

GÜLAY MERVE BAYRAKAL

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2016



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

(DOKTORA TEZİ)

**TAZE ET ÜRÜNLERİNİN RAF ÖMÜRLERİNİN
İZLENEBİLİRLİĞİNDE BİYO-İNDİKATÖRLERİN AKILLI
AMBALAJLAMA SİSTEMİ İÇERİSİNDE KULLANIMI**

GÜLAY MERVE BAYRAKAL

**DANIŞMAN
PROF.DR.GÜRHAN ÇİFTÇİOĞLU**

**BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2016

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü . İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Programında Doktora öğrencisi **Gülay Merve BAYRAKAL** tarafından Prof.Dr.Gürhan ÇİFTÇİOĞLU'nun danışmanlığında hazırlanan “Taze Et Ürünlerinin Raf Ömürlerinin İzlenebilirliğinde Biyo- İndikatörlerin Akıllı Ambalajlama Sistemi İçerisinde Kullanımı” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 26 /07 /2016 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında **başarılı bulunmuş** ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

D. Hem

Jüri Başkanı
Prof.Dr.Dilek HEPERKAN
İstanbul Teknik Üniversitesi
Kimya Metalurji Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü

Gürhan Çiftçi

Jüri-Danışman
Prof.Dr.Gürhan ÇİFTÇİOĞLU
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

Kamil Bostan

Jüri
Prof.Dr.Kamil BOSTAN
İstanbul Aydın Üniversitesi Güzel Sanatlar Fakültesi
Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü

Gülhan Türkay

Jüri
Prof.Dr.Gülhan TÜRKAY HOŞTÜRK
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

Özge Özgen Arun

Jüri
Prof.Dr.Özge ÖZGEN ARUN
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Gülay Merve BAYRAKAL

İTHAF

Her anımda yanımda olan ve bir ömür benimle olmalarını istediğim bir tanecik annem Müesser Öz, babam Adnan Öz, abim Gökay Mutlu Öz ve eşim Alper Bayrakal'a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Hayatım boyunca bana her zaman öncülük eden, yol gösteren, ilk okula başladığım günden doktora tezime kadar geçen sürede yaşadığım tüm sıkıntıları aşmama yardımcı olan, saygı ve sevgi dolu bir birey olarak yaşamamı sağlayan, ömrüm boyunca yanımda olan ve bundan sonra da olacağını bildiğim canım annem Müesser ÖZ, canım babam Adnan ÖZ ve bitanecik abim Gökay Mutlu ÖZ'e, 11 sene önce tutmuş olduğu elimi bir gün bile bırakmayan, gerek fiziken gerek ruhen her zaman yanımda olan, okul hayatı dahil yaşadığımız onca engeli birlikte aşmamıza vesile olan, tezime de yoğun katkı sağlayan biricik eşim Alper BAYRAKAL'a, istediğim konuda tezimi yapmamda beni cesaretlendiren, tezim boyunca önüme çıkmış tüm engellere çözüm bularak tezi tamamlamama yardımcı olan ve bana her konuda destek olan doktora danışmanım Prof. Dr. Gürhan ÇİFTÇİOĞLU'na, tüm anlayışlarıyla bana destek olan değerli hocalarım ve tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr. Özge ÖZGEN ARUN ve Prof. Dr. Gülhan TÜRKAY HOŞTÜRK'e, gerek çalışma koşulları gerek ise tecrübe ve sonsuz desteği ile yanımda olan Prof. Dr. Ali AYDIN'a, Mert SUDAĞIDAN'a ve sabır ve anlayış ile bana yardımcı olup gece gündüz beraber çalıştığımız başta Rüveyda GÜNAYDIN olmak üzere çalışma arkadaşlarıma, deneysel çalışmalarımda bana desteği esirgemeyen Çevre Analiz Laboratuvarı'na, İontek A.Ş.'ye, Teknokim Kimya'ya ve Apack'a ayrıca emeği geçen tüm hocalarıma ve mesai arkadaşlarıma en içten dileklerle teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 47011

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Etin Tanımı	3
2.2. Etin Beslenme Açısından Önemi	3
2.3. Etin Kimyasal Bileşimi	5
2.3.1. Su	7
2.3.2. Proteinler	8
2.3.3. Yağlar.....	8
2.3.4. Karbonhidratlar	9
2.3.5. Vitaminler	9
2.3.6. Mineral Maddeler.....	10
2.4. Gıdaların Bozulması	10
2.4.1. Gıdalarda Bozulma Çeşitleri	10
2.4.1.1. Fiziksel Bozulmalar	11
2.4.1.2. Kimyasal Bozulmalar	11
2.4.1.3. Mikrobiyal Gıda Bozulmaları	12
2.4.2. Etlerde Oluşan Bozulmalar	13
2.4.3. Bozulmanın Sağlık Açısından Önemi	16
2.4.4. Etlerde Bozulma Yapıcı Bakteriler	19
2.4.5. Bozulma Sonucu Oluşan Ürünler	25

2.5. Biyojen Aminler.....	26
2.5.1. Biyojen Aminlerin Sağlık Açısından Önemi	28
2.5.2. Histamin, Putresin ve Önemi	30
2.5.3. Histamin ve Putresin Üreten Mikroorganizmalar	31
2.6. Bozulma Tespit Metodları	32
2.7. Dijital Droplet PCR (ddPCR)	40
2.8. Et ve Et Ürünlerinde Aktif ve Akıllı Ambalajlama	43
2.8.1. Ambalajlama	43
2.8.2. Aktif ve Akıllı Ambalajlama.....	45
2.8.2.1. Aktif Ambalajlama Sistemleri:	45
2.8.2.2. Akıllı ambalajlama	48
3. GEREÇ VE YÖNTEM	62
3.1. GEREÇ	62
3.1.1. Örneklerin Temini.....	62
3.1.2. Ambalajlama ve Etiketlemede Kullanılan Malzemeler	62
3.1.3. Mikrobiyolojik Analizlerde Kullanılan Besiyerleri ve Kitler	63
3.1.4. Kullanılan Referans Suşlar.....	63
3.1.5. Moleküler Analizlerde Kullanılan Solüsyonlar ve Kitler	63
3.1.6. Laboratuvarlarda Kullanılan Alet – Ekipmanlar	64
3.2. YÖNTEM	66
3.2.1. Örneklerin Ambalajlanması ve Akıllı Etiketlerin Yerleştirilmesi	66
3.2.2. Mikrobiyolojik Analizler	67
3.2.3. pH Analizleri.....	69
3.2.4. Akıllı Etiket Uygulamaları ve Değerlendirilmesi	69
3.2.5. Moleküler Analizler	69
3.2.5.1. DNA Ekstraksiyonu	69
3.2.5.2. DNA Miktar Tayini.....	70
3.2.5.3. PCR Optimizasyonu ve Gradient Uygulaması.....	70
3.2.5.4. ddPCR	71
3.2.6. İstatistiksel Bulgular	72
4. BULGULAR.....	73
4.1. Mikrobiyolojik Analiz Bulguları	73
4.2. pH Analiz Bulguları.....	83

4.3. Akıllı Etiket Değerlendirme Bulguları.....	85
4.4. Moleküler Analiz Bulguları	90
5. TARTIŞMA	93
KAYNAKLAR	102
ÖZGEÇMİŞ	122



TABLOLAR LISTESİ

Tablo 2-1: Etin Kimyasal Bileşimi (100g) (USDA 2015) -1.....	6
Tablo 2-2: Etin Kimyasal Bileşimi (100g) (USDA 2015) -2.....	7
Tablo 2-3: Etlere Bozulmaya Sebep Olan Bakteriler-1	21
Tablo 2-4: Etlere Bozulmaya Sebep Olan Bakteriler-2	22
Tablo 2-5: Etlere Bozulmaya Sebep Olan Bakteriler-3	23
Tablo 2-6: Bakteriyel Bozulma Sonucu Oluşan Amino Asit ve Biyojen Aminler (Gram 2009 p. 92).....	28
Tablo 4-1: Modifiye Atmosfer Paketlenmiş ve Kontrol Grubu Kıymaların Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları (log ₁₀ kob/g)	73
Tablo 4-2: Modifiye Atmosfer Paketlenmiş ve Kontrol Grubu Parça Etlere Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları (log ₁₀ kob/g)	75
Tablo 4-3: Modifiye Atmosfer Paketlenmiş ve Kontrol Grubu Tavukların Mikrobiyolojik	77
Tablo 4-4: Modifiye Atmosfer Paketlenmiş ve Kontrol Grubu Balıkların Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları (log ₁₀ kob/g).....	79
Tablo 4-5: Kontrol Grubu Donmuş Kıymaların Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları (log ₁₀ kob/g).....	81
Tablo 4-6: Kontrol Grubu Donmuş Parça Etlere Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları (log ₁₀ kob/g).....	81
Tablo 4-7: Kontrol Grubu Donmuş Tavukların Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları (log ₁₀ kob/g).....	82
Tablo 4-8: Kontrol Grubu Donmuş Balıkların Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları (log ₁₀ kob/g).....	82
Tablo 4-9: Soğuk Muhafaza Etlere pH Analiz Sonuçları.....	83
Tablo 4-10: Donmuş Muhafaza Etlere pH Analiz Sonuçları	84
Tablo 4-11: Modifiye Atmosfer Paketleme ve Kontrol Grubu Soğuk Muhafaza Tavukların ddPCR Analiz Sonuçları (Gen Bölgesi Kopya Sayıları).....	90

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Ükelere ve Senelere Göre Et Üretimi (FAO 2015).....	4
Şekil 2-2: Kişi Başı Gıda Kaybı ve İsrافی (kg/yıl) (FAO 2016b).....	18
Şekil 2-3: ddPCR Çalışma Prensibi (Hindson ve ark. 2011).....	42
Şekil 2-4: Akıllı Ambalajlama Alanında Yıllık Bilimsel Yayın Sayısı (Vanderroosta ve ark. 2014).....	49
Şekil 3-1: ddPCR Çalışması	71
Şekil 4-1: MAP ve Kontrol Kıyma Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları (log ₁₀ kob/g)	74
Şekil 4-2: MAP ve Kontrol Et Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları (log ₁₀ kob/g).....	76
Şekil 4-3: MAP ve Kontrol Tavuk Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları (log ₁₀ kob/g).....	78
Şekil 4-4: MAP ve Kontrol Balık Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları (log ₁₀ kob/g).....	80
Şekil 4-5: Başlangıç Günü Kıyma	85
Şekil 4-6: Başlangıç Günü Balık	85
Şekil 4-7: Gün Kontrol Kıyma.....	86
Şekil 4-8: 1. Gün MAP Kıyma	86
Şekil 4-9: 3.Gün Kontrol Balık.....	87
Şekil 4-10: 3. Gün Kontrol Kıyma.....	87
Şekil 4-11: Donmuş Muhafaza Kıyma 180. Gün	88
Şekil 4-12: Sıcaklık-Zaman Etiketі.....	88
Şekil 4-13: Sıcaklık-Zaman Etiketі.....	89
Şekil 4-14: Soğuk Muhafaza MAP Tavuk Histamin Değerleri (Gen Bölgesi Kopya Sayıları).....	90
Şekil 4-15: Soğuk Muhafaza Kontrol Tavuk Histamin Değerleri (Gen Bölgesi Kopya Sayıları).....	91
Şekil 4-16: Soğuk Muhafaza MAP Tavuk Putresin Değerleri (Gen Bölgesi Kopya Sayıları).....	91
Şekil 4-17: Soğuk Muhafaza Kontrol Tavuk Putresin Değerleri (Gen Bölgesi Kopya Sayıları).....	92

SEMBOLLER / KISALTMALAR LISTESİ

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

4MU: 4-metilumbelliferon

7AMC: 7-nitrocoumarin-3-carboxylic acid 7-aminocoumarin

AB: Avrupa Birliği

AC: Total Aerobic

ADHD: Attention Deficit Hyperactivity Disorder

ADP: Adenozin Difosfat

AFNOR: Association Française de Normalisation

agdif / agdir: Agmatine Deaminase Geni

AIE: Aggregation-İnduced Emission

AMP: Adenozin Monofosfat

AOAC International: Association of Official Analytical Chamists International

AODC1 / AODC2: Ornithine Decarboxylase Geni

APCI: Atmospheric Pressure Chemical İonization

APCI-MS: Atmospheric Pressure Chemical İonization Mass Spectrometry

ark: Arkadaşları

ATP: Adenozin Trifosfat

aw: Water Activity

BA: Biyojen Amin

BCG: Bromocresol Green

BHA: Butylated Hydroxyanisole

BHT: Butylated Hydroxytoluene

BSE: Bovine Spongiform Encephalopathy

cAMP: Cyclic Adenosine Monophosphate

CAP: Controlled Atmosphere Packaging

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

cdPCR: Chamber Digital Polymerase Chain Reaction

CE: Capillary Electrophoresis

CL1 / CL2: Histidine Decarboxylase Geni

ct: Cycle Thershold

DA: Decarboxylating Agar

DAO: Diamin Oksidaz

ddPCR: Droplet Digital Polymerase Chain Reaction

DHA: Dokosaheksenoik Asit

EB: *Enterobacteriaceae*

EC: *Escherichia coli*

EC: European Commission

Eh: Redoks Potansiyeli

EHEC: Enterohemorajik *Escherichia coli*

EIEC: Enteroinvasive *Escherichia coli*

Em: Elektromanyetik Dalga

EMS: En Muhtemel Sayı

EPA: Eikosapentonoik asit

ESI: Electrospray Ionization

GC / MS: Gas Chromatography–Mass Spectrometry

GMO: Genetically Modified Organism

Hdc: Histidine Decarboxylase

hdc-f / hdc-r: Histidine Decarboxylase Geni

hdcRTrw / hdcRTfw: Histidine Decarboxylase Geni

HIS-F / HIS-R: Histidine Decarboxylase Geni

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

Hx: Hypoxanthine

HxR: İnosin

IMP: İnosin-5-monofosfat

ISO: International Organization for Standardization

IU: International Unit

JV16HC / JV17HC: Histidine Decarboxylase Geni

Kob: Koloni Oluşturan Birim

KPF / KPR: Histidine Decarboxylase Geni

LAB: Laktik Asit Bakterileri

LC-ESI-ITMS: Liquid Chromatography-Electrospray İonization-Tandem Mass Spectrometry

LDL: Low Density Lipoprotein

MAO: Monoamin Oksidaz

MAP: Modifiye Atmosfer Paketleme

MDA: Modified Decarboxylating Agar

MRD: Maximum Recovery Diluent

MRS: de Man Rogosa and Sharpe Agar

NDIR: Non Distributive Infrared

O/R: Oksidasyon-Redüksiyon Potansiyeli

odc: Ornithine Decarboxylase

PCA: Plate Count Agar

PCR: Polimeraz Chain Reaction

PDA: Photo Diode Array

pH: Power of Hydrogen

PHDC1 / PHDC2: Histidine Decarboxylase Geni

Pt3 / Pt4: Tyrosine Decarboxylase Geni

PUT1 / PUT2: Ornithine Decarboxylase Geni

qPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction

RFID: Radio Frequency Identification

spp: Species (plural)

TC: Total Coliform

TLC: Thin Layer Chromatography

TMA: Trimetilamin

TMAO: Trimetilamin Oksid

Tpes: Carboxylic Acid Modified Tetraphenylethenes

TSE: Türk Standardları Enstitüsü

TTI: Time Temperature Indicator

TVC: Total Viable Count

U: Uric acid

UHPLC: Ultra High Pressure Liquid Chromatography

UHPLC-MS/MS: Ultra High Pressure Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

UPLC/Q-TOFMS: Ultra-Performance Liquid Chromatography - Electrospray Time-Of-Flight Mass Spectrometry

USDA: United States Department of Agriculture

UV: Ultraviolet

VRBA: Violet Red Bile Agar

WHO: World Health Organization

X: Xanthine

YM: Yeast/Mold

ÖZET

Bayrakal, G.M. (2016). Taze Et Ürünlerinin Raf Ömürlerinin İzlenebilirliğinde Biyo-İndikatörlerin Akıllı Ambalajlama Sistemi İçerisinde Kullanımı. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Günümüzde, gıdaların üretimden tüketime kadar bozulmadan tüketiciye ulaşması gıda sanayi ve halk sağlığı açısından önem taşımaktadır. Bu alanda akıllı ambalajlama teknolojisi, paket içinde sunulan gıdalar hakkında üreticiye, perakendeciye ve alıcıya bilgi veren yeni teknolojilerdendir. Sunulan tez projesinin amacı, akıllı ambalajlama teknolojisinin uygulanabilirliğini ve bozulmaların hızlı ve doğru tespiti amacıyla gıda bozulmalarında ortaya çıkan biyojen aminlerin (BA) sentezinde rol oynayan genlerin miktarının saptanmasına yönelik Droplet Digital PCR (ddPCR) yönteminin kullanılabilirliğini tespit etmektir. Projede çabuk bozulabilen ürün grubu olarak dana kıyma ve bütün balık, dayanıklı ürün olarak ise parça et ve tavuk göğsü soğuk muhafaza altında modifiye atmosfer paketleme (MAP) ve donmuş muhafaza için standart yöntemle ambalajlanarak; soğutulmuş ve dondurulmuş depolamanın belirli günlerinde mikrobiyolojik, fizikokimyasal ve moleküler yönlerden analize alınmıştır. Deneysel ürünlere yapılan analizler sonucu MAP ve kontrol grupları karşılaştırıldığında bozulma kriteri olarak kabul edilen değerlere her grubun farklı günlerde ulaştığı tespit edilmiştir. Tavuk mikrobiyolojik verileri sonucuna göre mikroorganizma sayısı 10^8 kob/g'nin üzerine çıkan 9. gün bozulmanın başladığı gün olarak düşünülmüştür. Aynı güne denk gelen ddPCR verilerinde ise gen kopya sayısı 50-60'ın üzerinde tespit edilmiştir. Bu bilgilere göre histamin ve putresin üreten gen kopya sayısı için bozulma tespiti açısından 50 limit değer olarak yorumlanmıştır. Tavuk etleri analizleri sonucu elde edilen ddPCR verileri ile mikrobiyolojik analiz verileri karşılaştırıldığında ddPCR metodunun akıllı ambalajlama sistemi içerisinde akıllı etiketlerin kullanımı ile beraber bozulmanın hızlı tespiti amacıyla kullanılacak bir metot olduğu kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Mikrobiyolojik bozulma, akıllı ambalajlama, ddPCR, MAP, biyo-indikatörler.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 47011

ABSTRACT

Bayrakal, G.M. (2016). The Application of Bio-Indicators Entegrated to the Smart Packaging System for the Shelf Life of Fresh Meat Products

İstanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Food Hygiene and Technology, PhD Thesis, Istanbul.

Today, supplying unspoiled food products from production to consumption is an important challenge in terms of food industry and public health. Intelligent packaging technology, in this manner, provides valuable information about packaged food for manufacturers, retailers and the consumers. The aim of this presented thesis project are; to evaluate the applicability of the intelligent packaging and to determine the genes, which affects the synthesis of biogenic amines, fast and accurately, by using the ddPCR (Droplet Digital PCR) method. Minced beef and whole fish were selected as perishable food material and beef cubes and chicken breasts were selected as durable food material; and were packaged using Modified Atmosphere and conventional packaging. Refrigerated and frozen samples were analyzed by means of microbiologic flora, physico-chemical and the quantity of biogenic amine expression genes by ddPCR, in relevant storage days. Our results showed that MAP and control groups reached to spoilage level, according to the suggested values, on different days. 9. day is the spoilage day based on microbiological datas that microorganism number is higher than 10^8 cfu/g in chicken. At the same day, gene copy number is 50-60 in ddPCR data. According to these data, it is reported in our study that 50 is the limit value for histamine and putrescine producing gene number. When ddPCR and microbiological data were compared, it has been concluded that ddPCR analyze of targeted genes could be an option for rapid detection of spoilage in smart packaging systems.

Key Words: Microbiological spoilage, smart packaging, ddPCR, MAP, bio-indicators.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 47011

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Et, içeriğindeki besleyici değeri yüksek elementler sayesinde insan beslenmesi ve sağlığına önemli katkılar sağlamaktadır. Et, balık ve tavuk yapısındaki yüksek protein, yağ, vitamin ve mineral maddeleri nedeniyle beslenmemizin vazgeçilmez unsurları arasındadır. Ancak bu besin elementlerinin etlerde yüksek oranda bulunması mikroorganizmalara da hızla üreme fırsatı tanıyacağından etler çabuk bozulabilen gıdaların arasında yer almaktadır (Doulgeraki ve ark. 2012; Abdel-Aziz ve ark. 2016). İçeriğindeki yüksek su aktivitesi (aw) değeri ve kesim, parçalama, dağıtım aşamalarında yüksek kontaminasyona maruz kalabilmeleri risk yüzdelerini arttırmaktadır. Bu sebeplerle etlerin daha uzun raf ömrüne sahip olmaları, bozulmalardan kaynaklı hastalık ve ölüm oranlarını azaltmak ve ekonomik kayıpların önüne geçmek açısından et teknolojisinin önemli amaçlarından.

Geçmişten günümüze kadar gıdaların muhafazası amacıyla birçok yöntem kullanılmıştır. Gıdaları koruyan, muhafaza eden, raf ömrünü uzatan ve kalitenin devamını sağlayan ambalajlama ise bu yöntemlerden en sık başvurulanıdır. Gelişen teknoloji sayesinde ambalajlar da olağan fonksiyonları yanısıra tüketicilerle iletişime geçerek multifonksiyonel konuma gelmişlerdir (Pereira de Abreu ve ark. 2011; Robertson 2012 p. 4; Lee ve Rahman 2014 p. 186). Özellikle soğuk zincirde herhangi bir kırılma meydana geldiğinde renk değiştirerek durumu tüketiciye bildiren ürünler, dağıtım sırasında meydana gelmiş aksaklıklar ya da satış yerindeki elektrik kesintisi durumlarında ürünlerin durumu hakkında bilgi vererek tercih sebebi olmaktadır (Selman 1995 pp. 228-229; Yam ve ark. 2005). Bir diğer yeni nesil etiket ise ürünlerin tazeliği hakkında tüketiciyi uyaran tazelik etiketidir. Gıdaların bozulması sırasında açığa çıkan çeşitli maddeler ile etkileşime geçerek renk değiştiren ve böylece ürünlerin tüketilip tüketilemeyeceğini kolorimetrik olarak bildiren etiketler günümüzde akıllı ambalajlama sistemi içerisinde tercih edilen etiket tiplerindedir (Smolander 2003 pp. 128-143).

Gıda zehirlenmelerinde sağlık problemlerine neden olan etkenlerin tespitine yönelik metodlar genellikle uzun sürede sonuç verdiğinden, gıdaların bozulmasının önlenmesi kadar hızla tespiti de önem kazanmaktadır. Gıda kaynaklı zehirlenmeler

sonucu iş gücünde azalma, hastane masrafları kaynaklı sebeplerle ekonomik kayıpların dışında ölüm vakaları da görülmektedir (Eley 1996 p. 13; WHO 2015). Özellikle balıklarda bulunan histamin kaynaklı alerjiler ise ciddi sağlık sorunlarına sebebiyet vermektedir (Ohashi ve ark. 1991; Stratton ve ark. 1991). Herhangi bir belirti sonucu zehirlenmenin teşhisinin kolaylaşabilmesi ve tedavinin o yönde yapılabilmesi için ise zehirlenmeye sebep olan mikroorganizmalar tespit edilmelidir. Mikrobiyolojik analizler bu amaçla yapılsa dahi işlemlerin uzun sürmesi ve sonuçların geç alınması teşhis ve tedaviyi güçleştirmektedir. Moleküler analizler ise bu aşamada devreye girerek kesin sonuç ve kısa zamanda teşhis sağlarlar. 3. nesil polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi olan ddPCR ise her numuneyi 20.000 damlacığa bölüp her damlacığı ayrı analiz ettiği için doğruluğu arttırmakta ve tek bir gen dahi olsa tespit edebilmektedir (Pinheiro ve ark. 2012; Morisset ve ark. 2013; Rothrock Jr ve ark. 2013). Dünyada ddPCR alanında yapılan çalışmalar artsa da Türkiye’de bu teknolojiye içeren araştırma bulunmamaktadır. Buna karşın, yaptığımız kaynak incelemeleri sonucunda dünyada da ddPCR yöntemini bozulmaların erken saptanabilmesi amacıyla yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu bilgiler doğrultusunda tez çalışmasının amacı, gıdalarda oluşabilecek mikrobiyolojik ve fizikokimyasal bozukluklar ile ilgili direkt bilgi veren akıllı ambalajlama teknolojisini hayvansal gıdaların ambalajlanmasında kullanarak oluşabilecek gıda bozulmalarının hızlı tespiti yoluyla tüketicilere görsel tanılama şansı sağlayarak halk sağlığına, bilime ve teknolojiye katkı sağlamaktır. Aynı zamanda çalışmanın yönlendirdiği doğrultuda gıda bozulmalarını hızlı ve etkin bir şekilde tespit edebilecek moleküler metodun uygulanabilirliği, akıllı ambalajlama yöntemlerinde kullanılan göstergelerin uyumluluğunun araştırılması, akıllı ambalajlama teknolojisinde moleküler genetik tekniklerinin kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Etin Tanımı

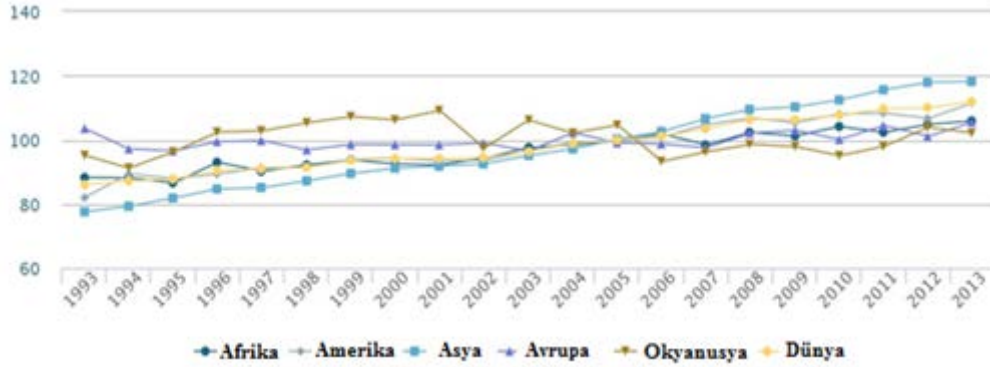
Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliği (2012)'ne göre çiğ kırmızı et; vakum ambalajlı veya kontrollü ortamda ambalajlanmış kırmızı et dahil soğutma, dondurma veya hızlı dondurmada başka herhangi bir muhafaza yöntemine tabi tutulmamış olan kırmızı et, çiğ kanatlı eti ise vakum ambalajlı veya kontrollü ortamda ambalajlanmış kanatlı eti dahil soğutma, dondurma veya hızlı dondurmada başka herhangi bir muhafaza yöntemine tabi tutulmamış olan kanatlı eti olarak tanımlanmıştır. Genel anlamda ise et, gıda değeri olan hayvanların tüm tüketilebilir dokuları olarak da tanımlanabilir.

2.2. Etin Beslenme Açısından Önemi

2020 yılında dünya nüfusunun yaklaşık 8 milyar kişi olması beklenmektedir (FAO 2014). Artan nüfusla beraber barınma, sağlık, eğitim gibi alanlarda olduğu gibi beslenmede de ihtiyaçların karşılanması güçleşmektedir. Hayvanların bakım ve besleme maliyeti arttıkça hayvansal üretim de azalmakta bu da beraberinde hayvansal gıdaya ulaşımı güçleştirmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde açlığın ve yetersiz beslenmenin gün geçtikçe artmasının yanı sıra gelişmiş ülkelerde de dengesiz beslenme artmaya başlamaktadır. Bunun en önemli sebepleri modern hayat, değişen yaşam standartları, sosyo-ekonomik değişimler ve kültürel değişimlerdir. Günümüz yaşantısında çalışan nüfus artmakta bu da paralelinde fast-food beslenme kültürünü getirmektedir. Sağlıklı yaşam ve hayvan refahı konuları gündeme geldikçe ise beslenme tarzı bitkisel kaynağa yönelmekte, vejeteryanlık ve vegan beslenme artmakta bu sebeplerle de hayvansal gıdalardan alınacak besin değerleri kısıtlanmakta veya tamamen yok edilmektedir.

Vejeteryan beslenmede hayvansal gıdaların tüketiminin az olduğu bitkisel beslenmeye ağırlık verilmesinden dolayı sağlıklı olup olmadığı, kalp rahatsızlıklarına karşı ne kadar korucu olduğu tartışılmaktadır. Vejeteryanların yaşam tarzları daha sağlıklı yaşamaya yönelik olduğundan daha az sigara, alkol, çay, kahve tüketimi ve daha fazla egzersiz yapmaları hastalıklardan korunmalarının sebebi olabilmektedir (Higgs 2000).

Et üretimi:



Şekil 2-1: Ülkelere ve Senelere Göre Et Üretimi (FAO 2015)

Hayvansal gıdaların başında kırmızı et, balık ve tavuk gelmektedir. Bu gıdaların önemi içeriğindeki besleyici elementler, proteinler, vitaminler, yağlar ve minerallerden gelmektedir. Farklı et gruplarının içerdiği farklı besleyici unsurlar nedeniyle sağlık açısından önemleri değişmektedir.

Konsantre besin kaynağı olan et, ideal büyüme ve gelişme için zorunlu bir gıdadır (Higgs 2000). Et ve balık, protein, vitamin A, vitamin B12, I, Fe, Zn, Se, taurin, ve uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri için önemli kaynaklardır (Sanders 1999). Ayrıca omnivor diyetlerde D vitamini, biotin, Ca, potansiyel nikotinic asit vegan diyetle oranla daha yüksektir (Rana ve Sanders 1986).

Eşit oranda tüketilen yağsız sığır eti, tavuk ve balık tüketimi, hiperkolesterolemik ve normokolesterolemik erkek ve kadınlarda plazma kolesterol ve LDL kolesterol seviyesini düşürmektedir (Higgs 2000). Düzenli et tüketimi beyin ve zeka gelişimine katkı sağlamakta, birçok kronik hastalığa karşı olumlu etkileri olmaktadır (McNeill ve Van Elswyk 2012; Pereira ve Vicente 2013).

Etlar, tüm alternatiflerinden daha yüksek oranda çinko ve niasin, bitkisel gıdalardan daha fazla omega-3 içerirler. Ayrıca, et vitamin B6 (ceviz hariç), selenyumdan (yumurta hariç) da zengindir ve bitkisel ürünlerde bulunmayan vitamin B12 için en iyi kaynaktır (Williams 2007).

Özellikle yağ oranı düşük, protein oranı ise yüksek olan, vitamin, mineral, çoklu doymamış yağ asitlerini ve nükleik asitleri bol miktarda içeren balık, et ürünlerine bir alternatif olarak kabul edilmektedir. (Babal 2005 p. 1). Akdeniz insanlarında, Eskimo ve Asyalılar'da hastalıklara karşı bağışıklık sistemlerinin güçlü olması, düşük kolesterol seviyesi ve tansiyonları, kalp hastalığı riskinin az oluşu ve hayat beklentilerinin yüksek oluşu su ürünlerini fazla tüketmelerine bağlanmaktadır (Babal 2005 p. 7).

Balık proteinleri metilhistidin ve hidrosimetil lizin gibi, genellikle bitki proteinlerinde bulunmayan amino asitleri içerir. Birçok balıktaki protein kalitesi etten daha fazla, laktoalbumin gibi ideal proteinle karşılaştırılınca da eşittir (Friedman 1996).

Deniz ürünleri sağlık için faydalı olan yağlar açısından önemli bir kaynaktır. Özellikle birçok yararı olan uzun zincirli omega-3 yağ asitleri, eikosapentenoik asit (EPA) ve dokosaheksenoik asit (DHA) deniz ürünlerinde yüksek düzeyde bulunmaktadır (Løvaas 2006 p. 17). Gorga (1998) ve Nettleton (2000)'den yapılan alıntıya göre, bu yağ asitleri tüketen kişileri migren, şeker hastalığı, eklem romatizması, kalp-damar rahatsızlıkları, yüksek tansiyon ve kolesterol bazı alerji ve kanserlere karşı korumaktadır. Bu sebeple ticari olarak farklı firmalar farklı markalar ile balık yağı preparatları üretmektedirler (Turan ve ark. 2006). Deniz ürünlerinde bulunan omega-3 yağ asidi, kalp hastalıkları, kanser, diyabet, artrit, Alzheimer hastalığı, depresyon, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, astım, nöro-muskuler hastalıklar, prenatal sorunlar, dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu (Attention Deficit Hyperactivity Disorder - ADHD) gibi birçok hastalığı önlemede ya da azaltmada etkili olmaktadır (Babal 2005 p. 3). Doğmamış ya da emzirme dönemindeki bebeklerde beyin gelişimi açısından önem taşıyan DHA ise anne sütü ile aktarılabildiği için anne adaylarına haftada birkaç kez balık yenmesi tavsiye edilmektedir (Løvaas 2006 p. 23).

2.3. Etin Kimyasal Bileşimi

Et, çok çeşitli hayvanlardan elde edilebilen ve bileşimi itibariyle değişik besin elementlerini içeren bir gıdadır. Yapısında temel besin bileşenlerinin pek çoğunu bulundurması eti vazgeçilmez bir besin kaynağı yapar. Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı Tarımsal Araştırma Servisi tarafından çeşitli etlerin bileşimi Tablo 2.1. ve 2.2'de gösterildiği şekilde bildirilmiştir.

Tablo 2-1: Etin Kimyasal Bileşimi (100g) (USDA 2015) -1

Kimyasal Bileşen	Sığır Eti (100g) Kuşbaşı	Sığır Eti (100g) Kıyma-% 15 Yağlı	Tavuk Eti (100g) Derisiz	Balık Eti (100g) Lüfer
Su	73,42 g	65,66 g	69,29 g	70,86 g
Enerji	117 kcal	215 kcal	199 kcal	124 kcal
Protein	23,07 g	18,59 g	13,79 g	20,04 g
Yağ	2,69 g	15,00 g	15,48 g	4,24 g
Kalsiyum	9 mg	15 mg	123 mg	7 mg
Demir	1,85 mg	2,09 mg	1,73 mg	0,48 mg
Magnezyum	23 mg	18 mg	13 mg	33 mg
Fosfor	212 mg	171 mg	154 mg	227 mg
Potasyum	342 mg	295 mg	128 mg	372 mg
Sodyum	55 mg	66 mg	51 mg	60 mg
Çinko	3,61 mg	4,48 mg	1,82 mg	0,81 mg
C vitamini	0,0 mg	0,0 mg	3,0 mg	0,0 mg
Tiamin	0,052 mg	0,042 mg	0,071 mg	0,058 mg
Riboflavin	0,124 mg	0,151 mg	0,175 mg	0,080 mg
Niasin	6,703 mg	4,649 mg	6,246 mg	5,950 mg
Vitamin B-6	0,651 mg	0,346 mg	0,320 mg	0,402 mg
Folat, DFE	13 µg	6 µg	9 µg	2 µg
Vitamin B-12	1,27 µg	2,17 µg	0,35 µg	5,39 µg
Vitamin A, RAE	0 µg	4 µg	32 µg	120 µg

Tablo 2-2: Etin Kimyasal Bileşimi (100g) (USDA 2015) -2

Kimyasal Bileşen	Sığır Eti (100g) Kuşbaşı	Sığır Eti (100g) Kıyma-%15 Yağlı	Tavuk Eti (100g) Derisiz	Balık Eti (100g) Lüfer
Vitamin A, IU	0 IU	14 IU	107 IU	398 IU
Vitamin E	0.22 mg	0.17 mg		
Vitamin D (D2 + D3)		0.1 µg		
Vitamin D	3.0 IU	3 IU		
Vitamin K	0.9 µg	1.3 µg		
Yağ Asidi (Doymuş)	1.032 g	5.715 g	4.710 g	0.915 g
Yağ Asidi (Mono Doymamış)	0.995 g	6.469 g	7.410 g	1.793 g
Yağ Asidi (Poli Doymamış)	0.108 g	0.433 g	2.280 g	1.060 g
Trans Yağ Asidi	0.113 g	0.860 g		
Kolesterol	55 mg	68 mg	104 mg	59 mg

2.3.1. Su

Su, insan hayatının temel ihtiyaçlarından biri olması yanında birçok gıdanın da bileşiminde bulunan ana maddedir.

Etin besleyici değerine, renk, tekstür, olgunluk gibi duyuşal özelliklerine, katkı maddelerinin çözünmesine ve etkinliğine katkı sağlayarak teknolojik özelliklerine önemli etkileri olmaktadır. Ayrıca mikrobiyal üreme ile de doğrudan ilişkili olup raf ömrü belirlenmesinde kullanılmaktadır (Arslan 2013 p. 41). Deniz ürünleri için ise su en önemli komponenttir (Pigott ve Tucker 1990 p. 41).

2.3.2. Proteinler

Besinlerin yararlanma derecesi içerisinde bulunan proteinin biyolojik değerine bağlıdır (Arslan 2013 p. 44). Biyolojik değeri en yüksek olan gıda 100 ile yumurta akı iken etin biyolojik değeri 75'dir ve içerdiği metiyonine göre hesaplanmaktadır. Et proteinlerinin beslenme açısından önemli olmasının diğer sebebi de sindirilme derecelerinin yüksek olmasıdır. Kırmızı ette biyolojik değeri en yüksek olan kısım bonfile (80) iken en düşük kısım baş etidir (54) (Yıldırım 1996 p. 310).

Özellikle kırmızı et tartışılmaz en iyi protein kaynağıdır (Pereira ve Vicente 2013). Et proteinlerinden en önemlileri aktin, miyozin ve kollajendir. Etlere metil, histidin, lizin ve hidroksimetil gibi bitkisel proteinlerde bulunmayan aminoasitler mevcuttur (Friedman 1996). Günlük esansiyel aminoasit (fenilalanin, triptofan, metiyonin hariç) ihtiyacımızın karşılanması için 150-250 g orta yağlı et tüketilmelidir (Yıldırım 1996 p. 310).

Balıklar yaklaşık %11-24 arasında protein içermektedirler (Sikorski ve ark. 1990 p. 34). Balık kasları, iyi bir aminoasit bileşimi içerdiği gibi besleyici ve kolay sindirilebilir proteinler için de iyi bir kaynaktır (Kristinsson ve Rasco 2000). Birçok balık proteininin besleyici değeri kazeine eşit ya da daha yüksektir ve etin protein kalitesinden daha yüksek, laktoalbumin gibi ideal proteinlere ise eşittir (Friedman 1996). Balık hayvansal protein alımının ortalama yaklaşık yüzde 20'sini karşılayarak ve yaklaşık 2,9 milyar kişinin tüketimini sağlayarak insan beslenmesinde önemli bir yer tutar (FAO 2014).

Et, esansiyel aminoasitlerden zengin bir kaynak olmasından dolayı sporcularda veya ameliyat sonrası durumlarda kas dokusunun yeniden inşa edilmesine katkı sağlar. Etlere taurinden de zengindir. Sisteinden taurin üretemeyen yeni doğmuş bebekler için bu aminoasit esansiyel konumundadır (Higgs 2000). Aynı zamanda taurin supplementlerinin kalbe yararlı etkilerinin olduğu konusunda da güçlü kanıtlar vardır (Stapleton ve ark. 1997).

2.3.3. Yağlar

Ette yağlar fosfolipid, nötral lipid, kolesterol ve serobrosit olarak bulunurlar. Esansiyel yağ asitleri (araşidonik, linoleik ve linolenik asit) ve yağda eriyen vitaminleri (A, D, E, K) içererek beslenmeye katkı sağlarlar. Aynı zamanda aroma maddelerinin çözünmesine yardımcı olarak ve kendileri de hidrolize olarak keton, uçucu yağ asitleri

ve aldehit açığa çıkartırlar böylece lezzet oluşumunda etkili olurlar (Arslan 2013 pp. 46-47).

Et, doku membranlarındaki trombositlerde tromboksan A₂ üretimi ve hücre dışı trombosit agregasyonunu arttıran araşidonik asitten zengin bir besindir (Li ve ark. 1998).

Hu ve ark. (2002)'ın yapmış olduğu çalışmaya göre deniz ürünlerinde diğer gıdalara kıyasla yüksek oranda bulunan omega-3 yağ asitleri özellikle kadınlarda koroner kalp hastalığını ve bundan kaynaklı ölümleri azaltmaktadır.

2.3.4. Karbonhidratlar

Karbonhidratların etteki önemi beslenmeden çok tekstürel özelliklere olan olumlu katkısından dolayıdır. Etin en önemli karbonhidratı olan glikojen olgunlaşma sırasında asiditeyi sağlayarak olgunlaşmaya katkıda bulunur (Yıldırım 1996 p. 292). Balıklarda ise karbonhidrat miktarı önemli düzeyde değildir (Pigott ve Tucker 1990 p. 42).

2.3.5. Vitaminler

Et ve et ürünleri B-kompleks vitaminleri için çok önemli bir kaynaktır. Bitkilerde B12 vitamini bulunmadığı için et çocukların B12 vitamin teminatı için iyi bir kaynaktır. Diğer taraftan et, yağda eriyen A, D, E ve K vitaminleri ve C vitamininden fakirdir (FAO 2007). Yağlı etlerde ise yağda eriyen vitaminler bol miktarda bulunmaktadır. Tavuk eti A vitamini ve askorbik asitten, sığır eti ise tokoferolden zengindir (Yıldırım 1996 p. 336).

