

T.C.

İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

GIDA MÜHENDİSLİĞİ BİLİM DALI

**PASTIRMA ÜRETİM SÜRECİNDEKİ BAKTERİ
ÇEŞİTLİLİĞİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Alya TOY

İstanbul

Ağustos, 2020

T.C.
İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

PASTIRMA ÜRETİM SÜRECİNDEKİ BAKTERİ
ÇEŞİTLİLİĞİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Alya TOY

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Banu METİN

İstanbul

Ağustos, 2020

TEZ ONAYI

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma, jürimiz tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman Dr. Öğr. Üyesi Banu METİN

Üye Prof. Dr. Bülent NAZLI

Üye Dr. Öğr. Üyesi Halime PEHLİVANOĞLU

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

Prof. Dr. Ali GÜNEŞ

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Yüksek lisans tezi olarak hazırladığım “**Pastırma Üretim Sürecindeki Bakteri Çeşitliliğinin Moleküler Yöntemlerle Tayini**” adlı çalışmanın öneri aşamasından sonuçlandığı aşamaya kadar geçen süreçte bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle uyduğumu, tez içindeki tüm bilgileri bilimsel ahlak ve gelenek çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığımı, bu çalışmamda doğrudan veya dolaylı olarak yaptığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu beyan ederim.

Alya TOY

ÖNSÖZ

Araştırmamdaki her aşamada bilimsel bilgisi ve sonsuz desteği ile her türlü yardım ve kolaylığı gösteren, fikir ve düşüncelerini rehber edindiğim ve öğrencisi olmaktan onur duyduğum çok değerli tez danışmanım olan Dr. Öğr. Üyesi Banu METİN'e içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim alanında dersleriyle bana vizyon katan çok değerli lisans ve yüksek lisans hocalarıma, eğitimim boyunca benden güvenini ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme ve laboratuvar arkadaşlarıma, çalışmamızda kullanılan pastırma numunelerinin teminini sağlayan Danet Et ve Et Ürünleri Paz. Tic. Ltd. Şti. firmasına büyük desteklerinden ötürü teşekkürlerimi sunarım.

Alya TOY

İstanbul - 2020

ÖZET

PASTIRMA ÜRETİM SÜRECİNDEKİ BAKTERİ ÇEŞİTLİLİĞİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TAYİNİ

Alya TOY

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği

Tez danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Banu METİN

Ağustos-2020, 113 Sayfa

Pastırma, Türkiye'nin tüm sığır eti veya manda sığır kaslarından üretilen geleneksel kuru kürlenmiş bir et ürünüdür. Bu çalışmada, üretim süreci sırasında 2. tuzlanmadan sonra (aşama 1), soğuk presleme (aşama 2), çemen kaplama (aşama 3) ve son ürün (aşama 4) olmak üzere dört farklı zamanda bakteriyel profilinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Mikrobiyal analizlere ek olarak, her numune için su aktivitesi ve pH ölçülmüştür. Üretim sırasında, pH 5,6'dan 5,8'e hafif bir artış göstermiştir; su aktivitesi aşama 3'e kadar 0,92'den 0,86'ya düşmüştür ve çemen ilavesinden sonra 0,89'e yükselmiştir. PCA'da sayılan toplam mezofilik aerobik bakteri 4,9-7,2 log kob/g bulunmuştur. MRS agar sonuçları 4,2-6,8 log kob/g laktik asit bakteri sayımını gösterirken, M17 agarda sonuçlar 4,6 ila 7,3 log kob/g arasında bulunmuştur. *Enterobacteriaceae* üyeleri VRBD agar tarafından sadece aşama 1'de tespit edilmiştir. MRS agar'dan 86 ve M17 agar'dan 80 ve VRBD agar'dan 30 bakteri tanımlanmak üzere saflaştırılmış ve DNA izolasyonuna tabi tutulmuştur. Rep-PCR (GTG5) ile gruplandırıldıktan sonra 62 MRS, 47 M17 ve 23 VRBD izolatının 16S rDNA dizilimi belirlenmiştir. MRS izolatları arasında tüm aşamalar için en baskın türün %38-76 nispi bolluğu olan *Lactobacillus sakei* olduğu ve en çok gözlenen ikinci türün ilk üç aşama için nispi bolluğu %22-29 olan *Weissella viridescens* olduğu bulunmuştur. Tanımlanan diğer türler arasında *Weissella confusa*, *Weissella halotolerans*, *Weissella cibaria*, *Weissella helenica*, *Lactobacillus curvatus* ve *Leuconostoc citreum* yer almaktadır. M17 agarda MRS agar ile de tespit edilen *L. sakei* ve *L. citreum*'a ilaveten *Weissella jogaejeotgali* ve *Carnobacterium divergens* gibi laktik asit bakterileri tespit

edilmiştir. Bunun yanında katalaz pozitif türlerden *Brochothrix thermosphacta* aşama 1'deki en baskın tür olarak ve *Staphylococcus saprophyticus* ise takip eden aşamalarda en baskın tür olarak tanımlanmıştır. VRBD agarda bakteri varlığı sadece 1. aşamada gözlemlenmiştir. *Pseudomonas fragi* grubu %76,66 oranla en baskın mikroorganizma olarak karşımıza çıkmaktadır. İkinci baskın tür olarak ise *Serratia liquefaciens* (%13) bulunmuştur. Bu türleri *Pseudomonas poae* (%3,33), *Pseudomonas taetrolens* (%3,33) ve *Pseudomonas gessardi* (%3,33) takip etmektedir. Sonuçlar, üretim sürecinde pastırmanın bakteriyel çeşitliliği hakkında bilgi vermektedir.

Anahtar Kelimeler: Pastırma, bakteriyel çeşitlilik, laktik asit bakterileri.



ABSTRACT

DETERMINATION OF THE BACTERIAL DIVERSITY DURING PRODUCTION PROCESS OF PASTIRMA

Alya TOY

Master of Science, Food Engineering

Thesis Advisor: Asist. Prof. Dr. Banu METİN

August-2020, 113 Pages

Pastirma is a traditional dry-cured meat product of Turkey, produced from whole beef or muscles of water buffalo. In this study, it was aimed to determine the microbial profile during the manufacturing process at four different time points, after the second salting (stage 1), after cold-pressing (stage 2), before çemen coating (stage 3) and the final product (stage 4). In addition to the microbial analyses, water activity and pH were measured for each sample. During the production, pH showed a slight increase from 5,6 to 5,8; while the water activity decreased from 0,92 to 0,86 until stage 3, and then increased to 0,89 after çemen addition. Total mesophilic aerobic bacteria counted on PCA was 4,9-7,2 log kob/g. MRS agar results indicated lactic acid bacteria counts of 4,2-6,8 log kob/g, while M17 agar counts were between 4,6 and 7,3 log kob/g. *Enterobacteriaceae* members were only detected in stage 1 by VRBD agar. Among the bacteria enumerated, 86 from MRS agar and 80 from M17 agar and 30 from VRBD agar were purified and subjected to DNA isolation for identification. After grouping by rep-PCR (GTG5), 16S rDNA sequences of 62 MRS, 47 M17 and 23 VRBD isolates were determined. Among the MRS isolates, the most dominant species for all stages was *Lactobacillus sakei* with a relative abundance of 38%-76% and the second mostly observed species was *Weissella viridescens* with a relative abundance of 22%-29% for the first three stages. Other species identified include *Weissella confusa*, *Weissella halotolerans*, *Weissella cibaria*, *Weissella helenica*, *Lactobacillus curvatus* and *Leuconostoc citreum*. Using M17 agar, lactic acid bacteria, such as *Weissella jogaejeotgali* and *Carnobacterium divergens* were detected in addition to *L. sakei* and

L. citreum, that were also detected using MRS agar. Moreover, catalase positive species, such as *Brochothrix thermosphacta* as the most dominant species in stage 1 and *Staphylococcus saprophyticus* as the most predominant one in the following stages were identified. The presence of bacteria in VRBD agar was observed only in stage 1. *Pseudomonas fragi* group was the dominant species with a relative abundance rate of 76.66%. *Serratia liquefaciens* (13%) was found as the second dominant species. These species were followed by *Pseudomonas poae* (3.33%), *Pseudomonas taetrolens* (3.33%) and *Pseudomonas gessardi* (3.33%). The results give information on the bacterial diversity of pastırma during the manufacturing process.

Keywords: Pastırma, bacterial diversity, lactic acid bacteria.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	i
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER	xi
TABLolar	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
GİRİŞ	1
BİRİNCİ BÖLÜM.....	2
LİTERATÜR TARAMASI	2
1.1. Et	2
1.1.1. Etin Yapısı ve Besin Değeri.....	3
1.1.2. Etin Histolojik Yapısı	5
1.2. Kurutulmuş Et Teknolojisi	7
1.2.1. Kurutulmuş Et Ürünlerinin Özellikleri	9
1.2.2. Dünyada Yaygın Olarak Üretilen Tipik Kurutulmuş Et Ürünleri	10
1.3. Pastırmanın Tanımı	15
1.4. Pastırmanın Tarihçesi	15
1.5. Pastırma Üretim Teknolojisi.....	16
1.5.1. Pastırma Üretiminde Kullanılacak Hayvanın Seçimi	18
1.5.2. Hayvan Kesimi ve Yüzüm İşlemi	18
1.5.3. Karkas Parçalama	19
1.5.4. Söküm	19
1.5.5. Ayrım (Açım)	20
1.5.6. Pastırmalık Parçaların Tuzlanması	21

1.5.7. Yıkama.....	22
1.5.8. Birinci Kurutma ve Soğuk Denkleme.....	22
1.5.9. İkinci Kurutma ve Sıcak Denkleme.....	23
1.5.10. Üçüncü Kurutma.....	24
1.5.11. Çemenleme	24
1.6. Pastırma Çeşitleri ve Özellikleri.....	28
1.7. Pastırmanın Mikrobiyolojik Özellikleri	29
1.8. Pastırmanın Biyokimyasal Özellikleri.....	30
1.9. Mikroorganizmaların Tanımlama Yöntemleri	30
1.9.1. Barkodlama.....	32
1.9.2. PCR (Polymerase Chain Reaction/ Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	35
1.9.3. GTG5 rep-PCR (Tekrarlayan element sekansı temelli polimeraz zincir reaksiyonu)	36
İKİNCİ BÖLÜM	38
MATERYAL VE METOT	38
2.1. Materyal.....	38
2.2. Metod.....	38
2.2.1. Kimyasal Analizler	39
2.2.2. Temel Mikrobiyolojik Analizler	39
2.2.3. Mikroorganizmaların İzolasyonu.....	40
2.2.4. Mikroorganizmaların Tanımlanması	41
3.1. Kimyasal Analizler.....	49
3.1.1. pH Değeri.....	49
3.1.2. Su Aktivitesi Değeri	51
3.2. Mikrobiyolojik Analizler.....	53
3.2.1. Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri	53
3.2.2. Laktik Asit Bakterileri	55
3.2.3. M17 izolatlar.....	55
3.2.4. <i>Enterobacteriaceae</i> Grubu Bakteriler.....	56
3.3. Tanımlanan Mikroorganizmalar	57
3.3.1. Laktik Asit Bakterileri	58
3.3.2. M17 izolatları.....	63
3.3.3. VRBD İzolatları.....	67

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM	71
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	71
KAYNAKÇA	75
EKLER.....	86



ŞEKİLLER

Şekil 1.1: Kas İpliklerinin Yapısı.....	7
Şekil 1.2: Et Ürünlerinin Kurutulması	8
Şekil 1.3: Pastırma Üretim Akış Şeması.....	17
Şekil 1.4: Pastırma ve Çemen Hamuru Arasındaki Difüzyon	25
Şekil 1.5: Karkasın Çeşitli Kısımlarından Çeşitli Pastırma Parçaların İsimlendirilmesi ve Elde Edildikleri Bölgeler.....	28
Şekil 1.6: Fermente Gıda Ekolojisinin Araştırılmasında Kullanılan Geleneksel ve Moleküler Yaklaşımların Şematik Gösterimi	32
Şekil 1.7: Ribozom Kompleksi ve 16S rRNA Geninin Şeması.....	34
Şekil 2.1: Sırasıyla %0.7 Agaroz Jelde Yürütülmüş λ DNA/HindIII (A) ve %1.5 Agaroz Jelde Yürütülmüş 100bp DNA Ladder (B) Marker Büyüklükleri (Bp)	47
Şekil 3.1: M17 İzolatlarına Ait GTG5 Elektroforez Görüntüsü	58
Şekil 3.2: Laktik Asit Bakterilerine Ait 16S PCR Elektroforez Görüntüsü.....	59
Şekil 3.3: Pastırma Aşamalarına Göre LAB'nin Yüzde Dağılımları.....	61
Şekil 3.4: M17 İzolatları İçin 16S PCR Elektroforez Görüntüsü.....	63
Şekil 3.5: Pastırma Aşamalarına Göre M17 İzolatlarının Yüzde Dağılımları	66
Şekil 3.6: VRBD İzolatlarının 16S PCR Elektroforez Görüntüsü	68
Şekil 3.7: Pastırma Aşamalarına Göre VRBD Agarda İzole Edilen Türlerin Yüzde Dağılımları	69

TABLULAR

Tablo 1.1: Bazı Gıdaların Biyolojik Değerleri ve Sindirilme Oranları.....	3
Tablo 1.2: Memeli Kasının Bileşimi.....	4
Tablo 1.3: Bazı Kurutulmuş Et Ürünlerinin Özellikleri.....	14
Tablo 1.4: Bir Karkastan Elde Edilen Pastırma Çeşitlerinin Elde Edildiği Kısımlar ve Adları	20
Tablo 1.5: Pastırma Üretiminde Çeşitli Araştırmacılar Tarafından Bildirilen Çemen Hamuru Bileşimler	27
Tablo 1.6: Pastırmanın Kategorilere Ayrılmasında Dikkate Alınan Kalite Özellikleri	29
Tablo 1.7: Pastırmanın Sınıflandırılması ve Çeşitleri	29
Tablo 1.8: Ülkemizde Pastırmanın Mikrobiyolojik Kalite Ölçütleri	30
Tablo 2.1: Mikrobiyolojik Analizler İçin Kullanılan Besiyerleri, İnkübasyon Süre ve Sıcaklıkları	40
Tablo 2.2: GTG5 Reaksiyon Bileşimi ve Miktarları.....	44
Tablo 2.3: Kullanılan İleri ve Geri Primerler.....	44
Tablo 2.4: Tanımlama PCR’ında Kullanılan Bileşenler ve Miktarları	45
Tablo 2.5: 16S PCR Döngüleri	45
Tablo 3.1: Farklı Aşamalardaki Pastırma Örneklerinin pH Değerleri	50
Tablo 3.2: Farklı Aşamalardaki Pastırma Örneklerinin a_w Değerleri	51
Tablo 3.3: Pastırma Üretim Sürecinin Farklı Bölgelerinden Alınan Örneklerin Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri Yükleri (log kob/g).....	54
Tablo 3.4: Sekans Sonucuyla Elde Edilen Bulgular	59
Tablo 3.5: Gram (+), Katalaz (-) M17 İzolatları (Laktik Asit Bakterileri)	64
Tablo 3.6: Katalaz (+), M17 İzolatları	64
Tablo 3.7: Sekans Sonucuyla Elde Edilen Bulgular	68

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

dk	Dakika
MRS	De Man Rogosa Sharp
DNA	Deoksirübönükleik Asit
g	Gram
Kob	Koloni Oluşturan Birim
L	Litre
Log	Logaritmik
M17	M17 Agar
µg	Mikrogram
mL	Mililitre
PCA	Plate Count Agar
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
Rpm	Revolutions Per Minute
RNA	Rübönükleik Asit
°C	Santigrat Derece
NaOH	Sodyum Hidroksit
a_w	Su Aktivitesi
Rep	Tekrarlayan Ekstrajenik Palindromik
TSE	Türk Standartları Enstitüsü
VRBD	Violet Red Bile Dextrose Agar

GİRİŞ

İnsan beslenmesi ve büyümesi açısından başta protein olmak üzere içerdikleri yağ, su, vitamin, mineral ve diğer tat veren organik öğeler nedeniyle et ve et ürünleri en önemli besinler arasında ilk başlarda yer almaktadır. Bu nedenle çok eski çağlardan beri insanoğlu bu gıdayı uzun süre muhafaza etmenin çeşitli yöntemlerini kullanmış ve bunları geliştirmiştir. Bu teknikler içerisinde bilinen en eski ve en çok kullanılan yöntem tuzladıktan sonra güneşte kurutmaktır. Bu şekilde tuzlanarak ve kurutularak elde edilen et ürünlerine Dünya'nın farklı bölgelerinden Biltong, Charque, Odk, Qwanta ve Kilishi adı verilen et ürünleri örnek verilirken, ülkemizde ise pastırma ve sucuk bu teknikle üretilen et ürünlerine örnek gösterilebilir. Pastırma Orta Asya Türkleri tarafından çok eski çağlarda bulunan ve günümüzde hala sevilerek tüketilen milli bir ürünüdür. Türkiye'de pastırma mikrobiyolojisi üzerine yapılmış moleküler çalışmalar var olmakla birlikte kapsamlı değildir. İdentifikasyon çalışmaları genelde son ürüne dayalı olmakla birlikte, tüm üretim sürecini kapsayan çalışmalarda ise tek tür mikroorganizma veya besiyerine bağlı kalınmıştır. Bu çalışmada, pastırmanın üretim sürecinin farklı aşamalarından alınan 4 adet örnekteki laktik asit bakterileri, katalaz (-) ve katalaz (+) mezofilik bakteriler ve *Enterobacteriaceae* grubu bakteriler sırasıyla MRS (De Man Rogosa Sharp), M17 (M 17 Agar) ve VRBD (Violet Red Bile Dextrose Agar) besiyerleri üzerinde geliştirilmiş, saflaştırılarak DNA izolasyonuna tabi tutulmuş ve tür bazında tanımlanmıştır. Bunun yanı sıra, seçilen aşamalarda pH ve su aktivitesi değerleri belirlenmiş ve bu özelliklerle gelişen mikroorganizmalar arasındaki ilişki değerlendirilmiştir.

BİRİNCİ BÖLÜM

LİTERATÜR TARAMASI

1.1. Et

Et eski zamanlardan beri göçebe yaşayan insanların belli başlı besinlerindedir ve Kuzey Amerika, Kuzey Avrupa, Okyanusya gibi ülkelerde tüketimi oldukça fazladır (Baysal, 2013). Et, yiyecek olarak kullanıma uygun olan hayvansal dokular olarak tanımlanmış ve bu dokulardan üretilen tüm ürünler bu tanımlamaya dahil edilmiştir (Aberle vd., 2012). Et, sığır, koyun, keçi, domuz, kümes hayvanları, su ürünleri ve çeşitli av hayvanlarının iskelet kası ve iç organlarından, belirli kesim, parçalama ve işleme sonucu elde edilen bir üründür (Demirci, 2014). Bilimsel anlamda ise et, başta kas dokusu olmak üzere kan, epitel, kemik, sinir, yağ ve bağ dokuları yapısında bulunduran hayvansal bir besin olarak tanımlanmaktadır (Tayar ve Korkmaz, 2007; Tayar vd., 2013).

Et, birkaç genel kategoriye ayrılabilir. Tüketim hacmi bakımından en büyük kategori kırmızı ettir (Aberle vd., 2012). Büyükbaş hayvan etleri kırmızı et olarak bilinir (Baysal, 2014). At, keçi, antilop, lama, deve, su aygırı ve tavşan etleri de birçok ülkede insan tüketimi için kullanılmaktadır. Kanatlı eti, yerli kuşların etidir ve tavuk, hindi, ördek, kaz ve gine kümes hayvanlarının etini içerir. Deniz ürünleri, büyük kısmı balık olan suda yaşayan organizmaların etidir. İstiridye, ıstakoz, yengeç ve diğer birçok türün eti de bu kategoriye dahil edilir. Dördüncü kategori, istisnasız herhangi bir hayvanın etinden oluşan av etidir (Aberle vd., 2012).

Toplam kırmızı et üretiminin 2019 yılının IV. çeyreğinde (ekim-aralık) 291 bin 565 ton olduğu bildirilmiştir. Toplam kırmızı et üretimi bir önceki yılın aynı çeyreğine göre %12,3 artarak 291 bin 565 tona ulaşmıştır. Bir önceki yıllık toplam ise %7,4 artarak 1 milyon 201 bin 469 ton olmuştur. IV. çeyrekte toplam kırmızı et üretimi içinde sadece kesimhanelerde üretilen kırmızı et miktarı ise 158 bin 911 tondur (TÜİK,

2020). Kastamonu'da yılda ortalama 200 ton pastırma üretildiği bildirilmiştir. Bu oran Türkiye'deki yıllık pastırma üretiminin %10'una karşılıktır (Türker, 2019).

1.1.1. Etin Yapısı ve Besin Değeri

Et, kas hücrelerinin bir araya gelerek iplik şeklinde oluşturdukları liflerin bağ dokuları ile bağlanmasıyla meydana gelmiş kaslardır. Et, protein, yağ, su ve minerallerden oluşmaktadır. Bunların yanı sıra az miktarda glikojen, B vitaminleri ve lezzet veren diğer organik öğeler vardır. Protein ve yağın etteki oranları etin yağlı veya yağsız oluşuna göre değişmektedir. Etin kırmızı rengi, içerisinde bulunan miyogloblin proteininden ileri gelir (Baysal, 2014). Etlerde besin değeri, elde edildiği hayvanın yaşı, cinsi, vücut kısımları, yetiştirildiği yöre ve yemlenmesine göre değişiklik gösterir. Et biyolojik değeri yüksek ve iyi kalitede protein barındırır (Tablo 1.1) (Tayar vd., 2013). Kasaplık hayvanların et ve yağ dokuları yapı taşları nedeniyle insan vücudunun et ve yağ dokuları ile neredeyse aynıdır. Bu sebeple, hayvansal proteinler ve yağlar, sindirim organlarımızda kolaylıkla yapı taşlarına ayrılmakta, emilmekte ve en yüksek düzeyde değerlendirilebilmektedir. Bazı besinler etten daha fazla protein ve yağ içerirler. Ancak bir besinin ham besin maddelerince zengin olması onun beslenmedeki öneminin bir ölçüsü olamaz. Asıl önemli olan, o besinin insan vücudunda ne kadarının sindirilebildiği ve sindirilen kısmının ne ölçüde yararlı hale geldiğidir. Bu nedenle diğer gıdaların proteini, yağı, vitamini, mineral maddesi, enzimi, karbonhidratı, hormonu etin içerdiği bu tür ham maddelerin yerini tutamaz (Tablo 1.1) (Göğüş, 1986).

Tablo 1.1: Bazı Gıdaların Biyolojik Değerleri ve Sindirilme Oranları

(Arslan, 2013; Denктаş, 2017)

Protein Kaynağı	Biyolojik Değer	Sindirilme Oranı (%)
Serum proteini	104	-
Yumurta	100	100
Sığır Eti	91	97
Soya	80	-
Süt	85	97
Balık	75	97
Baklagil	74	-

Et ve et ürünlerinin insan gıdası olmasındaki en başta gelen önemli özelliği protein içeriğidir. Et, içinde bulunan protein miktarı ve kalitesi bakımından, insan beslenmesi açısından en önemli gıda maddesi grubudur. Hayvansal kaynaklı proteinler ve bunların içerisinde etin proteinleri insanlar için dışarıdan alınması zorunlu olan esansiyel aminoasitleri yeterli bir şekilde içermektedir. Ayrıca bu proteinlerin insanlar tarafından sindirimi daha kolaydır ve vücutta kullanılabilirlikleri de bitkisel proteinlere göre daha yüksektir (Demirci, 2014).

Etin insan beslenmesinde önemli bir yeri olmasının diğer nedenleri arasında yağ ve mineral içeriği yer almaktadır. Et yağı, ete belirli bir lezzet, aroma ve sululuk vermesinin yanı sıra sindirim sistemi salgılarının salgılanmasını arttırdığı gibi, esansiyel yağ asitleri ve yağda eriyen vitaminlerin de kaynağıdır (Göğüş, 1986). Et kalsiyum dışında vücut için gerekli olan bütün mineral maddeleri en uygun formlarda içermektedir (Göğüş, 1986). İnsan beslenmesinde son derece önemli olan et, taze tüketilmesinin yanı sıra, değişik niteliklere sahip ürünlere (örn., pastırma, sucuk, salam, sosis, kavurma) dönüştürülerek de tüketilmektedir (Tekinşen ve Doğruer, 2000). Bunlar gibi birçok sebepten dolayı et ve et ürünleri insan beslenmesi açısından en önemli besinler arasında yer almaktadır.

Yaşa, cinse, cinsiyete ve beslenmeye bakılmaksızın genel bir kimyasal yapı belirtmek gerekirse; ette ortalama %70 su, %18 protein, %3,5 protein yapısında olmayan eriyebilir nitrojenli bileşikler ve %3 kül olduğu söylenebilir (Tablo 1.2). Su miktarı yağ miktarıyla ters orantılı olup, yağ arttıkça azalma, yağ azaldıkça artma gösterir. Protein: su oranları ise daha sabitlik göstererek 1 kısım proteine 4 kısım su içerecek şekildedir. Eterde karbonhidrat olarak glikojen bulunur (\geq %1) (Göğüş, 1986).

Tablo 1.2: Memeli Kasının Bileşimi (Toldrá, 2010)

Bileşenler	% Kas Ağırlığı
Su	%75 (%65-80)
Protein	%18,5 (%16-22)
Yağ	%3 (%1-13)
Karbonhidrat	%1 (%0,5-1,5)
Protein Olmayan Azotlu Maddeler	%1,7 (%1-2)
Diğer Protein Olmayan Azotlu Maddeler (vitaminler, mineraller vd.)	%0,85 (%0,5-1)

1.1.2. Etin Histolojik Yapısı

Organizmayı hücreler meydana getirmektedir. Hücreler yaşayan organizmaların yapısal ve işlevsel birimleridir. Benzer yapı ve işlevi olan bir grup hücreye doku denir (Peker ve Erbaş, 2014).

Dokular

Şekil ve görev bakımından benzerlikleri olan hücrelerin bir araya gelmesiyle dokular oluşur. Hücrelerin bir arada olabilmesi yapıştırıcı özelliği olan bir madde ile mümkündür. Bu madde hücre tarafından, hücreler arası boşluklara salgılanır. Et bilimi açısından önemli olan dokular aşağıdaki şekilde sıralanabilir (Yıldırım, 1996):

- Kas doku
- Kan doku
- Bağ doku
- Epitel doku
- Sinir doku

Kasaplık hayvanların kesilip baş, ayaklar (ön bacaklar *Articulus carpi*, arka bacaklar da *Articulus tarsi*'den kesilirler), deri, kuyruk (4. kuyruk omurundan kesilir), bütün iç organlar (göğüs, karın ve pelvis boşluğunda bulunan iç organlar) ayrıldıktan sonra geriye kalan bütün gövdeye karkas denir. Böbrek, böbrek yağları ile kuyruk, bazı ülkelerde karkasa dahil edilirken ülkemizde ise dahil edilmez (Anar, 2002).

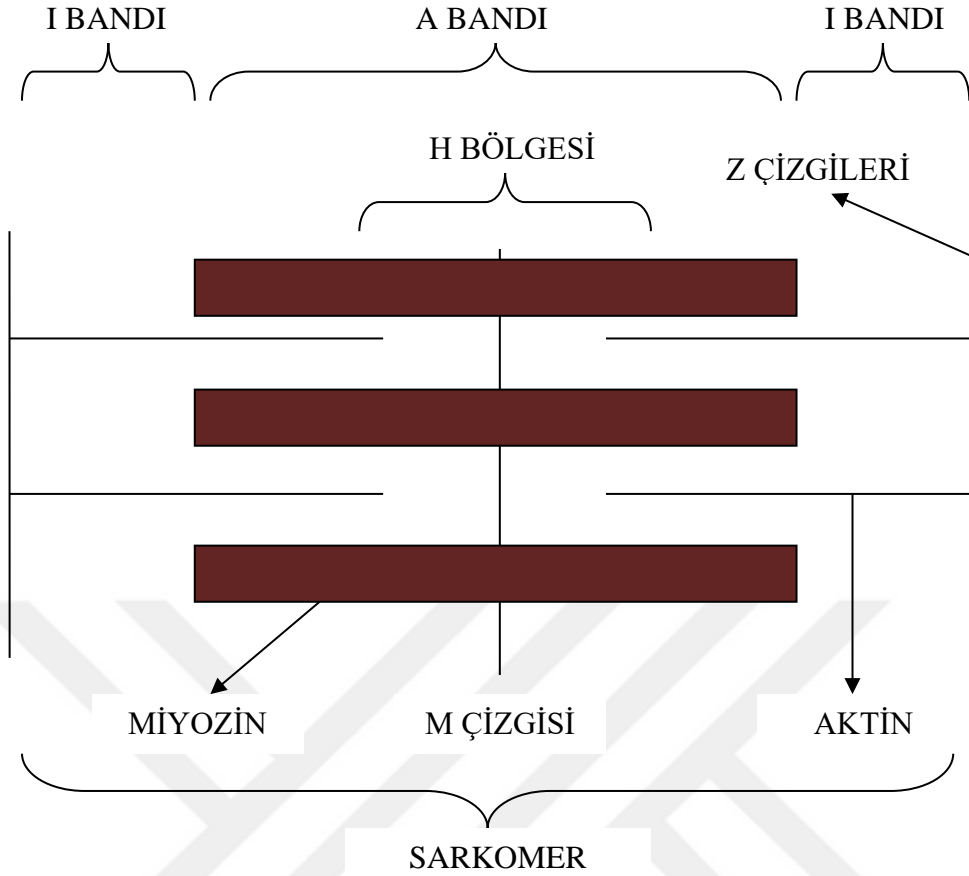
Et hayvanlarının karkas ağırlıklarının çoğunluğunu, iskeleti hareket ettirmek, duruş kontrolü ve solunum, yutma ve peristalsis gibi daha özel fonksiyonlar için alışılmadık şekilde tasarlanmış birçok kas içerir. Bu kas yapısı çizgili ve çizgisiz olarak iki ana türe ayrılır. Daha az hacimli olan çizgisiz veya düz kasların, çizgili kaslarla benzer işlevleri vardır; ancak farklı histolojik yapıya sahiptir. Düz kaslar öncelikle gastrointestinal kanalın ve dolaşım sisteminin astarlarında ve ayrıca kuşların taşıdığı gibi özel organlarda bulunur. Genellikle karın duvarında bulunan düz kaslar, karın boşluğunu ve içeriğini destekler (Hui vd., 2001). İskelet kaslarına çizgili kaslar da denilmektedir (Yıldırım, 1996).

İskelet kasları, hareket ve duruş kontrolünde ve hayati organların korunmasında ana rol oynar. İskelet kasları karmaşık bir yapıya sahiptir; çünkü kas liflerine ek olarak, büyük miktarlarda destekleyici bağ dokusu, damar ve milyarlarca kas lifinin her birini kontrol eden bir sinir kaynağı içerirler (Şekil 1.1). Ayrıca, iskelet kasları lipidler için

depo olarak görev yapar ve esas olarak sudan oluşan önemli miktarda hücre dışı sıvı içerir. Aynı zamanda iskelet kasları kalp kası içindeki kadar olmasa da mitokondri içerir. Ribozomlar ve golgi aygıtı gibi diğer organeller ise daha çok kas liflerinde bulunur (Hui vd., 2001).

Karkasların büyük bir bölümünü iskelet kasları oluşturur. İskelet kasları, iskelet üzerinde, küçük ve büyük kas demetlerinden oluşan ve vücut ağırlığının %35-65 miktarını oluşturan yapılardır (Anar, 2002). Bu kaslar genellikle kemiklere bağlıdır. Kaslar şekil, boy, bağlantı şekli, görevleri ve içerdikleri bağ doku ve sinir doku miktarları ile birbirinden ayrılırlar. Kas dokularında ara dokuyu bağ dokusu oluşturur. Bu dokularda fazlasıyla bulunan kan damarları ve sinir telleri bağ dokusu içerisinde yataklanmış haldedir (Anar, 2002). Kas çok sayıda kas lifinin veya telinin bir araya gelmesiyle oluşan kas demetlerinden ibarettir. İp şeklindeki kas telleri bir araya gelerek kas demetlerini oluşturur. Kas telleri (kas hücreleri) bir araya gelerek primer demetleri meydana getirir. Primer demetler toplanarak sekonder demetleri, sekonder demetler ise tersiyer demetleri oluşturabilirler (Anar, 2002).

