



T.C.

**AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**KARVAKROL, TİMOL VE KÜMİNALDEHİT' İN *Escherichia coli*
ATCC 25922 İLE KONTAMİNE EDİLMİŞ KIYMA
ÖRNEKLERİNDE DOĞAL ANTİMİKROBİYAL OLARAK TEK
TEK VE KOMBİNE KULLANIMLARI DURUMUNDA
KORUYUCULUKLARININ BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve Nur ÖZBEK

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Fatma ŞAHMURAT

AKSARAY, 2024

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 212324002 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi Merve Nur ÖZBEK tarafından hazırlanan “**KARVAKROL, TİMOL VE KÜMİNALDEHİT’ İN *E. COLİ* ATCC 25922 İLE KONTAMİNE EDİLMİŞ KIYMA ÖRNEKLERİNDE DOĞAL ANTİMİKROBİYAL OLARAK TEK TEK VE KOMBİNE KULLANIMLARI DURUMUNDA KORUYUCULUKLARININ BELİRLENMESİ**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Fatma ŞAHMURAT

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.....

Üye: Prof. Dr. Mustafa ARDIÇ

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.....

Üye: Dr. Öğretim Üyesi Serpil YALIM KAYA

Mersin Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.....

Tez Savunma Tarihi: 08/02/2024

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

Prof. Dr. Mehmet Ali HINIS
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu, çalışmamda kullandığım verilerin orijinalliğini ve her türlü intihalden uzak olduğunu beyan ederim.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Merve Nur ÖZBEK

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda desteğini ve kılavuzluğunu esirgemeyen ve çok yoğun hissettiğim, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle elinden gelenin fazlasını sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, bütün sorularıma her zaman cevap alabildiğim, hoşgörülü yaklaşımı, manevi desteği, güler yüzü ve yardımseverliğiyle tezimin her kısmında katkılarını sunan, hem akademik hayatı hem de insani yönleriyle örnek aldığım ve birlikte çalışmaktan büyük gurur duyup keyif aldığım, çok değerli tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Fatma ŞAHMURAT' a en içten sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve yüksek lisans sürecimin başından beri yanımda olduğunu her zaman hissettiğim ve tez sürecimde de desteğini esirgemeyen, öğrencisi olmaktan hep onur duyacağım, çok kıymetli hocam sayın Prof. Dr. Özen ÖZBOY ÖZBAŞ' a teşekkürü bir borç bilirim. Fikir ve çalışmalarıyla mesleki yaşamımıza ışık olan, hayatımıza dokunan ve tez savunma jürimde yer alarak beni onore eden anabilim dalı başkanımız çok değerli hocam Prof. Dr. Mustafa ARDIÇ' a çok teşekkür ederim. Yüksek lisans tezi savunma jürimde yer alarak görüşleri, katkıları ve eleştirileri ile tezimi değerlendiren saygı değer hocam Dr. Öğretim Üyesi Serpil YALIM KAYA' ya katkılardan dolayı içtenlikle teşekkür ederim. Tez çalışmamda her daim akademik bilgi birikimini benimle cömertçe paylaşan ve mikrobiyolojik alanda yol gösteren sayın Dr. Öğr. Deniz KOÇAN' a ve üniversite eğitimim boyunca her türlü desteği ve yardımı esirgemeyen “Gıda Mühendisliği Yüksek Lisans Programı” öğretim üyelerine müteşekkirim. Laboratuvar süreci içerisinde karşılaştığım problemlerin çözümü için kendilerine ne zaman danışsam bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, her zaman pozitif enerjileri ile beni motive eden, kıymetli hocalarım, Arş. Gör. Dr. Halil İbrahim KAHVE ve Arş. Gör. Dr. Furkan AYDIN' a teşekkürü bir borç bilirim. Bu süreçte beni yalnız bırakmayan ve laboratuvardaki çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen, Aksaray Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Lisansüstü öğrenimi gören değerli arkadaşım Kamran BAGHIROV' a ve tez dönemim süresince bana destek olarak, arayıp, fikirlerini ve tecrübelerini benimle paylaşan canım arkadaşım Arife YAŞAR' a en içten sevgilerimle teşekkür ederim.

Her zaman olduğu gibi Yüksek Lisans eğitimime başlarken de en büyük destekçim olan, bugünlere gelmemi sağlayan, anlayışını, sabrını, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen hayatım boyunca fedakârlık gösterip ellerini omzumda hissettiğim, koşulsuz sevgilerinden ve varlıklarından güç aldığım değerli ailem, babacığım Ahmet ÖZBEK ve canım annem Hatice ÖZBEK' e, Tüm eğitim sürecimde yardım ve desteklerini üzerimde gördüğüm ablam Gül ÖZBEK ve kardeşim Yusuf Can ÖZBEK' e, sonsuz minnet, saygı ve teşekkürlerimi sunarım...

Ayrıca büyük bir sabır, azim ve inatla bıkmadan, yorulmadan, hedefimden, hayallerimden vazgeçmediğim için kendime çok teşekkür ederim.

Merve Nur ÖZBEK

AKSARAY, 2024

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR TARAMASI.....	3
2.1 Kırmızı Et	3
2.2 Ette Bozulma Etmeni Mikroorganizmalar.....	4
2.3 Escherichia coli (<i>E. coli</i>)	5
2.4 Doğal Antimikrobiyaller	15
2.4.1 Karvakrol	20
2.4.2 Timol	25
2.4.3 Küminaldehit.....	27
2.5 Nanoenkapsülasyon.....	30
2.5.1 Nanoenkapsülasyon uygulamaları	33
2.6 Gıdalarda Doğal Antimikrobiyal Uygulamaları	38
2.6.1 Karvakrol uygulamaları	38
2.6.2 Timol uygulamaları	50
2.6.3 Küminaldehit uygulamaları	52
2.6.4 Timol ve Karvakrolün birlikte uygulandığı çalışmalar	57
3. MATERYAL VE YÖNTEM	67
3.1 Kullanılan Materyaller	67
3.1.1 Doğal antimikrobiyaller	67
3.1.2 Kullanılan mikroorganizmalar	67
3.1.3 Çalışmada kullanılan besiyerleri ve çözeltiler	67
3.1.4 Kullanılan kıyma	67
3.2 Yöntem	68
3.2.1 <i>E. coli</i> ATCC 25922 mikroorganizmasının aktifleştirilmesi	68
3.2.2 Antimikrobiyal stok emülsiyon çözeltilerinin hazırlanması	68
3.2.3 Deney tasarımı.....	69
3.2.4 Antimikrobiyallerin çiğ kıyma üzerindeki <i>E. coli</i> ATCC 25922' ye karşı etkisi.....	69
3.2.5 Bakteri sayımı	72
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	74
4.1 Nanoemülsiyonun Parçacık Boyut Değerleri	74
4.2 Nanoemülsiyonun Zeta (ζ) Potansiyel Değerleri	76
4.3 Deney Sonuçları.....	78
4.4 Optimizasyon (Doğrulama Analizi Sonuçları)	90
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	92
KAYNAKLAR.....	94
ÖZGEÇMİŞ	108

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KARVAKROL, TİMOL VE KÜMİNALDEHİT' İN *Escherichia coli* ATCC 25922 İLE KONTAMİNE EDİLMİŞ KIYMA ÖRNEKLERİNDE DOĞAL ANTİMİKROBİYEL OLARAK TEK TEK VE KOMBİNE KULLANIMLARI DURUMUNDA KORUYUCULUKLARININ BELİRLENMESİ

Merve Nur ÖZBEK

Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Fatma ŞAHMURAT

ÖZET

Mevcut çalışmada, gıdalar üzerinde doğal antimikrobiyaller olarak kullanım potansiyelleri bulunan timol, karvakrol ve küminaldehitin nanoemülsiyonlarının *Escherichia coli* ATCC 25922 mikroorganizması ile kontamine edilmiş taze kırmızı et (kıyma) üzerindeki antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. Bu amaçla Yanıt Yüzeyi Yöntemi Box-Behnken Tasarımı ile 4 faktör (karvakrol, timol, küminaldehit konsantrasyonları ve depolama günü) için 5 merkezi nokta kullanılarak deney planı yapılmıştır. Deney tasarımı belirlenen dozlardaki antimikrobiyaller önceden *Escherichia coli* ATCC 25922 ile inoküle edilmiş olan çiğ formdaki kıymalara eklenmiş ve buzdolabı koşullarında (+4 °C) 1., 15. ve 29. günlerde canlı mikroorganizma sayılarını belirlemek üzere test edilmiştir.

Yapılan deney sonucunda karvakrol ve timolün kıymada bulunan *E. coli* ATCC 25922 suşuna karşı etkin olduğu gözlenirken küminaldehitin etkisiz olduğu belirlenmiştir. Ayrıca depolama süresi de *E. coli* ATCC 25922'in aktivitesi üzerine etkili bulunmuştur. Verilerin doğrusal modele uygunluk gösterdiği belirlenmiştir. Analiz sonuçlarında maksimum azalma görülen antimikrobiyallere (karvakrol, timol) baktığımızda ise hedef mikroorganizma üzerinde (*E. coli* ATCC 25922) 3 log ve üzerinde bir azalmanın sağlanabilmesi için bu antimikrobiyallerin toplamının 3750 ppm olmasının gerektiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca yapılan optimizasyonda optimum koşullar hedeflenen mikrobiyal azalma (5 log) için karvakrol konsantrasyonu 2158,2 ppm, timol için 2227,95 ppm, küminaldehit için ihmal edilebilir küçüklükte ve depolama günü 22 olarak bulunmuştur. Bu koşullarda teorik olarak 4,97 değerinde olan bir azalma tahmin edilirken, doğrulama deneyleri sonucu bu değer 5,22±1,32 log seviyesinde olan azalma şeklinde olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda modelin optimum koşullardaki uyumluluk sonucu % 5 'lik bir hatayla sonuçlanmış olup model ile deneysel sonuçların uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Hedef 22. günde (37 °C) sağlanmış olup modelin doğrulanması kanıtlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Escherichia coli*, Kırmızı et, Karvakrol, Timol, Küminaldehit, Doğal Antimikrobiyaller, Yanıt Yüzey Yöntemi.

Şubat, 2024; 108 sayfa

M.Sc. THESIS

DETERMINATION OF THE PROTECTIVE EFFECTS OF CARVACROL, THYMOL AND CUMINALDEHYDE WHEN USED INDIVIDUALLY AND IN COMBINATION AS NATURAL ANTIMICROBIALS IN GROUND MEAT SAMPLES CONTAMINATED WITH *E. COLI* ATCC 25922

Merve Nur ÖZBEK

Aksaray University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Asst. Prof. Fatma ŞAHMURAT, PhD

ABSTRACT

In the current study, the antimicrobial effects of nanoemulsions of thymol, carvacrol and cuminaldehyde, which have the potential to be used as natural antimicrobials on foods, were examined on fresh red meat (minced meat) contaminated with *Escherichia coli* ATCC 25922 microorganism. For this purpose, an experimental plan was made using the Response Surface Method Box-Behnken Design and five central points for four factors (carvacrol, thymol, cuminaldehyde concentrations and storage day). Antimicrobials at the doses determined in the experimental design were added to raw ground meat previously inoculated with *Escherichia coli* ATCC 25922 and tested to determine the number of live microorganisms on the 1st, 15th and 29th days under refrigerator conditions (+4 °C).

As a result of the experiment, it was determined that carvacrol and Thymol were effective against the *E. coli* ATCC 25922 strain found in ground meat, while cuminaldehyde was ineffective. Additionally, storage time was found to be effective on the activity of *E. coli* ATCC:25922. It was determined that the data conformed to the linear model. When we look at the antimicrobials (carvacrol, thymol) that showed maximum reduction in the analysis results, it was concluded that the total of these antimicrobials should be 3750 ppm in order to achieve a 3 log or more reduction on the target microorganism (*E. coli* ATCC 25922). In addition, in the optimization, the optimum conditions for the targeted microbial reduction (5 logs) were found to be 2158.2 ppm for carvacrol concentration, 2227.95 ppm for thymol, negligible for cuminaldehyde, and 22 storage days. While a theoretical decrease of 4.97 was predicted under these conditions, verification experiments showed that this value was a decrease of 5.22 ± 1.32 log level. At the same time, the compatibility result of the model under optimum conditions resulted in an error of 5%, and it was determined that the model and experimental results were compatible. The target was achieved on the 22nd day (37 °C), proving the validity of the model.

Keywords: *Escherichia coli*, Red meat, Carvacrol, Thymol, Cuminaldehyde, Natural Antimicrobials, Response Surface Methodology.

February, 2024; 108 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Elektron mikroskopunda <i>E. coli</i> mikroorganizmasının görünümü.....	6
Şekil 2.2. <i>E. coli</i> O157 izolatının elektron mikrografisi.	7
Şekil 2.3. EAEC' ye ait 'Yığılmış Tuğla' modeli.	12
Şekil 2.4. <i>E. coli</i> O157' nin canlılara bulaşma şeması.	14
Şekil 2.5. Uçucu yağların antimikrobiyal etki mekanizması.	17
Şekil 2.6. (A), (B) Kekik, (C) Kekik tohumları.	20
Şekil 2.7. Kekik aromatik bitkisinden karvakrol oluşumu.	21
Şekil 2.8. Karvakrolün aromatik halka yapısı.	23
Şekil 2.9. Karvakrolün antibakteriyel etki mekanizması.	24
Şekil 2.10. Timolün aromatik halka yapısı.	25
Şekil 2.11. Karvakrol ve timolün biyolojik aktiviteleri.	26
Şekil 2.12. Timol ve karvakrolün gıda ürünlerine uygulanmasına örnekler.	27
Şekil 2.13. (A) Kimyon, (B) Kimyon tohumları, (C) Küminaldehitin halka yapısı...29	
Şekil 2.14. Küminaldehitin tıbbi ve tıbbi olmayan etkileri.	30
Şekil 2.15. Küminaldehitin bakterilere karşı etki mekanizması.	30
Şekil 2.16. Nanokapsüllenmiş uçucu yağların gıda kaynaklı mikroorganizmalara karşı speküle edilmiş etki mekanizmasının şematik gösterimi.	32
Şekil 3.1. Bandelin Sonopuls HD 2200 ultrasonikasyon cihazı.	69
Şekil 3.2. <i>E. coli</i> bakterisinin koloni sayımı.	73
Şekil 4.1. Karvakrol nanoemülsiyonunun parçacık boyutu dağılım grafiği.	75
Şekil 4.2. Timol nanoemülsiyonunun parçacık boyutu dağılım grafiği.	75
Şekil 4.3. Karvakrol nanoemülsiyonunun zeta potansiyeli dağılım grafiği.	77
Şekil 4.4. Timol nanoemülsiyonunun zeta potansiyeli dağılım grafiği.	77
Şekil 4.5. Tahmini ve gerçek değerlerin model uyum grafiği.	83
Şekil 4.6. Tahmini ve farklar model değerlendirme.	83
Şekil 4.7. Karvakrolün mikrobiyal yük üzerindeki etkisi.	85
Şekil 4.8. Timolün mikrobiyal yük üzerindeki etkisi.	86
Şekil 4.9. Küminaldehitin mikrobiyal yük üzerindeki etkisi.	86
Şekil 4.10. Gün faktörünün mikrobiyal yük üzerindeki etkisi.	87
Şekil 4.11. Karvakrol ve timolün 1. gündeki birlikte etkileri.	88
Şekil 4.12. Karvakrol ve timolün 15. gündeki birlikte etkileri.	89
Şekil 4.13. Karvakrol ve timolün 29. gündeki birlikte etkileri.	89

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kırmızı etin fiziko-kimyasal özellikleri	4
Çizelge 2.2. <i>E. coli</i> bakterisinin patojenik türleri	10
Çizelge 2.3. Bazı baharat türlerine ait ana bileşenler	16
Çizelge 2.4. Kekik esansiyel yağının % bileşimi	22
Çizelge 2.5. Kimyon esansiyel yağının bileşenlerinin oranları (%)	28
Çizelge 3.1. Box-Behnken deneme deseni için parametreler ve seviyeleri.	69
Çizelge 3.2. Deney tasarımı.	70
Çizelge 3.3. Çiğ kıyma örneklerinin karışım oranları.	71
Çizelge 4.1. Nanoparçacıkların zeta potansiyel değeri ile kararlılığı arasındaki ilişki.	76
Çizelge 4.2. Deney sonuçları.....	79
Çizelge 4.3. Regresyon katsayı (R^2) değerleri.	82
Çizelge 4.4. Doğrusal model için varyans (ANOVA) sonuçları.	84
Çizelge 4.5. Optimizasyon koşulları.....	91
Çizelge 4.6. Optimum koşullarda deneysel ve tahmini değerlerin karşılaştırılması.	91

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AIEC	Adherent-Invasive
AITC	Alil-izotiyosiyanatın
ANOVA	Varyans Analizi (Analysis of Variance)
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenozin Trifosfat
BPEO	Black Pepper Essential Oil - Karabiber esansiyel yağı
CAR	Karvakrol
CEO	Kimyon esansiyel yağı
CFU	Koloni oluşturan birim
DAEC	Diffusely Adherent <i>Escherichia coli</i> (Yaygın derecede yapışkan)
DNA	Deoksiriboz Nükleik Asit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	Enteroagregatif <i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohemorajik <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvaziv <i>Escherichia coli</i>
EO	Bitki Esansiyel Yağları
EOC	Esansiyel yağ bileşenleri
EPEC	Enteropatojenik <i>Escherichia coli</i>
ESBL	Extended-spectrum β -lactamase <i>Escherichia coli</i>
ETEC	Enterotoksijenik <i>Escherichia coli</i>
FİK	Franksiyonel İnhibitör Konsantrasyonu
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
GC-MS	Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
GEO	Zencefil Esansiyel Yağı
GRAS	Generally Recognized as Safe - Güvenli Olarak Kabul Edilen
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HUS	Hemolitik Üremik Sendrom
IU	İnternational Unit – Uluslararası birim
İYE	İdrar yolu enfeksiyonu
KV	Kilovat
L	Litre
LAB	Laktik asit bakterileri
LT	Isıya duyarlı enterotoksin
MAP	Modifiye atmosfer paketlenme
MBK	Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
MC	Nem içeriği
MERLAB	Merkez Laboratuvarı
MFK	Minimum fungusit konsantrasyonu
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MNEC	Menenjit/sepsis ile ilişkili <i>Escherichia coli</i>
MRSA	Antibiyotiğe dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MTK	Maksimum tolere edilen konsantrasyonlar
NE	Timol-nanoemülsiyonun
NMEC	Yenidoğan Menenjit <i>Escherichia coli</i>
ODTÜ	Orta Doğu Teknik Üniversitesi
OEO	Kekik esansiyel yağı
OVEO	Origanum vulgare esansiyel yağı

OZT	Orta zincirli trigliserit
PC	Prostat kanseri
PCA	Plate Count Agar
PEF	Darbeli elektrik alanları
PPM	Parts Per Million (Milyonda Bir Birim)
REO	Biberiye uçucu yağı
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
ST	Isıya dayanıklı enterotoksin
STEC	Shiga toksin üreten <i>Escherichia coli</i>
spp	Türleri
TBARS	Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler
T-CS	Timol kitosan nanoemülsiyonları
TEO-CS	Kekik esansiyel yağı içeren kitosan nanoemülsiyonları
THY	Timol
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
UPEC	Üropatojenik <i>Escherichia coli</i>
WMEO	Hardal esansiyel yağı
ZnO NP	Çinko oksit nanopartikülleri
cm	Santimetre
cm²	Santimetrekare
dk	Dakika
g	Gram
kg	Kilogram
kGy	Kilo gray
kHz	Kilo Hertz
kob/ml	Bir Mililitre Başına Koloni Oluşturan Birim
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mV	Milivolt
µg	Mikrogram
µmol	Mikromol
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
pH	Potansiyel Hidrojen
R²	Regrasyon Katsayısı
W	Watt
°C	Santigrat
ζ	Zeta
%	Yüzde
<	Küçüktür
~	Yaklaşık

1. GİRİŞ

Sığır eti önemli bir protein ve çeşitli temel vitamin kaynağıdır. Besin açısından zengin bir gıda olduğundan, çiğ et ürünlerinde mikroorganizmalar hızla çoğalabilmekte ve uygun olmayan koşullarda kolayca bozulabilmektedir. Özellikle kıyma, proses ekipmanlarından kolaylıkla çapraz kontaminasyona uğrayabilir ve hızla kalitesini kaybeder. Tüketicilerin daha sulu ve yumuşak sığır eti yemeyi tercih etmesi nedeniyle yetersiz ısı işlem yaygınlaşmakta ve önemli sağlık risklerine neden olmaktadır.

E. coli O157:H7, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* et bazı ürünlerle ilişkili gıda kaynaklı organizmalardan bazılarıdır. Bu patojenik bakterilerin tümü, yetersiz hijyen ve sanitasyon uygulamaları nedeniyle çapraz kontaminasyon yoluyla yayılabileceğinden et endüstrisi için büyük bir tehlikedir. *E. coli O157:H7*'nin on hücre kadar düşük bir bulaşıcı dozu vardır. İnsanları kolayca hasta edebilir; bu nedenle bilim insanları, gıda üreticileri, tüketiciler ve düzenleme kurumları bunu ciddiye almıştır ve sığır etinde *E. coli* bakterisi bulunması durumunda enfeksiyon olasılığını önlemek için etin satılmadan imha edilmesini bildirmektedirler. Bu eylem kayıplara veya sektöre ek maliyetlere neden olur.

Son yıllarda tüketicilerin daha doğal gıdalara olan talebi, üreticileri doğal gıda katkı maddeleri kullanmaya zorlamakta ve sentetik olanın yerine doğal antimikrobiyaller ve antioksidanlar gıda endüstrisinde kullanım olanaklarının araştırılmasını teşvik etmektedir. Birçok araştırmacı uçucu yağların ve onların aktif bileşenlerinin antimikrobiyal ve antioksidan aktivite gösterdiğini ortaya koymuş ve bunların gıda endüstrisinde doğal antimikrobiyal ve antioksidan olarak kullanılmasını önermiştir. Üstelik bu bileşenlerin gıda ürünlerine uygulanması, tıbbi faydalarının da olmasından dolayı eklendikleri ürünlere "fonksiyonel gıda" olarak değer katmaktadır.

Uçucu yağlar, bitkilerin farklı kısımlarından elde edilen uçucu doğal karışımlardır ve fenolikler, fenolik asitler, kinonlar, flavonoidler, tanenler, kumarinler, terpenoidler ve alkaloidler gibi ikincil metabolitlerden oluşurlar. İkincil metabolitler doğal olarak bitkinin mikroorganizmalara, böceklerle ve otçullara karşı savunma mekanizmasını sağlar. Bitki hücresinde her zaman mevcut olabilirler veya mikroorganizma veya böceklerin istilasına yanıt olarak üretilirler. Bunların, gıda kaynaklı patojenik bakterileri kontrol etme yeteneğine sahip potansiyel antimikrobiyal ajanlar olarak

Çalıştığı bilinmektedir. Uçucu yağların ya da bileşenlerinin kullanımının, güçlü antimikrobiyal doğaları nedeniyle doğal olarak gıda koruyucuları olarak etkili olabileceği düşünülmektedir. Ancak keskin aroma ve koku özellikleri nedeniyle istenmeyen organoleptik etkiler görülmesi kullanımlarını sınırlamaktadır. Bu maddelerin birbiriyle kombine kullanılması durumunda etkin doz oranları azalabilir ve bu olumsuz etki azaltılabilir.

Bu kapsamda mevcut çalışmada, *E. coli* ATCC 25922 ile kontamine edilmiş taze kıyma örneklerinde doğal antimikrobiyaller olarak karvakrol, timol ve küminaldehitin tek başlarına ve ikili, üçlü kombinasyonlarıyla kullanımları durumunda *E. coli* ATCC 25922'ye karşı gösterdikleri etkinin belirlenmesi amacıyla Yanıt Yüzey Yöntemi Box Behnken tasarımı ile deneme planı oluşturulmuş ve belirlenen deneme noktalarında mikrobiyal yükteki logaritmik değişim belirlenmiştir. Alınan sonuçlar analiz edilerek farklı antimikrobiyal konsantrasyonları ve depolama günlerinde mikrobiyal yükte oluşabilecek değişimin tahminlenmesini sağlayacak bir model bulunmuştur. Yapılan optimizasyon 5 log azalma hedeflenmiş ve bu hedefi karşılayan timol, karvakrol, küminaldehit dozları ve depolama süreleri hesaplanmıştır. Hesaplanan optimum nokta model doğrulaması için kullanılmıştır.

2. LİTERATÜR TARAMASI

2.1 Kırmızı Et

İnsan nüfusunun çoğalarak artması sebebiyle, gıda maddelerine olan ihtiyaçta gittikçe artmaktadır. Dolayısıyla, insan sağlığı için önemli bir yeri olan kırmızı et ve ürünlerine olan ilgi de yoğundur. Ülkemizde bulunan gıda güvenliğindeki gelişmeler, tüm ürünlerde olduğu gibi kırmızı et ve et ürünlerinin tüketicilere sağlıklı ve sorunsuz bir şekilde ulaşması için son hızıyla devam etmektedir (Tosun ve Demirbaş, 2012). Yapısından kaynaklı olarak taze ve işlenmemiş kırmızı et - kıyma diğer ürünlere göre daha kolay bozulma eğilimindedir. Bu sebeple bu ürünlerin hem üretimi hem de depolanması aşamasında çok miktarda başta mikrobiyolojik ve bunun yanında biyokimyasal, fizikokimyasal ve çeşitli enzimatik değişimler meydana gelmektedir (Sezer ve Bozkurt, 2021).

Kırmızı et, genellikle sığır, koyun, dana, domuz gibi otçul hayvanlardan elde edilen bir et olup esas olarak su, yüksek miktarda protein ve yağdan oluşmaktadır. Bu et türü, demir, çinko ve B vitaminleri içermektedir. Rengi ise içerisindeki miyogloblin pigmentinden kaynaklı olarak kırmızıya yakın tonlardadır. Farklı kesimlerden elde edilen kırmızı et türleri arasında biftek, bonfile, döner, kuzu pirzola ve sosis gibi çeşitler bulunmaktadır. Kıymayı tanımlayacak olursak kırmızı taze etin çok ince halde makinada veya el yardımıyla çekilmiş haline denilmektedir. Türkiye'de genellikle başta dana gibi koyun ve kuzulardan da elde edilmektedir, aynı zamanda hindi eti ve tavuk etinden de kıymalara rastlanılmaktadır. Protein bakımından zengin olduğundan ve damak zevkine uygunluğundan dolayı et dünyada sıklıkla tüketilen bir besin kaynağıdır. İşlenmemiş etlerde, uygun muhafaza ve yeterli koruma koşulları sağlanamadığı takdirde saatler veya günler içerisinde bozulma gözlenmektedir (URL-5). Kırmızı etin fiziko-kimyasal özellikleri Çizelge 2.1' de gösterilmiştir (Comi, 2017).

Et ve et ürünlerinde kesim sonrası, işleme ve depolama sırasında meydana gelen bozulmaların başlıca nedenleri; mikroorganizmalar, lipid oksidasyonu ve enzimatik bozulmadır. Etin mikrobiyal şekilde bozulması, depolama sıcaklığına ve paketleme koşullarına bağlı olarak birçok farklı bakteri popülasyonunun katkıda bulunabileceği karmaşık bir olaylar bütünüdür. Bozulma, mikrobiyal gelişimden ve et besinlerinin bakteriler tarafından tüketilmesinden ve bunun sonucunda istenmeyen metabolitlerin

salınmasından kaynaklanabilir. Etin bozulması, biyolojik ve kimyasal aktivitelerin bir kombinasyonunun etkileşime girebileceği ve ürünün insan tüketimi için kabul edilemez hale gelmesi olarak tanımlanabilmektedir (Casaburi vd., 2015).

Çizelge 2.1. Kırmızı etin fiziko-kimyasal özellikleri (Comi, 2017).

Parametre	Kırmızı Et
Su (nem)	75-80 %
Protein	15-20%
Yağ	2,5-8,2%
Vitamin (B)	0,8-0,9 mg/100 g
Şeker	0,4-1,2%
a_w	0,98-0,99
pH	5,5-5,7

2.2 Ette Bozulma Etmeni Mikroorganizmalar

Kırmızı ette bozulma genellikle mikroorganizmaların et üzerinde üremesi ve etin yapısal bütünlüğünü bozarak kalitesini düşürmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu mikroorganizmalar genellikle etin çevresinde bulunan bakteri, küf ve maya gibi organizmaları içermektedir. Taze ette kolonileşebilen mikroorganizmalar büyük ölçüde etin özelliklerine, işlenme ve depolanma şekline bağlı olarak değişebilmektedir (Casaburi vd., 2015).

Çiğ etin bozulması genel olarak depolama sırasında ette istenmeyen mikrobiyal gelişimden kaynaklanmaktadır. Et, en çabuk bozulan gıdalardan biri olarak kabul edilmektedir. Bunun nedeni, etin bozulmasına önemli ölçüde katkıda bulunan, kabul edilemez seviyelere kadar mikrobiyal büyümeyi destekleyen kimyasal bileşimidir. Etin başlangıçtaki mikrobiyal yükü, hayvanın kesim sırasındaki fizyolojik durumuna, mezbahalarda ve işleme sırasında kontaminasyonun yayılmasına bağlıdır. Dağıtım sırasındaki sıcaklık ve diğer koşullarda bozulma oranını etkileyebilmektedir. Literatüre göre taze kesilmiş etlerde *Acinetobacter* türü bakteriler başta olmak üzere *Pseudomonas* cinsleri, *Brochothrix* türleri ve bunlara ek olarak *Flavobacterium* mikroorganizmalarıda bulunmaktadır. Ayrıca *Psychrobacter*, Laktik asit bakterileri (LAB), *Staphylococcus* ve *Enterobacteriaceae* familyası gibi türlerde sıklıkla görülmektedir (Doulgeraki vd., 2012). Soğuk sıcaklıklarda ette gelişen bakteriler psikrotrofik olarak tanımlanmaktadır (Casaburi vd., 2015). Kırmızı ette bozulmaya neden olan *Aeromonas* türleri ile *Acinetobacter* cinsi mikroorganizmalar psikrotrofik

sınıfında yer almaktadırlar. *E. coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes* kırmızı ette gelişme gösteren diğer mikroorganizmalardandır ve bunları *Bacillus cereus*, *Alcaligenes* ve *Salmonella typhimurium* takip etmektedir. Ayrıca literatürde bozulma etmeni olarak *Brochotrix*, *Clostridium* ve *Streptococcus* cinsleri de tespit edilmiştir (Comi, 2017).

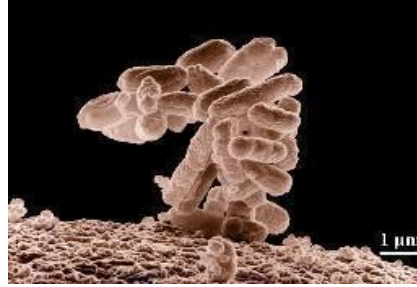
Et ve et ürünleri (kıyma, köfte), birçok patojen mikroorganizmaların gelişmesine neden olmaktadır. Bu patojenlerin başında *Escherichia coli* O157:H7 gelir (Kavrut, 2021). *Escherichia coli* (*E. coli*) gibi patojen bakteri türlerinin çiğ veya az pişmiş kırmızı et ile tüketilmesi sağlık açısından önemli tehlike oluşturmaktadır. Özellikle *E. coli* serotiplerinin neden olduğu gıda zehirlenmeleri ve diğer çeşitli hastalıklar olan hemolitik üremik sendrom (HUS), şiddetli ishal, böbrek yetmezliği gibi üriner sistem enfeksiyonları da bunların başında gelmektedir. Bu nedenle, taze kırmızı et ve oluşturdıkları et ürünlerinin güvenli bir şekilde işlenmesi ve tüketilmesi için uygun hijyen standartlarına ve pişirme yöntemlerine dikkat edilmesi gerekmektedir (Comi, 2017).

2.3 *Escherichia coli* (*E. coli*)

1885 yılında, Theodor Escherich adlı alman bir doktor *Escherichia coli* (*E. coli*) 'yi ilk olarak, (*Bacterium coli commune* olarak) bebek dışkılarından izole ederek tanımlamıştır. *E. coli*, genellikle memeli olarak sınıflandırılan hayvanların bağırsak floralarını takiben kalın bağırsakta yaşayan bir mikroorganizma türü olduğu için mevcut adını da buradan almıştır. Bu bakteri gram-negatif bir bakteri türü olup, *Enterobacteriaceae* familyasına aittir. Genellikle sindirim sistemi çevresinde bulunmakta ve insanlar için önemli bir rol oynamaktadır. Gram-negatif, çubuk şeklinde genellikle 1-2 µm uzunluğunda ve 0,5 µm genişliğinde (çapında) olan bir bakteri türüdür (Şekil 2.1) (Vila vd., 2016).

Fakültatif anaerobik özellik gösterir, yani hem oksijenli hem de oksijensiz ortamlarda yaşayabilmektedir. Gram-negatif olması, hücre zarının çift katmanlı oluşunu ifade eder. *E. coli* spp. hareketsiz, zorunlu patojenlerdir, tipik olarak laktozu fermente edemezler ve lizin dekarboksilaz ve indol negatiftirlerdir. Optimum büyüme şartlarında hızlı bir şekilde büyümekte ve ~20 dakika içerisinde çoğalabilmektedirler. Genellikle insan ve hayvanların sindirim sistemi mikrobiyotasının bir parçasıdır. *E.*

coli suşlarının son derece yaygın ve karmaşık bir insan patojeni olduğu ise ilk kez 1982 yılında iki hemorajik kolit salgınında rol oynadığı zaman anlaşılmıştır (Mead ve Griffin, 1998). ABD'de yılda tahmini 40.000 insanın ölüme neden olduğu çalışmalarla kanıtlanmıştır (Vila vd., 2016).



Şekil 2.1. Elektron mikroskopunda *E. coli* mikroorganizmasının görünümü.

E. coli bakterileri genellikle toplu halde yaşamaktadırlar (URL-1). *Escherichia coli*, canlılarda ve özellikle insanlarda yaygın olarak görülen birçok bakteriyel enfeksiyonun en temel nedenlerinin başında gelmektedir. Kommensal olarak konakçılar ile karşılıklı halde yarar sağlayan bir ilişki içinde yaşamlarını devam ettirmektedirler (Allocati vd., 2013). Canlılarda ciddi enfeksiyonlara sebebiyet vermesi ve farklı türlerinin otokton mikrobiyotasına ait önemli bölümünü temsil etmesinden kaynaklı mikrobiyoloji dünyasında spesifik ve ayrı bir yeri olan bakteri olarak nitelendirilmektedir (Poirel vd., 2018).

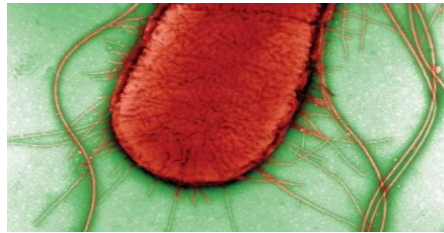
Mikrobiyoloji alanında geniş bir çalışma alanı içermesi nedeniyle de hem bilimsel araştırmalarda hem de biyoteknoloji uygulamalarında bu organizmanın önemi anlaşılmaktadır. *E. coli* O157 sağlıklı sığırların dışkısında bulunmakta ve kontamine gıda, su ve enfekte kişi veya hayvanlarla doğrudan temas yoluyla insanlara bulaşmaktadır. İnsan enfeksiyonu, asemptomatik dökülme, kanlı olmayan ishal, hemorajik kolit, hemolitik üremik sendrom (HUS) ve ölüm dahil olmak üzere çok çeşitli klinik hastalıklarla ilişkilidir. Doktorlar, hastalara az pişmiş kıyma veya pastörize edilmemiş süt ürünleri ve meyve suları tüketmenin tehlikeleri ve bu gıdaların önemi hakkında sürekli bilgiler vermektedirler (Mead ve Griffin, 1998).

E. coli türlerine ait bakteri suşlarının sınıflandırılması, çoğunlukla bakteri yüzeylerindeki doğal olarak var olan antijenler yoluyla yapılmaktadır. Bu sınıflandırma *E. coli*'nin O olarak nitelendirilen 'somatik', H diye tanımlanan

‘flagellar’ ile K olarak anılan ‘kapsül’ antijenlerine göre yapılmaktadır. Dış hücre zarının yapısını oluşturan O antijeni lipopolisakkarit yapıda olup ısıya direnç gösteren yüzey antijeni olarak da tanımlanmaktadır. Bu antijen beş veya daha fazla sayıdaki farklı polisakkarit grubu tarafından oluşturulmaktadır. "H" ise flagellada bulunan antijeni ifade etmektedir. *E. coli* serotipleri arasında ölümcül etki oluşturmamasından kaynaklı en tanınmış olan türü *O157:H7*'dir (URL-1).

Escherichia coli O157:H7, tanımlanan 157. somatik (O) antijeni ile 7. flagellar (H) antijenini ifade ettiği için bu şekilde adlandırılmıştır. *E. coli O157*'nin ne kadar süredir insan hastalıklarına neden olduğu hala bir spekülasyon konusudur. Genel olarak mevcut kanıtlar, *E. coli O157*'nin geçtiğimiz yarım yüzyılda önemli bir insan patojeni olarak ortaya çıktığını göstermektedir. *E. coli O157* enfeksiyonu hem kuzey hemde güney yarım kürede sıcak yaz aylarında daha yaygındır. Sağlıklı sığırlar, *E. coli O157* ile insan enfeksiyonu için önemli bir rezervuardır. Geviş getiren hayvanlarda özellikle yaygın olması, bu hayvanların bakteri için özel bir ortam oluşturduğunu düşündürmüştür. Gıda kaynaklı salgınların çoğu sığırlardan elde edilen gıdalardan, özellikle de kıyma ve çiğ süttten kaynaklandığı çalışmalarla kanıtlanmıştır (Mead ve Griffin, 1998).

Escherichia coli O157, bir grup patojenik *E. coli* enterohemorajik, verotoksin üretebilen veya Shiga toksin üretebilen canlılar olarak çeşitli şekillerde tanımlanan suşlardır. *E. coli O157*'nin neden olduğu ilk salgınlar, kanlı ishal başta olmak üzere şiddetli karın ağrısı ile oluşan bireylerden izole edilmesiyle 1982 yılında ABD'nin Oregon ve Michigan eyaletinde meydana gelmiştir. ABD'de 1973'ten, Kanada ve Birleşik Krallık'ta 1978'den kalma kültür koleksiyonlarında yapılan aramalarda, 1982'den önce depolanan yalnızca sekiz adet *E. coli O157* izolatının olduğu anlaşılmıştır. 1996 Orta İskoçya salgınından *E. coli O157* izolatının elektron mikrofasi Şekil 2.2' de gösterilmektedir (Pennington, 2010).



Şekil 2.2. *E. coli O157* izolatının elektron mikrofasi.

Escherichia coli omurgalı bağırsağı mikrobiyotasının ortak bir üyesi ve bağırsak mikrobiyotasının baskın aerobik bakterisidir. İnsanlarda görülme sıklığı %90' dan fazladır. *E. coli* suşları hem bağırsak dışı patolojilere (idrar yolu enfeksiyonları, çeşitli karın içi, akciğer, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, yenidoğan menenjit ve bakteriyemi) hem de bağırsak patolojilerine neden olmaktadır (HUS dahil ishalin çeşitli formları) (Denamur vd., 2020). En büyük endişe verici olan, dirençli *E. coli* dünya çapında hem insanlarda hem de hayvanlarda karşılaşılan en büyük zorluklardan biri olarak kabul edilmiş ve gerçek bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir (Poirel vd., 2018).

Bazı *E. coli* suşları, gıda kaynaklı hastalıklara neden olabilen patojenik özelliklere sahiptir. Et ve süt ürünleri gibi potansiyel olarak kontamine gıdaların iyi pişirilmesi, kişisel hijyen kurallarına uyulması ve güvenli su kaynaklarının kullanılması gibi önlemler, *E. coli* enfeksiyonlarının yayılmasını azaltmaya yardımcı olmaktadır. İnsanların ve diğer memelilerin normal bağırsak mikroflorasının önemli bir üyesi olmasının yanı sıra, çeşitli hastalıklara neden olan birçok patotipi de içerir. En az altı farklı patotip, ishal veya dizanteri gibi enterik hastalığa neden olur ve diğer patotipler, idrar yolu enfeksiyonları ve menenjit dahil olmak üzere ekstra bağırsak enfeksiyonlarına neden olur. Birkaç farklı *E. coli* suşu, çok çeşitli hücrel süreçleri etkileyen virülans faktörleri aracılığıyla çeşitli bağırsak ve bağırsak dışı hastalıklara neden olur. Genellikle *E. coli* ve insan konağı, sağlıklı bir şekilde ve karşılıklı yarar sağlayarak onlarca yıl boyunca bir arada yaşayabilirler (Kaper vd., 2004).

E. coli enfeksiyonlarının ilaçla tedavisi, antimikrobiyal olarak direncin ortaya çıkması sebebiyle önemli tehdit altındadır. Çoklu ilaca dirençli olan *E. coli* suşlarının yayılması sebebiyle tüm dünya üzerinde hastalıklarda artış görülmektedir. *E. coli* suşları içerisinde hastalık oluşumuna sebebiyet veren pek çok tip vardır. Bunlar hasta yaptıkları dokular ve hastalık mekanizmalarına dayalı olarak "patotip" olarak gruplandırılırlar (URL-1).