Suda çözünen vitaminler, B-kompleks ve C vitaminleri su ürünlerinin etlerinde karada yaşayan hayvan etleriyle yaklaşık olarak aynı düzeyde bulunurlar. Yağda çözünen A, D, E ve K vitaminleri ise karada yaşayan hayvanlardan daha yüksek miktarda bulunurlar. Bitkilerde bulunan provitamin A olarak bulunan karoten balıklar ile dönüştürülüp depolanarak A vitamini şeklinde düzenlenmektedir. Balık karaciğer yağları ise D vitamini için zengin bir kaynaktır. Balık eti alfa-tokoferolun en etkili halini önemli miktarda içerir. Vitamin K ise birçok balıkta az miktarda bulunur. B kompleks vitaminlerinden tiamin, riboflavin ve niasin balık dahil olmak üzere su ürünlerinin kaslarında önemli miktarda bulunmaktadır. Özellikle somon ve tuna B6 vitamini için önemli kaynaklardan biridir. B12 vitamini için de balıklar iyi bir kaynak oluşturur. Deniz ürünleri biotin açısından da zengindir (Pigott ve Tucker 1990 pp. 43-50).

2.3.6. Mineral Maddeler

Ette %0,1'den fazla miktarda kalsiyum, fosfor, sodyum, potasyum, klor, magnezyum, demir, bakır ve çinko gibi iz elementler bulunmaktadır. Ette bulunan demir bitkilerdeki demire oranla daha yüksek biyo-yararlanım, daha iyi emilim ve metabolizmaya sahiptir (FAO 2007). Etin içerdiği demir ve fosfor beslenme açısından ete büyük önem kazandırmaktadır. Mineraller deniz ürünlerinde etlere oranla kısmen fazla konsantrasyonda bulunmaktadır (Pigott ve Tucker 1990 p. 50). Et kobalt, krom ve nikeli de faydalı miktarlarda içermektedir (Higgs 2000).

Demir eksikliği ve demir eksikliği anemisi sanayileşmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ciddi sağlık problemlerindedir. Demir gıdalarda hem ya da non-hem olarak bulunur. Hem, nerdeyse sadece hayvansal gıdalarda hemoglobin ve miyoglobin olarak bulunur. Non-hem ise, hayvan ve bitki dokularında, takviye edilmiş besinlerde ve besin takviyelerinde bulunur (Geissler ve Singh 2011).

2.4. Gıdaların Bozulması

2.4.1. Gıdalarda Bozulma Çeşitleri

Bir gıda maddesinin bozulmuş olarak değerlendirilmesi, kalitesinin kabul edilebilir değerlerinde kayıplar oluşması şeklinde bildirilmiştir (Erol 2007 p. 237). Buna karşın bozulma, kabul edilebilir maksimum bakteriyel limit veya istenmeyen koku, görünüm ya da tat olarak da tanımlanabilir (Borch ve ark. 1996). Bozulma gıda maddesini duyuşal özellikleri bakımından tüketici tarafından kabul edilemez hale getirir (Gram ve ark. 2002). Ayrıca bozulan etlerin yüzeyinde oluşan yapışkan tabaka da ürünün kabul edilmemesi açısından önemli bir faktördür (Nychas ve ark. 2008).

Bu bozulmalar fiziksel hasarlar, kimyasal değişimler (oksidasyon, renk değişimleri) ve mikroorganizmalar ya da metabolit atıklar sonucu oluşan istenmeyen tat, görünüm ve koku olarak meydana gelebilirler (Gram ve ark. 2002). Gıdalarda oluşan fiziksel değişimler farklı kültür, coğrafya ve alışkanlıkların etkisi ile bazı kişilerce bozulma olarak kabul edilebilir bazılarıncı ise kabul edilemez. Bu duruma örnek olarak, ayranın bazı ülkelerde bozuk yoğurt olarak kabul görülüp tüketilmemesi, bazı yörelerde ise ekşimiş ayranın bile daha sağlıklı olacağı düşüncesi ile özellikle tüketilmesi verilebilir.

Gıdalarda meydana gelen bozulmalar birçok farklı faktör sonucu ortaya çıkar. Sıcaklık, pH, su aktivitesi, ışık ve oksijene maruz kalma, gıdalardaki kullanılabilir kimyasallar ve besinler bu faktörlerden bazılarıdır (Singh ve Anderson 2004 p. 4).

Gıdalarda oluşan bozulmalar, fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik olarak 3 ayrı kategoride incelenebilir.

2.4.1.1. Fiziksel Bozulmalar

Fiziksel bozulmalar fiziksel değişimler sonucu oluşurlar. Taze sebze ve meyvelerde oluşan ezilmeler, renk değişimleri, aşırı olgunlaşmalar, patates cipsi ve kahvaltılık gevrek gibi gevrek gıdalarda oluşan sertlik ya da yumuşamalar, dondurma gibi donmuş gıdalarda görülen buz kristalleri, toz gıdalarda görülen topaklaşmalar, Maillard reaksiyonu (indirgen şekerler ve aminoasitler arasında oluşan reaksiyon sonucu enzimatik olmayan kahverengileşme), donma yanıkları, aroma ve koku değişimleri fiziksel bozulmalara örnek verilebilir (Singh ve Anderson 2004 pp. 4-10).

Fiziksel bozulmalar şiddetli olduğu zaman tüketici ürünü almak istemeyeceği gibi bu tip bozulmalar mikrobiyal üremeye de zemin hazırlayabilirler. İyi tasarlanmış ambalajlama sistemlerinin kullanımı ile gıdalarda oluşan bu bozulmaların önüne geçilebilir (Singh ve Anderson 2004 p. 4).

2.4.1.2. Kimyasal Bozulmalar

Kimyasal değişimler vizkozitede artma, jelleşme, sedimentasyon ya da renk değişimleri (kahverengileşme) gibi fiziksel değişimlere sebep olabilirler. Lipid oksidasyonu, enzimatik oksidasyon, lipoliz kimyasal bozulmaya sebep olan olaylardandır (Huis in't Veld 1996). Ayrıca etlerde miyogloblin ve oksimiyogloblin proteinlerinin oksidaz sonucu kahverengi metmyoglobine dönüşümü de kimyasal bozulma şeklidir (Fellows 2009 p. 57).

Yağlarda meydana gelen bozulmalar lipolitik enzimler, oksidatif reaksiyonlar ve hidrolitik reaksiyonlar sonucu meydana gelen kimyasal bozulmalardır. Lipid oksidasyonu (oksidatif ransidite) kızartılmış gıdalar, fındık, kurutulmuş meyve ve etler, süt tozu, kahve ve margarinin içerdiği yağlarda oluşan en önemli bozulmadır (Singh ve Anderson 2004 pp. 10-11).

Yağ, karbonhidrat, protein ve mikrobeyinleri kapsayan kimyasal reaksiyonlar tüketici tarafından kabul edilemez renk, koku ve tekstürel değişimler meydana getirirler.

Bu reaksiyonlar, depolama ısısı, ışık ve oksijene maruz kalma, gıdanın pH'sı ve aw değerine bağlı olarak gerçekleşebilirler (Fellows 2009 p. 56).

2.4.1.3. Mikrobiyal Gıda Bozulmaları

Mikrobiyal bozulmaları en yaygın bozulma sebebidir ve görülebilir değişimler (koloniler, yapışkanlık vb.), tekstürel değişimler (polimerlerin bozulması) ya da istenmeyen tat ve koku olarak ortaya çıkabilirler (Gram ve ark. 2002). Mikrobiyal bozulma sonunda gıda maddelerinde tat, koku ve tekstürde değişimler, gaz oluşumu, sıvı birikimi oluşabilmektedir (Erol 2007 p. 237).

Genel olarak mikroorganizma aktiviteleri gıda bozulmalarında önemlidir ve gıda kaynaklı hastalıklara sebep olabilirler. Mikrobiyal bozulmalar taze sebze, meyve, et, kanatlı eti, balık, fırıncılık ürünleri, süt ve meyve suyu gibi bozulabilir gıdalar açısından önemlidir (Singh ve Anderson 2004 p. 11). Lipaz aktivitesi içeren mikroorganizmalar ile oluşturulan hidrolitik ransidite sadece çiğ et, balık, süt ve süt ürünlerinde meydana gelir (Singh ve Anderson 2004 p. 17).

Bakteri, mantar, virüs ve parazitler bozulmaya sebep olan mikroorganizmalardır. *Bacillus cereus*, *E. Coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium* spp., *Salmonella* spp. gibi bazı bakteriler gıda kaynaklı hastalıklara sebep olabildiği gibi, bazı mikroorganizmalar hastalığa sebep olmadan sadece bozulmaya sebep olabilirler (Singh ve Anderson 2004 p. 14). Enterobacteriaceae familyasında patojen bakteriler bulunduğu gibi bozulma yapıcı bakteriler de bu grupta yer alırlar. Bu grup üyesi bazı bakteriler kalite ve güvenliğin indikatörü olarak kullanılabilirler (Baylis 2006 p. 639).

Zygosaccharomyces yüksek şeker ve tuz oranına sahip gıdalarda koloni oluşturarak bozulmaya sebep olan mayalardandır. *Saccharomyces* gıda ve içecek üretiminde yararlanılmasının yanında bozulmaya da sebep olarak istenmeyen etki gösterebilirler. *Penisilin* ve *Aspergillus* da gıda bozulmasına sebep olan diğer küflerdir. *Alternaria* gıdalarda yüksek toksijenik etkiye sahip mikotoksin üretmesinin yanı sıra depolanmış tahıllarda ve mayalanmış tahıllarda gelişmeksizin varlığı tazelik indikatörü olarak kullanılabilir. Mayaların birçoğu ise gıdalarda bulunup izole edilmesine rağmen bozulmaya sebep olmayabilirler (Blackburn 2006 p. 19). *Yarrowia lipolytica*, proteolitik aktiviteleri ile et ve süt ürünlerinde, *Candida*, *C. zeylanoides*, *C. tropicalis* ve

C. stellata et, balık ve kurutulmuş gıdalarda bozulmaya sebep olan mayalardandır (Fellows 2009 p. 60).

Hepatit A, rota virüs, Norwalk virüs, BSE (bovine spongiform encephalopathy-deli dana hastalığı) virüsler ve prionlar tarafından oluşturulan gıda kaynaklı hastalıklardan bazılarıdır. Parazit enfeksiyonları da özellikle et, balık ve su ürünlerinde meydana gelirler. *Diphyllobothrium latum* gibi sestodlar sığır, domuz ve balık etinde bulunur. *Trichinella spiralis* gibi nematodlar domuz ve balık eti ile su ürünlerinde bulunur. *Clonorchis sinensis* gibi trematodlar ise balık, su ürünleri ve bazı sebzelerde bulunurlar (Singh ve Anderson 2004 p. 14).

Mikrobiyal gıda bozulmaları hem mikroorganizmaların gelişimi hem de mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimlerin etkisiyle oluşurlar. Mikroorganizmaların gıda maddesinde belirlenebilir değişimlere neden olabilmesi için belirli bir sayıya ulaşmış olması gerekir (Erol 2007 pp. 237-238). Mikroorganizmaların bozulma potansiyeli, bir ürünün bozulması ile ilişkili metabolitler üreten saf kültür yeteneğidir (Gram ve ark. 2002). Ürün aynı olsa dahi coğrafi kaynak ve mikrobiyal gelişim ile ilişkili diğer faktörlerden dolayı bozulma farklı oluşabilir. Bozulmaya, bozulmuş gıdadan izole edilen hangi bakterinin sebep olduğunu belirlemek için detaylı kimyasal, mikrobiyolojik ve duyu analizler yapılması gereklidir (Gram ve Huss 1996).

Gıdaların mikrobiyal bozulmalarında mikroorganizma türü ve sayısı ile baskın mikroflora önemlidir. Aynı zamanda aw, pH, redoks potansiyeli (Eh), besin içeriği, protein, karbonhidrat, yağ gibi gıda bileşenleri, hidrojen peroksit, laktik asit, bakteriosin vb. antimikrobiyal maddeler ve koruyucu yapılar gibi iç faktörler, depolama, ambalajlama, sıcaklık, atmosferdeki gaz oranı, ışık ve oksijene maruz kalma gibi çevresel faktörler, ve bu faktörler arasındaki etkileşim bozulmada etkili bileşenlerdir (Borch ve ark. 1996; Erol 2007 pp. 21-36; Fellows 2009 p. 57). Ayrıca balıkların çeşidi, yaşam çevresi ve avlanma metodu da bozulmayı belirleyen etkenlerdendir (Aksan 2010 p. 95).

2.4.2. Etlerde Oluşan Bozulmalar

Et kimyasal yapısından dolayı kolay bozulabilir gıdalar arasında en üst sıralarda yer almaktadır (Doulgeraki ve ark. 2012). Et, kanatlı eti, balık ve süt yüksek protein

içeriğine sahip gıdalar olduğundan çok çabuk bozulabilmektedirler (Abdel-Aziz ve ark. 2016).

Etler, bakteri, küf ve mayaların büyümeleri için gerekli olan tüm besin elementlerini zengin bir şekilde içermektedir ve bu bileşenler taze ette kullanılabilir formda yeterli miktarda bulunmaktadır. Etlerin pH değeri, yüksek su miktarı mikroorganizmaların gelişimi için optimum değerlerdir. Oksidasyon-redüksiyon potansiyeli (O/R) tüm etlerde düşük olmasına rağmen, yüzeydeki O/R koşulları yükselme eğiliminde olduğundan aerobik, fakültatif aerobik ve anaerobik mikroorganizmaların üremeleri için uygun koşullar oluşmaktadır (Jay 2012 p. 78). Özellikle kıyma ve parça etlerde yüzey alanının genişlemesi sonucu mikrobiyal gelişime daha açık hale gelerek hem aerobik bakterilerin gelişimi sonucu *Pseudomonas* spp. baskın hale gelmesiyle hem de merkezde oluşan mikroaerofilik ve anaerobik gelişim ile renk, koku değişimi ve yapışkanlık meydana gelir (Aksan 2010 p. 89).

Kanatlı etleri ise bozulma açısından kırmızı etlere benzemektedirler. İçerdiği besin elementlerinin zenginliği, kesim işlemi, yüksek pH değeri (göğüs etinde 5,7-5,9), redoks potansiyeli, kesim hattında kullanılan su sebebiyle deride mikroorganizma gelişiminin artması, deri ile birlikte tüketime sunulması ve deri kıvrımları arasında mikroorganizmaların birikmesi kanatlı etlerinin çabuk bozulmasına sebep olmaktadır (Erol 2007 pp. 244-245).

Balıklar, mikroorganizmalar tarafından üretilen ve kendi yapısında bulunan enzimler etkisiyle ete göre daha hızlı parçalanmaya başladığı için bozulma reaksiyonları da daha hızlı gerçekleşir. Ayrıca balık amino asit, trimetilamin oksit, kreatin gibi protein içermeyen nitrojenli bileşikler, peptid, glikojen ve proteini yüksek oranda içermesi, yüksek pH (\geq pH 6.0) içeriği sebebiyle mikroorganizmaların gelişimi için uygun ortamı hazırlar (Aksan 2010 p. 95). Yüksek aw değeri ve doku yapısının yumuşak olması da balıkların çabuk bozulma sebeplerindedir (Erol 2007 p. 250). Ayrıca balıkların avlanma yeri ile satışa sunulan yer arasındaki uzak mesafe dolayısıyla bu süre mikroorganizmaların lehine işlemektedir. Yakalanma şekilleri de kontaminasyon açısından önemli olup başlangıç kalitesini belirleyebilmektedir. Yakalanma sırasındaki hasarlar, balığın yapısı, post mortem değişim hızı ve depolanma şartları balıkların çabuk bozulma sebeplerindedir. Balıkların soğuk kanlı olması da diğer etlerin aksine soğutmanın mikroorganizmalar üzerinde etkisiz kalmasına sebep olmaktadır (Fraser ve

Sumar 1998). Etlerde mikrobiyal bozulmaları engelleyici olan doğal bariyerlerin fasiası, bağ doku ve ligamentlerin balıklarda bulunmaması da bozulma açısından önemlidir.

Kasaplık hayvan etleri ilk kesildiği zaman steril olarak kabul edilir fakat kesim, yüzüm, parçalama ve depolama işlemleri sırasında çeşitli kontaminasyonlara maruz kalabilirler. Kanatlı etlerinin iç kısımları da genellikle sterildir ya da düşük ısılarda gelişemeyen birkaç mikroorganizma içerir, bozulma florası ise yüzeyde sınırlanmıştır.

Taze kesilmiş et buzdolabında saklandığı zaman yüksek nem içermesinden dolayı bakteri ve maya kontaminasyonuna maruz kalır (Jay 2012 p. 107).

Hastalık oluşturmadan önce gıdaların bozulma tespitini yapmak bazen mümkün olmamaktadır ve gıdalar duyuşal olarak bozulma özellikleri göstermese de mikroorganizma üremesi meydana gelmiş olabilir. 10^7 kob/g mikroorganizma tespiti edilesiye kadar gıdalarda koku veya tat değişimi olmayabilir ya da tüketici tutumluluk için gıdanın bozulduğunu kabul etmeyip tüketebilir bu da zehirlenmelere sebep olabilir (Sperber 2009 p. 11).

Genellikle 10^3 - 10^6 kob/ml-g mikroorganizma içeren gıdalarda bozulma meydana gelmemektedir (Aksan 2010 p. 89). 10^6 - 10^7 kob/g mikroorganizma sayısına sahip vakum paketlenmiş etler, bozulmuş olabilir ve kötü kokuya sahip olabilirler. 10^7 - 10^8 kob/g mikroorganizma içeren aerobik ortamda depolanmış etler bozulma kokusuna sahiptirler. Özellikle bozulma kokusundan ette bulunan serbest aminoasitler ve bunlarla ilişkili bileşikler (H_2S sülfür içeren amino asitlerden, NH_3 birçok amino asitten, indol triptofandan) sorumludur. 10^7 - 10^9 kob/ml-g arasında mikroorganizma bulunduran neredeyse tüm gıdalarda bozulma özelliği gözükür ve aerobik depolanmış etlerde yapışkan tabaka oluşur. Yapışkan tabaka, bakteri yığınlarının gelişimi, etin yapısal proteinlerinin sertliğinin kaybedip yumuşak, gevşek bir hal alması sonucu oluşur. Kanatlı etlerinde de yapışkan tabaka oluşmadan önce bozulma kokusu oluşmaya başlar (Jay 2012 p. 85). 10^8 - 10^{10} kob/ml-g'de ise ürünlerde belirgin yapısal değişimler meydana gelmektedir (Aksan 2010 p. 89). MAP tekniğiyle paketlenmiş balıklarda 4,5 hafta sonunda LAB ve toplam psikrofilik mikroorganizma sayısı 10^6 - 10^7 kob/g iken, okside ve acı lezzet, çok yumuşak tekstürel özellikler saptanmıştır (Paludan-Muller ve ark. 1998). Balık dokularında bulunan otolitik enzimler tekstürel bozulmalara sebep olan en önemli faktörlerdendir. Kötü koku ve kötü tat mikrobiyal aktivite sonucu oluşmasına rağmen, acı ve hafif ekşi tatlar yarı steril örneklerde gözlemlenir. Paludan-

Muller ve ark. (1998) yapmış olduğu çalışmada, bozulmanın sadece mikrobiyal kaynaklı olmadığını aynı zamanda otolitik enzimlerin de etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Başlangıçta bulunan bakterilerin yalnızca %10'u buzdolabında üreme yeteneğine sahiptir ve düşük oranda bozulmaya sebep olabilirler. Et ürünleri hazırlanırken 65 °C - 75 °C'ye kadar ısıtılarak vejetatif formların birçoğu öldürüldüğü için ürünlerin raf ömrü ısıtma sonrası oluşan kontaminasyonla ilişkili olarak belirlenebilir. Yüzey kontaminasyonu et ve et ürünlerinin raf ömrünü belirler (Borch ve ark. 1996).

2.4.3. Bozulmanın Sağlık Açısından Önemi

Gıda kaynaklı hastalıklar; canlı hücrelerin gıda ile birlikte tüketilmesi sonucu bağırsak epiteline kolonize olmasıyla gıda enfeksiyonu, canlı hücrelerin gıda ile birlikte tüketilmesiyle sporlanan, lizise olan hücrelerin toksin bırakması sonucu toksikoenfeksiyon ve canlı hücrelerin gıdada çoğalarak toksin üretmesi ve toksinin gıda ile birlikte alınmasıyla meydana gelen intoksikasyon olarak 3 ayrı grupta incelenmektedir (Zorba 2010 pp. 129-130). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention-CDC)'ne göre, her yıl yaklaşık 48 milyon insan gıda kaynaklı hastalıklara yakalanabilmekte, hastaların 128.000'i hastanede tedavi görmekte ve 3.000 kişi ise ölmektedir (Aday ve Yener 2015). WHO araştırmalarına göre ise 2010 yılında 420–960 milyon kişide gıda kaynaklı hastalık meydana gelmiş ve 310.000–600.000 kişi hastalıklar sonucu hayatını kaybetmiştir (WHO 2015).

Diare, kusma ve karın ağrısı gıda zehirlenmeleri durumunda en çok karşılaşılan semptomlardır. Kolera toksini gibi bakteriyel toksinler, cyclic adenosine monophosphate (cAMP) gibi ikincil habercilerin intraselüler miktarını değiştirerek intestinal sekresyonu ve hareketliliği artırır ve bu da diareye sebep olabilir. Beynin 4. ventrikülünde bulunan kusma merkezinin farklı uyarıcılar tarafından uyarılması sonucu kusma meydana gelir, stafilokokal enterotoksinler abdominal vagusun uyarılması sonucu bu sistemi aktive ederler (Eley 1996 pp. 5-6). Gıdalar bozulmaları sonucunda gıda zehirlenmeleri ve gıda enfeksiyonlarına neden olmaktadır (Erol 2007 p. 49).

Gıda enfeksiyonlarına neden olan mikroorganizmalar; *Salmonella*, *Campylobacter*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* (EIEC, EHEC), *Listeria monocytogenes*, *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Coxiella burnetti*, *Shigella dysenteria*, hepatit A, hepatit E

virüsü, norovirüsler, rotavirüs, kene kaynaklı ensefalitis, echovirüs, astrovirüs, avian influenzavirüsü, poliovirus, enterovirus, *Giardia duodenalis*, *Giardia lamblia*, *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium parvum*, *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp., *Balantidium coli*, *Entamoeba histolytica*, *Trichinella* spp., *Taenia saginata*, *Taenia solium*, *Echinococcus* spp., *Fasciola hepatica*, *Anisakis* spp. ve *Diphyllobothrium latum*' dur (Eley 1992 pp. 1-10; Erol 2007 p. 51; Zorba 2010 p. 130).

Gıda toksienfeksiyonları, *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholera*, *E. coli* (enteropatojenik, enterotoksijenik), *Bacillus cereus*, *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium difficile* tarafından meydana gelmektedir (Zorba 2010 p. 130).

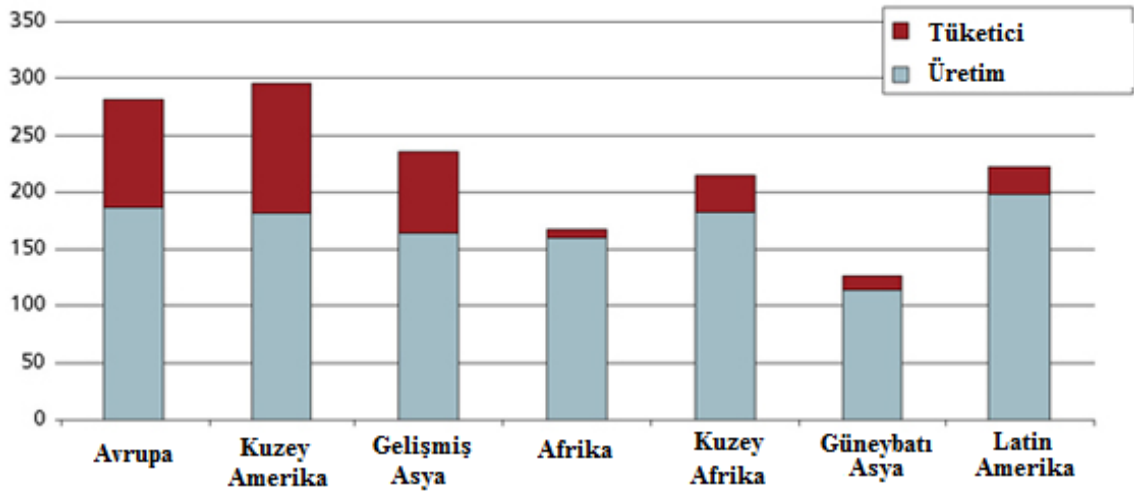
Gıda toksikasyonları ise, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Aspergillus* türleri, *Penicillium* türleri, *Fusarium* türlerinin gıda ile alımı sonucu oluşmaktadır (Erol 2007 p. 58; Zorba 2010 p. 130).

Patojen mikroorganizmalar veya onların metabolitleri ile kontamine gıdaların tüketilmeleri sonucu birçok hastalık meydana gelebilir fakat bu hastalıkların hepsi gıda zehirlenmesi olarak tanımlanamaz (Eley 1996 p.1).

Bozulmaya neden olan bazı bakteriler histamin ve diğer maddeleri üreterek alerjik reaksiyonlarla karakterize zehirlenmelerin oluşumuna neden olurlar. Hayvansal gıda kökenli infeksiyon ve zehirlenmeler sonucu hatalı ürünlerin toplanması, imhası, işgücü kaybı, hastalığın saptanması ve tedavi masraflarına bağlı önemli ekonomik kayıplar meydana gelmektedir (Erol 2007 pp.43-44).

Gıdaların tüketilmemesi ve çöpe atılması sonucu ekonomik olarak büyük kayıplar verilmektedir. Bu kayıpların önemli miktarı da gıda bozulmaları sonucu oluşmaktadır (Sperber 2009 pp. 2-3). Gıda yaşamın vazgeçilmez bir parçasıdır. Oysa, dünyada yaklaşık 1 milyar yetersiz beslenen (malnütrisyon) insan mevcuttur. Her yıl yaklaşık 4 milyon metrik ton gıda üretilir fakat bunun %30-50'si (1,2-2 milyar ton), kötü hasat, depolama ve nakliye koşulları ile pazar ve tüketici israfları dolayısıyla israf olmaktadır (Katsarova 2014). Gıda ve Tarım Örgütü'nün yapmış olduğu araştırmada her yıl 1,3 milyar ton gıdanın israf edildiği bildirilmiştir (FAO 2011). Yılda 263 milyon ton et üretilirken %20'si, balıkların ise %8'i tutulurken %35'i israf edilmektedir (FAO 2016a). Her yıl, zengin ülkelerde kişi başı 900 kg, gelir düzeyi düşük ülkelerde ise 460 kg gıda üretilmektedir. Kişi başı kaybedilen ve israf edilen gıda miktarları ise şekil 2-2' de verilmiştir. Gelişmiş ülkelerde bu kayıp 310 Amerikan dolarına, endüstrileşmiş

ülkelerde ise 680 Amerikan dolarına karşılık gelmektedir. Endüstrileşmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ise gıda israfı 630–670 milyon ton olmaktadır. 263 milyon ton etin %20'si israf olmakta bu da 75 milyon büyükbaş anlamına gelmektedir. Gıdalarda oluşan bu kayıp miktarı ile Latin Amerika ve Afrika'da 300 milyon, Avrupa'da ise 200 milyon kişinin gıda ihtiyacı karşılanabilirdi. Dünyadaki israfın $\frac{1}{4}$ 'ü korunabilseydi tüm dünyadaki 870 milyon kişi açlıktan korunabilirdi (FAO 2016b). ABD Tarım Bakanlığı'nın tahminine göre ise gıda kaybının %5'i korunabilirse bu miktar yaklaşık olarak günlük 320.000 kişinin kırmızı ve beyaz et ihtiyacını karşılayabilecektir (Cervený ve ark. 2009 p. 69). Avrupa Birliği'nde (AB), tedarik zinciri boyunca gıda atıkları yaklaşık 89 milyon ton veya kişi başına yıllık 180 kg olarak tahmin edilmiş ve önlem alınmadığı takdirde, 2020 yılına kadar yılda yaklaşık 126 milyon tona yükselmesi beklenmektedir (Katsarova 2014).



Şekil 2-2: Kişi Başı Gıda Kaybı ve İsrafı (kg/yıl) (FAO 2016b)

Ekonomik kayıplar bozulan gıdalardan kaynaklandığı gibi gıda zehirlenmeleri sonucu oluşan hastalıkların maliyetinden de kaynaklanmaktadır. Bu maliyetler; hastane masrafları, laboratuvar tetkikleri, hastalık sonucu üretim ve maaş kaybı, dava ve tazminat sonucu oluşan yasal giderlerdir (Eley 1996 p. 13).

Gıda bozulmaları sadece ekonomik kayıplara neden olmaz, aynı zamanda tüketilebilir gıda maddesi kayıplarına da yol açarlar (Erol 2007 p. 44).

2.4.4. Etlerde Bozulma Yapıcı Bakteriler

Kırmızı etlerde, *Pseudomonas* spp., *Moraxella* spp., *Acinetobacter*, Enterobacteriaceae, *Escherichia coli*, *Shewanella*, *Serratia*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Hafnia*, *Hafnia alvei*, *Lactic acid bacteria*, *Brochothrix*, *Brochothrix acinetobacter*, *B. thermosphacta*, *Carnobacterium* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp., *Aeromonas* spp., *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *Micrococcus* spp., *Psychrobacter* ssp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Alcaligenes*, *Streptococcus*, *Achromobacter*, *Photobacterium* spp., *Flavobacterium*, *Chromobacterium lividium*, *Proteus* bozulma yapan bakterilerin başında gelirler (Borch ve ark. 1996; Gram ve ark. 2002; Erol 2007 pp. 238-243; Aksan 2010 pp. 85-90).

Tavuklarda ise *Alcaligenes*, *Corynebacterium* spp., *Escherichia*, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Moraxella* spp., *Staphylococcus*, *Alteromonas*, *Proteus*, *Salmonella*, *Micrococcus* spp *Enterobacter* ve laktik asit bakterileri (LAB) bozulmaya sebep olan en önemli bakterilerdir (Aksan 2010 pp. 87-91).

Balıklarda bozulma yapan bakteriler arasında *Shewanella*, *Pseudomonas* spp., LAB, Enterobacteriaceae, *Photobacterium* türleri sayılabilir (Gram ve Dalgaard 2002). Ilıman su balıklarında psikrotrofik, gram negatif basillerden *Pseudomonas* spp., *Moraxella* spp., *Flavobacterium*, *Shewanella*, *Vibrionaceae*, *Acinetobacter* ve *Aeromonas* spp. yoğun olarak bulunmasına rağmen *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp., *Corynebacterium* spp. ve *Micrococcus* spp. gibi gram pozitif bakteriler de farklı oranlarda bulunabilirler (Gram ve Huss 1996). *Alcaligenes*, koliform grubu bakteriler, *Escherichia*, *Proteus*, *Serratia*, *Sarcina*, *Photobacterium phosphoreum* da balıklarda bulunabilen bozulmaya sebep olabilen diğer bakterilerdir (Jørgensen ve ark 2000; Erol 2007 pp. 249-252).

Genel olarak, *Pseudomonas* spp., *Shewanella*, *Lactobacillus*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Proteus*, maya ve küfler proteaz enzimi ile proteolitik aktivite göstererek peptid bağlarını parçalar, protein ve peptidlerin yıkılmasını katalize eder ve skatol, amonyak, alkol, amin, CO₂, hidrojen sülfür, indol ve merkaptan meydana getirerek bozulmaya sebep olurlar. *Brevibacterium*, *L. curvatus*, *Pseudomonas* spp., *Serratia*, *Staphylococcus*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *B. thermosphacta* ve bazı maya ve küfler lipaz enzimi ile lipolitik aktivite göstererek gliserol ester oluşumunu hidrolize ederek digliserid, serbest yağ asitleri,

gliserol ve monogliserid oluşturur ve oluşan yağ asitlerinin oksidasyonu, redüksiyonu, polimerizasyonu sonucu acılaşıma meydana gelir. Oksidatif aktivite gösteren oksidoredüktaz enzimine sahip *Lactobacillus* türleri ise miyoglobini metmiyoglobine çevirerek renk değişimine sebep olurlar (Erol 2007 p. 239).

Neredeyse tüm bakteriler aynı koşullarda gıdalarda bozulmaya sebep olabilirler. Başlangıçtaki farklılıklara rağmen aynı koşullar altında farklı gıdalarda benzer mikroflora ortaya çıkabilir. Bundan dolayı, *Pseudomonas* spp. ve gram negatif psikrofil mikroorganizmalar aerobik ve soğukta depolanan protein kaynaklı gıdalarda baskın olarak bulunabilirler (Gram ve ark. 2002). Ayrıca *Pseudomonas* spp. psikrotrofik bir bakteri olduğu için düşük sıcaklıkta muhafaza edilen gıdalarda bozulma indikatörü olarak kullanılabilir (Martínez ve ark. 2011).

Soğukta depolama ya da modifiye atmosfer paketleme gibi dış koşullarda yapılan değişiklikler bozulmanın geciktirilmesi için kullanılan yöntemlerdendir. Gıdaların düşük sıcaklıkta depolanması bozulmanın önüne geçmemekle beraber psikrofil mikroorganizmalardan kaynaklanan bozulmaları yavaşlatmaktadır. Bazı gram pozitif çubuklar (laktik asit bakterileri), spor oluşturan bakteriler (*Clostridium*) özellikle de gram negatif, çubuk ve spor oluşturmeyen bakteriler (*Pseudomonas* spp.) bu gruba giren bakterilerdendir. Birçok küf ve maya da psikrofil olmasına rağmen, düşük sıcaklıklarda bakterilerle iyi rekabet edemezler. Fakat asidik gıdalar, yüksek tuz ve şeker içeren gıdalarda bakteriler iyi gelişemedikleri için küf ve mayalar bu gıdalardaki bozulmalar için yüksek öneme sahip olurlar (Huis in't Veld 1996).

Yüksek Eh, gıdada bulunan su miktarı ve düşük sıcaklık *Pseudomonas*'ların üremesi için uygun ortamı meydana getirirler. O₂ geçirgenliği olan paket kullanıldığında, buzdolabında saklanan etler yüksek pH ve kötü koku ile birlikte gram negatif mikroorganizmalara maruz kaldığında *Pseudomonas* spp. baskın flora haline gelirler (Jay 2012 p. 99).

Tablo 2-3: Eterlerde Bozulmaya Sebep Olan Bakteriler-1

Bakteri	Et	Kanatlı	Balık	Kaynak
<i>Pseudomonas putida</i> <i>P.mephitica</i> <i>P. syringae, P. fragi</i>	+	+		Ercolini ve ark. 2006; Aksan 2010 pp. 87-91
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		+	+	Aksan 2010 pp. 87-91; Alonso-Hernando ve ark. 2013
Enterobacteriaceae	+		+	Paludan-Muller ve ark. 1998; Lindberg ve ark. 1998; Ercolini ve ark. 2006
<i>Enterobacter agglomerans</i>	+		+	Paludan-Muller ve ark. 1998; Lindberg ve ark. 1998; Ercolini ve ark. 2006
<i>Escherichia coli</i>		+	+	Lindberg ve ark. 1998; Alonso-Hernando ve ark. 2013
<i>Rahnella spp.</i>	+	+		Ercolini ve ark. 2006; Säde ve ark. 2013
<i>Rahnella aquatilis</i>	+		+	Paludan-Muller ve ark. 1998; Lindberg ve ark. 1998; Ercolini ve ark. 2006
LAB	+		+	Paludan-Muller ve ark. 1998; Ercolini ve ark. 2006
<i>Serratia proteamaculans</i>	+			Ercolini ve ark. 2006
<i>Pantoea ananatis</i>	+			Ercolini ve ark. 2006
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	+	+	+	Paludan-Muller ve ark. 1998; Alonso-Hernando ve ark. 2013
<i>Serratia grimesii</i>	+			Ercolini ve ark. 2006

Tablo 2-4: Eterde Bozulmaya Sebep Olan Bakteriler-2

Bakteri	Et	Kanatlı	Balık	Kaynak
<i>Lactobacillus graminis</i> <i>Lactobacillus carnosum</i>	+			Ercolini ve ark. 2006
<i>Lactobacillus sakei</i>	+		+	Paludan-Muller ve ark. 1998; Ercolini ve ark. 2006
<i>Lactobacillus viridescens</i> <i>Lactobacillus maltaromicus</i> <i>Lactobacillus curvatus</i>			+	Paludan-Muller ve ark. 1998
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>			+	Paludan-Muller ve ark. 1998
<i>Carnobacterium</i> spp.	+		+	Paludan-Muller ve ark. 1998
<i>Carnobacterium divergens</i>	+		+	Paludan-Muller ve ark. 1998; Ercolini ve ark. 2006
<i>Carnobacterium piscicola</i> <i>Carnobacterium gallinarum</i>			+	Paludan-Muller ve ark. 1998
<i>Leuconostoc</i> spp. <i>Leuconostoc kimchi</i> <i>Leuconostoc carnosum</i> <i>Leuconostoc gelidum</i>	+			Ercolini ve ark. 2006
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+		+	Paludan-Muller ve ark. 1998
<i>Staphylococcus</i> spp. <i>Staphylococcus xylosus</i> <i>S. succinus</i> <i>S. saprophyticus / S. cohnii</i>	+			Ercolini ve ark. 2006
<i>Citrobacter freundii</i>	+		+	Lindberg ve ark. 1998
<i>Moellerella wisconsensis</i>	+		+	Lindberg ve ark. 1998

Tablo 2-5: Etlerde Bozulmaya Sebep Olan Bakteriler-3

Bakteri	Et	Kanatlı	Balık	Kaynak
<i>Shewanella putrefaciens</i>	+	+	+	Aksan 2010 pp. 87-91
<i>Serratia liquefaciens</i>	+		+	Paludan-Muller ve ark. 1998; Lindberg ve ark. 1998
<i>Sarcina</i>			+	Paludan-Muller ve ark. 1998
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	+	+	Lindberg ve ark. 1998; Alonso-Hernando ve ark. 2013
<i>Yersinia ruckerii</i>			+	Lindberg ve ark. 1998
<i>Vibrio</i> spp. <i>Vibrio / Photobacterium</i> spp. <i>V. marinus</i>			+	Paludan-Muller ve ark. 1998
<i>Aeromonas hydrophila</i>			+	Paludan-Muller ve ark. 1998

Modifiye atmosfer paketlenmiş etlerde laktik asit bakterileri dominant flora olarak gözlemlenebilir (Doulgeraki ve ark. 2010). MAP tekniği gram negatif bakterilerin üremelerini azaltırken düşük sayıda olmalarına rağmen LAB'ın dominant flora haline gelmesine sebep olurlar (Paludan-Muller ve ark. 1998). MAP gıdalarda 7 gün depolama sonunda; *Pseudomonas* spp., mezofilik ve psikrotrofik aerobik bakteriler 10^7 kob/g üzerinde iken diğer mikroorganizmalar (Enterobacteriaceae ve *B. thermosphacta*) 10^5 - 10^6 kob/g arasındadır. Tüm bakteriler 14 gün sonra yaklaşık 10^8 kob/g ile en yüksek değere ulaşırlar. Yüksek oksijen içeriğine sahip MAP ile paketlenmiş sığır etinde *Pseudomonas* spp. ve *Lactobacillus sakei* tespit edilmiştir. *Rahnella* yüksek konsantrasyon oksijen varlığında inhibe edildiği için ya da diğer bozulma bakterileri tarafından baskılandığı için özellikle buzdolabında saklanan etlerde bozulmanın son dönemlerinde baskın flora olarak gözükmektedir (Ercolini ve ark. 2006). Yüksek pH ve düşük glukoz içeren etlerde ise amino asitleri parçalayan *Acinetobacter* ve *Moraxella* gelişim göstererek bozulmaya ve kokuşmaya sebep olurlar

(Aksan 2010 p. 87). Enterobacteriaceae da psikrotrofik olduğu için buzdolabında saklanan et, balık süt gibi gıdalarda kolayca üreyebilirler. Lindberg ve ark. (1998) yapmış olduğu çalışmada balıklarda %31, paketlenmiş kıymalarda ise %100 oranında Enterobacteriaceae saptanmıştır. Bozulmuş gıdanın yüzeyi yapışkan tabaka ile kaplandığında ise anaerobların gelişimi için uygun ortam sağlanmış olunur (Huis in't Veld 1996). *Shewanella putrefaciens* aerob ve anaerob koşullarda gelişerek H₂S ile metilsülfid üretir ve böylece renk değişimine sebep olduğu gibi kokuşmaya da neden olurlar (Aksan 2010 p. 88).

