

Uçucu Yağ İçeren Yenilebilir Kitosan Filmlerinin *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* O157:H7 Üzerine Etkinlikleri ^[1]

Emrah TORLAK *  Mustafa NİZAMLIOĞLU **

[1] Bu çalışma "Doğal Antimikrobiyal Maddeler ile Hazırlanan Yenilebilir ve Kaplanmış Plastik Filmlerin Gıda Kaynaklı Bazı Patojenlere Etkileri" isimli doktora tezinin bir bölümüdür

* İl Kontrol Laboratuvarı, TR-42090 Konya - TÜRKİYE

** Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Veteriner Fakültesi, Selçuk Üniversitesi, TR-42075 Konya - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2010-3768

Özet

Bu çalışmada kitosan ve uçucu yağ içeren kitosan solüsyonları ile hazırlanan yenilebilir filmlerin *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* O157:H7'ye karşı antimikrobiyal etkinlikleri kaşar peyniri üzerinde değerlendirilmiştir. Kekik ve karanfil uçucu yağları film solüsyonlarına %0.5 ve %1 oranında ilave edilmiştir. Kaşar peyniri örnekleri *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7 ile Log 5 kob/g düzeyinde kontamine edilmiştir. Yapay olarak kontamine edilen örnekler hazırlanan filmler ile kaplanmış ve 4°C'de 14 gün muhafaza edilmiştir. Muhafazanın 1, 7 ve 14. günlerinde yapılan sayımlar ile filmlerin *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7'ye karşı antimikrobiyal etkinlikleri değerlendirilmiştir. Muhafaza periyodu sonunda tüm film tiplerinin her iki patojene karşı antimikrobiyal etkinliği kontrol grubuna nazaran önemli düzeyde bulunmuştur (P<0.05). Kontrol grubuna nazaran yenilebilir filmler ile kaplanmış örneklerde *S. aureus* sayısı 0.90 Log ile 2.66 Log arasında ve *E. coli* O157:H7 sayısı 0.75 Log ile 2.32 Log arasında düşük tespit edilmiştir.

Anahtar sözcükler: Antimikrobiyal film, Kitosan, Uçucu yağ, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, Kaşar peyniri

Effectiveness of Edible Chitosan Films Containing Essential Oils on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7

Summary

In this study antimicrobial efficacy of edible films prepared with chitosan solution and chitosan solutions containing essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 were evaluated on kashar cheese. Oregano and clove oils were added to edible film solutions at 0.5% and 1%. Kashar cheese samples were contaminated with *S. aureus* and *E. coli* O157:H7 at 5 Log cfu/g. Artificially contaminated cheese samples were wrapped with prepared films and stored at 4°C for 14 days. Antimicrobial effectiveness of films against *S. aureus* and *E. coli* O157:H7 were evaluated by counts performed on 1, 7 and 14 days of storage period. At the end of storage period antimicrobial effectiveness of all film types against both pathogens were determined as significant (P<0.05). Applications of edible films to samples were resulted 0.90 to 2.66 Log reduction in count of *S. aureus* and 0.75 to 2.32 Log reduction in count of *E. coli* O157:H7 compared to control samples.

Keywords: Antimicrobial film, Chitosan, Essential oil, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, Kashar cheese

GİRİŞ

Yenilebilir filmler, gıda için gaz ve nem bariyeri sağlayan ve gıda ile birlikte tüketilebilir ince bir polimer tabakası olarak tanımlanabilir. Yenilebilir filmler bariyer özelliklerinin yanı sıra antimikrobiyal ve antioksidan maddeler için taşıyıcı bir matris olarak kullanılabilirler ¹.

