

Bazı doğal antimikrobiyal bileşiklerin *S. enteritidis*, *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* üzerine etkinliğinin taze tavuk eti sisteminde incelenmesi

Harika ÇANKAYA *, Necla ARAN, Gürbüz GÜNEŞ

İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Programı, 34469, Ayazağa, İstanbul

Özet

Bu çalışmada doğal antimikrobiyal maddeler (greyfurt çekirdek ekstraktı: GFSE, nisin) ve modifiye atmosfer paketlenme yöntemi kullanarak tavuk kıyması ve formülasyonlarında (GFSE, NaCl ve sarımsak tozu ilavesi) bulunması/çoğalması muhtemel patojen bakterilerin (S. enteritidis, E. coli O157:H7, L. monocytogenes 4b) 4°C ve 10°C’de kontrolü amaçlanmıştır. Antimikrobiyal maddelerin etkinliği ilk aşamada in-vitro test edilmiştir. Tryptic Soy Broth’da (TSB) nisin (+ 20 mM EDTA) S. enteritidis ve E. coli O157:H7 üzerinde önemli etki göstermemiştir. Öte yandan nisin (pH: 3.44-5.22, 73-500 ppm’de) tek başına L. monocytogenes üzerinde kuvvetli bakterisit etkilidir. Greyfurt çekirdek ekstraktı (GFSE) (60-300 ppm) TSB’de tüm patojenlere bakterisittir. GFSE (3000 ve 6000 ppm) ilavesi ile modifiye (%70 CO₂ + % 30 N₂) ve aerobik (%21 O₂ + %79 N₂) paketlenen tavuk kıymasının 10°C’ de 6 gün depolanmasında S. enteritidis ve E. coli O157:H7’ nin gelişimi üzerinde GFSE, süre ve paket tipi önemlidir (p<0.05). Formülasyonlarda (6000 ppm GFSE’ nin NaCl ve/veya sarımsak ile bileşimleri) 10°C’lik depolamada patojen bakterilerin gelişiminin önlenmesinde, S. enteritidis ve E. coli için GFSE, NaCl ve paket tipi, L. monocytogenes için ise bunlara ilaveten sarımsak önemli (p<0.05) etkide bulunmuştur. Soğuk depolamada(4°C) GFSE ve MAP kullanımı ile S. enteritidis ve E. coli kontrolünde, MAP’ın ilave katkısı belirlenmemiştir. Nisinin (250 ppm) tavuk kıymasında MAP ile kombinasyonu soğuk depolamada L. monocytogenes’in kontrolünü sağlamış, 6 gün sonunda kontrol-aerobik örneklerle göre bakteri sayısını 2,5 log₁₀ düşürmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Salmonella, E. coli O157:H7, Listeria, greyfurt çekirdek ekstraktı, nisin, tavuk eti, MAP.*

*Yazışmaların yapılacağı yazar: Harika ÇANKAYA.cankaya@itu.edu.tr; Tel: (212) 285 60 44.

Bu makale, birinci yazar tarafından İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Programı’nda tamamlanmış olan "Bazı doğal antimikrobiyal bileşiklerin *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* üzerine etkinliğinin taze tavuk eti sisteminde incelenmesi " adlı doktora tezinden hazırlanmıştır. Makale metni 17.03.2009 tarihinde dergiye ulaşılmış, 18.06.2009 tarihinde basım kararı alınmıştır. Makale ile ilgili tartışmalar 30.11.2010 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

The investigation of some natural antimicrobial compounds on activities of *S. enteritidis*, *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* in fresh chicken meat systems

Extended abstract

In the first part of this study, the effectiveness of natural antimicrobial substances [nisin (0-500 ppm) and/or EDTA (20 mM); grapefruit seed extract; GFSE (0-300 ppm)] on the growth of each pathogenic bacteria (*S. enteritidis*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* 4b) on the level 5 log₁₀/ml were investigated in Tryptic Soy Broth (TSB) media.

In the second part of the study, the effects of addition of grapefruit seed extract, nisin, garlic powder and NaCl on the bacteria were investigated in minced chicken meat samples or formulations under different temperature storage (4 and 10°C) and packaging (aerobic and modified atmosphere) conditions.

In microbial culture media, nisin-20 mM EDTA combination did not exhibit an inhibition effect on *S. enteritidis* and *E. coli* O157:H7 ($p > 0.05$), whereas 73-500 ppm nisin alone in the pH range of 3.44-5.22 showed strong bactericidal effect ($p < 0.05$) on *L. monocytogenes*. It was also observed that 20 mM EDTA itself at pH 5,22 had a bacteriostatic effect on *S. enteritidis* and *E. coli* O157:H7. Grapefruit seed extract (60-300 ppm) was found to have a bactericidal effect at pH 6.0 against all pathogenic microorganisms in the first hour and at the end of the 24-hour incubation period ($p > 0.05$) in TSB.

The number (log₁₀ CFU/g) of *S. enteritidis* and *L. monocytogenes* in minced chicken meat samples treated with 2000 ppm GFSE was found to be 0.5 log₁₀ and 1 log₁₀ CFU/g less respectively than in control at 4°C over the 6-day storage period. It was found that all factors (GFSE, period and packaging type) had a significant effect on the growth of *S. enteritidis* and *E. coli* O157:H7 over the 6-day storage period in minced chicken meat samples which were treated with 3000 and 6000 ppm of GFSE and packaged under aerobic (%21 O₂+%79 N₂) and modified atmosphere packaging (MAP) (%70 CO₂+% 30N₂) conditions at 10°C ($p < 0.05$). High concentration level of GFSE (6000 ppm) was more effective in inhibitions of *S. enteritidis* and *E. coli* O157:H7. The growth of these pathogenic bacteria was also inhibited using modified atmosphere packaging ($p < 0.05$).

A statistically significant difference was found between packaging methods for *L. monocytogenes*, whereas no statistically significant difference was found between the inhibition effects of 3000 and 6000 ppm GFSE.