Et ve balıkta vakum paketlenme gibi atmosfer değişimleri *Pseudomonas*'ları baskılar ve laktik asit bakterileri, Enterobacteriaceae ve bazen de *Brochothrix thermosphacta* miktarını değiştirirler (Gram ve ark. 2002). *Clostridium* ve koliform grubu bakteriler ise karbonhidratları parçalayarak asit ve gaz oluşumunda etkili olmaktadır. *Alcaligenes*, *Clostridium*, *Pseudomonas* spp. ve *Proteus* proteinleri parçalayarak hidrojen sülfid, amonyak, indol, skatol, merkaptan, aminleri oluştururlar ve putrit bozulma sonucu kokuşmaya sebep olurlar (Aksan 2010 pp. 87).

Küf ve mayalar, et işlenen ortamlarda aynı anda birçok yerde bulunabilme özelliğine sahip olmaları nedeniyle *Penicillium*, *Cladosporium* ve *Mucor* da olmak üzere bulunması beklenen mikroorganizmalardır. *Candida* ve *Rhodotorula* da et ve kanatlı ürünlerinde bulunması beklenen başlıca küflerdir. Bakteriler küflerden daha hızlı üreyerek yüzeyde bulunan ve mayaların gelişimi için önemli olan oksijeni tüketirler bundan dolayı etlerin üzerinde bakteriler serbestçe ürediğinde mayalar neredeyse hiç üreyemezler. Etlere mayaların üreyebilmesi için bakterilerin baskılanmış ya da ölmüş olması gerektiği için tetrasiklin gibi antibiyotikle hayvanlar tedavi edildiğinde ve etin yüzey kısımlarında bakteriyel gelişim için yeterli nem bulunmadığı zamanlarda mayalar bozulma açısından predominant flora olarak bulunabilirler. Kanatlı etinde de antibiyotikler bakteriyel florayı baskılamadığı sürece küfler bozulma açısından önem teşkil etmezler. Sığır çeyreklerinde ise durum bunun tersi olarak gelişir, koruyucu olarak antibakteriyel ajanların kullanıldığı ya da dondurulma sonucu bakteriyel yük azaltıldığında mayalar nadiren gelişebilirler. Kanatlı etinde de antibiyotikler kullanılmasına rağmen mayalar birincil bozulma ajanı olabilirler (Jay 2012 p.70). *Candida*, *Yarrowia*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces* ve *Torulopsis* kanatlı etlerinde bulunan en önemli mayalardır (Aksan 2010 p 91).

Thamnidium chaetocladioides, *T. elgans*, *Cladosporium herbarum*, *Mucor mucedo*, *M. lusitanicus*, *Rhizopus*, *M. racemosus*, *Chrysosporim* ve *Sporotrichum* etlerde bozulma sonucu görünümde değişikliklere sebep olurlar (Aksan 2010 pp. 86-87).

2.4.5. Bozulma Sonucu Oluşan Ürünler

Proteaz içeren mikroorganizmalar gıdalardaki proteinlerde oluşturdukları deaminasyon aktiviteleri sonucu amonyak, organik asit, hidrojen sülfid, merkaptan gibi komponentlerin açığa çıkmasına sebep olurlar (Singh ve Anderson 2004 p. 17). Özellikle sülfür içeren hidrojen sülfür, metil merkaptan ve dimetil sülfid gibi aminoasitlerin yıkımlanması sonucu kötü koku oluşabilir (Huis in't Veld 1996). Fakültatif anaerob *Enterobacter*, *Hafnia*, *Proteus* ve *Serratia* gelişimi sonucu etlerde amino asitlerin yıkımlanması ile merkaptan, amin, metilsülfid ve amonyak oluşarak kokuşma meydana gelir. Tavuklarda *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas* spp., *Moraxella* ve *Acinetobacter* sülfid benzeri koku oluştururlar (Aksan 2010 pp. 88-90). Balıklarda ise azotlu olmayan bileşiklerin parçalanması sonucu oluşan kadaverin, putresin, histamin, trimetilamin, indol, H₂S, NH₃, merkaptan, dimetilsülfid ve isobütirik asit, asetik asit, isovalerik asit gibi uçucu yağ asitleri kokuşma sebebidirler (Aksan 2010 p. 95).

Achromobacter, *Pseudomonas* spp. ve lipolitik mayaların etkisi ile yağların oksidasyonu sonucu meydana gelen aldehit ve asitler de kötü koku oluşumuna sebep olurlar. Mikroorganizmaların gelişimi sonucu propiyonik, formik, laktik ve bütirik asit ile yağ asitlerinin oluşumu sebebiyle etlerde ekşi tat ve koku meydana gelmektedir (Aksan 2010 pp. 85-87).

Nychas ve ark. 2007 senesinde yapmış oldukları tablodan değiştirilerek oluşturulan tabloya göre; kükürt bileşikleri (sülfidler, dimetilsülfid, dimetildisülfid, dimetiltrisülfid , metantiyol, hidrojen sülfid, metil merkaptan), esterler (metil esterler (asetat), etil esterler (asetat)), aromatik hidrokarbonlar, alifatik hidrokarbonlar, aldehitler (2-metilbütanol ketonlar) alkoller (etanol, metanol, 2-metilpropanol, 2-metilbütanol) ve amonyak gram negatiflerle kontamine olmuş gıdalarda kötü kokunun oluşma sebeplerindedir (Nychas ve ark. 2008).

Aseton, n-laktat, tiramin, pH ve gaz içeriği, et ve et ürünlerindeki bakteriyel bozulmanın tespitinde kimyasal indikatör olarak kullanılabilirler (Borch ve ark. 1996).

Sarımsak ve çürümüş soğan kokusu ile karidesten izole edilen sülfür içeren bileşikler deniz ürünü ve çeşitli gıdaların bakteriyel kontaminasyonu sonucu son ürün olarak ortaya çıkarlar. n-bütirik asit, sebze, meyve, et, süt ve balık ürünlerinde bozulmanın sebebi olarak kullanılmaktadır. n-valerik asit, n-bütirat, glukoz, glukonik ve 2-oksoglukonik asit, asetik asit, L- ve D-laktik asit, etanol, metil etil keton, aseton, dimetil sülfid, dimetil disülfid, diasetil, 3-metilbütanol bozulma sonucu açığa çıkan diğer kimyasal bileşiklerdir (Dainty 1996; Gram ve ark. 2002).

Nychas ve ark. 2007 senesinde yapmış oldukları tablodan değiştirilerek oluşturulan tabloya göre; laktik asit bakterileri sonucu bozulmuş etlerde L-Laktik asit, D-Laktik asit, asetik asit, aseton/diasetil, hidrojen peroksit, formik asit, etanol son ürün olarak meydana gelmektedirler (Nychas ve ark. 2008).

Balıklarda, trimetilamin (TMA), H_2S , $(CH_3)_2S_2$, ester, (metilbütanol) ortaya çıkan diğer bileşenlerdir (Gram ve ark. 2002). Deniz ürünleri bozulduğunda ortaya çıkan TMA balıktaki kokuşmaya ve amonyak benzeri kokuya sebep olur. *Aeromonas* spp., soğuğa toleranslı Enterobacteriaceae, *Vibrio* spp., *P. phosphoreum* ve *Shewanella* trimetilamin oksidi (TMAO) trimetilamine (TMA) çevirebilirler (Gram ve Dalgaard 2002).

Aerobik koşullarda depolanan etlerde ortaya çıkan H_2S , Enterobacteriaceae için indikatör olarak kullanılabilir (Dainty 1996).

Etlerin mikroorganizmalar ile kontamine olması ve bozulması sonucu açığa çıkan birçok madde bulunsa da bunların arasında biyojen aminler en önemli metabolitlerdendir. Biyojen aminlerin önemi halk sağlığı açısından yaratabileceği tehditlerin yanında bakteriyel kalitenin, gıdanın tazeliğinin ve bozulmasının göstergesi olarak kullanılabilmesinden kaynaklanmaktadır.

2.5. Biyojen Aminler

Biyojen aminler, düşük molekül ağırlığına sahip, biyolojik aktivite gösteren, hayvan, bitki ve mikroorganizmaların normal metabolizmaları sırasında oluşabilen ve parçalanabilen organik bazlardır. Birçok biyojen amin vücut sıcaklığının düzenlenmesi, mide hacmi, mide pH'sı ve beyin aktivitesi gibi birçok insan ve hayvan fizyolojik fonksiyonlarında önemli rol oynarlar (ten Brink ve ark. 1990). Bitkisel, mikrobiyal ve hayvansal hücreler için önemli azotlu bileşiklerdir (Silla Santos 1996).

Askar ve Treptow (1986) ile Maijala ve ark. (1993) tarafından ise biyojen aminler, aldehit ve ketonların aminasyon veya transaminasyonu ile ya da aminoasitlerin dekarboksilasyonu ile şekillenen azotlu bileşenler şeklinde tanımlanmıştır (Silla Santos 1996).

Protein veya serbest aminoasit içeren ve mikrobiyal ya da biyokimyasal etkilere maruz kalan tüm gıdalarda biyojen amin oluşumu beklenebilir (Silla Santos 1996).

Birçok biyojen aminin adlandırılmasında köken aldığı amino asitten faydalanılır; histamin-histadinden, tiramin-tirozinden, betafenilalamin (2-feniletilamin)-fenilalaninden, triptamin-triptofandan (Bodmer ve ark. 1999).

Biyojen aminler kimyasal yapılarına göre; alifatik (putresin, kadaverin, spermin, spermidin); aromatik (tiramin, feniletilamin) ve heterosiklik (histamin, triptamin) olarak 3'e ayrılırlar (Silla Santos 1996). Amin grubu sayılarına göre ise; monoamin (tiramin, feniletilamin), diamin (putresin, kadaverin) ve poliamin (spermin, spermidin) olarak 3'e ayrılırlar (Linares ve ark. 2011). Bardócz ve ark. (1993), Maijala ve ark. (1993), Halász ve ark. (1994)'dan yapılan alıntıya göre, poliamin, putresin, spermidin, spermin ve kadaverin gibi aminler canlı hücrelerin zorunlu bileşenleridir. Bu aminlerin protein sentezi, nükleik asit fonksiyonlarının düzenlenmesi ve hücre membranlarının dengede tutulmasında önemli görevleri vardır (Silla Santos 1996). Ayrıca histamin de nöromodülatör olarak önemli görev üstlenmiştir (Premont ve ark. 2001).

Biyojen aminler fermente gıdalar da dahil olmak üzere birçok bitkisel ve hayvansal gıdada bulunabilirler ve başta histidin olmak üzere birçok aminoasidin mikrobiyal dekarboksilasyonu ile meydana gelirler (Cinquina ve ark. 2004). Biyojen aminler, balık, balık ürünleri, et ürünleri, süt ürünleri, şarap, bira, sebze, meyve, çikolata, soya fasülyesi ve ürünleri, yumurta, peynir, fermente gıdalar gibi birçok gıdada bulunmaktadırlar (Shalaby 1996; Silla Santos 1996). Yiyecek ve içeceklerde bulunan en önemli biyojen aminler ise histamin, beta-fenilalamin, tiramin, triptamin, putresin, kadaverin, spermin ve spermidindir (Bodmer ve ark. 1999).

Tablo 2-6: Bakteriyel Bozulma Sonucu Oluşan Amino Asit ve Biyojen Aminler (Gram 2009 p. 92)

Amino Asit	Biyojen Amin	Reaksiyon
Histidin	Histamin	Dekarboksilaz
Tirozin	Tiramin	Dekarboksilaz
Lizin	Kadaverin	Dekarboksilaz
Arjinin	Agmatin	Dekarboksilaz
L- fenilalanin	β - Fenilalanin	Dekarboksilaz
Ornitin	Putresin	Dekarboksilaz
	Spermidin	Spermidin Sentaz
	Spermin	Spermin Sentaz

Birçok gıda biyojenik amin üretebilen mikroorganizmalar tarafından kolayca bozulabilirler (ten Brink ve ark. 1990). Gıdalarda biyojen amin oluşabilmesi için yalnızca mikroorganizma varlığı yeterli olmamakla birlikte bakterilerin dekarboksilaz deaminaz aktivitesine sahip olması, çevre koşullarının enzim aktivitesine uygun olması ve uygun aminoasit substratının bulunması gerekir (Spano ve ark. 2010). pH, sıcaklık, tuz ve glukoz konsantrasyonu, organik asit ve şeker konsantrasyonu, fermentasyon, iyi kaliteli hammadde seçimi, işleme sırasında sterilite koşullarına uyulması, O₂ ve CO₂ oranları, saklama yöntemleri, alkol içeriği, bakterilerin gıda içerisinde bulunma süresi, dekarboksilaz veya deaminaz pozitif mikroorganizmaların ve aminoasit öncü maddelerinin bulunması gıdalarda biyojen amin oluşumunu etkileyen faktörlerdir (Silla Santos 1996; Arena ve ark. 2008; Karahan 2003; Ladero ve ark. 2011).

2.5.1. Biyojen Aminlerin Sağlık Açısından Önemi

Biyojen aminler, insan ve hayvanlarda biyolojik olarak aktif aminleri içeren gıdaların alımı sonucu zehirlenmelere sebep olan toksik maddelerdir (Shalaby 1996). Hayati birçok biyokimyasal fonksiyona sahip biyojen aminler gıdalar ile fazla alındığında zehirlenmeye neden olabilirler, küçük bir kısmı ise bağırsaklarda amin oksidaz (monoamin oksidaz (MAO) ve diamin oksidaz) aracılığıyla daha az aktif olan formuna dönüşürler (Spano ve ark. 2010).

Histamin biyojen aminler arasında en önemli gıda kaynaklı intoksikasyon sebebidir. Histamin zehirlenmesi özellikle peynir veya balık yenilmesinden sonra ortaya çıkmaktadır.

Stratton (1991)'dan yapılan alıntıya göre, histamin insan ve diğer türlerin hücre membranlarında iki tip reseptör (H_1 ve H_2) ile etkileşerek toksik etki gösterir. Histamin, periferik kan damarları, kılcal damarlar ve arterlerin dilatasyonuna neden olarak hipotansiyon, kızarma ve baş ağrısına sebep olur (Silla Santos 1996). H_1 reseptörleri aracılığıyla bağırsak düz kaslarındaki daralma sonucu abdominal kramplar, diare ve kusmaya neden olur. Mide asit salgılanması paryetal hücrelerde bulunan H_2 reseptörleri aracılığıyla histamin tarafından düzenlenir fakat bu olayın histamin zehirlenmesi vakalarında görülen belirtilerin bazılarında sorumlu olup olmadığı bilinmemektedir (Taylor 1986). Histamin, tiriptamin, B-feniletilamin ve tiramin psikoaktif ve vazoaaktif gibi önemli fizyolojik etkilere sahip aktif aminlerdir (Shalaby 1996).

Biyojen aminler dekarboksilaz aktivitesi gösteren mikroorganizmalar tarafından üretilbildikleri için biyojen aminlerin varlığı gıdaların bozulduğunun göstergesi olabilir (Karahan 2003). Rokka ve ark. (2004) yapmış olduğu çalışmada kadaverin, tiramin ve putresin depolama süresi ve sıcaklığı konusunda indikatör görevi üstlenerek MAP ile ambalajlanmış tavuklarda mikrobiyal kaliteyi gösterdiğini belirtmişlerdir.

Kadaverin, histamin ve putresinin toplamı ile elde edilen biyojen amin indeksi etlerde tazeliğin tespiti amacıyla kullanılabilir (Kaniou ve ark. 2001). Fermente olmayan gıdalarda da biyojen amin varlığı istenmeyen mikrobiyal aktiviteyi yani gıdanın bozulmuş olduğunu göstermektedir (ten Brink ve ark. 1990; Millán ve ark. 2007; Spano ve ark. 2010). Yüksek düzeylerde tespit edilen BA ise gıdaların bozulduğunun göstergesidir (Linares ve ark. 2011). Bundan dolayı amin miktarı tespit edilerek bu düzey bozulma indikatörü olarak kullanılabilir. Histamin, putresin ve kadaverin genellikle balıklar ve etlerin bozulması sırasında yükselirken normalde yüksek düzeylerde saptanan spermin ve spermidin sayıca azalmaktadır (ten Brink ve ark. 1990). Gıdalardaki biyojen aminin yükselmemesi için ürünlerdeki başlangıç florası düşük düzeyde olmalı, işleme aşamasında hijyenik kurallara uyulmalı, depolama sürecinde ise kontaminasyonun ve mikrobiyal üremenin düzenli kontrolü yapıp engellenmelidir (ten Brink ve ark. 1990).

Gıdaların olgunlaşması sırasında putresin, tiramin ve kadaverin oluşmaktadır (Karahan 2003). Ayrıca histamin, tiramin, agmatin, putresin, kadaverin, spermin ve

spermidin gıdaların tazeliğinin ve bozulmasının belirlenmesinde indikatör olarak kullanıldığı gibi toksisiteleri açısından da önemlidirler (Silla Santos 1996).

Nöromodülatörlerdeki amin seviyelerindeki dengesizlikler, distoni, Parkinson hastalığı, şizofreni, ilaç bağımlılığı ve duygu-durum bozukluğu gibi birçok patolojik durumu bozulmuş beyin fonksiyonlarının sebebi olarak düşünülmektedir (Premont ve ark. 2011).

Ayrıca aminler, insan sağlığını tehdit eden ve hayvanlar için de karsinojenik etkiye sahip nitrozamin oluşturan öncül madde gibi davrandığı için mutajenik ön maddeler olarak incelenmişlerdir (Shalaby 1996). Putresin ve kadaverin kanserojen nitrozaminler oluşturmak üzere nitrit ile reaksiyona girebilirler (Fernández ve ark. 2007). Nitrozoprolin ve nitrozopiperidin bu reaksiyon sonucu oluşan karsinojenik nitrozaminlerdir (Karahana 2003). Tüm bu zararlarından dolayı biyojen aminler erken dönemde tespit edilmeli ve gıdalarda biyojen aminin birikimi engellenmelidir.

2.5.2. Histamin, Putresin ve Önemi

Histaminin alerjik gıda zehirlenmesine sebep olduğu konusunda birçok araştırma vardır (Ohashi ve ark.1991). Gıda zehirlenmesi konusunda birçok salgına sebep olmuştur ve bu zehirlenmeler histaminden zengin gıdaların tüketimi sonucu meydana gelmiştir. Özellikle uskumru balığı tüketimi sonrası salgınlar oluşsa da peynir de bu salgınlarda önemli bir etmendir. Şarap, kuru sosis, lahana turşusu, miso ve soya sosu gibi fermente besinler diğer aminlerle birlikte histamin de içerebilen gıdalardır (Stratton ve ark. 1991).

Uskumru balığında yüksek miktarda serbest histidin bulunur ve sıcaklık değişimlerine maruz kalındığında mikroorganizmalar tarafından histamine çevrilir (ten Brink ve ark. 1990). Özellikle *Scombridae*, *Scomberesocidae*, *Pomatomidae*, *Coryphaenidae*, *Carangidae*, *Clupeidae*, *Engraulidae* familyalarındaki balıklar histamin zehirlenmesine neden olabilmektelerdir (Taylor 1986). Ayrıca bozulmuş balıktaki kadaverin ve putresin de histamini parçalayan enzimi inhibe ederek zehirlenmelere sebebiyet verebilirler (Karahana 2003). Histamin zehirlenmesi ile alerjik reaksiyonlar birbiriyle çok karışmaktadır. Bunun ayrımını yapabilmek için ise, tüketilmiş gıdaya karşı daha önce alerjik reaksiyon gelişip gelişmediği tespit edilmeli, gruptaki diğer kişilerde zehirlenme belirtilerinin olup olmadığı saptanmalı, şüpheli gıdadaki histamin seviyeleri araştırılmalıdır (ten Brink ve ark. 1990).

Sekonder biyojen aminler ise hem histaminin toksisitesini arttırarak hem de nitriti karsinojenik nitrozamine çevirerek etkilerini gösterebilirler (Cinquina ve ark. 2004).

Histamin, putresin, kadaverin ve spermidin özellikle balıklarda kalite göstergesi olarak kullanılabilirdi için bu aminlerin gıdadaki miktarının saptanması bu açıdan da önemli bir yer tutmaktadır (Cinquina ve ark. 2004). MAP tavuklarda ise putresin, tiramin ve kadaverin kalite indikatörü olarak kullanılabilir (Rokka ve ark. 2004).

Histamin organoleptik özellikleri etkilemezken halk arasında giderek artan gıda intoleransına sebep olur. Bu nedenle, histamin ve diğer zararlı biyojen aminlerin varlığı mümkün olan en düşük seviyede tutulmalıdır (Bodmer ve ark. 1999). Gıdalarda izin verilen üst limit 100 mg histamin/kg iken alkollü içeceklerde 2 mg/1 kadar bulunması yasal olarak kabul edilmiştir (ten Brink ve ark. 1990). $5\mu\text{g}^{-1}$ putresin tespiti ise kaslarda otolitik bozulma başladığının sinyalidir (Rodríguez ve ark. 1999).

Yüksek proteolitik enzim aktivitesine sahip mikroorganizmalar, serbest histaminin kullanılabilirliğini arttırarak gıdalarda histamin oluşumu riskini yükseltirler. Bazı balık türleri (uskumrugiller, ringa ve hamsi) gibi zengin serbest histamin içeriğine sahip çığ materyal veya gıdalar yüksek miktarda histamin içerdiği için tehlikelidirler. Ayrıca, balık ve su ürünlerindeki serbest histidin seviyesi endojen ve kontamine edici proteaz aktivitesi dolayısıyla depolanma sürecinde dahi yükselmektedir. Bu nedenle balık ve balık ürünlerindeki histamin seviyesini mümkün olabilen en düşük seviyede tutabilmek için yakalandıktan hemen sonra proteolitik aktiviteleri ve dekarboksilasyonu inhibe edilmelidir. Birçok çalışma açıkça göstermektedir ki ürünlerin buzun üzerinde depolanması histamin oluşumunu tamamen yok etmese dahi önemli ölçüde azaltmaktadır (Bodmer ve ark. 1999).

2.5.3. Histamin ve Putresin Üreten Mikroorganizmalar

Gıdalarda fermentasyona neden olan laktik asit bakterileri (LAB) toksik ve patojenik bakteriler arasında kabul edilmemesine rağmen bazı türleri biyojen amin üretebilirler (Spano ve ark. 2010). Histidin dekarboksilaz pozitif olan bazı LAB histamin üretiminden sorumludurlar (ten Brink ve ark. 1990).

Enterobacteriaceae et ürünlerinde bozulma sonucu kadaverin, putresin ve histamin üretimine sebep olurlar (ten Brink ve ark. 1990; Bover-Cid ve Holzapfel 1999). *Proteus*, *Clostridium*, *Morganella morganii*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*

buchneri ve *Lactobacillus delbrueckii* gibi *Lactobacillus* türleri ve *Bacillus*, peynirde biyojen amin üretiminden sorumlu olduğu gibi balık ve etlerde daha çok Enterobacteriaceae ve *Enterococcus* ön plandadır (Önal 2007). Bozulan balıklarda ayrıca *Morganella morganii* de putresin üretimine neden olmaktadır (de las Rivas ve ark. 2006).

Etlerde, *Pediococcus*, *Lactobacillus* spp., *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus arabinose*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *L. divergens*, *L. carnis*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* spp., *Streptococcus*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Hafnia alvei*, *Propionibacteria* ve koliformlar biyojen amin oluşumuna sebep olurlar (Silla Santos 1996; Shalaby 1996).

Balık ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda Enterobacteriaceae'nın yanı sıra *Clostridium*, *Bacillus* ve *Lactobacillus* cinslerinden bakterilerin histidini dekarboksile ettiği belirtilmiştir. N-grup bakteriler, *Cedecea lapagei*, *M. morganii*, *Enterobacter aerogenes*, *K. planticola*, *Plesiomonas shigelloid*, *P. histaminum* *K. pneumoniae*, *Pseudomonas* spp., *Vibrio alginolyticus*, *C. neteri*, *Staph. xylosus*, *Acinetobacter lowffi*, *Aeromonas hydrophila*, C-grup bakteriler, *Photobacterium phosphoreum*, *Pleisomonas higelloides*, *Hafnia alvei*, *Providencia* ve *Serratia*'nın farklı türleri, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Alteromonas putrefaciens* de yer almaktadır (Shalaby 1996; Karahan 2003).

2.6. Bozulma Tespit Metodları

Kalitenin ve raf ömrünün değerlendirilmesi amacıyla kullanılan mikrobiyolojik ve kimyasal metodların geliştirilmesi için bozulma yapan mikroorganizmaların ve bozulma ile ilişkili metabolitlerin bilinmesi gerekir (Gram ve ark. 2002).

Bir gıdanın bozulup bozulmadığını tespit etmek amacıyla mikrobiyolojik, fiziksel ve kimyasal analizler yapılmaktadır.

Mikrobiyolojik analiz amacıyla mikroorganizmalar uygun besi yerlerine ekilerek kültürel olarak bozulma tespit edilmeye çalışılmaktadır. Ohashi ve ark. (1991) yapmış oldukları çalışmada tazelik tespiti amacıyla toplam bakteri sayısı ve psikrofil bakteri sayısını belirlemişlerdir. Rokka ve ark. (2004) aerobik mezofilik bakteri,

aerobik psikrotrofik bakteriler, laktik asit bakterileri, küf, maya, Enterobacteriaceae, H₂S üreten bakteriler, anaerobik ve fakültatif anaerobik bakteriler, buffer sitrat kalsiyum kazeinat agarda üreyen proteolitik ve diğer mikroorganizmalar ve sülfid indirgeyen clostridiumların tespitini yaparak MAP broiler karkaslarında kaliteyi tespit etmişlerdir. Smolander ve ark (2004) ise MAP broiler karkaslarında kalite tespiti amacıyla, aerobik mezofilik bakteri, aerobik psikrotrofik bakteri, laktik asit bakterileri, küf, maya, Enterobacteriaceae, H₂S üreten bakteriler, *Brochothrix thermosphacta*, proteolitik mikroorganizmalar ve anaerobik sporlu bakterileri tespit etmişlerdir.

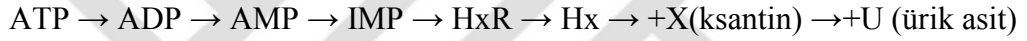
Depolama ısısının gıdaların bozulmasındaki etkisini belirlerken Enterobacteriaceae sayısından yararlanılmaktadır. Soğuk muhafaza aynı zamanda proteolitik bakterileri, hidrojen sülfid üreten bakterileri, laktik asit bakterileri ve clostridiumlar üzerine sınırlayıcı etkisi olması bozulma tespiti amacıyla bu bakterilerin analizini önemli kılmaktadır. Putresin ve kadaverin miktarı da aynı amaçla indikatör olarak kullanılmaktadır. Rokka ve ark. (2004) yaptığı çalışmada ise soğuk muhafazanın bu bakterilerin üremesini ilk 9 gün boyunca baskıladığı gösterilmiştir.

Mikrobiyolojik analiz amacıyla klasik metodlar kullanılabildiği gibi teknolojinin getirilerinden yararlanılarak üretilmiş yeni yöntemler de kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden bir tanesi de TEMPO (BioMérieux) sistemidir. TEMPO testlerinin çoğu AOAC International (eski adı Association of Official Analytical Chemists) ve ISO 16140 uluslararası kurallarına tabi Association Française de Normalisation (AFNOR) Certification gibi uluslararası resmi kuruluşlar tarafından onaylanmıştır. Hızlı, güvenilir ve pratik olan sistem besi yeri hazırlama, yanlış yorumlama gibi zorlukları ortadan kaldırmaktadır (<http://www.biomerieux.com.tr>).

Ürünlerin hijyen denetiminde kullanılabilen sistem aynı zamanda gıdalardaki bozulmayı da tespit etmeye olanak sağlamaktadır. TEMPO 16 tüplü En Muhtemel Sayı (EMS) mikrobiyolojik metoduna dayanmaktadır. Kartlardaki her kuyucuk bir dilüsyon tüpüne denk gelmektedir ve kuyucukların boyutları ile 1 ve 3 seviyesine (2.25 µl, 22.5 µl, 225 µl) kadar olan dilüsyonlar kart içerisinde yapılmaktadır. Kuyucuklar hazırlama ünitesinde besi yeri ve numune ile doldurulup otomatik dilüsyon yapıldıktan sonra kartların dolmuş uçları mühürlenip inkübasyona kaldırılır. Bakteriye özgü süre ve sıcaklıklar sonrası kartlar okuma istasyonuna alınarak sonuçlar tespit edilir. Bakteri yoğunluğunun tespiti besi yerleri içerisinde bulunan floresan boya sayesinde yapılmaktadır. Floresan boyanın varlığı ya da yok oluşuna bağlı olarak istatistiksel

sonuçlar bilgisayar tarafından oluşturulur ve kob/ml-g olarak bakteri yoğunluğu tespit edilir. Toplam koliform (TC) ve Enterobacteriaceae (EB) floresanın kaybolması esasına dayalı olarak çalışır. Floresan pH indikatörü olan 4-metilumbelliferon (4MU) aracılığıyla pH 6 seviyesinden aşağıya inerek asidite artar ve floresan kaybolur böylece pozitif kuyucuklarda floresan ışımaya olmazken negatif kuyucuklarda ışımaya meydana gelir. 4MU'a bağlı enzimatik floresan substrat: Toplam bakteri (TVC) ve *E.coli* (EC) analizinde nitrokumarin enzimi aktivitesi sonucu pozitif kuyucuklarda floresan oluşur. Laktik asit bakterileri (LAB) ve küf-maya (YM) analizinde ise nitro-redüktaz enzimi ile 7-nitrokumarin-3-karboksili asit 7-aminokumarin (7AMC)'e dönüşerek pozitif kuyucuklarda ışımaya meydana gelmektedir (<http://www.biomerieux-usa.com>).

Kimyasal metodlarla bozulma tespiti yapılırken pH, VBN, K değeri, poliaminler ve serbest aminoasit sayısı tespit edilebilmektedir (Ohashi ve ark.1991).



Bu ürünlerin miktarları balıkların ölümünden sonra değişim gösterirler bu sebeple de her nükleotitin miktarının ölçülmesi bozulma tespiti açısından önemlidir. Bu bileşiklerin tespiti amacıyla oksijen elektrotu ve 5'- nükleotidaz membran ve bir nükleozid fosforilaz-ksantin oksidaz membrandan oluşan bir sistem kullanılmaktadır. K değeri aşağıdaki şekilde ölçülebilir (Karube ve ark. 1984).

$$K_1 \text{ değeri: } KI = \frac{([\text{HxR}] + [\text{Hx}])}{([\text{IMP}] + [\text{HxR}] + [\text{Hx}])} \times 100$$

Rodríguez ve ark. (1999) balıklarda yapmış oldukları bozulma tespiti çalışmasında kimyasal parametre olarak, pH, K_1 değeri, TMA, ATP yıkımına ile meydana gelen inozin-5-monofosfat (IMP), inozin (HxR) ve hipoksantin (Hx) miktarlarını kullanmışlardır.

Vakum paketlenmiş balıklarda 12. gün sonunda pH; 6,5'den 6,7'ye, K; 52,2'den 98,6'ya, TMA; 3'den 12,7'ye, putresin; 2,5'den 8,5'e, kadaverin; 9'a, agmatin; 3,2'ye, spermidin; 4,3'den- 7,1'e, spermin; 7'den 9,3'e, yükselmiş, duyu analizi sonuçları ise 7. günden sonrası için kabul edilemez sınırlara ulaşmıştır (Rodríguez ve ark. 1999).

Fiziksel metodlarda ise, organoleptik özelliklere (koku, görünüş, tat, doku) bakılarak etin bozulduğu tespit edilmeye çalışılır. Smolander ve ark. (2004) koku ve

renk analizlerini kullanarak, Rodríguez ve ark. (1999) ise duyuusal analizler olarak renk, koku, tat ve tekstür analizlerini kullanarak bozulmayı tespit etmeye çalışmışlardır.

Kaniou ve ark. (2001) yapmış olduğu çalışmada paketlenmemiş sığır etlerinin 8 gün sonra organoleptik özelliklerinde bozulmalar başladığını 12. günde ise örneklerin tamamen bozulduğunu saptamışlardır. Vakum paketlenmiş örneklerin ise 35. güne kadar organoleptik özellikler bakımından kabul edilebilir sınırlar içerisinde olduğu tespit edilmiştir.

Poliamin adı verilen uçucu olmayan aminler ve diğer diaminler tazelik indikatörü olarak kullanılmaktadır. Putresin (1,4-diaminobütan), kadaverin (1,5-diaminopentan), tiramin (p- (2-aminoetil) fenol) ve spermidin (N-(3-aminopropil) -1,4-diaminobütan) miktarları ölçülerek bu düzeyler ile tazelik arasında ilişki kurulmaya çalışılmaktadır. Ohashi ve ark. (1991) göre; Takagi ve ark.(1970) kabuklu deniz ürünlerinin bozulmaları ve kokuşmaları sırasında poliaminlerin oluştuğunu belirtmişler, Mietz ve Karmas (1978) somonlardaki kadaverin ve putresini, Edwards ve ark. (1985) ile Sayem-El-Daher ve ark. (1985) depolama sürecinde sığır etinde oluşan poliaminleri incelemişlerdir. Karmas ve Mietz (1978) tuna balıklarındaki poliamin konsantrasyonu ile balığın tazeliği arasında bağlantı olduğunu, Yamanaka ve ark. (1987) ise kalamarlarda yapmış olduğu çalışma sonucunda agmatinin (4- (aminobütıl) guanidin) kalamarların tazelik göstergesi olarak kullanılabileceğini tespit etmişlerdir.

Biyojen aminler gıda bozulmalarında indikatör olarak kullanılabilirdiği için gıda kontrolü amacıyla biyojen aminlerin miktarının saptanması önem kazanmaktadır (Spano ve ark. 2010; Erim 2013).

Gıdalarda bulunan biyojen aminlerin tespitine yönelik metodlar sürekli gelişim göstermektedir. Bu metodlar genel olarak biyojen aminlerin tespiti ve biyojen amin üreten bakterilerin tespiti olarak ikiye ayrılmaktadır (Linares ve ark. 2011). Biyojen aminlerin direkt tespitine dayalı yöntemler özellikle; ince tabaka kromatografisi (TLC), gaz kromatografisi, kapillar elektroforetik metod (CE) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisidir (HPLC) (Önal 2007).

Biyojen aminlerin tespiti amacıyla daha önceleri ince tabaka kromatografisi (TLC) kullanılmasına karşın günümüzde miktar tayininde güvenilir sonuçlar veren ve aminlerin daha iyi ayrılması ve çözünürlüğünü sağlayan daha modern teknikler kullanılmaktadır. Gıdalarda bulunun biyojen aminlerin miktar tayini için genellikle

basınç-tabaka kromatografisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve gaz kromatografisi yöntemleri kullanılmaktadır (Linares ve ark. 2011).

Yapılan çalışmaların gösterdiği üzere HPLC biyojen amin tespiti amacıyla en sık başvurulan yöntemdir (Eerola ve ark. 1993; Rodríguez ve ark. 1999; Kaniou ve ark. 2001; Rokka ve ark. 2004; Šimat ve Dalgaard 2011; Bóka ve ark. 2012; Erim 2013). Linares ve ark. (2011) ise gaz kromatografisi ve florimetrik yöntem kullanmışlardır. Gaz kromatografisi kütle spektrometrisi (GC/MS) homojenize balık örneklerinin biyojenik amin konsantrasyonunu belirlemek için bir referans olarak kullanılmıştır (Chow ve ark. 2011). Rodríguez ve ark. (1999) balıklarda biyojen amin tespiti amacıyla HPLC yöntemini kullanmışlar, art kolon türevlendirme ve florimetrik yöntemden yararlanmışlardır. Cinquina ve ark. (2004) balıklarda putresin, histamin, kadaverin ve spermidin tespiti için kimyasal baskılama ve otomatik rejenerasyon sonra kondüktometrik tespit ile iyonik kromatografik ayırma yöntemi kullanmışlardır. Aures ve ark. (1968) ince tabaka kromatografisi yöntemi, Kvasnička ve Voldřich (2006) kadaverin, putresin, agmatin, histamin, triptamin ve tiramin tespiti için kondüktometrik tespiti ile kapillar zon elektroforez metodu kullanmışlardır.

Manetta ve ark. (2016) kırmızı ve beyaz şaraplarda etanolamin, metilamin, etilamin, isoamilamin miktar tayini ve b-fenilettilamin, putresin, kadaverin, histamin, tiramin, spermidin, spermin tespiti amacıyla analitleri dansil klorür ile derive etmiş, çift PDA dedektörlü HPLC ile analizini yapmışlardır. García-Villar ve ark. (2009) HPLC ile atmosferik basınçta kimyasal iyonizasyon kütle spektrometresini (APCI-MS) birlikte kullanarak şaraplardaki biyojen amin tespiti için HPLC-APCI-MS sistemini geliştirmişlerdir. Jia ve ark. (2012) Kore Bokbunja şaraplarındaki analiz için ultra-performans sıvı kromatografisi/dört kutup zaman bazlı ölçüm içeren kütle spektrometre sistemi (UPLC/Q-TOFMS) yöntemini geliştirmişlerdir. Romero-González ve ark. (2012) ançüzelerde dört biyojen amin (putresin, kadaverin, histamin ve tiramin) ile üç uçucu aminlerin (trimetilamin, trietilamin, ve tripropilamin) eş zamanlı tayini için ultra-performans sıvı kromatografisi, tandem kütle spektrometri (UHPLC-MS/MS) ve elektriksel püskürtme ile iyonlaştırmanın (ESI) birlikte kullanımını geliştirmişlerdir. Redruello ve ark. (2013) peynirlerdeki 22 aminoasiti, 7 biyojen amini (agmatin, histamin, tiramin, putresin, kadaverin, triptamin ve fenilettilamin) ve amonyum iyonlarını ultra-performans sıvı kromatografisini (UHPLC) kullanarak 10 dakikadan kısa sürede tespit etmişlerdir. Millán ve ark. (2007) ise şaraplarda bulunan 8 önemli

biyojen amini (histamin, tiramin, triptamin, putresin, kadaverin, feniletilamin, spermin ve spermidin) tespit için sıvı kromatografisi- elektriksel püskürtme ile iyonlaştırma-iyon tuzak kütle spektrometrisi (LC-ESI-ITMS) yöntemini geliştirmişlerdir.

Bóka ve ark. (2012) etlerin bozulma takibi amacıyla diamin oksidazı kullanarak toplam biyojen amin tespiti, monoamin oksidaz A'yı tiramin, triptamin ve feniletilamin tespiti, putresin oksidazı ise putresin tespiti amacıyla kullanmışlar ve toplam biyojen amin miktarını da HPLC metodu ile doğrulamışlardır. Di Fusco ve ark. (2011) mürdümüklerden elde edilen diamin oksidazı (DAO) şarap ve biralardaki biyojen aminlerin tespiti için elektrokimyasal biyosensörün biyokatalitik bileşeni olarak ilk kez kullanmışlardır.

Nakamura ve ark. (2011) agregasyon kaynaklı yayılma (AIE) mekanizmasına dayalı karboksilik asit modifiye tetrafeniletilen (TPEs) kullanılarak biyojen aminleri florimetrik yöntem kullanılarak tespit edip tanımlamaya çalışmışlardır.

Zhu ve ark. (2016) yaptığı çalışmada putresin miktarının depolama süresi ile paralel bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir. Kaniou ve ark. (2001) yaptığı çalışmada, paketlenmemiş örneklerde 12. günde putresinin 10,4 mg/g (ilk gün kesimden 24 saat sonra 0,8 mg/g'dı), kadaverinin 5,2 mg/g, toplam amin miktarının 16,5 mg/g (8 gün sonra 5 mg/g'dı)'a ulaştığını gözlemlenmiş ve organoleptik özellikler bakımından ürünlerin tüketilemez olduğunu kabul etmişlerdir. Histamin ise sadece 5. günde 2,2 mg/g olarak ölçülmüştür. Vakum paketlenmiş örneklerde ise, 19 gün sonra amin miktarı artmış, putresin 35. günde 36,3 mg/g (19. güne kadar 3,9 mg/g'dan daha düşüktü), histamin 19,0 mg/g kadaverin 26. günde 28,9 mg/g, toplam amin miktarı 12. günde 5 mg/g, 35. günde 74,0 mg/g (ilk gün 0,8 mg/g'dı) olarak tespit edilmiş ve organoleptik olarak kabul edilemez değerlere ulaşmıştır.

Rokka ve ark. (2004) yaptığı çalışma sonucu +2,9 °C - +5,4 °C arasında depolanmış tavuklarda putresin oluşumunun 12. günde 7,4 mg/kg (A1, 5,4 °C), 5,9 mg/kg (B2, 2,9 °C) ve 2,2 mg/kg (C1, 3,4 °C) olduğunu bildirmişlerdir. Farklı sıcaklıklarda depolanmış etlerde ise farklı sonuçlar almışlardır. Çalışma sonunda putresin en yüksek 190 mg/kg olarak, histamin 9. günde 23–53 mg/kg olarak, +6 °C altında depolanmış A1, B2, C1 örneklerinde ise toplam biyojen amin miktarı 12. günde 300 mg/kg olarak ölçülmüştür. Bu çalışma sonucuna göre tiramin, kadaverin ve putresinin MAP tavuklarda depolama sıcaklığı, zamanı ve mikrobiyal kalite açısından indikatör olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Mikroplatelerde bulunan bukalemun boya (PY-1) içeren bir polimerik kokteyl yardımı ile biyojen aminler varlığında renk maviden yeşil ve kırmızıya dönerek toksik konsantrasyonlar belirlenebilir. Yapılan bu floresan ölçümler ile insan burnu koku eşiğinin altındaki konsantrasyonlarda biyojen aminin deniz ürünlerinde belirlenmesi sağlanır (Azab ve ark. 2011). Rogers ve Staruszkiewicz (1997) çalışmasında deniz ürünlerindeki putresin ve kadaverin miktarını saptamak amacıyla gaz kromatografisi yöntemini, histamin miktarı için ise florometrik yöntemi kullanmışlardır.

