

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SOUS VİDE YÖNTEMİYLE PİŞİRİLEN KIYMAYA EKLENEN
ZEYTİN YAPRAĞI EKSTRAKTININ LİSTERİA
MONOCYTOGENES ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Özlem KIYMETLİ

Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Serap C. AKDEMİR

Haziran 2016

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SOUS VIDE YÖNTEMİYLE PİŞİRİLEN KIYMAYA
EKLENEN ZEYTİN YAPRAĞI EKSTRAKTININ
LİSTERİA MONOCYTOGENES ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Özlem KIYMETLİ

Enstitü Anabilim Dalı

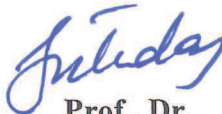
:

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Bu tez ^{23/06/2016} tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği/~~oyçokluğu~~ ile kabul edilmiştir.



Doç. Dr.
Serap C. AKDEMİR
Jüri Başkanı



Prof. Dr.
Sühendan MOL TOKAY
Üye



Yrd. Doç. Dr.
Ayşe AVCI
Üye

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Özlem KIYMETLİ
23.06.2016



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, tez çalışmamda beni yönlendiren ve tüm aşamalarında yanımda olarak katkılarını esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Serap COŞANSU AKDEMİR'e,

Çalışmanın maddi açıdan desteklenmesine olanak sağlayan Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığın'a (Proje No: 2015-50-01-050),

Laboratuvar olanakları konusunda anlayış ve yardımlarını esirgemeyen Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölüm Başkanı Doç. Dr. Ahmet AYAR'a,

Laboratuvar aşamasında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Ayşe SARIÇAM'a, Arş. Gör. Eda KILIÇ'a, Arş. Gör. Ahmet Ali BERBER'e, Arş. Gör. Esra BİLGİN'e ve arkadaşım Merve Ayşe DOĞANCI'ya,

Hayatım boyunca olduğu gibi tez aşamasında da maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen Annem Fatma KIYMETLİ'ye, Babam Zühtü KIYMETLİ'ye ve Kardeşlerim Özge KIYMETLİ ve Öznur KIYMETLİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	viii
SUMMARY.....	ix
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Zeytin yaprağının bileşimi ve özellikleri.....	3
2.2. Zeytin yaprağı ekstraktının gıdalarda kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalar.....	7
2.2.1. Et ve et ürünleri.....	7
2.2.2. Su ürünleri.....	8
2.2.3. Diğer ürünler.....	9
2.3. <i>Listeria monocytogenes</i> 'in özellikleri.....	10
2.4. Sous vide yöntemi.....	13
2.4.1. Sous vide yönteminin uygulanışı.....	13
2.4.2. Sous vide ürünlerinin raf ömrü ve raf ömrünü artırma üzerine yapılan çalışmalar.....	16
2.4.3. Sous vide pişirmenin gıdaların besin değerine etkisi.....	17

2.4.4. Sous vide pişirmenin kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri...	19
2.5. Sous vide ürünlerinde doğal antimikrobiyel maddelerin kullanımı.....	20
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.2. Yöntem.....	23
3.2.1. Kullanılan araç ve gereçler.....	23
3.2.2. Antimikrobiyel aktivite tayini.....	24
3.2.3. <i>Listeria monocytogenes</i> inokulumunun hazırlanması.....	24
3.2.4. In vitro koşullarda zeytin yaprağı ekstraktının <i>L. monocytogenes</i> üzerine etkisinin belirlenmesi.....	25
3.2.5. Kıyma örneklerinin hazırlanması ve inokülasyonu.....	26
3.2.6. Kıyma örneklerinin sous vide yöntemi ile pişirilmesi.....	26
3.2.7. Mikrobiyolojik analizler.....	27
3.2.7.1. Hammaddede yapılan mikrobiyolojik analizler.....	27
3.2.7.2. <i>Listeria monocytogenes</i> sayımı.....	27
3.2.8. Su aktivitesi ölçümü.....	28
3.2.9. İstatistik değerlendirme.....	28
BÖLÜM 4.	
ARAŞTIRMA BULGULARI.....	29
4.1. Disk difüzyon yöntemiyle antimikrobiyel aktivite tayini sonuçları....	29
4.2. Zeytin yaprağı ekstraktı varlığında ısıl işlemin in vitro koşullarda <i>L. monocytogenes</i> üzerine etkisi.....	30
4.3. Sous vide yöntemi ile farklı sıcaklıklarda pişirilen kıymada zeytin yaprağı ekstraktının <i>L. monocytogenes</i> üzerine etkisi.....	34
4.3.1. Kıyma örneklerine ait <i>L. monocytogenes</i> sayım sonuçları.....	34
4.3.2. Su aktivitesi ölçüm sonuçları.....	39
BÖLÜM 5.	
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	40

KAYNAKLAR.....	46
ÖZGEÇMİŞ.....	55



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AAE	: Askorbik asit eşdeğeri
BHT	: Bütilendirilmiş hidroksi tolue
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
HA	: Heterosiklik amin
HCA	: Heterosiklik aromatik amin
Kob	: Koloni oluşturan birim
Lab	: Laktik asit bakterileri
MFC	: Minimum fungusit konsantrasyonu
MIC	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
MS	: Metilselüloz
PAH	: Polisiklik aromatik hidrokarbon
SOD	: Süperoksit dismutaz
SV	: Sous vide
TMA-N	: Trimetilamin azot
TPAB	: Toplam psikrofil aerob bakteri
TSA	: Tryptic soy agar
TSBYE	: Tryptic soy broth + yeast extract
TVB-N	: Toplam uçucu bazik azot
ZYE	: Zeytin yaprağı ekstraktı

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. ZYE'de bulunan fenolik bileşenler.....	4
Şekil 2.2. Oleuropein bileşiğinin yapısı.....	4
Şekil 4.1. TSBYE besiyerinde 55°C'de ısıtıl işlem uygulanan <i>L. monocytogenes</i> kültüründe meydana gelen azalma miktarları	32
Şekil 4.2. TSBYE besiyerinde 60°C'de ısıtıl işlem uygulanan <i>L. monocytogenes</i> kültüründe meydana gelen azalma miktarları.....	33
Şekil 4.3. TSBYE besiyerinde 65°C'de ısıtıl işlem uygulanan <i>L. monocytogenes</i> kültüründe meydana gelen azalma miktarları.....	34
Şekil 4.4. 55°C'de sous vide pişirilen kıymaların <i>L. monocytogenes</i> azalma miktarları.....	36
Şekil 4.5. 60°C'de sous vide pişirilen kıymaların <i>L. monocytogenes</i> azalma miktarları.....	37
Şekil 4.6. 65°C'de sous vide pişirilen kıymaların <i>L. monocytogenes</i> azalma miktarları.....	38

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Sous vide yönteminin avantajları ve dezavantajları.....	15
Tablo 4.1. Zeytin yaprağı ekstraktının DMS-O ve su ile farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ZYE'nin patojen bakterilere karşı antimikrobiyel aktivitesini gösteren disk difüzyon testi sonuçları.....	29
Tablo 4.2. In vitro denemelerinde sıcaklık ölçüm sonuçları.....	30
Tablo 4.3. TSBYE besiyerinde 55°C'de ısıtıl işlem uygulanan denemeye ait <i>L. monocytogenes</i> sayım sonuçları.....	31
Tablo 4.4. TSBYE besiyerinde 60°C'de ısıtıl işlem uygulanan denemeye ait <i>L. monocytogenes</i> sayım sonuçları.....	32
Tablo 4.5. TSBYE besiyerinde 65°C'de ısıtıl işlem uygulanan denemeye ait <i>L. monocytogenes</i> sayım sonuçları.....	33
Tablo 4.6. Sous vide pişirme uygulamada iç sıcaklık ölçüm sonuçları.....	35
Tablo 4.7. 55°C 'de sous vide pişirilen kıymaların <i>L. monocytogenes</i> sayım sonuçları.....	35
Tablo 4.8. 60°C 'de sous vide pişirilen kıymaların <i>L. monocytogenes</i> sayım sonuçları.....	36
Tablo 4.9. 65°C 'de sous vide pişirilen kıymaların <i>L. monocytogenes</i> sayım sonuçları.....	38
Tablo 4.10. Sous vide pişirilen (55, 60 ve 65°C) kıymaların aw değerleri.....	39

ÖZET

Anahtar kelimeler: Zeytin yaprağı ekstraktı, sous vide, antimikrobiyel aktivite, *Listeria monocytogenes*, kıyma

Çalışma üç aşamada gerçekleştirilmiş olup, ilk aşamada dimetil sülfoksit ve saf su ile farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış zeytin yaprağı ekstraktının (ZYE) *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* Biyotip I ve *Bacillus cereus* üzerine antimikrobiyel etkisi disk difüzyon yöntemi ile test edilmiştir. ZYE %40 ve %50 konsantrasyonlarda test edilen tüm bakterilere karşı etkili olmakla birlikte, en yüksek antimikrobiyel etkinin daha geniş çapta inhibisyon zonu oluşumunun gözlemlendiği *L. monocytogenes* 'e karşı olduğu saptanmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında ZYE (%0,5 ve %1) ilave edilmiş ve 7-8 log kob/ml düzeyinde *L. monocytogenes* inoküle edilmiş TSBYE besiyerine farklı sıcaklıklarda (55, 60, 65°C) ısıtılma işlemi uygulanmıştır. In vitro koşullarda gerçekleştirilen bu denemelerde ZYE ilave edilmiş örneklerde *L. monocytogenes* sayısı ZYE ilave edilmemiş kontrol örneklerinden genellikle düşük olmakla birlikte, söz konusu fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($P>0,05$).

Üçüncü aşamada ise kıyma örneklerine 7-8 log kob/g düzeyinde *L. monocytogenes* aşılandıktan sonra %1 oranında ZYE ilave edilip vakum paketlenmiş ve aynı sıcaklıklarda sous vide yöntemi ile pişirilmiştir. *L. monocytogenes* sayısı 55°C'de 30 dakika süreyle pişirilen kontrol ve ZYE ilave edilmiş kıyma örneklerinde sırasıyla 0,96 ve 1,27 log kob/g azalmıştır. Diğer yandan patojenin kontrol ve ZYE ilave edilmiş örneklerdeki sayısında 60°C'de 20 dakikada sırasıyla 2,79 ve 3,83 log kob/g, 65°C'de 7,5 dakikada ise sırasıyla 1,69 ve 2,36 log kob/g azalma meydana gelmiştir.

Gerek in vitro koşullarda gerekse kıyma ile yapılan denemelerde ısıtılma işlem sıcaklığı yükseldikçe *L. monocytogenes* sayısında daha fazla azalma meydana geldiği ve zeytin yaprağı ekstraktının patojenin yıkımına katkıda bulunduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, zeytin yaprağı ekstraktının ısıtılma işlem görmüş et ürünlerinde *L. monocytogenes*'in kontrol altına alınmasında doğal antimikrobiyel olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

THE EFFECT OF OLIVE LEAF EXTRACT ADDED IN SOUS VIDE COOKED GROUND BEEF ON *LISTERIA MONOCYTOGENES*

SUMMARY

Keywords: olive leaf extract, sous vide, antimicrobial activity, *Listeria monocytogenes*, ground beef

The study was performed in three stages. At first stage, different concentrations olive leaf extract (OLE) were prepared with dimethyl sulfoxide and distilled water and then their antimicrobial activities on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* Biotype I and *Bacillus cereus* was tested by disc diffusion assay. Although OLE in 40% and 50% concentrations was effective on all tested pathogens, the highest antimicrobial effect was on *L. monocytogenes* which yielded the largest inhibitions zone.

At the second stage, OLE added (0,5% and 1%) TSBYE was inoculated with *L. monocytogenes* (7-8 log cfu/ml) and heated at different temperatures (55, 60, 65°C). In these experiments conducted in vitro conditions *L. monocytogenes* counts were lower in OLE added samples than those without OLE, however these differences were not statistically significant ($P>0.05$).

At the third stage, ground beef samples were inoculated with *L. monocytogenes* at the level of 7-8 log cfu/g and added with 1% OLE. Then they were vacuum packaged and sous vide cooked at the same temperatures. *L. monocytogenes* counts reduced by 0.96 and 1.27 log cfu/g in control and OLE added samples, respectively. On the other hand, counts of pathogen in control and OLE added samples sous vide cooked at 60°C for 20 minutes reduced by 2.79 and 3.83 log cfu/g, respectively, while reduced by 1.69 and 2.36 log cfu/g, respectively, in those of cooked at 65°C for 7.5 minutes.

It was observed that destruction of *L. monocytogenes* was increased by increasing temperature and OLE caused more reduction in population of the pathogen. According to these findings, it was concluded that OLE can be used as a natural antimicrobial in heat processed meat products to control *L. monocytogenes*.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Ülkemizde bolca bulunan zeytin ve zeytin ürünleri antioksidan ve antimikrobiyel özelliklerinden dolayı insan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir. Zeytinyağı üretiminde yan ürün olan zeytin yaprağı güçlü antimikrobiyel etki göstermektedir (Markin ve ark., 2003; Pereira ve ark., 2007). Zeytin yaprağı ekstraktı (ZYE) sentetik antioksidanlara (Harp, 2011) ve çeşitli endüstrilerde kullanılan sentetik antimikrobiyel maddelere karşı iyi birer alternatif olabilir (Korukluoğlu ve ark., 2006).

Geleneksel pişir-soğut yönteminin arzu edilmeyen besinsel, duyuşal ve mikrobiyel değişimlerinden dolayı gıda ile çevresel koşullar arasında set oluşturacak materyallerle zenginleştirilmiş pişir-soğut yöntemleri geliştirilmiştir (Hui ve ark., 2004). Bu yöntemlerden biri olan sous vide yöntemi, çiğ veya pişmiş gıdaların vakumlu poşet içerisinde kontrollü sıcaklık ve süre uygulanarak pişirilmesi tekniğidir (Schellekens ve Martens, 1993). Böylece sous vide paketlenme ile ürünü mikrobiyel, fiziksel ve duyuşal kalite kaybından korumak mümkündür (Jang ve ark., 2006).

Sous vide yönteminin aşamaları farklılık göstermekle birlikte genel olarak ön hazırlık, vakum poşetleme, pişirme ve soğutmadır (Hui ve ark., 2004; Schellekens, 1996; Yılmaz ve Bilici, 2014). Bu aşamalardan vakum paketlenme aracılığıyla çevreden gelebilecek kontaminasyon riski azaldığından raf ömrü artar, oksijenle teması kesildiği için oksidasyondan doğabilecek problemler azalır ve ısının etkili bir şekilde ürüne transferi sağlanır (Baldwin, 2012). Bu yöntemin raf ömrü, besin değeri ve antimikrobiyel aktivitesi üzerine yaptığı katkıları gösteren çalışmalar mevcuttur (Simpson ve ark.,1995; Rinaldi ve ark., 2014; Jang ve Lee, 2005; Coşansu ve ark., 2011; Çetinkaya, 2013)

Kırmızı et, kanatlı eti, süt ürünleri vb. gıdalardan *Listeria* türlerini izole etmek mümkündür (Yavuz, 2015). *Listeria monocytogenes* sporsuz, fakültatif anaerob, Gram pozitif patojen bir bakteridir. Birçok farklı üründe geniş gelişme sıcaklık aralığından dolayı bulunabilir (Farber ve ark., 1991; Mackiw ve ark., 2016). Antibiyotiklere karşı direnç gösterebilen bu bakteri (Mackiw ve ark., 2016) anaerobik koşullarında gelişebilmesinden dolayı sous vide yönteminin vakum poşetleme ve soğukta gelişebilmesinden dolayı soğutma aşamasına dikkat edilmelidir. Ayrıca bu bakteri türüne karşı antilisterik etki üzerine yapılan çalışmalar da (Mytle ve ark., 2006; Friedman ve ark., 2002) *Listeria* gelişimini engelleyecek veya sınırlandıracak antimikrobiyel özellikte bitkisel ürünler belirtilmiştir.

Bu çalışmada, ilk aşamada piyasadan temin edilen ticari zeytin yaprağı ekstraktının gıda kaynaklı patojen bakterilere (*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* Biyotip 1; *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Bacillus cereus*) antimikrobiyel etkisi in vitro koşullarda disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. İkinci aşamada ise ZYE'nin in vitro koşullarda TSBYE besiyerine ve kıymaya 10^7 - 10^8 kob/ml-g düzeyinde aşıl原因an *L. monocytogenes* üzerine farklı sıcaklık (55, 60, 65°C) ve sürelerde uygulanan ısıt işlem sırasındaki etkisi araştırılmıştır.

BÖLÜM 2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Zeytin Yaprığının Bileşimi ve Özellikleri

Akdeniz uygarlığının sembolü olan zeytin ağacı, sofralık zeytin ve zeytinyağı üretmek için eski zamanlardan beri yetiştirilmektedir. Zeytin üretimi ülkemizde Ege, Marmara, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu'da yapılmaktadır (Gülcü ve Demirci, 2008). İspanya, İtalya ve Yunanistan'dan sonra dünya zeytin üretiminde dördüncü sırada yer alan ülkemiz 2015 yılında 172 milyona yakın ağaç sayısı ile 1,7 milyon ton toplam üretim miktarına ulaşmıştır. Bu üretilen zeytinlerin 1,3 milyon tonu yağlık olarak kullanılmaktadır (Tuik, 2015; FAO, 2015).

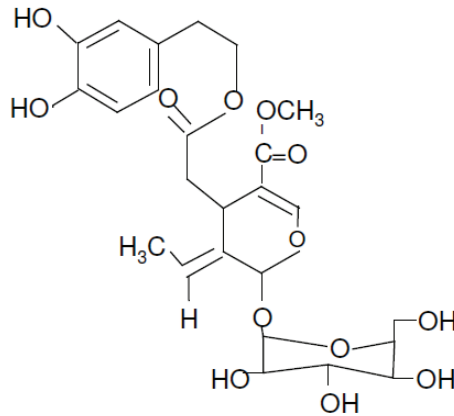
Zeytin antibakteriyel ve antifungal aktiviteye sahip polifenoller bakımından güçlü bir kaynaktır (Faiza ve ark., 2011). Zeytin posasından elde edilebilen fenolik bileşenler patojenlere karşı doğal fungusit (Wilkenhausen ve ark., 2005) ve zeytin çekirdeği doğal antioksidan olarak kullanılabilir (Silva ve ark., 2006).

