriği Üzerine *L. lactis spp. lactis* BZ'nin Etkisi**

Taze etin başlangıç toplam psikrofil aerobik bakteri (TPAB) içeriği 3,14 log kob/g bulunmuştur (Şekil 4.3). Depolama süresi boyunca koruyucu kültür uygulanmayan



**Şekil 4.3.** *L. lactis* spp. *lactis* BZ'nin taze etin toplam psikrotrof aerobik bakteri içeriği üzerine etkisi. Lc, *L. lactis* spp. *lactis* BZ.

kontrol et örneğinde TPAB sayısının arttığı ve depolamanın sonunda 9,33 log kob/g'a ulaştığı tespit edilmiştir. Depolamanın 1. gününden itibaren kontrol örneklerin TPAB sayısında görülen artışların istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ( $P < 0,05$ ). *L. lactis* spp. *lactis* BZ ile muamele edilen et örneklerinde depolamanın 0'ıncı ve 1'inci günlerinde belirlenemeyecek ( $< 10$  kob/g) düzeyde olduğu, ancak depolamanın 3'üncü gününde 2,07 log kob/g, 12'nci gününde ise 4,87 log kob/g'a çıktığı saptanmıştır. Depolamanın 5 ile 7'inci haftaları ve 7 ile 9'uncu haftaları arasında TPAB sayısında görülen artışın istatistiksel olarak önemsiz ( $P > 0,05$ ), diğer haftalar arası görülen artışın önemli ( $P < 0,05$ ) olduğu bulunmuştur. Kontrol örneği ile karşılaştırıldığında *L. lactis* spp. *lactis* BZ koruyucu kültür olarak kullanıldığında TPAB gelişimini kontrol altına aldığı ve raf ömrünü iyileştirdiği belirlenmiştir. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliğine göre taze ette her 5 örnekten 2'inde en fazla izin verilen toplam aerobik bakteri sayısının  $5 \times 10^6$  kob/g olduğu dikkate alınır, *L. lactis* spp. *lactis* BZ içeren taze et örneğinin bakteriyolojik kalitesinin buzdolabında gerçekleştirilen 12 günlük depolamanın sonunda halen iyi ve kabul edilebilir seviyede olduğu görülmektedir.

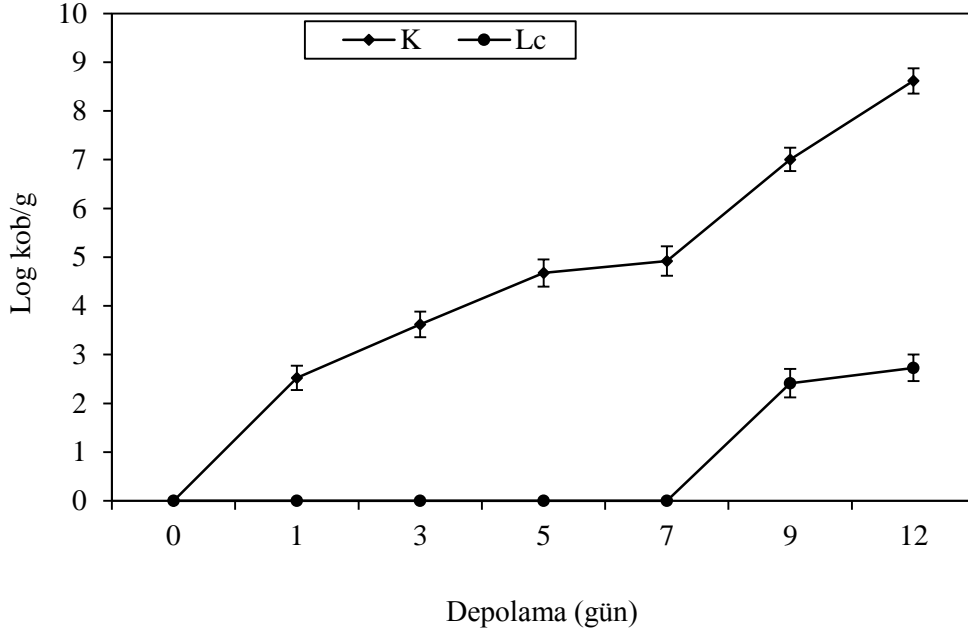
Battal (2012) tarafından yapılan çalışmada, *L. lactis* spp. *lactis* BZ tarafından üretilen laktokoksin BZ 400-800 AU/g taze sığır etine uygulandığında TPAB sayısını (etin başlangıç TPAB sayısı 6,12 log kob/g) depolamanın 8'inci gününe kadar azalttığı, bundan sonraki süreçte ise et örneklerinin TPAB sayısının düşük düzeyde de olsa arttığını bildirmiştir. Laktokoksin BZ yüksek konsantrasyonda (1600-2500 AU/g) kullanıldığında depolama süresince TPAB sayısında azalmaya neden olduğu, TPAB sayısını 6,12 log kob/g'dan 2,62 log kob/g'a düşürdüğünü bildirmişlerdir.

*Lactobacillus sakei* CTC 372 ile *Lactobacillus* CTC 711 (Djenane vd. (2005), *Lactobacillus carnis* MXVK76 ile *Lactobacillus pentosus* LP1-31035 (Signorini vd., 2006), *Lactobacillus curvatus* CRL705 (Castellano vd., 2010) taze etlerde psikrofil bozulma etmeni *Pseudomonas* spp. ve *Brochothrix thermosphacta*'nın gelişimini geciktirdiği ve kontrol örneği ile kıyaslandığında bu örneklerde her iki bakterinin gelişimlerini kontrol altına aldığı belirlenmiştir. Ayrıca *Lactobacillus carnis* MXVK76 ile *Lactobacillus pentosus* LP1-31035'in toplam aerobik bakteri gelişimini de kontrol altına aldığı bildirilmiştir (Signorini vd., 2006). *Lactobacillus acidophilus* koruyucu kültür olarak kullanıldığında et örneklerin toplam canlı bakteri sayısında azalmaya ve etin raf ömrünü kontrol örneğine 3 gün iyileştirdiği belirtilmiştir (Amin, 2012). *Lactobacillus acidophilus* içeren et örneklerinde toplam aerobik bakteri sayısının depolamanın 3'üncü gününde 9,67 log kob/g'a ulaştığı saptanmıştır.

#### **4.3. Taze Etin Toplam Koliform Bakteri İçeriği Üzerine *L. lactis* spp. *lactis* BZ'nin Etkisi**

Araştırmada kullanılan taze etin toplam koliform bakteri içeriğinin depolamanın 0'ıncı günü <10 kob/g'ın altında olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4.). Depolamanın 1'inci gününden itibaren kontrol örneğinde toplam koliform sayısının belirlenebilecek seviyeye çıktığı (2,53 log kob/g) ve depolama süresince de sayısının arttığı belirlenmiştir. Depolamanın 12'nci gününde sayısının 8,62 log kob/g'a ulaştığı bulunmuştur. Buzdolabında depolamanın 1'inci gününden itibaren kontrol örneğinin toplam koliform sayısında görülen artışları istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir (P<0,05). Sadece depolamanın 4'üncü ile 5'inci haftaları arasında gerçekleşen artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir (P>0,05). *L. lactis* spp. *lactis* BZ katılan et örneklerinde depolamanın 0'ıncı ile 7'inci günleri arasında belirlenemeyecek (<10

kob/g) seviyede olduğu, ancak depolamanın 9'uncü gününde 2,42 log kob/g, 12'nci gününde ise 2,73 log kob/g'a çıktığı tespit edilmiştir (Şekil 4.4.). Depolamanın 9 ile



**Şekil 4.4.** *L. lactis* spp. *lactis* BZ'nin taze etin toplam koliform bakteri içeriği üzerine etkisi. K, kontrol; Lc, *L. lactis* spp. *lactis* BZ

12'nci haftaları arasında koruyucu kültür içeren et örneklerinde toplam koliform sayısında görülen artışın istatistiksel olarak önemli ( $P<0,05$ ) olduğu bulunmuştur. Kontrol örneği ile *L. lactis* spp. *lactis* BZ içeren et örnekleri karşılaştırıldığında *L. lactis* spp. *lactis* BZ'nin taze et örneklerinde toplam koliform bakteri gelişimini çok etkili bir şekilde kontrol altına aldığı ve böylece etin güvenliği ile raf ömrünü iyileştirdiği belirlenmiştir.

