

DOĞAL ANTİMİKROBİYAL MADDELER İLE HAZIRLANAN YENİLEBİLİR FİMLERİN *LİSTERİA MONOCYTOGENES* ÜZERİNE ETKİLERİ

Emrah Torlak^{@1}Mustafa Nizamlioğlu²

Effects of Edible Films Prepared with Natural Antimicrobials on *Listeria monocytogenes*

Geliş Tarihi: 23.12.2009

Kabul Tarihi: 30.12.2009

Özet: Bu çalışmada kitosan ve uçucu yağ içeren kitosan solüsyonları ile hazırlanan yenilebilir filmlerin *Listeria monocytogenes*' e karşı antimikrobiyal etkileri gerçek gıda matrisi üzerinde değerlendirilmiştir. Kekik ve karanfil uçucu yağları yenilebilir film solüsyonlarına %0,5 ve %1 oranında ilave edilmiştir. Gıda matrisi olarak kullanılan kaşar peyniri dilimleri *L. monocytogenes* 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 *L. monocytogenes* karşı antimikrobiyal etkileri değerlendirilmiştir. Muhafaza periyodu sonunda tüm film tiplerinin *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal etkisi kontrol grubuna nazaran önemli düzeyde bulunmuştur ($P<0,05$). Kontrol grubuna nazaran yenilebilir filmler ile kaplanmış örneklerde *L. monocytogenes* sayısı 1,18 Log ile 2,39 Log arasında düşük tespit edilmiştir. Genel olarak kekik uçucu yağı içeren filmlerin karanfil uçucu yağı içeren filmlere nazaran daha güçlü antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal film, kitosan, uçucu yağ, *Listeria. monocytogenes*, Kaşar peyniri

Summary: In this study antimicrobial efficiency of edible films prepared with chitosan solution and chitosan solutions enriched with essential oils against *Listeria monocytogenes* were evaluated on real food matrix. Oregano and clove oil were added to edible film solutions at %0,5 and %1. Kashar cheese slices used as food matrix were contaminated with *L. monocytogenes* 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 *L. monocytogenes* 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 *L. monocytogenes* were determined as significant ($P<0,05$). Application of edible films to samples were resulted 1,18 to 2,39 Log reduction in count of *L. monocytogenes*. Generally oregano oil added films were showed greater antimicrobial effect on *L. monocytogenes* than clove oil added films.

Key Words: Antimicrobial film, chitosan, essential oil, *Listeria. monocytogenes*, 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 (Bourtoom, 2008).

Kitinin deasetilasyonu ile elde edilen doğal kaynaklı bir polimer olan kitosan gıda kaynaklı bakteri, küf ve mantarlara karşı antimikrobiyal aktivitesi ile gıdalar için potansiyel bir koruyucu katkı maddesidir. Bu özelliğinin yanı sıra film oluşturabilme ve bariyer özellikleri kitosanı

antimikrobiyal özellikte yenilebilir film ve kaplamalar için ideal bir materyal haline getirmektedir. Yapılan birçok çalışma kitosanın koruyucu ve kaplama materyali olarak kullanımının gıdaların kalite ve raf ömrünü arttırdığını ortaya koymuştur. Kitosanın Kore ve Japonya' da uzun yıllardır gıda katkı maddesi olarak kullanımı yasaldır. ABD' de ise GRAS olarak onaylanmıştır (No ve ark., 2007).

Son yıllarda yapılan çalışmalar bileşimlerdeki fenolik maddeler nedeniyle güçlü antimikrobiyal etkiye sahip olan uçucu yağların antimikrobiyal ambalaj sistemlerinde kullanım

1. İl Kontrol Laboratuvarı, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, KONYA

2. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, KONYA

@: torlakemrah@yahoo.com

*Bu çalışma Selçuk Üniversitesi tarafından desteklenen (09202011) "Doğal Antimikrobiyal Maddeler ile Hazırlanan Yenilebilir ve Kaplanmış Plastik Filmlerin Gıda Kaynaklı Bazı Patojenlere Etkileri" isimli doktora tezinin bir bölümüdür.

olanaklarını ortaya koymuştur (Burt, 2004; Joerger, 2007). 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 (EC, 2002). AB' de olduğu gibi ABD' de birçok uçucu yağ bileşeninin gıda katkı maddesi veya GRAS olarak kullanımı yasaldır (Nedorostova ve ark., 2009).