Her bir kas hücresi kendilerini saran, protein ve lipidlerden oluşan ve sarkolemma adı verilen bir zar ile çevrilidir. Sarkolemma içerisinde bulunan kas hücrelerinin protoplazmasına ise sarkoplazma adı verilir (Anar, 2002). Sarkoplazma içerisinde bulunan cisimciklerin en önemlilerinden biri olan miyofibriller (kas fibrili, kas ipçiği), ince, uzun ve silindirik çubuklar biçimindedirler (Göğüş, 1986). İskelet kası tellerinin enine çizgili görünmelerine yol açan organeller miyofibrillerdir (Anar, 2002). Bir miyofibril kendisinden çok daha ince olan ve ancak elektron mikroskopunda görülen miyofilamentlerden oluşur. Bunlar kimyasal yapı ve çaplarına göre ikiye ayrılır. Bunlardan aktin filamentleri 50-70 Å kalınlıkta ve 1 mikron uzunlukta, miyozin filamentleri ise 160 Å kalınlıkta ve 1,5 mikron uzunluktadır. Miyozin filamentleri sadece A bantlarında bulunup I bantlarına taşmazlar. Aktin filamentleri ise Z bandından başlayıp A bantlarına doğru uzarlar ve A bantlarında bir süre devam ederler. A bantlarının uçları aktin ve miyozinin ikisini de barındırırken ortasında sadece miyozin filamentleri bulunmaktadır. Bu orta kısım H bölgesi olarak isimlendirilir (Şekil 1.1) (Yıldırım, 1996).



Şekil 1.1: Kas İpliklerinin Yapısı

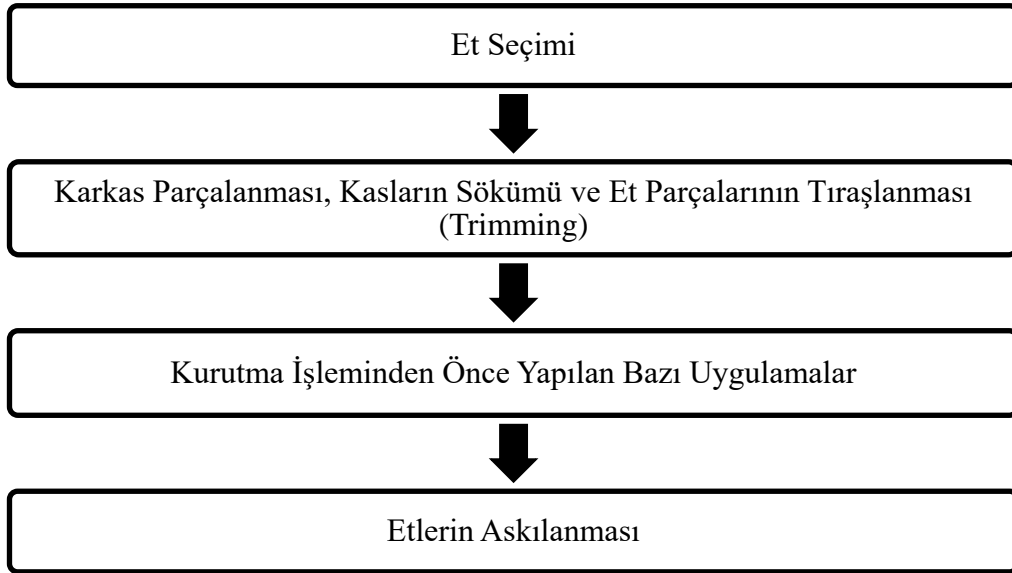
(Yıldırım, 1996)

1.2. Kurutulmuş Et Teknolojisi

Bugün dünyada, çok çeşitli et ürünü işleme teknolojilerinin bazı aşamalarında temel kurutma teknolojisi kullanılmakta, et bu şekilde muhafaza edilmekte ve tüketilmektedir (Gökalp vd., 2004). Eti korumak amacıyla tuzlamak ve kurutmak yüzyıllar öncesinde buzdolapları yokken, özellikle sıcaklığın yüksek olduğu bölgelerde tercih edilmiştir. Yüzyıllar boyunca birçok geleneksel kurutma ile et işleme tekniği geliştirilmiştir, ancak ürünün kalite ve güvenlik açısından her zaman kabul edilebilir olmasını sağlayacak tam anlamıyla güvenilir bir teknik yoktur (Leistner 1987; Leistner 1989; Yetim vd., 2006) Günümüzde etin raf ömrünü uzatmak için modern metotlar bulunmasına rağmen, hava sıcaklığının yüksek olduğu tropikal bölgelerde ve gelişmekte olan ülkelerde bu ekipmanları kullanmak maliyeti artırmaktadır. Böylece kurutma teknolojisi ve kurutulmuş et ürünleri hâlâ önemini sürdürmektedir (Özbay Doğu ve Sarıçoban, 2015). Kurutularak et muhafazası ve

işlenmesi büyük ve küçükbaş hayvan etlerinde olduğu gibi domuz, kümes hayvanları ve su ürünleri etlerinde de yaygın bir biçimde kullanılmaktadır (Gökalp vd., 2004). Etin muhafaza yöntemleri, coğrafyaya bağlı olarak değişmektedir. Örneğin Akdeniz Bölgesi'nde iklimden dolayı et, genelde kurutulmakla birlikte, bazı durumlarda tütsüleme işlemi de yapılmaktadır. Akdeniz bölgesindeki güneşli havalar uzun kurutma süreci için uygun olup etin su aktivitesini (a_w) düşürmeyi kolaylaştırmaktadır. Avrupa'da ise tütsüleme ve fermantasyon gibi yöntemler daha sık kullanılmaktadır (Özbay Doğu ve Sarıçoban, 2015). Ülkemizde ve dünyada tuzlu ve kürlenmiş etin açık havada kurutulması metoduyla üretilen pek çok kurutulmuş et ürünü bulunmaktadır (Öztañ, 1999).

Türk Gıda Kodeksi (TGK) Et ve Et Ürünleri Tebliği'ne göre kurutma, üretim sırasında ürünün teknolojisi gereği suyunun bir kısmının uzaklaştırılması işlemi olarak tanımlanmaktadır (Anonim, 2012). Etin kurutma işlemi, hayvan kesimi ile başlayan, trimming (tırışlama), hammadde seçimi, önışlemlerle devam eden ve uygun kurutma yönteminin uygulanması ile sona eren karmaşık bir süreç olarak kabul edilmektedir (Şekil 1.2). Ayrıca kurutma işlemi için sürecin ilk aşaması olan hayvan seçiminde, orta yaşlı, yağsız ve sağlıklı et, uygun bir seçim olarak görülmektedir (Özbay Doğu ve Sarıçoban, 2015).



Şekil 1.2: Et Ürünlerinin Kurutulması

(Özbay Doğu ve Sarıçoban, 2015)

Kurutmada fiziksel olarak etin nem içeriği dereceli olarak düşmektedir (FAO, 1990). Etteki en dip bölgelerdeki su, aşamalı olarak migrasyona uğrayarak etin üst kısımlarına geçerek ve oradan da buharlaşarak eti terk eder (Özbay Doğu ve Sarıçoban, 2015). Etin kurutulması sırasında suyun buharlaşarak kaybolması, kurutmanın birinci günü çok hızlı olurken sonra kademeli olarak yavaşlamaktadır (Gökalp vd., 2004). Kurutma işlemi boyunca oluşan ağırlık kaybı, aroma gelişimi ve ürünün yumuşaklığı, kurutma ile ilgili önemli kalite kriterlerini oluşturmaktadır. Kurutma esnasında et parçalarının birbiri ile temas etmesi istenmemektedir. Böyle bir durumda, temas eden bölgelerin uzun süre kurumamasına bağlı olarak mikroorganizmalar ve böcekler için elverişli ortam oluşması söz konusu olmaktadır (Özbay Doğu ve Sarıçoban, 2015).

Eti doğal sıcaklıklar altında kurutmak, güneş ışınlarının doğrudan etkisi ve havanın nem ve dolaşımı dahil olmak üzere, eti muhafaza etmenin en eski yöntemidir (FAO, 1990). Yüzde 30 civarında düşük nem oranına sahip ılık, kuru hava ve gündüz ile gece arasındaki nispeten küçük sıcaklık farkları et kurutma için en uygun koşullardır. Bununla birlikte, et kurutma temel hijyenik ve teknolojik kurallara uyulduğunda daha az elverişli koşullar altında da iyi sonuçlarla gerçekleştirilebilir. Kurutma işleminin yoğunluğu ve süresi hava sıcaklığına, neme ve hava sirkülasyonuna bağlıdır. Yüksek sıcaklıklar, düşük nem ve yoğun hava sirkülasyonu altında kurutma daha hızlı olacaktır (FAO, 1990).

1.2.1. Kurutulmuş Et Ürünlerinin Özellikleri

Kurutma teknolojisi, farklı bölgelerde çok farklı şekillerde uygulanmaktadır. Bu farklılıklarla birlikte, et rengi, aroması, mikrobiyolojisi ve kalitesi açısından her kurutulmuş etin taşınması gereken ortak özellikler bulunmaktadır (Özbay Doğu ve Sarıçoban, 2015). Kurutulmuş etteki su oranı %10 dolaylarında olduğundan, bakteri kontaminasyonuna karşı oldukça dayanıklıdır. Çünkü mikroorganizmaların gelişmesi için uygun bir ortam bulunmamaktadır. Kurutma öncesinde ette bol miktarda olan mikroorganizma, kurutma sonunda hızlı bir düşüş gösterir. Örnek verilecek olursa, kurutulmuş etlerde *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Clostridium botulinum* ve diğer patojen mikroorganizmalar, su düzeyi %30'un altında kaldığı sürece üreme göstermezler (Göğüs, 1986). Aynı zamanda su oranıyla doğru orantılı olan su aktivitesine bakacak olursak taze etin a_w 'si 0,98-0,99 arasındayken, işlenmiş bazı

ürünlerde a_w , pişmiş domuz butlarında 0,96-0,98, salam tipi kuru sosislerde 0,96-0,70, parça halindeki kuru et ürünlerinde ise 0,50-0,75'tir (Gökalp vd., 2004). Su aktivitesi değeri azaldıkça mikroorganizmaların üremesi azalır, dolayısıyla ürünün bozulması yavaşlar (Gökalp vd., 2004).

Kurutulmuş etin görünümü mümkün olduğunca homojen olmalıdır. Büyük kırışıklıkların ve çentiklerin olmaması, etin istenen devamlı ve düzgün dehidrasyonunu gösterir (Gökalp vd., 2004). Yüzeyin rengi ve çapraz kesimin rengi eşit ve koyu kırmızı olmalıdır. Daha koyu bir çevresel katman ve merkezdeki parlak kırmızı renk, ürünün daha derin katmanlarından buharlaşmayı engelleyen sert kabuk oluşumu ile yanlış, çok hızlı kurumaya işaret eder (FAO, 1990). Bu durumda, merkezi parçalar daha parlak bir renge ve daha yumuşak bir kıvamına sahiptir ve daha yüksek su içeriği nedeniyle, paketlenildiğinde veya başka şekilde saklandığında mikrobiyolojik bozulmaya karşı daha hassastır. Düzgün kurutulmuş etin kıvamı, donmuş ete benzer şekilde sert olmalıdır. Lezzet ve aroma, kurutulmuş etin tüketici tarafından kabulü için çok önemli kriterlerdir. Baharatsız doğal kurutulmuş et nispeten tuzlu, oksidemi bir tada sahip olmalıdır. Çok yağlı ürünler için aşırı oksidasyon tadı ve acılaşıma oluşmamalıdır (FAO, 1990; Gökalp vd., 2004).

Kurutulmuş etlerde protein konusunda önemli bir değişim söz konusu olmamaktadır. Kurutulmuş sığır etlerinde ortaya çıkan vitamin kaybı, taze etlerin evlerde pişirilmesinde meydana gelen vitamin kayıplarından fazla değildir. Araştırmacıların sonuçlarına göre kurutulmuş etlerdeki mevcut tiyaminin sadece %30-40 kısmı, riboflavinin en çok %10 kısmı, niasinin en çok %10 kısmı ve pantotenik asidin %20-30 kısmı kaybolmaktadır (Göğüş, 1986).

1.2.2. Dünyada Yaygın Olarak Üretilen Tipik Kurutulmuş Et Ürünleri

Etin kurutulmasına yönelmenin temel sebebini, çiğ etin raf ömrünün kısa olması ve soğuk zincirde depolanması zorunluluğu oluşturmaktadır (Özbay Doğu ve Sarıçoban, 2015). Gıdaların kurutulmasının temel prensibi, gıdanın yapısında bulunan suyun uzaklaştırılmasına bağlı olarak su aktivitesi değerinin düşürülmesi, dolayısı ile mikroorganizmaların çoğalmalarının engellenmesi ve bazı enzimlerin faaliyetlerinin durdurulması veya en aza indirilmesidir (Temelli, 2011). Bu şekilde üretilen et ürünlerine Güney Afrika ülkelerinde üretilen Biltong, Güney Amerika'daki Charque,

İsviçre'deki Bündnerfleisch, Doğu Afrika ve Somali'de Odk, Etiyopya'da Qwanta, Nijerya'da Kilishi ve Kızılderililer tarafından özellikle törenlerde yenilen Pemmican adı verilen et ürünleri örnek gösterilebilir. Günümüzde et ürünlerine güneşte kurutma ve tuzlamanın yanı sıra kütleme işlemi de dahil edilmektedir. Bu işleme teknolojisiyle üretilen et ürünlerine ise ham, bacon, cornbeef ve ülkemizden özellikle pastırma örnek gösterilebilir (Arslan, 2013).

Kurutularak muhafaza edilen et ürünleri temel olarak 3 gruba ayrılmaktadır:

- Yalnız tuzlama ve kurutma işlemi uygulananlar (örneğin charque),
- Tuz ve çeşitli katkı maddeleri ile muamele edildikten sonra kurutma işlemine tabi tutulanlar (örneğin biltong, jerky, pastırma),
- Tuzlama ve kurutma yanında, ısı işlem uygulananlar (örneğin odk, qwanta, kilishi) (Temelli, 2011).

Aşağıda Dünya genelinde üretilen kurutulmuş et ürünlerinden bazıları hakkında bilgiler verilmiştir. Ayrıca, bu ürünlerin biyokimyasal değerleri Tablo 1.3'te gösterilmiştir.

a) Odk

Doğu Afrika ve Somali'de yaygın olarak üretilen bir et ürünüdür. Yağsız Sığır etinin, kuru tuz ile muamele edilip, et parçalarının 4-6 saat güneşte kurutulduktan sonra ufak parçalar halinde bitkisel yağ içerisinde kızartılması ve bu işlemleri takiben tekrar kurutulması ve baharatlanması işlemleri sonunda elde edilmektedir. Sonrasında yüzeyi yine bitkisel yağ ile kaplanarak muhafaza edilir. Bu ürünün raf ömrü 12 aydan fazla olabilmektedir (Gökalp vd., 2004; Leistner, 1991).

b) Qwanta

Etiyopya ve diğer Doğu Afrika ülkelerinde tüketilen, geleneksel kurutulmuş bir et ürünüdür. Yağsız sığır eti, 20-40 cm'lik uzun şeritler halinde kesilerek 24-36 saat arasında kurumaya bırakılmaktadır. Kurutma öncesi bu parçalar, %25 tuz, %25 aromatik baharatlardan oluşmuş özel bir sosla ve %50 oranında acı biberli bir sosla kaplanmaktadır. Kurutmanın sonunda et parçaları hafif bir tütsülemeye tabii tutulur. Bu aşamadan sonra tereyağında kızartılarak bir süre daha kurutulur. Et bu haliyle herhangi bir ön işlem gerektirmeksizin tüketilebilmekte ve depolanabilmektedir (Gökalp vd., 2004; Leistner, 1991).

c) Kilishi

Nijerya başta olmak üzere diğer kurak ve yarı kurak Batı Afrika ülkelerinde tüketilmektedir (Gökalp vd., 2004). Kilishi, kaliteli sığır etinin ince parçalara ayrılarak güneş yardımıyla kurutulması ve ardından marine edilmesi, son olarak tekrar kurutulmasıyla elde edilen geleneksel bir et ürünüdür. Kızzartılarak tüketilmektedir (Özbay Doğu ve Sarıçoban, 2015). Genelde yapımında yağsız sığır etinden yararlanılsa da, keçi veya koyun eti de kullanılmaktadır. Sıcak ve kuru hava koşullarında genellikle Şubat ve Mayıs aylarında üretilmektedir (Gökalp vd., 2004). Kilishi, ambalajsız olarak oda sıcaklığında birkaç ay saklanabilir. Düşük yoğunluklu plastik paketlerin ürünü stabil şekilde oda sıcaklığında 1 yıl boyunca muhafaza edebildiği bilinmektedir (Özbay Doğu ve Sarıçoban, 2015; Temelli, 2011).

d) Biltong

“Biltong” kelimesindeki, bil (hayvan butu) ve tong (şerit) anlamlarını taşımaktadır. Bu et ürününün Afrika’da yüzyıllar öncesinde ve özellikle göçebe insanlar tarafından tüketildiği bilinmektedir (Özbay Doğu ve Sarıçoban, 2015). Biltong sığır ve av hayvanları etlerinin tuzlanmasıyla üretilmektedir (Gökalp vd., 2004; Temelli, 2011). Üretiminde karkastaki tüm kaslar kullanılabilmeyle birlikte geniş olan kaslar, biltong üretimine en uygun olanlar olarak görülmektedir (Özbay Doğu ve Sarıçoban, 2015). Etlar 1-2 cm kalınlığında uzun şeritler halinde kesildikten sonra salamura ve kuru tuzlamayla muamele edilmektedir. Gerekli aromayı sağlayacak farklı maddelerin ilavesinden sonra etler bu kürlenme şartlarında 12 saati geçmeyecek şekilde birkaç saat bekletilir. Bu aşamadan sonra kürlenmiş et parçaları sıcak su ve sirke (10:1) içeren karışıma daldırılarak güneşte kurutulmaktadır (1-2 hafta). Kuruyan ürünün dış yüzeyi koyu kahverengi, kesit yüzeyi ise kırmızı ve yumuşak bir hal aldığıında ürün tüketime hazır hale gelmiş demektir (Özbay Doğu ve Sarıçoban, 2015; Gökalp vd., 2004; Temelli, 2011).

e) Charqui

“Charqui” veya “Charque”, Brezilya’da tüketilen, tuzlanıp kurutulmuş elde edilen geleneksel bir et ürünüdür (Özbay Doğu ve Sarıçoban, 2015). Sığır karkaslarının arka ve ön çeyreklerinden kalınlıkları 5 cm geçmeyecek şekilde, 5 kg’lık parçalar kesilip ayrılır. Bu parçalar beton havuzlar içerisindeki doymuş tuz çözeltilerinin içerisinde 1 saat daldırılıp çıkarılır. Çıkarılan et parçaları havuzlar üzerindeki tahtalara konularak

süzdürülür (Gökalp vd., 2004). Kuru tuzlama işleminde et parçaları arasına tuz serpilerek ve etlerin yüksekliği yaklaşık 1 m olacak şekilde üst üste istiflenir. Üretimin diğer aşamasında ise istiflenen etlerin üzerine ağırlık konularak baskı yapması sağlanır. Baskılama işlemi 8 saat kadar sürmektedir (Temelli, 2011). Bu süre sonunda etler döndürülür ve bu sırada da etlerin arasına yine tuz serpilir. Bu döndürme işlemi 5 gün devam ettirilir. Fazla tuzu uzaklaştırmak amacıyla etler yıkanır ve sıkılarak hem fazla su uzaklaştırılır hem de etler düzleştirilir. Etler güneşte 4-6 saat kurutulur. Kurutma işlemi tamamlandıncaya etler tüketime hazır hale gelir. Normal oda sıcaklığında bu ürün birkaç ay muhafaza edilebilmektedir (Gökalp vd., 2004).

f) Kaddid

Sığır ve koyun etlerinin tuz ve baharat ile muamele edilmesinin ardından güneşte kurutulması ile elde edilen, Kuzey Afrika'ya özgü, fermente bir et ürünüdür (Temelli, 2011). Özellikle Tunus'un yerel halkı tarafından oldukça sevilmektedir (Özbay Doğu ve Sarıçoban, 2015). Hayvanın kesiminden sonra etler yaklaşık 2 gün süre ile olgunlaştırmaya bırakılır. Daha sonra kemiklerinden ayrılarak tuz ve baharat ile muamele edilir. Bu karışımla birlikte etler 8-10 saat bekletildikten sonra güneşte kurutulur. Kurutma işlemi 7-10 gün sürmektedir. Tüketime hazır hale gelen ürün ortam sıcaklığında 1 yıl kadar muhafaza edilebilir (Temelli, 2011).

g) Jerky

“Jerky” ya da “jerked beef”, Kuzey Amerika merkezli, tütsülenmiş, güneşte veya ateş üzerinde kurutulmuş, tütsü aromasına sahip geleneksel bir et ürünü olarak kabul edilebilir. Jerky yapımında genellikle sığır eti kullanılmakla birlikte, bizon, geyik, antilop ve hindi eti de kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak kümes hayvanları veya av etinden, ayrıca timsah etinden de jerky üretimi yapılmaktadır. Üretiminde et, öncelikle 0,5 cm kalınlıktan fazla olmayan 1-2 cm genişliğinde 15-20 cm boyunda parçalar halinde kesilmektedir. Bu aşamada et, tamamen yağından ayrılır. Daha sonra et, tuz, soya sosu, karabiber, taze sarımsak veya soğan ve kırmızıbiber karışımı ile ovularak 12 saat boyunca marine edilmektedir. Kürleme aşaması ise tuz, şeker ve bazen renk için sodyum nitrit ilave edilmesi ile yapılmaktadır. Sonrasında et, kaynayan suda yüzeyi beyazlaşmaya kadar (1-2 dakika) bekletilmektedir. Daha sonra et terbiye edilerek kurutulma işlemi gerçekleştirilir. Terbiyesi için kırmızıbiber, kekik, güvey otu, reyhan kullanılmaktadır. Kurutma, güneşte, fırınlarda veya kurutma odalarında

olabilmektedir. Jerky herhangi bir ön işlem gerektirmeksizin yemeye hazır bir et ürünü olarak atıştırılabilir bir gıda gibi tüketilmektedir (Özby Doğu ve Sarıçoban, 2015).

h) Khundi

Khundi, Nijerya'da sığır eti, deve veya at etinden üretilir. Taze et parçalar halinde kesilir, tuz serpilir ve yaklaşık 3 gün boyunca sert ağaçtan bir ızgarada tütsülenir. Birkaç ay boyunca depolanabilir (Leistner, 1991).

t) Sharmoot

Sudan ve diğer Kuzey ve Doğu Afrika bölgelerinin toz kurutulmuş et ürünüdür. En az 4 ay saklanabilir. Üretiminde sığır eti kullanılır. Sığır eti ince şeritler halinde kesildikten sonra ufalanarak ince bir toz halinde öğütülür. Tüketimden önce kurutulur ve çeşitli yemekler için bitkisel malzemelerle karıştırılır (Leistner, 1991).

Tablo 1.3: Bazı Kurutulmuş Et Ürünlerinin Özellikleri

Ürünler	Nem (%)	Protein (%)	Yağ (%)	Kül (%)	Tuz (%)	a _w	pH	Kaynak
Pastırma	30-35	52,41	2,36	6,7	4,5-6	0,88	5,75-6,1	FAO, 1990; Leistner 1991; Öztan, 1999.
Kilishi	7,5	50,2	17,8	9,6	9,8	0,59	5,81	İgene vd., 1990; Jones vd., 2001.
Biltong	11,5	65,0	1,9	12,5	3-8	0,77	5,5	Burfoot vd., 2010; Özby Doğu ve Sarıçoban, 2015; Temelli, 2011.
Charqui	16,7-22,9	64,6-69,8	20-35	7,8-9,5	10-20	0,6-0,7	5,9-6,1	Burfoot vd., 2010; Özby Doğu ve Sarıçoban, 2015; Mamani-Linares ve Cayo 2011.
Kaddid	10,38	-	-	-	10,21	0,54	5,32	Bennani vd., 1995.
Jerky	24,45-27,69	39,77	19,99	4,38	-	0,83-0,79	5,64-6,02	Yang vd., 2009; Kim vd., 2010.
Khundi	-	-	-	-	0,5	0,80	-	Leistner, 1991.
Sharmoot	68,2	20,1	9,7	-	-	0,40-0,55	5,69	Gailani ve Fung, 1989; Leistner, 1991.

1.3. Pastırmanın Tanımı

Pastırma kelimesi, baskılama anlamına gelen “bastırma” fiilinden türemiştir (Kılıç, 2009). Pastırma, çemen adı verilen bir karışım ile kaplanmış (pastırmayı muadillerinden farklı kılan bir özelliği) ve birkaç ay boyunca soğutulmadan saklanabilen, tuzlanmış, kısmen fermente edilmiş, kurutulmuş, bir ara nem ürünü olarak kabul edilen et ürünlerinden biridir ve daha çok Orta Doğu ülkelerinde oldukça popülerdir (Aksu ve Kaya, 2001; Batman vd., 2016; Gök vd., 2008; Yetim vd., 2006). Son ürün olan pastırma oldukça lezzetli ve besleyicidir. Ayrıca normal şartlar altında ortalama %45 nem, %30 protein, %15 yağ, %5 karbonhidrat (çemen) ve %5 kül içerir ve çiğ veya pişmiş olarak tüketilebilir (Yetim vd., 2006).

Türk Standartlar Enstitüsü'nün pastırma standardında pastırma, sağlıklı kasaplık büyükbaş hayvan gövde etlerinden usulüne göre ayrılan parçaların teknolojik işlemlerden geçirilerek kurutulması ve çemenlenmesi ile elde edilen bir et ürünü şeklinde tanımlanmaktadır. Pastırma, üretiminde kullanılan tuzun etkisiyle ve uygulanan kurutma işlemleri sonucunda, diğer et ürünlerine kıyasla daha düşük su aktivitesi (a_w) değerlerine sahip olduğundan, orta dereceli rutubetli et ürünleri içerisinde yer almaktadır (İnat, 2008; Özdemir vd., 1999).

1.4. Pastırmanın Tarihçesi

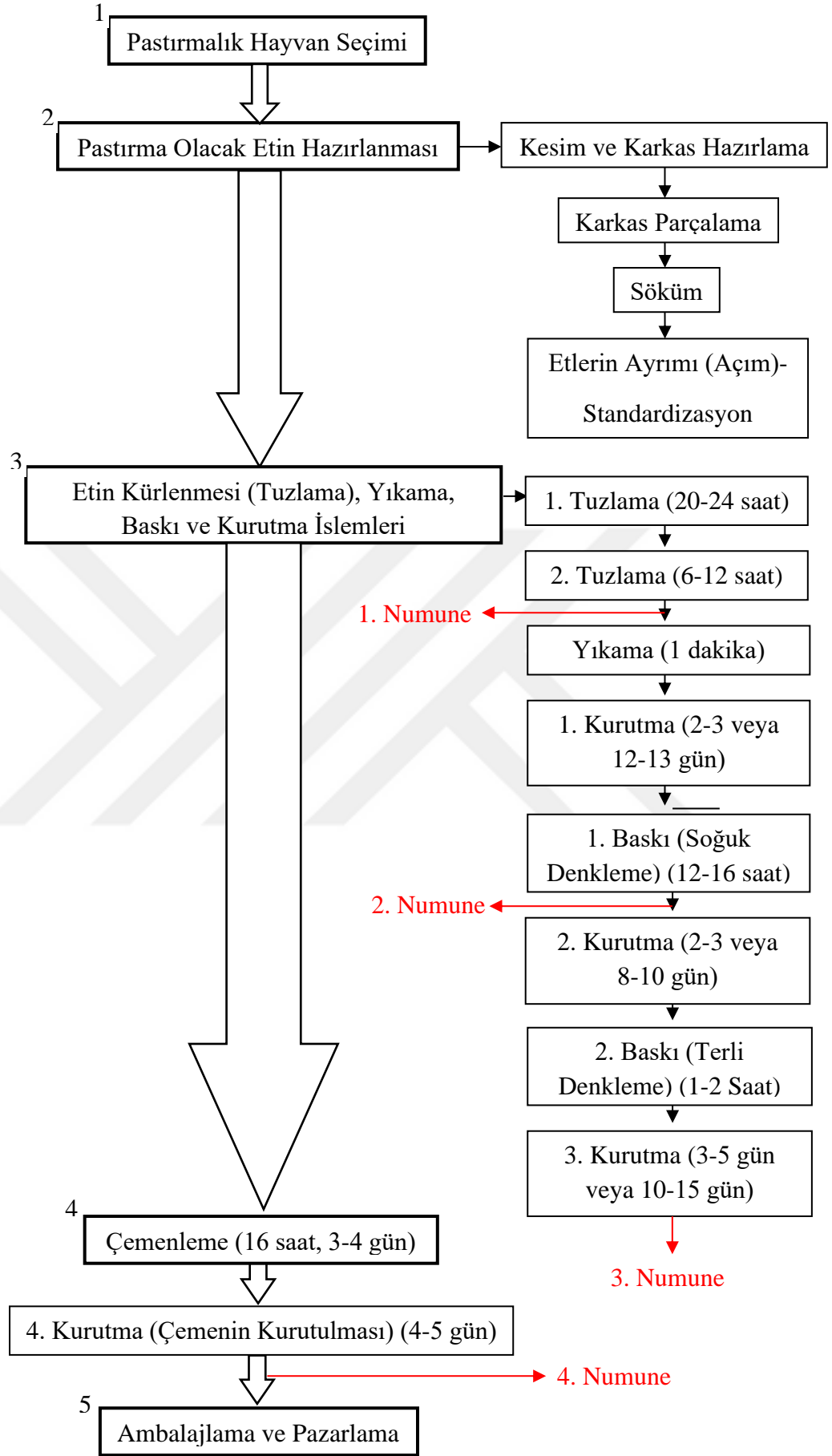
Geleneksel gıdalar, özellikle fermente ürünler, birçok nesiller için mutfak mirası ve insanların ortak değerlerini koruyan gıda matrisinin ayrılmaz parçalarıdır. Besleyici ve duyuşal nitelikleri nedeniyle, bitki ve hayvansal kaynaklı çok çeşitli geleneksel gıda ürünleri günümüzde hala tüketilmekte ve çeşitli ticari markalar altında satışa sunulmaktadır. Hayvansal kökenli bu tür ürünlerden biri, Türkiye’de yaygın olarak üretilen ve tüketilen pastırmadır (Ahmed vd., 2014; Güner vd., 2008; Kaban, 2013). Anadolu, uzun bir süre ayakta kalmış bir tarihe ve görkemli bir yemek kültürü ve besleyici besicilik kültürüne sahiptir (Ahmed vd., 2013; Ahmed, vd., 2014). Üretimi ilk kez Orta Asya Türkleri tarafından yapılmış olan pastırma, Anadolu’ya Selçuklular tarafından getirilmiştir. Asırlardır Türkiye’de üretilen et ürünleri arasında kendine özgü nitelikleri ile oldukça önemli bir yere sahip olan pastırma, ülkemizde üretilmesi ve sevilerek tüketilmesiyle de geleneksel ve milli bir et ürünü haline gelmiştir (Aksu ve Kaya, 2001). İlk olarak Türkler tarafından üretildiği bildirilmiş pastırma ve benzeri

et ürünlerinin üretimi, Çin, Rusya, Kafkasya, Kırım ve İran'da da yayılmıştır (Gökalp vd., 2004; Yetim ve Çankaya, 2001). Göçebe hayatın ihtiyacı olarak üretilmiş Türk besinleri arasında pastırma ve sucuk bulunmaktadır. Eti uzun süre muhafaza etmenin yolunu keşfeden Türk toplumu, pastırma ve sucuk gibi bugünün neredeyse aynısı olan besinleri göç ve sefer sırasında genellikle at sırtında tüketmekteydiler (Kızıldemir vd., 2014). Divan-ı Lügat-it Türk'te "yazın ye" anlamına gelen "yazok et" şeklinde geçen pastırma, bir süre "bastırma" olarak anılmış, daha sonralarda ise şimdiki adını almıştır. Orta Asya'da yaşayan Hunlar ve Oğuzlar'ın, aylar süren savaş yolculuklarına çıkarken yanlarına tuzlanmış et aldıkları ve bu eti yol boyunca yedikleri belirtilmektedir. Geri kalan etlerin atların eyerinde torba içinde saklanarak yol boyunca eyer ve diğer düzenekler tarafından sıkışıp ezilerek pastırma haline geldiği ifade edilmektedir (Gökalp vd., 2004; Kök, 2003).