In the formulation study, the effects of eight different combinations of GFSE (6000 ppm) with garlic powder (% 2 w/w) and NaCl (% 2 w/w) on pathogenic microorganisms were investigated under aerobic and modified atmosphere packaging conditions at 10°C during 6-day storage period. The results showed that growths of *S. enteritidis* and *E. coli* O157:H7 were significantly influenced by GFSE, NaCl, time and packaging method at 10°C. In addition to these factors, garlic powder had a significant (inhibitory) effect on *L. monocytogenes* growth ($p = 0.018$). It was observed that treated samples with GFSE resulted in a reduction of 2 log₁₀ mean for *S. enteritidis* and *E. coli* O157:H7 counts compared to controls over the first 3-day storage period. However, no further reduction activity was observed at the end of the 6-day storage period. MAP packaging resulted in 1 log₁₀ mean reduction for *S. enteritidis* and 2 log₁₀ mean reduction for *E. coli* O157:H7 compared to aerobic packaging over the 6-day storage period. During the first 3 days of storage the growth of *L. monocytogenes* was controlled with GFSE. At the end of 6 days storage, the number of *L. monocytogenes* was lowered by 2.5 log₁₀ mean compared to controls with the addition of GFSE. MAP packaging led to a reduction of 1 log₁₀ mean for *L. monocytogenes* compared to aerobic packaging.

The addition of GFSE (6000 ppm) resulted in approximately 2 log₁₀ reduction of *S. enteritidis* after 24 h at 4°C in aerobic packages. MAP packaging did not provide any advantage in the reduction of *S. enteritidis*. It was found that packaging method did not have a significant effect on *E. coli* O157:H7 ($p = 0.279$). GFSE and MAP packaging was found to be effective in controlling Listerial growth at 4°C.

It was found that nisin had a significant inhibition ($p < 0.05$) effect on *L. monocytogenes* growth in minced chicken meat at 4°C. At the end of 6 days, the use of 250 ppm nisin with modified atmosphere packaging lowered Listeria counts by 2.5 log₁₀ mean compared to aerobic-controls.

Keywords: *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Listeria*, grapefruit seed extract, nisin, chicken meat, MAP.

Giriş

Gıda kaynaklı patojen bakteriler enfeksiyon veya intoksikasyona neden olarak halk sağlığını etkilemekte, öte yandan tedavi giderleri ve işgücü kaybı gibi önemli ekonomik kayıplara da yol açmaktadır. WHO tarafından yapılan değerlendirmede bu patojenler arasında son 20 - 30 yılda *S. enteritidis*'de çarpıcı bir artış olduğu belirtilmektedir. Salmonellozis, dünyada en sık rapor edilen gıda kaynaklı hastalıklardan birisidir (Schlundt, 2002). Hastalık etmeni olduğu yıllardır bilinen *E. coli* ise son yıllarda verositol toksin üreten *E. coli* (VTEC) suşlarının belirlenmesi ile yeniden ilgi odağı olmuştur (Bell ve Kyriakides, 2002). Vakaların çoğunun yeterince ısıtılma işlemi uygulanmamış gıdaların tüketimi ile ortaya çıktığı ifade edilmiştir (Bacon ve Sofos, 2003). Et ve et ürünlerinden sıklıkla izole edilen patojenik diğer bir bakteri *L. monocytogenes* ise özellikle hamile kadınlar ve bağışıklık sistemi zayıf bireyler açısından potansiyel risk kaynağıdır (Lopez-Mendoza vd., 2007).

Gıdanın güvenliği ve kalitesi üzerinde çeşitli faktörlerin (engellerin) tekli veya birlikte etkileri vardır. Gıda muhafazasında engellerin optimum kombinasyonu, mikrobiyal stabiliteyi olduğu kadar gıdanın duyuşal, besinsel, toksikolojik ve ekonomik niteliklerini de olumlu yönde etkilemektedir (Leistner, 1992).

Gıda endüstrisinde kullanılan doğal antimikrobiyal maddeler bitkisel (esansiyel yağlar, ekstraktlar vd.) hayvansal (lizozim, laktoferrin, laktoperoksidaz sistem) ya da mikrobiyal kaynaklı bakteriyosinler (kolisinler, nisin, subtilin gibi lantibiyotikler ve pediosinler, laktisin, kolistin) olabilmektedir.

Modifiye Atmosfer Paketleme (MAP) son 20 yılda, taze ve minimal işlenmiş gıdalar ile et ve et ürünlerinin muhafazasında yaygın biçimde kullanılmaktadır. Bu yöntemle ortama gaz karışımı verilerek gıdayı çevreleyen paket atmosferinin bileşimi değiştirilmektedir (Skandamis ve Nychas, 2002).

Doğal antimikrobiyal maddeler kapsamında değerlendirilen bakteriyosinler, bazı bakteriler ta-

rafından üretilen ve benzeri bakteri gruplarının gelişmesini önleyen veya onlar üzerinde bakterisit etki gösteren proteinlerdir (Abee vd., 1995). Nisin, antimikrobiyal madde olarak günümüzde kullanılan tek bakteriyosindir (Cleveland vd., 2001). Nisin antimikrobiyal olarak en çok laktik asit bakterilerine ve *Clostridia* türlerine karşı etkilidir ve hedef bakterilerde hücre membranı geçirgenliğini etkileyerek düşük molekül ağırlıklı sitoplazmik bileşenlerin hücre dışına çıkmasına neden olmaktadır (Gill ve Holley, 2000). Nisin, kür edilmiş vakum ambalajlı et ürünlerinde yaygın bir deneme alanı bulmuştur (Cleveland vd., 2001).

Bitkisel kaynaklı bir antimikrobiyal madde olan greyfurt çekirdek ekstraktı (GFSE), greyfurt meyvesinin çekirdek ve pulpundan elde edilir. GFSE, doğal bir antimikrobiyal olup sıvı ve toz formda bulunmaktadır. GFSE geniş spektrumlu bakterisit, fungusit, antiviral ve antiparazitik etki gösteren bileşiktir. Tıbbi, kozmetik vd. kullanım alanları yanında meyve-sebze ve etlerin dezenfeksiyonunda uygulama alanı bulmuştur. GFSE bioflavonoidler ve polifenolik bileşiklerin bir kombinasyonundan oluşup, antimikrobiyal özelliklerinden sorumlu olan aktif quaternary amonyum bileşiğinin, bir 'diphenol hydroxy-benzene' kompleksi olduğu düşünülmektedir. Sıvı GFSE, A.B.D.'de % 60 greyfurt ekstrakt materyali ve % 40'da bitkisel gliserin ile standardize edilmiştir (Anon., 2006a, 2006b).