Kitinin deasetilasyonu ile elde edilen doğal kaynaklı bir polimer olan kitosan antimikrobiyal aktivitesi nedeniyle gıdalar için potansiyel bir koruyucu katkı maddesidir. Bu özelliğinin yanı sıra film oluşturabilme ve bariyer özellikleri kitosanı antimikrobiyal özellikte yenilebilir film ve kapla-



İletişim (Correspondence)



+90 332 3223424



torlakemrah@yahoo.com

malar için ideal bir materyal haline getirmektedir. Kitosanın Kore ve Japonya'da uzun yıllardır gıda katkı maddesi olarak kullanımı yasaldır. ABD'de ise GRAS (Generally recognized as safe) olarak onaylanmıştır ².

Yapılan çalışmalar bileşimlerdeki fenolik maddeler nedeniyle güçlü antimikrobiyal etkiye sahip olan uçucu yağların antimikrobiyal ambalaj sistemlerinde kullanım olanaklarını ortaya koymuştur ^{3,4}. Karvakrol, cinnamaldehyd, eugenol, *p*-simen, timol ve mentol gibi birçok uçucu yağ bileşeni tüketici sağlığına yönelik bir risk oluşturmadığından dolayı AB tarafından gıdalarda kullanımı yasal olan aroma maddeleri kapsamında değerlendirilmektedir ⁵. AB'de olduğu gibi ABD'de birçok uçucu yağ bileşeninin gıda katkı maddesi veya GRAS olarak kullanımı yasaldır ⁶.

Gıdalarda arzu edilmeyen mikrobiyal gelişme genellikle gıdanın yüzeyinde meydana gelmektedir. Yüzeydeki mikrobiyal gelişmeyi engellemek için antimikrobiyal maddeler püskürtme gibi teknikler ile doğrudan gıda yüzeyine uygulanabilmektedir. Ancak doğrudan yüzey uygulamalarının antimikrobiyal maddenin hızlı bir şekilde difüze olması ve yüksek miktarda antimikrobiyal madde kullanımı gibi dezavantajları mevcuttur. Alternatif olarak antimikrobiyal maddelerin ambalaj materyalleri ile kullanılması ile etken maddenin gıda yüzeyine difüzyonu yavaş bir şekilde gerçekleşmekte ve muhafaza süresi boyunca arzu edilen konsantrasyonda kalması sağlanmaktadır ^{7,8}.

Bu çalışmada, kitosan ve kekik ve karanfil uçucu yağları içeren kitosan filmlerinin önemli gıda patojenlerinden olan *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* O157:H7'ye karşı etkinlikleri doğrudan yapay kontamine gıda örnekleri ile buzdolabı sıcaklığında muhafaza şartları altında değerlendirilmiştir. Yapay kontaminasyon için yarı sert geleneksel Türk peynirlerinden kaşar peynirinin olgunlaşma uygulanmamış çeşidi olan taze kaşar peyniri örnekleri kullanılmıştır ⁹.

MATERYAL ve METOT

Kitosan ve Uçucu Yağlar

Film solüsyonlarının hazırlanmasında kullanılan orta moleküler ağırlıkta kitosan Sigma-Aldrich (Milwaukee, ABD)'den temin edilmiştir. *Origanum onites* türünden su buharı distilasyonu ile elde edilmiş ve %80 oranında karvakrol içeren kekik uçucu yağı İnan Tarım (Antalya, Türkiye)'den, *Syzygium aromaticum* türünün tomurcuklarından elde edilmiş ve %88 oranında eugenol içeren karanfil uçucu yağı ise Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir.

Kaşar Peyniri Örnekleri

Çalışma kullanılan tam yağlı taze kaşar peyniri örnekleri Büyük Aygın A.Ş. (Konya, Türkiye)'den temin edilmiştir ve dilimleme makinesi (Bizerba, Almanya) ile 3 mm kalınlığında dilimlenmiştir. Mikroorganizma sayımlarında kolay-

lık sağlama amacıyla 10 g ağırlığında (5.5×5.5 cm) dilimler kullanılmıştır. Yapay kontaminasyon için *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* O157:H7 ile doğal olarak kontamine olmayan kaşar peyniri örnekleri kullanılmıştır.