Antimikrobiyal gıda ambalajlarının etkilerinin değerlendirilmesine yönelik farklı *in vitro* test metotları kullanılmaktadır. Bununla birlikte *in vitro* test metotlarından elde edilen veriler antimikrobiyal etkinin değerlendirilmesinde yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle gıda örnekleri kullanılarak gerçek şartları yansıtan denemelerin yapılması antimikrobiyal etkinin değerlendirilmesinde önemlidir (Ha ve ark., 2001).

Bu çalışmada, kekik ve karanfil uçucu yağları ve kitosan ile hazırlanan yenilebilir filmlerin önemli gıda patojenlerinden olan *Listeria monocytogenes*' e karşı etkileri 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 (TSE, 2006).

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 GC-MS ile yapılan analiz sonucuna göre %80 oranında karvakrol içeren kekik uçucu yağı İnan Tarım (Antalya, Türkiye)' dan, *Syzygium aromaticum* türünün tomurcuklarından elde edilmiş ve sertifikasına göre %88 oranında eugenol içeren karanfil uçucu yağı ise Sigma-Aldrich' den temin edilmiştir.

Kaşar Peyniri Örnekleri

Hazırlanan filmlerin antimikrobiyal etkisinin değerlendirilmesinde matriks olarak kullanılan kaşar

peyniri örnekleri Büyük Aygın A.Ş. (Konya, Türkiye)' den temin edilmiştir.

Yapay kontaminasyon için kullanılacak kaşar peynirleri tam otomatik dilimleme makinesi (Bizerba, Almanya) ile 3 mm kalınlığında dilimlenmiştir. Mikrobiyolojik analizlerde ve bakteri sayılarının hesaplanmasında kolaylık sağlaması amacıyla ≈ 10 g ağırlığında (5,5x5,5 cm) dilimler kullanılmıştır. Kontaminasyon çalışması öncesinde kaşar peyniri örneklerinin pH değerleri tespit edilmiştir. Yapay kontaminasyon için *L. monocytogenes* 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 50 ml' lik santrifüj tüplerinde 5000 rpm' de 5 d santrifüj (Hettich, Almanya) edilmiştir (Ponce ve ark., 2008).

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 (Zivanovic ve ark., 2005). Tween 20 (%0,5, *h/h*) ile karıştırılan uçucu yağların ilavesinden sonra kompozit film solüsyonları homojenizer (Ika, Almanya) ile 20000 rpm' de 1 d homojenize edilmiştir.

Yenilebilir Filmlerin Hazırlanması

Yenilebilir filmler solvent evaporasyon metodu ile hazırlanmıştır. Hazırlanan film solüsyonları 28 ml (10 mg kitosan/cm²) olarak 85 mm çapında pleksiglas petri kutularına taksim edilmiş ve 20 saat boyunca 25°C' de biyogüvenlik kabini (Faster, İtalya) içerisinde evaporasyona tabi tutulmuştur. Evaporasyon sonunda oluşan filmler

Doğal Antimikrobiyal...

kullanım aşamasına kadar petri kutularında 4°C' de muhafaza edilmiştir. Antimikrobiyal etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla 5 farklı yenilebilir film hazırlanmıştır;

Ki; Saf kitosan solüsyonu ile hazırlanmış yenilebilir filmler

KiKe (%0,5); %0,5 oranında kekik uçucu yağı ilave edilmiş kompozit kitosan solüsyonu ile hazırlanmış yenilebilir filmler

KiKe (%1); %1 oranında kekik uçucu yağı ilave edilmiş kompozit kitosan solüsyonu ile hazırlanmış yenilebilir filmler

KiKa (%0,5); %0,5 oranında karanfil uçucu yağı ilave edilmiş kompozit kitosan solüsyonu ile hazırlanmış yenilebilir filmler

KiKa (%1); %1 oranında karanfil uçucu yağı ilave edilmiş kompozit kitosan solüsyonu ile hazırlanmış yenilebilir filmler