Zeytinyağı yan işleme ürünlerinden zeytin yaprağı ve zeytin karasuyu fenolik bileşenlerce zengindir (Basmacıoğlu-Malayoğlu ve Aktaş, 2011). Zeytin yaprağında 14 farklı fenolik bileşen (Şekil 2.1) belirlenmiş olup, bunlardan en fazla bulunanlar oleuropein, hydroxytyrosol, luteolin-7-glucoside, epigenin-7-glucoside ve verbascido'dur (Benavente-Garcia ve ark., 2000). Bu bileşiklerden oleuropein (Şekil 2.2) zeytinde acı karakteristiktir (Yıldız ve Uylaşer, 2011).

oleuropeoside	flavone	flavonol	flavan-3-ol	substitutue olmuş fenoller
• oleuropein • verbascoside	• luteolin-7-glucoside • apigenin-7-glucoside • diosmetin-7-glucoside • luteolin • diosmetin	• rutin	• catechin	• tyrosol • hydroxytyrosol • vanilin • vanillic acid • caffeic acid

Şekil 2.1. ZYE’de bulunan fenolik bileşenler (Benaventa-Garcia ve ark., 2000)

Oleuropein bileşiği zeytinin olgunluk derecesi ve nem içeriği ile ilişkilidir. Bu bileşiğin konsantrasyonu, zeytinde olgunluk ve nem arttıkça azalırken zeytin yaprağında olgunluk arttıkça artmaktadır (Menduh, 2015).



Şekil 2.2. Oleuropein bileşiğinin yapısı (Wilkenhausen ve ark., 2005)

Oleuropeinin hidrolizi ile elde edilen 3,4-dihydroxyphenylethanol-elenolic acid (3,4 DHPEA-EA) metabolitinin Gram pozitif bakterilerin farklı suşları üzerine antimikrobiyel etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis*’e karşı etkili olduğu belirlenmiş ve bu metabolitin deri enfeksiyonlarının tedavisinde doğal antimikrobiyel kaynak olarak kullanılabileceğinden bahsedilmiştir (Bisignano ve ark., 2014). Başka bir çalışmada ise zeytinlerin kullanımının mikrobiyel enfeksiyonların kontrolünde yararlı etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Faiza ve ark., 2011).

Mevsimsel değişimler zeytin yapraklarındaki fenolik bileşikleri ve antioksidan aktivitelerini önemli derecede etkilemektedir. Eylül ayında toplam antioksidan aktivite ve fenolik madde miktarı daha düşük bulunurken, en yüksek antioksidan aktivite Haziran, en yüksek fenolik bileşen miktarı ise Aralık ayında bulunmuştur. Bu nedenle yüksek konsantrasyonda oleuropein bileşimini elde edebilmek için zeytin yapraklarının Aralık ayında zeytin siyah döneme geçiş yaptığında toplanması ve kurutularak saklanması gerektiği belirtilmektedir (Saygın, 2009; Menduh, 2015).

Zeytin yaprağı ekstraktının toplam fenolik içeriği 1,60 mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g kuru ağırlık (Hayes ve ark., 2011), bağıl antioksidan kapasitesi 966 µg askorbik asit eşdeğeri (AAE)/g ve toplam fenolik içeriği 197,42 mg GAE/g'dır (Aytul, 2010). Bu fenolik bileşenlerden ekstraktta en çok bulunan oleuropein ($1151,5 \pm 57,2$ µg/ml), verbacoside ($68,8 \pm 0,8$ µg/ml), luteolin-7-O-glucoside ($25,6 \pm 0,6$ µg/ml), apigenin-7-O-glucoside ($15,9 \pm 0,7$ µg/ml), hydroxytyrosol ($10,2 \pm 0,1$ µg/ml) ve tyrosol ($15,6 \pm 0,1$ µg/ml) 'dür (Hayes ve ark., 2011).

Zeytin yapraklarının kurutulmasında C vitamini ve fenolik bileşenlerin önemli miktarda kaybına sebep olmayacak 40°C'da uygulanan sıcak hava kurutma yöntemi en iyi seçenektir (Sakallı ve Aktaş, 2011). Mevsimsel değişimlerin ve kurutma işlemlerinin zeytin yapraklarının bileşimine etkisinin yanı sıra zeytin yapraklarına uygulanan farklı çözücülerle muamele edilen ekstraktların da antifungal aktiviteleri farklılık gösterebilir.

Korukluoğlu ve ark. (2006) tarafından yapılan; etanol, etil asetat, aseton ve su ile elde edilen zeytin yaprağı ekstraktlarının seçilen bazı mayalar üzerine disk difüzyon yöntemi ile antifungal aktiviteleri değerlendirilmiştir. Çeşitli çözücüler kullanılarak elde edilen ekstraktlar mayalar üzerinde çeşitli derecelerde antifungal etki göstermiştir. Ayrıca zeytin yaprağı ekstraktlarının mayalara karşı MIC, MFC ve inhibisyon zon çapları sırasıyla 10-28 µg/ml, 20-48 µg/ml ve 1,5-9,3 mm'dir. Ayrıca çalışmada antifungal direncin yaprak ekstraktlarının aktif bileşenlerinin yanı sıra mikroorganizmanın cins, tür, suş ve izolasyon kaynağına da bağlı olabileceğini belirtilmiştir.

Zeytin yaprağı ve keklik otu ile beslenen hindilerin göğüs filetoları 12 gün boyunca soğuk depolanmıştır. Bu süre zarfında her iki üründe de lipit oksidasyonu ertelenmiştir. Bu etkiyi gerçekleştiren zeytin yaprakları keklik otuna göre daha etkili bulunmuştur. Depolama boyunca ise toplam canlı sayısı, laktik asit bakterileri, enterobakteriler ve psikrotrofik bakterilerinin gelişimi üzerinde inhibitör etki göstermiştir (Botsoglou ve ark., 2010).

Tavuk yemlerine zeytin yaprağı ilavesinin yumurtanın oleuropein içeriğini ve yumurta sarı rengini arttırdığı, yumurta sarısı kolesterol düzeyini ise düşürdüğü tespit edilmiştir. Böylece karmada zeytin yaprağı kullanımının fonksiyonel yumurta üretiminde kullanılma potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir (Çayan, 2013).

Zeytin üretiminde zeytin yaprağı ilavesi ile yağların antioksidan aktiviteleri arttırılabilir ve duyuşal olarak daha kaliteli yağlar elde edilebilir. Yağlardaki acılık ve yakıcılık şiddetleri yağlara yaprak ilave edildikçe artmıştır. Depolama süresince ise acılık ve yakıcılık şiddeti azalmıştır (Sevim, 2011).

Rafine zeytinyağının oksidatif direncinde, zeytin yaprağının ticari zeytin yaprağı ekstraktı kadar yada daha etkili olduğu belirlenmiştir. Ancak sentetik antioksidanlardan bütillendirilmiş hidroksi toluen (BHT) ve bütillendirilmiş hidroksi anisol (BHA)'dan daha az antioksidan aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Harp, 2011).

Sudjana ve ark. (2009) ticari ZYE'nin antimikrobiyel aktivitesi üzerine yaptıkları bir çalışmada *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus* [metisiline hassas], *S. aureus* [metisiline dirençli], *Salmonella enterica* için minimum inhibisyon konsantrasyonlarını sırasıyla %25, %25-50, %0,8-6,2, %0,8-12,5 ve %25 (v/v) olarak belirlemişlerdir. Bu değerlere göre bu 5 bakteri türünden ZYE'ye karşı en hassas olan *S. aureus*'tur. Başka bir çalışmada ise zeytin yaprağı ekstraktına karşı en hassas bakterilerin *E. coli*, *L. innocua* ve *S. carnosus* olduğu belirlenmiştir (Aytul, 2010).

Pereira ve ark. (2007) ise ZYE'ye karşı hassaslıklarına göre mikroorganizmaları *B.cereus* ~ *C. albicans* > *E. coli* > *S. aureus* > *C. neoformans* ~ *K. pneumoniae* ~ *P.aeruginosa* > *B. subtilis* olarak sıralamıştır. Aynı çalışmada 7 fenolik bileşen tanımlanmış ve bunlardan oleuropeinin en etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ZYE'deki fenoliklerin iyi radikal temizleyici aktivitelerinin yanı sıra süperoksit dismutaz (SOD)'a benzer aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu tip aktivite gösteren fenolikler oleuropein, kafeik asit, rutin ve bunların kombinasyonlarıdır (Lee ve ark., 2010).

Markin ve ark. (2003) tarafından %0,6 (w/v) konsantrasyonda su ile hazırlanan zeytin yaprağı ekstraktının tüm test edilen bakterileri 3 saat içerisinde öldürdüğü belirlenmiştir. Bu konsantrasyon 24 saat içerisinde *E. coli*'nin tamamen yıkımı için etkili olmuştur. Başka bir çalışmada ise *S. aureus*'un gelişimi ve enterotoksin B üretimi %0,2'den daha düşük konsantrasyondaki oleuropein ile engellenebilmiştir (Tranter ve ark., 1993).

Zeytin ve zeytin ürünleri antioksidan ve antimikrobiyel özelliklerinden dolayı insan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir. Zeytinyağı üretiminde yan ürün olan zeytin yaprağı güçlü antimikrobiyel etki göstermektedir (Markin ve ark., 2003; Pereira ve ark., 2007). Zeytin yaprağı ekstraktı sentetik antioksidanlara (Harp, 2011) ve çeşitli endüstrilerde kullanılan sentetik antimikrobiyel maddelere karşı iyi birer alternatif olabilir (Korukluoğlu ve ark., 2006).

2.2. Zeytin Yaprağı Ekstraktının Gıdalarda Kullanımı ile İlgili Yapılan Çalışmalar

2.2.1. Et ve et ürünleri

Sentetik antioksidanlara karşı olumsuz bir tutum sergilenmesi ve zararlı etkilerinden dolayı doğal antioksidanlara olan yönelim et ve kanatlı et endüstrisinde de kendisini göstermiştir (Karre ve ark., 2013).

Meyve ve bitki materyalleri yüksek fenolik içeriklerinden dolayı iyi birer alternatif olabilir. Nar, kızılcıam ve karanfil gibi ürünler endüstride kullanılan sentetik antioksidanların bazılarında daha iyi antioksidan özellik göstermektedir (Karre ve ark., 2013). Antioksidan aktivite açısından, zeytin yapraklarının radikal yakalama kapasitesinin BHT'den daha yüksek, BHA ile benzer veya daha etkili bulunduğu için ZYE'de bu tür ürünlere iyi birer alternatif olabilir (Harp, 2011).

Paketlenen çiğ sığır köftesinin raf ömrünü arttırma ve kalitesi üzerine ellajik asit (300 ve 600 µg/g), sesamol (250 ve 500 µg/g), lutein (100 ve 200 µg/g) ve ZYE (100 ve 200 µg/g)'nin etkisinin incelendiği çalışmada; bu ürünlerin sığır ürünlerinin rengini, lipid stabilitesini ve mikrobiyel kalitesini arttırmada potansiyel etki sahibi olduğundan ve fonksiyonel ve doğal igrediyentler olarak kullanılabileceğinden bahsedilmiştir. Ayrıca bu doğal igrediyentler et ürünlerine zararlı etkiye sahip olmaksızın eklenebilir. Bu bileşenlerin antioksidan potansiyelleri sırasıyla ellajik asit > sesamol > ZYE > lutein'dir (Hayes ve ark., 2010; 2011).

Zeytin yaprağı özütünün kırmızı ete %1, %2 ve %3 konsantrasyonlarda uygulandığı çalışmada (Aytul, 2010); %2 ve %3'lük konsantrasyonlar 4°C'de 9 gün depolanan örneklerdeki mikrobiyel yükü kontrol altında tutmuştur. Oksidatif bozulmayı ise diğerlerine nazaran %2'lik konsantrasyon geciktirmiştir. Ancak LAB üzerinde ZYE'nin inhibitör etkisi bulunmamıştır.

2.2.2. Su ürünleri

Ahmed ve ark. (2014) çiğ soyulmuş temizlenmemiş (pud) karideslerin mikrobiyel yükü üzerinde ZYE'nin etkisini araştırdıkları çalışmada; %0,5, %1 ve %2 ZYE içeren suya (4°C) karidesler 3 saat süreyle daldırılmıştır. ZYE'nin %1'lik konsantrasyonu kontrole kıyasla aerobik ve koliform bakteri sayısını en az 1 log kob/g azaltmıştır. %2'lik konsantrasyonun ise 4°C'de mikrobiyel yükü kontrol etmede en iyi etkiyi gösterdiği belirtilmiş ve su ürünleri endüstrisinde ZYE'nin doğal koruyucu olarak kullanılabilir olduğu vurgulanmıştır.

ZYE, 300 ppm'lik konsantrasyonda sardalyalara uygulanmış ve marinasyon sırasında mikrobiyel yükü kontrol altında tutarak oksidatif bozulmayı ve TVB-N oluşumunu geciktirmiştir. Ayrıca ekstrakt sardalya örnekleri üzerinde maya ve küf oluşumuna karşı daha hızlı bir etki göstermiştir (Aytul, 2010).

Acar (2012) 4°C'de depolanan sardalya, istavrit ve levrek balığı kıymaları üzerinde ZYE'nin kimyasal kalite parametrelerini ve renk ölçümlerini belirli aralıklarla 10 gün boyunca izlemiştir. ZYE balık kıymalarında toplam uçucu bazik azot, trimetilamin ve pH seviyeleri üzerinde etkili bulunmuştur. Ayrıca istavrit ve levrek kıymalarında ZYE lipid oksidasyonunu geciktirmiştir.

2.2.3. Diğer ürünler

ZYE'nin kullanım alanlarını çeşitlendirmek mümkündür. Günümüzde sıklıkla tükettiğimiz ürünlere ekstraktın uygulanmasının yanı sıra farklı özellikte ve fonksiyonel olarak tüketime sunulabilecek ürünler üretilebilmesi için yapılan çalışmalar da mevcuttur.

Kayısı püresi ile hazırlanan meyveli yoğurtlarda ZYE etkisinin incelendiği çalışmada; depolama sonunda ZYE içeren örneklerin toplam fenolik madde değerleri (1,14-1,17 mg GAE/g kuru madde) kontrol örneğine göre yüksek bulunmuştur ve yoğurt bakterilerinden *Streptococcus thermophilus*'un çalışmasında aktivatör özelliği tespit edilmiştir. Yoğurtlara eklenen ZYE arttıkça ürünün kurumadde miktarı ve antioksidan aktivitesi artmıştır. Ekstraktın meyveli yoğurda eklenmesiyle kimyasal ve fiziksel parametreleri üzerinde önemli değişiklik olmamıştır. Böylece fonksiyonel ürün olarak kayısı pürelili meyveli yoğurtların tüketime sunulabileceği ve duyuşal açıdan %0,4'lük ZYE ilavesinin kabul edilebilir olduğu belirtilmiştir (Peker, 2012).

Ayana (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, fiziksel özellikleri ve antimikrobiyel etkinliği yüksek olan %1,5 (a/h) ZYE içeren metilselüloz (MS) filmler yaklaşık 10^7 kob/ml *S. aureus* ile aşılınmış kaşar peyniri dilimlerine uygulanmıştır. Bu yenilebilir film *S. aureus* üzerinde etkili olmuştur. Depolamanın 7.ve 14. günlerinde sırasıyla *S.*

aureus 0,68 ve 1,22 log azalmıştır. Eklenen özüt miktarı arttıkça bakterinin inhibisyon zon çapında da artış gözlenmiştir. Böylece depolama süresince kaşar peynirinde bu tür bir uygulama mikrobiyolojik bozulmaları önleyebilir ve raf ömrünü arttırabilir. Ayrıca biyobozunur bu tür ambalajlar atık miktarını azaltarak çevre kirliliğini önleyebilir.

2.3. *Listeria monocytogenes*'in özellikleri

L. monocytogenes Gram pozitif, spor oluşturmeyen, kısa çubuk şeklinde, fakültatif anaerob bir bakteridir. Bu bakteri 20-37°C sıcaklıkta, pH 7 olduğunda ve su aktivitesinin 0,97 olduğu ortamlarda optimum gelişme gösterir (Anonim, 2011). Yaklaşık %30 ölüm oranına sahip Listeriosis olarak bilinen hastalığa neden olan, çevrede bolca bulunan, tipik buzdolabı sıcaklığı gibi düşük sıcaklıklarda dahi canlı kalabilen ve gelişebilen bir bakteri olduğu için tüketicilerde endişe yaratmaktadır (Anonim, 2011; Jae-Rim ve H. Marth, 1989). Özellikle yaşlılar, immun sistemi baskınlanmış bireyler, yeni doğanlar ve fetuslar yüksek ölüm oranına sahip olmakla beraber yüksek risk grubunu oluşturmaktadır (Hof ve ark., 1997; Lomonaco ve ark., 2015). Bu patojenin minimum, optimum ve maksimum gelişim sıcaklıkları veya sıcaklık aralıkları sırasıyla 0°C, 33°C ve 42,6-47°C'dir (Fang ve Huang, 2014; Huang, 2017). Bu bakteri ısıya karşı dirençli olup yapılan bir çalışmada pastörize edilen sosislerde *E. coli* O157 ve *Salmonella* Typhimurium'e göre daha dirençli bulunmuştur (Ducic ve ark., 2016).

