

ISSN 1303-3107

# GIDA VE YEM BİLİMİ - TEKNOLOJİSİ

JOURNAL OF FOOD AND FEED SCIENCE - TECHNOLOGY

Yıl/Year:11

Sayı/Number:14

2014

## Nisin İlave Edilmiş Metil Selüloz Filmlerin Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi

Determination Of Antimicrobial Effects Of Methyl Cellulose Films Containing Nisin

## Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmasında Kullanılan Başlıca Fenotipik ve Moleküler Yöntemler

Molecular and Phenotypic Methods for Lactic Acid Bacteria Identification

## Gıdalarda Isıl Olmayan Yeni Teknikler ve Mikroorganizmalar Üzerine Etkileri

Non-Thermal New Methods And Their Effects On Microorganisms

## Süt Endüstrisinde Su Kalitesi ve Önemi

Importance of Water Quality in Dairy Industry

## Biyofilm Oluşum Mekanizması ve Biyofilmlerin Gıda Güvenliğine Etkisi

Biofilm Formation Mechanism and Biofilm's Effect on Food Safety

BURSA

# GIDA VE YEM BİLİMİ - TEKNOLOJİSİ DERGİSİ

*Journal of Food and Feed Science - Technology*

ISSN 1303-3107

## Yayın Bilgileri (Editorial Information)

### Bursa Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Adına Sahibi

*Owner on behalf of Bursa Central Research  
Institute of Food and Feed Control*

### Harun SEÇKİN

*(Enstitü Müdürü-Institute Manager)*

### Sorumlu Yazı İşleri Müdürü (Editor)

Erdal EROĞLU

### Reklam ve Abone İşleri

*(Advertisement and Subscription)*

Ekrem KATMER

### Grafik Tasarım (Graphics Design)

Dr. Fatma GÜNGÖR

### Basım (Printing)

Gülmat Ofset

Kazım Karabekir Mh. 2. Karaağaç Sk.

No: 27 Yıldırım-BURSA

www.gulmat.com

Tlf : +90 224 368 61 61

Faks: +90 224 366 52 53

### Yönetim ve Yayın Adresi (Administration and Publishing Address)

Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma

Enstitüsü Müdürlüğü

Hürriyet cad. No:126 P.K. 3 16036

Osmangazi/BURSA

Tlf: + 90 224 246 47 20 (Pbx)

Faks: + 90 224 246 19 41

**E-posta (E-mail):** bursagida@bursagida.gov.tr

**Web adresi (Web site):** www.bursagida.gov.tr

## Vizyonumuz

Faaliyet Alanındaki Araştırma Konuları ile  
Laboratuvar Analizlerinde Vazgeçilmez  
Olmak.

## Our Vision

*Being essential in field of research  
activities and laboratory analyzes.*

## Misyonumuz

Gıda, yem, su ve su ürünleri konularında  
sektörün ihtiyacı olan kontrol ve araştırma  
hizmetleri ile bu konulardaki eğitimleri;  
kaliteli, güvenilir ve hızlı gerçekleştirerek,  
müşteri memnuniyeti ve gıda güvenliğini  
sağlayıp toplum sağlığını korumak.

## Our Mission

*Protecting the health of society,  
Providing customer satisfaction and food  
safety,  
Performing qualified, rapid and trustable  
control, research and training services  
according to food sector requirements.*



www.bursagida.gov.tr

ISSN 1303-3107

# **GIDA VE YEM BİLİMİ - TEKNOLOJİSİ DERGİSİ**

*Journal of Food and Feed  
Science - Technology*

Yıl/Year: 11

Sayı/Number: 14

2014

---

**GIDA VE YEM KONTROL MERKEZ ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ - BURSA  
CENTRAL RESEARCH INSTITUTE OF FOOD AND FEED CONTROL**

**Yayın KURULU** (*Editorial Board*)

Enver TAN (Başkan)  
Dr. Fatma GÜNGÖR  
Dr. Emine ALKIN  
Dr. Vesile ÇETİN  
Dr. Nurşen ÇİL  
Dr. Nazan ÇÖPLÜ  
Dr. Aykut GÜLEREN  
Orhan EREN  
Habil UMUR  
Dr. H. Özgül UÇURUM  
Ali ÖZCAN  
Dr. Arzu ÜRŞEN AŞYEMEZ

**Bu Sayının Bilimsel Yayın Danışmanları\*** (*Advisory Board*)

**Prof. Dr. Mehmet DEMİRCİ**

*Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Gıda Müh. Bölümü*

**Prof. Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU**

*Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Müh. Bölümü*

**Doç. Dr. Abdullah Kemal SEÇKİN**

*Bursa Teknik Üniversitesi Gıda Müh. Bölümü*

**Doç. Dr. Özlem TOKUŞOĞLU**

*Celal Bayar Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Müh. Bölümü*

\* İsimler unvanlarına göre alfabetik sıra ile yazılmıştır.

## İÇİNDEKİLER

## Sayfa

<b>Nisin İlave Edilmiş Metil Selüloz Filmlerin Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi</b> Determination Of Antimicrobial Effects Of Methyl Cellulose Films Containing Nisin .....	<b>1</b>
<b>Laktik Asit Bakterilerinin Tanılanmasında Kullanılan Başlıca Fenotipik ve Moleküler Yöntemler</b> Molecular and Phenotypic Methods for Lactic Acid Bacteria Identification .....	<b>8</b>
<b>Gıdalarda Isıl Olmayan Yeni Teknikler ve Mikroorganizmalar Üzerine Etkileri</b> Non-Thermal New Methods And Their Effects On Microorganisms .....	<b>23</b>
<b>Süt Endüstrisinde Su Kalitesi ve Önemi</b> Importance of Water Quality in Dairy Industry .....	<b>36</b>
<b>Biyofilm Oluşum Mekanizması ve Biyofilmlerin Gıda Güvenliğine Etkisi</b> Biofilm Formation Mechanism and Biofilm's Effect on Food Safety .....	<b>42</b>
<b>Süt ve Süt Ürünlerinde Organik Klorlu Pestisit Varlığı (Düzeltilme)</b> Organochlorine Pesticide Residues In Milk And Milk Products .....	<b>52</b>





## NİSİN İLAVE EDİLMİŞ METİL SELÜLOZ FİLMLEİN ANTIMİKROBİYAL ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Selin KALKAN\*

Emel ÜNAL\*\*

Zerrin ERGİNKAYA\*\*\*

### ÖZET

Nisin, antimikrobiyal bir peptid olarak, etkili bir bakteriyel inhibitördür ve çeşitli yüzeylere absorbe olabilme özelliği nedeniyle, ambalaj materyallerine ilave edilebilmektedir. Bu çalışmada, çeşitli oranlarda nisin içeren (500 IU, 1000 IU, 2000 IU ve 3000 IU/cm<sup>2</sup> film) yenilebilir metil selüloz filmler hazırlanarak, in vitro koşullarda, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *B. cereus*, *Salmonella Enteritidis* ve *S. aureus* gibi önemli gıda kaynaklı patojenler üzerinde antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, hazırlanan nisin ilaveli metil selüloz filmlerden, 1 cm çapında diskler kesilerek, agar difüzyon yöntemi ile oluşan zon çapları ölçülmüştür.

Yapılan analizler sonucunda, hazırlanan metil selüloz filmler, *E. coli*, *B. cereus* ve *Salmonella Enteritidis*'e karşı herhangi bir antimikrobiyal etki göstermezken, 3000 IU/cm<sup>2</sup> film oranında nisin içeren filmlerin, *S. aureus* üzerinde antimikrobiyal etki göstererek, 22.33±2.51 mm çapında zon oluşturduğu belirlenmiştir. Hazırlanan tüm metil selüloz filmlerin, en güçlü antimikrobiyal etkiyi ise *L. monocytogenes*'e karşı gösterdiği tespit edilerek (sırasıyla 20.33±0.47; 22.33±0.47; 26±1.00; 28.66±1.15 mm zon çapları) sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0,05). Tüm analizler 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Nisin, metil selüloz film, antimikrobiyal etki, aktif ambalajlama, patojen

## DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL EFFECTS OF METHYL CELLULOSE FILMS CONTAINING NISIN

### ABSTRACT

Nisin, as an antimicrobial peptide, is an effective inhibitor of bacterial and can be added packaging materials due to absorb various surface. In this study, we aim to determinate of antimicrobial effects of methyl cellulose films with containing various proportions nisin (500 IU, 1000 IU, 2000 IU and 3000 IU) against important food-borne pathogens such as *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *B. cereus*, *Salmonella Enteritidis* and *S. aureus* by in vitro. For his purpose, 1 cm diameter dicks cut from methyl cellulose films containing nisin and zone diameter were measured by the agar diffusion method. As results of these analysis which prepared methyl cellulose films didn't antimicrobial effect against *E. coli*, *B. cereus*, *Salmonella Enteritidis* but containing 3000 IU nisin methyl cellulose films have shown an antimicrobial effect against *S. aureus* by 22.33±2.51 mm zone diameter. All prepared methyl cellulose films have shown the most powerful antimicrobial effect against *L. monocytogenes* (respectively 20.33±0.47; 22.33±0.47; 26±1.00; 28.66±1.15 mm zone diameters) and all results were significant by statistically (P<0,05). All analysis was replicated in three times.

**Key Words:** Nisin, methyl cellulose film, antimicrobial effect, active packaging, pathogen

\*Öğr. Gör., Korkut Ata Üniversitesi, Bahçe M.Y.O., Gıda Teknolojisi Programı - OSMANIYE

\*\* Araş. Gör., Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Müh. Bölümü - ADANA

\*\*\*Prof. Dr., Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü - ADANA

E-mail: selinkalkan@osmaniye.edu.tr

E-mail: unale@cu.edu.tr ;

E-mail : zerriner@cu.edu.tr

## 1.GİRİŞ

Son yıllarda tüketici taleplerinde, minimum işlem görmüş gıdalara olan ilginin artmasına bağlı olarak, ambalaj sektöründe de yeni teknolojilerin araştırılmasına ve kullanılmasına başlanmıştır. Bu teknolojilerden, en fazla öne çıkan ise aktif ambalajlama tekniğidir. Aktif ambalajlama, ambalaj materyaline çeşitli aktif bileşenlerin katılımı yoluyla gerçekleşmektedir. Bu aktif bileşenler, antimikrobiyal özellikte olup, sentetik polimer ve yenilebilir film gibi farklı yapılar içinde etkinleşmektedirler (Ayana ve Turhan, 2010). Aktif ambalajlama sistemlerinde en önemli gelişme ise, paketlenme materyalinden antimikrobiyal maddelerin kontrollü salınımı ile gerçekleştirilen antimikrobiyal ambalajlamadır. Organik asitler, bakteriyosinler, antibiyotikler, fungusidler, çelat ajanları ve parabenler gıda ambalajlama materyalleri bünyesinde yer alarak antimikrobiyal aktivite gösterebilmektedirler (Khairuddin, 2005).

Günümüzde yaygın kullanımı olan geleneksel ambalaj materyalleri sentetik yapıdadır. Bu sentetik malzemeler, güvenli, kullanışlı ve ekonomik olmalarına rağmen biyolojik olarak bozunuma uğramadığından, çevresel kirlilik etmenlerindedir. Bu nedenle, son yıllarda yapılan araştırmalar, biyolojik olarak kolaylıkla bozunuma uğrayabilen, gıda ile tüketilebilen, toplam katı atık miktarını azaltarak daha çevresel alternatifler sunan protein, lipid ve polisakarit polimerlerin ambalaj materyali olarak kullanımı üzerine yoğunlaşmıştır. Bu kapsamda, antimikrobiyal madde içeren yenilebilir özellikte olan film ve kaplamaların kullanımı giderek yaygınlaşmakta ve kullanımı benimsenmektedir (Ayana, 2007). Yenilebilir film ve kaplamalar, gıdaları korumak, raf ömrünü artırmak amacıyla gıda yüzeyinde oluşturulmuş ince tabakalı, gıda ile birlikte tüketilebilen, doğal kaynaklardan elde edilen maddelerdir (Dursun ve Erkan, 2009).

Yenilebilir filmlerin sentetik paketlenme materyallerinin tamamen yerini alması beklenemez, ancak, nem, gaz ve lipid migrasyonunu kontrol etmelerinin yanı sıra, katkı maddelerinin de taşıyıcısı olarak kullanılabilirler (Sanjurjo ve ark., 2006). Yenilebilir film ve kaplama üretiminde kullanılan en yaygın polisakarit polimerler, selüloz türevleridir. Selüloz türevi polimerler, yenilebilirlik, biyouyumluluk, bariyer özellikleri, estetik görünüş, toksik olmama gibi özellikleri ile düşük fiyat sahip olma gibi bir çok avantaja sahiptirler (Imran ve ark., 2010). Yenilebilir film ve kaplama yapımında, hidroksipropil selüloz (E463; HPC), hidroksipropil metilselüloz (E464; HPMC), karboksimetilselüloz (E466; CMC) ve metilselüloz (E461; MC) gibi sadece 4 tane selüloz türevi kullanılmaktadır (Skurtys ve ark., 2010).

Genel olarak değerlendirildiğinde, büyük yüzey alanı ve biyopolimerik yapılarıyla, üründeki suyun büyük çoğunluğunu içine alma yeteneğine sahip selüloz içerikli kaplamalar, acılaşıma üzerinde olumlu etkilere sahiptirler. Selüloz esterleri, yenilebilir filmlerin suda çözünen, yağa dirençli, sağlam ve esnek yapmak için kullanılmaktadır. Plastikleştirici olarak bir yağ ile kombine edilmek suretiyle, taze veya dondurulmuş etlerin kaplanması yararlanılmaktadır. Metil selüloz, metilklorid ile reaksiyonu sonrası alkali ile muamelesiyle elde edilen bir selüloz esteridir (Dursun ve Erkan, 2009). Suyu karşı, en dirençli ve en düşük hidrofilitik özelliği gösteren selüloz türevidir (Skurtys ve ark., 2010). Termal jelasyon gösteren metil selüloz, ideal film oluşturucu özelliklere sahiptir ve yaygın bir şekilde yenilebilir film yapımında kullanılmaktadır. Metil selüloz veya hidroksimetil selüloz ile etlerin kaplanması, pişirme sırasında kayıpları minimize etmekte, yağ alımını azaltmakta, tavuk ve balık ürünlerinde glazing materyali olarak kullanıldığında ise, nem kayıplarını düşürmektedir (Dursun ve Erkan, 2009).

Tüketicilerin sağlıklı ve doğal ürünlere artan ilgisi nedeniyle bilim adamları, özellikle de antimikrobiyal katkı olarak sağlık açısından kötü bir imaja sahip kimyasalların kullanılmasının yerine doğal ajanlardan yararlanılmasını öngören birçok araştırma yürütmektedir. Doğal antimikrobiyaller, direk olarak ürün formülasyonuna konularak, gıdanın depolanması boyunca istenmeyen mikroorganizmaların inhibisyonunda kullanılabilirler gibi, antimikrobiyal madde, paketlenme materyali içerisine ilave edilerek, gıda yüzeyine direk olarak da uygulanabilmektedir (Cao-Hoang ve ark., 2010). Antimikrobiyal bileşiklerin salınımının kontrollü olarak gerçekleştirildiği, antimikrobiyal ambalajlama sistemleri ile, sadece başlangıçtaki mikroorganizmalar inhibe edilmeyip, ürünün depolanması ve taşınması esnasında da mevcut mikrobiyel gelişim engellenecektir. Bu sistemler, gıda güvenliğinin sağlanmasında patojen ve/veya bozulma yapan mikroorganizmalar için bir engel mekanizması oluştururlar (Cooksey, 2005).

Doğal bir antimikrobiyal madde olan nisin, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*'in bazı şuşları tarafından üretilen protein yapısında, antibakteriyal etkiye sahip bir bakteriyosindir. Nisinin, laktokoklar, basiller, mikro-



koklar, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* ve *C. botulinum*' un da dahil olduğu, pek çok Gram pozitif bakteriye karşı etkili olduğu bildirilmektedir. Ancak, Gram negatif bakterilerin yanı sıra, maya ve küflere karşı etkisiz ya da çok az etkili olduğu bildirilmektedir. Nisin, 1989' da Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA; Food and Drug Administration) tarafından ABD'de Genel Olarak Güvenilir Kabul Edilen [Generally Recognized As Safe (GRAS)] tek bakteriosindir (Aktürkoğlu ve Erol, 1999; Cao-Hoang ve ark., 2010). Gıda kaynaklı önemli bir çok Gram pozitif patojen bakterilere karşı etkili olan nisinin, selüloz, naylon, peynir altı protein izolatu, hidroksipropil metil selüloz, zein vb. birçok çeşit filmlere dahil edildiği ve bu paketlenme sistemlerinin nisinin taşıyıcısı olarak kullanıldığı, bir çok çalışma yapılmıştır. Nisin içeren yenilebilir filmlerin, gıda yüzeyindeki istenmeyen mikroorganizmalar üzerine olan inhibisyon etkisi, nisinin gıda matriksine difüzyonuna bağlıdır. Nisinin etkin difüzyonu ise gıdanın fiziko kimyasal özellikleri ile depolama sıcaklığı gibi çeşitli parametrelere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Cao-Hoang ve ark., 2010).

Bu çalışmada, çeşitli oranlarda nisin içeren (500 IU, 1000 IU, 2000 IU ve 3000 IU/cm<sup>2</sup> film) yenilebilir metil selüloz filmler hazırlanarak, aktif filmlerin in vitro koşullarda, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *B. cereus*, *Salmonella Enteritidis* ve *S. aureus* gibi önemli gıda kaynaklı patojenlere karşı antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. MATERYEL VE METOT

### 2.1. MATERYAL

#### 2.1.1. Kullanılan Mikroorganizmalar :

Çalışmada, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 13565-Oxoid ve Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilen, *E. coli*, *Bacillus cereus* ve *Salmonella Enteritidis* kullanılmıştır.

#### 2.1.2. Standart Nisin Solüsyonunun Hazırlanması :

Sigma-Aldrich'den (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) temin edilen nisin, 0,1 gram tartılarak 2 mL 0,01 M HCl solüsyonu (pH 2) içerisinde çözündürülmüştür. Hazırlanan solüsyon, 0,2 µm gözenek çaplı Milipore filtreden (Nalgene, Rochester, New York, USA) geçirilerek, kullanılmadan önce 4 °C'de depolanmıştır (Cao-Hoang ve ark., 2010).

### 2.2. METOT

#### 2.2.1. Nisin İçeren Metil Selüloz Filmlerin Hazırlanması :

Metil selüloz filmlerin hazırlanmasında, Ayana (2007) tarafından kullanılan yöntem temel alınmıştır. Film solüsyonu hazırlanırken, 4 g metil selüloz, 50 mL saf su içerisinde çözündürüldükten sonra, 90 °C'ye ısıtılmıştır. Çözelti içerisine, metil selüloz miktarının yaklaşık yarısı kadar gliserol (1,6 mL) ilave edilmiştir. Film solüsyonu içerisine nisin, 500, 1000, 2000 ve 3000 IU/ cm<sup>2</sup> aktif film oranlarında ilave edildikten sonra, oda sıcaklığındaki saf su ile hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan film solüsyonları, 10'ar mL olarak, steril cam petri kutularına aktarılmış ve 25 °C'de 24 saat süreyle kurumaya bırakılmıştır. Elde edilen aktif metil selüloz filmlerde, saf nisin miktarı 6,25 mg/g düzeyinde,, teorik olarak her cm<sup>2</sup> aktif film yüzeyinde 0,04 mg veya 1000 IU nisin bulunacak şekilde hesaplanmıştır (Cao-Hoang ve ark., 2010; Ayana, 2007).

#### 2.2.2. Nisin İçeren Metil Selüloz Filmlerin Antimikrobiyal Etkinliklerinin Tespiti :

Farklı nisin oranları ile hazırlanan metil selüloz filmlerin antimikrobiyel etkisi, agar difüzyon yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Stok kültürlerden, öze ile *L. monocytogenes*, *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* ve *Salmonella Enteritidis*' e ait koloniler Nutrient Broth (Merck) besiyerine inoküle edilmiştir. Duyarlılık testi için inokülüm miktarları, McFarland 0,5 standart değerine ulaşıncaya kadar, 37 °C'de inkübasyona bırakılmışlardır. Yoğunluğu ayarlanmış kültürlerden (10<sup>6</sup> kob/ml), 0,1 mL alınarak, her bir kültürün steril swab yardımıyla, Nutrient Agar (Merck) besiyerine ekimleri yapılmıştır. Yüzey ekimi yapılmış agar plağı üzerine, nisin içeren aktif metil selüloz filmlerden kesilen, 1 cm çaplı film diskler yerleştirilmiştir. Petri 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda, film disklerin etrafında oluşan berrak zon çapı ölçülerek değerlendirme yapılmıştır (Emiroğlu ve ark., 2010).

#### 2.2.3. İstatiksel Analizler :

Her bir deney için 3 bağımsız deneme yapılmıştır. İstatiksel analizler için SPSS 15.0 paket programı kullanılmıştır. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) denemeler arasında önem farklılıklarının karşılaştırılmasında kullanılmıştır (P<0.05) (Ye ve ark., 2008).

### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Nisin içeren metil selüloz filmlerin *L. monocytogenes*, *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* ve *Salmonella Enteritidis*' e karşı antimikrobiyal aktivitesi, inkübasyon sonrasında Nutrient Agar (Merck) plaklarında oluşan inhibisyon zon çaplarının ölçümüyle belirlenmiştir. Kontrol (nisin içermeyen), 500, 1000, 2000 ve 3000 IU/cm<sup>2</sup> aktif film oranlarda nisin içeren metil selüloz filmlerin, *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E.coli* ve *S. Enteritidis* üzerindeki antimikrobiyel etkileri sonucunda oluşan zon çapları (mm) Çizelge 1.'de gösterilmiştir. Her bir deneme için bulunan sonuçlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P<0,05$ ).

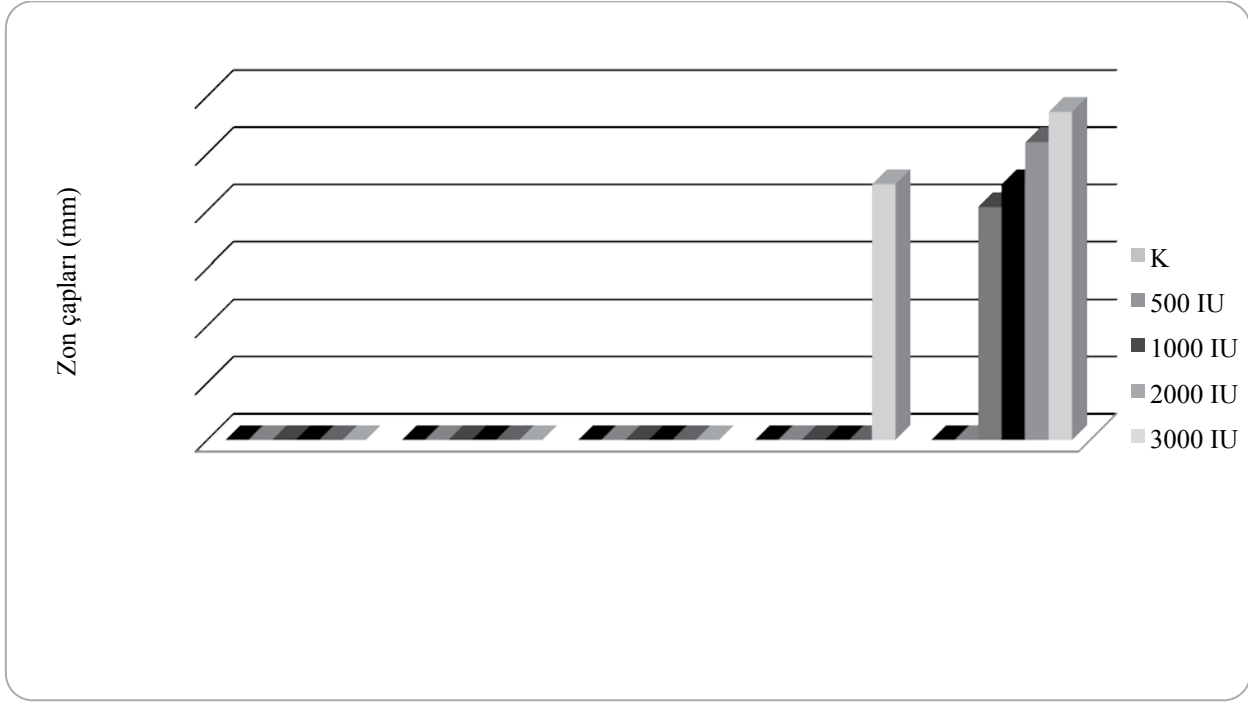
Çizelge 1. Nisin ilave edilmiş metil selüloz filmlerin çeşitli gıda patojenleri üzerindeki antimikrobiyel etkileri

Nisin (IU/cm <sup>2</sup> )	Zon çapları (mm)					Film altında üreme*
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella Enteritidis</i>	<i>E.coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	
K	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>e</sup>	+
500	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	20,33±0,47 <sup>d</sup>	-
1000	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	22,33±0,47 <sup>c</sup>	-
2000	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	26±1,00 <sup>b</sup>	-
3000	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	22,33±2,51 <sup>a</sup>	28,66±1,15 <sup>a</sup>	-

\*(+) Film altında üreme pozitif; (-) Film altında üreme negatif; a - e : aynı film örneği içindeki konsantrasyonlar arasında farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $P<0,05$ )

Agar difüzyon testi sonucunda nisin içermeyen kontrol metil selüloz filmlerin inhibisyon zonu oluşturmadığı, dolayısıyla antimikrobiyal bir etki göstermedikleri görülmüştür. Benzer şekilde nisin içeren (500, 1000, 2000 ve 3000 IU) antimikrobiyal metil selüloz filmler de *E. coli*, *B. cereus* ve *Salmonella Enteritidis*'e karşı herhangi bir antimikrobiyal etki göstermemiştir. 3000 IU/cm<sup>2</sup> film oranında nisin içeren filmlerin ise, *S. aureus* üzerinde antimikrobiyal etki göstererek, 22.33±2.51 mm çapında zon oluşturduğu belirlenmiştir. Şekil 1.'de nisin ilave edilmiş metil selüloz filmlerin çeşitli gıda patojenleri üzerindeki antimikrobiyal etkisi sonucunda oluşan zon çapları (mm) grafiksel olarak gösterilmiştir.

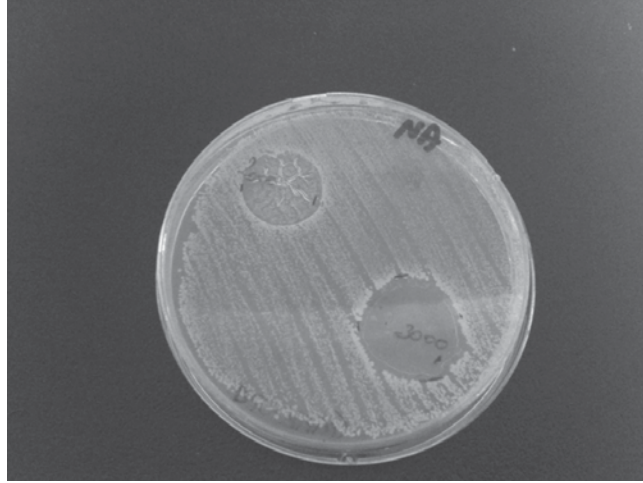
Şekil 1.'de de görüldüğü gibi, hazırlanan tüm metil selüloz filmlerin, en güçlü antimikrobiyal etkiyi *L. monocytogenes*'e karşı gösterdiği tespit edilmiştir. Bilindiği üzere nisin, Gram pozitif bakterilere karşı güçlü bir antimikrobiyal özellik sergilemektedir (Campos ve ark., 2011; Dawson ve ark., 2005). *Listeria monocytogenes*, Gram pozitif bir patojen olarak, nisin içeren metil selüloz filmlerden en çok etkilenen bakteri kültürü olmuştur. Bir diğer Gram pozitif bakteri olan *S. aureus*'un da, antimikrobiyal filmlerden etkilendiği görülmektedir. Benzer şekilde, Cooksey (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, nisin içeren hidroksimetil selüloz ve metil selüloz filmlerin *S. aureus* ve *L. monocytogenes*'in gelişimlerini önlemede, etkili olduğunu bulmuştur. Chi-zhang ve ark. ise (2004), nisin ile kombine edilmiş paketleme materyallerinin, *Listeria monocytogenes* gelişmesini önlemede önemli bir yöntem olabileceğini belirtmişlerdir. Pires ve ark. (2008) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, %50 oranında nisin ilave edilmiş selüloz polimerleri ile hazırlanan filmlerin *S. aureus* üzerinde antibakteriyel etki gösterdiği ve 27 mm'lik bir zon oluşturduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada, bir diğer Gram pozitif bakteri olan *B. cereus* ise, nisin içeren metil selüloz filmlerden etkilenmemiştir. Bu sonuçlar, zon çapının, mikroorganizmanın gelişme oranı ile antimikrobiyal maddenin besiyerine difüzyon oranına bağlı olarak değişiklik göstermesinden kaynaklanabilmektedir. Nitekim bizim çalışmamızda da elde edilen sonuçlar bu hipotezi destekler niteliktedir.



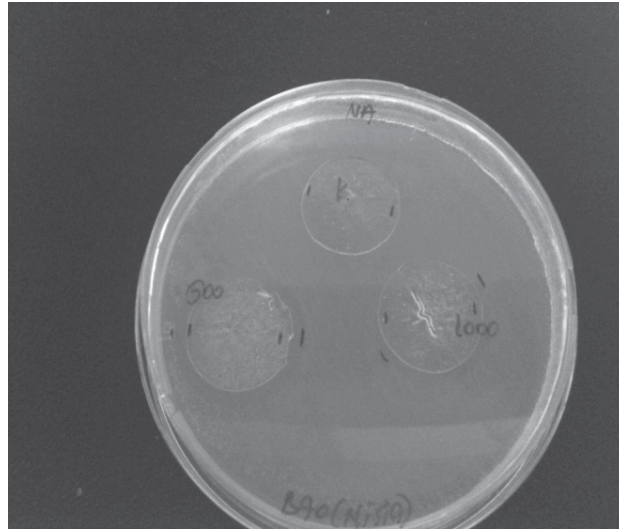
Şekil 1. Nisin içermeyen (K) ve farklı konsantrasyonlarda nisin içeren (500, 1000, 2000 ve 3000 IU) metil selüloz filmlerin oluşturduğu inhibisyon zon çapları (mm)

Mikroorganizmanın gelişme oranı ile, antimikrobiyal maddenin besiyerine difüzyon oranı, agar kompozisyonundan, filmin kimyasal yapısı ile film içerisindeki çapraz bağların oranından etkilenmektedir. Her üç Gram pozitif kültür arasındaki antimikrobiyal etki sonuçların farklılığı, nisin kültür ortamlarına eşit bir şekilde difüze olmaması ile mikroorganizmaların antimikrobiyal bileşiğe karşı farklı hassaslıklar göstermelerinden kaynaklanmıştır (Pires ve ark., 2008).