Biyojen aminlerin tespiti amaçlı kullanılan diğer bir yöntem ise biyojen amin üreten bakterilerin tespitidir. Bu amaçla biyojen amin üretiminden sorumlu bakteriler uygun besi yerlerine yapılan ekimler sonucu tespit edilebilirler. Bover-Cid ve Holzapfel (1999) yaptıkları çalışmada amino asit dekarboksilaz-pozitif laktik asit bakterileri gibi mikroorganizmaların tespiti için içerisinde pH indikatörü bulunan besi yeri geliştirmişlerdir. Bunun sonucunda eğer ki biyojen amin üreten LAB ve Enterobacteriaceae besi yerinde üreme gösterirse besi yerinin rengi pH indikatörü aracılığıyla mor renge dönüşmektedir. Majjala (1993) ise çalışmasında de Man Rogosa and Sharpe (MRS) Broth (Oxoid)'a otoklavlanmadan önce 2.0 g l^{-1} of histidin (MRS-H) ya da tirozin (MRS-T) ilave etmiştir. Decarboxylating Agar (DA)'da ise etlerde üreyen laktik asit bakterilerinin üremesini kolaylaştırmak için Lab-Lemco eklenip NaCl çıkartılmış böylece Modified Decarboxylating Agar (MDA) elde edilmiştir. Besi yerinin mor rengine dönüşümüyle pozitif ya da negatif olarak değerlendirme yapılmıştır.

Biyojen aminlerin diğer bir tespit yöntemi ise PCR ile biyojen amin miktarı ve biyojen amin üreten genin varlığını karşılaştırmaktır. Biyojen aminin tespitinden önce biyojen amin üreten bakteri tespit edilerek son üründe ne kadar biyojen amin var olabileceğinin tahmini yapılabilir (Linares ve ark. 2011). Coton ve ark. (1998) histidin dekarboksilaz geni taşıyan bakterileri analizini yaptıkları 118 şarabın neredeyse yarısında saptayarak bu bakterilerin yaygın olarak bulunduğunu göstermişlerdir.

Linares ve ark. (2011)'nın Van Poelje ve Snell (1990)'den yapmış oldukları alıntıya göre, histidin dekarboksilaz (HDC) enzimi 2 ayrı gruba ayrılmaktadır. 1. Grup; gram negatif ve ökaryotik hücrelerden üretilir ve kofaktör olarak piridoksal fosfata ihtiyaç duyarlar. 2. Grup; gram pozitif bakterilerden üretilen prostetik küme olarak kovalent bağlı piruvoil parçasını kullananlardır.

Ferrario ve ark. (2014) *Morganella morganii*'de bulunan histidin dekarboksilaz genini hdcRT fw/hdcRT rv primerlerini kullanarak araştırmışlardır.

Kanki ve ark. (2002) balıklarda yapmış oldukları çalışmada KPF2, KPR4 ve KPF5, KPR6 primer çiftleri kullanılarak *R. planticola* ve *R. ornithinolytica* bakterilerindeki histidin dekarboksilaz sentezleyen *hdc* genini tespit etmişlerdir.

Le Jeune ve ark. (1995) çalışmaları sonucu JV16HC/JV17HC primer setinin histidin dekarboksilaz üreten laktik asit bakterilerinin ve CL1/CL2 ile CL1/JV17HC primer setinin histamin üreten *Leuc. anos* tespitinde kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Daha önce Le June tarafından dizayn edilmiş JV16HC/ JV17HC ve CL1/JV17HC primerlerinden modifiye edilerek Landete ve ark. (2005) tarafından CL1mod primeri üretilmiş ve JV16HC/JV17HC ve CL1mod/JV17HC primerleri dizayn edilmiştir. Primer çiftleri kullanılarak histidin dekarboksilaz genini taşıyan LAB tespit edilmiştir.

hdc-f ve *hdc-r* primerleri kullanılarak histidin dekarboksilaz genini (*hdc*) taşıyan gram negatif bakteriler PCR analizi ile tespit edilmiştir (Takahashi ve ark. 2003). *hdcA* ve *hdcB* primerleri kullanılarak süt ve peynirlerdeki histamin üreten gram pozitif bakterileri tespit edebilmek için real time quantitative PCR yöntemi geliştirilmiştir (Fernández ve ark. 2006).

De las Rivas ve ark.(2006) ise histamin, tiramin, putresin, kadaverin tespiti için histamin üreten LAB tespiti amacıyla histidin, tirozin, ornitin, lisin dekarboksilaz kodlayan genleri tespit için sentetik oligonükleotid çiftleri dizayn etmişlerdir. Gram pozitif bakterilerden elde ettikleri *hdc* genini tespit için HIS1-F/HIS1-R primer setini, birçok dekarboksilaz genini tespit için HIS2-F ve HIS2-R primer çiftini, tirozin dekarboksilaz (*tdc*) geni tespiti için TDC-F/TDC-R primer çiftini, enterobacteria ve LAB den PUT1-F/PUT1-R primer çiftini, *Pseudomonas*'lardaki ornitin dekarboksilaz (*odc*) genini tespit için PUT2-F/ PUT2-R primer çiftini dizayn etmişlerdir. Costantini ve ark. (2006) PHDC1/PHDC2 (histidin dekarboksilaz), *Pt3/Pt4* (tirozin dekarboksilaz) ve AODC1/AODC2 (ornitin dekarboksilaz) primer setleri kullanılarak amino asit dekarboksilaz kodlayan sorumlu genleri tespit etmek amaçlanmıştır.

HDC3 ve HDC4 (*hdc*), TD2 ve TD5 (*tdc*) ve BSF8 ve BSR1541 16S rRNA universal primer çifti (PCR kontrolü için) kullanılarak fermente gıdalarda gram pozitif histamin ve tiramin üreten bakterileri tespit için yeni bir moleküler araç geliştirmişlerdir (Coton ve Coton 2005).

3/16 primer setini *M. morganii* gibi gram negatif bakterilerdeki *odc* genini (De las Rivas ve ark. 2007a) ve *S. liquefaciens* tespiti için kullanılmıştır (De las Rivas ve ark. 2007b).

Fermente gıdalardaki histamin, tiramin ve putresin üreten LAB tespit için bu bakterilerde bulunan histidin, tiramin ve ornitin dekarboksilaz kullanılarak 3/16 primer çifti multiplex PCR analizinde kullanılmıştır (Marcobal ve ark. 2005).

De las Rivas ve ark. (2005) gram negatif bakterilerde bulunan histidin dekarboksilaz kaynaklı primer çiftini kullanarak histamin, putresin ve tiramin üreten bakterileri tespit edebilecek multiplex-PCR yöntemi geliştirmişlerdir.

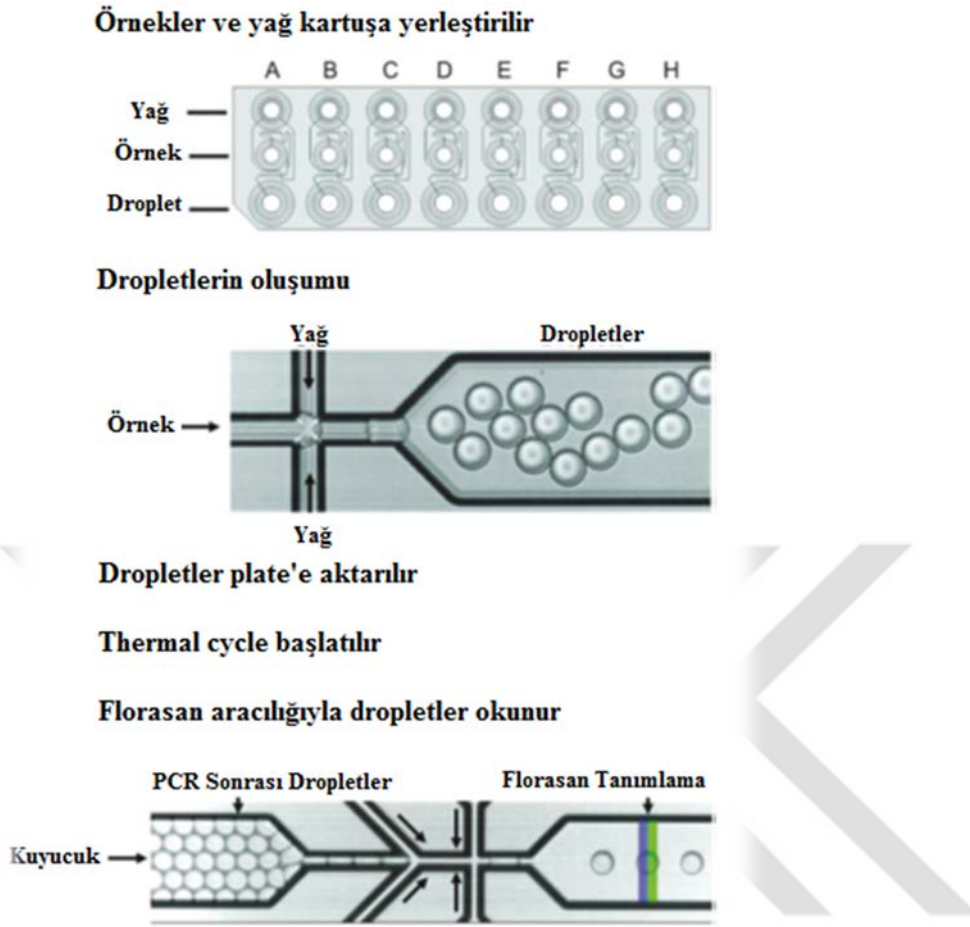
Nannelli ve ark. (2008) ise *agdif* / *agdir* primerlerini kullanarak şaraplardaki laktik asit üreten bakterileri tespit etmişlerdir.

2.7. Dijital Droplet PCR (ddPCR)

1. nesil yöntem olan PCR zamanla yerini 2. nesil olan real time PCR (qPCR)'a bırakmıştır. Gerek kantitatif sonuç vermesi, hataları en aza indirmesi, doğruluğunun yüksek olması gerek ise zamandan tasarruf sağlayarak sonuçların kısa sürede elde edilmesi bu teknolojinin tercih edilmesinin sebeplerindedir. Yeni nesil teknoloji sayesinde geliştirilen ddPCR ise 3. nesil olup qPCR'da meydana gelen hataları da yok ederek çok daha doğru sonuçlar elde etmeyi vadetmektedir. Her örneği 20.000 damlacığa bölüp her damlacığın da ayrı ayrı analiz edilmesi bu sistemin güvenilirliğini arttırmaktadır. Gen kopya sayısı analizi, tek hücre analizi, kanser teşhisi, gen ekspresyonu analizi, genetik modifiye organizma (GMO) ve çevre analizleri, patojen ve mikrobiyom analizi ddPCR'ın kullanım alanlarından bazılarıdır. Bu yeni teknolojinin araştırma projelerinde kullanımı ise gün geçtikçe artmaktadır. 2011 senesinde başlayan bilimsel araştırmalar 2012'de 9, 2014'de 115 ve 2015'de 175 ile artış göstermektedir. Tüm dünya çapında çalışmaların artmaya başlamasına rağmen yaptığımız kaynak incelemelerinde Türkiye'de bu alanda yapılmış bir araştırmaya rastlanılmamıştır.

ddPCR hedeflenen nükleik asidin miktarını belirlemek için kullanılan yeni bir teknolojidir. ddPCR volümetrik tanımlanan, yağ-su karışımı damlacıklarında ayrılmış nükleik asit moleküllerini sayarak kesin sonuç vermektedir. Tek bir ddPCR'da 20.000 damlacık bulunmakta ve her damlacığın analizi ayrı ayrı yapılmaktadır (Pinheiro ve ark. 2012).

Yeni teknolojilerden biri olan Chamber Digital PCR (cdPCR) mikro akışkan odacıklarda gerçekleşen birkaç bin reaksiyon esasına dayanır. ddPCR ise, su-yağ damlacıklarında bulunan binlerce/milyonlarca reaksiyonu akış sitometrisi kullanarak hesaplamaktadır (Morisset ve ark. 2013). Real-time PCR, floresan probalar aracılığıyla her döngü sonrası amplifikasyonun izlenmesiyle analog ölçümler yapmaktadır. Reaksiyon floresanın yoğunluk eşiğini geçtiği noktaya döngü eşiği (cycle threshold-Ct) denir. Birçok faktör de bu eşiği etkileyerek real-time PCR'ın hassasiyetini ve etkinliğini düşürebilir (Pinheiro ve ark. 2012). ddPCR'ın ise bu sistemlerden avantajlı olduğu noktalar vardır: Primer/prob annealing verimliliğini en aza indirerek endpoint timeline dayalı değil, miktarın doğrulanması için standartlara gerek duymaz, her kuyucukta 15.000-20.000 gibi yüksek miktarlarda reaksiyon gerçekleştirerek sonuç almaktadır (Rothrock Jr ve ark. 2013). 5 DNA örneğinin hassasiyetleri karşılaştırıldığında da, cdPCR'dan 4 kat daha büyük bir dinamik aralık verir. qPCR ile karşılaştırıldığında ise, ddPCR örnek miktarı düşük olduğunda dahi daha güvenilir sonuç verir, inhibitörlere karşı toleransı daha fazladır ve GMO ölçümlerinde fiyat ve çıktı açısından daha avantajlıdır (Morisset ve ark. 2013). Aynı zamanda sayım yöntemine dayalı diğer sistemlerle kıyaslandığında daha doğru ve hassas sonuçlar vermektedir (Rothrock Jr ve ark. 2013). Kopyalar arasında düşük varyasyon olması, arka planda bulunan karışık DNA'lardan etkilenmesinin düşük oluşu ise diğer avantajları arasındadır. ddPCR'ın dezavantajları ise, yüksek maliyetli olması, sınırlı çıktı alımı ve karışık iş akışıdır (Hindson ve ark. 2011).



Şekil 2-3: ddPCR Çalışma Prensibi (Hindson ve ark. 2011)

ddPCR çalışma prensipleri şu şekildedir: İlk olarak, ddPCR, master mix, TaqMan reaktifi ve örnekleri içeren 8 PCR reaksiyonu tek kullanımlık kartuşların kuyucuklarına yüklenir. Droplet generation oil de kuyucuklara yüklendikten sonra droplet jeneratöre yerleştirilir. Cihazda kuyucuklara uygulanan vakum etkisiyle yağ ve örnekler saniyede 1000 kez kuyucuklara çekilir. 20.000 damlacık için her bir damlacıktan 100.000'den fazla kopya üretilir. Meydana gelen karışımdaki faz farkından dolayı toplanma kuyucuklarına geçiş olur ve yağın üzerinde faz oluşur. Damlacıklar pipet yardımıyla 96 kuyucuklu PCR platelerine aktarılır ve thermal cycle başlatılır. Thermal cycle tamamlandığında ise plate droplet okuyucusuna yerleştirilir. Kullanılan TaqMan sayesinde hedeflenen ve referans genlerin ikili sayımının yapılmasına yardımcı olur. Her damlacıkta negatiflerin tespitinde kullanılan fluorojenik propların kusurlu

olarak yok edilmesinden kaynaklanan floresan sinyal vardır. Örneği içeren damlacıklarda TaqMan problemler aracılığıyla güçlü bir floresan sinyal oluşur. Floresan ışığa da ürünün negatif ya da pozitif eşiği geçmesine göre meydana gelir. Poisson dağılımı yöntemi sayesinde pozitif droplet parçacıkları sayılarak hedef genin miktarı bulunur. (Hindson ve ark. 2011).

2.8. Et ve Et Ürünlerinde Aktif ve Akıllı Ambalajlama

2.8.1. Ambalajlama

Ambalajlama; gıda kalitesinin üretimden tüketime kadar korunmasını sağlayan muhafaza işlemidir (Özçandır ve Yetim 2010).

Yaklaşık 400.000 yıl önce hayvansal ürünlerin dayanıklılığını arttırmak amacıyla soğuk yerde depolama, kurutma veya tütüleme yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. 10.000 yıl öncesi ise kurutma, tütüleme, tuzlama, fermentasyon ve soğukta depolama yöntemleri kullanılmaya başlanmışsa da yeterli muhafaza düzeyine ulaşılamamıştır. Son 200 yılda ise teknoloji gelişmesiyle birlikte yeni yöntemler kullanılmaya başlanmıştır (Sperber 2009 pp. 1-2). 1809 yılında Fransa'da Nicolas Appert hermetik kapatılmış cam kavanozlarda ısı ile gıda koruma araçları üretmiştir (Coles 2003 p. 2). Ambalajlama teknolojilerinin ilki sayılacak bu gelişmeden günümüze kadar birçok farklı ambalajlama yöntemleri kullanılmıştır. 19. yy'dan günümüze kadar koruma, hijyen, ürün kalitesi ve rahatlık, gıda teknolojisi ve ambalajlama sistemlerinin başlıca amaçları olmuşlardır. Son yıllarda, yoğun iş temposu içerisindeki tüketiciler tarafından kullanımı kolay olduğu ve yüksek kaliteli gıdalar sunduğu için paketlenmiş ürünlere talep artmaktadır (Coles 2003 p. 4).

Gıda ambalajının birincil amacı gıdayı, oksijen, su buharı, ultraviyole ışıktan, kimyasal ve mikrobiyolojik kontaminasyondan korumaktır (Pereira de Abreu ve ark. 2011). Ambalajlamanın temel fonksiyonları, koruma (su, su buharı, gaz, koku, mikroorganizma, toz, sarsıntı, sallanma, basınç kuvveti gibi dış etkilerden), muhafaza, bütünlük sağlama, tüketime kadar güvenliğinin sağlanması, raf ömrünün uzatılması, gıda kayıplarının azaltılması, dağıtım süresince bozulmanın önlenmesi, kalitenin devam ettirilmesidir. Ayrıca ürün hakkında bilgi vermesi, kullanım kolaylığı, tanıtım, satışa destek vermek, marka iletişim bilgileri, kampanya bilgileri, kullanım bilgileri, geri dönüşüm bilgileri içermesi de ambalajlamanın diğer fonksiyonları arasındadır (Coles 2003 p. 9; Özçandır ve Yetim 2010; Robertson 2012 pp. 2-4; Han 2014 pp. 3-4).

Raf ömrünü uzatabilmek için bakterilerin ambalajın içine girmesini engelleyecek bir bariyer oluşturmak ambalajlama sistemlerinin başlıca işlevidir. Basit bir bariyer sisteminin aksine günümüzde aktif ambalajlama, modifiye atmosfer paketlenme (MAP) ve yenilebilir filmler alanlarında araştırmalar yapılmaktadır. Bu sistemler güvenliği, güvenilirliği, korumayı, kolaylığı ve bilgi aktarımını arttırmaktadır. Geliştirilmiş yeni ambalajlama sistemleri sadece yeni materyaller değil aynı zamanda yeni ambalaj tasarım sistemleri anlamına gelmektedir (Han 2014 p. 5).

MAP tekniği ile et ürünü belirlediğimiz formüldeki hava ile doldurularak raf ömrünün ve kalitesinin artırılması amaçlanır (Kerry ve ark. 2006). MAP, taze ürünlerin tazeliğini koruması, balık ve et ürünlerinin respirasyon gibi biyokimyasal aktivitelerini kontrol etmek amacıyla kullanılır (Quintavalla ve Vicini 2002). MAP ve kontrollü atmosfer paketlenme (CAP) yöntemleri paketlenen etin tipi, formu, ürünlerin ticari kullanımına göre çeşitli şekillerde yapılabilir. Koruyucu ambalajlama sistemleri basit olmalı, ürünün satın alınması için uygun organoleptik özellikleri ve uzun bir depo ömrünü en uygun fiyatla verebilecek şekilde olmalıdır. Bu sebeple ürün için uygun ambalajlama şekli seçilirken, etin kalite özelliklerinin maruz kaldığı atmosfer koşullarından nasıl etkilendiği ve paketlenmiş ürünlerin depolama, dağıtım ve satışı sırasında koşullara dayanıklılığı bilinmelidir (Gill 2003 p. 365). MAP'da en önemli gazlar (soygaz olmayan) oksijen ve karbondioksittir. Bu gazların üstte oluşturduğu basınçlar et ürünlerinin kalitesi açısından indikatör olarak kullanılabilirler. Oksijen ve karbondioksitin profilleri zaman içinde değişebilir ve ürün tipi, respirasyon, ambalaj boyutu ve bütünlüğü, hacim oranları, depolama koşulları gibi faktörler göz önüne alınarak oluşturulur (Kerry ve ark. 2006).

Tüketici kırmızı et satın alırken, parlak ve kırmızı kas dokusu ve beyaz yağ dokusunu tercih ederken kanatlı etlerinde parlak ve beyaz eti tercih ederler. Düşük konsantrasyonda karbon monoksit içeren (%1'den az) ya da yüksek konsantrasyon oksijen ilave edilen paketlerle paketlenmiş kırmızı etlerde kırmızı rengin kalıcılığı daha uzun süre devam etmektedir (Gill 2003 p. 368).

MAP yönteminde aerobik bozulma bakterilerinin üremelerini geciktirmek amacıyla önemli oranlarda karbon dioksit ilave edilir (Gill 2003 p. 372). CO₂ selüler respirasyonu inhibe ederek aerobik mikroorganizmaların üremesini engeller, O₂ ise gıdadaki rengin devamı açısından kullanılmaktadır (Cervený ve ark. 2009 pp. 75-76).

Ayrıca az ya da çok oranlarda ilave edilen azot ise ambalajın çökmesinin önlenmesi açısından önemlidir (Gill 2003 p. 374).

Tavuk etlerinin paketlenmesinde genel olarak %40-%60 oranında karbondioksit/azot karışımı kullanılabilir. Anaerobik ortamda *Clostridium botulinum*'un üreme endişesi ile de %5 oksijen ilavesi yapılır fakat Lambert ve ark. (1991) yapmış oldukları çalışmada oksijen ilavesinin botulinumun üremesini engellemediği belirtilmiştir (Gill 2003 p. 374).

2.8.2. Aktif ve Akıllı Ambalajlama

Aktif ambalajlama sistemleri işlenmiş gıdaların raf ömrünü arttırmak ve aynı zamanda taze ve güvenli yüksek kaliteli ürünler sunmak açısından tüketici taleplerini karşılamak için başarıyla kullanılmaktadır. Aktif ambalajlama den diğer bir beklenti de hızla artan dünya nüfusunun için yeterli yiyecek sağlama ihtiyacı için gıda bozulmalarını geciktirmesidir. Ayrıca sanayi ülkelerinde tüketici uzun raf ömrü olmayan, uzun nakliyat süreleri bulunan mevsimsel, özellikle de taze tarımsal ürünleri tüm yıl tüketebilmek istemektedir. Geleneksel ambalajlama yöntemleri ile bu mümkün olmazken, aktif ambalajlar içerik ve çevresi ile etkileşim halinde olacak şekilde tasarlanmıştır (Pereira de Abreu ve ark. 2011).

2.8.2.1. Aktif Ambalajlama Sistemleri:

- **Oksijen Tutucular:** Ambalaj içerisindeki oksijen lipid oksidasyonu sonucu kötü tat oluşumuna, özellikle etlerde oksidasyon sonucu renk değişimlerine, askorbik asit, provitamin A, vitamin E gibi vitaminlerin oksidasyonu ile besin kayıplarına neden olabilmektedir. Aerobik bakterilerin ve böceklerin de üremesine sebep olarak özellikle solunum yapan meyve ve sebzelerin solunum hızına ve etilen üretimine olumsuz etkileri olabilmektedir (de Kruijf ve ark. 2002). Paketlerin içerisine veya üzerine oksijeni uzaklaştıran poşetler yerleştirilerek oksijensiz ortam yaratılarak oksidasyon, ransidite, aerobik bakteri ve küflerin gelişimi engellenir (Han 2014 p. 7). Oksijen absorbe edici sistemler demir tozlarının oksidasyonu şeklinde kimyasal yolla ya da enzimlerin kullanımı ile oksijenin tutulması şeklinde aktivite göstermektedir (Ozdemir ve Floros 2004). Oksijen tutucular genellikle gaz geçirmez ve indirgenmiş demir içeren esnek poşetlerin vakumla içerideki gazın boşaltıldığı ambalajlarda kullanılır (Brody ve ark. 2001 p. 1). Çok katmanlı poşetler ise tek katmanlı poşetlere göre daha etkili olmaktadır (Ozdemir ve Floros 2004). Co, Cl, Fe, Si, Al, Cr, Na, K, S, Mn, Ti, V, P

Ca ve Mg, oksijen tutucu olarak kullanılabilir ve bu elementler poşet, kapak, film olarak ambalaja yerleştirilebilirler (De Kruijf ve ark. 2002).

- **Karbondiyoksit Tutucular ve Yayıcılar:** Yüksek düzeydeki CO₂'in etlerde ve kanatlılarda yüzeydeki mikrobiyal gelişmeyi, meyve ve sebzelerde ise solunum hızını azaltıcı etkileri vardır. CO₂ ambalaj dışına kolayca çıkabildiği için bunu engellemek amacıyla karbondiyoksit yayıcı aktif sistemler kullanılabilir. Çabuk bozulabilen gıdaların raf ömrünü uzatmak amacıyla ise oksijen tutucu ve karbondiyoksit yayıcı sistemler birlikte kullanılabilir (Ozdemir ve Floros 2004). CO₂ tutucular ise, ambalajların depolama sırasında açığa çıkan karbondiyoksit kaynaklı şişmelerinin önlenmesi amacıyla kullanılır. Kahve çekirdeği gibi gıdalar depolama sırasında açığa çıkan CO₂ sonucu enzimatik olmayan kahverengileşme reaksiyonuna maruz kalırlar. Ayrıca kimçi, turşu gibi fermente ürünlerde fermentasyon ve olgunlaşmaya da olumlu katkıları olmaktadır (Han 2014 p. 7). Multiform Desiccants Inc. firması tarafından üretilmiş olan CO₂ tutucu paketler içerisinde kalsiyum oksit ve silika jel gibi su tutan bileşenler barındırır. Paketler içerisinde su ile kalsiyum oksit birleşerek daha sonra CO₂ ile reaksiyona girerek kalsiyum karbonat oluşturacak kalsiyum hidroksit üretirler (Ozdemir ve Floros 2004).
- **Nem Tutucular:** Kuru gıdalar, neme duyarlı gıdalar, farmasötikler ve elektronik aletlerde kullanılırlar. Poşet içerisindeki nem tutucular paketin içine yerleştirilerek ambalajın içerisindeki spesifik bağıl nemin korunmasını sağlarlar (Han 2014 p. 7). Fazla nemin tutulması mikrobiyal gelişimin engellenmesi için ve ambalaj yüzeyinde sisli bir film oluşumunu engellemek açısından önemlidir. Bu amaçla silika jel, moleküler elekler, montmorilonit gibi doğal killer, kalsiyum oksit, kalsiyum klorid, modifiye nişasta kullanılabilir. Özellikle silika jeller non-toksik ve non-korozif olması sebebiyle en çok kullanılan üründür (Ozdemir ve Floros 2004). S, Cr, Mg, Fe, Na, Sr, Ca, K, Mn, Zn, Al, Ti, Si, P ve V de nem tutucu olarak poşet, film ya da ped şeklinde kullanılabilirler (de Kruijf ve ark. 2002).
- **Antimikrobiyal Sistemler:** Özellikle et ürünleri için kullanılan bu yöntem, antimikrobiyal maddeleri içeren filmlerin ambalaj materyali olarak kullanılması şeklindedir. Antimikrobiyal ajanlar ambalajlama materyalinden ürünün yüzeyine doğru yavaşça ilerleyerek bakterilerin büyüme hızını ya da miktarını azaltarak, hedeflenen mikroorganizmaların lag fazını (duraklama) uzatarak ya da temas ettiği mikroorganizmaları öldürerek etkisini gösterirler (Quintavalla ve Vicini 2002). Organik

asitler, gümüş zeolit, baharat ve bitki özleri, butillenmiş hidroksianisol/ butillenmiş hidroksitolüen (BHA/BHT) antioksidanlar, E vitamini, uçucu klor dioksit ve kükürt dioksit antimikrobiyal sistemlerde kullanılan başlıca maddelerdir (Day 2003 p.283). Poşet ve film olarak uygulanabilen bu sistemlerde asit salikatlar, etanol, çinko, Ti, Fe, Si, Al, S, Cl, Mg, Pd, Na ve Ca da kullanılan diğer elementlerdir (de Kruijf ve ark. 2002).

- **Etilen Tutucular:** Etilen olgunlaşmayı hızlandırır, yumuşamayı, klorofil indirgenmesini artırır, böylece ambalajlanmış taze sebze ve meyvelerin raf ömrünü azaltır. Poşet içerisine yerleştirilen potasyum permanganat, aktive edilmiş karbon, ponza taşı, zeolit, kristobalit ve klinoptilolit gibi maddeler kullanılarak paket içerisindeki etilen tutulur. Mn, Mg, Fe, Al, K, Ca, Ti, ve Si film ya da poşet olarak kullanılabilen bu sistemlerin başlıca materyalleridir (de Kruijf ve ark. 2002).
- **Etanol Yayıcılar:** Gıdalarda mikrobiyal gelişimi önlemek amacıyla poşetler içerisine yerleştirilmiş olarak ya da film şeklinde kullanılabilir. Poşetler etanol emici materyaller taşıyabilir ya da enkapsulasyon yöntemi ile taşıyıcı materyale yerleştirilmiş olabilir. Etanolün etkinliği, taşıyıcı materyalin tipi ve boyutuna, taşıyıcı malzeme tarafından tutulan etanol miktarına, poşetin su buharı ve etanol geçirgenliğine, gıdanın su aktivitesine, ambalajlama filminin etanol geçirgenliğine bağlı olarak değişmektedir (Ozdemir ve Floros 2004).
- **Koku ve Tat Absorbe Edici:** Koku emiciler, oksidatif ve non-oksidatif biyokimyasal bozunmalar sonucu oluşan kötü kokuların uzaklaştırılması amacıyla kullanılırlar. Aroma, koku ve koku yayıcılar, kötü kokuları maskelemek, hoş gitmeyen kokuları nötralize etmek ya da güzel kokular ortaya çıkarması için kullanılabilirler (Brody ve ark. 2001 p. 4). Genellikle bu aktif paketler film olarak kullanılmaktadır (de Kruijf ve ark. 2002).
- **Yenilebilir Film Sistemleri:** Kristal halinde kalabilen ya da amorf yapı oluşturabilen bileşenler ve polimerler (şekerler, bitkisel zamlar, alg sakızlar, mikrobiyal sakızlar, lipidler ve türevleri, bitkisel mumlar, böcek mumlar gibi) yenilebilir film olarak kullanılabilirler. Bu kaplamalar paketlenen gıdanın bir parçası olarak tüketici tarafından yenilebilen ince tabakalardır. Buğday gluteni, gliserol, oleik asit, balmumu, kitosan, pektin bu materyallere örnek olarak verilebilir (Guilbertt ve ark. 1995).

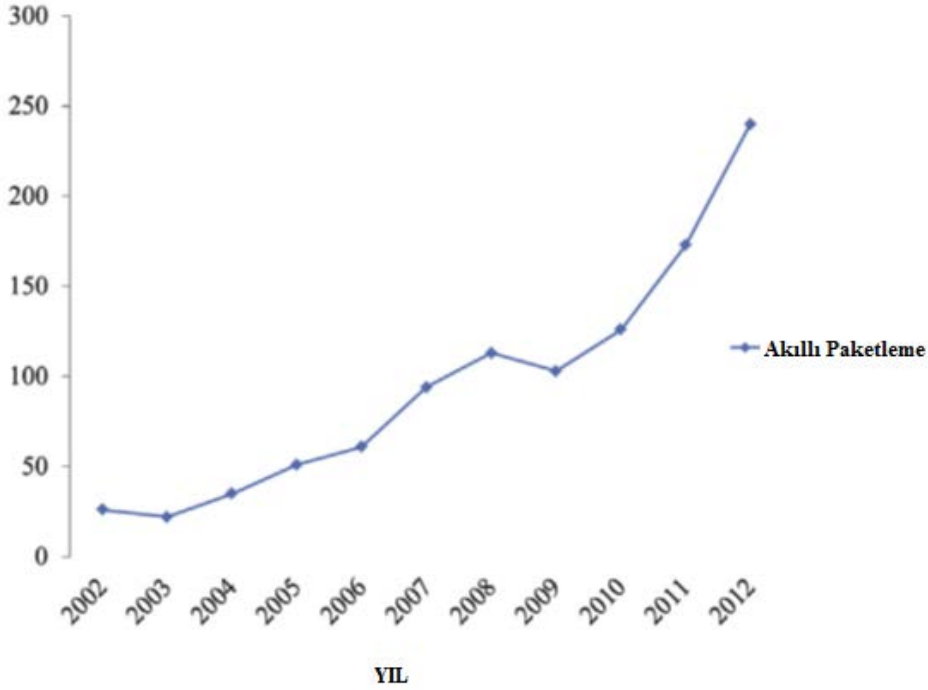
- **Antioksidan Ambalajlama:** Gıda bozulmalarının sebebi olabilen oksidasyonun azaltılması için antioksidan maddeler paket içerisine ya da dışına yerleştirilerek kullanılabilirler (López-De-Dicastillo ve ark. 2012). BHA ve BHT yüksek aktivitesi ve düşük maliyeti sebebiyle en çok kullanılan sentetik antioksidanlardır (Park ve ark. 2012). Tokoferol, bitki ekstratları, biberiye, kekik, çay gibi bitkisel esansiyel yağlar daha sağlıklı olması açısından sentetiklere göre tercih edilen doğal antioksidanlardır (López-De-Dicastillo ve ark. 2012). Antioksidanlar poşet, etiket, kaplama veya çok katlı filmler olarak kullanılabilirler (Realini ve Marcos 2014).

2.8.2.2. Akıllı ambalajlama

Yeni ambalajlama sistemlerinden bir diğeri de akıllı ambalajlardır. Akıllı ambalajlar, gıdanın durumunun izlenmesine imkan sağladığı gibi taşıma ve depolama sırasındaki farklı faktörler hakkında bilgi de verirler (Pereira de Abreu ve ark. 2011). 2000'lerin başından bu yana, gıda ambalajlama yenilik faaliyetleri giderek akıllı ambalaj geliştirme yönünde genişletilmiştir (Vanderroosta ve ark. 2014). Akıllı ambalajlama sistemleri; pH gibi renk indikatörleri aracılığıyla metabolitlerin indirekt tespiti ile gıdanın tazeliğinin belirlenmesi esasına dayalı tazelik indikatörleri ya da hedeflenen metabolitlerin biyosensörler kullanılarak direkt tespiti şeklindedir (Realini ve Marcos 2014).

Ambalajlama sistemlerindeki modern metodlar tüketiciye ürünü tanıma becerisini ayırteci şekiller, damgalar ya da etiketler aracılığıyla verebilirler (Robertson 2012 p. 4). Akıllı paketler, gıdanın özellikleri ile ilgili tüketiciye bilgi verdiği gibi gıdanın geçmişi ile ilgili de kayıtları tutabilir (Lee ve Rahman 2014 p. 186).

Sıcaklık, nem, pH seviyesini ve maruz kalınan ışığı ölçmek için kullanılan geleneksel sensörler dışında gıdaların kalitesi ve paket bütünlüğünü takip edebilmek için son yıllarda kimyasal sensörlere ağırlık verilmektedir. Vanderroosta ve ark. (2014) yapmış olduğu derlemede, Google Scholar verilerine göre 2002 den 2012 senesine doğru akıllı ambalajlama alanında yapılan bilimsel çalışmaların arttığı belirtilmiştir.



Şekil 2-4: Akıllı Ambalajlama Alanında Yıllık Bilimsel Yayın Sayısı (Vanderroosta ve ark. 2014)

Akıllı ambalajlama sistemleri sayesinde patojen ve tazelik indikatörleri aracılığıyla uçucu ve uçucu olmayan metabolitlerin tespiti ve sayımı ile gıdaların bozulup bozulmadığı ve güvenilirliği tespit edilebilir. Bu sistemin bir diğer önemli yanı ise, kullanımı kolay olması, maliyetinin ucuz olması, taşıma görevlerini yerine getirebilmesi ve entegre edilebilmesidir (Ahvenainen 2003 p. 11).

Aday ve Yener (2015)'in yapmış oldukları çalışmada tüketicilerin ürünlerin kalitesini ve raf ömrünü görsel olarak takip edebildiği için akıllı ambalajları aktif ambalajlara tercih ettiğini belirtmişlerdir. Türkiye gibi sıcak havaya sahip ülkelerde genelde aktif ambalaj tercih edilmesine rağmen ambalaj içerisindeki paketler tehlikeli olarak görüldüğü için tercihi azalttığı ayrıca vurgulanmıştır.

Gıdaların güvenilir ve taze olmalarına verilen önemin tüketiciler gözünde artması, izlenebilirlik alanında globalleşme ve akıllı ambalajlama sistemlerinin gıdaların kalitesini ve gıdaların tedarik zincirindeki kritik kontrol noktalarının izlenmesine olanak sağlamasından dolayı akıllı ambalajlama sistemleri gelecek yıllarda büyük öneme sahip olacaktır (Ahvenainen 2003 p. 16).

Gelişmiş ambalaj bileşenlerinin 2011 yılında 6,5 milyar Amerikan doları satış getirisi olmuştur ve bu miktarın 2017 yılında %6,3 yıllık bileşik büyüme oranı

artışından sonra yaklaşık 9,4 milyar \$ olması beklenmektedir. Akıllı ambalajların satışı da 2011 yılında yaklaşık 3,8 milyar \$ iken 2017 yılında %5,6 yıllık bileşik büyüme oranı artışından sonra yaklaşık 5,3 milyar \$'a yaklaşması beklenmektedir. Bu büyümenin sebebi ise, ambalajlama sistemlerindeki avantajların fark edilmesi ve tüketiciler tarafından kabul edilirliliğinin artmasından dolayı birçok firmanın bu ürünleri satmaya başlaması ve bunun da rakamlardaki değişime yansımadır (Cirillo ve ark. 2015). Avrupadaki Çevre kanunları (EC) 1935/2004 Avrupa pazarında aktif ve akıllı ambalajlar ile ilgili bilgilendirmeye izin vermektedir. Çevre mevzuatlarından (EC) 1935/2004 ve 450/2009 numaralı yönetmeliklerde aktif ve akıllı ambalajların kullanımı ve güvenilirliğine yönelik yönlendirmeler yapılmaktadır (Cirillo ve ark. 2015).

Akıllı ambalajlama sisteminde kullanılan 3 temel sistem; sensör, radyo frekanslı tanımlama etiketleri (RFID) ve indikatörlerdir (Kerry ve ark. 2006).

2.6.2.2.1. Sensör Sistemleri:

Sensör sistemleri genellikle MAP ve vakum paketlenme gibi paketlenme sistemlerinde kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Çoğu sensörler iki temel fonksiyonel birimler içerir; bir reseptör ve transformatör (dönüştürücü). Reseptörde, fiziksel ya da kimyasal bilgi transformatör ile ölçülebilir bir enerji formuna dönüştürülür. Transdüser örnek ile ilgili fiziksel ve kimyasal bilgiyi taşıyan enerjiyi kullanılabilir analitik sinyale dönüştürür (Kerry ve ark. 2006). Sensör bileşenleri gıda ile temas eden malzemelerde kullanılmak üzere onaylı olmalıdır. Ayrıca, analiz için pahalı bir enstrümantasyon gerektirmemelidir ve eğitimsiz bir kişi tarafından bile kontrol edilebilir olmalıdır. Aynı zamanda analitlere doğru geri dönüşü olmayan bir yanıtı sergilemesi gerekir (Puligundla ve ark. 2012). Güvenlik, kalite ve izlenebilirliği garanti etmek için gıda üreticilerine yapılan baskı gıdaların ambalajlanmasında sensör teknolojisinin kullanımını arttırmaktadır (Kerry ve ark. 2006).

Gaz Sensörleri

Paketin tepe boşluğundaki gaz yoğunluğu gıdada oluşan değişimlere, paketin yapısına veya çevre koşullarına bağlı olarak değişebilir. Örneğin, taze ürünlerin yaptığı solunum, bozulma yapan mikroorganizmalar tarafından üretilen gazlar, ambalaj malzemesi veya paketteki sızıntılar yoluyla meydana gelen gazlar paketin içindeki gaz kompozisyonunda değişime neden olabilir (Yam ve ark. 2005). Kress-Rogers (1998)'dan yapılan alıntıya göre, gaz tespiti için amperometrik oksijen sensörleri, potansiyometrik karbondioksit sensörleri, metal oksit yarı iletken alan etkili transistörler, organik iletken polimerler ve piezoelektrik kristal sensörleri kullanılmaktadır (Kerry ve ark. 2006).