Deneysel çalışmanın kapsamı

Bu çalışmada doğal antimikrobiyal maddelerden nisin (nisaplin) tek veya EDTA ile kombine edilerek, sodyum laktat (NaL) ve greyfurt çekirdek ekstraktı (GFSE; citril - 200)'nın antimikrobiyal etkinliği in-vitro ortamda, GFSE ve nisin (valisin) gıda (beyaz et; tavuk göğüs eti kıyması) matrisinde ve formülasyonlarda (GFSE'nin NaCl ve/veya sarımsak tozu ile farklı bileşimleri) aerobik ve modifiye paket atmosferinde düşük (4°C) ve/veya yüksek sıcaklık (10°C) depolama şartlarında araştırılmıştır. Ürünün raf ömrü artırılırken inokule edilen patojen bakterilerin (*S. enteritidis*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* 4b) inhibisyonu veya üremesinin kontrolü amaçlanmıştır.

Materyal ve yöntem

Bakteri kültürleri

Kanatlı etlerinden sıklıkla izole edilen bir patojen bakteri olan *S. enteritidis* KUKEN 369 (SZH; Nationalen Salmonella-Zentrale, Hygienisches Institut, Deutschland), *E. coli* O157:H7 ATCC 43894 ve *L. monocytogenes* SLCC 2375 4b TSA (Tryptic Soy Agar) yatık agarda 4°C'de, mikrobankta ve gliserolde -18°C'de muhafaza edilmiştir. Bakteriler in-vitro deneme öncesinde TSA yatık agardan iki kez üst üste 35°C'de 18 saatlik süre ile TSA yatık agara tazeleme yapılarak kullanılmıştır. Et deneylerinde ise gliserolde muhafaza edilen bakteriler deneme öncesinde steril 5 ml TSB-YE (Tryptic Soy Broth - Yeast Extract) a 50 µl ilave edilerek üst üste iki kez 35°C'de 18 saat tazelmiştir. *Salmonella* ve *E. coli* için 18 saatlik kültürler peptonlu suda 10⁷/ml'ye kadar seyreltilerek, daha zayıf üreme gözlenen *Listeria* da ise steril TSB-YE ile 1:1 veya 1:2 gibi seyreltilerek inokulum olarak kullanılmıştır.

İn-Vitro inhibisyon denemelerine hazırlık prosedürü

Antimikrobiyal madde olarak nisin (nisaplin), di sodyum EDTA ve greyfurt çekirdeği ekstraktının (GFSE;Citril-200) hemen deneme öncesi hazırlanan stok çözeltilerinden, sodyum laktat ise direkt olarak, TSB (Tryptic Soy Broth) (Acumedia, Maryland, A.B.D.) içeren deney tüplerine gerekli hacimde (≤ 1 ml) ilave edilmiştir. Antimikrobiyal madde kullanılmadığında körleri (nisin için 0.02 N HCl, diğerleri için steril saf su) kullanılmıştır. TSB besiyeri, toplam hacim 10 ml'ye tamamlandığında formülasyonu karşılayacak derişimde hazırlanmıştır. Tepki-Yüzey dene-melerinde minimum pH olarak, % 1 laktik asitin TSB besiyerinde meydana getirdiği pH: 3.44 seçilmiştir. pH ayarlaması 1 N HCl ve 5 N NaOH ile yapılmıştır. Deney tüpleri inokulasyon öncesinde 121°C'de 15 dak. sterilize edilmiştir.

İn-vitro test tüplerinde bakteri sayısının standardizasyonu

Mc Farland Standardlarından yararlanarak bakteri konsantrasyonu 10⁸ kob/ml tahminlenen tüpten 1 ml alınarak 9 ml peptonlu suya ilave

edilerek 10⁷ kob/ml dilüsyonu hazırlanmış, steril besiyeri+antimikrobiyal içeren test tüple-rine 0.1 ml (100 µl) ilave edilerek, 10 ml hacminde yaklaşık 5 log₁₀ kob/ml düzeyinde başlangıç bakteri sayısı sağlanmıştır.

İnokulasyon, inkübasyon şartları ve mikrobiyolojik sayım

Farklı konsantrasyonlarda inhibitör madde içeren veya içermeyen (kör) deney tüplerindeki TSB ortamına 0.1 ml inokulasyon yapıldıktan sonra deney tüpleri 35°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. GFSE ile inhibisyon denemeleri 1 saat (35°C'deki su banyosunda) ve 24 saat (etüvde) için olmak üzere, aynı şartlardaki 2 ayrı deney seti ile gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası ortamdaki bakteriyel gelişmenin durdurulması için deney tüpleri buzlu su içine alınarak soğutulmuş (10 dak.), analiz edilinceye kadar geçen süre içinde tüpler 4°C'de muhafaza edilmiştir. Bakteri sayımları dökme plak yöntemi ile TSA (Tryptic Soy Agar) (Acumedia, Maryland, A.B.D.) kültür ortamı kullanılarak yapılmış, petri kutuları 35°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve sayımlar bu süre sonunda yapılmıştır.

Tavuk kıymasına antimikrobiyal ilavesi, inokulasyon, depolama şartları ve mikrobiyolojik sayım

Tavuk kıyasması, -18°C'de dondurulmuş tavuk göğüs etinin 1 gece 4°C'de çözündürülerek parçaları dezenfekte edilen kıyım makinasında (Moulinex-Model HV8, Fransa) kıyım çekilmesi ile hazırlanmıştır.