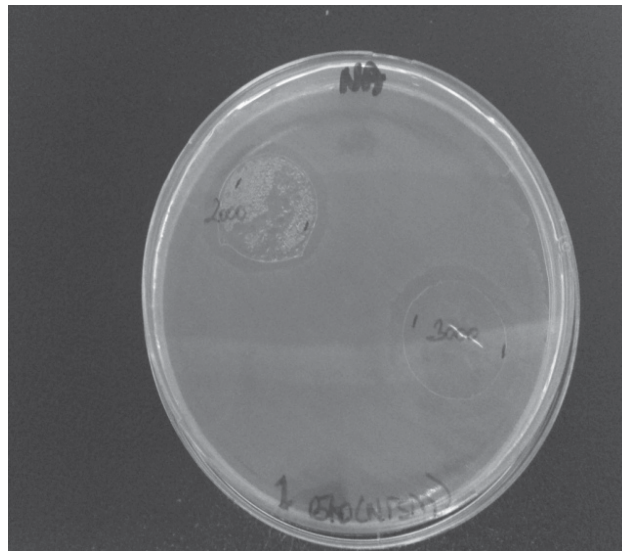
Nisinin, Gram negatif bakterilere karşı etkisiz, ya da çok az etki gösterdiği bilinmektedir (Kurt ve Zorba, 2005). Benzer bir etkiyle, bizim çalışmamızda, nisin içeren metil selüloz filmler Gram negatif olan *E. coli* ve *S. Enteritidis*'e karşı herhangi bir antimikrobiyal etki göstermemiştir. Şekil 2, 3 ve 4.'de *S. aureus* ile *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal etki gösteren nisin içeren aktif selüloz filmlerin oluşturduğu zon çapları görülmektedir.



Şekil 2. 3000 IU/cm<sup>2</sup> nisin ilave edilmiş metil selüloz filmlerin *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal etkisi



Şekil 3. Kontrol, 500 ve 1000 IU/cm<sup>2</sup> nisin ilave edilmiş metil selüloz filmlerin *Listeria monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal etkisi



Şekil 4. 2000 ve 3000 IU/cm<sup>2</sup> nisin ilave edilmiş metil selüloz filmlerin *Listeria monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal etkisi

#### 4. SONUÇ

Nisinin gıdaların korunmasında uygulanan kullanım şekillerinden birisi de, gıda yüzeyine uygulanan filmler ile olmaktadır. Bu tür antimikrobiyal özellikteki bioaktif filmler, temas ettikleri gıda yüzeyinde mikrobiyal gelişimi etkileyebilmektedir. Nisin, kullanıldığı biyofilmlerden gıda yüzeyine belli oranlarda geçerek, yüzeyde mikrobiyal gelişimi engelleyebilmektedir. Özellikle de nisinin hastalık ve ölümlere yol açan, *L. monocytogenes*'i etkin bir şekilde inaktive etmesi, et ve et ürünlerinde nisin içeren aktif filmlerin kullanımına yönelik araştırmaları teşvik etmektedir. Ayrıca nisin, antimikrobiyal olarak ürünlerde nitrit kullanımına yönelik, belli düzeylerde alternatif oluşturabilmektedir. Yapılan bu in vitro çalışma ile, nisin içeren metil selüloz yenilebilir filmlerin, antimikrobiyal özellikleri ortaya konularak gıda güvenliği açısından aktif filmlerin kullanılabilme alternatifi sunulmuştur.

#### 5. KAYNAKLAR

- Aktürkoğlu, E., Erol, İ., 1999. Beyaz Peynir Üretiminde Nisin Kullanımı ile *Listeria monocytogenes*'in İnhibisyonu. Tr. J. of Veterinary and Animal Science., 23(4):785-792.
- Ayana, B. 2007. Antimikrobiyel Yenilebilir Filmlerin Üretimi ve Özelliklerinin Belirlenmesi Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 60s., Mersin.
- Ayana, B., Turhan, N., 2010. Gıda ambalajlamasında Antimikrobiyel Madde İçeren Yenilebilir Filmler/Kaplamalar ve Uygulamaları. Gıda, 2: 151-158.
- Cao-Hoang, L., Chaine, A., Gregorie, L., Wache, Y., 2010. Potential of Nisin-Incorporated Sodium Caseinate Films to Control *Listeria* in Artificially Contaminated Cheese. Food Microbiology, 27:940-944.
- Campos, C.A., Gerschenson, L. N., Flores, S.K., 2011. Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. Food Bioprocess Technology, 4:849-875.
- Chi-Zhang Y., Yam K.L., Chikindas M. L. 2004. Effective control of *Listeria monocytogenes* by contamination of nisin formulated and slowly released into a broth system. Int. J. Food Microbiol., 90(1): 15-22.
- Clarissa Dos Santos Pires, A., Soares, N.F.F., Andrade, N.J., Silva, L.H.M., Camilloto, G.P., Bernardes, P.C., 2008. Development and Evaluation of Active Packaging for Sliced Mozzarella Preservation. Packaging Technology and Science, 21: 375-383.
- Cooksey, K. 2000. Utilization of antimicrobial packaging films for inhibition of selected microorganism. Food packaging: testing methods and applications. Ed: S.J. Risch. American Chemical Society, Washington DC, pp. 17-25.
- Cooksey, K. 2005. Effectiveness of antimicrobial food packaging materials. Food Add. and Cont., 22(10):980-987.
- Dawson, P.L., Harmon, L., Sotthibandhu, A., Han, I.Y. 2005. Antimicrobial Activity of Nisin-Absorbed Silica and Corn Starch Powders. Food Microbiology, 22: 93-99.
- Dursun, S., Erkan, N. 2009. Yenilebilir Protein Filmler ve Su Ürünlerinde Kullanımı. Journal of Fisheries Science.com., 3(4): 352-373.
- Emiroğlu Karagöz, Z., Yemiş Polat, G., Çoşkun Kodal, B., Candoğan, K. 2010. Antimicrobial Activity of Soy Edible Films Incorporated with Tyhme and Oregano Essential Oils on Fresh Ground Beef Patties. Meat Science, 86: 283-288.
- Imran, M., El-Fahmy, S., Revol-Junelles, A.M., Desorby, S. 2010. Cellulose Derivative Based Active Coatings: Effects of Nisin and Plastizer on Physico-Chemical and Antimicrobial Properties of Hidroxypropil Methylcellulose Films. Carbohydrate Polymers, 81: 219-225.
- Khairuddin, K. 2005. Study of on Antimicrobial Starch-Based Active Packaging System. University of Technology, Faculty of Chemical Engineering and Natural Resources Engineering, Department of Bioprocess Engineering. A research. 7s.
- Kurt, Ş., Zorba, Ö. 2005. Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanım Olanakları. YYÜ Vet. Fak. Derg., 16(1):77-83.
- Sanjurjo, K., Flores, S., Gerschenson, L., Jagus, R. 2006. Study of the Performance of Nisin Supported in Edible Films. Food Research Internationa., 39: 749-754.
- Skurtys, O., Acevedo, C., Pedreschi, F., Osorio, F., Agulera, J.M. 2010. Food Hydrocolloid Edible Films and Coatings. Nova Science Publishers Inc. 66p., New York, USA.
- Ye, M., Neetto, H., Chen, H. 2008. Effectiveness of Chitosan-Coated Plastic Films Intercorporating Antimicrobilas in Inhibition of *Listeria monocytogenes* on Cold-Smoked Salmon. International Journal of Food Microbiology, 127: 235-240.



## LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN TANILANMASINDA KULLANILAN BAŞLICA FENOTİPİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLER

Okta YERLİKAYA\*

### ÖZET

Sağlığa yararlı etkileri ve fermantasyon olaylarında önemli fonksiyonları olan laktik asit bakterileri gıda endüstrisinde kullanılan bakterilerin en önemlileri arasındadır. Laktik asit bakterilerinin kesin olarak tanımlanmaları teknolojik, ekolojik ve güvenlik açısından büyük önem taşımaktadır. Geleneksel tanımlama çalışmaları ile bu bakterilerin tanılanması uzun zaman almakta ve yük getirmektedir. Genetik çalışmaların hız kazanmasıyla birlikte, süt ürünlerindeki doğal laktik asit bakterilerinin moleküler yöntemler kullanarak araştırmalarına başlanmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. İyi bilinmektedir ki, doğal olarak bulunan mikroorganizmaların önemli bir kısmı geleneksel peynirlerin kendine özgü tat, aroma ve yapılarının oluşmasında büyük katkı sağlamaktadır. Bunun yanında, temel ekosistem ile ilgili mikroorganizmaların tam anlamıyla nicel ve nitel olarak belirlenmesini sağlayabilecek moleküler yöntem bulunmamaktadır. Bu nedenle, mikroorganizmaların daha nesnel tanılanması için moleküler yöntemlerin kombinasyonları uygulanmalıdır.

Bu makalede süt ürünlerindeki laktik asit bakterilerinin tanılanmasında kullanılan kültüre bağlı ve kültüre bağlı olmayan moleküler yöntemler üzerinde durulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Laktik asit bakterileri, moleküler yöntemler, bakteri tanılama, süt ürünleri, PZR

## MOLECULAR AND PHENOTYPIC METHODS FOR LACTIC ACID BACTERIA IDENTIFICATION

### ABSTRACT

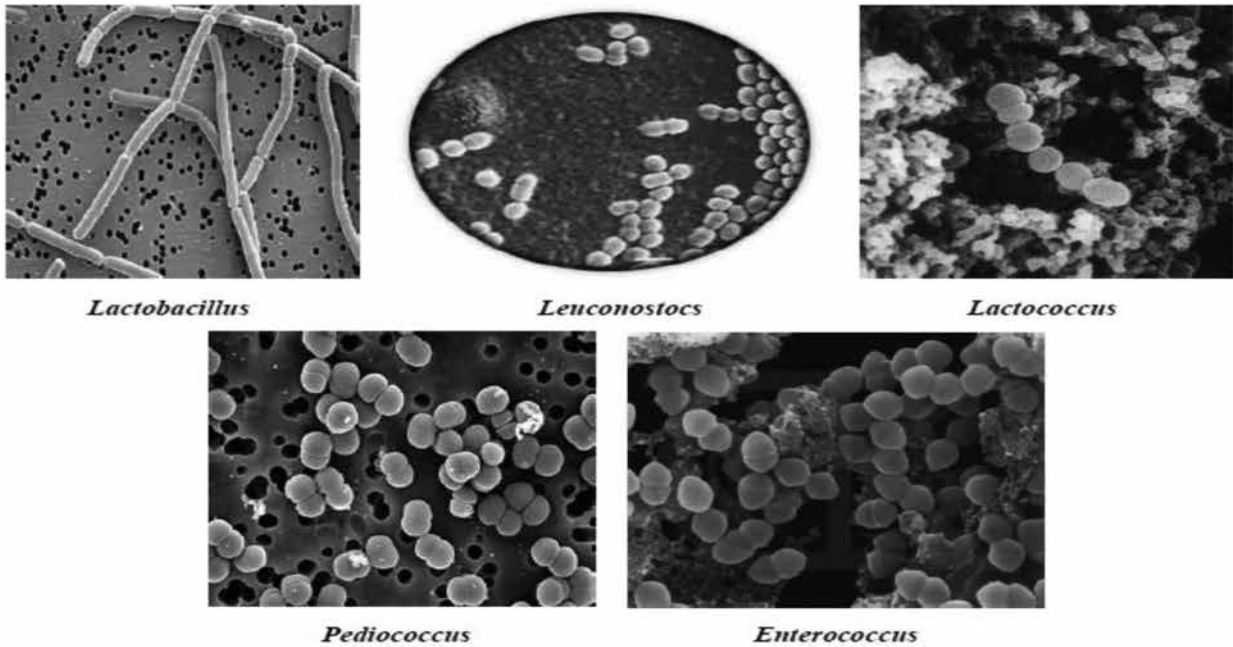
Lactic acid bacteria, that are healthy for people and have important properties for fermentation reactions, are placed into most important bacteria used in food industry. Certain identification of lactic acid bacteria plays an important role in technologic, ecologic and safety subjects. Identification of these bacteria by traditional identification studies takes longer time and it is more difficult. It is started to be researched that natural lactic acid bacteria in dairy products associated with genetic studies are getting faster, and successful results are obtained. It is well-known that an important part of microorganisms naturally found, contribute to specific flavor, aroma and texture of traditional cheeses. Furthermore there is no molecular method that could determine microorganisms which are related to main ecosystem qualitatively and quantitatively exactly. For this reason, combinations of molecular methods should apply for more objective identification of microorganisms. In this review, it was emphasized that molecular methods depends and don't depend on culture used in identification of lactic acid bacteria in dairy products.

**Key Words:** Lactic acid bacteria, molecular methods, bacteria identification, dairy products, PCR

## 1. GİRİŞ

Mikrobiyoloji bilim dalının doğuşu ile birlikte, tabiatta çok yaygın olarak bulunan laktik asit bakterileri (LAB) ile ilgili çalışmalar da başlamıştır. İlk kez 19. yüzyıl sonlarında sütte fermentasyona ve pıhtılaşmaya yol açan bakteriler laktik asit bakterileri olarak isimlendirilmiş ve daha sonraki yıllarda Lactobacillaceae familyası içinde sınıflandırılmışlardır. Morfolojik açıdan çok değişken özellik gösteren kısa ya da uzun çubuk veya kok şekilli familya üyeleri fizyolojik açıdan oldukça benzer özellik göstermektedirler. Tüm üyeler; Gram pozitif, katalaz negatif, Sporolactobacillus inulinus hariç spor oluşturmeyen, fakültatif anaerobik Pediococcus cinsi hariç yalnız tek düzlemde bölünen ve bazı istisnalar hariç hareketsiz, çubuk veya kok şeklinde bakteriler olarak tanımlanmaktadır. Mutlak fermentatifler ve asıl fermentasyon ürünü olarak laktik asit üretmektedirler. Türden türe değişimle birlikte organik asit, diasetil, hidrojen peroksit, bakteriyosin, karbondioksit, asetaldehit, etanol ve diğer metabolitleri de üretmektedirler. Doğal ortamları başta süt ve süt ürünleri olmak üzere işlenmemiş, taze veya çürümüş bitkiler, insan ve hayvanların barsak mukoza ve içerikleridir (Çon ve Gökalp, 2000; Yerlikaya ve Kesenkaş, 2009).

Peynir, yoğurt, kefir, kıymız, ayran ve probiyotik süt ürünlerinde Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Enterococcus ve Streptococcus türleri en sık kullanılan LAB arasındadır. Bazı araştırmacılar Bifidobacterium, Propionibacterium ve Brevibacterium türlerini filogenetik açıdan LAB olarak değerlendirmese de, bu türler pek çok fermente gıdanın üretiminde kullanılmaktadır. Ancak bunlardan bazıları LAB-benzeri özellikler göstermektedir (Fuller, 1989; Klaenhammer et al., 2002). Bunun yanında Enterococcus türleri özellikle pek çok geleneksel peynirlerin doğal florasını oluşturarak ürünün tat, yapı ve dokusal özelliklerine etki etmesine karşın, diğer pek çok laktik asit bakterisi gibi GRAS (genellikle güvenli kabul edilen) statüsünde değildir (Yerlikaya ve ark., 2010). Bazı laktik asit bakteri genuslarına ait mikroskopik görüntüler Şekil 1.'de verilmiştir.



Şekil 1. Bazı laktik asit bakteri genuslarına ait mikroskopik görüntüler (Doğan, 2009)

Süt ürünlerinin mikrobiyal ekosistemi çok karmaşıktır ve süt ürünlerinin tat, aroma ve yapılarının geniş bir çeşitlilik kazanmasından sorumludur. Pek çok bakteri peynir ve fermente süt ürünlerinin organoleptik kalitesinin sağlanmasında olumlu etki ederken, bunun tersine bazı bakteriler insan sağlığını tehdit edici etkiler gösterebilmektedir. Peynir üretimi büyük oranda doğal veya starter kültür olarak eklenen laktik asit bakterilerinin (LAB) fermantasyonuna dayanmaktadır (Ogier et al., 2004). Süt ürünlerinin mikroorganizma içeriği, starter ve non-starter laktik asit bakterileri, diğer bakteriler, mayalar ve ipliksi mantarlardan oluşmaktadır. Bu bakteriler peynir olgunlaşması süresince önemli rol oynamaktadır. Starter ve ikincil bakteriler peynirin fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirmekte ve peynirin aroma, tat ve yapısal karakteristiklerini büyük ölçüde etkilemektedir (Beresford et al., 2001; Jany and Barbier, 2008).

Pek çok gıdanın üretiminde kullanılan LAB'nin taksonomik farklılaşmasında, bunların fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin kolayca saptanabilmesi ve endüstriyel uygulamalarda çok önemli olduklarının ortaya konmasının rolü büyüktür. LAB'lerini tanılamada ilk olarak kullanılan karakterler; sütte ve diğer besi ortamlarına alındıklarında oluşturdukları laktik asit miktarı, minimum, optimum ve maksimum gelişme sıcaklığı, oksijene tolerans, farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme, gaz ve uçucu aroma bileşikleri üretmeleri ile pH'ya toleranstır. Bunun yanında LAB'lerinin oluşturdukları laktik asit izomerlerinin basit kitler kullanılarak saptanması da geçerli bir ölçüttür. Yine, argininden NH<sub>3</sub> oluşumu, eskülünü hidrolize etme yetenekleri, safra tuzlarına direnç gibi özelliklerden de yararlanılmaktadır (Kılıç, 2008).

Moleküler yöntemler çevresel örnekler, gıdalar ve diğer karmaşık ekosistemde bulunan mikroorganizmaların saptanması, tanılanması ve karakterize edilmesi için kullanılan araçlardır. Son on yıldır, gıda mikrobiyolojisi uygulamaları arasına giren kültüre bağlı moleküler yöntemlerin uygulanması önceden ekimi yapılmayan örnekten toplam mikrobiyal DNA'nın izolasyonuna ve 16S rRNA geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile çoğaltılmasına dayanmaktadır. Belirtilmelidir ki kültüre bağlı veya kültüre bağlı olmayan moleküler yöntemler, sadece bakteriyel DNA'nın direk örnekten veya kültür ortamındaki bakteri kolonisinden alınıp alınmadığına bağlı olarak uygulanabilmektedir. İyi bilinmektedir ki, geleneksel kültüre alma karmaşık çevrenin tüm mikrobiyal çeşitliliğini içermemektedir (Giraffa and Neviani, 2001; Rantsiou et al., 2004; Ben Amor et al., 2007; Hovda, 2007). Geleneksel peynirlerin tipik duyu özellikleri geleneksel peynir yapım uygulamaları, süt hayvanlarının beslenmesi ve mikrobiyal toplumun çeşitlilik ve etkinliğine bağlı olmaktadır. Peynir mikroflorasının kalitatif ve kantitatif bileşimi ve aktivitesi olgunlaşma boyunca duyu özelliklerinin gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (Duthoit et al., 2003).

Süt ve ürünlerinin mikrobiyal ekosisteminin çeşitliliği ve canlılığı ile ilgili çalışmalar her geçen gün artmakta, DNA (veya RNA)'nın herhangi bir kültürasyon kullanmadan direk analizine dayanan kültüre bağlı olmayan yöntemlere eğilim artmaktadır. Temel olarak, bu yöntemler toplam bakteriyel DNA ve/veya RNA'nın örnekten direk olarak ekstraksiyonu ve PZR ile çoğaltılmasını kapsamaktadır. Mikrobiyal yoğunluk çalışmalarında primer, gen ve/veya çeşitli 16S rRNA gen bölgelerinin pek çok kombinasyonunun geniş ölçüde kullanıldığı konusunda pek çok çalışma yayınlanmıştır. Amplifikasyon teknikleri kullanılarak sentezlenmiş DNA dizileri, jel veya kapiler elektroforez ile veya hibridize edilerek özel problemlere ayrılabilir (Jany and Barbier, 2008; Randazzo et al., 2009). Bu çalışmada süt ürünlerinde bulunan laktik asit bakterilerinin tanılanmasında kullanılan kültüre bağlı olmayan moleküler yaklaşımlar özetlenmiştir.

## **2. LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN TANILANMASINDA KULLANILAN FENOTİPİK VE GENOTİPİK YÖNTEMLER**

Genelde, fenotipik bakteri tanımlama yöntemleri genotipik yöntemlere nazaran daha ucuzdur. Pek çok fenotipik tanımlama çalışması API (BioMérieux), BIOLOG, Enterotube (Roche), Phoenix (BD), MicroScan (Dade Behring) veya CRYSTAL Api (BBL) gibi minyatüre edilmiş tanımlama kitleri ile gerçekleştirilmektedir. Fenotipik tekniklerin bazı LAB için kullanışlı olduğu düşünülse de, sonuçların benzer genotip gösteren türler arasında hatalı sonuç verdiği iddia edilmektedir. Otomatize tanılamalar hızlı, yüksek doğrulukta, tekrarlanabilir tanımlama yaparlar ve daha az teknik iş gücü gerektirirler. Pahalı olması, bakteri morfolojisini önceden bilmenin gerekliliği, çok uygun yoğunlukta bakteri süspansiyonu hazırlama zorunluluğu, biyokimyasal özellikleri yakın benzerlik gösteren türlerin identifiye edilerek birbirinden ayrılmasının zorluğu gibi dezavantajları da vardır. Bu nedenle, genotipik tanımlama yöntemlerinin kullanılması daha doğru sınıflandırma ve ayırım sağlamak amacıyla



uygun görülmektedir (McCartney, 2002).

## 2.1. FENOTİPİK TANILAMA YÖNTEMLERİ

Özellikle endüstriyel veya uygulamalı mikrobiyoloji birimlerinde, gıda kaynaklı LAB'lerinin tanınmasında fenotipik testler hala kullanılmaktadır. Bu yöntemler morfolojik ve fizyolojik karakterizasyon, karbonhidrat fermentasyon testleri ve protein profillerinin belirlenmesini kapsamaktadır. Gıda teknolojisinde yaygın olarak kullanılan laktik asit bakterilerinin fenotipik özellikleri Şekil2, 3 ve 4'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

	Farklı Sıcaklıkta Gelişme (°C)				Glukoz'dan CO <sub>2</sub>	Litmus sıtfe gelişme	Laktoz	Frktöz	Galaktöz	Maltoz	Sakkaröz	Salisin	Mannitol	Melibioz	Raffinoz	Sorbitol	Arabinöz	Amigdalın	Sellobioz	Trehaloz	Esculin hidrolizi	Arginin'den NH <sub>3</sub>
	10	15	37	45																		
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	-	-	?	+	-	?	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	?	-	?	+	-	?	-	+	-	d	+	-	-	-	+	-	-	-	d/+	d	-	d/-
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	-	-	?	+	-	?	+	+	d/+	+	+	+	-	-	-	+/-	-	+/-	d/-	+	+/-	-
<i>Lb. helveticus</i>	-	-	?	+	-	?	+	+	+	d/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d/±	-	-
<i>Lb. acidophilus</i>	?	-	?	+	-	?	+	+	+	+	+	+	-	d	d	+	?	+	+	d	+	-
<i>Lb. johnsonii</i>	?	+	?	+	?	?	d	+	+	+	+	-	d	d	?	?	+	+	+	d	+	?
<i>Lb. gallinarum</i>	?	+	?	+	?	?	d	+	+	+	+	-	+	+	?	?	+	+	-	+	+	?
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhannosus</i>	?	+	?	+	-	?	+	+	+	±/+	+/-	+	+	-	-	+	d/-	+	+	+	+	-
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	?	+	?	d/-	-	?	+/-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	d/+	+	+	+	?

+: suşların %90'ından çoğu pozitif; -: suşların %90'ından çoğu negatif; d: %11-89'u pozitif; ±: %10 ile 90arası pozitif; +/-: bazı literatürlerde pozitif, bazı literatürlerde negatif olarak geçiyor; w: zayıf fermentasyon; d/+: bazı literatürlerde d, bazı literatürlerde pozitif olarak geçiyor; d/-: bazı literatürlerde d, bazı literatürlerde negatif olarak geçiyor; ?: herhangi bir bilgiye rastlanmadı.

Şekil 2. *Lactobacillus* türlerinin fenotipik özellikleri (Güley, 2008)

	Farklı Sıcaklıkta Gelişme (°C)				Glukoz'dan CO <sub>2</sub>	Litmus sıtfe gelişme	Laktoz	Frktöz	Galaktöz	Maltoz	Sakkaröz	Salisin	Mannitol	Melibioz	Raffinoz	Sorbitol	Arabinöz	Amigdalın	Sellobioz	Trehaloz	Esculin hidrolizi	Arginin'den NH <sub>3</sub>
	10	15	37	45																		
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i>	?	+	?	±/-	-	?	+/-	+	+	+	+/-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
<i>Lb. plantarum</i>	+	+	?	-	-	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Lb. brevis</i>	?	+	?	-	+	?	-	?	-	±	-	w	+	-	-	+	-	-	-	±	±	+
<i>Lb. buchneri</i>	?	+	?	±	+	?	?	?	d	+	d	?	?	+	d/+	-	+	-	-	-	d	+
<i>Lb. kefir</i>	?	+	?	-	+	?	±	?	±	±/+	-	-	-	±/+	-	-	d/+	?	-	-	-	+
<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>mesent</i>	+	?	d/+	-	d/+	R A C d ++	±/+	+	+	+	+	+/-	d/-	d/+	d/+	-	+/-	d	d/+	+	±/+	-
<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	+	?	+	-	d/+	R A C d ++	+ <sup>w</sup>	+	d/+	+	+	±/-	d/-	d/-	d/-	-	-	d	d/-	+	d/-	-
<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	+	?	-	-	+/-	R A C - ±	+ <sup>w</sup>	-	+ <sup>w</sup>	d/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leu. lactis</i>	+	?	+	-	d/+	R A C d ++	+	+	+	+	+	±	-	+	±	-	-	-	-	-	-	-

+: suşların %90'ından çoğu pozitif; -: suşların %90'ından çoğu negatif; d: %11-89'u pozitif; ±: %10 ile 90arası pozitif; +/-: bazı literatürlerde pozitif, bazı literatürlerde negatif olarak geçiyor; w: zayıf fermentasyon; d/+: bazı literatürlerde d, bazı literatürlerde pozitif olarak geçiyor; d/-: bazı literatürlerde d, bazı literatürlerde negatif olarak geçiyor; ?: herhangi bir bilgiye rastlanmadı.

Şekil 3. *Lactobacillus* ve *Leuconostoc* türlerinin fenotipik özellikleri (Güley, 2008)

	Farklı sıcaklıkta gelişme			Eskulin hidrolizi	Arginin'den NH <sub>3</sub>	% 2 NaCl	% 4 NaCl	% 6.5 NaCl	pH 9.6'da gelişme	Laktöz	Früktöz	Galaktöz	Maltoz	Melhitöz	Salisin	Sakkaroz	Sorbitol	Rafinöz	Arabinöz
	10 °C	40 °C	45°C																
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>	+	+	-	+	+	+	+	-	?	+	?	?	+	?	+	-	-	+	-
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	d	d/-	d	-	d/+	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D+	+	+	+	+	+

+: suşların %90'ından çoğu pozitif; -: suşların %90'ından çoğu negatif; d: %11-89'u pozitif; =: %10 ile 90arası pozitif; +/- : bazı literatürlerde pozitif, bazı literatürlerde negatif olarak geçiyor; w: zayıf fermentasyon; d/+: bazı literatürlerde d, bazı literatürlerde pozitif olarak geçiyor; d/- : bazı literatürlerde d, bazı literatürlerde negatif olarak geçiyor; D+: Genellikle pozitif ? : herhangi bir bilgiye rastlanmadı

Şekil 4. *Lactococcus* ve *Enterococcus* türlerinin fenotipik özellikleri (Güley, 2008)

Gonzalez et al. (2000) balık ve tatlı su kaynaklarından 249 adet LAB izolatını 44 morfolojik ve fizyolojik test kullanarak tanılamışlardır. Ancak bu izolatların büyük kısmı (%90) yalnızca genus düzeyinde tanılanmıştır. Tuncer (2009) Türk Tulum Peynirlerinden 39 adet enterokok türü izole etmiş ve bunları geleneksel fenotipik yöntemlerle tanılamıştır. Çalışma sonucunda türlerin dağılımını *Enterococcus faecium* (%43.58), *Enterococcus faecalis* (%28.21) ve *Enterococcus durans* (%28.21) olarak saptamıştır. Şanlıbaba ve Akçelik (2000) çiğ süt ve peynir altı suyundan izole ettikleri 73 adet bakterinin tanılamasını geleneksel yöntemlerle gerçekleştirmiş, çalışma sonucunda laktokok izolatlarının 50 adedinin *L. lactis* subsp. *lactis*, 7 adedinin *L. lactis* subsp. *diacetylactis* ve 16 adedinin de *L. lactis* subsp. *cremoris* suşu olduğu saptanmıştır. Sağdıç ve ark. (2002) 20 farklı tereyağı örneğinden 55 adet LAB izole etmişler ve yaptıkları geleneksel tanılama çalışması sonucunda bu türleri *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* (%21.2), *Streptococcus* sp. (%4.7), *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (%20), *Lactobacillus casei* ssp. *casei* (%15.3), *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (%2.3), *Enterococcus faecium* (%18.8), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*) (%7.1), *Leuconostoc gelidum* (*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*) (%4.7) and *Weissella paramesenteroides* (*Leuconostoc paramesenteroides*) (%5.9) olarak tanılamışlardır.

Genellikle, bu fizyolojik testler ticari uygun sistemler kullanılarak belirlenen karbonhidrat fermentasyon desenleri ile kombine edilmektedir. Corsetti et al. (2001) ekşi maya örneklerinden izole ettiği 317 adet muhtemel LAB'nin morfolojik ve fizyolojik özelliklerini incelemiş daha sonra ticari API50CHL (BioMérieux, Fransa) sistem kullanarak tanılamışlardır. Buna rağmen, izolatların yalnızca % 38'i tür seviyesinde tanımlanabilmiştir. Benzer şekilde Uganda geleneksel fermente süt içeceğinden izole edilen 113 LAB kesin olmayan tür seviyesinde tanılanmıştır (Muyanja et al., 2003). Yine iki adet kombine karbonhidrat fermentasyonu test kitinin kullanımı 14 LAB izolatını tür olarak ayıramamıştır (Wijtzes et al., 1997). Akpınar et al. (2011) çeşitli geleneksel türk yoğurtlarından 208 adet LAB izole etmiş, fenotipik tanılama yöntemleri, API test kitleri ve Vitek 2 kompakt sistem (BioMérieux, Fransa) kombinasyonu kullanarak bunlardan yalnızca 41 tanesini tür düzeyinde tanımlayabilmiştir. Danova et al. (2005) kırmızıdan izole ettikleri bakterileri API50CHL kiti kullanarak *L. salivarius*, *L. buchneri* ve *L. plantarum* olarak tanılamışlardır. Bu çalışmalar fenotipik tanılama yöntemlerinin zayıf tekrar edilebilirlik ve düşük taksonomik ayırma özelliği nedeniyle daha çok genus seviyesinde tanılanabildiğini göstermektedir.

Protein karışımlarını analiz etmede kullanılan SDS-PAGE, poliakrilamid jel elektroforezinin değişik bir uygulama şeklidir. Bu yöntem protein moleküllerinin büyüklüklerine göre ayrılması prensibine dayalı bir yöntem olduğu için, yöntemden proteinlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesi amacıyla da yararlanılabilmektedir. Proteinler amfoter bileşiklerdir ve net yükleri ortamın pH'sına bağlıdır. Bir çözeltide pH proteinin izoelektrik

noktasından yüksek ise, proteinin net yükü negatiftir ve elektrik alanı altında anoda doğru, çözelti pH'sı proteinin izoelektrik noktasından düşük ise net yük pozitif olacak ve protein katoda doğru hareket edecektir.