Listeriosis özellikle tüketime hazır (Ready to Eat) gıda ürünleri ile ilişkilidir (Gram, 2004). RTE gıdalar genel olarak raf ömrü uzun ürünler olup vakum veya modifiye atmosferde paketlenerek depolanır ve ek pişirmeye ihtiyaç duyulmadan tüketilebilir. Bu nedenle *Listeria* enfeksiyonları için uygun bir ortam elde edilir. Özellikle *L. monocytogenes* aerobik ve anaerobik koşullar altında, düşük sıcaklıkta ve geniş pH aralığında gelişebildiği için bu tür ürünlerde risk yaratır (Valimaa ve ark., 2015). Bu özelliklerinden dolayı et ürünlerinde dikkat edilmesi gereken bir bakteridir (Espitia ve ark., 2013). Düşük pH ve su aktivitesine sahip bazı gıdalarda ve servis edilmeden önce ısıtılan dondurulmuş ürünlerde tüketiciler için risk nispeten

azalmaktadır (Tompkin, 2002). Bunun yanında et ürünlerinin raf ömrünü uzatmak için engel teknolojisi yararlı olabilir (Espitia ve ark., 2013; Stekelenburg, 2003). Hem raf ömrünü uzatmak hem de güvenilir ürünler elde edebilmek ve antimikrobiyel özelliklerinden yararlanmak için bu tür ürünlerde ekstraktların tek tek kullanımındansa uygun konsantrasyonda kombinasyonlarının kullanımı daha etkin antilisterik etki gösterebilmektedir (Jang ve ark., 2006; Rohani ve ark., 2011; Stekelenburg, 2003;). Sous vide yönteminin işlem basamaklarından vakum paketlenme ve soğuk depolamayı düşündüğümüzde bu patojen için uygun ortama sahip olduğunu söyleyebiliriz.

Saraiva ve ark. (2016) yaptıkları bir çalışmada vakum paketlenmede aerobik koşullara nazaran bu patojen daha iyi canlılığını korumuştur. Çalışmada bu durum, patojenin fakültatif anaerob bir bakteri olduğundan ve hava içeren paketli ürünlerde bozulma bakterilerinin gelişiminin daha iyi olmasından kaynaklı olabileceği şeklinde açıklanmıştır.

Aerobik ve anaerobik koşullar işlem görmemiş peynir ürünlerinde *L. monocytogenes*'in canlı kalması ve gelişimine izin verir . Ayrıca depolama sıcaklığı ve paketlenme koşulları *L. monocytogenes*'in canlı kalmasını etkileyebilir. Vakum paketlenme bakteriyel gelişimi engelleyebilir. Ancak depolama boyunca patojen canlı kalabilir (Bellio ve ark., 2016).

Yapılan başka bir çalışmada *L. monocytogenes* ile kontamine edilen sığır eti örneklerine FTS, nisin, lizozim, sitrik asit ve laktik asit kullanımının etkisi araştırılmış ve 10 günlük depolama sonunda sırasıyla azalma miktarları 0,1 log, 1,1 log, 1,5 log, 2,2 log ve 4.9 log olarak belirlenmiştir. Bu antimikrobiyel maddelerden en etkilisi laktik asit ve sitrik asit olmuştur (Akkuş, 2012).

Farklı kombinasyonlar denenerek antilisterik etki gösterebilecek uygulamalar yaratılabilir. Bunlardan Rohani ve ark. (2011) 30°C'de pH 5,6 ve 0 g/100 ml NaCl varlığında sarımsak ve nisin kombinasyonunun önemli antilisterik aktiviteye sahip olduğunu belirtmiştir.

Tavuk ürünleri için *L. monocytogenes* tehlike oluşturduğundan dolayı Mytle ve ark. (2006) tarafından tüketime hazır tavuk sosisi üzerinde bu bakteriyi engellemede karanfil yağının antimikrobiyel aktivitesi üzerine yapılan çalışmada; *L. monocytogenes*'in bütün suşları 5°C ve 15°C'de canlı kalmış, fakat hem %1 hem de %2'lik karanfil yağı varlığında gelişimi her iki depolama koşulları altında da engellenmiştir. *L. monocytogenes* popülasyonu düşük inokulum (10^2 - 10^3 kob/g) düzeyinde 5°C'de 2 haftalık depolama sonucunda kontrol örneklerinde 0,8-2,1 log₁₀ kob/g, 15°C'de 1 haftalık depolama sonunda ise 2,5-4,7 log₁₀ kob/g artış gerçekleşmiştir. Yüksek inokulum (10^4 - 10^6 kob/g) düzeyinde ise *L. monocytogenes* sayısı sırasıyla 0,4-1,4 log₁₀ kob/g, 2,3-3,5 log₁₀ kob/g artış göstermiştir. Buna karşın %1 ve %2'lik karanfil yağı ilave edilen örneklerde patojenin gelişimini engellemiştir.

Karanfil yağının antilisterik etkisinin değerlendirildiği Menon ve Garg (2001) tarafından gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise; 7°C ve 30°C'de depolanan et ve peynir örneklerinde %0,5 ve %1 konsantrasyonda karanfil yağı ilavesi *L. monocytogenes* gelişimini kısıtlamıştır. Karanfil yağının %1'lik konsantrasyonu daha iyi antilisterik aktivite göstermiş ve uygulanan her iki konsantrasyonda kontrole kıyasla *L. monocytogenes* sayısı 1-3 log₁₀ kob/g daha düşük bulunmuştur. Buna göre, et ve peynir ürünlerinde karanfil yağının kısa süreli depolamalarda doğal koruyucu olarak kullanılması mümkün olabilirken uzun süreli depolamada *L. monocytogenes* gelişimi devam edeceğinden gıda güvenliği bakımından risk oluşturabileceği sonucuna varılmıştır.

L. monocytogenes üzerine en etkili esansiyel yağların; gardenya, sedir, defne yaprağı, karanfil tomurcuğu, keklik otu, tarçın, yenibahar, kekik ve silhat yağları olduğu, en etkili yağ bileşenlerinin ise sinemaldehit, öjenol, timol, karvakrol, sitral, geraniyol, perilla aldehit, karvon, estragol ve salisilaldehit olduğu bildirilmiştir (Friedman ve ark., 2002).

2.4. Sous Vide Yöntemi

Geleneksel pişir-soğut yönteminin arzu edilmeyen besinsel, duyuşsal ve mikrobiyel değişimlerinden dolayı gıda ile çevresel koşullar arasında bir set oluşturacak plastik poşet veya tepsi ısıtıl işlemiden önce işleme dahil edilerek zenginleştirilmiş pişir-soğut yöntemi geliştirilmiştir. Son yıllarda bu yöntemin özel bir formu olan sous vide yöntemi de catering ve perakende sektöründe ilgi görmüştür (Hui ve ark., 2004).

2.4.1. Sous vide yönteminin uygulanışı

Sous vide çiğ veya pişmiş gıdaların vakumlu poşet içerisinde kontrollü sıcaklık ve süre uygulanarak pişirilmesi tekniğidir (Schellekens ve Martens, 1993). Yemek sektöründe ilk uygulamaları 1960'lara dayanan vakumda pişirme; 1970'lerden sonra Fransa'da geliştirilerek sous vide metodu ortaya çıkmıştır ve bu metot 1984'den bu yana ticari ve endüstri kuruluşlarından okul ve perakende sektörüne kadar geniş bir uygulama alanı bulmuştur (Schellekens ve Martens, 1993; Creed, 1995).

Sous vide yönteminin aşamaları ürüne göre farklılık göstermekle birlikte genel olarak ön hazırlık, ısıya dayanıklı poşetler içerisinde vakumlama, kontrollü koşullar altında pişirme ve hemen tüketilmeyecekse hızlı soğutma ve kontrollü depolamadır (Hui ve ark., 2004; Schellekens, 1996; Yılmaz ve Bilici, 2014). Bu metot uygulanırken dikkat edilmesi gereken önemli hususlar şunlardır:

- Hassas ürünler ve sıcak soslar tam olarak vakumlanmaz (Schellekens, 1996).
- Balık ve etler için yüksek sıcaklık istenmeyen kimyasal bileşenleri oluşturabileceğinden (Çiçek ve Bulgan, 2013) düşük sıcaklık (örn. 70°C'den düşük) ve sebzelerde kabul edilebilir tekstür (Creed, 1998) için yüksek sıcaklık (örn. 95°C) tercih edilmelidir (Schellekens, 1996).
- Bazı sebzeler için ön haşlama gerekebilir (Vlok, 1998; Rinaldi ve ark., 2013)

- Daha sonradan tüketilecekse pişirme işleminden hemen sonra hızlı bir soğutma gerçekleştirilip, depolama boyunca sıcaklık kontrolü gerçekleştirilmelidir. Aksi halde depolama boyunca mikrobiyel gelişim gerçekleşebilir (Jang ve Lee, 2005).

Sous vide yönteminde klasik pişirme metotlarından farklı olarak daha düşük pişirme sıcaklığı (<100°C) ve daha uzun pişirme süresi uygulanır (Oz ve Zikarov, 2015). Vakum paketleme aracılığıyla çevreden gelebilecek kontaminasyon riski azaldığından raf ömrü artar, oksijenle teması kesildiği için oksidasyondan doğabilecek problemler azalır ve ısının etkili şekilde ürüne transferi sağlanır (Baldwin, 2012). Sous vide paketleme ile ürünü mikrobiyel, fiziksel ve duyu kalite kaybından korumak mümkündür (Jang ve ark., 2006). Böylece geleneksel yöntemle sınırlı olan raf ömrü sous vide pişirme ile artmaktadır. Raf ömrü ürüne ve uygulanan sıcaklık ve süreye bağlı olmakla birlikte, SV ürünlerinin raf ömrü 5 ile 42 gün arasında değişebilir (Hui ve ark., 2004). Bu yöntemle tavuk ürünlerinde mikrobiyel gelişim 7 haftaya kadar ertelenebilir (Wang ve ark., 2004). Farklı katkıları, doğal antioksidanlar, ön pişirme, baharat ve antioksidan özellikteki filmler gibi uygulamalarla bu raf ömrü daha da uzatılabilir.

Sous vide pişirmede uygulanan 65-95°C gibi düşük sıcaklıklar tüketiciler için mikrobiyel güvenlik konusunda endişeye neden olmaktadır (Schallegens ve Martens, 1993). Özellikle vakum paketlenen ürünlerde oluşturulan anaerobik koşullardan dolayı *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* ve laktik asit bakterileri gibi mikroorganizmalar önem arz etmektedir (Gonzalez-Fandos ve ark., 2004). Ayrıca sıcaklık-süre kombinasyonu, ürünün başlangıç mikrobiyel yükü, sanitasyon, depolama sıcaklığı ve süreye dikkat edilmezse özellikle sporlu bakteriler ve düşük sıcaklıkta gelişebilen *L. monocytogenes* açısından risk oluşturabilir (Mytle ve ark., 2006; Nyati, 2000; Juneja ve Marner, 1996). Bu pişirme yönteminin avantajları ve dezavantajları Tablo 2.1.'de belirtilmiştir.

Tablo 2.1. Sous vide yönteminin avantajları ve dezavantajları (Hui ve ark., 2004)

AVANTAJLARI	DEZAVANTAJLARI
- Duyusal kaliteyi artırır - Besin değerini muhafaza eder - Raf ömrünü uzatır - Katkı ilavesine ihtiyaç azalır - Ürün çeşitliliği artar - Merkezi üretim olanağı sağlar - Et maliyeti/ ağırlık kaybı azalır - İşlem sonrası kontaminasyon riski azalır - Üretilen ürünlerde çeşitlilik sağlar - Porsiyon kontrolünü artırır	- Ekipman maliyeti - Eğitimli personel yetersizliği - Soğutma aşamasının takibinin maliyeti - Bağışıklığı düşük kişiler için risklerinin bulunması - Yaygın olmayışı

Piştirilen ürünlerin kabul edilebilirliğini sınırlayan faktörler uygulanan sıcaklık-süre, depolama koşullarına bağlı olarak duysal özelliklerinin azalması ve mikrobiyel gelişmedir (El-Ansari ve Bekhit, 2014). Ancak hijyen, işleme koşulları ve depolama koşullarına dikkat edilirse SV pişirme güvenilir bir yöntemdir. Ayrıca mikrobiyel risklerden uzak durmak ve kimyasal değişimleri geciktirmek için bu yöntemde baharat ve esansiyel yağlarla farklı kombinasyonlar oluşturulmaya çalışılmıştır. Özellikle sentetik antioksidanların toksikolojik etkilerinden dolayı, son yıllarda fenolikler bakımından zengin olan doğal antioksidanlara yönelim vardır (Friedman ve ark., 2002; Karre ve ark., 2013; Krishnan ve ark., 2014; Shah ve ark., 2014). Bu doğal antioksidanlar bitkilerin yaprak, kök, gövde, meyve, tohum ve kabuk gibi farklı kısımlarından solvent ve ekstraksiyon yöntemleriyle hazırlanabilir (Shah ve ark., 2014).

Depolama sıcaklığı arttıkça geleneksel ve sous vide piştirilen ürünlerin arasında göreceli olarak duysal kalite değişimleri arasındaki fark artar (Jang ve Lee, 2005). Ayrıca mikrobiyel ve fiziksel kalitesindeki değişim hızlanır (Paik ve ark., 2006).

Sous vide paketli ürünler geleneksel yöntemle pişirilen ürünlere göre duyusal kalitede üstünlük sağlar (Jang ve Lee, 2005).

2.4.2. Sous vide ürünlerin raf ömrü ve raf ömrünü arttırma üzerine yapılan çalışmalar

Sous vide ürünlerinin raf ömrü sıcaklık-süre ve ürüne bağlı olarak 5 ile 42 gün arasında değişmektedir (Hui ve ark., 2004). Duyusal kalite bakımından raf ömrü mikrobiyel kalite bakımından olan raf ömrüne göre daha kısadır ve depolamanın daha erken safhalarında mezofilik, psikrotrofik aerobik bakteri ve trimetilamin nitrojen (TMA-N) değerleri sınırlarını aşmamış olmasına karşın duyusal testlerden düşük puan alabilir (Jang ve Lee, 2005; Coşansu ve ark., 2011).

Mol ve ark. (2012) 70°C’de 10 dakika sous vide pişirdikleri mezgit balığında farklı sıcaklıklarda (4°C ve 12°C) depolamanın raf ömrüne etkisini araştırdıkları çalışmada; balığın lipid, protein ve nem içeriğinin sous vide pişirmeden sonra istatistiksel olarak farklılık gösterdiğini belirtmiş, kül ve karbonhidrat içeriğinde ise aynı eğilim gözlenmemiştir. Ayrıca çiğ balıkta 11,64 mg/100 g olan TVB-N değeri sous vide pişirmeden sonra 9,62 mg/100 değerine düşmüştür. Ancak 30 mg/100 g olan sınır değerini 12°C ve 4°C’de sırasıyla 18 ve 42. günde aştığı görülmüştür. Kısa raf ömrüne sahip olan mezgit balığının raf ömrü 70°C’de 10 dakika sous vide pişirme ile her iki depolama sıcaklığında da artış göstermiştir. 12°C’de psikrotrofik bakteri türü sınır değeri 15.günden sonra ve mezofilik aerobik bakteri ve TMA-N değeri sınır değeri 21. günden sonra aşmıştır. 4°C’de ise duyusal değerlendirme, mezofilik ve psikrotrofik bakteri yükü dikkate alındığında balığın raf ömrü 35 gün olarak belirtilmiştir.

Geleneksel ve sous vide pişirilen ve farklı sürelerde depolanan sığır etinin raf ömrünün izlendiği bir çalışmada (Jang ve Lee, 2005); geleneksel pişirilen et ürününde raf ömrü 20, 10 ve 3°C’de depolamada sırasıyla 7, 11 ve 26 gün olarak bulunmuştur. Sous vide ürünlerinde mikrobiyel gelişim bakımından 3 ve 10°C’de depolanan ürünlerde raf ömrü 40 günden daha fazla iken 20°C’de depolanan

ürünlerde mikrobiyel gelişim 9. günde başlamıştır. Geleneksel pişirilen örneklerde duyuusal kalite bakımından 3 ve 10°C’de sırasıyla raf ömrü 7 ve 3 gün iken sous vide yöntemiyle pişirilen örneklerde 12 günden fazladır. Buna göre, değerlendirilen depolama sıcaklıklarında sous vide paketlemenin mikrobiyel, fiziksel ve duyuusal degradasyon bakımından ürünü korumada etkili bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Jang ve Lee, 2005).

Aynı araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada (Jang ve ark., 2006) ise sığır etinde sirke ve sakenin birlikte kullanımının tek tek eklenmesine nazaran raf ömrünü arttırmada daha iyi alternatif olabileceği belirtilmiştir. Depolamadan önce hiçbir şey eklenmemiş olan sığır etlerinde duyuusal kalite daha yüksek bulunmuştur ve ürünlerde tek olarak sirke ve sake kullanıp kullanılmamasına bakılmaksızın duyuusal kalite 8°C’da 10 günlük süre zarfında azalmıştır (Jang ve ark., 2006).

Simpson ve ark. (1995) spaghetti ve et soslu ürünlere *Clostridium botulinum* A ve B inoküle ettikten sonra sous vide yöntemi ile pişirmişlerdir. Pişirme işlemi 75°C 36 dakika uygulandıktan sonra örnekler 15°C’de depolanmıştır. Toksin 5,5’ten daha yüksek pH değerine sahip örneklerde 14-21 günden sonra, pH değeri 5,25 olan örneklerde 35 günden sonra tespit edilmiştir. 15°C’de 42 gün depolama boyunca pH değeri 5,25’ten küçük olan örneklerde ise toksin belirlenmemiştir. Ardından pH 5,5 olan örneklerde %1-3(w/w) tuz konsantrasyonunun güvenlik üzerindeki etkileri sonraki çalışmalar da değerlendirilmiştir. Çalışmada pH azaldıkça ve tuz konsantrasyonu %1,5 ve üzeri olduğunda toksin üretimi engellenmiştir.