- **O₂ Sensörleri:** Sensör bir lipofilik indikatör boyanın ve uygun bir polimerin organik çözücü içinde çözünmesi ile üretilir. Bu kokteyl bir polyester film ya da cam gibi bir katı alt-tabakaya uygulanarak floresan bir film kaplama ya da bir nokta üretmek için kuru bırakılmıştır. Etlerde kullanılan birçok pakette ve MAP sistemlerinde kullanılabilir. OxySense® ve O2xyDot® O₂ sensörlerindedir (Kerry ve ark. 2006).
- **CO₂ Sensörleri:** Gıdaların güvenlik ve tazeliğini korumak ve gerçek zamanlı tazeliğini değerlendirmek için ucuz, doğru, hızlı, güvenilir, non-invaziv ve non-yıkıcı yöntemler veya cihazlara ihtiyaç vardır. Bu nedenle gaz kompozisyonu hakkında bilgi verebilen görsel ya da enstrümantal olarak ölçülebilir teknoloji geliştirilerek tüketiciye ulaşana kadarki noktalarda ambalajlanmış gıda ile ilgili kalite bilgilerine ulaşılabilir. Geleneksel yöntemlerde, CO₂ sensörleri dönüştürücünün türüne göre, optik ve elektrokimyasal olarak 2 tiptedir. Elektrokimyasal CO₂ sensörleri daha potansiyometrik, amperometrik olarak kategorize-sub ve iletkenlik türleridir. Non Distributive Infrared (NDIR) ve Severinghaus tipi sensörler gaz ve çözünmüş CO₂ tespiti için kullanılırlar. Gazı geçiren bir zarla kaplı CO₂ ve bikarbonatın reaksiyona girmesi sonucu iletkenliğin değişimi sonucu ölçüm yapılır. Kawabata ve ark. (1989); Mills ve ark. (1992), Mills ve ark. (1997)'den yapılan alıntıya göre de yenilikçi yöntemlerde optik CO₂ sensörleri; pH indikatör boya (fenol kırmızısı, kresol kırmızı, timol mavis vb.) kolorimetrik değişimine dayalı sensörler ve rutenyum (II) kompleksleri ve 1-hidroksipiren trisülfonat gibi fosforlu boyaların CO₂'e

bağlı olarak oluşan floresan renk değişimleri esasına dayalı sensörler olarak iki çeşittirler (Puligundla ve ark. 2012).

Biyosensörler

Biyosensör biyokimyasal reaksiyonlara ait bilgileri algılayan, kayıt alan ve aktaran bir kompakt analitik cihazdır. Bu akıllı cihaz 2 bileşenden oluşmaktadır: Bir hedef analitiği tanıyan bir biyoreseptör ve biyokimyasal sinyalleri ölçülebilir elektrik tepkisine dönüştüren bir transformatör (dönüştürücü). Biyoreseptör enzim, antijen, mikroorganizma, hormon ya da nükleik asit gibi organik ya da biyolojik materyal olabilir (Yam ve ark. 2005). Gıda ambalajları için bu tür sistemler göz önüne alındığında, bu sistemlerin mikrobiyal kontaminantların saptanmasına yönelik olduğu söylenebilir. Bodenhammer (2002) ve Bodenhammer ve ark. (2004)'dan alıntı yapan Kerry ve ark. (2006) göre, Toxin Alert (Ontario, Canada) tarafından geliştirilen Toxin Guard® polietilen bazlı ambalaj materyali ile antikorların birleşimi ile *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *E. coli* 0157 ve *Listeria* spp.'yi görsel olarak teşhis edebilir. SIRA Technologies (California, USA) tarafından üretilmiş The Food Sentinel Systeme kontaminasyonun barkodda immünolojik reaksiyonlar yoluyla algılanmasını sağlayan bir biyosensör sistemidir.

2.6.2.2.2. Radyo Frekanslı Tanımlama Etiketleri (RFID):

RFID teknolojisi sensör ya da indikatör yerine elektronik bilgi vererek çalışmaktadır. Bu sistemde konteyner ya da paletlere takılı etiketlerden kullanıcıya direkt bilgi aktarımı gerçekleşir. Bu etiketler 50 metreye kadar aktivasyon sağlayan ve pil ile çalışan aktif etiketler ve 5 metreye kadar okuma yapabilen okuyucu tarafından sağlanan enerji ile çalışan pasif etiketler olarak ikiye ayrılırlar (Kerry ve ark. 2006). RFID sisteminde, okuyucu (bir verici ve/veya alıcıdan oluşan bir okuma/yazma cihazı) RFID etiketi ile iletişim kurmak amacıyla antenleri aracılığıyla elektromanyetik dalgaları (EM) kullanır. Bu etiketler antene takılı mikroçipden oluşan bilgi taşıyıcı alet olabilir (Vanderroosta ve ark. 2014).

Bu sistem sayesinde depoda ve raftaki ürün miktarına, raf ömrünü tamamlayan ürünlere, ürünlerin uygun sıcaklık koşullarında depolanıp depolanmadığı gibi bilgilere ulaşılabilmektedir (Kokangül ve Fenercioğlu 2012).

2.6.2.2.3. İndikatörler:

İndikatör olarak kullanılabilen erime noktası sıcaklığı, enzim reaksiyonu, polimerizasyon, korozyon ve likit kristalleri gibi birçok fizikokimyasal prensipler vardır. Bu indikatörler renk değişimi, hareket ya da hem renk değişimi hem hareket şeklinde 3 farklı yanıt verirler (Selman 1995 p. 217). İndikatörler pahalı olmamalı, toksik olmamalı ve suda çözünür bir yapıya sahip olmamalıdır (Puligundla ve ark. 2012). İndikatör olarak metilen mavisi ve diğer renk indikatörleri, asitler, antioksidanlar, mineral yağlar, şekerler ve elementler (K, Mg, Na, Al, Si, Ca) kullanılabilirler (De Kruijf ve ark. 2002).

A- Gaz sızıntısı (Gaz Konsantrasyon) İndikatörleri:

Oksijen ve karbondioksit indikatörleri gıda kalitesini izlemek için kullanılabilirler. Bu indikatörler genellikle kimyasal ve enzimatik reaksiyonlar sonucu renk değişimi esasına dayalı olarak çalışırlar ve paket içerisindeki gaz ile temas halinde olmak zorunda olduğundan gıda ile de direkt temas halindedir (De Jong ve ark. 2005).

1- O₂ İndikatörleri: Paket içerisinde bulunan oksijen oksidatif acılaşmaya, renk değişimine ve mikrobiyal bozulmalara sebep olabilir. Bu sebeple oksijen indikatörleri en çok kullanılan gaz indikatörleridir (Yam ve ark. 2005). Tipik bir oksijen indikatörü redoks-boyası (metilen mavisi gibi), bir alkalın bileşik (sodyum hidroksit gibi) bir indirgeyici bileşikten (indirgeyici şekerler gibi) oluşur. Oksijen indikatörleri temel olarak oksidatif enzimlerden oluşmaktadır. Ayrıca, bir çözücü (su ya da bir alkol) ve hacim arttırıcı (silika jel, polimerler, selüloz malzemeleri, zeolit gibi) da indikatöre eklenebilir. İndikatörler etiket, tablet, baskılı tabaka olarak ya da polimer film katmanı olarak üretilirler (Otlas ve Yalcin 2008). Japonya'da Mitsubishi Gas Chemical Co. Ltd. tarafından üretilen Ageless-Eye® indikatörlere örnek olarak gösterilebilir (Ahvenainen ve Hurme 1997). O₂ indikatörleri tablet bulunan poşetlerin paket içerisine yerleştirilmesi şeklinde de kullanılabilirler (De Kruijf ve ark. 2002).

2- CO₂ İndikatörleri: CO₂ indikatörleri, paket içerisinde bir sızıntı olup olmadığını kontrol amaçlı kullanıldığı gibi mikrobiyal üreme kontrolü (mikroorganizmalar üredikleri zaman CO₂ oluştururlar ve oluşan CO₂ de

paketin üst kısmında toplanır) için de kullanılabilirler (Hurme 2003 p. 280). Mills ve McMurray (1991)'den alıntı yapan Smolander ve ark. (1997) göre, Balderson ve Whitwood tarafından üretilen CO₂ indikatörü MAP'da kullanıma uygun olarak tasarlanmıştır. İndikatör 5 indikatör şeritten oluşmaktadır. Şeritler, bir indikatör anyonu ve bir lipofilik organik kuvaterner katyonundan oluşur. Her şeritler CO₂ yoğunluğu belli düzeyin (örneğin %25, %20, %15, %10 veya %5) altına düştüğünde renk değiştirir. CO₂ konsantrasyonu bir veya birden fazla şeritte oluşan renk değişimine göre belirlenir. İngiltere'de Sealed Air Ltd tarafından üretilmiş olan Tufflex GS® de indikatörlere bir örnektir (Ahvenainen ve Hurme 1997). CO₂ indikatörleri paket içerisinde etiket olarak kullanılabilirler (De Kruijf ve ark. 2002).

B- Sıcaklık-Zaman İndikatörleri:

Kullanılan kritik sıcaklığın üzerine çıkılan kümülatif sıcaklık- zamanı göstermek için tüm sıcaklık geçmişini veren "sıcaklık-zaman indikatörü" ve kritik sıcaklığın altında da üstünde de olsa bilgi veren "sıcaklık indikatörü" olmak üzere iki çeşit sıcaklık indikatörü vardır (Ahvenainen ve Hurme 1997). Sıcaklık indikatörleri ya mevcut sıcaklığı gösterir ya da 8 °C gibi soğutma ya da dondurma noktası gibi önceden belirlenmiş bir sıcaklık eşiğine geldiğini belirtir. Sıcaklık-zaman indikatörü ise, maruz kalınan sıcaklığın geçmişi hakkında bilgi veren fiziko-kimyasal bir mekanizmadır (Selman 1995 p. 216).

Sıcaklık-zaman indikatörleri (TTI) gıda üreticilere, tüketicilere ve perakendecilere ambalajlanmış gıda ile ilgili sağlık, güvenilirlik ve kalite ile ilgili güvence vermesi sebebiyle akıllı ambalajlama teknolojisindeki önemli araçlardan biridir (Selman 1995 pp. 228-229). Gıdaların kalitesi yüksek sıcaklıklarda daha hızlı bozulduğundan dolayı gıdaların güvenliğini arttırmak için sıcaklığın devamlı olarak düşük ısılarda tutulması gereklidir (De Jong ve ark. 2005). Sıcaklık ve kalitenin birbiriyle bağlı olmasının sebebi ise, yüksek sıcaklıklarda biyokimyasal reaksiyonlar ve mikrobiyal üremelere bağlı olarak yüksek sıcaklıklarda bozulmanın daha hızlı olmasıdır. Bu indikatör çeşidi paketin dışına yapıştırılan etiket şeklinde kullanılabilir (De Kruijf ve ark. 2002).

Bu etiketler dağıtım ve depolama sırasında soğutulmuş ve dondurulmuş ürünlerin maruz kaldığı yanlış sıcaklığın gözle görülür hale gelmesini sağlarlar.

Ayrıca bu indikatörler bozulabilir ürünlerin kalan raf ömrünü tahmin etmek açısından tazelik indikatörü olarak da kullanılabilirler (Yam ve ark. 2005). Sıcaklık zaman kontrolü etiketleri özellikle et, balık, kanatlı eti, içecekler ve hazır gıdalarda kullanılmaktadır (Day 2003 p.283).

Paketlerin üzerine etiket şeklinde yapıştırılan indikatörler, dağıtım zinciri boyunca paketin maruz kaldığı sıcaklıklar hakkında bilgi verir. Bu bilgiler genellikle mekanik deformasyon, renk değişimi ve hareketlenmesi şeklinde görünür bir cevap olarak meydana gelir (Ahvenainen ve Hurme 1997). Sıcaklık zaman indikatörlerinin çalışma prensibinde meydana gelen cevaplar mekanik, kimyasal, enzimatik ve mikrobiyolojik olarak meydana gelen geri dönüşümsüz değişimlerdir (Hogan ve Kerry 2008 p. 47) Ayrıca bu indikatörler, korozyon, polimerizasyon ve erime noktası prensibine de bağlı olarak çalışırlar. Sıcaklık-zaman indikatörlerinde önemli olan indikatörün çalışma süresidir. Her indikatörün belli ömrü olduğu için raf ömrünün kontrolü açısından bozulma süresi (raf ömrü limiti) ile bu süre eşit zamanlarda dolmalıdır (De Kruijf ve ark. 2002; De Jong ve ark. 2005).

TTI paketlerin tek tek dışına yapıştırılacağı gibi büyük kutu ya da kolilerin dışına da yapıştırılabilir (De Jong ve ark. 2005). PakSense® ticari olarak satılan sıcaklık zaman indikatörlerinden biridir. Bu etiketlerde uyulması gereken sıcaklık limitleri etikete işlenerek dağıtım süresince su ürünleri, ilaç ve etin maruz kaldığı sıcaklıklardan sapma olup olmadığı tespit edilebilir. Onvu® da sevkiyat boyunca maruz kalınan sıcaklığın kontrolü amacıyla kolilerin dışına yapıştırılan etiketlerdendir (Özçandır ve Yetim 2010).

En çok kullanılan çeşitleri; fiziksel bariyerler (plastik ısı ile daralan kol ve boyun bantları gibi), bant ve etiket şeklinde mühürler, kutuların bir ucundan diğerine geçen kağıt/plastik/folyodan yapılmış iç mühürlerdir. Ticari olarak satılan indikatörlerden bazıları yapışkanlı etiket ve bantlar, çözücü çözünen boyalar ve enkapsüle boyalar, optik değişken filmler ve holografik açma şeritleridir (Selman 1995 p. 216). Birçok aktif ambalajlama sistemlerinde olduğu gibi sıcaklık kontrol ambalajlamada da Japonya dünyanın en büyük ülkesidir (Day 2008 p. 15). Amerika'da birçok soğutulmuş hazır et ve süt ürünlerinde kullanılmaktadır. Avrupada ise Fransa en çok üreten ülkedir (Ahvenainen ve Hurme 1997).

Sıcaklık-zaman indikatörleri diffüzyon bazlı (3M Monitor Mark[®], Freshness Check[®]), polimer bazlı (Lifelines Freshness Monitor[®], Fresh-Check[®]) ve enzimatik (VITSAB TTI[®]) olarak 3'e ayrılırlar (Kerry ve ark. 2006).

Avery Dennison (Amerika) firması tarafından üretilmiş olan TT Sensor[®] diffüzyon temeline dayalıdır. Polar bileşik iki tabaka arasına yayılır ve konsantrasyonunu değiştirerek rengin sarıdan pembeye dönmesine neden olur (Taoukis 2008 p. 64; Park ve ark. 2015). Manske tarafından 1976 yılında patenti alınan ve 3M Company (St. Paul, MN, Amerika) tarafın üretilen 3M Monitor Mark[®] renkli bir yağ asidi esterinin yüksek kaliteli kurutma kağıdından yapılmış gözenekli fitil boyunca diffüzyonu esasına dayanır. Aynı şirket tarafından üretilmiş olan Freshness Check[®] ise, viskoelastik materyalin sıcaklığa bağlı oranda ışığı yansıtan gözenekli matriks içine diffüzyonu şeklinde aktivitesini gösterir. Gözenekli matriks de ışık geçirgenliğinde değişikliğe neden olarak görsel yanıt oluşmasını sağlar (Kerry ve ark. 2006).

Temptime Corp., Morris Plains, NJ (Amerika) tarafından üretilmiş Fresh-Check TTI[®], katı hal polimerizasyon reaksiyonu temeline dayanarak renkli polimerlerin açığa çıkmasıyla etkisini gösterir. Merkezde oluşan renk ile renk halkasını çevreleyen referans renk karşılaştırılır (renksiz halka mavi renge) dönüşür (Hogan ve Kerry 2008 p. 49; Park ve ark. 2015). Temptime Indicator (Paris, Fransa) tarafından üretilmiş Temptime Freshness Monitor[®] ve Fresh-Check[®] de katı hal polimerizasyon reaksiyonu esasına dayalıdır (Koutsoumanis ve Gougouli 2015). Ciba Specialty Chemicals & Freshpoint (İsveç) tarafından üretilmiş OnVu[®] TTI katı hal reaksiyonuna dayalı bir diğer indikatördür. Benzilpiridin gibi organik pigmentler, ışığa duyarlı bileşikler sıcaklığa bağlı olarak renk değiştirirler. Ultraviyole (UV) ışığı ile aktive edilir ve etikette bulunan içteki mavi kalp beyaz renge döner (Koutsoumanis ve Gougouli 2015).

VITSAB A.B. (İsveç) tarafından üretilen CheckPoint[®] TTI, lipid substratlarının enzimatik hidrolizi sonucunda pH'nın düşmesi sonucu koyu yeşil indikatörün sarı ve portakal kırmızısı renge dönüşmesi ile etkisini gösterir (Taukis 2008 p. 68; Park ve ark. 2015). Blixt and Tiru (1977) tarafından patenti alınmış ve I-Point Company (İsveç) tarafından üretilmiş I-Point[®] lipid substratın enzimatik hidrolizi sonucu pH'nın düşmesi ve renk değişiminin meydana gelmesi esasına dayanır. Aktivasyon öncesi lipaz ve lipid substratı iki ayrı bölümde

bulunmaktadır. Aktivasyon sonrası bariyer kırılır enzim ve substrat birbirine karışır böylece renk değişimi başlamış olur. Reaksiyon penceresi etrafında oluşan renkler; 0 (Yeşil), 1 (Sarı), 2 (Turuncu), 3 (Kırmızı) olarak adlandırılır ve meydana gelen değişimlerin gözle görülür biçimde ölçülmesi sağlanır (Taoukis ve Labuza 1989).

Fransız şirketi CRYOLOG (Gentilly,Fransa) mikrobiyal sistemlere dayalı iki adet TTI üretmiştir. TRACEO[®] seçilmiş laktik asit bakterilerini (LAB) içeren küçük mavi etiketlerdir. Üründe kritik sıcaklık ihlalleri yaşandığında ya da ürün son kullanım tarihine ulaştığında mavi renk geri dönüşümü olmadan pembeye döner ve opaklaşma meydana gelir (Ellouze ve ark. 2008). CRYOLOG şirketinin üretmiş olduğu diğer indikatör ise eO[®], uygun pH indikatörleri aracılığıyla mikrobiyal gelişim olduğunda renk değişimine (yeşil renk kırmızıya dönüşür) sebep olur (Taoukis 2008 p. 63; Park ve ark. 2015). Keep-it[®], Keep-it Technologies (Norveç) tarafından üretilmiş kimyasal reaksiyona bağlı olarak etkinlik gösterir. Bu indikatör, hareketsizleştirilmiş bir reaktan (Fe³⁺ gibi) ve bir mobil reaktan (ferrosiyandır gibi) içerir. İki reaktan birbirlerinden mühür ile ayrılmış iki ayrı bölmede bulunurlar. İndikatörün aktif hale geldiğinin göstergesi olarak iki reaktan birbirleriyle temas haline geçince bölümler arasındaki mühür ortadan kalkar ve görsel olarak tespit edilebilir bir reaksiyon meydana gelir (Koutsoumanis ve Gougouli 2015).

Sıcaklık-zaman etiketlerinin en önemli katkısı kalite ve güvenliği etkilediği için taze balıkların dağıtım ve tüketimi sırasında sıcaklık-zaman çizelgesinin takip edilebilmesi yönündedir. Uygun olmayan paketlenme, taşıma ve depolama işlemleri balık ürünlerinin kısa sürede bozulmasına sebep olurlar (Giannakouroua ve ark. 2005). Sadece balıklarda değil aynı endişe özellikle çabuk bozulabilen kıyma, tavuk gibi gıdalarda da olduğu için tez çalışmasında sıcaklık-zaman etiketi kullanılmak istenmiştir.

Teknokim (İzmir, Türkiye) (<http://www.teknokimkimya.com>) ise Türkiye'nin ilk yerli kimyasal ve biyolojik indikatörler üreticisi olmasının yanında 2007 yılında TS EN ISO 11140 belgesi ile ilk kimyasal indikatör üreticisi olmuştur. Gıda, ilaç ve aşı sektöründe kullanılmak üzere 0 °C/2 °C, 2 °C/9 °C/26 °C' ye duyarlı sıcaklık zaman indikatörleri üretilmektedir. İndikatör

içerisinde bulunan polimer kimyasal rezervuar ile dolu medikal ped -42°C ile 38°C arası sıcaklıklarda hareket ederek ortam ısısı hakkında bilgi vermektedir.

C- Tazelik İndikatörleri:

Tazelik indikatörleri direkt olarak gıdanın kalitesi hakkında bilgi verirler (Smolander 2003 p. 128). Sıcaklık-zaman etiketleri mikrobiyal gelişim hakkında bilgi verirken gaz sızıntı indikatörleri mikrobiyal gelişim ve kontaminasyon hakkında bilgi verebilir. Tazelik indikatörleri ise her iki durum sonucunda da meydana gelebilecek mikrobiyal bozulma hakkında direkt bilgi verebilir.

Paketlenmiş yiyeceklerin kalite kontrolü için sıcaklık ihlalleri ya da paketteki sızıntıların dışında ürünün tazeliğinin azalıp azalmadığı ya da bozulup bozulmadığı gösterilmelidir. Patent literatürlerinde, CO_2 , diasetil, aminler, amonyak ve hidrojen sülfid gibi gıdaların olgunlaşmaları sırasında açığa çıkan uçucu metabolitlerin tespitine dayalı birçok tazelik indikatörü ya da kavramı bulunmaktadır (De Kruijf ve ark. 2002). Tazelik indikatörü olarak aynı zamanda, glukoz, organik asitler (laktik ve asetik asitler), etanol, uçucu azot bileşikleri (amonyak, dimetilamin, trimetilamin), biyojenik aminler (tiramin, kadaverin, putresin, histamin), ATP bozunma ürünleri ve kükürt bileşikleri (hidrojen sülfat) kullanılabilir (Smolander 2003 p. 130). Etanole duyarlı ambalajlarda tepede biriken etanol ile peroksidaz, alkol oksidaz ve kromojenik substrat ile reaksiyona girerler (Smolander 2003 pp. 128-143).

Tazelik indikatörlerinin etkisi, ürünün tipine, bozulma florasına, ambalajlama sistemine ve depolama koşullarına bağlıdır. Geniş renk değişim aralığına sahip indikatörlerde ise bazı dezavantajlar bulunmaktadır. Renk değişimleri üründe meydana gelen bozulma gibi değişimler dışında başka etkilerle oluşabilir (Kerry ve ark. 2006). Ürün tipine özgü tazelik indikatörlerine örnek olarak paketlenmiş balıklarda kullanılan tri-metilamin N-oksit (TMAO)'in bakteriler tarafından redükte edilmesiyle oluşan tri-metil amin ya da toplam indirgenmiş azot gazına bağlı olarak üretilenler verilebilir (De Jong ve ark. 2005).

Avantajlı olduğu alanlar ise; noninvazif olması (böylece herhangi bir paket içerisine yerleştirilebilir), ucuz olması, mikrobiyal kontaminasyonu tespit açısından etkin olması, antibiyotiklere gerek duyulmaması, esnek ambalajlama

materyalleri ve tek kullanımlık doku kültür ürünleri ile uyumlu olması, kullanılan ambalajlama sistemlerine işlevsellik katmak amacıyla eklenebilir olmasıdır (De Jong ve ark. 2005).

Bozulma sonrası oluşan mikrobiyal metabolitleri tespit amacıyla renk değişimi esasına dayalı pH indikatörleri kullanılabilir (Kerry ve ark. 2006).

Karışım boyalardan oluşan bozulma indikatörleri (bozulma sonucu oluşan CO₂ miktarını gözle görülebilir hale getiren pH duyarlı metil red ve bromtimol blue) son kullanma tarihinden önce bozulan ürünlerin tüketimini azaltmaktadır. Gıdaların güvenilirliğinin garanti edilebilmesi tüketiciler için en önemli etmendir. Üreticiler için ise ürünlerin güvenilirliği müşteri memnuniyetsizliğini engelleyip markalarının değerini arttırmak açısından önemlidir. Bu indikatörlerin minimal işlenmiş gıdalar, kolay hazırlanan gıdalar, fermente gıdalar, taze et ve et ürünleri, kümes hayvanları ve kümes hayvanları ürünleri, deniz ürünleri ve su ürünleri, ekmek ve unlu mamuller, tatlılar ve taze kesilmiş meyve ve sebzeler gibi ürünlerde kullanılabilmesi için gelecekte yeni çalışmalar yapılmalıdır (Nopwinyuwonga ve ark. 2010).

Uçucu aminlerle reaksiyona giren tazelik etiketlerine bir örnek olarak Fresh Tag[®] verilebilir. Cox Technologies (Plainfield, IL, Amerika) tarafından 1999 yılında üretilmiş olan FreshTag[®] indikatör etiketi balık ve diğer deniz ürünlerinin tazeliğinin saptanmasında kullanılabilir ve uçucu aminler ile reaksiyona girerek etkinliğini gösteren indikatör renk değişimi esasına dayanır (de Kruijf ve ark. 2002; Kerry ve ark. 2006). Deniz ürünleri bozulmaya başladığında uçucu aminler üstte toplanır, reaktif ile reaksiyona girerek etiketteki fitilin pembeye dönüşmesi ile sonuçlanır (Kerry 2014 p. 559).

Oscar Mayer Foods Corp. (Madison, Amerika) pH değişimine hassas boyalardan temel alan bir tazelik indikatörü geliştirmiştir. Substratlardan biri tükendiği zaman pH değişimi meydana gelir ve yeşil renk pembeye dönüşerek tazelik ile ilgili bilgi verir. Sıcaklık yükseldiği zaman da dengede kaymalar meydana gelir ve renk değişimi gözlenir (Selman 1995 p. 223).

Smolander ve ark. (2002) MAP piliç parçalarında yaptıkları çalışmada hidrojen sülfite duyarlı tazelik indikatörü kullanmışlardır. Etlerde mikrobiyolojik bozulma sonrası oluşan hidrojen sülfid miyoglobinin varlığında renk değişimine sebep olmuştur. Miyoglobine bağlandığında yeşil pigment meydana gelmekte bu

da marine edilmemiş piliçlerde tazelik indikatörü olarak kullanılabilir. Miyoglobindeki renk değişimi özellikle MAP uygulamalarında kullanılan N₂ ve CO₂ gazlarının karışım olarak bulunduğu da meydana gelebilmektedir. Renk değişiminin gözlemlenmesi kokuşmanın da başladığını göstermektedir.

Balamatsia ve ark. (2007) kanatlı etlerindeki tazeliği tespit amacıyla trimetilamin nitrogen (TMA-N) ve toplam uçucu bazik azot (TVB-N)'un tazelik indikatörü amacıyla kullanılabilirliğini yaptıkları çalışma sırasında mikrobiyolojik ve duyu analizler ile korrelasyonunu inceleyerek tespit etmişlerdir.

Pacquit ve ark. (2007) balıklardaki bozulmanın kolorimetrik tespiti amacıyla yaptıkları çalışmada pH duyarlı polimer matriks (Bromocresol green ya da BCG (sodyum tuzu), selüloz asetat, amonyum bromür tuzları) boyası TVB-N ile reaksiyona girerek renk değişimi gözlemlenmeye çalışılmıştır. Bozulma sonucu oluşan aminler paketin üst katmanında toplanmış ve indikatörle reaksiyona girerek BCG'nin sarıdan maviye döndüğü görülmüştür. Meyve ve sebzelerde son kullanım tarihini izlemek, dağıtım ve depolama sürecindeki rotasyonu belirlemek böylece israfı en aza indirmek ve tüketici açısından da hangi ürünün alınıp alınmaması tercihi için tazelik indikatörü kullanılabilir. <http://www.ripesense.com>'dan yapılan alıntıya göre, ripeSense® (Yeni Zelanda) olgunlaşma sırasında açığa çıkan aromalar ile reaksiyona girerek kırmızı olan renginin turuncu ve sarıya döndüğü gözlemlenmektedir. Bu indikatörler armut, kivi, kavun, mango, avokado ve diğer sert çekirdekli meyveler için uygulanabilirler (Kuswandi ve ark. 2013).

Elmalarda, CF₂® tazelik etiketlerinde 17 gün sonrasında molibden mavisini renk gözlenmiştir. Mavinin tonları şeklinde oluşmaya başlayan renk değişimi olgunlaşmanın sonunda koyu mavi hal almakta böylece 5 haftalık süreçte elmaların olgunlaşması takip edilebilmektedir. Molibden mavisinde meydana gelen bu değişim etilen aracılığıyla peroksi molibdatın indirgenmesi sonucu beyaz/sarıdan maviye dönüşmesi ile oluşmaktadır (Lang ve Hübert 2012). Guvalardaki tazeliğin izlenmesi amacıyla uçucu organik bileşimlerin (asetik asit vb.) oluşumu sonucu pH azalmasına duyarlı BPB (bromophenol blue)/selüloz membran kullanılarak rengin maviden yeşile dönüştüğü gözlenmiştir (Kuswandi ve ark. 2013).

Teknokim (<http://www.teknokimkimya.com>) tarafından üretilip ülkemizde satışa sunulan tazelik indikatörü ise pH değişimine bağlı olarak aktivite göstermektedir. Gıdaların direkt üzerine yerleştirilen indikatörler enzimatik aktivite sonrası pH değişimi ile yeşilden sarı renge dönüşmektedirler.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Örneklerin Temini

Örneklerin satış sırasında maruz kalabileceği kontaminasyonların engellenebilmesi amacıyla özellikle çabuk bozulabilen balık direkt halden erken saatlerde alınarak laboratuvara soğuk zincirde ulaştırıldı. Ambalajlama öncesinde iç organlar çıkartılıp temizlenerek hazır hale getirildi. Kasaptan günlük olarak alınarak soğuk zincir altında laboratuvara getirilen etler hızla analiz günleri örneklemeler için paketleni. Tavuk etleri yüzey alanı genişlememesi açısından çalışmadan hemen önce parçalanarak satıştaki boyutlarına getirilip paketleni. Tüm ürün gruplarının alımı 10.02.2015 tarihinde gerçekleştirildi ve aynı gün paketleni. Kıyma, et, ve tavuk her ambalajda 100'er gram balıklar ise 6'şar adet sardalya balığı olacak şekilde bölünerek toplamda 80 adet ambalaj elde edildi. Her ürün grubu için birer paket yapılarak farklı gün ve muhafaza sıcaklıklarına göre sınıflandırıldı. Başlangıç günü (0. gün) analizleri için ayrılan örneklerin analizleri gerçekleştirildi. Analizler İ.Ü. Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.1.2. Ambalajlama ve Etiketlemede Kullanılan Malzemeler

- Polipropilen Tabak 190/144/50 (Apack, Türkiye)
- Polivinilklorid Üst Film (Apack, Türkiye)
- % 60 CO₂ , % 40 N₂ Gaz Kombinasyonu (Messer, Türkiye)
- % 80 CO₂ , % 20 N₂ Gaz Kombinasyonu (Messer, Türkiye)
- %40 CO₂, % 60 O₂ Gaz Kombinasyonu (Messer, Türkiye)
- Soğuk Zincir İndikatörü (Teknokim, Türkiye)
- Tazelik İndikatörü (Teknokim, Türkiye)

3.1.3. Mikrobiyolojik Analizlerde Kullanılan Besiyerleri ve Kitler

- Plate Count Agar (Merck, 1.05463)
- Rogosa Agar (Merck, 1.05413)
- Pseudomonas Agar (Oxoid, CM0559)
- Pseudomonas C-F-C Supplemet (Oxoid, SR0103)
- % 99,5 Gliserin (Tekkim, TK 070190.01000)
- %96 Asetik Asit (Merck, 1000319)
- Tryptone Soya Agar (Oxoid, CM0131)
- Maximum Recovery Diluent (Merck, 1.12535)
- Phosphate Buffered Saline (Oxoid, BR0014G)
- TEMPO AC (bioMérieux, 411113)
- TEMPO TC (bioMérieux, 80006)
- TEMPO EC (bioMérieux, 80004)
- TEMPO EB (bioMérieux, 80003)
- TEMPO LAB (bioMérieux, 80071)
- TEMPO YM (bioMérieux, 80001)

3.1.4. Kullanılan Referans Suşlar

Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan *Morganella morganii* ve *Enterobacter aerogenes* kültürleri İstanbul Üniversitesi Kültür Saklama ve Koleksiyon Enstitüsü'nden temin edilmiştir.

3.1.5. Moleküler Analizlerde Kullanılan Solüsyonlar ve Kitler

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, 11796828001)
- 25 mM MgCl₂ (Thermo Scientific)
- 10X Tag Buffer with KCL (Thermo Scientific)
- Tag DNA Polymerase 5 U7 μ L, 500 U (Thermo Scientific, EP0402)

- dNTP Set (Thermo Scientific, R0182)
- Ethanol Absolute (Sigma-Aldrich, 32221)
- 2- Propanol (Sigma-Aldrich, I9516)
- Lysozyme 50000U/mg (Merck, 05281)
- 10 mM Tris-HCL, pH 8,0
- Agarose D1-LE (Wisent, 800-015-EG)
- Safe View Classic (ABM, G108)
- GeneRuler 100 bp DNA Ladder 0,5 µg/µl, 50 µg (Thermo Scientific, SM0241)
- 1X TAE Buffer
- QX200 Droplet Generation Oil for EvaGreen (Biorad, 1864005)
- ddPCR Droplet Reader Oil (Biorad, 1863004)
- QX200 ddPCR Supermix for EvaGreen (Biorad, 1864034)
- DG8 Cartridges for Droplet Generator (Biorad, 1864008)
- Microseal 'B' Seal Seals (Biorad, MSB1001)
- ddPCR Plate Kit (Biorad, 10023379)
- Droplet Generator DG8 Gasket (Biorad, 1863009)

3.1.6. Laboratuvarlarda Kullanılan Alet – Ekipmanlar

- Ambalajlama Cihazı (Ponapack, VTK 40SC, Türkiye)
- Stomacher (Seward 400, İngiltere)
- Tüp Karıştırıcı-Vortex (Fine Vortex – FINEPCR, Kore)
- İnkübatör (Memmert, IN55, Almanya) (37 °C)
- İnkübatör (Memmert, IN 55, Almanya) (30 °C)
- İnkübatör (Memmert, IN 55, Almanya) (25 °C)

- Soğutucu İnkübatör (Panasonic, MIR-254-PE, Japonya) (7 °C)
- Su Banyosu (Memmert, SV-1422, Almanya)
- TEMPO Hazırlama Ünitesi (bioMérieux, Fransa)
- TEMPO Okuma Ünitesi (bioMérieux, Fransa)
- Ultra-Deiyonize su Cihazı (Sartorius, 611VF, Almanya)
- Otoklav (HV-50L, Hirayama, Japonya)
- Derin Dondurucu (Bosch, GSD30M10NE, Almanya)
- Derin Dondurucu (Uğur, ULF 410SSL, Türkiye)
- Buzdolabı (Samsung, RSA1STSL, Güney Kore)
- Tip II Biyogüvenlik Kabini (Nuaire, 425-400E, ABD)
- Hassas Terazı (RADWAG, WTB2000, Polonya)
- Hassas Terazı (Sartorius, CP224S, Almanya)
- pH Metre (Hanna, HI2211, Amerika)
- Santrifüj (VWR, 16DH, Amerika)
- Santrifüj (Hettich, D-78532, Almanya)
- Heating/Cooling Dry Block (Grant-Bio, PCH-2, İngiltere)
- Mini Mikrosantrifüj (ISOLAB, D1008, Almanya)
- Thermal Cyclers (Biorad, PTC0200, Meksika)
- Elektroforez Ünitesi (Thermo Scientific, Amerika)
- Görüntüleme Sistemi (VILBER LOURTMAT, Almanya)
- EPOCH Mikroplaka Spektrofotometre (BioTek, Amerika)
- PX1 PCR Plate Sealer (Biorad, 1814000, Amerika)
- QX200 Droplet Generator (Biorad, 1864002, Amerika)
- QX200 Droplet Reader (Biorad, 1864003, Amerika)
- Cam ve Diğer Laboratuvar Malzemeleri

3.2. YÖNTEM

Çalışmada kullanılan örneklerin hazırlanması, ambalajlanması, mikrobiyolojik ve fizikokimyasal analizlerinin yapılması amacıyla İ.Ü. Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü laboratuvarları, ddPCR analizleri için ise İ.T.Ü. Teknokent’de bulunan İontek A.Ş. laboratuvarları kullanılmıştır.

3.2.1. Örneklerin Ambalajlanması ve Akıllı Etiketlerin Yerleştirilmesi

Örneklerin temin edildiği başlangıç gününde materyal olarak polipropilen tabaklar ve üst film olarak da polivinilklorid kullanılarak ambalajlama yapıldı. Tabaklara örnekler koyulmadan önce marketlerde de satışa sunulduğu şekilde içerisine kurutma kağıdı koyuldu böylece numuneden sızan suyun örnekleri mikrobiyal üremeye açık hale getirmesi de engellenmiş oldu. Tabaklara örnekler yerleştirildikten sonra Teknokim tarafından üretilmiş olan pH ölçümü esasına dayalı tazelik etiketleri örneklerle temas edecek ve renk değişimi dışarıdan gözlenecek şekilde paketlere yerleştirildi.

Paketler Ponapack VTK 40SC ambalajlama cihazına yerleştirilerek kontrol grupları içerisine herhangi bir gaz verilmeden yüzeyleri makine içerisinde filmle kaplanarak soğuk ve donmuş muhafazaya alınacak 52 adet ambalajlar hazır hale getirildi. MAP için ise önceden hazırlanan balık, tavuk, kıyma ve parça et için uygun olan gaz kombinasyonları kullanıldı. Balık için %60 CO₂ - %40 N₂ , tavuk için %80 CO₂ - %20 N₂ parça et ve kıyma için ise %40CO₂ - % 60O₂ gaz karışımları kullanılarak ambalajlama yapıldı ve sadece soğuk muhafazaya alınacak 28 adet ambalaj elde edilmiştir.

Makineden çıkartılan paketlerdeki filmlerin dış yüzeyine yine Teknokim tarafından üretilmiş olan sıcaklık-zaman etiketleri yapıştırıldı. Bu etiketler sayesinde soğuk deponun uygun olarak çalışıp çalışmadığı kontrolü yapılarak numunelerin uygunsuz depolama sonucu bozulması engellendi. Aynı zamanda soğuk ve donmuş muhafaza ısıları depo dışarısında elektronik olarak takibe olanak veren termometre tarafından takip edilerek etiketlerin uygunluğu değerlendirildi. 4 saat sonunda etkisiz hale gelen etiketlerden dolayı depo ısısının elektronik takibi daha önemli hale geldi. Paketler soğuk muhafaza amacıyla 0 °C’lik dolaba alındığında sıcaklık zaman etiketi

aktif hale geçebilmesi için etiketin fitili depolama alanında çıkartıldı. Soğuk ve donmuş muhafazadaki numunelerimiz analiz zamanları doluncaya kadar depolandı.

3.2.2. Mikrobiyolojik Analizler

Başlangıç gününde ürünlerin mikrobiyolojik yüklerinin tespiti amacıyla tüm ürün gruplarına mikrobiyolojik analiz yapıldı. İlk gün analizleri ürünlerin başlangıç floresanın tespiti böylece bozulma arttıkça artan mikrobiyal yükün doğru istatistiki değerlendirilmesi açısından önem taşımaktadır.

Soğuk muhafazadaki örneklerin mikrobiyolojik analizleri 1., 3., 5., 7., 9., 12. ve 15. günlerde, donmuş muhafazadaki örneklerin ise 15., 30., 90., 120., 150. ve 180. günlerde yapıldı. Her analiz 2'şer tekrarlı olarak yapıp ortalama değerler dikkate alınmıştır. Ayrıca analiz günlerinde kontrolü yapılarak bütünlüğü bozulmamış ambalajlar alınıp analizleri yapıldı.

Maximum Recovery Diluent (MRD) 9.5 g tartılarak 1 litre distile su ile sulandırıldı ve 121 °C'de 15 dakika otoklav yapılarak steril hale getirildi. Mikrobiyolojik analizler amacıyla TEMPO cihazı ve klasik kültürel yöntemler tercih edildi. TEMPO cihazı ile yapılan analizlerde filtreleri daha küçük olması sebebiyle TEMPO stomacher poşeti kullanıldı. Balık örneklerinden derisinden bulaşabilecek kontaminasyonun engellenmesi amacıyla filetosu çıkarılarak iç kısımlardan numune alındı. Diğer numuneler ise boyutları küçültülerek analize alındı. Örneklerden 10 g alınarak MRD ile 1/9 oranında sulandırıldı ve Stomacher Lab-Blender (400) ile 1 dakika karıştırılarak homojenizat elde edildi. Ekilecek bakteriye göre seçilecek olan dilusyonlara göre homojenizattan 1 ml alındıktan sonra 9 ml uygun solüsyon içeren tüpler kullanılarak seyreltildi (Gabis ve ark. 1976).