Battal (2012) *L. lactis* spp. *lactis* BZ tarafından üretilen laktokoksin BZ başlangıç toplam koliform sayısı  $1,90 \times 10^4$  kob/g olan taze sığır etine 200-2500 AU/g uygulandığında koliform bakteri içeriğinde depolama süresince önemli düzeyde azalmaya neden olduğunu bildirmiştir. Laktokoksin BZ yüksek düzeyde (800, 1600 ve 2500 AU/g) ete uygulandığında konsantrasyona bağlı olarak depolamanın 8'inci ve 4'üncü gününde belirlenemeyecek seviyenin altına düşürdüğünü bulmuşlardır.

Castellano vd. (2010) taze ete  $10^6$  kob/g düzeyinde biyokoruyucu olarak bakteriyosin üreten *Lactobacillus curvatus* CRL705 kullanıldığında etin toplam koliform bakteri içeriği üzerine önemli bir inhibitör etki göstermediğini bildirmişlerdir. Depolama işleminin sonunda (60 gün) kontrol ve *Lactobacillus curvatus* CRL705 içeren et örneklerinde koliform bakteri sayısının sırasıyla 4,68 ile 4,50 log kob/g olduğunu rapor etmişlerdir.

*Lactobacillus acidophilus* ( $10^7$  kob/g) taze sığır etine uygulandığında Enterobacteriaceae ve toplam koliform bakteri içeriği üzerine inhibitör etki yarattığı ve dolayısıyla et örneklerinin Enterobacteriaceae ve toplam koliform sayılarının depolama süresince azaldığı belirtilmiştir (Amin, 2012).

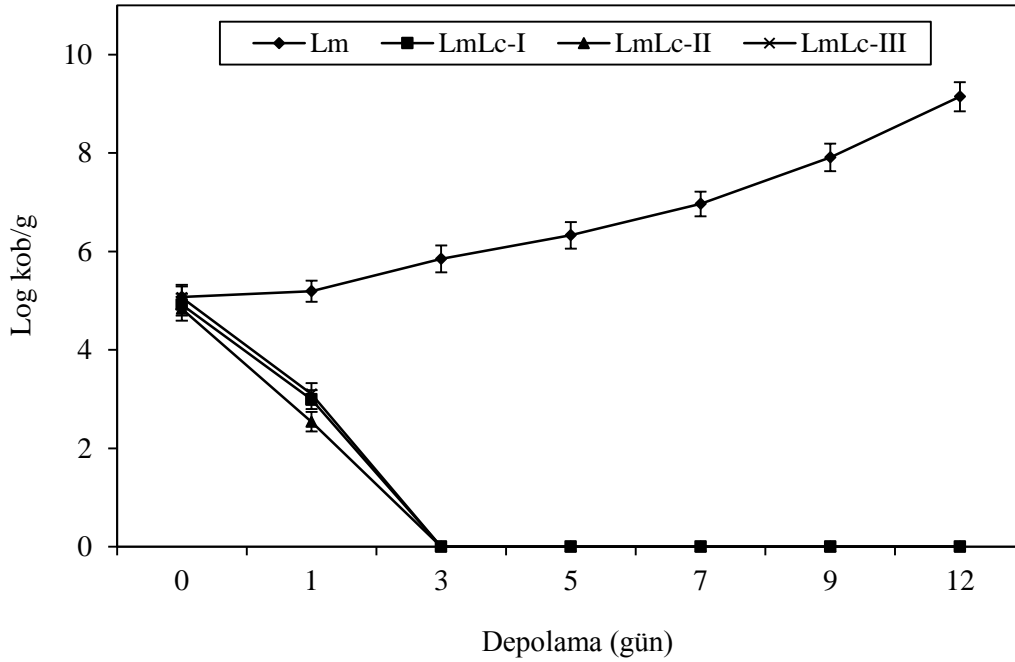
#### **4.4. *L. lactis* spp. *lactis* BZ'nin Taze Ette Gıda Kaynaklı Patojen Bakterilerin Gelişimi Üzerine Etkisi**

Çalışmada sığır eti endüstrisinde en çok sorun teşkil eden patojen bakterilerden *L. monocytogenes* ile *E. coli* O157:H7 kullanılmıştır. Taze sığır etinde *L. monocytogenes* veya *E. coli* O157:H7'in gelişimi ve/veya canlılığı üzerine *L. lactis* spp. *lactis* BZ'nin inhibitör etkisini ortaya koymak için 3 farklı deneme planı kurulmuştur. Kontaminasyon esnasında, kontaminasyondan önce ve kontaminasyondan sonra inhibitör etkisini belirlemek için 1'inci grup et örnekleri *L. lactis* spp. *lactis* BZ ve *Listeria monocytogenes* veya *E. coli* O157:H7 ile aynı anda, 2'nci grup et örnekleri *L. lactis* spp. *lactis* BZ ile inokule edilip buzdolabında 24 saat bekletildikten sonra *L. monocytogenes* veya *E. coli* O157:H7, 3'ncü grup et örnekleri *L. monocytogenes* veya *E. coli* O157:H7 ( $10^4$  kob/g) ile kontamine edilip buzdolabında 24 saat bekletildikten sonra *L. lactis* spp. *lactis* BZ ile muamele edilmiştir.

##### **4.4.1. *L. lactis* spp. *lactis* BZ'nin Taze Ette *L. monocytogenes*'in Gelişimi Üzerine Etkisi**

Yapılan çalışma sonucunda *L. lactis* spp. *lactis* BZ aynı anda *L. monocytogenes* veya kontaminasyondan önce ete inoküle edildiği zaman kontaminasyondan sonra ilave edilmesine göre inhibitör etkisinin daha iyi olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5). *L. lactis* spp. *lactis* BZ aynı anda *L. monocytogenes* veya *L. monocytogenes* katımından 24 saat

önce ete uygulandığında listeria sayısını sırasıyla depolamanın 0'ıncı gününde 5,08 log kob/g'dan 4,92 (0,16 log'luk azalma) ve 4,84 (0,24 log'luk azalma) log kob/g'a, 1'inci gününde ise 2,99 (2,18 log'luk azalma) ve 2,54 (2,54 log'luk azalma) log kob/g'a düşürdüğü belirlenmiştir. *L. lactis* spp. *lactis* BZ, *L. monocytogenes* katımından 24 saat sonra ete uygulandığında depolamanın 0 ve 1'inci günlerinde listeria sayısının sırasıyla



**Şekil 4.5.** *L. lactis* spp. *lactis* BZ'nin taze ette *L. monocytogenes* gelişimi üzerine etkisi. K, kontrol; Lc, *L. lactis* spp. *lactis* BZ. K: Kontrol; Lc: *L. lactis* spp. *lactis* BZ; Lm: *L. monocytogenes*; EcLc-I: *L. lactis* spp. *lactis* BZ ve *L. monocytogenes*'in aynı anda ilave edildiği et örneği; EcLc-II: *L. lactis* spp. *lactis* BZ inokulasyonundan 24 saat sonra *L. monocytogenes*'in ilave edilen et örneği; EcLc-III: *L. lactis* spp. *lactis* BZ inokulasyonundan 24 saat önce *L. monocytogenes*'in ilave edilen et örneği.

5,06 (0,02 log'luk azalma) ve 3,11 (1,97 log'luk azalma) log kob/g'a azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.5). Her üç uygulamada da listeria sayısının depolamanın 3'ncü gününden itibaren sayılamayacak seviyenin altına düştüğü ve bu durumun depolama işleminin sonuna kadar devam ettiği tespit edilmiştir. Depolamanın 0'ıncı günlerinde listeria sayısında gözlenen azalmanın istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P>0,05$ ), depolamanın 1 ve 3'üncü günlerinde gözlenen azalmanın önemli olduğu bulunmuştur ( $P<0,05$ ). Kontrol et örneklerinde ise depolama süresince *L. monocytogenes* sayısının arttığı ve canlı listeria hücre sayısında gözlenen bu artışların istatistiksel olarak önemli

olduğu bulunmuştur ( $P < 0,05$ ). Kontrol et örneğinde 12 günlük depolama işleminin sonunda *L. monocytogenes* sayısının 5,10 log kob/g'dan 9,15 log kob/g'a ulaştığı belirlenmiştir.