Türkiye'de pastırma Osmanlı padişahlarından II. Ahmet'e (1691- 1694) ait bir fermanda yer almış ve pastırma ile ilgili bazı hususlar sıralanmıştır. Ticari pastırma üretimine ise 17. yüzyılda başlanmıştır. Aynı zamanda hala yurdumuzda parça etler halinde işlenen en önemli et ürünü pastırmadır. Pastırma üretimi ikliminden dolayı özellikle Kayseri ilinde gelişmiştir (Gökalp vd., 2004).

1.5. Pastırma Üretim Teknolojisi

Ülkemizde pastırma üretimi Kayseri'de kapu ismi verilen işleklerde yapılır. Pastırma üretimi genellikle Eylül ayının ikinci yarısında başlar, sonbaharın sonuna kadar kesintili bir şekilde devam eder ve bu dönem halk arasında pastırma yazı sığağı adıyla anılır (Tekinşen ve Doğruer, 2000). Ülkemizde modern teknoloji ile üretim yapan et işletmelerinin yanısıra geleneksel yöntemlerle, Türk örf ve adetleri doğrultusunda, usta-kalfa-çıraklık esaslarına bağlı olarak üretim yapan küçük işletmeler de bulunmaktadır. Dolayısıyla, üretimin başından itibaren aşamalar işletmeden işletmeye, ustadan ustaya veyahut yöreden yöreye önemli farklılıklar göstermektedir. Geleneksel pastırma üretim aşamaları Şekil 1.3'te verilmiştir.



Şekil 1.3: Pastırma Üretim Akış Şeması

(Kaynak: Anar, 2012; Gökalp vd., 2004)

1.5.1. Pastırma Üretiminde Kullanılacak Hayvanın Seçimi

Kaliteli pastırma üretiminde önemli olan ilk aşama hayvan ve karkasların seçimidir. Pastırma diğer et ürünlerine kıyasla daha çiğ olduğu için kesim öncesi ve sonrası sağlıklı hayvan ve karkas seçimi son derece önemlidir (Gökalp vd., 2004). Hayvan mutlaka sağlıklı olmalıdır. Pastırma üretiminde eti yenen her türlü hayvan kullanılsa da, genellikle besi durumu iyi, 3-6 yaşlarında inek, tosun (1,5-4 yaş arasındaki kısırlaştırılmamış erkek sığır) ve toksa (kısırlaştırılmamış erkek manda) etleri tercih edilmektedir (Anar, 2012; Tekinşen ve Doğruer, 2000).

Etin bağ doku oranının düşük olması ve çok genç hayvan eti olmaması tercih edilir (Anar, 2012). Çünkü genç hayvan etlerinin su oranları çok daha yüksek olduğu için kuruma sırasında zorluklara ve yüksek oranda fireye neden olur (Anar, 2012; Gökalp vd., 2004). Ayrıca, yaşlı ve zayıf öküz (4 yaşından büyük kısırlaştırılmış erkek sığır) ve dişi manda etlerinin pastırmanın sert yapılı olmasına neden olduklarından dolayı üretimde kullanılmaları tercih edilmez (Tekinşen ve Doğruer, 2000). Pastırma üretiminde kullanılacak hayvanların %55 randımanı mutlaka aşmaları ve %62'lere kadar ulaşması beklenir (Gökalp vd., 2004). Aşırı derece besili ve yağlı hayvanların etleri ise pastırmanın yağlı olmasına neden olacakları için tercih edilmez (Anar, 2012; Tekinşen ve Doğruer, 2000). Hayvanın besisiz olması durumunda ise etler kurutulma ve baskılama safhalarında aşırı derecede büzülme, kıvrılmakta ve incelmektedir.

1.5.2. Hayvan Kesimi ve Yüzüm İşlemi

Pastırma üretiminde kullanılacak etin hazırlanmasının ilk aşamasında hayvanın kesilmesi ve yüzülmesi işlemleri vardır (Anar, 2012; Tekinşen ve Doğruer, 2000). Hayvan kesilmeden önce mutlaka dinlendirilmelidir. Çünkü yorgun veya stresli kesilen hayvanların kanları tam anlamıyla akamaz veya etlerinde postmortem (ölüm sonrası) değişiklikler (örn., pH'nın 7,4'ten 5,4'e kadar düşmesi) tercih edilen düzeyde oluşmaz. Bu nedenle böyle etlerden yapılan pastırmalarda kalite bakımından çeşitli kusurlar çıkar ve ürünün raf ömrü kısalmır. Kesimden önce hayvanlara yem verilmesi et kalitesini olumsuz olarak etkileyeceğinden, kesilecek hayvanlar yaz aylarında 8, kış aylarında ise 12 saat dinlendirilmelidir. Bu nedenle hayvanların kesimden önce 8 saat içinde yem almaları önlenmeli, sadece su tüketmelerine izin verilmelidir (Tekinşen ve Doğruer, 2000).

Pastırmalık etler klasik yöntemlerle kesilmesine rağmen, geleneksel üretimde bazı özel uygulamalar kullanılmaktadır. Hayvan kesimine genelde sabahın erken saatlerinde başlanır ve 20-30 başlık partiler halinde kesim yapılır. Kaliteli pastırma üretimi için kanının iyice akıtılması gerektiğinden hayvanın omuriliği (*M. oblangata*) hemen kesilmeyip hayvanın daha geç ölmesi sağlanır. Bu suretle omuriliği hemen kesilmeyen hayvan daha çok çırpırır bu da kanın daha kolay akmasını ve ATP'nin harcanmasını hızlandırır. Sonuç olarak kas rigor motrise daha çabuk girerek kaslar sertleşir. Kasların sertleşmesiyle birlikte karkasın parçalanması, kemiklerin sıyrılması ve kasların ayrılması kolayca yapılabilir. Bu durum kasların zedelenmeden bütün halde çıkarılmasına yardımcı olur (Anar, 2012; Gökalp vd., 2004). Eğer rigor mortis şekillenmeden kesim işlemine geçilirse etler yumuşak olacağından kemiklerle olan bağlantı yerlerinden kolay ayrılamaz ve dolayısıyla düzgün bir şekilde kesilemez (Tekinşen ve Doğruer, 2000).

1.5.3. Karkas Parçalama

Olgunlaşan ette parçalama işlemine geçilir. Parçalama işlemi kol, döş, sırt ve butun çıkarılması şeklinde yapılır. Parçalama işlemi ile birlikte bir karkastan iki kol, iki sırt, iki döş, ve iki but olarak toplamda 8 parça elde edilmiş olur. Ardından çengellere asılan parça etler dinlendirilir (5-8 saat) ve söküme hazır hale getirilmiş olur (Anar, 2012; Gökalp vd., 2004; Tekinşen ve Doğruer, 2000). Kesim için keskin bıçaklar, kemikli bölgelerin kesim ve ayrımı için ise uygun elektrikli testereler tercih edilmelidir (Gökalp vd., 2004).

1.5.4. Söküm

Pastırma yapılacak etlerin blok şeklinde kemiklerden çıkarılmasına söküm denir. Söküm parçalamadan sonra elde edilip dinlendirilen kol, döş, sırt ve but parçalarına yapılır. Bu işleme genelde parçalamadan 2-4 saat sonra başlanır. Bunun sebebi etlerin soğumasını ve rigor mortis safhasını geçirmesini beklemektir. Böylelikle söküm işlemi çok daha kolay gerçekleştirilir. Söküm aşaması sıcak havalarda 4-5 saat sürerken soğuk havalarda 2-3 saat sürmektedir. Söküm işlemi bilgelik ve ustalık gerektirir, anatomik bilgi uygulanarak kasların tam çıkarılması hedeflenir (Anar, 2012; Gökalp vd., 2004; Tekinşen ve Doğruer, 2000).

1.5.5. Ayrım (Açım)

Söküm işleminden sonra elde edilen et parçaları 8-9 saat serin ve hava akımı olan bir yerde dinlendirildikten sonra bu parçalara pastırma şeklini vermek için fasia (kasın yüzeyi), tendon (kasın uç bölgesi), ligament (kasın kemiğe bağlandığı bölge), lenf yumruları (beze, çöz) ve fazla yağların ayıklaması işlemine açım, ayırım veya biçim adı verilir. Söküm işlemi sırasında mehle, kuşgözü ve kelle pastırmalarının yapımında kullanacaklar etler son biçimlerini aldıkları için ayırım işlemine dahil edilmezler. Diğer et parçaları ise açım işlemiyle son şekillerine kavuşurlar (Anar, 2012; Tekinşen ve Doğruer, 2000).

Ayrım işlemiyle birlikte karkastan 20 farklı pastırma elde edilebilmektedir. Ancak son yıllarda tüketicilerin özellikle kaliteli pastırmalara ilgi göstermeleri ve ekonomik sebeplerden dolayı artık sadece kelle, etek, kanlı bez, bacak ve kavram kısımlarından pastırma üretimi yapılmamaktadır. Bu işlem sonunda bir karkastan yapılan pastırma çeşitlerinin elde edildiği yerler ve isimleri Tablo 1.4'te ve bunların şematize edilmiş hali Şekil 1.16'da verilmiştir.

Tablo 1.4: Bir Karkastan Elde Edilen Pastırma Çeşitlerinin Elde Edildiği Kısımlar ve Adları

(Doğruer, 1992)

Bölge	Pastırma Çeşidi
Kol	Omuz, bez (orta bez, kanlı bez), bacak, kürek
But	Kuşgözü*, bohça, kapak, kenar, dilme, şekerpare
Sırt	Mehle, tütünlük, sırt, akrabaş, etek (orta etek, kenar etek)
Döş	Döş, meme, kavram

*Kuşgözü (bonfile) pastırma üretiminde karkas parçalanırken butla birlikte çıkarılmaktadır.

Tüm parçalar iki yarım karkastan simetrik olarak ikili şekilde elde edilmektedir (Gökcalp vd., 2004).

1.5.6. Pastırmalık Parçaların Tuzlanması

Pastırmalık etlerin hazırlanması işleminden sonra bu et parçalarına çemenleme işlemine kadar bir dizi işlem uygulanır. Ayrım işleminden sonra etlerin askılanabilmesi için kalın uçlarından delinerek uygun ipler geçirilir ve tuzlama safhasına geçirilir (Anar, 2012; Gökalp vd., 2004). Tuzlama safhasıyla ete lezzet verilmesinin yanı sıra birçok mikroorganizmanın gelişme oranı önemli düzeyde engellenir. Tuzun buradaki görevi serbest (kullanılabilir) suyu bağlayarak mikroorganizmaların faaliyetlerini sınırlandırmaktır (Tekinşen ve Doğruer, 2000). Ayrıca tuz, et proteinlerinde çözünürlüğü artırarak lezzetin oluşmasında etkili olmaktadır. Tuzun bilinen bakteriostatik etkisi yüksek tuz konsantrasyonlarında artış göstermektedir (Uğuz, 2007). Pastırma üretiminde kullanılacak tuz, göl tuzu olmamalıdır onun yerine sodyum klorür miktarı fazla olduğu için kaya tuzu olmalıdır. Bu özelliği nedeniyle kaya tuzu pastırmalık etlerin istenilen düzeyde sertleşmesini sağlar (Tekinşen ve Doğruer, 2000).

Tuzlama işleminden önce tuzun iyice işlemesi ve etin su kaybını kolaylaştırmak amacıyla etlerin üzerine belirli aralıklarla ince bıçak yaraları (şaklar) açılır. Bu işlem “şaklama” olarak adlandırılır. Bu işlem etin tek bir yüzeyine olacak şekilde, et kalınlığının yarısına kadar ve kas liflerine paralel olarak gerçekleştirilir. Şaklama işleminde bıçak et yüzeyine 45°'lik bir açıyla tutulur, parçanın büyüklüğüne göre 5-8 kesik olacak şekilde kesik atılır. Bu hususlar etin fazla parçalanmasını ve istenilenden fazla tuz emmesini engellediği için oldukça önemlidir (Anar, 2012; Tekinşen ve Doğruer, 2000). Tercihen farklı çeşit pastırmalık etler kendi içerisinde tuzlanır (Gökalp vd., 2004). Bıçak yaralarının içerisine parmaklar yardımıyla tuz doldurularak tuzun ete iyi işlemesi sağlanır. Tuzlanan etler hafifçe silkelenerek fazla tuzdan arındırılır. Daha sonra bu et parçaları bıçak kesitleri üste gelecek şekilde, zeminden yüksek bir yerde (20-25cm), dikdörtgen şeklinde, bir sıra enlemesine bir sıra da boylamasına olacak şekilde üst üste istiflenirler. İstif yüksekliğinin 1m'den yüksek olması durumunda alttaki etlerde ezilmeler meydana gelebilir. Bu aşamadan sonra pastırma üretiminde bu et parçalarına tuzlu adı verilmektedir. Tuzlular bu şekilde normal ve sıcak havalarda 24-36 saat bekletilirken soğuk havalarda ise 24-48 saat bekletilirler (Anar, 2012; Gökalp vd., 2004; Tekinşen ve Doğruer, 2000).

Birinci tuzlama sonunda tuzlular en üstteki parçalar en alta, en alttaki parçalar da en üste gelecek şekilde ters-yüz edilerek istiflenir ve bu işlem “döndürme” olarak tabir edilir. Bu işlem yapılırken bir miktar daha tuzun etin yaralı yüzeyine serpilmesi önerilir. İkinci tuzlama olarak adlandırılan bu işlemin amacı etlerin tuz almayan yerlerinin tuzlanması ve etin kanlı suyunun bir miktar uzaklaştırılmasıdır. İkinci tuzlama süresinin (12 saat) birinci tuzlama süresinden daha az olmasının nedeni ise pastırmanın istenilenden fazla tuzlu olmasını engellemektir (Anar, 2012; Gökalp vd., 2004; Tekinşen ve Doğruer, 2000).

1.5.7. Yıkama

İki kez tuzlama işlemi uygulanan etler içi kaliteli su ile dolu olan ve sürekli akan su bulunan, su sirkülasyonu sağlanan birinci teknede iplerinden tutularak sert hareketlerle sağa sola sallanır. Aynı işlem, aynı koşulları barındıran ikinci bir su teknesinde tekrarlanır. Yıkama işlemi ile birlikte etlerdeki fazla tuz ve eğer kontamine olduysalar katı kirlere uzaklaştırılmış olur (Anar, 2012; Gökalp vd., 2004; Tekinşen ve Doğruer, 2000).

1.5.8. Birinci Kurutma ve Soğuk Denkleme

Yıkama işleminden sonra tuzlular, yerden 175-180 cm yükseklikte ve birbirlerinden 1 metre uzaklıkta, çereklere (pastırmalık parçaların kurumaları için asıldıkları ahşap veya paslanmaz madeni askılar) pastırma sıcaklarında 2-3 gün, soğuk mevsimlerde ise 10-15 gün kadar asılırlar (Anar, 2012; Tekinşen ve Doğruer, 2000). Kurutma süresinin bağlı olduğu kriterler şunlardır (Tekinşen ve Doğruer, 2000).

- Havanın sıcaklığı,
- Rutubet,
- Rüzgar durumu,
- Pastırmalık etlerin büyüklüğü,
- Sık veya seyrek asılmaları,
- Etlerin üzerindeki şak sayısı.

Eğer kurutma aşaması klimalı odalarda olacak ise, odaların sıcaklığı 24-27°C'ye, rutubeti %55-60 arasına, hava sirkülasyonu ise 15-30 m/dk olarak ayarlanmalıdır

(Anar, 2012). Bu işlemin yeterliği için somut bir kriter olmamakla birlikte, pastırmalık et baş ve işaret parmağı arasında sıkıştırılır. Eğer kurutma işlemi tam anlamıyla gerçekleştirildiyse bu aşamada ette yumuşak bir kabuk ve kendine has bir koku oluşur. Ayrıca etin rengi değişerek koyu kırmızı bir renk alır (Tekinşen ve Doğruer, 2000). Bu aşama “birinci kurutma” olarak adlandırılır (Anar, 2012).

Kuruma işlemini bitiren tuzlular, tam olarak soğuduktan sonra, asılı oldukları çereklere alınarak birinci denkleme alınır, bu işlem aynı zamanda “soğuk denkleme” olarak bilinmektedir. Geleneksel olarak denkleme işlemi yerden 75-100 cm yükseklikte, dikdörtgen biçimde beton, mozaikten yapılmış özel yer, fayans ya da paslanmaz çelik olan bir zemin üzerine etlerin bir sıra enine bir sıra boyuna olacak şekilde yerleştirilmesiyle yapılır. Üzerine tüm etleri kaplayacak büyüklükte bir tahta konular ve tahta üzerinden boyunduruk direği geçirilir. Direğin bir ucu duvara gömülür ya da duvara tutturulmuş demir bir merdivenin basamak aralıklarına yerleştirilerek sabitlenir. Direğin diğer ucuna ise 50 kg ağırlık bağlanır. Denkleme süresi parça etlerin boyut ve ağırlığına göre değişir; parça etlerden küçük ve hafif olanlar bu şekilde yapılan bir baskı altında 6 saat, büyük ve ağır parçalar ise 8-12 saat denkleme işlemine tabi tutulur (Ekmekçi, 2012).

Denkleme işlemi için günümüzde modern işletmelerde hidrolik presler kullanılmaktadır. Soğuk denkleme işlemiyle birlikte tuzlu etler bir miktar daha su kaybeder, yassılaştır ve üzerindeki şaklar kapanır. Burada amaç pastırmalık etlerdeki serbest suyun uzaklaştırılmasıdır (Anar, 2012; Tekinşen ve Doğruer, 2000).

1.5.9. İkinci Kurutma ve Sıcak Denkleme

Soğuk denklemeden çıkan etlerin yüzeyi ıslaktır bu nedenle ikinci kurutma için açık havada güneş alan, hava akımı olmayan yerlerde askılara asılır (Anar, 2012; Tekinşen ve Doğruer, 2000). Eğer hava akımına izin verilirse yağ yüzeyler aşırı kuruyabilir bu nedenle bu yerin etrafı yelken beziyle örtülür (Tekinşen ve Doğruer, 2000). Bu kurutma işlemi açık ve güneşli havalarda 1-3 gün sürerken kapalı ve soğuk havalarda ise 10 güne kadar sürebilir. İkinci kurutma işlemiyle pastırmalık etlerin yüzeyinde bulunan yağ parçaları güneşin etkisiyle eriyerek yüzeyde yağ damlacıkları oluşturur. Bu olaya pastırma üretiminde “terleme” denir. Aynı zamanda eriyen yağların

donmasıyla pastırma yüzeyi matlaşarak beyaz-sarı bir hal alır. Bu olay pastırma ağarması olarak bilinir (Anar, 2012; Tekinşen ve Doğruer, 2000).

Terlemesi tamamlanan pastırmalar ikinci kez denkleme işlemine tabi tutulur. Bu aşamadaki pastırmalar sıcak ve terli olduklarından bu aşama pastırma üretiminden sıcak denkleme ya da terli denkleme olarak bilinir. Terli denkleme işlemi geleneksel pastırma üretiminde güneşin batışına yakın ve yağ sızıntılarının yoğun olduğu zamanda yapılır. Modern pastırma üretiminde ise hidrolitik sistemlerden faydalanılır. Terli denkleme işlemi pastırmalara 1-1,5 saat arası uygulanır ve terli etlerin sıcak ve yumuşak olmalarından dolayı etler kısa sürede yassılaşılarak pastırma şeklini alırlar. Bu sürenin aşılması durumunda sıcak nedeniyle pastırmada özellikle anaerobik istenmeyen bozucu mikroorganizmalar üreyebilir. Bu aşamada bir miktar daha su kaybedilmesinin yanısıra yağ sızıntıları etin içine nüfus ederek pastırmaya has lezzet ve tekstür kazanmasını sağlar (Tekinşen ve Doğruer, 2000).

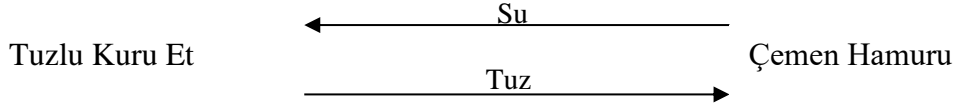
1.5.10. Üçüncü Kurutma

Sıcak denklemeden çıkarılan pastırmalar boyunduruklara (kuzey kısmı dışında diğer uç yanı ve üstü kapalı, güneşsiz ve hava akımsız ortam) asılır. Burada son kurutma işlemi uygulanan pastırmalar şekillerini kaybetmeksizin hava koşullarına bağlı olarak 3-7 gün bekletilirler. Pastırma üretiminde bu aşamaya kadar olan safha halk arasında pastırma yetirmesi olarak bilinir ve pastırmaya has özellikler önemli ölçüde bu aşamada kazandırılır. Pastırmalar olgunlaşır ve çemenleme işlemine hazır hale gelirler (Anar, 2012; Tekinşen ve Doğruer, 2000).

1.5.11. Çemenleme

Kurutma işleminden sonra pastırmaya, dış etkilere, özellikle kurtlanmaya ve mikrobiyal bozulmaya karşı korumak amacıyla bir soslama işlemi yapılır. Bu soslama işlemi aynı zamanda pastırmaya kendine has lezzetini, aromasını ve rengini kazandırır. Çemen hamurunun su oranı yüksek ve tuzsuz olduğu için tuzlu kuru et ve çemen hamuru arasında difüzyon olayı meydana gelerek pastırmada tuz-rutubet dengesi meydana gelir (Şekil 1.5) (Doğruer, 1998; Gökalp vd., 2004; Tekinşen ve Doğruer, 2000). Yetim ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptıkları çalışmanın sonucuna göre,

çemen pastası ve sarımsağın, test edilen üç patojenin büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiği ortaya konmuştur. Ayrıca genel olarak, çemen hamurunun inhibe edici etkisinin, sarımsak etkisinden daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu etki çemen bileşenlerinin sinerjik etkisine bağlanmıştır (Yetim vd., 2006). Böylece çemenin, pastırmanın raf ömrü üzerinde oldukça olumlu etkisi olduğunu söylenebilir.



Şekil 1.4: Pastırma ve Çemen Hamuru Arasındaki Difüzyon

(Gökalp vd., 2004; Tekinşen ve Doğruer, 2000)

Çemen hamurunun pastırmaya sayılan bu yararları dışında;

- Pastırmayı dış etkenlere, bakterilere (içerisindeki sarımsağın bakterisit etkisi bulunmaktadır) ve haşerelere karşı ambalaj materyali gibi korumak,
- Pastırmanın gereğinden fazla kurumasını engellemek,
- Pastırmanın hava ile olan temasını önleyerek, bozulmasını, kokuşmasını veya küflenmesini geciktirmek ve pastırma yağlarının oksitlenerek acılaşmasına engel olmak gibi yararları vardır (Anar, 2012; Yıldırım, 1996).

a) Çemeni Oluşturan Unsurlar

Çemenin bileşimine yaygın olarak sadece buy otu tohumu unu, sarımsak, kırmızı biber ve su girerken, bazı özel olarak hazırlanan pastırma çemenlerine daha iyi çeşni verebilmek amacıyla kimyon, karabiber, karanfil, ve tarçın gibi baharatlardan düşük oranlarda kullanılabilir (Tekinşen ve Doğruer, 2000).

- **Buy Otu:** Buy otu (*Trigonella foenum-graecum* L.), *Leguminosae* familyasından olan bir bitkidir. Kökeni Akdeniz'in doğusunda bulunan bölgelerdir. Uzun yıllardır hem insan hem de veterinerlikte tıbbi olarak, mutfakta ise baharat olarak (gıda) kullanılmıştır (Billaud ve Adrian, 2001). İçerdiği başlıca bileşikler şunlardır; kumarin, kolin, galaktomannan, nikotin

amid, fitosterol, flavonit, foenugraesin ve alkaloid olan trigonellin (Tekinşen ve Doğruer, 2000).

- **Sarımsak:** Sarımsak (*Allium sativum* L.) *Liliaceae* familyasında yer alan bir bitkidir. Asıl kökeni Orta ve Batı Asya'dır. Türkiye'de başta Kastamonu olmak üzere yaygın olarak yetiştirilen bir bitkidir. Sarımsakta bulunan en önemli maddeler; alliin (%0,2-1,0) ve allisin'dir (Tekinşen ve Doğruer, 2000).
- **Kırmızı Biber:** Acı kırmızı biber *Solanaceae* familyasından olan *Capsicum fretescens* L., *C. minimum* Mill., *C. baccatum* L. ve *C. annuum* L. var. *longum* Sendf türlerinin meyve kısımlarından elde edilir. Acı tadı içerisindeki kapsaisin, dihidrokapseisin, norhidrokapseisin, homodihidrokapseisin ve homokapsaisin'den ibaret kapsaisinoit bileşiklerinden dolayıdır (Tekinşen ve Doğruer, 2000). Tatlı kırmızıbiber ise *Solanaceae* familyasındaki *Capaicum annuum* L. bitkisinin meyve kısımlarından elde edilir. Genellikle renk vermek amacıyla kullanılır. Renk özelliği çok sayıda karotenoid pigmentine sahip olmasındandır (Tekinşen ve Doğruer, 2000).

b) Çemen Hamurunun Hazırlanması

Hazırlanacak çemen hamurunun miktarı kesilen hayvanın sayısına göre düzenlenmektedir. Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliği'nin 4. maddesinin c bendine göre çemenleme, pastırma üretiminde, buy otu tohumu unu, toz kırmızıbiber ve sarımsak karışımının tuz ve su ile karıştırılıp hamur haline getirildikten sonra ürünün dış yüzeyinin kaplanması işlemini ifade eder. Çemenin bileşiminde bulunan buy otu tohumu unu, acı kırmızıbiber ve sarımsak karıştırılarak su ile birlikte yoğurulur (Anar, 2012; Tekinşen ve Doğruer, 2000; Yıldırım, 1996). Buy otu ununun yapıştırıcı özelliği olduğundan bir kılıf görevi üstlenir (Yıldırım, 1996). Çemen hamuru içerisindeki unsurlar üreticiye göre değişmekle birlikte bazı araştırmacılar tarafından bildirilen çeşitli çemen hamuru bileşimleri Tablo 1.5'de verilmiştir.

Tablo 1.5: Pastırma Üretiminde Çeşitli Araştırmacılar Tarafından Bildirilen Çemen Hamuru Bileşimler

Su	Buy Otu Tohumu Unu	Sarımsak	Kırmızı Biber	Diğer Maddeler	Kaynak
%37,9	%21,3	%34,3	%6,5		Berkmen (1940)
%65,6	%16,4	%13,1	%4,9		Karasoy (1952)
%39,2	%39,2	%17,6	%3,9	%0,006 ^a	Özeren (1980)
-	%40	%30	%20	%10,1 ^b	Kök (1985)
%37,0	%20,0	%35	%6	%2,0 ^c	Leistner (1987)
%48,0	%37,0	%10	%4	1,003 ^d	Anıl (1988)
%50	%15	%20	%15		Doğruer vd., (1998)
%54,54	%22,7	%15,91	%6,81		Aksu ve Kaya (2005)
%41,8	%29,1	%20,4	%8,7		Yetim vd., (2006)
%54,54	%18,2	%16,4	%10,9		Kaban (2009)
%55	%12	%20	%13		Ahhmed vd., (2013)
-	%50	%35	%15		Deniz vd., (2016)*

* Kuru madde üzerinden

a: Boya maddesi

b: Burçak unu (%7,5) + buğday unu (%2,5) + boya (%0,1)

c: Kimyon (%1,0) + hardal (%1,0)

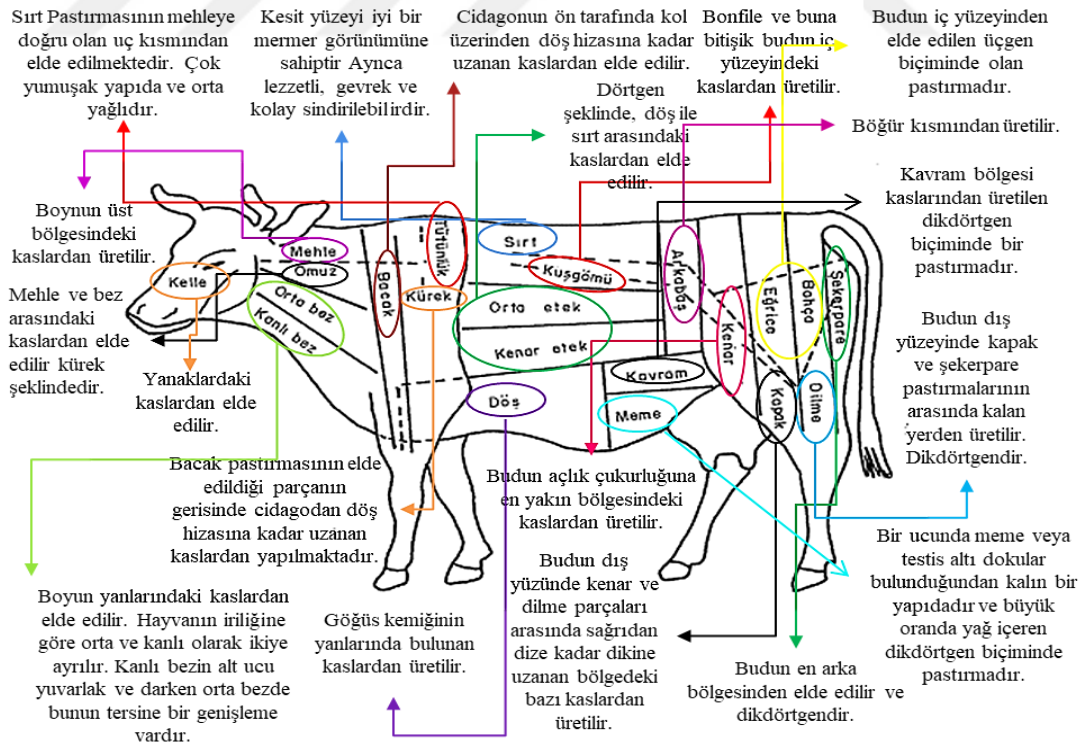
d: Tarçın + karanfil + kimyon + boya.

Pastırmalar çemenleme işlemine tabi tutulmadan öncesinde varsa üzerlerindeki çıkıntılar ve fazlalıklar bıçakla tıraşlanarak düzeltilir (Tekinşen ve Doğruer, 2000). Daha sonra bir tekne içerisinde bulunan çemen hamuru bu pastırmaların üzerine sürülür ve pastırmalar istiflenerek çemende 16-36 saat kadar bekletilir. Bu işlem pastırma üretiminde “çemende yatırma” olarak adlandırılır (Anar, 2012). Bu sürenin uzun olması pastırmanın daha iyi lezzet, yapı ve kalitede olmasını sağlar. Çemene yatırma işleminin yapıldığı yerin sıcaklığı düşük olmazsa (10°C) çemen hamuru bozulabilir. Bu nedenle bu detaya dikkat edilmelidir (Tekinşen ve Doğruer, 2000). Çemenin fazlasının el ile silinerek alınması ise pastırmacılıkta “silme” olarak bilinir (Anar, 2012). Pastırmanın üzerindeki çemen hamurunun kalınlığı 1-6 mm arasında olmalıdır (Tekinşen ve Doğruer, 2000). Bu işlemden sonra pastırmalar tekrar çereklere asılırlar ve güneşli günlerde 1-2 gün, kapalı günlerde ise 6-7 gün süreyle kurumaya

bırakılırlar. Eğer kurutma işlemi klimalı odalarda gerçekleştirilecekse kurutma ortamı 18-20°C, %60-65 nispi rutubet ve 1.5 m/s hava sirkülasyonuna sahip olmalıdır. Pastırmalar böyle bir ortamda 24-36 saat kurutulmalıdır (Gökalp vd., 2004). Bu aşamadan sonra pastırmalar pazarlanmak amacıyla son aşama olan paketleme aşamasına alınır (Tekinşen ve Doğruer, 2000).

1.6. Pastırma Çeşitleri ve Özellikleri

Geçmişte bir karkastan 26 çeşit pastırma üretilirken günümüzde bu sayı tüketicinin kaliteli pastırma çeşitlerine yönelmesi ve tercih edilmeyen, ekonomik değeri düşük pastırmalık kasların diğer et ürünlerine işlenmesi nedeniyle azalmıştır (Çakıcı ve Aksu, 2012). Türk Standartları Enstitüsü “Pastırma Yapım Kuralları” (TS 9268) standardında bir sığır karkasından 16-20 çeşit pastırma üretilebileceği belirtilmiştir (Çakıcı ve Aksu, 2012). Bu pastırmaların isimleri ve çıkarıldığı bölgeler Şekil 1.6’da verilmiştir. Pastırmalar üretildikleri et parçalarının elde edildikleri hayvanın vücudunda buldukları yerlere göre çeşitlere, özelliklerine göre de farklı kalite sınıflarına ayrılırlar (Tablo 1.6) (Tekinşen ve Doğruer, 2000).