Escherichia coli' nin birçok serotipi bulunmakta olup genetik çeşitliliği nedeniyle çeşitli suşları ve alt tipleri içerisinde barındıran bir bakteri türüdür. Bu çeşitlilik, *E. coli*' nin farklı yaşam ortamlarına ve koşullara uyum sağlamasına olanak tanır. *E. coli* suşları genellikle belirli özelliklere göre sınıflandırılır, örneğin, *Enterohemorajik Escherichia coli* (EHEC) ile *enterotoksijenik Escherichia coli* (ETEC) ve

enteropatogenik Escherichia coli (EPEC) gibi patojenik suşlar, insanlarda hastalıklara neden olabilen suşlardır. Bunlara ek olarak bağırsak patojenleri arasında iyi tanımlanmış diğer suşlar ise başta *enteroagregatif Escherichia coli* (EAEC) ile *enteroinvaziv Escherichia coli* (EIEC) ve yaygın olarak yapışabilme özelliği gösteren *Escherichia coli* (DAEC)' dir. EPEC, EHEC ve ETEC ayrıca insan suşlarında bulunan virülans faktörlerinin çoğunu ve insan suşlarında bulunmayan benzersiz kolonizasyon faktörlerini kullanarak hayvanlarda hastalığa neden olabilmektedir. Bilinen altı ishal yapıcı *E. coli* kategorisinin her biri, ökaryotik hücrelerle etkileşimlerinde benzersiz özelliklere sahiptir (Kaper vd., 2004).

EPEC suşları, özellikle kötü hijyen koşulları altında çocuklarda ve hayvanlarda ishale neden olur. EHEC, hemorajik kolite veya HUS' a neden olan tipik olarak gıda kaynaklı bir patojendir. Tipik EHEC suşları, *E. coli*, STEC üreten Shiga toksini olarak adlandırılır. ETEC, her yaştan insanda hafiften şiddetliye kadar sulu ishale birlikte gezgin ishallerine neden olan en yaygın patojenlerdir. EAEC suşları insanlarda kalıcı ishal ile ilişkilidir ve dünya çapında birçok ishal hastalığı salgınının nedeni olarak kabul edilmektedir. Asemptomatik insanların bağırsaklarında sıklıkla bulunan EAEC, dünya çapında seyahat eden ishallerin ikinci en önemli nedenidir (Allocati vd., 2013).

EAEC sıklıkla gelişmekte olan ülkelerdeki çocuklarda ve HIV (Human Immunodeficiency Virus) ile enfekte hastalarda ishale ilişkilidir. AIEC, Crohn hastalığı lezyonlarıyla ilişkilendirilen, yakın zamanda ortaya çıkan bir patotiptir EIEC hem çocuklarda hem de yetişkinlerde sıklıkla sulu ishale ve bazen de dizanteriye neden olur. DAEC özellikle çocuklarda ishale neden olmaktadır. *E. coli* bakterisinin patojenik türleri Çizelge 2.2' de verilmiştir (Allocati vd., 2013).

E. coli çoğu sıcakkanlı hayvanın beslenme kanalının normal bileşenlerinden biridir; normal bir insan organizmasında prokaryotik hücrelerin sayısı insan hücrelerini yaklaşık 10 ila 1 oranında aşacak kadar çok sayıda prokaryotlardan oluşan karmaşık bir bağırsak topluluğudur. *E. coli*' nin birincil yaşam alanı ileum ve kolonun distal kısmını kapsayan alt bağırsaktır. *E. coli* bebeklerin, çocukların, yetişkinlerin ve seyahat edenlerin ishalleri hastalıklarında önemli bir etiyolojik ajandır. İshalleri hastalıklarla ilişkili üç tip suş ayırt edilmiştir; EPEC, ETEC ve EIEC olarak adlandırılmıştır (Hartl ve Dykhuizen, 1984).

Enteropatojenik E. coli (EPEC) suşları, 1940' ların sonlarından başlayarak, 0111:H2 ve 055:H6' yı da içeren bir serotip koleksiyonunun sıklıkla infantil ishal ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Diğer enteropatojenik bakteriler gibi, bu suşlar da bazen bebeklerde hastalığa neden olmadan ortaya çıkabilmektedir. EPEC suşları bağırsak mukozasına oldukça yapışkandır; bu durum, spesifik bir yapışkanlığı belirleyen plazmidin varlığıyla ilişkilidir. Ek olarak EPEC suşları, belirli *Shigella*'ların ürettiği toksinden ayırt edilemeyen bir protein toksini de üretmektedirler (Hartl ve Dykhuizen, 1984). EPEC suşları, temizliğe dikkat edilmemiş kötü denilebilecek hijyen durumlarında ilk başta çocuklarda meydana gelmek üzere ishale neden olmaktadır (URL-1).

Çizelge 2.2. *E. coli* bakterisinin patojenik türleri (Allocati vd., 2013).

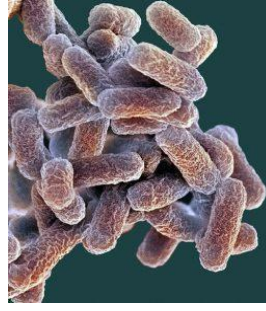
Patotip (Kısaltma)	Hastalıklar	Belirtiler
<i>Enteropatojenik E. coli</i> (EPEC)	Çocuklarda ishal	Sulu ishal ve kusma
<i>Enterohemorajik E. coli</i> (EHEC)	HUS	Kanlı ishal
<i>Enterotoksijenik E. coli</i> (ETEC)	Turist ishali	Sulu ishal ve kusma
<i>Enteroaggregatif E. coli</i> (EAEC)	Çocuklarda ishal	Mukus ve kusma ile ishal
Üropatojenik <i>E. coli</i> (UPEC)	Daha düşük İYE ve sistemik enfeksiyonlar	Sistit, piyelonefrit
Yapışkan invazif <i>E. coli</i> (AIEC)	Crohn hastalığı ile ilişkili	Kalıcı bağırsak iltihabı
<i>Diffusely Adherent E. coli</i> (DAEC)	Çocuklarda akut ishal	Tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonu (İYE), sulu ishal
Yenidoğan Menenjit <i>E. coli</i> (NMEC)	Yenidoğan Menenjit	Akut menenjit, sepsis

Enterohemorajik E. coli (EHEC) ilk kez 1982 yılında insan hastalığının nedeni olarak tanımlanmış, kanlı ishal (hemorajik kolit), kansız ishal ve HUS' a neden olmuştur. EHEC suşları, gıda tüketimi yoluyla insanlara bulaşabilir ve ciddi hastalıklara yol açabilir. Bu suşlar genellikle kontamine su veya gıdalarla temas sonucunda yayılmaktadır (Kaper vd., 2004).

Özellikle çiğ veya yetersiz pişmiş et, kontamine su, sebzeler veya süt ürünleri gibi gıda maddeleri aracılığıyla insanlara bulaşabilir. EHEC' nin neden olduğu hastalıklar arasında enterohemorajik kolit (bağırsak iltihabı) bulunmakta ve ciddi böbrek

sorunlarına, kanlı ishale yol açmaktadır. EHEC' nin ana rezervuarı sığır bağırsak sistemidir ve ilk salgınlar az pişmiş hamburger tüketimiyle ilişkilendirilmiştir. Enfeksiyon için gereken son derece düşük bulaşıcı dozun (<100 hücre olduğu tahmin edilmektedir) kolaylaştırdığı EHEC, aynı zamanda rekreasyonel ve belediye içme suyu, kişiden kişiye bulaşma ve hayvanat bahçesi ve çiftlik ziyaretleriyle bağlantılı çok sayıda salgına da neden olmuştur. EHEC' nin sebep olduğu kuluçka süresinin 3 ila 4 gün olduğu kanıtlanmıştır (Kaper vd., 2004). *Enterotoksijenik Escherichia coli* (ETEC) tipleri, çeşitli enterotoksinler oluşturarak hastalık yapmaktadırlar. Hafif, kendi kendini sınırlayan hastalıktan şiddetli tasfiye hastalığına kadar değişebilen sulu ishale neden olmaktadır. Organizma, gelişmekte olan ülkelerde çocukluk çağı ishalinin önemli bir nedenidir ve seyahat edenlerde ishalin ana nedenini oluşturmaktadır. ETEC ince bağırsak mukozasının yüzeyini kolonize eder ve bağırsak sekresyonuna yol açan enterotoksinleri üretir (Kaper vd., 2004). Üretilen enterotoksinler temel olarak iki tiptedir: kolera enterotoksinine bağlı ısıya duyarlı enterotoksin (LT) ve ısıya dayanıklı enterotoksin (ST). ETEC suşları LT veya ST ya da her ikisini birden üretebilir (Hartl ve Dykhuizen, 1984).

ST eksotoksini, bulunan epitel hücrelerinin suyu emmelerini engellerler, LT eksotoksinide mevcut hücrelerin suyla birlikte elektrolit salgılamalarına sebep olmaktadır. Dolayısıyla bağırsaktaki suyu, tuzu ve sıvı kaybındaki oranı artırarak tüm canlılarda salgısal ishale neden olmaktadır. EHEC tipi bakterilerde bahsi geçen bu ST ve LT eksotoksinleri bulunmamaktadır, bunlar Şhiga toksini salgılamakta ve bu toksin bağırsaktaki epitel hücrelerinin resmen ölümüne yol açmaktadır, dolayısıyla bağırsak kendi görevini yapamayarak su emme yeteneğini kaybedip kanlı ishal oluşturmaktadır (URL-1). *Enterogregatif E. coli* (EAEC), hem gelişmekte olan hem de gelişmiş ülkelerde çocuklarda ve yetişkinlerde sıklıkla inatçı ishalin bir nedeni olarak giderek daha fazla tanınmaktadır ve ifade edilmiş biçimi 'Dünya çapında birçok salgının nedeni' şeklindedir. Bununla birlikte, EAEC' lerin en azından bir alt kümesinin insan patojenleri olduğu kanıtlanmıştır. İnsan bağırsağı eksplantları üzerinde yapılan çalışmalar, EAEC' in hafif ancak anlamlı mukozal hasara yol açtığını göstermiştir. EAEC, epitelyal hücrelere karakteristik bir "yığılmış tuğla" modeliyle yapışma yeteneğiyle tanımlanmaktadır. Bu yığılmış tuğla modeli Şekil 2.3' de gösterilmiştir (Okeke ve Nataro, 2001).



Şekil 2.3. EAEC' ye ait 'Yığılmış Tuğla' modeli.

Üropatojenik *Escherichia coli* (UPEC), idrar yolunda meydana gelen bakteriyel enfeksiyonlarının neredeyse %90' ının nedenini oluşturmakta ve *Escherichia coli* bu bölgede açık ara en yaygın enfeksiyona neden olan ajandır. Menenjit/sepsis ile ilişkili olan *Escherichia coli* (MNEC), Gram (-) neonatal menenjitinin en yaygın nedenini oluşturmakta ve vakalarda ölüm oranı %15 olarak tespit edilmiştir. Hayatta kalanların büyük çoğunluğunda (% 40) ciddi nörolojik bozukluklar görülmüştür. Diğer bazı potansiyel *E. coli* patotipleri tanımlanmıştır ancak bunların hiçbirisi yukarıda açıklanan patotipler kadar iyi belirlenmemiştir (Kaper vd., 2004).

Enteroinvaziv Escherichia coli (EIEC) türleri ise, doku hücrelerinin en iç bölgelerine girip çoğalırlar. Suşlarında yine serolojik olarak EPEC ve ETEC' ten büyük ölçüde farklı olan üçüncü sınıf suşlar, bu suşlar kolonun epitel hücrelerini istila etme yeteneğinden kaynaklanan Shigella benzeri dizanteriye veya kanlı ishale neden olmaktadır. Bu suşlar biyokimyasal ve serolojik özellikler ve virülans mekanizmaları açısından *Shigella*' ya çok benzemektedir. Örneğin birçok EIEC suşu laktozu kullanamamakta ve genellikle yetişkinlerden izole edilmektedir (Hartl ve Dykhuizen, 1984). Çoğunlukla ateşle birlikte seyreden karın krampları ile şiddetli olarak mukozal ve kanlı ishal oluşumu, gıda kaynaklı patojenler olan EIEC türlerinin sebep olduğu basilli dizanterinin en temel özellikleridir (URL-1).

Diffusely Adherent Escherichia coli (DAEC) ise Özelleşmiş fimbrialar sayesinde seyrek olarak epitele bağlanmakta ve hücre içindeki sinyal mekanizmasını etkinleştirmektedirler. DAEC kısaca konakçı hücrelere sıkıca bağlanmakta ve yapışmaktadır. *Escherichia coli*' nin resmen heterojen bir patotipi olarak adlandırılır. DAEC, 1,5 - 5 yaş arasındaki çocuklarda çoğunlukla ishal, yetişkinlerde ise idrar yolu enfeksiyonu (İYE) ile ilişkilidir. DAEC çocuklarda önemli olarak sulu ishale neden olur. "Yetişkinler, Crohn' s, çölyak ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve bazı kronik

inflamatuvar bağırsak hastalıklarında bulunan DAEC suşlarının asemptomatik taşıyıcılarıdır." (URL-1).

Shigella ve *Salmonella* ailelerinin mevcut üyeleri, aslında *Escherichia coli* 'nin alt tiplerini içermektedirler. "Shiga toksinleri, *Shigella dysenteriae* bakterisi ve belirli *E. coli* suşları tarafından üretilen virülans faktörleridir." Çok çeşitli serotiplere ait Shiga toksin üreten *Escherichia coli* (STEC) suşlarının canlılarda özellikle insanlarda ciddi şekilde hastalıklara neden olabileceği kabul edilmiş olup O157:H7 bir STEC serotipini temsil etmektedir. O157:H7 suşunun üzerinde taşımış olduğu Shiga toksini geni, *E. coli* ' ye *Shigella*'dan geçmekte ve büyük salgınlarla ilişkilendirilen önemli bir tip olmuştur (URL-1).

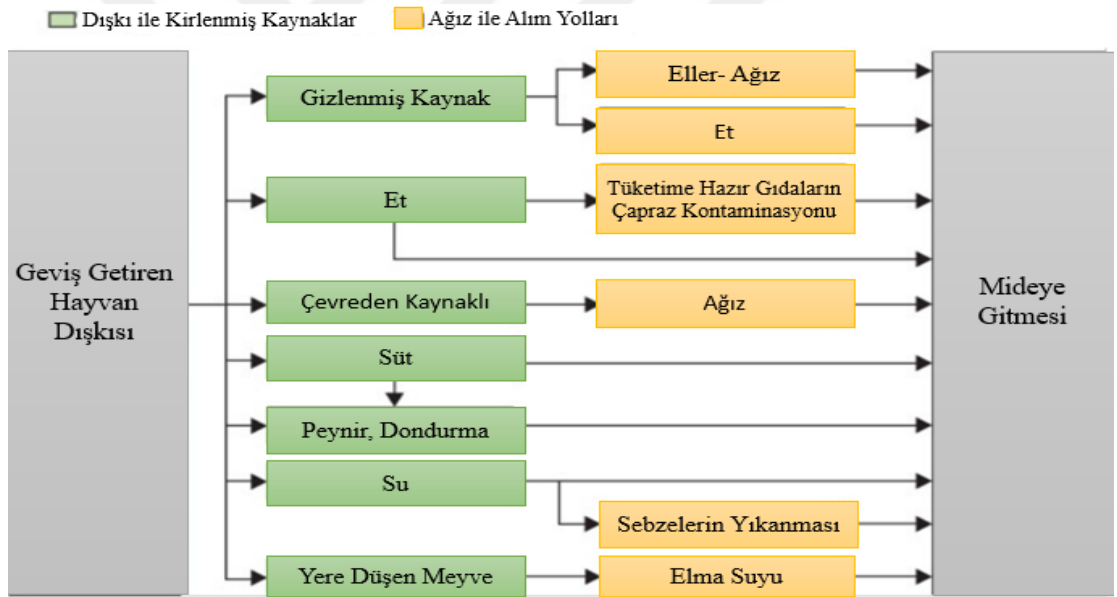
Dolayısıyla, 1982 ile 2006 yılları arasında Birleşik Krallık ve Danimarka' nın başta olduğu ve bunları Kanada ve Finlandiya' nın takip ettiği ardından Japonya' nın geldiği mikrobiyolojik açıdan doğrulanmış 90 salgının bulunduğu bir çalışmanın sonuçlarına bakıldığında, salgınların önemli olarak % 42,2' sinde bulaşma kaynağının gıda, % 12,2' sinde ise süt ürünlerinin, % 7,8' inde hayvan temasının, % 6,7 oranında ise su, % 2,2' sinde çevre ve bilinmeyenler olduğu anlaşılmıştır (Pennington, 2010).

Şimdiye kadar kaydedilen en büyük salgın 1996 yılında Japonya'nın Sakai şehrinde meydana gelmiş ve okul yemeklerinde servis edilen beyaz turp filizleriyle ilişkili 7966 vaka (2764' ü mikrobiyolojik olarak doğrulanmış, 106' sı HUS' lu) ile gerçekleşmiştir. ABD'de bulaşma yolunun vektör olarak gıda kaynaklı salgınların % 41' inde kıyma olması dikkat çekici bir faktördür. ABD'de 1992 ile 2002 yılları arasında 24 çok durumlu salgın kaydedilmiş olup hepsinin gıda kaynaklı olduğu anlaşılmıştır. Bunlardan 16' sı (% 67) kıymayla, altısı (% 25) ise ürünle ilişkilendirilmiştir (Pennington, 2010).

E. coli ' nin gıdalara bulaşması genellikle dışkı kaynaklı olup, kontamine su, çiğ veya yetersiz pişmiş et, çiğ sebzeler, süt ürünleri ve diğer gıda maddeleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu nedenle, gıda endüstrisi, üretim süreçlerini ve hammaddeleri dikkatlice yöneterek bu bakterinin gıdalara bulaşma riskini azaltmaya odaklanılmalıdır. Çiğ veya yarı pişmiş gıdaların işlenmesi ve pişirilmesi aşamalarında özel önlemler alınmalıdır. *Escherichia coli* O157, çoğunlukla geviş getirebilen

hayvanlar tarafından fark bile edilmeden taşınabilen mevcut öldürücü bir patojeni ifade eder (Pennington, 2010).

Sütün pastörizasyon işleminden geçmesi ve suların klorlanması gibi engellerin bir kısmı mevcut nüfusun önemli bir bölümünü etkili olarak koruyor olsa da elleri yıkamak ve çapraz bulaşmayı önleyebilen çalışma uygulamalarının çoğunlukla insan davranışına bağlı olduğu bilinmektedir. Organizma, Avrupa ve Kuzey Amerika'daki mezbahalarda halen kullanılmakta olan geleneksel görsel denetim sistemleriyle tespit edilmekten kurtulabilmektedir. Bu nedenle, salgınların hemen kontrol edilmesi ve zamanında destekleyici olarak tedavilerle hızlı teşhisler gibi insanlara bulaştıktan sonra mevcut olan riskleri azaltma ve hafifletme adımları beklenebilecek ilk şeyi oluşturmaktadır. *E. coli* O157' nin bulaşmasının şematik gösterimi Şekil 2.4' de verilmiştir (Pennington, 2010).



Şekil 2.4. *E. coli* O157' nin canlılara bulaşma şeması.

Gıda ürünlerinin oluşturduğu enfeksiyonların büyük bölümünü engellemeye yönelik önlemler, çoğunlukla uygun saklama metotlarını ve pişirme sıcaklıklarını içermektedir. *Escherichia coli* 'nin canlılara bulaşmasını önlemeye yönelik kanıtlanmış yöntemler arasında en başta el yıkama, iyileştirilmiş hijyen-sanitasyon ve içme sularının temizliği yer almaktadır. Çünkü bulaşmaların çoğunlukla gıda ve su kaynaklarından fekal kontaminasyon yoluyla gerçekleştiği bildirilmiştir. Ayrıca, *Escherichia coli* 'yi uzak tutma yöntemleri arasında eti çok iyi olarak pişirmek, meyve suları ve süt gibi çiğ, pastörize edilmemiş içeceklerin tüketiminden olabildiğince

kaçınmak yer almaktadır. Son olarak, yemekleri hazırlarken etraftan kaynaklı çapraz kontaminasyondan kaçınmak için mutfak gereçlerinin ve çalışma alanlarının temizliğine dikkat edilmesi gerekmektedir (URL-1).

Et endüstrisinde, *Escherichia coli* O157:H7 gibi ciddi gıda kaynaklı patojenlerin büyümesini engellemek için doğal koruyucu olarak antimikrobiyallerin kullanılması büyük önem taşımaktadır. Çünkü tüketiciler, gıda ürünlerinde kullanılan katkı maddelerinin daha az uygulandığı, doğal olarak içerik özellikleri en az seviyede değişmiş, kolay ve hızlıca hazırlanabilen, ayrıca daha uzun ve güvenli raf ömrüne sahip, aynı zamanda uygun maliyetli cüzdanı yakmayan gıdaları çok daha fazla tercih etmektedirler (Klein vd., 2013). Bu nedenle gıda kaynaklı patojenlerin yeterli kontrolü için, doğal aromatik bitkilerin uçucu yağlarındaki etken maddelerin uygulanması büyük bir önem arz etmektedir (Kavrut, 2021).

2.4 Doğal Antimikrobiyaller

Kırmızı et ve et ürünlerinde aromatik bitkiler ve baharatlar doğrudan kullanılabileceği gibi bunların barındırdıkları ekstraktları da güzel bir şekilde uygulanmaktadır. Çeşitli etkileri ile bu et ürünlerinin kalitesi iyileştirilip raf ömrü uzatılarak ekonomik olarak kayıpların önüne geçilmektedir. Bitki esansiyel yağları (EO' ları) antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar gibi çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptirler. Özellikle, EO' lar, gıda endüstrisi için belirgin antibakteriyel ve gıda koruyucu özellikler sergiler. Çok sayıda EO et ve et ürünleri, sebze ve meyveler ile süt ürünleri için gıda koruyucu olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Gıda kaynaklı tehdit, önemli antimikrobiyal ve antioksidan özelliklere sahip yeni ve toksik olmayan koruyucu maddelerin geliştirilmesine yol açmıştır. Organoleptik etkileri en aza indirmek ve özelliklerinden ödün vermeyen daha geniş gıda ürünleri üretmek için EO' lar kullanılabilir (Falleh vd., 2020). Esansiyel yağlardaki kimyasallar, genellikle antimikrobiyal özelliklere sahip oldukları için bitki savunmasında önemli bir rol oynayan ikincil metabolitlerdir. Esansiyel yağlara ve bunların gıda muhafazasındaki uygulamalarına olan ilgi, son yıllarda sentetik koruyuculara yönelik giderek olumsuz tüketici algısı nedeniyle daha da artmaktadır. Ayrıca, gıda kaynaklı hastalıklar dünya çapında büyüyen bir halk sağlığı sorunu haline gelmiş ve daha etkili koruma stratejileri geliştirilmelidir (Hyldgaard vd., 2012).

Bitkilerin uçucu yağlarının mikroorganizmalar üzerinde oluşturdıkları inhibisyon ve inaktivasyon etkileri bulunmaktadır. Özellikle birçok gıdanın üretiminde antimikrobiyal madde olarak kimyasal katkıların insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinden kaçınmak için, bitkilerin doğal uçucu yağlarının tercih edilmesi tüketici talebinin karşılanması yönünden kritik önem içermektedir. Kırmızı et ve ürünlerinde oksidatif bozulmaların önlenbilmesinde yapay ve doğal antioksidanlarla beraber bitkilerin içerisinde barındırdıkları doğal ekstraktları da yaygın şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalarda gıda kaynaklı patojen bakterilere, karanfil, kimyon, kekik, tarçın, keklik otu, fesleğen bitkilerinin uçucu yağlarının farklı seviyelerde antimikrobiyal etki içerdikleri anlaşılmıştır (Şimşek vd., 2012).

Bitkilerde yer alan bu esansiyel yağlar, patojen olan mikroorganizmalara karşı savunma amacıyla üretilmektedirler. Hem antimikrobiyal hem de antioksidan etkili bu ajanlar bitkilerin başta çiçek, tomurcuk gibi hatta kabuk ve tohum gibi farklı kısımlarından su distilasyonu ile elde edilmektedirler. Gıda endüstrisinde bu uçucu yağlar genellikle olası bir bozulmayı önlemek ve aynı zamanda ürünlerin mevcut raf ömürlerini uzatmak amacıyla koruyucu şekilde kullanım potansiyeli içermektedirler. (Yücel ve Öztürk, 2018).

Uçucu yağlar doğal antimikrobiyal ve antioksidanların önemli kaynaklarıdır. Uçucu yağlar terpenoidler (karvakrol, karvon, timol) ve fenil propanoidler (sinnamaldehit, öjenol, anthol vb.) olarak adlandırılan aktif bileşikler içermektedir (Saricaoglu ve Turhan, 2018). Bazı baharat türlerine ait ana bileşenler Çizelge 2.3’ de görülmektedir (Çoban vd., 2010).

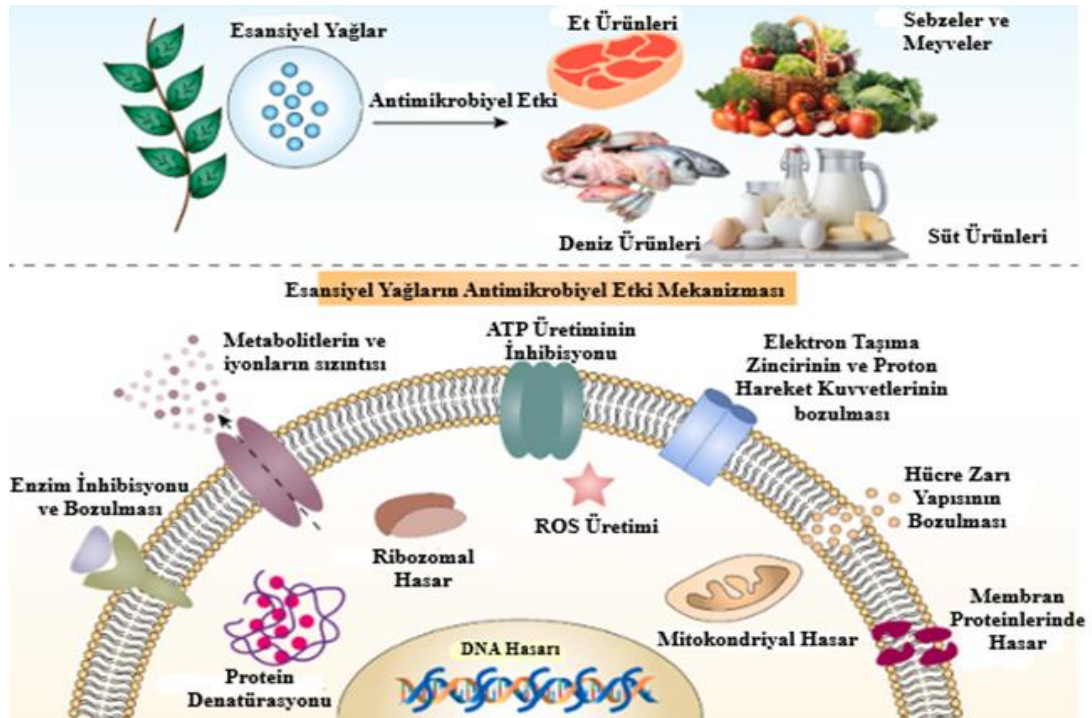
Çizelge 2.3. Bazı baharat türlerine ait ana bileşenler (Çoban vd., 2010).

Baharat	Cins ismi	Etken maddesi
Biberiye	<i>Rosemarinus officinalis</i>	Karnosik asit karnosol, rosemarinik asit
Adaçayı	<i>Salvia officinalis</i>	Karnosol, karnosik asit, rosmanol
Kekik	<i>Thymus vulgaris</i>	Timol, karvakrol,
Karanfil	<i>Eugenia caryophyllata</i>	Eugenol, gallatlar
Zerdeçal	<i>Curcuma longa L.</i>	Kurkumin

Gıda endüstrisi, gıdanın bozulmasını tetikleyen mikroorganizmaların büyümesini engellemek için çeşitli kimyasallardan yararlanmaktadır. Yüksek sıcaklıkta işleme

kullanımının yanı sıra bunların uygulanması, öncelikle patojenik ve bozulmaya neden olan mikroorganizmaların faaliyetlerini bozarak gıdaların kullanım ömrünün uzatılmasına yardımcı olmaktadır; ancak bazı gıdaların organoleptik ve duyuşal özellikleri üzerinde zararlı etkileri olabilmektedir. Koruma ve işleme yöntemlerinin uygulanmasını azaltmak için doğal koruyucular geliştirilmiştir (El-Saber Batiha vd., 2021). Uçucu yağların mevcut antimikrobiyal aktivitelerinin, birçok bileşiğe bağlı olduğu literatürde bildirilmiştir. Uçucu yağ ve bu yağların bileşenlerinin (fenolik yapıdaki monoterpenlerin) büyük bir karakteristik özelliğini oluşturan su geçirirmeme (hidrofobisite), mikroorganizmaların hücre zarları yapısındaki fosfolipit yağ tabakasını uyararak enzimlere ait olan sistemlerini derinden bozmakta veya hücre içi organellerin geçirgenlik özelliğini büyük oranda artırmaktadır. Sonuç itibarıyla bu geçirgenliğin artmasıyla birlikte iyon ve mevcut moleküllerin hücre dışına sızmasıyla hücrenin ölümü gerçekleşmektedir (Yaman vd., 2023). Ek olarak hücresel enerji sistemini baskılayıp müdahale ederek ve protonların hareket gücünü bozarak mevcut halde bulunan sitoplazmik zarın zarar görmesine neden olmakta ve bu olaylar sonucunda da hücre ölümüne neden olmaktadır (Yaman vd., 2023).

Şekil 2.5’ te gıdalara eklenen esansiyel uçucu yağların antimikrobiyal olarak etki mekanizmaları gösterilmiştir (Rout vd., 2022).



Şekil 2.5. Uçucu yağların antimikrobiyal etki mekanizması.

Esansiyel yağlar, hücre zarına zarar verip hücre zarı geçirgenliğini değiştirerek makromoleküler maddeler, ATP (Adenozin Trifosfat) ve DNA (Deoksiriboz Nükleik Asit) gibi bazı bileşenlerin sitoplazmaya salınmasına neden olmaktadır. Genel olarak esansiyel yağların antimikrobiyal etkileri hem hücre yüzeyinde hem de sitoplazma içinde bir dizi olayı içermektedir (Cui vd., 2015).

Uçucu yağlardaki bu antimikrobiyal ve biyolojik aktiviteler mevcut olan biyoaktif uçucu bileşenlerin varlığı ile açıklanmaktadır. Çeşitli ve birçok bileşenlerden oluşan uçucu yağların antimikrobiyal aktiviteleri sanıldığı gibi tek bir bileşiğin etkisine bağlı olmamaktadır. Uçucu yağların antimikrobiyal etki mekanizmasını anlatacak olursak; fenolik yapıda bulunan monoterpenlerin mikrobiyal olarak hücre geçirgenliğini değiştirme, sitoplazmik zara zarar verme, hücrenin oluşturduğu enerji sistemine müdahale etme ve protonların mevcut hareket gücünü bozma yetenekleri ile açıklanabilmektedir. Sitoplazmik zarın temelden zarar görmesi direkt hücre ölümüne sebebiyet vermektedir. Ayrıca uçucu yağların ve onlara ait bileşenlerinin önemli ve ayırt edici bir özelliği de hidrofobik etkiye sahip olmalarıdır ki bu özellik onlara hücrenin daha geçirgen halde olmasını sağlamaktadır. Hücrenin daha geçirgen olması demek, iyonların ve moleküllerin hücre dışına sızmasını ifade etmekte ve sonuç itibarıyla hücre ölümünün meydana gelmiş olması demektir. *Gram (+)* bakterilerin, *Gram (-)* bakterilere kıyasla uçucu yağlara karşı daha duyarlı olduğu literatürde bildirilmiştir. Ayrıca doğal olarak antioksidan etkiye sahip olan uçucu yağların gıdalarda lipid oksidasyonunu durdurduğu veya geciktirdiği dolayısıyla da gıda ürünlerinin raf ömrünü uzattığı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Yücel ve Öztürk, 2018).

Bitki esansiyel yağları (EO' lar) dikkate değer antimikrobiyal etkinliğe sahiptir ve bu nedenle sağlığa zararlı sentetik koruyuculara alternatif olarak büyük bir potansiyel içerir. Muhteşem etkinliklerine rağmen henüz gıda sektöründe yaygın olarak kullanılmamaktadırlar. EO' ların koruyucu madde olarak kullanılması gıda sisteminde mevcut engelleri ortadan kaldırmaya yardımcıdır. Nanomalzemelerin EO' ların taşıyıcı ajanı olarak uygulamaları son zamanlarda gıda endüstrilerinin düşük dozlarda raf ömrünü ve koruyucu etkinliğini artırmak için ilgi odağı haline gelmiştir. Genel olarak, EO' lar lipofilik bileşiklerin kompleks uçucu karışımıdır; bu nedenle, nano ve mikroemülsiyonlar, katı lipid nanopartikülleri ve lipozomlar gibi lipid bazlı sistemler,

EO bazlı gıda koruyucuları için kapsülleyici materyaller olarak etkinliklerini araştırmak üzere kapsamlı bir şekilde incelenmektedir (Prakash vd., 2018).

Doğal koruyucu olarak antimikrobiyallerin bulunduğu sınıf içerisinde bakteriyosinler de yer almaktadır. Bakteriyosinler, bakteriler tarafından üretilen, diğer bakterileri öldüren veya büyümesini engelleyen antibakteriyel proteinlerdir. Birçok laktik asit bakterisi (LAB), yüksek çeşitlilikte farklı bakteriyosinler üretir. Bu bakteriyosinler çok sayıda fermente edilmiş ve fermente edilmemiş gıdada bulunan LAB tarafından üretiliyor olsa da nisin şu anda gıda koruyucu olarak yaygın olarak kullanılan tek bakteriyosindir (Cleveland vd., 2001).

Günümüzde bilinçli tüketicilerin sağlıklı olana ve doğal gıdaya yönelme talepleri doğrultusunda yapılan araştırmalar et endüstrisine de yansımış ve bunun üzerine yapılan çalışmalar artış göstermiştir. Nitrit dünyada genellikle et ürünlerinde; başta karakteristik olarak renk ve lezzetteki gelişime katkı sağlaması, ek olarak lipit oksidasyonunu kontrol altına alması ve patojen mikroorganizmalar üzerinde olumlu antimikrobiyal etkiler göstermesi sebepleriyle günümüzde yaygın olarak kullanılmakta olan sentetik bir katkı maddesidir. Ancak bunların yanında nitritin toksik, mutajenik ve aynı zamanda kanserojenik N-nitrozamin bileşiklerinin oluşumuna neden olması ve en önemli olarak insan sağlığı üzerinde büyük bir risk oluşturması nedeniyle alternatif olabilecek çeşitli doğal katkı arayışlarına gidilmiştir (Shan vd., 2009).

Bir dizi esansiyel yağ bileşeni, gıda ürünlerinde aroma verici olarak kullanım amaçları için Avrupa Komisyonu tarafından kabul edilmiştir. Kayıtlı tatlandırıcılar örneğin linalool, timol, öjenol, sinamaldehit, vanilin, karvakrol, sitral ve limonendir ve bunların hepsinin tüketici sağlığı açısından hiçbir risk teşkil etmediği bilinmektedir. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) bu maddeleri kısaca 'güvenli olarak kabul edilen' (GRAS) şeklinde sınıflandırmaktadır. FDA tarafından GRAS olarak sınıflandırılan ham esansiyel yağlar arasında karanfil, kekik, kimyon, hindistan cevizi, fesleğen, hardal ve tarçın yer almaktadır (Hyldgaard vd., 2012). Bitkiler antimikrobiyal aktiviteye sahip çeşitli bileşikler üretmektedirler. Bazıları her zaman mevcutken diğerleri mikrobiyal istilaya veya fiziksel yaralanmaya tepki olarak üretilmektedir. Uçucu yağların en aktif antimikrobiyal bileşiklerinin belirlenmesi zahmetlidir çünkü uçucu yağlar 45'e kadar farklı bileşenin karmaşık

karışımlardır ve bunların bileşimi belirli bir uçucu yağ, hasat mevsimine ve yağ çıkarmak için kullanılan yöntemlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Aktif bileşikler kimyasal yapılarına göre dört gruba ayrılmaktadırlar; terpenler, terpenoidler, fenilpropenler ve diğerleri şeklindedir. Terpenoidler geniş bir mikroorganizma yelpazesine karşı aktif olan geniş bir antimikrobiyal bileşik grubudur; şimdiye kadar tanımlanan en aktif monoterpenoidler karvakrol ve timoldür. (Hyldgaard vd., 2012). Gıda kaynaklı patojenlerin büyümesini önlemek veya gıda bozulmalarının başlamasını geciktirmek için gıda katkı maddeleri gibi doğal alternatiflerin olası kullanımına büyük ilgi vardır. Fenoller (fenolik asit, polifenoller, tanenler) ve organik asitler (asetik, laktik, sitrik) gibi doğal olarak oluşan birçok bileşik bu bağlamda ele alınmıştır. Pek çok baharat, şifalı bitki ve ekstrakt, uçucu yağ fraksiyonundan dolayı antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Tüketicinin eğilimleri, gıdaların raf ömrünü uzatmak ve güvenliğini korumak için 'daha doğal' koruyucuların geliştirilmesine olan ilginin yeniden canlanmasına neden olmuştur. Bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilen birçok bileşiğin antimikrobiyal özellikleri bildirilmiştir (Roller, 1995). Kekik etken maddesi olan karvakrol ve timol ile kimyonun etken maddesi olan küminaldehitin antimikrobiyal etkinliği bu nedenle gıda endüstrisi açısından önem arz etmektedir.

2.4.1 Karvakrol

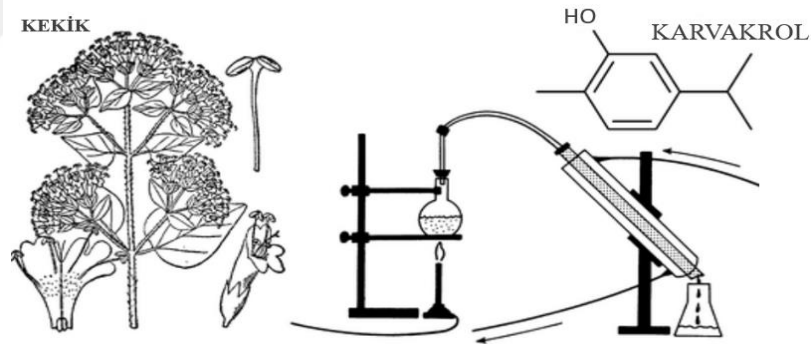
Karvakrol kekik uçucu yağının (*Thymus vulgaris*) ana aktif bileşenlerinden birisidir. Dünyada ve ülkemizde yaygın bir şekilde kullanılan kekik türlerinin ortak özelliği içerisinde uçucu yağ barındırmaları ve bu uçucu yağların ana bileşenlerinin temel olarak timol ve karvakrol olması sayılmaktadır. Bu etkin maddeler, kekiğe kendine özgü kokusunu vermekte olup aynı zamanda antioksidan özellikte kazandıran fenolik bileşikler bütünüdür. Bu fenolik bileşikler uçucu yağların yaklaşık olarak %78-82' sini oluşturmaktadır (Çoban vd., 2010). Kekik ve kekik tohumları Şekil 2.6' da gösterilmiştir (URL-2,3,4).



Şekil 2.6. (A), (B) Kekik, (C) Kekik tohumları.

Kekik gibi uçucu yağlarda yüksek konsantrasyonlarda bulunan ve karvakrol adı verilen bu bileşik hücrelerde ve hayvanlarda çok sayıda biyoaktivite sergilemektedir. Karvakrolün antiinflamatuvar, analjezik, antiartritik, antialerjik, antikarsinojenik, antidiyabetik, kardiyoprotektif, gastroprotektif, hepatoprotektif ve nöroprotektif yönlerinin yanı sıra metabolik, sinerjistik ve mekanik özellikleri de bulunmaktadır. Kekik aromatik bitkisinden karvakrol oluşum şeması Şekil 2.7 'de verilmiştir (Friedman, 2014).

Kekik gibi doğal kaynaklardan ekstrakte edilen iki fenolik, monoterpen izomeri olan karvakrol ve timol; antioksidan, antimikrobiyal, antihipertansif ve antikanser özelliklere sahiptir. Ayrıca fonksiyonel gıda formülasyonlarında uygulamaları olmuş, gıda kalitesini etkilemiş ve insan sağlığını olumlu yönde etkilemiştir. Son zamanlarda, çeşitli gıdaların raf ömrünü uzatma potansiyeli göstererek ürünlerde başarıyla kullanılmaktadırlar. Karvakrol ve timol potansiyelleri nedeniyle, gıda kalitesinin iyileştirilmesi ve çeşitli uygulamalar için umut verici bileşenler olarak kabul edilebilirler (Rathod vd., 2021).



Şekil 2.7. Kekik aromatik bitkisinden karvakrol oluşumu.

Karvakrol (5-izopropil-2-metilfenol), bir monoterpenoid fenoldür ve γ -terpinen ve p -simenden biyosentezlenir. Oda sıcaklığında sıvı halde izopropil-o-kresol, 2-p-simenol, 5-izopropil-2-timol veya izo-timol olarak da adlandırılır. Karvakrol, *Thymus capitatus* ve *Thymus Vulgaris* (kekik) gibi bitkilerin önemli bir bileşeni olan ve sırasıyla %74,4 ve %60 oranında muhtevasına sahip birçok aromatik bitkide bulunabilir (Souza vd., 2022).

Karvakrolün yoğunluğu 0.976 g/mL' dir. Suda çözünme özelliği olmayan yüksek çözünürlüğe sahip bir fenol şeklinde de tanımlanabilmektedir. GRAS (Generally

Recognized as Safe) olarak kabul edilir ve bu nedenle gıdalarda kullanımı onaylanmıştır (Souza vd., 2022).