Antimikrobiyal maddelerin hemen deneme öncesinde stok çözeltileri hazırlanmıştır. Nisin (valisin) steril su ile hazırlanan 0.02 N HCl içerisinde, GFSE stok çözeltisi ise steril su ile hazırlanmıştır ve 25 g tavuk kıyasması içeren aerobik ve MAP paketlere maksimum 1 ml ilave edilerek gerekli konsantrasyon sağlanmıştır. Antimikrobiyal ilave edilmediğinde ise içinde hazırlandıkları sıvı kullanılmıştır. Bunu takiben paketlere her bakteri için 0.25 ml (250 µl, ette yaklaşık 10⁵/g) inokulum ilave edilerek ilave sonunda paketler silindir bir çubuk yardımı ile paket dışından iyice homojenize edilmiştir. Formülasyon çalışmasında NaCl ve sarımsak

tozu % 2 (w/w) oranında tavuk kıymasına ilave edilmiştir. Daha sonra ambalajlama makinasında (Multivac ambalajlama makinası, Sepp Haggenmüller GmbH & Co. KG, Wolfertschwenden, Almanya) uygun atmosferde (aerobik/modifiye) ambalajlanarak kapatılmıştır ve 4 veya 10°C'de soğutmalı inkübatör (Nüve, ES 110 soğutmalı inkübatör, İstanbul, Türkiye) içerisinde gerekli sürelerde depolanmıştır. Depolama süresi sonunda soğutucuya alınan paketlerde mikrobiyolojik sayımlara geçilmiştir. Thin Agar Layer (İnce Agar Tabakası - TAL) yönteminde 14 + 14 ml [alt tabakada seçici besiyeri : Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar, Cefixime-Tellurite Sorbitol McConkey (SMAC - CT) Agar veya Oxford Listeria Selective Agar, 14 ml + üst tabakada TSA, 14 ml] şeklinde 2 tabaka halinde hazırlanan besiyerine sürme plak yöntemi ile ekim yapılır. Seçici besiyerleri, supplementleri ve TSA Merck firmasından (Darmstadt, Almanya) temin edilmiştir. Toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı (total plate count) TSA agar kullanılarak dökme plak yöntemi ile yapılmıştır. Petri kutularında sayım 35°C'de 24 saat inkübasyon sonunda yapılmıştır. Tipik *Salmonella enteritidis* kolonileri XLD agarda koyu gri koloniler, *E. coli* O157:H7 kolonileri olarak SMAC - CT agar da renksiz koloniler, *Listeria* kolonileri ise Oxford Listeria agar da ise siyah-yeşil, siyah zonlu kolonilerdir.

İstatistik analizler

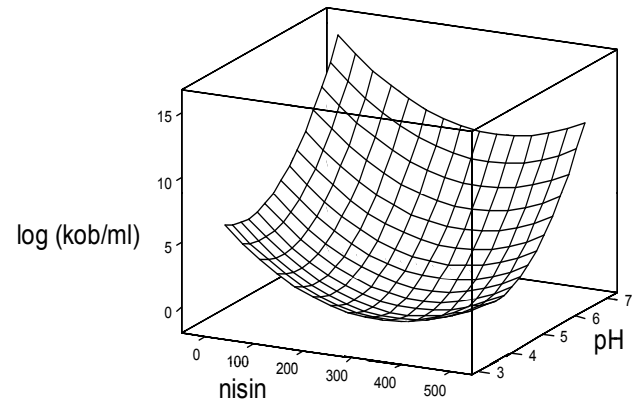
Veriler Minitab-12 bilgisayar programı kullanılarak ANOVA varyans analiziyle istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Deneysel çalışmanın sonuçları

Nisinin in-vitro ortamda patojen bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkileri

Farklı pH düzeyleri (3.44-7.00) ve nisin konsantrasyonlarının (0-500 ppm) *S. enteritidis* ve *E. coli* O157:H7 üzerindeki etkileri EDTA varlığında (20 mM) 'Merkezi Birleşik Desen' kullanılarak Tepki Yüzey Yöntemi ile incelenmiştir. *L. monocytogenes* ile yürütülen çalışmada ise deney koşulları aynı kalmış ancak besiyerine EDTA ilave edilmemiştir. Denemeler, TSB besiyeri ortamında 35°C'de 24 saatlik

inkübasyonla gerçekleştirilmiştir. Buna göre *S. enteritidis* ve *E. coli* O157:H7'nin gelişiminde pH'nın etkisi önemli iken ($p < 0.05$), nisinin bakteri inaktivasyonunda etkisinin önemli olmadığı ($p > 0.05$) bulunmuştur. EDTA 20 mM ve pH:5.22'de tek başına bu bakteriler üzerinde bakteriostatik etkili bulunmuştur. Nisinin *L. monocytogenes* üzerindeki antimikrobiyal etkisi incelendiğinde, nisin ve pH'nın bakteri gelişiminde etkisi önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Nisinin besiyerine 73-500 ppm ilavesinin 3.44-5.22 pH değerleri arasında *L. monocytogenes* üzerinde kuvvetli bakterisit etki gösterdiği görülmüştür (Şekil 1).



Şekil 1. Nisin konsantrasyonu ve pH'nın 35°C'de 24 saat sonunda *L. monocytogenes* üzerine etkisi

Gill ve Holley (2003) tarafından yapılan çalışmada ortamda EDTA için 24°C'de 60 saat inkübasyonla pH:6.0'da saptanan MIC değerleri *E. coli* ve *S. typhimurium*'da sırasıyla 1000 ppm ve >2000 ppm olarak belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda 20 mM EDTA (7445 ppm) pH 5.22'de gram negatiflere tek başına bakteriostatik etkili bulunmuştur.

Boziaris ve diğerleri (2007)'nin *L. Monocytogenes*'in in-vitro ortamda farklı a_w ve pH değerlerinde nisinle indirgenmesini inceledikleri çalışmada artan tuz ve nisin konsantrasyonu ve düşük pH değerlerinin bakteride daha yavaş gelişme hızı ve lag fazının uzamasıyla sonuçlandığını göstermişlerdir. Düşük pH değerlerinde nisinin çözünürlüğü, stabilitesi ve antimikrobiyal etkisi artmaktadır (Delves - Broughton, 1987).