Battal (2012) *L. lactis* spp. *lactis* BZ tarafından sentezlenen laktokoksin BZ (400-3200 AU/g), *L. monocytogenes* ile kontamine edilmiş (4,71 ve 7,92 log kob/g) taze sığır etine uygulandığında ete tutunmuş ve tutunma aşamasında olan listeria hücre sayısında önemli bir azalmaya neden olduğunu bulmuştur. Laktokoksin BZ 4,71 ve 7,92 log kob/g düzeyinde *L. monocytogenes* ile kontamine edilmiş et rneklarine 1600 AU/g konsantrasyonda ilave edildiğinde uygulamanın ilk 30 dakikası içerisinde listeria sayısında sırasıyla 4,71 ve 4,39 log azalmaya neden olduğunu belirlemiştir. Tutunma aşamasında olan listeria sayısında ise aynı konsantrasyonda *L. monocytogenes*'i 5,0 log kob/g içeren et örneklerinde uygulamanın 10'uncu dakikasında belirlenemeyecek seviyeye indirdiği, 7,99 log kob/g içeren örnekte ise 4,96 log'luk azalmaya neden olduğunu saptamıştır. Ayrıca laktokoksin BZ'nin yağsız, yarım yağlı ve tam yağlı UHT sütlerde *L. monocytogenes*'e karşı kuvvetli antilisterial aktivite gösterdiği de belirlenmiştir (ncl, 2010)

Bakteriyosin reticisi olmayan *Lactobacillus sakei*, *L. monocytogenes* ile kontamine edilmiş dilimlenmiş jambon ve sosise uygulandığında söz konusu patojen bakterinin gelişimini kontrol altına aldığı bildirilmiştir (Bredholt vd., 1999; 2001). Bakteriyosin (sakasin P) reticisi *Lactobacillus sakei* Lb790 (yaklaşık  $10^4$  kob/g) *L. monocytogenes* (yaklaşık  $10^2$  kob/g) ile kontamine edilmiş ete uygulandığında patojen bakterinin gelişimini durdurduğu belirlenmiştir (Katla vd., 2002). Başka bir çalışmada biyokoruyucu olarak *Leuconostoc carnosum* ( $6,3 \times 10^6$  kob/g), *L. monocytogenes* ( $10^4$  kob/g) ile kontamine edilmiş sosis rneklarine uygulandığında listeria sayısının depolamanın başında azalmaya başladığı ve depolamanın 21. gününde 10 kob/g'ın altına düştüğü belirtilmiştir (Budde vd., 2003). Sosisle yapılan başka bir araştırmada *Leuconostoc carnosum* 4010'un sosis hamurunda gelişerek leukosin ürettiği ve buna bağlı olarak *L. monocytogenes* ( $10^4$  kob/g)'in gelişimini etkili bir şekilde önlediği belirtilmiştir (Jacobsen vd., 2003). Castellano vd. (2004), *Lactobacillus casei* CRL705'in depolama süresince bakteriyosin ürettiği ve *Listeria innocua*'nın gelişimini bakteriyostatik etki göstererek durdurduğunu saptamışlardır. *Enterococcus faecium*

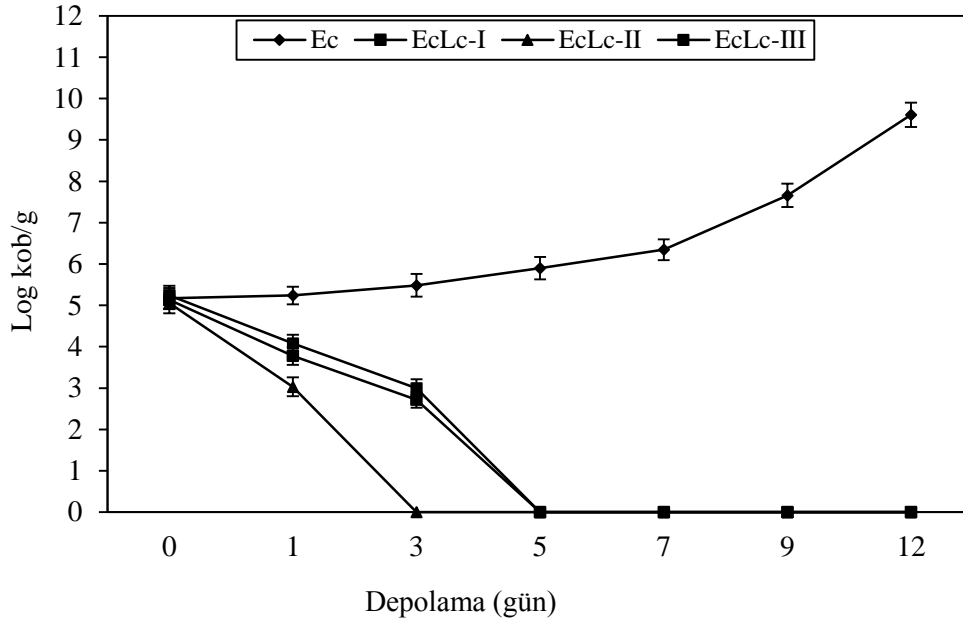
PCD71 (7,3 log kob/g) ve *Lactobacillus fermentum* ACA-DC179 (6,9 log kob/g)'un çiğ tavuk etinde *L. monocytogenes* (5,0 log cfu/g) ve *Salmonella* Enteritidis (5,0 log cfu/g)'in gelişimini etkili bir şekilde önlediği bulunmuştur (Maragkoudakis vd., 2009). Sparo vd. (2013) yaptıkları çalışmada bakteriyosin üreticisi *Enterococcus faecalis* CECT7121 ( $10^4$  kob/g)'in *L. monocytogenes* ( $10^5$  kob/g)'e karşı kuvvetli antilisterial aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar *Enterococcus faecalis* CECT7121'in *L. monocytogenes* ile aynı anda veya 24 saat önce veya sonra ilave edilmesi durumlarında listeria sayısını depolamanın 24'üncü saatinden itibaren belirlenemeyecek seviyeye indiğini belirlenmişlerdir.

Sakasin P üreticisi *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28wt ( $10^3$  kob/g) ile pediosin AcH üreticisi *Pediococcus acidilactici* H ( $10^3$  kob/g)'nin çiğ domuz etinde *L. monocytogenes* ( $10^2$  kob/g) sayısını depolamanın 1'inci ve 2'nci haftasında belirlenemeyecek seviyenin altına düşürdüğü, ancak depolamanın 6'ncı haftasından itibaren listeria sayısının çok yavaş da olsa artmaya başladığı ifade edilmiştir (Kouakou vd., 2010).