Örneklerin Hazırlanması ve Muhafazası

Kaşar peynirleri örneklerinin yapay kontaminasyonu için kullanılan *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) suşu Microbiologics Inc. (Saint Cloud, ABD)' den temin edilmiştir. Yapay kontaminasyon için bakteriyal yoğunluğu yaklaşık 10^7 kob/ml düzeyine ayarlanan inokulum kullanılmıştır. Steril petri kutuları içine konulan kaşar peyniri dilimleri (≈ 10 g) inokulum olarak hazırlanan dilüsyonun 0,1 ml' si ile kontamine edilmiştir. Böylece yaklaşık 10^5 kob/g (5 Log kob/g) düzeyinde kontamine edilen örnekler inokulumun absorbe

olması ve bakteriyal tutunmayı sağlamak amacıyla 4°C' de 15 d bekletilmiştir.

Yenilebilir filmler için kontrol grubu olarak kontamine edilmiş ve kitosan filmleri ile kaplanmamış kaşar peyniri dilimleri kullanılmıştır.

Kontamine kaşar peyniri dilimlerinin kaplanması için 6x6 cm ebadında filmler kullanılmıştır. Örneklerin kaplanmasından önce filmlerin örnekler ile temas edecek yüzleri biyogüvenlik kabini içinde 2 d UV ışık altında tutularak sterilize edilmiştir (Ye ve ark., 2008). Filmlerin sterilizasyonu sonrası 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) $4\pm 1^\circ\text{C}$ ' de 14 gün süreyle muhafaza edilmişlerdir. Muhafazanın 1., 7. ve 14. günlerinde örneklerdeki *L. monocytogenes* sayısı saptanmıştır.

L. monocytogenes Sayımları

Örneklerdeki *L. monocytogenes* sayısı 10 g örnek kullanılarak, başlangıç süspansiyonu ve dilüsyonların 0,1 ml' si ile yapılan paralel ekimlerden elde edilen sonuçlar ile belirlenmiştir (HPA, 2005). Gerekli görüldüğünde karakteristik koloniler VITEK II otomatize identifikasyon sistemi (bioMérieux, Fransa) ile doğrulanmıştır. *L. monocytogenes* sayımı Oxford Agar' da $37\pm 1^\circ\text{C}$ ' de 24 ± 1 saat inkübasyon sonunda yapılmıştır (ISO, 1998).

Tablo 1. Yenilebilir filmlerin kaşar peyniri örneklerinde *L. monocytogenes*' e karşı etkileri.

| Film tipi | Kontaminasyon Düzeyi | Muhafaza süresi (gün) | | |
|--------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | 1 | 7 | 14 |
| Kontrol | | 5,15±0,23 ^a | 5,36±0,14 ^a | 5,41±0,21 ^a |
| Ki | | 4,88±0,15 ^{ab} | 4,46±0,21 ^b | 4,23±0,36 ^b |
| KiKe (%0,5) | 5,11±0,22 [*] | 4,52±0,17 ^c | 3,82±0,27 ^{cd} | 3,22±0,81 ^c |
| KiKe (% 1) | | 4,32±0,16 ^c | 3,46±0,57 ^d | 3,02±0,38 ^c |
| KiKa (% 0,5) | | 4,63±0,16 ^{bc} | 4,13±0,26 ^{bc} | 3,62±0,33 ^{bc} |
| KiKa (% 1) | | 4,43±0,18 ^c | 3,77±0,17 ^{cd} | 3,32±0,42 ^c |

* Ortalama \pm standart sapma ($n=3$), Log kob/g

^a Aynı sütunda farklı üssel ifadeye sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0,05$)

İstatistiksel Değerlendirme

Bağımsız üç tekrar olarak yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilmiş ve ortalama değerler %95 güven düzeyinde Duncan çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırılmıştır.

Bulgular

Yapay kontaminasyon öncesinde kaşar peyniri örneklerinin pH değerleri $5,52 \pm 0,08$ ($n=3$) olarak tespit edilmiştir.

Hazırlanan tüm yenilebilir film tiplerinin kaşar peyniri örneklerindeki *L. monocytogenes* sayısını 4°C ' de 14 günlük muhafaza periyodu sonunda kontrol grubuna göre önemli düzeyde ($P<0,05$) azalttığı tespit edilmiştir. Örneklerde muhafaza periyodunun 1., 7. ve 14. gününde yapılan sayımlar sonucu belirlenen *L. monocytogenes* sayıları Tablo 1' de verilmiştir.