2.4.3. Sous vide pişirmenin gıdaların besin değerine etkisi

İnsan sağlığı ve gelişiminde önemli rol oynayan et ve et ürünleri; dengeli beslenmede yüksek biyolojik değere sahip önemli bileşenlerdir (Pereira ve Vicente, 2013). Uzun süre yüksek ısıya maruz bırakılan etlerde polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH), heterosiklik amin (HA) ve akrilamid gibi bileşiklerin oluşması ile et kalitesi olumsuz etkilenmektedir (Babür ve Kayaalp, 2015).

Kırmızı et, kanatlı eti ve balık etlerinin yüksek sıcaklıklarda pişirilmesi sonucu ng/g düzeyinde heterosiklik aminler (HA) oluşur. Bunlar pişirilmiş etlerde mutajenik/kanserojenik etki gösterir. Bu yüzden HA'lerin oluşumunu önlemek için ızgara, kızartma gibi işlemlerden ziyade buğulama, haşlama gibi pişirme uygulamaları önerilir (Çiçek ve Bulgan, 2013). Bu nedenle insan beslenmesinde önemli yere sahip et ürünlerinin besinsel içeriğinden maksimum yararlanabilmek için daha uygun pişirmek ve depolamak gerekir. Etlerin pişirilmesinde bu bakımdan SV pişirmede iyi birer alternatif olabilir.

Sığır eti üzerine yapılan bir çalışmada (Oz ve Zikirov, 2015) SV pişirme, kaynatma ve kızartmanın farklı sıcaklıklarda ve sürelerde farklı 10 yöntem ile heterosiklik aromatik amin (HCA) oluşumu gözlemlenmiştir. Kızartmada HCA miktarı daha yüksek bulunur iken en düşük HCA değerini 75-85°C'de 120 dk SV pişirme ve haşlama (<100°C-42 dk) yöntemi göstermiştir. Sıcaklık değişmeden pişirme süresinin artması ise SV yönteminde HCA miktarını yükseltmiştir (Oz ve Zikirov, 2015).

Diğer bir çalışmada (Zikirov, 2014) ise SV yönteminin HCA oluşumu bakımından güvenilir bir pişirme yöntemi olduğundan bahsedilmiş ve bu yöntem ile uzun süre pişirilen etlerde dahi HCA'ların çok düşük seviyelerde olduğu belirtilmiştir. Toplam HCA içeriği 0,036-0,123 ng/g bulunmuş ve aynı sıcaklıkta sürenin uzamasıyla miktarı yükselmiştir.

Rinaldi ve ark. (2014) tarafından yürütülen çalışmada sığır eti 75°C ve 100°C SV yöntemi ile pişirilmiştir. Kaynatmaya kıyasla daha yüksek B₃ vitamin muhafazası gösteren SV pişirmede 2 sıcaklık değerinde de B₃ vitamini muhafaza değerleri benzer bulunurken B₁₂ vitamini muhafazasında 75°C'de uygulanan SV yöntemi daha iyi değer göstermiştir. Çalışmada bunun nedeni pişirme sıcaklığının düşük olmasına ve su içeriğinin yüksek olmasına bağlanmıştır. Bu sonuca göre; kısa sürede yüksek sıcaklıkta SV pişirmenin ette uygulanabilirliğini B₁₂ muhafazası sınırlamıştır.

Bazı sebzelerde 1 dakikalık ısı uygulaması bile önemli derecede toplam fenolik bileşenlerin değerini azaltabilir (Ismail ve ark., 2004). Sebzeler farklı antioksidan

bileşenleri (α -tokoferol, β -tokoferol, vitamin C, selenyum yada fenolik bileşenler gibi) ile farklı antioksidan aktivitesi gösterebilir ve pişirme boyunca besinsel kayıpları da ürüne göre değişebilir (Ismail ve ark, 2004; Baardseth ve ark, 2010).

Iborra-Bernad ve ark. (2014) çalışmalarında; geleneksel ve SV yöntemleriyle pişirilen kırmızı lahananın antosiyanin içeriklerini karşılaştırmış ve geleneksel yöntemde antosiyanin kaybı SV yönteminde meydana gelen kaybın iki katı bulunmuştur.

Werlein (1998) geleneksel ve sous vide pişirilen havuçların kalitelerini kıyasladığı çalışmada; geleneksel yöntemle pişirilen havuçlarda sukroz, fruktoz ve glikozda önemli azalma meydana gelmiştir. Sukroz içeriği %67 azalırken sous vide ürünlerinde aksine hem işleme ve depolama boyunca hemde tekrar ısıtmadan sonra şeker içeriği önemli azalış göstermemiştir. Ayrıca havuçta bu yöntem geleneksel yöntemle göre daha yüksek serbest radikal yakalama etkisi göstermiştir (Patras ve ark, 2010).

2.4.4. Sous vide pişirmenin kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri

Sous vide pişirilmiş ve 3 farklı sıcaklıkta depolanmış (3°C, 10°C ve 20°C) sığır etindeki pH değeri sabit kalmıştır. Buna karşın geleneksel yöntemle pişirilen sığır etinde pH değeri azalmıştır. Geleneksel yöntemle pişirilen ve 3°C'de depolanan sığır etinde 8. günden sonra anaerobik ve 10. günden sonra aerobik mikrobiyel gelişim başlamıştır (Jang ve Lee, 2005).

Piştirme sıcaklığı, paketleme metodu, depolama sıcaklığı ve depolama periyodu mikroorganizmaların gelişimini etkiler. Ayrıca sous vide pişirmede depolama sıcaklığı yükseldikçe mikrobiyel sayı artacak ve daha hızlı gelişim gösterecektir (Wang ve ark., 2004).

Sous vide piştirme mikrobiyel gelişimini azaltmasına rağmen maya gelişimini anaerobik koşullarından dolayı arttırabilir. Bunun yanı sıra piştirme suyunun ve

depolama sıcaklığı sous vide ürünleri için anaerobik bakteri gelişiminde kritik değerlerdir (Wang ve ark, 2004).

Nyati ve ark. (2000) SV pişirilen et ürünlerinin 3°C ve 8°C’de 5 haftalık depolama boyunca mikrobiyolojik ve organoleptik kalitelerini incelemiştir. Başlangıçta $<10^2$ kob/g olan *B. cereus* sayısı 4 hafta sonunda 3×10^4 kob/g düzeyine ulaşmıştır. SV (70°C) pişirilen tavuk göğüs etinde ise toplam aerobik bakteri başlangıç yükü 2×10^4 kob/g, 3°C depolamada 5.haftada 6×10^1 kob/g iken 8°C depolamada 4. haftada 9×10^6 kob/g olmuştur.

Sous vide yöntemi gıdanın hava ile temasını kestiği için anerobik ve fakültatif anaerob bakteriler için ve ısıtıl işleminden sonra soğuk depolama gerçekleştirildiğinden psiktotrofik bakteriler için uygun bir ortam sağlayabilir.

Sous vide ürünleri vakum paketlenildikten sonra genellikle %1-5 arasında oksijen paketin içerisinde mevcuttur. Bu fakültatif anaerob bakterilerin gelişmesine sebep olabilir. Fakültatif anaerob bakteriler mevcut oksijeni kullanırlar ve oksijen tükendikten sonra ortam anaerob bakteriler için uygun hale gelir. Bu nedenle gelişebilen çoğu patojen bakteri anaerob ve fakültatif anaerob karakterdedir. *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus* spp., *Clostridium* spp. ve *Salmonella* spp., *Bacillus* spp. örnek verilebilir (Schellekens ve Martens, 1993).

2.5. Sous Vide Ürünlerinde Doğal Antimikrobiyel Maddelerin Kullanımı

Et ve et ürünlerinde bitkisel ve ekstraktların antioksidan ve/veya antimikrobiyel potansiyeli üzerine çalışmalar yapılmıştır (Jang ve ark., 2006; Shah ve ark., 2014). Özellikle sentetik antioksidanların toksikolojik etkilerinden dolayı, son yıllarda fenolikler bakımından zengin olan doğal antioksidanlara yönelim vardır (Friedman ve ark., 2002; Karre ve ark., 2013; Krishnan ve ark., 2014; Shah ve ark., 2014).

Et ve et ürünlerinde bitki ekstraktlarının kullanımı duyuşal ve besinsel kaliteyi geliştirir (Shah ve ark., 2014). Ancak bazı bitkisel ekstraktlar duyuşal özellikleri

olumsuz etkileyeceğinden etkin konsantrasyonda kullanımları mümkün olmayabilir (Jang ve ark., 2006). Bu durumda antimikrobiyel özelliğe sahip bitkisel ekstraktların sous vide pişirme yöntemi ile birlikte uygulanması daha etkin ve nitelikli ürünler elde edilmesine olanak sağlayabilir.

Jang ve ark. (2006) Kore’de popüler bir yemek olan soya sosu ile hazırlanan sığır etini ön işlemlerden geçirdikten sonra sirke ve sake ekleyerek sous vide yöntemiyle pişirmişler ve iki farklı sıcaklıkta depolanmışlardır. Sirke ve sakenin her iki depolama sıcaklığında da (8°C ve 20°C) mikrobiyel gelişimi kontrol altına almada etkili olduğunu belirtmişlerdir. Sirke ve sakenin birlikte kullanımı ise daha etkili bulunmuştur.

Aynı ürün üzerine yapılan diğer bir çalışmada ise Paik ve ark. (2006) depolama süresince nisin etkisini incelemiştir. Beklenildiği üzere nisin mikrobiyel gelişimi ve bozulmayı ertelemiştir. Mezofilik bakteri sayısı depolama sıcaklığına ve ürünün başlangıç mikrobiyel yüküne bağlı olarak artmıştır. Nisinin etkisi nispeten yüksek sıcaklıkta (25°C) depolanan üründe bile açık bir şekilde gözlenmiştir. Nisin eklenmeyen örneklerde ise anaerobik mikroorganizmaların sayısı artmıştır. Ayrıca 4°C’de depolanan örneklerle göre mikrobiyel ve fiziksel karakteristikler daha hızlı değişmiştir. Sous vide pişirilen üründe nisin etkisi mikrobiyel gelişimi, bozulmayı ve örneklerdeki renk ve tekstür değişimlerini etkilemiştir.

Sous vide paketlenmiş palamutların duyu, biyokimyasal ve mikrobiyel kalitesi üzerinde limon suyunun etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise Coşansu ve ark. (2011); yüzeyine limon suyu uygulanan palamutlarda (LSV) kabul edilebilirliğin uygulanmayanlara göre 2 hafta arttırdığını belirtmiştir. Bu uygulamayla birlikte psikrotrofik aerobik bakterilerin gelişimi ertelenmiş ve daha az mikrobiyel yük göstermiştir. Limon suyu uygulanan SV örneklerinde pH değerleri 63 günlük depolama boyunca 4,71-5,14 arasında değişmiş ve gıdaları korumada etkili olan 5,7 - değerinin altında seyretmiştir. Toplam uçucu bazik azot (TVB-N) değerleri ise 42 günlük depolamada kontrol örneklerinde 9,83-47,72 arasında değer gösterir iken LSV’de 11,00-59,29 arasında 63 günlük depolamada göstermiştir. TVB-N’de kabul

edilebilir 30 mg/100g değerini kontrol ve LSV örnekleri sırasıyla 35 gün ve 49. günde aşmıştır. Bu uygulamanın raf ömrünü arttırmada ucuz ve karmaşık olmayan bir uygulama olduğu belirtilmiştir.



BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Araştırmada kullanılan ticari zeytin yaprağı sıvı ekstresi Tariş Zeytin A.Ş.'den temin edilmiştir. Kullanılan dana kıyma ise yerel bir kasaptan alınmıştır.

ZYE'nin antimikrobiyel aktivitesinin belirlenmesi amacıyla disk difüzyon yönteminde kullanılan *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* Biyotip 1, *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) kültürleri Sakarya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kullanılan araç-gereçler

Çalışmada kullanılan başlıca ekipmanlar, Polyscience Sous Vide Pro.CREATIVE Series, KIT (Included Tank & Lid Serial No: R11253547), Elektrola Sous Vide Vakum Torbası (15 cm × 20 cm), Hettich Universal 320R soğutmalı santrifüj, JSR JSSB-30T su banyosu, IKA MS3 Basic vortex, IKA C-MAG-HS7 ısıtıcılı manyetik karıştırıcı, Eppendorf Research plus mikropipet, AND GR-200 hassas terazi ve AQUALAB su aktivitesi ölçüm cihazı (Model Series 3, Decagon Devices, Pullman, WA) dır.

3.2.2. Antimikrobiyel aktivite tayini

Antimikrobiyel aktivite tayini için disk difüzyon yöntemi uygulanmıştır (Bauer ve ark, 1966). Araştırmada kültür koleksiyonundan temin edilen bakterilerin (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* Biyotip I, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644) analiz gerçekleştirilmeden önce saflık kontrolleri yapılmış ve biyokimyasal testlerle doğrulanmıştır. Çalışmada kullanılan bakteri kültürlerine %15 (v/v) gliserol ilave edilerek -20°C’de muhafaza edilmiştir.

Bakteri kültürleri %0,6 oranında maya ekstraktı ilave edimiş Tryptic Soy Broth (TSBYE, Merck) besiyerine %1 oranında aşılınmış, ardından *L. monocytogenes* 30°C’de, diğer bakteriler 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Aynı işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra elde edilen aktif kültürden %0,6 oranında maya ekstraktı ilave edilmiş Tryptic Soy Agar (TSAYE, Merck) besiyerine 50 µl aktarılıp drigalski spatülü ile yayılmıştır. Antimikrobiyel aktivite testinde kullanılacak ZYE çözeltilisi dimetil sülfoksit (DMSO) ve saf su kullanılarak iki şekilde ve 6 farklı konsantrasyonda (%5, 10, 20, 30, 40, 50) hazırlanmıştır. Altı mm çapındaki steril kağıt diskler aktif bakteri kültürü yayılmış TSAYE besiyeri üzerinde belirli aralıklarla yerleştirilmiş ve diskler 50’şer µl yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan ZYE çözeltilisi aktarılmıştır. Kontrol diskine saf su ile seyreltilenler için yine aynı miktarda su ve DMS-O ile seyreltilenler için ise DMSO aktarılmıştır. *L. monocytogenes* inoküle edilmiş petri kutuları 30°C’de 24-48 saat, diğerleri 37°C’de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 7 mm veya daha geniş olan zon çapları cetvelle ölçülerek kaydedilmiştir. Antimikrobiyel aktivite testleri iki paralelli yapılmış ve sonuçların ortalaması alınmıştır.

3.2.3. *Listeria monocytogenes* inokulumunun hazırlanması

L. monocytogenes kültürü 5 ml’lik TSBYE’e 100 µl aktararak 30°C’de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Aynı işlem bu sefer aktifleştirilmiş kültürden 5 ml’lik TSBYE’e 100 µl aktararak tekrarlanmıştır. İki kez aktifleştirilen kültürden

inokülasyonda kullanılacak TSBYE'e %1 oranında aşılansarak 30°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyonun ardından *L. monocytogenes* kültürü 4°C'de 4000 devir/dakika hızda 10 dakika santrifüjlendikten sonra supernatant uzaklaştırılmıştır. Peletin üzerine steril peptonlu su ilave edilerek karıştırılmış ve tekrar santrifüjlenmiştir. Aynı işlem bir kez daha tekrar edilerek besiyeri kalıntıları tamamen uzaklaştırılmıştır. Son olarak peletin üzerine steril peptonlu su ilave edilerek orjinal hacme tamamlanmış ve inokulum kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.2.4. In vitro koşullarda zeytin yaprağı ekstraktının *L. monocytogenes* üzerine etkisinin belirlenmesi

In vitro koşullarda ZYE'nin *L. monocytogenes* üzerine etkisinin belirlenmesi için gerçekleştirilen denemeler Skandamis ve ark. (2008)'e göre yapılmıştır. Bu amaçla yaklaşık 10^7 - 10^8 kob/ml olacak şekilde içinde 9 ml TSBYE bulunan tüplere 3.2.3'te anlatıldığı şekilde hazırlanan *L. monocytogenes* inokülümünden 1 ml ilave edilmiştir. ZYE'den besiyerinde son konsantrasyon %0,5 ve %1 olacak şekilde ilave edilmiş, kontrol tüplerine ise aynı miktarda steril saf su ilave edilip karıştırılmıştır. Tüpler sıcaklığı 55°C ayarlanmış sous vide cihazına sıcaklık 55°C'ye ulaştıktan sonra yerleştirilmiştir. Cihazdaki su seviyesinin tüplerdeki besiyeri seviyesinden 4 cm daha yüksek olmasına dikkat edilmiştir. Isıl işlem süresince 3-5 dakikada bir tüpler çalkalanmıştır. 55°C'de ısıl işlem süresince 15. ve 30. dakikalarda alınan tüpler hızla soğutulmuş ve ekim yapılmak üzere seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Aynı işlemler 60°C için 10 ve 20 dakikalık sürelerde ve 65°C için ise 2,5; 5 ve 7,5 dakikalık süreler sonunda örnekleme yapılmıştır. Her bir örnekleme zamanında 3 paralel tüp sayım için kullanılmış ve denemeler iki tekerrür olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. Kıyma örneklerinin hazırlanması ve inokülasyonu

Denemede kullanılan kıyma soğuk koşullarda laboratuvara getirilmiş, kullanılabilecek kadar derin dondurucuda muhafaza edilmiş ve kullanımdan önce bir gece buzdolabında bekletilerek çözündürülmüştür.