#### **4.4.2. *L. lactis* spp. *lactis* BZ'nin Taze Ette *E. coli* O157:H7'nin Gelişimi Üzerine Etkisi**

*L. lactis* spp. *lactis* BZ aynı anda *E. coli* O157:H7 veya patojen bakteri kontaminasyonundan önce ete inoküle edildiği zaman kontaminasyondan sonra ilave edilmesine göre antibakteriyal aktivitesinin biraz daha iyi olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.6). *L. lactis* spp. *lactis* BZ, *E. coli* O157:H7 ile birlikte veya *E. coli* O157:H7 katımından 24 saat önce ete uygulandığında *E. coli* O157:H7 sayısını depolamanın 1'inci gününde sırasıyla 5,17 log kob/g'dan 3,78 (1,39 log'luk azalma) ve 3,03 (2,14 log'luk azalma) log kob/g'a, 3'üncü gününde ise 2,72 log kob/g (2,45 log'luk azalma) ve sayılamayacak seviyenin altına (yaklaşık 5 log'luk azalma) düşürdüğü belirlenmiştir. *L. lactis* spp. *lactis* BZ, *E. coli* O157:H7 ilavesinden 24 saat sonra ete uygulandığında depolamanın 1 ve 3'üncü günlerinde bakteri sayısının sırasıyla 4,08 (1,09 log'luk azalma) ve 2,99 (2,18 log'luk azalma) log kob/g'a azaldığı saptanmıştır. *L. lactis* spp. *lactis* BZ, *E. coli* O157:H7 kontaminasyonundan önce ete inoküle edildiğinde depolama işleminin 3'üncü, aynı anda veya kontaminasyondan sonra katılan et örneklerinde ise depolamanın 5'inci gününden itibaren *E. coli* sayısını tespit edilemeyecek seviyenin altına düşürdüğü ve bu durumun depolama işleminin sonuna kadar devam ettiği tespit

edilmiştir. Depolamanın 0'ıncı günlerinde *E. coli* O157:H7 sayısında gözlenen azalmanın istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P>0,05$ ), depolamanın 1 ve 3'üncü günlerinde gözlenen azalmanın önemli olduğu bulunmuştur ( $P<0,05$ ). *L. lactis* spp. *lactis* BZ içermeyen kontrol et örneklerinde buzdolabı koşullarında gerçekleştirilen depolama periyodunca *E. coli* O157:H7 sayısının arttığı ve hücre sayısında gözlenen bu artışların istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ( $P<0,05$ ). Kontrol et örneğinde 12



**Şekil 4.6.** *L. lactis* spp. *lactis* BZ'nin taze ette *E. coli* O157:H7'nin gelişimi üzerine etkisi. K: Kontrol; Lc: *L. lactis* spp. *lactis* BZ; Ec: *E. coli* O157:H7; EcLc-I: *L. lactis* spp. *lactis* BZ ve *E. coli* O157:H7'nin aynı anda ilave edildiği et örneği; EcLc-II: *L. lactis* spp. *lactis* BZ inokulasyonundan 24 saat sonra *E. coli* O157:H7'nin ilave edilen et örneği; EcLc-III: *L. lactis* spp. *lactis* BZ inokulasyonundan 24 saat önce *E. coli* O157:H7'nin ilave edilen et örneği.

günlük depolama işleminin sonunda *E. coli* O157:H7 sayısının 5,17 log kob/g'dan 9,61 log kob/g'a ulaştığı belirlenmiştir (Şekil 4.6).

Bredholt vd., (1999) bakteriyosin üretmeyen *Lactobacillus sakei* jambon ve sosis üretiminde koruyucu kültür olarak kullanıldığında *E. coli* O157:H7'nin gelişimini inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada bakteriyosin üreticisi *E. faecalis* CECT7121 ( $10^4$  kob/g) ve *E. coli* O157:H7 ( $10^5$  kob/g) aynı anda ete ilave edildiklerinde depolamanın 72. saatinden sonra *E. coli* O157:H7 sayısının

belirlenemeyecek seviyenin altına düştüğü bildirilmiştir. *Enterococcus faecalis* CECT7121 inokülasyonundan 24 saat önce veya sonra *E. coli* O157:H7 katılan et örneklerinde patojen bakteri sayısının depolamanın 24 ve 48'inci saatlerinde tespit edilemeyecek düzeye indiği belirtilmiştir (Sparo vd., 2013). Her iki çalışmada da koruyucu kültür içermeyen kontrol et örneklerinde buzdolabında gerçekleştirilen depolama işlemi süresince *E. coli* O157:H7'nin geliştiği belirtilmiştir.

#### **4.5. *L. lactis* spp. *lactis* BZ'nin Taze Etin pH Değeri Üzerine Etkisi**

pH değeri gıdaların raf ömrünü belirleyen mikrobiyal gelişim üzerinde önemli rol oynayan faktörlerden birisidir. Et örneklerinin pH değeri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Tablodan da görüldüğü üzere kontrol örneğinin pH değerinin 12 günlük depolama süresince artışı belirlenmiştir. Depolamanın 0 ile 3'üncü günleri arasında pH değerinde gözlenen artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P>0,05$ ), 4'üncü haftasından itibaren

pH değerinde görülen artışın istatistiksel olarak önemli olduğu ( $P<0,05$ ) belirlenmiştir. Koruyucu kültür olarak *L. lactis* spp. *lactis* BZ'nin ette kullanılması durumunda et örneklerinin pH değerlerinin çok düşük düzeyde arttığı, hatta sabit kaldığı gözlenmiştir ( $P>0,05$ ). Depolama işleminin sonunda kontrol örneğinin pH değeri 5,70'den 6,25'e, *L. lactis* spp. *lactis* BZ içeren et örneklerinde ise 5,63'ten 5,71'e çıktığı saptanmıştır. Koruyucu kültür içeren et örneklerinde pH değerinin sabit kalmasının nedeni *L. lactis* spp. *lactis* BZ ette bulunan bozulma etmeni ve patojen mikroorganizmaların gelişimlerini önlemesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca söz konusu bu örneklerde pH değerinin düşmemesinin nedeni de *L. lactis* spp. *lactis* BZ'nin organik asit oluşturma yeteneğinin zayıf olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Sadece *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 içeren et örnekleri ile koruyucu kültür ile patojen bakterilerin aynı anda ve patojen kültür ilavesinden 24 saat sonra koruyucu kültür içeren et örneklerinin kontrol örneğine benzer şekilde depolama süresince pH değerlerinin arttığı, *L. lactis* spp. *lactis* BZ ilavesinden 24 saat sonra patojen bakteri katılan et örneklerinin pH değerlerinin ise sadece koruyucu kültür içeren et örneklerine benzer bir davranış sergilediği belirlenmiştir. Et ürünlerinde pH değerindeki artış, düşük sıcaklıklarda gerçekleşen biyokimyasal değişimler sonucu bazik karakterli uçucu azotlu

bileşiklerin oluşmasına ve mikrobiyal yüke bağlı olarak protein hidroliziyle açığa çıkan alkil gruplarına atfedilmektedir (Ibrahim ve Desouky, 2009; Hathout-Amal ve Aly-Soher, 2010; Amin, 2012).

Bakteriyosin üreticisi *Lactobacillus casei* CRL705 ete koruyucu kültür olarak uygulandığında et örneklerinin pH değerinde önemli bir değişime neden olmadığı belirlenmiştir. Koruyucu kültür içeren et örneğinde pH değerinin depolamanın sonunda 5,45'den 5,06'ya, kontrol örneğin pH değerinin ise 5,39'dan 5,25'e düştüğü ifade edilmiştir (Castellano vd., 2004).

**Çizelge 4.1.** Et örneklerinin pH değerleri

Örnekler	Depolama Süresi (Gün)						
	0	1	3	5	7	9	12
K	5,70±0,03	5,70±0,05	5,73±0,03	5,74±0,01	5,77±0,03	5,96±0,06	6,25±0,03
Lc	5,63±0,04	5,63±0,05	5,64±0,02	5,65±0,03	5,66±0,04	5,69±0,03	5,71±0,04
Lm	5,62±0,02	5,64±0,01	5,67±0,01	5,73±0,08	5,80±0,06	5,92±0,07	6,12±0,17
LmLc-I	5,61±0,02	5,62±0,01	5,65±0,02	5,67±0,02	5,71±0,04	5,76±0,07	5,87±0,08
LmLc-II	5,62±0,01	5,63±0,01	5,63±0,01	5,69±0,04	5,74±0,05	5,76±0,06	5,80±0,02
LmLc-III	5,61±0,01	5,62±0,01	5,62±0,05	5,66±0,02	5,73±0,01	5,79±0,04	5,98±0,02
Ec	5,67±0,05	5,72±0,04	5,75±0,10	5,79±0,09	5,84±0,08	6,00±0,07	6,18±0,06
EcLc-I	5,61±0,01	5,62±0,01	5,66±0,01	5,71±0,02	5,74±0,01	5,85±0,01	6,16±0,03
EcLc-II	5,62±0,02	5,62±0,06	5,63±0,01	5,65±0,05	5,66±0,03	5,68±0,04	5,73±0,09
EcLc-III	5,62±0,02	5,65±0,03	5,69±0,02	5,76±0,04	5,82±0,01	5,95±0,07	6,21±0,05

K: Kontrol; Lc: *L. lactis* spp. *lactis* BZ; Lm: *L. monocytogenes*; Ec: *E. coli* O157:H7; I: *L. lactis* spp. *lactis* BZ ve patojenlerin aynı anda ilave edildiği et örneği; II: *L. lactis* spp. *lactis* BZ inokulasyonundan 24 saat sonra patojenlerin ilave edilen et örneği; III: *L. lactis* spp. *lactis* BZ inokulasyonundan 24 saat önce patojenlerin ilave edilen et örneği.