Greyluft çekirdek ekstraktının (grapefruit seed extract:GFSE) in-vitro ortamda patojen bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkileri

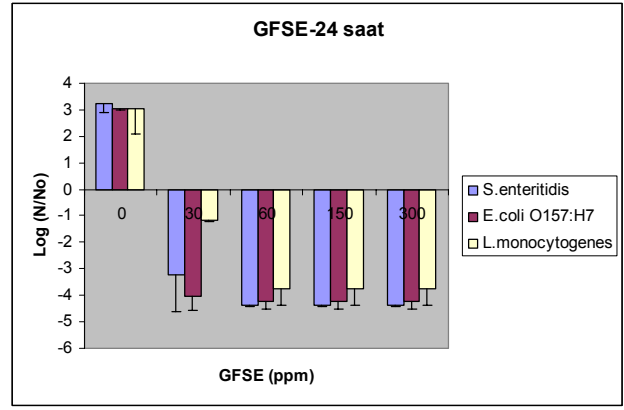
Ön denemede besiyerine 300 ppm saf GFSE ilavesi ile 3 patojen bakteride tam inaktivasyon gözlemlendiği için, daha düşük konsantrasyonlarda GFSE'nin (30-300 ppm) ilk bir saatte ve 24 saat sonundaki bakteri gelişimine etkisine bakılmıştır (35°C, pH:6.0). Denemelerde taze tavuk eti pH'sı olan pH:6.0 seçilmiştir.

GFSE'nin *S. enteritidis*, *E. coli* O157:H7 üzerinde ilk 1 saatteki etkisi incelendiğinde, kontrolde bakteri sayısında stabilite gözlenirken 24 saat sonunda 3 log₁₀ kadar artmıştır. GFSE 60 - 300 ppm de 10. dak. dan itibaren ilk 1 saatte ve 24 saat sonunda bu bakterilerde bakterisit etki göstermiştir.

Ji-Yeun ve diğerleri (2007)'nin GFSE'nin *S. typhimurium* üzerine etkisini araştırdığı bir çalışmada, 37°C'de 20 µg/ml GFSE varlığında 8 saat bakterinin gelişiminin inhibe olmadığı gösterilmiştir ki bizim çalışmamızda da 30 ppm konsantrasyonda ilk 1 saat içinde bakteri canlılığını korumuştur.

GFSE'nin *L. monocytogenes* üzerinde ilk 1 saatteki etkisi incelendiğinde kontrolde bakteri sayısında stabilite gözlenirken, 24 saat sonunda 3 log₁₀ kadar artmış, 60 - 300 ppm de 1. dak. dan itibaren 1 saatte ve buna paralel olarak 24 saat sonunda kuvvetli bakterisit etki meydana gelmiştir. GFSE'nin 30 ppm konsantrasyonunda ise 1 saat içinde bakteri sayısı 1 log₁₀'a düşmüşken, 24 saat inkübasyon sonunda *Listeria* sayısı daha yüksek çıkmıştır. Bu durum bakterinin düşük antimikrobiyal konsantrasyonuna zaman içinde direnç geliştirebildiğini göstermiştir (Şekil 2).

Xu ve diğerleri (2007) tarafından yapılan çalışmada, GFSE'nin gıda kaynaklı patojen bakterilere etkisi in-vitro ve minimal işlenmiş sebzelerde test edilmiş, sonuçta *Salmonella* için MIC değeri 15, *L. monocytogenes* için 64 ppm bulunmuştur. Xu ve diğerlerinin *Salmonella* ve *Listeria* için MIC bulguları bizim bulgularımıza yakın olup Xu ve diğerlerinin çalışmasında başlangıç bakteri sayısı 7 log₁₀ olup, inkübasyon süre ve sıcaklığı ise 30°C'de 48 saattir.



Şekil 2. Farklı konsantrasyonlarda (0-30-60-150-300) GFSE varlığında 35°C'de 24 saat sonunda test organizmaları sayılarındaki değişimler (pH: 6.0)

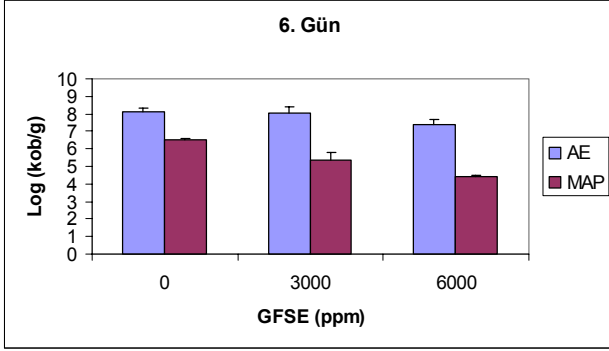
GFSE'nin Gr(-) ve (+) bazı bakteri izolatlarına antibakteriyel etkilerine 1:1 ila 1:512 arasında değişen konsantrasyonlarda, değişen zaman aralıklarında bakılmış ve 1:512 (1953 ppm) lik dilüsyonda hem bakterisit hem de non-toksik kalmıştır. GFSE 1:1 den 1:128 (7812 ppm)e kadarki konsantrasyonlarda yine bakterisit fakat toksik (insan deri fibroblast hücrelerine) bulunmuştur (Heggens vd., 2002).

Tavuk kıymasında patojenlere karşı antimikrobiyal ve ambalaj (Aerobik-MAP) uygulamaları

Denememizde antimikrobiyal etkili GFSE ile gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatan modifiye ambalaj tekniği kombine edilerek 'engel teknolojisi' uygulamasının tavuk kıymasına inokule edilen patojen bakteriler üzerindeki etkisini görmek amaçlanmıştır. GFSE konsantrasyonu 2 düzeyde (3000 ve 6000 ppm) çalışılmıştır. Ambalaj atmosferi bileşimi aerobik paketler için %21 O₂+%79 N₂ ve modifiye atmosfer paketler için %70 CO₂+%30 N₂ olarak seçilmiştir.