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre gıdalardaki karvakrol kalıntıları 50 mg/kg'ı geçmediği takdirde zarar vermez. Karvakrol, Avrupa Konseyi'nin ekmek yapımında, jelibonda, hazır çeşnilerde, dondurma ve pudinglerde bulunabilen tatlandırıcılar listesinde de yer almaktadır (Souza vd., 2022).

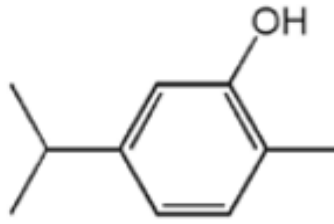
Karvakrolün insan sağlığı üzerindeki etkinliği son zamanlarda çok dikkat çekmeye başlamıştır. Literatürde karvakrolün insan sağlığı üzerinde oluşturduğu ciddi etkileri bildirilmiştir. Mevcut çalışmalar karvakrolün antibakteriyel ve anti-fungal özelliğini aynı zamanda da antioksidan özellik sergilediğini kanıtlamıştır. Baharat olarak yaygın bir şekilde kullanılan kekik, özellikle içerisinde muhafaza ettiği timol ve karvakrol uçucu yağları ile insan sağlığı açısından çok önemli ve güçlü etkiler içermektedir (Yaman vd., 2018). Kekik EO bileşimi içerisindeki karvakrol ve timolün oranları Çizelge 2.4' de gösterilmektedir (Govaris vd., 2010).

Çizelge 2.4. Kekik esansiyel yağının % bileşimi (Govaris vd., 2010).

Bileşenler	Oran (%)
α -thujene	0,12
α -pinene	0,44
camphene	0,10
1-octen-3-ol	0,32
b-myrcene	0,76
α -phellandrene	0,10
α -terpinene	0,77
p-cymene	5,18
limonin	0,30
γ -terpinene	2,80
terpinolene	0,14
borneol	0,34
terpinen-4-ol	0,47
methyl-thymyl ether	0,25
timol	4,82
karvakrol	80,15
caryophyllene	0,78
α -humulene	0,12
b-bisabolene	0,50
caryophyllene oxide	0,58

Karvakrolün antibakteriyel, antikanserojen, antifungal gibi özellikler içerdği ve ayrıca bunlara ek olarak yaraların iyileşmesini sağlayıp hücrelerin çoğalmasını hızlandıran etkilerinin olduğu kanıtlanmıştır (Govaris vd., 2010). Antimikrobiyal etkisinin ise, esas olarak membran hasarı, solunum zincirindeki değişiklikler ve bunun sonucunda ATP sentezindeki azalma nedeniyle Gram-pozitif mikroorganizmalara karşı Gram-negatif mikroorganizmalardan daha fazla olduğu görülmektedir (Souza vd., 2022).

Karvakrolün antimikrobiyal etkisi hücre zarında yapısal ve fonksiyonel hasarlara neden olmaktadır. Karvakrolün birincil etki şekli, geçirgenliği arttırdığı membranda konumlanma yeteneğidir. Karvakrole maruz kalan hücreler, karvakrolün akışkanlık üzerindeki etkisi nedeniyle optimal membran yapılarını ve fonksiyonlarını korumak için adaptasyon mekanizması olarak membranlarının yağ asit kompozisyonlarını değiştirmektedirler (Hyltdgaard vd., 2012). Karvakrolün aromatik halka yapısı Şekil 2.8’ de gösterilmiştir (Ahmad vd., 2011).



Şekil 2.8. Karvakrolün aromatik halka yapısı.

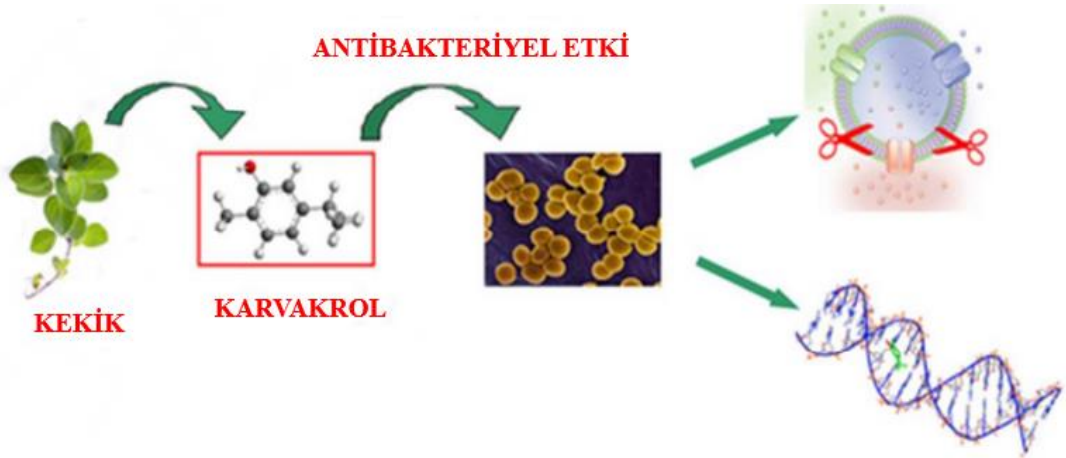
Nükleik asitlerin ve *S. pyogenes* hücrelerinin sızıntısı, karvakrolün sitoplazmik hücreler üzerindeki etkisini doğrulayan göstergelerdir. Karvakrol daha yüksek konsantrasyonlarda membranda tam veya ciddi hasara neden olmaktadır ve sitozolik proteinlerin, enzimlerin, besinlerin ve genetik materyallerin sızmasını artırır (Wijesundara vd., 2021).

Bu nedenle, karvakrolün sızıntıya neden olan konsantrasyonları ile MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) değeri arasındaki korelasyonlar, membran hasarının önemli bir etki mekanizması olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde monoterpenler, ATP (Adenozin Trifosfat), iyonlar ve nükleik asit gibi hücresel içeriklerin membrandan sızmasını etkileyerek sitoplazmik membranların lipit çift katmanıyla iş birliği yapar (Wijesundara vd., 2021).

Bakteriyel hücre zarının geçirgenliğini arttırmanın yanı sıra, karvakrolün ikinci temel etki mekanizması olarak doğrudan genomik DNA'ya bağlandığı ileri sürülmektedir. Karvakrolün hücresel içeriğin sızmasına neden olma yeteneği, etkisinin bakteriyel membranlarda gözeneklere neden olabileceğini düşündürmektedir. Pek çok küçük molekülün antimikrobiyal etkisinin bakteriyel membranlarda gözenek oluşumuna ve hücresel içeriklerin sızmasına neden olduğuna yaygın olarak inanılmaktadır. Karvakrolün aynı zamanda güvenli olduğu ve insan hücreleri üzerinde minimum düzeyde toksisite gösterdiği de bilinmektedir (Wijesundara vd., 2021).

Karvakrol ayrıca membran geçirgenliğini arttırarak proton ve potasyum kaybına neden olup, genel olarak pH'ın düşmesini sağlamaktadır. Bu sayede membran yıkılarak ATP sentezi inhibe edilmiş olmakta ve bu olaylar sonucunda hücrenin ölümü gerçekleşmektedir (Ultee ve Smid, 2001).

Ek olarak, karvakrol ATP üzerine inhibitör aktiviteye sahiptir ve hidroksil grubu ve bakteriyel membran boyunca gradyanı azaltan delokalize elektron sistemi (çift bağlar) nedeniyle bir proton değiştirici olarak görev yapar. Bu, membran proton hareket kuvvetinin düşmesine ve ATP'nin azalmasına neden olur ve sonunda hücre ölümüne yol açar (Hajibonabi vd., 2023). Bu etki mekanizması Şekil 2.9'da gösterilmiştir (Wang vd., 2016).



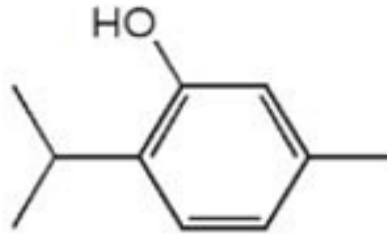
Şekil 2.9. Karvakrolün antibakteriyel etki mekanizması.

Dolayısıyla karvakrol, antibakteriyel etkisini bakteriyel hücre zarının geçirgenliğini artırarak ve doğrudan genomik DNA'ya bağlanarak göstermektedir (Wang vd., 2016).

2.4.2 Timol

Timol (2-izopropil-5-metilfenol), *Thymus*, *Ocimum*, *Origanum* cinsleri gibi *Lamiaceae* familyasının bitkilerinden elde edilen uçucu yağlarda ve ayrıca *Verbenaceae* familyasından *Monarda* cinsinde bulunan bir terpen fenoldür (Souza vd., 2022). Timol bir fenolik monoterpene ve kekik uçucu yağının ana bileşenlerindendir. Yapısal olarak karvakrole çok benzemektedir, fenolik halka üzerinde farklı bir pozisyonda hidroksil grubuna sahiptir. (Hylgaard vd., 2012).

Diğer esansiyel yağ bileşenleri gibi, Timolde gıdalarda kullanım için Avrupa Komisyonu tarafından tescil edilmiş ve tüketicilerin sağlığı açısından potansiyel bir risk teşkil etmemektedir. Genel olarak kabul edilen (GRAS - Generally Recognized as Safe) şeklinde olarak sınıflandırılan FDA (ABD Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanmıştır. Gıdalardaki timol miktarı 50 mg/kg'ı geçmediği sürece zarar vermez. Timol, antioksidan, antiinflamatuar, antiseptik, antibakteriyel, antifungal özellikleri ve kardiyovasküler sistem üzerindeki yararlı etkileri ile bilinir. Gıdalarda bir antimikrobiyal ajan veya sentetik tatlandırıcı olarak kullanılır (Souza vd., 2022). Timolün aromatik halka yapısı Şekil 2.10' da gösterilmiştir (Ahmad vd., 2011).



Şekil 2.10. Timolün aromatik halka yapısı.

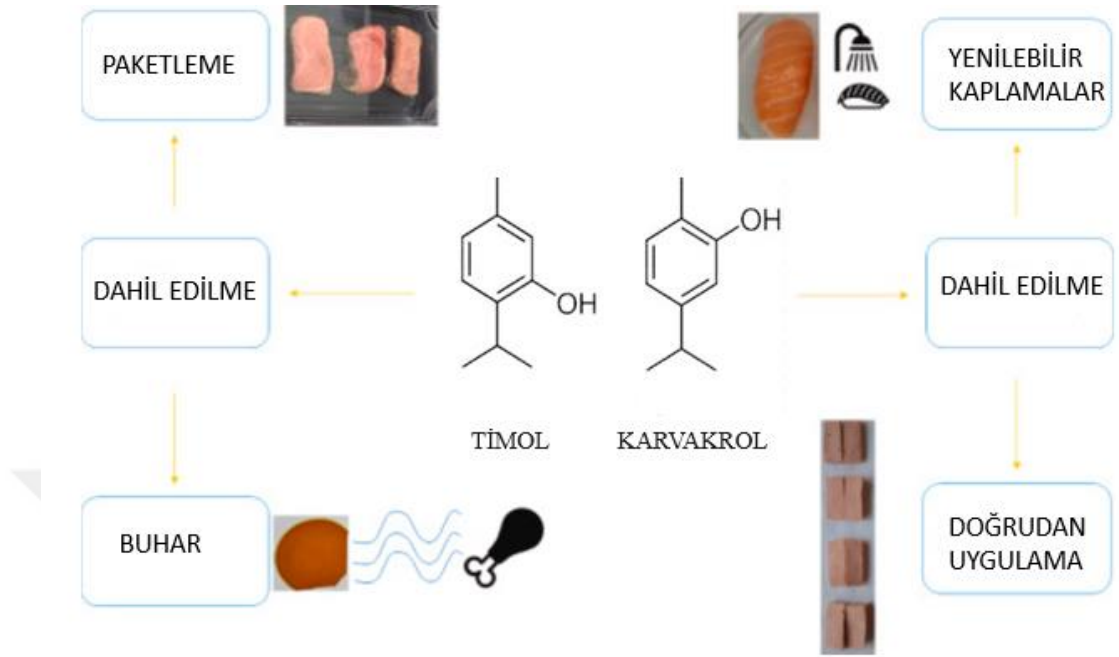
Timol antimikrobiyal etki mekanizmasını hücre zarlarıyla etkileşime girerek göstermektedir. Etkileşim, membran geçirgenliğini etkiler ve bu, membran potansiyeli kaybı, etidyum bromürün hücre alımı ve potasyum iyonları, ATP (Adenozin Trifosfat) ve karboksifloresin sızıntısı ile ilişkilidir. Timol, bir lipit çift katmanının polar baş-grup bölgesinde bütünleşerek hücre membranında değişikliklere neden olmakta; bu da düşük konsantrasyonlarda, timolün akışkanlaştırıcı etkilerini telafi etmek ve membran fonksiyonunu ve yapısını korumak için membran lipit profilinde adaptasyonel değişikliklerine neden olmaktadır (Hylgaard vd., 2012).

Karvakrol ve timolün biyolojik aktiviteleri Şekil 2.11’de verilmiş olup bu aktivitelerin iyi bilinmesine rağmen bu tür bileşenlerin gerçek gıda ürünleri üzerinde doğrulanması büyük önem arz etmektedir. Çünkü gerçek gıda matrisinin karmaşık yapısı ve daha çeşitli mikrobiyolojik flora içermesi nedeniyle timol ve karvakrolün etkinliğinde farklılıklar görülebilmektedir. Aynı zamanda bu bileşiklerin, her gıda ürününde eşit derecede etki göstermemesi ve bazılarının belirli gıda ürünleriyle kullanımının uygun olmaması nedeniyle gıda uygulamalarına dikkat edilmesi gerekmektedir (Rathod vd., 2021).

Şekil 2.11. Karvakrol ve timolün biyolojik aktiviteleri.

Timol ve karvakrol, önemli ölçüde geniş spektrumlu antimikrobiyal etkiler sergileyen bitkilerden elde edilen aromatik bileşiklerdir. Ayrıca antispazmodik, antiinflamatuvar ve anti-kanserojen dahil olmak üzere kapsamlı biyolojik etkiler göstermektedirler. Karvakrol ve timolün hoş kokuları, tatları ve güçlü antioksidan etkileri vardır (Hajibonabi vd., 2023). Bu nedenle, olumlu toksisitelerinin yanı sıra biyolojik etkileri, timol ve karvakrolü, gıdaların mikrobiyal bozulmasını engellemek için bir katkı maddesi ve antibiyotiğe dirençli bakterilere karşı güçlü antimikrobiyal ajanlar olarak bir seçenek haline getirmektedir. Ancak uçuculuk, düşük stabilite ve yüksek

hidrofobiklik karvakrol ve timolün uygulamalarını sınırlandırmaktadır (Hajibonabi vd., 2023).



Şekil 2.12. Timol ve karvakrolün gıda ürünlerine uygulanmasına örnekler.

Karvakrol ve timolün antimikrobiyal aktivitelerinin moleküler mekanizmaları henüz tam olarak tanımlanmamıştır. Karvakrolün, yüksek hidrofobikliği nedeniyle fosfolipide bağlı asil zincirleriyle etkileşime girme yeteneğinden dolayı antibakteriyel etkiler de göstermektedir. Karvakrol ve timolün antibakteriyel etkisi, hücre zarının akışkanlığını ve geçirgenliğini artırarak, lipid zincirleri arasına yerleşerek hücre homeostazisinde bir dağılıma neden olmasına bağlıdır. Hücre zarından geçen proteinler hücre içi pH' ın düşmesine neden olur. Son olarak membran potansiyelini azaltabilir. Bu bileşiklerin bakteri zarlarında neden olduğu yapısal ve işlevsel değişiklikler, aynı zamanda hayati önem taşıyan hücreler arası bileşenlerin sızması ve metabolik dengesizlik ile de ilişkilidir (Hajibonabi vd., 2023).

2.4.3 Küminaldehit

Küminaldehit (4-izopropilbenzaldehit), geniş spektrumlu antibakteriyel aktivite gösteren kimyon tohumlarından elde edilen esansiyel yağın ana biyoaktif bileşenidir. Bu bileşik, uçucu yağda bulunan başlıca kimyasal bileşenlerden biri olan monoterpen ailesine aittir. Bu uçucu yağ hücre zarı ve sitoplazmanın yapısını ve işlevini

değiştirerek antibakteriyel etkiler gösterir. Yağ bileşenleri zarda çözünerek şişmeye ve zar fonksiyonunun azalmasına neden olur, hücrelerin morfolojisini değiştirir ve hücre ölümüne yol açar (Wongkattiya vd., 2019).

Küminaldehit kimyonun etkin maddelerinden birisidir. Kimyon ise, *Cuminum cyminum* L. 'nin (*Umbelliferae* veya *Apiaceae* familyası) kurutulmuş olgun meyvesinden yapılan hafif acı ve keskin tadı olan güçlü aromatik bir baharat olup en önemli biyoaktif bileşeni küminaldehittir (Amin, 2012). Kimyon esansiyel yağının uçucu bileşenlerinin oranları ise Çizelge 2.5' de verilmiştir (Xu vd., 2021).

Çizelge 2.5. Kimyon esansiyel yağının bileşenlerinin oranları (%) (Xu vd., 2021).

Bileşen ismi	İçerik miktarı (%)
Phenylacetaldehyde	0,021
a-Terpinene	0,211
2-Nonenal	0,023
Terpinen-4-ol	0,093
4-Isopropylphenol	0,116
Küminaldehit	38,73
Anisic aldehyde	0,130
4-Sulfophthalic acid	0,282
Anisaldehyde	0,304
Karvakrol	0,022
Benzenemethanol,4-(1-methylethyl)	10,91

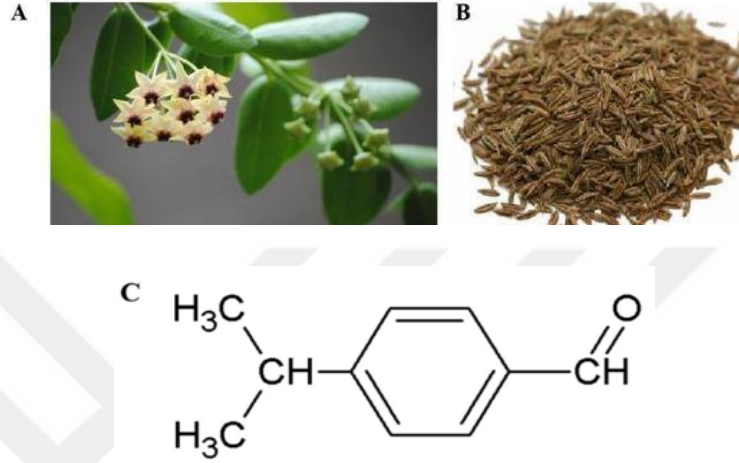
Küminaldehit, geleneksel olarak hazımsızlık, ishal, karın kolik ve sarılık tedavisinde kullanılan yeşil kimyon (*Cuminum Cyminum* L.) gibi yaygın olarak kullanılan bir dizi baharatın esansiyel yağında tanımlanan ana bileşenlerden biridir (Ebada, 2017).

Kimyon esansiyel yağı, antioksidan, antidiyabetik, antiinflamatuvar, antibakteriyel etkileriyle birlikte birçok farmakolojik özelliğe sahiptir. Küminaldehit, doğal biyofumigant olarak tıbbi olmayan etkilerinin yanı sıra, çeşitli hastalıklara karşı umut verici potansiyel bir ilaç adayıdır (Ebada, 2017).

Oksitlenmiş bir aldehit monoterpen olan Küminaldehit, Mısır'da yerel olarak yetiştirilen ve daha sonra çeşitli coğrafi bölgelere yayılan, yaygın olarak kullanılan bir baharat olan yeşil kimyon tohumlarında (*Cuminum cyminum* Linn, *Family Apiaceae*) önemli bir uçucu yağ bileşenidir. Başta Asya, Kuzey Afrika ve Güney Avrupa, Meksika ve Şili olmak üzere başlıca üretim ülkeleri Hindistan ve İran'dır. Küminaldehit ayrıca tarçın gibi yaygın olarak kullanılan diğer baharatlarda da yüksek

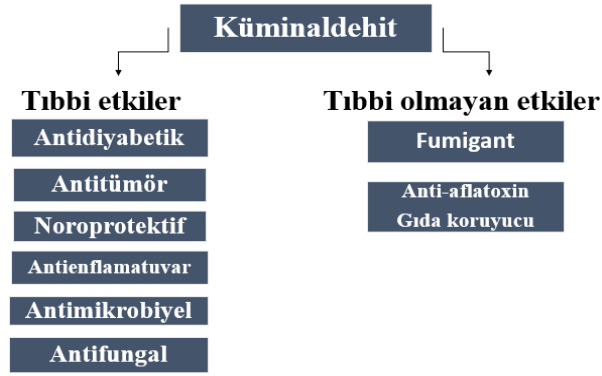
miktarda belirlenmiştir. *Cuminum cyminum* geleneksel olarak ishal ve sarılığı tedavi etmek için kullanılmaktadır. Aynı zamanda antioksidan, antibakteriyel ve antifungal etkilere de sahiptir (Ebada, 2017).

Şekil 2.13’ de (A) *Cuminum cyminum* (Kimyon) bitkisi, (B) *Cuminum cyminum* tohumları ve (C) Küminaldehitin aromatik halka yapısı gösterilmiştir (Li vd., 2023a).



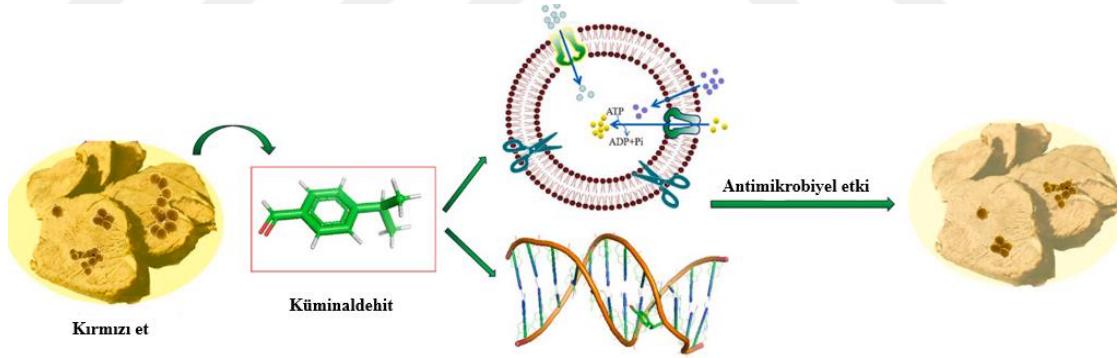
Şekil 2.13. (A) Kimyon, (B) Kimyon tohumları, (C) Küminaldehitin halka yapısı.

Çok sayıda bitki arasında *Cuminum cyminum* L. (*C. cyminum*), 3-5 şemsiye salkımına sahip yıllık bir bitki olan *Umbelliferae* familyasına aittir ve iyileştirici etkisi dikkat çekicidir. *C. cyminum* birçok ülkede yetiştirilmektedir ve toz haline getirilmiş meyveleri ve tohumları sıklıkla koku arttırıcı ve tıbbi tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Geleneksel farmakolojide *C. cyminum* diyabet, epilepsi ve ağrıyı tedavi etmek için kullanılmaktadır. Bunlar arasında terapötik etkileri esas olarak antioksidan, antibakteriyel ve antikonvülsan gibi *C. cyminum* tohumlarına bağlıdır. Tohumlarda en bol bulunan bileşen Küminaldehittir (4-izopropilbenzaldehit). Bu nedenle *C. cyminum*' un farmakolojik etkisi tohumlardaki küminaldehite atfedilmektedir (Li vd., 2023a). Aynı zamanda küminaldehitin tıbbi ve tıbbi olmayan etkileri Şekil 2.14’ de gösterildiği gibidir (Ebada, 2017). Küminaldehitin bakterilere karşı potansiyel etki mekanizması ise esas olarak plazma zarını hedeflemektedir. Bunun nedeni, bakteri hücre zarındaki lipoteikoik asidin lipofilik ucunun, Küminaldehitin hücre plazma zarı yoluyla bakteri hücrelerine nüfuz etmesini ve yayılmasını sağlayan hidrofobik küminaldehitin penetrasyonuna yardımcı olmasıdır (Li vd., 2022b).



Şekil 2.14. Küminaldehitin tıbbi ve tıbbi olmayan etkileri.

Küminaldehit hücre zarının geçirgenliğini arttırmakta ve hücre morfolojisinde değişikliklere neden olmaktadır. Sitoplazmadaki küminaldehit, DNA ile etkileşime girerek gen ekspresyonuna ve protein sentezine müdahale ederek sonuçta bakteri hücrelerinin etkisizleşmesine yol açmaktadır. Küminaldehitin bakterilere karşı etki mekanizması Şekil 2.15’ te gösterilmiştir (Li vd., 2022b). Ek olarak küminaldehitin antifungal aktivitesi ise membran bütünlüğünün bozulmasından kaynaklı sekonder metabolizma geninin aşağı regülasyonuna bağlanmasıyla açıklanmaktadır (Xu vd., 2021).



Şekil 2.15. Küminaldehitin bakterilere karşı etki mekanizması.

2.5 Nanoenkapsülasyon

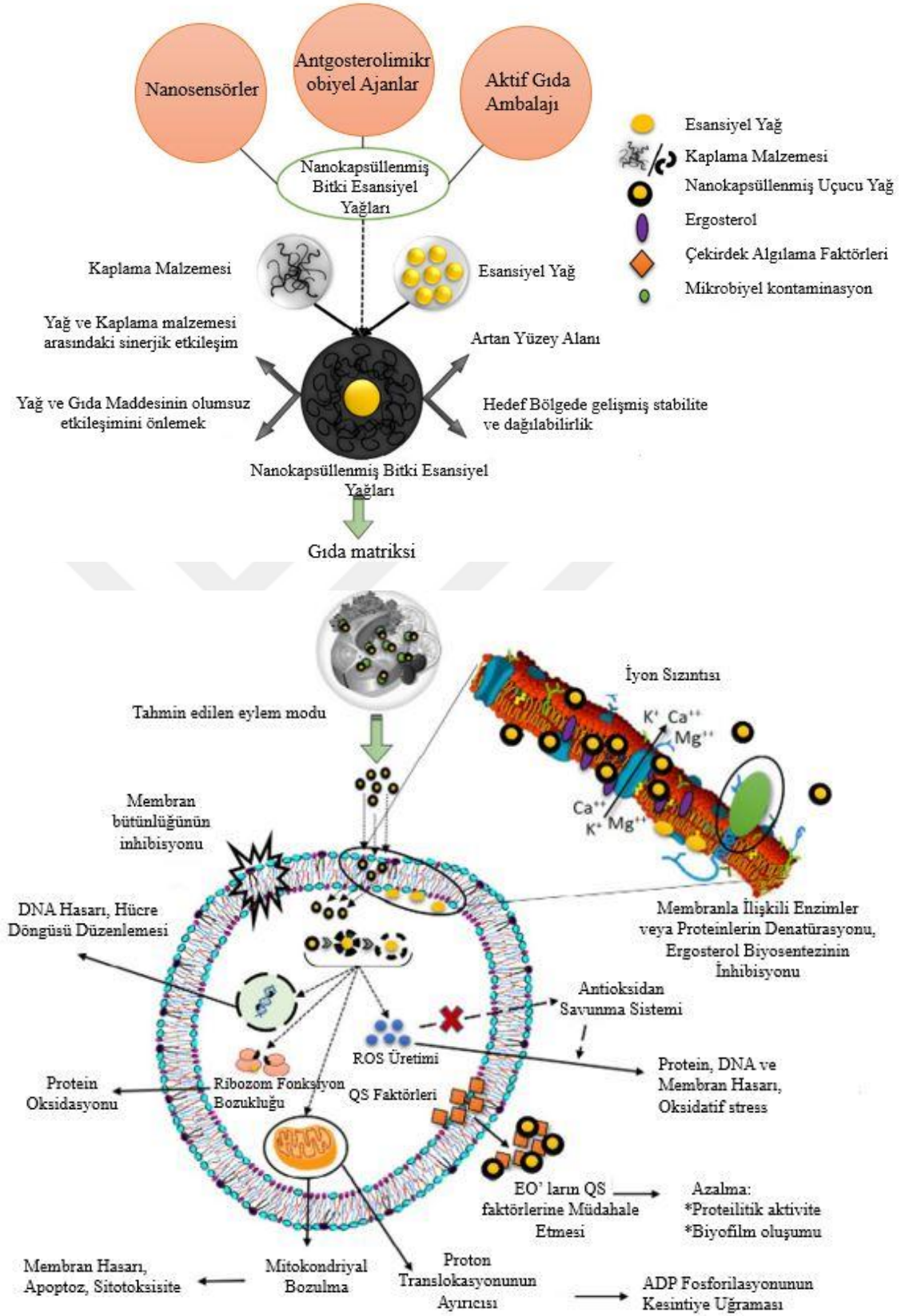
Emülsiyonlar, basit bir tanımlama ile birbiri ile karışmayan en az iki sıvının birbirleri içerisinde damlacıklar halinde dağıldığı heterojen sistemlerdir. Bu sistemler, hidrofilik ve lipofilik iki fazdan oluşurlar. Bu iki faz, emülsiyonun iç ve dış fazı olarak adlandırılmaktadır. Dış faz, sürekli faz olarak da tanımlanmaktadır ve iç fazı damlacıklar halinde taşımaktadır. Mikroemülsiyonlar dengede olan sistemler iken nanoemülsiyonlar dengede olmayan sistemler olarak tanımlanabilmektedir.

Nanoemülsiyonlara, karotenoidler, fitosteroller ve antioksidanlar gibi bazı fonksiyonel bileşenleri enkapsüle edilerek suda ya da meyve sularında çözünmesi ve biyoyararlılıkların artması sağlanabilmektedir (İlyasoğlu vd., 2010).

Dolayısıyla uçucu yağların kullanımı, suda çözünürlüklerinin nispeten düşük olması nedeniyle sınırlıdır. Ayrıca esansiyel yağların gıdaya doğrudan dahil edilmesi, duyuşal özelliklerinde aşırı değişiklik olasılığı nedeniyle teknolojik zorluklar ortaya çıkarmaktadır. Bu tür dezavantajların üstesinden gelmek için nanoemülsifikasyon gibi uçucu yağları yağ-su emülsiyonları veya nanoemülsiyonlar içinde kapsülleme teknikleri kullanılmaktadır. Kapsüllemeden sonra lipofilik bileşenler, suda dağılılabirliklerinin artması nedeniyle su bazlı yiyecek ve içeceklerle kolayca dahil edilebilmektedir. Nanoemülsiyonlar birçok açıdan bileşimleri, yapıları ve termodinamik özellikleri açısından geleneksel emülsiyonlara benzer özelliklere sahiptir. Bununla birlikte parçacık boyutundaki farklılıklar, nanoemülsiyonların ve makroemülsiyonların sıklıkla çok farklı fonksiyonel özelliklere sahip olduğu anlamına gelmektedir (Chang vd., 2013).

Ek olarak lipofilik biyoaktif bileşiklerin berrak içecek sosları ve şuruplar gibi şeffaf su bazlı ürünlere dahil edilmesi için kullanılabilirler. Nanoemülsiyon damlacıklarının küçük boyutu aynı zamanda bunların yerçekimine bağlı ayrılma, topaklanma ve birleşmeye karşı makroemülsiyonlara göre çok daha iyi stabilizeye sahip oldukları anlamına da gelir. Son olarak, emülsiyonlardaki damlacık boyutu azaldıkça kapsüllenmiş bileşiklerin aktivitesi artmaktadır (Chang vd., 2013).

Yapılan bir çalışmada, nanokapsüllenmiş uçucu yağların gıda kaynaklı mikroplara karşı speküle edilmiş etki mekanizmasının şematik gösterimi Şekil 2.16' da gösterilmiştir (Prakash vd., 2018).



Şekil 2.16. Nanokapsülünmüş uçucu yağların gıda kaynaklı mikroorganizmalara karşı speküle edilmiş etki mekanizmasının şematik gösterimi.

2.5.1 Nanoenkapsülasyon uygulamaları

Yapılan bir çalışmada kekik yağı kapsüllü nanolipozomların, herhangi bir olumsuz sağlık riski ve organoleptik etki oluşturmada, serbest kekik yağının aksine *Salmonella enteritidis* 'in inhibisyonuna karşı daha fazla bakteriyostatik etki gösterdiği rapor edilmiştir. 25 °C'de 7 günlük depolama süresi boyunca kapsüllenmiş yağ, tavuk göğüs etindeki sayıları 6,42 log kob/mL' nin altına düşürmüştür. İlk iki günde serbest yağ, sayımları yaklaşık 3,11 log cfu/mL'ye düşürürken, kapsüllenmiş yağ ilave edilmiş numunelerde yaklaşık 5,1 log cfu/mL olarak azalma sağlanmıştır. Geri kalan depolama süresi boyunca kapsüllenmiş yağ, *Salmonella enteritidis* 'in canlılığını 5-6 log cfu/mL civarında korurken, serbest yağ 8,23 log cfu/mL kadar yüksek bir değere ulaştırmıştır. Özetle kapsüllenmiş yağın, serbest kekik yağına kıyasla test edilen miroorganizmaların inhibisyonuna karşı daha fazla bakteriyostatik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Cui vd., 2017).

Tavuk ezmesi üzerinde yapılan başka bir çalışmada farklı miktarlarda kekik (*Origanum vulgare*) EO' yu kapsülleyen nanoemülsiyonlar üretilmiş ve bunların fizikokimyasal stabiliteleri ve antibakteriyel aktiviteleri değerlendirilmiştir. 4 ± 2 °C' de 8 günlük depolamanın ardından kekik nanoemülsiyonu, doğrudan eklenen kekik yağıyla karşılaştırıldığında *E. coli* ' yi önemli ölçüde azalttığı anlaşılmıştır (Moraes-Lovison vd., 2017).

Öte yandan *S. aureus* gelişiminin hem serbest hem de kapsüllenmiş kekik içeren örneklerde benzer olduğu gözlenmiş, ancak nitrile işlenmiş örnekler en etkili olmaya devam ettiği anlaşılmıştır. Tavuk ezmesinin fiziko-kimyasal özellikleri üzerinde herhangi bir olumsuz etki bildirilmemiştir. Nanoemülsiyonların ortalama damlacık çapları 35-55 nm aralığında ve 5 g EO/100 g nanoemülsiyon içeren nanoemülsiyonlar 45 günlük depolama süresi boyunca stabilize göstermiştir. Nanoemülsiyonlar, minimum inhibitör konsantrasyon için (*Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* için sırasıyla 0,56 ve 0,60 mg kekik EO/mL) ve minimum bakteri öldürücü konsantrasyon için 0,90 ve 3,32 mg kekik EO/mL için in vitro düşük değerlerle gösterilen iyi antibakteriyel etki sergilemiştir. Bu nedenle elde edilen sonuçlar, kekik EO' yu kapsülleyen nanoemülsiyonların, mikrobiyal büyümeyi önlemek, kontrol etmek ve raf ömrünü uzatmak için tavuk ezmesi gibi gıda formülasyonlarına dahil edilmeye uygun olduğunu göstermiştir (Moraes-Lovison vd., 2017).

Başka bir çalışmada, serbest nisin, kapsüllenmiş nisin (aktive edilmiş aljinat taneciklerinde) ve nisin filminin (palmitoillenmiş aljinat bazlı filmler), steril sığır eti kas dilimleri üzerindeki *S. aureus*' un inhibisyonunu azalttığı rapor edilmiştir. 4 °C'de 7 günlük depolamanın ardından, 500 ve 1000 IU/mL nisin konsantrasyonu içeren nisin filmi ile kaplanan sığır eti dilimlerinde (film uygulaması) *S. aureus* sayılarında 0,91 ve 1,86 log cfu/cm² azalma gözlenmiştir. Aynı konsantrasyonlarda kapsüllenmiş nişin ise, *S. aureus*' ta 1,77 ve 1,93 cfu/g azalmayla sonuçlanırken, serbest nisin (çözelti), 14 günlük depolamadan sonra sığır numunesinde test edilen mikroorganizmada 2,2 ve 2,81 cfu/g azalmaya yol açmıştır. İlki için daha düşük indirgeme oranlarının nedeni, kapsüllenmiş nisin durumunda enzim ile substrat arasındaki teması sınırlayabilen aljinat duvarının sterik engeli olmasıdır (Millette vd., 2007).

Bir çalışmada, doğal antimikrobiyal ajanlar olarak karvakrol ve timol içeren mikrokapsül kaplamalı plastik esnek filmlerin antimikrobiyal özellikleri incelenmiştir. Bu ajanların mikrokapsüllenmesi kontrollü salımlarını mümkün kılmakta ve *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Aspergillus niger* gibi geniş bir yelpazedeki mikroorganizmaların yok edilmesine (veya büyümelerinin engellenmesine) yol açmaktadır. Çalışılan antimikrobiyal ajanlarının miselyum büyümesine karşı güçlü inhibitörler olduğu ancak küf sporlarının çimlenmesine karşı etkili olmadığı bulunmuştur. Timol (T) ve karvakrol (C), incelenen mikroorganizmalara karşı sırasıyla 125-250 ppm ve 75-375 ppm minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) ile önemli bir antimikrobiyal aktivitesi göstermiştir. Timol ve karvakrol kombinasyonlarının sinerjistik etkisi de araştırılmış ve en yüksek sinerjinin %50 T ve %50 C konsantrasyonunda elde edildiği bulunmuştur. Mikrokapsüllenmiş antimikrobiyal ajanlarının konsantrasyonu, %10 timol ve %10 karvakrolde mikroorganizmalar için 4,3-11,3 mm'lik inhibisyon bölgeleri aralığı göstermiştir. Sonuçlar, antimikrobiyal gıda ambalajı için polimer filmlere katılan mikrokapsüllenmiş timol ve karvakrolün kullanılmasının uygunluğunu doğrulamıştır (Guarda vd., 2011).

Bir çalışmada, çeşitli oranlarda karvakrol (%1, %1,5 ve %2) ile birleştirilmiş antimikrobiyal filmler üretilmiş ve tavuk göğsünün raf ömrü üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çalışmada filmlere %2 karvakrol eklenmesi, gıdaları bozan en yaygın bakteriler olan *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*' ye karşı güçlü

antimikrobiyal aktiviteler sergilediği ve tavuk göğsünün raf ömrünü 5 günden 9 güne kadar uzattığı gözlenmiştir. %2 karvakrol ilaveli film ile sarılmış tavuk göğsünün tazeliği, ambalajı açılmış ve sadece normal film ile sarılmış gruba göre daha iyi olduğu anlaşılmıştır. Genel olarak, %2 karvakrol eklenmiş filmlerin gıda ambalajında gıda bozulmasını önlemek ve raf ömrünü uzatmak için umut verici bir uygulama olduğu bu çalışma ile doğrulanmıştır (Peng vd., 2022).

Başka bir çalışmada, kimyon uçucu yağının (CEO) nanokapsülü ile biyolojik olarak parçalanabilen kitosan kaplamasının hazırlaması incelenmiş olup bu amaçla *Escherichia coli* O157:H7 ve *Staphylococcus aureus* bakterileri kullanılmıştır. Nanolipozomların ortalama parçacık boyutu 134 nm olarak ölçülmüş ve ζ (zeta) potansiyeli -4,60 mV olarak bulunmuştur. Çalışmada CEO' nun kapsüllenmesi, numunelerin yüzeyinde antimikrobiyal ajanların kontrol salınımını sağlamış ve bu da serbest EO ile karşılaştırıldığında daha uzun bir antimikrobiyal aktivite ile sonuçlanmıştır. Çalışma, MAP ile kombinasyon halinde kapsüllenmiş CEO içeren kitosan kaplamaların dana etinin raf ömrünü uzatmak için iyi bir seçenek olabileceğini göstermiştir (Fattahian vd., 2022).

Soğutmadan (4 °C) önce tavuk filetolarını kaplamak için mısır ve soya fasulyesi yağları ile hazırlanan bir nanoemülsiyona dahil edilen karanfil EO' nun karakterizasyonu ve etkisi bir çalışmada incelenmiştir. Nanoemülsiyonla kaplanmış filetolar, kaplanmamış örneklerle karşılaştırıldığında, psikrofilik bakterilerde %15,50, TBARS bakterilerinde ise yaklaşık %20 oranında azalmaların meydana geldiği anlaşılmıştır (Ahmadabadi vd., 2022).

Et muhafazasında potansiyel kullanımları açısından incelenen diğer EO' lar arasında çay ağacı EO' su da gelmektedir. Bu nedenle yapılan başka bir çalışmada çay ağacı EO, glisiriza-polisakarit nanofiberlere dahil etmek amacıyla gliadin nanopartikülleri (375,62 nm) içerisinde kapsüllenmiştir. Et için bu işlemin kullanılması, diğer numunelerle karşılaştırıldığında, 5 gün buzdolabındaki (4 °C) muhafazasından sonra domuz numunelerinde *Salmonella typhimurium'* u %98,52 ve tavuk numunelerinde %97,86 oranında azaltmıştır. Bu nanofiber uygulaması tavuk ve domuz eti örneklerinde TBARS değerlerini sırasıyla %70 ve %60 oranında azaltarak antioksidan etkiler de sergilemişlerdir (Cai vd., 2021).

Severino ve arkadaşları 2015 yılında, yüzey aktif madde olarak tween 20 ile limon ve bergamot EO' ları içeren nanoemülsiyonun daha büyük damlacık boyutu barındırdığını tespit etmişlerdir. Dolayısıyla su içinde yağ emülsiyonlarının hazırlanmasında tween 80 'in tween 20' ye kıyasla daha iyi yüzey aktif madde olduğu ve daha yüksek performans içerdiği çalışma ile anlaşılmıştır (Severino vd., 2015).