Biyokoruyucu olarak *Lactobacillus carnis* MXVK76, *Lactobacillus pentosus* LP1-31035 uygulanan vakum paketlenmiş et örneklerinde depolamanın ilk 2 gününde pH değerinde 0,6 ünitelik azalma, bundan sonraki günlerde ise örneklerin pH'sında artış olduğu belirtilmiştir (Signorini vd., 2006). Castellano vd. (2010) yaptıkları bir çalışmada bakteriyosin üreticisi *Lactobacillus curvatus* CRL705 uygulanan et örneklerinin pH değerlerinin depolama sürecinde 5,55'ten 5,45'e düştüğünü, kontrol örneğinin pH değerinin ise 5,55'ten 5,60'a yükseldiğini saptamışlardır.

Nisin (200 ppm nisaplin) ve *Lactobacillus acidophilus* ( $10^7$  kob/g) ayrı ayrı ve birlikte taze sığır etine uygulandığı bir çalışmada, bütün et örneklerinin pH değerlerinin depolama süresince arttığı belirlenmiştir (Amin, 2012). Ancak, nisin, *Lactobacillus acidophilus* ve nisin+*Lactobacillus acidophilus* içeren et örneklerini pH değerlerinde görülen artışın daha düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir. Kontrol örneğinin pH değerinin 5,82'den depolamanın 2'nci gününde 6,92'ye, *Lactobacillus acidophilus* içeren örnekte depolamanın 3'üncü gününde 7,01'e, nisin+*Lactobacillus acidophilus* içeren örnekte ise depolamanın 5'inci gününde 6,94'e ulaştığı saptanmıştır.

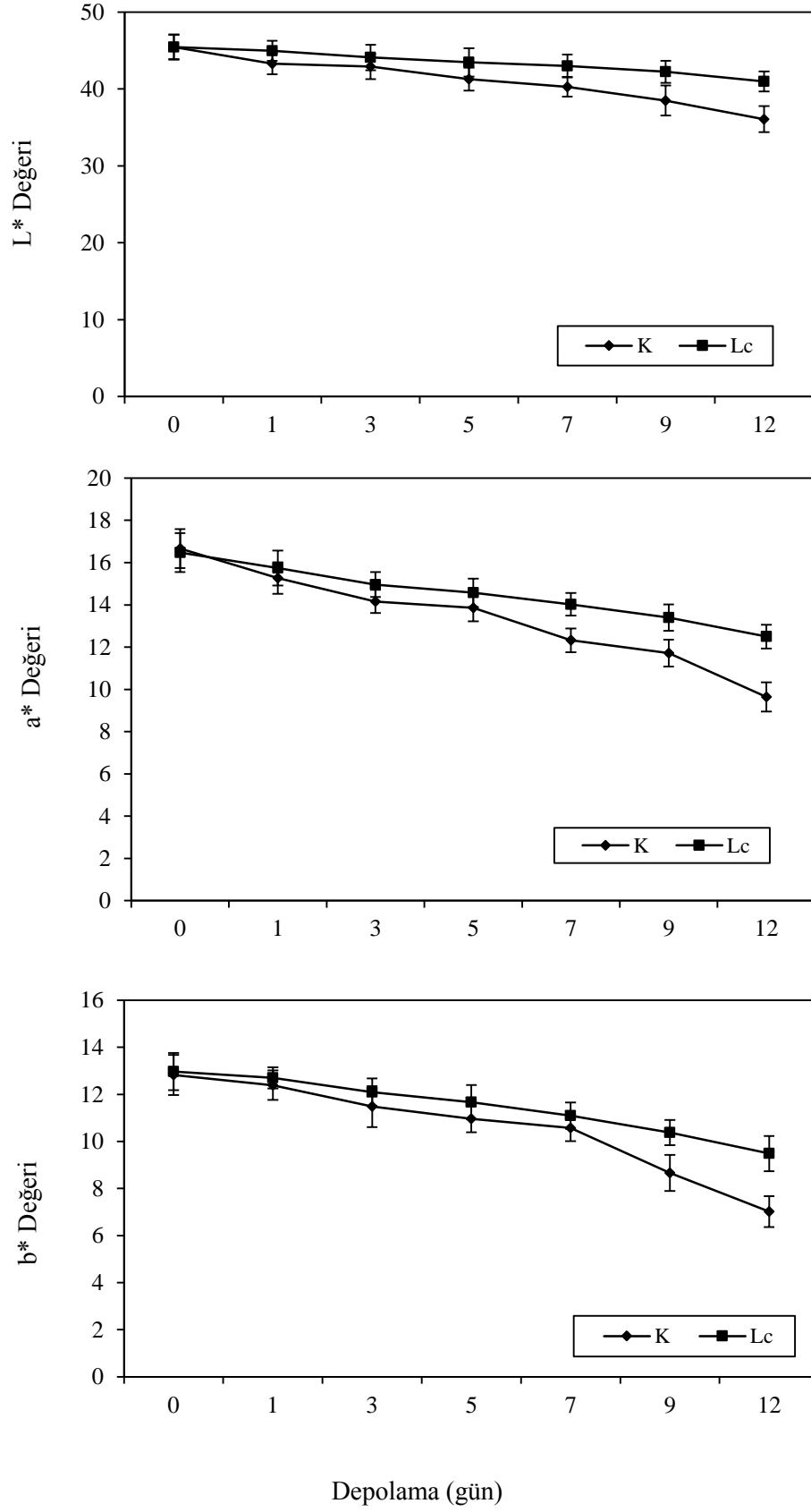
Bakteriyosinjenik *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28wt ile *Pediococcus acidilactici* H bakterilerini tek başlarına ve kombine şekilde biyokoruyucu olarak ete uygulandıklarında örneklerin pH değerlerinin depolamanın 3'ncü haftasına kadar azaldığı ve bundan sonraki süreçte yeniden arttığı belirlenmiştir. Depolamanın sonunda sadece *Lactobacillus curvatus* veya *Pediococcus acidilactici* veya her iki bakteriyi içeren et örneklerin pH değerlerinin 6,1, 5,9 ve 5,7'ye ulaştığı bildirilmiştir (Kouakou vd., 2010).

#### **4.6. *L. lactis* spp. *lactis* BZ'nin Taze Etin Rengi Üzerine Etkisi**

Etin rengi, etin albenisinde ve dolayısıyla tüketici beğenisinde önemli rol oynayan kriterlerden birisidir. Et renginin yoğunluğu miyoglobulin içeriğine bağlıdır. Ette gözlenen farklı renkler oksimiyoglobulin (açık kırmızı), miyoglobulin (koyu kırmızı) ve metmiyoglobulinin (gri-kahverengi) bağıl oranlarıyla ilişkilidir (Mancini ve Hunt, 2005).