Proteinin net yükü molekül yapısına ve molekül büyüklüğüne bağlı olarak değişmektedir. SDS (CH<sub>3</sub>(-CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-CHOSO-Na<sup>+</sup>) anyonik bir deterjandır ve polipeptit omurgasının etrafını sararak proteini denatüre etmektedir. Proteinlere bağlanırken seçici olmayan SDS, polipeptide negatif yük sağlamaktadır. SDS-PAGE uygulanacak örnekler, β-merkaptoetanol ve SDS içeren tamponda 5 dakika kaynar su banyosunda ısıl işleme tabi tutulmaktadır. Böylece proteinler denatürasyona uğratarak disülfid bağlarının kırılması sağlanır. Karışımdaki her protein bu şekilde SDS molekülleriyle bağlı zincir şeklinde bir polipeptide dönüşmektedir. Bundan sonra proteinlerin elektrik alanı etkisi altında toplanmasını sağlayan çok geniş gözeneklere sahip olan “ön ayırıcı jel” ve bunun hemen ardından da daha küçük gözenek çapları olan ve proteinlerin ayrılmasını sağlayan “ayırıcı jel”de, protein-SDS bileşiklerinin anoda doğru hareket etmesi elektrik alanı altında sağlanmaktadır. Buna göre de, denatüre edilmiş proteinler elektrik yüklerine göre değil yalnızca molekül ağırlıklarına göre ayrılmaktadır (Yılmaz ve Temiz, 2003).

Tam hücre proteinlerinin Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) analizinin LAB'lerinin tanımlanmasında daha güvenilir bir tanımlama yöntemi olduğu ispat edilmiştir (Pot et al., 1994). Leisner et al. (2001) Malezya baharatlarından 64 adet LAB izole etmiş ve protein profillerini inceleyerek başarılı bir şekilde tür seviyesinde tanımlama yapmıştır. Daha sonraki yıllarda, probiyotik ürün kaynaklı 355 adet izolat SDS-PAGE yöntemi kullanılarak tanısı yapılmıştır (Temmerman et al., 2003a). Yüksekdağ ve Beyatlı (2009) kefir, beyaz peynir, kasar peyniri ve sucuktan toplam 36 adet laktik asit bakterisi izole edilmiştir. İzole edilen kültürler biyokimyasal testler ve API 50 CH kiti ile tanımlanmış ve toplam protein profilleri Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ile belirlenmiştir. Tanımlama testleri sonucunda 36 adet laktik asit bakterisi, *Leuconostoc cremoris* (1 suş), *Leu. mesenteroides* (1 suş), *Lb. brevis* (1 suş), *Lb. casei* (2 suş), *Lb. lactis* (2 suş), *Lb. plantarum* (2 suş), *Lb. helveticus* (3 suş), *Lactococcus cremoris* (3 suş), *Lc. lactis* (3 suş), *Streptococcus durans* (1 suş), *Str. thermophilus* (2 suş), *Pediococcus acidilactici* (2 suş), *P. pentosaceus* (4 suş) ve *P. dextrinicus* (9 suş) olarak tanımlanmıştır.

Yine proteinlerin SDS-PAGE analizi yapıldığında *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. johnsonii*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. pentosus* ve *L. parapantarum* gibi türlerin tanımlanmasında başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Gancheva et al. 1999; Torriani et al., 2001).

Osmanağaoğlu (2007) hazır gıdalardan ve çeşitli kültür koleksiyonlarından temin edilen 88 adet farklı LAB'ini jel elektrofrezisi ile pilazmid DNA'larının analizi ve SDS-PAGE ile hücre duvarı protein profillerinin analizini gerçekleştirmiş, fizyolojik, biyokimyasal/metabolik ve morfolojik testler üzerine kurulmuş olan geleneksel fenotipik tanımlama yöntemleri ile desteklenmiştir. Bu bağlamda hücre duvarı proteinlerinin SDS-PAGE'yi birçok tür içeren fazla sayıda LAB izolatlarının tanımlanmasında kolay, oldukça hızlı ve güvenilir olduğu saptanmıştır.

Söz konusu yöntemlerin yanında LAB'lerinin tanımlanmasında organik asitlerin ince tabaka kromatografisi ve Yağ Asidi Metil Ester (FAME) analizi gibi diğer bazı fenotipik yöntemler de kullanılmaktadır (Lee et al., 2001). LAB'lerinin tür düzeyinde güvenilir bir şekilde tanımlanması için çoklu fenotipik teknikler sıklıkla kombine halde kullanılmaktadır. Böylece, bir yöntemde görülen eksiklik diğer yöntemin güçlü özellikleri ile telafi edilebilmektedir.

Ancak, pek çok laktik asit bakterisi benzer besinsel ihtiyaçlara sahip olup benzer çevresel şartlarda gelişim gösterdiklerinden tanımlanmalarında kullanılan geleneksel yöntemler oldukça zaman alıcı ve ayırım güçlerindeki yetersizliklerinden dolayı şüphe uyandırmaktadır. Bununla birlikte büyüme koşulları hücre morfolojisini etkileyebilmekte ve bazı durumlarda genus düzeyinde tanımlama yaparken bile zorluk yaratmaktadır. Bundan dolayı LAB'lerinin genus ve tür bazında tanımlanmasında kullanılan fenotipik ve biyokimyasal özelliklere dayalı yöntemlerin kullanımı genellikle yanlış sonuçların elde edilmesine sebep olabilmektedir (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011).

## 2.2. MOLEKÜLER (GENOTİPİK) TANILAMA YÖNTEMLERİ

### 2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR: Polymerase Chain Reaction) :

Başarılı bir polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli moleküler yaklaşım için öncelikle toplam bakteri DNA'sının bir örnekten etkili bir şekilde önceden direk ekstraksiyonu gereklidir. Toplam bakteri DNA ekstraksiyonu ve saflaştırılması pek çok protokol kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Hangi ekstraksiyon protokolü kullanılacak ise karmaşık matrisde bulunan tüm bakterilerin DNA'sı toplanmayabilir veya örnekte bulunan tüm bakterilerin DNA'larının ekstraksiyonu aynı derecede verimli olmayabilir. Bu nedenle, PCR amplifikasyonu örnekte bulunan tüm laktik asit bakterinin amplikonlarının (klonlanmış ve PCR ile çoğaltılmış bir DNA dizisi) elde edilememesiyle sonuçlanabilmektedir.

Ek olarak, bazı genotipler örnekteki düşük tür zenginliği nedeniyle fark edilmeden aynen kalabilmektedir. Bu durumun görülmesi, incelenen örneğin yetersiz homojenizasyonu, tamamlanmamış hücre lizisi (hücre çözünmesi) ve nükleik asit salınımının engellenmesi ya da PCR ürünlerinin inhibe edilmesi nedeniyle olabilmektedir. Ayrıca, mikrobiyal topluluktan moleküler tanılama için kritik bir aşama da, çok çeşitli organizmaların ayırt edilmesinde PCR'da amplifikasyon için kullanılacak bir gen veya genetik markör'ün seçimidir. Günümüzde, bakteriyel 16S ribozomal RNA kalıt bölgesi (operon), kuşatan 16S rRNA ve 23S rRNA genleri, mikrobiyal ekoloji çalışmalarında moleküler markör olarak çok sık kullanılmaktadır (Justé et al., 2008).

Bununla beraber, 16S rRNA geni yakın ilişkili türlerin tanılanmasında güçlükler göstermektedir. Bu nedenle, LAB türlerinin ayırımında elongasyon (uzatma) faktörü, Tu geni, rpoB geni, rpoA geni, DNA rekombinaz geni (RecA) ve pheS geni gibi diğer hedef genlerden faydalanılmaktadır (Randazzo et al., 2009; Naser et al., 2005; Justé et al., 2008).

Çeşitli gıda ürünüde bulunan LAB'nin genus, tür, veya suş düzeyinde spesifik olarak saptanmasında kullanılan en hızlı PCR yaklaşımı örnekten ekstrakte edilen toplam bakteriyel DNA'sında hedef organizmaların PCR temelli saptanması için özel primerlerin kullanılmasıdır. Temel dezavantajı ise yalnızca örnekte olması beklenen mikroorganizmaların saptanabilmesidir. Bu nedenle, bazı PCR analizleri geleneksel peynirler gibi karmaşık mikrobiyal ekosistemlerin analizinde sınırlı olmaktadır. Bazı yaklaşımlar ise süt ürünlerinde bulunabilecek her bakteri türü için özel primer eşleşmesi gerektirdiğinden çok nadir kullanılmaktadır. Bununla beraber, hedeflenen türlerin varlığının ve kesin tanılanmasının onaylanması için yardımcı yaklaşımlar da bulunmaktadır (Ogier et al., 2004; El-Baradei et al., 2007).

Geleneksel Mısır Domiati Peyniri'nde bakteriyel ekosistemin biyo-çeşitliliği kalıp DNA olarak peynirden direkt olarak ekstrakte edilen DNA kullanımı türe özgü PZR kullanımıyla araştırılmıştır. Peynirdeki bakteriyel türlerin onaylanmasında otuz bir türe özgü primer kullanılmıştır. Araştırmada, türe özgü PCR tekniği kullanılarak pek çok *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Staphylococcus* genusu temsilcisi saptanmıştır (El-Baradei et al., 2007). Bununla birlikte, bazı kültüre bağlı olmayan PZR yaklaşımları yaygın bakteri primerleri kullanılan yöntemlerden daha fazla emek istemektedir. Yine de, bazı yaklaşımlar diğer kültüre bağlı yaklaşımların eksiklerinden biri olan her küçük LAB topluluğu üyesini tanımlayabilmektedir.

### 2.2.2. PCR - Denatüre Gradiyen Jel Elektroforezi (PCR-DGGE: PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) ve PCR - Zamansal Sıcaklık Gradyent Elektroforezi (PCR-TTGE: PCR- Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) :

Denatüre gradiyen jel elektroforezi (DGGE) farklı işletme koşullarında mikroorganizma popülasyonunda meydana gelen değişimleri izlemek amacıyla kullanılan bir tekniktir. Mikrobiyal tür tayininde, kültürden izole edilen 16SrRNA örneği, birleştirilmiş zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile çoğaltılmakta ve RNA profili belirlenerek karışık kültürün hangi bakterilerden oluştuğu belirlenmektedir. Dizi analizi öncesi tür farklılıkları, (DGGE) tekniği ile Guanin (G) ve Sitozin (C) içeriğine göre tespit edilmektedir. DGGE analizinde denatüre madde (formamit ve üre karışımı), poliakrilamid jellerdeki yarı erimiş, çift sarmallı DNA moleküllerinin elektroforetik hareketine bağlıdır. Mevcut çalışmalarda bu deneyden faydalanılarak türlerin zamana bağlı değişimleri gözlemlenmektedir (Özkaya ve Demir, 2011).

Türlerin birbirinden ayırt edilmesi için klasik PCR ile 16S rRNA genlerinin çoğaltılmasından sonra, DGGE analiziyle türler birbirinden ayırt edilmektedir. Dizi analizi için seçilecek klonların miktarı PCR ve DGGE analizleri sonunda tespit edilmektedir. PCR ya da DGGE jellerinde görüntülenen bandlar, uygun saflaştırma

kitleri kullanılarak saflaştırılmakta, bu ürünler daha sonra “dye terminator cycle sequencing” reaksiyonuna sokularak floresan işaretli parçaların amplifikasyonları gerçekleştirilmektedir. Elde edilen ürün saflaştırılmakta ve formamid çözeltisi içinde süspansiyon edilmiştir. Kapiler elektroforez tekniği ile çalışan cihazdan elde edilen dizi analizi verileri, A-G-C-T dizin dosyaları biçiminde kopyalanarak, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> internet sitesinde BLAST programında değerlendirmeye alınmakta ve bu veri tabanında tanımlanmış mevcut türlerle olan muhtemel farklılıklar raporlanmaktadır (Özkaya ve Demir, 2011).

TTGE tekniği ise, DGGE tekniğine benzemekle birlikte denatüre edici gradiyent jelleri kullanılmadan gerçekleştirildiğinden bu yöntemin daha basit, hızlı ve kolay tekrarlanabilir olmasını sağlamaktadır (Yoshino et al. 1991). Çoğaltılan DNA, üre içeren poliakrilamid jel üzerine yerleştirilmektedir. Elektroforez süresince, sıcaklık yavaş yavaş ve düzenli olarak arttırılmaktadır. Sonuçta elektroforez süresince linear bir sıcaklık gradiyeni elde edilir. Denatüre ortam jeldeki üre konsantrasyonuna göre hal almaktadır.

Süt ürünlerinin mikrobiyal yoğunluk ve hareketlerin kültüre bağlı olmayan PCR-DGGE/TTGE moleküller yöntemleri kullanılarak incelenmesi için; genomik bakteriyel DNA ve/veya RNA, örnekten direkt olarak izole edilmeli ve çeşitli 16S gen bölgelerinin çoğaltılması gerekmektedir (Flórez and Mayo, 2006; Rantsiou et al., 2008). Mikrobiyal ekolojide PCR-DGGE tekniğinin kullanımı Muyzer ve ark. (2004) tarafından ortaya konmuştur. Pek çok araştırmacı birçok laboratuvarında mikrobiyal yoğunluğun araştırılmasında uygun bir teknik olarak bu tekniği kullanmaktadır. PCR-DGGE genellikle kültivasyona gerek kalmadan mikrobiyal topluluğun yapısının incelenmesinde kullanılmaktadır (Muyzer and Smalla, 1998; Ercolini, 2004).

PCR-DGGE/TTGE tekniği kullanılarak süt ürünlerinde bulunan mikroorganizma çeşitliliği ve yoğunluğu pek çok araştırmacı tarafından çalışılmıştır. Bazı çalışmalarda, belirtilmektedir ki farklı peynir çeşitlerinin mikroflorası peynir yapım teknolojilerinden etkilendiğinden dolayı kendine özgüdür ve birbirinden bağımsız özellikler gösterebilmektedir. Üstelik farklı bölgelerde üretilen aynı tip peynirlerin de farklı mikrobiyolojik kompozisyon gösterdiği de tespit edilmiştir. Ayrıca, herhangi bir peynirin tüm mikroflora karakteristiğinin ortaya çıkarılmasında evrensel moleküler yaklaşım da bulunmamaktadır. Son çalışmalar yalnızca geleneksel peynirlerin mikrobiyal yoğunluk ve dinamiğini belirlemede çok aşamalı yaklaşımları incelemek gerektiğini doğrulamaktadır ve farklı LAB türlerinin belirlenmesinde kullanılan farklı yöntem tekniklerini vurgulamaktadır (Aponte et al., 2008; Randazzo et al., 2009). 16S rRNA geninin farklı değişken gen bölgelerinin amplifikasyonu ve/veya 16S rRNA geninin aynı değişken gen bölgelerinin farklı genel bakteri primerleri ile eşleşmesi farklı sonuçlar verebilmektedir. Buna ek olarak, farklı DGGE şartları PCR ampikonunun (klonlanmış ve PCR ile çoğaltılmış bir DNA dizisi) ayrımının farklı kararlılık göstermesiyle sonuçlanabilmektedir.

Stilton peynirinin bakteriyel popülasyonu üzerine yapılan bir çalışma *Leuconostoc* topluluğunun temsil edilmesi için yalnızca 16S rRNA geninin V4-V5 bölgesinin amplifikasyonunun saptanmasının yeterli olduğunu, V3 bölgesinin ise başarısız olduğunu ortaya çıkarmıştır (Ercolini et al., 2003). Benzer sonuçlar Provolone del Monaco peynirinin mikroorganizma yoğunluğu ve hareketi üzerine yapılan çalışmada da V3 gen bölgesi yerine V6-V8 bölgelerinin amplifikasyonunun daha yüksek mikrobiyal yoğunluk gösterdiğini ortaya konmuştur (Aponte et al., 2008). Peynirin enterokokal popülasyonunun DGGE’de analizinde farklı primer çiftleri kullanıldığında önemli bir farklılık gözlemlenmiştir. Bu durum başarılı bir DGGE analizi için uygun primer çifti seçiminin kritik bir aşama olduğunu göstermiştir (Mohar Lorbeget et al., 2009). Karışık mikrobiyal bir toplulukta türlerin tamamının saptanması DGGE yönteminin bir diğer zorluğudur. Şöyle ki, popülasyonun düşük oranını oluşturan türler kolaylıkla saptanamaz (Muyzar et al., 1993).

Çok sık, karışık popülasyondan bazı türlerin konsantrasyonları 104 CFU/g seviyesinden düşük olduğunda PCR-DGGE yöntemiyle tanınamaz (Cocolin et al., 2001; Fontana et al., 2005). Bununla beraber, bu durum diğer primerler PCR amplifikasyon aşamasında uygulandığında doğru olamaz. DGGE analizinde saptama sınırı türlere ve belki de suşların dikkate alınmasına bağlıdır. Yine de, kültüre bağımsız PCR-DGGE yönteminin hassasiyet sorunu genel bakteri primerlerinin yerine grup (genus)’lara özgü özel primerlerin kullanımıyla geliştirilebilmektedir ve bu yolla küçük topluluklar da saptanabilmektedir (Coeuret et al., 2003; Ben Amor et al., 2007).

Ogier et al. (2002) bazı süt ürünlerinde bulunan *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* ve *Staphylococcus* genuslarının tanımlanmasında TTGE tekniğini kullanmışlardır. Yöntem bakterilerin düşük Guanin-Sitozin yapılı genomların 16S rDNA V3 bölgelerindeki farklılıklara da-

yandırılarak optimize edilmiş, sonuç olarak TTGE'nin süt ürünlerinde bilinmeyen ekosistemlerin bakteri florasının belirlenmesinde kullanılabileceğini ortaya koymuştur. TTGE için saptama sınırı azınlık türlerin 1:100 veya daha az toplam DNA konsantrasyonu bulunduğu gözlemlenmektedir. Türlerin TTGE ile saptanması, hem düşük DNA konsantrasyonlarında hem de toplam DNA konsantrasyonu varlığında kısıtlı olabilmektedir. Toplam ekstrakte edilen DNA'daki dominant türlerin DNA'ları tarafından PCR primerleri için rekabet, TTGE duyarlılığı için sınırlayıcı bir faktördür (Ogier et al., 2002; Henri-Dubernet et al., 2004). Geleneksel peynirlerin metabolik olarak aktif mikroflorasını ortaya çıkarmak için bazı yazarlar ters-transkripsiyonlu (RT) RNA üzerinde analizler uygulamışlardır. RT-PCR-DGGE (RNA temelli) ve PCR-DGGE (DNA temelli) kombine kullanımı toplam mikroflora çeşitliliğinden metabolik aktif bileşenlerin ayırt edilmesine olanak sağlamıştır (Flórez and Mayo, 2006; El-Baradei et al., 2007; Jany and Barbier, 2008; Rantsiou et al., 2008).

RNA temelli DGGE profili DNA temelli DGGE profili ile karşılaştırıldığında yöresel Sicilya peynirinin olgunlaşması süresince mikrobiyal grupların saptanması için oldukça yüksek derecede metabolik aktivite belirlenmiştir (Randazzo et al., 2002). Bu nedenle, RT-PCR-DGGE yaklaşımı farklı olgunlaşma periyotlarında farklı mikrobiyal grupların aktif olabilmesinden dolayı uzun süre olgunlaştırılan peynirler konusunda yapılan çalışmalarda daha uygun olabilmektedir. Bakteriler canlı da olsa cansız da olsa DNA'ları genellikle peynir matrisinde bulunmaktadır. RNA DNA'dan daha az stabil olduğunda, RNA ölü organizmalarda daha hızlı bozulacaktır. Ek olarak, RNA temelli uygulamaların DNA temelli uygulamalara göre daha hassas olduğu düşünülmektedir (Justé et al., 2008). DNA temelli yaklaşımların eksikliği Lcitra et al. (2007) tarafından 7 ay olgunlaştırılmış Ragusano peynirinin PCFR-TTGE analizinde ortaya konmuştur. PCR-TTGE peynirin olgunlaşma sürecindeki mikroflora değişiminde herhangi bir değişiklik ortaya koymamıştır.

### **2.2.3. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi-PCR (SSCP-PCR: Single-Strand Conformation Polymorphism-PCR) :**

SSCP-PCR denatüre (single-stranded) PCR ürünlerinin ayrılması için ya akrilamid jel temelli ya da kapiler temelli otomatik sekanslayıcı (dizici) kullanılan moleküler bir tekniktir. Denatürasyonun olmadığı şartlar altında, tek-iplikli DNA nükleotid dizilimine ve fiziko-kimyasal ortamına göre tersiyer (3. derece) yapılar katlanmaktadır. Bu durum denatüre olmayan jellerde elektroforetik hareketlilikte farklılığa neden olmaktadır (Jany and Barbier, 2008). Genel primerlerin kullanımı nedeniyle, SSCP, diğer kültüre bağlı olmayan moleküler yöntemler gibi, herhangi bir a priori bilgisi olmadan popülasyondaki türler hakkında daha objektif bilgi vermektedir (Duthoit et al., 2003).

Çiğ süttten üretilen Salers peynirinde mikrobiyal topluluğun analiz edilmesinde 18S rRNA geninin V4 bölgesi ve 16S rRNA geninin V2 ve V3 bölgelerinin amplifikasyonu, geleneksel Saint-Nectaire peyniri ve çiğ süt analizinde 16S rRNA geninin V3 bölgesi amplifikasyonu kullanılmıştır. SSCP-PCR analizi bazı SSCP piklerinde türlerin kromotogramları nedeniyle etkilenebilmektedir. Bu nedenle, mikrobiyal yoğunluk eksik değerlendirilmesine neden olabilmekte ve yalnızca dominant popülasyon saptanmaktadır (Saubusse et al., 2007; Verdier-Metz et al., 2009).

### **2.2.4. Floresan in situ Hibridizasyon (FISH) :**

16S rRNA gen problemleri ile floresan in situ hibridizasyon gıda matrisindeki mikroorganizmaların fiziksel saptanması ve mikrobiyal tanımlanmasını sağlayan kültüre bağımsız moleküler yöntemdir. Bu yöntem aynı zamanda çevresel örneklerdeki mikrobiyal popülasyonun dağılımı hakkında bilgi vermektedir. Gıda mikrobiyolojisinde, FISH bakterilerin izolasyona gerek kalmadan in situ tanımlanmasında kullanılmaktadır (Cocolin et al., 2007). Bu yöntem PCR temelli bir moleküler teknik değildir floresan kullanılarak etiketlenen 16S rRNA bakteriyel alan probu peynir gibi gıda matrislerinde yayılmış mikrobiyel hücre kolonilerinin araştırılmasına olanak vermektedir. FISH nükleik asit dizilimlerini floresan özellik kazandırılmış prob yardımıyla belirlemektedir. Oligonükleotid problemleri, her taksonomik genusa özel ve türe özel seviyeye indirecek şekilde hedef 16S rRNA gen bölgesine göre dizayn edilmelidir (Motter and Göbel, 2000; Ercolini et al., 2003).

Temel anlamda, FISH analizi bazı aşamalardan oluşmaktadır: (i) örnek hazırlanması ve hücre fiksasyonu (saptama), genellikle formaldehit kullanarak; (ii) mikroskopik kızak üzerine örneğin sabitlenmesi (iii) probun artan geçirgenliğine hücre uygulamaları (iv) floresan özellik kazandırılmış etiketli oligonükleotid problemlerle

in situ hibridizasyon. Hibridizasyondan sonra parçanın epifloresan mikroskop ile incelenmesi (Amann et al., 2001; Giraffa and Neviani, 2001). FISH Stilton peynirinde bakteri topluluğu yapı ve yerleşimi incelemelerinde de kullanılmıştır. Floresan özellikteki etiketli oligonukleotid problemler *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* ve *Leuconostoc pseudomesenteroides*'in saptanması için geliştirilmiştir. Bu problemlerin ve bakteri probunun Eub338'in birlikte kullanımı peynir matrisinde bulunan farklı mikrobiyal türlerin saptanmasında başarılı olmuştur (Ercolini et al., 2003). Feta peyniri örneklerinin mikroflorasında bulunan *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus* spp. ve *L. plantarum* gibi bakteriler, FISH tekniği kullanılarak analiz edilmiştir. Hedeflenen özel bir grup veya tür olduğunda, FISH tekniği çok kullanışlı olmaktadır.

### 2.2.5. Real Time PCR (qPCR) (Gerçek Zamanlı PCR) :

Son yıllarda PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, Real-time PCR olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. Real-time PCR'da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlem uygulamalarına gerek kalmamaktadır. Real-time PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan yada diziye özgün problemlerden yararlanılmaktadır. Real-time PCR reaksiyon esnasında her bir PCR siklüsünde yeterli miktarda ürünün verdiği floresans ışığa göre çalışıp reaksiyonda aşama aşama oluşan ürünü sonuna kadar kontrol eden bir sistemdir (Aydın-Sayitoğlu, 2005).

RNA molekülü PCR ile çoğaltılmadığından PCR aşamasından önce RNA ters transkriptaz (reverse transcriptase) enzimi kullanılarak cDNA (komplementer DNA)'ya çevrilir. Ardından DNA, PCR ile çoğaltılmaktadır. Bu sentezleme aşaması RT-PCR olarak adlandırılmaktadır. Floresan ışımaya tekniklerinin de kullanıma girmesiyle kinetik revers transkriptaz-PCR (RT-PCR)'da bir devrim yaşanmaktadır. Bu sayede tümör hücrelerinin ilaç dirençlerinden kemoterapi taramalarına ve tümör evrelerinin moleküler saptanmasına kadar uzanan bir çok farklı alanda gen anlatımını sayısal bir değer olarak ölçmek mümkün olmaktadır. Bu gelişme sayesinde artık gen kopya ürünlerinin düzeylerini sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek, devam eden PCR reaksiyonunu ekranda izleyerek 'Real Time' (eşzamanlı) olarak reaksiyonun gidişine müdahale etmek ve PCR döngülerinin sayısıyla oynayabilmek de mümkündür. Birçok adlandırmayla anılan bu teknolojiye floresan okuma yapması nedeniyle yabancı yayınlarda Floresan Kantitatif RT-PCR, Kantitatif-kinetik PCR gibi çeşitli adlar altında rastlamak mümkündür (Aydın-Sayitoğlu, 2005).

İtalyan geleneksel ve endüstriyel peynirlerde hedef gen olarak bir fenilalanil-tRNA sentaz (PheS) kültürden bağımsız qPCR kullanımı *Enterococcus gilvus*'un varlığını ve miktarını değerlendirmek için optimize edilmiştir. *Enterococcus gilvus*'un diğer LAB'lerinden kesin olarak ayırt edilmesi belgelenmiş, böylelikle real time-PCR tahlilinin kesin özgünlüğü ispatlanmıştır (Zago et al., 2009). Ongol et al. (2009) yoğurt ve meyveli yoğurtlardaki *Streptococcus thermophilus* miktarını real-time PCR yöntemiyle belirlemişlerdir. *Streptococcus thermophilus*'un standart sayımı ile qPCR ile sayımı arasında standart plak sayımının % 3.96 oranında lehinde fark ile iki yöntem arasında yüksek benzerlik gösterdiği saptanmıştır. *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* ATCC 19257 suşu karışık kültürle fermente edilen süt ürünündeki miktarı da qPCR tekniği kullanılarak başarılı bir şekilde belirlenmiştir. Çalışır durumdaki özel primerler kullanılarak, karışık kültürün her mililitresinde bulunan *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* ATCC 19257 suşunun saptama sınırı 200 CFU olarak tespit edilmiştir (Grattepanche et al., 2005). Bogovič Matijašič et al (2009) probiyotik ürünlerde bulunan *Lactobacillus gasseri*, *Enterococcus faecium* ve *Bifidobacterium infantis*'in seçici olarak hatasız saptanması için 16S rRNA gen parçalarının amplifikasyonu üzerine dayalı real-time PCR yönteminin uygun bir yaklaşım olduğunu kanıtlamışlardır.

DNA temelli real-time PCR yaklaşımlarına ek olarak, Monnet et al. (2008) kültürleme olmadan peynirden RNA ekstraksiyonu için bir yöntem geliştirmiş ve *Lactococcus lactis* için real-time ters transkripsiyon PCR optimize etmiştir. RNA temelli RNA real-time PCR hedefin metabolik durumu ve niceliği hakkında faydalı veri sağlamıştır. Genel anlamda, kültüre bağlı olmayan real-time PCR yöntemi geliştirme hassasiyet, kesinlik ve robotik otomasyon imkanı gibi avantajlar sağlamaktadır (Powel et al., 2006).

### 2.2.6. Terminal Restriksiyon Parçacık Uzunluk Polimorfizmi (T-RFLP: Terminal Fragment Length Polymorphism) :

T-RFLP tekniği 16S rRNA geninde varyasyona dayanan karmaşık mikrobiyal yoğunluğu değerlendirmek için kullanılan hızlı, hassas ve tekrarlanabilir yöntemdir. Analiz farklı çevresel şartlardaki veya bakterilerin doğal ortamlarındaki yapı ve yaşamlarını incelemekte kullanılabilir (Anonim, 2011a). T-RFLP analizi belirli bir genin polimorfizminin analiz edilmesiyle mikrobiyal bir topluluğun parmak izinin alınmasına olanak vermektedir. Analiz floresan etiketli 16S rRNA geni son PCR ürününün restriksiyon endonükleaz dijesyonuna dayanmaktadır. Yöntem örneklerin mikrobiyal toplulukların tür kompozisyonuna bağlı olarak belirgin profilleri (parmak izi) sağlamaktadır (Grüntzig et al., 2002).

Üç adet Tilsit tipi peynirlerin sekiz haftalık olgunlaşma periyodu boyunca peynir yüzeyinde bulunan kompleks bakteriyel floranın üyelerini karakterize etmek için T-RFLP analizi gerçekleştirilmiştir (Rademarker et al., 2005). Çalışmada Hae III ve Cfo I restriksiyon enzimleri kullanılmıştır. Starter suşlardan pek çoğu 2-4 haftanın sonunda maksimum seviyeye ulaşmış, ancak 8 hafta sonunda gözlemlenmemiştir. İstisna olarak *Corynebacterium* türlerinin tamamen olgunlaşmış peynirlerinin yüzeyinde dominant bakteri genusu olarak bulunduğu saptanmıştır (Rademarker et al., 2005). T-RFLP analizinin sert tip peynirlere (Gouda tipi ve Maasdam) ve yoğurda uygulanması da Rademarker et al. (2006) tarafından rapor edilmiştir. T-RPUP analizi peynir olgunlaşması gibi uzun zamanlı ve yoğurt üretimi gibi kısa zamanlı ürünlerde bakteriyel popülasyonun yoğunluğu ve dinamiğinin karakterize edilmesinde etkin bir şekilde kullanılabilir. Yine T-RFLP analizi basit süt starter kültürleri gibi basit mikrobiyal ekosistemlerin yarı nicel sergilenmesi için uygun olabilmektedir. Farklı hücre lizis direnci, genom büyüklüğü veya G+C (guanin+sitozin) yapısı gibi farklı amplifikasyonlara neden olabilecek yüksek mikrobiyal yoğunluklu karmaşık ekosistemlerin analizinde ve sonuç olarak, T-RFLP analizi örnekte bilinmeyen türlerin bulunması durumunda sayısının fazla çıkmasına neden olabilmektedir (Sánchez et al., 2006).