12 gün boyunca 4 °C'de soğutulmuş taze domuz etini korumak için bir nanopartikül kaplama sistemi (139,47 nm) oluşturmak üzere kitosan matrisi içine hapsedilmiş stabil kekik EO nanoemülsiyonları bir çalışmada geliştirilmiştir. Bu nanopartikül sistemi, sırasıyla %60,35 ve %55,50 oranında inhibitör etkiyle, *E. coli* gibi gram negatif bakterilere kıyasla gram pozitif bakteriler (*Staphylococcus aureus*) üzerinde daha iyi antimikrobiyal aktivite göstermiştir. 12 günlük depolamanın ardından domuz numunelerinde toplam canlı sayımı yapılmış ve nanopartikül bazlı kaplama sistemi ile işlenen et numunelerinde %12,79' luk bir azalma çalışma ile görülmüştür (Liu ve Liu, 2020).

Sığır eti hamburgerinin raf ömrünü uzatmak amacıyla kapsüllenmiş kimyon tohumu esansiyel yağı içeren aktif bir selülozik kağıt üretilmiştir. Nanoemülsiyonlar tween 80 karışımı ile hazırlanmıştır. Buzdolabında ve dondurulmuş depolama sonrasında toplam mezofilik sayımlarda mikroorganizma gelişimindeki azalmalar sırasıyla %20 ve %10' a, psikrofilik bakteri sayımlarında ise azalmaların yaklaşık %15 ve %10'a ulaştığı tespit edilmiştir. Kısaca, mikrokapsüllenmiş kimyon tohumu esansiyel yağı yüklü selülozik kağıtların uygulanması, sığır eti hamburgerinin raf ömrünü uzatma potansiyeline sahip olduğu tespit edilmiştir. Nanoemülsiyonların damlacık boyutunun 100,3 nm ve ζ potansiyelinin de sıfıra yakın ve -0,3 mV' ye eşit olduğu çalışma ile anlaşılmıştır (Hemmatkhah vd., 2020).

Tavuk göğsü filetolarının raf ömrünü uzatmak için zencefil esansiyel yağı (GEO) içeren nanoemülsiyon bazlı yenilebilir sodyum kazeinat kaplamalar filetoların üzerine uygulanmıştır. Nanoemülsiyonun hazırlanmasında iyonik olmayan yüzey aktif madde olan tween 80 ve distile su kullanılmıştır. Tavuk fileto numuneleri (25 g), 225 ml steril peptonlu su ile ayrı stomacher torbalarına aseptik olarak aktarılmış ve bir stomacher karıştırıcıda homojenleştirilmiştir. Bu araştırmada elde edilen tween 80 ile stabilize edilmiş GEO nanoemülsiyonlarının damlacık boyutlarının 60-170 nm olduğu tespit

edilmiştir. GEO nanoemülsiyonunun ζ potansiyel değeri ise $-18,70 \pm 1,32$ mV şeklinde olmuştur (Noori vd., 2018).

Snoussi ve arkadaşları 2022 yılında kekik EO' nun kapsüllemesini geliştirmek için polimerik bir matris geliştirmişlerdir. Nanoparçacık sistem %40 kitosan, %40 Arap zamkı ve %20 orta zincirli trigliseritlerinden (110,19 nm) oluşmuştur. Sığır eti için antimikrobiyal ve antioksidan bir kaplama sistemi olarak kapsüllemenin etkili olduğu çalışma ile kanıtlanmış olup 4 °C' de 20 günlük depolamanın ardından toplam koliformlar, psikotrop bakteriler ile maya ve küflerde kaplanmamış numunelere kıyasla sayılarında sırasıyla %48,87, %20,21 ve %12,83' lük azalmalar gözlenmiştir (Snoussi vd., 2022).

Zein proteini gıda endüstrisinde yenilebilir kaplama malzemesi olarak kullanılmakta olup epigallokateşin galat için gelecek vaat eden kapsülleme ve dağıtım sistemi olarak bu protein ile kaplanmış kitosan nanopartikülleri yapılan bir çalışmada hazırlanmış ve epigallokateşin galat, zein kaplamalı ve kaplamasız kitosan nanopartiküllere kapsüllemiştir. Epigallokateşin galat ' ın kapsüllemesinin kontrollü bir salım özelliği sağlayıp sağlayamayacağını ve yağlı gıda benzerlerinde stabilitesini artırıp arttırmayacağı incelenmiştir. Zein konsantrasyonu 72 mg' dan 216 mg' a yükseldikçe nanopartiküllerin ortalama parçacık boyutunun 240,6 nm' den 197,6 nm' ye düştüğü çalışma ile anlaşılmıştır. Epigallokateşin galat ile kapsüllemiş kitosan nanopartiküllerinin ζ potansiyel değeri +31 mV olarak bulunmuş ve Zein proteini ile kaplandıktan sonra nanopartiküllerin ζ potansiyelinin +35 mV' a yükselip oldukça pozitif hale geldiği çalışma ile anlaşılmıştır (Liang vd., 2017).

Yapılan diğer bir çalışmada ise doğal pH' da bulunan yağsız sütün ζ potansiyel değerinin $-34,6$ mV $\pm 3,6$ olduğu bulunmuştur (Tholstrup Sejersen vd., 2007).

Yapılan bir çalışmada mısır yağı ile pirinç kepeği proteini ve pirinç kepeği proteini-kateşin komplekslerinin oluşturduğu su içinde yağ emülsiyonlarının %0,05 - %0,25 konsantrasyonunda stabiliteyi incelenmiştir. Pirinç kepeği proteini ile kateşin kompleksinin kullanıldığı emülsiyonlar, en küçük damlacık boyutunu ve en iyi emülsifiye edici özellikleri sergilemişlerdir. Bununla birlikte, %0,20' nin üzerindeki bir kateşin konsantrasyonu, artan damlacık boyutu ve protein toplanması nedeniyle mutlak ζ -potansiyel (zeta) değerlerinin azalmasıyla emülsiyon stabilitesini olumsuz

yönde etkilemiştir. Pirinç kepeği proteini tarafından stabilize edilen emülsiyon, yaklaşık $-13,52$ mV' lik en düşük mutlak ζ -potansiyel değerini göstermiştir (Li vd., 2020).

Sahip oldukları antimikrobiyal, antibakteriyel ve bakteriyostatik özellikleri nedeniyle esansiyel yağlar birçok araştırma konusu içerisinde yer almaktadırlar.

2.6 Gıdalarda Doğal Antimikrobiyal Uygulamaları

2.6.1 Karvakrol uygulamaları

Bir çalışmada karvakrol tek başına ve seçilmiş antibiyotiklerle birlikte dört *S. pyogenes* suşuna karşı antibakteriyel etkisi, özellikle potansiyel büyüme inhibisyonu ve hızlı bakterisit mekanizmaları in vitro olarak araştırılmıştır. Karvakrolün *S. pyogenes*' e karşı olarak minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) ile minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBK), sırasıyla 125 ppm ve 250 ppm bulunmuştur. Öldürme eğrisi sonuçları, karvakrolün *S. pyogenes*'e karşı anında bakterisidal aktivite sergilediğini göstermiştir. Karvakrolün indüklediği membran bütünlüğü değişiklikleri, laktat dehidrojenaz enzimleri ve nükleik asitler gibi sitoplazmik içeriğin sızmasına yol açmıştır. Çalışmayla, karvakrolün öncelikle hücre zarı bütünlüğünü bozarak, sitoplazmik içerik sızıntısına ve sonuçta bakteriyel hücre ölümüne yol açarak *S. pyogenes*'i öldürdüğü ortaya çıkmıştır. Bu bulgular, karvakrolün, streptokokal farenjit ile ilişkili rahatsızlığın giderilmesinde boğaz buharı, pastil veya gargara formunda yeni bir doğal sağlık ürünü olarak gelişme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (Wijesundara vd., 2021).

Meira ve arkadaşları 2017 yılında, uçucu yağ bileşiklerinin ve fenolik asitlerin kuru fermente sosis üretimindeki etkinliğini incelemişlerdir. Sonuçlar, bir gıda matrisinde karvakrolün antimikrobiyal potansiyelini göstermiş olup sosis hamurunda meydana gelen ani pH düşüşünü önlemek amacıyla daha düşük miktarlarda karvakrol kullanılmasının gerektiğini göstermiş olup karvakrolün MİK değeri *E. coli* O157:H7 için 195,29 ppm olarak bulunmuştur (Meira vd., 2017).

Karvakrol ve sinnamik asidin taze kesilmiş meyvelerde mikrobiyal bozulmayı geciktirip geciktirmediği ile ilgili yapılan bir çalışmada, kesilmiş kivi'nin 751-2253 ppm' deki karvakrol solüsyonlarına batırılması, 4 °C'de 21 gün boyunca toplam canlı

sayısını 6 ± 6 'dan $<2 \log$ ' a düşürdüğü gözlemlenmiş ve ek olarak istenmeyen renk ve koku değişiklikleri de görülmüştür. 150 ppm karvakrol veya sinamik asit ile muamele sırasıyla, 4°C ve 8°C ' de 5 gün boyunca kivi'deki canlı sayısını 4 ve $1\pm5 \log \text{ kob/g}$ azaltmıştır. İşlem görmüş kavundaki canlı sayımlar, işlem görmemiş kontrollerle karşılaştırıldığında 3. günde 8°C 'de $6 \log \text{ cfu/g}$ daha düşük ve 5. günde 4°C ' de ise 4 log daha düşük olduğu görülmüştür. Sonuçta 150 ppm karvakrol veya sinamik asit ile muamelenin, taze kesilmiş kivi ve tatlı özsu kavununda soğuk sıcaklıklarda bozulmasını geciktirdiği anlaşılmıştır (Roller ve Seedhar, 2002).

2000 yılında, kekik ve kekiğin uçucu yağında bulunan bir etken madde olan karvakrolün, pirinçteki gıda kaynaklı bir patojen olan *Bacillus cereus*' a karşı antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar karvakrolün, 150 ppm ve daha yüksek konsantrasyonlarda kullanılmasının patojen büyümesinde doza bağlı bir inhibisyona neden olduğunu kanıtlamıştır. Yüksek konsantrasyonlarda karvakrolün kokusu ve tadı nedeniyle 300 ppm karvakrol, benzer yapıya sahip doğal bir antimikrobiyal bileşik olan 270 ppm simen ile birleştirildiğinde karvakrolün antimikrobiyal aktivitesi artmış ve sinerjistik bir etki gözlenmiştir. Bu çalışma, *B. cereus*' un pirinçte büyümesinin karvakrol tarafından engellendiğini göstermektedir (Ultee vd., 2000b).

Ultee ve arkadaşları 1998 yılında, karvakrolün, gıda kaynaklı patojen olan *Bacillus cereus*'a karşı bakterisidal etkisini araştırmışlar ve karvakrolün *B. cereus*'a karşı doza bağlı olarak büyüme inhibisyonunun olduğunu bulmuşlardır. 112,65 ppm ve üzerindeki konsantrasyonlarda büyümenin tamamen engellendiği çalışma ile tespit edilmiştir. Bu konsantrasyonun altındaki karvakrol seviyesinin gecikme fazını uzattığı, spesifik büyüme oranını düşürdüğü ve maksimum popülasyon yoğunluğunu da azalttığı saptanmıştır. Sonuç olarak, 112,65 ppm veya üzerindeki karvakrol seviyesinin gıda kaynaklı patojen olan *B. cereus*' a karşı bakterisit olduğu çalışma ile anlaşılmıştır (Ultee vd., 1998).

Başka bir çalışmada, karvakrolün gıdayla ilişkili bakteri suşlarına [*gram (+)* ve *gram (-)*] karşı antimikrobiyal aktivitesi araştırılmış olup mikroorganizmaların hem katı ortamda hem de sıvı ortamlarda karvakrole karşı daha hassas olduğu saptanmıştır. Ek olarak, karvakrol uygulamasının yapıldığı mikroorganizma suşlarındaki hücrelerin yüzey yapısında değişiklikler gözlenmiştir. Ek olarak karvakrol ile temas sonrasında

mikroorganizmaların hem uzunluğunun hem de çapının azaldığı saptanmıştır. Sonuçlar karvakrolün bakteri türleri üzerindeki antimikrobiyal etkisini doğrulamıştır (La Stora vd., 2011).

Yapılan bir çalışmada üzüm meyvelerine aşıl原因mış olan *Botrytis cinerea* üzerine karvakrolün etkinliği, dört konsantrasyonda (50, 200, 500 ve 1000 ppm) incelenmiştir. Çalışmada tüm konsantrasyonlar *B. cinerea*'nin büyümesini tamamen inhibe etmiş olup karvakrol konsantrasyonu arttıkça çürümüş meyvelerdeki azalmanın da önemli ölçüde arttığı anlaşılmıştır. Çalışma verileri, sofralık üzümlerin depolanması sırasında karvakrol kullanımının mantar çürümesini kontrol etmek için kullanılan diğer sentetik fungusitlere alternatif olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Martínez-Romero vd., 2007).

Bir fenolik monoterpen olan karvakrolün anti-inflamatuar özellikleri 2013 yılında yapılan çalışma ile incelenmiştir. Karvakrolün anti-inflamatuar etkileri bir inflamasyon modeli olan farelerde araştırılmıştır. Veriler karvakrol uygulamasının (50 ve 100 ppm), fare pençelerindeki iltihaplanmaya karşı anti-inflamatuar etkiler oluşturduğunu ve pençedeki ödemi hafiflettiğini göstermiştir. Mevcut sonuçlardan, karvakrolün inflammatuar medyatörlerin üretimini azaltarak anti-inflamatuar etkilere neden olduğu anlaşılmıştır (Lima vd., 2013).

2016 yılında, tarçın veya kekik içeren (karvakrol) aktif ambalajların *Escherichia coli* ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Sonuçlar, tarçın ve kekikğin hem doğrudan temas halinde hem de buhar fazında antibakteriyel aktivitesinin olduğunu göstermiştir. Karvakrolün *E. coli* üzerindeki MİK ve MBK değerleri aynı olup bu değer 190 ppm' dir. Aynı zamanda EO' larla tedavi edilen bakterilerde önemli anormalliklerin olduğu çalışma ile tespit edilmiştir (Sitoplazmatik bileşenlerin pıhtılaşması, hücre yapısının çökmesi) (Becerril vd., 2007).

Yapılan başka çalışmada, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 hücrelerinde karvakrol ve p-simen'in protein sentezi üzerine etkileri araştırılmıştır. İnkübasyon sırasında 150 ppm karvakrolün varlığı, *E. coli* O157:H7'nin önemli miktarlarda ısı şok proteini üretmesine neden olmuş ve flagellin sentezini önemli ölçüde inhibe etmiştir. Her iki bileşiğin artan konsantrasyonlarında hareketlilik azalmıştır. Çalışma, uçucu yağ bileşenlerinin bakterilerde ısı şok proteinini indüklediğini ve karvakrol

inkübasyonunun *E. coli* O157:H7'de flagella gelişimini önlediğini gösteren çalışma olması sebebiyle önem içermektedir (Burt vd., 2007b).

Kekik ve kekiğin esansiyel yağı fraksiyonunda bulunan doğal bir antimikrobiyal bileşik olan karvakrolün, *Bacillus cereus'* a karşı öldürücü nitelikte olduğu yapılan başka bir çalışma ile kanıtlanmıştır. Öldürücü olmayan karvakrol konsantrasyonlarının varlığında ise *B. cereus'* un karvakrole karşı duyarlılığında azalmalar saptanmıştır. Ayrıca 60 ppm karvakrole uyarlanmış hücreler, uyarlanmamış hücrelere göre daha düşük bir membran akışkanlığı sergilemişlerdir (Ultee vd., 2000a).

2018 yılında, meyve sularının pastörizasyonunda doğal antimikrobiyallerin ve düşük sıcaklıkların ilişkisi araştırılmıştır. Çalışmada meyve sularının karvakrol ile desteklenmesi hem aside uyum sağlamış hem de uyum sağlamamış bakteri hücrelerinin hayatta kalma oranını azaltmıştır. Karvakrolün eklenmesiyle *E. coli* konsantrasyonundaki azalma, ananas suyunda -4,69 ile -6,88 log hücre/ml arasında, portakal suyunda -3,15 ile -6,27 log hücre/ml arasında ve karpuz suyunda -1,92 ile -4,33 log hücre/ml şeklinde olmuştur. Karvakrol varlığında bakteriyel inaktivasyonun +0,60 ile +2,98 log hücre/ml arasında arttığı gözlemlenmiştir. Karvakrolün kullanılması, hafif ısıl işlemlerin verimliliğini arttırmakta ve asitle uyumlu bakteri hücrelerinin artan termal direncini ortadan kaldırmaktadır. Çalışma ile, doğal antimikrobiyallerin hafif ısıl işlemlerle kombinasyonunun, meyve sularının güvenliğini sağlamada iyi bir strateji olduğu anlaşılmıştır (Tchuenchieu vd., 2018).

Yapılan bir çalışmada karvakrol ve çinko oksit nanopartiküllerinin (ZnO NP) *Campylobacter jejuni'* ye karşı sinerjistik antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Karvakrol ve ZnO NP' lerin kombinasyonu, antimikrobiyal etkinliği arttırmış ve bakterisidal bir etkiye neden olmuştur. Karvakrolün, hücre zarına zarar veren ve *C. jejuni'* nin duyarlılığını arttıran tetikleyici bir faktör olduğu tespit edilmiştir. 27 ppm'den yüksek konsantrasyonda karvakrol uygulaması, hücre popülasyonunda bakterisidal etki oluşturmuştur (2 log 10 cfu/mL). Karvakrolün *C. jejuni'* ye karşı minimum inhibitör konsantrasyonunun (MİK) 18 ila 20,25 ppm arasında değiştiği ve *C. jejuni'* ye karşı minimum bakteri öldürücü konsantrasyonunun (MBK) 27 ppm civarında olduğu görülmüştür. Çalışma, bakteriyel inaktivasyonu ve stres tepkisini anlamak için temel bilgileri sağlamış ve bunun sonucunda uçucu bir yağ ve metal oksit nanoparçacığının sinerjistik antimikrobiyal etkisini açıklamıştır (Windia vd., 2019).

Atas ve arkadaşları 2022 yılında, karvakrol kullanarak, sınırlı antimikrobiyal etkinliğe sahip doğal bir ürün olan berberinin *Bacillus subtilis*' teki antimikrobiyal aktivitesini incelemişlerdir. 25 ppm karvakrol ve 75 ppm berberin ile kombinasyonun morfolojiyi ve zarın geçirgenliğini değiştirdiği yapılan çalışmayla kanıtlanmıştır. Genel olarak bulgular, karvakrolün berberinin etkisini güçlendirdiğini ek olarak karvakrolün, berberin gibi antimikrobiyallerle kombinasyon tedavilerinde kullanılma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir (Atas vd., 2022).

Başka bir çalışmada, kapsüllenmiş uçucu yağların etkinliği oral yoldan verilmek üzere domuzların ince bağırsaklarında test edilmiştir. Karvakrol model bir uçucu yağ olarak kullanılmış ve mikrokapsüllerde başarılı bir şekilde kapsüllenmiştir. Bu kapsülleme yöntemi, simüle edilmiş bir gastrointestinal modelde *Escherichia coli* K88'e karşı test edilmiş ve antimikrobiyal aktiviteden ödün vermediği anlaşılmıştır. Sonuçlar, domuzlarda enterik hastalıkların kontrolünde antimikrobiyal ajanlar olarak uçucu yağların kullanılabileceğini göstermiştir. Çalışma ile kapsüllenmiş karvakrolün, ince bağırsaktaki antibakteriyel aktiviteyi arttırdığı tespit edilmiştir (Wang vd., 2009).

Ultee ve Smid 2001 yılında, karvakrolün *Bacillus cereus* ishal toksini üretimi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Karvakrol (0-60 ppm), sıvı besiyerinde *B. cereus*'un canlı sayısını ve maksimum spesifik büyüme hızını azaltmış ancak toplam protein miktarını etkilememiştir. 60 ppm karvakrol varlığı ishal toksininin üretiminde keskin bir düşüşe (%80) neden olmuştur. Yapılan çalışmayla, karvakrolün gıda ürünlerine eklenebileceği, böylece *B. cereus*' un toksin üretme riskinin azaltılabileceği ve ürünlerin güvenliğinin artırılabilceği sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda düşük dozlardaki karvakrol aroma ve tada zarar vermemektedir (Ultee ve Smid, 2001).

Yapılan bir çalışmada, %1,0 karvakrol ve %0,1 tetrasodyum pirofosfatın, 10⁵ cfu/g konsantrasyonunda kıymaya eklenen *Escherichia coli* ve *Salmonella Typhi*' nin D10 radyasyonu üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Kıyma hava altında paketlenildiğinde *E. coli* ve *Salmonella Typhi* için sırasıyla 0,126 ve 0,526 kGy radyasyon D10 değerlerinin olduğu çalışmayla görülmüştür. Karvakrol ve tetrasodyum pirofosfatın eklenmesi ve değiştirilmiş atmosfer paketlemesinin kullanılması, radyasyon D10 değerini; *E. coli* için 0,126' dan 0,046 kGy' ye ve *Salmonella Typhi* için 0,526'dan 0,053 kGy' ye düşürmüştür (Chiasson vd., 2005).

Bir çalışmada kekik esansiyel yağının önemli bir bileşeni olan karvakrol ve nisinin *L. monocytogenes* 10403S' nin hayatta kalması üzerindeki sinerjik etkisi, dilimlenmiş salam sosislerinin 4 °C'de saklanması sırasında incelenmiştir. Karvakrol, *L. Monocytogenes* 10403S ve gıda izolatları da dahil olmak üzere incelenen tüm suşlara karşı, 250 ppm MİK ve 250 ila 500 ppm arasında değişen MBK ile güçlü antibakteriyel aktivite sergilemiştir. Karvakrole maruz bırakılan *L. monocytogenes*' te membran geçirgenliğinde ve depolarizasyonda artış ve solunum aktivitesinde değişiklikler görülmüştür. Sinerjileri, 4 °C' de depolama altında yemeye hazır, dilimlenmiş salam sosisi örneklerinde bakteri popülasyonlarının engellenmesiyle de kanıtlanmıştır. Bu sonuçlar, karvakrol ve nisin kombinasyonunun, *gıdalardaki L. monocytogenes*' i kontrol etmek için koruyucu olarak potansiyel kullanıma sahip, etkili bir doğal antimikrobiyal uygulama olduğunu göstermiştir (Churklam vd., 2020).

Başka bir çalışmada ise elma, mango, portakal ve domates sularından süspansiyon edilen *Escherichia coli* O157:H7 hücrelerini etkisiz hale getirmek için, karvakrolün hafif ısı veya darbeli elektrik alanları (PEF) ile kombinasyon halindeki bakterisidal etkisi değerlendirilmiştir. 195,3 ppm karvakrol ile hafif ısı (54 °C ve 60 °C) veya PEF (30 kV/cm) tedavileri kullanılarak güçlü sinerjistik öldürücü etkiler olduğu çalışma ile tespit edilmiştir. Sonuçlar, her bir meyve suyunun özellikleri (bileşim, pH, iletkenlik, vb.) sebebi ile ısı veya PEF' in muamele edilmiş bakteriler üzerinde etki edebilmesi için karvakrolün kullanılmasının önemli olduğunu göstermiştir (Ait-Ouazzou vd., 2013).

2023 yılında yapılan çalışmada, gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan bir koruyucu ve aroma maddesi olan karvakrole maruz kalan *Escherichia coli* ve *Bacillus cereus* bakteri suşlarının 48 saatlik büyüme kinetiği deneysel olarak incelenmiştir. Bir kırmızı et modeli geliştirilmiş olup bu model, büyüme ve ölüm oranlarının farklı konsantrasyonlardaki koruyucu maddeler tarafından nasıl değiştirildiğini (bakteriostatik ve bakterisidal etki) açıklamıştır. Bu yaklaşımda, karvakrolün *B. cereus* ve *E. coli* suşlarının popülasyonları üzerindeki bakteri üremesini engelleme etkisi analiz edilmiştir. Karvakrolün *E. coli* ile *Bacillus cereus* üzerine MİK değerleri sırasıyla 1833,55 ppm ve 228,59 ppm olarak bulunmuştur (Pedreira vd., 2023).

Antibiyotiklere karşı bakteriyel direnç, mikrobiyal enfeksiyonla ilişkili hastalıkların tedavisi için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Bu nedenle Khan ve arkadaşlarının

yaptığı çalışmada, idrar yolu enfeksiyonu geçirmekte olan bir hastanın asit sıvısından alınıp izole edilen *Extended-spectrum β -lactamase Escherichia coli'* ye (ESBL) karşı karvakrolün antimikrobiyal potansiyeli incelenmiştir. Karvakrol, 450 ppm' lik minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) sergilemiş ve bu konsantrasyonda *E. coli* hücre sayılarını zamana bağlı olarak önemli ölçüde azaltmıştır. Sonuçlar karvakrolün ESBL *E. coli'* ye karşı potansiyel olarak antimikrobiyal rol üstlendiğini göstermiştir. Karvakrol, *E. coli'* nin membran bütünlüğünü bozmakta ve hücrel içeriklerin (DNA ve proteinler) salınmasına neden olup kolon hücrelerini bakteri istilasından korumaktadır. Bu karvakrolün canlı *E. coli* sayısında ciddi bir toksik etkiye sahip olduğunu açıklar. Bulgular, karvakrolün kadın popülasyonunda idrar yolu enfeksiyonuna neden olan ESBL *E. coli'* ye karşı güçlü bir antimikrobiyal aday olabileceği göstermiştir (Khan vd., 2017).

Doğal katkı maddeleri olarak aktif bileşiklerin, alil-izotiyosiyanatın (AITC) ve karvakrolün (CAR) taze tavuk eti kalitesi üzerine etkileri 2019 yılında yapılan çalışmayla incelenmiştir. CAR' ün başta *Escherichia coli O157:H7* ve sonra *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella typhimurium'* un büyümesini azaltmada daha aktif olduğu çalışmayla anlaşılmıştır. 500 ppm CAR, lipid oksidasyonunu kontrol etme ve renk değişikliklerini koruma konusunda AITC' den daha fazla aktivite göstermiştir. Sonuç olarak hem AITC hem de CAR' ün, et ve et ürünlerinin raf ömrünü uzatma konusunda büyük bir potansiyele sahip olduğu anlaşılmış olup, tavuk etinin kalite özelliklerini koruma konusundaki potansiyelleriyle CAR ve AITC' nin etkinliği vurgulanmıştır (Hussein vd., 2019).

Karvakrol buharının aktivitesi, triptik soy agarda ve çiğ tavuk parçalarında *Salmonella enterica serotip* 'e karşı Burt ve arkadaşları tarafından 2007 yılında değerlendirilmiştir. Tavuk parçalarına uygulanan karvakrol buharı 4, 20 ve 37 °C'de canlı *Salmonella* sayısını önemli ölçüde azaltmış ve tüm canlı hücreler (yaklaşık 5×10^3 cfu), 37 °C'de minimum 3 saatte elimine olmuşlardır. İnhibisyonun aerobik ve anaerobik koşullar altında eşit derecede etkili olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, karvakrol buharının, agar ve çiğ tavuk yüzeyinde *S. enterica serotip Enteritidis* gelişiminin engellenmesinde ve yok edilmesinde etkili olduğu anlaşılmıştır (Burt vd., 2007a).

Escherichia coli O157:H7 ile kontamine olmuş, daha sonra pastörize edilmemiş olan elma suyunun içilmesiyle ilişkili gıda salgınları, ciddi hastalıklara ve bazen de ölüme

neden olmaktadır. Karvakrol gibi doğal antimikrobiyal maddelerin çiğ meyve sularına eklenmesi, meyve sularının güvenliğinin sağlanması ve raf ömrünün uzatılması açısından potansiyel bir öneme sahiptir. Kiskó ve arkadaşları 2005 yılında, pastörize edilmemiş elma suyunda *Escherichia coli* O157:H7' yi kontrol etmek için çok düşük konsantrasyonlarda (37,6 ppm-188 ppm) karvakrol ve p- simen ilavesinin hem ayrı ayrı hem de kombinasyon halindeki uygulamalarını test etmişlerdir. Meyve suyunun 188 ppm karvakrol veya p- cymene ile işlenmesi, *Escherichia coli* O157:H7 sayısını tespit edilemeyen seviyelere düşürmüştür. Çalışmayla fenolik bileşiklerin, *Escherichia coli* O157:H7' ye karşı biyosidal etki gösterdiğini ve pastörize edilmemiş elma suyunun raf ömründe ve güvenliğinde iyileşme sağladığı kanıtlanmıştır (Kiskó ve Roller, 2005).

Cryptococcus neoformans, bağışıklık sistemi zayıf olan bireyleri etkileyen mantar enfeksiyonu kriptokokkozunun bir ajanıdır. 2016 yılında yapılan çalışmada karvakrolün *C. neoformans* suşlarına karşı antifungal aktivitesi incelenmiştir. Sonuçlar karvakrolün *C. neoformans*'a karşı antifungal aktiviteye sahip olduğunu ve etki şeklinin mantar membran instabilitesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Karvakrolün minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) ve minimum fungisit konsantrasyonu (MFK) çalışmada değerlendirilmiş olup MİK değerleri, 25 ila 81 ppm arasında ve MFC, 25 ila 102 ppm şeklinde değişmiştir. Sonuçlar karvakrolün *C. neoformans*'a karşı antifungal aktiviteye sahip olduğunu ve etki şeklinin fungal membran instabilitesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir (De Oliveira Nóbrega vd., 2016).

Başka bir çalışmada, nanolipozomlara kapsüllenmiş karvakrol ve polimerik nanokapsüllere kapsüllenmiş karvakrol, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Salmonella spp.*'ye karşı olarak test edilmiştir. Sonuçlar, nanokapsüllere kapsüllenmiş karvakrolün biyofilm oluşumunu önlemek amacıyla gıdayla temas eden yüzeylerde kullanım potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Polimerik nanokapsüller, nanolipozomlardan daha küçük boyuta ve pozitif yüzey yüküne sahip oldukları için, mikroorganizmalarla etkileşimleri daha kolay olmuş ve kullanıldıklarında, *S. aureus*, *E. coli* ve *Salmonella*' dan oluşan bakteri havuzlarına karşı bakterisidal etkinin olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla, polimerik nanokapsüller içine kapsüllenmiş karvakrolün yüzey dezenfektanı şeklinde kullanılma potansiyeli içerdiği bu çalışma ile anlaşılmıştır (Ayres Cacciatore vd., 2020)

Başka bir çalışmada, karvakrolün tek başına ve antibiyotik sefiksim ile kombinasyon halinde kullanımının *Escherichia coli*' ye karşı antibakteriyel ve anti-biyofilm aktivitesi araştırılmıştır. Karvakrol ve sefiksim *E. coli*' ye karşı sinerjistik bir etkileşim göstermiş olup karvakrolün MİK ve MBK değerleri 250 ppm olarak bulunmuştur. Karvakrol ve sefiksim aynı zamanda biyofilm oluşumunu da önemli ölçüde inhibe etmiştir. Sonuçlar, en iyi antibakteriyel ve anti-biyofilm özelliklerin sefiksim ve karvakrolün kombine kullanımında olduğunu göstermiştir. Çalışma ile karvakrolün sadece antibakteriyel özelliklere sahip olmadığı ve anti-biyofilm aktivite sergilediği de anlaşılmıştır (Asadi vd., 2023)

2017 yılında, rendelenmiş lahanalarda bulunan doğal mikroflora üzerine karvakrol nanoemülsiyonu uygulanmış ve temsili bir bakteri suşu olarak *Escherichia coli* ATCC 25922' ye karşı antimikrobiyal etkinliği değerlendirilmiştir. Sonuçta karvakrol nanoemülsiyonunun taze kesilmiş lahana üzerindeki antimikrobiyal aktivitesinin yalnızca 0. günde gözlemlendiğini, ek olarak aerobik bakteri seviyesini 5 log cfu/g'nin altına düşürdüğünü ve bu nedenle daha güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Antimikrobiyal etkinin, mezofilik ve psikrotropik bakterilere karşı maya ve küflere göre biraz daha güçlü olduğu anlaşılmıştır. Çalışma ile, karvakrol nanoemülsiyonunun taze kesilmiş sebzelerin güvenliğinin kontrolünde kullanılabileceği anlaşılmıştır (Sow vd., 2017).

Stratakos ve Grant tarafından yapılan bir çalışmada, çiğ sığır etinde bulunan patojenik bir bakteri olan *Escherichia coli* üzerine fiziksel, biyolojik ve doğal müdahalelerin antimikrobiyal etkinliği araştırılmıştır. Karvakrol veya kekik esansiyel yağları içeren nanoemülsiyonların, *E. coli* üzerinde anında 1,41 ve 1,36 log düzeyinde azalmaya neden olduğu görülmüştür. Çalışma bulguları, karvakrol ve kekik esansiyel yağı nanoemülsiyonlarının patojenik *E. coli* kontaminasyonunu kontrol etmek için sığır eti endüstrisinde potansiyel olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Stratakos ve Grant, 2018).

Başka bir çalışmada, sığır derisi ve sığır karkas kesimleri üzerinde karvakrolün *Escherichia coli* O157' ye karşı antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Karvakrol (0, 10000, 20000 ve 30000 ppm), sığır derisine ve sığır karkas kesimlerine uygulanmış, bir *E. coli* O157 kokteyli (5–6 log cfu/cm²) ile aşılınmış ve temas halinde 10 dk muameleye bırakılmıştır. Karvakrolün (30000), sırasıyla hem karkas kesimlerinde

hem de deride yıkamasız ve suyla yıkamalı kontrollere kıyasla aşılınmış *E. coli O157'* yi (1,4 ve 1,58 log cfu/cm²) önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. Bu çalışmayla, karvakrolün gıda zincirinde *E. coli O157'* yi azaltmak için alternatif olarak kullanılabileceği kanıtlanmıştır (McDonnell vd., 2012). Başka bir çalışmada, karvakrolün, sütte *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli O157:H7* suşlarına karşı antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. karvakrolün *S. aureus* ve *E. coli* 'ye karşı minimum inhibe edici konsantrasyonları (MİK' ler) ve minimum bakterisidal konsantrasyonları (MBK' ler) belirlenmiştir. Karvakrolün, her iki gıda kaynaklı patojene karşı antibakteriyel aktivite sergilediği görülmüştür. Karvakrolün *S. aureus'* a karşı MİK ve MBK' sı sırasıyla 15000 ve 20000 ppm iken, *E. coli O157'* ye karşı olanlar sırasıyla 16000 ve 32000 ppm bulunmuştur. Antibakteriyel etkiler, herhangi bir aktivite kaybı olmadan 14 gün boyunca devam etmiştir. Ayrıca, süte eklenen karvakrolün, sonraki günlerde birçok kez *S. aureus* ve *E. coli O157:H7* popülasyonlarını öldürmede etkili olduğu bulunmuştur. Çalışma, karvakrolün gıda kaynaklı patojenlere karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Cho ve Lee, 2014).

Karvakrolün antibakteriyel etkinliği, çeşitli örneklerden izole edilen dokuz patojenik bakteri türü (*Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *St. Pneumonia*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter spp.* ve *Serratia spp.*) üzerinde Abass ve arkadaşları tarafından incelenmiştir. Bu yağın inhibitör etkileri standart antibiyotikler olan siprofloksasin ile karşılaştırılmış ve karvakrolün farklı bakteri üreme konsantrasyonlarındaki inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar, farklı enfeksiyon bölgelerinden alınan bakteri izolatlarının siprofloksasine duyarlı olduğunu ve antibakteriyel etkisinin karvakrolün etkisinden daha az olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda *Pseudomonas aeruginosa* hariç çalışılan diğer bakteri izolatlarında büyük bir inhibisyon büyümesi görülmüştür (Abass Bnyan vd., 2014).

Kümes hayvanlarında kullanılan, *Enrofloxacin* ve *Colistin* antibiyotiklerine dirençli *Escherichia coli* suşları üzerine kekik esansiyel yağı ve bu yağın ana bileşeni olan karvakrolün antibakteriyel özellikleri 2018 yılında yapılan çalışmayla belirlenmiştir. Sonuçlar çalışmada kullanılan antibiyotiklere kıyasla karvakrolün, *Escherichia coli* suşları üzerindeki aktivitesinin güçlü olduğunu göstermiştir. Çalışmayla, kekik

esansiyel yağının bakteri direncine iyi bir alternatif olduğu anlaşılmıştır (Khrıbch vd., 2018).

Yapılan bir çalışmada, karvakrol bileşiğinin inhibitör altı konsantrasyonlarının gıda kaynaklı patojen olan *Campylobacter jejuni*' nin ana virölans özellikleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Deneyler karvakrolün inhibitör altı konsantrasyonlarının, bakteriyel büyümeyi etkilemeden *C. Jejuni*' nin motilitesini inhibe ettiğini ortaya çıkarmıştır. Sonuçlar, bakteriyel büyümeyi bozmayan konsantrasyonlarda bile karvakrolün *C. jejuni* virölansını azalttığını ve hücrel enfeksiyona karşı koruduğunu göstermiştir (Van Alphen vd., 2012).

Gıda kaynaklı patojen *Bacillus cereus*' un vejetatif hücrelerinin biyoenerjetik parametreleri üzerindeki etkisi açısından karvakrol 1999 yılında incelenmiştir. Karvakrol mevcudiyetinde 30 dakikalık bir inkübasyon, canlı hücre sayılarını katlanarak azaltmıştır. Karvakrol, 150 ppm üzerindeki konsantrasyonlarda mevcut olduğunda 20°C'de *B. cereus* hücrelerine karşı bakterisidaldir. 1 mikrometre karvakrol eklenmesi, hücre içi ATP miktarını 14 dakika içinde sifıra yakın değerlere düşürmüştür. Çalışma, karvakrole (300 ppm) maruz kalmanın ATP' nin konsantrasyonunda bir azalmaya yol açtığını göstermiştir. *B. cereus* salgınlarıyla ilişkili ürünlere (örneğin, pirinç, makarna ve çorba), karvakrolün hem antimikrobiyal hem de aroma verici bir bileşik olarak uygulanabildiği sonucuna varılmıştır (Ultee vd., 1999).

2021 yılında, dört farklı türden (her biri 50 adet) 200 peynir örneğinde, *Aspergillus fumigatus* varlığı araştırılmış olup izole edilen suşlar kekik ve karvakrol olmak üzere iki doğal nano-emülsiyonun etkisi altında büyüme yetenekleri açısından değerlendirilmiştir. Bu mantar, süt ürünlerinde depolama sırasında bozulmalara neden olmakla kalmayıp insan sağlığını tehdit etmektedir. *A. fumigatus*' un görülme oranı Kareish, Damietta ve işlenmiş peynirlerde sırasıyla 12 (%24), 3 (%6) ve 6 (%12) olarak saptanırken, Cheddar peynirinde tespit edilememiştir. Sonuçlar, *A. fumigatus* büyümesi üzerine karvakrolün kekikten daha önemli bir inhibe edici etkisi olduğunu ve alt yapısında belirgin bir yıkım olduğunu göstermektedir. Bu çalışmayla sentetik antifungal yerine peynir kalitesini artırmak için doğal gıda katkı maddesi olarak karvakrolün kullanılabileceği anlaşılmıştır (ShakEr ve Farghaly, 2021).

Yapılan bir çalışmada, kekik esansiyel yağının önemli bir bileşeni olan karvakrolün, *E. coli* sero grupları üzerindeki antibakteriyel etkisi araştırılmıştır. 8 farklı STEC grubu üzerindeki membran geçirgenliğindeki değişiklikleri değerlendirmek için karvakrolün antimikrobiyal mekanizması kullanılmıştır. Sonuçlar, doğal antimikrobiyal bileşik olan karvakrolün, gıda ve yemdeki 8 ilgili sero gruba karşı kullanılma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Karvakrol test edilen tüm sero grupların büyümesini inhibe etmiştir. İlk birkaç saat artan miktarlarda karvakrol kullanımı tüm numunelerde antimikrobiyal etkinliği önemli ölçüde artırmıştır (Stratakos vd., 2017).

Bir çalışmada, karvakrolün *Salmonella Typhimurium'* a karşı antibakteriyel aktivitesi incelenmiştir. MİK ve MBK değerleri 312 ppm olarak bulunmuştur. *S. Typhimurium'* un karvakrol ile işlenmiş biyofilmlerinde 5,12 log' luk bir azalma meydana gelirken, karvakrolün paslanmaz çelik üzerinde bakteri sayısını 5 log azalttığı görülmüştür. MİK' deki tedavi ile 0 ila 6 saat arasındaki zamanlarda bakteri sayılarında kademeli bir azalmanın olduğu ve 6 saat sonra hiçbir canlı hücrenin tespit edilemediği çalışma ile gözlemlenmiştir. Bu nedenle karvakrolün gıda işleme ortamlarında bakterilerin kontrolü için kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Trevisan vd., 2018).

Karvakrol, antikanser aktivitelerinden dolayı son zamanlarda büyük ilgi görmektedir. 2019 yılında karvakrol β -siklodekstrin içerisine eklenmiş ve PC (Prostat kanseri) hücrelerine karşı aktivitesi incelenmiştir. Çalışmada karvakrolün β -siklodekstrin ile başarılı bir şekilde komplekslendiği anlaşılmış olup aynı zamanda karvakrolün hücre canlılığını ve PC hücrelerinin çoğalmasını etkili bir şekilde azalttığı tespit edilmiştir. Bulgular, karvakrolün çözünürlük ve biyoyararlanım özelliklerini arttırdığını ve prostat kanseri hücreleri üzerinde de antikanser etkiler meydana getirdiğini göstermiştir (Trindade vd., 2019).

Başka çalışmada ise, mevcut elma sularına doğal koruyucu etken madde olan karvakrol eklenmesinin depolama süresince elma sularındaki fizikokimyasal özellikleri üzerinde meydana getirebileceği değişimler araştırılmıştır. Karvakrol eklenmesi mevcut üründe bozulma faktörü olan *Zygosaccharomyces bailii* mayasını başarılı olarak inhibe etmiştir. Karvakrol düzeyindeki artış maya sayısında 7 log şeklinde bir azalma sağlamış olup meyve sularındaki bozulmayı da önlemiştir. Sodyum benzoat kullanılmadan sadece 417 ppm eklenen karvakrol, 11 °C sıcaklıkta

ve depolama sonunda (20 gün) maya miktarının en düşük düzeyde olduğu çalışmayla anlaşılmıştır (Karaman vd., 2019).