*L. lactis* spp. *lactis* BZ içeren ve içermeyen et örneklerinin renk değerleri ( $L^*$ ,  $a^*$  ve  $b^*$ ) Şekil 4.7'de sunulmuştur. Şekilde de görüldüğü üzere kontrol ve bakteriyosinjenik bakteri içeren et örneklerinin  $L^*$  değerlerinin depolama süresince azaldığı ( $P < 0,05$ ), ancak bu azalmanın *L. lactis* spp. *lactis* BZ içeren et örneğinde daha düşük düzeyde olduğu ( $P > 0,05$ ) gözlenmiştir. Depolama işleminin sonunda kontrol örneğinin  $L^*$  değeri 45,46'dan 36,08'e, *L. lactis* spp. *lactis* BZ içeren et örneğinde ise 45,46'dan 40,96'ya düştüğü belirlenmiştir. Örnekler  $a^*$  ve  $b^*$  değerleri açısından incelendiğinde,  $L^*$  değerinde olduğu gibi her iki örnekte depolama süresince  $a^*$  ve  $b^*$  değerinin azaldığı bulunmuştur (Şekil 4.7). Fakat kontrol örneğine göre *L. lactis* spp. *lactis* BZ uygulanan

et örneğinde görülen azalmanın daha düşük düzeyde olduğu saptanmıştır. Kontrol örneğinin depolama periyodunun sonunda a\* değeri 16,67'den 9,64'e, *L. lactis* spp. *lactis* BZ'li örnekte ise 16,45'den 12,50'ye düştüğü tespit edilmiştir. Kontrol örneğinin 0-1, 4-5 ve 6-7'nci günleri arasında görülen farkın istatistiksel olarak önemli olduğu ( $P<0,05$ ), 2-3, 3-4 ve 5-6'ncı günleri arasında görülen farkın önemli olmadığı ( $P>0,05$ ) belirlenmiştir. *L. lactis* spp. *lactis* BZ uygulanan örneklerin a\* değerinde görülen azalmanın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır. Örneklerin b\* değerinin de 12 günlük depolama işlemi sonunda azaldığı belirlenmiştir. Kontrol örneğinin b\* değeri 12,82'den 7,02'ye, *L. lactis* spp. *lactis* BZ içeren örnekte ise 12,97'den 9,49'a düştüğü



Şekil 4.7. Et örneklerinin L\*, a\* ve b\* değerleri. K, kontrol; Lc: *L. lactis* spp. *lactis* BZ.

belirlenmiştir (Şekil 4.7). Kontrol örneğinin  $b^*$  değerinde depolama süresince görülen farklılığın istatistiksel olarak önemli ( $P < 0,05$ ), *L. lactis* spp. *lactis* BZ ile muamele edilen et örneklerinde ise önemsiz ( $P > 0,05$ ) olduğu bulunmuştur.

Castellano vd. (2011) de biyokoruyucu olarak *Lactobacillus curvatus* CRL705 ve *Lactococcus lactis* CRL1109 uygulanan köfte örneklerinin  $L^*$ ,  $a^*$  ve  $b^*$  değerlerinde buzdolabı sıcaklığında depolamanın 6'ncı gününe önemli bir değişimin olmadığını bildirmişlerdir.

## BÖLÜM V

### SONUÇLAR

Bu çalışmada *L. lactis* spp. *lactis* BZ'nin koruyucu kültür olarak et endüstrisinde kullanım olanağını ortaya koymak amacıyla taze sığır etinin mikrobiyolojik ve duyu kalitesi ile patojen bakterilerden *L. monocytogenes* ile *E. coli* O157:H7 üzerine antagonistik etkileri incelenmiştir. Araştırmada elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- a) *L. lactis* spp. *lactis* BZ 8,01 log kob/g düzeyinde taze sığır etine inoküle edildiğinde buzdolabı koşullarında geliştiği ve bakteriyosini olan laktokoksin BZ'yi depolama süresince ürettiği belirlenmiştir.
- b) Başlangıç toplam psikrofil aerobik bakteri içeriği 3,14 log kob/g olan taze ete *L. lactis* spp. *lactis* BZ uygulandığında depolamanın 0'ıncı ve 1'inci günlerinde belirlenemeyecek (<10 kob/g) düzeye indirdiği, ancak depolamanın 3'üncü gününde TPAB sayısının arttığı ve muhafazanın 12'nci gününde 4,87 log kob/g'a ulaştığı bulunmuştur. Kontrol örneği ile karşılaştırıldığında bu artışın düşük düzeyde olduğu görülmüştür. Kontrol örneğinde TPAB sayısının depolama işleminin sonunda 9,33 log kob/g'a ulaştığı tespit edilmiştir.
- c) Koruyucu kültür olarak *L. lactis* spp. *lactis* BZ ile muamele edilen et örneklerinde toplam koliform sayısının muhafazanın 0 ile 7'inci günleri arasında belirlenemeyecek (<10 kob/g) düzeyde olduğu, ancak depolamanın 9'uncu gününden itibaren artmaya başladığı ve depolamanın 12'nci gününde 2,73 log kob/g'a çıktığı tespit edilmiştir. Buzdolabında muhafaza sırasında kontrol örneğinin toplam koliform sayısının <1 log kob/g'dan 8,62 log kob/g'a arttığı bulunmuştur.
- d) *L. lactis* spp. *lactis* BZ aynı anda *Listeria monocytogenes* veya listeria kontaminasyonundan 24 saat önce ete inoküle edildiğinde antilisterial aktivitesinin daha iyi olduğu belirlenmiştir. *L. lactis* spp. *lactis* BZ aynı anda, *L. monocytogenes* veya *L. monocytogenes* katımından 24 saat önce veya sonra ete uygulandığında depolamanın 1'inci gününde sırasıyla 2,18, 2,54 ve 1,97 log'luk azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Her üç uygulamada da listeria sayısının muhafazanın 3'üncü gününden itibaren sayılamayacak düzeyin altına düştüğü ve bu durumun depolama işleminin sonuna kadar devam ettiği gözlenmiştir.

- e) *L. lactis* spp. *lactis* BZ, *E. coli* O157:H7 ile birlikte veya *E. coli* O157:H7 katımından 24 saat önce veya sonra ete inokule edildiğinde buzdolabında muhafazanın 1'inci gününde *E. coli* sayısında sırasıyla 1,39, 2,14 ve 1,09 log, 3'üncü gününde ise 2,45, 5,0 ve 2,18 log'luk azalmaya neden olduğu bulunmuştur. *E. coli* kontaminasyonundan önce *L. lactis* spp. *lactis* BZ uygulanan et örneklerinde *E. coli* sayısı depolama işleminin 3'üncü gününden, aynı anda veya kontaminasyondan sonra katılan et örneklerinde depolamanın 5'inci gününden itibaren sayılamayacak seviyenin altına düştüğü ve bu durumun depolama işleminin sonuna kadar devam ettiği tespit edilmiştir.
- f) Buzdolabında 12 günlük muhafaza işlemi sırasında *L. lactis* spp. *lactis* BZ ile muamele edilen veya edilmeyen bütün et örneklerinde pH değerinin arttığı, ancak *L. lactis* spp. *lactis* BZ içeren et örneklerinde bu artışın daha düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir.
- g) Bakteriyosinjenik *L. lactis* spp. *lactis* BZ ile muamele edilen et örneği ile muamele edilmeyen kontrol et örneğinde L\*, a\* ve b\* değerlerinin depolama işlemi süresince azaldığı, ancak *L. lactis* spp. *lactis* BZ içeren et örneğinde L\*, a\* ve b\* değerlerinde görülen azalmanın biraz daha düşük düzeyde olduğu saptanmıştır.

Genel bir değerlendirme yapıldığında, bakteriyosin üreticisi *L. lactis* spp. *lactis* BZ taze sığır etine uygulandığında taze etin mikrobiyolojik kalitesini iyileştirdiği ve depolama ömrünü arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca et endüstrisinde halk sağlığı açısından en önemli problem teşkil eden patojen bakterilerden *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7'ye karşı et ortamında kontaminasyon anında, kontaminasyondan önce ve sonra yüksek düzeyde antibakteriyal aktivite sergilediği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, taze sığır etin mikrobiyolojik kalitesi ve güvenliğini iyileştirmek amacıyla *L. lactis* spp. *lactis* BZ koruyucu kültür olarak kullanım potansiyeline sahip olduğu söylenebilir.