Kontrol grubu olarak yenilebilir filmler ile kaplanmamış kaşar peyniri örneklerinde *L. monocytogenes* sayısının 14 günlük muhafaza periyodu sonunda $5,11 \text{ Log kob/g}$ ' dan $5,41 \text{ Log kob/g}$ ' a yükseldiği görülmüştür.

Yenilebilir filmler ile kaplanmış kaşar peyniri örneklerinde *L. monocytogenes* sayısının 14. gün sonunda kontrol grubuna nazaran $1,18 \text{ Log}$ ile $2,39 \text{ Log}$ arasında azaldığı ve muhafaza periyodu boyunca yapılan sayım sonuçlarına göre tüm film tiplerinin kontrol grubuna göre antimikrobiyal etkisinin önemli düzeyde ($P<0,05$) olduğu tespit edilmiştir. Muhafaza periyodu sonunda en düşük ve en yüksek *L. monocytogenes* sayıları sırasıyla %1 oranında kekik uçucu yağı ile hazırlanan kitosan (KiKe (%1)) ve saf kitosan (Ki) filmleri ile kaplanmış örneklerde tespit edilmiştir.

Film solüsyonuna %0,5 ve %1 oranında kekik ve %1 oranında karanfil uçucu yağı ilavesinin kitosan filmlerinin *L. monocytogenes*' e karşı etkisini önemli düzeyde arttırdığı ($P<0,05$) tespit edilmiştir. Bununla birlikte %0,5 oranında karanfil uçucu yağı ilavesinin *L. monocytogenes* üzerine etkisinin önemli düzeyde ($P>0,05$) olmadığı saptanmıştır.

Tartışma ve Sonuç

Muhafaza periyodu sonunda kontrol grubu örneklerinde *L. monocytogenes* sayısı $0,31 \text{ Log}$ artış göstermiştir. Benzer şekilde Çetinkaya ve Soyutemiz (2007) farklı düzeylerde kontamine edilmiş süt örneklerinden hazırlanan ve 5°C ' de 7 gün muhafaza edilen vakum paketlenmiş kaşar peyniri örneklerindeki *L. monocytogenes* sayısının muhafaza periyodu boyunca $0,19 \text{ Log}$ ve $0,44 \text{ Log}$ arasında artış gösterdiğini bildirmişlerdir. *L. monocytogenes*' in peynirlerde canlılığını korumasında en önemli faktörler üretim ve muhafaza aşamalarındaki pH ve sıcaklıktır (Linton ve ark., 2008). Diğer bir faktör ise rekabetçi flora olarak laktik asit bakterilerinin varlığıdır (Duan ve ark., 2007). Genigeorgis ve ark. (1991) 4 ile 30°C arasında farklı sıcaklıklarda muhafaza edilen farklı tipteki peynir örneklerinde *L. monocytogenes*' in canlılığı üzerine yaptıkları çalışmada örneklerin pH değerleri ile *L. monocytogenes*' in gelişimi arasındaki korelasyonun önemli düzeyde ($P<0,05$) olduğunu ve genel olarak pH' sı $5,5$ ve üzerinde olan örneklerde *L. monocytogenes*' in canlılığını koruyabildiği ve çoğalabildiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan kaşar peynirlerinin pH değerleri ve *L. monocytogenes*' in gelişebildiği sıcaklık değerleri (Erol, 2007) göz önüne alındığında kontrol grubu örneklerinde *L. monocytogenes* sayısında $0,31 \text{ Log}$ ve $0,24 \text{ Log}$ düzeyindeki artış beklenen bir sonuçtur.

Saf kitosan yenilebilir filmi ile kaplanmış kaşar peyniri örneklerinde *L. monocytogenes* sayıları muhafaza periyodu boyunca kontrol grubuna nazaran önemli düzeyde ($P<0,05$) azalmıştır. Benzer şekilde in vitro olarak ve farklı gıda matriksleri ile yapılan çalışmalar kitosan solüsyonlarının ve filmlerinin *L. monocytogenes*' e karşı etkilerini ortaya koymuştur (Joerger, 2007). Duan ve ark (2007) asetik asit ile hazırlanan kitosan filmleri ile kaplanmış mozarella peynirlerinde *L. monocytogenes* sayısının 10°C ' de 14 gün muhafaza periyodu sonunda önemli düzeyde ($P<0,05$) azaldığını bildirmişlerdir. Zivanovic ve ark. (2005) asetik asit ile hazırlanan kitosan filmlerinin salam örneklerinde *L. monocytogenes* sayısını 5°C ' de 10 gün muhafaza sonunda yaklaşık 2 Log düzeyinde azalttığını tespit etmişlerdir.