2.6.2 Timol uygulamaları

Yapılan bir çalışmada timol ve timol-nanoemülsiyonun (NE) antimikrobiyal etkinliği *S. aureus*, *E. coli* ve *C. perfringens*' e karşı bir sosis ürünüde 4 hafta boyunca incelenmiştir. Timol-NE' nin damlacık boyutu 86,39 nm olarak ölçülmüştür. Sosislerdeki *S. aureus*, *C. perfringens* ve *E. coli*' nin başlangıç popülasyonu yaklaşık 105,5 log cfu/g bulunmuştur. Sade timol ve NE içeren timolün *S. aureus*, *E. coli* ve *C. perfringens*'e karşı MİK ve MBK değerlerine bakılmış ve buna göre sade timolün MİK değerleri sırasıyla 103, 60 ve 93,3 ppm ve MBK değerleri, *E. coli*, *S. aureus* ve *C. perfringens*' e karşı sırasıyla 406, 200 ve 406 ppm olarak bulunmuştur. NE' nin test edilen üç bakterinin büyümesini engellemede daha etkili olduğu anlaşılmıştır. Sonuçlar, et ürünlerinde antimikrobiyal ajan olarak timol ve NE' nin büyük potansiyelini göstermiş ve bu nedenle timol veya NE' nin 60 ppm nitritle birlikte kullanımının sosis ürünlerinde mikrobiyal ve renk kalitesinin korunmasında çok etkili olabileceği anlaşılmıştır (Sepahvand vd., 2021).

2014 yılında, timolün *Salmonella ser. Typhimurium*' a karşı etki mekanizması araştırılmıştır. Timolün *S. typhimurium*' a karşı minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) 750 ppm olarak bulunmuş ve bakteri sayısı zamana bağlı olarak azalmış olup membran bütünlüğü bozulmuştur. Timolün, nitrik oksit üretimini ve glutatyon seviyesini zamana bağlı olarak önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Çoğu ilacın başaramadığı hücre içi *S. typhimurium*' u öldürmede timolün etkinliği, makrofajların oksidatif stresten kurtulmasını destekleme kapasitesiyle birleştiğinde, onu *S. typhimurium* enfeksiyonunun tedavisi için sağlam bir aday haline getirdiği çalışmayla anlaşılmıştır (Chauhan ve Kang, 2014).

Bir başka çalışmada, aynalı sazan balığından (*Cyprinus carpio carpio L.*) yapılmış kıymaya farklı katkı maddeleri eklenilerek balık köfteleri oluşturulmuş ve bu köfteler 3 gruba bölünmüştür. Birinci grup kontrol grubu (grup A) olup timol eklenmemiştir. B grubunda ise köftelere köfte ağırlığının % 0,5' i kadar timol ve 1 ml sıvı yağ ile karıştırılmış olup fırça ile sürülmüştür. C grubu örnekleri hazırlanırken köfte ağırlığının %1' i kadar timol 1 ml kadar sıvı yağ ile karıştırılarak uygulanmıştır.

Mikrobiyolojik analiz sonuçlarına bakıldığında A grubu, B ve C grubuyla karşılaştırıldığında değerlerin yüksek çıktığı görülmüştür. İstatistiksel olarak ise C grubu örneklerinde mezofil aerob bakteri sayıları ile, maya ve küf sayılarında daha düşük bulunmuştur. Sonuç olarak, balıktan yapılan köftelere ilave edilen timolün gıdanın raf ömrünü uzattığı ve duyu kaliteyi olumsuz etkilemediği anlaşılmıştır (Pelin Can ve Emir Çoban, 2012).

Özvural' ın 2017 yılında yapmış olduğu bir çalışmada, %0,5 ve %1 oranlarındaki çemen ekstraktı ve yine aynı oranlardaki timol içeren emülsiyonlar ile kaplanmış olan köfte örneklerinin 4°C' de belirlenen günlerdeki (10 günlük) depolama süresince belirli aralıklarla çeşitli (pH, nem, tiyobarbitürik asit ve çeşitli reaktif maddeler (2-tiyobarbitürik asit-TBARS) analizleri yapılarak, örnekler kaplama yapılmamış köfte ve kaplanan köfte örnekleriyle karşılaştırılmışlardır. Tüm örneklerde pH değeri depolama sürecince giderek artış göstermiştir. Depolama sonunda timol içeren örneklerin diğer içermeyen örneklere göre daha az oksidasyona uğradığı çalışma ile tespit edilmiştir. Sonuç olarak timol eklenilerek emülsiyonlarla kaplanan köftelerin depolama koşullarındaki oluşabilecek olumsuz şartlara karşı daha dayanıklı olduğu, ve bunu da çemen ekstraktıyla kaplanan örneklerin izlediği anlaşılmıştır (Özvural, 2017).

Aynalı sazan balığı' ndan (*Cyprinus carpio L.*) yapılan köftelerin başta mikrobiyolojik daha sonra kimyasal özellikleri üzerine timol ve sodyum laktat' ın yalnız kullanımları ve kombine şekildeki kullanımlarının etkileri 2015 yılında yapılan bir çalışmada derinlemesine incelenmiştir. Mikrobiyolojik analiz sonuçları, yalnız %1 sodyum laktat ile %1 sodyum laktat ile birlikte %0,25 timol kullanımının köfte örnekleri üzerindeki muhafaza ve dolayısıyla raf ömrü süresini artırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada artan timol konsantrasyonunun mevcut bazı gruplar üzerinde kabul edilemez bir aroma sergilediği de gözlenmiştir (Erol ve İlhak, 2015).

Santurio ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları çalışmada, *Thymus vulgaris* (kekik) uçucu yağının ve timol bileşiğinin antimikrobiyal aktiviteleri, kümes hayvanlarından ve domuzlardan elde edilen 20 *E. coli* suşuna karşı incelenmiştir. Her izolat için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) belirlenmiştir. Elde edilen MİK ve MBK değerleri uçucu yağın tek başına bileşikten üstün olduğunu göstermiştir. Sonuçlar, kekik esansiyel yağının potansiyel

bir antimikrobiyal olduğunu ve gıdalarda yapay inhibitörlerin yerine koruyucu olarak güvenle kullanılabileceğini göstermiştir (Santurio vd., 2014).

Timolün hem asit hem de hafif ısıl işlem görmüş gıdalarda bozulma riskini temsil edebilecek bazı bakterilere karşı inhibe edici aktivitesi Falcone ve arkadaşları tarafından incelenmiştir. Sonuçlar, timolün büyüme döngüsünün her aşamasında önemli bir antimikrobiyal etki gösterdiğini kanıtlamış ve laktik asit bakterilerinin timol etkisine spor oluşturan bakterilerden daha dirençli olduğunu göstermiştir. Konsantrasyonu 500 ppm'ye eşit veya daha yüksek olduğunda, büyüme indeksi sıfıra yakın değerlere ulaşmış bu da daha yüksek konsantrasyonda timolün algılanabilir büyümeyi tamamen engellediğini göstermiştir (Falcone vd., 2005).

2.6.3 Küminaldehit uygulamaları

2023 yılında küminaldehitin, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*'un (*S. Typhimurium*) hücre zarı ve genomik DNA'sı üzerindeki etkisi araştırılmış ve antibakteriyel mekanizması ortaya konulmuştur. *S. Typhimurium* için küminaldehitin minimum inhibitör konsantrasyonu 600 ppm olarak belirlenmiştir. Küminaldehit, bakteriyel membran proteinlerine bağlanarak yapısını ve konformasyonunu değiştirerek hücre içi maddelerin sızmasına ve hücre bütünlüğünün bozulmasına neden olmakla birlikte nükleik asitlerle etkileşimde bulunarak hücre büyümesinde durgunluğa yol açmaktadır. Çalışmayla, küminaldehitin toz bebek formülünde uygulanabilmesi için teorik gerekçe sağlanmıştır (Li vd., 2023b).

Escherichia coli ve *Staphylococcus aureus* sıklıkla ciddi enfeksiyonlara dönüşebilen idrar yolu enfeksiyonlarının önemli etkenleridir. Antibiyotiğe dirençli suşların yükselişi, antibiyotik kullanımının yerini alacak veya yardımcı madde olarak işlev göreceği yeni tedavilerin araştırılmasına yol açmıştır. Yapılan çalışmada küminaldehitin in silico ve in vitro aktivitelerinin yanı sıra siprofloksasinin *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı etkilerini güçlendirme yeteneği araştırılmıştır. In silico analizi, küminaldehitin bir antimikrobiyal ve membran geçirgenliğini artırıcı olarak görev yapabileceğini göstermiştir. Gastrointestinal sistem tarafından oldukça emilebilir olduğu ve muhtemelen kan beyin bariyerini geçebileceği öne sürülen bu bileşiğin oral biyoyararlanımı ve ilaç skoru da iyi bulunmuştur. Küminaldehit, *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal ve anti-biyofilm etkileri göstermiş ve Siprofloksasin ile inkübe

edildiğinde bu etkiler daha da artmıştır. Klinik izolat *E. coli*- R dışında test edilen tüm bakterilerin biyofilm oluşturduğu sonucuna varılmıştır. Cüminaldehidin hem *S. aureus* ATCC 6538 hem de *E. coli*-R üzerindeki MİK değerleri 12000 ppm olarak bulunmuştur (Monteiro-Neto vd., 2020).

Kimyon da dahil olmak üzere pek çok bitki kaynağında önceden belirlenmiş bir monoterpenoid olan küminaldehit, LD50' ye sahip bir parazit solucan olan *Haemonchus contortus*' ta reaktif oksijene bağlı hasara ve ölüme neden olmaktadır. *Haemonchus contortus*, çiftlik hayvanlarında, özellikle de geviş getiren hayvanlarda gastrointestinal enfeksiyona neden olan en yaygın, ekonomik açıdan önemli ve oldukça patojenik parazitlerden birisidir. Alb ile karşılaştırıldığında küminaldehite (74 ppm) maruz kaldıktan sonraki 12 saat içinde nitrik oksit sentaz aktivitesinde de kesin bir artış (2,9 kat) olmuştur. Erkek ve dişi solucanlarda küminaldehit en fazla aynı konsantrasyon olan 740 ppm' de aktifti. Yetişkin dişi ve yetişkin erkek solucanlar için 12 saatlik küminaldehit maruziyetinde LD50 değerleri $127,3 \pm 7,5$, $184,5 \pm 12,1$ ppm olmuştur. Bu nedenle küminaldehitin klinik öncesi potansiyeli, yaygın olarak kullanılan antihelmintik ilaç Alb' den çok daha yüksektir. Sonuçlar küminaldehiti yeni bir aktif antihelmintik molekül olarak keşfetmek için yeni fırsatlar olduğunu göstermektedir (Goel vd., 2020).

Li ve arkadaşları 2022 yılında küminaldehitin *Staphylococcus aureus* ekzotoksinleri ile invazif enzimler üzerindeki inhibitör mekanizması ve soslu sığır eti üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Küminaldehit, heptamer oluşumunu engelleyerek hemolitik aktiviteyi azaltmış olup kültür ortamında ve soslanmış sığır etinde enterotoksin içeriğini inhibe etmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, küminaldehit ilavesi soslanmış sığır etinde *S. aureus* sayısında, toplam uçucu baz nitrojeninde, asit değerinde ve tiobarbitürik asit reaktif maddelerinde 9 gün sonunda önemli bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca küminaldehit, soslanmış sığır etinin kızarıklığını da iyileştirmiştir. 0, 3, 6, ve 9. gün depolama günlerine göre MİK değerleri sırasıyla $46,14 \pm 1,89$, $52,56 \pm 2,04$, $53,10 \pm 1,37$, $53,67 \pm 0,10$ şeklindedir. Bu sonuçlar, küminaldehitin *S. aureus* toksininin sentezini etkili bir şekilde sınırlayabildiğini ve soslu sığır etine küminaldehit eklenmesinin, gıda patojenlerinin büyümesini engellemenin ve kalite profillerini korumanın potansiyel yolu olduğunu göstermektedir (Li vd., 2022a).

Yapılan bir çalışmada küminaldehitin meme kanseri hücrelerine karşı anti-neoplastik potansiyeli araştırılmıştır. küminaldehitin (4-izopropilbenzaldehit) anti-neoplastik etkilerinin nanokonjugatlar tarafından arttırılması değerlendirilmiştir. Hedeflenen ilaç nanokonjugatları, hücre döngüsünün durmasına neden olduğu anlaşılmış ve mitokondriyal hasar yoluyla hücrelerde apoptozun içsel yolu indüklemiştir. Hedeflenen ilaç nanokonjugatlarının in vivo intravenöz enjeksiyonu, küminaldehitin artan birikimi yoluyla dişi meme yastığı tümörünün büyümesinde etkili bir azalmaya yol açtığı görülmüştür. Bu nedenle, meme kanseri tedavisi için güçlü bir terapötik modelin sağlandığı sonucuna varılmıştır (Ghosh vd., 2022).

Bir çalışmada, patojenik suşlar (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43888, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Salmonella enteritidis* Typhimurium ATCC 14028 ve *Listeria monocytogenes*) üzerine kimyon ve karanfil esansiyel yağları ilavesinin etkinliği araştırılmıştır. Genel olarak tüm patojenler için MİK değerleri 100 ile 750 ppm arasındadır. Sonuçlar, kimyon ve karanfil esansiyel yağları ile bunların fonksiyonel ekstraktlarının 500 ppm'den 750 ppm'e kadar olan konsantrasyonlarda etkili olduğunu göstermiştir. Kimyon esansiyel yağı, 750 µL uygulanmasıyla 3,78 log cfu/g azalma, karanfil esansiyel yağı, 2250 µL uygulamayla 3,78 log cfu/g azalma sağlamıştır. Uçucu yağların ve fonksiyonel ekstraktların kimyasal bileşiminde karanfil yağında öjenol, kimyon yağında küminaldehitin ana bileşenler olduğu belirlenmiştir. Esansiyel yağlar, bakteri hücrelerinin sayısında azalma sağlayarak, et gibi bir gıda matrisinin korunmasında büyük avantaj sağlamaktadırlar (Hernández-Ochoa vd., 2014).

Küminaldehit, bir dizi patojene karşı güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip bir bileşendir. 2022 yılında, narenciye meyvelerinde hasat sonrası yeşil küf oluşumuna neden olan *Penicillium digitatum*'un yabani tip bir suşu (Pds01) ve imazalile dirençli bir suşu (Pdw03) üzerinde büyümeyi önleyici etkisi incelenmiştir. Küminaldehit, MİK değeri 300 ppm ve MFK 600 ppm ile her iki suşun misel büyümesini güçlü bir şekilde inhibe ettiği sonucuna varılmıştır. *P. digitatum* ile inkübe edilen Ponkan meyvesinde yeşil küf oluşumunu önemli ölçüde azalttığı çalışmayla ortaya konulmuştur. Turunçgil meyvelerinde hasat sonrası yeşil küf kontrolü için küminaldehitin potansiyel olarak yeni bir antifungal ilaç molekülü olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Reymick vd., 2022).

Li ve arkadaşlarının 2022 yılında yapmış oldukları çalışmada, küminaldehitin *Staphylococcus aureus* ATCC 6538' e (*S. aureus*) karşı antibakteriyel mekanizmaları, membran hasarı ve genomik DNA ile etkileşimi açısından araştırılmıştır. Sonuçlar, küminaldehitin *S. aureus*' a karşı MİK' sinin 800 ppm olduğunu göstermiştir. Ek olarak çalışmada küminaldehitin hücre morfolojisinde gözle görülür değişikliklere neden olarak hücre zarının geçirgenliğini arttırdığı tespit edilmiştir. Sonuçlar, küminaldehitin DNA' ya bağlanabileceğini ve DNA' nın ikincil yapısını değiştirebileceğini ve hücrelerin etkisizleşmesine yol açabileceğini göstermiştir. Çalışmada soslu sığır eti üzerine küminaldehit (2 veya 4 MİK) uygulanması, *S. aureus* sayılarında belirgin bir düşüşe neden olmuş ve *S. aureus*' un büyümesini önemli bir şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir. Küminaldehit, hücre zarıyla genomik DNA' yı etkileyerek gıda endüstrisinde *S. aureus*' un büyümesini kontrol etmede antibakteriyel etki sağlamıştır (Li vd., 2022b).

Başka bir çalışmada küminaldehitin, yaşlanma, özellikle mekansal öğrenme ve hafıza üzerindeki etkilerini değerlendirebilmek için fareler üzerinde bir araştırma yapılmıştır. Küminaldehitin deksametazona karşı nöroprotektif etkisini analiz etmek amacıyla hücreler üzerinde Morris su labirenti kullanılarak in vitro bir çalışma tasarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, deksametazonun neden olduğu nöronal toksisiteye karşı küminaldehitin nöroprotektif etkisini göstermiştir. Ayrıca, küminaldehitin fareler tarafından oral olarak alınması, labirent testinde öğrenme ve hafızanın arttığını göstermektedir. Bulgular, küminaldehitin, nörotrofik faktörleri kodlayan genlerin ve/veya sinir devrelerinin dengesizliğinde ve sinaptik plastisite bozukluklarında rol oynayan genlerin modülasyonu yoluyla uzaysal öğrenme ve hafıza geliştirme potansiyeline sahip olduğuna dair ilk kanıtı sunmuştur. Bu nedenle günlük kimyon esansiyel yağı alımının bilişsel işlevin makul düzeyde iyileşmesine katkıda bulunabileceği çalışmayla anlaşılmış olup küminaldehitin yaşlılar için amnezi ve hafıza bozukluklarına karşı umut verici bir ilaç olabileceği sonucuna varılmıştır (Omari vd., 2021).

Cuminum cyminum tohumlarında en bol bulunan bileşen küminaldehittir. Bir çalışmada, küminaldehitin anti-biyofilm etkisi ve olası etki mekanizması *Staphylococcus aureus* üzerinde araştırılmıştır. Deneyler, küminaldehitin, biyofilmin yapışmasını sınırlayıp biyokütlesini azalttığını ve yapışkan yapısını tahrip ettiğini

göstermiştir. Aynı zamanda küminaldehit ile tedavi edilen yapışık hücrelerin metabolik aktivitesinin de azaldığını kanıtlamıştır. Ek olarak *S. aureus*' un hücre hareketliliğinin, hücre yüzeyi hidrofobikliğinin ve hücre dışı polimer üretiminin de küminaldehit varlığında inhibe edildiği de anlaşılmıştır. Çalışma, gıda yüzeyinde *S. aureus* enfeksiyonu olasılığını azaltmada potansiyel bir anti-biyofilm ajan olarak küminaldehitin uygulama değerini ortaya koymuştur (Li vd., 2023a).

De ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, kimyonda (*Cuminum cyminum*) bulunan antimikrobiyal bileşenler belirlenmiş olup *C. cyminum*' dan izole edilen küminaldehidin antimikrobiyal aktivitesinin varlığı incelenmiştir. Çalışma bulguları MIC değeri 60'ın altında olan tüm bakteri, mantar ve mayalara karşı Küminaldehit etkisinin oldukça fazla ve özellikle bu etkinin *B. Subtilis*, *Trichophyton rubrum*, *A. tumefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas oleovorans*, *S. Cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*' ye karşı olduğunu göstermiştir. *E. coli* bakterisine karşı küminaldehitin MİK değeri 42 ppm bulunmuştur (De vd., 2003).

Gıdaların *Aspergillus flavus* ile kontamine olması, insan ve hayvan sağlığı açısından büyük bir tehdit oluşturmakta ve ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Birçok yemekte çeşni ve aroma veren kimyonun, Xu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *A. flavus* kontaminasyonunu önlemede büyük bir potansiyele sahip olduğu kanıtlanmıştır. Kimyon esansiyel yağı (CEO) kullanılarak, 9 aya varan depolama süresi boyunca fıstıklarda *A. flavus* kontaminasyonunun oluşması engellenmiştir. Ayrıca küminaldehitin, hem *A. flavus*' un hem de aflatoksin B1 biyosentezinin büyümesine karşı önleyici aktivite sergilediği ve CEO' daki baskın bileşen olduğu kanıtlanmıştır. Sonuçlar, küminaldehitin konidial büyümeye karşı minimum inhibitör konsantrasyonunun (MİK) 640 ppm olduğunu ve 800 ppm küminaldehite maruz bırakılan misellerin aflatoksin B1 üretimini kontrole kıyasla %99' dan fazla azalttığını göstermiştir. Çalışmada, CEO' daki küminaldehitin yer fıstığında *A. flavus*' un kolonizasyonunu ve toksisitesini azaltmada yüksek potansiyele (MİK, 640 ppm) sahip olduğu anlaşılmış ve küminaldehitin *A. flavus* kontaminasyonunun önlenmesinde potansiyel bir ajan olarak kullanılabileceği kanısına varılmıştır (Xu vd., 2021).

2010 yılında yapılan çalışmada, kimyonun antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik aktiviteleri karakterize edilmek için incelenmiştir. *E. coli*, *S. aureus* ve *S. faecalis* yağ seyreltilerine karşı duyarlı bulunmuştur. Kimyon yağına maruz kaldığında tam ölüm

süresi *E. coli*, *S. aureus* ve *S. faecalis* için sırasıyla 30, 90 ve 120 dakika olmuştur. İncelenen yağlara karşı en hassas, olarak *E. coli* ve en az duyarlı mikroorganizmanın *S. faecalis*' in olduğu sonucuna varılmıştır (Allahghadri vd., 2010).

Yapılan başka bir çalışmada *Cuminum cyminum* (kimyon) uçucu yağının, ana bileşenlerinin küminaldehit (%27,10), betapinen (%25,04) ve gamma-terpinen (%15,68) olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada esansiyel yağın, *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* ve *S. Typhi* üzerinde antibakteriyel aktivite sergilediği anlaşılmıştır. Esansiyel yağ, tetrasikline benzer bir inhibisyon bölgesi ile *B. cereus*'a karşı en güçlü antimikrobiyal aktiviteyi göstermiş olup küminaldehitin test edilen tüm bakterileri inhibe eden en aktif bileşik olduğu kanıtlanmıştır. Sonuçlar, *C. cyminum L.*' den ekstrakte edilen uçucu yağın, gıda kaynaklı hastalıkları kontrol etmek için alternatif bir doğal koruyucu olarak uygulanabileceğini göstermektedir. Böylece kimyasal koruyucuların uygulanmasının sağlık açısından oluşturduğu tehlikelerin önüne geçilebileceği çalışmada vurgulanmıştır. Kimyon esansiyel yağının, *Escherichia coli* DMST 4212 üzerinde oluşturduğu zon çapı 10,6-0,2 mm olarak ölçülmüştür (Wongkattiya vd., 2019).

2.6.4 Timol ve Karvakrolün birlikte uygulandığı çalışmalar

Miladi ve arkadaşları, çeşitli aromatik bitkiler tarafından üretilen iki monoterpenik fenol olan timol (THY) ve karvakrolü (CAR), klinik ve gıda kaynaklı patojenlerden oluşan bir panele karşı antibakteriyel ve akış pompası önleyici yetenekleri açısından test etmişlerdir. Sonuç olarak, test edilen bakterilerin THY ve CAR 'a karşı önemli derecede duyarlı olduğu anlaşılmıştır. Özellikle THY, CAR' a kıyasla test edilen suşların çoğuna karşı güçlü bir inhibitör aktivite sergilemiştir. *Escherichia coli* ATCC 35218' ye karşı timol ve karvakrolün MİK değerleri sırasıyla; 128 ve 512 ppm olarak bulunurken MBK (Minimum Bakterisidal Konsantrasyon) değerlerinde de bir değişimin olmadığı görülmüştür. Çalışma ile, THY ve CAR' ın gıda kaynaklı patojenlerde potansiyel akış pompası inhibitörü kaynağı olarak görev yapabileceği anlaşılmıştır (Miladi vd., 2016).

2010 yılında yapılan çalışmada, karvakrol ve timolün çeşitli suşlar/serogruplar ve diğer bakteri türlerine karşı in vitro antimikrobiyal özelliklere sahip olabilme ve iki antimikrobiyalin çeşitli koşullarda *E. coli* O157:H7'yi inhibe edebilme durumu

araştırılmıştır. Bu kapsamda 500 ppm konsantrasyonundaki karvakrolün model bir işkembe sisteminde *E. coli O157:H7*'yi inhibe ettiği ve öldürdüğü gözlemlenmiş, ancak bu konsantrasyonun da işkembe fermantasyonunu olumsuz yönde etkilediği çalışmada tespit edilmiştir. Tüm analizlerde hem karvakrol hem de timol için MİK değeri 2000 ppm olarak bulunmuş ancak, 500 ppm timol ve karvakrol konsantrasyonun kontrollerle karşılaştırıldığında *E. coli O157:H7*'yi önemli ölçüde inhibe ettiği ve 24 saat inkübasyon sonrasında tespit edilemediği sonucuna varılmıştır (Rivas vd., 2010).

1988 yılında yapılan bir çalışmada, büyüme ortamına 50 ila 400 ppm arasında değişen konsantrasyonlarda eklenen sekiz esansiyel yağ bileşeni, 10 yaygın gıda kaynaklı bakteriye karşı etkileri açısından araştırılmıştır. Bakterilerin çeşitli kombinasyonlarda (%2,0 sodyum klorür, %0,05 askorbik asit veya %0,5 sukroz içeren) ve 50 ppm karvakrol veya 100 ppm küminaldehit içeren kültür ortamlarında da çoğaldığı görülmüştür. Çalışmada karvakrol en yüksek anti-bakteriyel aktiviteyi göstermiştir. 200-400 ppm'deki karvakrol ve timol, *Pseudomonas aeruginosa* hariç bazı konsantrasyonlarda inhibitör etki sergilemiştir. Karvakrol veya küminaldehit, sodyum klorür ve askorbik asit ile kombinasyon halinde kullanıldığında ise bazı bakteriler üzerinde arttırılmış bir inhibitör etkinin olduğu kanıtlanmıştır. Buna ek olarak, karvakrol, küminaldehit ve timolün, 100-400 ppm'de çoğu bakterinin büyümesini tamamen inhibe etmiştir (Kivanc ve Akgöl, 1988).

2007' de yapılan çalışmada sinamalaldehit, timol ve karvakrolün tek başına veya kombinasyonlarının *Salmonella Typhimurium*' a karşı antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Sonuçlar, *S. Typhimurium*' un büyümesini önemli ölçüde engelleyen sinamalaldehit, timol ve karvakrolün en düşük konsantrasyonlarının sırasıyla 200, 400 ve 400 ppm olduğunu göstermiştir. Farklı antimikrobiyalleri birleştiren bir sistemde, sinamalaldehit/timol, sinamalaldehit/karvakrol ve timol/karvakrol ile yapılan işlemler, *S. Typhimurium*' un önemli ölçüde daha az popülasyonunu ortaya çıkardı ve tek başına sinamalaldehit, timol veya karvakrol ile tedavi edilen numunelerle karşılaştırıldığında sinerjik etki gözlemlendi. Bu sinerjik kombinasyonların, yumurta, kümes hayvanları, süt ürünleri, et ve ürünleri gibi *S. Typhimurium* tarafından kolaylıkla kontamine olan tüm gıdalar için kullanılabileceği ve kimyasal koruyucular yerine bu doğal

kombinasyonların kullanılmasıyla zararlı etkilerin önlenebileceği anlaşılmıştır (Zhou vd., 2007).

Bir çalışmada, *Thymus capitatus*' un iki ana bileşeni olan timol ve karvakrolün antibakteriyel aktivitesi dört bakteri suşuna karşı test edilmiş olup tüm bakteri türlerine karşı antibakteriyel aktivite spektrumu gösterdiği anlaşılmıştır. Timol fraksiyonunun karvakrolden daha güçlü antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Timol fraksiyonu 5 – 8 ppm arasında değişen MİK değerleri sergilerken, karvakrol fraksiyonu 7 – 8 ppm arasında MİK değerleri sergilemiştir. Çalışma ile, *Thymus capitatus*' un aktif bileşenleri olan timol ve karvakrolün, termal yaralanma hastalarında enfeksiyonlara neden olan *Pseudomonas aeruginos* suşuna karşı etkili bir alternatif tedavi potansiyeline sahip olduğu kanıtlanmıştır. *E. coli*' nin zon çapı, timol uygulamasında 19 mm ve karvakrol uygulamasında ise 18 mm olarak ölçülmüştür (Althunibat vd., 2016).

Hava ve vakum paketlenme altında 21 gün boyunca 4 °C'de saklanan marine edilmiş taze tavuk etine %0,4 ve %0,8 oranında eklenen karvakrol ve timolün antimikrobiyal etkisi Karam ve arkadaşları tarafından incelenmiştir. Verilere göre marine edilmiş tavuk örneklerinde *Pseudomonas spp.* ve *B. thermosphacta* en baskın mikrobiyotayı oluşturmaktaydı. Ek olarak çalışmada, aktif EO bileşenlerinin kullanımı, özellikle de vakum paketlenme ile kombinasyon halinde daha yüksek konsantrasyon, bozulmaya neden olan mikrobiyotanın büyümesini geciktirmiş ve yaklaşık 2,9-3,1 log kob/g oranında önemli bir azalmaya neden olmuştur. Marine edilmiş tavuğa eklenen kekik ve kekik EO' larının aktif bileşenlerinin, etkili bir antimikrobiyal özellik sunduğu tespit edilmiştir (Karam vd., 2019).

Bir çalışmada, kekikten elde edilen esansiyel yağların birincil aktif bileşenleri olan karvakrol ve timol içeren kırmızı şarap formülasyonları gıda kaynaklı bakterilere karşı (*Escherichia coli* O157:H7 ve *Salmonella enterica*) inhibe edici olarak değerlendirilmiştir. Etleri yumuşatmak için şarap ile marine etme tekniği kullanılmakta ve şaraplar gıda uyumlu antimikrobiyallerdir. Tek başına kırmızı şarapla yapılan tedavi *Salmonella*'ya karşı orta derecede etkiliyken, *E. coli*' ye karşı hiçbir etki göstermemiştir. Ancak şaraba uçucu yağın eklenmesiyle bakteriler üzerinde güçlü bir antimikrobiyal etki sağladığı görülmüştür. Bu çalışmayla kırmızı şaraptaki esansiyel yağların gıdalarda etkili bir antimikrobiyal olduğu anlaşılmıştır (Friedman vd., 2017).

Hayvancılık atıklarının, tamamlanmamış anoksik fermantasyonu rahatsız edici koku emisyonlarına neden olmaktadır. Bu nedenle antimikrobiyal katkı maddeleri koku emisyonlarının ve patojenlerin kontrolünde faydalı olabilmektedir. Varel 'in 2002 yılında yapmış olduğu çalışmada, 2516 ppm' de doğal antimikrobiyal bileşik olan, karvakrol ve timol, rahatsız edici koku bileşiklerini, izobütirat, valerat, izovalerat ve kresol üretimini tamamen inhibe etmiş, diğer kısa zincirli uçucu yağ asitlerini ve domuzlardan kaynaklanan gaz emisyonlarını önemli ölçüde azaltmıştır. Sonuçlar, bitki kaynaklı yağlar olan karvakrol ve timolün (2516 ppm) depolanan domuz atıklarının mikrobiyal fermantasyonunu engellemek için kullanılabileceğini göstermiştir (Varel, 2002).

Bir çalışmada, şarap bozulmasına neden olduğu bilinen doğal maya florasına karşı karvakrol ve timolün antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Karvakrol ve timol, şarap koruyucusu olan potasyum metabisülfite kıyasla daha iyi antifungal aktivite sergilemiştir. Kırmızı şaraba karvakrol ve timol (64 ppm) eklenmesi, bozulmaya neden olan mayaların büyümesini engellemiştir. Karvakrol ve timolün antimikrobiyal etkinliğini membran hasarı, sitoplazmik içeriğin sızması ve ergosterol tükenmesi yoluyla yaptığı anlaşılmıştır. Karvakrol ve timolün, şarapta potansiyel doğal koruyucu olarak kullanılabileceği yönünde umut vaat ettiği yapılan çalışmayla kanıtlanmıştır. Karvakrol ve timol, şarap fermantasyonu için aşı olarak kullanılan *S. cerevisiae* türü (MİK 256 ppm) hariç, test edilen tüm türlere karşı pH 3,5'te daha iyi antifungal aktivite (16-128 ppm) sergilemiştir (Chavan ve Tupe, 2014).

Clostridium perfringens enfeksiyonu, kanatlı hayvan üretiminde ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu nedenle yapılan bir çalışmada, *C. perfringens* ile enfekte olmuş etlik piliçlerde esansiyel yağ (aktif bileşen olarak % 25 timol ve % 25 karvakrol içeren EO) ilavesinin büyüme performansı, bağırsak morfolojisi ve bağışıklık tepkileri üzerindeki koruyucu etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak *C. perfringens* ile mücadele edilen etlik piliçlerde, 60, 120 ve 240 ppm EO takviyesinin bağırsak lezyonlarını hafiflettiği, bağırsak histomorfolojisini iyileştirdiği, inflamatuvar yanıtı azalttığı ve spesifik immün yanıtı arttırdığı tespit edilmiştir. Sonuçlar, etlik piliçleri *C. perfringens* enfeksiyonuna karşı korumak için optimum takviye dozunun, 240 ppm EO olduğunu göstermiştir (Du vd., 2016).

Yapılan bir çalışmada selülozik pedlerin kıyma etindeki mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Selülozik pedler genellikle et paketleme tepsilerinin altındaki sıvıyı emmek için kullanılmaktadırlar. EO' ların (tarçın ve kekik) bu pedlere eklenmesiyle mikroorganizma gelişimleri incelenmiştir. Tarçın ve kekik esansiyel yağları içeren emülsiyonlarla değiştirilmiş selülozik pedler, kıymanın psikrofilik mikrobiyotasına karşı antimikrobiyal aktivite sergilemiş olup farklı oranlarda karvakrol, timol, linalool içeren emülsiyonun, *S. enterica* ve *P. putida* büyümesini azalttığı görülmüştür. Tarçın ve kekik emülsiyonları, mikroorganizmaların büyümesini %0,5' lik bir konsantrasyonda inhibe ederken, kekik emülsiyonu, %0,75'lik bir konsantrasyonda büyümeyi engellemiştir. Sonuç olarak EO' lu pedlerin mevcudiyetinde paketlenmiş etlerde mikrobiyal yük azalmış, raf ömrü artmıştır (Agrimonti vd., 2019).

Yapılan bir çalışmada, timol ve karvakrolün kangal balıkları üzerinde oluşturdukları anestezi etkileri araştırılmıştır. Beş farklı timol konsantrasyonları ve ek olarak karvakrol konsantrasyonuna ait değerler oluşturulmuştur. Her iki anestezi maddeye ait konsantrasyon değerleri kangal balıkları üzerindeki bayılma ve ayılma süreleri üzerine etkilerine bakılmıştır. Sonuç olarak kangal balıklarındaki anestezi olarak konsantrasyon değerlerinin timol için 50 ppm ve karvakrolde ise bu değerin 50 ppm olduğu anlaşılmıştır (Orhan, 2020).

Yapılan bir çalışmada, karvakrol ve timol içeren mikrokapsül kaplamalı plastik esnek filmlerin antimikrobiyal özellikleri araştırılmıştır. Karvakrol ve timolün miselyum büyümesine karşı güçlü birer inhibitör oldukları ancak küf sporlarının çimlenmesine karşı etkili olmadığı bulunmuştur. Mikrokapsüllenmiş antimikrobiyal ajanlarının konsantrasyonu, %10 timol ve %10 karvakrolde mikroorganizmalar için 4,3-11,3 mm'lik inhibisyon bölgeleri aralığı göstermiştir. Timol ve karvakrolün, test edilen tüm mikroorganizmalara karşı AM aktivite sergilediği görülmüştür. Taze gıdaların korunması için bir polimer matris içinde mikrokapsüllenmiş timol ve karvakrolün kullanılmasının önemi bu çalışma ile vurgulanmıştır. Timol ve karvakrolün *E. coli* üzerinde oluşturdukları MİK değerleri sırasıyla 250 ve 375 ppm olarak tespit edilmiştir (Guarda vd., 2011).

Timol, karvakrol ve timol/karvakrol lipozomlarının, antimikrobiyal aktivitesi 2017 yılında, her biri *Staphylococcus aureus* veya *Salmonella enterica*'nın dört suşundan

oluşan iki bakteri havuzuna karşı değerlendirilmiştir. *S. aureus* havuzuna karşı timol, karvakrol ve lipozomlarının minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) 662 ppm iken, *Salmonella* havuzu için MİK değerleri; timol ve karvakrol için 331 ppm ve TCL için 662 ppm olarak tespit edilmiştir. Çalışma, timol, karvakrol ve timol/karvakrol lipozomlarının, *S. aureus* ve *Salmonella* bakteri havuzlarına karşı antimikrobiyal aktivitesinin olduğunu göstermiştir (Engel vd., 2017).

Bir çalışmada, timol ve karvakrolün *Botrytis Cinerea*'ya karşı antifungal aktivitesi ve potansiyel mekanizması araştırılmıştır. *B. Cinerea*, hasat öncesi ve sonrası dönemde gövde ve meyve çürüklüğüne neden olan birincil bir patojendir. Sonuçlar, timol ve karvakrolün hedeflenen patojene karşı timol için 65 ppm ve 100 ppm ve karvakrol için 120 ppm ve 140 ppm'lik minimum inhibitör konsantrasyon ve minimum fungisidal konsantrasyonla güçlü antifungal aktivite sergilediğini göstermiştir. Timol ve karvakrol, miselleri bozarak *B. cinerea*'nın morfolojisini açıkça değiştirmiştir. Mevcut sonuçlar timol ve karvakrolün bahçecilik ürünlerinde gri küf kontrolünde *B. Cinerea*'ya karşı geleneksel fungusitlere iyi bir alternatif olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Zhang vd., 2019).

Yapılan bir çalışmada, karvakrol ve timolün *E. coli*'ye karşı antibakteriyel mekanizması araştırılmıştır. İki bileşenin membran geçirgenliği ve membran potansiyeli üzerindeki etkisini belirlemek için akış sitometrisi ve flüoresan boyalar kullanılmıştır. Zar geçirgenliği deneyinde, karvakrol veya timol ile tedavi edilen hücrelerin ortalama floresan yoğunluğu, maruz kalmayan hücrelerden daha düşük bulunmuştur. Canlı hücrelerin sayısı, iki bileşenin artan konsantrasyonu ile kademeli olarak azalmış ve ilk 6 saatte karvakrol ve timol, canlı hücre sayısında tespit edilemeyecek keskin bir düşüşe neden olmuştur. Sonuç olarak karvakrol ve timolün (200 ppm) *E. coli* üzerinde istenilen antimikrobiyal etkiyi sağladığı anlaşılmıştır (Xu vd., 2008).

Yapılan bir çalışmada beş esansiyel yağın (EO) toksik olmayan bir *Escherichia coli* O157:H7 suşunda, emülgatör varlığında ve yokluğunda üç farklı sıcaklıkta antibakteriyel özellikleri araştırılmıştır. Kekik (*Origanum vulgare*) ve kekik EO (*Thymus vulgaris*; açık ve kırmızı çeşitler) en güçlü bakteriyostatik ve bakterisidal özellikler göstermiş ve bunu defne (*Pimenta racemosa*) ardından da karanfil tomurcuğu EO takip etmiştir. Sonuçlar kekik ve kekik EO'nın geniş bir sıcaklık

aralığında önemli ölçüde in vitro kolisidal ve kolistatik özelliklere sahip olduğunu göstermiş dolayısıyla karvakrol ve timolün (kekik EO' nun ana bileşenleri) bakteriyel hücre zarlarını geçirgen hale getirdiği doğrulanmıştır (Burt ve Reinders, 2003).

Yapılan bir çalışmada, narenciye özleri, [*Citrus medica*, limon (*Citrus limon*), calamansi (*Citrus microcarpa*)] ile esansiyel yağ bileşenlerinin (EOC) (karvakrol ve timol) aside uyum sağlamayan ve aside uyum sağlamış hedef mikroorganizmalara karşı antibakteriyel etkileri incelemiştir. *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes* üzerlerinde tek başına narenciye özlerinin veya EOC' nin bakterileri etkisiz hale getiremediği görülmüştür. Bununla birlikte, kombine tedaviler belirgin bir sinerji sergilemiş ve narenciye özleri+EOC' ler tüm bakterileri elimine etmişlerdir. Test edilen narenciye özleri arasında en yüksek sinerjiyi, egzotik bir narenciye olan calamansi göstermiş ve calamansi (<%20) + EOC' ler (<%0,032) en dirençli patojeni (*E. coli* O157:H7) bile tamamen inaktive etmiştir. Egzotik narenciye meyvesinin yüksek bir antibakteriyel madde olduğu çalışmayla anlaşılmıştır (Chung vd., 2018).

Bir çalışmada, kekik esansiyel yağı, karvakrol ve timolün biyofilmde yetiştirilen *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* suşları üzerindeki aktivitesinin yanı sıra yağların biyofilm oluşumu üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Test edilen *S. aureus* ve *S. epidermidis* suşlarının çoğu için, biyofilm inhibe edici konsantrasyon (kekik için 125 ppm–500 ppm, karvakrol ve timol için 310 ppm –125 ppm)) ve biyofilm yok etme konsantrasyonu değerleri, planktonik büyümeyi engellemek için gereken konsantrasyondan iki veya dört kat daha fazla bulunmuştur. Sonuç olarak yağların inhibitör altı konsantrasyonlarının, polistiren plakalar üzerinde *S. aureus* ve *S. epidermidis* suşlarının biyofilm oluşumunu zayıflattığı görülmüştür (Nostro vd., 2007).