Şekil 1.5: Karkasın Çeşitli Kısımlarından Çeşitli Pastırma Parçalarının

İsimlendirilmesi ve Elde Edildikleri Bölgeler

(Çakıcı ve Aksu, 2012; Ekmekçi, 2012)

Tablo 1.6: Pastırmanın Kategorilere Ayrılmasında Dikkate Alınan Kalite Özellikleri

(Tekinşen ve Doğruer, 2000)

Özellik	I. Sınıf	II. Sınıf	III. Sınıf
Yağlılık	Az	Orta	Çok
Kas İçi Yağ Dağılımı	Oldukça Belirgin	Az Belirgin	Belirgin Değil
Renk	Pembe-kırmızı	Kırmızı-koyu kırmızı	Koyu Kırmızı
Kabuk Oluşumu	Yok	Görülebilir	Var
Kesit Yüzü	Parlak Kırmızı	Kırmızı	Koyu Kırmızı
Gevreklik	Gevrek	Orta Derecede	Sert
Kalınlık (Çemen) Dağılım	İyi (1-2 mm) Homojen	Orta (2-4 mm) Homojen değil	Kaba (>4 mm) Homojen değil

Türk Standartları Enstitüsü'nün pastırma standardı TS 1071'e göre pastırmalar, Tablo 1.7'de görüldüğü gibi üçe ayrılır. Pastırma çeşitlerinin elde edildikleri kaslar ve bu kasların yerleri hayvan üzerinde ayrıntılı bir şekilde Şekil 1.16'da gösterilmiştir.

Tablo 1.7: Pastırmanın Sınıflandırılması ve Çeşitleri

(Türk Standartları Enstitüsü TS 1071)

Sınıf	Çeşit
I.	Kuşgözü, sırt
II.	Bohça, kenar, şekerpare, but dilmesi, mehle, omuz, kürek, kapak
III.	Döş, orta ve kanlı bez, bacak, etek, kavram, meme

1.7. Pastırmanın Mikrobiyolojik Özellikleri

Türk Gıda Kodeksi Et Ürünleri Tebliği'nde ve TSE Pastırma Standardı'nda pastırma mikrobiyal özellikleri hakkında getirilen sınırlandırmalar ve sahip olması gereken mikrobiyolojik kalite kriterleri Tablo 1.8'de verilmiştir (Tekinşen ve Doğruer, 2000).

Tablo 1.8: Ülkemizde Pastırmanın Mikrobiyolojik Kalite Ölçütleri

(Tekinşen ve Doğruer, 2000)

Özellik	Gıda Kodeksi (kob/g)	Pastırma Standardı (kob/g)
Genel aerobik mezofilik bakteri**		10 ⁴ -10 ⁵
<i>Staphylococcus aureus</i> *	5x10 ² -5x10 ³	50-10 ²
<i>Salmonella</i>	25 g'da bulunmamalı	25 g'da bulunmamalı
<i>Escherichia coli</i>	Bulunmamalı	Bulunmamalı
<i>Clostridium perfringens</i> **	10-10 ²	10-10 ²
Maya-küf**	10-10 ²	10-10 ²

* Beş numuneden en fazla birinde kabul edilebilir.

** Beş numuneden en fazla ikisinde kabul edilebilir.

1.8. Pastırmanın Biyokimyasal Özellikleri

Kimyasal kalite bakımından Türk Gıda Kodeksi Et, Hazırlanmış Et Karışımları ve Et Ürünleri Tebliği'nin (Tebliğ No: 2018/52) 9. maddesinin c bendine göre pastırmada;

- Çemen hariç olmak üzere, nem miktarı kütlece en çok %50,
- pH değeri en yüksek 6.0,
- Çemen hariç olmak üzere, tuz miktarı kuru maddede kütlece en çok%10,
- Çemen miktarı kütlece en çok %10 olmalıdır.

1.9. Mikroorganizmaların Tanımlama Yöntemleri

Moleküler tanımlama yöntemleri, ilerlemekte olan teknolojinin mikrobiyoloji alanında sunduğu en önemli yeniliklerdendir (Çetinkaya ve Ayhan, 2012). Mikrobiyoloji uygulamalarında önemli bir yere sahip olan bu hızlı yöntemler klinik, gıda ve çevresel örneklerde bulunan patojen mikroorganizmalar ve onların metabolitlerinin erken tespiti, izolasyonu, identifikasyonu ve sayımı amacıyla kullanılmaktadır (Aras, 2011). Moleküler tanımlama yöntemlerine yenilerinin eklenmesi, farklı amaçlarla yürütülen bilimsel çalışmalara büyük fayda sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarda en çok kullanılan moleküler tanımlama yöntemleri; PFGE (Darbeli Alan Jel Elektrofrezisi), PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ve 16S rDNA dizilim analizi olarak sayılabilir ve

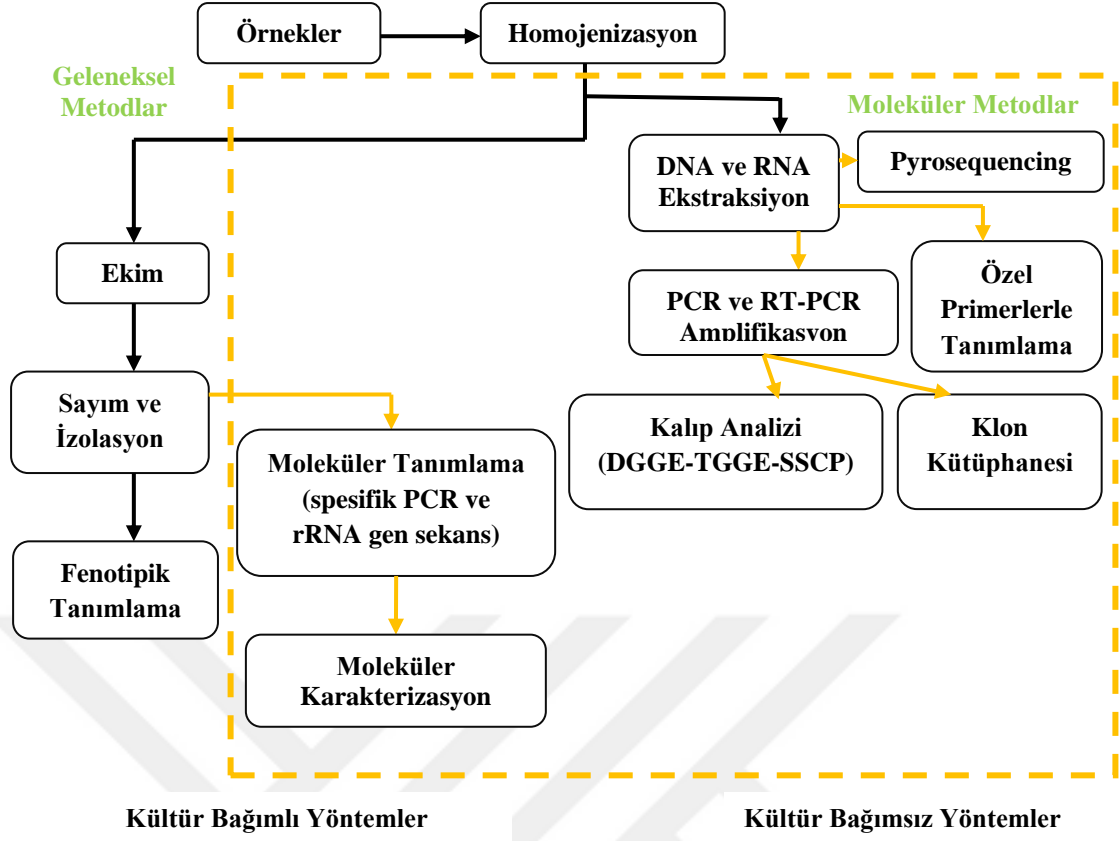
bunlara gün geçtikçe yeni moleküler teknikler içeren çalışmalar eklenmektedir (Çetinkaya ve Ayhan, 2012). İdeal bir tanımlama sisteminde olması gereken özellikler;

- Ayrım gücünün yüksek olması,
- Belli bir zaman sonra ve farklı merkezlerde elde edilen sonuçların ‘tekrarlanabilirlik’ bakımından başarılı sonuç vermesi,
- Laboratuvar koleksiyonlarına ilaveten doğal izolatlara kolay bir şekilde uygulanabilir olması,
- Hızlı olması,
- Bilgisayara bağlı analiz ve elektronik veri tabanı ile uyumlu olması,
- Çok karmaşık veya pahalı olmaması şeklinde sıralanabilir (Kıran ve Osmanoğlu, 2011).

Mikrobiyota çalışmalarında kullanılan mikrobiyolojik tanımlama yöntemlerinin tarihsel gelişimine bakıldığında bunların temel olarak kültür-temelli yöntemler ve kültür-bağımsız yöntemler olarak iki gruba ayrıldığı görülmektedir (Şekil 1.7) (Gürsoy ve Otlu, 2017).

Kültür temelli yöntemlerde, organizmanın seçilerek üretilmesini sağlayan bir takım özel kültür ortamlarına ekilmesini takiben fenotipik ya da moleküler yöntemlerle tanımlama yapılır. Fenotipik yöntemler, Gram boyama gibi fizyolojik özelliklerinin hedef alındığı boyama yöntemlerini, morfolojik koloni özelliklerinin belirlenmesini, farklı kültür ortamlarında üreme özelliklerinin incelenmesini veya organizmanın oluşturduğu veya tükettiği metabolit özelliklerine bakılmasını gerektirir. Moleküler yöntemlerde ise DNA izolasyonunu takiben moleküler bir tanımlama metodu uygulanır (Gürsoy ve Otlu, 2017).

Tek tek kültüre edilen mikroorganizmalardan ziyade direk örnekten izole edilen DNA'nın analiz edildiği kültür-bağımsız teknikler ise bize mikrobiyal toplulukların daha derin bir şekilde araştırılmasına imkan sağlamaktadır (Gürsoy ve Otlu, 2017). Fakat bu yöntem kültüre dayalı yöntemlere oranla daha maliyetli olabilir ve detaylı biyoinformatik analiz gerektirebilir.



Şekil 1.6: Fermente Gıda Ekolojisinin Araştırılmasında Kullanılan Geleneksel ve Moleküler Yaklaşımların Şematik Gösterimi (Toldrá ve Hui, 2015)

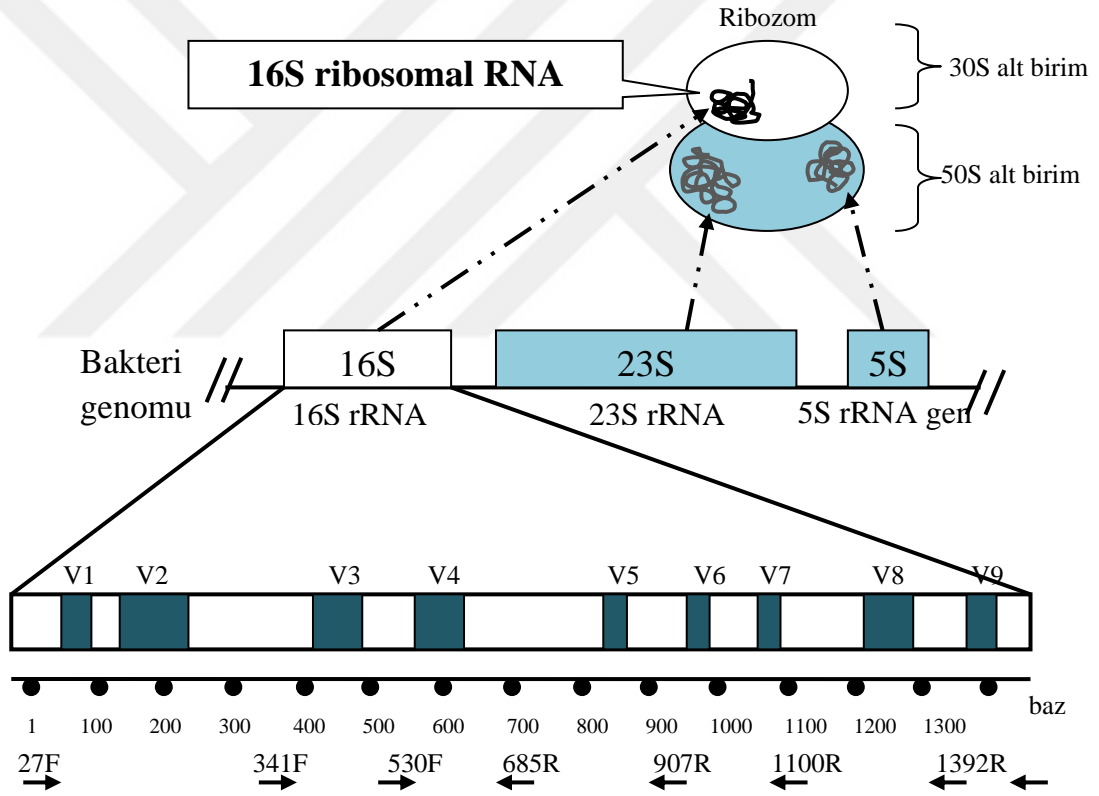
Moleküler yöntemler bakteri izolatlarını cins, tür, alttür ve suş düzeyinde kategorize etmeyi, tanımlamayı ve karakterize etmeyi amaçlamaktadır. Her yöntemin uygulanış biçimleri, tekrar edilebilirlik, materyal gereksinimi ve sonuca ulaşmadaki doğruluk seviyeleri bakımından avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Fakat genellikle, son yıllarda tercih edilmeye başlanan DNA'ya dayalı moleküler yöntemler son derece güvenilir, basit ve pahalı olmayan tanımlama ve sınıflandırma metodları olarak yorumlanmaktadır (Yılmaz ve Temiz, 2003).

1.9.1. Barkodlama

İlk kez Hebert vd., (2003) tarafından kullanılan bir kavram olan “DNA barkot” kavramı daha sonraları bilim dünyasının ilgisini çekmeyi başarmıştır. DNA barkotları (DNA taksonomi), biyolojik çeşitliliğin ve türlerin saptanmasında standart DNA bölgelerinin kullanılmasına yönelik yeni ve yararlı bir yöntem olarak açığa çıkmıştır (Filiz ve Koç, 2012). Bakteriyolojide, taksonların sekans verileri kullanılarak

tanımlanabileceği kabul edilmektedir ve sekans farkına dayalı takson (tür) tanımlamak için temel kurallar geliştirilmektedir. Bu şekilde tanımlanan taksonlara "filotipler" veya "moleküler operasyonel taksonomik birimler" adı verilmiştir (Blaxter, 2003). Hebert ve arkadaşları tüm hayvan taksonlarının tanımlanması için bir DNA barkod veritabanı oluşturulmasını önermişlerdir (Hebert vd., 2003). Bakteri türlerini moleküler tabanlı tekniklerle tespit etmek çok önemlidir, çünkü bu teknikler nükleotid asitlerin analizine dayanır ve tekrarlanabilir. Ayrıca, alan son yıllarda önemli ölçüde ilerlemiş ve bakterilerin DNA barkodu olarak belirli bir genom dizisine dayanan yeni kriterler kullanarak sınıflandırılmasını mümkün kılmıştır (Abdollahniya vd., 2018). Bakteri, arkea ve tek hücreli gibi en küçük organizmalar için gerçek çeşitliliğinin % 99'undan fazlası hakkında bilgisiz olabiliriz. Fakat çeşitliliğin geleneksel yöntemlerle kataloglanması mümkün değildir. Bunun yerine, gelişmekte olan teknolojiler bu iş için kullanılmalıdır. Hebert ve arkadaşlarının önerdiği barkod sistemi ile belirlenen spesifik bir DNA dizisi, süpermarketteki ürünlerin bir barkod ile tanımlanması gibi, bir organizmanın tanımlanması ve sınıflandırılması için kullanılabilir (Hebert vd., 2003). DNA barkot uygulamalarında, çeşitli canlılardan barkot dizileri elde edilerek bu DNA dizileri filogenetik ağaçların oluşturulmasında kullanılır (Filiz ve Koç, 2012). Bu yaklaşımın avantajlarından biri, ham verilerin -DNA dizisinin-veritabanlarında saklanabilmesi ve daha önce dizilenmiş gruplarla karşılaştırma ve yeniden analiz için internet üzerinden erişilebilmesidir. Ayrıca DNA barkodlama, genomun kısa, standart bir fragmanında sekans varyasyonunun karşılaştırmalı analizi yoluyla tür düzeyinde doğru tanımlama için hızlı ve uygun maliyetli bir yöntem sağlar (Shokralla vd., 2015). Hebert ve meslektaşlarının ilk çalışmalarında olduğu gibi, böyle bir programın ilk aşamalarında bilinen çeşitliliği temsil etmek ve barkodları biyolojiye bağlamak için tanımlanmış örnekler ihtiyacı duyulacaktır. Halka açık veritabanlarında: yaklaşık 12.000 COI (sitokrom c oksidaz) sekansı, 20.000'den fazla ribozomal RNA SSU (small subunit, küçük ünite) gen sekansı (tüm organizmalardan, örneğin, bakteriler için 16S) ve ITS (Internal Transcribed Spacer) sekansı gibi 50.000'den fazla potansiyel barkod sekansı zaten mevcuttur. Teknolojik ilerleme ve genom ölçeğinde sekanslama göz önüne alındığında, çok sayıda örnek için birkaç barkod geninin sekanslanması hızlı ve ucuz bir şekilde gerçekleştirilebilir (Blaxter, 2003).

Mikroorganizmaların PCR analizleri ile tespit edilmesi için, hedef bölgenin seçimi oldukça önemlidir (Aydın ve Sudağdan, 2016). 16S rRNA geni, bakteri ve arkea olmak üzere tüm prokaryotik hücrelerde bulunan 30S ribozomal alt biriminin rRNA molekülünü kodlar (Fukuda vd., 2016). Ribozom yapısının şeması ve 16S rRNA geninin şeması Şekil 1.18'de gösterilmektedir. 23S rRNA ve 5S rRNA, 50S ribozomal alt biriminde bulunan rRNA alt birimleridir (Fukuda vd., 2016). 16S gen bölgesinin hedef bölge olarak kabul edilmesi belirli özellikleri sebebiyledir (Aydın ve Sudağdan, 2016). İlk olarak, gen nispeten kısadır (yaklaşık 1.500 bp). İkincisi, 16S rRNA gen dizisinde çoğu bakteri arasında yaygın olan (korunmuş bölge) on dokuz bölge vardır ve dokuz farklı bölgeye (hiper değişken bölgeler) ayrılmıştır (Şekil 1.8). Üçüncüsü, ulusal veri tabanlarına kaydedilen gen dizileri önemli ölçüde artmaktadır, çünkü gen



dizisi bakteriyel taksonomik çalışmalarda tanımlama ve sınıflandırma için önemli bir bilgidir (Fukuda vd., 2016).

Şekil 1.7: Ribozom Kompleksi ve 16S rRNA Geninin Şeması

(Fukuda vd., 2016)

1.9.2. PCR (Polymerase Chain Reaction/ Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PCR yani polimeraz zincir reaksiyonunu, DNA replikasyonunun taklit edilmesi şeklinde tanımlayabiliriz (Okutucu ve Pehlivan, 2003). 1980'lerin başında ortaya çıkan PCR tekniği, mikrobik etkenlerin tespit edilmesinde vazgeçilmez bir yöntem haline gelmiş ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak bu teknikten faydalanılmıştır (Gürsoy ve Otlu, 2017). PCR işleminin tüp içerisinde hızlı ve art arda bir şekilde tekrarlanmasıyla ilk aşamadaki DNA miktarının milyonlarca artırılması mevzu bahistir (Okutucu ve Pehlivan, 2003).

PCR tekniğinin temel bileşenleri şu şekilde sıralanabilir (Çetinkaya ve Ayhan, 2012; Okutucu ve Pehlivan, 2003; Yılmaz ve Temiz, 2003);

Kalıp DNA: Amplifiye (çoğaltılacak) hedef DNA dizisini içeren genetik materyal.

Primer: 4-10 işaretlenmiş nükleotitten meydana gelen, kalıp DNA'yı çoğaltmak için kullanılan kısa ve tek sarmallı yaklaşık 20 bazlık sentetik DNA molekülleridir. Bunlar hedef DNA'ya özgü olduklarından tanıyıp ona bağlanırlar ve ortamdaki başka DNA'lar ile çapraz reaksiyon vermezler.

Polimeraz Enzimleri: Termotabil karakterli Taq DNA polimeraz enziminin görevi primerlere bağlanıp bunlara 3' ucundan nükleotidleri ekleyerek sentez yapmaktır.

Deoksinükleotit-Trifosfat (dNTP) Karışımı: dNTP'ler (ATP, GTP, TTP, CTP) Taq DNA polimerazın substratlarıdır ve DNA sarmalının tamamlanmasında kullanılırlar.

Mg⁺² iyonu: İşlemden kofaktör olarak oldukça önemlidir.

Tampon Maddeler ve Tuzlar: Bunlar polimeraz enzimlerinin çalışması için önemlidir.

PCR, basit, spesifik ve hassas bir yöntem olmasının yanı sıra temelde üç aşamadan oluşmaktadır (Çakır ve Çakmakçı, 2005; Çetinkaya ve Ayhan, 2012; Yılmaz ve Devran, 2003; Yılmaz ve Temiz, 2003);

DNA Zincirinin Açılması (Denaturation): Kalıp DNA molekülü, 1-2 dakika 92-95°C'ye maruz bırakılarak çift sarmal yapıdaki DNA iplikçikleri birbirlerinden ayrılarak denatüre edilir (Yılmaz ve Devran, 2003).

Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Yapışması (Annealing): Sıcaklığın, 37-65°C'ye düşürülerek oligonükleotid primerlerinin açılan DNA zincirlerinin kendi baz

dizilerine karşılık gelen bölgeye yapışması işlemidir ve üretilecek baz uzunluğuna bağlı olarak 30-60 saniye sürebilmektedir (Yılmaz ve Devran, 2003).

Primer Uzaması (Primer Extension): Bu aşama 72°C’de 1 dakika sürer çünkü Taq DNA polimeraz bu sıcaklıkta daha iyi çalışmaktadır. Bu döngü 30-35 defa tekrar ettirildikten sonra son aşamada polimerizasyonun tam olarak gerçekleşmesi için 5 dakika bekletme süresiyle reaksiyon sonlandırılır (Çakır ve Çakmakçı, 2005; Yılmaz ve Devran, 2003).

PCR işleminin kaç döngü sonunda bitirileceğini, oluşan DNA molekülü sayısı belirler. Yani örneğin “n” sayıda döngü varsa, ortamda maksimum “2ⁿ” sayıda çoğaltılmış DNA olması beklenir (Yılmaz ve Temiz, 2003).

PCR işleminin avantajları arasında, hızlı, özgül, az miktarda DNA içeren örneklerle bile uygulanabilir oluşu, geniş kullanım alanlarına sahip olması ve diğer metotlara kıyasla hata payı oranının düşük olması sayılabilir (Çetinkaya ve Ayhan, 2012; Yılmaz ve Devran, 2003). Cihaz ve malzeme gerektirmesi, deneyimli personel ihtiyacı ve ortamda bulunan istenmeyen DNA’nın primer ile aynı dizilime sahip olması riskiyle hatalı sonuçlar alınabilmesi, yöntemin en önemli dezavantajları arasındadır.

PCR işlemi sonunda elde edilen PCR ürünlerinin tanımlanmasında sıklıkla kullanılan yöntemler agaroz jel elektroforezi ve poliakrilamid jel elektroforezidir (Yılmaz ve Devran, 2003). Elde edilen bu ürünler agaroz jel kullanılarak elektroforezle ayrıştırılır ve DNA zincirleri etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışık kaynağında floresans ile gözlemlenir (Yılmaz ve Temiz, 2003). Böylece oluşan bantlar sayesinde hedef DNA’nın varlığı veya yokluğu tespit edilebilmektedir (Gürsoy ve Otlu, 2017). Agaroz jel elektroforezi, 100 baz çiftinden daha küçük DNA moleküllerinin ayrıştırılmasında yetersiz kaldığı için, bunların ayrımında genellikle poliakrilamid jel elektroforezi yöntemi kullanılmaktadır (Yılmaz ve Temiz, 2003).

1.9.3. GTG5 rep-PCR (Tekrarlayan element sekansı temelli polimeraz zincir reaksiyonu)

Versalovic vd., (1994) yaptıkları bir çalışmada bakteriyel parmak izi için bakteriyel genomların içinde bulunan ve “rep” olarak isimlendirilen tekrarlanan DNA elementlerinin PCR ile amplifikasyonundan elde edilen spesifik bantların

incelenmesine yönelik bir tiplendirme yöntemi tanımlamıştır (Versalovic vd., 1994; Kıran ve Osmanoglu, 2011). GTG5-PCR çoğu bakterinin genomunda birçok kopyasının doğal olarak bulunduğu, farklı şekilde amplifikasyona izin veren, serpiştirilmiş tekrarlayan sekanslarını temel alan ve oligonükleotit PCR primerleri kullanan bir genomik parmak izi tekniğidir. GTG5-PCR parmak izinin, çok çeşitli Gram-negatif ve birkaç Gram-pozitif cinsin sınıflandırılması için değerli bir araç olduğu düşünülmektedir (Masco, 2003). Bu tekniğin özellikle mikrobiyal çeşitlilik çalışmalarında yararlı olduğu kanıtlanmıştır (Kayaşlı, 2019).

Tekrarlayan element sekansı temelli polimeraz zincir reaksiyonu (rep-PCR) amplifikasyonu, basit bir PCR bazlı teknik olarak bilinmektedir ve aşağıdaki özelliklere sahiptir,

- Düşük maliyetli,
- Yüksek ayırt edici güçte
- Yüksek verim için uygun ve
- Çok çeşitli Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerin sınıflandırılması için güvenilir bir araç (Adıgüzel ve Atasever, 2009).

Tekniğin avantajları arasında uygulanmasının kolay olması, ayrıca hem çok sayıda hem de az sayıda örneğe uygulanabilir olması sayılabilir. Yöntemin en önemli dezavantajı ise elde edilen desenlerdeki yüksek değişimdir (Kıran ve Osmanoglu, 2011).

İKİNCİ BÖLÜM

MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

Çalışmada kullanılan pastırma örnekleri Danet Et ve Et Ürünleri Paz. Tic. Ltd. Şti. firmasından 2018 yılının Ekim ayında temin edilmiştir. Çalışmada sadece son ürün değil, tüm üretim sürecini takip etmek amacıyla sürecin önemli zamanlarından 4 örnek seçilmiştir. Bu doğrultuda seçilen 4 örnek, 2. tuzlamadan sonraki et, soğuk presleme sonrasındaki et, terlemeden çıkmış çemenleme öncesindeki et ve son ürün olarak seçilmiştir. Böylelikle üretim sürecinde meydana gelen mikrobiyal değişimlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Fabrikadan soğuk zincir ile laboratuvara gelen örnekler analizler için bekletilirken laboratuvar ortamında ışık almayacak şekilde 4°C'de 1 gün muhafaza edilmiştir. Seçilen bu 4 örneğin analizleri İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarında yürütülmüştür.

2.2. Metod

Yöntem genel olarak 4 değişik üretim aşamasından alınan pastırma numunelerinin temel kimyasal özelliklerinin (pH ve a_w) ve temel mikrobiyolojik özelliklerinin belirlenmesi ve izole edilen mikroorganizmaların moleküler yöntemlerle tanımlanmasını içermektedir.

2.2.1. Numune Hazırlama

Numunelerin hazırlanması amacıyla pastırma örneklerinden aseptik ortamda, steril bıçak ile 25'er g alınarak steril Stomacher poşetlerine tartılmış ve üzerine 225 mL fizyolojik tuzlu su (%0,85 NaCl) ilave edilmiştir (Hazar vd., 2017). Seaward

marka stomacher cihazının el kitabında yazan talimatlara göre homojenize edilmiştir (Anonim, Interscience, 400 P & Bag Mixer, Quick user guide).

2.2.1. Kimyasal Analizler

Hammadde temininden sonra ilk olarak kimyasal analizler uygulanmıştır. Bu analizler, mikrobiyal gelişmeleri son derece önemli derecede etkileyen pH ve su aktivitesi olarak seçilmiştir.

a) pH Değerinin Belirlenmesi

Örneklerde pH ölçümü yapılmadan önce pH metre, pH 4 ve pH 7 tampon çözeltileri ile kalibre edilmiştir (Öztürk, 2015). Pastırmanın üretim sürecinde alınan her örnekten 2'şer paralelli olmak üzere pH analizleri, pH metre cihazı (Hanna, HI 2211, ABD) ile belirlenmiştir.

b) Su Aktivitesinin Belirlenmesi

Numunelerin a_w değerleri ölçülürken her aşamadaki etten 2'şer paralelli olmak üzere, a_w cihazı (LabSwift a_w , Novasina) ile belirlenmiştir (Kaban, 2009). Numuneler 10 kuruş büyüklüğünde steril bıçak ile kesilerek cihaza yerleştirilmiş ve kullanma klavuzuna uygun olarak ölçüm yapılmıştır.

2.2.2. Temel Mikrobiyolojik Analizler

Mikrobiyolojik analizler için PCA (Plate Count Agar) (Biolife), MRS (De Man Rogosa Sharp) (Merck), VRBD (Violet Red Bile Dextrose Agar) (Merck) ve M17 (Biolife) besiyerleri kullanılmıştır (Tablo 2.1). Mikrobiyolojik analizlerde kullanılacak olan besiyerleri, VRBD hariç olmak üzere hazırlanma yönergelerine uygun olarak hazırlanmış ve 121°C'de 15 dak. otoklavlanarak (Selecta, Presoclave II, İngiltere) sterilizasyona tabi tutulmuştur (Yalanca, 2009). VRBD besiyeri ise manyetik ısıtıcılı karıştırıcıda kaynatılarak steril edilmiştir (Wisetir hotplate stirrer MSH-20A). Sterilizasyon sonunda bir süre soğumaya bırakılmıştır. Daha sonrasında aseptik ortamda steril petrilere aktarılmış ve oda sıcaklığında (20-25°C) katılaşıncaya kadar en az 4 saat beklenmiştir. Hazırlanan pastırma homojenizatlarından 1 mL alınarak içerisinde 9'ar mL fizyolojik peptonlu su bulunan tüplere aktarılmış, 10 sn. süreyle vortekslenmiş ve böylelikle 10^{-1} - 10^{-6} olarak seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Desimal seyreltmenin ardından 0,1 mL alınarak Drigalski ile yayma yöntemi ile ilgili petriye

ekim yapılmıştır. Her dilüsyondan 2'şer paralelli olacak şekilde çalışılmıştır. Ekim yapılan besiyerleri uygun sıcaklık ve sürelerde inkübasyona bırakılmıştır (Tablo 2.1). Süre sonunda kolonilerin sayımı yapılmıştır.

Tablo 2.1: Mikrobiyolojik Analizler İçin Kullanılan Besiyerleri, İnkübasyon Süre ve Sıcaklıkları

Analiz	Besiyeri	İnkübasyon Sıcaklığı	İnkübasyon Süresi	İnkübasyon Şartları	Kaynak
Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri (TMAB)	PCA	30°C	2 gün	Aerobik	(Bennani vd., 1995)
Laktik Asit Bakterileri (LAB)	MRS	30°C	2 gün	Anaerobik	(Öz, 2017)
<i>Enterobacteriaceae</i>	VRBD	30°C	2 gün	Aerobik	(Kaban, 2009)
M17 İzolatlar	M17	30°C	3 gün	Anaerobik	(Dinçer ve Kıvanç, 2012)

2.2.3. Mikroorganizmaların İzolasyonu

İnkübasyon süresi sonunda MRS, M17 ve VRBD besiyerlerinde farklı morfolojik özellik gösteren kolonilerin yeni besiyerlerine 3 çizgi ekim yöntemiyle ekilmiştir. Daha sonra tek koloniye düşürülerek mikroorganizma saflaştırılmıştır. Katı besiyerinde üremiş olan mikroorganizmalar buzdolabında (+4°C'de) haftada 1 kez yeni besiyerlerine aktararak muhafaza edilmiştir. Uzun süreli muhafaza veya sonraki çalışmalarda kullanılması için gliserol stok hazırlanmıştır. Bunun için, 10g/L Bacto yeast extract (Sigma-Aldrich), 20 g/L Bacto pepton (Merck), 20 g/L dekstroz (Sigma-Aldrich) homojen şekilde karıştırılarak karışımın %20'si kadar gliserol eklenmiştir. Bu karışım ve 1,5 mL'lik boş kriyo tüpler 121°C'de 15 dak. otoklavlanmıştır. Sterilizasyon süresi sonunda karışım kriyo tüplere aktarılmış ve soğumaya bırakılmıştır. Katı besiyerindeki izolatlardan steril öze ile bu tüplere ekim yapıldıktan sonra tüpler uygun inkübasyon sıcaklıklarında 1 gün bekletilmişlerdir. Üreme olan tüpler vorteksle 10 saniye karıştırıldıktan sonra -80°C dondurucuya konulmuştur.