Toplam bakteri (AC), küf-maya (YM), Enterobacteriaceae (EB), laktik asit bakterileri (LAB), toplam koliform (TC), *Escherichia coli* (EC) analizleri için TEMPO cihazı kullanıldı. Toz halinde kendi uygun şişelerinde ticari olarak satışa sunulan besi yerleri mikroorganizma çeşidine göre farklı oranlarda MRD kullanılarak sulandırılmasının ardından vorteks yardımıyla karıştırılarak aktif hale getirildi. Sulandırılan homojenizattan uygun oranlarda otomatik pipet ile içerisine koyulduktan sonra tekrar vortekslenerek karışım homojen hale getirildi. Besi yeri-örnek karışımını içeren şişeler doldurma tablasına alındıktan sonra besi yeri kartuşlarının uçları

sterilizasyonu bozulmadan şişenin içerisine yerleştirildi. Barkod tarayıcı bilgisayarla analize alınan numunenin adı ve dilüsyon oranı girildikten sonra okutma cihazı ile hem kartuşların hem de içerisine yerleştirilen şişelerin barkod numaraları okutularak bilgisayara kaydı yapıldı. Doldurma tablası TEMPO hazırlık ünitesi içerisine yerleştirildikten sonra otomatik dolum başlatıldı. İnkübasyon bittikten ve kartuşun ucu kesilip ekim tamamlandıktan sonra besiyeri ve numuneyi içeren kartuş cihazdan dışarıya çıkartılarak inkübasyon amaçlı inkübasyon/okuma tablalarına alındı. Küf maya analizi için kartuşlar 25 °C'de 72-76 saat (EN ISO 21527 ve BAM bölüm 18 standartlarına eşdeğer), toplam bakteri için 30 °C'de 24-48 saat (EN ISO 4833 eşdeğer), Enterobacteriaceae için 35 °C'de 22-27 saat (ISO 21528-2 eşdeğer), LAB için 30 °C'de 40-48 saat (NF ISO 15214 eşdeğer), toplam koliform için 30 °C'de FDA-BAM'da tanımlandığı gibi 22-27 saat, *Escherichia coli* için ise 37 °C'de 24-27 saat (EN ISO 16649-2 eşdeğer) inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyon süreleri dolan kartuşlar etüvden alınarak TEMPO okuma ünitesine yerleştirildi ve bilgisayara okuma sonucu işlenen bilgilerin kaydı yapıldı.

Pseudomonas spp., *Lactobacillus* spp. toplam psikrofil analizleri için ise Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods tarafından açıklanan klasik analiz yöntemleri uygulandı (Gilliland ve ark. 1976; Sandine ve ark. 1976). *Pseudomonas* agar 24,2 g tartılarak 500 ml distile su ile sulandırıldıktan sonra içerisine 5 ml gliserol eklendi ve sıcak su banyosunda homojen hale gelene kadar ısıtıldı. 121 °C'de 15 dakika otoklav sterilizasyonu ardından 50 °C'ye soğutulup steril koşullarda 1 şişe 2 ml su/alkol çözeltisi ile sulandırılmış C-F-C supplement eklendi. Karıştırılarak hazır hale gelen besi yeri 90x15 boyutundaki steril petrilere 12,5 ml gelecek şekilde döküldü. Donmuş petrilere uygun dilüsyonlardan 0,1 ml ekim yapılarak drigalski ile yayıldı ve 7 °C ±1 °C'de 10 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından tipik koloniler sayıldı ve sulandırma kat sayısı yardımıyla kob/g cinsinden tahmini tanı yöntemiyle sonuçlar elde edildi.

Rogosa agar 37,25 gram tartılarak 500 ml distile su ile sulandırıldı ve su banyosunda homojen hale gelene kadar ısıtıldı. Otoklav işlemi uygulanmadan steril hale gelen besi yerine %96 asetik asit ilavesi ile pH'sı 5,5'e ayarlandı. Steril ortamda steril petri kaplarına dökülen besi yerleri soğutulmasının ardından uygun dilüsyonlardaki numunelerden 0,1 ml ekim yapılarak 35 °C'de 48-72 saat inkübasyona kaldırıldı.

İnkübasyon ardından tipik koloniler sayılarak sulandırma kat sayısı yardımıyla kob/g cinsinden tahmini tanı yöntemiyle sonuçlar elde edildi.

Plate count agar (PCA) 12,25 g tartıldıktan sonra 500 ml distile su ile sulandırıldı. Su banyosunda homojen hale gelene kadar ısıtıldıktan sonra 121 °C'de 15 dakika otoklav yapılarak steril hale getirildi. 45 °C –50 °C'ye soğutulan besi yeri steril petrilere döküldü. Katılaşılarak kullanıma hazır hale gelen besi yerlerine farklı dilüsyonlarda numunelerden 0,1 ml ekim yapılarak drigalski yardımıyla yayıldı. Ekimleri tamamlanan petrilere 7 °C ±1 °C'de 10 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresini dolduran petrilere alınarak üremiş olan tüm koloniler sayıldı ve sulandırma kat sayısı yardımıyla kob/g cinsinden sonuçlar elde edildi.

3.2.3. pH Analizleri

Bozulmanın fizikokimyasal yolla tespit edilebilmesi için pH ölçümleri yapıldı. Mikrobiyolojik analiz amaçlı numune alımı tamamlandıktan sonra alınan örneklerden 10 g tartılarak küçük parçalara ayrıldı ve 90 ml distile su ile sulandırılarak homojenize hale getirilerek pH metre ile pH ölçümleri yapıldı. Ambalajlama öncesi pH değerleri ile depolama süresince oluşacak değişimler kıyaslanabilmesi için kayıtlar alındı.

3.2.4. Akıllı Etiket Uygulamaları ve Değerlendirilmesi

Tazelik indikatörlerinde ürünlerin taze olarak nitelendirilmesi için etiketlerin mavi rengini koruması, bozuk olarak nitelendirilmesi için ise rengin sarıya dönmüş olması gerekmektedir. Sıcaklık-zaman indikatörlerinde ise beyaz olan kısım maviye döndüğü zaman sıcaklık kırılmasının meydana geldiğini belirtmekte, renk değişiminin miktarı ise geçen süreyi bildirmektedir. Bu bilgiler ışığında sıcaklık-zaman indikatörü ve tazelik indikatörü olarak kullanılan etiketlerin takibi yapıp kayıtları alındı.

3.2.5. Moleküler Analizler

3.2.5.1. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu amacıyla High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) kiti kullanıldı. Üretici talimatnamesine göre dokudan direkt DNA ekstraksiyonu yapıldı. Steril koşullarda yaklaşık 10 g dokudan numune alındıktan sonra bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrılarak ependorf içerisine alındı. 200 µl Tissue Buffer ve 40 µl Proteinase K eklenerek 55 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. 200 µl Binding Buffer

ilavesinden sonra ise 10 dakika 70 °C'de inkübe edildi. 100 µl isopropanol eklenip kit içerisinde bulunan High Pure Filter Tube, Collection Tube'e takılarak hazırlanmış olan karışım filtreden geçirilmek üzere aktarıldı ve santrifüje alındı. 500 µl İnhibitor Removal Buffer, 500 µl Wash Buffer ve 2. kez 500 µl Wash Buffer sırayla filtre üzerine koyulduktan sonra her aşama sonrası santrifüj yapıldı ve son aşama olan elution için filtre yeni ependorfa alınıp 70 °C'ye ısıtılmış 200 µl Elution Buffer ilave edilip santrifüj yapıldı. Filtre atıldıktan sonra ependorf içerisinde kalan DNA'lar PCR analizlerine kadar -20 °C'de saklandı.

3.2.5.2. DNA Miktar Tayini

Gıdalardaki DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra 2 µl alındıktan sonra Epoch mikropipla spektrofotometre yardımı ile DNA miktarları ve saflıkları tespit edildi. Saf olduğu belirlenen ekstratlar yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda 1/10-1/400 arasında ultra saf su ile sulandırılarak yoğunlukları azaltıldı.

3.2.5.3. PCR Optimizasyonu ve Gradient Uygulaması

Putresin üreten genlerin tespiti amacıyla agdif (5'-ATGCCCGGTGAATTTGAA-3') ve agdir (5'-TTGCGCTGGTTTAGCACC-3') primer çiftleri, histamin üreten genlerin tespiti amacıyla ise hdcRTfw (5'-ACTCAATCGGTGTTTCCGGC-3'), hdcRTrv (5'-TGTGACCGTTACGTGAACCG-3') primer çiftleri kullanıldı (Nannelli ve ark. 2008; Ferrario ve ark. 2014).

Pozitif kontrol olarak kullanılacak suşlar TSA'da üretilip ekstraksiyonu High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) ile yapıldıktan sonra PCR ile doğrulandı. PCR koşulları olarak kullanılan süre ve sıcaklıklar şu şekildedir: Enzim Denatürasyon 95 °C 5 dakika, 40 Döngü, Denatürasyon 95 °C 30 saniye, Bağlanma 60 °C 1 dakika, Uzama 4 °C 5 dakika, Enzim Deaktivasyon 90 °C 5 dakika. Bağlanma sıcaklığı 55 °C–60 °C arasında değiştirilerek gradient PCR denemeleri yapıldı. Her deneme işleminden sonra PCR ürünleri yatay agaroz jel elektroforez ile incelendi. 20 µl PCR ürünü alındıktan sonra 1 µl yükleme tamponu ile karıştırılıp Safe View içeren %1.5'lik agaroz jelde kuyucuklara yüklenerek 100V'da 30 dakika yürütüldü. Elektroforez işlemi takiben görüntüleme sistemine alınan jel UV ışığı altında resmi alınarak incelendi ve DNA ladder ile karşılaştırılarak 90-bp ve 110-bp içeren bantlar tespit edildi.

3.2.5.4. ddPCR

Optimizasyon işlemleri tamamlandıktan sonra uygun genlerin numunelerdeki varlığının miktar tespiti amacıyla ddPCR sistemi kullanıldı. Bu amaçla, EvaGreen master mix ve DNA'lar karıştırılıp kartuşa yüklendi. Yağların da yüklenmesinden sonra kartuşlar ddPCR Droplet Generator cihazına koyularak droplet hazırlanması sağlandı. Dropletlerden 40 µl alarak plakalara aktarıldı ve plakaların mühürlenmesi ardından PCR cihazına yerleştirildi. PCR koşulları girildikten sonra cihaz çalıştırılarak genler çoğaltılmaya başlandı. Thermal Cycler çalışması bittiğinde ise plaka QX200 Droplet Reader cihazına yerleştirilerek dropletlerin ölçümü yapıldı ve Quanto Soft programı aracılığı ile sonuçlar değerlendirildi. Çalışma sonucu elde edilen veriler sulandırma kat sayıları ile çarpılarak sonuçlar elde edildi.



Şekil 3-1: ddPCR Çalışması

3.2.6. İstatistiksel Bulgular

+4 °C'de muhafaza edilen MAP ve kontrol gruplarının arasındaki her bir parametre (mikrobiyolojik ve pH analiz verileri) bazında benzerlik istatistiki olarak SPSS programı (SPSS, version 20.0 for Windows, SPSS Inc.) kullanılarak Friedman metoduna göre yapıldı (Chantawannakul ve ark. 2002; Koistinen ve ark. 2007). Donmuş ürünlerde ise her grubun kendi içerisinde analizi yapılmış ve günler ile bakteri sayıları arasındaki ilişki SPSS programı (SPSS, version 20.0 for Windows, SPSS Inc.) kullanılarak Spearman'ın sıra korrelasyon yöntemine göre istatistiki olarak değerlendirildi (Al-Kadamany ve ark. 2003; González ve ark. 2003).



4. BULGULAR

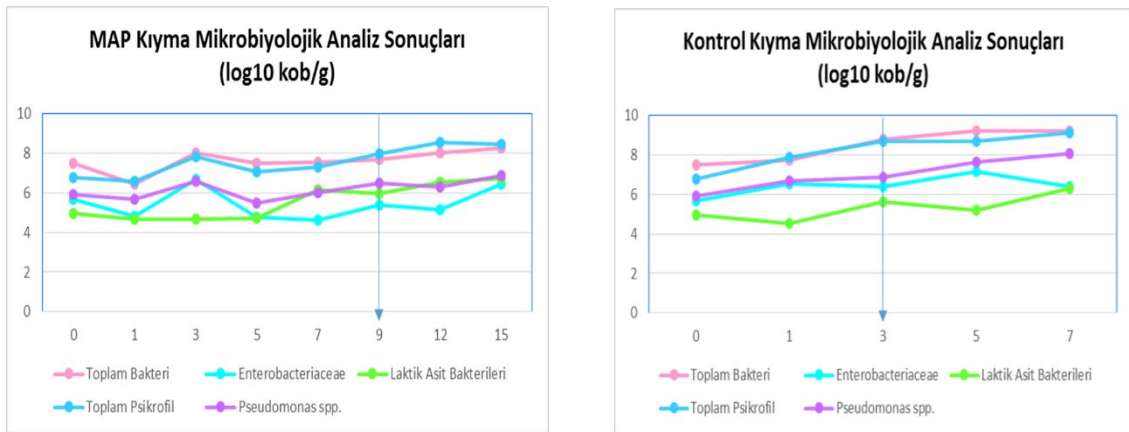
Numuneler MAP yöntemi ile paketlenmeden önce ilk gün analizleri yapılmış ve bu gruplar başlangıç günü olarak isimlendirilmiştir. Kıyma, et, tavuk ve balığın paketlenmesi ardından muhafaza yöntemlerine göre değişiklik gösteren günlerde mikrobiyolojik, fizikokimyasal ve moleküler analizler yapılmış, etiketlerde meydana gelen değişimler gözlemlenmiştir. Elde edilen bulguların ortalama değerleri tablo 4-1, 4-2, 4-3, 4-4, 4-5, 4-6, 4-7, 4-8, 4-9, 4-10, 4-11’de verilmiştir.

4.1. Mikrobiyolojik Analiz Bulguları

Tablo 4-1: Modifiye Atmosfer Paketlenmiş ve Kontrol Grubu Kıymaların Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları (log₁₀ kob/g)

KIYMA									
Mikrobiyolojik Analizler	Paketleme Çeşidi	Başlangıç Günü	Günler						
			1	3	5	7	9	12	15
Toplam Bakteri	MAP	7,49	6,46	8,04	7,51	7,55	7,67	8,04	8,25
	Kontrol	7,49	7,72	8,77	9,23	9,20	-	-	-
Toplam Koliform	MAP	5,69	4,38	6,47	4,44	4,20	4,97	3,94	5,17
	Kontrol	5,69	6,00	6,51	6,27	6,04	-	-	-
<i>E. coli</i>	MAP	< 1	< 1	2,70	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
	Kontrol	< 1	2,30	2,47	1,99	1,00	-	-	-
Enterobacteriaceae	MAP	5,69	4,81	6,69	4,79	4,64	5,39	5,14	6,47
	Kontrol	5,69	6,56	6,39	7,17	6,38	-	-	-
Laktik Asit Bakterileri	MAP	4,94	4,69	4,69	4,73	6,17	5,99	6,54	6,75
	Kontrol	4,94	4,54	5,63	5,20	6,30	-	-	-
Küf-Maya	MAP	5,53	4,90	4,69	4,91	4,51	4,96	4,20	4,44
	Kontrol	5,53	5,38	4,69	6,34	5,96	-	-	-
Toplam Psikrofil Bakteri	MAP	6,77	6,60	7,84	7,07	7,30	7,96	8,54	8,47
	Kontrol	6,77	7,86	8,69	8,69	9,14	-	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	MAP	5,90	5,66	6,60	5,47	6,00	6,51	6,30	6,90
	Kontrol	5,90	6,70	6,90	7,64	8,70	-	-	-
<i>Lactobacillus spp.</i>	MAP	4,17	3,65	4,00	3,90	3,95	5,07	5,23	4,30
	Kontrol	4,17	4,27	4,34	4,79	5,04	-	-	-

Çabuk bozulan ürün gruplarından kıymanın MAP ve kontrol grupları arasındaki mikrobiyolojik farklılıklar ile grupların kendi içlerindeki gün geçtikçe meydana gelen değişimleri Tablo 4.1’de verilmiştir. Mikrobiyolojik değerler log₁₀ cinsinden kob/g olarak hesaplanmıştır. İlk gün 7,49 log₁₀ kob/g olan toplam bakteri sayısı MAP grubu için 15. gün sonunda 8,25 log₁₀ kob/g’ye ulaşırken kontrol grubunda 3. günde dahi bu değer 8,77 log₁₀ kob/g olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubundaki kıymalarda görülen artışların 7. günden sonra bu ürünler için öngörülen bozulma eşik değerlerinin çok üzerinde olması nedeniyle bu grupların analizleri 7 gün ile sınırlandırılmıştır. İki grup birbiri ile kıyaslandığında, MAP ürünlerin 15. gündeki mikrobiyolojik değerlerinin kontrol grubunda 7. günde ölçülen değerlerin altında kaldığı belirlenmiştir. Her iki grupta da en düşük çıkan *E.coli* ise MAP kıymada 5. günden sonra saptanmamasına rağmen kontrol kıymada başlangıç günü hariç her analiz gününde 1 log₁₀ kob/g değerinin üzerinde tespit edilmiştir. Başlangıç mikroflorasının yüksek olması nedeni ile, MAP ve kontrol grupları karşılaştırıldığında kıymanın bozulma kriterleri kabul edilecek değerlere MAP grubunun 9. günde, kontrol grubunun ise 3. günde ulaştığı değerlendirilmiştir. MAP ve kontrol grubu örnekleri arasındaki ilişki Friedman yöntemi ile istatistiki olarak değerlendirildiğinde özellikle toplam bakteri sayıları açısından belirli analiz günlerinde elde edilen değerler açısından $p < 0,01$ düzeyinde anlamlılık saptanmıştır.



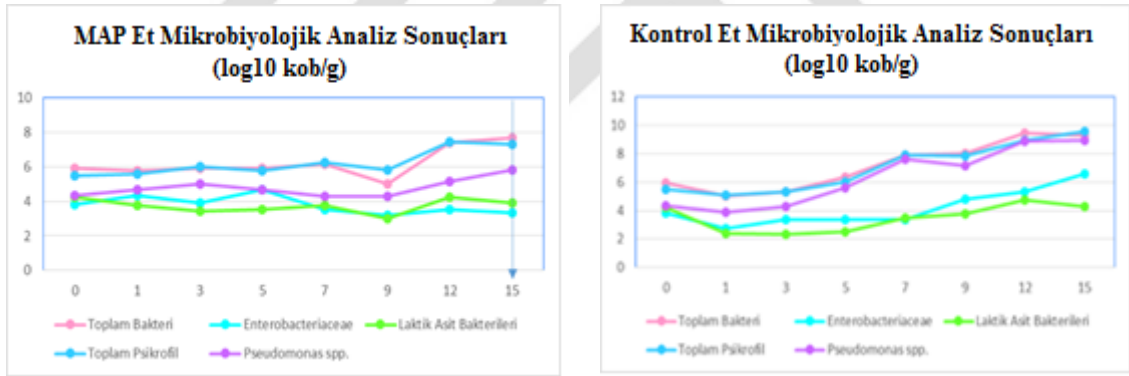
Şekil 4-1: MAP ve Kontrol Kıyma Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları (log₁₀ kob/g)

Tablo 4-2: Modifiye Atmosfer Paketlenmiş ve Kontrol Grubu Parça Etlerin Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları (log10 kob/g)

Parça Et									
Mikrobiyal Analizler	Paketleme Çeşidi	Başlangıç Günü	Günler						
			1	3	5	7	9	12	15
Toplam Bakteri	MAP	5,94	5,77	5,91	5,91	6,14	5,00	7,39	7,69
	Kontrol	5,94	5,04	5,30	6,34	7,89	8,04	9,47	9,30
Toplam Koliform	MAP	3,69	4,30	3,86	3,66	3,76	3,34	3,14	3,47
	Kontrol	3,69	2,81	3,07	3,59	4,17	4,36	5,69	6,14
<i>E. coli</i>	MAP	< 1	< 1	1,32	1,00	1,00	1,32	1,63	1,00
	Kontrol	< 1	1,63	1,50	< 1	2,59	1,73	2,91	1,00
Enterobacteriaceae	MAP	3,81	4,36	3,91	4,69	3,51	3,20	3,51	3,32
	Kontrol	3,81	2,76	3,39	3,36	3,36	4,83	5,32	6,56
Laktik Asit Bakterileri	MAP	4,23	3,77	3,43	3,55	3,75	3,00	4,23	3,93
	Kontrol	4,23	2,39	2,32	2,51	3,51	3,77	4,74	4,30
Küf-Maya	MAP	4,86	4,96	4,69	4,34	4,83	3,75	4,27	4,00
	Kontrol	4,86	4,17	4,30	4,92	5,80	5,38	6,69	5,77
Toplam Psicrofil Bakteri	MAP	5,47	5,60	6,00	5,77	6,25	5,84	7,47	7,30
	Kontrol	5,47	5,11	5,30	6,00	7,90	7,84	8,92	9,60
<i>Pseudomonas spp.</i>	MAP	4,34	4,69	5,00	4,69	4,30	4,30	5,14	5,84
	Kontrol	4,34	3,90	4,32	5,64	7,60	7,14	8,90	8,95
<i>Lactobacillus spp.</i>	MAP	2,77	3,77	3,47	3,30	3,47	2,90	4,69	3,77
	Kontrol	2,77	3,00	1,90	2,75	3,00	2,90	3,77	4,36

Parça ette meydana gelen değişimleri incelemek gerekirse; başlangıç günü 5,94 log₁₀ kob/g olan toplam bakteri sayısı 15. gün MAP grubunda 7,69 log₁₀ kob/g'ye çıkmış iken kontrol grubunda çok daha yükselerek 9,30 log₁₀ kob/g olarak bulunmuştur. Toplam koliform, Enterobacteriaceae sayıları ise kontrol grubunda MAP'a kıyasla yaklaşık 2 katına çıkmış iken Laktik asit bakterileri, küf-maya, psikrofil bakteriler, *Pseudomonas* spp. ve *Lactobacillus* spp. de daha fazla yükselmiştir. MAP ve kontrol grupları karşılaştırıldığında parça etin bozulma kriterleri kabul edilecek değerlere MAP gruplarında 15. günde, kontrol gruplarında ise 7. günde ulaştığı değerlendirmesi yapılmıştır.

MAP ve kontrol grubu örnekleri arasındaki ilişki Friedman yöntemi ile istatistiki olarak kıyaslandığında EB değerleri arasındaki fark $p < 0,01$ düzeyinde, EC değerleri arasındaki fark $p < 0,01$, *Pseudomonas* spp. değerleri arasındaki fark $p < 0,01$, psikrofil bakteri değerleri arasındaki fark $p < 0,01$, LAB değerleri arasındaki fark $p < 0,01$, *Lactobacillus* spp. değerleri arasındaki fark $p < 0,05$, küf-maya değerleri arasındaki fark ise $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur.



şekil 4-2: MAP ve Kontrol Et Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları (log₁₀ kob/g)

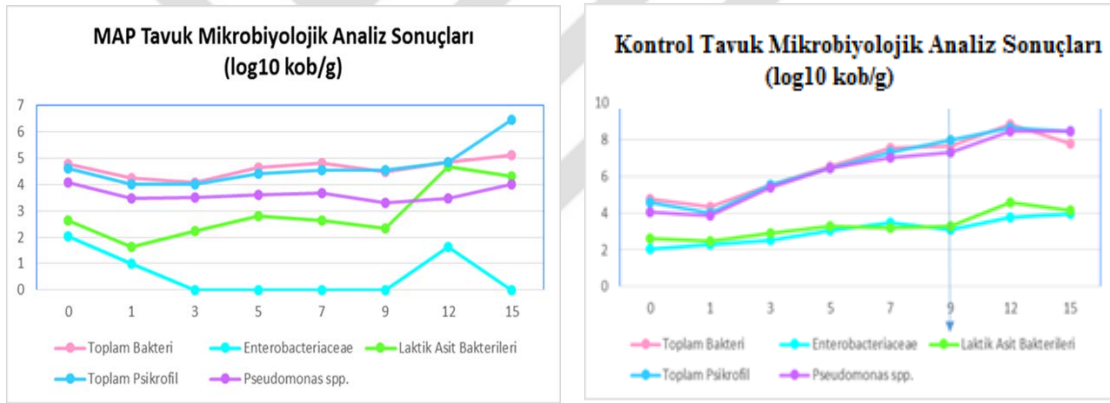
Tablo 4-3: Modifiye Atmosfer Paketlenmiş ve Kontrol Grubu Tavukların Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları (log₁₀ kob/g)

Tavuk									
Mikrobiyal Analizler	Paketleme Çeşidi	Başlangıç Günü	Günler						
			1	3	5	7	9	12	15
Toplam Bakteri	MAP	4,77	4,23	4,07	4,63	4,80	4,47	4,84	5,11
	Kontrol	4,77	4,36	5,53	6,53	7,53	7,64	8,82	7,79
Toplam Koliform	MAP	2,00	1,75	1,32	1,50	1,00	1,00	1,50	1,00
	Kontrol	2,00	2,79	2,64	2,69	3,70	2,32	4,47	4,32
<i>E. coli</i>	MAP	< 1	< 1	1,51	1,32	1,32	< 1	1,00	1,00
	Kontrol	< 1	2,84	1,00	1,00	1,32	1,00	1,00	1,51
Enterobact eriaceae	MAP	2,04	1,00	< 1	< 1	< 1	< 1	1,65	< 1
	Kontrol	2,04	2,30	2,51	3,04	3,47	3,11	3,75	3,95
Laktik Asit Bakterileri	MAP	2,63	1,65	2,25	2,80	2,65	2,32	4,69	4,32
	Kontrol	2,63	2,47	2,89	3,30	3,20	3,30	4,56	4,14
Küf-Maya	MAP	3,00	2,23	1,51	2,75	2,59	2,17	2,55	2,69
	Kontrol	3,00	3,00	3,07	4,27	4,43	4,20	4,44	4,72
Psikrofil Bakteriler	MAP	4,60	4,00	4,00	4,41	4,55	4,85	6,47	6,30
	Kontrol	4,60	4,00	5,54	6,47	7,30	8,00	8,66	8,47
<i>Pseudomonas</i> spp.	MAP	4,07	3,47	3,50	3,61	3,69	3,30	3,47	4,00
	Kontrol	4,07	3,84	5,41	6,45	7,00	7,30	8,47	8,47
<i>Lactobacillus</i> spp.	MAP	3,00	2,00	2,69	2,55	2,49	2,47	3,00	3,60
	Kontrol	3,00	2,47	2,65	3,04	3,26	3,07	3,60	3,55

Tavukların ise paketlenme farkından doğan farklılıklarda da diğer gruplardaki gibi belirgin ayrımlar vardır. Toplam bakteri de MAP grubunda 15. günde 4,77 log₁₀ kob/g'den 5,11 log₁₀ kob/g'ye, yükselme eğrisi düşük olmasına karşın kontrol grubu

7,79 log₁₀ kob/g'ye yükselerek gıdanın tamamen bozulduğunu göstermiştir. Toplam koliform miktarındaki fark ise yaklaşık 4 kattan fazla olarak gözlemlenmiştir. Aynı şekilde küf-maya ve *Pseudomonas* spp. de yaklaşık 2 katına çıkarak farkı açık bir şekilde ortaya koymuştur. MAP ve kontrol grupları karşılaştırıldığında tavuğun bozulma kriterleri kabul edilecek değerlere MAP gruplarında 15. günde dahi ulaşmadığı kontrol gruplarında ise 9. günde ulaştığı değerlendirilmiştir.

MAP ve kontrol grubu örnekleri arasındaki ilişki Friedman yöntemi ile istatistiki olarak kıyaslandığında EB değerleri arasındaki fark $p < 0,05$ düzeyinde, EC değerleri arasındaki fark $p < 0,05$, *Pseudomonas* spp. değerleri arasındaki fark $p < 0,05$, psikrofil bakteri değerleri arasındaki fark $p < 0,05$, LAB değerleri arasındaki fark $p < 0,05$, *Lactobacillus* spp. değerleri arasındaki fark $p < 0,05$, TC değerleri arasındaki fark $p < 0,05$, küf-maya değerleri arasındaki fark ise $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur.



Şekil 4-3: MAP ve Kontrol Tavuk Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları (log₁₀ kob/g)

Tablo 4-4: Modifiye Atmosfer Paketlenmiş ve Kontrol Grubu Balıkların Mikrobiyolojik Analiz

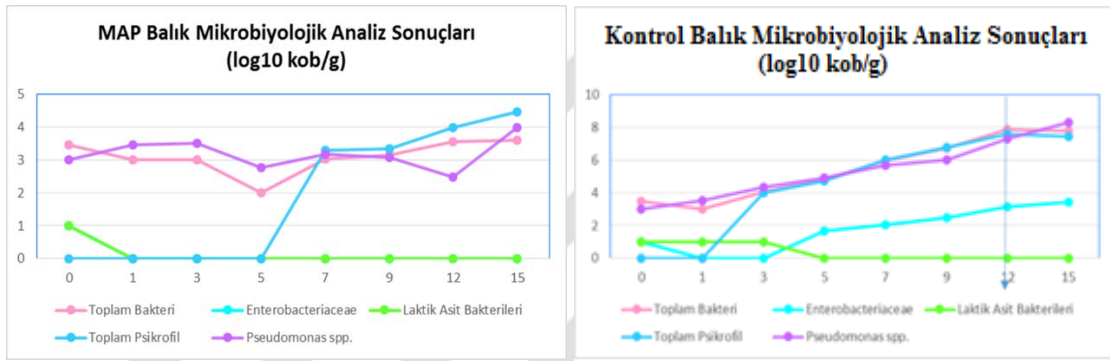
Balık									
Mikrobiyal Analizler	Paketleme Çeşidi	Başlangıç Günü	Günler						
			1	3	5	7	9	12	15
Toplam Bakteri	MAP	3,47	3,00	3,00	2,00	3,04	3,14	3,55	3,60
	Kontrol	3,47	3,00	4,07	4,83	5,96	6,71	7,89	7,80
Toplam Koliform	MAP	1,99	1,74	1,51	1,51	2,27	1,32	1,65	1,69
	Kontrol	1,99	1,74	1,65	1,74	2,59	2,91	3,86	4,27
E. coli	MAP	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
	Kontrol	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Enterobacteriaceae	MAP	1,00	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
	Kontrol	1,00	< 1	< 1	1,65	2,07	2,47	3,14	3,43
Laktik Asit Bakterileri	MAP	1,00	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
	Kontrol	1,00	1,00	1,00	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Küf-Maya	MAP	< 1	1,32	1,32	1,32	1,65	1,51	1,74	1,77
	Kontrol	< 1	< 1	< 1	2,47	3,32	3,77	4,38	5,23
Psikrofil Bakteriler	MAP	< 1	< 1	< 1	< 1	3,30	3,34	4,00	4,47
	Kontrol	< 1	< 1	4,00	4,72	6,00	6,77	7,60	7,47
<i>Pseudomonas</i> spp.	MAP	3,00	3,47	3,50	2,77	3,17	3,07	2,47	4,00
	Kontrol	3,00	3,54	4,36	4,90	5,69	6,00	7,30	8,30
<i>Lactobacillus</i> spp.	MAP	2,00	2,00	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
	Kontrol	2,00	2,00	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1

Sonuçları (log₁₀ kob/g)

Bir diğer çabuk bozulan ürün grubu olan balıkta da MAP ve kontrol grupları karşılaştırılınca aradaki fark açıkça gözlemlenmektedir. Toplam bakteri sayısı MAP grubunda 3,60 log₁₀ kob/g iken kontrol grubunda 2 katına çıkarak 7,80 log₁₀ kob/g olarak saptanmıştır. Toplam koliform ve küf-maya sayısı ise tavukta olduğu gibi yaklaşık 4 katına, Enterobacteriaceae da 3 katına çıkarak MAP ve kontrol grubu arasındaki farkı göstermiştir. *E. coli*, laktik asit bakterileri ve *Lactobacillus* spp. ise her iki paketleme grubunda da tespit edilememiştir. MAP ve kontrol grupları karşılaştırıldığında balığın bozulma kriterleri kabul edilecek değerlere MAP gruplarında

15. günde dahi ulaşmamasına rağmen kontrol gruplarında 12. günde ulaştığı değerlendirilmesi yapılmıştır. Özellikle MAP balık mikrobiyolojik olarak bozulmamış görülmekle beraber analiz günlerinde kötü koku oluşması tespit edilmiştir.

MAP ve kontrol grubu örnekleri arasındaki ilişki Friedman yöntemi ile istatistik olarak kıyaslandığında EB değerleri arasındaki fark $p<0,01$ düzeyinde, EC değerleri arasındaki fark $p<0,05$, *Pseudomonas* spp. değerleri arasındaki fark $p<0,001$, psikrofil bakteri değerleri arasındaki fark $p<0,001$, LAB değerleri arasındaki fark $p<0,01$, *Lactobacillus* spp. değerleri arasındaki fark $p<0,01$, küf-maya değerleri arasındaki fark ise $p<0,001$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur.



Şekil 4-4: MAP ve Kontrol Balık Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları (log10 kob/g)

Tablo 4-5: Kontrol Grubu Donmuş Kıymaların Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları (log10 kob/g)

KIYMA	Donmuş Muhafaza						
	Günler						
Mikrobiyal Analizler	Başlangıç Günü	15	30	90	120	150	180
Toplam Bakteri	7,49	6,69	7,14	7,23	6,75	8,32	8,47
Toplam Koliform	5,69	5,14	5,20	4,53	4,32	3,30	3,20
<i>E. coli</i>	<1	1,32	1,50	1,64	1,64	1,64	1,75
Enterobacteriaceae	5,69	5,74	5,64	5,23	3,32	3,98	2,00
Laktik Asit Bakterileri	4,94	3,98	3,79	4,14	3,64	3,89	4,25
Küf-Maya	5,53	5,23	4,60	4,74	4,49	4,61	4,86
Toplam Psikrofil Bakteri	6,77	8,00	7,30	7,23	6,60	6,77	7,30
<i>Pseudomonas spp.</i>	5,90	7,69	7,00	6,69	6,00	6,30	5,90
<i>Lactobacillus spp.</i>	4,17	3,47	3,47	3,90	2,60	3,60	3,69

Tablo 4-6: Kontrol Grubu Donmuş Parça Etlerin Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları (log10 kob/g)

PARÇA ET	Donmuş Muhafaza						
	Günler						
Mikrobiyal Analizler	Başlangıç Günü	15	30	90	120	150	180
Toplam Bakteri	5,94	5,23	4,51	4,73	4,30	3,76	4,69
Toplam Koliform	3,69	2,90	2,93	2,36	1,93	1,86	<1
<i>E. coli</i>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Enterobacteriaceae	3,81	3,07	2,00	1,77	1,32	2,30	2,30
Laktik Asit Bakterileri	4,23	2,96	1,84	2,34	2,71	2,04	2,04
Küf-Maya	4,86	4,79	3,64	2,32	3,07	2,72	3,95
Toplam Psikrofil Bakteri	5,47	4,54	4,30	3,96	3,60	2,69	4,17
<i>Pseudomonas spp.</i>	4,34	3,77	3,30	3,47	2,95	2,30	3,17
<i>Lactobacillus spp.</i>	2,77	2,17	3,00	2,90	2,47	1,90	2,47

Tablo 4-7: Kontrol Grubu Donmuş Tavukların Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları (log10 kob/g)

TAVUK	Donmuş Muhafaza						
		Günler					
Mikrobiyal Analizler	Başlangıç Günü	15	30	90	120	150	180
Toplam Bakteri	4,77	4,44	4,75	4,68	4,65	5,00	6,77
Toplam Koliform	2,00	1,00	<1	1,00	1,50	<1	<1
<i>E. coli</i>	<1	<1	<1	<1	1,00	<1	<1
Enterobacteriaceae	2,04	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Laktik Asit Bakterileri	2,63	2,83	2,00	3,04	3,56	1,91	2,62
Küf-Maya	3,00	3,92	2,32	3,36	2,50	1,93	4,59
Toplam Psikrofil Bakteri	4,60	3,60	3,90	4,04	3,60	2,38	3,47
<i>Pseudomonas spp.</i>	4,07	4,77	3,30	3,47	2,95	1,95	2,60
<i>Lactobacillus spp.</i>	3,00	2,00	3,30	2,90	3,00	1,84	2,00

Tablo 4-8: Kontrol Grubu Donmuş Balıkların Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları (log10 kob/g)

BALIK	Donmuş Muhafaza						
		Günler					
Mikrobiyal Analizler	Başlangıç Günü	15	30	90	120	150	180
Toplam Bakteri	3,47	2,20	2,30	1,32	1,00	1,00	2,00
Toplam Koliform	1,99	<1	1	<1	<1	<1	1,84
<i>E. coli</i>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	0
Enterobacteriaceae	1,00	<1	<1	<1	<1	<1	1,64
Laktik Asit Bakterileri	1,00	<1	<1	<1	<1	<1	3,14
Küf-Maya	<1	2,74	1,00	1,00	1,00	1,00	3,69
Toplam Psikrofil Bakteri	2,20	2,00	3,47	1,60	1,77	1,30	1,47
<i>Pseudomonas spp.</i>	3,00	1,00	1,47	<1	<1	<1	<1
<i>Lactobacillus spp.</i>	2,00	<1	<1	<1	<1	<1	<1

Donmuş gıdalar ise meydana gelen değişimleri gözlemlemek amacıyla analiz günlerine kadar -18 °C'de muhafaza edilmişlerdir. Bu ürün grupları ise birbiriyle kıyaslandığı zaman kıymadaki toplam bakteri sayısı 8,47 log10 kob/g olarak tespit edilmiş ve diğer gıdalara kıyasla çok daha yüksek çıkmıştır. Tavukta ise başlangıç günü ile 180. gün kıyaslandığında 2 log değerinde artış göstererek diğer ürünlere göre kendi içerisinde en yüksek artışa sahip olduğu görülmüştür. Balıkta *Pseudomonas spp.*, *Lactobacillus spp.* ve *E. coli*, tavuklarda toplam koliform, *E. coli* ve Enterobacteriaceae, parça ette ise toplam koliform ve *E. coli* 180. günde dahi hiç tespit edilememiştir. Bozulma kriterleri açısından değerlendirildiğinde et, tavuk ve balıkta 180. günde bile

sonuç alınamamasına karşın kıymaların bu değerlere 150. günde ulaştığı değerlendirilmiştir.

Donmuş gıdalarda meydana gelen bakteriyel bozulmalar Spearman'ın sıra korrelasyon yöntemi ile istatistiki olarak değerlendirildiğinde balıklarda Enterobacteriaceae değerleri arasındaki fark $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur.

4.2. pH Analiz Bulguları

Ürünler arasındaki pH değişimleri tabloda gösterilmiştir.

Tablo 4-9: Soğuk Muhafaza Etlerin pH Analiz Sonuçları

PH	Başlangıç Günü	1	3	5	7	9	12	15
Soğuk Muhafaza MAP Kıyma	5,81	5,8	5,91	5,77	5,8	5,91	5,77	5,74
Soğuk Muhafaza Kontrol Kıyma	5,81	5,96	5,98	6,31	6,26	6,25	6,24	6,36
Soğuk Muhafaza MAP Et	5,62	5,61	5,73	5,61	5,61	5,63	5,64	5,68
Soğuk Muhafaza Kontrol Et	5,62	5,63	5,62	5,64	5,62	5,67	5,7	6,02
Soğuk Muhafaza MAP Tavuk	6,23	6,26	6,31	6,15	6,15	6,1	6,11	6,32
Soğuk Muhafaza Kontrol Tavuk	6,23	6,03	6,12	6,14	6,18	6,25	6,34	6,46
Soğuk Muhafaza MAP Balık	6,61	6,61	6,55	6,58	6,62	6,71	6,9	7,02
Soğuk Muhafaza Kontrol Balık	6,61	6,64	6,67	6,74	6,87	6,84	7,55	7,67

Dört ⁰C’de muhafaza edilmiş ürünlerin analiz günlerinde pH değerleri saptanmış ve bu analizler sonucunda da MAP ve kontrol grubu ürünler arasında fark tespit edilmiştir. MAP kıyma ve parça ette önemli bir fark gözlenmemesine rağmen kontrol grubu kıymada pH 5,81’den 6,31’e çıkarak 5. günde normal sınırlarını aşmıştır. Kontrol grubu parça ette ise pH 5,62’den 6,02’ye 15. günde çıkarak kıymaya oranla değişim uzun sürede gözlenmiştir. Tavukta MAP ve kontrol gruplarındaki fark 0,10 kadardır ve her ikisinde de başlangıç günü analizlerine göre yükselme vardır. Balık ise pH değişimlerinin en çok görüldüğü örnek grubu olmuştur. MAP grubunda başlangıç günü ile 15. gün arasında pH 6,61’den 7,02’e yükselirken kontrol grubunda 1,0 fark gözlenerek 15. gün 7,67 pH değeri tespit edilmiştir.

MAP ve kontrol grubu örnekleri pH değerleri arasındaki ilişki Friedman yöntemi ile istatistiki olarak değerlendirildiğinde kıyma pH değerleri arasındaki farkta anlamlı bir değişim gözlenmezken parça et pH değerleri arasındaki fark $p<0,01$, tavuk pH değerleri arasındaki fark $p<0,05$, balık pH değerleri arasındaki fark ise $p<0,001$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur.