Film Solüsyonlarının Hazırlanması

Kitosanın (%2, a/h) asetik asit (%1, h/h) çözeltisi içinde çözündürülmesi ile saf kitosan solüsyonu hazırlanmıştır. Solüsyona plastikleştirici olarak %0.7 (h/h) oranında gliserol ilave edilmiştir. Hazırlanan solüsyon manyetik karıştırıcı (Heidolph, Almanya) ile 6 saat boyunca karıştırılmıştır. Kitosan solüsyonundan çözünmeyen partiküllerin uzaklaştırılması için 5.000 rpm'de 5 dak. santrifüj (Hettich, Almanya) edilmiştir ¹⁰.

Uçucu yağ içeren kompozit kitosan solüsyonları hazırlanan saf kitosan solüsyonuna kekik ve karanfil uçucu yağlarının %0.5 ve %1 (h/h) oranında ilave edilmesi ile elde edilmiştir. Kekik ve karanfil uçucu yağlarının film solüsyonu içinde homojen bir şekilde dağılması için uçucu yağlar öncelikle Tween 20 ile vortex (Heidolph, Almanya) yardımı ile karıştırılmışlardır (%0.5, h/h) ¹¹. Tween 20 ile karıştırılan uçucu yağların ilavesinden sonra kompozit film solüsyonları homojenizer (Ika, Almanya) ile 20.000 rpm'de 1 dak. homojenize edilmiştir.

Yenilebilir Filmlerin Hazırlanması

Yenilebilir filmler solvent evaporasyon metodu ile hazırlanmıştır. Hazırlanan film solüsyonları pleksiglas petri kutularına taksim edilmiş (10 mg kitosan/cm²) ve 20 saat boyunca oda sıcaklığında evaporasyona tabi tutulmuştur. Evaporasyon sonunda oluşan filmler kullanım aşamasına kadar petri kutularında 4°C'de muhafaza edilmiştir. Antimikrobiyal etkinliklerinin değerlendirilmesi amacıyla 5 farklı yenilebilir film hazırlanmıştır;

Ki; Saf kitosan solüsyonu ile hazırlanmış kitosan filmi, KiKe (%0.5); %0.5 oranında kekik uçucu yağı içeren kitosan filmi, KiKa (%1); %1 oranında kekik uçucu yağı içeren kitosan filmi, KiKa (%0.5); %0.5 oranında karanfil uçucu yağı içeren kitosan filmi, KiKa (%1); %1 oranında karanfil uçucu yağı içeren kitosan filmi.

Örneklerin Hazırlanması ve Muhafazası

Kaşar peynirleri örneklerinin yapay kontaminasyonu için kullanılan *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) suşu Microbiologics Inc. (Saint Cloud, ABD)'den temin edilmiştir. *Escherichia coli* O157:H7 serotipi Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden temin edilmiştir. Yapay kontaminasyon için bakteriyel yoğunluğu yaklaşık 10⁷ kob/ml düzeyine ayarlanan inokulum kullanılmıştır. Steril petri kutuları içine konulan kaşar peyniri dilimleri (10 g) 0.1 ml inokulum ile kontamine edilmiştir. Böylece yaklaşık 10⁵ kob/g (5 Log kob/g) düzeyinde kontamine edilen örnekler inokulumun absorbe olması amacıyla 4°C'de 15 dak. bekletilmişlerdir.

Kontrol grubu olarak kontamine edilmiş ve kitosan filmleri ile kaplanmamış kaşar peyniri dilimleri kullanılmıştır.

Kontamine kaşar peyniri dilimlerinin kaplanması için 6×6 cm ebadında filmler kullanılmıştır. Örneklerin kaplanmasından önce filmlerin örnekler ile temas edecek yüzleri biyogüvenlik kabini içinde 2 d UV ışık altında tutulmuşlardır¹². Bu işlemden sonra kontamine kaşar peyniri dilimleri iki film arasında steril stomacher poşetleri içine alınmış ve ısı kapatma cihazı (Uzvac, Türkiye) ile ambalajlanmıştır.