2.2.4. Mikroorganizmaların Tanımlanması

İzolatların tanımlanması için önce DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, daha sonra rep-PCR uygulanmıştır. Agaroz jelde rep-PCR profilleri birbirine benzeyen izolatlar gruplandırılmış, her gruptan seçilen bir izolata 16S tanımlama PCR'ı yapılmıştır. PCR saflaştırma işleminden sonra örnekler, dizilimlerinin belirlenmesi için Medsantek laboratuvarına gönderilmiştir. Gelen dizi analizi sonuçlarına göre pastırma sürecindeki mikroorganizmalar belirlenmiştir.

a) DNA İzolasyonu

1.a) Laktik Asit Bakterileri ve M17 izolatları için DNA İzolasyonu

Laktik asit bakterilerine (MRS izolatlarına) ve M17 izolatlarına DNA izolasyonu Martín-Platero ve arkadaşlarının 2009 yılında çalıştığı metot ile gerçekleştirilmiştir (Martín-Platero vd., 2009). Laktik asit bakterileri için hazırlama talimatlarına uygun şekilde hazırlanan MRS Broth, M17 izolatlar için ise Nutrient Broth 10 mL olacak şekilde cam tüplere doldurulmuştur. Bu sıvı besiyeri dolu cam tüpler 121°C'de 15 dak. otoklavlanarak (Selecta, Presoclave II, İngiltere) sterilizasyona tabi tutulmuştur. Otoklavlanma süresi sonunda bir süre oda sıcaklığına gelmesi beklenen sıvı besiyerlerine daha önceden tek koloniye düşürülmüş bakterilerden steril öze yardımıyla alınarak 10 mL sıvı besiyerine ekimi yapılmıştır. Ekimler aseptik koşullarda, ateş yanında gerçekleştirilmiştir. Tüpler 30°C'de 1 gün inkübe edilmiş ve süre sonunda sıvı besiyeri vortekslenip 15 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Bu tüpler 13.000 rpm'de 5 dak. süreyle santrifüj (Hitachi, CR22N, Japonya) işlemine tabi tutulduktan sonra süpernatant atılmıştır. Tüplerde bulunan pelletler 1 mL 30 mM NaCl (Isolab)- 2 mM EDTA (Sigma) ile yıkanmıştır. Bu işlemden sonra tekrardan 13.000 rpm'de 5 dak. santrifüj edilip süpernatant tamamen dökülmüş ve geri kalan süpernatant pipet vasıtasıyla çekilip atılmıştır. Pellet 100 µL TES (25 mM Tris-HCl (pH:8)- 10 mM EDTA- %10 Sükroz) Buffer, 100 µL taze lizozim (10 µg/µL) (Thermo Scientific) ve 1 µL RNase (40 mg/mL) (Thermo Scientific) içerisinde çözülmüştür. Bu karışım vorteksledikten sonra pipet ile 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Bu tüpler Termomikserde (Hangzhou Miulab, MTH-100) 37°C'de 30 dak. inkübe edilip inkübasyon sonunda 600 µL lizis (100 mM EDTA- 100 mM Tris-HCl (pH:8)- 10 mM NaCl- %1'lik SDS çözeltisi) buffer eklenmiştir ve tüpler ters yüz edilerek

karıştırılmıştır. Bu işlemden sonra tüpler oda sıcaklığında (20-25°C) 15 dak. bekletilmiştir. Ardından 10 µL proteinaz K (600 u /mL, 20 mg/mL) (Thermo Scientific) eklenmiş ve tekrar oda sıcaklığında 15 dak. bekletilmiştir. Daha verimli bir lizis için termomikserde 80°C'de 5 dak. inkübe edilen örnekler sonrasında oda sıcaklığında 10 dak. daha bekletilmiştir. Tüplere süre sonunda 200 µL 3M sodyum asetat (pH: 5,2) (Sigma) eklenmiş ve tüpler ters yüz edilerek güzelce karıştırılmıştır. Daha sonrasında 15 dak. boyunca buzda bekletilmişlerdir. 13.000 rpm'de 5 dak. santrifüj (Beckman Coulter, Microfuge 20R) edildikten sonra süpernatant (~600 µL) steril 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Üzerine süpernatant ile aynı miktarda soğuk isopropanol (Sigma) eklenmiş ve tüpler ters yüz edilerek karıştırılmıştır. 13.000 rpm'de 10 dak. santrifüj edildikten sonra süpernatant dökülmüştür. Pelletin üzerine 1 mL %70 etanol (Merck) çözeltisi eklenip, tüp yere paralel şekilde tutularak hafifçe sallanmış ve böylelikle pelletin etanol çözeltisi ile yıkanması sağlanmıştır. Tüpler tekrardan 13.000 rpm'de 10 dak. santrifüj edildikten sonra süpernatant dökülmüştür. 13.000 rpm'de 5 dak. santrifüj edilmiş ve kalan süpernatant pipet ile çekilip atılmıştır. Tüpler hafif yatay konumlandırılarak kapakları açık bir şekilde içerisinde kalan alkolün uçması amacıyla oda sıcaklığında 10 dak. bekletilmiştir. Son olarak pellet 50 µL TE Buffer (Sigma) içerisinde hafifçe karıştırılarak çözülmüştür.

2.a) Enterobacteriaceae Grubu Bakterilerinde DNA İzolasyonu

Enterobacteriaceae grubu bakterilerinin DNA izolasyonu için ise Purelink Genomic DNA kitinin (Invitrogen) Gram (-) bakteriler için olan protokolü uygulanmıştır (Anonim, Invitrogen PureLink Genomic DNA Kits, User guide). Uygun olarak hazırlanan ve steril edilen Nutrient Broth'a ekim yapılan bakteriler 30°C'de 3 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda DNA izolasyonu için Purelink Genomic DNA kitinin (Invitrogen) Gram (-) bakteriler için olan protokolü uygulanmıştır. Bu protokole göre öncelikle üreme gerçekleşen sıvı besiyerleri vortekslenip 15 mL'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Bu tüpler 13.000 rpm'de 5 dak. süreyle santrifüj (Hitachi, CR22N, Japonya) işlemine tabi tutulduktan sonra süpernatant atılmıştır. Pelletin üzerine 180 µL Digestion buffer (Purelink) ve 20 µL proteinaz K (Thermo Scientific) eklenerek tüpler vortekslenmiştir. Bu tüpler Termomikserde (Miulab) 55°C'de 30 dak. inkübe edilip inkübasyon sonunda 1 µL

RNase (Thermo Scientific) eklenmiş ve vortekslenmiştir. Oda sıcaklığında (20-25°C) 2 dak. bekletildikten sonra içerisine 200 µL lysis/binding buffer eklenerek ve vortekslenmiştir. Ardından 200 µL %96-100 etanol (Merck) ilave edilip 5 sn. vortekslenmiştir. Bu karışım kit içerisinde bulunan kolonlara aktarılmıştır. Bu kolonlar 10.000 g'de 2 dak. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda kolonun süpernatant atılarak filtre kısımları yeni altlıklarla değiştirilmiştir. Kolona 500 µL içerisine etanol ilave edilmiş wash buffer 1 eklendikten sonra 10.000 g'de 1 dak. santrifüj edilerek süpernatant bulunan alt kısım tekrar temiz altlıklarla değiştirilmiştir. 500 µL etanol ilave edilmiş wash buffer 2 eklenip kolonlar maximum hızda 3 dak. santrifüj edilmiştir. Süre sonunda filtreler steril 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilmiştir. İçerisine 70 µL elution buffer eklenip 1 dak. oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi sonunda tüpler maximum hızda 1 dak. santrifüj edilmiştir.

Her iki DNA izolasyon yönteminden sonra elde edilen DNA numunelerinin saflığının ve nükleik asit konsantrasyonunun belirlenmesi için spektrofotometre (Shimadzu Biotech, Biospec Nano, ABD) cihazına izolattan 2 µL koyularak analize tabi tutulmuştur (Anonim, Shimadzu Spectrophotometer, Instruction manual). Her iki metodun son çözücüsü, cihazın kontrol analizi için kullanılmıştır. Örneklerin 260 nm/280 nm değerleri ölçülerek DNA konsantrasyonları ng/µL olarak belirlenmiştir.

b) PCR

1.b) GTG5 rep-PCR Analizi

İzole edilen DNA'da parmak izi analizi Rademaker ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2007) belirtilen rep-PCR tekniği ile gerçekleştirilmiştir. 200 µL'lik PCR tüplerine toplam hacim 25 µL (Versalovic vd., 1994; Masco, 2003) tarafından yapılan çalışmalarda belirtilen yöntem ile 25 µL hacminde gerçekleştirilmiştir) olacak şekilde Tablo 2.2'de verilen reaksiyon bileşimi hazırlanmıştır. Primer olarak GTG5 (Macrogen) (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') 10 µM olacak şekilde seyreltilerek kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak 1 adet PCR tüpüne DNA yerine ultra saf su konulmuştur. DNA amplifikasyonu Thermal Cycler (Bio-Rad, T100) cihazında 25 µL PCR karışımı içinde gerçekleştirilmiştir. PCR protokolü; 95°C'de 7 dakika ön denatürasyon basamağı ardından her biri kendi içerisinde 90°C'de 30 saniye

denatürasyon, 40°C’de 1 dakika primer bağlanması ve 65°C’de 8 dakika uzama basamaklarından oluşan toplam 30 döngüde gerçekleştirilmiştir. Son olarak 65°C’de 16 dakika ilave bir uzama basamağı yer almıştır. Ardından 4°C’ye soğutma adımı uygulanmıştır.

Tablo 2.2: GTG5 Reaksiyon Bileşimi ve Miktarları

Reaksiyon Bileşimi	Miktar (µL)
2,5 Mm dNTP Mix	2 µL
GTG-5 (Primer) (10 µmol)	2 µL
Taq DNA Polimeraz (5 u/µL, Thermo Scientific)	0,25 µL
10xDream Buffer (20 mM, Thermo Scientific)	2,5 µL
DNA (≈100 ng/µL)	1 µL
Distile Su	17,25 µL
Toplam Hacim	25 µL

2.b) Tanımlama PCR’ları

GTG5 rep-PCR ile gruplandırılan laktik asit bakterileri, M17 izolatları ve *Enterobacteriaceae* grubu bakterilerin tanımlanması için, her gruptan bir izolata uygulanan 16S PCR’larında kullanılan primerlerin özellikleri Tablo 2.3’te, kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 2.4’te ve PCR döngüleri Tablo 2.5’te verilmiştir. Bakterilerin tanımlanması için kullanılan 16S PCR’da primer olarak kullanılan 27F (Medsantek) ve 1492R (Medsantek) primerleri Frank vd., (2008) çalışmasından örnek alınarak kullanılmıştır.

Tablo 2.3: Kullanılan İleri ve Geri Primerler

	İLERİ PRİMER	GERİ PRİMER
16S PCR	27F (Macrogen) (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-30)	1492R (Macrogen) (50-GGTTACCTTGTTACGACTT-30)
rpoA	rpoA21F (Medsantek) (5'ATGATYGARTTTGAAAACC3')	rpoA23R (Medsantek) (5'ACHGTRTTRATDCCDGCRCG3')

Tablo 2.4: Tanımlama PCR’ında Kullanılan Bileşenler ve Miktarları

Bileşen	25 µL karışım miktarı	50 µL karışım miktarı
10 x Dream Buffer (20 mM, Thermo Scientific)	2,5 µL	5 µL
dNTP (2,5 mM)	2 µL	4 µL
Dream Taq (5 U/µL, Thermo Scientific)	0,25 µL	0,5 µL
Distile Su	17,25 µL	34,5 µL
DNA (≈100 ng/µL)	1 µL	2 µL
İleri Primer (10 µM)	1 µL	2 µL
Geri Primer (10 µM)	1 µL	2 µL

Tablo 2.5: 16S PCR Döngüleri

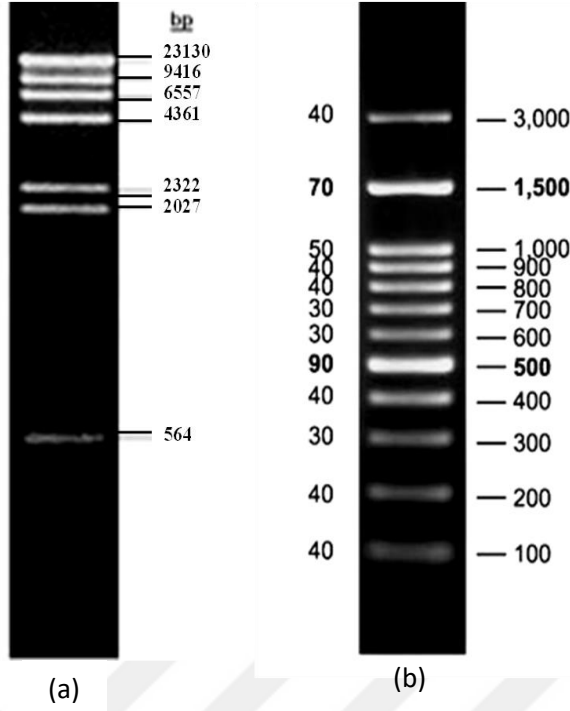
PCR AŞAMALARI	16S PCR DÖNGÜLERİ	
	Laktik Asit Bakterileri ve M17 izolatları	<i>Enterobacteriaceae</i> Grubu Bakteriler
İlk Denatürasyon	94°C – 1 dak.	94°C – 1 dak.
Denatürasyon	94°C – 30 sn.	94°C – 30 sn.
Primer Bağlanması	48°C – 30 sn.	50°C – 30 sn.
Uzama	72°C-1,5 dak.	72°C-1,5 dak.
Son Uzama	72°C – 10 dak.	72°C – 10 dak.
Döngü	34	34

c) Agaroz Jel Elektroforezi

Rep-PCR işlemi sayesinde çoğaltılan DNA bölgelerinin boyutlarına göre ayrılması ve tanımlama PCR’larının görüntülenmesi agaroz jel elektroforezinde (Bio-Rad, Ready Sub-Cell GT, ABD) gerçekleştirilmiştir (Lee vd. 2012; Helling, Goodman ve Boyer, 1974).. Rep-PCR sonuçlarını görüntülenmek için %1,5’luk, tanımlama PCR’ları için ise %0,8’lik agaroz (Sigma) konsantrasyonu içeren jeller kullanılmıştır (Cerit, 2003).

Bu amaçla hassas terazi ile 1,5 g veya 0,8 g olarak tartılan agaroz üzerine 50xTAE (Tris-EDTA-Asetik asit) (Bio-Rad)'den seyreltilerek hazırlanan 100 mL 1xTAE tampon çözeltisi ilave edilmiştir. Agaroz çözününceye kadar yaklaşık 2 dakika boyunca mikrodalga fırında ısıtılmıştır. Isıtma işleminden sonra jel el yakmayacak sıcaklığa kadar soğutmaya bırakılmıştır. Yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulan jele 5 µL nükleik asit boyası Red-Safe (Intron) eklenmiş ve homojen karışım sağlanınca elektroforez kalıbına aktararak örneklerin yükleneceği kuyucukların oluşmasını sağlayan tarak yerleştirilmiştir. Daha sonrasında en az 30 dakika jelin donması beklenmiştir. Süre sonunda donan jelin hasar görmemesine dikkat edilerek tarak ortamdan uzaklaştırılmıştır. Jel, içerisinde jelin yüzeyini kaplayacak şekilde tampon çözelti (1xTAE) bulunan yatay elektroforez tankına (Major Science Mini-300) yerleştirilmiştir. PCR ürünlerinden 10 µL alınarak temiz bir parafilm üzerinde 2 µL yükleme boyası ile karıştırılarak mikropipet yardımıyla jel üzerindeki kuyucuklara yüklenmiştir. Jeldeki ilk ve son kuyucuklara, oluşacak bantların yorumlanabilmesi amacıyla 6 µL marker (2 µL λ DNA/HindIII (0,5 µg/µL, Gene Direx) + 4 µL saf su) ve 6 µL Ladder (100 bp, Gene Direx) yüklenmiştir (Şekil 2.1). Elektroforez tankı güç kaynağına bağlanarak Rep-PCR örnekleri için 35 Volt'ta yaklaşık 5 saat, tanımlama PCR örnekleri için ise 85 Volt'ta 40 dakika yürütülmüştür (Sambrook vd., 1989).

Yürütme işlemi sonunda nazikçe tanktan çıkarılan jel, saf su ile temizlenen Etidyum Bromid tablaya yerleştirilmiş ve jel görüntüleme cihazında (Bio-Rad Gel Doc EZ Imager) görüntülenme işlemine tabi tutulmuştur. Alınan görüntülerde oluşan bantlar, markerler yardımıyla incelenmiştir.



Şekil 2.1: Sırasıyla %0.7 Agaroz Jelde Yürütülmüş λ DNA/HindIII (A) ve %1.5 Agaroz Jelde Yürütülmüş 100bp DNA Ladder (B) Marker Büyüklükleri (Bp)

d) PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

DNA örneklerindeki PCR reaksiyonu kalıntılarının giderilmesi amacıyla PCR saflaştırma kiti GeneJet (Thermo Scientific), kullanım kılavuzundaki yönergelere göre kullanılmıştır (Anonim, Thermo Scientific, User guide, 2016). 25 μ L hacimde gerçekleştirilen tanımlama PCR'ı sonrasında bant gözlemlenen örneklere aynı koşullarda 50 μ L PCR'ı uygulanmıştır. Daha sonrasında saflaştırma işlemine tabi tutulmuştur. Tanımlama PCR işlemlerinden kalan toplamda 60 μ L PCR ürünü mikropipet yardımıyla steril 1,5 mL'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Üzerine kit içerisinde bulunan Binding Buffer, PCR ürünü miktarında eklenmiştir. Burada tüp içerisinde sarı renk gözlemlenmesine dikkat edilmiştir. Yine PCR ürünü miktarı (60 μ L) kadar %100 isopropanol (Sigma) eklenmiştir. Santrifüj tüplerinin her biri bu aşamada 5 saniye kadar vortekslenmiştir. Elde edilen bu karışım kit içerisinde bulunan kolonlara mikropipet aracılığıyla aktarılmıştır. 13.000 rpm'de 1 dak. santrifüj edilen tüplerin altındaki kalan sıvı kısımlar atılmıştır. Kolon içerisine 700 μ L Wash Buffer ilave edilmiş ve tekrar 13.000 rpm'de 1 dak. santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Süre sonunda altta biriken sıvı kısım dökülerek, yine 13.000 rpm'de 1 dak. boş bir santrifüj

daha gerçekleştirilmiştir. Ardından alt kısım tamamen çöpe atılarak, kolon kısımları yeni steril santrifüj tüplerine yerleştirilmiştir. Kolon üzerine kit içerisinde bulunan Elution Buffer'dan 50 µL ilave edilmiştir ve tüpler 13.000 rpm'de 1 dak. santrifüj edilmiştir. Bu aşamada kolon atılarak santrifüj tüpünde biriken sıvı kısım -20°C'de saklanmıştır.

Saflaştırma işleminin doğruluğunu test etmek amacıyla dizilim analizi öncesi son bir jel yükleme yapılmıştır. Agaroz jel elektroforez kısmında anlatıldığı şekilde %0,8'lik jel kullanılmıştır. Anlatılandan farklı olarak santrifüj tüpünde biriken karışımdan 5 µL alınarak temiz bir parafilm üzerinde 1 µL yükleme boyası ile karıştırılmış ve jel üzerindeki kuyucuklara yüklenmiştir. Burada sadece ilk kuyucuğa marker olarak 6 µL Ladder (100bp, Gene Direx) yüklenmiştir. Güç kaynağı 85 Volt'a ayarlanarak jeller 40 dakika yürütülmüştür. Tanktan çıkarılan jel Etidyum Bromid tablaya yerleştirilmiştir ve görüntüleme cihazında (BIO-RAD) görüntülenme işlemine tabi tutulmuştur.

e) Dizi Analizi

Saflaştırılan PCR örneklerinden 20 µL, bu örneklerin jel görüntüleri ve her örnek başına 2 µL primer Sanger Sekans yapılmak üzere Medsantek firmasına gönderilmiştir. Dizilim analizi sonuçları Chromas 2.6.6. programında incelenmiş ve BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul vd., 1997) ile benzerlik analizine tabi tutulmuştur. Programın tek bir izolat için birkaç mikroorganizmaya %100 benzerlik vermesi durumunda, bu mikroorganizmaların tip suş dizilimleri NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) veri bankasından bulunmuştur. Elde edilen dizilim ile benzerlik gösteren mikroorganizmaların dizilimlerinin karşılaştırması amacıyla Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) dizilim karşılaştırma programı kullanılmıştır. Böylelikle benzerlik daha detaylı incelenmiştir.

f) İstatistiksel Analizler

Veriler, Windows tabanlı JMP 14.1 programı vasıtasıyla tek yönlü varyans analizi ile test edilmiştir. Gruplar arasındaki farklılık Tukey HSD testi ile %95 güven aralığında ($p<0,05$) belirlenmiştir.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR VE TARTIŞMA

Pastırmanın üretim sürecinin detaylı incelenmesi amacıyla seçilen 4 adet örneğe (2. tuzlamadan sonraki et, soğuk presleme sonrasındaki et, terlemeden çıkmış çemenleme öncesindeki et ve son ürün) mikrobiyolojik analizler ve kimyasal analizler yapılmıştır. Mikrobiyolojik analizler olarak; toplam mezofilik aerobik bakteri, laktik asit bakterisi, *Enterobacteriaceae* ve M17 besiyerinde olası laktik kokların sayımı yapılmıştır. Ayrıca laktik asit bakterisi, *Enterobacteriaceae* ve M17 izolatları için DNA izolasyonu, gruplandırma (rep-PCR), 16S tanımlama PCR'ları, dizilim analizi ve BLAST benzerlik analizi ile mikroorganizma tanımlama yapılmıştır. Kimyasal analizlerden ise özellikle mikrobiyolojik gelişmeyi etkileyen pH ve a_w analizleri yapılmıştır.

3.1. Kimyasal Analizler

Çalışmada mikrobiyolojik floranın gelişimi için önem arz eden pH ve a_w analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. pH Değeri

Pastırmanın farklı üretim aşamalarında gözlemlenen pH değerleri Tablo 3.1'de verilmiştir. Yapılan analizlere göre en düşük pH değeri ilk örnek olan 2. tuzlamadan sonraki ette ölçülmüştür. Bulunan veriler istatistiksel olarak incelendiğinde 1. aşamadan alınan örnekler ile diğer örnekler arasında anlamlı bir fark gözlemlenirken ($p < 0,05$), 2. 3. ve 4. numaralı örnekler arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir ($p > 0,05$) (Tablo 3.1). Buna göre ilk aşamadan sonra pH'ta bir artış görülmektedir. Pastırma üretimi için kullanılacak çiğ etin optimum pH aralığı 5,4-5,8 olarak belirlenmiştir (Öztan,1999). TS 1071 Standardına göre son ürün, pastırmada pH'nın

4,5-5,8 aralığında olması gerektiği göz önünde bulundurulduğunda, çalışmamızdaki pastırmanın son pH değerinin standartlara uygun olduğu görülmektedir.

Tablo 3.1: Farklı Aşamalardaki Pastırma Örneklerinin pH Değerleri

NUMUNE NO	AŞAMALAR	pH
1	2. Tuzlamadan sonrası	5,63±0,02 ^B
2	Soğuk presleme sonrası	5,73±0,01 ^A
3	Çemenleme işlemi öncesi	5,81±0,005 ^A
4	Son ürün	5,8±0,015 ^A

Öztürk'ün (2015) yaptığı çalışmada 5 farklı *Longissimus dorsi* kasından üretilen pastırmaların üretim prosesinden seçilen 4 farklı örnekte pH değerleri ölçülmüştür. Öztürk (2015), bu çalışmadan farklı olarak hammaddeyi de incelemiş olup son ürün olan pastırmayı ise çalışmasına dahil etmemiştir. Üretim süresince pH değerlerinde doğrusal bir yükseliş gözlemlenmiştir. Seçilen pastırma örneklerinin en düşük, en yüksek ve ortalama pH değerleri sırası ile 5,5, 5,82 ve 5,66 olarak belirlenmiştir.

Özdemir vd.,'nin (1999) Ankara da tüketime sunulan pastırmalar üzerine yaptıkları çalışmada pastırma örneklerinde, pH değerlerini en az 5,35, en çok 5,85 ve ortalama olarak 5,54 düzeyinde saptamışlardır.

Pastırma üretiminde uçucu bileşiklerin bileşiminin değişmesiyle birlikte meydana gelen mikrobiyolojik ve fizikokimyasal parametrelerdeki değişimleri inceleyen bir çalışmada üretim aşamaları ilerledikçe ilk iki aşamalarda düşüş sonraki aşamaların pH değerlerinde ise doğrusal bir yükseliş gözlemlenmiştir. Bu çalışmada olduğu gibi Kaban'ın çalışmasında da tuzlama sonrasında artış gözlemlenmiştir. Kaban, bu artışın proteoliz neticesinde olabileceğini belirtmiştir (Kaban, 2009).

Doğruer ve diğerleri (2003), sodyum ve potasyum nitratın üretim periyodu süresince pastırmanın kalitesine etkisini inceledikleri çalışmalarında, pastırmalık etlerin tuzlama öncesi 5,56 olarak ölçtükleri pH değerinin tuzlama sonrasında yükseliş göstererek 5,73'e ulaştığını, çemenleme öncesinde ise 6,09 değerine kadar artış gösteren pastırma pH değerinin ise son üründe 5,56 olarak belirlediklerini bildirmişlerdir.

Pastırma, bütün parçalar halinde işlenen geleneksel bir kuru-kurutulmuş et ürünüdür, pH değeri pastırmada genellikle 5,5 ya da daha yüksektir (Akköse, 2017; Fettahoğlu, 2019; Kaban, 2009; Kaban, 2013). Bizim çalışmamızda da tüm pastırma örneklerinde pH değeri, 5,5'un üzerinde olduğu tespit edilmiştir.

Pastırmadaki proteolitik değişmelere tuz miktarının etkisinin incelendiği bir çalışmada, çiğ ette ortalama 5,42 olarak ölçülen pH değerinin üretim süresince artış göstererek farklı tuz konsantrasyonlarında olan örneklerde 5,85, 5,75 ve 5,65 değerlerine kadar ulaştığı bildirilmiştir (Uğuz, 2007).

Bu çalışmada elde edilen pH sonuçlarının, şimdye kadar yapılmış olan pastırmayla ilgili çoğu çalışmayla uyumlu olduğu gözlemlenmiştir.

3.1.2. Su Aktivitesi Değeri

Pastırma ve jambon gibi kuru işlenmiş et ürünlerinde su aktivitesi, mikrobiyolojik stabilite için önemli derecede etkilidir (Kaban, 2009). Bu tip ürünlerde, su aktivitesi genellikle olgunlaşma sürecinden etkilenir (Hazar, 2017). Bu sebeplerden dolayı mikrobiyolojik floranın tespiti için yapılan bu çalışmada üzerinde çalışılan diğer bir kimyasal analiz su aktivitesidir. Üretim sürecinden seçilen her numunede 2'şer paralel şekilde ölçülen en düşük su aktivitesi değeri 0,857, en yüksek su aktivitesi değeri ise 0,926 olarak ölçülmüştür. Pastırma üretim sürecindeki ortalama su aktivitesi değeri 0,883 olarak bulunmuştur. Pastırma örneklerinde üretim sırasında belirlenen su aktivitesi (a_w) değerleri Tablo 3.2'de toplu olarak verilmiştir. Verilerin varyans analizi incelendiğinde 2. ve 3. numaralı örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmezken ($p>0,05$), 1. 2. ve 4. örnekler arasında veya 1. 2. ve 3. örnekler arasında anlamlı bir fark gözlemlenmiştir ($p<0,05$) (Tablo 3.2).

Tablo 3.2: Farklı Aşamalardaki Pastırma Örneklerinin a_w Değerleri

NUMUNE NO	AŞAMALAR	a_w
1	2. Tuzlamadan sonrası	0,923±0,003 ^A
2	Soğuk presleme sonrası	0,859±0,002 ^C
3	Çemenleme işlemi öncesi	0,862±0,001 ^C
4	Son ürün	0,889±0,002 ^B

Şimdiye kadar yapılan çoğu çalışmada olduğu gibi bu çalışmada da su aktivitesindeki en büyük düşüşün soğuk presleme işleminden sonra olduğu belirlenmiştir. Presleme yani baskılama işlemiyle birlikte et su kaybetmiştir. İkinci kurutma işlemi sonrasında yani çemenleme öncesinde istatikselsel olarak bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Çemen hamuruyla kaplanan etten alınan örnekte ise su aktivitesi değeri yükselerek 0,889 değerine ulaşmıştır. Bu yükselişin sebebi çemen hamurunun içerisindeki sudan kaynaklanıyor olabilir.

Leistner (1988) pastırmanın a_w değerinin 0,85 ile 0,90 arasında olması gerektiğini belirtmiştir, bu çalışmada da son ürün su aktivitesi değeri bu değerlerle uyumlu bulunmuştur (Leistner, 1988). Ayrıca son ürün olan pastırmada ölçülen a_w değeri çoğu araştırmanın (Anıl, 1988; Doğruer, 1992; Doğruer vd., 2003; İnat, 2008; Kaban, 2013; Yıldırım, 1981) belirlediği değerlerle uyumludur.

Kaban'ın (2009) yaptığı çalışmada, pastırma üretimindeki uçucu bileşiklerin bileşiminin mikrobiyolojik ve fizikokimyasal parametrelerle ilişkisini incelemiştir. Üretim sürecinden 5 adet örnek alınarak yapılan çalışmada ölçülen su aktiviteleri doğrusal olarak azalma göstermiştir. Seçilen 2 örnek bizim çalışmamızla aynı aşamalardan seçilmiştir (tuzlamadan sonra ve son ürün) ve bu 2 adet örnekte Kaban'ın araştırmasıyla paralel sonuçlar elde edilmiştir. Kaban, tuzlama sonrasında aldığı örnekte a_w değerini 0,94-0,96 aralığında bulurken son ürün olan pastırmada 0,86-0,88 arasında bulmuştur.

Pastırma üretiminde kontaminasyon kaynaklarının belirlenmesi ve iyileştirme koşullarının araştırılması üzerine yapılan çalışmada (İnat, 2008) işletmede üretim periyodu boyunca ölçülen a_w değerleri ile bu çalışma kıyaslandığında sonuçların uyumlu olduğu görülmüştür. İnat, tuzlamadan sonraki numunesinde a_w değerini 0,96, baskılama işleminden sonraki numunesinde ortalama 0,94, kurutma işlemi sonrasında 0,84 ve çemenleme işlemi sonrasında ise 0,87 bulmuştur. Bu çalışmada su aktivitesi tuzlama ve presleme işlemleriyle düşüş gösterirken çemenleme işleminden sonra önemsiz bir yükseliş göstermiştir.

Özdemir ve arkadaşlarının (1999) yaptıkları bir çalışmada pastırma numunelerinde, a_w değerlerinin en az 0,81, en çok 0,93 ve ortalama olarak ise 0,89 düzeyinde bulduklarını bildirmişlerdir.

Gürbüz vd.'nin (2003) yaptığı çalışmada pastırma üretiminin geliştirilmesinde sıcak dumanlama uygulaması ve bu uygulamanın kaliteye etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada tuzlama sonrasında ve çemenleme sonrasında ölçülen a_w değerleri sırasıyla 0,908 ve 0,909 bulunmuştur.

Bromelin uygulamasının pastırmanın kimyasal, mikrobiyolojik ve duyu kalitesine etkisini inceleyen Doğruer vd., (1997) yaptıkları çalışmada kontrol olarak pastırmanın üretim sürecinin belirli aşamalarında su aktivitesi değerlerine bakmışlardır. Bu çalışma sonucunda tuzlamadan sonra 0,954 olarak ölçülen a_w değeri, çemenleme öncesi 0,893 değerine düşmüş ve çemenleme işlemiyle birlikte 0,910 değerine yükselmiştir.

Çalışmamız diğer çalışmalarla kıyaslandığında bulunan a_w değerlerinin birbirleriyle uyumlu veya yakın olduğu gözlemlenmektedir.