Burt ve arkadaşları, sığır dışkısından izole edilen bir *E. coli* O157: H7 suşuna karşı hem karvakrol hem de timol üzerine stabilizatör eklenmesinin etkinliğini araştırmışlardır. Karvakrol ve timolün, bir dengeleyici ile veya bir etanol solüsyonu içinde kullanıldığında, sıvı gıdalarda *E. coli* O157:H7'nin büyümesini önlemede veya sayısını azaltmada etkili olduğu görülmüştür. Stabilizatör içeren et suyu kullanımı, karvakrolün etkisini önemli ölçüde iyileştirmiş ve böylece nihai popülasyon yoğunluğunda bir azalma sağlanmıştır. Çalışmada, karvakrol ve timolün kekik ve

kekik EO' larının *E. coli O157:H7* üzerinde aditif bir antibakteriyel etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, çözücü olarak etanol kullanımının uygun olmadığı ve organoleptik nedenlerle daha düşük konsantrasyonların istendiği durumlarda stabilizatörlerin eklenmesi, sıvı gıdalardaki karvakrol ve timolün performansını artırmaktadır. Karvakrol ve timolün *E. coli O157: H7* üzerine MİK değerleri aynı olup 180,27 ppm bulunmuş ve MBK değerleri ise sırasıyla 210,3 ppm ve 180,27 ppm olarak tespit edilmiştir (Burt vd., 2005).

2011 yılında, *Listeria innocua* inaktivasyonunda 3 doğal ajanın (karvakrol, timol ve öjenol) ikili ve üçlü karışımlarının yanı sıra bakterisidal etkisi değerlendirilmiştir. Bu ajanların minimum bakterisidal konsantrasyonları belirlenmiş ve ardından ikili ve üçlü karışımlarına bakılmıştır. Kültür ortamları *L. innocua* ile aşılansmış ardından 72 saat 35 °C'de inkübe edilmiştir. En etkili bireysel antimikrobiyal ajan karvakrol bulunmuş ve bunu sırasıyla timol ve öjenol takip etmiştir. En etkili ikili karışımın 75 ppm karvakrol ve 62,5 ppm timol olduğu görülmüştür. Ayrıca, sırasıyla 75, 31,25 ve 56,25 ppm konsantrasyonlarındaki üçlü karvakrol-timol-öjenol karışımı, *L. innocua* inaktivasyonu için en etkili karışımdır. Antimikrobiyal ajanların sinerjistik kombinasyonlarının, çoğu mikrobiyal büyümeyi etkisiz hale getirmeye yardımcı olduğu anlaşılmıştır (García-García vd., 2011).

Timol, karvakrol ve kekik yağının *Salmonella'* ya karşı üzüm domateslerdeki antimikrobiyal aktiviteleri, Lu ve Wu tarafından belirlenmiştir. *Salmonella enterica* serovarları domates endüstrisi için önemlidir. Aşılansmış asma domatesler % 4 etanol, 200 ppm klor veya bu oranın altındaki yıkama solüsyonundan biriyle 5 veya 10 dakika süreyle yıkanmıştır. Timolün 0,4 mg/ml konsantrasyonda, *S. enterica serovars Typhimurium, Kentucky, Senftenberg ve Enteritidis'* te 4,1 log azalma sağlayan üç doğal antimikrobiyal ajan arasında en etkili olduğu anlaşılmıştır. Antimikrobiyal solüsyon olarak kullanılan timol, kekik yağı ve karvakrol domateslerin renk ve pH değerini etkilememiştir. Timol kullanımıyla kontrole kıyasla *S. enterica* popülasyonlarında 4,6 log oranında azalma olmuş ve patojenlerin domateslerden yıkama solüsyonlarına potansiyel bulaşma riski engellenmiştir. Çalışmayla, 400 ppm timolün, taze sebze ürünleri için mevcut klor bazlı olan yıkama solüsyonlarına alternatif olduğu sonucuna varılmıştır (Lu ve Wu, 2010).

Başka bir çalışmada, Lamiaceae bitki ailesinin uçucu yağlarının ana bileşenleri olan karvakrol ve timol, farklı kökenlerden (klinik, et, süt) *Staphylococcus aureus* suşuna karşı antimikrobiyal etkilerini belirlemek için değerlendirilmiştir. *S. aureus* suşlarının %42'sine karşı karvakrol ve timol arasında hiçbir antimikrobiyal etkileşim gözlenmemiştir. Karvakrol ve timol kombinasyonları, test edilen suşların %60 'ı için bakterisidal olmuştur. Sonuçlar, *S. aureus*' u kontrol etmek, organoleptik özellikleri korumak ve raf ömrünü uzatmak için gıdalarda bu kombinasyonun uygulanmasının doğru olduğunu göstermiştir (Rúa vd., 2019).

Kanatlı eti, yüksek konsantrasyonda çoklu doymamış yağ asitleri nedeniyle oksidatif bozulmaya yatkındır. Luna ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, timol ve onun izomeri karvakrolün yeme eklendiğinde lipit oksidasyonu üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak antioksidan bütillenmiş hidroksitoluen takviyesi kullanılmış ve 150 mg/kg bütillenmiş hidroksitoluen (pozitif kontrol), 150 ppm timol veya 150 ppm karvakrol eklenmiştir. Göğüs ve uyluk örnekleri 4°C depolamanın 0, 5 ve 10. günlerinde alınmış ve yem takviyesinin göğüs numunesinin oksidasyonunu önemli ölçüde etkilemediği anlaşılmıştır. Bununla birlikte, 5 ve 10 günlük depolamadan sonra, kontrol grubunun uyluk örneklerinde, takviye edilen 3 grupta karşılaştırıldığında giderek daha yüksek TBARS (Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler) değerleri algılanmış ve ilginç bir şekilde, yemle desteklenen gruplar arasında düşük TBARS değerlerinin tespit edildiği görülmüştür. Bu nedenle doğal antioksidanlar olan timol veya karvakrolün uygulanması kanatlı eti kalitesinin iyileştirilmesinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Luna vd., 2010).

Alfonso ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptığı çalışmada timol, karvakrol ve her iki saf esansiyel yağın karışımının *Penicillium digitalatum* ve *Penicillium italicum*'a karşı antifungal etkinliği araştırılmıştır. Sonuçlar, tüm in vitro testlerde her iki esansiyel yağın da mantar gelişimini engellemede etkili olduğunu göstermiştir. En iyi sonuçlar timol ile elde edilmiş ve 250 ppm konsantrasyonu ile limon yüzeylerinde *P.digitalatum*' un gelişimini tamamen engellediği tespit edilmiştir. Ek olarak, *P.digitalatum* ile aşılınmış limonlara timol ve karvakrol içeren balmumunun uygulanması (10, 25, 50, 100, 250 ve 500 ppm karvakrol), konsantrasyona bağlı bir şekilde çürümenin, solunum hızının, etilen üretiminin ve toplam asitliğin azalmasını sağlamıştır. Çalışmayla narenciye paketlenme hatlarında bu uçucu yağların balmumu ile uygulanması, sentetik

fungisitlerin kullanımını azaltmak için iyi bir alternatif olabileceği anlaşılmıştır (Pérez-Alfonso vd., 2012).

Ahmad ve arkadaşları, timol ve karvakrolü dirençli 111 *Candida* izolatına karşı incelemiştir. (*C. tropikalis*, *C. Krusei*, *C. albicans*, *C. Parapsilosis* ve *C. glabrata* izolatları idrar yolu enfeksiyonlu vakalardan elde edilmiştir.) Her iki bileşiğin tüm izolatlara karşı değişen derecelerde etkili olduğu bulunmuş olup aynı zamanda tüm mantarlara karşı da fungisidal etki sergiledikleri anlaşılmıştır. Sonuç olarak, bu çalışma ile, karvakrol ve timolün, geliştirilmiş formülasyonlardan sonra umut verici ilaçlar olarak kullanılabileceği anlaşılmıştır (Ahmad vd., 2011).

Lambert ve arkadaşları, kekik esansiyel yağının (OEO) ve onun iki temel bileşeni olan timol ve karvakrolün, *Pseudomonas aeruginos* ile *Staphylococcus aureus*' a karşı MİK sonuçlarını değerlendirmişlerdir. İnhibisyon profillerinin analizi ardından, karvakrol ve timol karışımlarının ilave bir etki sağladığı ve OEO tarafından genel inhibisyonun esas olarak bu ikisinin ilave antimikrobiyal etkisine dayandığı öne sürülmüştür. Bu tür bir inhibisyonun, pH homeostazisini ve inorganik iyonların dengesini etkileyen membran bütünlüğündeki hasardan kaynaklandığı görülmüştür. Bitki ekstraktlarında bulunan karvakrol±timolün kombinasyonları nedeniyle bu tür doğal koruyucuların gıdalarda başarılı bir şekilde uygulanabileceği sonucuna varılmıştır (Lambert vd., 2001).

2015 yılında, timol ve karvakrol bileşenlerinin antibakteriyel aktiviteleri etlik piliçlerdeki *Clostridium perfringens* bakterisi üzerinde test edilmiştir. Timol ve karvakrolün *C. Perfringens* suşlarına karşı güçlü antibakteriyel aktivitesinin olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla timol ve karvakrol takviyesinin, piliçlerde bağırsak mikrobiyotasını etkileyip, bağırsak lezyonunu hafiflettiği çalışma ile saptanmıştır. Bu sayede piliçlerde *C. perfringens* enfeksiyonunun kontrolünde karvakrol ve timol kullanımının büyük öneme sahip olduğu anlaşılmıştır. Timolün *E. coli* için MİK değeri 187,5 ppm ve MBK değeri 375 ppm olarak bulunurken; Karvakrolün *E. coli* için MİK değeri 375 ppm ve MBK değeri 750 ppm olarak tespit edilmiştir (Du vd., 2015).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Materyaller

3.1.1 Doğal antimikrobiyaller

Mevcut çalışmada %98 saflıkta karvakrol, %98,5 saflıkta timol ve %98 saflıkta küminaldehit kullanılmış olup bu antimikrobiyaller Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir. Analizler öncesinde ultrasonik homojenizasyonla 25000 ppm' lik stok emülsiyon çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir antimikrobiyalın stok emülsiyon çözeltilerinin hazırlanış şekli yöntemler kısmında anlatılmaktadır.

3.1.2 Kullanılan mikroorganizmalar

Bu araştırmada, Aksaray Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde bulunan, Gıda Biyoteknoloji Laboratuvarındaki kültür koleksiyonunda yer alan *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanılmıştır.

3.1.3 Çalışmada kullanılan besiyerleri ve çözeltiler

Araştırmada *E. coli* ATCC 25922 mikroorganizmasının canlandırılması ve buzdolabında saklanabilmesi için Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck) besiyeri ve Tryptic Soy Agar (TSA) (Merck) besiyeri kullanılmıştır. Mikroorganizmaların sayılması için Plate Count Agar (PCA) (Merck) besiyeri, bakteri dilüsyonlarının hazırlanmasında serum fizyolojik çözeltileri kullanılmış olup kıyma örneklerinde bulunan mikroorganizmaların sıvı ortama geçmesini sağlamak amacıyla steril edilmiş peptonlu su kullanılmıştır.

Antimikrobiyal stok emülsiyonların hazırlanmasında steril saf su ve emülgatör olarak tween 80 (Polisorbat 80) (Sigma Firması) kullanılmıştır.

3.1.4 Kullanılan kıyma

Çalışmada, kırmızı dana eti olarak sırt bölgesinden elde edilen kıyma (%75 su, %20 protein, %3 yağ, %1 karbonhidrat, %1 mineral madde ve vitamin) kullanılmış olup yerel bir kasaptan kesimden iki gün sonra satın alınmıştır. Bütün blok olarak dört kilogramlık parça halinde alınan dana sırt eti vakit kaybetmeden hızlıca buzdolabına

kaldırılmıştır. Ertesi gün kıyma makinesinde kıyma formuna getirilmiş olup antimikrobiyaller ile karıştırılmak üzere hesaplanan oranlarda analiz için hazırlanmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 *E. coli* ATCC 25922 mikroorganizmasının aktifleştirilmesi

Gliserol içerisinde dondurucuda muhafaza edilen *E. coli* ATCC 25922 suşu olan stok kültürden, 100µl alınarak Tryptic Soy Broth (TSB) (10 mL) besiyeri içerisine inoküle edilmiş ve 37°C’de 24 saat inkübatörde bırakılarak aktifleştirilmiştir. İnkübasyon işlemi sonrasında bu tüplerden Tryptic Soy Agar besiyerine (TSA) sürme yapılarak tek koloni düşmesi sağlanmıştır. Analiz öncesi tek koloniden alınan örnekler TSB içerisinde çoğaltılmıştır.

3.2.2 Antimikrobiyal stok emülsiyon çözeltilerinin hazırlanması

Antimikrobiyallerin stok emülsiyon çözeltileri, 2012 yılında tanımlanmış olan nanoemülsiyon hazırlama yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır (Ghosh vd., 2012). Bu emülsiyonlar su içinde yağ emülsiyonu olarak hazırlanmış olup, antimikrobiyal faz kısmı yağ fazını oluştururken bu yağ fazının iki katı kadar tween 80’in distile steril saf su ile karıştırılmasıyla su fazı oluşmaktadır.

Antimikrobiyallerin kullanılacak olan miktarı, 50 mL’ lik hacimdeki stok emülsiyonda 25000 ppm konsantrasyon sağlayacak şekilde hesaplanmıştır. Su fazında bulunan steril saf suyla antimikrobiyallerin iki katı kadar tween 80 manyetik karıştırıcıda 15 dakika boyunca karıştırılmış olup üzerine antimikrobiyaller hesaplanan miktarlarda eklenerek 15 dakika daha manyetik karıştırıcıda karıştırılmaya devam edilmiştir.

Hazırlanan bu kaba emülsiyon Bandelin Sonopuls marka HD 2200 model (200 W/20 kHz) (Şekil 3.1) ultrasonikasyon cihazında 15 dakika süreyle % 90 güç ve 5 saniyelik pulslarla homojenize edilmiş ve dolayısıyla antimikrobiyallerin tween 80 içerisine enkapsüle edilerek sıvı fazda homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır. Ultrasonikasyon cihazı ile belirlenen sürelerde sonikasyon işlemi yapılmış olan nihai örneklerin (karvakrol ve timol stok emülsiyonları) parçacık boyutu ve zeta potansiyel değerlerinin analizleri, ODTÜ (MERLAB) bünyesinde yapılmıştır.



Şekil 3.1. Bandelin Sonopuls HD 2200 ultrasonikasyon cihazı.

3.2.3 Deney tasarımı

Yanıt Yüzey Yöntemi kullanılarak sistem modellenilebilmekte, sistemin yanıtını etkileyen çok sayıda değişken bir arada ve eşzamanlı olarak incelenebilmekte ve prosesin işlem parametrelerindeki değişime verdiği yanıt en az sayıda deneme yapılarak en iyi şekilde tanımlanabilmektedir (Koç ve Kaymak Ertekin, 2010). Bu nedenle çalışmanın deney tasarımı, 4 faktör için (karvakrol, timol, küminaldehit konsantrasyonları ve depolama günü) Yanıt Yüzeyi Yöntemi Box-Behnken Tasarımı ile 5 merkezi nokta kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel modelleme yazılımı olan Design Expert 13 'de çalışma için uygulanması gereken deney parametreleri (Box-Behnken deneme deseni) Çizelge 3.1' de gösterilmektedir.

Çizelge 3.1. Box-Behnken deneme deseni için parametreler ve seviyeleri.

Bağımsız Değişkenler	Seviye		
	-1	0	+1
A: Karvakrol konsantrasyonu (ppm)	0	1250	2500
B: Timol konsantrasyonu (ppm)	0	1250	2500
C: Küminaldehit konsantrasyonu (ppm)	0	1250	2500
D: Gün	1	15	29

3.2.4 Antimikrobiyallerin çiğ kıyma üzerindeki *E. coli* ATCC 25922' ye karşı etkisi

Çiğ kıyma örneklerine eklenmiş *E. coli* ATCC 25922 bakteri suşlarının üzerine karvakrol, timol ve küminaldehitin tek tek etkilerinin yanı sıra etin raf ömrü üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Toplam 29 analiz noktasıyla deney tasarımı Çizelge 3.2' deki gibi oluşmuştur. Çiğ kıyma örneklerinin karışım oranları ise Çizelge 3.3 'te verilmiştir.

Çizelge 3.2. Deney tasarımı.

Deney	Antimikrobiyal Konsantrasyonu [ppm (v/v)]			Gün
	Karvakrol	Timol	Küminaldehit	
1	1250	1250	2500	1
2	1250	0	1250	1
3	0	1250	1250	1
4	1250	2500	1250	1
5	2500	1250	1250	1
6	1250	1250	0	1
7	0	0	1250	15
8	1250	1250	1250	15
9	1250	1250	1250	15
10	1250	0	2500	15
11	2500	0	1250	15
12	1250	2500	2500	15
13	2500	1250	0	15
14	0	1250	2500	15
15	1250	1250	1250	15
16	1250	1250	1250	15
17	2500	2500	1250	15
18	2500	1250	2500	15
19	0	1250	0	15
20	1250	0	0	15
21	1250	1250	1250	15
22	1250	2500	0	15
23	0	2500	1250	15
24	1250	1250	0	29
25	2500	1250	1250	29
26	0	1250	1250	29
27	1250	2500	1250	29
28	1250	1250	2500	29
29	1250	0	1250	29

Çizelge 3.3. Çiğ kıyma örneklerinin karışım oranları.

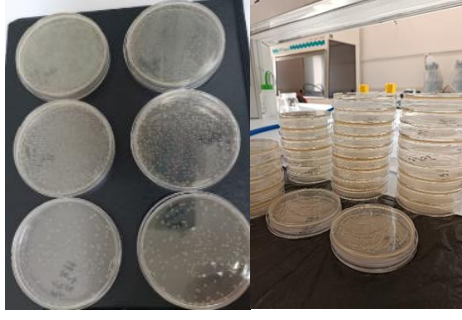
Örnek Adı	Çiğ Kıyma(g)	<i>E coli</i> 24 h Kültür (mL)	Karvakrol 25000 ppm Stok (mL)	Timol 25000 ppm Stok (mL)	Küminaldehit 25000 ppm Stok (mL)	Steril Su (mL)
6	19,5	3	1,5	1,5	3	1,5
21	19,5	3	1,5	0	1,5	4,5
9	19,5	3	0	1,5	1,5	4,5
22	19,5	3	1,5	3	1,5	1,5
10	19,5	3	3	1,5	1,5	1,5
5	19,5	3	1,5	1,5	0	4,5
1	19,5	3	0	0	1,5	6
27	19,5	3	1,5	1,5	1,5	3
26	19,5	3	1,5	1,5	1,5	3
15	19,5	3	1,5	0	3	3
2	19,5	3	3	0	1,5	3
16	19,5	3	1,5	3	3	0
18	19,5	3	3	1,5	0	3
19	19,5	3	0	1,5	3	3
28	19,5	3	1,5	1,5	1,5	3
25	19,5	3	1,5	1,5	1,5	3
4	19,5	3	3	3	1,5	0
20	19,5	3	3	1,5	3	0
17	19,5	3	0	1,5	0	6
13	19,5	3	1,5	0	0	6
29	19,5	3	1,5	1,5	1,5	3
14	19,5	3	1,5	3	0	3
3	19,5	3	0	3	1,5	3
7	19,5	3	1,5	1,5	0	4,5
12	19,5	3	3	1,5	1,5	1,5
11	19,5	3	0	1,5	1,5	4,5
24	19,5	3	1,5	3	1,5	1,5
8	19,5	3	1,5	1,5	3	1,5
23	19,5	3	1,5	0	1,5	4,5

Bu amaçla tween 80 ile ultrasonikasyon yöntemi kullanılarak enkapsüle edilmiş antimikrobiyaller, *E. coli* ATCC 25922 ile kontamine edilmiş ete ön çalışmalarla belirlenen doz aralığında eklenmiştir. Yeni kesilmiş kırmızı et, çapraz kontaminasyona uğramadığı müddetçe steril olduğu kabul edilmektedir. Kasaptan alınmış parça halindeki çiğ kırmızı dana etinin dış yüzey kısımları önceden %80' lik alkolle steril edilmiş bıçak yardımıyla aseptik koşullar altında temizlenmiş ve yine parçaları 90°C'de 1 saat Pasteur Fırını' nda steril edilmiş olan kıyma makinesi (Arnica Promeat 2000 W) ile kıyma formuna getirilmiştir. Bu çiğ kıyma örneğinden de analizlere başlamadan önce PCA besi yerine bir ile on arası dilüsyonlardan yayma yöntemiyle sayım için ekim yapılmıştır. 37°C'de önce 24 saat daha sonra tekrar 24 saat olarak toplamda 48 saatlik inkübasyon sonunda sayılabilir bir üremenin olmadığı tespit edilmiştir.

29 örnek için iki paralelli deney planı düzenlenmiştir. Çiğ kıyma örneklerine eklenen antimikrobiyallerin konsantrasyonları Çizelge 3.2' de verildiği gibi olup, Tryptic Soy Broth içerisinde canlı sayısı $1,17 \times 10^8$ olan *E. coli* kültüründen 1/10 seyreltme ile örnekler eklenmiş, örneklerdeki ilk mikrobiyal yükün 10^7 düzeyinde olması sağlanmıştır. Örnekler toplam 30 g olarak hazırlanmış ve stomacher poşetlerin içerisine antimikrobiyaller, steril saf sular ve *E. coli* kültürü Çizelge 3.3' de verilen oranlarda eklenerek tekrar Stomacher Cihazı'nda (Wiggins Hg 400VW) iki dakika boyunca karıştırılmaya devam edilmiştir. Stomacher poşetler analiz yapılacağı günler için (1., 15. ve 29. gün) tek tek ayrılarak buzdolabında (+4 °C) depolanmaya bırakılmıştır.

3.2.5 Bakteri sayımı

Zamana karşı canlı mikroorganizma sayısındaki değişimi incelemek için Desighn Expert Yanıt Yüzey Yöntemi Box Bhengen tasarımına göre hesaplanan 1., 15. ve 29. günlerde uygun örneklerden stomacher poşetlere 10' ar gram alınmış, üzerlerine 90 mL steril peptonlu su eklenerek iki dakika boyunca Stomacher Cihazı' nda karıştırılmıştır. Serum fizyolojik içerisinde seri dilüsyonlar hazırlanarak Plate Count Agar (PCA) genel besiyerine aktarılıp yayma kültürel sayım yöntemiyle ekim yapılmış ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda koloni sayımı gerçekleştirilmiştir (Şekil 3. 2).



Şekil 3.2. *E. coli* bakterisinin koloni sayımı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

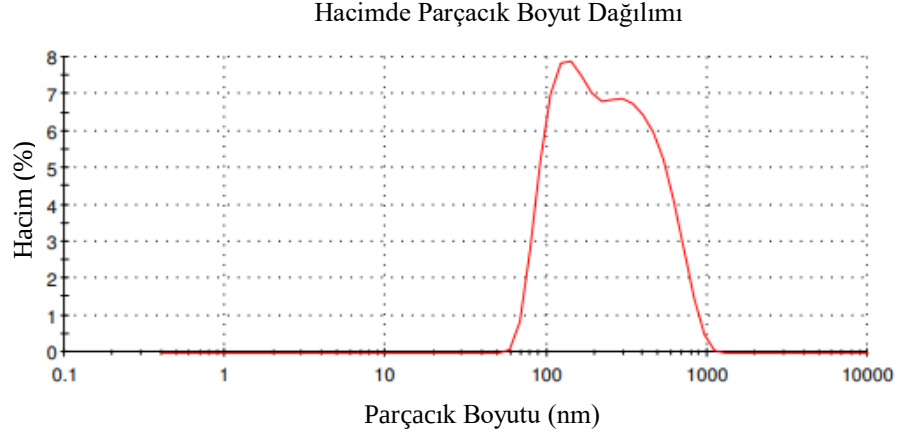
4.1 Nanoemülsiyonun Parçacık Boyut Değerleri

Gıda endüstrisinde enkapsülasyon teknikleri hassas bileşenlerin çevresel faktörlere karşı korunması, kontrollü salınımı, biyoaktif özelliklerinin artırılması ve tat ve kokusunun maskelenmesi amacıyla uygulanmaktadır. Elde edilen enkapsüle maddelerin boyutunun 1 µm altında olması halinde nanokapsüller elde edilmektedir. Nanokapsül üretimi için birçok yöntem bulunmakta ve bu yöntemler lipid formülasyon bazlı nanoenkapsülasyon teknolojileri, doğal nanotaşıyıcı bazlı nanoenkapsülasyon teknolojileri, özel ekipman bazlı nanoenkapsülasyon teknolojileri, biyopolimer nanoparçacık bazlı nanoenkapsülasyon teknolojileri ve diğer nanoenkapsülasyon teknolojileri olmak üzere sınıflandırılmaktadır (Tontul, 2019).

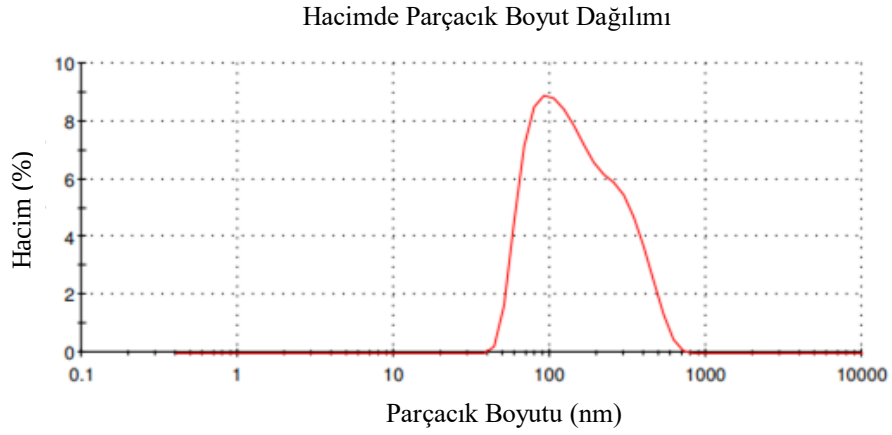
Dağılmış faza sahip su içinde yağ emülsiyonları, biyoaktif yağlar, uçucu yağlar, karotenoidler, tokoferoller gibi hidrofobik materyallerin nanoenkapsülasyonunda kullanılmaktadır. Son yıllarda daha karmaşık çoklu nanoemülsiyonların (su içinde yağ içinde su ve yağ içinde su içinde yağ) geliştirilmesi mümkün olmuştur. Nanoemülsiyonların hazırlanmasında hidrofilik faz, hidrofobik faz ve emülgatör olmak üzere en az 3 farklı materyale ihtiyaç bulunmaktadır. Nanoemülsiyon oluşturmak amacıyla oldukça yüksek basınçlar ve birçok teknik kullanılmaktadır. Bu teknikler genellikle yüksek enerjili teknikler ve düşük enerjili teknikler olarak adlandırılmaktadır (Tontul, 2019).

Mevcut çalışmada, hedef antimikrobiyallerin (karvakrol, timol, küminaldehit) belirlenen oranlarda steril saf su ve tween 80 ile birlikte oluşturduğu su fazında yağ nanoemülsiyonu oluşturma denemeleri, belirlenen sonikasyon süresinden (15 dk) geçirilerek üç faktör ve beş merkezi kompozit deneme deseni kullanılarak yanıt yüzey yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Yüksek enerjili nanoemülsiyon hazırlama tekniklerden olan ultrasonikasyon yöntemi ile belirlenen sürelerde sonikasyon işlemi yapılmış ve nihai örneklerde zeta potansiyel ve parçacık boyutu analizleri ODTÜ (MERLAB) laboratuvarında yapılmıştır.

Analizler sonucunda, nanoemülsiyonların parçacık boyutlarının karvakrol için 235,5 nm (Şekil 4.1) ve timol için ise 188,7 nm (Şekil 4.2) olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. Karvakrol nanoemülsiyonunun parçacık boyutu dağılım grafiği.



Şekil 4.2. Timol nanoemülsiyonunun parçacık boyutu dağılım grafiği.

Sow ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada % 1 (w/w) karvakrol ve %2,5 (w/w) mısır yağından oluşan yağ fazı %3,5 (w/w) içeren bir karvakrol nanoemülsiyonu, %100 amplitüd kullanılarak 10 dakikada ultrasonifikasyon yoluyla üretilmiş ve ortalama parçacık boyutu 309 ± 19 nm olarak belirlenmiş ve bizim oluşturduğumuz nanoemülsiyonun parçacık boyutuyla yakın bulunmuştur (Sow vd., 2017). Bugüne kadar timolün tween 80 ile nano boyutta enkapsüle edildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Literatürde nanoemülsiyon tanımı için parçacık boyutu kesin bir aralık olarak belirtilmemiştir. Bunun sebebinin; farklı emülsiyon hazırlama teknikleri, kullanılan yüzey aktif maddelerin çeşitliliği ve ultrasonik teknikte kullanılan sonikasyon cihazının güç, pulse ayarları gibi farklılıklarından kaynaklı olabileceği anlaşılmaktadır. Dağılmış faz parçacık büyüklüğü on ile birkaç yüz nanometre arasında olan emülsiyonlar nanoemülsiyon olarak tanımlanmaktadır

(Tontul, 2019). Dolayısıyla bu değer aralıkları içerisinde parçacıklar elde edilmiş olması emülsiyonların nano boyuta ulaştığının göstergesidir.

4.2 Nanoemülsiyonun Zeta (ζ) Potansiyel Değerleri

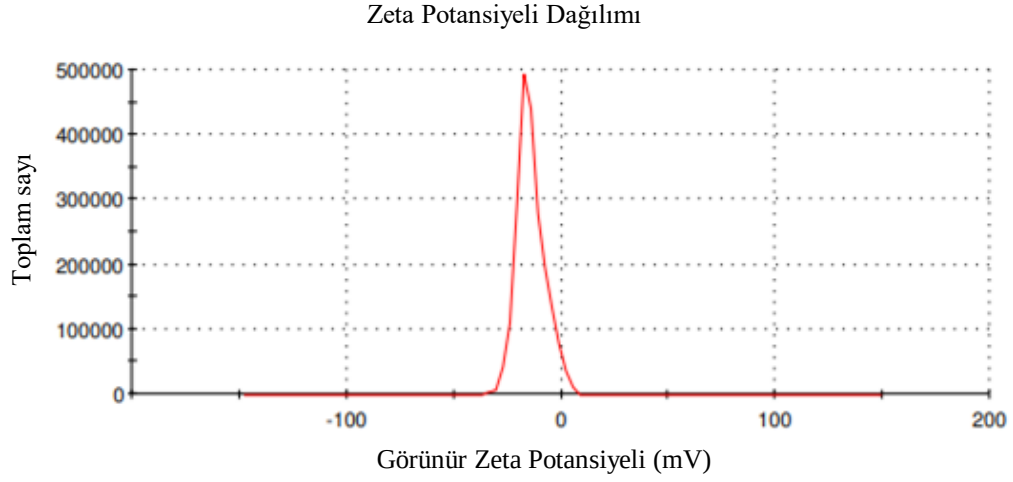
Zeta Potansiyeli, parçacık ile parçacığın içinde bulunduğu sıvı arasında oluşmaktadır. Parçacıklar arasında itme ve çekme kuvvetleri oluşmasına neden olmaktadır. Bir sıvı içerisindeki aynı yükteki parçacıklar birbirlerini iter, farklı yükteki parçacıklar ise çeker. Bu çekme ve itme kuvveti parçacığın zeta potansiyel değerine bağlıdır. Özetle zeta potansiyeli, bir parçacığın dağıldığı yığın sıvısı ve nanoparçacık yüzeyi ile alakalı zıt yüklü iyonları içeren sıvı tabakası arasındaki potansiyel farkının bir ölçüsüdür (Ateş vd., 2018).

Zeta potansiyel ölçümü dağılma mekanizmaları ile ilgili ayrıntılı bilgi verir ve elektrostatik dağılma kontrolünün anahtarıdır. Parçacıkların sıvılar içerisindeki davranışları yüzeylerindeki elektrik yükü ile değil, zeta potansiyel değerleri (mV) ile belirlenir. Zeta potansiyeli parçacığın içinde bulunduğu sıvının pH değeri ile değişmektedir. Zeta potansiyelinin büyüklüğü parçacık kararlılığı hakkında bilgi sağlar, daha yüksek büyüklükteki potansiyeller artan elektrostatik itme ve dolayısıyla artan kararlılığı göstermektedir (Çizelge 4.1) (Ateş vd., 2018).

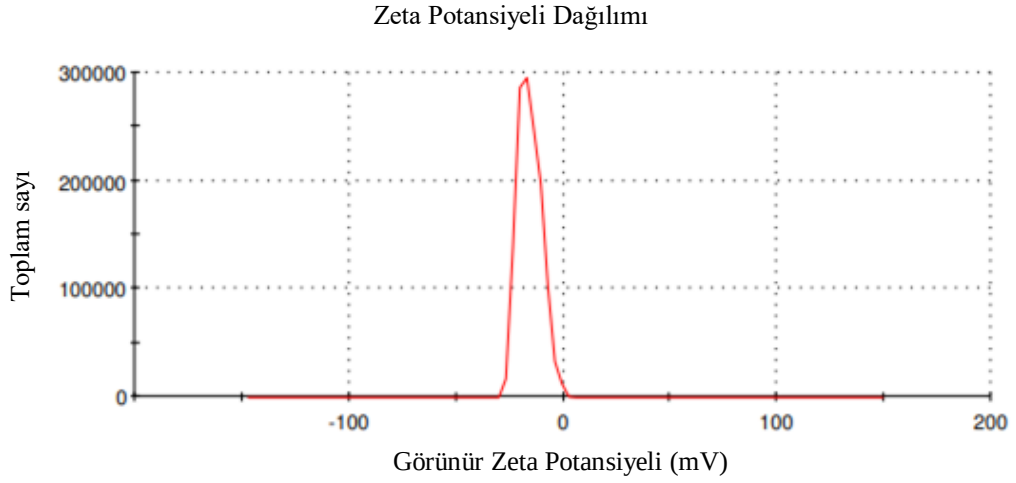
Çizelge 4.1. Nanoparçacıkların zeta potansiyel değeri ile kararlılığı arasındaki ilişki.

Zeta Değeri	Nanoparçacıkların Kararlılığı
0-5 mV	Parçacıklar kümeleşme veya bir araya gelme eğilimi sergilerler,
5-20 mV	Parçacıklar minimal düzeyde kararlıdırlar,
20-40 mV	Parçacıklar orta düzeyde kararlıdırlar,
40+ mV	Parçacıklar son düzeyde kararlıdırlar,

Bu çalışmada karvakrolün zeta potansiyel değeri -14,1 mV (Şekil 4.3) olarak bulunurken bu değer timol için -15,7 mV (Şekil 4.4) şeklinde tespit edilmiştir. Küminaldehit emülsiyonu için parçacık boyut analizi teknik sebeplerle yapılamadığından burada sunulamamıştır. Çizelge 4.2' ye göre karvakrol ve timol emülsiyonlarının zeta potansiyelleri 5-20 mV arasında olduğu için minimal düzeyde kararlılık gösterdiği ve hazırlanan emülsiyonların kararlılıklarının zayıf olduğu sonucuna varılabilir. Ancak stok emülsiyonlar deney setlerinin kurulduğu günlerde hazırlanıp bekletilmeden kullanıldığı için kararsız oluşlarının etkisi ihmal edilebilir.



Şekil 4.3. Karvakrol nanoemülsiyonunun zeta potansiyeli dağılım grafiği.



Şekil 4.4. Timol nanoemülsiyonunun zeta potansiyeli dağılım grafiği.

Aynı zamanda zeta potansiyeli, çözeltideki bir nanoparçacığı çevreleyen elektriksel çift katmandaki elektrostatik potansiyelin ölçümüne yönelik olan yöntem şeklinde de ifade edilmektedir. Zeta potansiyeli -10 ila $+10$ mV arasında olan nanopartiküller yaklaşık olarak nötr olarak kabul edilirken, zeta potansiyeli $+30$ mV' den büyük veya -30 mV' den küçük olan nanopartiküller sırasıyla güçlü katyonik ve güçlü anyonik olarak kabul edilmektedir (Clogston ve Patri, 2011).

Bir başka çalışmada nanoemülsiyonlar (ağırlıkça %10 toplam yağ fazı), uçucu yağ (karvakrol), taşıyıcı yağ (orta zincirli trigliserit, OZT) ve iyonik olmayan yüzey aktif maddeden (tween 80) oluşan bir karışımın sürekli karıştırılarak sulu bir çözelti halinde titre edilmesiyle oluşturulmuştur. Yağ fazı bileşimi (karvakrol-OZT kütle oranı),

başlangıç damlacık çapı üzerinde önemli bir etkiye sahip olmuş ve en küçük parçacık boyutu 55 nm, ağırlıkça %2,5 karvakrol ve ağırlıkça %7,5 OZT' de olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda tween 80' inde ortalama damlacık çapı üzerinde önemli etkisi olmuştur. Toplam yüzey aktif madde konsantrasyonu arttıkça (ağırlıkça %5'ten %20'ye) damlacık boyutunda azaldığı çalışma ile anlaşılmıştır. Yağ fazındaki karvakrol konsantrasyonu arttıkça nanoemülsiyonların depolama sırasında damlacık büyümesine karşı stabilitesinin azaldığı da görülmüştür. Tersine, karvakrol konsantrasyonu arttıkça nanoemülsiyonların antimikrobiyal etkinliği de artmıştır (Chang vd., 2013). Tween 80 miselinin ve % 0,2 timolün parçacık boyut dağılımları bir çalışmada incelenmiştir. Boş ve çözündürülmüş misellerin, parçacık boyut çapı yaklaşık 10 nm şeklinde dağılım göstermiştir. Timolün sudaki parçacık boyut indeksi ise 178 nm olarak bulunmuştur. Gıda ürünlerinde, özellikle berrak içeceklerde sentetik antioksidanların yerine kullanılabileceği bu çalışma ile doğrulanmıştır (Deng vd., 2016). Yapılan başka bir çalışmada, taze marul üzerindeki kekik yağı nanoemülsiyonlarının etkisi değerlendirilmiştir. Kekik yağı nanoemülsiyonunun parçacık boyut ve ζ potansiyel değerleri sırasıyla 148 nm ve -18 mV olarak bulunmuştur (Bhargava vd., 2015).

4.3 Deney Sonuçları

Yanıt yüzey yöntemi, alternatif deneysel stratejiler ve diğer yandan bunları değerlendirmek için olanaklar sunmaktadır. Kısaca, optimal bir sonuç elde etmek için bir dizi tasarlanmış deneyin kullanılmasını ifade etmektedir.

Bu çalışmada karvakrol, timol, küminaldehitin çiğ kıyma örneklerinde *E. coli* ATCC 25922 'ye karşı antimikrobiyal etkilerinin tek tek ve birlikte nasıl olduğunu araştırmak amacıyla bu üç antimikrobiyal maddenin dozları ve depolama süresi değişkenler olarak seçilerek 4 faktörlü Box Behnken tasarımıyla Yanıt Yüzey Yöntemi kullanılarak deney noktaları belirlenmiştir. Bu noktalarda canlı mikroorganizma sayılarındaki azalma gözlenmiş ve yanıt olarak değerlendirilmiştir. Deney sonuçları Çizelge 4.2' de gösterildiği gibi tespit edilmiştir. Öncelikli hedef tek tek antimikrobiyallerin canlı mikroorganizma yüküne etkisini belirlemek ve bu üç antimikrobiyalin sinerjik çalışıp çalışmadıklarını belirlemektir.

Çizelge 4.2. Deney sonuçları.

Deney	Konsantrasyon [ppm (v/v)]			Gün	Yanıt
	Karvakrol	Timol	Küminaldehit		Log azalma
1	1250	1250	2500	1	0,68
2	1250	0	1250	1	-0,35
3	0	1250	1250	1	-0,24
4	1250	2500	1250	1	0,89
5	2500	1250	1250	1	1,02
6	1250	1250	0	1	0,02
7	0	0	1250	15	-0,76
8	1250	1250	1250	15	1,94
9	1250	1250	1250	15	0,33
10	1250	0	2500	15	-0,45
11	2500	0	1250	15	0,69
12	1250	2500	2500	15	3,50
13	2500	1250	0	15	1,74
14	0	1250	2500	15	0,22
15	1250	1250	1250	15	1,27
16	1250	1250	1250	15	0,73
17	2500	2500	1250	15	> 6*
18	2500	1250	2500	15	3,71
19	0	1250	0	15	-0,19
20	1250	0	0	15	-0,23
21	1250	1250	1250	15	1,00
22	1250	2500	0	15	> 6*
23	0	2500	1250	15	2,20
24	1250	1250	0	29	1,89
25	2500	1250	1250	29	> 6*
26	0	1250	1250	29	-0,09
27	1250	2500	1250	29	3,13
28	1250	1250	2500	29	2,24
29	1250	0	1250	29	-0,52

*Sayılabilir limit altında kaldığından en az 6 log azalma elde edilmiştir.

Daha önce yapılan bir çalışmada besiyeri ortamında bu üç antimikrobiyalın ikili ve üçlü kombinasyonlarının sinerjik etki gösterdikleri belirlenmiş fakat et çalışmasında kullanılan dozlar etkisiz olduğu için gerçek gıda ortamındaki davranışları tanımlanamamıştır (Pamuk, 2022). Daha önce yapılan bu çalışmanın MİK sonuçları (timol:150 ppm, karvakrol:300 ppm, küminaldehit:300 ppm) göz önünde bulundurularak ön denemeler yapılmış ve antimikrobiyallerin doz aralıklarına 0-2500 ppm olarak karar verilmiştir.