Hazırlanan örnekler soğutmalı inkübatörde (Binder, Almanya) 4±1°C'de 14 gün süreyle muhafaza edilmişlerdir. Muhafazanın 1, 7 ve 14. günlerinde örneklerdeki *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* O157:H7 sayısı saptanmıştır.

Mikroorganizma Sayımları

Örneklerdeki *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* O157:H7 sayıları 10 g örnek kullanılarak hazırlanan başlangıç süspansiyonu ve dilusyonlardan izolasyon besiyelerine inokülasyon ve 37±1°C'de 24±1 saat inkübasyon sonunda belirlenmiştir. *Staphylococcus aureus* sayımı için Baird Parker Agar (Merck), *Escherichia coli* O157:H7 sayımı Cefixime-Tellurite ilaveli Sorbitol MacConkey Agar (bio-Mérieux Co, Marcy l'Etoile, Fransa) kullanılmıştır¹³. Gerekli görüldüğünde karakteristik koloniler VITEK II identifikasyon sistemi (bioMérieux, Fransa) ile doğrulanmıştır.

İstatistiksel Değerlendirme

Bağımsız üç tekrar olarak yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar SPSS (Version 10.0) programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilmiş ve ortalama

değerler %95 güven düzeyinde Duncan çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırılmıştır.

BULGULAR

Kontrol grubu örneklerinde *S. aureus* sayısı 14 günlük muhafaza periyodu sonunda 4.92 Log kob/g'dan 4.75 Log kob/g'a düşmüştür. Yenilebilir filmler ile kaplanmış kaşar peyniri örneklerinde *S. aureus* sayısının 14. gün sonunda kontrol grubuna nazaran 0.90 Log ile 2.66 Log arasında azaldığı ve tüm film tiplerinin kontrol grubuna göre antimikrobiyal etkisinin önemli düzeyde (P<0.05) olduğu tespit edilmiştir. Muhafaza periyodu sonunda yapılan sayım sonuçlarına göre film solüsyonlarına %0.5 ve %1 oranında kekik ve karanfil uçucu yağı ilavesinin kitosan filmlerinin *S. aureus*'a karşı etkisini önemli düzeyde arttırdığı (P<0.05) tespit edilmiştir. Örneklerde *S. aureus* sayısında en fazla azalmayı sağlayan %1 oranında kekik uçucu yağı içeren kitosan filmlerinden elde edilen sonuçlar ile %0.5 oranında kekik (KiKe [%0.5]) ve karanfil uçucu yağı (KiKa [%0.5]) içeren filmlerden elde edilen sonuçlar arasındaki fark önemli düzeyde (P<0.05) bulunmuştur (Tablo 1).

Muhafaza periyodu sonunda kontrol grubu örneklerinde *E. coli* O157:H7 sayısının 4.88 Log kob/g'dan 4.51 Log kob/g'a düştüğü görülmüştür. Yenilebilir filmler ile kaplanmış kaşar peyniri örneklerinde *E. coli* O157:H7 sayısının 14. gün sonunda kontrol grubuna nazaran 0.75 Log ile 2.32 Log arasında azaldığı ve tüm film tiplerinin kontrol grubuna göre antimikrobiyal etkisinin önemli düzeyde (P<0.05) olduğu tespit edilmiştir. Uçucu yağların ilavesinin kitosan filmlerin *E. coli* O157:H7'ye karşı etkisini önemli düzeyde arttırdığı (P<0.05) tespit edilmiştir. Kaşar peyniri

Tablo 1. Yenilebilir filmlerin kaşar peyniri örneklerinde *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* O157:H7'ye karşı etkinlikleri