### 2.2.7. Uzunluk Heterojenitesi PCR (LH-PCR: Length Heterogeneity-PCR) :

LH-PCR analizi daha yaygın kullanılan T-RFLP yöntemi ile benzerlik göstermektedir. Bu iki yöntem arasındaki fark, T-RPUP yöntemi PCR parça uzunluğu varyasyonlarını bölge farklarının restriksiyonu yoluyla tanımlarken, LH-PCR analizi farklı mikroorganizmalarda 16S rRNA dizilimlerinin uzunluğunda doğal farklılaşmalara dayanarak mikroorganizmanın ayırt edilmesidir. LH-PCR mikrobiyal yoğunluk çalışmalarında daha sınırlı kullanılırken, T-RFLP analizi çeşitli uygulamalarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Ritchie et al., 2000).

LH-PCR'in başlıca avantajı diğer analiz yöntemlerinden daha etkili, kolay ve yüksek tekrarlanabilirliğidir. Yöntem, teorik olarak mikrobiyal topluluktaki dominant popülasyonun kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Floresan veriler şeklinde elektroforogramlara dönüştürüldüğünde meydana gelen pikler, farklı boyutlardaki bölgeler ve piklerin altında kalan alanlar bölümlerin oransal miktarlarının ölçülmesi ile belirlenmektedir. LH-PCR tekniği kullanılarak, sonuçlar 30-40 dakika gibi kısa bir sürede hızlı bir şekilde elde edilebilmektedir (Lazzi et al., 2004).

LH-PCR yöntemi süt ürünlerinde yaygın olarak bulunan bir genus olan *Lactobacillus* türlerinin biyoteknolojik potansiyellerinin incelenmesi çalışmalarında da kullanılmış ve bu genusun tanımlanmasında karşılaşılan zorluklar gösterilmiştir (Martin-Platero et al., 2009). UH-PCR kullanılarak *Lactobacillus* türleri *L. plantarum*, *L. paraplantarum* ve *L. curvatus/L. corynformis* Quesaila Arochea peynirinde, *L. plantarum*, ve *L. curvatus/L. corynformis* ise Torta Arochea peynirinde saptanmıştır. LH-PCR Torta Arochea peynirinde düşük sayıda *L. paracasei* saptarken, TTGE analizi ile herhangi bir saptama yapılamamıştır (Martin-Platero et al., 2009). LH-PCR tekniği ile Grana Padano peynirinde bulunan peynir altı suyu kültürlerinin de arasında bulunduğu starter kültürlerden dominant LAB'lerinin popülasyon parmak izleri ve temel mikrobiyal farkları elde edilmiştir (Lazzi et al., 2004). Çalışmada dominant türlerin *L. helveticus*, *L. delbrueckii* ssp. *lactis*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* olduğu saptanmıştır (Fornasari et al., 2006).



### 3. SONUÇ

Kültüre bağımsız moleküler yaklaşımlarda hala süt ve süt ürünlerinin mikroflorasının belirlenmesi konusunda eksik kalan noktalar bulunmaktadır. Bu sebeple, bu yöntemlerde karşılaşılan saptama sınırlandırılmalarının giderilmesi için çalışmalar yapılması gerekmektedir. Bunun yanında, gelecek yıllarda gıda ve süt kaynaklı laktik asit bakterilerinin analizi için yeni tekniklerin geliştirilmesi amacıyla yeni çalışmalara devam edilecektir. Özellikle micro array teknolojisinin uygulanmaya başlamasıyla toplam genom sekanslamasının hızla gelişmesi tanılama ve saptama için yeni olanaklar sağlayacaktır. Yine, kütle spektrumuna dayanan genomik olmayan tam hücre analizi tekniği de yüksek ayırım gücüne sahip olmaktadır.

### 4. KAYNAKLAR

- Akpınar, A., Yerlikaya, O. and Kılıç, S. 2011. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Turkish homemade yoghurts. *African Journal of Microbiology Research* 5(6): 675-682.
- Amann, R., Fuchs, B.M. and Behrens, S. 2001. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Current Opinion of Biotechnology* 12: 231-236.
- Anonim, 2011. Terminal fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis on applied biosystem capillary electrophoresis systems, Applied Biosystems: Application Note T-RFLP on the 3130/30, [http://www3.applied-biosystems.com/cms/groups/mcbmarketing/documents/generaldocuments/cms\\_042272.pdf](http://www3.applied-biosystems.com/cms/groups/mcbmarketing/documents/generaldocuments/cms_042272.pdf).
- Aponte, M., Fusco, V., Andolfi, R. and Coppola, S. 2008. Lactic acid bacteria occurring during manufacture and ripening of Provolone del Monaco cheese: Detection by different analytical approaches. *International Dairy Journal* 18: 403-413.
- Aydın-Sayıtoğlu, M. 2005. Hematoloji’de real time PCR. Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi, Temel Moleküler Hematoloji Kursu, 12-13 Mart, Mersin.
- Ben Amor, K., Vaughan, E.E. and de Vos, W.M. 2007. Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. *Journal of Nutrition (Suppl.)* 137: 741-747.
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A. and Cogan, M.T. 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* 11: 259-274.
- Bogovič-Matijašič, B., Obermajer, T. and Rogelj, I. 2009. Quantification of *Lactobacillus gasseri*, *Enterococcus faecium* and *Bifidobacterium infantis* in a probiotic OTC drug by real-time PCR. *Food Control* 21: 419-425.
- Cocolin, L., Diez, A., Urso, R., Rantsiou, K., Comi, G., Bergmaier, I. and Beimfohr, C. 2007. Optimization of conditions for profiling bacterial populations in food by culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology* 120: 100-109.
- Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C. and Comi, G. 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA genes V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 5113-5121.
- Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M., Vernoux, J.P. 2003. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait*,83: 269-306.
- Corsetti, O., Lavermicocca, P., Morea, M., Baruzzi, F., Tosti, N. and Gobetti, M. 2001. Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of Southern Italy. *International Journal of Food Microbiology* 64: 95-104.
- Çon, A.H. ve Gökalp, H.Y. 2000. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal metabolitleri ve etki şekilleri. *Türk Mikrobiyoloji ve Cemiyeti Dergisi* 30: 180-190.
- Danova, S., Petrov, K., Pavlov, P. and Petrova, P. 2005. Isolation and characterization of *Lactobacillus* strains involved in koumiss fermentation. *International Journal of Dairy Technology* 58(2): 100-106.
- Doğan, P. 2009. *Pediococcus acidilactici* PBF suşunda bakteriyosin üretiminden sorumlu genin aktarımı. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji A.B.D., Yüksek Lisans Tezi, 115s.
- Duthoit, F., Godon, J.J. and Montel, M.C. 2003. Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3840-3848.

- El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A. and Ogier, J.C. 2007. Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional Egyptian Domiati cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 1248–1255.
- Ercolini, D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: Novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiology Methods* 56: 297–314.
- Ercolini, D., Hill, P.J. and Dodd, C.E.R. 2003. Bacterial community structure and location in Stillton cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3540–3548.
- Ercolini, D., Hill, P.J. and Dodd, C.E.R. 2003. Development of a fluorescence in situ hybridization method for cheese using a 16S rRNA probe. *Journal of Microbiological Methods* 52: 267–271.
- Flórez, A.B. and Mayo, B. 2006. PCR-DGGE as a tool for characterizing dominant microbial populations in the Spanish blue-veined Cabrales cheese. *International Dairy Journal* 16: 1205–1210.
- Fontana, C., Vignolo, G. and Coconcelli, P.S. 2005. PCR-DGGE analysis for the identification of microbial populations from Argentinean dry sausages. *Journal of Microbiological Methods* 63: 254–263.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66: 365–378.
- Gancheva, A., Pot, B., Vanhonacker, K., Hoste, B. and Kersters, K. 1999. A polyphasic approach towards the identification of strains belonging to *Lactobacillus acidophilus* and related species. *System Applied Microbiology* 22: 573–585.
- Gatti, M., De Dea Lindner, J., De Lorentiis, A., Bottari, B., Santarelli, M., Bernini, V. and Neviani, E. 2008. Dynamics of whole and lysed bacterial cells during Parmigiano-Reggiano cheese production and ripening. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 6161–6167.
- Giraffa, G. and Neviani, E. 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* 67: 19–34.
- Gonzalez, C.J., Encinas, J.P., Garcia-Lopez, M.L. and Otero, A. 2000. Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes. *Food Microbiology* 17: 383–391.
- Grattepanche, F., Lacroix, C., Audet, P. and Lapointe, G. 2005. Quantification by real-time PCR of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in milk fermented by a mixed culture. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 414–421.
- Grüntzig, V., Stres, B., Ayala del Río, H.L. and Tiedje, J.M. 2002. Improved protocol for T-RFLP by capillary electrophoresis, Ribosomal Database Project Protocol, II ([http://rdp8.cme.msu.edu/html/t-rflp\\_jul02.html](http://rdp8.cme.msu.edu/html/t-rflp_jul02.html)).
- Güley, Z. 2008. Doğal üretilen küflü peynirden izole edilen bazı laktik asit bakterilerinin aflatoksin b1 ve aflatoksin m1 üzerine etkisinin araştırılması. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Süt Teknolojisi A.B.D, Doktora Tezi, Bornova, İzmir.
- Henri-Dubernet, S., Desmases, N. and Guéguen, M. 2004. Culture-dependent and culture-independent methods for molecular analysis of the diversity of lactobacilli in ‘Camembert de Normandie’ cheese. *Lait* 84: 179–189.
- Hovda, M.B. 2007. Application of PCR and DGGE to characterise the microflora of farmed fish, PhD Thesis, University of Bergen, Bergen, Norway.
- Jany, J.L. and Barbier, G. 2008. Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiology* 25: 839–848.
- Justé, A., Thomma, B.P.H.J. and Lievens, B. 2008. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology* 25: 745–761.
- Kılıç, S. 2008. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. E.Ü. Yayınları Ziraat Fak. Yayın No: 542. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova-İzmir.
- Kıran, F. ve Osmanağaoğlu, Ö. 2011. Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) identifikasyonunda tiplendirmesinde kullanılan moleküler yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 27(1): 62–74.
- Klaenhammer, T., Altermann, E., Arigoni, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J., Cano, R., Chaillou, S., Deutscher, J., Gasson, M., Guchte, M van de, Guzzo, J., Hartke, A., Hawkins, T., Hols, P., Hutkins, R., Klee-rebezem, M., Kok, Kuipers, O., Lubbers, M., Maguin, E., McKay, L., Mills, D., Nauta, A., Overbeek, R., Pel, H., Pridmore, D., Saier, M., Sinderen, De van, Sorokin, A., Steele, J., O’Sullivan, D., Vos, W de, Weimer, B., Zagorec, M. and Siezen, R. 2002. Discovering lactic acid bacteria by genomics. *International Journal of Genetic and Molecular Microbiology* 82: 29–58.

- Lazzi, C., Rossetti, L., Zago, M., Neviani, E. and Giraffa, G. 2004. Evaluation of bacterial communities belonging to natural whey starters for Grana Padano cheese by length heterogeneity—PCR. *Journal of Applied Microbiology* 96: 481–490.
- Lee, K-Y., So, J.S. and Heo, T.R. 2001. Thin layer chromatographic determination of organic acids for rapid identification of bifidobacteria at genus level. *Journal of Microbiological Methods* 45: 1–6.
- Leisner, J.J., Vancanneyt, M., Rusul, G., Pot, B., Lefebvre, K., Fresi, A. and Tee, L.K. 2001. Identification of lactic acid bacteria constituting the predominating microflora in an acid-fermented condiment (tempoyak) popular in Malaysia. *International Journal of Food Microbiology* 63: 149–157.
- Licitra, G., Ogier, J.C., Parayre, S., Pedilligieri, C., Carnemolla, T.M., Falentin, H., Madec, M.N., Carpino, S. and Lortal, S. 2007. Variability of bacterial biofilms of the ‘tina’ wood vats used in the Ragusano cheese-making process. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 6980–6987.
- Martin-Platero, A.M., Maqueda, M., Valdivia, E., Purswani, J. and Martinez-Bueno, M. 2009. Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats’ milk cheeses from Sierra de Aracena. *Food Microbiology* 26: 294–304.
- McCartney, A.L. 2002. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *British Journal of Nutrition* 88: 29–37.
- Lorbeg, P.M., Majhenic, A.C. and Rogelj, I. 2009. Evaluation of different primers for PCR-DGGE analysis of cheese-associated enterococci. *Journal of Dairy Research* 76: 265–271.
- Monnet, C., Ulvé, V., Sarthou, A.S. and Irlinger, F. 2008. Extraction of RNA from cheese without prior separation of microbial cells. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 5724–5730.
- Motter, A. and Göbel, U.B. 2000. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 41: 85–112.
- Muyzer, G., De Wall, E.C. and Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695–700.
- Muyzer, G. and Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 127–141.
- Naser, S.M., Thompson, F.L., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M. and Swings, J. 2005. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology* 151: 2141–2150.
- Ogier, J.C., Lafarge, V., Girard, V., Rault, A., Maladen, V., Gruss, A., Leveau, J.Y. and Delacroix-Buchet, A. 2004. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5628–5643.
- Ogier, J.C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P. and Delacroix-Buchet, A. 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3691–3701.
- Ongol, M.P., Tanaka, M., Sone, T. and Asano, K. 2009. A real-time PCR method targeting a gene sequence encoding 16S rRNA processing protein, *rimM*, for detection and enumeration of *Streptococcus thermophilus* in dairy products. *Food Research International* 42: 893–898.
- Osmanağaoğlu, Ö. 2007. Laktik asit bakterilerinin moleküler tekniklerle tanımlanması. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu. 20050705006HPD.
- Özkaya, B. and Demir, A. 2011. Kentesel katı atık yönetiminde PCR-DGGE-Dizi analizi temelli moleküler tekniklerle mikrobiyal tür tayini. *Sigma 3 Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi* (3): 219-227.
- Pot, B., Ludwig, W., Kersters, K. and Schleifer, K-H. 1994. Taxonomy of lactic acid bacteria, L De Vuyst, E.J Vandamma, Editors, *Bacteriocins of lactic acid bacteria; Microbiology, genetics and applications*, Chapman and Hall, London, UK 13–90.
- Powel, S., Ferguson, S., Bowman, J. and Snape, I. 2006. Using real-time PCR to assess changes in the hydrocarbon-degrading microbial community in Antarctic soil during bioremediation. *Microbial Ecology* 52: 523–532.
- Rademaker, J.L.W., Hoolwerf, J.D., Wagendorp, A.A. and te Giffel, M.C. 2006. Assessment of microbial population dynamics during yoghurt and hard cheese fermentation and ripening by DNA population fingerprinting.

- ting. *International Dairy Journal* 16: 457–466.
- Rademaker, J.L.W., Peinhopf, M., Rijnen, L., Bockelmann, W. and Noordman, W.H. 2005. The surface microflora dynamics of bacterial smear-ripened Tilsit cheese determined by T-RFLP DNA population fingerprint analysis. *International Dairy Journal* 15: 785–794.
- Randazzo, C.L., Caggia, C. and Neviani, E. 2009. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *Journal of Microbiological Methods*, 78: 1–9.
- Randazzo, C.L., Torriani, S., Akkermans, A.D.L., de Vos, W.M. and Vaughan, E.E. 2002. Diversity, dynamics and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1882–1892.
- Rantsiou, K., Comi, G. and Cocolin, L. 2004. The *rpoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis to follow lactic acid bacterial population dynamics during food fermentations. *Food Microbiology* 21: 481–487.
- Rantsiou, K., Urso, R., Dolci, P., Comi, G. and Cocolin, L. 2008. Microflora of Feta cheese from four Greek manufacturers. *International Journal of Food Microbiology* 126: 36–42.
- Ritchie, N.J., Schutter, M.E., Dick, R.P. and Myrold, D.D. 2000. Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1668–1675.
- Sağdıç, O., Arici, M. and Şimşek, O. 2002. Selection of starters for a traditional Turkish yayik butter made from yoghurt. *Food Microbiology* 19: 303–312.
- Sánchez, J.I., Rossetti, L., Martínez, B., Rodríguez, A. and Giraffa, G. 2006. Application of reverse transcriptase PCR-based T-RFLP to perform semi-quantitative analysis of metabolically active bacteria in dairy fermentations. *Journal Microbiological Methods*, 65: 268–277.
- Saubusse, M., Millet, L., Delbès, C., Callon, C. and Montel, M.C. 2007. Application of single strand conformation polymorphism-PCR method for distinguishing cheese bacterial communities that inhibit *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 16: 126–135.
- Şanlıbaba, P. ve Akçelik, M. 2000. Çiğ süt ve peyniraltı sularından izole edilen laktokokların faj duyarlılıkları. *Turkish Journal of Biology* 24: 425–435
- Temmerman, R., Scheirlinck, I., Huys, G., and Swings, J. 2003. Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 220–226.
- Torriani, S., Clementi, F., Vancanneyt, M., Hoste, B., Dellaglio, F., Kersters, K. 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* species by RAPD-PCR and AFLP. *Systematic and Applied Microbiology* 24: 554–560.
- Tuncer, Y. 2009. Some technological properties of phenotypically identified enterococci strains isolated from Turkish tulum cheese. *African Journal of Biotechnology* 8(24): 7008-7016.
- Verdier-Metz, I., Michel, V., Delbès, C. and Montel, M.C. 2009. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiology* 26: 305–310.
- Yerlikaya, O. ve Kesenkaş, H. 2009. Laktik asit bakterilerinin ve fermente süt ürünlerinin antimikrobiyal özellikleri. *Hasad Gıda*, 25(290): 30-35.
- Yerlikaya, O., Kınık, Ö. ve Akbulut, N. 2010. Süt teknolojisinde enterokoklar ve enterokokların gıda güvenlik değerlendirmesindeki önemi. *Hasad Gıda* 25(296): 32-41.
- Yılmaz, R. and Temiz, A. 2003. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 'un klasik ve moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanması ve karakterizasyonu. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* 01(03): 19-42
- Yoshino, K., Nishigaki, K. and Husimi, Y. 1991. Temperature sweep gel electrophoresis: a simple method to detect point mutations. *Nucleic Acids Researchs* 19: 3153.
- Yuksekdag, Z.N. and Beyatlı, Y. 2009. Bazı laktik asit bakterilerinin fizyolojik, biyokimyasal, plazmit DNA ve protein profil özelliklerinin incelenmesi. *GIDA*, 34(2): 91-98.
- Zago, M., Bonvini, B., Carminati, D. and Giraffa, G. 2009. Detection and quantification of *Enterococcus gilvus* in cheese by real-time PCR. *Systematic and Applied Microbiology* 32: 514–521.



## GIDALARDA ISIL OLMAYAN YENİ TEKNİKLER VE MİKROORGANİZMALAR ÜZERİNE ETKİLERİ

Merve AÇU\* Oktay YERLİKAYA\*\* Özer KINIK\*\*\*

### ÖZET

Gıda güvenliği ve kalitesi açısından biyolojik ve kimyasal aktivitelerin kontrol altına alınması gerekmektedir. Bu da genellikle geleneksel ısı işlemlerle sağlanmaktadır. Ancak bu ısı işlemlerin bazıları gıdanın besin değeri ve duyu özelliklerinde önemli değişikliklere yol açmaktadır. Bu nedenle günümüzde gıda üreticileri gerek gıdanın raf ömrünü uzatabilmek, gerekse gıdanın besin değerini koruyabilmek için yeni teknoloji ve yöntem arayışı içine girmişlerdir. Geleneksel ısı yöntemlere alternatif olan bu yeni teknikler, gıda endüstrisinde uzun bir süredir gündemdedir.

Bu makalede gıda işletmelerinde kullanılan ve kullanılabilecek yeni uygulamalardan olan vurgulu elektrik alan, vurgulu (atımlı) ışık, yüksek basınç uygulaması, ultrasound, mikrofiltrasyon, X ışınları, ultraviyole ışık, yüksek voltaj ark deşarjı ve salınımlı manyetik alan yöntemleri ile mikroorganizmalar üzerindeki etkileri incelenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Gıda teknolojisi, ısı olmayan yeni teknikler, vurgulu elektrik alan, yüksek hidrostatik basınç

## NON-THERMAL NEW METHODS AND THEIR EFFECTS ON MICROORGANISMS

### ABSTRACT

Biological and chemical activities are needed to be brought under control for food safety and quality. This situation generally is obtained with traditional heat treatments. However, some of these heat treatments cause important changes in the nutritional value and sensory properties. Therefore, today, food producers are trying to find new technologies and methods both to improve the shelf life of the food and protect the nutritional value. These novel techniques that are alternatives to the traditional heat treatments are topical for a long time in food industry. In this article, new methods that contain pulsed electric field, pulsed light, high hydrostatic pressure, ultrasound, microfiltration, X-rays, ultraviolet light, high voltage arc discharge and oscillating magnetic field and their effects on microorganisms have been researched.

**Key Words:** Food technology, non-thermal new methods, pulsed electric field, high hydrostatic pressure

## 1. GİRİŞ

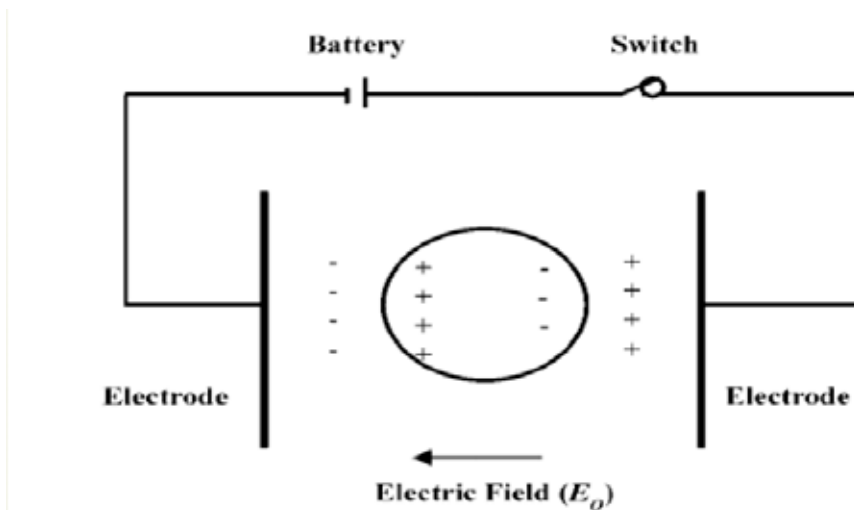
Son zamanlarda gıdaların kalitesini, besin değerini ve duyu özelliklerini daha az etkileyecek yeni gıda işleme yöntemlerinin istenmesi nedeniyle yeni ve alternatif pastörizasyon ile sterilizasyon yöntemleri önem kazanmaktadır. Gıdaların yüksek sıcaklıktaki ısıl işlemlere tabii tutulmasıyla gıdanın yapısında açığa çıkan olumsuzlukların ortadan kaldırılması amacıyla "ısı olmayan yollarla" gıda muhafazası önem kazanmıştır. Isıl olmayan işlemler bozulma yapan ve patojen mikroorganizmalar ile istenmeyen enzimlerin inaktivasyonunu sağlarken proses sıcaklığının düşük olması dolayısıyla ürünün tadı, kokusu, tekstürü ve besin öğeleri daha iyi korunmakta ve taze halindeki özelliklerine çok yakın nitelikte ürün elde edilmektedir. Bunun yanında da daha az enerjiye gereksinim duyulmaktadır (Güleç, 2006).

Son yıllarda yüksek kalitede gıda ürünlerine karşı artan tüketici taleplerinden dolayı ısıl olmayan yeni teknolojilere olan ilgi sürekli olarak artmaktadır. Bu sebeple gıda endüstrisinde, geleneksel işleme tekniklerine göre genellikle daha düşük sıcaklıklarda yürütülen ve böylece ısıl işlemin gıda kalitesi üzerine olumsuz etkisini azaltan ısıl olmayan teknolojiler kullanılmaya başlanmıştır. Vurgulu elektrik alanı (PEF), yüksek basınç (HP), ultrasound ve ultraviyole (UV) uygulamaları bu yeni gıda işleme teknolojilerinden bazılarıdır. Özellikle sıvı gıdaların işlenmesinde ısıl işleme (pastörizasyon, sterilizasyon) alternatif olarak PEF ve UV uygulamaları ticari bir potansiyele sahiptirler.

## 2. VURGULU ELEKTRİK ALAN (PEF)

Vurgulu elektrik alan, kısa süre (genellikle 2-300 ms) ve yüksek elektriksel alan esasına dayanır. Bu teknolojide iki elektrot arasına konulan gıdaya 20 - 80 kV/cm<sup>2</sup> arası yüksek voltaj uygulanır. Dışarıdan uygulanan elektrik alan hücre membranı boyunca transmembran potansiyel denilen bir elektrik potansiyel farkı oluşturur. Bu potansiyel kritik bir değere ulaştığında, hücre membranında por oluşumu veya elektroporasyon başlar ve geçirgenlik artar. Böylece, hücre membranının koruyucu özelliği ortadan kalkar ve hücre içindeki yaşam materyalleri kaybolur (Coimbra ve Teixeira, 2010).

Geçirgenlikteki bu artış, dışarıdan uygulanan elektrik alanın gücü kritik değere eşitse ya da kritik değeri çok az aşmışsa geri dönülebilir düzeydedir. Gıdaların pastörizasyonunda ise bu değer aşılması ve hücre duvarlarında geri dönüşümsüz tahribat için işlem süresi veya şiddeti artırılmaktadır. Membranın zarar görmesinin nedeni küçük moleküllerin ve iyonların sızmasından dolayı oluşan ozmotik basıncındaki dengesizliktir. Sitoplazmik içeriğin ozmotik basıncından dolayı hücre şişmeye başlar ve porlar büzülür. Hücre hacmi çok arttığında da hücre membranı parçalanır ve dağılır (Anonim, 2011a).



Şekil 1: Elektriksel Alana Maruz Bırakılan Bir Hücredeki Transmembran Potansiyel Endüksiyonu (Anonim, 2011a).

Serbest yükler membran yüzeyinin her iki tarafında da birikir. Yüzey yüklerinin birikmesi elektromekanik stresi ve transmembran potansiyeli artırır. Hücre membranının içinde ve dışındaki zıt yüklerdeki çekimden dolayı sıkıştırma basıncı artar; bu da membran kalınlığının azalmasına neden olur. Elektrik alan gücü belli bir seviyeyi geçtiği zaman membranda porlar oluşmaya başlamaktadır. Genel olarak bitki ve hayvan hücreleri vurgular uygulanmaya başlandıktan sonra 1µs içinde kritik trans-membran değerine (~0,7-0,22V) ulaşır (Anonim, 2011a).

Vurgulu elektrik alan teknolojisi konusundaki çalışmalar özellikle sıvı ve katı gıdalarda değişen amaçlarla kullanımının optimize edilmesi üzerinedir. Sıvı gıdaların pastörizasyonunda geleneksel ısıl işlem yerine kullanılabilir en umut verici teknoloji olarak PEF yöntemi görülmektedir (Anonim, 2011a).

PEF teknolojisi elma suyu, sıvı yumurta, portakal suyu, süt ve çorbaların raf ömrünü uzatmada başarıyla kullanılmaktadır. Geleneksel ısıl işlemlere göre gerek fiziko-kimyasal ve duyuşsal özellikler daha iyi korunmakta gerekse daha az enerji harcanmaktadır. Vurgunun oluşumu kapasitörün yavaş yüklenmesi ve hızlı boşalımı ile gerçekleşir. Elektrik alan vurgular çoğunlukla üstel azalma ya da kare dalga formundadır. Üstel azalma vurgusu, çok hızlı maksimum değere yükselip yavaşça sıfıra inen tek yönlü voltajdır. Kare dalga formunda ise, voltaj hızlıca sıfırdan maksimum değerine yükselir, belirlenen süre bu değerde kalır ve aniden sıfıra düşer (Anonim, 2011a).

### 2.1. Vurgulu Elektrik Alan (PEF) Uygulamasının Mikroorganizmalar Üzerine Etkisi :

Salmonella dublin (Sensoy ve ark., 1997), Staphylococcus aureus (Sobrinio-López ve Martín-Belloso 2006), Pseudomonas izolatları (Craven ve ark., 2008), Pseudomonas fluorescens (Fernandez-Molina ve ark., 2006) mikroorganizmaları üzerinde PEF'in etkisi incelenmiştir. Söz konusu çalışmanın sonuçları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1: Sütteki Mikroorganizmaların PEF Uygulamasından Sonraki D Değerleri (Coimbra ve Teixeira, 2010).

Mikroorganizma	Sütün Tipi	Uygulama Türü	Logaritmik Düşüş
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Yağsız süt	28 kV/cm, 1 atım, 2 µs, 40°C	2
<i>Pseudomonas türleri</i>	Tam yağlı süt	31 kV/cm, 1 atım, 2 µs, 55°C	>3
<i>Staphylococcus aureus</i>	Tam yağlı süt	35 kV/cm, 150 bipolar atım, 8 µs, 25°C	4.5
<i>Salmonella dublin</i>	Yağsız süt	25 kV/cm, 100 atım, 30°C	1

UHT yağsız sütte *Bacillus cereus* vejetatif hücrelerinin PEF ile inaktivasyonu çalışmalarında 35kV/cm elektrik alanda 90 µs uygulama ile 2 log azalma elde edilmiştir. UHT sütte *Bacillus stearotherophilus*'un PEF ile inaktivasyonunda ise ve 50°C'de 60kV/cm'de 210 µs işlem ile 3 logaritmik birimlik bir azalma elde edilmiştir. Uygulama sonucunda süütün pH ve titrasyon asitliğinde farklılık gözlenmemiştir (Anonim, 2011a).

Qin ve ark. (1995) PEF işlemi uygulanmış sütlerin fiziksel ya da kimyasal özelliklerinde ve duyuşsal karakteristiklerinde herhangi bir değişime neden olmadan buzdolabı koşullarında iki haftadan daha uzun süre muhafaza edilebileceğini kanıtlamışlardır. Diğer taraftan Sepulveda ve ark. (2003) PEF'in hafif bir ısı ile işlemle beraber uygulanmasının daha etkili bir koruma metodu olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu konuda yaptıkları çalışmalarda iki metodun kombinasyonu ile elde edilen sütlerin kalitelerinde herhangi bir değişim olmadan raf ömürlerinin 4 haftadan daha uzun sürelerle uzatılabildiğini tespit etmişlerdir.

PEF uygulaması mikrobiyal inaktivasyonun yanında enzimlerin inaktive edilmesinde de kullanılır. Sütteki alkali fosfataz, peroksidaz, lipaz ve proteazın inaktivasyonu üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Sütteki alkali fosfataz ısı pastörizasyonun yeterliliğinin göstergesidir. Castro ve ark. (2001) yağsız, %2 yağlı ve tam yağlı sütte PEF uygulamasıyla alkali fosfataz inaktivasyonunu araştırmışlardır. 18.8 kV/cm elektrik alan kuvvetinde ve 70 vurgu sayısında alkali fosfataz miktarında yağsız sütte %65'in üzerinde azalma tespit edilirken, %2 yağlı sütte ve tam yağlı sütte %59 düzeyinde azalma tespit etmişlerdir. Grahl ve Märkl (1996) PEF'in peroksidaz ve lipaz üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Cserhalmi ve ark. (2002), elma suyunda yaptıkları çalışmada *Bacillus cereus* sporlarının 20 kV/cm gücündeki elektrik alanında ve 10 vurgu sayısındaki hafif bir PEF uygulaması için dirençli olduklarını tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda bakteri sporlarının sayısında 1 logaritmik birim azalma gözlemlendiğini kaydetmişlerdir (Seçkin ve Özgören, 2011).