## KAYNAKLAR

- Amenu, D., “Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from “Ergo”, Ethiopian traditional fermented milk”, *Current Research in Microbiology and Biotechnology* 1, 278-284, 2013.
- Amin, R.A., “Effect of biopreservation as a modern technology on quality aspects and microbial safety of minced beef”, *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry* 7, 38-49, 2012.
- Ammor, M.S. and Mayo, B., “Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter culture in dry sausage production; an update”, *Meat Science* 76, 138-146, 2007.
- Anonim, “SPSS for Windows”, Chicago, IL, USA, SPSS Inc., 1999.
- AOAC, Official methods of analysis (17th ed.), *Association of Official Analytical Chemists*, Washington, DC, 2002.
- Aymerich, T., Picouet, P.A. and Monfort, J.M., “Decontamination technologies for meat products”, *Meat Science* 78, 114–129, 2008.
- Battal, S. “Laktokoksin Bz'nin Taze Sığır Etinin Mikrobiyolojik Kalitesi Üzerine Etkisi” Yüksek Lisans Tezi, *G.O.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü*, Tokat, 1-61, 2012.
- Bell, C., “Approach to the control of entero-haemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)”, *International Journal of Food Microbiology* 78, 197- 216, 2002.
- Besser, R. E., Lett, S. M., Weber, J. T., Doyle, M. P., Barret, T. J., Wells, J. G., Wells, J. G., and Griffin, M. P., “An Outbreak of diarrhea and hemolytic üremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in Fresh-Pressed Apple Cider”, *The Journal of the American Medical Association* 269(17), 2217-2220, 1993.
- Bredholt, S., Nesbakken, T. and Holck, A., “Industrial application of an antilisterial strain of *Lactobacillus sakei* as a protective culture and its effect on the sensory

acceptability of cooked, sliced, vacuum-packaged meats”, *International Journal of Food Microbiology* 66, 191- 196, 2001.

Bredholt, S., Nesbakken, T. and Holck, A., “Protective cultures inhibit growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in cooked, sliced, vacuum- and gas-packaged meat”, *International Journal of Food Microbiology* 53, 43- 52, 1999.

Budde, B.B., Hornbaek, T., Jakobsen, J., Barkholt, V. and Koch, A.G., “*Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments ”, *International Journal of Food Microbiology* 83 ,171–184, 2003.

Castellano, P., Belfiore, C. and Vignolo, G., “Combination of bioprotective cultures with EDTA to reduce *Escherichia coli* O157:H7 in frozen ground-beef patties”, *Food Control* 22, 1461- 1465, 2011.

Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S. and Vignolo, G., “A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina”, *Meat Science* 79, 483- 499, 2008.

Castellano, P., Gonzales, C., Carduza, F. and Vignolo, G., “Protective action of *Lactobacillus curvatus* CRL705 on vacuum-packaged raw beef effect on sensory and structural characteristics”, *Meat Science* 85, 394- 401, 2010.

Castellano, P.H., Holzapfel, W.H. and Vignolo, G.M., “The control of *Listeria innocua* and *Lactobacillus sakei* in broth and meat slurry with the bacteriocinogenic strain *Lactobacillus casei* CRL705”, *Food Microbiology* 21, 291- 298, 2004.

Chan, Y. C., Boor, K. J. and Wiedmann, M., “ $\sigma^B$ -Dependent and  $\sigma^B$ -independent mechanisms contribute to transcription of *Listeria monocytogenes* cold stress genes during cold shock and cold growth”, *Applied and Environmental Microbiology* 13, 6019- 6029, 2007.

Chaturangkul, S. and Boor, K. J., “ $\sigma^B$  Activation under environmental and energy stress conditions in *Listeria monocytogenes*”, *Applied and Environmental Microbiology* 72, 5197- 5203, 2006.

Chen, H. and Hoover, D. G., “Bacteriocins and their food applications”, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2, 82- 100, 2003.

Cintas, L.M., Casaus, M. P., Herranz, C., Nes, I.,F. and Hernandez, P. E., “Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria”, *Food Science and Technology International* 7(4), 281–305, 2001.

Cleveland, J., Montville J. T., Nes, I. F. and Chikindas, M. L., “Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation”, *International Journal of Food Microbiology* 71, 1- 20, 2001.

Cotter, P. D., Hill, C. and Ross, P., “Bacteriocins: developing innate immunity for food”, *Nature Reviews Microbiology* 3, 777-788, 2005.

Datta, S., Akteri, A., Shah, I.G., Fatema, K., Islami, T.H., Bandyopadhyay, A., Khan, Z.U.M. and Biswas, D., “Microbiological quality assessment of raw meat and meat products, and antibiotic susceptibility of isolated *Staphylococcus aureus*”, *Agriculture, Food and Analytical Bacteriology* 2(3), 187-194, 2012.

Dave, D. and Ghaly A. E., “Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: A critical review”, *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 6, 486-510, 2011.

De Kwaadstenie T. M., Todorov, S. D., Knoetze, H., Dicks, L.M.T., “Characterization of a 3 944 Dalton bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria”, *International Journal of Food Microbiology* 105, 433–444, 2005.

Devlieghere, F., Vermieren, L. and Deberve, J., “New preservation technologies: possibilities and limitations”, *International Dairy Journal* 14, 273- 285.

Denny, J. and McLauchlin, J., “Human *Listeria monocytogenes* infections in Europe an opportunity for improved European surveillance”, *Euro Surveillance* 13, 8082, 2008.

Djenane, D., Martinez, L., Blanco, D., Yangüela, J., Beltran, J.A. and Rocaes, P., “Effect of lactic acid bacteria on extension of shelf life and growth of *Listeria*

*monocytogenes* in beef steaks stored in CO<sub>2</sub> rich atmosphere”, ***Brazilian Journal of Microbiology*** 36, 405-412, 2005.

Dortu, C. and Thonart, P., “Bacteriocins from lactic acid bacteria: interest for food products biopreservation”, ***Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*** 13, 143- 154, 2009.

Doulgeraki, A.I., Ercolini, D., Villani, F. and Nychas, G.J., “Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions”, ***International Journal of Food Microbiology*** 157, 130- 141, 2012.

Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L.M. and Prevost, H., “The continuing story of class IIa bacteriocins”, ***Microbiology and Molecular Biology Reviews*** 70, 564-582, 2006.

Florentini, M.A., Ernani, S.S., Porto, A.C.S., Jaciara Z.M. and Franco, B.D.G.M., “Influence of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* BN in the shelf-life of refrigerated bovine meat”, ***Brazilian Journal of Microbiology*** 32, 42-46, 2001.

Fung, D.Y., “Microbial hazards in food: food-borne infections and intoxications”, In: Handbook of Meat Processing, Ed. Fiedel Toldra, ***Blackwell Publishing***, 2010.

Ghraiiri, T., Frere, J., Berjeaud, J.M., Manai, M., “Lactococcin MMT24, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* isolated from *rigouta* cheese”, ***International Journal of Food Microbiology*** 105, 389-398, 2005.

Hathout-Amal, S. and Aly-Soher, E., “Role of lactic acid bacteria as a biopreservative agent of Talbina”, ***Journal of American Science***, 6, 889-898, 2010.

Hill, C., McAuliffe, O. and Ross, R.P., “Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lactacin 3147-producing starter culture”, ***Journal of Applied Microbiology*** 86, 251-256, 1999.

Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. and Schillinger, U., “Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition”, ***The American Journal of Clinical Nutrition*** 73, 365- 373, 2001.

- Hugas, M. and Monfort, J.M., "Bacterial starter cultures for meat fermentation", *Food Chemistry* 59, 547- 554, 1997.
- Hurst, A., "Nisin", *Advances in Applied Microbiology* 27, 85–123, 1981.
- Ibrahim, S.M. and Desouky, S.G. "Effect of antimicrobial metabolites produced by lactic acid bacteria (LAB) on quality aspects of frozen tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fillets", *World Journal of Fish and Marine Sciences* 1, 40-45, 2009.
- Ivanova, I., Kabadjova, P., Pantev, A., Danova, S. and Dousset, X., "Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B14 isolated from boza Bulgarian traditional cereal beverage", *Biocatalysis: Fundamentals & Applications* 41, 47-53, 2000.
- Jakobsen, T., Budde, B.B. and Koch, A.G., "Application of *Leuconostoc carnosum* for biopreservation of cooked meat products", *Journal of Applied Microbiology* 95, 242, 249, 2003.
- Jemmi, T. and Stephan, R., "*Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator", *Revue Scientifique Et Technique De L'Office International Des Epizooties* 25 (2), 571- 580, 2006.
- Jordan, K.N., Oxford, L. and O'Bryn, C.P., "Survival of low-pH stress by *Escherichia coli* O157: H7: correlation between alterations in the cell envelope and increased acid tolerance", *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3048- 3055, 1999.
- Katla, T., Moretro, T., Sveen, I., Aasen, I.M., Axelsson, L., Rorvik, L.M. and Naterstad, K., "Inhibition of *Listeria monocytogenes* in chicken cold cuts by addition of sakacin P and sakacin P-producing *Lactobacillus sakei*", *Journal of Applied Microbiology* 93, 191- 196, 2002.
- Klaenhammer, T.R., "Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria" *FEMS Microbiology Reviews* 12, 39-86, 1993.