Yaklaşık olarak 1 aya kadar örneklerin buzdolabı ortamında depolanması sağlanmış ve 1., 15. ve 29. günlerde canlı mikroorganizma sayımları yapılmıştır. İlk mikrobiyal yükü tüm kıyma örnekleri için 10^7 olarak ayarlanmıştır. Mikrobiyal azalma, log azalma olarak verilmiş ve aşağıdaki formülle (4.1) hesaplanmıştır.

$$\text{Log} \left(\frac{N_0}{N} \right) = \log \log (N_0) - \log(N) \quad (4.1)$$

N_0 : İlk mikrobiyal yük, kob/ml

N : Son mikrobiyal yük, kob/ml

Deney 6 (1. gün) ve deney 24 (29. gün) numaralı örneklerde kullanılan antimikrobiyallerin dozları aynı olup, birinci günde 0,02 log azalma sağlanırken 29. günde bu oranın 2 loga çıktığı görülmüştür. Dolayısıyla kıymada bulunan *E. coli* sayılarının azalmasında gün faktörünün önemli olduğu söylenebilir. Deney 12, deney 18 ve deney 27'ye bakıldığında en az 3 log mikrobiyal azalmanın sağlanabilmesi için karvakrol ve timol konsantrasyon toplamalarının minimum 3750 ppm olması gerektiği saptanmıştır.

Ayrıca deney 19 ve deney 20 de herhangi bir mikrobiyal azalma gözlenmemiş olup hem karvakrol hem timol tek başlarına etki gösteremedikleri söylenebilir. 12 ve 22 numaralı deneylerde ise aynı gün analizlerinin yapılmasına rağmen birinde 3,5 log, diğerinde 7 log düzeyinde azalma olmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda aynı karvakrol ve timol seviyesine rağmen küminaldehitin mikrobiyal azalmayı zorlaştırarak etkinliklerini azalttığı anlaşılmıştır. İleride daha detaylı tartışılacak olmasıyla birlikte deney sonuçlarına göz attığımızda küminaldehit varlığının etkisiz ya da antagonistik etkiye sahip olduğu söylenebilir. 18 ve 25 numaralı deneylere bakıldığında gün faktörünün önemi görülmektedir. 15. günde 3,7 log azalma görülürken 29. günde bu

azalma 6 log seviyesinin üzerindedir. Küminaldehit konsantrasyonunda azalış olmasına rağmen gün faktörü dikkat çekmektedir ve mikrobiyal azalmayı artırmıştır. Küminaldehit konsantrasyonu artırıldığında ise mikrobiyal azalmada artış olmamış ve küminaldehitin etkisiz olduğu burada da doğrulanmıştır. 13 numaralı örnekte en az 6 log azalma beklenirken (karvakrol ve timol toplamı 3750 ppm) 1,7 log azalma gözlenmiştir. Bu sebeple timolün karvakrole göre daha etkili olduğu tartışılabilir. Marul üzerinde yapılan bir çalışmada ise kekik yağı nanoemülsiyonlarının gıda kaynaklı bakterilerde ortalama 2,18-3,57 log' luk bir azalma sağladığı gözlenmiştir. 1000 ppm' in marul üzerinde bulunan *E. coli* O157:H7' de 3,35 log cfu/g seviyesinde azalma sağladığı anlaşılmıştır (Bhargava vd., 2015).

Çizelge 4.2' de deney noktaları ve logaritmik azalma sonuçları verilmiştir. Log azalmanın negatif olması o deney noktasında mikrobiyal yükte artış olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, Design Expert 13 istatistik paket programında analiz edilerek gerçek ve kodlanmış faktörler cinsinden modellenmiş ve en uygun önerilen modelin doğrusal model olduğuna karar verilmiştir. Mevcut çalışmadaki modelde değişkenler birinci dereceden olarak ifade edilmekte olup aynı zamanda modelin doğrusal olması değişkenler arasında herhangi bir interaksiyon olmadığını, yani değişkenlerin birlikte etkilerinin önemli olmadığını göstermiştir ($P < 0.0001$).

Gerçek faktörler cinsinden denklem, her faktörün belirli seviyelerine verilecek yanıt hakkında tahminlerde bulunabilmek için kullanılmaktadır. Burada her faktör için seviyeler orijinal birimleriyle belirtilmektedir. Bu denklem, her bir faktörün göreceli etkisini belirlemek için kullanılmamalıdır. Çünkü katsayılar, her bir faktörün birimlerini barındıracak şekilde ölçeklendirilmekte ve kesişim, tasarım alanının merkezinde bulunmamaktadır. Mevcut çalışmada modelin denklemi (4.2) gösterildiği gibi olup; A karvakrolü, B timolü, C küminaldehiti ve D ifadesi gün terimlerini temsil etmektedir. Bu denklem bilinmeyen bir noktadaki logaritmik azalmanın ne olacağını tahminlemek için kullanılabilir denklemdir.

$$R_1 = -3,24694 + 0,001344A + 0,001700B - 0,000026C + 0,069669D \quad (4.2)$$

Kodlanmış faktörler cinsinden son denklem, her faktörün belirli seviyelerine verilen yanıt hakkında tahminlerde bulunmak için kullanılmaktadır. Varsayılan olarak faktörlerin yüksek seviyeleri genellikle +1, düşük seviyeleri ise -1 olarak

kodlanmaktadır. Kodlanmış denklem, faktör katsayılarını karşılaştırarak faktörlerin göreceli etkisini belirlemek için önem arz etmektedir. Yanıt Yüzey Yöntemi aracılığıyla elde edilmiş optimizasyon için kullanılan bağımsız değişkenler ve bunların kodlanmış faktörler cinsinden yanıt değişkenlerine ait regresyon denklemi (4.3) aşağıda gösterildiği gibidir. Denklem 4.3 incelenince katsayısı en yüksek olan Timol konsantrasyonunun cevaba yani logaritmik azalmaya en fazla etkisi olduğunu söyleyebiliriz. Timolü, karvakrol ve depolama günü takip etmektedir. Küminaldehit ise diğer değişkenlerin katsayılarından oldukça küçük katsayıya sahip olduğu için etkisi ihmal edilebilir görülmektedir. Ayrıca küminaldehitin katsayısının negatif olması logaritmik azalma cevabına tersi yönde etki ettiğini söyleyebiliriz. İleriki sayfalarda değişkenlerin etkileri daha detaylı tartışılacaktır.

$$R_1 = +1,57 + 1,68A + 2,12B - 0,0320C + 0,9754D \quad (4.3)$$

Modelin regresyon katsayıları (R^2) ve modelin uyum eksikliği değerlendirilmiştir. R^2 değerinin bire yaklaşması bizlere modelin deneysel verilere daha iyi uyum sağladığını göstermektedir. Ek olarak, daha küçük R^2 değeri, yanıtların davranış çeşitliliğini açıklamayla alakalı olmadığını da göstermektedir.

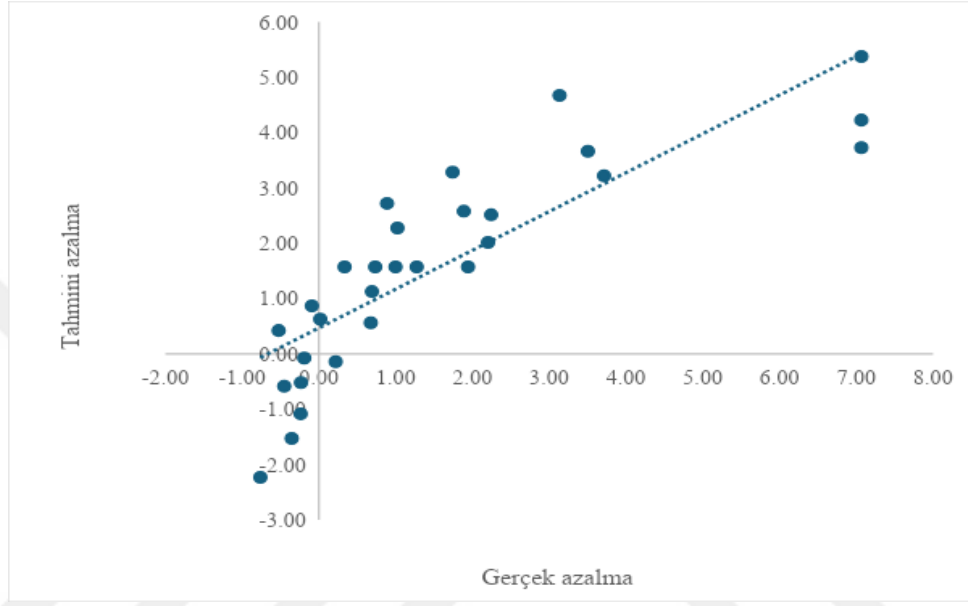
Çizelge 4.3' de gösterildiği gibi mikrobiyal yük azalmasını belirlemek için regresyon katsayısı, $R^2 = 0,7018$ değeri çalışma sonucunda bulunmuş olup bu, modelin numunenin tamamını temsil etme olasılığının yüksek olduğunu göstermektedir.

0,5425' lik tahmin edilen R^2 değeri, 0,6521' lik düzeltilmiş R^2 ile makul düzeyde uyum içindedir; yani fark 0,2' den azdır. Yeterli hassasiyet verisi ise, sinyal-gürültü oranını ölçmekte ve genellikle 4' ten büyük bir oran arzu edilmektedir. Yeterli hassasiyet verisi 13,8103 olarak elde edilerek istenilen oranlarda sinyallere işaret etmekte ve dolayısıyla bu modelimizin kullanılabilir olduğunu açıklamaktadır.

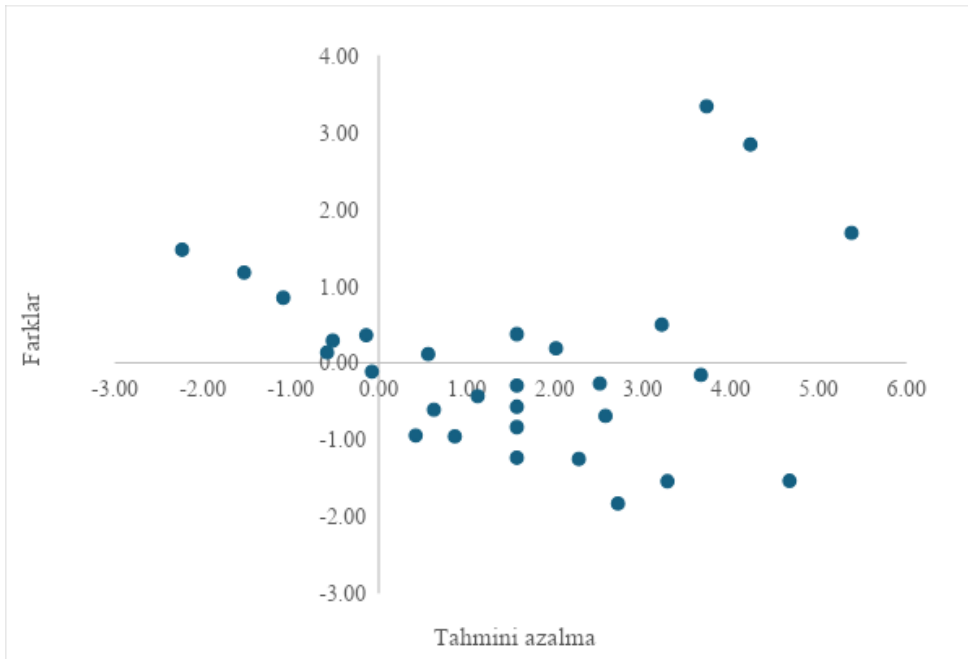
Çizelge 4.3. Regresyon katsayı (R^2) değerleri.

Standart hata	1,33
Ortalama	1,57
C.V. %	84,46
R^2	0,7018
Düzeltilmiş R^2	0,6521
Tahmin edilen R^2	0,5425
Yeterli Hassasiyet	13,8103

Seçilen modelin güvenilirliğini doğrulamak için, tahmin edilen değerler, elde edilen deneysel (gerçek) değer ile ekil 4.5' de gösterildiği gibi karşılaştırılmıştır ve aralarında yeterli bir korelasyon katsayısı göstermiştir. Çalışma sonucunda modelden elde edilen tahmini değerlerin, deneysel değerlerle dikkate değer bir uyum içinde olduğu tespit edilmiştir. Tahmini ve farklar dağılımına baktığımızda ise, dağılımın gelişigüzel olduğu ve bir trend izlemediği görülmektedir (ekil 4.6).



Şekil 4.5. Tahmini ve gerçek değerlerin model uyum grafiği.



Şekil 4.6. Tahmini ve farklar model değerlendirmesi.

Mevcut çalışmada, giriş parametrelerinin her biri doğrusal, birinci dereceden olmuş ve etkileşim teriminin etkisi Yanıt Yüzey Yöntemi araç kutusundaki varyans analizi (ANOVA) ile hesaplanmıştır. Önerilen regresyon denkleminde yanıt değişkeni üzerinde anlamlı etkisi olan parametreler kullanılmıştır.

Deneysel veriler, bağımsız değişkenler için doğru denklemine uyacak şekilde doğrusal regresyon yoluyla analize tabi tutulmuştur. Bu değişkenler arasındaki anlamlı farkı kontrol etmek için F değeri 0,001, 0,01 ve 0,05 olasılıkla hesaplanarak varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Bağımsız değişkenlerin yanıt değişkenleri üzerindeki etkisini görselleştirmek için, Design Expert Yazılımı kullanılarak doğru grafikleri, kontur grafikleri ve yanıt yüzeyi grafikleri oluşturulmuştur.

Çalışmada istatistiksel analiz (ANOVA) sonuçları (Çizelge 4.4), deneysel verilerin, bir doğru modeliyle iyi bir şekilde temsil edilebileceğini ortaya çıkarmıştır ($R^2 = 0,7018$). Uyum eksikliği, tüm değişkenler için net hataya göre anlamlı bulunmamıştır ($p \leq 0,05$), bu da modelimizin istatistiksel olarak doğru olduğunu göstermektedir. İstatistiksel analiz, önerilen modelin yeterli olduğunu ve tüm yanıtlar için oldukça tatmin edici R^2 değerlerine sahip olduğunu göstermektedir.

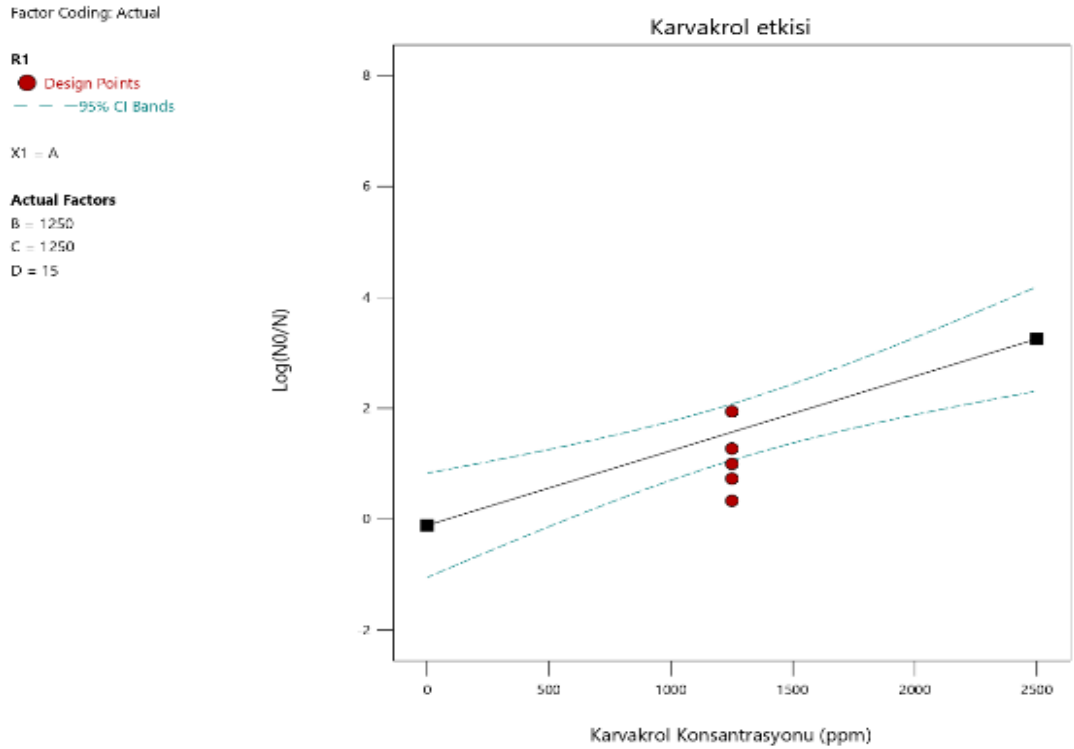
Çizelge 4.4. Doğrusal model için varyans (ANOVA) sonuçları.

	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri	P Değeri
Model	99,49	4	24,87	14,12	<0,0001
A-Karvakrol	33,88	1	33,88	19,24	0,0002
B-Timol	54,18	1	54,18	30,76	<0,0001
C-Küminaldehit	0,0123	1	0,0123	0,007	0,9342
D-gün	11,42	1	11,42	6,48	0,0177
Kalıntı Hatası	42,27	24	1,76	-	-
Uyum Eksikliği	40,81	20	2,04	5,58	0,0535
Net Hata	1,46	4	0,3656	-	-

Çizelge 4.4 incelendiğinde model F değerinin 14,12 olması modelin anlamlı yani önemli olduğunu göstermektedir ($P < 0,0001$). Model terimlerine bakıldığında ise C yani Küminaldehit hariç diğer değişkenlerin etkisinin anlamlı olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla küminaldehitin anlamlı olmayıp önemsiz olduğu ($P > 0,1$) çalışma ile tespit edilmiştir.

Daha önce yapılan bir çalışmada bu üç antimikrobiyalın (karvakrol, timol, küminaldehit), *E. coli* ATCC 25922' ye karşı minimum inhibasyon konsantrasyonları (MİK) timol için 150 ppm iken karvakrol ve küminaldehit için 300 ppm olarak bulunmuştur ve timol-karvakrol, karvakrol-küminaldehit ve timol-karvakrol-küminaldehit için sinerji saptanmıştır (Pamuk, 2022). Görülmektedir ki besiyeri ortamında belirlenen MİK değerleri gıda ortamında aynı seviyede olamamakta ve sinerji etkisi de azalmaktadır. Bunun sebebi olarak kırmızı etin doğal yapısında bulunan yağ globülleri, aminoasitler ve proteinler gibi bileşenlerin bakteriler tarafından koruyucu olarak kullanılması ve bu sayede canlılıklarını uzun süre sürdürebilmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışma sonuçlarına göre kullanılan antimikrobiyallerin tek tek hedef mikroorganizma üzerine (*E. coli* ATCC 25922) etkilerine bakıldığında, karvakrol ve timolün artan konsantrasyonlarında mikrobiyal yük üzerinde oluşturdıkları azalmalar artış gösterirken (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8), küminaldehitte herhangi bir değişimin olmadığı anlaşılmıştır (Şekil 4.9). Ek olarak çalışmamızda karvakrol ve timolde olduğu gibi gün faktöründe mikroorganizma yükünün azalması yönünde olumlu etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.7. Karvakrolün mikrobiyal yük üzerindeki etkisi.

Factor Coding: Actual

R1

● Design Points
— 95% CI Bands

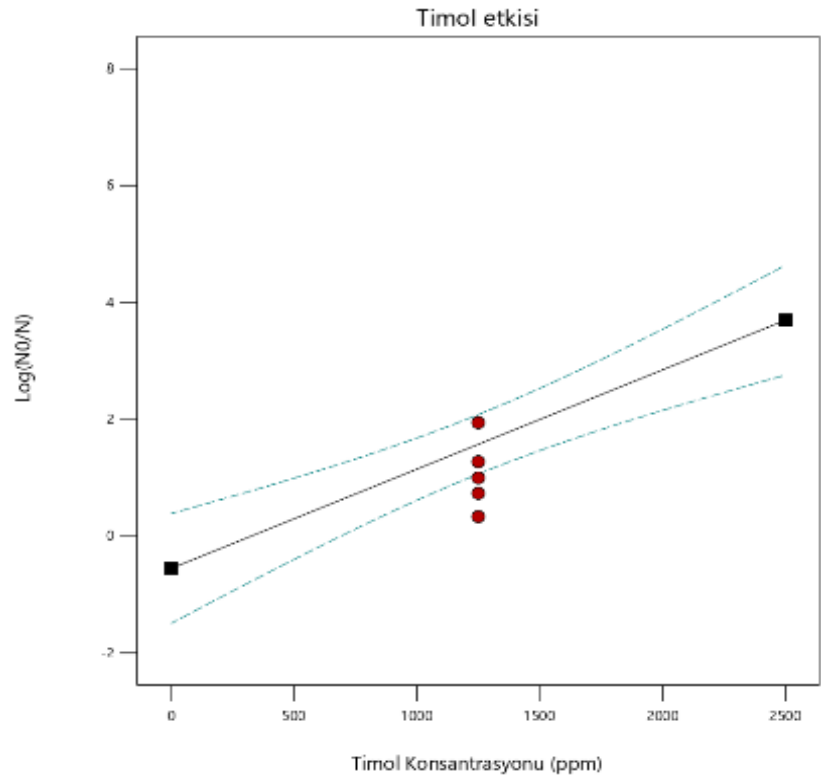
X1 = B

Actual Factors

A = 1250

C = 1250

D = 15



Şekil 4.8. Timolün mikrobiyal yük üzerindeki etkisi.

Factor Coding: Actual

R1

● Design Points
— 95% CI Bands

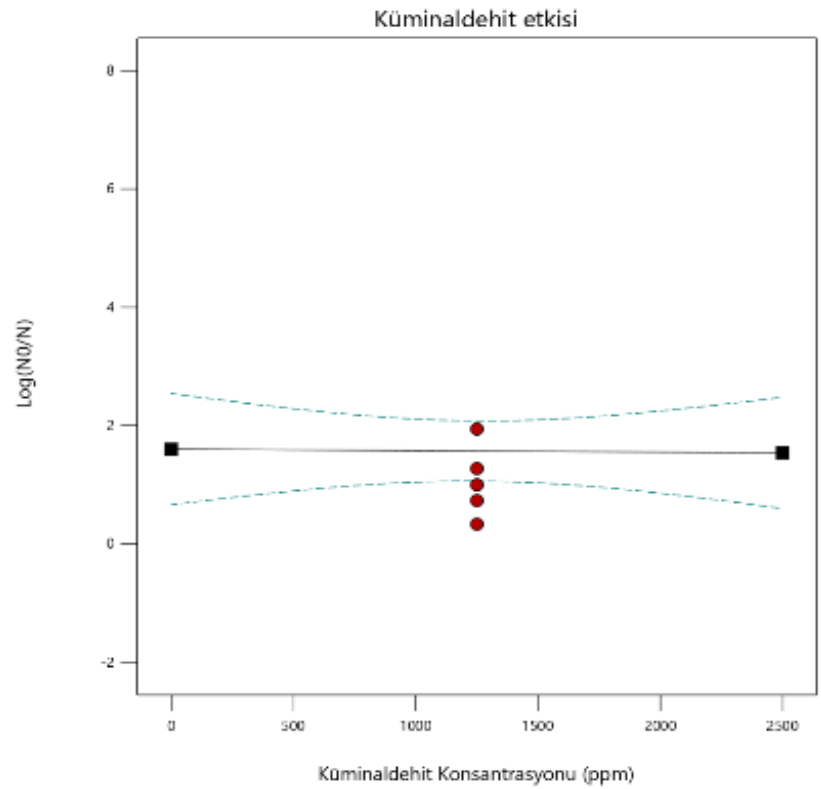
X1 = C

Actual Factors

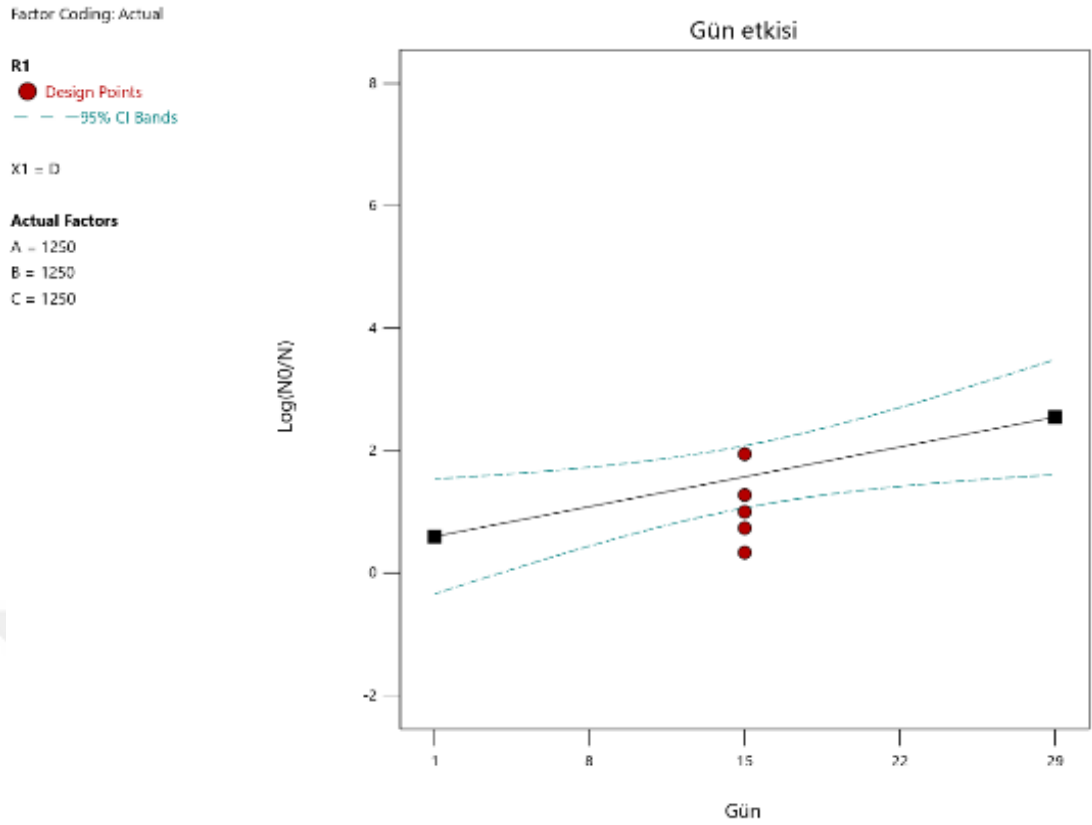
A = 1250

B = 1250

D = 15



Şekil 4.9. Küminaldehitin mikrobiyal yük üzerindeki etkisi.



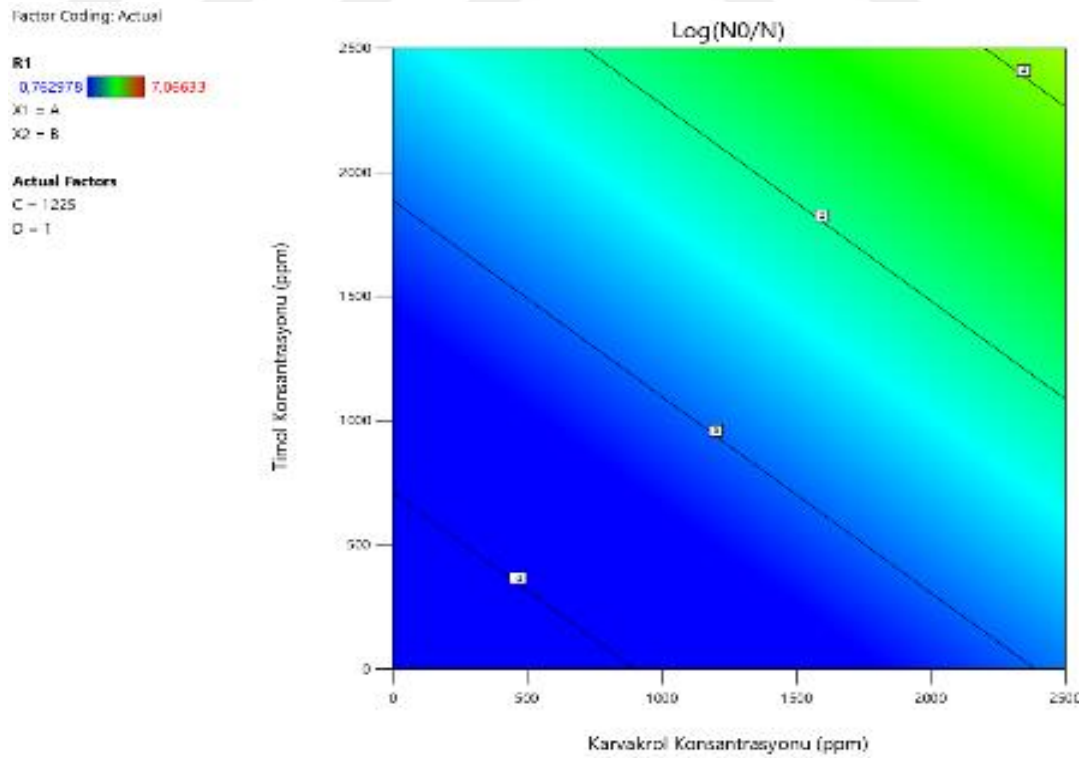
Şekil 4.10. Gün faktörünün mikrobiyal yük üzerindeki etkisi.

Başka bir çalışmada, timol ve karvakrol içeren mikrokapsüllerle kaplanan plastik esnek bir filmin *E. coli* O157:H7'ye karşı etkisi incelenmiş ve timol/karvakrol arasında sinerjik etki belirlenmiştir. Bu gözlem besiyeri ortamında yapıldığı için gerçek gıda ortamı ile karşılaştırılması yetersiz kalmaktadır (Guarda vd., 2011). Gallucci ve arkadaşları ise karvakrol ve timol arasında *E. coli*'ye karşı fraksiyonel inhibisyon konsantrasyon (FİK) değerini 4 bulmuşlar ve timol karvakrol arasında *E. coli*'ye karşı antagonistik yani birbirlerinin etkisinin azaltan bir ilişki rapor etmişlerdir (Gallucci vd., 2009). Aslında bu sadece sinerjik etkiyi karşılaştırmak için kullandıkları yöntemlerin farklılığından ve referans değerlerindeki hassasiyetin farklılığından kaynaklanmıştır.

Karvakrolün *Escherichia coli* O157'ye karşı antimikrobiyal aktivitesi sığır derisi ve sığır karkası kesimlerinde değerlendirildiği bir çalışmada 30000 ppm karvakrolün bu ürünler yüzeyinde cm^2 'de 10 dakika içinde 1,4 ve 1,58 log azalma sağladığı belirlenmiştir (McDonnell vd., 2012). Yine başka bir çalışmada karvakrol ve timolün *E. coli*'ye karşı etki mekanizmaları incelenmiş, bu bileşenlerin hücre dış zarını parçaladığı ve hücre içi materyali hücrelerden dış ortama saldırdığı rapor edilmiştir. Test edilen bileşenlerden karvakrol ve timol, *E. coli*'nin hücre içi ATP havuzunu azaltmış

ve aynı zamanda hücre dışı ATP' yi artırmıştır. Bu da açıkça sitoplazmik membran üzerinde yıkıcı etki gösterdiklerine işaret etmektedir. Karvakrolün *E. coli* (KBN10P03217)'ye karşı etkisinin incelendiği bir çalışmada MİK değeri 450 ppm bulunmuş olup zamana bağlı şekilde *E. coli* sayısını önemli olarak azaltmıştır. Karvakrol hücre duvarında yıkıma ve hücre bileşenlerinin hücre dışına salınımına sebep olmuştur (Khan vd., 2017). Bu çalışma da in vitro olarak besiyeri ortamında yapıldığı için MİK değerinde eklenen karvakrol 2 saat sonra tüm *E. coli* hücrelerinin tamamının ölmesini sağlamıştır.

Yapılan çalışmada karvakrol ve timolün birlikte kullanıldıkları andaki etkileri aşağıdaki kontür grafiklerinde gün bazı (1. gün: Şekil 4.11) (15. gün: Şekil 4.12) (29. gün: Şekil 4.13) dikkate alınarak gösterilmektedir. Küminaldehitin herhangi bir etkisinin olmadığı kanıtlandığı için mevcut diğer antimikrobiyaller ile herhangi bir etkileşimi söz konusu değildir. Karvakrol ve timolün birlikte kullanımı istatistiksel olarak önemli bulunmasa da Şekil 4.11, 4.12, 4.13 incelendiğinde depolama süresinin uzamasıyla birlikte karvakrol ve timolün beraber kullanımının 29. günde etkinliğinin arttığını söyleyebiliriz.



Şekil 4.11. Karvakrol ve timolün 1. gündeki birlikte etkileri.

Factor Coding: Actual

R²

-0,962978

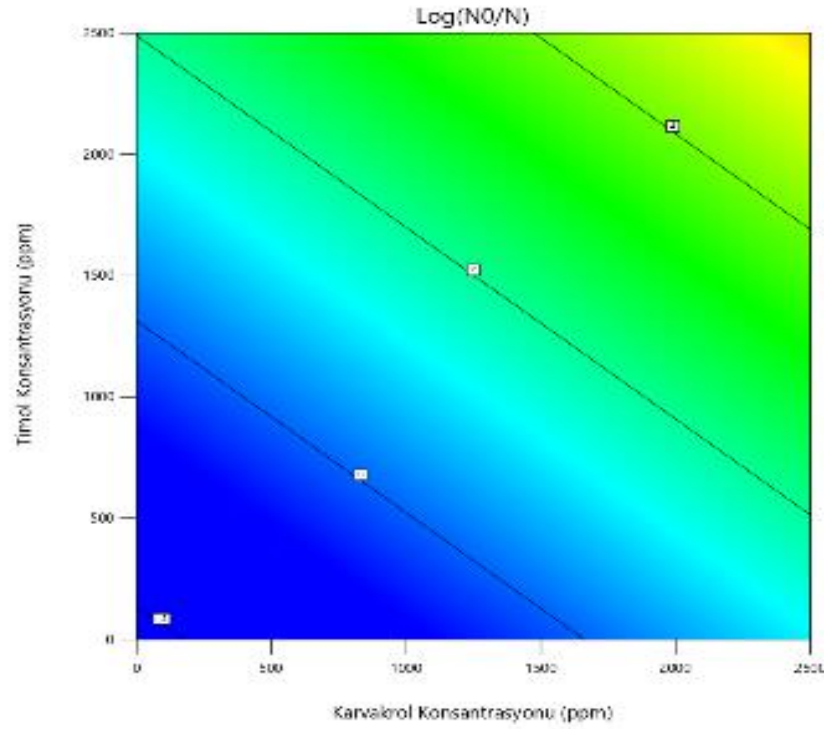
X1 = A

X2 = B

Actual Factors

C = 1225

D = 15



Şekil 4.12. Karvakrol ve timolün 15. gündeki birlikte etkileri.

Factor Coding: Actual

R²

-0,962978

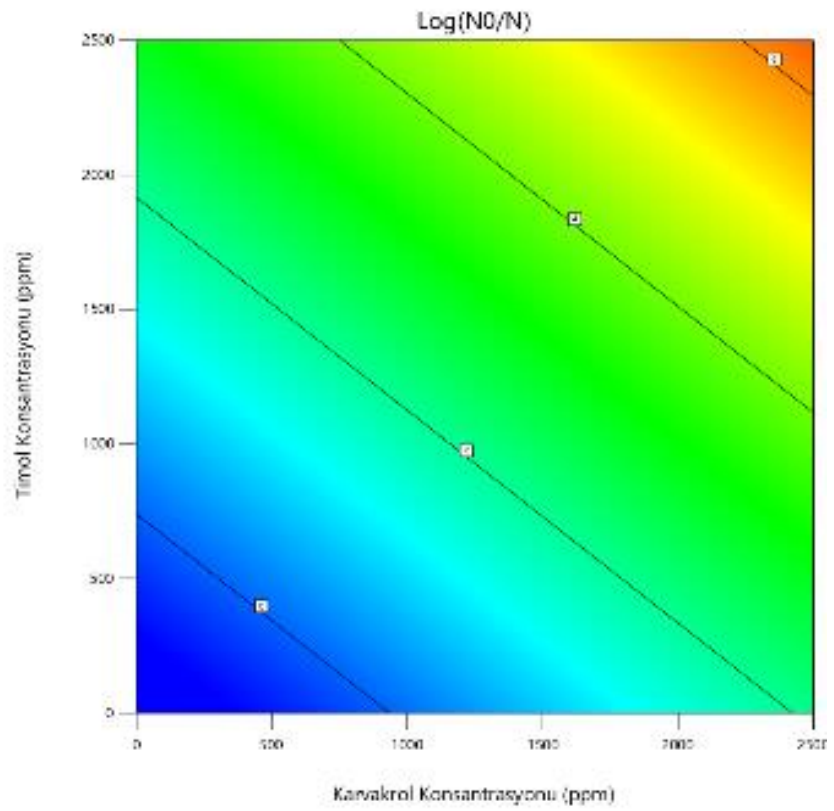
X1 = A

X2 = B

Actual Factors

C = 1225

D = 29



Şekil 4.13. Karvakrol ve timolün 29. gündeki birlikte etkileri.

Daha önce Pamuk tarafından yapılan çalışmada ise MİK değeri karvakrol için 300 ppm ve timol için 150 ppm olarak belirlenmiştir ancak aynı çalışmada kıyma örnekleri üzerinde bu dozlar etkisiz olmuştur (Pamuk, 2022). Bu çalışmada görülmüştür ki zamana bağlı olmakla birlikte karvakrol ve timolün *E. coli* 'ye karşı etkin dozu kıyma örnekleri söz konusu olduğunda çok daha yüksektir. Yine besiyeri ortamında etki süresi çok kısaysa da gıdanın kompleks yapısı sebebiyle bu sürenin et örneklerinde daha uzun olduğu düşünülmektedir.

Antimikrobiyallerin model sistemlerde iyi çalıştığı, ancak karmaşık gıdalarda daha az işe yaradığı ve bunun altında yatan kapsamlı mekanizmaların var olduğu bildirilmiştir. Bu aktivite kaybı çoğunlukla fiziksel bir olgudur. Genellikle çeşitli bileşenlerden oluşan gıdaya eklenen antimikrobiyalın bu bileşenlerle çok sayıda moleküler etkileşim göstermesiyle açıklanabileceği düşünülmektedir. Ancak bugüne kadar, bu sayısız moleküler etkileşimleri tanımlayıp modellemek ve daha sonra antimikrobiyal bileşenlerin bir matrise bağlı olup olmadığını veya mikrobiyal hücrelerle etkileşime girmekte serbest olup olmadığını tahmin etmek için gereken karmaşık hesaplamalar henüz tam anlamıyla yapılamamıştır. Bu konudaki ilerlemelerin, muhtemelen bireysel moleküler etkileşimleri tanımlayan karmaşık sayısal denklemleri yinelemeli olarak çözebilecek daha karmaşık simülasyon stratejilerinin geliştirilmesinden doğabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, içerik etkileşimlerinin gerçekleştirileceği sistemlerde aktiviteyi belirlemek için standartlaştırılmış bir yol sağlayan, değiştirilmiş mikrobiyolojik model sistemlerinin geliştirilmesine de bu sebeple ihtiyaç vardır (Weiss vd., 2015).

4.4 Optimizasyon (Doğrulama Analizi Sonuçları)

Doğrulama analizi modeli doğrulamak için yapılmaktadır. Bu doğrulamayı yapmak için optimum nokta seçilmiş ve bu optimum noktanın belirlenmesi içinde optimizasyon koşulları Design Expert 13'e girilmiştir (Çizelge 4.5). Elde edilen optimum koşullarda doğrulama analizleri önceki analizlerde takip edilen yöntemle yapılmıştır. Mevcut çalışmada, optimizasyon koşulları belirlenirken Çizelge 4.5' te gösterildiği gibi karvakrol, timol ve küminaldehitin konsantrasyonlarının minimum seviyeye (en az) indirilmesi amaçlanmıştır. Bu değerler ne kadar küçük olursa, üründe meydana gelebilecek koku ve aromadaki değişimler az olacaktır.

Çizelge 4.5. Optimizasyon koşulları.

	Amaç	Ağırlık
A: Karvakrol konsantrasyonu (ppm)	En az	***
B: Timol konsantrasyonu (ppm)	En az	***
C: Küminaldehit konsantrasyonu (ppm)	En az	***
D: gün	En az	***
R1: log azalma	5 log azalma	*****

Aynı zamanda gün faktörü de minimize edilmiştir. FDA tarafından risk analizleri sonucunda patojenler için çiğ et ürünlerinde en az 5 log azalma olması gerekliliği ilkesiyle cevap olarak seçilen logaritmik azalma değerinin (R1) 5 olması hedeflenmiştir. Önem düzeylerine göre koşulların ağırlık seviyeleri oluşturulmuş ve log azalma (R1) faktörünün ağırlık seviyesi diğerlerine göre daha yüksek koşullandırılmıştır (ABD Tarım Bakanlığı) (URL-6).

Karvakrol için optimum koşullardaki konsantrasyon 2158,20 ppm, timol için 2227,95 ppm, küminaldehit için ihmal edilebilir küçüklükte ve depolama günü 22 olarak bulunmuştur. Bu koşullarda teorik olarak 4,97 değerinde olan bir azalma tahmin edilirken, doğrulama deneyleri sonucu bu değer 5,22±1,32 log seviyesinde olduğu gözlenmiştir. Bu deneysel ve tahmini değerlerin karşılaştırılması Çizelge 4.6’ da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Optimum koşullarda deneysel ve tahmini değerlerin karşılaştırılması.