### 3. VURGULU (Atımlı) IŞIK

Atımlı ışık yönteminde, infrared bölgeye yakın olan UV bölgedeki geniş spektrumlu dalga boyları (200 nm-1 mm) kullanılmaktadır. Sterilize edilecek bir yüzey yaklaşık olarak yüzeyde 0,01-50 J/cm<sup>2</sup> enerji yoğunluğuna sahip en az 1 atımlı ışığa maruz bırakılır. Bu durumda 170-2600 nm arasında değişen dalga boyu dağılımının kullanılması gerekmektedir. Atımların süresi 1 µs ile 0,1 s arasında değişip saniyede 1-20 flaş uygulanır (Anonim, 2011b).

#### 3.1. Vurgulu (Atımlı) Işığın Mikroorganizmalar Üzerine Etkisi :

*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus subtilis* gibi mikroorganizmalar 1-2 J/cm<sup>2</sup> yoğunluğundaki 1-35 aralığında flaş yapılarak inaktive edilebilmektedir. Yapılan bir çalışmada çökelekteki *Pseudomonas spp.*'lerin sayısında 16 J/cm<sup>2</sup> yoğunluğundaki 0.5 ms aralıkla yapılan 2 atımla 1.5 logaritmik birimlik bir azalma görülmüştür (Dunn ve ark., 1988). Çiğ yumurtalardaki bir çalışmada da 0.5 J/cm<sup>2</sup>'lik 8 flaş sonucunda *Salmonella enteritidis* sayısında 8 logaritmik birimlik bir azalma olmuştur (Anonim, 2011b).

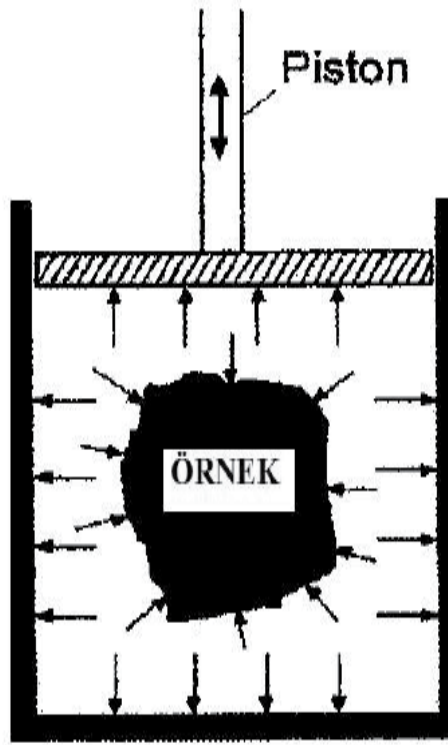
Başka bir çalışmada da yüksek basınç uygulamasıyla kombinasyonu sonucu balıktaki koliformlar ve psikotrof bakterilerde 3 logaritmik birimlik azalma olduğu görülmüştür (Dunn ve ark., 1988).

### 4. YÜKSEK BASINÇ UYGULAMASI

Yüksek hidrostatik basınç patojen ve saprofit mikroorganizmaların inaktivasyonu yeteneğine sahip olan yeni bir gıda muhafaza metodudur. Gıda üretiminde mikroorganizmaların inaktivasyonu amacıyla yüksek basınç uygulamaları kullanımı gittikçe artan bir yöntem olarak dikkat çekmektedir. Burada basınç, sıcaklık yerine kullanılan stabilize edici bir faktör durumundadır (Özcan ve Kurtuldu, 2011).

Yüksek hidrostatik basınç uygulaması, üzerinde en çok çalışılan alternatif bir metottur. Bu uygulamada 100-1000 Mpa aralığında yüksek basınçlar uygulanır. Yüksek basınçın ilk uygulamaları 19. yüzyılın sonlarına doğru sütte gerçekleştirilmiştir. (Arıcı, 2006).





Şekil 2: HHP Şematik Gösterimi (Hinrichs ve ark., 1996)

Yüksek basıncın inaktivasyon mekanizması fiziksel olarak Le Chatelier prensibi ile açıklanabilir. Kuvvetten kaçış olarak bilinen yasaya göre, dengede olan bir fiziksel sisteme dışarıdan bir etki yapıldığında, sistem bu etkiyi en aza indirecek şekilde kendini değişikliğe uğratar. Basınç artarsa hacim azalır ve yoğunluk artar; dolayısıyla denge, mol sayısı az olan tarafa kayar ve sistemin kimyasal dengesi değişir (Özcan ve Kurtuldu, 2011).

Yüksek basınç altında tat, koku ve vitaminler en az etkilendiği, mikroorganizmalar ile enzimler de inaktive olduğu için bu yöntem süt pastörizasyonu ve sterilizasyonu için düşünülebilir. Yüksek basınç uygulaması (100–1000 Mpa) oda sıcaklığında yapılabilen en umut verici gıda muhafaza yöntemlerinden birisidir (Pereira ve Vicente, 2010).

#### 4.1. Yüksek Basıncın Mikroorganizmalar Üzerine Etkisi :

Bakteriyel endosporların basınca en dayanıklı olan hayat formları oldukları tespit edilmiştir. Clostridium botulinum da yüksek hidrostatik basınç uygulanan mikroorganizmalar arasında basınca en dayanıklıların listesinde en başta yer almaktadır.

Aynı şekilde C. botulinum'un sporları, basınca en dayanıklı olduğu bilinen sporlar arasındadır. 17B ve Cap 9B suşlarının spor süspansiyonları 75°C'de 30 dakika boyunca 827 MPa basınç uygulamasına dayanabildikleri bildirilmektedir (Anonim, 2011b).

Çeşitli araştırmacılar yaptıkları çalışmalar sonucunda, E. coli O157:H7 ve Salmonella spp.'nin basınca karşı sporlara eşdeğer direnç gösterdikleri ve bu mikroorganizmaların gıda güvenliğindeki önemleri ile gıdalarda etkili yüksek hidrostatik basınç uygulamalarının gelişiminde büyük öneme sahip olduklarını ortaya koymuşlardır (Arıcı, 2006).

Süt ve kanatlı etlerindeki *E. coli* O157:H7 NCTC 12079 ve *S. aureus* NCTC 10652'e karşı yüksek hidrostatik basınç işlemi uygulanmıştır (Patterson ve Kilpatrick; 1998; Arıcı, 2006).

UHT sütte 50°C'de 15 dakika boyunca 400 MPa'lık bir uygulama *E. coli* sayısını yaklaşık 5 logaritmik ünite düzeyinde azaltırken; aynı süre ve sıcaklıkta 500 MPa'lık bir uygulama *S. aureus* sayısını yaklaşık 6 logaritmik ünite azaltmıştır (Arıcı, 2006).

*S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* ve *E. coli* O157:H7 suşları için basınç dirençlerinin çeşitliliği belirlenmiştir (Alpas ve ark., 1994). Bununla birlikte, türlerdeki basınç dirençleri uygulama sıcaklığı 25°C'den 50°C'ye yükseltildiğinde belirgin olarak azalmıştır. *E. coli* ve *L. monocytogenes*'in oda sıcaklığında basınca en dayanıklı türler oldukları görülmüştür (Arıcı, 2006).

Çoğu mikroorganizmanın vejetatif formu 600 Mpa'da 15 dk'da ve 20-30°C'de zarar görür. HHP uygulaması ile *Listeria monocytogenes* 340 MPa'da tamamen inaktif edilebilmektedir. Ancak bu bakterinin UHT ve çiğ sütte, yüksek basınca karşı daha dirençli olduğu bildirilmiştir (Simpson ve Gilmour, 1997; Arıcı, 2006).

## 5. ULTRASOUND

Ultrasound veya bir başka deyişle sonikasyon gıda endüstrisi için umut vadeden alternatif teknolojilerden biridir. Termosonik (ısı ve sonikasyon), manosonik (basınç ve sonikasyon), ve manotermosonik (ısı, basınç ve sonikasyon) işlemler mikroorganizmaların inhibisyonu amacıyla etkili bir şekilde kullanılabilir (Güleç, 2006).

Mikroorganizmaların yok olması zamana ve ultrasonik uygulamanın gücüne bağlıdır. Bakteri üzerine ultrasonun öldürücü etkisi, stoplazmatik membranın tahrip edilmesine dayanır (Anonim, 2011b).

Ultrasoundun hücrelerde oluşturduğu yıkım etkisi konusunda farklı teoriler mevcuttur. Ultrasonik dalga bir sıvıdan geçtiğinde çok küçük kabarcıklar veya boşluklar meydana getirmektedir (kavitasyon oluşumu). Bu kabarcıklar sönmüştükleri anda o noktalarda lokal olarak yüksek sıcaklık ve basınç oluşturmaktadırlar. Sıcaklık ve basınçta meydana gelen bu ani değişimler de hücre duvarının yapısının bozulmasına neden olmaktadır (Anonim, 2011b).

Mikrobiyal inaktivasyon açısından bir diğer mekanizma ise serbest radikal oluşumu ile açıklanmaktadır. Ultrasound uygulaması sırasında OH-radikalleri ve hidrojen peroksit oluşmakta ve meydana gelen bu bileşenlerin önemli bakterisidal etkileri bulunmaktadır (Anonim, 2011b).

### 5.1. Ultrasoundun Mikroorganizmalar Üzerine Etkisi:

Scherba ve arkadaşları ultrasound uygulamasının sulu süspansiyondaki *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas aeruginosa*'yı yok edebildiğini belirtmiştir (Bayraktaroğlu ve Obuz, 2006).

Gram-pozitif hücreler ise hücre duvarlarının daha kalın olması dolayısıyla gram-negatif hücrelere oranla daha dirençlidirler. Sporlar ise ultrasona karşı çok dirençlidir (Anonim, 2011b).

Yapılan bir çalışmada 5 ile 62°C arasında değişen sıcaklıklarda 20 kHz/160 W'lık bir uygulamada *Streptococcus faecium* ve *Streptococcus durans* inaktivasyonu incelenmiştir (Ordoñez ve ark., 1984). Ultrasonun sıcaklık ile beraber uygulanmasının çok daha etkili olduğu görülmüştür (1 logaritmik birim daha fazla azaltma etkisi).

Sütteki *Bacillus subtilis* sporları üzerinde 70-95°C sıcaklık aralıklarında ultrasound uygulaması yapılmıştır (Garcia ve ark., 1989). Tek başına ultrasound bir etki göstermezken, sıcaklıkla beraber ultrasound uygulaması spor popülasyonunu % 63-73 oranında azaltmıştır.

Yine bir çalışmada UHT sütte *Staphylococcus aureus* için önceki normlarla ultrason yöntemi uygulanmıştır (Ordoñez ve ark., 1987). Tek başına ısıl yonteme göre ultrasoundla beraber uygulanan ısıl işlemin D değerlerini % 43 daha fazla azalttığı görülmüştür (Anonim, 2011b).

Yüksek basınç ve ısısal işlemlerle kombine edilmiş ultrasound uygulamasının, *L. monocytogenes* üzerine etkili olduğu belirtilmektedir. Yoğun sıvılar ve katılar ultrasound dalgalarının yayılmasını engellediği için, bu tekniğin süt ve meyve sularının sterilizasyonu için daha kullanışlı olduğu düşünülmektedir (Bayraktaroğlu ve Obuz, 2006).

## 6. MİKROFİLTRASYON

Membran ayırma tekniklerinden mikrofiltrasyon, özellikle süt sanayinde bakteriyolojik nedenlerle uygulanan yüksek derecelerdeki ısı işleminin başta proteinler olmak üzere çeşitli bileşenler üzerindeki olumsuz etkisini önleyebilmek için kullanılan alternatif bir yöntemdir. Mikrofiltrasyon, sıvı içinde farklı boyutlardaki maddelerin geçişine izin verir. Mikrofiltrasyon molekül ağırlıkları 200 kDa'dan büyük olan partikülleri seçici olarak ayırabilme yeteneğinde, basıncı 0,1-0,5 bar arasında değişen bir tekniktir. Kullanılan membranın gözenek çapları 0.1-10 µm aralığında değişmektedir. Bu yüzden süt endüstrisi için mikrofiltrasyon, kazein miselleri gibi koloidal partiküller, serum protein agregatları ve süt yağ globülleri, somatik hücre, bakteri ve diğer mikroorganizmalar gibi biyolojik orijinli benzer hücre yapısı materyallerin ayırımında kullanılmaktadır (Yetişmeyen ve Yıldız, 2006).

### 6.1. Mikrofiltrasyonun Mikroorganizmalar Üzerine Etkisi:

Yapılan bir çalışmada gözenek çapı 0,2 µm olan membranlardan *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* ve *Candida famata* mikroorganizma türlerini içeren (yaklaşık 108 adet/ml) süspansiyon, mikrofiltrasyon edildiğinde bu organizmaların geri tutulduğu görülmüştür. Pastörizasyonla (72°C/15 sn) % 98 oranında bir toplam bakteri redüksiyonu sağlanırken, mikrofiltrasyon ile bu oranın % 99,9 düzeyinde yer aldığı yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Yetişmeyen ve Yıldız, 2006).

Mikrofiltrasyon ile yağsız sütteki bakterilerin alıkonulması üzerine yapılan çalışmalarda sütteki toplam bakterinin %99.10 ile %99.90 oranında; *Bacillus cereus* sporlarının %99.95'den fazlasının ve laktatı fermente eden bakteri sporlarının %98.40'den fazlasının tutulduğu belirlenmiştir (Özcan ve Kurtuldu, 2011).

## 7. X-IŞINLARI

Radyoaktif maddeler, atomlarının sürekli olarak parçalanması sırasında çevreye bazı ışınlar yayarlar. Bu ışınlar çarptıkları materyalde elektrik yüklü iyonların oluşmasına neden olurlar. Bu ışınlar iyonize ışın adı verilir.

Gıda ışınlama; gıdaların iyonize ışınlarla muamele edilmesidir. Gıdaların muhafazasında gama ışınları, X-ışınları ve hızlandırılmış elektron ışınları kullanılmaktadır. X-ışınları 5 MeV (milyon elektron volt) ve daha düşük enerjide çalışan kaynaklardan üretilmektedir. X-ışınlarının maddeye giriciliği ve hızı yüksek olduğu için ışınlama süresi kısadır (Atasever ve Atasever, 2007).

### 7.1. X-Işınlarının Mikroorganizmalar Üzerine Etkisi:

Bir çalışmada sığır kıymasındaki *E. coli* O157:H7'lerin % 99.9'u X-ışınları ile ortadan kaldırılmıştır (Bremssthrahlung ve ark.). Kullanılan ışınlar 107 - 108 rads/s değerindedir.

Başka bir çalışmada da sığır kıymasındaki *E. coli* O157:H7 sayısında 3 logaritmik birim kadar bir azalma görülmüştür (220 keV /40 ns) (Atasever ve Atasever, 2007).

Işınlamanın yüksek dozda (10 kGy üzeri) uygulamalarına ışınlama veya radyasyonla sterilizasyon denilmektedir. Bu amaçla kullanılan ışınlama dozları 10-45 kGy arasındadır.

Örneğin ortamdaki 1012 adet *Clostridium botulinum* sporunun öldürülmesi için 45 kGy düzeyinde bir ışınlama dozu gereklidir. Ancak böyle yüksek dozlarda gıdaların renk ve koku gibi duyuşsal özellikleri olumsuz yönde etkilenmekte, hatta gıdalarda toksikolojik değişimler de gözlenebilmektedir. Bu nedenle de gıdaların ışınlama ile sterilizasyonu yerine ışınlamanın ısı işlem, dondurma gibi diğer gıda muhafaza yöntemleri ile birlikte uygulanması önerilmektedir. Aşırı yüksek doz ışınlama özellikle fazla yağ içeren gıdalarda aroma kaybına sebep olur. Süt ve süt ürünleri de lezzetsiz bir aroma oluştuğundan dolayı ışınlamaya uygun değildir (Atasever ve Atasever, 2007).

## 8. ULTRAVİYOLE

Ultraviyole (UV) radyasyon görünür ışıktan kısa, X-ışınından uzun dalga boyuna sahip (yaklaşık 10-400 nm) bir elektromanyetik radyasyondur. UV radyasyon, dalga boyuna göre; yakın-UV (near-UV, 380-200 nm) ve uzak-UV (extreme-UV, 200-10 nm) olarak ikiye ayrılabilir. UV radyasyon kısa dalga boyu ve yüksek enerjisi nedeniyle her çeşit mikroorganizmayı öldürebilir (Özkütük, 2005).

UV ışığın en büyük antimikrobiyal etkinliği 250-260 nm (253.7 nm) dalga boyu bölgesindedir. Bu dalga boyu, DNA tarafından en etkin şekilde absorbe edilen dalga boyudur. Hücresel DNA'larca absorbe edilen UV radyasyon enerjisi, bitişik timin bazları arasında kimyasal kovalent bağları oluşturarak timin dimerleri meydana getirir. Ortaya çıkan bu timin dimerleri hücresel UV hasarının başlıca mekanizmasını oluşturur. Hücre bölünmesi öncesi kromozom replikasyonu bozulur; genlerin transkripsiyonu ve ekspresyonu yapılamaz. UV radyasyonun bu direkt antimikrobiyal etkileri dışında, ortamda ozon (O<sub>3</sub>) ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gibi serbest radikaller oluşturarak indirekt etkisinin de olduğu belirtilmektedir. Mikrobiyal inaktivasyonun sağlanması için gıdanın en az 0,04 J/cm<sup>2</sup> enerjiye maruz kalması gerekmektedir (Özkütük, 2005).

### 8.1. Ultraviyolenin Mikroorganizmalar Üzerine Etkisi:

Ultraviyole uygulamasının sütün mikrobiyal kalitesine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada 5 farklı süt üreticisinden elde edilen süt örneklerine pastörizasyon ve ultraviyole (UV) işlemleri uygulanmıştır. Uygulama yapılan örneklerde toplam aerobik mezofilik bakteri, koliform, E. coli, maya-küf, Streptococcus spp. ve Lactobacillus spp. sayımları gerçekleştirilmiştir (Engin ve ark., 2009). Elde edilen sonuçlar Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2: Sütlerin toplam aerobik mezofilik canlı, koliform ve maya-küf sayıları (Engin ve ark., 2009).

Örnek	Ortalama (log kob/ml)								
	Toplam Aerobik Mezofilik Canlı			Koliform Grup Bakteri			Maya-Küf		
	K	P	UV	K	P	UV	K	P	UV
1	4.70±0.04 <sup>a</sup>	2.01±0.01 <sup>b</sup>	2.04±0.01 <sup>b</sup>	2.30±0.01 <sup>a</sup>	<1 <sup>b</sup>	<1 <sup>b</sup>	4.68±0.13 <sup>a</sup>	<1 <sup>b</sup>	3.49±0.17 <sup>a</sup>
2	4.97±0.15 <sup>a</sup>	2.04±0.01 <sup>c</sup>	3.27±0.01 <sup>b</sup>	2.69±0.08 <sup>a</sup>	<1 <sup>b</sup>	<1 <sup>b</sup>	4.14±0.01 <sup>a</sup>	<1 <sup>b</sup>	3.64±0.17 <sup>a</sup>
3	6.08±0.01 <sup>a</sup>	2.28±0.01 <sup>c</sup>	3.31±0.01 <sup>b</sup>	3.40±0.19 <sup>a</sup>	<1 <sup>b</sup>	<1 <sup>b</sup>	5.32±0.32 <sup>a</sup>	<1 <sup>b</sup>	4.84±0.01 <sup>a</sup>
4	6.03±0.01 <sup>a</sup>	<1 <sup>c</sup>	4.20±0.11 <sup>b</sup>	4.61±0.11 <sup>a</sup>	<1 <sup>b</sup>	<1 <sup>b</sup>	5.24±0.01 <sup>a</sup>	<1 <sup>b</sup>	4.70±0.01 <sup>a</sup>
5	5.80±0.01 <sup>a</sup>	2.16±0.01 <sup>c</sup>	3.68±0.14 <sup>b</sup>	3.65±0.03 <sup>a</sup>	<1 <sup>b</sup>	<1 <sup>b</sup>	5.96±0.20 <sup>a</sup>	<1 <sup>c</sup>	4.51±0.01 <sup>b</sup>

\*Aynı satırda ve aynı mikroorganizma grubunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0.01).

K: Çiğ süt, P: 65°C'de 30 dakika pastörize edilmiş süt, UV: Ultraviyole uygulanmış süt

Tablo 3: Sütlerde *Streptococcus spp.* ve *Lactobacillus spp.* sayısı (Engin ve ark., 2009).

Ortalama (log kob/ml)						
Örnek	<i>Streptococcus spp.</i>			<i>Lactobacillus spp.</i>		
	K	P	UV	K	P	UV
1	5.42±0.01 <sup>a</sup>	2.14±0.06 <sup>b</sup>	2.14±0.01 <sup>b</sup>	4.42±0.03 <sup>a</sup>	<1 <sup>b</sup>	2.25±0.02 <sup>b</sup>
2	5.54±0.14 <sup>a</sup>	3.35±0.01 <sup>c</sup>	4.51±0.01 <sup>b</sup>	5.27±0.04 <sup>a</sup>	2.57±0.08 <sup>b</sup>	2.88±0.04 <sup>b</sup>
3	6.21±0.01 <sup>a</sup>	3.78±0.01 <sup>c</sup>	4.56±0.01 <sup>b</sup>	5.46±0.29 <sup>a</sup>	2.82±0.02 <sup>b</sup>	3.13±0.01 <sup>b</sup>
4	6.04±0.04 <sup>a</sup>	4.44±0.01 <sup>b</sup>	4.48±0.01 <sup>b</sup>	5.97±0.13 <sup>a</sup>	<1 <sup>c</sup>	4.48±0.01 <sup>b</sup>
5	5.82±0.12 <sup>a</sup>	4.48±0.01 <sup>b</sup>	4.83±0.02 <sup>b</sup>	5.92±0.02 <sup>a</sup>	<1 <sup>b</sup>	3.57±0.35 <sup>b</sup>

\*Aynı satırda ve aynı bakteri cinsinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0.01).

K: Çiğ süt, P: 65°C'de 30 dakika pastörize edilmiş süt, UV: Ultraviyole uygulanmış süt

Süt örneklerinin toplam aerobik mezofilik bakteri ve koliform popülasyonu üzerine UV uygulamasının pastörizasyon işlemi kadar etkili olduğu ve önemli düzeyde redüksiyon sağladığı tespit edilmiştir. Ancak UV uygulamasının maya-küf ve *Streptococcus spp.* üzerine etkisinin daha düşük olduğu belirlenmiştir (Engin ve ark., 2009).

## 9. SALINIMLI MANYETİK ALAN

Manyetik alan gıdalarda mikrobiyal inaktivasyon açısından potansiyel etkiye sahip bir yöntemdir. Manyetik alan yoğunluğu ya sabittir ya da zamanla sinüzoidal dalgalar şeklinde değişir. Manyetik alan genel olarak, mikroorganizmaların gelişme ve çoğalmaları üzerinde etkilidir (Anonim, 2001b).

### 9.1 Salınımlı Manyetik Alanın Mikroorganizmalar Üzerine Etkisi:

Manyetik alan mikroorganizmaların DNA sentezlenmesinde, biyomembranların veya biyomoleküllerin diziliminde ve plazma membranı arasında iyonik harekette değişikliğe ve sonuç olarak hücrenin çoğalma hızında değişikliğe sebep olmaktadır. 5 - 50 Tesla arası manyetik alan yoğunluğunda 5 - 500 kHz arası frekans ile tek bir atım uygulanmasının mikroorganizma sayısını en az 2 log azalttığı belirtilmektedir. Gıdanın bu uygulamaya toplam maruz kalma süresi genelde 1 ile 100 atım arası, 25 µsn ile 10 milisaniye arasındadır (Anonim, 2001b).

Bu teknolojinin uygulanabilmesi için en önemli gereklilik gıdanın yüksek elektrik dirence (10 - 25 ohm-cm) sahip olmasıdır. Yüksek frekanslar (>500 kHz) kullanılması inaktivasyon açısından daha az etkili olup gıdanın ısınma riski bulunmaktadır. Bu yöntemin süt, yoğurt, portakal suyu ve hamurlarda bu bağlamda uygulaması mevcuttur. 2-25 T ve 5-500 Hz'lik manyetik alanda bakteriyel popülasyonda 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> kob/g'lık bir azalma olduğu görülmüştür (Hofman, 1985; Anonim, 2001b).

Mikroorganizmalar üzerine çeşitli özellikteki manyetik alanların etkisini özetleyen sonuçlar Pothakamury ve ark. (1993) tarafından özetlenmiş ve Tablo 4'de gösterilmiştir (Anonim, 2011b).

Tablo 4: Mikroorganizmalar Üzerine Çeşitli Özellikteki Manyetik Alanların Etkisi

Mikroorganizma	Manyetik Alan Tipi	Alan Şiddeti (T)	Atım Şiddeti (Hz)	Etkisi	Referans
<i>Staphylococcus aureus</i>	Statik	1.5	0	3. ve 6. saatler arasında gelişim hızı artmış, 6-7 saatler arası tekrar düşmüştür.	Gerenscer ve ark., 1962
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	salınlımlı	0.015	0.1-0.3	Atımların sıklaştırılmasıyla uyarılma düzeyi de artmıştır.	Moore, 1979
<i>Bacillus subtilis</i>	statik	0.03	0	Gelişim engellenmiştir.	Moore, 1979
<i>Streptococcus thermophilus</i> (sütte)	salınlımlı	12.0	6000 (1 atım)	Hücre popülasyonu 25000 hücre/ml'den 970'e düşmüştür.	Moore, 1979

## 10. SONUÇ

Gıdaların genel kalitesine ve besinsel değerine daha az etki edecek yeni gıda işleme yöntemlerinin tüketici tarafından istenmesi nedeniyle yeni ve alternatif pastörizasyon ve sterilizasyon yöntemleri önem kazanmaktadır. Yeni teknolojiler arasında olan ısı olmayan işlemler tek başlarına ve diğer muhafaza yöntemleri ile beraber kullanılarak duyu ve besin içeriği açısından kaliteli ürün elde edilmesinde başarıyla kullanılabilir teknikler olarak görülmektedir. Bu yöntemlerle, gıdanın yapısında yüksek sıcaklıkların etkisiyle açığa çıkan, uçucu tat-koku maddeleri, vitaminler ve diğer besin öğeleri kaybı, tekstür bozuklukları, tatta meydana gelen değişimler gibi olumsuzluklar ortadan kaldırılabilir.

Sütün raf ömrünün uzatılmasını amaçlayarak geliştirilen; mikrofiltrasyon (MF), yüksek hidrostatik basınç (HHP) teknolojisi ve vurgulu elektrik alan (PEF) gibi uygulamalar günümüzde mikrobiyolojik açıdan güvenli, gıda maddelerinin üretiminde ısı işlemlerinin yerini alabilecek yeni teknikler olarak giderek önem kazanmakta olup pek çok araştırmacı bu konular üzerine odaklanmaktadır. Ülkemiz süt endüstrisinde, sütün raf ömrünün uzatılması üzerine geliştirilen yeni tekniklerin uygulanabilirliği ile ilgili çalışmalar halen devam etmektedir. Atımlı ışık teknolojisi gıda yüzeylerinde geniş ölçüde kullanılabilir bir yöntemdir; ancak hala geniş çaplı araştırmalar gereklidir. Gıda endüstrisinde ultrasound ile mikroorganizma inaktivasyon işlemi nadir görülmekle birlikte genel olarak diğer koruma yöntemleri ile birlikte kullanılmaktadır ve de bu kombinasyonlar gıda endüstrisinde önemli bir potansiyele sahiptir. UV kullanımına ise özellikle meyve sularında rastlanmaktadır. Yeni bir uygulama olan yüksek voltaj teknolojisi elektroliz ve oluşan kimyasal maddelerden dolayı sıvıların pastörizasyonunda uygun olmayabilir. Manyetik alan uygulaması da tartışmalı sonuçlar ortaya çıkarabilir. Bu yöntemin etkinliğinin belirlenmesi için daha fazla araştırma yapılmalıdır.

## 11. KAYNAKLAR

- Alpas, H., Kalchayandand, N., Sikes, T., Dunne, C.P. and Ray, B., 1994. Hydrostatic pressure among strains of foodborne pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4248-4251.
- Anonim, 2011a. <http://www.food.hacettepe.edu.tr> – 15.06.2011a.
- Anonim, 2011b. <http://www.fda.gov/food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm100158.htm>. A report of the Institute of Food Technologists for the Food and Drug Administration of the U.S. Department of Health and Human Services. Erişim: 11.10.2011.
- Arıcı, M., 2006. Gıda Muhafazasında Yüksek Hidrostatik Basıncın Mikroorganizmalar Üzerine Etkisi, Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, *Journal of Tekirdağ Agricultural Faculty*.
- Atasever M., Atasever M, 2007. Işınlamanın Gıda Teknolojisindeki Kullanımı, Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg. 2 (3) 107-116.
- Bayraktaroğlu G., Obuz E., 24-26 Mayıs 2006. Ultrasound Yönteminin İlkeleri ve Gıda Endüstrisinde Kullanımı, Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu.
- Castro AJ, Swanson BG, Barbosa-Cánovas GV, Zhang Q.H. 2001. Pulsed electric field modification of milk alkaline phosphatase activity. In G.V.Barbosa-Cánovas, Q.H. Zhang (Eds.), *Pulsed electric fields in food processing. Fundamental aspects and applications*. Technomic Publishing Company Inc. Lancaster, PA.pp:65-82
- Coimbra J.S.R., Teixeira J.A., 2010. *Engineering Aspects of Milk and Dairy Products*, CRC Press.
- Craven, H.M., Swiergon, P., Ng, S., Midgely, J., Versteeg, C., Coventry, M.J. & Wan, J., 2008. Evaluation of pulsed electric field and minimal heat treatments for inactivation of pseudomonads and enhancement of milk shelf-life. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9:211–216.
- Cserhalmi Z, Vidacs I, Beczner J, Czukor B. 2002. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus cereus* by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3(1): 41-45.
- Dunn, J.E., Clark RW, Asmus JF, Pearlman JS, Boyer K & Parrichaud F., 1988. Method and apparatus for preservation of foodstuffs. International Patent no. WO88/03369.
- Engin, B., Güneşer, O., ve Karagül-Yüceer, Y., 2009. Ultraviyole ışınlarının sütün mikrobiyel özellikleri üzerine etkisi. *GIDA*, 34 (5): 303-308.
- Evrendilek, G.A. & Zhang, Q.H., 2005. Effects of pulse polarity and pulse delaying time on pulsed electric fields—induced pasteurization of *E. coli* O157:H7. *Journal of Food Engineering*, 68:271–276.
- Fernandez-Molina, J.J., Bermusez-Aguirre, D., Altunakar, B., Swanson, B.G. & Barbosa-Canovas, G.V., 2006. Inactivation of *Listeria innocua* and *Pseudomonas fluorescens* by pulsed electric fields in skim milk: energy requirements. *Journal of Food Process Engineering*, 29:561–573.
- Garcia, M. L., Burgos, J., Sanz, B. and Ordoñez, J. A., 1989. Effect of heat and ultrasonic waves on the survival of two strains of *Bacillus subtilis*. *J Appl Bacteriol.* 67:619-628.
- Gerencser, V.F., Barnothy, M.F., and Barnothy, J.M. 1962. Inhibition of bacterial growth by magnetic fields. *Nature*, 196:539-541.
- Grahl T, Märkl H. 1996. Killing of micro-organisms by pulsed electric fields. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45:148-157.
- Güleç H., 24-26 Mayıs 2006. Modern Gıda Muhafazasında Vurgulu Elektrik Alan ve Ultrason Uygulamaları, Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu.
- Hinrichs J., B. Rademacher and H. G. Kessler. 1996. Food processing of milk products with ultrahigh pressure. Heat treatments and alternative methods: International Dairy Federation (IDF) Symposium. p: 185-201. 6-8 September 1995, Vienna.
- Hofmann, G.A., 1985. Deactivation of microorganisms by an oscillating magnetic field. U.S. Patent 4,524,079.