Çözündürülen kıyma mikrobiyolojik analizler (TPAB, TMAB, maya-küf ve koliform sayımları) ve sıcaklık kontrolü için belli miktar ayrıldıktan sonra 2 gruba ayrılmıştır. Zeytin yaprağı ekstraktının ilave edileceği gruba 10^7 - 10^8 kob/g olacak şekilde *L. monocytogenes* inoküle edildikten sonra kıymada %1 oranında (v/w) ZYE olacak şekilde saf su ile seyreltilen ekstrakt ilave edilmiştir. Kontrol grubuna ise 10^7 - 10^8 kob/g düzeyinde *L. monocytogenes* ilave edildikten sonra ZYE yerine aynı koşulları sağlaması için aynı miktarda steril saf su ilave edilmiştir. Kıyma örnekleri *L. monocytogenes* ve ZYE'nin homojen dağılması için yaklaşık 3 dakika yoğurulmuştur. Sonrasında 8,5 cm çapında, 1 cm derinliğindeki cam petriler kalıp olarak kullanılmak suretiyle 25-30 g'lık porsiyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler yüksek sıcaklığa dayanıklı poşetlerin içerisine konularak %99 oranında uygulanarak paketlenmiştir.

3.2.6. Kıyma örneklerinin sous vide yöntemi ile pişirilmesi

Şekil verilip vakum paketlenen kıyma örnekleri ısıtılma işlemine tabi tutulmadan yarım saat öncesinde sous vide cihazı çalıştırılarak hedef sıcaklıklara (55°C , 60°C ve 65°C) ulaşması beklenmiştir. İstenilen sıcaklığa ulaştığında örnekler sabit sıcaklıkta ve sirkülasyonlu sous vide cihazının içerisine bırakılarak 55°C 'de 15 ve 30 dk; 60°C 'de 10 ve 20 dk; 65°C 'de ise 2,5, 5 ve 7,5 dk pişirilmiştir. Belirtilen sıcaklıklarda baz alınan süreler kıyma örneklerinin iç sıcaklığının ulaştığı an değil sous vide cihazına konulduğu an itibarıyla başlatılmıştır. Örneklem zamanlarında her gruptan 2'şer örnek alınarak sıcaklığı 0°C olan buzlu su içerisinde örneklerin iç sıcaklığı 4°C 'ye ulaşana kadar tutulmuştur.

3.2.7. Mikrobiyolojik analizler

3.2.7.1. Hammaddede yapılan mikrobiyolojik analizler

Denemelerde kullanılan kıymanın mikrobiyolojik kalitesini belirlemek amacıyla Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri (TMAB), Toplam Psikrofilik Aerobik Bakteri (TPAB), toplam maya-küf ve toplam koliform sayımı yapılmıştır (Halkman, 2005). Bu amaçla 10 g kıyma örneği aseptik koşullarda tartılmış, 90 ml steril Maximum Recovery Diluent (MRD; 1g/L pepton; 8,5 g/L NaCl) ilave edilerek homojenize edilmiş ve yine MRD kullanılarak dilüsyonlar hazırlanmıştır.

TMAB sayımı için uygun dilüsyonlardan Plate Count Agar (PCA, Merck) besiyerine ekim yapılmış ve petriler 30°C'de 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. TPAB sayımı için PCA besiyerine ekim yapılmış ve petriler 6±2°C'de 7-10 gün süre ile inkübe edilmiştir. Toplam maya-küf sayımı için Potato Dextrose Agar (PDA, Merck) besiyerine ekim yapılmış ve 30°C'de 3-5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon tamamlandığında oluşan koloniler sayılmış ve sonuçlar kob/g olarak ifade edilmiştir. Toplam koliform sayımı ise EMS yöntemiyle gerçekleştirilmiş olup uygun dilüsyonlardan Lauryl Sulphate Tryptose (LST, Merck) Broth besiyerine 3'lü tüp sistemine göre 1'er ml aktarılmış ve tüpler 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda gaz oluşumu görülen tüpler pozitif olarak değerlendirilerek EMS tablosundan toplam koliform sayısı hesaplanmış ve EMS/g olarak ifade edilmiştir.

3.2.7.2. *Listeria monocytogenes* sayımı

In vitro koşullarda ZYE'nin ısıl işlem sırasında *L. monocytogenes* üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapılan denemelerde ısıl işlem sonrası hızla soğutulan TSBYE tüplerindeki *L. monocytogenes* sayısını belirlemek amacıyla MRD ile seri dilüsyonlar hazırlanmış ve uygun dilüsyonlardan TSAYE besiyerine yayma kültür yöntemi ile ekim yapılmıştır. Petri kutuları 30°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmış ve

inkübasyon sonunda oluşan koloniler sayılmış ve sonuçlar kob/ml olarak ifade edilmiştir.

Kıyma örneklerinde ise *L. monocytogenes* sayımı Miller ve ark. (2010)'a göre yapılmıştır. Sous vide pişirme işlemi sonrasında soğutulan kıyma örneğinden 10'ar g tartılarak stomacher poşetine aktarılmıştır. Üzerine 90 ml MRD ilave edilip homojenize edilmiş ve yine MRD ile seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Uygun dilüsyonlardan TSAYE besiyerine 0,1 ml aktararak drigalski spatülü ile yayılmış ve petri kutuları 3 saat süreyle oda sıcaklığında (~25 °C) inkübe edilmiştir. Üç saatlik inkübasyonun ardından TSAYE üzerine 45°C sıcaklıktaki Palcam Agar besiyerinden 10 ml aktarılmış ve TSAYE besiyerinin üzerini tamamen kaplaması sağlanmıştır. Palcam Agar katılaştıktan sonra petri kutuları 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda TSAYE ve Palcam Agar arasında oluşan zeytin yeşil-gri renkli siyah zonlu koloniler *L. monocytogenes* olarak sayılmış, sonuçlar kob/g olarak ifade edilmiştir.

3.2.8. Su aktivitesi ölçümü

Kıyma örneklerinin su aktivitesi değerleri Aqualab su aktivitesi ölçüm cihazı (Model Series 3, Decagon Devices, Pullman, WA) ile belirlenmiştir.

3.2.9. İstatistik değerlendirme

Mikrobiyolojik analiz sonuçlarına ilişkin veriler logaritmik değerlere çevrildikten sonra SPSS 20.0 paket programı ile varyans analizi yapılmış, gruplar arası farklılıklar bağımsız t testi ve Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir ($\alpha=0,05$).

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Disk Difüzyon Yöntemiyle Antimikrobiyel Aktivite Tayini Sonuçları

Su ve DMS-O ile seyreltilen zeytin yaprağı ekstraktının farklı patojen bakterilere karşı antimikrobiyel etkisini belirlemek için gerçekleştirilen disk difüzyon testinde elde edilen sonuçlar Tablo 4.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Zeytin yaprağı ekstraktının DMS-O ve su ile farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ZYE'nin patojen bakterilere karşı antimikrobiyel aktivitesini gösteren disk difüzyon testi sonuçları (mm)

Bakteriler	%5	%10	%20	%30	%40	%50
<u>DMS-O ile hazırlanan</u>						
<i>B. cereus</i>	-	-	-	7,00	8,50	9,00
<i>E. coli</i> O157:H7	-	-	-	-	7,75	9,00
<i>E. coli</i> Biyotip 1	-	-	-	-	8,00	8,50
<i>S. Enteritidis</i>	-	-	-	8,00	8,50	9,33
<i>S. Typhimurium</i>	-	-	-	-	7,50	8,00
<i>S. aureus</i>	-	-	-	10,25	12,67	13,67
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	8,17	10,67	14,00
<u>Su ile hazırlanan</u>						
<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	7,75	8,00
<i>E. coli</i> O157:H7	-	-	-	7,50	7,50	7,67
<i>E. coli</i> Biyotip 1	-	-	-	7,33	7,33	7,33
<i>S. Enteritidis</i>	-	-	-	7,00	7,33	7,50
<i>S. Typhimurium</i>	-	-	-	7,00	7,50	8,00
<i>S. aureus</i>	-	-	-	8,75	10,50	11,50
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	7,83	10,33	11,83	12,67

Çalışmada DMS-O ile seyreltilen zeytin yaprağı ekstraktının %40 ve %50 konsantrasyonlarında test edilen tüm bakterilere karşı 7,50-14,00 mm aralığında inhibisyon zonu oluşmuştur. Buna karşın %30 konsantrasyondaki ZYE *B. cereus*, *S. Enteritidis*, *S. aureus* ve *L. monocytogenes*'e karşı inhibitör etki göstermiştir. DMS-O ile hazırlanan %5, %10 ve %20 konsantrasyondaki ZYE test edilen bakteri kültürlerinin hiç birine karşı inhibisyon zonu oluşturmamıştır.

Çalışmada ürüne eklenecek ZYE su ile hazırlanacağından disk difüzyon testi steril saf su ile tekrarlanmıştır. Su ile seyreltilen zeytin yaprağı ekstraktının %30, %40 ve %50 konsantrasyonlarında, çalışılan bakterilere karşın oluşan inhibisyon zon çapları ölçülebilmektedir. Ayrıca çalışılan bu bakterilerden ZYE'na karşı en hassas bakteriler *S. aureus* ve *L. monocytogenes* olarak belirlenmiştir. *L. monocytogenes* disk difüzyon yönteminde 7,83-12,67 mm aralığında zon çapı oluşturmıştır.

4.2. Zeytin Yaprak Ekstraktı Varlığında Isıl İşlemin In vitro Koşullarda *L. monocytogenes* Üzerine Etkisi

In vitro denemeleri sırasında sıcaklık kontrolü için tutulan TSBYE besiyerinde belirli aralıklarla ölçülen sıcaklık değerleri Tablo 4.2.'de belirtilmiştir.

Tablo 4.2. In vitro denemelerinde sıcaklık ölçüm sonuçları

Isıl işlem süresi (dakika)	55°C	60°C	65°C
0.30 dk	51°C	48°C	50°C
1. dk	53°C	57°C	58.6°C
1.5. dk	54°C	58.2°C	61.9°C
2. dk	54.7°C	59.5°C	64.6°C
2.30. dk	-	59.9°C	64.8°C

In vitro koşullarda TSBYE besiyerine %0, %0,5 ve %1 ZYE ilave edilerek 55°C'de 15 ve 30 dakika ısıtıl işlem uygulandıktan sonra elde edilen *L. monocytogenes* sayım sonuçları Tablo 4.3.'te verilmiştir.

55°C’de ısıt işlem uygulanan in vitro denemede her 3 grupta da ısıt işlem süresi uzadıkça *L. monocytogenes* sayısı azalmış ve ZYE içeren TSBYE besiyerinde kontrole kıyasla patojenin sayısında daha fazla azalma meydana gelmiştir. İstatistik analiz sonuçlarına göre %1 ZYE içeren örnek grubunda ilk 15 dakikada meydana gelen azalma önemli bulunmuştur ($P<0,05$).

Tablo 4.3. TSBYE besiyerinde 55°C’de ısıt işlem uygulanan denemeye ait *L. monocytogenes* sayım sonuçları (log kob/ml; ortalama $\pm$ standart sapma)

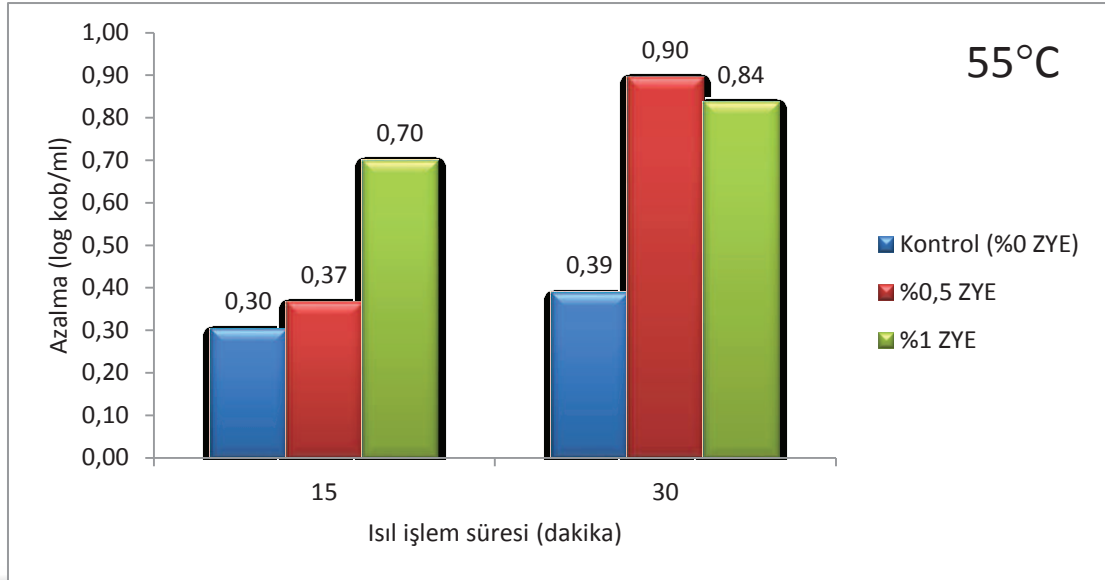
Isıt işlem süresi (dakika)	%0 ZYE (Kontrol)	%0,5 ZYE	%1 ZYE
0	8,09 $\pm$ 0,60 aA	7,79 $\pm$ 0,58 aA	8,45 $\pm$ 0,04 aA
15	7,78 $\pm$ 0,12 aA	7,43 $\pm$ 0,55 aA	7,75 $\pm$ 0,07 bA
30	7,70 $\pm$ 0,36 aA	6,90 $\pm$ 0,77 aA	7,62 $\pm$ 0,17 bA

(a-b) aynı sütunda farklı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0,05$).

(A-B) aynı satırda farklı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0,05$).

55°C’de ısıt işlem uygulanan in vitro denemede farklı sürelerdeki *L. monocytogenes* sayısında azalma miktarı (log kob/ml) Şekil 4.1.’de gösterilmiştir. Bu sıcaklıkta *L. monocytogenes*’in 15. ve 30. dakikalarında azalma miktarları sırasıyla kontrol grubu için 0,30;0,39 log kob/ml, %0,5 ZYE içeren grup için 0,37-0,90 log kob/ml ve %1 ZYE içeren grup için 0,70 ve 0,84 log kob/ml’dir.

Genel olarak ZYE 55°C’de *L. monocytogenes* üzerinde inhibitör etki göstermiştir. Özellikle %1 ZYE içeren grupta ilk 15 dakikada bu etki daha belirgindir.



Şekil 4.1. TSBYE besiyerinde 55°C’de ısıtma uygulanan *L. monocytogenes* kültüründe meydana gelen azalma miktarları (log kob/ml)

60°C’de ısıtma işlem sonrası *L. monocytogenes* sayım sonuçları ise Tablo 4.4.’te gösterilmiştir. Gruplar arasındaki fark önemli bulunmazken ($P>0,05$), her üç grup için de ısıtma işlem süresi uzadıkça patojenin sayısında meydana gelen azalma istatistiksel olarak önemli ($P<0,05$) bulunmuştur.

Tablo 4.4. TSBYE besiyerinde 60°C’de ısıtma işlem uygulanan denemeye ait *L. monocytogenes* sayım sonuçları (log kob/ml; ortalama $\pm$ standart sapma)

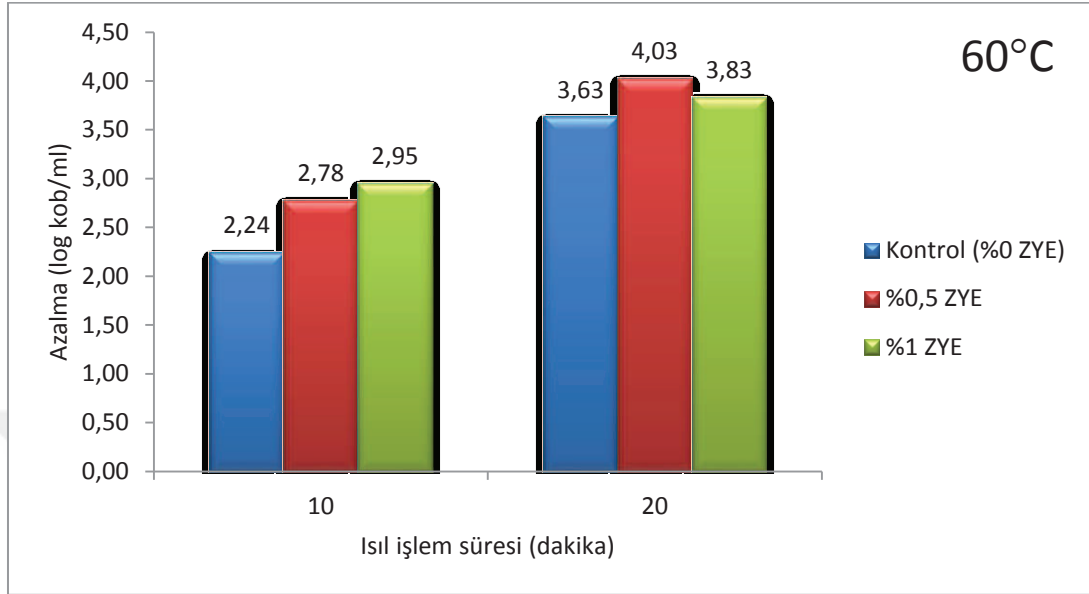
Isıl işlem süresi (dakika)	%0 ZYE (Kontrol)	%0,5 ZYE	%1 ZYE
0	8,67 $\pm$ 0,20 aA	8,67 $\pm$ 0,30 aA	8,69 $\pm$ 0,23 aA
10	6,43 $\pm$ 1,00 bA	5,89 $\pm$ 1,20 bA	5,74 $\pm$ 0,36 bA
20	5,04 $\pm$ 0,62 cA	4,64 $\pm$ 0,21 cA	4,86 $\pm$ 0,22 cA

(a-b) aynı sütunda farklı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0,05$).

(A-B) aynı satırda farklı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0,05$).

60°C’de ısıtma işlem uygulanan in vitro denemede farklı sürelerdeki *L. monocytogenes* azalma miktarı (log kob/ml) Şekil 4.2.’de gösterilmiştir. *L. monocytogenes* azalma miktarları 10. ve 20. dakikada sırasıyla kontrol grubu için 2,24 ve 3,63 log kob/ml, %0,5 ZYE içeren grup için 2,78 ve 4,03 log kob/ml, %1 ZYE içeren grup için ise 2,95 ve 3,83 log kob/ml olarak belirlenmiştir. ZYE içeren gruptaki azalma kontrol

grubuna göre daha fazla olsa da gruplar arasında bu fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($P>0,05$).