Tablo 4-10: Donmuş Muhafaza Etlerin pH Analiz Sonuçları

PH	Başlangıç Günü	15	30	90	120	150	180
Donmuş Muhafaza Kıyma	5,81	5,77	5,72	5,82	5,85	5,77	5,72
Donmuş Muhafaza Et	5,62	5,62	5,38	5,31	5,56	5,38	5,47
Donmuş Muhafaza Tavuk	6,23	6,04	6,2	5,84	6,38	5,92	6,22
Donmuş Muhafaza Balık	6,61	6,55	6,65	6,52	6,77	6,51	6,81

Donmuş muhafazada ise pH farkları soğuk muhafazada olduğu gibi belirgin değildir. Kıyma ve parça ette pH düşmüş iken balıkta 6,61’den 6,82’ye yükselerek 0,2 derecelik artış görülmüştür.

4.3. Akıllı Etiket Değerlendirme Bulguları

Tazelik ve sıcaklık-zaman etiketlerinde ise gün gün meydana gelen değişimler görüntülenerek kayıt altına alınmıştır.



Şekil 4-5: Başlangıç Günü Kıyma



Şekil 4-6: Başlangıç Günü Balık

Başlangıç günü etiketlerin tümünün mavi renkte olduğu görülmüştür. Bu da tüm ürünlerin taze olduğunun göstergesidir.



Şekil 4-7: Gün Kontrol Kıyma



Şekil 4-8: 1. Gün MAP Kıyma

Birinci gün etikette meydana gelen değişimler gözlemlendiğinde MAP grubunda ürün etiketinin sarı renge döndüğü, kontrol gruplarında ise bu rengi mavi halini koruduğu değerlendirilmiştir.



Şekil 4-9: 3.Gün Kontrol Balık



Şekil 4-10: 3. Gün Kontrol Kıyma

Tazeliğin azaldığı 3. gün balık ve 3. gün kıymada tazelik etiketlerinin tamamen sarıya döndüğü görülmüştür.



Şekil 4-11: Donmuş Muhafaza Kıyma 180. Gün

Donmuş muhafazadaki gıdaların mikrobiyolojik ve fizikokimyasal analizleri sonucunda ürünlerin 150. günde kıymanın bozulmuş olduğu tespit edilmesine rağmen etiketlerin taze renk gösterdiği gözlenmiştir.



Şekil 4-12: Sıcaklık-Zaman Etiketi



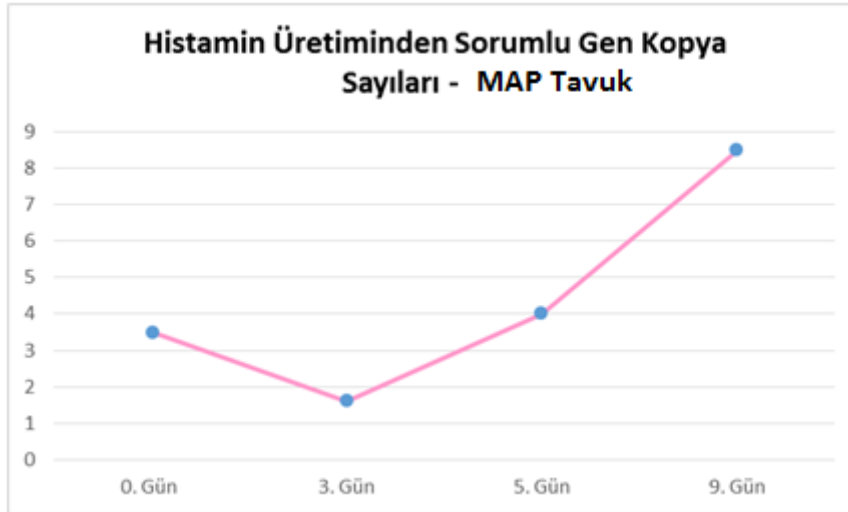
Şekil 4-13: Sıcaklık-Zaman Etiketi

Sıcaklık-zaman etiketinde 2-8 °C üzerinde meydana gelecek sapmalar saat bazında gözlemlenebilmektedir. Bu sayede eğer ki uygun dereceler arasında tutulmadı ise etiketin şekil 4.13'deki gibi maviye döndüğü görülmüştür. Sıcaklık kontrolleri aynı zamanda sıcaklık kontrolörü ile de takip edilerek olası kırılmalar kontrollü olarak tespit edilmiştir. Bu etiketlerde 4 saatlik kırılmalar izlenebilmekle birlikte çalışmada 1 saatlik kırılmalar dikkate alınmıştır. Çalışma boyunca soğuk muhafazada bırakılan hiçbir üründe kırılma görülmemiş, çalışmanın analizleri tamamlandıktan sonra kalan deneme ürünleri soğuk muhafazada saklanmaya devam edilmiş, bu süreçte etiketlerdeki değişimler takip edilmiştir. Bazı ürünler kontrol amaçlı oda ısısında bırakılmış, etiketlerde soğuk zincirin kırıldığını gösteren değişimler tespit edilmiştir (Şekil 4-12, 4-13).

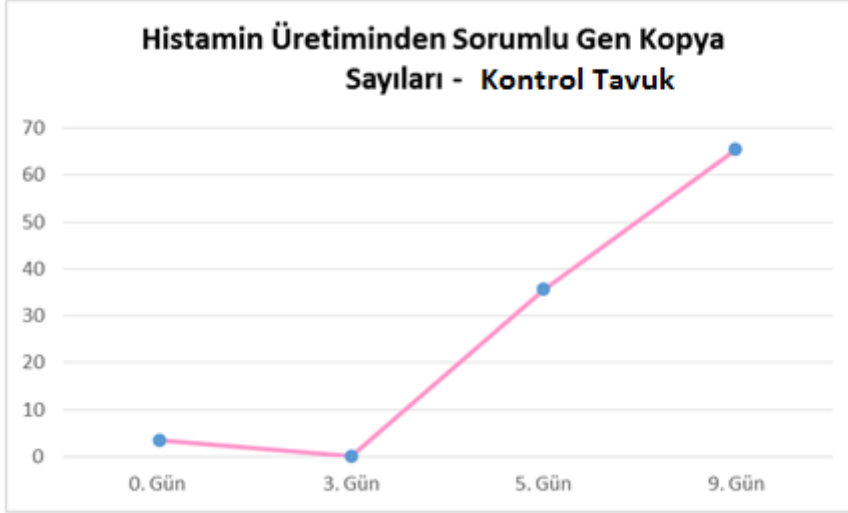
4.4. Moleküler Analiz Bulguları

Tablo 4-11: Modifiye Atmosfer Paketleme ve Kontrol Grubu Soğuk Muhafaza Tavukların ddPCR Analiz Sonuçları (Gen Bölgesi Kopya Sayıları)

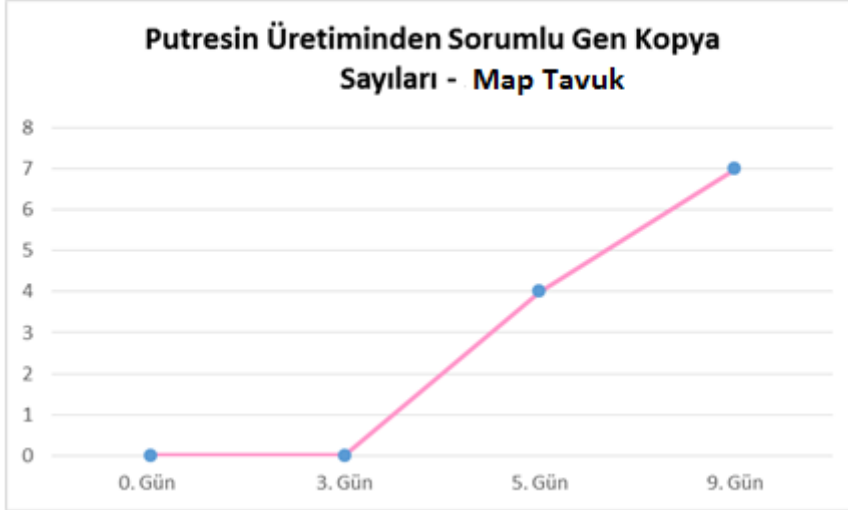
ddPCR	Başlangıç Günü	3	5	9
Soğuk Muhafaza MAP Tavuk (Histamin)	3,50	1,60	4,00	8,50
Soğuk Muhafaza Kontrol Tavuk (Histamin)	3,50	0,00	35,50	65,50
Soğuk Muhafaza MAP Tavuk (Putresin)	0,00	0,00	4,00	7,00
Soğuk Muhafaza Kontrol Tavuk (Putresin)	0,00	1,50	35,00	55,00



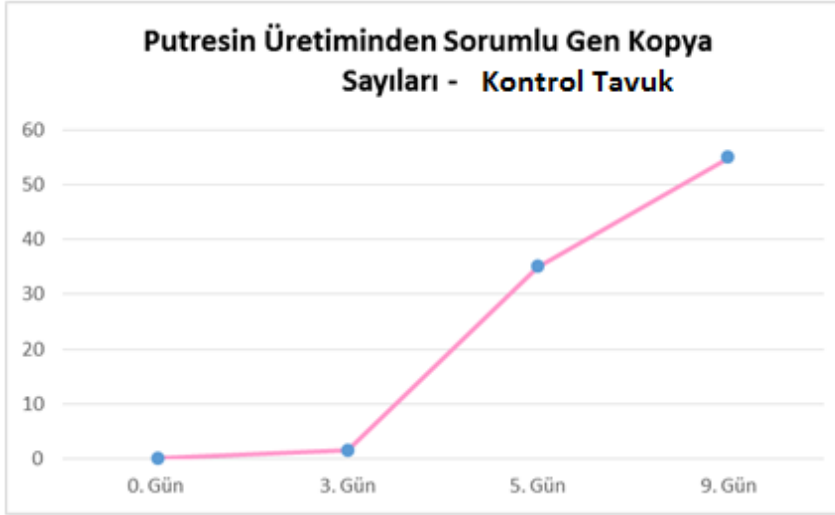
Şekil 4-14: Soğuk Muhafaza MAP Tavuk Histamin Değerleri (Gen Bölgesi Kopya Sayıları)



Şekil 4-15: Soğuk Muhafaza Kontrol Tavuk Histamin Değerleri (Gen Bölgesi Kopya Sayıları)



Şekil 4-16: Soğuk Muhafaza MAP Tavuk Putresin Değerleri (Gen Bölgesi Kopya Sayıları)



Şekil 4-17: Soğuk Muhafaza Kontrol Tavuk Putresin Değerleri (Gen Bölgesi Kopya Sayıları)

Tavuk numunesinde yaptığımız ddPCR analiz sonuçları tablo 4-11 ve şekil 4-18, 4-19, 4-20, 4-21’de verilmiştir. Tablodaki değerlere göre oluşturulmuş şekillerde de görüldüğü gibi hem MAP hem de kontrol grubu tavuklarda histamin ve putresin üretimine neden olan genlerin tekrar sayılarının ilerleyen depolama süresinde arttığı gözlemlenmiştir. Her iki grupta da 3. günden itibaren değerler artmaya başlamıştır. Mikrobiyolojik analiz bulgularına baktığımızda da 5. günden itibaren değerlerin yükseldiğini ve ürünlerin bozulma sınırlarına ulaştığını görülmüştür. Bu iki sonuç birlikte değerlendirildiğinde paralel olarak artış saptanmıştır. MAP ve kontrol grupları kendi aralarında kıyaslandığında ise artışların her iki biyojen amin için de çok yüksek olduğu tespit edilmiştir. 9. gün MAP kıyama histamin değeri 8.50 iken, kontrol grubunda 65,50, putresin ise MAP grubunda 7 iken kontrol grubunda 55,00 olarak bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

Besleyici faktörleri yüksek olan et sağlığımız için tüketilmesi gereken besinlerin başında gelmektedir. Fakat gerek kimyasal gerek fiziksel gerek ise mikrobiyolojik özelliklerinden dolayı etler çabuk bozulabilmektedir. Gıda kaynaklı hastalıklar geçmişte olduğu gibi günümüzde de yaşamımızı tehdit etmeye devam etmektedir. Hastalıkları önlemek amacıyla yapılması gerekenlerden biri de gıdaların bozulmasını engellemektir. Birçok yöntem raf ömrünü uzatmak için kullanılmakta ve gelişen teknoloji ile bu yöntemler çeşitlilik kazanabilmektedir. Bu sistemlerden biri olan ambalajlama gıdaların koruyuculuğunu yapmak dışında tüketici ile etkileşime geçerek ürünlerin tazeliği ve raf ömürleri hakkında bilgi verebilmektedir. Böylece uygun olan ürünler satın alınıp diğerlerinin imhasına olanak sağlanmış olmaktadır. Sıcaklık-zaman ve tazelik indikatörleri bu amaçla kullanılan akıllı ambalajlama sistemleridir. Tez çalışmasında da bu etiketler kullanılarak akıllı ambalajlama sisteminin alt üyelerinden ikisi değerlendirilmiştir.

Bozulmaların engellenmesi ile hastalıkların ortaya çıkma riski azaltılmasının yanında herhangi bir zehirlenme durumunda tedaviye en kısa zamanda başlanması da bir o kadar önemlidir. Bu sebeple gıda kaynaklı bir hastalık saptandığında en kısa sürede altında yatan sebep ortaya çıkartılmalı ve etkene yönelik tedaviye başlanmalıdır. Klasik mikrobiyolojik analizler ile zaman kaybı yaşanmasına rağmen ddPCR analizleri ile hem hızlı hem de kantitatif olarak güvenilir sonuçlar alınabilmektedir. Bu sebeple tez çalışmasında ddPCR'ın gıda bozulmaları tespitinde kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Zhu ve ark. (2016) yaptığı çalışmada; *Pseudosciaena crocea* cinsi balıklar hava geçirmez polietilen kaplarda +4 °C'de muhafazası sonucu meydana gelen değişimleri incelemişlerdir. Buna göre, 5. gün sonunda PCA'da sayılan toplam bakteri miktarı 3,55 log₁₀ kob/g'dan 7,61 log₁₀ kob/g'a, 6 gün sonunda ise violet red bile agarda (VRBA) yapılan ekim sonucu Enterobacteriaceae 3,33 log₁₀ kob/g'dan 6,23 log₁₀ kob/g'a, MRS agarda yapılan ekim sonucu LAB 2,63 log₁₀ kob/g'dan 5,04 log₁₀ kob/g'a yükselmiştir.

Blana ve ark. (2014) kıymalarda farklı ambalajlama teknikleri ve sürelerinde oluşan değişimleri araştırmışlardır. Çalışma sonucunda 0 °C'de *Pseudomonas* spp. 4,30

log₁₀ kob/g'dan Enterobacteriaceae 3,99 log₁₀ kob/g'dan, LAB 5,26 log₁₀ kob/g'dan, küf ve maya ise 4,18 log₁₀ kob/g'dan sırasıyla yaklaşık 10 log₁₀ kob/g, 8 log₁₀ kob/g, 8 log₁₀ kob/g, 7 log₁₀ kob/g'a yükselmişlerdir. *Pseudomonas* spp. aerobik tüm numunelerde baskın flora olarak bulunmuştur. MAP numunelerde ise tüm mikroorganizmalar aerobik ambalajlamaya kıyasla daha az bulunmuş, dominant flora olarak ise LAB bulunmuştur.

Toplam bakteri sayısı 10⁷ kob/g olduğunda aerobik koşullarda bulunan et bozulmuş kabul edilmektedir (Ellis ve ark. 2002; Peng ve ark. 2011). Stanbridge ve Davies (1999)'den yapılan alıntıya göre, bakteri sayısı 10⁷ kob/g olduğunda etler tazeliğini kaybetmiş olsa da istenmeyen kokuların oluşumu 10⁸ kob/g'da, kokuşma kokusu ise 10⁹ kob/g'da meydana gelmektedir (Panagou ve ark. 2014).

Säde ve ark. (2013) MAP farklı et gruplarında yapmış olduğu çalışmada 14 et örneğinin 8 adedi 10⁴-10⁶ kob/g arasında, 2 adedi >10⁶ kob/g, 31 kıymanın 15 tanesi 10⁴-10⁶ kob/g arasında, 1 adedi >10⁶ kob/g, 16 beyaz etin 9 tanesi 10⁴-10⁶ kob/g arasında, 7 adedi >10⁶ kob/g oranında Enterobacteriaceae içermektedir.

Etlerin MAP +4 °C'de depolandığı süre boyunca yapılan analizlere göre, başlangıç toplam mezofilik bakteri sayısı 4,02 – 4,33 log₁₀ kob/g, psikrotrofik bakteri sayısı 3,60 – 3,86 log₁₀ kob/g iken 8. günde tüm bakteriler 6,30 log₁₀ kob/g düzeyine ulaşmıştır. 4. günde ise psikrotrofik bakterilerin mezofiliklerden yüksek olması MAP'ın buzdolabında psikrotrofiklerin gelişimini hızlandırmasına bağlanmıştır (Murphy ve ark. 2013).

Rukchon ve ark. (2014) tavuklarda 4 °C'de 6. gün sonunda toplam aerobik bakteri, *Pseudomonas* spp., Enterobacteriaceae sayısını 4,80, 7,00, 4,20 log₁₀ kob g⁻¹ olarak bulmuşlar ve tüketime uygun olarak belirlemişlerdir.

Farklı gaz oranlarıyla MAP uygulanmış tavuklarda gaz içeriği ayrımı olmaksızın toplam bakteri miktarı 4 °C'de 20 gün sonunda 3,2 log₁₀ kob/g'dan 8,4-8,3 log₁₀ kob/g'a ulaşmıştır (Rossaint ve ark. 2015). Sadece hava ile paketlenmiş tavuklarda ise 20. gün sonunda toplam bakteri miktarı 3,3 log₁₀ kob/g'dan 9,6 log₁₀ kob/g ulaşırken son ölçümlerde *Pseudomonas* spp. 9,5, Enterobacteriaceae 5,9 log₁₀ kob/g, *Lactobacilli* spp. 4,2 log₁₀ kob/g ölçülmüştür (Rossaint ve ark. 2014).

Tavuklarda *Pseudomonas* spp. başlangıç florası 4,1 log₁₀ kob/g iken duyuşal özelliklerde değişim başladığında 7,5 log₁₀ kob/g, bozulduktan sonra son aşamada ise genellikle 9–10 log₁₀ kob/g'a ulaşmaktadır. Tavuklarda *Pseudomonas* spp. gelişimi hızlı olmaktadır ve bu bakteri tazelik indikatörü olarak kullanılabilir (Bruckner ve ark. 2013).

Sahar ve Dufour (2014) 5 °C'de muhafaza edilen tavukları incelediklerinde toplam bakteri, *Pseudomonas* spp., Enterobacteriaceae'nın 8. güne kadar yükseldiğini ve hakim floranın da *Pseudomonas* spp. olduğunu saptamışlardır.

Sıfır °C'de muhafaza edilen balıklarda toplam bakteri sayısı 10 gün sonra 8,2 log₁₀ kob/g, *Pseudomonas* spp. 7,4 log₁₀ kob/g, LAB 5,4 log₁₀ kob/g'a çıkmış olmalarına rağmen Enterobacteriaceae neredeyse aynı kalmıştır (Dabade ve ark. 2015).

Sıfır °C'de muhafaza edilmiş balıkların mikrobiyal analizi sonucunda *Pseudomonas* spp. 3,41 log₁₀ kob/g'den 7,37 log₁₀ kob/g'a yükselirken LAB ve Enterobacteriaceae 1 log'un altında iken 13. gün sonunda LAB 1 log'un altında, Enterobacteriaceae ise 4,5 log kob/g çıkmıştır (Parlapani ve ark. 2015).

Sarika ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada 4 °C'de muhafaza edilmiş balıklar 14. gün sonunda bozulmuş olduğu için 28. gün beklenmeden analiz sona erdirilmiş ve toplam bakteri miktarı 8,0±0.10 log₁₀ kob/g olarak bulunmuştur. 28. gün sonunda Enterobacteriaceae >6,0 log₁₀ kob/g ve LAB 5,86±0.18 log₁₀ kob/g olarak tespit edilmiştir.

Yesudhasan ve ark. (2014) balıklarda kontrol gruplarında (atmosferik paketlenme) toplam aerobik bakteri miktarı 12. günde 10⁷ kob/g MAP gruplarında 25. günde tespit etmiştir. Başlangıçta 4,08 log₁₀ kob/g olan LAB sayısı çok yavaş artarak kontrol grubunda 4,74 log₁₀ kob/g'a 14. günde ulaşmıştır. *Pseudomonas* spp. 3,1 log₁₀ kob/g'dan 14. günde kontrol gruplarında 5,8 log₁₀ kob/g'a MAP grubunda ise 2 logluk artış yapmışlardır. Enterobacteriaceae 12. günde 3,8 log₁₀ kob/g'dan kontrol grubunda 1 log artarken MAP grubunda azalarak 3,3 log₁₀ kob/g sayılmıştır.

Balıkların MAP ve hava ile yapılan paketlemelerinin 2 °C'de depolanması sonucu ilk gün 3 log₁₀ kob/g olan toplam bakteri sayısı organoleptik bozulma başladığında hava ile yapılan paketlenmede 7,5 log₁₀ kob/g, MAP' da 7 log₁₀ kob/g'a yükselmiştir. Hava ile yapılan paketlenmenin ilk aşamalarında baskın popülasyon olan

Pseudomonas spp., LAB, Enterobacteriaceae 1 log₁₀ kob/g'nin altında iken bozulma başladığında sırasıyla 7,2 log₁₀ kob/g, 3,5 log₁₀ kob/g, 2,5 log₁₀ kob/g'a, MAP ise 6,4 log₁₀ kob/g, 6 log₁₀ kob/g ve 4,6 log₁₀ kob/g olarak belirlenmiştir (Parlapani ve ark. 2015).

Paketlendikten sonra farklı derecelerde tutulan balıkların mikrobiyolojik analizi sonucunda sırasıyla başlangıç toplam bakteri florası, *Pseudomonas* spp., LAB, Enterobacteriaceae 3,54 log₁₀ kob/g, 3,00 log₁₀ kob/g, 1 log₁₀ kob/g, 2,36 log₁₀ kob/g iken bozulma gerçekleştiğinde 0 °C'de 7,86, 7,34, 2,07, 6,29 log₁₀ kob/g ve 5 °C'de 8,08, 7,96, 3,20 ve 6,68 log₁₀ kob/g olarak tespit edilmiştir (Parlapani ve Boziaris 2016).

MAP gıdaların raf ömürlerinin uzun olması amacıyla kullanılabilirliği birçok çalışma ile denenmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır (Blana ve ark. 2014; Yesudhason ve ark. 2014; Rossaint ve ark. 2015). Tez çalışması sonucunda mikrobiyolojik bulgular incelendiğinde yapılan çalışmalar ile benzer sonuçlar alınarak MAP grubundaki değerlerin kontrol gruplarından daha düşük olduğu görülmüştür. Yapılan istatistiki çalışmalar da bizim verilerimizi destekleyerek birçok parametrede anlamlı sonuçlar alınmıştır.

Tez çalışmasından elde edilen mikrobiyolojik bulgular, uluslararası literatürlerde ve Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'nde önerilen değerlerle (toplam mezofilik aerob bakteri, psikrofiller ve *E. coli*) yorumlandığında, MAP ve kontrol grubu kıyma örneklerinde sırasıyla soğuk depolamanın 3. ve 3. günlerinde; parça et örneklerinde sırasıyla soğuk depolamanın 15. ve 7. günlerinde; tavuk örneklerinde sırasıyla soğuk depolamanın 15. ve 7. günlerinde ve balık örneklerinde sırasıyla soğuk depolamanın 15. ve 9. günlerinde eşik değerlere ulaşıldığı değerlendirilmiştir. Donmuş depolanan örneklerde ise kıymalarda eşik değere 150. günlerde ulaşıldığı, diğer örneklerde 180. günde henüz eşik değerlere ulaşılmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, değişik kaynaklarda da bildirildiği şekilde, ambalajlama, tercihinin ürünlerin raf ömrü ve bozulma eşiğine ulaşılması açısından önemli bir fark yaratacağı ve bozulma eşiğindeki kırılma noktaları yönünden ürün özellikleri gibi iç faktörlere ve depolama koşulları gibi çevresel faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebileceğini göstermiştir.

Li ve ark. (2015) PVC filmle kaplanmış ve +4 °C'de depolanan sığır etlerinin 5,7 olan pH'sının 10. günde 5,8'e yükseldiğini görmüşlerdir.

MAP farklı et gruplarının 4 °C'de 12-17 gün sonunda yapılan analizlerde etlerin pH'sı 5,48, kıymanın 5,78, tavuğun ise 6,07 olarak belirlenmiştir (Sâde ve ark. 2013).

4 °C'de MAP etlerde yapılan çalışma sonucunda gaz içeriğinin pH üzerinde etkisinin olmadığı, ilk gün 5,55-5,61 olan pH'nın ilk 7 gün değişmediği sonraki günlerde ise 14. güne kadar 5,33-5,41 seviyelerine düştüğü saptanmıştır (Murphy ve ark. 2013).

MAP ve hava ile paketlenmiş tavuklarda bozulma sonucu pH 5,8 - 6,4 arası ölçülmüş ve gaz oranlarına göre farklılıklar gözlenmemiştir (Rossaint ve ark. 2014). Herbert ve ark. (2013) da gaz farklılıklarının ve sürenin pH'yı etkilemediğini ve tavuklarda genel olarak 5,7 – 6,2 olduğunu belirtmişlerdir.

Bruckner ve ark. (2013) 4 °C'de depolanan tavuklarda pH'nın 6,02'den 6,23'e yükseldiğini tespit etmişlerdir. Zhang ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada başlangıçta 5,8 pH derecesinin balıkların oda ısısında tutulduğunda bozulma ortalarında pH 6,2 ve sonlara doğru pH > 6,9 (en yüksek bakteri seviyesine sahip) olduğunu yani pH 6,2 – 7,0 arasında bozulmanın olduğunu belirtmişlerdir.

Sarika ve ark. (2012) 4 °C'de muhafaza edilmiş balıklarda pH değerinin 6,82'den 7,01'e (14. gün), 7,25'e (21. gün), 7,91'e (28. Gün) arttığını, 0 °C'de muhafaza edilmiş balıklarda 6,79'den 6,70'e (14. gün), 6,68'e (21. gün), 6,65'e (28. gün), 18 °C'de muhafaza edilmiş balıklarda ise 6,78'den 6,75'e (14. gün), 6,71'e (21. gün), 6,69'e (28.gün) azaldığını saptamışlardır.

Mikrobiyal bozulma başladıkça pH değişimleri başlamakta ve bu da verilere yansımaktadır. Murphy ve ark. (2013) bulguları ile eşleşecek şekilde MAP kıymada pH da önemli değişimler gözlemlenmemiştir. Kontrol gruplarında ise mikrobiyolojik verilere paralel olarak artış görülmüştür. Mikrobiyolojik değerleri daha düşük olan MAP'ın pH değişimleri de kontrol gruplarına oranla daha az çıkmıştır. Balıklarda kontrol grubunun 9. günde bozulduğu kabul edilirse pH'nın da paralel bir şekilde kabul edilemez sınırlara ulaştığı görülmüştür.

Smolander ve ark. (2004) tavuklarda yapmış oldukları çalışma sonucu sıcaklık-zaman indikatörleri ile toplam bakteri, Enterobacteriaceae ve koku ile aralarında pozitif korrelasyon olduğu kanısına varmışlardır.

Kim ve ark. (2012) laktik asit yoğunluğu ile bağlantılı TTI kullanmışlar, pH değişimine bağlı olarak indikatörün kullanılabilirliğini test etmişler ve olumlu sonuçlar almışlardır.

MAP domuz sosislerinde pH bazlı indikatörler kullanılmış ve özellikle toplam bakteri miktarı ile korrelasyon olduğu belirtilmiştir (Salinas ve ark. 2014). Ancak, Modifiye atmosfer paketlenmiş etlerde %20-80 gibi yüksek karbondioksit konsantrasyonu kullanılması bakteriyel bozulma sonrası oluşan karbondioksit artışı ile karışabilir bu da pH değişimine bağlı tazelik indikatörlerinde yanlış sonuçlar verebilir (Kerry ve ark. 2006).

Chun ve ark. (2014) balıkların tazeliğini tespit etmek amacıyla pH bazlı bromokrezol yeşil boyasını indikatör olarak kullanmışlar ve TMA seviyesi ile olan ilişkisini değerlendirmişlerdir. Çalışmada toplam bakteri sayısı, *P. fragi* sayısı ve pH ile doğru orantılı indikatörün sarıdan maviye farklı renklerde görüldüğü ve bu indikatörlerin tazelik göstergesi olarak kullanılabilirliği sonucuna varılmıştır.

Methyl red, xyleneol blue, crystal violet lactone ve bromophenol blue, cresol red, bromocresol green boyalarından oluşan iki farklı kolorimetrik indikatörün 4 °C'de pH ve bakteri yoğunluğuyla paralellik gösterdiği için balıkların tazeliğini belirlemede kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Morsy ve ark. 2015).

Tez çalışmasında tüketiciler ile birebir etkileşime geçebilen sıcaklık-zaman ve tazelik indikatörünün kullanılabilirliği de test edilmiştir. Belirlenen analiz günlerinde izlenerek görüntüleri alınmış ve değişimler not edilmiştir. Sıcaklık-zaman etiketleri ambalajın dışına yapıştırılarak maruz kalınan sıcaklık değişimleri saptanmış ve gıdaların sıcaklık kırılmasına maruz kalmadığı tespit edilmiştir. Deneme amaçlı olarak sıcaklık değişimine maruz bırakılan etiketlerde ise değişimler gözlenerek maruz kalınan sürenin tespiti yapılmıştır. Sıcaklık-zaman etiketlerinin soğukta muhafaza edilen örnekler üzerinde izlenmesi sonucu, bu etiketlerin soğuk zincirin kırılıp kırılmadığına dair bilgi vermesi yönünden tüketicilere bir avantaj sağlayacağı değerlendirilmiştir. Günümüzde bu tip etiketler maaliyetli olması nedeniyle üreticiler tarafından tercih edilmemektedir. Ayrıca bu ürünler, akıllı ambalajlama tekniği yönünden de tavsiye edilebilir.

Tazelik etiketlerinde soğuk mufazadaki kontrol gruplarında pH değişimine bağlı sonuçlar gözlenmiş ve pH artışı meydana geldikçe etiketin renginin değiştiği tespit edilmiş ve başarılı görülmüştür. Donmuş muhafaza ve soğuk muhafaza MAP gruplarında ise sapmalar görülmüştür. Tazelik indikatörlerinin soğuk muhafaza koşulları altındaki performansı değerlendirildiğinde ambalaj içindeki ürünün kendisi dışındaki faktörlerin (paket içerisindeki ilave gaz gibi) indikatörlerde bozulmaya bağlı olmayan renk (pH) değişimi göstermesi yönünden MAP sistemi içinde ve dondurulmuş ürünlerde kullanılması için daha fazla geliştirilmesi gerektiği yorumlanmıştır.

Pinheiro ve ark. (2012) yaptıkları çalışma sonucu ddPCR başarılı bulunup %5'den az DNA yoğunluğuna sahip numunelerde dahi başarılı ölçümler yapmıştır.

Yem ve tohumlardaki GMO miktarı ddPCR ile tespit edilebilmektedir. GMO analizi açısından uygulanabilir ve hassasiyeti yüksek bir yöntemdir. qPCR aksine DNA ekstraksiyonlarında var olan amplifikasyonun inhibisyonu konusunda hassas değildir ve çok küçük örnek miktarlarında dahi kesin sonuç verebilmektedir (Morisset ve ark. 2013). Kanser çalışmalarında da kullanılabilen ddPCR'ın castPCR'dan çok daha doğru ve hassas olduğu Reid ve ark. (2014)'nin yapmış olduğu çalışmada belirtilmiştir. WGA DNA ile birlikte kullanılan ddPCR ise kanser mutasyon araştırmalarında daha güvenilir şekilde sonuç vermektedir.

ddPCR, metod validasyonu yapıldıktan sonra kanatlı üretiminde mevcut olan ya da bulaşan patojen spesifik genlerin tespitinde ve zoonoz patojenlerin düşük enfektif dozunun belirlenmesinde kullanılabilir (Rothrock Jr ve ark. 2013).

Cai ve ark. (2014), Cottenet ve ark. (2016) ile Floren ve ark. (2015) et ve et ürünlerine hile amaçlı katılan et türlerinin tayinini, Kappel ve Schröder (2015) ise balıklarda tür tayinini ddPCR ile yapmışlardır. Kanatlı işletmesinde kullanılan sulardaki zoonotik patojenlerin tespiti yapılabildiği gibi, sütlerdeki *Bacillus cereus* tespiti de yapılabilmektedir (Rothrock Jr. ve ark. 2013; Porcellato ve ark. 2016).

Birçok alanda çalışma yapılmış ddPCR'ın miktar tayini yapabilmesi açısından diğer yöntemlere göre güvenilirliği daha yüksektir. Tek kopyayı dahi analiz edebilmesi özellikle kanser çalışmaları gibi hayati öneme sahip alanlarda tercih sebebidir. Gıdaların bozulması sonucu meydana gelen değişimler ya da histamin kaynaklı alerjiler de ölümcül sonuçlara sebebiyet verebilmektedir. Tez çalışmasında bozulmaların erken teşhisi amacıyla ddPCR kullanılmıştır. Bozulma sırasında birçok bakteri gıdayı

kontamine edebildiği için tek bir bakteri analizine değil bozulma sonucu açığa çıkan histamin ve putresinin üretimine sebep olan genlerin miktar tayinine yönelinmiştir. Bu biyojen aminleri üreten genler ise birden çok bakteride bulunabildiğinden dolayı gen miktarındaki artış ile bozulma arasında bir ilişki saptanmaya çalışılmıştır.

ddPCR verilerine bakıldığında tavuk MAP ve kontrol grupları karşılaştırılmış ve ikisi arasında hem putresin hem de histamin açısından fark görülmüştür. İki değer de gün ilerledikçe sayı artmış ayrıca MAP ve kontroller karşılaştırıldığında kontrol grubunda diğer gruba oranla değerler daha yüksek bulunmuştur. MAP gruplarında mikrobiyolojik olarak 15. günde bozulmayı tespit edemediğimiz göz önüne alındığında histamin ve putresin üreten genlerinin de miktarlarında fazla artış olmaması yaptığımız çalışmanın bizim beklentilerimiz yönünde ilerlediğini göstermektedir. Balıkta mikrobiyolojik verilerin tam olarak bozulmayı yansıtmaması sebebi ile bozulmanın mikrobiyolojik değil enzimatik olduğu yorumlanmıştır. Paludan-Muller ve ark. (1998) ile Parlapani ve ark. (2015) yaptığı çalışmalar da bulgularımızı destekler niteliktedir. Bu nedenle ddPCR'a dayalı biyojen amin üreten genlerin varlığına yönelik testlerin balıkta kullanılamayacağı görüşüne varılmıştır.

Kontrol tavuk örneklerinin 9. günde ulaştığı, MAP örneklerinin ise 15. Günde dahi mikrobiyolojik açıdan eşik değerlere ulaşmadığı göz önüne alındığında; özellikle kontrol tavuk örneklerinin 9. günde ulaştığı öngörülen ve ddPCR metodu ile çoğaltılan hdcRT ve agdi gen bölgelerinin kantitatif olarak yaklaşık 50-60 tekrar yaptığı değerlerin bozulma eşik değeri olarak kullanılabilmesi değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda, ddPCR metodunun et ve et ürünlerinde bozulmanın hızlı tespiti amacı ile kullanılacak bir metod olabileceği ve daha ileri çalışmalarla bu metodun çabuk karar verilmesi gereken denetim ve gıda zehirlenme vakaları gibi olgularda bir ön tespit metodu olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir. Ancak, tez çalışmasının bu alanda yapılan ilk çalışma olması ve daha fazla veri elde edilerek yapılacak çalışmalar ile desteklenmesi ile metodun test edilmesi ve uygulanabilirliği açısından ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Tez çalışması sonucunda elde edilen bulgular dğrultusunda sıcaklık-zaman ve tazelik indikatörlerinin akıllı ambalajlama teknolojisinde kullanımı tavsiye edilmekte ancak özellikle tazelik indikatörleri üzerinde yeni bilimsel çalışmalar yapılması gerektiği vurgulanmaktadır. Akıllı ambalajlama sistemleri ile beraber kullanılarak bozulmanın erken tanısı amacıyla laboratuvar ortamında kesin sonuçlar verebilecek

ddPCR analizleri sonucunda bu çalışmada elde edilen bulguların umut verici olduğu görülmüş ve sistemin çalışılabilirliğini göstermiştir. Bu doğrultuda, gıdalardaki histamin ve putresin üretiminden sorumlu gen miktarları 50-60 tekrarı geçtiğinde gıdaların bozulmuş olarak nitelendirilebileceğine dair değerlendirme yapılmıştır.



KAYNAKLAR

- Abdel-Aziz, S.M., Asker, M.M.S., Keera, A.A. ve Mahmoud, M.G. (2016). Microbial Food Spoilage: Control Strategies for Shelf Life Extension. *Microbes in Food and Health*. 239-264.
- Aday, S.M. ve Yener, U. (2015). Assessing consumers' adoption of active and intelligent packaging. *British Food Journal*. 117(1), 157-177.
- Ahvenainen, R. (2003). Active and Intelligent Packaging: an Introduction. İçinde R Ahvenainen (Ed), *Novel Food Packaging Techniques*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited; 5-21.
- Ahvenainen, R. ve Hurme, E. (1997). Active and smart packaging for meeting consumer demands for quality and safety. *Food Additives and Contaminants*. 14(6-7), 753-763.
- Aksan, E. (2010). Gıdaların Mikrobiyal Bozulması. İçinde O.Erkmen (Ed). *Gıda Mikrobiyolojisi*. Ankara: Efil Yayınevi; 82-123.
- Al-Kadamany, E., Khattar, M., Haddad, T. ve Toufeili, I. (2003). Estimation of shelf-life of concentrated yogurt by monitoring selected microbiological and physicochemical changes during storage. *LWT - Food Science and Technology*. 36(4), 407-414.
- Alonso-Hernando, A., Guevara-Franco, J.A., Alonso-Calleja, C. ve Capita, R. (2013). Effect of the Temperature of the Dipping Solution on the Antimicrobial Effectiveness of Various Chemical Decontaminants against Pathogenic and Spoilage Bacteria on Poultry. *Journal of Food Protection*. 76, 833-842.
- Arena, M.E., Landete, J.M., Manca de Nadra, M.C., Pardo, I. ve Ferrer, S. (2008). Factors affecting the production of putrescine from agmatine by *Lactobacillus hilgardii* X1B isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*. 105, 158-165.
- Arslan, A. (2013). *Et Muayenesi ve Et Ürünleri Teknolojisi* (2.Basım). Malatya: Medipres Matbaacılık Ltd. Şti.

Aures, D., Fleming, R. ve Håkanson, R. (1968). Separation and detection of biogenic amines by thin-layer chromatography: Micro-Analysis of tissue amines and of enzymes involved in their metabolism. *Journal of Chromatography A*. 33, 480-493.

Azab, H.A., El-Korashy, S.A., Anwar, Z.M., Khairy, G.M., Steinerb, M.S. ve Duerkop, A. (2011). High-throughput sensing microtiter plate for determination of biogenic amines in seafood using fluorescence or eye-vision. *Analyst*. 136, 4492–4499.

Babal, K. (Ed). (2005). *Seafood Sense: The Truth about Seafood Nutrition & Safety*. California: Basic Health Publications, Inc.

Balamatsia, C.C., Patsias, A., Kontominas, M.G. ve Savvaidis, I.N. (2007). Possible role of volatile amines as quality-indicating metabolites in modified atmosphere-packaged chicken fillets: Correlation with microbiological and sensory attributes. *Food Chemistry*. 104, 1622–1628.

Baylis, C.L. (2006). Enterobacteriaceae. İçinde C.W. Blackburn (Ed), *Food Spoilage Microorganisms*. İngiltere: Woodhead Publishing Ltd.; 624-669.

Blackburn, C.W. (2006). Introduction. İçinde C.W. Blackburn (Ed), *Food Spoilage Microorganisms*. İngiltere: Woodhead Publishing Ltd.; 7-13.

Blana, V.A. ve Nychas, G.-J.E. (2014). Presence of Quorum Sensing Signal Molecules in Minced Beef Stored Under Various Temperature and Packaging Conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 173, 1–8.

Bodmer, S., Imark, C. ve Kneubühl, M. (1999). Biogenic amines in foods: Histamine and food processing. *Inflammation Research*. 48, 296–300.

Bóka, B., Adányi, N., Virág, D., Sebela, M. ve Kiss, A. (2012). Spoilage Detection with Biogenic Amine Biosensors, Comparison of Different Enzyme Electrodes. *Electroanalysis*. 24, 181–186.

Borch, E., Kant-Muemansb, M.L. ve Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat products and cured meat. *International Journal of Food Microbiology*. 33, 103–120.

Bover-Cid, S. ve Holzapfel, W.H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 53 (1), 33-41.

Brody, A.L., Strupinsky, E.P. ve Kline, L.R. (Ed). (2001). *Active Packaging for Food Applications*. USA: CRC Press LLC.