- Moore, R.L. 1979. Biological effects of magnetic fields. Studies with microorganisms. *Can. J. Microbiol.*, 25:1145-1151.
- Ordoñez, J. A., Sanz, B., Hernandez, P. E. and Lopez-Lorenzo, P., 1984. A note on the effect of combined ultrasonic and heat treatments on the survival of thermophilic streptococci. *J Appl Bacteriol.* 56:175-177.
- Ordoñez, J. A., Aguilera, M. A., Garcia, M. L. and Sanz, B., 1987. Effect of combined ultrasonic and heat treatment (thermoultrasonication) on the survival of a strain of *Staphylococcus aureus*. *J Dairy Res.* 54:61-67.
- Özcan T., Kurtuldu O., 2011. Sütün Raf Ömrünün Uzatılmasında Alternatif Yöntemler, Uludağ. Üni. Ziraat Fakültesi Dergisi, Cilt 25, Say. 1, 119-129 (Journal of Agricultural Faculty of Uludağ University).
- Özkütük N., 2005. Mikrodalga ve Ultraviyole ile Dezenfeksiyon Uygulamaları, Kullanım Alanları ve Genel Özellikleri, 4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi.
- Patterson, M.F. and Kilpatrick, D.J., 1998. The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on inactivation of pathogens in milk and poultry. *J. Food Protect.* 61: 432-436.
- Pereira, R.N. and Vicente, A.A., 2010. Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. *Food Research International* 43:1936–1943.
- Pothakamury, U.R., Barbosa-Cánovas, G.V., and Swanson, B.G. (1993). Magnetic-field inactivation of microorganisms and generation of biological changes. *Food Technol.* 47(12):85-93.
- Qin B, Pothakamury U, Vega H, Martin O, Barbosa-Cánovas GV, Swanson B. 1995. Food pasteurization using high intensity pulsed electric fields. *Food Technology*, 49(12): 55-60.
- Seçkin, A. K ve Özgören E., 2011. Gıda Endüstrisinde Darbeli Elektrik Alan Uygulamaları. *Gıda ve Yem Bilimi - Teknolojisi Dergisi / Journal of Food and Feed Science - Technology* 11:39-48.
- Sensoy, I., Zhang, Q.H. & Sastry, S.K., 1997. Inactivation kinetics of *Salmonella* Dublin by pulsed electric field. *Journal of Food Process and Engineering*, 20:367–381.
- Sepulveda D, Góngora-Nieto M, Guerrero-Beltrán J, Barbosa-Cánovas G.V. 2003. Extension of milk shelf-life by a hurdle combination of pulsed electric fields and a mild thermal treatment. Institute of Food Technologists, Annual Meeting, Book of Abstracts, s. 92C-6.
- Simpson, R.K. ve Gilmour, A., 1997. The effect of high hydrostatic pressure on the activity of intracellular enzymes of *Listeria monocytogenes*. *Let. Appl. Microbiol.* 25: 48-53.
- Sobrino-Lopez, A. & Martin-Belloso, O., 2006. Enhancing inactivation of *Staphylococcus aureus* in skim milk by combining high intensity pulsed electric fields and nisin. *Journal of Food Protection*, 69:345–353.
- Yetişmeyen A., Yıldız F., 24-26 Mayıs 2006. Süt Endüstrisinde Mikrofiltrasyonun Kullanımı, Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu.



## SÜT ENDÜSTRİSİNDE SU KALİTESİ VE ÖNEMİ

Elif ÖZER\*

Harun KESENKAŞ \*\*

Özer KINIK\*\*\*

### ÖZET

Su değerli ve vazgeçilemez bir kaynaktır. Özellikle gıda fabrikaları için suyun önemi büyüktür. Su, ürün bileşiminde bulunmasının yanında soğutma, yıkama, temizleme, buhar üretimi ve hammaddenin taşınması gibi gıda proseslerinde çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Süt endüstrisinde ise su ayran, yoğurt, tereyağı, peynir gibi ürünlerin kalitesini ve özelliklerini doğrudan etkilemektedir. Dolayısıyla suyun kalitesi ve güvenliği önem taşımaktadır. Suyun içilebilir kalitede olup olmadığının anlaşılabilmesi için fiziksel, kimyasal ve biyolojik niteliklerinin bilinmesi gerekmektedir.

Suların gıda endüstrisi açısından uygun hale getirilmesi için genellikle klorlama, ozon, filtrasyon ve UV radyasyon gibi yöntemler kullanılmaktadır. Suda oluşabilecek tehlikeler söz konusu yöntemlerle kontrol altına alınmalı ve kontrollerin etkinliği belirlenmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** Su kalitesi, gıda endüstrisi, süt ürünleri, süt endüstrisi, dezenfeksiyon yöntemleri.

## İMPORTANCE OF WATER QUALITY IN DIARY INDUSTRY

### ABSTRACT

Water is a valuable and indispensable source. Especially for food factories water is of great importance. In food processing, water is used as a combination of product, also for various purposes such as cooling, washing, cleaning, steam production and transportation of the raw material. In case, in dairy industry water directly affects the quality and the features of the products such as milk based drinks, yogurt, butter, cheese. Therefore water quality and safety are very important. In order to understand whether water has drinking quality or not, its' physical, chemical and biological properties must be known. To make waters appropriate for the food industry usually chlorination, ozone, filtration, UV radiation methods are used. Hazards that may occur in water should be taken to control by these methods and effectiveness of methods should be determined.

**Key Words:** Water quality, food industry, dairy products, milk industry, disinfection methods.

\*Araştırma Görevlisi, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü-İZMİR

\*\*Doç.Dr., Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü-İZMİR

\*\*\*Prof.Dr., Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü-İZMİR

## 1. GİRİŞ

Su, değeri gün geçtikçe artan kıt bir kaynak olup, kalitesi ve güvenliği göz ardı edilemez. Su ile ilgili potansiyel biyolojik, fiziksel ve kimyasal riskler iyi kontrol edilmeli, suyun en önemli kullanım alanlarından biri olan gıda proseslerinde yararlanılan su içme suyu kalitesinde olmalı, üretim için herhangi bir risk teşkil etmemeli ve personel üzerinde negatif bir etkisi olmamalıdır. Bundan dolayı, gıda işletmelerinde kullanılacak su çeşitli yönlerden ele alınmalıdır:

Su bakteriyolojik açıdan ele alındığında; patojenik bakteri içermemeli ve toplam bakteri içeriği düşük olmalıdır. Toplam bakteri sayısı ise İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik'te belirtilen sınır değerleri geçmemelidir. Koliform grubu bakteri ve Enterekoklar bulunmamalıdır. Toksikolojik açıdan ele alındığında su çeşitli toksik ingrediyeentler (fulorür, siyanid, arsenik, selenyum, kadmiyum, krom vs.) açısından da güvenilir olmalıdır. Kimyasal yönden ise su, pH 6.5-8.5 aralığına karşılık gelen uygun

hidrojen iyonu içermeli, ve ağızda belirli bir sertlik derecesini karşılayan hafif buruk bir tat bırakmalıdır. Aynı zamanda demir, manganez, çinko ve bakır iyonları ve bazı diğer iyonlar belirli limitlerde olmalıdır. Görünüş itibarıyla ise su; renksiz, kokusuz olmalı, askıda katı madde, suda yüzen materyal, tortu, olgun larva ve diğer benzerlerini bulundurmamalıdır (Kayaardı, 2004; Wujie et al. 2011; Winkler and Nikoleski, 2012).

Suyun en büyük kullanım alanlarından biri olan gıda proseslerinde sudan; ürün bileşimi olarak, ayrıca soğutma, yıkama, temizleme, buhar üretimi ve hammaddenin taşınması gibi çeşitli amaçlarla yararlanılmaktadır. Ancak, söz konusu işlemlerde yüksek kalitede olması istenilen su gerek içinde doğal olarak bulunan, gerek sonradan karışan maddeler nedeniyle kontamine olmuş ve kabul edilemeyecek duruma gelmiş olabilir (Şahin, 2008). Bu derlemenin amacı çeşitli şekillerde süt endüstrisinde kullanılan suyun temizlik ve kalitesinin önemine dikkat çekmek, suyun kontaminasyon kaynaklarına ve süt sanayinde kullanımına uygun hale getirmek için kullanılan dezenfeksiyon yöntemlerine değinmektir.

## 2. KONTAMİNASYON KAYNAKLARI

Suyun içilebilir kalitede olup olmadığının anlaşılabilmesi için fiziksel, kimyasal ve biyolojik niteliklerinin bilinmesi gerekmektedir. Suda oluşabilecek fiziksel tehlikeler genellikle filtrasyonla kontrol altına alınabilmekte ve kontrollerin etkinliği sudaki bulanıklık ölçümleriyle belirlenebilmektedir. Sudaki kimyasal riskler ise organik bileşikler, birçok kontaminantı (pestisitler vs.) ve elementleri (ağır metaller) kapsamaktadır.

Biyolojik risklerde ise, duyulan endişe yalnızca organizmaların varlığı değil, bunların yaratacağı olası tehlikelerdir. Örnek verecek olursak, suda bulunan bazı alg türleri toksin oluşumuna neden olmaktadır. Bakterileri, virüsleri, protozoaları ve parazitleri içeren su orijinli mikroorganizmalar potansiyel hastalık kaynaklarıdır (Winkler and Nikoleski, 2012).

Sularda en çok rastlanan mikroorganizmalar Pseudomonas, Bacillus, Micrococcus, Alcaligenes ve Flavobacterium türü bakterilerdir. Doğal olarak içme sularında fekal mikroorganizmalar bulunmamalıdır. Bunların varlığı suda patojen bakterilerin olduğunun göstergesidir. İnsan ve hayvan orijinli kullanım sularının ve kanalizasyon sularının içme suyu kaynaklarına bulaşması sonucu suda koliform grubu mikroorganizmalar bulunmaktadır. Koliform ve enterokoklar bağırsak kökenli bakterilerdir. Fekal koliformlar, Salmonella türleri için indikatör bakteri olarak kabul edilmektedir WHO'a göre şişelenmiş içme sularında mezofilik aerob toplam bakteri sayısı 100/ml'den fazla olmamalı, fekal bulaşma indikatörü mikroorganizmalar bulunmamalıdır. Ülkemizde ilgili yönetmeliklere göre içme ve kaynak sularının 250 ml'sinde koliform grubu bakteri, enterekoklar, E. coli, P. aeruginosa, 100 ml'sinde patojen stafilkokoklar, 5L'sinde parazitler, 50ml'sinde ise aerob sporlu sülfid redükte eden bakteriler bulunmamalıdır (Çizelge1).

Gıda endüstrisi açısından su kalitesine bakıldığında dikkatler özellikle Legionella ve Cryptosporidium'a çevrilmiştir. İçme sularının geleneksel yöntemlerle arıtıldığı yerlerde Cryptosporidium potansiyel bir tehlikedir. Özellikle C. parvum tarafından oluşturulan gastroenteritis vakalarında son yıllarda meydana gelen artış dikkat çekicidir. Bu protozoon kimyasal dezenfektanlara karşı dayanıklı ancak kurutmaya ve UV ışığına karşı duyarlıdır. Legionella ise solunum yoluyla iletilmekte ve ciddi solunum yolu rahatsızlıklarına neden olabilmektedir. Bu bakterinin gelişme karakteristiğine bakıldığında, su sıcaklığının 20°C'nin altında ve

60°C'nin üstünde olması bakterinin sistemde çoğalmasını önlemektedir (Robertsen et al. 1992; Uğur ve ark., 2001; Kirby et al. 2003; Dawson, 2005; Winkler and Nikoleski, 2012).

Geçirgenlikteki bu artış, dışarıdan uygulanan elektrik alanın gücü kritik değere eşitse ya da kritik değeri çok az aşmışsa geri dönülebilir düzeydedir. Gıdaların pastörizasyonunda ise bu değer aşılması ve hücre duvarlarında geri dönüşümsüz tahribat için işlem süresi veya şiddeti arttırılmaktadır. Membranın zarar görmesinin nedeni küçük moleküllerin ve iyonların sızmasından dolayı oluşan ozmotik basıncıdaki dengesizliktir. Sitoplazmik içeriğin ozmotik basıncından dolayı hücre şişmeye başlar ve porlar büzülür. Hücre hacmi çok arttığında da hücre membranı parçalanır ve dağılır (Anonim, 2011a).

Çizelge 1. İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik'te Yer Alan Mikrobiyolojik Parametreler ve Sınır Değerler

Parametre	Parametrik Değer	
	İçme Suları ve Kaynak Suları için	İçme - kullanma Suları için
<i>E. coli</i>	0/250 ml	0/100 ml
Enterokok	0/250 ml	0/100 ml
Koliform bakteri	0/250 ml	0/100 ml
<i>P. aeruginosa</i>	0/250 ml	-
Anaerob sporlu sülfid redükte eden bakteriler	0/50 ml	-
Patojen Stafilokoklar	0/100 ml	-
Kaynaktan alınan numunede maksimum: 22 °C'de koloni sayımı 37 °C'de koloni sayımı	20/ml 5/ml	
İmlâhanede ambalajlandıktan sonra alınan numunede; 22 °C'de koloni sayımı 37 °C'de koloni sayımı	100/ml 20/ml	-
Piyasada satılan ambalajlı sulardan alınan numunede maksimum: 22 °C'de koloni sayımı 37 °C'de koloni sayımı	İmlâhane için belirlenen sınır değer on katını geçemez.	
Parazitler	0/5 L	-

### 3. SÜT ÜRÜNLERİ ve SU

Suyun süt sanayinde çok önemli uygulama alanları bulunmaktadır. Fakat su, mikrobiyolojik kalitesi iyi değilse süt ve süt ürünleri açısından çok ciddi bir risk faktörü oluşturabilmektedir. Süt endüstrisinde kullanılan su içilebilir nitelikte olmalıdır. Suyun sürekli ve yeterli sağlanması önemlidir. Suyun basınç ve sıcaklığının kontrolü için uygun tesisat bulunmalı, su arıtımı ile ilgili kayıtlar düzenli tutulmalıdır. Buz, eğer ürünle temas edecek şekilde kullanılacaksa, içilebilir nitelikte sudan üretilmiş olmalı, uygun hijyenik koşullarda taşınmalı ve depolanmalıdır. Aynı şekilde gıda ve gıda ile direk temas eden madde ve malzemelerle doğrudan temas eden yüzeylerde kullanılan buhar, içilebilir nitelikte sudan elde edilmelidir. Gıda ile temas etmemesi gereken su tamamen ayrı hatlarda taşınmalıdır (Mostert and Buys, 2008; Anon., 2010). Diğer bir deyişle süt sanayinde çeşitli proseslerde farklı amaçlarla kullanılacak su İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik'te belirtilen değerlere uygunluk göstermelidir.

**3.1. Ayran:** Geleneksel bir ürünümüz olan ve ülkemizde oldukça yüksek miktarda tüketilen ayran, süte su katarak veya yoğurda su katarak olmak üzere iki farklı yöntem ile üretilmektedir. Bu yöntemlerin ilkinde yoğurt üretiminde olduğu gibi homojenizasyon, ısıtma işlemi, kültür ilavesi ve inkübasyon işlemleri uygulanmakta; diğer yöntemde ise öncelikle yoğurt üretimi yapılmakta, pıhtısı kırılan yoğurda istenilen kurumadde değerine göre su ilavesi yapılmaktadır. Ayran üretiminde kullanılan suyun kalitesi çok önemlidir. Kullanılan suda patojen bulunmamasına rağmen üründe bozulmaya neden olacak mikroorganizma bulunabilmektedir. Özellikle yoğurttan ayran yapılıyorsa su mutlaka ısıtma işlemi görmelidir. Dolayısıyla ayran üretiminde kullanılacak su; içilebilir nitelikte olmalı, mikrobiyal, fiziksel ve kimyasal kontaminant içermemelidir (Anon., 2007).

**3.2. Peynir:** Peynir teknolojisinde bazı peynirlerin imalatında pıhtı+peynir suyu karışımına su katılması, yani pıhtı yıkama işlemi yapılmaktadır. Bu uygulamanın asıl amacı, telemede öngörülen pH değerini aşmamak için asitliği ayarlamak ve daha yumuşak bir tat elde etmektir. Bu uygulamayla telemedeki laktik asit, laktoz ve mineral madde oranı azaldığı için peynirin pH değeri belli bir düzeyde tutulabilmekte, tat ve yapı da olumlu yönde etkilenmektedir.

Süt endüstrisinde peynir üretiminde kullanılan suyun önemi bununla sınırlı değildir. Çeşitli tip plastik kaplarda ya da tenekelerde salamura içinde olgunlaştırılan peynirlerde de su kalitesi ürünü doğrudan etkilemektedir. Bu tür peynirler Türkiye'den en iyi örnek Beyaz peynirdir (Üçüncü, 2004).

**3.2. Tereyağı:** Tereyağı üretim teknolojisinde yayıkla sonunda, tereyağı granülleri arasında kalan yayıkaltını tamamen uzaklaştırmak için yıkama işlemi yapılmaktadır. Bu işlem sayesinde asitlikte düşme sağlanarak tereyağının dayanma gücü artırılmaktadır. Ayrıca, tereyağının tekstürü yıkama işlemiyle düzeltilmekte ve düşük kaliteli kremadan elde edilen yağlarda oluşabilecek yavan tat bir dereceye kadar giderilebilmektedir. Dolayısıyla kullanılan suyun kalitesi tereyağı üretiminde de ürünü doğrudan etkilemektedir. Yıkamada kullanılan su mikrobiyolojik ve kimyasal yönden yeterli kalitede olmalıdır (Yetişmeyen, 1995).

**3.3. UHT Süt:** Çiğ sütün UHT süte işlenmesinde "direkt" ve "indirekt" olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmaktadır. Direkt ısıtma yönteminde yeterince ısıtılmış buharla süt karıştırılmakta (üperizasyon), indirekt yöntemde ise ısıtıcı ortam ile süt arasındaki bir yüzey boyunca aktarılmaktadır. Direkt sistemlerde sterilizasyon aşamasında ya aşırı ısıtılmış buhar süt akımına verilmekte, ya da bir infüzyon odasında süt aşırı ısıtılmış buhar içine püskürtülmekte veya ince bir film halinde akıtılmaktadır. Dolayısıyla, direkt sistemle çalışan UHT işletmelerinde, kullanılan buhar ürün kalitesi üzerinde doğrudan etkili olduğundan buhar kazanına giren suyun kalitesi ve gördüğü işlemler çok önemlidir (Numanoğlu, 2006).

### 4. SÜT İŞLETMELERİNDE KULLANILACAK SUYUN TEMİZLENMESİ

Suyun temizlenmesi; su içinde bulunan yabancı maddelerin çıkarılarak içilebilir hale getirilmesi, dezenfekte edilerek sağlık riski olmayan, güvenilir bir nitelik kazandırılması için uygulanan işlemlerdir. Isıtma işlemi ve UV ışınları suyun fiziksel dezenfeksiyonu için kullanılırken; iyot, ozon, klor gibi dezenfektanlardan kimyasal dezenfeksiyonda yararlanılmaktadır (Uğur ve ark., 2001).

Suyun temizlenmesi için en uygun tekniğin seçimi su kaynağına, sistem dizaynına ve işlem yapılacak suyun kullanım amacına bağlıdır. Çizelge 2'de sudaki risklere yönelik en yaygın kontrol teknikleri özetlenmiştir.

**4.1. Filtrasyon:** Kontaminasyon riskine bağlı olmakla birlikte, filtrasyon suyun katı maddeleri tutan bir

filtreden geçirilmesi prensibine dayanmaktadır. Filtrasyon metotları daha büyük parçacıkları tutmak için kullanılan gözenekli filtrelerden, küçük asılı partikülleri ve mikroorganizmaları tutmak için kullanılan membran filtrasyon yöntemlerine kadar çeşitlilik göstermektedir. Ancak herhangi bir mikrobiyolojik gelişme riskine karşılık filtreler kullanılmadıklarında da suyun sürekli devir daimi gerekmektedir (Winkler and Nikoleski, 2012).

**4.2. Klorlama:** Klorlama suların dezenfeksiyonunda kullanılan en yaygın oksitleyici metottur. Klorun popülaritesinin sebebi; ucuz olması, mikroorganizmalara karşı etkisinin yüksek olması ve kullanım kolaylığıdır. Sulara düşük miktarda klor ilavesi, mikroorganizmalara dolayısıyla sudan kaynaklanabilecek hastalıklara karşı yeterli bir önlemdir. Bu amaçla klor, ya sodyum hipoklorit veya kalsiyum hipoklorit gibi klorlu bileşiklerin çözeltisi şeklinde ya da gaz olarak (klorit-dioksit) uygulanır. Hipoklorit otomatik sistemlerde suyun sürekli klorlanması için uygun bir yöntemken, dezavantajı yüksek korozif etki göstermesidir. Klorit-dioksitin ise stabil olmayan bir karakterde olması ve kullanım noktasında elde edilmesi zorunluluğuna karşı, avantajı hipoklorite göre daha az korozif etki göstermesidir. Ayrıca sütteki mikroorganizmaların bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jelsi bir tabaka içinde yaşayan topluluk olarak tanımlanan biyofilmlere karşı hipokloritten daha iyi etki göstermektedir. Bu jelsi tabaka “ekzopolisakkarit” adı verilen polisakkarit bazlı bir ağ yapısıdır. Biyofilmlerin hem endüstriyehem de sağlık üzerine ciddi olumsuz etkileri vardır. Dolayısıyla klorit-dioksit klorlamada tercih edilen bir metot olarak karşımıza çıkmaktadır (Gün ve Ekinci, 2009; Winkler and Nikoleski, 2012).

Bu yöntemde etkili bir dezenfeksiyon için klor konsantrasyonunun en az 0.5 mg/L olması ve klorun suyla en az 30 dakika temas ettirilmesi gerekmekte, ayrıca suyun pH'sı 6-7 olduğunda klor en iyi etkiyi göstermektedir. Klorla dezenfeksiyon: basit klorlama, amonyaklı klorlama ve süperklorlama olmak üzere üç farklı şekilde yapılabilmektedir (Uğur ve ark., 2001; Kayardı, 2004).

**4.3. Ozon:** Ozon güçlü oksitleyici bir maddedir. Ozonun sterilizasyon etkinliği klordan üstündür, bakterisit etkisi klordan 10 kat daha çabuktur. Normal sıcaklıkta, ozon mavi renk veren bir gazdır. Fakat genellikle renksiz gözüktür, sıvı ozon ise koyu mavidir. Üstün özellikleri ve sudaki yüksek çözünürlüğü nedeniyle ozon suların dezenfeksiyonu için çok uygun bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Suya 0.4 mg/L konsantrasyonda beş dakika süreyle uygulanması yeterlidir, sporların varlığında ise konsantrasyonu 2 mg/L'ye çıkarmak gerekmektedir. Ayrıca ozon Çevre Koruma Örgütü (EPA) tarafından içme sularında daha önce de değinildiği üzere sularda ciddi sorun teşkil eden *C. parvum* varlığının en etkili kontrol mekanizması olarak ilan edilmiştir. Bu parazitin serbest klorla inaktivasyonu zor iken serbest ozon uygulamasında kolaylıkla inaktive olabilmektedir. Ozonun tüm bu üstünlüklerine rağmen, elde edilmesinin ve kullanılmasının ekonomik olmayışı uygulama alanının kısıtlı olmasına neden olmaktadır (Uğur ve ark., 2001; Kuşçu ve Pazır, 2004; Wujie et al. 2011; Winkler and Nikoleski, 2012).

Çizelge 2. Sudaki risklere yönelik en yaygın uygulanan kontrol teknikleri (Winkler and Nikoleski, 2012)

Tehlikeli madde	Filtrasyon	Membran filtrasyon	İyon değişimi	Klorlama Ozonlama	UV radyasyon	Nötralizasyon	Elektro-kimyasal aktive su
Katılar	X	X					
Sertlik içeren tuzlar		X	X				
pH ayarlaması		X				X	
Diğer kimyasal kontaminantlar	X	X	X				
Bakteri		X		X	X		X
Virüs		X		X virüs türüne bağlı	X		X
Protozoon		X		X <i>Cryptosporidium</i>	X <i>Cryptosporidium</i>		X
Alg toksinleri						X kontaminasyon türü tespit edildiye	X

**4.4. UV Radyasyon:** Mikroorganizmalar kısa dalga boyundaki UV ışınlarıyla inaktive edilebilmektedirler İşlem esnasında mikroorganizma hücrelerinin DNA'ları zarar görmektedir. Mikroorganizmaların protein ve nükleik asitleri spektrum enerjisini absorbe etmekte, böylece proteinleri denatüre olmakta ve sonuç olarak mikroorganizmalar ölmektedir. UV ışın kaynağı şeffaf bir koruyucu kılıfta tutulmuş olup, suyun geçebileceği bir akış odasında bekletilmektedir. Uygulamanın avantajı işlem esnasında herhangi bir kimyasalın kullanılmaması, işlemin kısa sürmesi ve sterilizasyon etkinliğinin yüksek olmasıdır. Ancak, sürekli bir sterilizasyonun sağlanamaması ve ekonomik olmaması yaygın bir kullanım alanı olmasını engellemektedir (Wujie et al. 2011; Winkler and Nikoleski, 2012).

## 5. SONUÇ

Su en değerli doğal kaynaklarımızdan biridir. Fakat suyun çeşitli etkenlerle kontaminasyonu kaçınılmazdır. Suyun süt ürünleri proseslerinde kullanımı söz konusu olduğunda hem insan sağlığı, hem de ürün kalitesi açısından önemi göz ardı edilemez. Dolayısıyla su ile ilgili potansiyel biyolojik, fiziksel ve kimyasal riskler iyi kontrol edilmeli, suyun en önemli kullanım alanlarından biri olan süt endüstrisinde kullanılan su içme suyu kalitesinde olmalı, üretim için herhangi bir risk teşkil etmemeli ve personel üzerinde negatif bir etkisi olmamalıdır. Suların gıda endüstrisi açısından uygun hale getirilmesi için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Suda oluşabilecek tehlikeler söz konusu yöntemlerle kontrol altına alınmalı, kontrollerin etkinliği belirlenmelidir ve kayıt altında tutulmalıdır.

## 6. KAYNAKLAR

- Anonim, 2007. Megep (Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi), Gıda Teknolojisi, Ayran, Ankara, 50 s.
- Anonim, 2010. Süt ve Süt Ürünleri İyi Hijyen Uygulamaları Rehberi. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Rehber no:7, 42 s.
- Dawson, D., 2005. Foodborne protozoan parasites. *Int. J. Food Microbiol.* 103(2): 207-227.
- Gün, İ., Ekinci, F.Y., 2009. Biyofilmler: Yüzeydeki mikrobiyal yaşam. *Gıda*, 34(3): 165-173.
- Kayardı, S., 2004. Gıda Hijyeni ve Sanitasyon, SİDAS Yayınları, Manisa, 146 s.
- Kirby, R.M., Bartram, J., Carr, R., 2003. Water in food production and processing: quantity and quality concerns. *Food Control*, 14: 282-299.
- Kuşçu, A., Pazır, F., 2004. Gıda endüstrisinde ozon uygulamaları. *Gıda* 29(2):123-129.
- Mostert, J. F., Buys, E. M., 2008. Hygiene by Design, Water Quality, 75-114. *Advanced Dairy Science and Technology*, Britz T. J., Robinson, R. K. (Ed). Blackwell Publishing, UK.
- Numanoğlu, E., 2006. UHT içme sütlerinde gelişen acılaşıma ve jelleşme kusurlarının nedenleri ve çözüm yolları, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 123 s.
- Robertson, L. J., Campbell, A. T., Smith, H. V., 1992. Survival of *Cryptosporidium parvum* Oocysts under various environmental pressures. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(11): 3494-3500.
- Şahin, M., 2008. Gıda sanayinde su ve önemi, Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü, İzmir.
- Uğur, M., Nazlı, B., Bostan, K., 2001. Gıda Hijyeni, Teknik Yayınevi, 274 s.
- Üçüncü, M., 2004. A'dan Z'ye Peynir Teknolojisi-1, Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, Bornova/İzmir, 543 s.
- Winkler, A., Nikoleski, D., 2012. Ensuring water quality in food processing. *New Food*, 15(1): 51-53.
- Wujie, Zhufei, Xujing, 2011. The influence of water quality on food quality and the treatment of water for food processing. *Procedia Environmental Sciences* 10: 2671-2676.
- Yetişmeyen, A., 1995. Süt Teknolojisi, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, 229s.



## BİYOFİLM OLUŞUM MEKANİZMASI VE BİYOFİMLERİN GIDA GÜVENLİĞİNE ETKİSİ

Ecem AKAN\*

Özer KINIK\*\*

### ÖZET

Gıda kaynaklı hastalıklar, insan sağlığını her geçen gün daha fazla tehdit etmektedir. Bu hastalıklar halk sağlığı açısından büyük birer tehlikedir. Büyük ölçüde bu hastalıklara biyofilmler de neden olabilmektedir. Biyofilmler gıda endüstrisinde antimikrobiyal ajanlara ve temizliğe dirençli olan yerleşmiş mikroorganizma topluluğu şeklinde bir problem olarak ortaya çıkar.

Bu çalışmada biyofilm oluşum mekanizması, biyofilmlerin gıda güvenliğine etkisi, biyofilm oluşumunu engelleme yöntemleri değerlendirilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyofilm, antimikrobiyal ajanlar, gıda kaynaklı hastalıklar, gıda güvenliği

## BIOFILM FORMATION MECHANISM AND BIOFILMS' EFFECT ON FOOD SAFETY

### ABSTRACT

Human health is more threatened by food borne diseases day by day. These diseases are important danger in terms of community health. Biofilms can also cause these diseases widely. Biofilms which resistant to antimicrobial agents and cleaners is a community of microorganisms. In this study formation mechanisms of biofilms, their effect on food safety and prevention methods of biofilms will be reviewed.

**Key Words:** Biofilm, antimicrobial agents, food borne diseases, food safety

\*Arş.gör.Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü-AYDIN Ecem.akan@windowslive.com

\*\*Prof.Dr.Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü-İZMİR



## 1. GİRİŞ

Gıdalar; gıda ve su bazlı patojen mikroorganizmaların taşınmasında önemli bulaşma kaynakları olmaları yanında görülen genel hastalıkların önemli bir kısmını da oluştururlar. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından belirtildiği üzere gıdaya bulaşmalar, üretiminden tüketimine (tarladan-çatala) kadar her aşamada gerçekleşebilir ayrıca su, toprak, hava kaynaklı çevresel bulaşmalar da görülebilir (WHO, 2007a; WHO, 2007b.). Dünya Sağlık Örgütü'ne göre Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde bu durum büyük bir halk sağlığı sorunu olarak düşünülmektedir (WHO, 2007).

Gıda kaynaklı enfeksiyonların en önemli kaynaklarından birisinin biyofilmler olduğu belirtilmektedir (Costerton, Stewart, & Greenberg, 1999). Biyofilmler, ısının yüzeyden akışını geciktirmesi, yüzeydeki sıvının sürtünme direncinin artması, yüzeydeki kimyasal sürtünme oranının artması gibi ciddi sorunlara neden olmaktadır. Gıda endüstrisinde biyofilmlerin sorun oluşturduğu en önemli sektörler arasında süt (Chmielewski & Frank, 2003), et (Sofos & Geornaras, 2010), kanatlı (Harvey, Keenan, & Gilmour, 2007), deniz ürünleri(Shikongo-Nambabi, 2011) bulunmaktadır.