Film solüsyonlarına %0,5 ve %1 oranında kekik ve %1 oranında karanfil uçucu yağı ilavesi yenilebilir filmlerin muhafaza periyodu sonunda *L. monocytogenes*' e karşı antimikrobiyal etkilerini önemli düzeyde ($P<0,05$) arttırmıştır. Karanfil uçucu yağının %0,5 oranında ilavesinin yenilebilir filmlerin *L. monocytogenes* üzerine etkisini önemli düzeyde arttırmadığı ($P>0,05$) tespit edilmiştir. Benzer şekilde yapılan in vitro çalışmalar kekik türlerinin uçucu yağı ve ana bileşeni olan karvakrolün karanfil uçucu yağı ve anabileşeni olan eugenole nazaran *L. monocytogenes* üzerine daha güçlü antimikrobiyal etkinliğinin olduğunu ortaya koymuştur (Burt, 2004). Bu sonuç eugenole nazaran daha hidrofobik yapıda olan karvakrolün hücre membranlarında birikebilmesi ve serbest hidroksil grubu sayesinde proton değişimi yapabilmesi nedeniyle eugenole nazaran bakteri hücre membran yapısına daha fazla zarar vermesi ile açıklanabilir (Arfa ve ark., 2006). Oussalah ve ark. (2007) *Origanum* türleri başta olmak üzere yüksek karvakrol oranına sahip uçucu yağların karanfil uçucu yağına nazaran *L. monocytogenes*' e karşı daha güçlü antimikrobiyal etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Zivanovic ve ark. (2005) kekik, kişniş, anason ve reyhan uçucu yağları ilave edilmiş kitosan filmleri arasında *L. monocytogenes*' e karşı en güçlü antimikrobiyal etkiyi kekik uçucu yağı içeren kitosan filmlerinin gösterdiğini ve %1 ve %2 oranında kekik uçucu yağı ilave edilmiş kitosan filmlerinin salam örneklerinde *L. monocytogenes* sayısını 5°C' de 10 gün muhafaza sonunda 3,6 Log ve 4 Log düzeyinde azalttığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada kitosan filmlerinin *L. monocytogenes*' e karşı göstermiş olduğu antimikrobiyal etki filmlerin peynir matriksinden su absorbe ederek kitosanın temas yüzeyinde aktif duruma geçmesi ile açıklanabilir (Zivanovic ve ark., 2005). Ayrıca kaşar peyniri örnekleri kitosanın antimikrobiyal aktivitesi için ideal pH değerine sahiptir. Yapılan çalışmalar kitosanın nötral pH değerlerine nazaran düşük pH değerlerinde pozitif yüklenmiş aktif gruplarının sayısındaki artış nedeniyle antimikrobiyal aktivitesinin daha güçlü olduğunu ortaya koymuştur (Wang, 1992; No ve ark., 2002; Fernandes-Saiz ve ark., 2009). Ayrıca düşük

pH düzeylerinde bakteri hücre yüzeyinde anyonik hale geçen karboksil ve fosfat grupları kitosana daha fazla elektrostatik bağlanma noktası sunmaktadır (Helander ve ark., 2001).

Kekik uçucu yağı, güçlü antimikrobiyal aktivitesi nedeniyle uçucu yağların gıda ambalaj materyalleri ile birlikte kullanımına yönelik çalışmalarda kullanılan uçucu yağların başında gelmektedir (Joerger, 2007). Yapılan in vitro çalışmalar ile uyumlu olarak ambalaj materyalleri ile birlikte farklı uçucu yağların kullanıldığı çalışmalarda en etkin sonuçlar kekik uçucu yağı ile elde edilmiştir (Oussalah ve ark., 2004; Zivanovic ve ark., 2005; Becerril ve ark., 2007; Rojas-Grau ve ark., 2007).