3.2. Mikrobiyolojik Analizler

3.2.1. Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri

Toplam mezofilik aerobik bakteri yükünün (TMAB) belirlenmesi için PCA besiyerine ekim yapılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda en yüksek bakteri yükleri $7,13 \pm 0,016$ ve $7,15 \pm 0,053$ log kob/g olarak çemenleme öncesi ve son ürün olan çemenlenmiş pastırmada görülürken, en düşük bakteri yükü olan $4,88 \pm 0,011$ ise 2. tuzlamadan sonraki ette gözlemlenmiştir (Tablo 3.3). TMAB sonuçları 3. ve 4. örnekler kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemektedir ($p > 0,05$). Bunlar dışındaki diğer bütün örnekler arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmiştir ($p < 0,05$).

Tablo 3.3: Pastırma Üretim Sürecinin Farklı Bölgelerinden Alınan Örneklerin Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri Yükleri (log kob/g)

NUMUNE NO	AŞAMALAR	TMAB	LAB	M17 Agarda Gelişen Bakteriler	<i>Enterobacteriaceae</i>
1	2. Tuzlamadan Sonrası	4,88±0,011 ^C	4,23±0,051 ^C	4,92±0,020 ^B	4,60±0,054 ^A
2	Soğuk Presleme Sonrası	5,29±0,055 ^B	5,67±0,018 ^B	4,63±0,025 ^B	0
3	Çemenleme İşlemi Öncesi	7,13±0,016 ^A	6,83±0,054 ^A	7,25±0,16 ^A	0
4	Son Ürün	7,15±0,053 ^A	6,64±0,014 ^A	6,65±0,12 ^A	0

Güner, Gönülalan ve Doğruer (2008) yaptıkları çalışmadaki kontrolleriyle bu çalışma karşılaştırıldığında benzer sonuçlar olduğu gözlemlenmiştir. Güner ve arkadaşlarının çalışmasında en düşük TMAB yükü 4,75±0,116 log kob/g olarak kürlenmeden sonraki örnekte gözlemlenirken, en yüksek bakteri yükü ise 8,34±0,769 log kob/g olarak son ürün olan pastırmada sayılmıştır. Bu çalışma ile benzer olarak TMAB yükü üretim sürecinde artış göstermiştir.

Bromelin uygulamasının pastırmanın kimyasal, mikrobiyolojik ve duyu kalitesine etkisini inceleyen Doğruer vd. (1997) yaptıkları çalışma kontrol grubu baz alınarak incelendiğinde, bakteri yükü tuzlamadan sonraki ette 4,20±0,86 log kob/g, çemenleme işlemi öncesindeki ette 5,95±0,31 log kob/g ve çemenleme sonrasındaki ette 6,95±0,31 log kob/g olarak sayılmıştır.

Diğer bir çalışmada ise Gürbüz vd., (2003) pastırma yapım teknolojisinin geliştirilmesinde sıcak dumanlama uygulanması ve bu uygulamanın kaliteye etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmadaki kontrol grubu olan geleneksel pastırma üretim yöntemiyle üretilen örnekler ile bu çalışma karşılaştırıldığında benzerlikler görülmektedir. En düşük genel canlı yükü tuzlama öncesindeki örnekte 5,09 log kob/g olarak ölçülürken, en yüksek genel canlı yükü çemenleme sonrasında alınan örnekte 7,59 log kob/g olarak ölçülmüştür. Aşamalar arasında fark edilen bir yükseliş vardır. Gerekli karşılaştırmalar yapıldığında bu çalışmanın diğer çalışmalarla elde edilen verilerle yakınlık gösterdiği görülmektedir.

3.2.2. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterilerinin mikrobiyal yükünün belirlenmesi ve DNA izolasyonu amacıyla MRS besiyerine ekim yapılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda sayılan bakteri yüklerinin log kob/g cinsinden paralellerin ortalamaları, standart sapmaları ve istatistiksel verileriyle birlikte Tablo 3.3'te verilmiştir. Üretim sürecindeki en yüksek üreme çemenleme işlemi öncesinde $6,83 \pm 0,054$ log kob/g ve son üründe $6,64 \pm 0,14$ olarak ölçülmüştür. En düşük üreme ise tuzlamadan iki gün sonraki ette $4,23 \pm 0,051$ log kob/g olarak hesaplanmıştır (Tablo 3.3). Sonuçların varyans analizleri incelendiğinde 3. ve 4. aşamadaki örnekler arasında anlamlı bir fark bulunmamış, 1. ve 2. no'lu örnekler ise hem birbirlerinden hem de 3. ve 4. örneklerden farklı bulunmuştur ($p < 0,05$) (Tablo 3.3). Üretim süreci boyunca son ürüne kadar doğrusal olarak artış gösteren LAB yükü, son ürüne geçerken anlamsız bir düşüş gözlemlenmiştir.

Güner, Gönülalan ve Doğruer (2008) yaptıkları çalışmada en yüksek laktik asit bakterisi yükü $5,52 \pm 0,708$ log kob/g olarak verilmişken, düşük laktik asit bakterisi yükü $2,95 \pm 0,033$ log kob/g olarak verilmiştir. Bu değerlerin bu çalışmaya kıyasla daha düşük olduğu görülmektedir. Bunun sebebi pastırma üretiminde kullanılan hayvan etinin özelliklerinden, üretim koşullarının farklı olmasından veya üretimde kullanılan tuz miktarından kaynaklanmış olabilir.

Doğruer vd.'nin (1997) yürüttükleri çalışmada laktik asit bakterisi yükü tuzlamadan sonra $3,70 \pm 1,21$ log kob/g, çemenleme öncesinde $7,25 \pm 0,08$ log kob/g ve son üründe $7,25 \pm 0,08$ log kob/g olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar bu çalışma ile yakın olmakla birlikte üretim sürecinde görülen artış da benzerlik göstermektedir.

3.2.3. M17 izolatlar

M17 izolatların sayımı ve izolasyonu için ekimleri M17 agara yapılmıştır. Üretim süreci boyunca en düşük bakteri yükü 2. tuzlamadan sonrası ve soğuk presleme sonrasındaki aşamalarda $4,92 \pm 0,020$ log kob/g ve $4,63 \pm 0,025$ log kob/g olarak ölçülürken, en yüksek bakteri yükü ise çemenleme işlemi öncesi ve son üründe sırasıyla $7,25 \pm 0,16$ log kob/g ve $6,65 \pm 0,12$ log kob/g olarak bulunmuştur. Sonuçlar istatistiksel olarak incelendiğinde 1. ve 2. örnekler ile 3. ve 4. örnekler kendi aralarında

anlamli değildir ($p>0,05$) (Tablo 3.3). M17 besiyeri pastırma üretim sürecinin mikrobiyolojisi incelemede bu çalışmada ilk defa kullanılmıştır.

Gürbüz vd. (2003) yaptıkları çalışmada *Staphylococcus-Micrococcus* mikroorganizmalarının sayımı için MSA (Mannitol Salt Agar) besiyerini kullanmışlardır. Bu alışmada 1. Grup yani geleneksel yöntemlerle üretilen pastırma sonuçlarına bakıldığında, tuzlama sonrasında alınan numunede 3,39 log kob/g bulunurken emenleme işlemi sonrasında alınan numunede 5,96 log kob/g olarak sayılmıştır.

Doğruer, 2001 yılında yaptığı çalışmada sığır pastırmasında tuzlamadan sonra alınan numunede *Staphylococcus-Micrococcus* miktarı MSA besiyeri ile $4,24\pm 0,31$ olarak tespit edilmiştir. Çemenleme işlemi öncesindeki numunede bu değer $3,86\pm 0,19$ bulunurken, emenleme işleminden sonra alınan numunede ise $6,44\pm 0,09$ olarak tespit edilmiştir.

3.2.4. Enterobacteriaceae Grubu Bakteriler

Enterobacteriaceae grubu bakterilerin koloni sayımı için VRBD besiyerine ekim yapılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda sadece ilk aşama olan 2. tuzlamadan sonrasında alınan örnekte varlığı gözlemlenmiş, diğer aşamalarda ise gözlemlenmemiştir. İlk aşamadaki *Enterobacteriaceae* yükü $4,60\pm 0,054$ log kob/g olarak sayılmıştır (Tablo 3.3).

Doğruer vd. (1997) yaptıkları çalışmada VRBA besiyeri kullanarak koliform grubu bakterilerin sayımını yapmışlardır. Bu çalışmaya benzer olarak, ilk aşamada düşük seviyelerde saptanan koliform grubu mikroorganizmaların üretimin diğer aşamalarında üremediği gözlemlenmiştir.

İspanyol bir geleneksel et ürünü olan kuru işlenmiş lacón üretimi sırasında mikrobiyolojik değişiklikler üzerine Vilar vd. (2000) yaptığı bir araştırmada üretimin 5 farklı aşamasından örnekler alınmıştır. Sadece ilk aşama dışında *Enterobacteriaceae* grubu bakteri ürememiştir. Bakteri yükü $3,32\pm 1,63$ log kob/g olarak bildirilmiştir. *Enterobacteriaceae* grubu mikroorganizmalarının tuza en hassas olanlar arasında olduğu göz önüne alındığında uygun sonuçlar olduğu görölmektedir; genelde sadece 0,93'ten yüksek a_w değerlerinde oęalurlar (Vilar vd., 2000).

Güner, Gönülalan ve Doğruer (2008) yaptıkları çalışmadan koliform grubu bakteriler VRBA besiyerine ekim yapılarak sadece ilk aşamalar olan kürlenme öncesi ve sonrası bir miktar belirlenmiştir. Daha sonra *Enterobacteriaceae* varlığı bu çalışmada olduğu gibi gözlemlenmemiştir. Kürlenme işleminden önce $2,48 \pm 0,035$ log kob/g kürlenme işleminden sonra ise $1,71 \pm 0,137$ log kob/g olarak belirtilmiştir.

Başka bir çalışmada ise Gürbüz ve diğerleri (2003) geleneksel yöntemle üretilmiş pastırmada koliform grubu bakterileri tuzlama öncesinde ve sonrasında VRBA besiyeri kullanarak gözlemlenmişlerdir. Bu çalışma ile paralel olarak çemenleme işleminden sonra Gram (-) bakterilere rastlanmamıştır.

Fettahoğlu vd.,'nin (2019) yaptıkları çalışmada farklı kürlenme işlemleri altında üretilen pastırmalardaki Gram (+), katalaz (+) kokların biyoçeşitlilik ve karakterizasyonunu incelemişlerdir. Bu çalışmada VRBD besiyerini kullanarak *Enterobacteriaceae* sayısının üretim sürecinde su aktivitesinin azalması nedeniyle tespit edilebilir seviyenin altında (<2 log kob/g) olduğu bildirilmiştir.

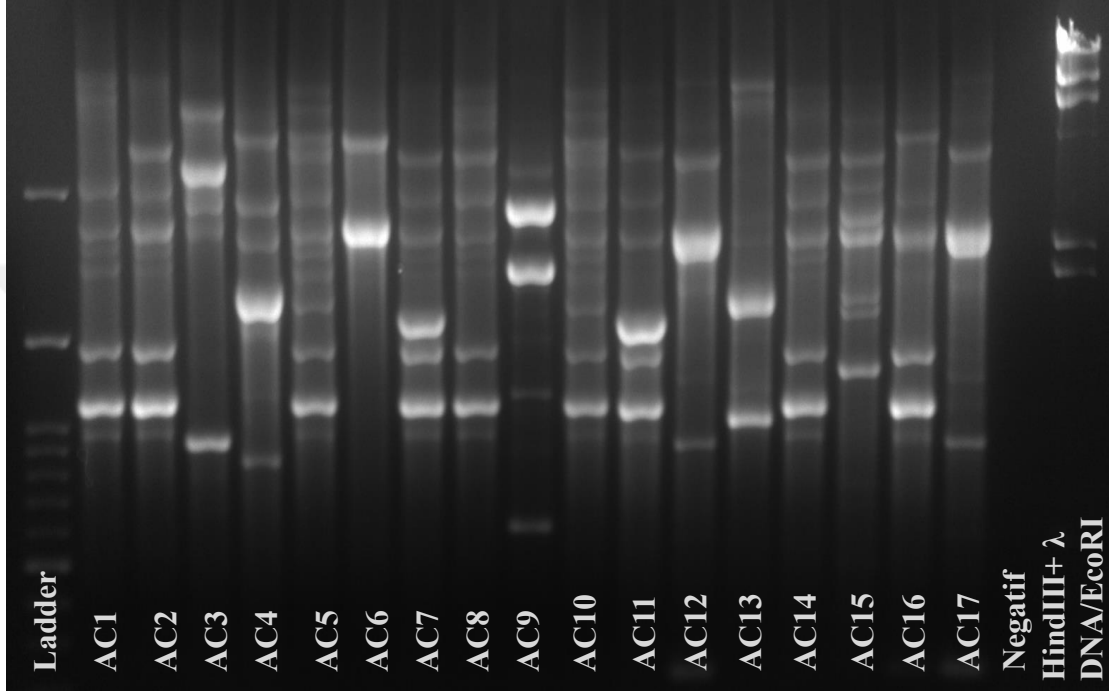
Kaban'ın (2009) yaptığı çalışmada *Enterobacteriaceae* yükü, hammadde hariç (10^2 kob/g) diğer üretim aşamaları sırasında tespit edilebilir seviyenin altında olduğu bildirilmiştir.

Pastırma ile ilgili yapılan diğer pek çok çalışmada da, *Enterobacteriaceae* familyası üyelerinin pastırma üretiminde hayatta kalamayacağı genel olarak belirtilmiştir (Aksu & Kaya, 2001; Kaban, 2009; Öz vd., 2017). Bunun en önemli nedeni laktik asit bakterilerinin, özellikle *Enterobacteriaceae* familyasına ait bakterilerin gelişmesini olumsuz yönde etkilemesidir (Tekinşen ve Doğruer, 2000). Bu çalışma sonucunda da diğer çalışmalarda olduğu gibi Gram (-) flora üzerinde tuzun ve su aktivitesinin azalmasının oldukça etkili olduğu ortaya çıkmıştır.

3.3. Tanımlanan Mikroorganizmalar

Araştırmada laktik asit bakterileri, M17 izolatları ve koliform grubu bakterilerin identifikasyonu amacı ile izole edilen bakteriler arasından sırasıyla 87 adet laktik asit bakterisi, 80 adet M17 izolatu ve 30 adet VRBD izolatu seçilerek DNA izolasyonuna tabi tutulmuşlardır. DNA izolasyonu işleminden sonra elde edilen izolatların GTG5-PCR sonucunda, jel elektroforez ile parmak izi görüntüleri elde edilmiştir. Laktik asit

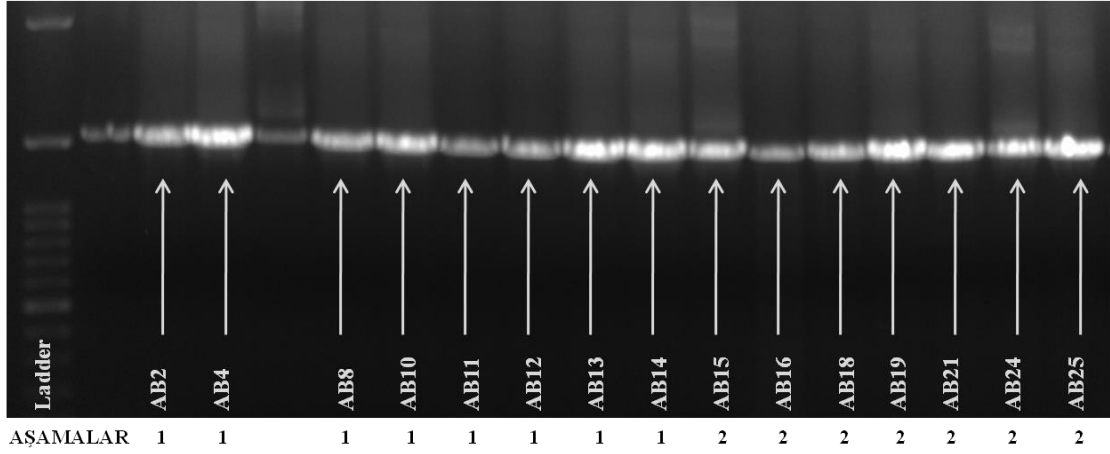
bakterileri için elde edilmiş örnek bir jel görüntü sonucu Şekil 3.1’de verilmiştir. Elde edilen tüm izolatlar için jel görüntüleri Ek 1 (laktik asit bakterileri) ve Ek 2 (M17 izolatları) ve Ek 3 (VRBD izolatları)’de yer almaktadır. Birbirleriyle benzer bant ve görüntüler veren izolatlar kendi içlerinde gruplandırılarak 16S dizilimlerinin belirlenmesi amacıyla 62 adet laktik asit bakterisi, 47 adet M17 izolatı ve 23 adet VRBD izolatı seçilmiştir.



Şekil 3.1: M17 İzolatlarına Ait GTG5 Elektroforez Görüntüsü

3.3.1. Laktik Asit Bakterileri

Gruplandırma işleminden sonra seçilen 62 adet laktik asit bakterisinin 16S rRNA bölgesi PCR ile çoğaltılmış ve dizilimi belirlenmiştir. Sadece 2 adet izolat için (AC2 VE AC9) ilgili kütüphanelerle karşılaştırıldığında net bir sonuç alınamadığından *rpoA* geni çoğaltılmış ve dizilim analizine tabi tutulmuştur. Bunun neticesinde tanımlamaları netlik kazanmıştır. Laktik asit bakterileri için elde edilen bir örnek jel görüntüsü Şekil 3.2’de verilmiştir. Geri kalan tüm laktik asit bakterilerinin 16S PCR’ına ait jel görüntüleri Ek 4’te verilmiştir. 16S PCR ürünün 1500 bp civarında olduğu görülmektedir.



Şekil 3.2: Laktik Asit Bakterilerine Ait 16S PCR Elektroforez Görüntüsü

Elde edilen kromotogramlar ilgili kütüphanelerle karşılaştırıldığında 86 adet suşun 45 tanesini *Lactobacillus sakei*, 16 tanesini *Weissella viridescens*, 10 tanesini *Lactobacillus graminis*, 6 tanesini *Weissella halotolerans*, 3 tanesini *Lactobacillus curvatus*, 2 tanesini *Leuconostoc citreum*, 2 tanesini *Weissella helenica* geriye kalan 1 tanesini *Weissella cibaria* ve 1 tane *Weissella confusa* oluşturmaktadır. İzolatların hangi aşamadan izole edildikleri, BLAST benzerlik oranları ve mikroorganizma cins ve tür isimleri ayrıntılı olarak Tablo 3.4’te verilmiştir.

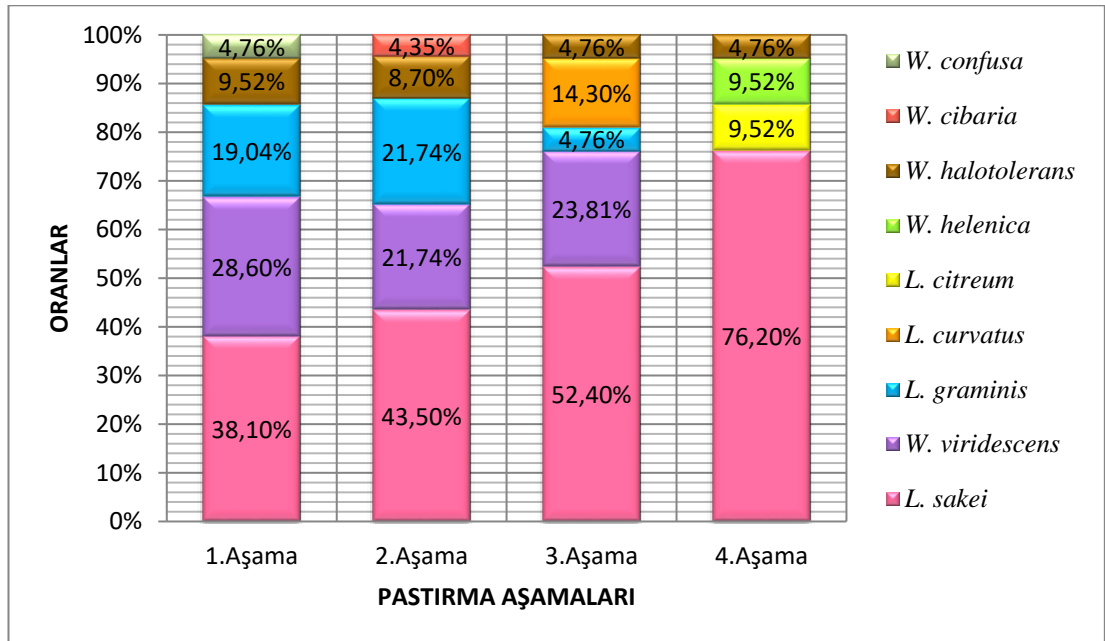
Tablo 3.4: Sekans Sonucuyla Elde Edilen Bulgular

İzolat Kodu	Tespit Edilen Bakterinin Tür ve Cins Adı	Alındığı Aşama	BLAST Benzerlik Oranı	Temsil Ettiği İzolatlar
AB2	<i>Lactobacillus sakei</i>	1. AŞAMA	% 100	-
AB4	<i>Weissella viridescens</i>	1. AŞAMA	% 100	-
AB8	<i>Lactobacillus sakei</i>	1. AŞAMA	% 100	-
AB10	<i>Lactobacillus sakei</i>	1. AŞAMA	% 100	-
AB11	<i>Lactobacillus sakei</i>	1. AŞAMA	% 99,88	-
AB12	<i>Lactobacillus sakei</i>	1. AŞAMA	% 100	-
AB13	<i>Lactobacillus sakei</i>	1. AŞAMA	% 100	AB1
AB14	<i>Lactobacillus graminis</i>	1. AŞAMA	% 100	AB3 AB7 AB17
AB15	<i>Weissella viridescens</i>	2. AŞAMA	% 100	AB33
AB16	<i>Lactobacillus graminis</i>	2. AŞAMA	% 84,66	AB6 AB23 AB26
AB18	<i>Lactobacillus sakei</i>	2. AŞAMA	% 100	-
AB19	<i>Weissella viridescens</i>	2. AŞAMA	% 100	-

AB21	<i>Lactobacillus sakei</i>	2. AŞAMA	%99,67	AB5 AB20 AB22
AB24	<i>Weissella cibaria</i>	2. AŞAMA	% 100	-
AB25	<i>Weissella viridescens</i>	2. AŞAMA	% 100	-
AB27	<i>Weissella viridescens</i>	2. AŞAMA	% 100	-
AB28	<i>Lactobacillus graminis</i>	2. AŞAMA	% 100	-
AB29	<i>Weissella halotolerans</i>	2. AŞAMA	% 100	-
AB31	<i>Lactobacillus sakei</i>	2. AŞAMA	% 100	-
AB32	<i>Lactobacillus sakei</i>	2. AŞAMA	%99,88	-
AB34	<i>Lactobacillus sakei</i>	3. AŞAMA	% 100	-
AB35	<i>Weissella viridescens</i>	3. AŞAMA	% 100	-
AB36	<i>Weissella viridescens</i>	3. AŞAMA	% 100	-
AB37	<i>Weissella halotolerans</i>	3. AŞAMA	%99,88	-
AB39	<i>Weissella viridescens</i>	3. AŞAMA	% 100	-
AB40	<i>Weissella viridescens</i>	1. AŞAMA	% 100	AB38 AB42
AB41	<i>Weissella confusa</i>	1. AŞAMA	%99,83	-
AB43	<i>Weissella viridescens</i>	1. AŞAMA	%97,18	-
AB44	<i>Lactobacillus sakei</i>	1. AŞAMA	%96,21	-
AB45	<i>Weissella halotolerans</i>	1. AŞAMA	% 100	AB47
AB46	<i>Weissella viridescens</i>	1. AŞAMA	% 100	-
AB48	<i>Weissella halotolerans</i>	2. AŞAMA	% 100	-
AB49	<i>Lactobacillus sakei</i>	2. AŞAMA	%97,50	AB30 AB9
AB50	<i>Weissella viridescens</i>	3. AŞAMA	% 100	-
AB52	<i>Lactobacillus sakei</i>	3. AŞAMA	% 100	-
AB53	<i>Lactobacillus sakei</i>	3. AŞAMA	% 100	-
AB54	<i>Lactobacillus sakei</i>	3. AŞAMA	% 100	-
AB55	<i>Lactobacillus graminis</i>	3. AŞAMA	% 100	-
AB57	<i>Lactobacillus sakei</i>	3. AŞAMA	% 100	-
AB58	<i>Lactobacillus sakei</i>	3. AŞAMA	% 100	-
AB59	<i>Weissella viridescens</i>	3. AŞAMA	% 100	-
AB60	<i>Lactobacillus sakei</i>	3. AŞAMA	% 100	-
AB63	<i>Lactobacillus curvatus</i>	3. AŞAMA	% 100	AB51 AB56
AB64	<i>Lactobacillus sakei</i>	3. AŞAMA	% 100	AB62
AB65	<i>Lactobacillus sakei</i>	3. AŞAMA	% 100	-
AB66	<i>Lactobacillus sakei</i>	3. AŞAMA	% 100	-
AB68	<i>Lactobacillus sakei</i>	4. AŞAMA	% 100	-
AB69	<i>Lactobacillus sakei</i>	4. AŞAMA	% 100	-
AB70	<i>Lactobacillus sakei</i>	4. AŞAMA	% 100	AB72
AB71	<i>Lactobacillus sakei</i>	4. AŞAMA	% 100	-

AB73	<i>Lactobacillus sakei</i>	4. AŞAMA	% 100	-
AB74	<i>Lactobacillus sakei</i>	4. AŞAMA	% 100	-
AB76	<i>Lactobacillus sakei</i>	4. AŞAMA	% 100	AB75 AB80
AB77	<i>Lactobacillus sakei</i>	4. AŞAMA	% 100	-
AB78	<i>Lactobacillus sakei</i>	4. AŞAMA	% 100	-
AB82	<i>Weissella halotolerans</i>	4. AŞAMA	% 100	-
AB85	<i>Lactobacillus sakei</i>	4. AŞAMA	% 100	-
AB86	<i>Leuconostoc citreum</i>	4. AŞAMA	% 100	-
AB87	<i>Weissella helenica</i>	4. AŞAMA	% 100	AB83
AB89	<i>Lactobacillus sakei</i>	4. AŞAMA	% 100	-
AB90	<i>Lactobacillus sakei</i>	4. AŞAMA	% 100	AB88
AB93	<i>Leuconostoc citreum</i>	4. AŞAMA	% 100	-

L. sakei pastırmanın her aşamasında dominant bakteri olarak karşımıza çıkmıştır (Şekil 3.3). Son ürün olan çemenlenmiş pastırma örneğinde diğer aşamalara göre daha yüksek oranda olduğu görülmektedir (%76,2). Daha önceden *Lb. viridescens* olarak adlandırılan bakteri türü, Collins vd., (1993) tarafından *Weissella viridescens* olarak tekrar isimlendirilmiştir (Fusco vd., 2015). Bu tür, diğer birçok çalışmada olduğu gibi bu çalışmada da ikinci baskın tür olarak gözlemlenmiştir. *Weissella viridescens* etin bozulmasında etkili olabileceği için et işleme endüstrisinde en önemli türlerden biridir (Dušková vd., 2013).



Şekil 3.3: Pastırma Aşamalarına Göre LAB'nin Yüzde Dağılımları

W. halotolerans eski adı ile *Lb. halotolerans* (Yörük ve Güner, 2011) bu çalışmada her aşamada görülmüştür. Tür isminden de anlaşılacağı üzere tuza karşı dayanıklı bir bakteridir (Kandler vd., 1983). *L. graminis* ilk 3 aşamada varlığını önemli ölçüde sürdürürken son aşamadaki numunede gözlemlenmemiştir. *W. confusa* ve *W. cibaria* sırasıyla 1. ve 2. aşamada varlığını az miktarlarda göstermiş, daha sonraki aşamalarda ise tespit edilmemişlerdir. *W. helenica* ise diğer çalışmalarda olduğu gibi son ürün olan pastırmadan önemli miktarda izole edilmiştir (Şekil 3.3).

Pastırma örneklerinden izole edilen *W. viridescens*, *W. hellenica*, *W. confusa*, *Leuconostoc* spp., *L. plantarum* ve *L. sakei* olarak nitelendirilen türler daha önce et ürünlerinde bildirilmiştir. *W. helenica* ve *W. viridescens*, et veya et ürünleri ile yaygın olarak ilişkilendirilmiştir (Adıgüzel ve Atasever, 2009; Collins vd., 1993; Dinçer ve Kıvanç, 2012)

Yalanca'nın (2009) yaptığı yüksek lisans çalışmasında biyokimyasal yöntemlerle sadece cins bazında tanımlama yapılmıştır. 15 pastırma örneğinden izole edilen 12 laktik asit bakterisinin 8'i *Lactobacillus* spp., 3'ü *Pediococcus* spp., 1'i *Enterococcus* spp. olarak bulunmuştur. Söz konusu çalışmada izole edilen *Lactobacillus* spp. yoğunluğu bu çalışma ile paralellik göstermektedir.

Lewus, Kaiser ve Montville (1991) yaptıkları çalışmada et örneklerinden bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerini izole etmeyi ve onların psikrotrofik gıda kaynaklı patojenlere karşı aktivite spektrumlarını saptamayı amaçlamışlardır. Bu çalışma sayesinde etlerden laktik asit bakterilerinin genellikle izole edildiklerini ve bu mikroorganizmaların, bozulma bakterileri ve varsa *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus* gibi patojenleri engelleyebildiğini bildirmişlerdir.

Dinçer ve Kıvanç'ın, Türk pastırmasından laktik asit bakterilerinin karakterizasyonu üzerine yaptıkları çalışmada (2012), *Lactobacillus plantarum* tespit edilen ana tür olarak bildirmiştir. Ayrıca, otomatik ribotipleme ile *Lactobacillus sakei*, *Enterococcus faecium* ve *Pediococcus acidilactici* türleri de tespit edilmiştir.

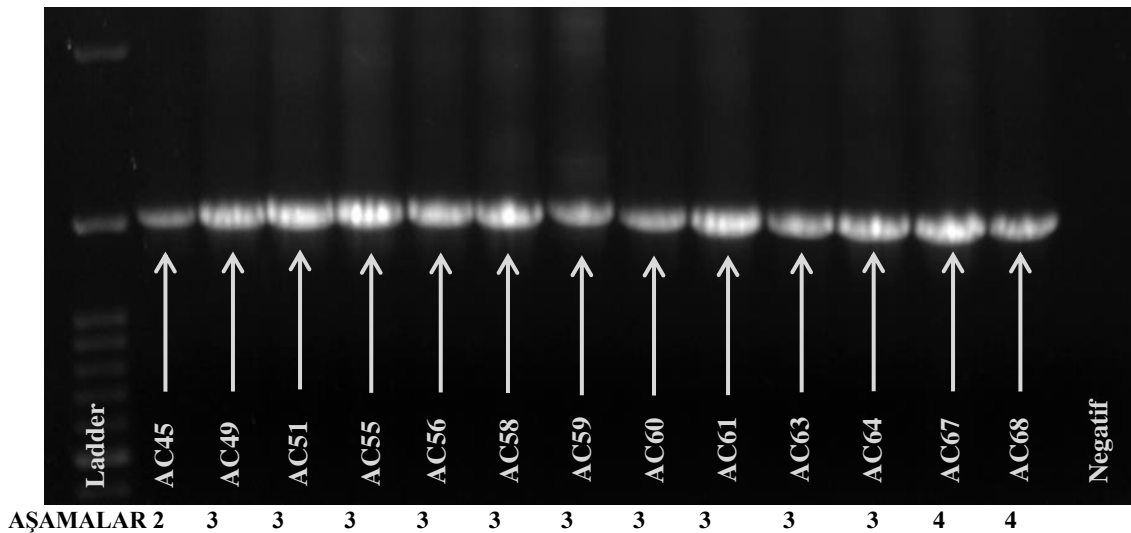
Başka bir çalışmada Öz vd., (2017) pastırma örneklerinden izole ettikleri toplam 106 laktik asit bakterisindeki dominant türü *Lactobacillus sakei* olarak tanımlamışlardır. *Weissella cibaria* (%24,5) ve *W. confusa* (%19,8) da yüksek oranda tespit edilmiştir. En fazla gözlenen dört farklı bakteri cinsi *Weissella* (%49), *Lactobacillus* (%34,9), *Pediococcus* (%10,4) ve *Leuconostoc* (%5,6) olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, *P.*

pentosaceus (%5,7), *P. acidilactici* (%4,7), *Leu. carnosum* (%3,8), *W. helenica* (%2,8), *L. plantarum* (%1,9), *L. paraplantarum* (%1,9), *L. curvatus* (%1,9), *W. halotolerans* (%1,9), *L. graminis* (%0,9), *L. sakei* subsp. *carnosus* (%0,9), *Leu. citreum* (%0,9), *Leu. mesenteroides* (%0,9) suşları da pastırma örneklerinden farklı oranlarda izole edilmiştir.