## 2. BİYOFİLM TANIMI VE YAPISI

Biyofilmler, bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jelsi bir tabaka içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk olarak tanımlanabilir (Leone ve ark., 2006). Biyofilm oluşumu in vivo olarak canlı hücrelerde veya in vitro olarak cansız yüzeylerde meydana gelebilir. Nem miktarının fazlalığı ve besin maddelerinin ortamda bulunması biyofilm oluşumunu arttırmaktadır.

Biyofilmlerin oluşumuna ve gelişmesine bakteri suşu (Borucki, Peppin, & White, 2003; Chae & Schraft, 2000), yüzey özellikleri, pH, besin miktarı, sıcaklık (Donlan, 2002) gibi çeşitli çevresel faktörler etkili olmaktadır. Biyofilm hücreleri antimikrobiyal ajanlara karşı planktonik hücrelerden daha dirençli olup antimikrobiyal ajanlarla teması engelleyen ya da azaltan bariyere sahiptirler (O'Toole&Kaplan, 2000).

Gıda patojenleri biyofilm tabakasının içerisinde kolayca lokalize olmakta ve kontaminasyon riskini arttırmaktadır (Aksu ve ark.,2011 ). Bozulmaya ve hastalığa neden olan mikroorganizma çeşitleri biyofilm ve çeşitli hastalıkların oluşumuna sebep olabilir (Parsek&Singh, 2003). Biyofilmler tek bir mikroorganizma türü tarafından oluşturulabildiği gibi birden fazla türü de yapısında barındırabilir. Farklı türlerden oluşan biyofilmlerde her tür kendi mikrokolonisini oluşturur, bu mikrokoloniler birbirlerinden su kanalları aracılığı ile ayrılmışlardır. Su kanalları içinde devam eden su akışı besin maddelerinin ve oksijenin difüzyonunu sağlar. Bunlardan en yaygınları Pseudomonas, Enterobacter, Flavobacterium, Alcaligenes Staphylococcus, Bacillus türleridir(Ölmez, 2009).

Biyofilm yapısında bulunan maddeler ekstrasellüler matriks yapı ile birbirlerine tutunmaktadır. Su bakteriyel hücre kapsülleri içinde bulunmakta veya mikroorganizmaların monosakkaritlerden oluşturduğu yüksek molekül ağırlıklı polimerler olan ekzopolisakkarite (EPS) bağlanmaktadır (Ölmez, 2009 ).

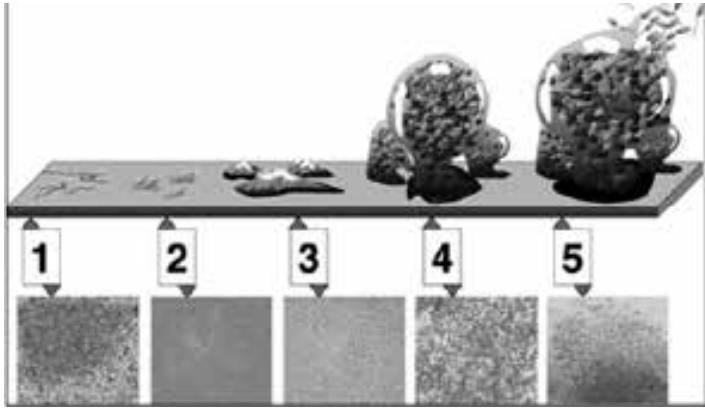
EPS'ler biyofilm oluşturarak mikroorganizmaların koloni oluşturmaya ve yüzeye bağlanmasına yardımcı olmaktadır. Ayrıca organizmayı ozmotik strese, faj atıklarına, toksik bileşiklere ve antibiyotiklere karşı da koruyabilmektedirler (Mıdık ve ark., 2011).

## 3. BİYOFİLM OLUŞUM BASAMAKLARI

Biyofilm tabakası çok farklı çevrelerde oluşabilir ve en basit biyofilm tabakası bile karmaşık bir dinamiğe sahiptir. Biyofilm gelişimi taze besiyeri sağlandıkça devam eder. Ancak ,ortamdaki besin maddeleri tükenince yüzey bağlantıları zayıflar ve hücreler planktonik modlarına geri dönerler (Gün ve Ekinci, 2009).

Biyofilm oluşumu beş basamakta incelenebilir. Öncelikle hücreler yüzeye yakın mesafede etkileşerek yüzeye dönüşümlü olarak tutunurlar. Yüzeye dönüşümlü olarak tutunurken o yüzeyde yaşamalarını sağlayacak besin maddelerinin var olup olmadığını araştırırlar. Daha sonra yüzeye kısa mesafeli etkileşimler olan dipol-dipol etkileşimi, hidrofobik etkileşimler, iyon-dipol etkileşimi, iyonik ve kova-lent bağlar ve hidrojen etkileşimleri sayesinde hücre organelleri ile yüzeye dönüşümsüz olarak tutunurlar. Yüzeye tutunan bakteri gelişir,

koloni oluşturur. Mikrokoloniler zamanla büyür ve yüksek yapılara dönüşürler. Bu aşamada olgun biyofilm oluşmuştur. Biyofilm gelişiminin kopma veya ayrılma evresinde tek bir bakteri veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılır. Şekil 1’de biyofilm oluşum aşamaları gösterilmiştir.



Şekil 1: Biyofilm Oluşum Aşamaları (Srey ve ark., 2012)

1. Dönüşümlü tutunma
2. Geri dönüşümsüz tutunma
3. Koloni gelişimi
4. Biyofilm olgunlaşması
5. Biyofilm hücrelerinin koparak ayrılması

### 3.1. Dönüşümlü Tutunma:

Bakteri hücrelerinin yüzeye ilk tutunmasında bakteri hücresi yüzey ile tam olarak temas etmemekte, ancak bakteri hücresi ile yüzey arasında uzun mesafeli etkileşimler meydana gelmektedir. Bu aşamada bakterinin yüzeye tutunması bakteriyel hücre yüzeyinin (Ferreira, Pereira, Melo, 2010), tekstür (Donlan, 2002), yüzey yükü (Abdallah ve ark., 2009), hidrofobiklik (Donlan, 2002) pH, sıcaklık (Nilsson ve ark., 2011) ve besin maddelerinin varlığı (Donlan, 2002; Gerstel ve Römling, 2001) gibi fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Yüzeye tutunan hücreler çok az miktarda EPS'ye sahiptirler ve bağımsız hareket etme yeteneğindedirler (O'Toole ve Kolter, 1998).

Yüzey özellikleri bakteriyel tutunmada önemli rol oynar. Bakteriler türüne göre farklı yüzeylere farklı miktarlarda bağlanabilirler. Örneğin Sinde ve Carballo (2000) Salmonella ve Listeria'nın hidrofobik yüzeylere hidrofilik yüzeylerden çok daha fazla miktarda tutunabildiklerini saptamışlardır. Hücreler bu aşamada, durulama gibi basit yıkama işlemleri ile kolayca yüzeyden uzaklaştırılabilirler.

### 3.2. Dönüşümsüz Tutunma:

Dönüşümlü tutunmadan dönüşümsüz tutunmaya geçiş EPS varlığında bakterinin yapmış olduğu zayıf bağların kalıcıya dönüşmesidir (Stoodley ve ark., 2002). Dönüşümsüz tutunmayı yüzeyle kısa mesafeli etkileşimler sağlamaktadır. Bakteri hücreleri flagella(kamçı) ve pili(ince kıl) gibi organelleri ile ve EPS oluşturarak yüzeylere dönüşümsüz olarak bağlanırlar (Poulsen, 1999).

Dönüşümsüz tutunma aşamasından sonra biyofilm hücrelerini yüzeyden uzaklaştırabilmek için güçlü mekanik kuvvet, enzim, dezenfektan, deterjan, saniterler (Sinde ve Carballo, 2000) ve/veya yüksek ısı işleme ihtiyaç vardır (Augustin ve ark., 2004; Maukonen ve ark., 2003; Sinde ve Carballo, 2000).

Gerke ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada (1998) Staphylococcus epidermidis bakterisinin hücre içi polisakarit ürettiğini bu şekilde yüzeye tutunup mikrokoloni geliştirip olgun biyofilm oluşturduğunu saptamışlardır.

### 3.3. Koloni Gelişimi:

Mikrokoloni gelişimi bakteri hücrelerinin yüzeyde birikmesi, mikroorganizmaların gelişmesi ve EPS (Chmielewski ve Frank., 2003) üretimi sonucunda gerçekleşir. EPS bakteri ve alt katmanı arasında bağ oluşumuna katkıda bulunur, koloniyi her türlü çevresel strese karşı stabil hale getirir (Donlan, 2002). Bu

sistemde bakterilerin yüzeyde toplanma işlemi planktonik hücrelerin sinyal molekülleriyle etkileşip bir araya gelmesiyle gerçekleşir. Bu aşamada bir bakteri hücresi yüzeyde koloni oluşturduktan sonra (ilk koloni), aynı yüzeyde diğer bakteriler de koloni oluşturur (ikincil koloni). Biyofilm büyüdükçe, polimer matriksinde kapsül oluşturmuş mikroorganizmalarda da artış görülür (Poulsen, 1999).

O'Toole ve Kolter (1998) çalışmalarında *Pseudomonas aeruginosa* PA14'susunun mikrokoloni oluşturabilmesi için pili 4 genine ihtiyacı olduğunu saptamışlardır. Yüzme hareketinin, bakteriye yüzeydeki itici güçlerin üstesinden gelebilmesini ve alt katmana ulaşabilmesini sağladığı pili 4 yardımıyla uzama ve geri çekilme hareketleriyle mikrokolonileri oluşturduğu düşünülmektedir (Skerker ve Berg, 2001).

### 3.4. Olgun Biyofilm Oluşumu:

Bu aşamada biyofilm hücreleri besin maddelerinin etkisiyle apartman yada mantar şeklinde yapılara dönüşürler (Chmielewski ve Frank., 2003; Klausen ve ark., 2003). Çeşitli yüksekliklerde kuleler oluşturan mikrokolonilerin aralarında besinlerin ulaştırılması ve metabolik atık ürünlerin uzaklaştırılması için dolaşım sistemi olarak görev yapan su kanalları bulunmaktadır (Poulsen, 1999; Kumar ve ark., 1998). Hücrelerin bu yapıya ulaşılabilmesi için yaklaşık 10 gün yada daha uzun bir süre gerekmektedir (Stoodley ve ark., 2002).

### 3.5. Biyofilm Hücrelerinin Koparak Ayrılması:

Biyofilm oluşumunda son aşama biyofilm hücrelerinin koparak ayrılmasıdır. Hücreler bu aşamada planktonik fazlarına geri dönerler (Sauer ve ark., 2002). Artan akış kuvveti (Stoodley ve ark., 2002), iç enzimatik bozulma, EPS yada yüzey bağlayan proteinlerin açığa çıkması gibi hücre içinde görülen işlemler biyofilm hücrelerinin ayrılmasında önemli rol üstlenir (Kaplan ve ark., 2004). Ayrıca ortamda besin maddelerinin tükenmesi de hücresel ayrılmaların önemli bir nedeni olabilmektedir (O'Toole ve Kaplan, 2000). Bu ayrılma işlemi dış kuvvetlerin etkisiyle olabileceği gibi, biyofilm oluşum basamağının bir parçası olarak tek bir hücrenin veya çoklu hücrelerin kopmasının bir sonucu da olabilir (Poulsen, 1999).

## 4. BİYOFİMLER VE SÜT ENDÜSTRİSİ

Süt çok hızlı bir şekilde bozulabilen bir üründür ve mikroorganizmaların gelişmesi için uygun bir ortama sahiptir. Kontamine olmuş süt ve ürünlerinin genellikle uygun bir şekilde temizlenmemiş ve dezenfekte edilmemiş ekipmanlardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Jessen ve Lammert, 2003; Koutzayiotis, 1992). Süt ürünlerinde yaygın olarak *Enterobacter* (Salo ve ark., 2006), *Listeria* (Waak ve ark., 2002), *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* (Sharma ve Anand, 2002) ve *Pseudomonas* türleri (Wiedmann ve ark., 2000) tespit edilmektedir. Süt ürünlerinin bakteriyel kontaminasyonu ürünün özelliklerine, kalitesine ve güvenliğine etki eder. Boru hatlarında oluşan biyofilm, boru hattı boyunca akışın azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca biyofilm oluşan borularda ısı taşınımı azalabilmekte, biyofilm ürüne kontamine olabilmekte ve biyofilm içindeki asit oluşumu nedeniyle borular korozyona uğrayabilmektedir (Jayaraman ve ark., 1997; Poulsen, 1999).

Chechowski (1990) çalışmasında süt işletmelerinde sağım hattından soğutmaya gönderilen sütün geçtiği paslanmaz çelikten yapılmış borulardan akan 25 ° C'deki sütte *Pseudomonas aeruginosa*'nın 30 dakika içerisinde tutunabildiği, soğutmadan işletmeye gönderilen sütün geçtiği paslanmaz çelikten yapılmış borulardan geçen 4° C'deki sütte ise 2 saat içerisinde tutunduğunu bildirmiştir. Ayrıca *Listeria* spp.'nin bu sıcaklıkta 20 dakikada yüzeye kolaylıkla tutunabildiği de ifade edilmiştir.

Süt işletmelerinde *Listeria monocytogenes* önemli bir tehlikedir. Sütün değerli bir besin kaynağı olması bu mikroorganizmanın gelişmesini önemli ölçüde sağlamaktadır. Araştırmalar *Listeria monocytogenes* bulaşmasında gıdalar arasında ilk sırada süt ve süt ürünleri gösterilmektedir (Helke ve Wong, 1992; Helke ve ark., 1992).

Yapılan bazı araştırmalarda ortamda süt kalıntısı azken bile 6 ° C ve %75,5 nisbi nem şartlarında, 10 gün sonra contalardan ve paslanmaz çelik borulardan *L. monocytogenes* izole edilebilmiştir. Daha fazla kalıntı varlığında ve en uygun olmayan sıcaklık ve nem koşullarında ise en az 3 gün en fazla 5 gün *L. monocytogenes* canlılığını sürdürmüştür.

## 5. BİYOFİLM KONTROL YÖNTEMLERİ

Biyofilm hücreleri gıda endüstrisinde pek çok soruna neden olduğu için onların oluşumu ve gelişimini daha iyi anlayabilmek için pek çok çalışmaya yapılmaya devam edilmektedir. Biyofilmlerin tespiti için düzenli olarak gıda işleme yüzeylerinden, karkaslardan, boru sistemlerinden ve sıvı örneklerinden alınarak mikrobiyolojik analiz yapılması ürün güvenliği açısından gerekliliktir.

Biyofilm oluşumunun engellenmesinde birinci ve en önemli nokta hücrelerin yüzeye tutunmalarını engellemek için düzenli ve etkin temizlik ve dezenfeksiyon işlemlerinin yapılmasıdır (Midelet ve Carpentier, 2004; Simoes ve ark., 2006). Temizlikte amaç EPS tabakasının parçalanmasıdır. Gıda işletmelerinin büyük bir kısmında, temizlik sırasında biyofilmin uzaklaştırılması için yüzeye mekanik kuvvet uygulanmaktadır. Mekanik işlemler arasında yer alan otomatik fırça ile veya yüksek basınçla temizlik yapılması, jel temizleyicilerin kullanımından veya düşük basınçla yapılan temizlikten daha etkilidir.

Pek çok araştırmacı yüzeydeki maddelerin antimikrobiyal ajanlar (Knetsch ve Koole, 2011; Park ve ark., 2004) ile ya yüzeyi kaplayarak (Knetsch ve Koole, 2011; Thouvenin ve ark., 2003) ya da yüzeyin fizikokimyasal özelliklerini değiştirerek (Chandra ve ark., 2005; Rosmaninho ve ark., 2007) uzaklaştırılacağını saptamışlardır. Biyofilm hücrelerinin antibakteriyel maddelere karşı dayanımının, planktonik hücrelerden en az 500 kat daha fazla olduğu ifade edilmektedir (Costerton ve ark., 1995.).

Zeraik ve Nitschhe (2010) sürfektanla muamele işleminden sonra yüzeyin daha fazla hidrofilik olduğunu saptamışlardır. Muamele edilmiş yüzeyde hidrofobiklik azalmıştır ve bakteriyel tutunmada önemli derecede azalma saptanmıştır.

Kimyasal maddeler, yüksek basınçlı temizleme sistemleri, enzimler, ultrason, elektrik alan gibi yeni yöntemler de biyofilm oluşumunu engellemede kullanılmaktadır.

### 5.1. Kimyasal Madde Kullanımı:

Biyofilm organizmalarını yok etmek veya ortadan kaldırmak için kullanılan kimyasal maddeler EPS'e nüfuz etmelidir ve mikrobiyel hücreye geçişi sağlanmalıdır (Meyer, 2003). Klor ile biyofilm organizmalarını uzaklaştırmak kullanılan en ucuz yöntemdir. Ancak biyofilm hücrelerinin oluşturduğu yapışkan polimer tabaka klorun mikroorganizmalara ulaşmasını engellediğinden yüksek konsantrasyonda kullanılmalıdır. Biyofilm bakterisi klora serbest halde suda yüzen bakteriye oranla 150-3000 kez daha dirençlidir. Ozon, aynı konsantrasyonlarda klora göre iki kat daha aktiftir ancak sistemin ozona dayanıklı maddeden yapılmış olması gerekmektedir. Dörtlü amonyumlar, biyofilmin yüzeyden uzaklaştırılmasında etkilidirler ancak kopan parçacıkların sistemden uzaklaştırılması için sistemin basınçlı su geçirilerek durulanması gerekmektedir. Formaldehit etkili bir biyosittir, biyofilm hücrelerini öldürür ancak biyofilmin fiziksel varlığı üzerinde hiçbir etkisi olmadığından kullanımı uygun değildir (Anonim, 2013).

### 5.2. Biyofilm Kontrolünde Yeni Yaklaşımlar

#### 5.2.1. Ultrason :

Ultrason gıda endüstrisinde dondurma, kesme, tavlama, beyazlatma, sterilizasyon ve ekstraksiyon gibi çeşitli işlemlerde kullanılan bir tekniktir (Chemat ve ark., 2011). Oulahal- Lagsir ve ark. (2000a) ultrasonik aparatın paslanmaz çelik ve polipropilen yüzeyde biyofilm uzaklaştırılmasında etkisini araştırmışlardır. Polipropilen tabaka üzerinde swap yöntemiyle alınan süt örneklerinde bu aparatın 2 kat daha fazla etki ile biyofilmi uzaklaştırdığı saptanmıştır. Bununla birlikte düşük sıklıkta radyo ses dalgaları biyofilm hücrelerinin canlılığını azaltmada yüksek sıklıkta radyo ses dalgalarından daha etkilidir. Gıda endüstrisinde bu bakteriler sadece ultrasonik teknik kullanılarak yok edilemeyebilir. Diğer tekniklerle beraber uygulanması tavsiye edilmektedir (Piyasena ve ark., 2003; Qian ve ark., 1997).

Ultrason ayrıca biyofilme karşı antibiyotiklerin etkisini artırır (Peterson ve Pitt, 2000). Ultrason biyofilm matrisine oksijen difüzyonunu sağlar böylelikle biyofilm hücreleri aktif olmaya başlar ve bu yüzden antibiyotik kullanılması gerekir.

#### 5.2.2. Enzimler:

Enzimler spesifik kimyasal molekül üzerinde katalitik aktiviteye sahip proteinlerdir. Gıda endüstrisinde

biyofilm uzaklaştırılmasında önemli bir alternatiflerdir.

EPS, heterojenik kompleks yapıya sahip bir moleküldür ve bu kompleks yapıyı bozabilmek için enzimlerin yardımına ihtiyaç vardır (Simoes ve ark., 2010). Lequette (2010) biyofilm uzaklaştırılmasında enzimlerin etkisinin bakteri türüne göre değişebildiğini ve surfaktanlarla kombinasyon sağlandığında biyofilmlerin daha kolay uzaklaştırılabildiğini göstermiştir.

Molobela ve arkadaşlarının (2010) çalışmasında ise *P. fluorescens* biyofilm EPS'sinin proteaz enzimiyle kolaylıkla parçalanabildiği ancak amilaz enziminin EPS üzerinde daha az etkili olduğu tespit edilmiştir.

Polisakkarit hidrolize eden enzimler ile oksidoredüktazların kombinasyonu biyofilm uzaklaştırılmasında önerilmektedir. Bu amaçla kullanılan polisakkarit hidrolize eden enzimler biyofilm matriksini parçalamakta (Johansen ve ark., 1997), oksidoredüktazlar ise bakterisidal etkiye sahip olduğu için gelişimi engellemektedir.

Bir başka çalışmada biyofilmlerin uzaklaştırılmasında pektin esteraz, pektin liyaz ve selüloz ayrı ayrı kullanılmış ve etki dereceleri gözlemlenmiştir. Bu enzimlerin *P. fluorescens* olgun biyofilmine karşı fazla etki göstermediği ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte pronaz bu enzimlerle birlikte kullanıldığında biyofilm gelişimi önemli derecede azalmıştır (Orgaz ve ark., 2007).

Görülebileceği gibi enzimler biyofilm kontrolünde yeni ve gelişen alternatif yaklaşımlar olarak kullanılmaktadırlar.

### 5.2.3. Elektrik Alan:

Son yıllarda yapılan çalışmalardan bir diğeri de, biyofilm oluşumunu engellemede biyoelektrik alanların kullanımınıdır. Bu konuda yapılan araştırmanın birinde 200-400  $\mu$ A gibi çok düşük akımda, gümüş, karbon ve platin elektrotların kullanıldığı elektriksel alanda, gram negatif ve gram pozitif bakterilerin planktonik hücreleri yanında *Candida albicans* gibi biyofilm oluşturan mikroorganizmaların hücrelerinin de imha edildiği belirtilmektedir (Davis ve ark., 1991).

Bir başka çalışmada biyofilm oluşturan *P. aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae*'nin tobramisin antibiyotigi ile birlikte 1 mA elektrik uygulamasıyla bakteri düzeyinde 8 log'luk bir azalma meydana geldiğini belirlenmiştir (Wellman ve ark., 1996).

Paslanmaz çelik yüzeyde *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmi üzerine gerçekleştirilen bir çalışmada, biyositlerle birlikte 5 V/cm – 1.15 mA/cm<sup>2</sup> gibi düşük kuvvette elektrik alanı ( $\pm$ 12 V/cm) ve düşük akım yoğunluğunda ( $\pm$ 2.1 mA/cm<sup>2</sup>) elektriksel alan uygulamasının bakteri inhibisyonu üzerine etkisinin olduğu belirlenmiştir (Blenkinsopp ve ark., 1992).

### 5.2.4. Engeller Teknolojisi:

Engeller teknolojisi 2 ya da daha fazla yöntemin kombinasyonundan oluşur. En etkili uygulamayı başarabilmek için en doğru kombinasyona ihtiyaç duyulur. Sodyum hipoklorit (NaClO) ile UV ışın kombinasyonu gıda kaynaklı patojenlerin azaltılmasında tek başına uygulamalardan daha fazla azalmaya neden olmuştur (Ha, 2011).

DeQueiroz ve Day (2007) çalışmalarında sodyum hipoklorit (NaClO) ve hidrojen peroksit kombinasyonunun *P. aeruginosa* biyofilminin yüzeyden uzaklaştırılmasında antimikrobiyal aktivite ve etkililiğini gözlememişlerdir. Çok kısa zamanda hücre sayısında önemli düşüşler gözlemişlerdir. Hidrojen peroksit ve UV kombinasyonu ile sinerjistik etkiyle çok daha olumlu sonuçlar alınmıştır. Ayrıca ozon ve ultrasonun sinerjistik etkisiyle beraber biyofilm hücrelerinde önemli düşüşlere rastlanmıştır.

## 6. SONUÇ

Gıda işletmelerinde sanitasyon aşamalarında meydana gelen eksiklikler herhangi bir yüzeyde kolaylıkla biyofilm oluşmasına sebep olmaktadır. Biyofilmler de gıda güvenliğini olumsuz yönde etkilemektedir. Ayrıca, biyofilm oluşumunu engellemenin mümkün olmadığı, bakterilerin biyofilm yapısı içinde genetik değişimlere uğrayabileceği düşünüldüğünde gıda işletmelerinde HACCP kriterlerinin çok iyi belirlenmesi ve uygulanması gerekmektedir.

Konu ile ilgili günümüze kadar birçok araştırma yapılmakla birlikte, özellikle biyofilm oluşumunun engellenmesiyle ilgili yeni teknolojik gelişmeler konunun önemini ve güncelliğini korumaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

- Abdallah, F. B., Chaieb, K., Zmantar, T., Kallel, H., & Bakhrouf, A. (2009). Adherence assays and slime production of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 394-398.
- Aksu F., Ünver A., Uran H. (2011). Gıda endüstrisinde biyofilm oluşumuna bağlı riskler. 7. Gıda Mühendisliği Kongre Kitabı Syf:105.
- Anonim. (2013). [http://www.novakim.com/\\_FILES\\_/dosyalar/icerik/a54e837a-biyo\\_film\\_cid2000.pdf](http://www.novakim.com/_FILES_/dosyalar/icerik/a54e837a-biyo_film_cid2000.pdf). Erişim tarihi, 20.11.2013
- Augustin, M., Ali-Vehmas, T., & Atroshi, F. (2004). Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical sciences: a Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques*, 7(1), 55-64.
- Blenkinsopp S., Khoury A., Costerton J. (1992). Electrical Enhancement of Biocide efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 58 (11): 3770-3773.
- Borucki, M. K., Peppin, J. D., & White, D. (2003). Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7336-7342.
- Chae, M. S., & Schraft, H. (2000). Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1e2), 103-111.
- Chandra, J., Patel, J. D., Li, J., Zhou, G., Mukherjee, P. K., McCormick, T. S., et al. (2005). Modification of surface properties of biomaterials influences the ability of *Candida albicans* to form biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8795-8801.
- Chechowski, H. (1990). Bacterial attachment to Buna-N gaskets in milk processing equipment. *Journal Dairy Technology*. 45:113-114.
- Chemat, F., Zill-e-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813-835, Elsevier B.V.
- Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1), 22-32.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. (1995). Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*. 49: 711-745.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.
- Davis VC, Wagle N, Anderson MD, Warren MM. (1991). Bacterial and fungal killing by iontophoresis with Long-Lived Electrodes. *Antimicrob Agents Chemother*, 35 (10): 2131-2134.
- DeQueiroz, G. A., & Day, D. F. (2007). Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in killing and removing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms from surfaces. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 794-802.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881-890, Centers for Disease Control and Prevention.
- Ferreira, C., Pereira, A. M., & Melo, L. F. (2010). Advances in industrial biofilm control with micro-nanotechnology. *Applied Microbiology*, 845-854.
- Gerke, C., Kraft, A., Süßmuth, R., Schweitzer, O., & Götz, F. (1998). Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(29), 18586-18593.
- Gerstel, U., & Römling, U. (2001). Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella typhimurium*. *Environmental Microbiology*, 3(10), 638-648.
- Gün İ.; Ekinçi F. (2009). Biyofilmler: Yüzeylelerdeki Mikrobiyel Yaşam. *Gıda* 34 (3): 165-173.
- Ha, J.-H., & Ha, S.-D. (2011). Synergistic effects of sodium hypochlorite and ultraviolet radiation in reducing the levels of selected foodborne pathogenic bacteria. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(5), 587-591.
- Harvey, J., Keenan, K. P., & Gilmour, A. (2007). Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiology*, 24(4), 380-392.
- Helke, M., Wong, L. (1992). Survival and growth characteristics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella*

- Typhimurium on stainless steel and Buna-Nitril surfaces. *Journal Food Microbiology*, 20: 104-105.
- Helke, M., Somers, B.; Wong, L. (1992). Attachment of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* on stainless steel and Buna-Nitril in the presence of milk and individual milk components. *J.Food. Prot.* 56: 479-484
- Jayaraman A, Cheng ET, Earthman JC, Wood TK. (1997). Importance of biofilm formation for corrosion inhibition of SAE 1018 steel by axenic aerobic biofilms. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 18: 396–401.
- Jessen, B., & Lammert, L. (2003). Biofilm and disinfection in meat processing plants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(4), 265-269.
- Johansen, C., Falholt, P., & Gram, L. (1997). Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9), 3724-3728.
- Kaplan, J. B., Ragunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D. H., & Ramasubbu, N. (2004). Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), 2633-2636.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., et al. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology*, 48(6), 1511-1524
- Knetsch, M. L. W., & Koole, L. H. (2011). New strategies in the development of antimicrobial coatings: the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. *Polymers*, 3(1), 340-366.
- Koutzayiotis, C. (1992). Bacterial biofilms in milk pipelines. *African Journal of Dairy Science*, 24, 19-22.
- Kumar CG, Anand SK. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal Food Microbiology*, 42: 9–27.
- Leone S, Molinaro A, Alfieri F, Cafaro V, Lanzetta R, Donato A, Parrilli M. (2006). The biofilm matrix of *Pseudomonas sp. OX1* grown on phenol is mainly constituted by alginate oligosaccharides. *Carbohydr Res*, 341: 2456 – 2461.
- Lequette, Y., Boels, G., Clarisse, M., & Faille, C. (2010). Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling*, 26(4), 421-431.
- Maukonen, J., Mättö, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., & Saarela, M. (2003). Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(6), 327-356.
- Meyer B. (2003). Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *Int. Biodeterioration Biodegrad*, 51: 249 – 253.
- Midik F., Tokatlı M., Özçelik F. (2011). Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritler ve üretimini etkileyen faktörler. Syf: 106.
- Midelet, G., & Carpentier, B. (2004). Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food. *Journal of Applied Microbiology*, 97(2), 262-270.
- Molobela, I. P., Cloete, T. E., & Beukes, M. (2010). Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria. *Journal of Microbiology*, 4(14), 1515-1524.
- Nilsson, R. E., Ross, T., & Bowman, J. P. (2011). Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 150(1), 14-24.
- Orgaz, B., Neufeld, R. J., & Sanjose, C. (2007). Single-step biofilm removal with delayed release encapsulated Pronase mixed with soluble enzymes. *Enzyme*, 40, 1045-1051.
- O’Toole, G. A., & Kaplan, H. B. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 49-79.
- O’Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2), 295-304.
- Oulahal-Lagsir, N., Martial-Gros, A., Bonneau, M., & Blum, L. J. (2000a). Ultrasonic methodology coupled to ATP bioluminescence for the non-invasive detection of fouling in food processing equipment validation and application to a dairy factory. *Journal of Applied Microbiology*, 89(3), 433-441.
- Ölmez, Z. (2009). Süt sanayisinde biyofilm Oluşturan mikroorganizmalar ve biyofilm oluşumunun önlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.