Table 1. Effectiveness of edible films against *S.aureus* and *E. coli* O157:H7 on kashar cheese samples

Film Tipi	Kontaminasyon	Örnekleme Günleri		
	Düzeyi	1	7	14
<i>S. aureus</i>				
Kontrol	4.92±0.31*	4.95±0.27 ^a	4.92±0.23 ^a	4.75±0.23 ^a
Ki		4.67±0.24 ^{ab}	4.16±0.16 ^b	3.85±0.34 ^b
KiKe (%0.5)		4.45±0.30 ^{bc}	3.62±0.23 ^{cd}	3.06±0.37 ^c
KiKe (%1)		4.28±0.06 ^c	3.48±0.14 ^d	2.09±0.36 ^d
KiKa (%0.5)		4.52±0.11 ^{abc}	3.94±0.15 ^{bc}	3.11±0.07 ^c
KiKa (%1)		4.28±0.22 ^{bc}	3.68±0.26 ^{cd}	2.74±0.68 ^{cd}
<i>E. coli</i> O157:H7				
Kontrol	4.88±0.21	4.79±0.23 ^a	4.76±0.15 ^a	4.51±0.11 ^a
Ki		4.62±0.13 ^b	4.17±0.19 ^b	3.76±0.20 ^b
KiKe (%0.5)		4.24±0.06 ^b	3.82±0.18 ^c	2.99±0.13 ^c
KiKe (%1)		4.16±0.24 ^b	3.31±0.09 ^e	2.19±0.20 ^d
KiKa (%0.5)		4.46±0.20 ^{ab}	3.75±0.26 ^{cd}	2.87±0.66 ^c
KiKa (%1)		4.24±0.26 ^b	3.46±0.22 ^{de}	2.75±0.08 ^c

* Ortalama±standart sapma (n=3), Log kob/g

^a Aynı sütunda farklı üssel ifadeye sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (P<0.05)

örneklerinde %1 oranında kekik uçucu yağı içeren kitosan filmlerinden elde edilen sonuçlar ile uçucu yağ içeren diğer filmlerden elde edilen sonuçlar arasındaki fark önemli düzeyde ($P<0.05$) bulunmuştur (Tablo 1).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bir gıda katkı maddesi olan ¹⁴ gliserol ilavesi ile hazırlanan yenilebilir filmlerin yeterli elastikiyete sahip olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde Suyatma ve ark.¹⁵ gliserolün kitosan filmleri için ideal bir plastikleştirici olduğunu ve kitosan miktarının %20'si oranında gliserolün film bileşimi ile ilavesinin yeterli elastikiyeti sağladığını bildirmişlerdir.

Buzdolabı sıcaklığında muhafaza periyodu sonunda kontrol grubu örneklerinde *S. aureus* sayısı 0.17 Log düzeyinde azalmıştır. Bu durum laktik asit bakterileri başta olmak üzere rekabetçi flora ve *S. aureus*'un zayıf rekabetçi özelliği ile açıklanabilir ¹⁶. Meyrand ve ark.¹⁷ 4°C'de 30 gün muhafaza edilen camembert peyniri örneklerinde *S. aureus* sayısında yaklaşık 1 Log düzeyinde azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Bachmann ve Spahr ¹⁸ *S. aureus* ile yaklaşık 7 Log düzeyinde kontamine olan yarı sert peynir örneklerinde 11-13°C'de 90 gün muhafaza sonunda *S. aureus*'un tamamen inhibe olduğunu bildirmişlerdir.

Muhafaza periyodu sonunda tüm yenilebilir filmlerin *S. aureus*'a karşı etkinliklerinin kontrol grubuna nazaran önemli düzeyde ($P<0.05$) olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar kitosan ve kitosan temelli kompozit filmlerin *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal etkilerini ortaya koymuştur ⁴. Fernandez-Saiz ve ark.¹⁹ asetik asit ile hazırlanan kitosan filmlerinin *S. aureus*'a karşı etkinliğini sıvı besiyerinde *in vitro* olarak değerlendirdikleri çalışmalarında kitosan filmlerinin *S. aureus* sayısını kontrol grubuna nazaran yaklaşık 2.5 Log düzeyinde azalttığını bildirmişlerdir.