Şekil 4.2. TSBYE besiyerinde 60°C'de ısıtılma uygulanan *L. monocytogenes* kültüründe meydana gelen azalma miktarları (log kob/ml)

65°C'de ısıtılma sonrası *L. monocytogenes* sayım sonuçları Tablo 4.5.'te gösterilmiştir. Tüm gruplarda ısıtılma süresi uzadıkça meydana gelen azalma miktarı önemli ($P<0,05$) bulunmuştur.

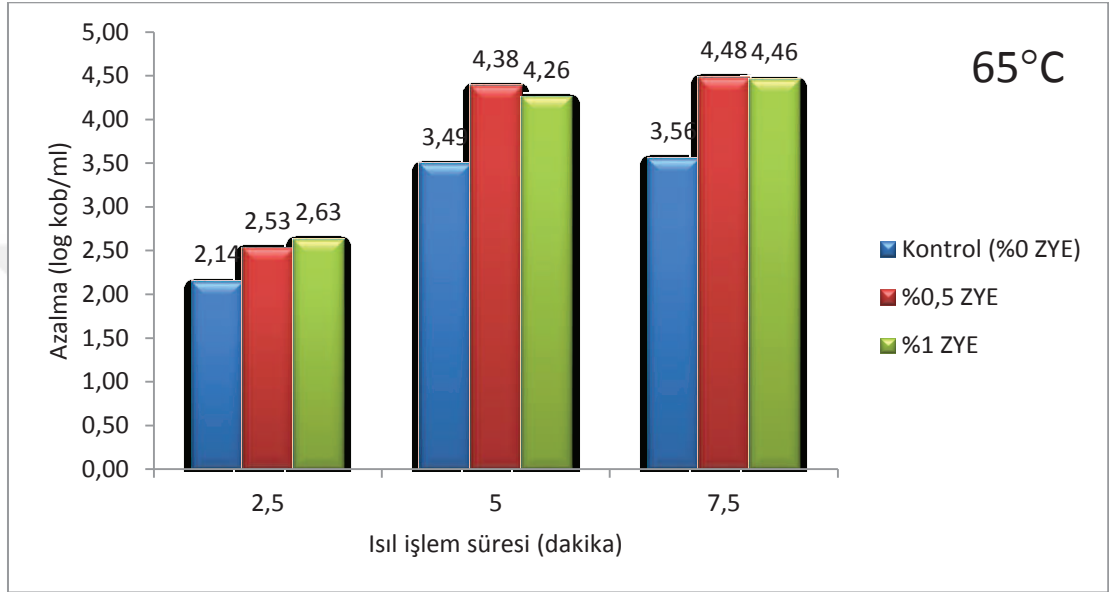
Tablo 4.5. TSBYE besiyerinde 65°C'de ısıtılma uygulanan denemeye ait *L. monocytogenes* sayım sonuçları (log kob/ml; ortalama $\pm$ standart sapma)

Isıl işlem süresi (dakika)	%0 ZYE (Kontrol)	%0,5 ZYE	%1 ZYE
0	8,64 $\pm$ 0,10 aA	8,58 $\pm$ 0,11 aA	8,66 $\pm$ 0,18 aA
2,5	6,49 $\pm$ 0,61 bA	6,05 $\pm$ 0,66 bA	6,02 $\pm$ 0,33 bA
5	3,14 $\pm$ 0,90 cA	4,20 $\pm$ 0,28 cB	4,40 $\pm$ 0,14 bcB
7,5	5,08 $\pm$ 0,79 cA	4,10 $\pm$ 0,27 cB	4,20 $\pm$ 0,28 cB

(a-b) aynı sütunda farklı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0,05$).

(A-B) aynı satırda farklı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0,05$).

65°C’de ısıtım işlem uygulanan in vitro denemede farklı sürelerdeki *L. monocytogenes* azalma miktarı (log kob/ml) Şekil 4.3.’te gösterilmiştir. Bu sıcaklıkta *L. monocytogenes* azalma miktarı kontrol grubu için 2,14-3,56 log kob/ml, %0,5 ZYE grubu için 2,53-4,48 log kob/ml ve %1 ZYE grubu için ise 2,63-4,46 log kob/ml aralığındadır.



Şekil 4.3. TSBYE besiyerinde 65°C’de ısıtım işlem uygulanan *L. monocytogenes* kültüründe meydana gelen azalma miktarları (log kob/ml)

4.3. Sous Vide Yöntemi ile Farklı Sıcaklıklarda Pişirilen Kıymada Zeytin Yaprağı Ekstraktının *L. monocytogenes* Üzerine Etkisi

Sous vide pişirme uygulanmadan önce dana kıymada mikrobiyolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Hammaddede gerçekleştirilen bu analizlerde TMAB $6,61 \pm 0,29$ log kob/g, TPAB $6,57 \pm 0,45$ log kob/g, maya-küf sayısı $3,94 \pm 0,70$ log kob/g ve koliform sayısı $4,64 \pm 0,35$ log EMS/g olarak belirlenmiştir.

4.3.1. Kıyma örneklerine ait *L. monocytogenes* sayım sonuçları

Sıcaklık kontrolü amacıyla sous vide pişirilen kıyma örneklerinin belirli sürelerde ölçülen sıcaklık değerleri Tablo 4.6.’da verilmiştir.

Tablo 4.6. Sous vide pişirme uygulamada iç sıcaklık ölçüm sonuçları

<u>55°C</u>		<u>60°C</u>		<u>65°C</u>	
15.dk	51.7°C	10.dk	52.4°C	2,5.dk	49.9°C
30.dk	53.7°C	20.dk	57.2°C	5.dk	55.4°C
				7,5.dk	58.8°C

Sous vide pişirmenin 55°C’de 15 ve 30 dakika uygulandığı çalışmada *L. monocytogenes* sayım sonuçları Tablo 4.7.’de gösterilmiştir. Bu sıcaklıkta kıyma örneklerinde *L. monocytogenes* sayısı kontrol grubunda 7,96 log kob/g’dan 7,01 log kob/g’a, %1 ZYE içeren grupta ise 7,75 log kob/g’dan 6,48 log kob/g’a düşmüştür. 55°C’de 15 dakika ısıtıl işlem uygulanan örneklerde gruplar arasındaki *L. monocytogenes* sayısı bakımından gözlenen fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0,05$).

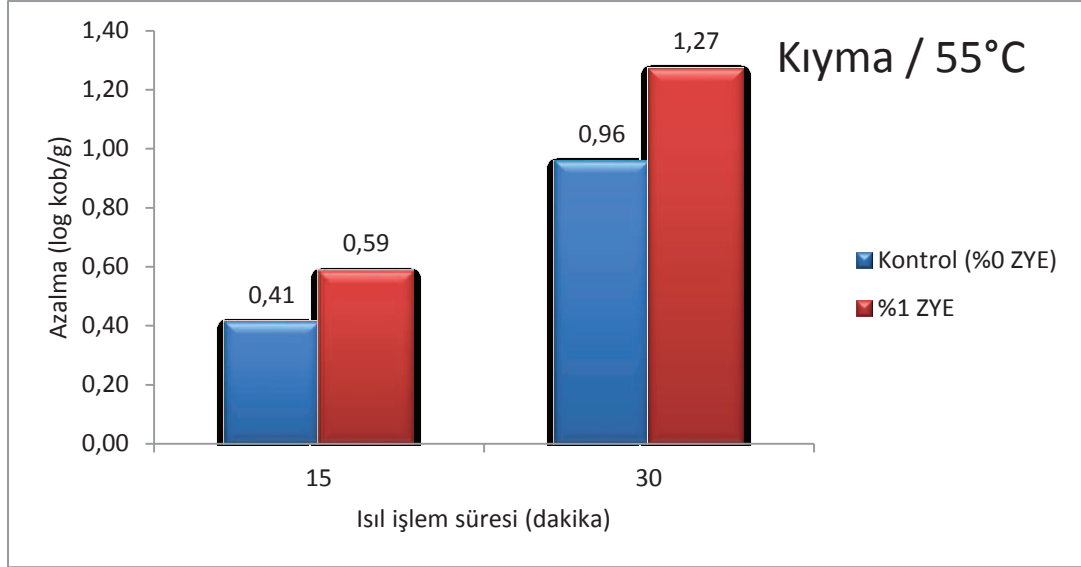
Tablo 4.7. 55 °C’de Sous vide pişirilen kıymaların *L. monocytogenes* sayım sonuçları

Isıl işlem süresi (dakika)	%0 ZYE (Kontrol)	%1 ZYE
0	7,96±0,42 aA	7,75±0,04 aA
15	7,55±0,06 abA	7,16±0,14 bB
30	7,01±0,48 bA	6,48±0,25 cA

(a-b) aynı sütunda farklı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0,05$).

(A-B) aynı satırda farklı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0,05$).

Sous vide pişirilen kıymaların farklı sürelerdeki *L. monocytogenes* azalma miktarları Şekil 4.4.’te gösterilmiştir. Kıyma örneklerinin bu sıcaklıkta 15 ve 30 dakika sous vide pişirilmesiyle kontrol grubunda *L. monocytogenes* azalma miktarı sırasıyla 0,41 ve 0,96 log kob/g’dır. ZYE içeren örnek grupları ise daha fazla düşüş göstererek azalma miktarları 15. dakika için 0,59 log kob/g ve 30. dakika için 1,27 log kob/g olmuştur.



Şekil 4.4. 55°C’de sous vide pişirilen kıymaların *L. monocytogenes* azalma miktarları (log kob/g)

Sous vide pişirmenin 60°C’de 10 ve 20 dakika süreyle uygulandığı denemede elde edilen sonuçlar Tablo 4.8’de gösterilmiştir. Bu sıcaklıkta kıyma örnekleri 20 dakika pişirildiğinde kontrol grubunda *L. monocytogenes* sayısı 7,80 log kob/g’dan 5,01 log kob/g düzeyine düşerken, %1 ZYE ilave edilmiş örneklerde 7,85 log kob/g’dan 4,02 log kob/g düzeyine düşmüştür. Kontrol grubu ile ZYE ilave edilmiş örnek grubu arasındaki fark önemli bulunmamıştır ($P>0,05$). Buna karşın her iki örnek grubunda da zamana bağlı olarak meydana gelen azalma istatistiksel olarak önemlidir ($P<0,05$).

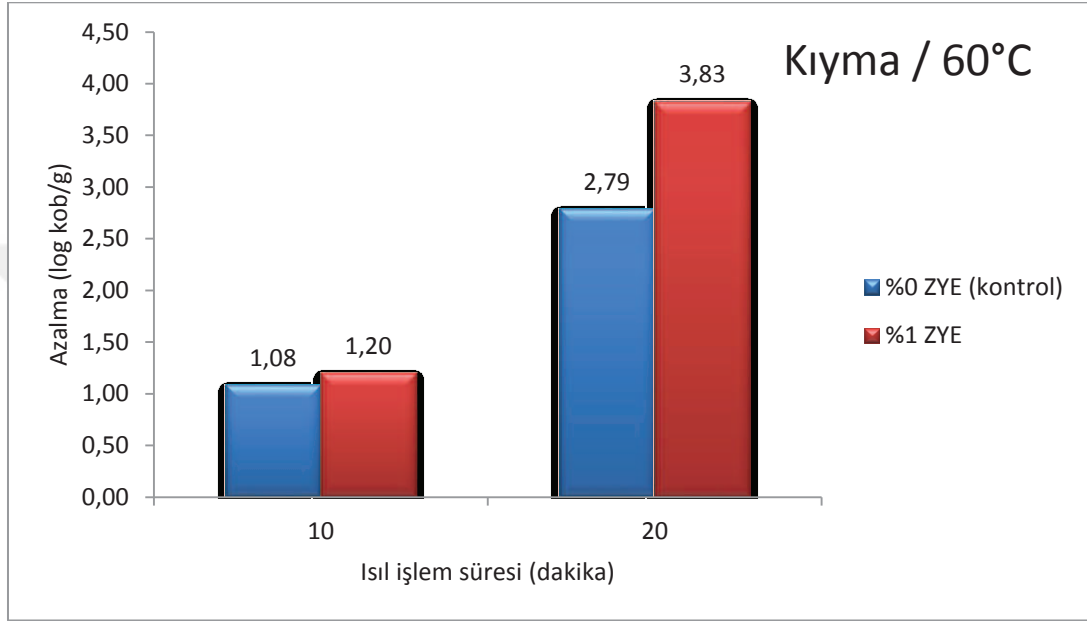
Tablo 4.8. 60 °C’de Sous vide pişirilen kıymaların *L. monocytogenes* sayım sonuçları

Isıl işlem süresi (dakika)	%0 ZYE (Kontrol)	%1 ZYE
0.dk	7,80±0,10 aA	7,85±0,28 aA
10.dk	6,72±0,60 bA	6,65±0,43 bA
20.dk	5,01±0,22 cA	4,02±0,79 cA

(a-b) aynı sütunda farklı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0,05$).

(A-B) aynı satırda farklı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0,05$).

60°C’de sous vide pişirilen kıyma örneklerinde farklı sürelerdeki *L. monocytogenes* azalma miktarı Şekil 4.5.’de gösterilmiştir. Isıl işlemin 10. dakikasında kontrol örneklerinde *L. monocytogenes* azalma miktarı 1,08 log kob/g, 20. dakikada ise 2,79 log kob/g’dur. ZYE içeren örnek grubunun 10. ve 20. dakikada gösterdikleri azalma miktarları ise sırasıyla 1,20 ve 3,83 log kob/g’dır.



Şekil 4.5. 60°C’de sous vide pişirilen kıymaların *L. monocytogenes* azalma miktarları (log kob/g)

Sous vide pişirmenin 65°C’de 2,5;5 ve 7,5 dakika uygulandığı çalışmada elde edilen *L. monocytogenes* sayım sonuçları Tablo 4.9.’da gösterilmiştir. Bu sıcaklıkta patojenin sayısı kontrol grubunda 7,5 dakikada 7,76 log kob/g’dan 6,07 log kob/g’a, ZYE ilave edilen grupta ise 7,75 log kob/g’dan 5,39 log kob/g’a düşmüştür. Her iki grupta da 2,5 dakikadan sonra, meydana gelen azalma istatistiksel olarak önemli ($P<0,05$) bulunmuştur.

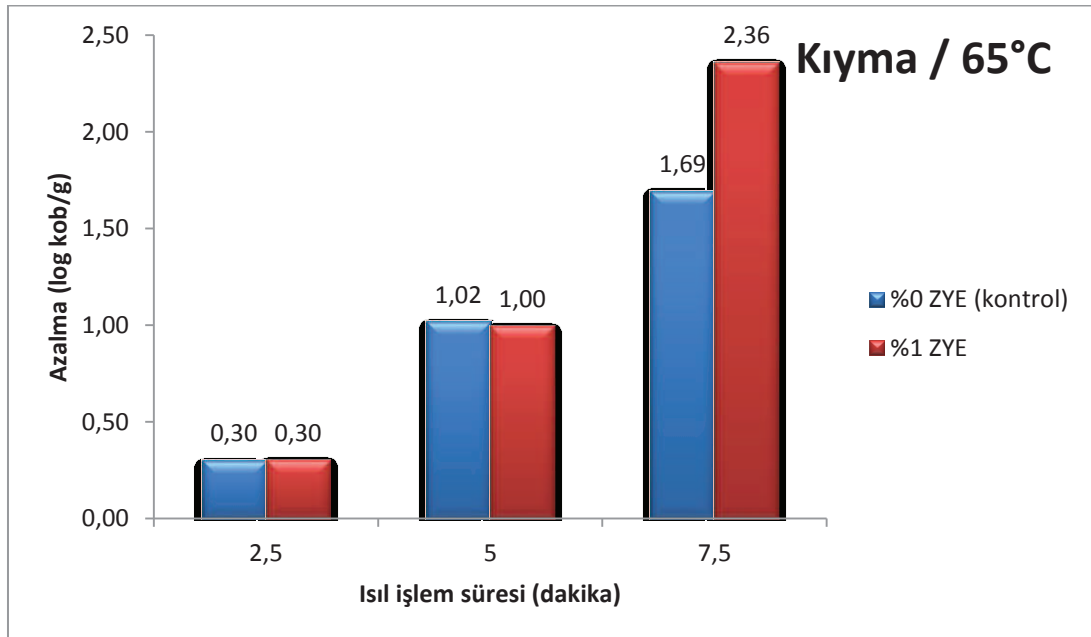
Tablo 4.9. 65°C’de Sous vide pişirilen kıymaların *L. monocytogenes* sayım sonuçları

Isıl işlem süresi (dakika)	%0 ZYE (Kontrol)	%1 ZYE
0.dk	7,76±0,14 aA	7,75±0,24 aA
2,5.dk	7,46±0,12 aA	7,44±0,32 aA
5.dk	6,75±0,52 bA	6,75±0,10 aA
7,5.dk	6,07±0,28 cA	5,39±1,20 bA

(a-b) aynı sütunda farklı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (P<0,05).

(A-B) aynı satırda farklı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (P<0,05).

65°C’de ısıtım işlem uygulanan sous vide pişirilen örneklerin farklı sürelerdeki *L. monocytogenes* sayısında azalma miktarı Şekil 4.6.’da gösterilmiştir. Her iki grupta da 2,5 dakikalık sürede *L. monocytogenes* azalma miktarları aynı olarak 0,30 log kob/g değeri elde edilmiştir. Kontrol grubunda 5 dakikada 1,02 log kob/g olan azalma miktarı, 7,5 dakikada 1,69 log kob/g olmuştur. ZYE grubunda ise 5. dakikada azalma miktarı kontrole benzer şekilde 1,00 log kob/g değerini gösterirken 7,5. dakikada kontrole kıyasla 2,36 log kob/g değerini göstermiştir.