- Kouakou, P., Ghalfi, H., Dortu, C., Evrard, P. and Thonart, P., “Combined use of bacteriocin-producing strains to control *Listeria monocytogenes* regrowth in raw pork meat”, *International Journal of Food Science & Technology* 45, 937- 943, 2010.
- Lee, N. K., Paik, H. D., “Partial characterization of lacticin NK24, a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK24 isolated from Jeot-Gal”, *Food Microbiology* 18, 17-24, 2001.
- Leyer, G.J., Wang, L.L. and Johnson, E.A., “Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods”, *Applied and Environmental Microbiology* 61, 3752- 3755, 1995.
- Liu, D., “Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen”, *Journal of Medical Microbiology* 55, 645- 659, 2006.
- Liu, G., Griffiths, M.W., Shang, N., Chen, N. and Li, P., “Applicability of bacteriocinogenic *Lactobacillus pentosus* 31-1 as a novel functional starter culture or coculture for fermented sausage manufacture”, *Journal of Food Protection* 73 (2), 292–298, 2010.
- Lopez, A. S. and Belloso, O. M., “Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products”, *International Dairy Journal* 4, 329- 343, 2008.
- Luo, M.R., “Applying colour science in colour design”, *Optics & Laser Technology* 38, 392- 398, 2005.
- Lücke, F.K., “Utilization of microbes to process and preserve meat”, *Meat Science* 56, 105- 115, 2000.
- Mancini, R.A. and Hunt M.C. “Current research in meat color” *Meat Science* 71, 100-121, 2005.
- Maragkoudakis, P. A., Mountzouris, K. C., Psyrras, D., Cremonese, S., Fischer, J., Cantor, M. D. and Tsakalidou, E., “Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and

*Salmonella enteritidis*” **International Journal of Food Microbiology** 130, 219- 226, 2009.

Mbandi, E. and Shelef, L. A., “Enhanced antimicrobial effects of combination of lactate and diacete on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella spp.* in beef Bologna”, **International Journal of Food Microbiology** 76, 191-198, 2002.

McAuliffe, O., O’Keeffe, T., Hill, C. and Ross, R.P., “Regulation of immunity of the two-component lantibiotic, lactacin 3147, by the transcriptional repressor LtnR”, **Molecular Microbiology** 39, 982–993, 2001.

McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J. and Jewell, K., “*Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods”, **International Journal of Food Microbiology** 92, 15- 33, 2004.

Mead, P., Slutsker, L. and Deitz, V., “ Food related illness and death in the United States”, **Emergence Infection Disease** 5, 607- 625, 1999.

Nychas, G.J., Skandamis, P.N., Tassou, C.C. and Koutsoumanis, K.P., “Meat spoilage during distribution”, **Meat Science** 78, 77- 89, 2008.

Olaoye, O.A, and Onilude, A.A., “Assessment of microbiological quality of sachet-packaged drinking water in Western Nigeria and its public health significance”, **Public Health** 123, 729- 734, 2009.

Orsi, R.H., Den Bakker H.C. and Wiedmann, M., “*Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics”, **International Journal of Medical Microbiology**, 301, 76- 79, 2011.

Öncül, N., Laktokoksin BZ ve enterosin KP’nin süt endüstrisinde biyokoruyucu olarak kullanım olanaklarının araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, **G.O.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü**, Tokat, 1-89, 2010.

Papagianni, M., “Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications”, **Biotechnology Advances** 21, 465- 499, 2003.

Piard, J.C., Muriana, P.M., Desmazeaud, M.J and Klaenhammer, T.M., “Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine- containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* sups. *lactis* CNRZ 481”, ***Applied and Environmental Microbiology*** 58, 279- 284, 1992.

Rodriguez, J.M., Martinez, M.I., Horn, N. and Dodd, H.M., “Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria”, ***International Journal of Food Microbiology*** 80, 101- 106, 2003.

Sakala, R.M., Hayashidani, H., Kato, Y., Kaneuchi, C. and Ogawa, M., “Isolation and characterization of *Lactococcus piscium* strains from vacuum-packaged refrigerated beef”, ***Journal of Applied Microbiology*** 92 (1), 173–179, 2002.

Signorini, M.L., Alquicira, E.P. and Legarreta, I.G., “Effect of lactic acid and lactic acid bacteria on growth of spoilage microorganisms in vacuum- packaged beef”, ***Journal of Muscle Foods*** 17, 277- 290, 2006.

Soomro, A.H., Masud, T. and Anwaar, K., “ Role of lactic acid bacteria in food preservation and human health”, ***Pakistan Journal of Nutrition*** 1(1), 20-24, 2002.

Sparo, M.D., Confalonieri, A., Urbizu, L., Ceci, M. and Bruni, S.F., “Biopreservation of ground beef meat by *Enterococcus faecalis* CECT7121”, ***Brazilian Journal of Microbiology*** 44, 43-49, 2013.

Steele, B. T., Murphy, N. and Rance, C. P., “An outbreak of hemolytic uremic syndrome associated with ingestion of fresh apple juice”, ***Journal of Pediatric*** 101, 963–965, 1982.

Şahingil, D., İşleroğlu, H., Yıldırım, Z., Akçelik, M. and Yıldırım, M., “Characterization of lactococcin BZ produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BZ isolated from boza”, ***Turkish Journal of Biology*** 35, 21-33, 2011.

Thevenot, D., Delignette- Muller, M. L., Christieans, S., Leroy, S., Kodjo, A. and Vernozy- Rozand, C., “Serological and molecular ecology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from 13 French pork meat salting–curing plants and their products”, ***International Journal of Food Microbiology*** 112, 153- 162, 2006.

Todorov, S.D., Danova, S.T., Van Reenen, C.A., Meincken, M., Dinkova, G., Ivanova, I. V., Dicks, L.M.T., “Characterization of bacteriocin HV219, produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HV219 isolated from human vaginal secretions”, *Journal of Basic Microbiology* 46, 226–238, 2007.

Todorov, S.D. and Dick, L.M.T., “Screening for bacteriocin- producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria comparison of the bacteriocins”, *Process Biochemistry* 41, 11- 19, 2006.

Von Mollendorf, J.W., Todorov, S. D. and Dicks, L. M. T., “Comparison of bacteriocins produced by lactic-acid bacteria isolated from boza, a cereal-based fermented beverage from the Balkan Peninsula”, *Current Microbiology* 53, 209-216, 2006.

Yildirim, Z. and Johnson, M.G., “Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R isolated from radish”, *Letters in Applied Microbiology* 26, 297-304, 1998.

Zhao, T., Doyle, M.P. and Besser, R.E., “ Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7 in apple cider with and without preservatives”, *Applied and Environmental Microbiology* 59(8), 2526-2530, 1993.

Zhou, G., H., Xu, X.L., and Liu, Y., “Presevation technologies for fresh meat ”, *Meat Science* 86, 119-128, 2010.

## ÖZ GEÇMİŞ

Tuba Sakin 19.10.1988 tarihinde Lüleburgaz'da doğdu. İlköğretimi Fatsa Dumlupınar İlköğretim Okulu, liseyi Ünye Anadolu Öğretmen Lisesi'nde tamamladı. 2007 yılında Ondokuzmayıs Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne başlayıp 2011 yılında mezun oldu. Aynı yıl mezun olduğu Ondokuz Mayıs Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde yüksek lisans öğrenimine başladı. Aralık 2013'te Niğde Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne araştırma görevlisi olarak atandı. O tarihten itibaren aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmaya devam etmektedir.