Dorman ve Deans ²⁰ kekik ve karanfil uçucu yağları ve ana bileşenlerinin *S. aureus*'a karşı daha güçlü antibakteriyel etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada muhafaza periyodu sonunda yapılan sayım sonuçları film solüsyonlarına kekik ve karanfil uçucu yağlarının ilavesinin filmlerin *S. aureus*'a karşı etkinliğini önemli düzeyde ($P<0.05$) arttırdığını göstermiştir. Becerril ve ark.²¹ kekik uçucu yağı içeren plastik filmlerin *S. aureus* hücrelerinde hücresel bütünlüğün bozulması ve stoplazmik içeriğin koagülasyonu gibi önemli değişimlere neden olduğunu gözlemlemişlerdir.

Kontrol grubu örneklerinde 14. gün sonunda *E. coli* O157:H7 sayısı 0.36 Log düzeyinde azaldığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar buzdolabı sıcaklığında muhafaza edilen farklı peynir örneklerinde *E. coli* O157:H7 sayısının örneklerin pH'sı ve rekabetçi floraya bağlı olarak azaldığını ortaya koymuştur. Lekkas ve ark.²² 4°C'de 28 gün muhafaza edilen ve pH'sı 3.9 olan Galotyri tipi peynir örneklerinde *E. coli* O157:H7 sayısında yaklaşık 1.5 Log düzeyinde bir

azalma olurken pH'sı 3.7 olan örneklerde *E. coli* O157:H7'nin tamamen inhibe olduğunu saptamışlardır. Spano ve ark.²³ *E. coli* O157:H7 ile 2 Log düzeyinde kontamine olan mozarella örneklerinde *E. coli* O157:H7'nin 4°C'de 7 gün muhafaza sonunda tamamen inhibe olduğunu bildirmişlerdir.

Kitosan filmlerinin kontamine kaşar peyniri örneklerinde *E. coli* O157:H7 sayısını muhafaza periyodu sonunda önemli düzeyde ($P<0.05$) azalttığı tespit edilmiştir. Bu sonuç katyonik yapıdaki kitosan moleküllerinin Gram negatif hücre membranındaki anyonik komponentler ile etkileşimi ile membran bütünlüğünü bozmaları ile açıklanabilir ²⁴. Joerger ve ark.⁴ kitosan ile kaplanmış plastik filmlerin et eksudatı örneklerinde *E. coli* O157:H7 sayısını yaklaşık 2 Log düzeyinde azalttığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte Zivanovic ve ark.¹¹ asetik asit ile hazırlanan kitosan filmlerinin 10°C'de 5 gün muhafaza edilen salam örneklerinde *E. coli* O157:H7 sayısında kontrol grubuna nazaran önemli bir değişime neden olmadığını bildirmişlerdir.