Şekil 4.6. 65°C’de sous vide pişirilen kıymaların *L. monocytogenes* azalma miktarları (log kob/g)

4.3.2. Su aktivitesi ölçüm sonuçları

Çalışmada hammadde olarak kullanılan kıyma örneğinin su aktivitesi (a_w) değeri 0,967 olarak ölçülmüştür. ZYE ilave edilen örnek gruplarında su aktivitesi değerleri kontrole kıyasla 55 ve 60°C’de değişim göstermemiş ve sırasıyla 0,977 ve 0,974 bulunmuş, 65°C’de ise kontrol grubu için 0,974 olan a_w değeri ZYE grubu için 0,972 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. Sous vide pişirilen (55, 60 ve 65°C) kıymaların a_w değerleri

Sıcaklık	Süre	Kontrol	ZYE(%1)
55°C	0.dk	0,976±0,005	0,977±0,009
	15.dk	0,974±0,001	0,972±0,003
	30.dk	0,969±0,008	0,972±0,004
60 °C	0.dk	0,973±0,004	0,974±0,002
	10.dk	0,975±0,003	0,970±0,006
	20.dk	0,976±0,001	0,971±0,003
65°C	0.dk	0,974±0,004	0,972±0,003
	2,5.dk	0,972±0,005	0,973±0,007
	5.dk	0,977±0,002	0,975±0,002
	7,5.dk	0,978±0,001	0,974±0,003

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada ZYE'nin, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* Biyotip I ve *Bacillus cereus*'a karşı antimikrobiyel aktivitesi disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Disk difüzyon testi sonuçlarına göre test edilen bakteriler içinde ZYE'ye karşı en hassas olanın *L. monocytogenes* olduğu belirlenmiş ve çalışmanın bundan sonraki aşamaları bu bakteri ile gerçekleştirilmiştir. Bir sonraki aşamada ZYE (%0,5 ve %1) ilave edilen TSBYE besiyerine 7-8 log kob/ml *L. monocytogenes* inoküle edilmiş ve farklı sıcaklıklarda (55, 60 ve 65°C) ısıl işlem uygulanmıştır. Çalışmanın son aşamasında ise 7-8 log kob/g düzeyinde *L. monocytogenes* inoküle edilen kıymaya %1 oranında ZYE ilave edildikten sonra aynı sıcaklıklarda ısıl işlem uygulanmıştır. Isıl işlem sonrasında *L. monocytogenes* sayımı yapılarak ısıl işlem ve ZYE'nin patojen üzerine etkisi araştırılmıştır.

Ülkemizde bolca bulunan zeytin ve zeytin ürünleri antioksidan ve antimikrobiyel özelliklerinden dolayı insan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir. Zeytinyağı üretiminde yan ürün olan zeytin yaprağı güçlü antimikrobiyel etki göstermektedir (Markin ve ark., 2003; Pereira ve ark., 2007). Ancak belirli suşlar zeytin yaprağı ve yağına karşı direnç göstermekle birlikte genelde bu ürünler Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı potansiyel antimikrobiyel aktivite göstermektedir (Hussain ve ark., 2014).

Bu çalışmada *S. aureus* ve *L. monocytogenes* ZYE'na karşı en hassas olan patojenler olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde, Sudjana ve ark. (2009) tarafından ticari ZYE'nin antimikrobiyel aktivitesi üzerine yapılan bir çalışmada beş farklı bakteri (*L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus* [metisiline hassas], *S. aureus* [metisiline dirençli],

Salmonella enteritica) arasında ZYE'ye karşı en hassas olanın *S. aureus* olduğu belirlenmiştir.

Krishnan ve ark. (2014) taze tavuk etinin raf ömrünü arttırmada baharat ekstraktlarının antimikrobiyel ve antioksidan etkileri üzerine yaptıkları çalışmada, Gram pozitif bakterilerin Gram negatif bakterilere göre bu tür ekstraktlara karşı daha hassas olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada da benzer bulgular elde edilmiş olup, *B. cereus* hariç diğer iki Gram-pozitif bakterinin *Salmonella* ve *E. coli* serotiplerine göre ZYE'ye daha fazla hassas olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.1). Bilindiği üzere ZYE'nde kateşinler yer almaktadır (Benaventa-Garcia ve ark., 2000). Arakawa ve ark. (2004) yeşil çay ve siyah çaydaki kateşinlerin güçlü bakterisidal etki gösterdiklerini belirlemişlerdir. Kateşinler tarafından reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu ve bu reaktif oksijen türlerinin bakterisidal etkide önemli role sahip oldukları ortaya konmuştur. Yeşil çayda bulunan kateşinlerin bakteri sitoplazma membranı üzerine etkili oldukları ve sitoplazma membranına zarar vererek hücre içeriğinin dışarı sızmasına yol açtıkları saptanmıştır (Ikigai ve ark., 1993). Gram negatif bakterilerin Gram pozitif bakterilere göre kateşinlere daha dirençli olması, Gram negatif bakteri hücre duvarında bulunan dış membranın varlığı ile açıklanmaktadır. Buna göre Gram negatif hücreler hücre duvarı dışında yer alan dış membran sayesinde kateşinlerin zararlı etkilerinden korunmaktadır. Ikigai ve ark. (1993) yeşil çaydan elde edilen epigallokateşin gallata *S. aureus*'un *E. coli*'den daha duyarlı olduğunu göstermişlerdir.

L. monocytogenes'in ısı inaktivasyonu üzerinde farklı sıcaklıklar (57,5; 60 ve 62,5 °C), farklı konsantrasyonlarda NaCl (%0-3 w/w) ve elma polifenolünün (APP) tek başına ya da kombinasyonlarının değerlendirildiği Juneja ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada; düşük tuz seviyesi ve APP konsantrasyonu (%2,5 NaCl ve %0,5 APP) yüksek antimikrobiyel aktivite göstermiştir. NaCl patojenin ısı inaktivasyonunun üzerinde koruyucu etki göstermiştir ve konsantrasyonunun artmasıyla D değeri artmıştır. Sığır etine APP ilavesi ise tüm sıcaklıklarda D değerini düşürerek patojenin ısıl direncini azaltmıştır. Bu eklentilerin %0, %1, %2 ve %3'lük APP konsantrasyonlarında D değerleri sırasıyla 57,5°C için 9,23; 6,87; 5,90 ve 2,95

dakika, 60°C için 4,33; 3,72; 2,12 ve 1,53 dakika, 62,5°C için elde edilen değerler ise 1,93; 1,61; 1,50 ve 1,46 dakika'dır. Görüldüğü gibi konsantrasyon arttıkça D değeri düşmektedir. Ancak ısıнын yükselmesiyle birlikte her ne kadar yüksek sıcaklıklarda sıcaklığın etkisiyle hassasiyet daha fazla olsada D değerlerine bakıldığında konsantrasyonlar arasındaki fark düşük sıcaklıklarda daha belirgin olmaktadır.

Farklı bir çalışmada (Grosulescu ve ark., 2011) ise sıcaklık (56,3-60°C), sodyum laktat (%0-4,8) ve sodyum diasetat (%0-2,5) ve pediosinin (0-10000 AU) 10⁷ kob/g *L. monocytogenes* içeren Bologna tipi sosiste etkileri değerlendirilmiştir. Sodyum laktat koruyucu etki göstermiştir. Ayrıca çeşitli antimikrobiyel maddeler arasındaki etkileşimler sıcaklığa bağlı olarak sodyum laktat ve sodyum diasetatın yüksek konsantrasyonlarında değişiklik göstermiştir. Pediosin ilavesi ise 5000 AU'ya kadar olmak üzere özellikle düşük konsantrasyonlarda daha etkili bulunmuştur.

Grosulescu ve ark. (2011)'nin sonuçlarına benzerlik göstererek bu çalışmada uygulanan sıcaklıklar tek başına patojenin ölümünü hızlandırmıştır. Ancak ZYE eklentisi yapıldığında hem sous vide hemde in vitro denemelerde istatistiksel olarak önemli fark oluşturmada da bu ölüm süresi hızlanarak kontrol grubuna kıyasla daha etkin olmuştur. Juneja ve ark. (2013)'de APP konsantrasyonunun artmasıyla birlikte D değeri düşmüştür. Bu da patojenin direncinin kırılmasında ekstraktın ne kadar etkin olduğunu göstermektedir. Bizim çalışmamızda gerçekleştirilen sous vide pişirmede %1 ve in vitro denemelerinde %0,5 ve %1 konsantrasyonlarda ZYE ilavesi Juneja ve ark. (2013)'e benzer olarak konsantrasyonunun artmasıyla patojenin azalma miktarını gösteren log kob/ml-g değerleri artmıştır. Bu etki özellikle in vitro denemelerde; 55 °C'in 15. dakikasında, 60 °C'in 10. dakikasında ve 65 °C'in 2,5. dakikasında görülmektedir. Ancak bu üç koşulda da istatistiksel olarak gruplar arasındaki fark önemsizdir (P>0,05).

Franco-Vega ve ark. (2015) in vitro koşullarda *L. monocytogenes*'e 55, 60 ve 65 °C'de ısı işlem uygulamışlar ve bu sıcaklıklardaki D değerlerini sırasıyla 10,70; 5,10 ve 1,34 dakika olarak hesaplamışlardır. Ayrıca ultrasonikasyon uygulaması ile ısı işlem birlikte uygulandığında D değerleri daha azalmıştır.

Çalışmada uygulanan %0,5 ve %1'lik konsantrasyonda ZYE içeren in vitro denemelerde ve %1'lik konsantrasyonda ZYE eklenip sous vide pişirilen kıyma örneklerinde kontrol örneklerine (%0 ZYE) kıyasla *L. monocytogenes* sayısında özellikle 55 ve 60°C'de olmak üzere daha fazla azalma meydana gelmiştir. *L. monocytogenes*'in gıdalarda gelişiminin engellenmesi veya geciktirilmesi amacıyla bitkisel ekstraktların kullanımı konusunda yapılmış çalışmalar mevcuttur. Örneğin Menon ve Garg (2001) %0,5 ve %1 konsantrasyonda karanfil yağının et ve peynirde 30 ve 7 °C'de depolama süresince antilisterik etki gösterdiğini, %1 konsantrasyonda karanfil yağı ilavesinin patojenin sayısını 1-3 log kob/g azalttığını belirlemişlerdir. ZYE'nin kırmızı et (Aytul, 2010) ve karides (Ahmed ve ark., 2014) gibi gıdalarda mikrobiyel yük ve raf ömrü üzerine etkisi konusunda yapılmış çalışmalar bulunmakla birlikte, gıdalarda *L. monocytogenes* popülasyonu üzerine etkisinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Antilisterik etki antimikrobiyel maddenin konsantrasyonuna, uygulama sıcaklığına ve süreye bağlı olarak değişmekle birlikte antimikrobiyel maddenin özellikleri de önemlidir. Mikrobiyel bozulmaya hassas taze et ürünlerinin başında gelen kıyma içerdiği besin maddeleri, uygun pH ve su aktivitesi değerleri bakımından mikroorganizmalar için uygun bir gelişme ortamı sağlamaktadır (Değirmencioğlu ve ark., 2008). Bu çalışmada ZYE'nin ısıl işlemle birlikte *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyel etkisi in vitro koşullarda ve kıymada araştırılmıştır. Toplam ısıl işlem süreleri 55, 60 ve 65 °C için sırasıyla 30, 20 ve 7,5 dakika olarak ön denemeler ve literatür verilerine göre belirlenmiştir. Ancak uygulanan sıcaklık ve süre kombinasyonları patojeni tamamen inhibe etmeye yeterli olmamıştır. Bu nedenle çalışmada uygulanan tüm sıcaklık dereceleri için ısıl işlem süresinin uzatılmasıyla ZYE'nin *L. monocytogenes* üzerine etkisi konusunda daha net verilere ulaşılabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada gerçekleştirilen su aktivitesi ölçüm sonuçlarında değerler 0,969-0,978 aralığında bulunmuştur. Genel olarak ZYE ilavesinin kıymanın su aktivitesi değerini etkilemediği gözlenmiştir. Su aktivitesi azaldıkça *L. monocytogenes*'in ısıl direncinin

arttığı bilinmektedir. Sumner ve ark. (1991) su aktivitesi 0,98'den 0,90'a düşürüldüğünde *L. monocytogenes*'in $D_{65,6^{\circ}\text{C}}$ değerinin 0,36 dakikadan 3,8 dakikaya yükseldiğini rapor etmişlerdir. Buna göre, çalışmada ZYE ilavesinin su aktivitesi değerlerini etkilemediğinin belirlenmiş olması patojenin sayısında meydana gelen azalmanın su aktivitesinden ziyade ısıtma işlem ve/veya ZYE'den kaynaklandığını göstermektedir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular şu şekilde özetlenebilir:

- ZYE'nin *B. cereus* hariç olmak üzere genellikle Gram pozitif bakteriler üzerine Gram negatif bakterilere göre daha etkili olduğu ve çalışmada test edilen bakterilerden en hassas olanın *L. monocytogenes* olduğu belirlenmiştir.
- In vitro koşullarda %0,05 ve %1 ZYE ilavesi ısıtma işlemde uygulanan sıcaklığa ve süreye bağlı olarak değişmek üzere *L. monocytogenes* sayısının kontrol (%0 ZYE) örneklerinden 0,03-0,98 log kob/ml daha düşük olmasını sağlamıştır.
- Kıymada ise yine ısıtma işlemde uygulanan sıcaklık ve süreye bağlı olmak üzere %1 oranında ZYE ilavesinin *L. monocytogenes* sayısını kontrol örneklerine göre 0-0,99 log kob/g daha düşürdüğü gözlenmiştir.
- Kıymaya ZYE ilavesi su aktivitesi değerini etkilememiştir.

Gerçekleştirilen çalışmada baz alınan farklı sıcaklıklardan dolayı *L. monocytogenes*'in ısıtma direncinde farklılık gözlemlenmiş ve ZYE varlığında bu ısıtma direncin nasıl bir değişim gösterdiği değerlendirilmiştir. Farklı ekstraktların bu bakteri üzerinde antimikrobiyel etkisini gösteren çalışmalar yoğunlukta olmasına rağmen sıcaklıkla ilişkisini gösteren çalışmalara az rastlanılmaktadır. Var olan çalışmalarda da özellikle et ürünleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Sous vide pişirme ile birlikte sıcaklık ve ekstraktların bu bakteri üzerinde ısıtma direncine karşı nasıl bir etki göstereceği ise çalışmalarda rastlanılmamıştır. Karşılaştırma yapabilmek ve et gibi ürünlerin pişirme aşamasında bu tür ekstraktlar kullanılacak ise antimikrobiyel

etkilerinden yararlanabilmek için pişirme ile etkilerinin değerlendirildiği çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca bu tür ekstraktlarla ucuz, daha etkin ve gıda güvenliği açısından daha güvenilir ürünler elde edilebilir.

Son yıllarda besinsel, duyuşal ve mikrobiyel kalite bakımından sağladığı avantajlar bakımından ilgi çeken sous vide yöntemiyle ilgili çalışmalar arasında ZYE'nin ısıt işleminde *L. monocytogenes*'e karşı uygulayan bir başka çalışmaya rastlanmamış olup, bu alanda yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez çalışması sous vide yönteminin gıda endüstrisinde doğal antimikrobiyel maddelerle birlikte kullanım potansiyelinin araştırıldığı bir çalışmadır. Sonuçlara göre zeytin yaprağı ekstraktının ısıt işlem görmüş et ürünlerinde *L. monocytogenes*'in kontrol altına alınmasında doğal antimikrobiyel olarak kullanılabileceği ve gıda güvenliğinin sağlanmasında potansiyele sahip olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca, ZYE'nin diğer gıda bileşenleri ile etkileşimlerinin ve diğer doğal antimikrobiyel maddelerle birlikte kullanım olanaklarının da araştırılmasının gerekli olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Acar, C. 2012. Soğukta depolanmış Sardalya (*Sardina pilchardus*), İstavrit (*Trachurus trachurus*) ve Levrek (*Dicentrarchus labrax*) kıymalarına zeytin yaprağı ekstresinin etkisi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Ahmed, A.M. Rabii, N.S., Garbaj, A.M., Abolghait, S.K. 2014. Antibacterial effect of olive (*Olea europaea* L.) leaves extract in raw peeled undeveined shrimp (*Penaeus semisulcatus*). International Journal of Veterinary Science and Medicine, 2:53-56.
- Akkuş, R.F. 2012. *Listeria monocytogenes* ile kontamine edilmiş sığır eti prepratlarında nisin, lizozim, sitrik asit ve laktik asit'in etkisi. Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Anonim, 2011. *Listeria monocytogenes*. The Food Safety Authority of Ireland, Microbial Factsheet Series, Issue No.1, September 2011.
- Arakawa, H., Maeda, M., Okubo, S., Shimamura, T. 2004. Role of hydrogen peroxide in bactericidal action of catechin. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 27(3):277-281
- Ayana, B. 2007. Antimikrobiyel yenilebilir filmlerin üretimi ve özelliklerinin belirlenmesi. Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Aytul, K.K. 2010. Antimicrobial and antioxidant activities of olive leaf extract and its food applications. İzmir Institute of Technology. Yüksek Lisans Tezi.
- Baardseth, P., Bjerke, F., Martinsen, B.K., Skrede, G. 2010. Vitamin C, total phenolics and antioxidative activit in tip-cut green beans (*Phaseolus vulgaris*) and swede rods (*Brassica napus* var. *Napobrassica*) processed by methods used in catering. J.Sci. Food Agric., 90:1245-1255.
- Babur, T.E., Kayaalp, Y. 2015. Geleneksel pişirme yöntemlerinin et kalitesine etkileri. Journal of Tourism and Gastronomy Studies, 3/4:58-64.
- Baldwin, D.E. 2012. Sous vide cooking: A review. International Journal of Gastronomy and Food Science, 1:15-30.