Özdemir ve Sırıken (1996) yaptıkları araştırmada pastırmadan izole ettikleri 94 laktobasil suşunun 40 tanesinin *Lactobacillus sakei*, 9'unun *L. carnis* (*Carnobacterium piscicola*), 8'nin *L. curvatus*, 8'nin *L. divergens*, 7'sinin *L. alimentarius*, 6'sının *L. casei* spp. *rhamnosus* (*L. rhamnosus*), 6'sının *L. confusus* (*W. confusa*), 5'inin *L. plantarum* ve 5'inin de *L. viridescens* (*W. viridescens*) olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda homofermantatif laktobasillerin dominant mikroflorayı oluşturduğu ve bunlar içerisinde de *L. sakei*'nin en yüksek düzeyde yer aldığını bulmuşlardır.

3.3.2. M17 izolatları

M17 agardan izole edilen 80 adet bakteri GTG5 parmak izi görüntüleri ile 47 gruba indirgenmiştir. Bu 47 adet bakterinin, 16S rRNA bölgeleri PCR ile çoğaltılmış ve dizilimi belirlenmiştir. Örnek bir 16S jel görüntüsü Şekil 3.4'te verilmiştir. Diğer izolatların jel görüntüleri Ek 5'te verilmiştir. Elde edilen bantlar 1500 bp civarındadır.



Şekil 3.4: M17 İzolatları İçin 16S PCR Elektroferez Görüntüsü

Dizilim analizinden elde edilen veriler incelendiğinde izole edilen 80 suşun *Brochothrix thermosphacta*, *Psychrobacter faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Leuconostoc citreum*, *Bacillus subtilis*, *Carnobacterium divergens*, *Staphylococcus equorum*, *Kocuria salsicia*, *Lactobacillus sakei* ve *Weissella jogaejeotgali* türlerinden oluştuğu gözlemlenmiştir. Sekans sonucu elde edilen verilerin ayrıntılı açıklaması Tablo 3.5 ve Tablo 3.6’da verilmiştir.

Tablo 3.5: Gram (+), Katalaz (-) M17 İzolatları (Laktik Asit Bakterileri)

İzolat Kodu	Tespit Edilen Bakterinin Türk ve Cins Adı	Alındığı Aşama	BLAST Benzerlik Oranı	Temsil Ettiği İzolatlar
AC13	<i>Carnobacterium divergens</i>	1. AŞAMA	%100	-
AC59	<i>Lactobacillus sakei</i>	3. AŞAMA	%100	-
AC68	<i>Leuconostoc citreum</i>	4. AŞAMA	%100	-
AC70	<i>Lactobacillus sakei</i>	4. AŞAMA	%100	-
AC73	<i>Lactobacillus sakei</i>	4. AŞAMA	%100	-
AC79	<i>Lactobacillus sakei</i>	4. AŞAMA	%100	-
AC80	<i>Weissella jogaejeotgali</i>	4. AŞAMA	%100	AC71

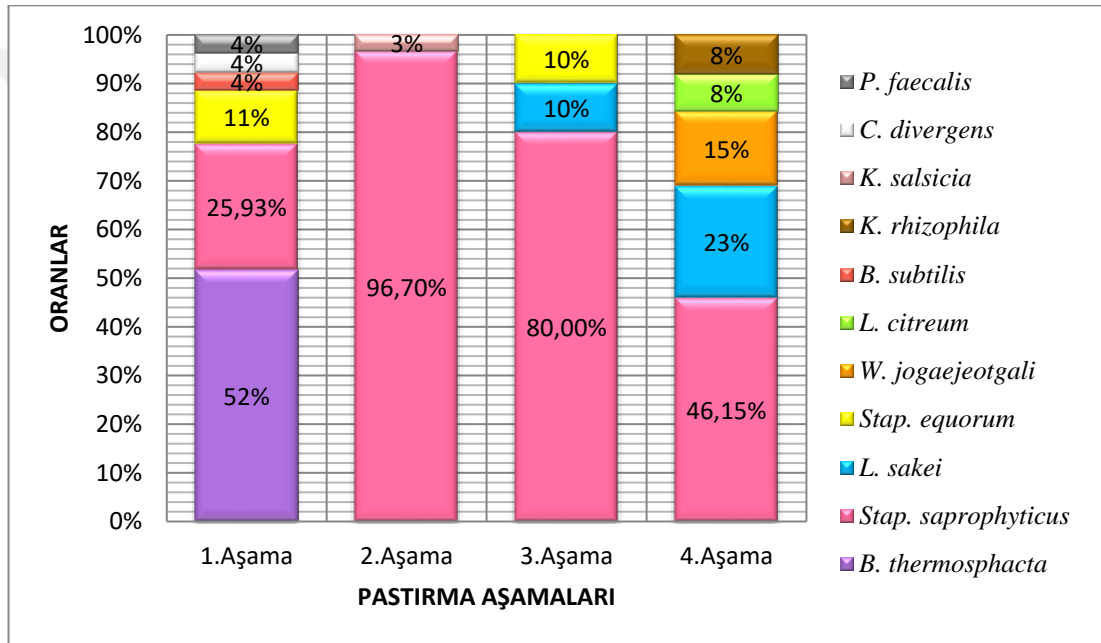
Tablo 3.6: Katalaz (+), M17 İzolatları

İzolat Kodu	Tespit Edilen Bakterinin Türk ve Cins Adı	Alındığı Aşama	BLAST Benzerlik Oranı	Temsil Ettiği İzolatlar
AC2	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	1. AŞAMA	%100	AC14
AC4	<i>Psychrobacter faecalis</i>	1. AŞAMA	%100	-
AC5	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	1. AŞAMA	%100	AC10
AC6	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1. AŞAMA	%100	AC41 AC72
AC7	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	1. AŞAMA	%100	AC11
AC8	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	1. AŞAMA	%100	-
AC9	<i>Bacillus subtilis</i>	1. AŞAMA	%99,86	-
AC15	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1. AŞAMA	%100	-
AC16	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	1. AŞAMA	%100	-
AC17	<i>Staphylococcus equorum</i>	1. AŞAMA	%99,86	AC12
AC18	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	1. AŞAMA	%100	AC1
AC20	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	1. AŞAMA	%100	AC19 AC22 AC24
AC21	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1. AŞAMA	%100	AC31 AC35

AC23	<i>Staphylococcus equorum</i>	1. AŞAMA	%99,86	-
AC25	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2. AŞAMA	%100	-
AC26	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2. AŞAMA	%100	AC48
AC28	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2. AŞAMA	%100	AC36 AC50
AC30	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2. AŞAMA	%99,87	AC29 AC62 AC66
AC32	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2. AŞAMA	%100	AC57
AC33	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2. AŞAMA	%100	-
AC34	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2. AŞAMA	%99,86	AC3 AC37 AC44 AC52
AC40	<i>Kocuria salsicia</i>	2. AŞAMA	%100	-
AC42	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2. AŞAMA	%100	AC54
AC43	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2. AŞAMA	%100	AC27 AC38 AC39 AC47 AC51 AC53
AC45	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2. AŞAMA	%100	AC46
AC49	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3. AŞAMA	%100	-
AC55	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3. AŞAMA	%100	-
AC56	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3. AŞAMA	%100	-
AC58	<i>Staphylococcus equorum</i>	3. AŞAMA	%100	-
AC60	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3. AŞAMA	%100	-
AC61	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3. AŞAMA	%100	-
AC63	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3. AŞAMA	%100	-
AC64	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3. AŞAMA	%100	AC65
AC67	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	4. AŞAMA	%100	-
AC69	<i>Kocuria rhizophila</i>	4. AŞAMA	%100	-
AC74	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	4. AŞAMA	%100	-
AC75	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	4. AŞAMA	%100	-
AC76	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	4. AŞAMA	%100	-
AC77	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	4. AŞAMA	%100	-
AC78	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	4. AŞAMA	%100	-

Bu çalışmada M17 agar laktik streptokokları belirlemek amacıyla kullanılmıştır. M17 besiyeri bize MRS agar ile tespit edemediğimiz çeşitli bakterileri (*Carnobacterium divergens*, *Weissella jogaejeotgali*) tespit etmemize olanak sağlamıştır. Ancak ulaşılan sonuçlara bakıldığında pastırmada katalaz (-) laktik asit bakterilerinin, katalaz (+) bakterilere göre çok daha az bulunduğunu söyleyebiliriz.

Pastırma üretim sürecine bakıldığında M17 besiyerinden izole edilen bakteriler arasında %62,5 oranla *Staphylococcus saprophyticus* baskın tür olarak karşımıza çıkmıştır. Her aşamada gözlenen bu tür, aşamalar arasında %96,70 ile en yüksek oranda 2. aşamadan alınan örnekte izole edilmiştir. İkinci dominant tür olarak *Brochothrix thermosphacta* %17,5 oranla karşımıza çıkmıştır. Bu tür ise sadece 1. aşamadaki örnekte gözlemlenmiş, diğer aşamalarda gözlemlenmemiştir. Bu mikroorganizmaları %5 ile *Lactobacillus sakei* ve *Staphylococcus equorum* takip etmiştir. *L. sakei* sadece 3. ve 4. aşamada tespit edilirken, *S. equorum* sadece 1. ve 3. aşamada gözlenmiştir. Sayılan türler dışında geriye kalan türlerin ise Şekil 3.5'te gösterilen ayrıntılı grafikte hangi aşamalarda belirlendikleri verilmiştir.



Şekil 3.5: Pastırma Aşamalarına Göre M17 İzolatlarının Yüzde Dağılımları

Et ürünleri ile ilgili olarak bilinen mikrobiyal popülasyon, genellikle *Enterobacteriaceae*, LAB, *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas* ve bazı *Clostridium* üyeleridir (Borch vd., 1996; Doulgeraki vd., 2012; Karabıyıklı vd., 2015).

Brochothrix thermosphacta'nın neden etten izole edilebildiği tam anlamıyla açıklanamamıştır. Bu bakterinin izole edilmesi için sıcaklığın düşük olması bir sebep olarak görülse de çoğu gıda işlemeden önce soğutulmasına rağmen *B. thermosphacta*, süt veya sebze ürünlerinden izole edilmez. Etin, bu bakterinin büyümesini destekleyen farklı kimyasal ve biyokimyasal parametreleri birleştirmesi muhtemel bir sebeptir

(Labadie, 1999). Bu bakteri çalışılan örneklerden sadece 1. aşamadaki etten %52 oranında izole edilmiştir (şekil 3.5).

Psikrotrofik *B. thermosphacta*, önemli bir et bozulma bakterisidir ve genellikle taze etlerin bozulmasına neden olur (Doulgeraki vd., 2012). *B. thermosphacta*'nın hem aerobik hem de vakumlu depolama sırasında et üzerinde gelişmesi, onu önemli bir et kolonizatr ve bozulmamış mikrobiyotanın önemli bir parçası yapar (Labadie, 1999). Ayrıca zaman zaman baskın organizma olabilir (Borch vd., 1996).

Doulgeraki vd., (2012) bazı bozulma bakterilerinin anaerobik koşullar altında soğukta saklanan etlerde LAB ile rekabet edemediklerini, ancak *B. thermosphacta*'nın her zaman MAP'ta depolanan sığır etinde bulunduğunu gözlemlemişlerdir.

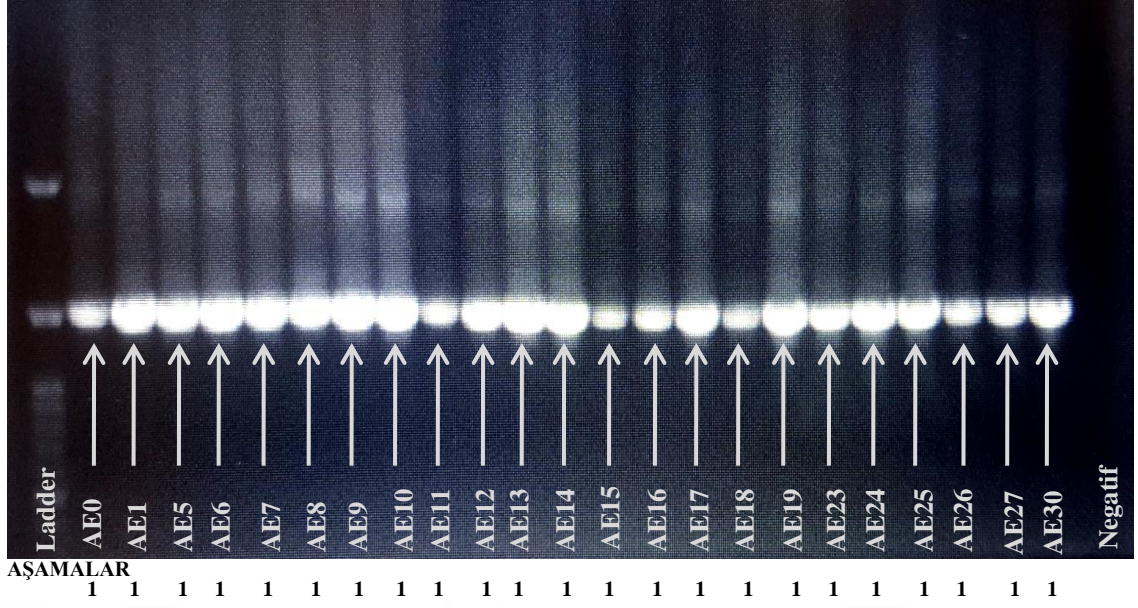
Fettahoğlu vd. (2019) yaptıkları farklı krleme işlemleri altında üretilen pastırmadan izole edilen gram pozitif, katalaz pozitif kokun biyolojik çeşitliliği ve karakterizasyonu adlı çalışmada MSA besiyerinde geliştirilen 87 izolat, fenotipik olarak, *Staphylococcus vitulinus* (45 izolat), *S. xylosus* (16 izolat), *S. saprophyticus* (15 izolat), *S. equorum* (8 izolat) ve *S. gallinarum* (3 izolat) olarak tanımlanmıştır. Et rnlerinde potansiyel bir başlangıç kültürü olarak da kabul edilen bir tür olan *S. equorum*, krleme koşullarına bağlı olarak %9,52 ile %22,73 oranında tespit edilmiştir.

Erol, zdemir ve Kısa (1998) yaptıkları çalışmada, P agara ekim yaparak pastırmaların mikroflorasında stafilokokların dominant olduğunu ve *S. saprophyticus* ile *S. xylosus* ve *Micrococcus varians*'ın her iki cins içerisinde en sıklıkla identifiye edilen türler olduğunu saptamışlardır. Ayrıca klasik yöntemle tanımlanan suşların %58,6'sı *S. saprophyticus* olarak saptanmıştır.

Choi vd. (2014) yaptıkları çalışmada *Staphylococcus* türlerinin ortak bir özelliği olarak yüksek NaCl konsantrasyonlarına tolerans gösterdiklerini bildirmişlerdir. Bu da bu türün neden pastırmadan dominant olarak izole edildiğini açıklayabilir.

3.3.3. VRBD zolatları

Gruplandırma işlemiyle birlikte 30 adet VRBD agar izolatı 23 adete düşürülmüştür. Bu 23 adet bakteri, dizilimlerinin belirlenmesi amacıyla 16S PCR işlemine tabi tutulmuştur (şekil 3.6).



Şekil 3.6: VRBD İzolatlarının 16S PCR Elektroferez Görüntüsü

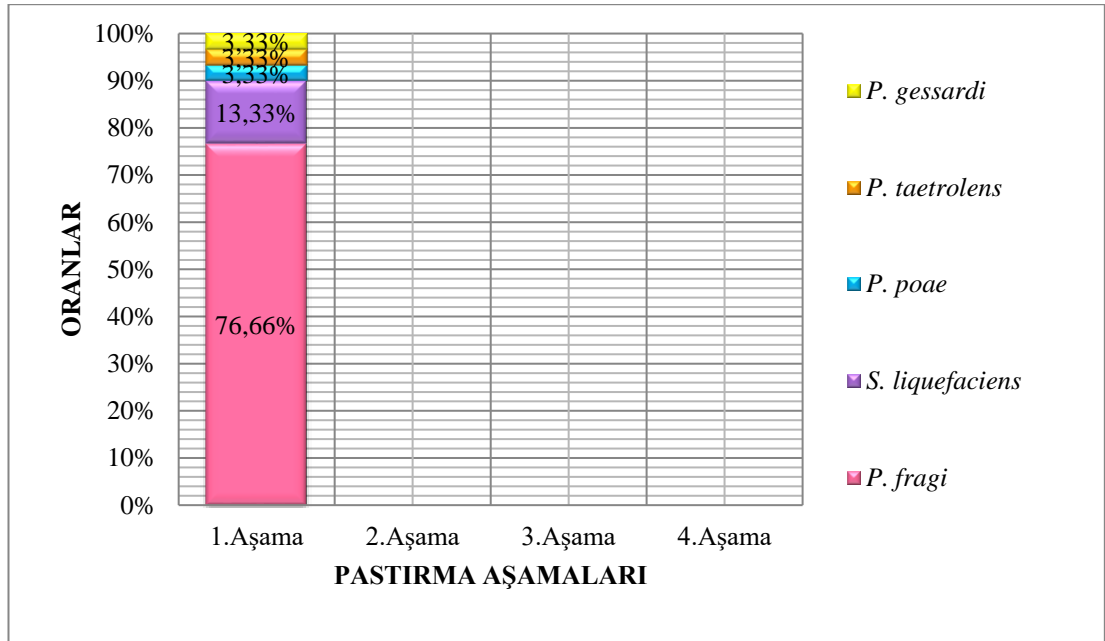
Sekans analiziyle birlikte elde edilen kromotogramlar ilgili kütüphaneler ile karşılaştırıldığında 23 adet izolatın *Enterobacteriaceae* üyeleri olmayıp, *Pseudomonas fragi*, *Serratia liquefaciens*, *Pseudomonas poae*, *Pseudomonas taetrolens*, *Pseudomonas gessardi* türlerinden oluştuğu gözlemlenmiştir (Tablo 3.7). Sekans analiziyle ulaşılan sonuçların ayrıntılı açıklaması Tablo 3.7’de verilmiştir.

Tablo 3.7: Sekans Sonucuyla Elde Edilen Bulgular

İzolat Kodu	Tespit Edilen Bakterinin Türk ve Cins Adı	Alındığı Aşama	BLAST Benzerlik Oranı	Temsil Ettiği İzolatlar
AE0	<i>Pseudomonas fragi</i>	1. AŞAMA	%100	-
AE1	<i>Serratia liquefaciens</i>	1. AŞAMA	%100	AE2 AE3 AE4
AE5	<i>Pseudomonas fragi</i>	1. AŞAMA	%100	AE22
AE6	<i>Pseudomonas fragi</i>	1. AŞAMA	%100	-
AE7	<i>Pseudomonas fragi</i>	1. AŞAMA	%100	-
AE8	<i>Pseudomonas fragi</i>	1. AŞAMA	%100	-
AE9	<i>Pseudomonas fragi</i>	1. AŞAMA	%99,87	-
AE10	<i>Pseudomonas fragi</i>	1. AŞAMA	%100	-
AE11	<i>Pseudomonas fragi</i>	1. AŞAMA	%100	-
AE12	<i>Pseudomonas poae</i>	1. AŞAMA	%100	-

AE13	<i>Pseudomonas fragi</i>	1. AŞAMA	%100	-
AE14	<i>Pseudomonas fragi</i>	1. AŞAMA	%100	-
AE15	<i>Pseudomonas fragi</i>	1. AŞAMA	%100	-
AE16	<i>Pseudomonas fragi</i>	1. AŞAMA	%100	-
AE17	<i>Pseudomonas fragi</i>	1. AŞAMA	%100	-
A18	<i>Pseudomonas taetrolens</i>	1. AŞAMA	%100	-
AE19	<i>Pseudomonas fragi</i>	1. AŞAMA	%100	-
AE23	<i>Pseudomonas fragi</i>	1. AŞAMA	%100	AE00 AE20 AE21
AE24	<i>Pseudomonas fragi</i>	1. AŞAMA	%99,88	-
AE25	<i>Pseudomonas fragi</i>	1. AŞAMA	%99,88	-
AE26	<i>Pseudomonas fragi</i>	1. AŞAMA	%100	-
A27	<i>Pseudomonas gessardi</i>	1. AŞAMA	%100	-
AE30	<i>Pseudomonas fragi</i>	1. AŞAMA	%100	-

VRBD agarda bakteri varlığı sadece 1. aşama olarak adlandırılan 2. tuzlama sonrasında alınan et örneğinde gözlemlenmiştir. Pastırmadaki en baskın tür %76,66 oranla *Pseudomonas fragi* olarak karşımıza çıkmaktadır. *Serratia liquefaciens* ise %13 oranıyla ikinci baskın tür olarak bulunmuştur. Bu türleri *Pseudomonas poae* (%3,33), *Pseudomonas taetrolens* (%3,33) ve *Pseudomonas gessardi* (%3,33) türleri takip etmektedir (Şekil 3.6).



Şekil 3.7: Pastırma Aşamalarına Göre VRBD Agarda İzole Edilen Türlerin Yüzde Dağılımları

İnat (2008) yaptığı araştırmada, farklı araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda üretim başlangıcında enterobakterilerin numunelerde bulunmasına karşın, son üründe saptama sınırlarının altında kaldığını, bunun da genelde a_w değerinin düşmesinden, sarımsağın antimikrobiyal etkisinden veya nitritin Gram (-) bakteriler üzerine olan baskılayıcı etkisinden kaynaklandığını bildirmiştir. Ayrıca Marin vd., 1995 yılında yaptıkları çalışmada üretim başlangıcında ette bulunan enterokokların, salamura işlemi sonunda dahi sayılarını muhafaza ettiklerini, ancak baskılama işleminin sonunda sayılarında azalma olduğunu saptamışlardır (İnat, 2008). Çalışmaların birçoğu *Enterobacteriaceae*'nin pastırma işlemlerinde hayatta kalamayacağını göstermiştir (Kaban, 2009; z vd., 2017).

Hazar, Kaban ve Kaya (2017) yaptıkları çalışmada VRBD agar kullanmıştır. *Enterobacteriaceae* sayısı, tüm numunelerde saptanabilir seviyenin altında tespit edilmiş ve pastırma parçalarının içlerinde tespit edilmemiştir. Parçaların yüzeyinde, tuzlama sonrası aşamanın sonunda ortalama sayılar çok daha düşük ve enterokokların kuruma, olgunlaşma safhasının sonunda ortadan kayboldukları bildirilmiştir.

Pseudomonas cinsinin çeşitli türleri sıklıkla aerobik olarak depolanan taze gıdaların bozulmasının ana nedensel ajanları olarak kabul edilir. Bu mikroorganizma genellikle birkaç gıdanın bozulmasına sebep olsa da, etin demir ihtiyacı ve proteolitik enzim salınımı için kendine özgü sistemi de dahil olmak üzere çeşitli nedenlerle ekolojik nişi olabileceği kabul edilmiştir. Daha ileri araştırmalarda bu tür sonuçların yorumlanması, taze gıdaların depolanmasıyla ilişkili mikrobiyal ekoloji hakkında önemli bilgiler sağlayabilir (Ercolini vd., 2007).

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın amacı, ülkemizde geleneksel olarak sıkça tüketilen bir besin maddesi olan pastırmanın üretim sürecindeki mikrobiyal profilinin belirlenmesidir. Pastırma üretim sürecinin belirli aşamalarından alınan dört farklı örneğe bazı kimyasal ve mikrobiyolojik analizler yapılmıştır. Yapılan deneyler sonucu elde edilen veriler aşağıda özetlendiği gibidir.

Pastırma örneklerine uygulanan kimyasal analizlerden pH analizi sonuçlarına göre, üretim süresinde ilk aşamadan sonra bir artış gözlemlenmiştir. Analizlere göre, en yüksek pH değeri 2. 3. ve 4. örnekte sırasıyla $5,73\pm 0,01$, $5,81\pm 0,005$ ve $5,80\pm 0,015$ gözlemlenirken en düşük pH değeri ise 2. tuzlamadan sonraki et olan 1. örnekte gözlemlenmiştir ($5,63\pm 0,02$). Çalışmamızda tespit edilen pH değerleri standartlarla ve şimdije kadar yapılan çoğu araştırma ile uyumludur.

Uygulanan su aktivitesi analizi sonuçlarına bakıldığında üretim sürecindeki en düşük değer, soğuk presleme sonrası ve çemenleme işlemi öncesi aşamalarında sırasıyla $0,859\pm 0,002$ ve $0,862\pm 0,001$ olarak ölçülürken, en yüksek değer ise 2. tuzlamadan sonraki ette (1. örnek) $0,923\pm 0,003$ olarak tespit edilmiştir. Çoğu çalışmada belirtildiği gibi fermantasyon sürecinde su aktivitesindeki en büyük düşüş bu çalışmada da soğuk presleme işleminden sonra gerçekleşmiştir. Baskılama işlemiyle birlikte et su kaybetmiştir. Su aktivitesi en yüksek değerine ise çemen hamuruyla kaplı olan son örnekte ulaşmıştır. Bu yükselişin kullanılan çemen hamurunun içerisinde yer alan suyun ete tıfıse olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Su aktivitesi değerleri genel anlamda diğer birçok çalışma ile uyumlu ve standartlara uygun bulunmuştur.

Toplam mezofilik aerobik bakterilerin belirlenmesi için PCA ekimi sonucu en yüksek bakteri yükü çemenleme işleminin öncesinde ve son ürün olan çemenlenmiş pastırmada sırasıyla $7,13 \pm 0,016$ log kob/g ve $7,15 \pm 0,053$ log kob/g olarak tespit edilirken, en düşük bakteri yükü ise $4,88 \pm 0,011$ log kob/g olarak 2. tuzlamadan sonraki ette gözlemlenmiştir. Bakteri yükü seçilen aşamalar arasında artış göstermiştir. Yapılan diğer çalışmalardaki veriler ile paralel sonuçlar bulunmuştur.

Laktik asit bakterilerinin mikrobiyal yükünün belirlenmesi amacıyla MRS besiyerine yapılan ekim sonucunda üretim sürecindeki en yüksek üreme çemenleme işleminin öncesinde ve son ürün olan çemenlenmiş pastırmada sırasıyla $6,83 \pm 0,054$ log kob/g ve $6,64 \pm 0,014$ log kob/g olarak sayılırken, en düşük üreme ise $4,23 \pm 0,051$ log kob/g olarak 2. tuzlamadan sonraki ette sayılmıştır. Aşamalar arasında çemenleme işleminin öncesi ve son ürüne kadar bir yükseliş gözlemlenmiştir. Genel olarak çalışmada tespit edilen laktik asit bakteri yükü bazı çalışmalara benzerlik gösterirken diğer bazı çalışmalardan ise yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu farklılık pastırma üretiminde kullanılan hayvan etinin özelliklerinden, hammaddenin işlendiği ortamın mikrobiyal yükünün farklı olmasından, üretimde kullanılan tuzun özelliği ve miktarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

M17 besiyerinde gelişen bakteri yükünün belirlenmesi için yapılan sayımda en yüksek bakteri yükü 3. ve 4. aşamadaki numunelerde sırasıyla $7,25 \pm 0,16$ log kob/g ve $6,65 \pm 0,12$ log kob/g olarak tespit edilmiştir. En düşük bakteri yükü ise 1. ve 2. aşamadaki numunelerde sırasıyla $4,92 \pm 0,020$ log kob/g ve $4,63 \pm 0,025$ log kob/g olarak bulunmuştur. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda M17 besiyeri kullanılarak üretim sürecinde mezofilik kokların sayımını yapan bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Enterobacteriaceae grubu bakterilerin sayımı amacıyla VRBD besiyerine ekim yapılarak sadece ilk aşama olan 2. tuzlama sonrasında alınan örnekte üreme gözlemlenmiştir. Bu aşamadaki bakteri yükü $4,60 \pm 0,054$ log kob/g olarak tespit edilmiştir. Diğer aşamalarda ise bakteri yükü sıfır olarak bulunmuştur. Genel anlamda bu durumun düşen su aktivitesinden kaynaklandığı ve laktik asit bakterilerinin *Enterobacteriaceae* vb. Gram (-) bakterilerin gelişmesini olumsuz yönde etkilediği de bilinmektedir. Çalışmamızda tespit ettiğimiz bu durum şimdiye kadar yapılmış çoğu çalışmayla desteklenmektedir. Genel anlamda ilk aşamalarda üreme görülmekle birlikte diğer aşamalarda tespit edilebilir seviyelerin altında olduğu bildirilmiştir.

Çalışmada laktik asit bakterileri, M17 besiyerinde gelişen bakteriler ve *Enterobacteriaceae* grubu bakterilerin identifikasyonu amacı ile izole edilen bakteriler arasından sırasıyla 86 adet laktik asit bakterisi, 80 adet M17 izolatu ve 30 adet *Enterobacteriaceae* grubu bakterisi seçilerek DNA izolasyonuna tabi tutulmuşlardır. Ardından elde edilen izolatları gruplandırmak için Rep-PCR sonrası elektroforez ile parmak izi görüntüleri elde edilmiştir. Gruplandırma sonucunda 62 laktik asit bakterisi, 47 adet M17 izolatu ve 23 adet VRBD izolatının 16S rRNA dizilimleri belirlenmiştir. Çalışmamız, diğer çalışmalardan farklı olarak laktik asit bakterilerini son ürüne bağlı kalmayarak bütün üretim sürecinde tanımlayan ilk çalışmadır.

Dizilim analizi sonuçlarına göre, izole edilen 86 laktik asit bakterilerininin 45 tanesini *Lactobacillus sakei*, 16 tanesini *Weissella viridescens*, 10 tanesini *Lactobacillus graminis*, 6 tanesini *Weissella halotolerans*, 3 tanesini *Lactobacillus curvatus*, 2 tanesini *Leuconostoc citreum*, 2 tanesini *Weissella helenica* geriye kalan 2 tanesini *Weissella cibaria* ve *Weissella confusa* oluşturmaktadır. Pastırma üretiminin her aşamasında dominant bakteri olarak *L. sakei* karşımıza çıkmıştır. LAB sayısı her aşamada artış göstermiştir. 1. 2. ve 3. aşamalarda varlığını gösteren ve ikinci baskın bakteri olan *Weissella viridescens*'e son aşamada rastlanmamıştır. Yine ilk üç aşamada varlığını sürdüren *Lactobacillus graminis*'e son aşamada rastlanmamıştır. Etin çemenlenmesiyle birlikte ilk üç aşamada olmayan *Weissella helenica* ve *Leuconostoc citreum* bakterileri tespit edilmiştir. Bu bakterilerin çemen hamurundan kaynaklandığı düşünülmüştür. *Weissella halotolerans* tuza karşı dayanıklı bir bakteri olduğundan istisnasız her aşamada tespit edilmiştir.

M17 agardan izole edilen 80 suşun *Brochothrix thermosphacta*, *Psychrobacter faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Leuconostoc citreum*, *Bacillus subtilis*, *Carnobacterium divergens*, *Staphylococcus equorum*, *Kocuria salsicia*, *Lactobacillus sakei* ve *Weissella jogaejeotgali* türlerinden oluştuğu belirlenmiştir. *Staphylococcus saprophyticus* birinci baskın tür olarak her aşamada tespit edilirken, *B. thermosphacta* ikinci baskın tür olarak sadece 1. aşamada gözlenmiştir. M17 agar laktik streptokokları belirlemek amacıyla kullanılmasına rağmen sonuçlara bakıldığında pastırmada katalaz (-) laktik asit bakterilerininin, katalaz (+) bakterilere göre çok daha az bulunduğu tespit edilmiştir. Buna rağmen, MRS agar ile tespit edilememiş *Carnobacterium divergens*, *Leuconostoc citreum* ve *Weissella jogaejeotgali* türleri M17 besiyeri sayesinde saptanmıştır.

VRBD agarda incelenen *Enterobacteriaceae* grubu bakteriler sadece 2. tuzlama sonrasında alınan et örneğinde gözlemlenmiştir. İzole edilen bakterilerin tanımlanması, gelişen bakterilerin *Enterobacteriaceae* üyesi olmayıp *Pseudomonas* türleri olduğunu göstermiştir. Pastırmadaki en baskın türü %76,6 oranla *Pseudomonas fragi* olarak saptanmıştır. Bu türleri *Serratia liquefaciens* (%13), *Pseudomonas poae*, *Pseudomonas taetrolens*, *Pseudomonas gessardi* türleri takip etmektedir.