Muhafaza periyodu sonunda yapılan sayım sonuçlarına göre film solüsyonlarına uçucu yağ ilavesi filmlerin *E. coli* O157:H7 üzerine etkilerini önemli düzeyde ($P<0.05$) arttırmıştır. Bununla birlikte kekik uçucu yağı ilavesinin örneklerde *E. coli* O157:H7 üzerine inhibe edici etkisi daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç ile uyumlu olarak Burt ve Reinders ²⁵ kekik uçucu yağının *E. coli* O157:H7 üzerine karanfil uçucu yağına nazaran daha güçlü antimikrobiyal etkinliğinin olduğunu ve kekik uçucu yağının bakterisidal konsantrasyonun *E. coli* O157:H7 hücrelerinde bir dakika içinde geri dönüşümü mümkün olmayan hasarlara neden olduğunu bildirmişlerdir. Gıda örnekleri ve *in vitro* olarak yapılan çalışmalar kekik uçucu yağı ve karvakrol içeren farklı filmlerin *E. coli* O157:H7 üzerine güçlü antibakteriyel etkilerinin olduğunu ortaya koymuştur ⁴. Zivanovic ve ark.¹¹ %1 ve %2 oranında kekik uçucu yağı ilave edilmiş kitosan filmlerinin salam örneklerinde *E. coli* O157:H7 sayısını 5°C'de 10 gün muhafaza sonunda yaklaşık 3 Log düzeyinde azalttığını bildirmişlerdir. Oussalah ve ark.²⁶ %1 oranında kekik uçucu yağı içeren süt proteininden hazırlanmış yenilebilir filmler ile kaplanmış sığır etlerinde *E. coli* O157:H7 sayısının 4°C'de 7 gün muhafaza sonunda 1.2 Log düzeyinde azaldığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada kitosan filmlerinin *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* O157:H7'ye karşı göstermiş olduğu antimikrobiyal etki filmlerin peynir matriksinden su absorbe ederek kitosanın temas yüzeyinde aktif duruma geçmesi ile açıklanabilir ¹¹. Ayrıca çalışma kullanılan kaşar peyniri örneklerinin pH değeri (5.52 ± 0.08) kitosanın antimikrobiyal aktivitesi için idealdir. Yapılan çalışmalar kitosanın nötral pH değerlerine nazaran düşük pH değerlerinde pozitif yüklenmiş aktif gruplarının sayısındaki artış nedeniyle antimikrobiyal aktivitesinin daha güçlü olduğunu ortaya koymuştur. Kitosan bakteriler üzerine etkinliğini hücre membranlarının yapısını bozarak göstermektedir ^{27,28}. Dü-