- Basmacıoğlu-Malayoğlu, H., Aktaş, B. 2011. Zeytin yağı işleme yan ürünlerinden zeytin yaprağı ile zeytin karasuyunun antimikrobiyel ve antioksidan etkileri. *Hayvansal Üretim*, 52(1):49-58.
- Bauer, A.W, Kirby, E., Sherris, E.M. Turk, M. 1966. Antibiotic by standarized single disk method. *Am. J. Clin. Path.*, 45: 493-496.
- Bellio, A., Astegiano, S., Traversa, A., Bianchi, D.M., Gallina, S., Vitale, N., Zuccon, F., Decastelli, L. 2016. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in sliced, vacuum-packaged raw milk cheese stored at two different temperatures and time periods. *International Dairy Journal*, 57:15-19.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., Del Rio, J.A. 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, 68:457-462.
- Bisignano, C., Filocamo, A., Ginestra, G., Giofre, S.V., Navarra, M., Romeo, R., Mandalari, G. 2014. 3,4-DHPEA-EA from *Olea Europaea* L. is effective against Standard and clinicl isolates of *Staphylococcus sp*, *Ann Clin Microbiol Antimicrob*,13:24. Doi: 10.1186/1476-0711-13-24.
- Botsoglou, E., Govaris, A., Moulas, A., Botsoglou, Dr N. 2010. Oxidative stability and microbial growth of turkey breast fillets during refrigerated storage as influenced by feed supplementation with olive leaves, oregano and/or α – tocopheryl acetate. *British Poultry Science*, 51(6):760-768.
- Cayan, H. 2013. Fonksiyonel yumurta eldesinde yumurta tavuğu karmalarında zeytin yaprağının kullanım olanakları, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Coşansu, S., Mol, S., Alakavuk, D.U., Özturan, S. 2011. The effect of lemon juice on bonito (Sarda sarda, Bloch, 1793) preserved by sous vide packaging. *International Journal of Food Science and Technology*, 46:395-401.
- Creed, P.G. 1995. The sensory and nutritional quality of ‘sous vide’ foods. *Food Control*, 6(1):45-52.
- Creed, P.G. 1998. Sensory and nutritional aspects of sous vide processed foods. G.S. içinde, *Sous vide and cook chill processing fort he food industry* (s.pp. 57-88). Gaithersburg, MD., USA: Aspen Publishers INC., ISBN 0-7514-0433-0/978-07514-0433-3.
- Çetinkaya, S., Bilgin, S., Ertan, Ö.O., Bilgin, F. 2015. Vakum paketli pişirme yöntemi (Sous Vide) ve gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)’na uygulanması. *Eğirdir Su Ürünleri Dergisi*, 11(2):35-44.

- Çiçek, U., Bulgan, A. 2013. Et ve et ürünlerinde heterosiklik aminler. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 30 (1):25-32.
- Değirmencioğlu, N., Esmer, Ö.K., İrkin, R., Değirmencioğlu, A. Modifiye atmosferde ambalajlamanın kıymanın kimyasal ve mikrobiyolojik kalite özellikleri üzerine etkisi. Türkiye 10. Gıda Kongresi; 21-23 Mayıs 2008, Erzurum.
- Ducic, M., Klisara, N., Markov, S., Blagovic, B., Vidakovic, A. 2016. The fate and pasteurization-based inactivation of *Escherichia coli* O157, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in dry, fermented sausages. Food Control, 59:400-406.
- El-Ansari, A., Bekhit, A.E-D.A. 2014. Processing, storage and quality of cook-chill or cook-freeze foods. MM. Siddiqui, & M. Rahman (eds.), *Minimally Processed Foods*, Food Engineering Series (s. Chapter 7)), DOI 10.1007/978-3-319-10677-9_7, Switzerland.
- Espitia, P.J.P., Pacheco, J.J.R., De Melo, N.R., De F.F. Soares, N., Durango, A.M. 2013. Packaging properties and control of *Listeria monocytogenes* in Bologna by cellulosic films incorporated with pediocin. Braz. J. Food Technol, Campinas, 16(3):226-235, jul./set.2013.
- Faiza, I., Wahiba, K., Nassira, G., Chahrazed, B., Atık, B.F. 2011. Antibacterial and antifungal activities of olive (*Olea europaea* L.) from Algeria. J. Microbiol. Biotech. Res., 1(2):69-73.
- Fang ve Huang, 2014. Growth and survival kinetics of *Listeria monocytogenes* in cooked egg whites. Food Control, 36:191-198.
- FAOSTAT Date: Sun Jun 12 09:53:08 CEST 2016.
- Farber, J.M., Peterkin, P.I. 1991. *Listeria monocytogenes* , a food-borne pathogen. Microbiological Reviews, Sept:476-511.
- Franco-Vega, A., Ramirez-Corona, N., Lopez-Malo, A., Palou, E. 2015. Estimation of *Listeria monocytogenes* survival during thermoultrasonic treatments in non-isothermal conditions: Effect of ultrasound on temperature and survival profiles. Food Microbiology, 52:124-130.
- Friedman, M., Henika, P.R., Mandrell, R.E. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. Journal of Food Protection, 65(10):1545-1560.

- Gonzales-Fandos, E., Garcia-Linares, M.C., Villarino-Rodriguez, A., Garcia-Arias, M.T., Garcia-Fernandez, M.C. 2004. Evaluation of the microbiological safety and sensory quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processed by the sous vide method. Food Microbiology 21:193-201.
- Gram, L. 2004. How to meet and FSO-Control of *Listeria monocytogenes* in smoked fish industry. Mitt. Lebensm. Hyg. 95, 59-67.
- Grosulescu, C., Juneja, V.K., Ravishankar, S. 2011. Effects and interactions of sodium lactate, sodium diacetate, and pediocin on the thermal inactivation of starved *Listeria monocytogenes* on Bologna. Food Microbiology, 28:440-446.
- Gülcü, M., Demirci, A.Ş. Zeytin ve yaprağındaki biyoaktif bileşenler ve sağlık üzerine etkileri. I. Ulusal Zeytin Öğrenci Kongresi, 17-18 Mayıs 2008, Edremit/BALIKESİR.
- Halkman, A.K. 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Başak Matbaacılık, Ankara, 358.
- Harp, F. 2011. Gemlik, Domat, Adana Topağı, Adana yerli zeytin yapraklarının antioksidan etkilerinin belirlenmesi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Hayes, J.E., Stepanyan, V., Allen, P., O'grady, M.N., Kerry, J.P. 2010. Effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on the quality and shelf-life stability of packaged raw minced beef patties. Meat Science, 84:613-620.
- Hayes, J.E., Allen, P., Brunton, N., O'grady, M.N., Kerry, J.P. 2011. Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. Food Chemistry, 126:948-955.
- Hof, H., Nichterlein, T., Kretschmar, M. 1997. Management of Listeriosis. Clinical Microbiology Reviews, Apr. 10(2): 345-357.
- Huang, L. 2017. Dynamic kinetics analysis of growth of *Listeria monocytogenes* in a simulated comminuted, non-cured cooked pork product. Food Control, 71: 160-167.
- Hui, Y.H., Ghazala, S., Graham, D.M., Murrell K.D., Nip, W.K. 2004. Handbook of vegetable preservation and processing. Marcel Dekker, Inc.
- Hussain, A., Qarshi, I.A., Liaqat, R., Akhtar, S., Aziz, I., Ullah, I., Shinwari, Z.K. 2014. Antimicrobial potential of leaf and fruit extracts and oils of wild and cultivated edible olive. Pak. J. Bot., 46(4):1463-1468.

- Iborra-Bernad, C., Tarrega, A., Garcia-Segovia, O., Martinez-Monzo, J. 2014. Advantages of sous vide cooked red cabbage: Structural, nutritional and sensory aspects. *Food Science and Technology*, 451-460.
- Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y., Shimamura, T. 1993. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1147(1):132-136.
- Ismail, A., Marjan, Z.M., Foong, C.W. 2004. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry*, 87:581-586.
- Jae-Rim, B., Marth, E.H. 1989. Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* Vol. 17, No. 6, 634-643.
- Jang, J.D., Lee, D.S. 2005. Development of a *sous-vide* packaging process for Korean seasoned beef. *Food Control* 16:285-291.
- Jang, J.D., Seo, G.H., Lyu, E.S., Yam, K.L., Lee, D.S. 2006. Hurdle effect of vinegar and sake on Korean seasoned beef preserved by sous vide packaging. *Food Control*, 17:171-175
- Juneja, V.K., Merner, B.S. 1996. Growth of *Clostridium perfringens* from spore inocula in *sous-vide* turkey products. *International Journal of Food Microbiology*, 32:115-123.
- Juneja, V.K., Altuntaş, E.G., Ayhan, K., Hwang, C.A., Sheen, S., Friedman, M. 2013. Predictive model for the reduction of heat resistance of *Listeria monocytogenes* in ground beef by the combined effect of sodium chloride and apple polyphenols. *International Journal of Food Microbiology*, 164:54-59.
- Karre, L., Lopez, K., Getty, K.J.K. 2013. Natural antioxidants in meat and poultry products. *Meat Science*, 94:220-227.
- Korukluoğlu, M., Şahan, Y., Yiğit, A., Karakas, R. 2006. Antifungal activity of olive leaf (*Olea Europaea L.*) extracts from the Trilye Region of Turkey. *Annals of Microbiology*, 56(4) 359-362.
- Krishnan, K.R., Babuskin, S., Az Hagu Saravana Babu, P., Sasikala, M., Sabina, K., Archana, G., Sivarajan, M., Sukumar, M. 2014. Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat. *International Journal of Food Microbiology*, 171:32-40.
- Lee, Ok-Hwan., Lee, Boo-Yong. 2010. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology* 101:3751-3754.

- Lomonaco, S., Nucera, D., Filipello, V. 2015. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. *Infection, Genetics and Evolution*, 35:172-183.
- Mackiw, E., Modzelewska, M., Maka, L., Sciezynska, H., Pawlowska, K., Postupolski, J., Korsak, D. 2016. Antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat products in Poland in 2007-2011. *Food Control*, 59:7-11.
- Markin, D., Duek, L., Berdicevsky, I. 2003. In vitro antimicrobial activity of olive leaves. *Blackwell Publishing LTD. Mycoses*, 48:132-136.
- Menduh, B. 2015. Zeytin zeytin çekirdeği ve zeytin yaprağındaki Oleuropein bileşiğinin izolasyonu ve miktarlarının karşılaştırılması. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Menon, K.V., Garg, S.R. 2001. Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. *Food Microbiology*, 18:647-650.
- Miller, F.A., Ramos, B., Brandao, T.R.S., Teixeira, P., Silva, C.L.M. 2010. Comparison of recovery methods for the enumeration of injured *Listeria innocua* cells under isothermal and non-isothermal treatments. *Food Microbiology*, 27:1112-1120.
- Mol, S., Özturan, S., Coşansu, S. 2012. Determination of the quality and shelf life of sous vide packaged whiting (*Merlangius Merlangus euxinus*, Nordman, 1840) stored at cold (4C) and temperature abuse (12C). *Journal of Food Processing and Preservation*, 36:497-503.
- Mytle, N., Anderson, G.L., Doyle, M.P., Smith, M.A. 2006. Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. *Food Control*, 17:102-107.
- Nyati, H. 2000. An evaluation of the effect of storage and processing temperatures on the microbiological status of sous vide extended shelf-life products. *Food Control*, 11:471-476.
- Oz,F., Zikirov, E. 2015. The effects of sous-vide cooking method on the formation of heterocyclic aromatic amines in beef chops. *LWT-Food Science and Technology*, 64:120-125.
- Paik, K. -D., Kim, H. -J., Nam, K.-J., Kim, C. -J., Lee, S. -E., Lee, D. -S. 2006. Effect of nisin on the storage of *sous vide* processed Korean seasoned beef. *Food Control* 17:994-1000.
- Patras, A., P.Brunton, N., Butler, F. 2010. Effect of water immersion and sous vide processing on antioxidant activity, phenolic, carotenoid content and color of carrots disks. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34: 1009-1023.

- Peker, H. 2012. Keçiboynuzu gamı kullanılarak az yağlı yoğurt ve zeytin yaprağı ekstraktı kullanılarak fonksiyonel meyveli yoğurt üretimlerinin araştırılması. Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Pereira, A.P., Ferreira, I.C.F.R., Marcelino, F., Valentao, P., Andrade, P.H., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., Pereira, J.A. 2007. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*, 12:1153-1162.
- Pereira, P.M., Vicente, A.F. 2013. Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science*, 93:586-592.
- Rinaldi, M., Dall’asta, C., Meli, F., Morini, E., Pellegrini, N., Gatti, M., Chiavaro, E. 2013. Physicochemical and microbiological quality of sous-vide-processed carrots and brussels sprouts. *Food Bioprocess Technol*, 6:3076-3087.
- Rinaldi, M., Dall’asta, C., Paciulli, M., Cirlini, M., Manzi, C., Chiavaro, E. 2014. A novel time/temperature approach to Sous Vide cooking of beef muscle. *Food Bioprocess Technol*, 7:2969-2977
- Rohani, S.M.R., Moradi, M., Mehdizadeh, T., Saei-Dehkordi, S.S., Griffiths, M.W. 2011. The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. *LWT-Food Science and Technology*, 44:2260-2265.
- Sakallı, A.Ö., Aktaş, T. 2011. Drying of olive tree (*Olea europaea*) leaves using different drying techniques11. Uluslararası Tarımsal Mekanizasyon ve Enerji Kongresi, 21-23 Eylül 2011, Tekirdağ, s. 424-428.
- Saraiva, C., Fontes, M.C., Patarata, L., Martins, C., Cadavez, V., Gonzales- Barron, U. 2016. Modelling the kinetics of *Listeria monocytogenes* in refrigerated fresh beef under different packaging atmospheres. *LWT-Food Science and Technology*, 66:664-671.
- Saygın, B. 2009. Zeytin yaprağındaki başlıca fenolik bileşikler ve bunların antioksidan kapasiteleri üzerine araştırmalar. Ege Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Schellekens, T., Martens, T. 1993. “Sous vide” cooking. Brussels: Commission of the European Communities Directorate General XII, Science Research and Development Publication N EUR 15018 EN.
- Schellekens, M. 1996. New research issues in sous-vide cooking. *Trends in Food Science & Technology* August vol.7.

- Sevim, D. 2011. Zeytin yaprağı ilave edilerek elde edilen zeytinyağlarının bazı temel kalite kriterleri ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Shah, M.A., Don Bosco, S.J., Mir, S.A. 2014. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Science*, 98:21-33.
- Silva, S., Gomes, L., Leitaó, A.V., Vilas Boas, L. 2006. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Sci. Tech. Int.*, 12(5):385-396.
- Simpson, M.V., Smith, J.P., Doods, K., Ramaswamy, H.S., Blanchfield, B., Simpson, B.K. 1995. Challenge studies with *Clostridium botulinum* in a sous-vide spaghetti and meat-sauce product. *Journal of Food Protection*, 58(3):229-234.
- Skandamis, P.N., Yoon, Y., Stopforth, J.D., Kendall, P.A., Sofos, J.N. 2008. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiology*, 25:294-303.
- Stekelenburg, F.K. 2003. Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* in Frankfurter sausage by the addition of potassium lactate and sodium diacetate mixtures. *Food Microbiology*, 20:133-137.
- Sudjana, A.N., D'orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N., Riley, T.V., Hammer, K.A. 2009. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33:461-463.
- Sumner, S.S., Sandros, T.M., Harmon, M.C., Scott, V.N., Bernard, D.T. 1991. Heat resistance of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in sucrose solutions of various water activities. *Journal of Food Science*, 56(6):1741-1743.
- Tompkin, R.B. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the Food-Processing Environment. *Journal of Food Protection*, 65(4): 709-725.
- Tranter, H.S., Tassou, S.C., Nychas, G.J. 1993. The effect of the olive phenolic compound, oleuropein, on growth and enterotoxin B production by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 74:253-259.
- Tuik, Zeytin üretimi. www.tuik.gov.tr/Prelstatistik Tablo.do?istab_id=1073, Erişim Tarihi: 12.06.2016.
- Valimaa, A.-L., Tilsala-Timisjarvi, A., Virtanen, E. 2015. Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain- A review. *Food Control*, 55:103-114.
- Vlok, N.H. 1998. Effects of heat processing on product quality of sous-vide broccoli packs. *Magister Technologiae: Food Technology*.

- Yavuz, N. 2015. Kütahya ilinde tüketime sunulan gıdalarda *Listeria monocytogenes* varlığının araştırılması. Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Yıldız, G., Uylaşer, V. 2011. Doğal bir antimikrobiyel: Oleuropein. U.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi, 1(25):131-142.
- Yılmaz, H., Bilici, S. 2014. Toplu beslenme hizmetlerinde alternatif pişirme yöntemi: “sous vide”. GIDA, 40(3):163-170.
- Zikirov, E. 2014. Sous-vide pişirme yönteminin sığır etinde heterosiklik aromatik amin oluşumu ve bazı kalitatif kriterler üzerine etkisi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enst., Yüksek Lisans Tezi.
- Wang, S.H., Chang, M.H., Chen, T.C. 2004. Shelf-life and microbiological profiler of chicken wing products following Sous vide treatment. Internatonal Journal of Poultry Science, 3(5): 326-332.
- Werlein, H.-D. 1998. Comparison of the quality of sous vide and conventially processed carrots. Z Lebensm Unders Forsch A, 207: 311-315.
- Winkenhausen, E., Pospiech, R., Laufenberg, G. 2005. Antifungal activity of phenolic compounds extracted from dried olive pomace. Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia, 1(24):41-46.

ÖZGEÇMİŞ

Özlem KIYMETLİ, 11.05.1991’de İzmir’de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Bursa-Yenişehir’de tamamladı. 2014 yılında Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümünden mezun oldu. Aynı yıl içerisinde Sakarya Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü’nde yüksek lisans eğitimine başladı.