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar kitosan filmlerinin *L. monocytogenes* üzerine önemli düzeyde inhibe edici etkisinin olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte kekik ve karanfil uçucu yağlarının antimikrobiyal etkinliklerinin artırılması amacıyla kitosan filmleri ile birlikte kullanım olanaklarının olduğunu ortaya koymuştur.

Kaynaklar

- Arfa, A.B., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., Chalier, P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett. Appl. Microbiol.*, 43, 149-154.
- Becerril, R., Gómez-Lus R., Goñi, P., López, P., Nerín, C. (2007). Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E. coli* and *S. aureus*. *Anal. Bioanal. Chem.*, 388, 1003-1011.
- Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. *Int. Food. Res. J.*, 15, 3.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food. Microbiol.*, 94, 223-253.
- Çetinkaya, F., Soyutemiz, G.E. (2007). Evaluation of *Listeria monocytogenes* populations during the manufacture and vacuum-packaged storage of kashar cheese. *Acta. Vet. Brno.*, 76, 143-148.

- Duan, J., Park, S.I., Daeschel, M.A., Zhao, Y. (2007). Antimicrobial chitosan-lysozyme (CL) films and coatings for enhancing microbial safety of mozzarella cheese. *J. Food. Sci.*, 72, 355-362.
- EC, 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.
- Erol, İ. (2007). "Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi". Pozitif Matbaacılık, Ankara.
- Fernandez-Saiz, P., Lagaron, J.M., Ocio, M.J. (2009). 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, 913-921.
- Genigeorgis, C., Carniciu, M., Dutulescu, D., Farver, T.B. (1991). Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in market cheeses stored at 4 to 30°C. *J. Food Prot.* 54, 9, 662-668.
- Ha, J.U., Kim, Y.M., Lee, D.S. (2001). Multilayered antimicrobial polyethylene films applied to the packaging of ground beef. *Packag. Technol. Sci.*, 15, 55-62.
- Helander, I.M., Nurmiaho-Lassila, E.L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., Roller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 71, 235-244.
- HPA. (2005). Health Protection Agency, Preparation sample and dilutions, F2. Londra.
- ISO. (1998). Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*-Part 2: Enumeration method, 11290-2. Cenevre.
- Joerger, R.D. (2007). Antimicrobial films for food applications: A quantitative analysis of their effectiveness. *Packag. Technol. Sci.*, 20, 231-273.
- Linton, M., Mackle, A.B., Upadhyay, V.K., Kelly, A.L., Patterson, M.F. (2008). The fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of camembert-type cheese: a comparison between raw milk and milk treated with high hydrostatic pressure. *Innovat. Food. Sci. Emerg. Tech.*, 9, 423-428.
- Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., Pulkrabek, J. (2009). Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control.*, 20, 157-160.
- No, H.K., Meyers, S.P., Prinyawiwatkul, W., Xu, Z. (2007). Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: a review. *J. Food Sci.*, 72, 5, 87-100.
- No, H.K., Park, N.Y., Lee, S.H., Meyers, S.P. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int. J. Food Microbiol.*, 74, 65-72.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control.*, 18, 4, 14-20.
- Oussalah, M., Caillet, S., Salmieri, S., Saucier, L., Lacroix, M. (2004). 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.
- Ponce, A.G., Roura, S.I., del Valle, C.E., Moreira, M.R. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: *In vitro* and *in vivo* studies. *Postharvest Biol. Tec.*, 49, 294-300.
- Rojas-Grau, A.M., Avena-Bustillos, R.J., Olsen, C., Friedman, M., Henika, P.R., Martin-Belloso, O., Pan, Z., McHugh, T. (2007). Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films. *J. Food Eng.*, 81, 634-641.
- TSE. (2006). Türk Standartları Enstitüsü, Kaşar Peyniri, TS 3272. Ankara.
- Wang, G.H. (1992). Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. *J. Food Protect.*, 55, 916-919.

Doğal Antimikrobiyal...

Ye, M., Neetoo, H., Chen, H. (2008). Control of *Listeria monocytogenes* on ham steaks by antimicrobials incorporated into chitosan-coated plastic films. Food Microbiol., 25, 260-268.

Zivanovic, S., Chi, S., Draughton, A.E. (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. J. Food Sci. 70, M45-M51.