	Deneysel	Tahmini	% hata
Log azalma	5,22±1,32	4,97	5

Desirability: 0,369

Aynı zamanda modelin optimum koşullardaki uyumluluk sonucu % 5 ‘lik bir hatayla sonuçlanmış olup model ile deneysel sonuçların uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan çalışma sonunda desirability değeri (Koşulların hepsini aynı anda karşılayabilme düzeyi) 0,369 şeklinde bulunarak 0-1 arasında olması sebebiyle başarılı olduğu söylenebilir (Çizelge 4.6).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada *E. coli* ATCC 25922 ile kontamine edilmiş kıyma örneklerinde karvakrol, timol ve küminaldehitin kullanımları durumunda *E. coli* ATCC 25922' ye karşı etkin oldukları dozlar belirlenmiştir. Ek olarak yanıt yüzey yöntemiyle planlanan deney sonuçlarının analizi ve antimikrobiyal dozları ile *E. coli* sayısındaki azalma arasındaki ilişkiyi tanımlayan bir model elde edilmiştir.

Yapılan deney sonucunda timol, karvakrol ve gün faktörlerinin *E. coli* ATCC 25922 suşuna karşı antimikrobiyal etki gösterdikleri anlaşılmıştır. Küminaldehit ise 0-2500 ppm doz aralığında etkisiz bulunmuştur. Karvakrol ve timolün diğer koruma yöntemleriyle kombine edilerek kullanılmasının yöntemlerin etkinliğini artırabileceği düşünülmektedir.

Türetilen doğrusal model gelecekte yapılacak çalışmalar için kıymada *E. coli*' ye karşı hedeflenen azalmayı sağlayabilecek karvakrol, timol ve depolama süresinin tahmininde kullanılabilir. Çalışmada çiğ kıyma uygulamalarında, istatiksel olarak mikrobiyal yük üzerindeki azalmalar, gün ve kullanılan antimikrobiyal konsantrasyonlarına bağlı şekilde gözlenmiştir. Hedeflenen mikrobiyal yük azalması 5 log olarak planlanmış ve bu mikrobiyal azalmanın doğrulama analizlerinde 22. günde sağlandığı tespit edilmiştir.

Analiz sonuçlarında maksimum azalma görülen antimikrobiyallere (karvakrol, timol) baktığımızda ise hedef mikroorganizma üzerinde (*E. coli* ATCC 25922) 3 log ve üzerinde bir azalmanın sağlanabilmesi için bu antimikrobiyallerin toplamının 3750 ppm olmasının gerektiği sonucuna varılmıştır.

Dikkat çeken bir diğer nokta 15. gün analiz sonuçlarında 7 log düzeyinde azalma olmasıdır. Bunun sebebinin yüksek oranda karvakrol (2500 ppm) ve timolden (2500 ppm) kaynaklandığı açık olarak görülmektedir. Bu da yüksek oranda antimikrobiyallerin mikroorganizmalar üzerindeki etkilerini doğrular niteliktedir. Bu nedenle gıda çalışmalarında daha yüksek antimikrobiyal konsantrasyon dozlarına ihtiyaç vardır.

Ürünleri korumak ve mikrobiyal kaynaklı bozulmaları engellemek amacıyla gıda ve özellikle kırmızı et sektöründe doğal antimikrobiyallerin arayışı son derece önem arz

etmektedir. Dolayısıyla bilim insanları gıda sektörü için gelecekte bu alana yönelmelidirler. Bu nedenle gelecek için çalışmaların şimdiden planlanması gerekmektedir. Ayrıca aromatik özellikte olan bu antimikrobiyallerin etkin dozlarının, kırmızı etin duyuşal özelliklerinde kullanılması durumunda göstereceğı etkiler de incelenmelidir.

Literatürde timol ve küminaldehitin tween 80 ile nano boyutta enkapsüle edildiğı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu antimikrobiyallerin enkapsülasyonları mevcut çalışmada ilk kez uygulanmış olup gelecekteki araştırmacılara yol gösterici niteliktedir.



KAYNAKLAR

- Abass Bnyan, I., Tariq Abid, A. ve Naji Obied, H., 2014. Antibacterial Activity of Carvacrol against Different Types of Bacteria, *Journal of Natural Sciences Research*, 4, 9.
- Agrimonti, C., White, J. C., Tonetti, S. ve Marmiroli, N., 2019. Antimicrobial activity of cellulosic pads amended with emulsions of essential oils of oregano, thyme and cinnamon against microorganisms in minced beef meat, *International Journal of Food Microbiology*, 305, 108246.
- Ahmad, A., Khan, A., Akhtar, F., Yousuf, S., Xess, I., Khan, L. A. ve Manzoor, N., 2011. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 30, 1, 41–50.
- Ahmadabadi, L. R., Hosseini, S. E., Seyedein Ardebili, S. M. ve Mousavi Khaneghah, A., 2022. Application of clove essential oil-loaded nanoemulsions in coating of chicken fillets, *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16, 1, 819–828.
- Ait-Ouazzou, A., Espina, L., García-Gonzalo, D. ve Pagán, R., 2013. Synergistic combination of physical treatments and carvacrol for *Escherichia coli* O157:H7 inactivation in apple, mango, orange, and tomato juices, *Food Control*, 32,1, 159–167.
- Allahghadri, T., Rasooli, I., Owlia, P., Nadooshan, M. J., Ghazanfari, T., Taghizadeh, M. ve Astaneh, S. D. A., 2010. Antimicrobial Property, Antioxidant Capacity, and Cytotoxicity of Essential Oil from Cumin Produced in Iran, *Journal of Food Science*, 75, 2, H54–H61.
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F. ve Di Ilio, C., 2013. *Escherichia coli* in Europe: An Overview, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, 12, 6235–6254.
- Althunibat, O., Qaralleh, H. ve Khleifat, K., 2016. Effect of thymol and carvacrol, the major components of *Thymus capitatus* on the growth of *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal Of Pure And Applied Microbiology*, 10, 1, 367-374.
- Amin, G., 2012. Cumin, *Handbook of Herbs and Spices: Second Edition*, 1, 250–259.
- Asadi, S., Nayeri-Fasaei, B., Zahraei-Salehi, T., Yahya-Rayat, R., Shams, N. ve Sharifi, A., 2023. Antibacterial and anti-biofilm properties of carvacrol alone and in combination with cefixime against *Escherichia coli*, *BMC Microbiology*, 23,1, 1–10.
- Atas, B., Aksoy, C. S., Avci, F. G., Sayar, N. A., Ulgen, K., Ozkirimli, E. ve Akbulut, B. S., 2022. Carvacrol Enhances the Antimicrobial Potency of Berberine in *Bacillus subtilis*, *Current Microbiology*, 79,5, 1–8.

- Ateş, M., 2018. Nanoparçacıkların Ölçme ve İnceleme Teknikleri, Turkish Journal of Scientific Reviews, 11, 1, 63–69.
- Ayres Cacciatore, F., Dalmás, M., Maders, C., Ataíde Isaíá, H., Brandelli, A. ve da Silva Malheiros, P., 2020. Carvacrol encapsulation into nanostructures: Characterization and antimicrobial activity against foodborne pathogens adhered to stainless steel, Food Research International, 133, 109143.
- Becerril, R., Gómez-Lus, R., Goñi, P., López, P. ve Nerín, C., 2007. Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E. coli* and *S. aureus*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 388, 5–6, 1003–1011.
- Bhargava, K., Conti, D. S., da Rocha, S. R. P. ve Zhang, Y., 2015. Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce, Food Microbiology, 47, 69–73.
- Burt, S. A. ve Reinders, R. D., 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7, Letters in Applied Microbiology, 36, 3, 162–167.
- Burt, S. A., Fledderman, M. J., Haagsman, H. P., van Knapen, F. ve Veldhuizen, E. J. A., 2007a. Inhibition of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis on agar and raw chicken by carvacrol vapour, International Journal of Food Microbiology, 119, 3, 346–350.
- Burt, S. A., Van Der Zee, R., Koets, A. P., De Graaff, A. M., Van Knapen, F., Gastra, W., Haagsman, H. P. ve Veldhuizen, E. J. A., 2007b. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7, Applied and Environmental Microbiology, 73, 14, 4484–4490.
- Burt, S. A., Vlieland, R., Haagsman, H. P. ve Veldhuizen, E. J. A., 2005. Increase in Activity of Essential Oil Components Carvacrol and Thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by Addition of Food Stabilizers, Journal of Food Protection, 68, 5, 919–926.
- Cai, M., Zhang, G., Wang, J., Li, C., Cui, H. ve Lin, L., 2021. Application of glycyrrhiza polysaccharide nanofibers loaded with tea tree essential oil/ gliadin nanoparticles in meat preservation, Food Bioscience, 43, 101270.
- Casaburi, A., Piombino, P., Nychas, G. J., Villani, F. ve Ercolini, D., 2015. Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage, Food Microbiology, 45, 83–102.
- Chang, Y., McLandsborough, L. ve McClements, D. J., 2013. Physicochemical properties and antimicrobial efficacy of carvacrol nanoemulsions formed by spontaneous emulsification, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61, 37, 8906–8913.

- Chauhan, A. K. ve Kang, S. C., 2014. Thymol disrupts the membrane integrity of *Salmonella* ser. typhimurium in vitro and recovers infected macrophages from oxidative stress in an ex vivo model, *Research in Microbiology*, 165, 7, 559–565.
- Chavan, P. S. ve Tupe, S. G., 2014. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts, *Food Control*, 46, 115–120.
- Chiasson, F., Borsa, J. ve Lacroix, M., 2005. Combined Effect of Carvacrol and Packaging Conditions on Radiosensitivity of *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhi in Ground Beef, *Journal of Food Protection*, 68, 12, 2567–2570.
- Cho, Y. ve Lee, H.-J., 2014. Antibacterial effects of carvacrol against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7, *Journal of Biomedical and Translational Research*, 15, 3, 117–122.
- Chung, D., Cho, T. J. ve Rhee, M. S., 2018. Citrus fruit extracts with carvacrol and thymol eliminated 7-log acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* typhimurium, and *Listeria monocytogenes*: A potential of effective natural antibacterial agents, *Food Research International*, 107, 578–588.
- Churklam, W., Chaturongakul, S., Ngamwongsatit, B. ve Aunpad, R., 2020. The mechanisms of action of carvacrol and its synergism with nisin against *Listeria monocytogenes* on sliced bologna sausage, *Food Control*, 108, 106864.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F. ve Chikindas, M. L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation, *International Journal of Food Microbiology*, 71, 1, 1–20.
- Clogston, J. D. ve Patri, A. K., 2011. Zeta Potential Measurement, *Methods in Molecular Biology*, 697, 63–70.
- Comi, G., 2017. Spoilage of Meat and Fish, *The Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers*, 179–210.
- Cui, H., Yuan, L. ve Lin, L., 2017. Novel chitosan film embedded with liposome-encapsulated phage for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7 in beef, *Carbohydrate Polymers*, 177, 156–164.
- Cui, H., Zhang, X., Zhou, H., Zhao, C. ve Lin, L., 2015. Antimicrobial activity and mechanisms of *Salvia sclarea* essential oil, *Botanical Studies*, 56, 1, 1–8.
- Çoban, Ö. E., Patır, B. Ö. E. ve Patır, B., 2010. Antioksidan Etkili Bazı Bitki ve Baharatların Gıdalarda Kullanımı *Electronic Journal of Food Technologies*, 5, 2, 7–19.
- De Oliveira Nóbrega, R., Paula De Castro Teixeira, A., Araújo De Oliveira, W., De Oliveira Lima, E. and Oliveira Lima, I., 2016. Investigation of the antifungal activity of carvacrol against strains of *Cryptococcus neoformans*, 54, 11, 2591–2596.

- De, M., De, A. K., Mukhopadhyay, R., Banerjee, A. B. ve Miró, M., 2003. Actividad Antimicrobiana de *Cuminum cyminum* L., *Ars Pharmaceutica*, 44,3, 257–269.
- Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S. ve Gordon, D., 2020. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*, *Nature Reviews Microbiology*, 19,1, 37–54.
- Deng, L. L., Taxipalati, M., Que, F. ve Zhang, H., 2016. Physical characterization and antioxidant activity of thymol solubilized Tween 80 micelles, *Scientific Reports*, 6, 1, 1–8.
- Doulgeraki, A. I., Ercolini, D., Villani, F. ve Nychas, G. J. E., 2012. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions, *International Journal of Food Microbiology*, 157, 2, 130–141.
- Du, E., Gan, L., Li, Z., Wang, W., Liu, D. ve Guo, Y., 2015. In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*, *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6,1, 1–12.
- Du, E., Wang, W., Gan, L., Li, Z., Guo, S. ve Guo, Y., 2016. Effects of thymol and carvacrol supplementation on intestinal integrity and immune responses of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*, *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7, 1, 1–10.
- Ebada, M. E., 2017. Cuminaldehyde: A Potential Drug Candidate, *Pharmacology and Clinical Research*, 2, 2, 1-4.
- El-Saber Batiha, G., Hussein, D. E., Algammal, A. M., George, T. T., Jeandet, P., Al-Snafi, A. E., Tiwari, A., Pagnossa, J. P., Lima, C. M., Thorat, N. D., Zahoor, M., El-Esawi, M., Dey, A., Alghamdi, S., Hetta, H. F. ve Cruz-Martins, N., 2021. Application of natural antimicrobials in food preservation: Recent views, *Food Control*, 126, 108066.
- Engel, J. B., Heckler, C., Tondo, E. C., Daroit, D. J. ve da Silva Malheiros, P., 2017. Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel, *International Journal of Food Microbiology*, 252, 18–23.
- Erol, P. ve İlhak, O. İ., 2015. Sodyum Laktat ve Timol’ün Aynalı Sazan Balığı’ndan (*Cyprinus carpio* L.) Yapılan Köftelerin Bazı Mikrobiyolojik ve Duyusal Nitelikleri Üzerine Etkisi, *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, Erciyes Üniversitesi, 12, 3, 153–161.
- Falcone, P., Speranza, B., Del Nobile, M. A., Corbo, M. R. ve Sinigaglia, M., 2005. A Study on the Antimicrobial Activity of Thymol Intended as a Natural Preservative, *Journal of Food Protection*, 68, 8, 1664–1670.
- Falleh, H., Ben Jemaa, M., Saada, M. ve Ksouri, R., 2020. Essential oils: A promising eco-friendly food preservative, *Food Chemistry*, 330, 127268.

- Fattahian, A., Fazlara, A., Maktabi, S., Pourmahdi, M. ve Bavarsad, N., 2022. The effects of chitosan containing nano-capsulated *Cuminum cyminum* essential oil on the shelf-life of veal in modified atmosphere packaging, *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16, 1, 920–933.
- Friedman, M., 2014. Chemistry and multibeneficial bioactivities of carvacrol (4-isopropyl-2-methylphenol), a component of essential oils produced by aromatic plants and spices, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 31, 7652–7670.
- Friedman, M., Levin, C. E. ve Henika, P. R., 2017. Addition of phytochemical-rich plant extracts mitigate the antimicrobial activity of essential oil/wine mixtures against *Escherichia coli* O157:H7 but not against *Salmonella enterica*, *Food Control*, 73, 562–565.
- Gallucci, M. N., Oliva, M., Casero, C., Dambolena, J., Luna, A., Zygodlo, J. ve Demo, M., 2009. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*, *Flavour and Fragrance Journal*, 24,6, 348–354.
- García-García, R., López-Malo, A. ve Palou, E., 2011. Bactericidal Action of Binary and Ternary Mixtures of Carvacrol, Thymol, and Eugenol against *Listeria innocua*, *Journal of Food Science*, 76, 2, M95–M100.
- Ghosh, S., Kundu, M., Dutta, S., Mahalanobish, S., Ghosh, N., Das, J. ve Sil, P. C., 2022. Enhancement of anti-neoplastic effects of cuminaldehyde against breast cancer via mesoporous silica nanoparticle based targeted drug delivery system, *Life Sciences*, 298, 120525.
- Ghosh, V., Mukherjee, A. ve Chandrasekaran, N., 2012. Mustard Oil Microemulsion Formulation And Evaluation Of Bactericidal Activity, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, 4, 497–500.
- Goel, V., Das Singla, L. ve Choudhury, D., 2020. Cuminaldehyde induces oxidative stress-mediated physical damage and death of *Haemonchus contortus*, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 130, 110411.
- Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A. ve Chatzopoulou, P. S., 2010. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella Enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage, *International Journal of Food Microbiology*, 137, 2–3, 175–180.
- Guarda, A., Rubilar, J. F., Miltz, J. ve Galotto, M. J., 2011. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol, *International Journal of Food Microbiology*, 146 ,2, 144–150.
- Hajibonabi, A., Yekani, M., Sharifi, S., Nahad, J. S., Dizaj, S. M. ve Memar, M. Y., 2023. Antimicrobial activity of nanoformulations of carvacrol and thymol: New trend and applications, *OpenNano*, 13, 100170.
- Hartl, D. L. ve Dykhuizen, D. E., 1984. The population genetics of *Escherichia coli*, *Annual Review of Genetics*, 18, 31–68.

- Hemmatkhah, F., Zeynali, F. ve Almasi, H., 2020. Encapsulated Cumin Seed Essential Oil-Loaded Active Papers: Characterization and Evaluation of the Effect on Quality Attributes of Beef Hamburger, *Food and Bioprocess Technology*, 13, 3, 533–547.
- Hernández-Ochoa, L., Aguirre-Prieto, Y. B., Nevárez-Moorillón, G. V., Gutierrez-Mendez, N. ve Salas-Muñoz, E., 2014. Use of essential oils and extracts from spices in meat protection, *Journal of Food Science and Technology*, 51, 5, 957–963.
- Hussein, K. N., Friedrich, L., Kiskó, G., Ayari, E., Németh, C. ve Dalmadi, I., 2019. Use of allyl-isothiocyanate and carvacrol to preserve fresh chicken meat during chilling storage, *Czech Journal of Food Sciences*, 37, 6, 417- 424.
- Hyldgaard, M., Mygind, T. ve Meyer, R. L., 2012. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components, *Frontiers in Microbiology*, 3,01, 20029.
- İlyasoğlu, H. ve El, S. N., 2010. Nanoemülsiyonlar: Oluşumları, Yapıları ve Kollodial Salınım Sistemleri Olarak Gıda Sektöründe Kullanım Alanları, *Gıda*, 35, 2, 143–150.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P. ve Mobley, H. L. T., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*, *Nature Reviews Microbiology*, 2, 2, 123–140.
- Karam, L., Roustom, R., Abiad, M. G., El-Obeid, T. ve Savvaiddis, I. N., 2019. Combined effects of thymol, carvacrol and packaging on the shelf-life of marinated chicken, *International Journal of Food Microbiology*, 291, 42–47.
- Karaman, K. ve Sağdıç, O., 2019. Investigation of The Effect of Carvacrol Addition on The Change of Some Physicochemical and Bioactive Properties of Apple Juice Contaminated with *Zygosaccharomyces bailii*, *Turkish Journal of Agriculture- Food Science and Technology*, 7, 11, 1882–1893.
- Kaur, R. ve Kaur, L., 2021. Encapsulated natural antimicrobials: A promising way to reduce microbial growth in different food systems, *Food Control*, 123, 107678.
- Kavrut, E., 2021. Kıyma ve Kıyma Benzeri Ürünlerde “Hamburger Hastalığı” olarak *E. coli* O157:H7’nin varlığı, *Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 4, 2, 146–155.
- Khan, I., Bahuguna, A., Kumar, P., Bajpai, V. K. ve Kang, S. C., 2017. Antimicrobial potential of carvacrol against uropathogenic *Escherichia coli* via membrane disruption, depolarization, and reactive oxygen species generation, *Frontiers in Microbiology*, 282618.
- Khribch, J., Nassik, S., Houadfi, M. El, Zrira, S. ve Oukessou, M., 2018. Antibacterial activity of essential oil of oregano and carvacrol on avian *Escherichia coli* strains, *Revue Marocaine Des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 6, 3, 300–307.

- Kim, H., Lee, S., Son, B., Jeon, J., Kim, D., Lee, W., Youn, H. S., Lee, J. M. ve Youn, B. H., 2018. Biocidal effect of thymol and carvacrol on aquatic organisms: Possible application in ballast water management systems, *Marine Pollution Bulletin*, 133, 734–740.
- Kiskó, G. ve Roller, S., 2005. Carvacrol and p-cymene inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice, *BMC Microbiology*, 5, 1, 1–9.
- Kivanc, M. ve Akg  ul, A., 1988. Effect of some essential oil components on the growth of food-borne bacteria and synergism with some food ingredients, *Flavour and Fragrance Journal*, 3, 2, 95–98.
- Ko , B. ve Kaymak-Ertekin, F., 2010. Response surface methodology and food processing applications, *Gıda*, 35, 1, 63–70.
- La Stora, A., Ercolini, D., Marinello, F., Di Pasqua, R., Villani, F. ve Mauriello, G., 2011. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells, *Research in Microbiology*, 162, 2, 164–172.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J. ve Nychas, G. J. E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol, *Journal of Applied Microbiology*, 91, 3, 453–462.
- Li, D., Zhao, Y., Wang, X., Tang, H., Wu, N., Wu, F., Yu, D. Ve Elfalleh, W., 2020. Effects of (+)-catechin on a rice bran protein oil-in-water emulsion: Droplet size, zeta-potential, emulsifying properties, and rheological behavior, *Food Hydrocolloids*, 98, 105306.
- Li, H., Addo, K. A., Yu, Y. G ve Xiao, X. L., 2023a. Cuminaldehyde inhibits biofilm formation by affecting the primary adhesion of *Staphylococcus aureus*, *South African Journal of Botany*, 156, 13–20.
- Li, H., Addo, K. A., Yu, Y. G ve Xiao, X. L., 2023b. Effects of cuminaldehyde combined with mild heat against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in powdered infant formula, *Food Control*, 148, 109663.
- Li, H., Huang, Y. yan, Addo, K. A., Yu, Y.G ve Xiao, X. L., 2022a. Effects of cuminaldehyde on toxins production of *Staphylococcus aureus* and its application in sauced beef, *Food Control*, 137, 108960.
- Li, H., Zhang, M., Addo, K. A., Yu, Y., and Xiao, X., 2022b. Action mode of cuminaldehyde against *Staphylococcus aureus* and its application in sauced beef. *LWT*, 155, 112924.
- Liang, J., Yan, H., Wang, X., Zhou, Y., Gao, X., Puligundla, P. ve Wan, X., 2017. Encapsulation of epigallocatechin gallate in zein/chitosan nanoparticles for controlled applications in food systems, *Food Chemistry*, 231, 19–24.
- Lima, M. D. S., Quintans-J  nior, L. J., De Santana, W. A., Martins Kaneto, C., Pereira Soares, M. B. ve Villarreal, C. F., 2013. Anti-inflammatory effects of carvacrol: Evidence for a key role of interleukin-10, *European Journal of Pharmacology*, 699, 1–3, 112–117.

- Liu, T. ve Liu, L., 2020. Fabrication and characterization of chitosan nanoemulsions loading thymol or thyme essential oil for the preservation of refrigerated pork, *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 1509–1515.
- Lu, Y. ve Wu, C., 2010. Reduction of *Salmonella enterica* Contamination on Grape Tomatoes by Washing with Thyme Oil, Thymol, and Carvacrol as Compared with Chlorine Treatment, *Journal of Food Protection*, 73, 12, 2270–2275.
- Luna, A., Lábaque, M. C., Zygadlo, J. A. ve Marin, R. H., 2010. Effects of thymol and carvacrol feed supplementation on lipid oxidation in broiler meat, *Poultry Science*, 89, 2, 366–370.
- Martínez-Romero, D., Guillén, F., Valverde, J. M., Bailén, G., Zapata, P., Serrano, M., Castillo, S. ve Valero, D., 2007. Influence of carvacrol on survival of *Botrytis cinerea* inoculated in table grapes, *International Journal of Food Microbiology*, 115, 2, 144–148.
- McDonnell, M. J., Rivas, L., Burgess, C. M., Fanning, S. ve Duffy, G., 2012. Evaluation of Carvacrol for the Control of *Escherichia coli* O157 on Cattle Hide and Carcass Cuts, *Foodborne Pathogens And Disease*, 9, 11, 1049–1052.
- Mead, P. S. ve Griffin, P. M., 1998. *Escherichia coli* O157:H7, *Lancet*, 352, 9135, 1207–1212.
- Meira, N. V. B., Holley, R. A., Bordin, K., Macedo, R. E. ve Luciano, F. B., 2017. Combination of essential oil compounds and phenolic acids against *Escherichia coli* O157:H7 in vitro and in dry-fermented sausage production, *International Journal of Food Microbiology*, 260, 59–64.
- Miladi, H., Zmantar, T., Chaabouni, Y., Fedhila, K., Bakhrouf, A., Mahdouani, K. ve Chaieb, K., 2016. Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against food-borne pathogens, *Microbial Pathogenesis*, 99, 95–100.
- Millette, M., Le Tien, C., Smoragiewicz, W. ve Lacroix, M., 2007. Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads, *Food Control*, 18, 7, 878–884.
- Monteiro-Neto, V., de Souza, C. D., Gonzaga, L. F., da Silveira, B. C., Sousa, N. C. F., Pontes, J. P., Santos, D. M., Martins, W. C., Pessoa, J. F. V., Carvalho Júnior, A. R., Almeida, V. S. S., de Oliveira, N. M. T., de Araújo, T. S., Maria-Ferreira, D., Mendes, S. J. F., Ferro, T. A. F. ve Fernandes, E. S., 2020. Cuminaldehyde potentiates the antimicrobial actions of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Plos One*, 15, 5, E0232987.
- Moraes-Lovison, M., Marostegan, L. F. P., Peres, M. S., Menezes, I. F., Ghiraldi, M., Rodrigues, R. A. F., Fernandes, A. M. ve Pinho, S. C., 2017. Nanoemulsions encapsulating oregano essential oil: Production, stability, antibacterial activity and incorporation in chicken pâté, *LWT*, 77, 233–240.

- Noori, S., Zeynali, F. ve Almasi, H., 2018. Antimicrobial and antioxidant efficiency of nanoemulsion-based edible coating containing ginger (*Zingiber officinale*) essential oil and its effect on safety and quality attributes of chicken breast fillets, *Food Control*, 84, 312–320.
- Nostro, A., Roccaro, A. S., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M. A., Pizzimenti, F. C., Cioni, P. L., Procopio, F. ve Blanco, A. R., 2007. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms, *Journal of Medical Microbiology*, 56, 4, 519–523.
- Okeke, I. N. ve Nataro, J. P., 2001. Enteropathogenic *Escherichia coli*, *The Lancet Infectious Diseases*, 1,5, 304–313.
- Omari, Z., Kazunori, S., Sabti, M., Bejaoui, M., Hafidi, A., Gadhi, C. ve Isoda, H., 2021. Dietary administration of cumin-derived cuminaldehyde induce neuroprotective and learning and memory enhancement effects to aging mice, *Aging (Albany NY)*, 13,2, 1671.
- Orhan, N., 2020. Kangal Balığında (*Garra Rufa*) Timol ve Karvakrol Maddelerinin Anestezik Olarak Kullanılabilirliğinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
- Özvural, E. B., 2017. Çemen Ekstraktı ve Timol İçeren Filmlerle Kaplanan Köftelerin Bazı Kalite Özelliklerinin İncelenmesi, *The Journal of Food*, 42,4, 364–371.
- Pamuk, F., 2022. Karvakrol, Timol ve Küminaldehit’ in *Escherichia coli*’ ye karşı sinerjik etkilerinin belirlenmesi ve etin mikrobiyolojik raf ömrü üzerine etkilerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aksaray.
- Pedreira, A., Martínez-López, N., Vázquez, J. A. ve García, M. R., 2023. Modelling the antimicrobial effect of food preservatives in bacteria: Application to *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* inhibition with carvacrol, *Journal of Food Engineering*, 111734.
- Pelin Can, Ö. ve Emir Çoban, Ö., 2012. Aynalı sazan balığı (*Cyprinus carpio carpio* L., 1758) kıymasından hazırlanan köftelerin raf ömrü üzerine timol’ün etkisi, *Journal of Etlik Veterinary Microbiology*, 23, 1, 9–14.
- Peng, S., Zhang, J., Zhang, T., Hati, S., Mo, H., Xu, D., Li, H., Hu, L. ve Liu, Z., 2022. Characterization of carvacrol incorporated antimicrobial film based on agar/konjac glucomannan and its application in chicken preservation, *Journal of Food Engineering*, 330, 111091.
- Pennington, H., 2010. *Escherichia coli* O157, *The Lancet*, 376, 9750, 1428–1435.
- Pérez-Alfonso, C. O., Martínez-Romero, D., Zapata, P. J., Serrano, M., Valero, D. ve Castillo, S., 2012. The effects of essential oils carvacrol and thymol on growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* involved in lemon decay, *International Journal of Food Microbiology*, 158, 2, 101–106.

- Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P. ve Schwarz, S., 2018. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*, *Microbiology Spectrum*, 6,4.
- Prakash, B., Kujur, A., Yadav, A., Kumar, A., Singh, P. P. ve Dubey, N. K., 2018. Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system, *Food Control*, 89, 1–11.
- Rathod, N. B., Kulawik, P., Ozogul, F., Regenstein, J. M. ve Ozogul, Y., 2021. Biological activity of plant-based carvacrol and thymol and their impact on human health and food quality, *Trends in Food Science and Technology*, 116, 733–748.
- Reymick, O. O., Liu, D., Cheng, Y., Ouyang, Q. ve Tao, N., 2022. Cuminaldehyde-induced oxidative stress inhibits growth of *Penicillium digitatum* in citrus, *Postharvest Biology and Technology*, 192, 111991.
- Rivas, L., McDonnell, M. J., Burgess, C. M., O'Brien, M., Navarro-Villa, A., Fanning, S. ve Duffy, G., 2010. Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol, *International Journal of Food Microbiology*, 139, 1–2, 70-78.
- Roller, S., 1995. The quest for natural antimicrobials as novel means of food preservation: Status report on a European research project, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 36, 3–4, 333–345.
- Roller, S. ve Seedhar, P., 2002. Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruit at 4° and 8°C, *Letters in Applied Microbiology*, 35, 5, 390–394.
- Rout, S., Tambe, S. ve Deshmukh, R., 2022. Recent trends in the application of essential oils: The next generation of food preservation and food packaging, *Trends in Food Science and Technology*, 129, 2022, 421-439.
- Rúa, J., Del Valle, P., De Arriaga, D., Fernández-Álvarez, L. ve García-Armesto, M. R., 2019. Combination of Carvacrol and Thymol: Antimicrobial Activity Against *Staphylococcus aureus* and Antioxidant Activity, *Foodborne Pathogens and Disease*, 16, 9, 622–629.
- Santurio, F., de Jesus, K., Pantella, F., Adriel, R., Schlemmer, B., Fries, M., Lucy, L., Scientiae, A., Flores Santurio, D., Pantella Kunz de Jesus, F., Adriel Zanette, R., Bizzi Schlemmer, K., Fraton, A. ve Lucy Martins Fries, L., 2014. Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Thyme and of Thymol against *Escherichia coli* Strains, *Acta Scientiae Veterinariae*, 42, 1234, 1–4.
- Sepahvand, S., Amiri, S., Radi, M. ve Akhavan, H. R., 2021. Antimicrobial Activity of Thymol and Thymol-Nanoemulsion Against Three Food-Borne Pathogens Inoculated in a Sausage Model. *Food and Bioprocess Technology*, 14, 10, 1936–1945.

- Severino, R., Ferrari, G., Vu, K. D., Donsi, F., Salmieri, S. ve Lacroix, M., 2015. Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* on green beans, *Food Control*, 50, 215–222.
- Sezer, Y. Ç. ve Bozkurt, H., 2021. Et ve et ürünlerinin üretimi ve saklanması antimikrobiyal ambalajlama sistemlerinin kullanımı, *Food and Health*, 7, 2, 150–163.
- ShakEr, E. M. ve Farghaly, M., 2021. Antifungal Activity of Thyme and Carvacrol Nanoemulsions Against *Aspergillus fumigatus* Isolated from Different Types of Cheese, *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 9, 11, 1945–1950.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D. ve Corke, H., 2009. Antibacterial and antioxidant effects of five spice and herb extracts as natural preservatives of raw pork, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 11, 1879–1885.
- Snoussi, A., Chouaibi, M., Ben Haj Koubaier, H. ve Bouzouita, N., 2022. Encapsulation of Tunisian thyme essential oil in O/W nanoemulsions: Application for meat preservation, *Meat Science*, 188, 108785.
- Souza, V. V. M. A., Almeida, J. M., Barbosa, L. N. ve Silva, N. C. C., 2022. Citral, carvacrol, eugenol and thymol: antimicrobial activity and its application in Food, *Journal of Essential Oil Research*, 34, 3, 181–194.
- Sow, L. C., Tirtawinata, F., Yang, H., Shao, Q. ve Wang, S., 2017. Carvacrol nanoemulsion combined with acid electrolysed water to inactivate bacteria yeast in vitro and native microflora on shredded cabbages, *Food Control*, 76, 88–95.
- Stratakos, A. C. ve Grant, I. R., 2018. Evaluation of the efficacy of multiple physical, biological and natural antimicrobial interventions for control of pathogenic *Escherichia coli* on beef, *Food Microbiology*, 76, 209–218.
- Stratakos, A., Sima, F., Linton, M., Kelly, C., Pinkerton, L. ve Corcionivoschi, N., 2017. Effect of Carvacrol on O157 and non-O157 Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*, *Animal Science and Biotechnologies*, 50, 1, 126–129.
- Şimşek, A. ve Kılıç, B., 2012. Et ve Et Ürünlerinde Antioksidan Kullanımındaki Güncel Gelişmeler, *Akademik Gıda*, 10, 2, 75–83.
- Tchuenchieu, A., Sylvain, S. K., Pop, C., Jean-Justin, E. N., Mudura, E., Etoa, F. X. ve Rotar, A., 2018. Low thermal inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922 in pineapple, orange and watermelon juices: Effect of a prior acid-adaptation and of carvacrol supplementation, *Journal of Food Safety*, 38, 1, e12415.
- Tholstrup Sejersen, M., Salomonsen, T., Ipsen, R., Clark, R., Rolin, C. ve Balling Engelsen, S., 2007. Zeta potential of pectin-stabilised casein aggregates in acidified milk drinks, *International Dairy Journal*, 17, 4, 302–307.
- Tontul, İ., 2019. Nanoencapsulation Techniques in Food Industry, *Turkish Journal of Agriculture- Food Science and Technology*, 7, 2, 220–233.

- Tosun, D., ve Demirbaş, N., 2012. Türkiye’de Kırmızı Et ve Et Ürünleri Sanayiinde Gıda Güvenliği Sorunları ve Öneriler, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 26, 1, 93–102.
- Trevisan, D. A. C., Da Silva, A. F., Negri, M., De Abreu Filho, B. A., Machinski Junior, M., Patussi, E. V., Campanerut-Sá, P. A. Z. Ve Mikcha, J. M. G., 2018. Antibacterial and antibiofilm activity of carvacrol against *Salmonella enterica* serotype Typhimurium, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54, 1, e17229.
- Trindade, G. G. G., Thrivikraman, G., Menezes, P. P., França, C. M., Lima, B. S., Carvalho, Y. M. B. G., Souza, E. P. B. S. S., Duarte, M. C., Shanmugam, S., Quintans-Júnior, L. J., Bezerra, D. P., Bertassoni, L. E. ve Araújo, A. A. S., 2019. Carvacrol/ β -cyclodextrin inclusion complex inhibits cell proliferation and migration of prostate cancer cells, *Food and Chemical Toxicology*, 125, 198–209.
- Ultee, A. ve Smid, E. J., 2001. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*, *International Journal of Food Microbiology*, 64, 3, 373–378.
- Ultee, A., Gorris, L. G. M. ve Smid, E. J., 1998. Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*, *Journal of Applied Microbiology*, 85, 2, 211–218.
- Ultee, A., Kets, E. P. W., Alberda, M., Hoekstra, F. A. ve Smid, E. J., 2000a. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol, *Archives of Microbiology*, 174, 4, 233–238.
- Ultee, A., Kets, E. P. W. ve Smid, E. J., 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 10, 4606–4610.
- Ultee, A., Slump, R. A., Steging, G. ve Smid, E. J., 2000b. Antimicrobial Activity of Carvacrol toward *Bacillus cereus* on Rice, *Journal of Food Protection*, 63, 5, 620–624.
- Van Alphen, L. B., Burt, S. A., Veenendaal, A. K. J., Bleumink-Pluym, N. M. C. ve van Putten, J. P. M., 2012. The Natural Antimicrobial Carvacrol Inhibits *Campylobacter jejuni* Motility and Infection of Epithelial Cells, *Plos One*, 7, 9, e45343.
- Varel, V. H., 2002. Carvacrol and thymol reduce swine waste odor and pathogens: Stability of oils, *Current Microbiology*, 44, 1, 38–43.
- Vila, J., Sáez-López, E., Johnson, J. R., Römling, U., Dobrindt, U., Cantón, R., Giske, C. G., Naas, T., Carattoli, A., Martínez-Medina, M., Bosch, J., Retamar, P., Rodríguez-Banõ, J., Baquero, F. ve Soto, S. M., 2016. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings, *FEMS Microbiology Reviews*, 40, 4, 437–463.

- Wang, L. H., Wang, M. S., Zeng, X. A., Zhang, Z. H., Gong, D. M. ve Huang, Y. B., 2016. Membrane Destruction and DNA Binding of *Staphylococcus aureus* Cells Induced by Carvacrol and Its Combined Effect with a Pulsed Electric Field, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 32, 6355–6363.
- Wang, Q., Gong, J., Huang, X., Yu, H. ve Xue, F., 2009. In vitro evaluation of the activity of microencapsulated carvacrol against *Escherichia coli* with K88 pili. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 6, 1781–1788.
- Weiss, J., Loeffler, M. ve Terjung, N., 2015. The antimicrobial paradox: why preservatives lose activity in foods, *Current Opinion in Food Science*, 4, 69–75.
- Wijesundara, N. M., Lee, S. F., Cheng, Z., Davidson, R. ve Rupasinghe, H. P. V., 2021. Carvacrol exhibits rapid bactericidal activity against *Streptococcus pyogenes* through cell membrane damage, *Scientific Reports*, 11, 1, 1–14.
- Windiasti, G., Feng, J., Ma, L., Hu, Y., Hakeem, M. J., Amoako, K., Delaquis, P. ve Lu, X., 2019. Investigating the synergistic antimicrobial effect of carvacrol and zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*, *Food Control*, 96, 39–46.
- Wongkattiya, N., Sanguansermisri, P., Fraser, I. H. ve Sanguansermisri, D., 2019. Antibacterial activity of cuminaldehyde on food-borne pathogens, the bioactive component of essential oil from *Cuminum Cyminum* L. collected in Thailand, *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 16,4.
- Xu, D., Wei, M., Peng, S., Mo, H., Huang, L., Yao, L. ve Hu, L., 2021. Cuminaldehyde in cumin essential oils prevents the growth and aflatoxin B1 biosynthesis of *Aspergillus flavus* in peanuts, *Food Control*, 125, 107985.
- Xu, J., Zhou, F., Ji, B. P., Pei, R. S. ve Xu, N., 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*, *Letters in Applied Microbiology*, 47, 3, 174–179.
- Yaman, N., Ötleş, S. ve Özdestan Ocak, Ö., 2023. Süt ve Süt Ürünlerinde Kekik ve Kekik Uçucu Yağlarının Kullanımı, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 28, 2, 762–774.
- Yaman, S., Özdemir, Z., Şit, M., Özer, B. ve Çatal, O., 2018. Kekik Yağı Karvakrol'ün İnsan Sağlığına Etkileri, *SETSCI Conference Indexing System*, 2, 391–392.
- Yücel Şengün, İ. ve Öztürk, B., 2018. Bitkisel Kaynaklı Bazı Doğal Antimikrobiyaller, *Anadolu University Journal of Science and Technology*, 7, 2, 256–276.
- Zhang, J., Ma, S., Du, S., Chen, S. ve Sun, H., 2019. Antifungal activity of thymol and carvacrol against postharvest pathogens *Botrytis cinerea*, *Journal of Food Science and Technology*, 56, 5, 2611–2620.
- Zhou, F., Ji, B., Zhang, H., Jiang, H., Yang, Z., Li, J., Li, J. ve Yan, W., 2007. The Antibacterial Effect Of Cinnamaldehyde, Thymol, Carvacrol And Their Combinations Against The Foodborne Pathogen *Salmonella Typhimurium*, *Journal Of Food Safety*, 27, 2, 124–133.

URL-1 < https://tr.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli >, Erişim Tarihi:28.08.2023.

URL-2 < <https://www.mutbirlik.com/urun/dogal-kekik-tohumu-1-gram> >, Erişim Tarihi: 25.11.2023.

URL-3 < <https://www.anavarzabal.com/blog/kekik-bitkisi-ve-kekik-bali> >, Erişim Tarihi: 25.11.2023.

URL-4 < <https://www.ekodoga.com/urun/sivri-kekik-tohumu-50-gr-tibbi-aromatik-bitki-tohumu> >, Erişim Tarihi: 18.12.2023.

URL-5 < <https://tr.wikipedia.org/wiki/Et> >, Erişim Tarihi: 15.01.2024.

URL-6 < https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2020-07/Salm_RTE_Risk_Assess_ExecSumm_Sep2005.pdf >, Erişim Tarihi: 22.02.2024.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Merve Nur ÖZBEK

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Aksaray Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü,
2015-2020

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim
Dalı, 2021-

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. Yozgat Et ve Süt Kurumu (Et Entegre Tesisi) 2018 / Yaz Stajı
2. Kayseri Sütçübey Süt Ürünleri Fabrikası 2018 / Yaz Stajı

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Kongrelerde Sunulan Makaleler

1. Karvakrol, Timol ve Küminaldehitin *E. coli* ATCC 25922 ile kontamine edilmiş kıyma örneklerinde doğal antimikrobiyal olarak tek tek ve kombine kullanımları durumunda koruyuculuklarının belirlenmesi / 7. Uluslararası Palandöken Bilimsel Araştırmalar Kongresi, 02-03 Aralık 2023/ ERZURUM/ TÜRKİYE