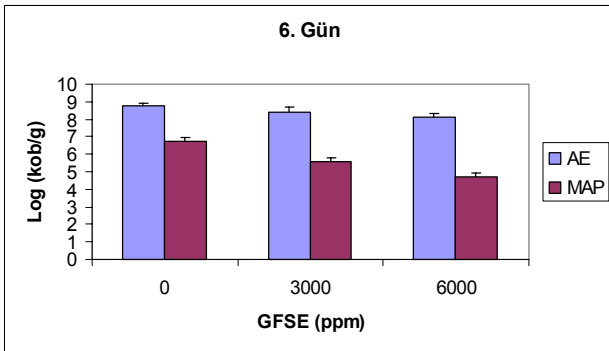
GFSE ilavesi ve MAP'ın (%70 CO₂+%30 N₂) kombine edilerek 10°C'de 6 gün depolanması ile aerobik depolamaya kıyasla mikrobiyal faaliyette belirgin bir sınırlanma görülmüştür. 6000 ppm GFSE ilavesinde, aerobik depolamada 4.5 log₁₀'luk toplam bakteri sayısından, 6 gün sonunda yaklaşık 8.5 log₁₀ bakteri sayısına ulaşılmışken MAP'ta sayı 6 log₁₀ civarında kalmış, buna paralel olarak inokule edilen patojenlerde

de *Salmonella*'da ve *Listeria*'da yaklaşık 0.5 log₁₀ ve *E. coli*'de yaklaşık 1 log₁₀'luk artışlar kaydedilmiştir ki aerobik paketlemeden daha sınırlı düzeydedir. Patojen bakterilerin nisbeten yüksek sıcaklıkta kontrolü sağlanmıştır (Şekil 3, 4, 5).

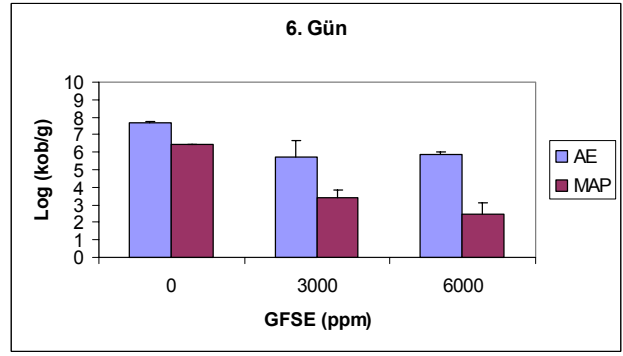


Şekil 3. Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında ve farklı iki ortam atmosferinde (AE: aerobik, MAP: modifiye atmosfer paket) 10°C'de depolanan tavuk kıymasında 6. günde *S. enteritidis* sayıları

Genel olarak, ilave edilen GFSE, rekabetçi floranın da düşük sayıda olduğu ilk gün patojen bakterilerde belirgin bir indirgeme sağlamıştır. Depolamada 10°C gibi nisbeten yüksek sıcaklık derecesinde, kıymaya GFSE ilavesi ve MAP uygulaması birlikte açıkça engel oluşturmuş, ortamdaki patojen vd. bakteri faaliyetini sınırlarken raf ömrünü de uzatmıştır. İnhibisyonda 6000 ppm daha etkindir.



Şekil 4. Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında ve farklı iki ortam atmosferinde (AE: aerobik, MAP: modifiye atmosfer paket) 10°C'de depolanan tavuk kıymasında 6. günde *E. coli* O157:H7 sayıları



Şekil 5. Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında ve farklı iki ortam atmosferinde (AE: aerobik, MAP: modifiye atmosfer paket) 10°C'de depolanan tavuk kıymasında 6. günde *L. monocytogenes* sayıları

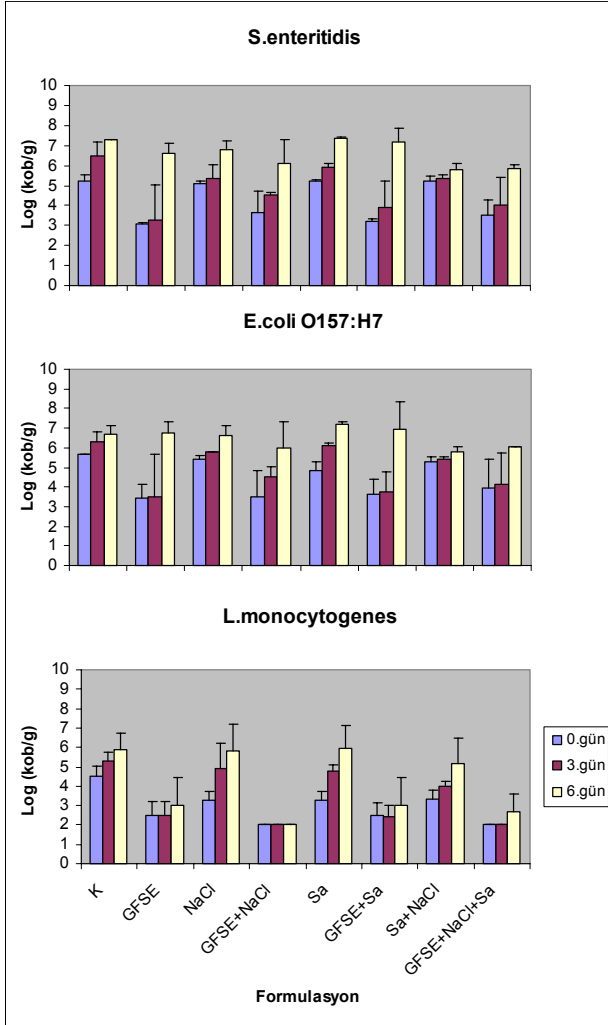
Tavuk kıymasının farklı formülasyonlarında GFSE ve MAP'in patojenler üzerine etkisi
GFSE'nin (6000 ppm) sarımsak tozu (% 2 w/w) ve tuz (NaCl, % 2 w/w) ile 8 farklı formülasyonunun aerobik ve modifiye atmosferde paketlenmenin, 10°C'de test organizmaları üzerine etkisi incelenmiştir.

Buna göre, *S. enteritidis* ve *E. coli* O157:H7'nin 10°C gibi nisbeten yüksek sıcaklıkta gelişiminde GFSE, NaCl, süre ve paket tipi önemli ($p < 0.05$) etkide bulunmuştur. *L. monocytogenes* için bu faktörlere ilaveten sarımsak tozu da etkili bulunmuştur (Şekil 6).