şük pH düzeylerinde bakteri hücre yüzeyinde anyonik hale geçen karboksil ve fosfat grupları kitosana daha fazla elektrostatik bağlanma noktası sunmaktadır ²². Ayrıca bakteri hücrelerinde DNA, RNA ve hücre duvarı sentezini azaltan ²⁹ asetik asit kitosan filmlerinin antimikrobiyal etkinliğini arttırmaktadır ¹¹.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar kitosan filmlerinin *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* O157:H7 üzerine önemli düzeyde inhibe edici etkisinin olduğunu ve uçucu yağların antimikrobiyal etkinliklerinin artırılması amacıyla kitosan filmleri ile birlikte kullanım olanaklarının olduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte kitosan filmlerine uçucu yağ ilavesinin gıdaların duyuşal nitelikleri üzerine etkilerinin araştırılmasına yönelik çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. **Bourtoom T:** Edible films and coatings: Characteristics and properties. *Int Food Res J*, 15, 3-6, 2008.
2. **No HK, Meyers SP, Prinyawiwatkul W, Xu Z:** Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A review. *J Food Sci*, 72 (5): 87-100, 2007.
3. **Burt S:** Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int J Food Microbiol*, 94 (3): 223-253, 2004.
4. **Joerger RD:** Antimicrobial films for food applications: A quantitative analysis of their effectiveness. *Packag Technol Sci*, 20 (4): 231-273, 2007.
5. **Anonim:** Commission Decision of 23 January (2002) amending Commission Decision 1999/217/EC as regards the register of flavouring substances used in or on foodstuffs. 2002/113/EC, Official Journal L49 20/02/2002:1-160, 2002.
6. **Nedorostova L, Kloucek P, Kokoska L, Stolcova M, Pulkrabek J:** Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control*, 20 (2): 157-160, 2009.
7. **Min S, Krochta JM:** Inhibition of *Penicillium commune* by edible whey protein films incorporating lactoferrin, lactoferrin hydrolysate, and lactoperoxidase systems. *J Food Sci*, 70 (2): 87-94, 2005.
8. **Kristo E, Koutsoumanis KP, Biliaderis CG:** Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloid*, 22 (3): 373-386, 2008.
9. **Anonim:** Türk Standardı, Kaşar Peyniri, TS 3272. Ankara.
10. **Ponce AG, Roura SI, del Valle CE, Moreira MR:** Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: *In vitro* and *in vivo* studies. *Postharvest Biol Tec*, 49 (2): 294-300, 2008.
11. **Zivanovic S, Chi S, Draughton AE:** Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *J Food Sci*, 70 (1): M45-M51, 2005.
12. **Ye M, Neetoo H, Chen H:** Control of *Listeria monocytogenes* on ham steaks by antimicrobials incorporated into chitosan-coated plastic films. *Food Microbiol*, 25 (2): 260-268, 2008.
13. **Anonim:** Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual, New Hampshire, 2002.
14. **Anonim:** Türk Gıda Kodeksi, Renklendiriciler ve Tatlandırıcılar Dışındaki Gıda Katkı Maddeleri Tebliği, Ankara, 2003.
15. **Suyatma NE, Tighzert L, Copinet A, Coma V:** Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal and surface properties of chitosan films. *J Agr Food Chem*, 53 (10): 3950-3957, 2005.
16. **Erol İ:** Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi, Pozitif Matbaacılık, Ankara, 2007.
17. **Meyrand A, Boutrand-Loei S, Ray-Gueniot S, Mazuy C, Gaspard CE, Jaubert G, Perrin G, Lapeyre C, Vernozy-Rozand C:** Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of camembert-type cheeses from raw goats' milk. *J App Microbiol*, 85 (3): 537-544, 1998.
18. **Bachmann HP, Spahr U:** The fate of potentially pathogenic bacteria in swiss hard and semihard cheeses made from raw milk. *J Dairy Sci*, 78 (3): 476-483, 1995.
19. **Fernandez-Saiz P, Ocio MJ, Lagaron JM:** Film-forming process and biocide assessment of highmolecular-weight chitosan as determined by combined ATR-FTIR spectroscopy and antimicrobial assays. *Biopolymers*, 83 (6): 577-583, 2006.
20. **Dorman HJD, Deans SG:** Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*, 88 (2): 308-316, 2000.
21. **Becerril R, Gómez-Lus R, Goñi P, López P, Nerín C:** Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E. coli* and *S. aureus*. *Anal Bioanal Chem*, 388 (5-6): 1003-1011, 2007.
22. **Lekkas C, Kakouri A, Paleologos E, Voutsinas LP, Kontominas MG, Samelis J:** Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Galotyri cheese stored at 4 and 12°C. *Food Microbiol*, 23 (3): 268-276, 2006.
23. **Spano G, Goffredo E, Beneduce L, Tarantino D, Dupuy A, Massa S:** Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of mozzarella cheese. *Lett Appl Microbiol*, 36 (2): 73-76, 2003.
24. **Helander IM, Nurmiho-Lassila EL, Ahvenainen R, Rhoades J, Roller S:** Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int J Food Microbiol*, 71 (2-3): 235-244, 2001.
25. **Burt SA, Reinders RD:** Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol*, 36 (3): 162-167, 2003.
26. **Oussalah M, Caillet S, Salmieri S, Saucier L, Lacroix M:** Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *J Agric Food Chem*, 52 (18): 5598-5605, 2004.
27. **No HK, Park NY, Lee SH, Meyers SP:** Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol*, 74 (1-2): 65-72, 2002.
28. **Fernandez-Saiz P, Lagaron JM, Ocio MJ:** Optimization of the biocide properties of chitosan for its application in the design of active films of interest in the food area. *Food Hydrocolloid*, 23 (3): 913-921, 2009.
29. **Ricke SC:** Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Sci*, 82, 632-639, 2003.