Bruckner, S., Albrecht, A., Petersen, B, ve Kreyenschmidt, J. (2013). Characterization and Comparison of Spoilage Processes in Fresh Pork and Poultry. *Journal of Food Quality*. 35 (5), 372–382.

Cai, Y., Li, X., Lv, R., Yang, J., Li, J., He, Y. ve ark. (2014). Quantitative Analysis of Pork and Chicken Products by Droplet Digital PCR. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*. 1-6.

Cervený, J., Meyer, J.D. ve Hall, P.A. (2009). Microbiological Spoilage of Meat and Poultry Products İçinde W.H. Sperber ve M.P. Doyle (Ed), *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. London, UK: Springer Science + Business Media, LLC; 69-86.

Chantawannakul, P., Oncharoen, A., Klanbut, K., Chukeatirote, E. ve Lumyong, S. (2002). Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *ScienceAsia*. 28, 241-245.

Chow, C.F., Kong, H.K., Leung, S.W., Chiu, B.K.W., Koo, C.K., Lei, E.N.Y. ve ark. (2011). Heterobimetallic Ru (II)-Eu(III) complex as chemodosimeter for selective biogenic amine odorants detection in fish sample. *Analytical Chemistry*. 83(1), 289–296.

Chun, H.N., Kim, B. ve Shin, H.S. (2014). Evaluation of a Freshness Indicator for Quality of Fish Products During Storage. *Food Science and Biotechnology*. 23(5), 1719-1725.

Cinquina, A.L., Cal`ı, A., Longo, F., De Santis, L., Severoni, A. ve Abballe, F. (2004). Determination of biogenic amines in fish tissues by ion-exchange chromatography with conductivity detection. *Journal of Chromatography A*. 1032, 73–77.

Cirillo, G., Spizzirri, G.U. ve Iemma, F. (2015). *Functional Polymers in Food Science: From Technology to Biology, Volume 1: Food Packaging*. Canada: Scrivener Publishing LLC.

- Coles, R. (2003). Introduction. İçinde R. Coles, D. McDowell ve M.J. Kirwan (2nd ed). *Food Packaging Technology*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd; 1-31.
- Costantini, A., Cersosimo, M., Del Prete, V. ve Garcia-Moruno, E. (2006). Production of Biogenic Amines by Lactic Acid Bacteria: Screening by PCR, Thin-Layer Chromatography, and High-Performance Liquid Chromatography of Strains Isolated from Wine and Must. *Journal of Food Protection*. 69, 391-396.
- Coton, E. ve Coton, M. (2005). Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 63, 296 – 304.
- Coton, E., Rollan, G., Bertrand, A. ve Lonvaud-Funel, A. (1998). Histamine-Producing Lactic Acid Bacteria in Wines: Early Detection, Frequency, and Distribution. *American Journal of Enology and Viticulture*. 49(2), 199-204.
- Cottenet, G., Sonnard, V., Blancpain, C., Ho, H.Z., Leong, H.L. ve Chuah, P.F. (2016). A DNA macro-array to simultaneously identify 32 meat species in food samples. *Food Control*. 67, 135-143.
- Dabade, D.S., den Besten, H.M.W., Azokpota, P., Nout, M.J.R., Hounhouigan, D.J. ve Zwietering, M.H. (2015). Spoilage evaluation, shelf-life prediction, and potential spoilage organisms of tropical brackish water shrimp (*Penaeus notialis*) at different storage temperatures. *Food Microbiology*. 48, 8-16
- Dainty, R.H. (1996). Chemical / biochemical detection of spoilage. *International Journal of Food Microbiology*. 33, 19—33.
- Day, B.P.F. (2003). Active Packaging. İçinde R. Coles, D. McDowell, M. J. Kirwan (Ed), *Food Packaging Technology*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd; 282-302.
- Day, B.P.F. (2008) Active Packaging of Food. İçinde J. Kerry ve P. Butler (Ed.), *Smart Packaging Technologies for Fast Moving Consumer Goods*. England: John Wiley&Sons, Ltd.; 1-18.
- De Jong, A.R., Boumans, H., Slaghek, T., Van Veen, J., Rijk, R. ve Van Zandvoort, M. (2005). Active and intelligent packaging for food: Is it the future?. *Food Additives and Contaminants*. 22(10), 975–979.

De Kruijf, N., van Beest, M., Rijk, R., Sipiläinen-Malm Losada, P. P., ve De Meulenaer, B. (2002). Active and intelligent packaging: applications and regulatory aspects. *Food Additives and Contaminants*. 19, 144–162.

De las Rivas, B., Carrascosa, A.V. ve Muñoz, R. (2007b). Gene cloning, expression, and functional characterization of an ornithine decarboxylase protein from *Serratia liquefaciens* IFI65. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 17, 408–413.

De las Rivas, B., Marcobal, A. ve Muñoz, R. (2005). Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines. *FEMS Microbiology Letters*. 244, 367–372.

De las Rivas, B., Marcobal, A. ve Muñoz, R. (2007a). Gene organization of the ornithine decarboxylase-encoding region in *Morganella morganii*. *Journal of Applied Microbiology*. 102, 1551–1560.

De las Rivas, B., Marcobal, A., Carrascosa, A., Muñoz, R. (2006). PCR detection of food bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine and cadaverine. *Journal of Food Protection*. 69, 2509–2514.

Di Fusco, M., Federico, R., Boffi, A., Macone, A., Favero, G. ve Mazzei, F. (2011). Characterization and application of a diamine oxidase from *Lathyrus sativus* as component of an electrochemical biosensor for the determination of biogenic amines in wine and beer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 401, 707–716.

Doulgeraki, A.I., Ercolini, D., Villani, F. ve Nychas, G.J.E. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 157, 130–141.

Doulgeraki, A.I., Paramithiotis, S., Kagkli, D.M. ve Nychas, G.J.E. (2010). Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *Food Microbiology*. 27, 1028-1034.

Eerola, S., Hinkkanen, R., Lindfors, E. ve Hirvi, T. (1993). Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*. 76(3), 575–577.

Eley, A.R. (Ed). (1996). Introduction. İçinde *Microbial Food Poisoning*. (2nd ed). London, UK: Chapman & Hall; 1-14.

Ellis, D.I., Broadhurst, D., Kell, D.B., Rowland, J.J. ve Goodacre, R. (2002). Rapid and Quantitative Detection of the Microbial Spoilage of Meat by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Machine Learning. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(6), 2822-2828.

Ellouze, M., Pichaud, M., Bonatti, C., Coroller, L., Couvert, O., Thuault, D. ve ark. (2008) Modelling pH evolution and lactic acid production in the growth medium of a lactic acid bacterium: Application to set a biological TTI. *International Journal of Food Microbiology*. 128, 101–107.

Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P ve Villani, F. (2006). Changes in the Spoilage-Related Microbiota of Beef during Refrigerated Storage under Different Packaging Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (7), 4663–4671.

Erim, F.B. (2013). Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples. *Trends in Analytical Chemistry*. 52, 239–247.

Erol, İ. (Ed). (2007). *Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi*. Ankara: Pozitif Matbaacılık Ltd. Sti.

FAO (2007). Heinz, G. ve Hautzinger, P. *Meat Processing Technology For Small- To Mediumscale Producers*. Food And Agriculture Organization Of The United Nations Regional Office For Asia And The Pacific. Erişim 07.12.2015, <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/ai407e/ai407e00.pdf>

FAO (2011). *Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention*. Food AAnd Agriculture Organization Of The United Nations. Rome. Erişim 12.02.2016, <http://www.fao.org/docrep/014/mb060e/mb060e.pdf>.

FAO (2014) *Food and Nutrition in Numbers*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Erişim Erişim 07.12.2015, <http://www.fao.org/3/a-i4175e.pdf>

FAO (2016a). *Save Food: Global initiative on food loss and waste reduction*. Food and Agriculture Organization of The United Nations. Erişim 05.02.2016, <http://www.fao.org/save-food/resources/keyfindings/infographics/meat/en/>

FAO (2016b). *SAVE FOOD: Global Initiative on Food Loss and Waste Reduction*. Food and Agriculture Organization of The United Nations. Erişim 05.02.2016, <http://www.fao.org/save-food/resources/keyfindings/en/>

FAO (2015). *Production quantities by country*. Food and Agriculture Organization of The United Nations Statistics Division. Erişim 05.02.2016, <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>.

Fellows, P.J. (2009). *Food Processing Technology: Principles and Practice*. (3rd ed). New York: CRC Press LLC.

Fernández, M., del Río, B., Linares, D.M., Martín, M.C. ve Alvarez, M.A. (2006). Real-Time Polymerase Chain Reaction for Quantitative Detection of Histamine-Producing Bacteria: Use in Cheese Production. *Journal of Dairy Science*. 89, 3763–3769.

Fernández, M., Linares, D.M., Rodríguez, A. ve Alvarez, M.A. (2007). Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 73. 1400–1406.

Ferrario, C., Borgo, F., de las Rivas, B., Muñoz, R., Ricci, G. ve Fortina, M.G. (2014). Sequencing, Characterization, and Gene Expression Analysis of the Histidine Decarboxylase Gene Cluster of *Morganella morganii*. *Current Microbiology*. 68, 404–411.

Floren, C., Wiedemann, I., Brenig, B., Schütz, E. ve Beck, J. (2015). Species identification and quantification in meat and meat products using droplet digital PCR (ddPCR). *Food Chemistry*. 173, 1054–1058.

Fraser, O.P. ve Sumar, S. (1998). Compositional changes and spoilage in fish (part II) – microbiological induced deterioration. *Nutrition & Food Science*. 6, 325-329.

Friedman, M. (1996). Nutritional Value of Proteins from Different Food Sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44, 6-29.

García-Villar, N., Hernández-Cassou, S. ve Saurina, J. (2009). Determination of biogenic amines in wines by pre-column derivatization and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1216, 6387–6393.

- Geissler, C ve Singh, M. (2011). Iron, Meat and Health. *Nutrients*. 3(3), 283-316.
- Giannakouroua, M.C., Koutsoumanisb, K., Nychasc, G.J.E. ve Taoukis, P.S. (2005). Field evaluation of the application of time temperature integrators for monitoring fish quality in the chill chain. *International Journal of Food Microbiology*. 102, 323 – 336.
- Gill, C.O. (2003). Active Packaging in Practice: Meat. İçinde R Ahvenainen (Ed), *Novel Food Packaging Techniques*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited; 365-383.
- Gilliland S.E, Michener H.D. ve Kraft A.A (1976). Psychrotrophic Microorganisms. İçinde M.L. Speck (Ed), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington, USA: American Public Health Association (APHA); 173-178.
- González, R.D., Tamagnini, L.M., Olmos, P.D. ve de Sousa, G.B. (2003). Evaluation of a chromogenic medium for total coliforms and *Escherichia coli* determination in ready-to-eat foods. *Food Microbiology*. 20 (5), 601–604.
- Gram, L. (2009). Microbiological Spoilage of Fish and Seafood Products İçinde W.H. Sperber ve M.P. Doyle (Ed), *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. London, UK: Springer Science + Business Media, LLC; 87-120.
- Gram, L. ve Huss, H.H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*. 33, 121–137.
- Gram, L. ve Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria – problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*. 13, 262–266.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn J.B., Christensen A.B. ve Givskov M. (2002). Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 78, 79 – 97.
- Guilbertt, S., Gontard, N. ve Cuq, B. (1995). Technology and Applications of Edible Protective Films. *Packaging Technology and Science*. 8, 339-346.
- Han, J.H. (Ed). (2014). A review of food packaging technologies and innovations. İçinde *Innovations in Food Packaging*. (2nd ed). London, UK: Elsevier Ltd; 3-12.

Herbert, U., Rossaint, S., Khanna, M.A. ve Kreyenschmidt, J. (2013). Comparison of argon-based and nitrogen-based modified atmosphere packaging on bacterial growth and product quality of chicken breast fillets. *Poultry Science*. 92, 1348–1356.

Higgs, J.D. (2000). The changing nature of red meat: 20 years improving nutritional quality. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 85–95.

Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J. ve Makarewicz, A.J. (2011). High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Analytical Chemistry*. 83 (22), 8604–8610.

Hogan, S.A. ve Kerry, J.P. (2008) Smart Packaging of Meat and Poultry Products. İçinde J. Kerry ve P. Butler (Ed.), *Smart Packaging Technologies for Fast Moving Consumer Goods*. England: John Wiley&Sons, Ltd.; 61–74.

Hu, F.B., Bronner, L, Willett, W.C., Stampfer, M.J., Rexrode, K.M, Albert, C.M. ve ark. (2002). Fish and Omega-3 Fatty Acid Intake and Risk of Coronary Heart Disease in Women. *The Journal of the American Medical Association*. 287 (14), 1815–1821.

Huis in't Veld, J. H. J. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods. *International Journal of Food Microbiology*. 33, 1–18.

Hurme, E. (2003). Detecting Leaks in Modified Atmosphere Packaging. İçinde R Ahvenainen (Ed), *Novel Food Packaging Techniques*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited; 276-286.

Jay, J.M. (2012). *Modern Food Microbiology*. (5th ed). Maryland: Aspen Publishers, Inc.

Jia, S., Kang, Y.P., Park, J.H., Lee, J. ve Kwon, S.W. (2012). Determination of biogenic amines in Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) wines using a novel ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry. *Food Chemistry*. 132, 1185–1190.

Jørgensen, L.V., Dalgaard, P. ve Huss, H.H. (2000). Multiple Compound Quality Index for Cold-Smoked Salmon (*Salmo salar*) Developed by Multivariate Regression of Biogenic Amines and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 2448–2453.

Kaniou, I., Samouris, G., Mouratidou, T., Eleftheriadou, A. ve Zantopoulos, N. (2001). Determination of biogenic amines in fresh unpacked and vacuum-packed beef during storage at 4⁰ C. *Food Chemistry*. 74, 515–519.

Kanki, M., Yoda, T., Tsukamoto, T. ve Shibata, T. (2002). Klebsiella pneumoniae Produces No Histamine: *Raoultella planticola* and *Raoultella ornithinolytica* Strains Are Histamine Producers. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(7), 3462–3466.

Kappel, K. ve Schröder, U. (2015). Species identification of fishery products in Germany. *Food Science Dialog*. 10, 31-34.

Karahan, A.G. (2003). Gıdalarda Biyojen Aminler. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*. 1(5), 21-32.

Karube, I., Matsuoka, H., Suzuki, S., Watanabe, E. ve Toyama, K. (1984). Determination of Fish Freshness with an Enzyme Sensor System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 32, 314-319.

Katsarova, I. (2014). Tackling food waste The EU's contribution to a global issue. *European Parliamentary Research Service Report*, No: 130678REV1. Erişim 05.02.2016, <http://www.eprs.ep.parl.union.eu> — <http://epthinktank.eu>

Kerry, J.P. (2014). New Packaging Technologies, Materials and Formats for Fast-Moving Consumer Products. İçinde J.H. Han (Ed), *Innovations in Food Packaging*. (2nd ed), USA: Elsevier Ltd; 549-584.

Kerry, J.P., O'Grady, M.N. ve Hogan, S.A. (2006). Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Science*. 74, 113–130.

Kim, M.J., Jung, S.W., Park, H.R. ve Lee, S.J. (2012). Selection of an optimum pH-indicator for developing lactic acid bacteria-based time–temperature integrators (TTI). *Journal of Food Engineering*. 113, 471–478.

Koistinen, K.M., Plumed-Ferrer, C., Lehesranta, S.J., Karenlampi, S.O. ve von Wright, A. (2007). Comparison of growth-phase-dependent cytosolic proteomes of two *Lactobacillus plantarum* strains used in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Letters*. 273, 12–21.

Kokangül, G. ve Fenercioğlu, H. (2012). Gıda Endüstrisinde Akıllı Ambalaj Kullanımı. *Electronic Journal of Food Technologies*. 7 (2), 31-43.

Koutsoumanis, K.P. ve Gougouli, M. (2015). Use of Time Temperature Integrators in food safety management. *Trends in Food Science & Technology*. 43, 236-244.

Kristinsson H.G., Rasco B.A. (2000). Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 43–81.

Kuswandi, B., Maryska, C., Jayus, Abdullah, A. ve Heng, L.Y. (2013). Real time on-package freshness indicator for guavas packaging. *Food Measure*. 7, 29–39.

Kvasnička, F. ve Voldřich, M. (2006). Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection. *Journal of Chromatography A*. 1103, 145–149.

Ladero, V., Coton, M., Fernández, M., Buron, N., Martín, M.C., Guichard, H. ve ark. (2011). Biogenic amines content in Spanish and French natural ciders: Application of qPCR for quantitative detection of biogenic amine-producers. *Food Microbiology*. 28, 554-561.

Landete, J.M., Ferrer, S. ve Pardo, I. (2005). Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine?. *Journal of Applied Microbiology*. 99, 580–586.

Lang, C. ve Hübert, T. (2012). A Colour Ripeness Indicator for Apples. *Food Bioprocess Technol*. 5, 3244–3249.

Le Jeune, C., Lonvaud-Funel, A., Ten Brink, Hofstra, H. ve van der Vossen, J.M.B.M. (1995). Development of a detection system for histidine decarboxylating lactic acid bacteria based on DNA probes, PCR and activity test. *Journal of Applied Bacteriology*. 78, 316-326.

Lee, S.J. ve Rahman, A.T.M.M. (2014). Intelligent Packaging fFor Food Products İçinde J.H. Han (Ed), *Innovations in Food Packaging*. (2nd ed), USA: Elsevier Ltd; 171-212.

Li, D., Ng, A., Mann, N. J. ve Sinclair, A. J. (1998). Contribution of Meat Fat to Dietary Arachidonic Acid. *Lipids*. 33 (4), 437-440.

- Li, S., Zamaratskaia, G., Roos, S., Båth, K., Meijer, J., Borch, E. ve ark. (2015). Interrelationships between the metrics of instrumental meat color and microbial growth during aerobic storage of beef at 4°C. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A - Animal Science*. 65 (2), 97–106.
- Linares, D.M., Cruz Martín, M., Ladero, V., Alvarez, M.A. ve Fernández, M. (2011). Biogenic Amines in Dairy Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 51, 691–703.
- Lindberg, A.M., Ljungh, A., Ahrne, S., Lofdahl, S. ve Molin, G. (1998). Enterobacteriaceae found in high numbers in fish, minced meat and pasteurised milk or cream and the presence of toxin encoding genes. *International Journal of Food Microbiology*. 39, 11–17.
- López-De-Dicastillo, C., Gómez-Estaca, J., Catalá, R., Gavara, R. ve Hernández-Muñoz, P. (2012). Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines. *Food Chemistry*. 131, 1376-1384.
- Løvaas, E. (2006). Marine phospholipids (MPL): Resources, applications and markets. İçinde J.B. Luten, C. Jacobsen, K Bekaert, A. Saebø ve J. Oehlenschläger (Ed). *Seafood Research from Fish to Dish: Quality, Safety and Processing of Wild and Farmed Fish: Chapter 1: Nutritional properties and oxidation of marine lipid*. Netherlands: Wageningen Academic Publishers; 17-29.
- Maijala, R.L. (1993). Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS-broth and modified decarboxylation agar. *Letters in Applied Microbiology*. 17, 40-43.
- Manetta, A.C., Di Giuseppe, L., Tofalo, R., Martuscelli, M., Schirone, M., Giammarco, M. ve ark. (2016). Evaluation of biogenic amines in wine: Determination by an improved HPLC-PDA method. *Food Control*. 62, 351-356.
- Marcobal, Á., De las Rivas, B., Moreno-Arribas, M. V. ve Muñoz, A. (2005). Multiplex PCR Method for the Simultaneous Detection of Histamine-, Tyramine-, and Putrescine-Producing Lactic Acid Bacteria in Foods. *Journal of Food Protection*. 4, 660-884.

- Martínez, N., Martín, M.C., Herrero, A., Fernández, M., Alvarez, M.A. ve Ladero, V. (2011). qPCR as a powerful tool for microbial food spoilage quantification: Significance for food quality. *Trends in Food Science & Technology*. 22, 367-376.
- McNeill, S. ve Van Elswyk, M.E. (2012). Red meat in global nutrition. *Meat Science*. 92, 166-173.
- Millán, S., Sampedro, M.C., Unceta, N., Goicolea, M.A. ve Barrio, R.J. (2007). Simple and rapid determination of biogenic amines in wine by liquid chromatography–electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 584, 145–152.
- Morisset, D., Štebih, D., Milavec, M., Gruden, K. ve Žel, J. (2013). Quantitative Analysis of Food and Feed Samples with Droplet Digital PCR. *PLOS ONE*. 8(5), 1-9.
- Morsy, M.K., Zór, K., Kostesha, N., Alstrøm, T.S., Heiskanen, A., El-Tanahi, H. ve ark. (2015). Development and validation of a colorimetric sensor array for fish spoilage monitoring. *Food Control*, doi: 10.1016/j.foodcont.2015.07.038.
- Murphy, K.M., O'Grady, M.N. ve Kerry, J.P. (2013). Effect of varying the gas headspace to meat ratio on the quality and shelf-life of beef steaks packaged in high oxygen modified atmosphere packs. *Meat Science*. 94, 447–454.
- Nakamura, M., Sanji, T. ve M. Tanaka, M. (2011). Fluorometric Sensing of Biogenic Amines with Aggregation-Induced Emission-Active Tetraphenylethenes. *Chemistry A European Journal*. 17(19), 5344–5349.
- Nannelli, F., Claisse, O., Gindreau, E., de Revel, G., Lonvaud-Funel, A. ve Lucas, P.M. (2008). Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods. *Letters in Applied Microbiology*. 47, 594–599.
- Nopwinyuwonga, A., Trevanichb, S. ve Suppaku, P. (2010). Development of a novel colorimetric indicator label for monitoring freshness of intermediate-moisture dessert spoilage. *Talanta*. 81, 1126–1132.
- Nychas, G.J.E., Skandamis, P.N., Tassou, C.C. ve Koutsoumanis, K.P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*. 78, 77–89.

Ohashi, E., Okamoto, M., Ozawa, A. ve Fujita, T. (1991). Characterization of Common Squid Using Several Freshness Indicators. *Journal of Food Science*. 56(1), 161-163.

Otles, S. ve Yalcin, B. (2008). Intelligent Food Packaging. *LogForum*. 4(4), 1-9.

Ozdemir, M. ve Floros, J.D. (2004). Active Food Packaging Technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 44, 185–193.

Önal, A. (2007). A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*. 103, 1475–1486.

Özçandır, S. ve Yetim, H. (2010). Akıllı Ambalajlama Teknolojisi ve Gıdalarda İzlenebilirlik. *Electronic Journal of Food Technologies*. 5 (1), 1-11. Erişim

Pacquit, A., Frisby, J., Diamond, D., Lau, K.T., Farrell, A., Quilty, B. ve ark. (2007). Development of a smart packaging for the monitoring of fish spoilage. *Food Chemistry*. 102, 466–470.

Paludan-Muller, C., Dalgaard, P., Huss H.H. ve Gram, L. (1998). Evaluation of the role of *Carnobacterium piscicola* in spoilage of vacuum- and modified-atmosphere-packed cold-smoked salmon stored at 5 °C. *International Journal of Food Microbiology*. 39, 155–166.

Panagou, E.Z., Papadopoulou, O., Carstensen, J.M. ve Nychas, G.J.E. (2014). Potential of multispectral imaging technology for rapid and non-destructive determination of the microbiological quality of beef filets during aerobic storage. *International Journal of Food Microbiology*. 174, 1–11.

Park, H.-Y., Kim, S.-J., Kim, K.M., You, Y.-S., Kim, S.Y. ve Han, J. (2012). Development of Antioxidant Packaging Material by Applying Corn-Zein to LLDPE Film in Combination with Phenolic Compounds. *Journal of Food Science*. 77(10), 273-279.

Park, Y.W., Kim S.M., Lee, J.Y. ve Jang, W. (2015). Application of biosensors in smart packaging. *Molecular & Cellular Toxicology*. 11, 277-285.

Parlapani, F.F. ve Boziaris, I.S. (2016). Monitoring of spoilage and determination of microbial communities based on 16S rRNA gene sequence analysis of whole sea bream stored at various temperatures. *LWT - Food Science and Technology*. 66, 553-559.

- Parlapani, F.F., Verdos, G.I., Haroutounian, S.A. ve Boziaris, I.S. (2015). The dynamics of *Pseudomonas* and volatiles during the spoilage of gutted sea bream stored at 2 °C. *Food Control*. 55, 257-265.
- Peng, Y., Zhang, J., Wang, W., Li, Y., Wu, J., Huang, H. ve ark. (2011). Potential prediction of the microbial spoilage of beef using spatially resolved hyperspectral scattering profiles. *Journal of Food Engineering*. 102(2), 163-169.
- Pereira de Abreu, D. A., Cruz, J. M., ve Paseiro Losada, P. (2011). Active and intelligent packaging for the food industry. *Food Reviews International*. 28, 146–187.
- Pereira, P.M.C.C. ve Vicente, A.F.R.B. (2013). Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science*, 93, 586–592.
- Pigott, G.M ve Tucker, B.W. (Ed). (1990). *Seafood: Effects of Technology on Nutrition*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Pinheiro, L.B., Coleman, V.A., Hindson, C.M., Herrmann, J.O., Hindson, B.J. ve Bhat, S. (2012). Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Analytical Chemistry*. 84, 1003-1011.
- Porcellato, D., Narvhus, J. ve Skeie, S.B. (2016). Detection and quantification of *Bacillus cereus* group in milk by droplet digital PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 127, 1–6.
- Premont, R.T., Gainetdinov, R.R. ve Caron M.G. (2001). Following the trace of elusive amines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98, 9474–9475.
- Puligundla, P., Jung, J. ve Ko, S. (2012). Carbon dioxide sensors for intelligent food packaging applications. *Food Control*. 25, 328-333.
- Quintavalla, S. ve Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*. 62, 373–380.
- Rana, K. ve Sanders, T.A.B. (1986). Taurine concentrations in the diet, plasma, urine and breast milk of vegans compared with omnivores. *British Journal of Nutrition*. 56, 17-27.

Realini, C.E. ve Marcos, B. (2014). Active and Intelligent Packaging Systems for a Modern Societ. *Meat Science*. 98, 404-419.

Redruello, B., Ladero, V., Cuesta, I., Álvarez-Buylla, J.R., Cruz Martín, M., Fernández, M. ve ark. (2013). A fast, reliable, ultra high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of amino acids, biogenic amines and ammonium ions in cheese, using diethyl ethoxymethylenemalonate as a derivatising agent. *Food Chemistry*. 139, 1029–1035.

Reid, A.L., Freeman, J.B., Millward, M., Ziman, M. ve Gray, E.S., (2014). Detection of BRAF-V600E and V600K in melanoma circulating tumour 3 cells by droplet digital PCR. *Clinical Biochemistry*.

Robertson, G.L. (2012). *Food Packaging: Principles and Practice*. (3rd ed). New York: CRC Press Taylor&Francis Group, LLC.

Rodríguez, C.J., Besteiro, I. ve Pascual, C. (1999). Biochemical changes in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chilled storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79, 1473-1480.

Rogers, P.L. ve Staruszkiewicz, W. (1997). Gas chromatographic method for putrescine and cadaverine in canned tuna and mahimahi and fluorometric method for histamine (minor modification of AOAC Official Method 977.13): collaborative study. *Journal of AOAC International*. 80(3), 591-602.

Rokka, M., Eerola, S., Smolander, M., Alakomi, H.L. ve Ahvenainen, R. (2004). Monitoring of the quality of modified atmosphere packaged broiler chicken cuts stored in different temperature conditions B. Biogenic amines as quality-indicating metabolites. *Food Control*. 15, 601–607.

Romero-González, R., Alarcon-Flores, M.I., Vidal, J.L.M. ve Frenich, A.G. (2012). Simultaneous Determination of Four Biogenic and Three Volatile Amines in Anchovy by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60, 5324–5329.

Rossaint, S., Klausmann, S. ve Kreyenschmidt, J. (2015). Effect of high-oxygen and oxygen-free modified atmosphere packaging on the spoilage process of poultry breast fillets. *Poultry Science*. 94, 96–103.

Rossaint, S., Klausmann, S., Herbert, U. ve Kreyenschmidt, J. (2014). Effect of package perforation on the spoilage process of poultry stored under different modified atmospheres. *Food Packaging and Shelf Life*. 1, 68-76.

Rothrock Jr., M. J., Hiatt, K. L., Kiepper B. H., Ingram K. ve Hinton A. (2013). Quantification of Zoonotic Bacterial Pathogens within Commercial Poultry Processing Water Samples Using Droplet Digital PCR. *Advances in Microbiology*. 3, 403-411.

Rukchon, C., Nopwinyuwong, A., Trevanich, S., Jinkarn, T ve Suppakul, P. (2014). Development of a food spoilage indicator for monitoring freshness of skinless chicken breast. *Talanta*. 130, 547–554.

Säde, E. Murros, A. ve Björkroth, J. (2013). Predominant enterobacteria on modified-atmosphere packaged meat and poultry. *Food Microbiology*. 34, 252-258.

Sahar, A. ve Dufour, É. (2014). Use of Fourier transform-infrared spectroscopy to predict spoilage bacteria on aerobically stored chicken breast fillets. *LWT - Food Science and Technology*. 56, 315-320.

Salinas, Y., Ros-Lis, J.V., Vivancos, J.L., Martínez-Mañez, R., Marcos, M.D., Aucejo, S. ve ark. (2014). A novel colorimetric sensor array for monitoring fresh pork sausages spoilage. *Food Control*. 35, 166-176.

Sanders, T. A. B. (1999). Meat or wheat for the next millennium? A debate pro veg. The nutritional adequacy of plant-based diets. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58, 265–269.

Sandine W.E., Hill W.M. ve Thompson H. (1976). Acid Producing Microorganisms. İçinde M.L. Speck (Ed), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington, USA: American Public Health Association (APHA); 215-224.

Sarika, A.R., Lipton, A.P., Aishwarya, M.S. ve Dhivya, R.S. (2012). Isolation of a Bacteriocin-Producing *Lactococcus lactis* and Application of Its Bacteriocin to Manage Spoilage Bacteria in High-Value Marine Fish Under Different Storage Temperatures. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 167, 1280–1289.

Selman, J.D. (1995). Time-Temperature Indicators. İçinde M.L. Rooney (Ed), *Active Food Packaging*. London, UK: Springer Science + Business Media, LLC; 215-237.

Shalaby, A.R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 29(7), 675-690.

Sikorski, Z.E., Kolakowaka, A. ve Pan, B.S. (1990). Composition of the Major Groups of Marine Food Organisms. İçinde Z.E. Sikorski (Ed), *Seafood: Resources, Nutritional Composition, and Preservation*. USA: CRC Press LLC; 29-54.

Silla Santos, M.H. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 29, 213-231.

Šimat, V. ve Dalgaard, P. (2011). Use of small diameter column particles to enhance HPLC determination of histamine and other biogenic amines in seafood. *LWT - Food Science and Technology*. 44, 399-406.

Singh, R.P. ve Anderson, B.A. (2004). The Major Types of Food Spoilage: an overview. İçinde R. Steele (Ed), *Understanding and Measuring the Shelf-life of Food*. New York; CRC Press LLC; 3-23.

Smolander, M. (2003) The use of freshness indicators in packaging. İçinde R Ahvenainen (Ed), *Novel Food Packaging Techniques*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited; 128–143.

Smolander, M., Alakomi, H.-L., Ritvanen, T., Vainionpää, J. ve Ahvenainen, R. (2004). Monitoring of the quality of modified atmosphere packaged broiler chicken cuts stored in different temperature conditions. A. Time-temperature indicators as qualityindicating tools. *Food Control*. 15, 217–229.

Smolander, M., Hurme, E. ve Ahvenainen, R. (1997). Leak indicators for modified-atmosphere packages. *Trends in Food Science & Technology*. 81, 101-106.

Smolander, M., Hurme, E., Latva-Kala, K., Luoma, T., Alakomi, H.L. ve Ahvenainen, R. (2002). Myoglobin-based indicators for the evaluation of freshness of unmarinated broiler cuts. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 3, 279–288.

Spano, G., Russo, P., Lonvaud-Fune, A., Lucas, P., Alexandre, H. ve Grandvalet, C. (2010). Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition*. 64, 95–100.

Sperber, W.H. (2009). Introduction to the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. İçinde W.H. Sperber ve M.P. Doyle (Ed), *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. London, UK: Springer Science + Business Media, LLC; 1-40.

Stapleton, P.P, Charles, R.P., Redmond, H.P. ve Bouchier-Hayes, D.J. (1997). Taurine and human nutrition. *Clinical Nutrition*. 16, 103-108.

Stratton, J.E., Hutkins, R.W. ve Taylor, S. L. (1991). Biogenic Amines in Cheese and other Fermented Foods: A Review. *Journal of Food Protection*. 54, 460-470.

Takahashi, H., Kimura, B., Yoshikawa, M. ve Fujii, T. (2003). Cloning and Sequencing of the Histidine Decarboxylase Genes of Gram-Negative, Histamine-Producing Bacteria and Their Application in Detection and Identification of These Organisms in Fish. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(5), 2568–2579.

Taoukis, P. S. (2008) Application of Time– Temperature Integrators for Monitoring and Management of Perishable Product Quality in the Cold Chain. İçinde J. Kerry ve P. Butler (Ed.), *Smart Packaging Technologies for Fast Moving Consumer Goods*. England: John Wiley&Sons, Ltd.; 61–74.

Taoukis, P.S. ve Labuza, T.P. (1989). Applicability of Time-Temperature Indicators as Shelf Life Monitors of Food Products. *Journal of Food Science*. 54(4), 783-788.

Taylor, S. L. (1986). Histamine Food Poisoning: Toxicology And Clinical Aspects. *Critical Reviews in Toxicology*. 17(2), 91-128.

ten Brink, B. Damink, C., Joosten H.M.L.J. ve Huis in't Veld, J.H.J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 11, 73-84.

Turan, H., Kaya, Y. ve Sönmez, G. (2006). Balık Etinin Besin Değeri ve İnsan Sağlığındaki Yeri. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*. 23, 505-508.

Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliği. (2012 Aralık). *Resmi Gazete*. Ankara: Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. Erişim 05.02.2016, <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2012/12/20121205-12.htm>

- USDA (2015). National Nutrient Database for Standard Reference Release 28. *United States Department of Agriculture Agricultural Research Service*. Erişim <https://ndb.nal.usda.gov>.
- Vanderroosta, M., Ragaerta, P., Devliegherea, F. ve De Meulenaer, B. (2014). Intelligent food packaging: The next generation. *Trends in Food Science & Technology*. 39, 47-62.
- WHO (2015). WHO estimates of the Global burden of foodborne diseases. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/199350/1/9789241565165_eng.pdf?ua=1
- Williams, P. (2007). Nutritional composition of red meat. *Nutrition & Dietetics*. 64(4), 113-119.
- Yam, K.L., Takhıstov, P.T. ve Miltz, J. (2005). Intelligent Packaging: Concepts and Applications. *Journal of Food Science*. 70(1), 1-10.
- Yesudhason, P., Lalitha, K.V., Srinivasa Gopal, T.K. ve Ravishankar, C.N. (2014). Retention of shelf life and microbial quality of seer fish stored in modified atmosphere packaging and sodium acetate pretreatment. *Food Packaging and Shelf Life*. 1(2), 123-130.
- Yıldırım, Y. (Ed). (1996). *Et Endüstrisi* (4. Baskı). Ankara: Kozan Ofset Mat. San. ve Tic. Ltd. Şti.
- Zhang, X., Lu, S. ve Chen, X. (2014). A visual pH sensing film using natural dyes from *Bauhinia blakeana* Dunn. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 198, 268–273.
- Zhu, J., Zhao, A., Feng, L. ve Gao, H. (2016). Quorum sensing signals affect spoilage of refrigerated large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) by *Shewanella baltica*. *International Journal of Food Microbiology*, 217, 146-155.
- Zorba, N.N. (2010). Gıda Kaynaklı Mikrobiyal Hastalıklar. İçinde O.Erkmen (Ed). *Gıda Mikrobiyolojisi*. Ankara: Efil Yayınevi; 127-130.

Enteritidis and Salmonella spp. Isolated from Raw Chicken Carcasses", Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, cilt.21, ss.777-779, 2015

Dümen E., Sezgin F.H., Cerit H., Bayrakal G.M., "Determination and Effects of Milk and Dairy Products Consumption Profile in Thrace Region to some Microbiological Parameters ", Global Journal of Science Frontier Research: D Agriculture and Veterinary , vol.15, no.1, pp.1-8, 2015

HAKEMLİ KONGRE / SEMPOZYUMLARIN BİLDİRİ KİTAPLARINDA YER ALAN YAYINLAR

Başaran Kahraman B., Issa G., Adigüzel M.C., Kahraman T., Bayrakal G.M., Koluman A., "Prevalence and antimicrobial resistance of thermophilic Campylobacter species isolated from raw meat chicken", International Vetistanbul group congress 2016, sarajevo, BOSNA HERSEK, 17-20 Mayıs 2016, pp.127-127

Yetimler G., Bayrakal G.M., Aydın A., "Investigation of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus strains isolated in raw milk", 18th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, İSTANBUL, TÜRKİYE, 26-28 Nisan 2016, pp.80-81

Çoban A. , Aydın A., Bayrakal G.M., Sudağdan M., "Presence of beta-lactam resistance in Staphylococcus aureus", WVA/WMA Global Conference on One Health, Madrid, İSPANYA, 21-22 Mayıs 2015, vol.1, no.1, pp.27-27

Çoban A. , Aydın A., Bayrakal G.M., Günaydın R. , Sudağdan M., "Investigation Of Proteolytic And Lipolytic Spoilage Causing Bacteria For Retailed Chicken Meats In Istanbul", 3rd International Poultry Meat Congress, ANTALYA, TÜRKİYE, 22-26 Nisan 2015, ss.196-199

Bayrakal G.M., Çanak Ö., Ağılönü Y., Bingöl E.B., Çiftçioğlu G.R., "Koyun Böbrekleri ve Mezbaha Alanlarında İyonize Tuzlu Suyun Biyosidal Etkisi", 5.Gıda Güvenliği Kongresi, İSTANBUL, TÜRKİYE, 7-8 Mayıs 2015, pp.129-130

Çanak Ö., Ağılönü Y., Bayrakal G.M., Bingöl E.B., Çiftçioğlu G.R., "İyonize Tuzlu Suyun Mezbaha Çalışma Alanları ve Koyun Sakatları Üzerine Antimikrobiyal Etkisi", 17th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, İSTANBUL, TÜRKİYE, 28-30 Nisan 2015, pp.62-62

Dümen E., Akkaya H., Bayrakal G.M., "Collaboration and Further Development of Honey Producers for Healthy and Qualified Honey Production in Kırklareli", II International VETistanbul Group Congress 2015, Saint-Petersburg, RUSYA, 7-9 Nisan 2015, pp.584-584

Akkaya H., Sezgin F.H., Bayrakal G.M., Dümen E., Ergin S., "Kovandan Sofraya; Balarısı, Bal ve Tüketici Sağlığını Riske Eden Paraziter, Viral ve Mikrobiyolojik Etkenlerin Varlığının Araştırılması ve Aralarındaki Etkileşimlerin Belirlenmesi", 4. Uluslararası Muğla Arıcılık Ve Çam Balı Kongresi eş zamanlı olarak 20. Apislatia Kongresi, MUĞLA, TÜRKİYE, 5-9 Kasım 2014, pp.474-474

Bayrakal G.M., Dümen E., Sezgin F.H., "The Evaluation Of Pathogen Bacteria Profile Of 'Çiğ Köfte' (Raw Meatball) And Its Lettuce Marketed In Populous Cities Of Turkey", 3. International Conference on Antimicrobial Research, Madrid, İSPANYA, 1-3 Ekim 2014, pp.410-410

Bayrakal G.M., Cerit H., Dümen E., Sezgin F.H., "The Profile Of Consumers' Habits And Hygiene Analysis Of The Animal Based Foods Form Purchasing To Consumption Period In The Cities Of Aegean Region, Turkey", 3. International Conference on Antimicrobial Research, Madrid, İSPANYA, 1-3 Ekim 2014, pp.412-412

Çoban A. , Issa G. , Bayrakal G.M., Aydın A., Sudağdan M., "Investigation Of Biofilm Related Gene Contents In Staphylococcus Aureus Strains From Food Contact Surfaces", I. International VETistanbul Group Congress, İSTANBUL, TÜRKİYE, 28-30 Nisan 2014, pp.113-113

Aydın A., Çoban A. , Bayrakal G.M., Günaydın R. , Issa G. , Sudağdan M., "Antibiotic Susceptibility Of Staphylococcus Aureus Isolates From Food Contact Surfaces In Turkey", I. International VETistanbul Group Congress , İSTANBUL, TÜRKİYE, 28-30 Nisan 2014, pp.112-112

Bayrakal G.M., Aydın A., Issa G. , Çoban A. , Sudağdan M., "Presence Of The Disinfectant Resistance Genes In Staphylococcus Aureus Strains From Food Contact Surfaces ", I. International Vetistanbul Group Congress 2014, İSTANBUL, TÜRKİYE, 28-30 Nisan 2014, pp.114-114

Muratoğlu K., Yılmaz Eker F., Bayrakal G.M., Levent G. , Özbek U., Çiftçioğlu G.R., "Correlation Between Phenotypic and Genotypic Tetracycline Resistance of Escherichia