- Park, S.-I., Daeschel, M. A., & Zhao, Y. (2004). Functional properties of antimicrobial lysozyme-chitosan composite films. *Journal of Food Science*, 69(8), M215-M221.
- Parsek, M. R., & Singh, P. K. (2003). Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual Review of Microbiology*, 57, 677-701.
- Peterson, R. V., & Pitt, W. G. (2000). The effect of frequency and power density on the ultrasonically-enhanced killing of biofilm-sequestered *Escherichia coli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 17(4), 219-227.
- Piyasena, P., Mohareb, E., & McKellar, R. C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3), 207-216.
- Poulsen LV. (1999). Microbial biofilm in food processing. *Lebensm. Wiss. u. Techn.*, 32 (6): 321-326.
- Qian, Z., Sagers, R. D., & Piti, W. G. (1997). The effect of ultrasonic frequency upon enhanced killing of *P. aeruginosa* biofilms. *Annals of Biomedical Engineering*, 25(1), 69-76.
- Rosmaninho, R., Santos, O., Nylander, T., Paulsson, M., Beuf, M., Benezech, T., et al. (2007). Modified stainless steel surfaces targeted to reduce fouling e evaluation of fouling by milk components. *Journal of Food Engineering*, 80(4), 1176-1187.
- Salo, S., Ehavald, H., Raaska, L., Vokk, R., & Wirtanen, G. (2006). Microbial surveys in-Estonian dairies. *LWT - Food Science and Technology*, 39(5), 460-471.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Bacteriology*, 184(4), 1140-1154.
- Sharma, M., & Anand, S. K. (2002). Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiology*, 19, 627-636.
- Shikongo-Nambabi, M. (2011). Control of bacterial contamination during marine fish processing. *Journal of Biology*, 3(1), 1-17.
- Simões, M., Simões, L. C., Machado, I., Pereira, M. O., & Vieira, M. J. (2006). Control of flow-generated biofilms with surfactants: evidence of resistance and recovery. *Food and Bioproducts*, 84(4), 338-345.
- Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), 573-583.
- Sinde, E., & Carballo, J. (2000). Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*, 17, 439-447.
- Skerker, J. M., & Berg, H. C. (2001). Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(12), 6901-6904.
- Sofos, J. N., & Geornaras, I. (2010). Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157:H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products. *Meat Science*, 86(1), 2-14, Elsevier Ltd.
- Srey, O., Kabir, I., Ha, S. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31, 572-585.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56, 187-209.
- Thouvenin, M., Langlois, V., Briandet, R., Langlois, J. Y., Guerin, P. H., Peron, J. J., et al. (2003). Study of erodable paint properties involved in antifouling activity. *Biofouling*, 19(3), 177-186.
- Waak, E., Tham, W., & Danielsson-Tham, M.-L. (2002). Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3366-3370.
- Wellman N, Fortun SM, McLeod BR. 1996. Bacterial biofilms and the bioelectric effect. *American Society for Microbiology* 40 (9): 2012–2014.
- WHO. (2007a). WHO Food safety and foodborne illness. World Health Organization, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>. Erişim tarihi, 26.03.12
- WHO. (2007b) WHO Foodborne diseases. World Health Organization., [http://www.who.int/topics/foodborne\\_diseases/en/](http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/en/). Erişim tarihi, 26.03.12
- Wiedmann, M., Weilmeier, D., Dineen, S. S., Ralyea, R., & Boor, K. J. (2000). Molecular and phenotypic



characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2085-2095.

Zeraik, A. E., & Nitschke, M. (2010). Biosurfactants as agents to reduce adhesion of pathogenic bacteria to polystyrene surfaces: effect of temperature and hydrophobicity. *Current Microbiology*, 61(6), 554-559.



## SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİNDE ORGANİK KLORLU PESTİSİT VARLIĞI

Muhammet DERVİŞOĞLU\* Osman GÜL\*\* Fehmi YAZICI\*\*\* Oğuz AYDEMİR\*\*\*\*

### DÜZELTME

Gıda ve Yem Bilimi - Teknolojisi Dergisi'nin 2013/13. sayısında yayımlanan ; "**Süt ve Süt Ürünlerinde Organik Klorlu Pestisit Varlığı**" Sayfa: 31-40; Makalesinde verilmesi gereken Çizelge-1 ve Çizelge-2 sehven basım sırasında atlanmıştır. Elimizde olmayan bu hatadan dolayı yazarlarından ve okuyucularımızdan özür diler, tablolar tekrar verilerek durum düzeltilmiştir.

### ÖZET

Organik klorlu (OK) pestisitler, haşarat kontrolü amaçlı kullanımları sonucu çevrede uzun süre kalmaları ve potansiyel toksisitelerinden dolayı ciddi problemlere yol açan bileşiklerdir. Yağlı dokularda biriken bu bileşiklerin hayvanlarda yüksek seviyeye ulaşması, gıda zincirinde de yüksek seviyede bulunacağını göstermektedir. Oldukça stabil ve lipofilik özellik gösteren bu bileşikler beslenmede önemli yer tutan süt ve süt ürünlerine, özellikle de anne sütlerine geçmektedir.

Süt ve süt ürünlerinde bu maddelerin bulunması, bu ürünleri tüketen bebekler ve çocuklar açısından oldukça riskli bir durumdur. Bundan dolayı Türkiye dahil çoğu ülkeler bu bileşiklerin kullanımını sınırlandırmış veya yasaklamışlardır. Ancak ülkemizin çeşitli bölgelerinde yasal olmayan şekilde bu bileşikler hâlâ kullanılmaktadır. Bunu önlemek amacıyla çeşitli gıdalarla birlikte sütlerde pestisit kalıntılarının takibi için "Ulusal Kalıntı Kontrol Planı" yürürlüğe konmuştur. Bu plan çerçevesinde anne sütü de dahil olmak üzere süt ve süt ürünlerinde kalıntı izleme çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Organik Klorlu Pestisit, Kalıntı, Süt ve Süt Ürünleri, Toksikite, Sağlık

### ORGANOCHLORINE PESTICIDE RESIDUES IN MILK AND MILK PRODUCTS

#### ABSTRACT

Organochlorine pesticides are compounds that they are being extensively used against livestock ectoparasites and agricultural pests, hence they have caused series problem on human health because of their resistance to biochemical degradation and their toxicity. These compounds tend to accumulate in fatty tissues and reaching harmful concentrations in organisms situated at the high-end of the food chain. These compounds are highly stable and lipophilic that subsequently are translocated and excreted through milk. Their occurrence in milk and milk products are important, since milk and milk products are widely consumed by infants and children. Therefore, many countries including Turkey have restricted or banned use of these compounds. However, they are still being used illegally in some part of Turkey. For prevent of their use, "National Residue Control Plan" have put into action to monitoring of pesticide residue in Turkey. Therefore, there are necessary monitoring study of residue in milk and milk products including human milk within this control plan.

**Key Words:** Organochlorine Pesticide, Residues, Milk and Milk Products, Toxicity, Health

\*Doç. Dr. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Müh. Fak. Gıda Mühendisliği Bölümü- SAMSUN e-mail: mderviso@omu.edu.tr

\*\*Öğr. Gör. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yeşilyurt Demir-Çelik MYO Gıda Teknolojisi Bölümü- SAMSUN

\*\*\*Prof.Dr. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Müh. Fak. Gıda Mühendisliği Bölümü- SAMSUN

\*\*\*\*Yrd. Doç. Dr. Karatekin Üniversitesi Müh. Fak. Gıda Mühendisliği Bölümü-ÇANKIRI

Çizelge 1. Türkiye'nin farklı bölgelerinde analiz edilen süt ve süt ürünlerindeki yaklaşık OK pestisit seviyeleri (mg/kg yağ)

Şehir	Yıl	Ürün	KO (%)	$\alpha$ -HCH	$\beta$ -HCH	$\gamma$ -HCH	HCB	HE*	p,p'-DDE	p,p'-DDT	$\Sigma$ DDT	DDE/DDT	Kaynaklar
Ankara	84-85	İnsan sütü	100	<0.01	0.92	<0.01	-	-	2.71	0.42	3.66	6.45	Karakaya ve ark., 1987
Adana	84-85	İnsan sütü	100	<0.01	1.43	<0.01	-	-	8.55	1.17	10.57	7.31	Karakaya ve ark., 1987
Kocaeli	84-85	İnsan sütü	100	<0.01	0.72	<0.01	-	-	2.56	0.37	3.30	6.92	Karakaya ve ark., 1987
Kayseri	1988	İnsan sütü	-	0.096	0.522	0.156	0.084	0.011	2.39	0.41	3.07	5.61	Üstünbaş ve ark., 1994
Van	95-96	İnsan sütü	100	0.05	0.417	0.016	0.058	0.078	2.26	0.141	2.67	14.74	Çok ve ark., 1997
Manisa	95-96	İnsan sütü		0.067	0.355	0.017	0.044	0.069	1.85	0.072	2.15	17.45	Çok ve ark., 1997
Ankara	2001	Tereyağı	0	-	-	-	-	-	TE	TE	-	-	Yentür ve ark., 2001.
Ankara	2002	İnsan sütü	-	0.05	0.49	0.01	0.15	0.06	2.28	0.13	2.41	17.54	Çok ve ark., 2004
K.Maraş	2003	İnsan sütü	100	<0.5	0.149	0.003	0.02	-	1.522	0.065	1.595	28.0	Erdogru ve ark., 2004
Konya	2005	Tereyağı	94	0.022	0.041	0.032	-	0.011	0.028	0.003	0.063	9.33	Nizamlihoğlu ve ark., 2005
Afyon	2005	İnsan sütü	-	0.027	0.285	0.014	0.073	0.061	2.098	0.111	2.209	18.9	Çok ve ark., 2005.
Afyon	2008	İnek sütü	22	TE	0.091	TE	<0.001	TE	TE	0.016	-	-	Bulut ve ark., 2011.
Afyon	2009	Tereyağı	37.5	0.002	0.214	0.003	0.008	TE	0.005	0.025	-	0.2	Bulut ve ark., 2010.
Samsun	2010	İnek sütü	0	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	-	-	Güvenç ve Aksoy, 2010.

<sup>KO</sup> Kontaminasyon oranı, <sup>\*</sup>Heptaklor epoksit, <sup>TE</sup> Tespit edilememiştir.

Çizelge 2. Çeşitli ülkelerde analiz edilen süt ve süt ürünlerindeki OK pestisit seviyeleri (mg/kg yağ)

Ülke	Yıl	Ürün	KO (%)	$\alpha$ -HCH	$\beta$ -HCH	$\gamma$ -HCH	HCB	p,p'-DDE	p,p'-DDT	ZDDT	Kaynaklar
İtalya	98-01	İnsan sütü	-	-	-	-	0.051	0.44	0.044	-	Abbate ve ark., 2008.
Hindistan	98-99	İnek sütü	100	0.006	0.003	0.001	-	0.02	0.005	0.037	Sharma ve ark., 2007.
	-	İnek sütü	63.38	0.018	0.099	0.01	-	0.036	0.055	0.172	Nag ve Raikwar, 2008.
Endonezya	01-03	Anne sütü	100	TE	0.002	TE	0.002	0.6	0.033	0.64	Sudaryanto ve ark., 2006.
Japonya	01-04	İnsan sütü	100	<0.001	0.11	-	0.014	0.33	0.013	0.34	Kunisue ve ark., 2006.
Rusya	03-04	İnsan sütü	100	0.01	0.8	<0.001	0.1	0.6	0.05	0.66	Tsydenova ve ark., 2007.
Almanya	2005	İnsan sütü	90.69	-	0.017	-	0.027	0.159	TE	0.18	Raab ve ark., 2008.
Gana	05-06	İnek sütü	-	-	-	<0.001	-	0.002	0.013	-	Darke ve Acquah, 2008.
Meksika	2003	Keçi sütü	100	0.017	0.036	0.038	-	0.013	0.021	-	Flores ve ark., 2007.
Polonya	02-03	Süt ürünleri	-	-	-	0.004	-	-	-	0.05	Radzyminska ve ark., 2008.
Brezilya	2006	İnek sütü	100	0.003	-	-	0.003	0.012	0.001	0.02	Heck ve ark., 2007.
İspanya	07-08	İnek sütü	100	<0.001	0.002	<0.001	0.002	0.005	TE	-	Luzardo ve ark., 2012.
İran	2007	İnsan sütü	100	0.35	0.735	0.58	1.02	-	-	1.93	Behrooz ve ark., 2009b.
	2006	İnsan sütü	100	1.044	1.16	0.35	0.63	1.814	0.46	2.685	Behrooz ve ark., 2009a.
Belçika	06-09	İnsan sütü	100	-	<0.001	TE	TE	TE	0.016	0.124	Colles ve ark., 2008.
Güney Afrika	-	İnsan sütü	-	-	-	-	-	1.18	0.83	0.66	Mutshahia ve ark., 2009.
ABD	2009	Tereyağı	-	TE	TE	-	<0.001	0.005	TE	-	Schechter ve ark., 2010.
		İnek sütü	-	TE	TE	-	TE	<0.001	TE	-	
Ürdün	01-07	İnek sütü	-	0.06	0.073	TE	-	0.027	TE	-	Salem ve ark., 2009.
Pakistan	-	İnek sütü	80	0.098	0.048	0.196	-	0.142	0.022	0.278	Zia ve ark., 2009.
Tunus	2010	İnsan sütü	100	-	0.04	0.037	0.287	0.509	0.437	1.164	Hassine ve ark., 2012.
Romanya	07-08	İnek sütü	56	0.002	0.001	0.004	0.008	-	-	0.013	Georgescu ve ark., 2011.
Uganda	-	İnek sütü	100	-	-	0.026	-	0.009	0.033	0.052	Kampire ve ark., 2011.

<sup>KO</sup> Kontaminasyon oranı, <sup>TE</sup> Tespit edilememiştir.

## GIDA VE YEM BİLİMİ - TEKNOLOJİSİ DERGİSİ YAYIN İLKELERİ VE YAZIM KURALLARI

1. Bursa Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Gıda ve Yem Bilimi-Teknolojisi Dergisi hakemli bir dergidir.

2. Dergide, **özgün araştırma ürünü makaleler** ile belirli bir konuyu yeterli sayıda kaynaktan araştırarak hazırlanmış **derleme makaleleri** yayımlanır. Son gelişmeleri ve araştırmaları kapsayan ve orijinal metne sadık kalınarak yapılan çeviri yazılar da yayım için değerlendirilir. **Çeviri yazılarda** orijinal eserin yabancı dildeki adı, yazarı, yayınlandığı yer ve yılı belirtilmelidir.

3. Dergide yayımlanacak makaleler aşağıda belirtilen konularda olmalıdır:

- Gıda ve Yem Güvenirliği ve Kalitesi
- Gıda ve Yem İşleme Teknolojileri
- Gıda Katkı Maddeleri ve Yem Ham Maddelerinin Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi
- Gıda, Su ve Yem Analiz Yöntemleri
- Geleneksel Gıdalar
- Gıda ve Yem Ambalajları
- Gıda Sanayi Atıklarının Değerlendirilmesi
- Organik Gıda ve Yem
- Beslenme
- Gıda ve Yem Biyoteknolojisi
- Gıda ve Yem Ekonomisi ve Politikası (Gıda ve Yemlerde Sosyo-Ekonomik Araştırmalar)
- Gıda ve Yem Bilimi-Teknolojisi ile ilgili diğer konular

4. Yazılar, 2 yazılı kopya ve CD ile birlikte posta ile; bursagida@bursagida.gov.tr adresine elektronik ortamda gönderilmelidir.

5. Yazıyla birlikte “bu çalışma hiçbir yerde yayımlanmamıştır ve yayımlanmak üzere gönderilmemiştir” beyanının bulunduğu ve tüm yazarların imzası olan dilekçe gönderilmelidir.

6. Gönderilen yazıların Gıda ve Yem Bilimi-Teknolojisi Dergisinde yayımlanması ve yayımlanma sırası kararı, Yayın Kuruluna aittir. Yayımlanmaması kararı alınan yazılar ise yazarlarına iade edilir. Yayın Kurulu belirlenen yazım kuralları çerçevesinde gerekli düzeltmeleri yapmaya yetkilidir.

7. Dergiye gönderilen tüm yazıların sorumluluğu yazı sahiplerine aittir.

### 8. Çalışmanın Hazırlanması:

Yazılar Microsoft Word yazılımıyla, A4 boyutundaki kağıdın tek yüzüne Times New Roman yazı tipi, 11 punto ve 1,5 satır aralıkla yazılmalı; sayfanın üst, alt ve sağ kenar boşlukları 2 cm, sol kenar boşluğu 2,5 cm olarak düzenlenmelidir. Metnin hiçbir yerinde paragraf girintisi kullanılmamalı, paragraflar öncesi ve sonrası 6 nk aralık bırakılmalıdır.

Makale; Başlık, Yazar isimleri ve Adresleri, Özet, Türkçe Anahtar Kelimeler, İngilizce Başlık, Abstract, Keywords, Ana Metin (Giriş, Materyal ve Metot, Bulgular ve Tartışma, Sonuç), Teşekkür (gerekliyorsa), Kısaltmalar (gerekliyorsa) ve Kaynaklar ana başlıkları altında hazırlanmalıdır.

**Başlık:** Başlıklar metne uygun kısa ve açık, ana başlık büyük harfle, sayfaya ortalanmış, 12 punto; ara başlıklar yalnız ilk harfleri büyük; alt başlık yalnızca ilk harfleri büyük, sonuna iki nokta üst üste konulup, aynı satırdan devam etmelidir. Tüm başlıklar koyu olmalıdır.

**Yazar İsimleri:** Eserin yazar ya da yazarlarının adı ve soyadı başlığın hemen altında bir satır boşluktan sonra, unvan belirtilmeden, 10 punto, yazarın ön ismi açık ve küçük harflerle, soyadı büyük harfle yazılmalıdır. Ünvan ve bağlı oldukları kurumlar ile sorumlu yazarın e-posta adresi ilk sayfanın altında ana metinden çizgi ile ayrılmış dipnot olarak yazılmalıdır. Çalışma herhangi bir kurumun desteği ile gerçekleşmiş ise kurumun adı da ilk sayfa altına dipnot olarak yazılmalıdır.

**Özet ve Abstract:** 200 kelimeyi geçmeyecek şekilde Türkçe ve İngilizce yazılmalıdır. İngilizce özetin başına eserin başlığı İngilizce olarak yazılmalıdır.

**Anahtar Kelimeler / Keywords:** Özetlerin altına eser metnini ifade edebilecek en az 5 adet anahtar kelime belirtilmelidir

**Metin:** Giriş, Materyal ve Metot, Bulgular ve Tartışma, Sonuç kısımlarından oluşur.

Çalışma içerisinde geçen mikroorganizma isimleri ile latince ifade ve isimler italik olarak yazılmalı ve kısaltmalarda uluslararası yazım kuralları göz önünde bulundurulmalıdır.

Yazı içinde geçen tablolar, “çizelge”; grafik, resim, fotoğraf, harita ve akım şemaları ise “şekil” olarak isimlendirilmeli, şekiller 14x20 cm boyutlarını geçmemelidir.

Çizelge başlıkları çizelgenin üstüne, şekil başlıkları ise şeklin altına yazılmalı ve sırayla numaralandırılmalıdır, kullanılan çizelge ve şekillere metin içinde atıf mutlaka yapılmalıdır. Metin içinde geçen veriler çizelge ve şekillerin tekrarı olmamalıdır.

Çizelge ve şekillerin başlıkları içerikleriyle uyumlu ve anlaşılabilir olmalıdır. Şekiller ve resimler yüksek çözünürlükte (en az 300 ppi çözünürlükte) olmasına dikkat edilmelidir. Resimler (ve gerekiyorsa şekiller) \*.jpg formatında metin içerisinde yer almalıdır.

Verilen tüm çizelge ve resimlere metin içerisinde atıf yapılmalıdır. Atıflar, parantez içinde (yazar, tarih) şeklinde yapılmalı ve kaynaklar bölümünde detayları yazılmalıdır.

**Kaynaklar:** Yararlanılan kaynaklar sıra numarası verilmeksizin yazarın soyadı dikkate alınarak alfabetik sıraya göre 10 punto ve tek satır aralığı yazılmalıdır. Aynı yazara ait fazla sayıdaki eserler kronolojik olarak sıralanmalıdır. Kaynaklar, aşağıdaki örneklerde olduğu gibi, metin içerisinde yazarın soyadı ve eserin yayın yılı esas alınarak, yazarı belli olmayan kaynaklar metin içinde (Anon., yıl) şeklinde, kaynaklar bölümünde ise Anonymous, yıl,... verilmelidir.

**Örnekler;** Metin içindeki kaynaklara yapılan atıflarda, (Kantar, 1998), (Anon., 1988), (Ekşi ve Karadeniz, 1993), (Altan ve ark., 1984); yazarlara yapılan atıflarda, “Kantar (1998)'e göre.., Ekşi ve Karadeniz (1993), Altan ve ark. (1998); aynı yazarın birden fazla yayınına atıfta bulunuluyorsa, (Kantar 1998a, 1998b) örneklerinde olduğu gibi yazılmalıdır.

**Kitap:** Anonymous, 1983. Gıda Maddeleri Muayene ve Analiz Yöntemleri. TOKB Köy Hiz. Gen. Müd. Yayınları, Genel Yayın No: 65, 796 s, Ankara.

**Kitap bölümü:** Öztan, A., 2003. Et Bilimi ve Teknolojisi. TMMOB Gıda Mühendisleri Odası Yayınları, Yayın No: 1 Genişletilmiş Baskı, s. 200-400, Ankara.

Rhoades, J. D., 1982. Cation Exchange Capacity. Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties, 2nd ed., Ed: A.L. Page. Soil Sci. Soc. of Amer. Inc., Madison, Wisconsin, pp. 149-157.

**Kongre bildiri veya poster:** Parsons, C.M. 1994. Amino acid availability for poultry. 9th European Poultry Conference, World's Poultry Science Association, Book of proceedings, Glasgow, UK, Vol: 2, 356-359.

**Makale:** Karakaya, M., Sarıçoban, C. ve Aksoğan, M., 2003. Tavşan etinin prerigor ve postrigor aşamalarında bazı teknolojik özelliklerinin tespiti. Gıda ve Yem Bilimi-Teknolojisi Dergisi, 3: 15-19.

**İnternet Kaynağı:** Warren, N.J., Bauder J.W. and Pearson K.E., 2004. Basics of salinity and sodicity effects on soil physical properties. Land Resources and Environmental Sciences Department, Montana State University, <http://waterquality.montana.edu/docs/methane/basics.pdf> (Accessed 15.12.2004).



T.C.  
GIDA TARIM VE HAYVANCILIK  
BAKANLIĞI

174  
ALO GIDA  
ALO GIDA

YEDİĞİNE İÇTİĞİNE  
DİKKAT ET  
GÜVENİLİR GIDA TÜKET



“EN İYİ DENETÇİ TÜKETİCİNİN KENDİSİDİR”







## Agilent 7000C Triple Quadrupole GC/MS Sistemi

# MÜKEMMEL DOĞRULUK İÇİN ÇÖZÜM SUNUYORUZ!

Endüstriye yön veren kesinlik, doğruluk ve hassasiyeti sağlamak için geliştirilmiş termal profili ile ikinci nesil

### Ekstraktör İyon Kaynağı

- Düşük dedeksiyon limitleri
- Daha çok analit belirleme
- Basit numune hazırlama
- Büyük matriks değişimi
- Analiz süresinde azalma
- Sıkı kalite kontrol kriterleri
- Yüksek hız



Agilent; eser seviyede hedeflenen pestisit miktar tayini için, 7000C Triple Quadrupole GC/MS Sistemine dayalı iki farklı pestisit analizörü sunuyor. Bu sistemler Agilent'in ortalama 8 MRM, 1000'in üzerinde pestisit ve diğer toksik kontaminantları içeren, pestisit ve çevresel kirlilikler veritabanı ile geliyor. Bu veritabanı alıkonma zamanı sabitleme de dahil, dakikalar içerisinde size özel GC/QQQ metodu geliştirmeye yönelik araçlar da sunmaktadır.

## Gıda Analizleriniz için Güvenilir Analitik Çözümler

**Bizim deneyimimiz, sizin başarınız!**  
Sizin başarınız, bizim deneyimimiz!



### Pestisit / Aflatoksin / Hormon / Koruyucu / Katkı / Mikrobiyoloji



#### Shimadzu LCMS-8030 Sıvı Kromatografi Triple Quadropole Kütle Spektrometre Sistemi

- Ultra-Yüksek MS Hızı
- UFSweeper Teknolojisi ile saniyede 500 MRM geçişi
- Benzersiz polarite geçiş hızı
- Shimadzu UHPLC ile tam entegrasyon ve yüksek verim

#### LCMS-8030 ile Yapabileceğiniz Bazı Analizler:

Pestisit ve Zirai İlaç Kalıntısı Analizleri  
Veteriner İlaç ve Hormon Analizleri  
Meyve Sebzelere Pestisit Kalıntısının Miktar Tayini  
Suda Çözünen Vitaminlerin Miktar Tayini



#### Shimadzu GCMS-TQ8030 Gaz Kromatografi Triple Quadropole Kütle Spektrometre Sistemi

- Yüksek Hassasiyetli İyon Kaynağı
- UFSweeper® ve ASSP™ ile Ultra Yüksek Hızlı Tarama Performansı
- Farklı Ölçüm Modları ile Yüksek Seçicilik ve Zengin Uygulama Seçenekleri
- Patentli Overdrive Lens Gürültü Azaltma Teknolojisi
- AART ve Easy sTop gibi kullanıcı Dostu Özellikler

#### GCMS-TQ8030 ile Yapabileceğiniz Bazı Analizler:

Pestisit ve Akrilamid Analizleri  
Yağ Asitleri Analizleri  
Aroma ve Alkol Analizleri  
Koruyucu Analizleri  
Gıda ile Temas Eden Ambalaj Analizleri

### Yapabilecekleriniz bu kadarla sınırlı değil!

HPLC ile **Aflatoksin** ve diğer **Mikotoksinler**, **Tatlandırıcı** ve **Antibiyotik Analizleri**, **AAS** ile **Ağır Metal Analizleri**, **FTIR** ile **Ambalaj Analizleri**, **BioSpec Nano** ile **DNA/RNA/Protein Kantitasyonu** ve gıdaya yönelik daha nice uygulama

| antteknik.com |

Moleküler biyoloji alanında yapmak istediğiniz her tür araştırma konusu için, firmamız bünyesinde bulunan laboratuvar imkanlarından faydalanabilir ya da hizmet alabilirsiniz.

### Moleküler Genetik Yöntemlerle Yapılan Araştırma Konuları;

- SNP Analizi
- Mutasyon Tayini
- mRNA Array
- miRNA Array
- CGH Array
- Metilasyon Array
- CHIP - chip
- CNV Array,
- Yeni Nesil Dizileme,
- Patojen Tespiti,
- Virus / Bakteri Deteksiyonu,
- İlaç Direnci Tespiti,
- Ette Tür Tayini,
- GMO Araştırma,

Var/Yok Analizi,  
Kantitatif Analiz,  
Melting Analizi,

High Resolution Melting Analizi

### Laboratuvar İmkanları;

- Roche Magna Lyser Homojenizator
- Roche MagnaPure Compact Otomatik Nükleik Asit İzolasyon Robotu
- Roche LightCycler 480 Real-Time PCR sistemi
- Roche LightCycler 1.5 Real-Time PCR sistemi
- Agilent Array Platformu
- Roche GS Junior Yeni Nesil Dizileme
- Agilent Bioanalyser,
- Hücre Kültür Laboratuvarı



454 LIFE SCIENCES



**INTERLAB**  
LABORATUAR ÜRÜNLERİ SAN. ve TİC. A.Ş

**ISOLAB**  
Laborgeräte GmbH

**SIGMA-ALDRICH™**

**SUPELCO™**  
Analytical

**ALDRICH™**  
Chemistry

**SIGMA™**  
Life Science

**Fluka™**  
Analytical



Tüketicilerinin ihtiyaçlarını  
karşılacak her bir bilgi parçasını  
ürün veya hizmet kalitesine  
dönüştürmenin gururunu  
yaşıyoruz.

Başka nasıl bir marka  
ürünlerini 59 ülkeye ihraç edebilir ki?



[www.interlab.com.tr](http://www.interlab.com.tr)

[www.isolab.de](http://www.isolab.de)

**İstanbul**  
Tel: (0212) 798 21 68  
34@interlab.com.tr

**Ankara**  
Tel: (0312) 397 39 39  
06@interlab.com.tr

**İzmir**  
Tel: (0232) 342 02 03  
35@interlab.com.tr

**Adana**  
Tel: (0322) 226 66 38  
01@interlab.com.tr

**Eskişehir**  
Tel: (0222) 225 90 20  
26@interlab.com.tr



Laboratuvarınızdaki tüm cihazlar tek bir tuşla çalışıyor, One Click™!  
One Click™, hızlı metod seçme ve adapte etme olanağı, yüksek güvenlik ve zamandan tasarruf sağlar.

#### Nem Tayin Cihazları



Termal Analiz Cihazları

#### Titratörler



pH Metreler

#### Hassas Teraziler



RAININ Pipetler

#### Yetkili Bölge Bayilerimiz

**Marmara Bölgesi**

Arif Malyer Elektronik Terazi Lab. Cih., Tel: 0224 272 68 00

**Ege Bölgesi ve Akdeniz Bölgesi**

ECS Laboratuvar Cihazları Ltd. Şti., Tel: 0232 435 17 87

**Ankara ve İç Anadolu Bölgesi**

Mettech Ankara , Tel: 0506 710 13 71

**Adana ve Güney Doğu Anadolu Bölgesi**

Promed, Tel: 0322 226 55 65

**Van ve Doğu Anadolu Bölgesi**

Aygenler, Tel: 0432 216 58 52

**Mettler-Toledo TR**, Altunizade Mah. Haluk Türksöy Arka Sk.

No: 6-Z1, Üsküdar/İstanbul Tel: 0216 400 20 20

[www.mt.com](http://www.mt.com)

**METTLER TOLEDO**

# bioMérieux Mikrobiyolojide Lider

bioMérieux **50**

Pioneer today and tomorrow™

Hazır Besiyeleri

**BioBall™**

BioBall  
Sayısı Belirli Kalite  
Kontrol Suşları

**AIR IDEAL 3P™**  
Traceability

Airideal  
Aktif Hava Kontrol  
Cihazı

Dilumat  
Otomatize  
Dilüsyon Terazisi

Smasher  
Hız Ayarlı ve Sessiz  
Stomacher Cihazı

**VIDAS**

Hızlı Patojen  
Tespit Sistemi

**TEMPO™**  
reader

Otomatize Gıda  
Mikroorganizmaları  
Sayım Sistemi

**VITEK 2™**  
compact

Tam Otomatik  
Mikroorganizma  
Tanımlama Sistemi

# 50

**bioMérieux,**  
Bütün gıda üreticilerine,  
mikrobiyolojik kalite kontrollerini  
sağlamada

- Hızlı
- Güvenli
- Uyumlu ve
- Hassas

Sonuçlar veren çözümler sunar...

  
**BIOMÉRIEUX**  
INDUSTRY

Tel: 444 00 83 info@biomerieux.com.tr www.biomerieux.com.tr

# Lezzet “Emek” ister.

Yarım asırdır olduğu gibi...



MARPA 0 224 245 35 15

**Emek**

[www.emekyag.com.tr](http://www.emekyag.com.tr)



# BOLACALAR

## UN - YEM - YAĞ

Bolacalar yarım asırlık tecrübesiyle, tarımsal ürünleri işleyerek gıda ve yem sanayi için gerekli olan başlıca ürünleri ve hammaddeleri üretmektedir.



BOLACALAR Un-Yem-Yağ Gıda San. ve Tic. A.Ş.  
Adres : Bursa Cad. No:45/1 Yenişehir / Bursa  
Tel : 0 224 773 1821 Faks : 0 224 773 1823  
www.bolacalar.com bolacalar@bolacalar.com

SGS ISO 9001-SGS ISO 22000