Ortamda % 2 NaCl bulunması, 6. gün sonunda *S. enteritidis* ve *E. coli*'de ortalama 1 log₁₀'a yakın indirgenme sağlamıştır. GFSE ilk 3 günlük depolamada bu bakterilerde kontrole göre 2 log₁₀ a yakın indirgenme sağlarken 6. gün sonunda etkinlik düşüktür. GFSE ilk 3 günlük depolamada bu bakterilerde kontrole göre ortalama 2 log₁₀'a yakın indirgenme sağlarken 6. gün sonunda etkinlik düşüktür. İlk 3 günlük depolamada *Listeria* gelişimi kontrol altında tutulurken, 6 gün sonunda kontrole göre ortalama 3 log₁₀ aşağıda kalmıştır

Soğuk depolamada GFSE'nin MAP ile etkisi
Tavuk kıymasına 6000 ppm GFSE ilave edilerek aerobik veya MAP paketlenmesiyle 4°C'de 6 gün boyunca patojen bakterilerin inaktivasyonu incelenmiştir. Buna göre

Salmonella'nın inaktivasyonunda GFSE, süre ve paket etkisi önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Bakteri sayıları 1. ve 3. günlerde birbirinden önemli farklı çıkmamıştır. Bakteri sayısı GFSE ilavesiyle 1 gün sonra 2 log₁₀ kadar (aerobik) düşmüştür. MAP' ta bu düşüş 1 log₁₀ dur ve her iki paket tipinde de 6 gün boyunca bakteri sayılarında genel olarak stabilite gözlenmiştir. MAP paketleme *Salmonella*'nın indirgenmesinde avantaj sağlamamıştır.



Şekil 6. Greyfurt çekirdek ekstraktı'nın sarımsak tozu ve tuzla kombinasyonlarının MAP paketlenmiş kıymada 10°C'de patojenlerin gelişimine etkisi*

*K: Kontrol, GFSE: 6000 ppm GFSE, NaCl: % 2 NaCl, GFSE+NaCl: 6000 ppm GFSE+% 2 NaCl, Sa: % 2 sarımsak tozu, GFSE+Sa: 6000 ppm GFSE+%2 sarımsak tozu, Sa+NaCl: % 2 sarımsak tozu +% 2 NaCl, GFSE+NaCl+Sa: 6000 ppm GFSE+% 2 NaCl+% 2 sarımsak tozu

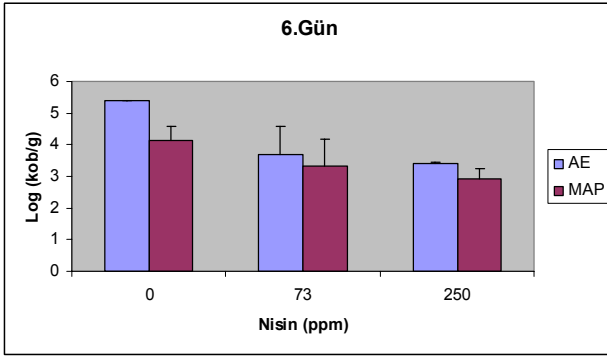
*E. coli*O157:H7'nin kıymadaki inaktivasyonunda GFSE ve süre etkisi önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Paket etkisi ise önemsizdir ($p= 0.279$). Bakteri sayıları 1. ve 3. günlerde birbirinden önemli düzeyde farklı çıkmamıştır. İlk gün sonunda bakteri sayısı GFSE ilavesiyle aerobik paketlemede 2.5 log₁₀ kadar düşmüştür. MAP' ta bu düşüş 1 log₁₀ kadardır.

L. monocytogenes için GFSE, 1. gün sonunda aerobik ve MAP paketlemede GFSE ilavesiyle 1 log₁₀ kadar düşüş meydana gelmiştir, depolama ile aerobik pakette kontrolde bakteri sayısı 1.5 log₁₀ artarken MAP'ta daha stabil kalmıştır. *Listeria* için de GFSE, süre ve paket etkisi önemli bulunmuştur ($p<0.05$). MAP paketleme bakterinin inhibisyonunda aerobik paketlemeden daha avantajlı bulunmuştur. GFSE ve MAP, 6 gün sonunda *Listeria*'da kontrol-aerobik paketlere göre 3 log₁₀ indirgenme sağlamıştır.

Tavuk kıymasında *L. monocytogenes* üzerinde nisin (valisin) ve MAP Etkisi

Nisinin in-vitro deneme bulgularımızdan hareketle etkili iki düzeyi seçilmiş ve aerobik ve MAP paketlenerek 4°C'de 6 gün depolanmıştır. Bulguların ANOVA varyans analizi ile istatistik analizi yapılmıştır. Buna göre nisin, paket tipi ve depolama süresi *L. monocytogenes*'in canlılığında önemli etkide ($p<0.05$) bulunmuştur. Kullanılan iki konsantrasyonun (73 ve 250 ppm) etkisi istatistiksel olarak farklıdır. İnhibisyonda 250 ppm daha etkindir. Depolamada 1. ve 3. günler istatistik olarak farklı değilken 3. ve 6. günler birbirinden farklıdır. MAP, *Listeria*'nın kontrolünde daha etkili paketleme yöntemi olmuştur (Şekil 7).

Nisin Gr(+) organizmalara ve sporlarına karşı koruyucu olmakla birlikte nisinin başka koruyucu maddelerle kombinasyonları, koruma-ya Gr(-)'leri de dahil edebilir. EDTA, sitrik asit gibi çelatlayıcılar, fosfatlar ve sodyum klorür gibi bağlayıcı maddeler, lizozim, organik asitler ve yüzey aktif maddelerden tween-20, vakum ve CO₂ paketleme ile hidrostatik basınç uygulamaları nisine sinerjistik etkili uygulamalardır (Dawson, 2003).



Şekil 7. Nisin'in aerobik ve modifiye atmosfer paketlenmiş tavuk kıymasında *L. monocytogenes* gelişimine etkisi (4°C)

Pawar ve diğerleri (2000)'nin çalışmasında, buffalo eti kıymasında 400 ve 800 IU/g nisinin (Nisaplin) % 2.0 NaCl ile kombinasyonu, inokule edilen 10^3 kob/g *L. monocytogenes*'in 4°C'de depolanması sırasında inhibisyonunda önemli etkide (listeriostatik) bulunmuştur. Kontrolde 16 gün sonunda 6.4 log₁₀ olan sayı, 800 IU/g nisin + %2 NaCl ilavesi ile 3.8 log₁₀ kadardır. Bizim çalışmamızda yaklaşık 4.0 log₁₀ olan başlangıç *Listeria* sayısı 4°C'de 6 gün depolama sonunda kontrol aerobik pakette 5.50 log₁₀ a ulaşırken, 250 ppm nisinin (10000 IU/g) modifiye atmosfer ile kombinasyonunda 3.0 log₁₀ bulunmuştur.

Sığır kıymasında nisinin tek ve kekik esansiyel yağı ile kombine kullanımında, % 0.6 esansiyel yağın 1000 IU/g nisinle kombinasyonu, 4°C lik depolama sırasında, *L. monocytogenes*'i 2.0 log₁₀ cfu/g olarak saptanan Avrupa Birliği resmi limitinin altına düşürmüştür. Bu çalışmada nisin kıymaya 500 ve 1000 IU/g düzeylerinde tek başına ilave edildiğinde 4 ve 10°C'lik depolamaların 2. gününde sırasıyla 1 ve 1.5 log₁₀ düzeylerinde indirgeme meydana getirmişlerdir. Ancak 1000 IU/g nisin ilavesinde 6. günden itibaren *Listeria* sayıları artarak 4.4 log₁₀ a ulaşmıştır (Solomakos vd., 2008). Bizim çalışmamızda da 6. günde muamele örneklerinde bakteri sayısı başlangıç inokulasyon düzeylerine yakındır. Solomakos ve diğerleri kıymada nisinin antimikrobiyal aktivitesinin konsantrasyon ve suşa bağımlı olduğunu bildirmiştir.

Sonuç

Engel teknolojisi kapsamında tavuk kıymasında GFSE'nin MAP'la kombinasyonu incelemeye alınan patojen bakterilerin gelişimini 10°C'de önemli ölçüde geciktirmiştir. Öte yandan 4°C'de depolanan tavuk kıymasında GFSE ve MAP'ın birlikte kullanımında *S. enteritidis* ve *E. coli* O157:H7 üzerinde MAP'ın bir etkisi belirlenmemiş, *L. monocytogenes* üzerinde ise önemli düzeyde inhibisyona neden olduğu saptanmıştır. Nisinin (≥ 73 ppm) tavuk kıymasında 4°C'de modifiye atmosfer ortamında *L. monocytogenes*'in gelişimini kontrol altına aldığı gözlenmiştir.

Kaynaklar

- Abee, T., Krockel, L. ve Hill, C., (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning, *International Journal of Food Microbiology*, **28**, 2, 169-185.
- Bacon, R.T. ve Sofos, J.N., (2003). *Food safety handbook*, Ch.10, Schmidt, R.H. ve Rodrick, G.E., eds, Wiley-Interscience A John Wiley and Sons Inc., New Jersey.
- Bell, C. ve Kyriakides, A., (2002). *Foodborne pathogens: Hazards, risk analysis and control*, Ch.10-12, Blackburn, C. de W. ve McClure, P., eds, CRC Press, New York, Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- Boziaris, I.S., Skandamis, P.N., Anastasiadi, M. ve Nychas, G.-J.E. (2007). Effect of NaCl and KCl on fate and growth/no growth interfaces of *Listeria monocytogenes* Scott A at different pH and nisin concentrations, *Journal of Applied Microbiology*, **102**, 3, 796-805.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. ve Chikindas, M.L., (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation, *International Journal of Food Microbiology*, **71**, 1-20.
- Dawson, P.L., (2003). *Natural antimicrobials for the minimally processing of foods*, Ch.3, Roller, S., eds, Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Cambridge.
- Delves-Broughton, J., (1987). Nisin in food preservation, *Nordeuropæisk mejeritidsskrift*, **1**, 87, 1-8.
- Gill, A.O. ve Holley, R.A., (2000). Surface applications of lysozyme, nisin, and EDTA to inhibit spoilage and pathogenic bacteria on ham and bologna, *Journal of Food Protection*, **63**, 1338-1346.

- Gill, A.O. ve Holley, R.A., (2003). Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24°C, *International Journal of Food Microbiology*, **80**, 3, 251-259.
- Heggors, J.P., Cottingham, J., Gusman, J., Reagor, L., McCoy, L., Carino, E., Cox, R. ve Zhao, J.G., (2002). The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: II. Mechanism of action and in vitro toxicity, *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, **8**, 3, 333-340.
- Ji-Yeun, K., Sangryul, R. ve Geun, E.J., (2007). Effects of sulforaphane, grapefruit seed extracts, and reuterin on virulence gene expression using hila and invF fusion strains of *Salmonella typhimurium*, *Food Science and Biotechnology*, **16**, 5, 778-782.
- Schlundt, J., (2002). New directions in foodborne disease prevention, *International Journal of Food Microbiology*, **78**, 3-17.
- Skandamis, P.N. ve Nychas, G.J.E., (2002). Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions, *International Journal of Food Microbiology*, **79**, 35-45.
- Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P. ve Botso-glou, N., (2008). The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage, *Food Microbiology*, **25**, 1, 120-127.
- Leistner, L., (1992). Food preservation by combined methods, *Food Research International*, **25**, 151-158.
- Lopez-Mendoza, M.C., Ruiz, P. ve Mata, C.M., (2007). Combined effects of nisin, lactic acid and modified atmosphere packaging on the survival of *Listeria monocytogenes* in raw ground pork, *International Journal of Food Science and Technology*, **42**, 5, 562-566.
- Pawar, D.D., Malik, S.V.S., Bhilegaonkar, K.N. ve Barbuddhe, S.B., (2000). Effect of nisin and its combination with sodium chloride on the survival of *L. monocytogenes* added to raw buffalo meat mince, *Meat Science*, **56**, 215-219.
- Xu, W., Qu, W., Huang, K., Guo, F., Yang, J., Zhao, H. ve Luo, Y.B., (2007). Antibacterial effect of Grapefruit Seed Extract on food-borne pathogens and its application in the preservation of minimally processed vegetables, *Postharvest Biology and Technology*, **45**, 1, 126-133.
-
- Anon., (2006a).
<http://www.health.enotes.com/alternative-medicine-encyclopedia/grapefruit-seed-extract>
- Anon., (2006b).
<http://www.geocities.com/HotSprings/Spa/grapefruit.html>