Araştırmada moleküler tanımlama yöntemlerinden PCR metodu etkili bir şekilde kullanılarak başarılı sonuçlar alınmıştır. Bu sonuçlar ilerideki birçok çalışmaya ışık tutacak ve yeni çalışmalar için temel oluşturacaktır. Dizilim analizi sonucunda aynı tür olarak belirlenen bazı izolatların rep-PCR ile birbirlerinden çok farklı bantlar vermeleri üzerine yeni bir çalışma yapılabilir. Bunun nedeni, olarak kullanılan GTG5 primerinin bazı tür altı (alt tür veya suş) farklılıkları tespit etmesinden kaynaklanması gösterilebilir. İleride yapılacak çalışmalarla bu alt türler tanımlanabilir. Ayrıca daha sonra yapılacak çalışmalarda iki farklı pastırma üretiminden örnekler seçilerek bu sonuçlar karşılaştırılabilir. Elde edilen veriler pastırma üretim sürecini, üretilen pastırmanın kalitesini, insan sağlığına olan faydası ve besin değerinin iyileştirilmesinde kullanılabilir.

KAYNAKÇA

- Abdollahniya, D., Hosseini, S. M., Baghbaderani, B. K., Mordadi, A., & Arabestani, M. R. (2018). Identification of Lactobacillus species isolated from traditional dairy products using RAPD-PCR. *Avicenna J Clin Microbiol Infect*, 5, 7-13.
- Aberle, E. D., Forrest, J. C., Gerrard, D. E., & Mills, E. W., (2012). *Principles of Meat Science*, USA, 1.
- Adıgüzel, G., & Atasever, M. (2009). Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Turkish dry fermented sausage. *Romanian Biotechnological Letters*, 14(1), 4130-4138.
- Ahhmed, A. M., Kaneko, G., Ushio, H., Inomata, T., Yetim, H., Karaman, S., Muguruma M., & Sakata, R. (2013). Changes in physico chemical properties of proteins in Kayserian Pastirma made from the *M. semimembranosus* muscle of cows during traditional processing. *Food Science and Human Wellness*, 2(1), 46-55.
- Ahhmed, A. M., Birişik, C., Karaman, S., Öztürk, İ., Bilgen, M., Kaneko, G., Ushio H., Sakata R., & Yetim, H. (2014). Improvements in functional properties of dry cured meat using fermented soy paste. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 22(5), 446-449.
- Akköse, A. (2017). Effect of freezing/thawing process on salting kinetics and thermal properties of beef. *CyTA-Journal of Food*, 15(3), 418-424.
- Aksu, M. İ., & Kaya, M. (2001). Some microbiological, chemical and physical characteristics of pastirma marketed in Erzurum. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 25(3), 319-326.
- Aksu, M. I., & Kaya, M. (2005). Effect of storage temperatures and time on shelf-life of sliced and modified atmosphere packaged Pastirma, a dried meat product, produced from beef. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(8), 1305-1312.

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST And PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs. *Nucleic Acids Research*, 25 (17), 3389-3402.
- Anar, Ş. (2012). *Et ve et ürünleri teknolojisi*, Bursa, Dora Yayıncılık, 8-359.
- Anıl, N. (1988). Türk pastırması; modern yapım tekniğinin geliştirilmesi ve vakumla paketlenerek saklanması. *Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 4(1), 363-375.
- Anonim, (2002). Türk Standartları Enstitüsü Pastırma Standardı. ICS 67.120.10. TS 1071/T3, Ankara.
- Anonim, Interscience, 400 P & Bag Mixer, Quick user guide.
- Anonim, Shimadzu Spectrophotometer, BioSpec-nano, Instruction manual.
- Anonim, Thermo Scientific, User guide, Pub. No. MAN0012663, Rev. Date 12 October 2016.
- Anonim, (2009). Türk Gıda Kodeksi et, hazırlanmış et karışımları ve et ürünleri tebliği (Tebliğ no: 2018/52).Resmi Gazete, Sayı: 30670.
- Anonymous, (1990). Manual on simple methods of meat preservation. *FAO Animal Production and Health Paper 79*. Rome: Food and Agriculture Organization of The United Nations. M-25 ISBN 92-5-102744-7.
- Anonim, Invitrogen PureLink Genomic DNA Kits, User guide, Catalog Numbers K1820-01, K1820-02, K1821-04, Publication Number MAN0000601.
- Aras, Z. (2011). Mikrobiyolojide kullanılan hızlı tanı yöntemleri. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68(2), 97-104.
- Arslan, A. (2013). *Et muayenesi ve et ürünleri teknolojisi*. Malatya, Medipres Yayıncılık, 701-708.
- Aydın, A., & Sudağdan, M. (2016). Gıda Mikrobiyolojisinde Moleküler Biyolojik Tekniklerin Kullanımı ve Tiplendirme Yöntemleri. *Türkiye Klinikleri J Food Hyg Technol-Special Topics*, 2(1), 1-9.
- Batman, S. G., Sipahioglu, O., & Yetim, H. (2016). Using infrared drying method for producing pastırma. *62nd International Congress of Meat Science and Technology*, Thailand.
- Baysal, A., (2013). *Genel Beslenme*, Hatiboğlu Yayınevi, Ankara, 85.

- Baysal, A., (2014). *Beslenme*, Hatiboğlu Yayınları, Ankara, 274-275.
- Bennani, L., Zenati, Y., Faid, M., & Ettayebi, M. (1995). Physico-chemical and microbiological characteristics of a dried salted meat product (Kaddid) in Morocco. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 201(6), 528-532.
- Berkmen, L. (1940). Türkiye'de ette, et müstahzaratında bilhassa pastırmada hastalık âmillerinin mevcudiyetile, dayanma müddetleri üzerinde araştırmalar. *T.C. Ziraat Vekaleti, Yüksek Ziraat Enstitüsü Çalış.*, 72.
- Billaud, C., & Adrian J. (2001). Composition, nutritional value and physiological properties. *Fenugreek Sciences-des-ailment*, 21, 3-26.
- Blaxter, M. (2003). Molecular systematics: countingan gels with DNA. *Nature*, 421(6919), 122.
- Borch, E., Kant-Muemansb, M. L., & Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat products and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 103-120.
- Burfoot, D., Everis, L., Mulvey, L., Wood, A., & Campden, R. B. (2010). Literature review of microbiological hazards associated with biltong and similar dried meat products. *Food Standard Agency, London*, 87.
- Cerit, H. (2003). Determination of the allele frequency of some genomic loci in a Holstein cattle population and its importance in individual identification. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 27(1), 81-91.
- Choi, S., Jung, J., Jeon, C. O., & Park, W. (2014). Comparative genomic and transcriptomic analyses of NaCl-tolerant *Staphylococcus* sp. OJ82 isolated from fermented seafood. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(2), 807-822.
- Collins, M. D., Samelis, J., Metaxopoulos, J., & Wallbanks, S. (1993). Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(6), 595-603.
- Çakıcı, N., & Aksu, M., İ. (2012). Pastırma çeşitleri ve özellikleri. *Conference: III. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, Bildiri Kitabı*, Konya, 774-776.

- Çakır, İ., & Çakmakçı M., L. (2005). Gıdalarda patojen mikroorganizma aranmasında kullanılan moleküler genetik yöntemler. *On-line Mikrobiyoloji Derg*, 3, 1-7.
- Çetinkaya, E., & Ayhan, K. (2012). Mikrobiyolojide kullanılan bazı moleküler teknikler. *Karaelmas Science and Engineering Journal*, 2(1), 53-62.
- Demirci, M., (2014). *Beslenme*. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No: 44, Tekirdağ, 85-86.
- Deniz, E., Mora, L., Aristoy, M. C., Candoğan, K., & Toldrá, F., (2016). Free amino acids and bioactive peptides profile of Pastırma during its processing. *Food Research International*, 89, 194-201.
- Denktaş, S. (2017). Et ve et ürünlerinin fonksiyonelliğinin artırılması. *Kocatepe Veterinary Journal*, 10 (2), 106-117.
- Dinçer, E., & Kıvanç, M. (2012). Characterization of lactic acid bacteria from Turkish Pastırma. *Annals of Microbiology*, 62 (3), 1155-1163.
- Doğruer, Y. (1992). Farklı tuzlama süreleri ve baskılama ağırlıklarının pastırma kalitesine etkileri üzerine araştırmalar (Doctoral dissertation, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Doğruer, Y. (2001). Geleneksel pastırma üretiminde hindi ve tavuk etinin kullanılabilme imkanları. *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 17,3: 37-42.
- Doğruer, Y., Güner, A., Gürbüz, Ü., & Uçar, G. (2003). Sodyum ve potasyum nitratin üretim periyodu süresince pastırmanın kalitesine etkisi. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 27(4), 805-811.
- Doğruer, Y., Nizamlıoğlu, M., Gürbüz, Ü., & Kayaardı, S., (1998). Çeşitli çemen karışımlarının pastırma kalitesine etkisi II: Mikrobiyolojik nitelikler. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 22 (221-229).
- Doğruer, Y., Yalçın, S., Gürbüz, Ü., Nizamlıoğlu, M., & Atasever, M., (1997). Bromelin uygulamasının pastırmanın kimyasal, mikrobiyolojik ve duyusal kalitesine etkisi. *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 13(2), 83-89.
- Doğu, S. Ö., & Sarıçoban, C. (2015). Et kurutma teknolojisi ve dünyada tüketilen bazı kurutulmuş et ürünleri. *Journal of Food and Health Science* 1(3), 109-123.

- Doulgeraki, A. I., Ercolini, D., Villani, F., & Nychas, G. J. E. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 130-141.
- Duřková, M., Kameník, J., & Karpíšková, R. (2013). *Weissella viridescens* in meat products— a review. *Acta Veterinaria Brno*, 82(3), 237-241.
- Ekmekçi, M. Y. (2012). Tuzu azaltılmış pastırma üretiminde potasyum klorür ve kalsiyum klorür kullanımının bazı kalite özellikleri üzerine etkileri (Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı).
- Ercolini, D., Russo, F., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., & Villani, F. (2007). Simultaneous detection of *Pseudomonas fragi*, *P. lundensis*, and *P. putida* from meat by use of a multiplex PCR assay targeting the *carA* gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(7), 2354-2359.
- Erol, İ., Özdemir H., & Kısa Ö. (1998). Pastırmalardan izole edilen mikrokok ve stafilocokların klasik yöntem ve API-ID 32 STAPH sistemi ile karşılaştırmalı identifikasyonu. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi* 45, 135-144.
- Fettahoğlu, K., Çınar, K., Kaya, M., & Kaban, G. (2019). Biodiversity and characterization of gram-positive, catalase-positive cocci isolated from pastırma produced under different curing processes. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 43(1), 68-75.
- Filiz, E., & Koç İ. (2012). Bitkilerde DNA barkotları. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 12(1), 53-57.
- Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., & Olsen, G. J. (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2461-2470.
- Fukuda, K., Ogawa, M., Taniguchi, H., & Saito, M. (2016). Molecular approaches to studying microbial communities: targeting the 16S ribosomal RNA gene. *Journal of UOEH*, 38(3), 223-232.
- Fusco, V., Quero, G. M., Cho, G. S., Kabisch, J., Meske, D., Neve, H., Bockelmann, W., & Franz, C. M. A. P. (2015). The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology*, 6, 155.

- Gailani, M. B., & Fung, D. Y. (1989). Microbiology and water activity relationship in the processing and storage of Sudanese dry meat (Sharmoot). *Journal of Food Protection*, 52(1), 13-20.
- Göğüş, A. K. (1986). *Et Teknolojisi*. AÜ Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, 9-132.
- Gök, V., Obuz, E., & Akkaya, L. (2008). Effects of packaging method and storage time on the chemical, microbiological, and sensory properties of Turkish pastırma—A dry cured beef product. *Meat Science*, 80(2), 335-344.
- Gökalp, H., Y., Kaya M., & Zorba Ö. (2004). *Et Ürünleri İşleme Mühendisliği*. Atatürk Üniversitesi Yayınları No: 786. Erzurum, 247-270.
- Güner, A., Gönülalan, Z., & Doğruer, Y. (2008). Effect of tumbling and multi-needle injection of curing agents on quality characteristics of pastırma. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(1), 123-129.
- Gürbüz, Ü., Doğruer, Y., Yalçın, S., Nizamlıoğlu, M., & Güner, A. (2003). Pastırma yapım teknolojisinin geliştirilmesinde sıcak dumanlama uygulanması ve kaliteye etkisi. *Veterinerlik Bilimleri Dergisi*, 19. 1-2: 57-66.
- Gürbüz, Ü., Doğruer, Y., Nizamlıoğlu, M., Atasever, M., & Kayaardı, S. (1997). Bromelin uygulamasının depolama süresince pastırmanın bazı kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerine etkisi. *Veterinerlik Bilimleri Dergisi*, 13,2: 91-98.
- Gürsoy, N. C., & Otlu, B. (2017). Mikrobiyota çalışmalarında moleküler tanı yöntemleri. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 1, 56-67.
- Hazar, F. Y., Kaban, G., & Kaya, M. (2017). The effects of different processing conditions on biogenic amine formation and some qualitative properties in pastırma. *Journal of Food Science and Technology*, 54(12), 3892-3898.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and DeWaard, J.R., (2003). Biological identification sthrough DNA barcodes. *Proc R Soc B*, 270, 313–321.
- Helling, R. B., Goodman, H. M., & Boyer, H. W. (1974). Analysis of endonuclease R· EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *Journal of Virology*, 14(5), 1235-1244.
- Hui, Y. H., Nip, W. K., Rogers, R. W., & Young, O., A. (2001). *Meat Science and Applications*. Marcel Dekker, ABD, 6-18.

- İnat, G., (2008). Pastırma üretiminde kontaminasyon kaynaklarının belirlenmesi ve iyileştirme koşullarının araştırılması. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 27(1-2), 53-59.
- Jones, M. J., Tanya, V. N., Mbofung, C. M. F., Fonkem, D. N., & Silverside, D. E. (2001). A microbiological and nutritional evaluation of the West African dried meat product, Kilishi. *The Journal of Food Technology in Africa*, 6(4), 126-129.
- Kaban, G., (2009). Changes in the composition of volatile compounds and in microbiological and physicochemical parameters during pastırma processing. *Meat Science*, 82(1), 17-23.
- Kaban, G. (2013). Sucuk and pastırma: Microbiological changes and formation of volatile compounds. *Meat science*, 95(4), 912-918.
- Kandler, O., Schillinger, U., & Weiss, N. (1983). *Lactobacillus halotolerans* sp. nov., nom. rev. and *Lactobacillus minor* sp. nov., nom. rev. *Systematic and Applied Microbiology*, 4(2), 280-285.
- Karabıyıklı, Ş., Öncül, N., & Cevahiroğlu, H. (2015). Microbiological safety of pastrami: A traditional meat product. *LWT-Food Science and Technology*, 64(1), 1-5.
- Karasoy, M. (1952). Menşei Hayvani Gıda Konservelerinden Bazıları Üzerinde Tetkikat ve Hayvanlardan Gıda Vasıtasıyla İnsanlara Bulaşan Mikropların Gıda Konservelerinde Yaşama Müddetleri. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Yayınevi* (31).
- Kayaşlı, K., (2019). *Lactobacillus* izolatlarının probiyotik fonksiyonları referans alınarak *rapd-pcr* ile ayrımının yapılması (Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı).
- Kılıç, B. (2009). Current trends in traditional Turkish meat products and cuisine. *LWT-Food Science and Technology*, 42(10), 1581-1589.
- Kıran, F., & Osmanağaoğlu, Ö. (2011). Laktik asit bakterilerinin (LAB) identifikasyonunda/tiplendirmesinde kullanılan moleküler yöntemler. *Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Fen Bilimleri Dergisi*, 27(1), 62-74.
- Kızıldemir Ö., Öztürk E., & Sarıışık M. (2014). Türk mutfak kültürünün tarihsel gelişiminde yaşanan değişimler. *Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*, 14(3), 191-210.

- Kim, T. H., Choi, Y. S., Choi, J. H., Han, D. J., Kim, H. Y., Lee, M. A., Shim, S., Y., Paik, H., D., & Kim, C. J. (2010). Physico chemical properties and sensory characteristics of semi-dried pork jerky with ricebran fiber. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 30(6), 966-974.
- Kök F. (2003). Pastırma üretim teknolojisini geliştirme çabaları. *Uludag University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine* 22, 1-2-3: 109-114.
- Labadie, J. (1999). Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. *Meat Science*, 52(3), 299-305.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (62), e3923.
- Leistner, L. (1988). Hürden-Technologie bei Fleischerzeugnissen und anderen Lebensmitteln. Lebensmittelqualität Wissenschaft und Technik, R Stufe (Hrsg), Wissenschaftliche Arbeitstagung, 25 Jahre Institut für Forschung und Entwicklung der Maizena Ges. mbH.
- Leistner, L. (1991). Fermented and intermediate-moisture meat products. *Outlook on Agriculture*, 20(2), 113-119.
- Lewus, C. B., Kaiser, A., & Montville, T. J. (1991). Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Applied Environmental Microbiology*, 57(6), 1683-1688.
- Mamani-Linares, W., & Cayo, F. (2011). Características físico-químicas del charqui de llama. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 22(4), 290-300.
- Martín-Platero, A. M., Maqueda, M., Valdivia, E., Purswani, J., & Martínez-Bueno, M. (2009). Polyphasic study of microbial communities of two spanish farmhouse goats' milk cheeses from sierra de aracena. *Food Microbiology*, 26 (3), 294-304.
- Masco, L., Huys, G., Gevers, D., Verbruggen, L., & Swings, J. (2003). Identification of *Bifidobacterium* species using rep-PCR fingerprinting. *Systematic And Applied Microbiology*, 26(4), 557-563.
- Novasina (2011): Water activity in pet foods. Ed:11-2011, Novasina AG, Switzerland.

- Okutucu, B., & Pehlivan, S. (2003). Reverz-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Uygulama Alanları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 12(2), 138, 149.
- Öz, E., Kaban, G., Barış, Ö., & Kaya, M. (2017). Isolation and identification of lactic acid bacteria from pastırma. *Food Control*, 77, 158-162.
- Özdemir, H., & Sırıken B., (1996). Pastırmadan izole edilen laktobasillerin bazı biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi* 43: 307-310.
- Özdemir, H., Sireli, U. T., Sarımehmetoğlu, B., & Inat, G. (1999). Ankara'da tüketime sunulan pastırmalarda mikrobiyal floranın incelenmesi. *Turkish Journal Veterinary and Animal Sciences*, 23 (Suppl 1), 57-62.
- Öztan, A., (1999). *Et bilimi ve teknolojisi*. Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Yayınları No: 19, 342s, Ankara.
- Öztürk, İ., (2015). Presence, changes and technological properties of yeast species during processing of pastırma, a Turkish dry-cured meat product. *Food Control*, 50, 76-84.
- Rademaker, J. L., Herbet, H., Starrenburg, M. J., Naser, S. M., Gevers, D., Kelly, W., Swings, J., Van Hylckama Vlieg, J. E. (2007). Diversity analysis of dairy and nondairy *Lactococcus lactis* isolates, using a novel multilocus sequence analysis scheme and (GTG) 5-PCR fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (22), 7128-7137.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1-1, 86.
- Shokralla, S., Hellberg, R. S., Handy, S. M., King, I., & Hajibabaei, M. (2015). A DNA mini-barcoding system for authentication of processed fish products. *Scientific Reports*, 5, 15894.
- Tayar, M. & Korkmaz N., H., (2007). *Beslenme ve Sağlıklı Yaşam*, Nobel Akademik Yayıncılık, Bursa.
- Tayar, M., Korkmaz N., H., & Özkeleş E., (2013). *Beslenme İlkeleri*, Dora Basım Yayın, Bursa.
- Tekinşen O., C., & Doğruer Y., (2000). *Her Yönüyle Pastırma*. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.

- Temelli, S. (2011). Geleneksel yöntemlerle üretilen kurutulmuş et ürünleri "dried meat products manufactured by traditional methods". *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 30(2), 61-66.
- Toldrá, F. (Ed.). (2010). *Handbook of Meat Processing*. John Wiley & Sons.
- Toldrá, F., Hui Y., H., Astiasarán, I., Sebranek J., G., & Règine T., (2015). *Handbook of Fermented Meat and Poultry*, UK, John Wiley & Sons, 178.
- Türker, N., Türkmen, M., & Caymaz, E., (2019). Geleneksel bir ürün olarak Kastamonu pastırması. *Gastroia: Journal of Gastronomy and Travel Research*, 3(2), 264-277.
- Türkiye İstatistik Kurumu, (2020). Kırmızı Et Üretim İstatistikleri. Sayı: 33680.
- Uğuz, Ş. Y., & Soyer, A. T. D. (2007). *Pastırmadaki Proteolitik Değişmelere Tuz Miktarının Etkisi* (Doctoral Dissertation, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı).
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J., & Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5(1), 25-40.
- Vilar, I., Garcia Fontan, M. C., Prieto, B., Tornadijo, M. E., & Carballo, J. (2000). A survey on the microbiological changes during the manufacture of dry-cured lacón, a Spanish traditional meat product. *Journal of Applied Microbiology*, 89(6), 1018-1026.
- Yalanca, I. (2009). Geleneksel et ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik direncinin belirlenmesi. *Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- Yang, H. S., Hwang, Y. H., Joo, S. T., & Park, G. B. (2009). The physico chemical and microbiological characteristics of pork jerky in comparison to beef jerky. *Meat Science*, 82(3), 289-294.
- Yetim, H., & Çankaya, H., (2001). Kalsiyum klorür İlavesi ve salamura kürleme yönteminin pastırma gevrekliğine etkisi. *GIDA*, 26(3), 203-207.
- Yetim, H., Sağıç, O., Doğan, M., & Ockerman, H. W. (2006). Sensitivity of three pathogenic bacteria to Turkish cemen paste and its ingredients. *Meat Science*, 74(2), 354-358.
- Yıldırım, Y., (1981). Et ürünlerimizin su aktivitesi (a_w) değerlerinin saptanması üzerine bir araştırma. *Uludağ Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 1(1), 9-26.

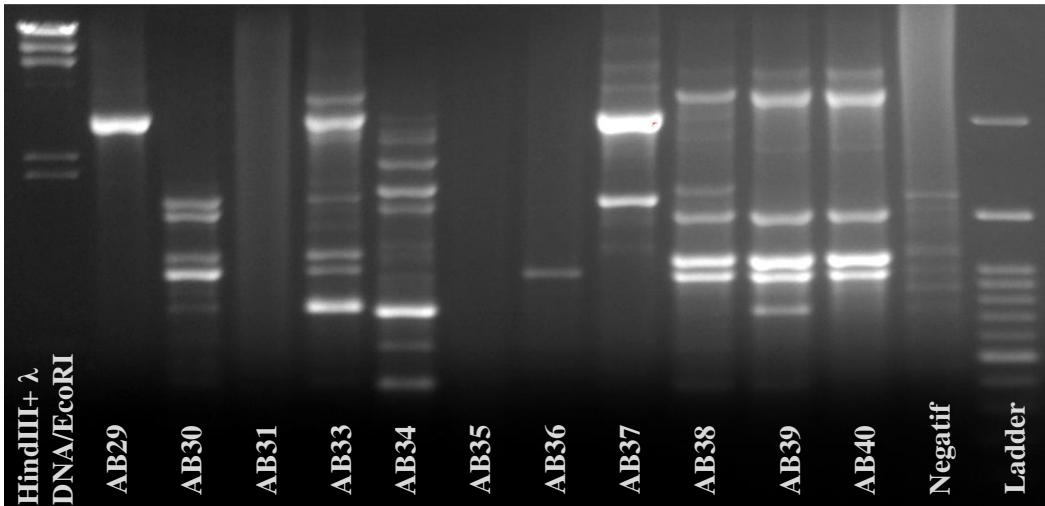
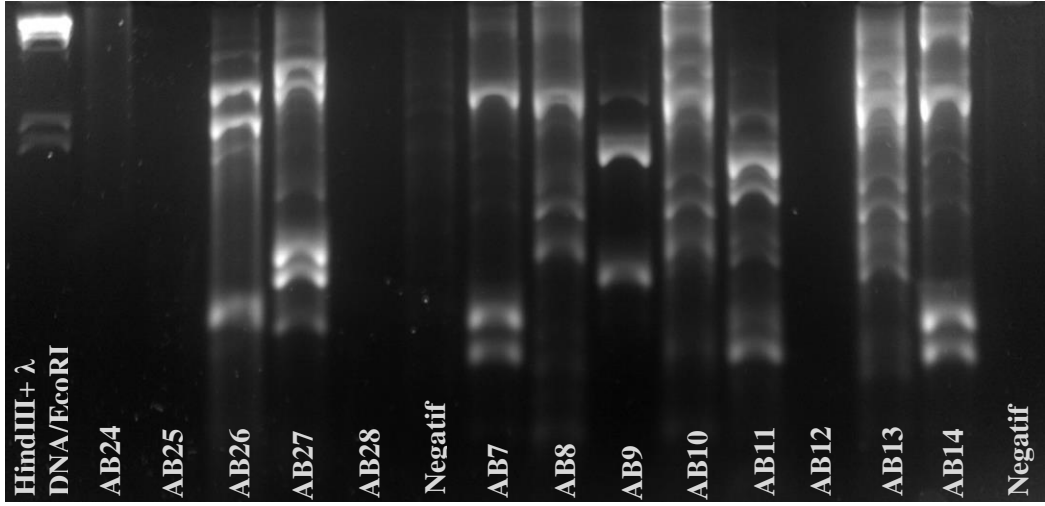
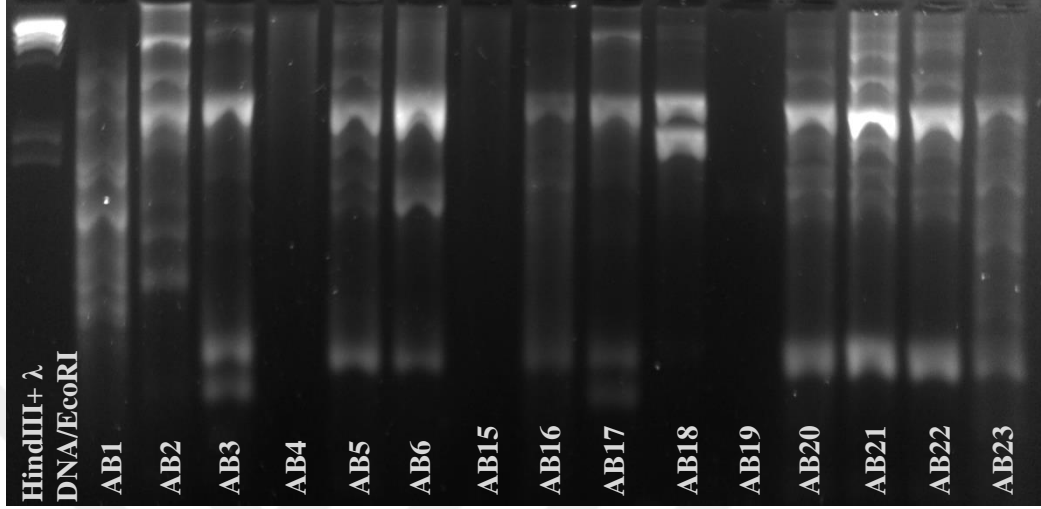
- Yıldırım, Y. (1996). *Et Endüstrisi*. Uludağ Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi. Ankara.
- Yılmaz, R., & Temiz, A. (2003). *Streptococcus salivarius* subs. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'un klasik ve moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanması ve karakterizasyonu. *Orlab Mikrobiyoloji Dergisi*, 1 (3), 19-42.
- Yılmaz, S., & Devran, Z. (2003). Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve bitki biyoteknolojisinde yaygın uygulamaları. *Derim*, 20 (1), 31-42.
- Yörük, G., & Güner, A. (2011). Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması ve *Weissella* türlerinin gıda mikrobiyolojisinde önemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 6(2), 163-176.

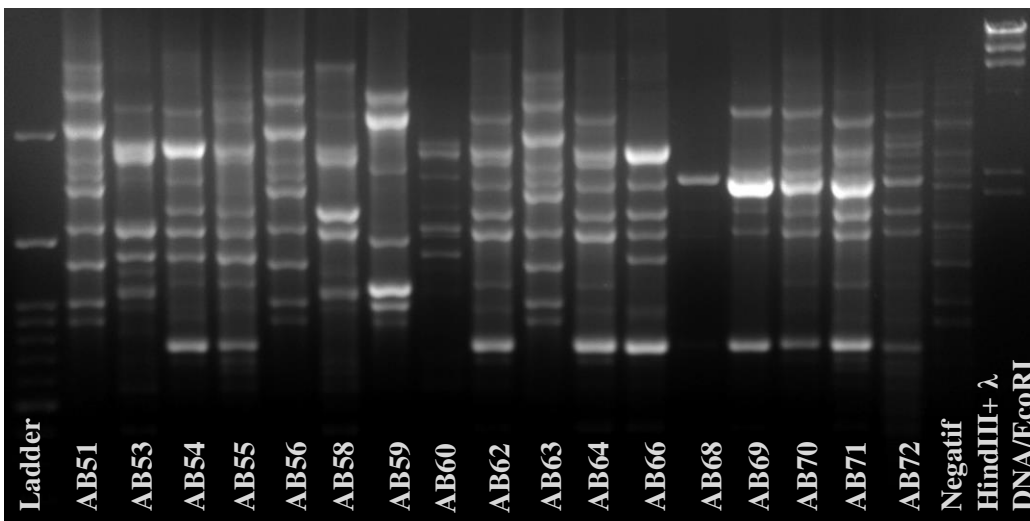
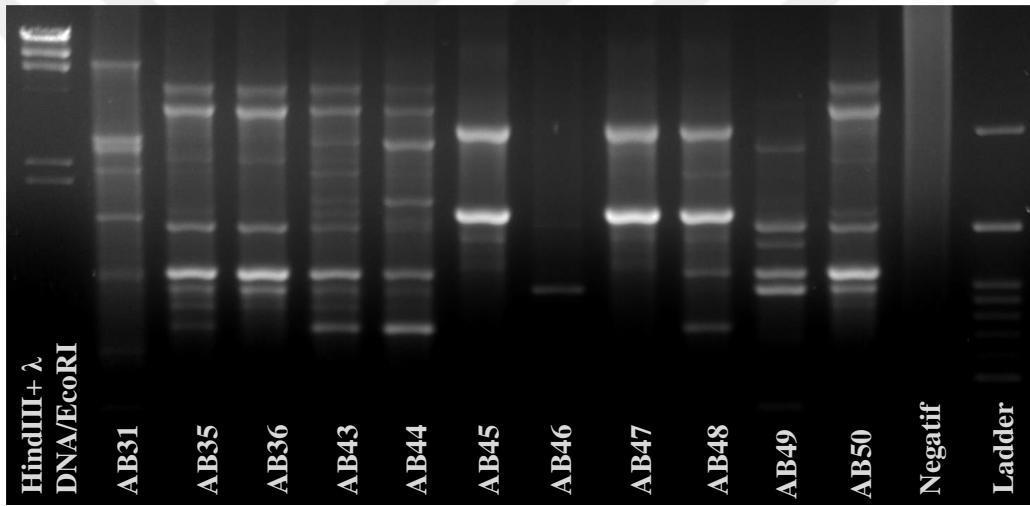
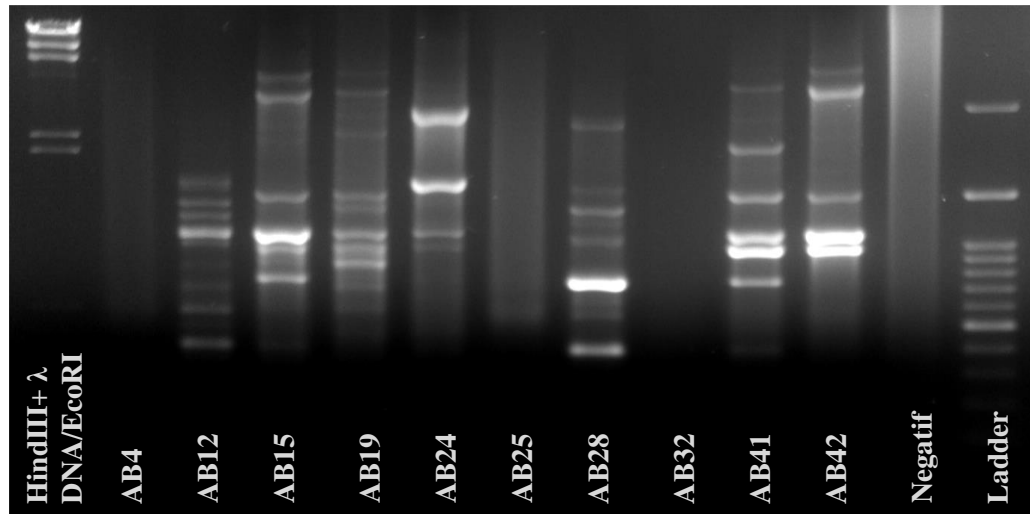


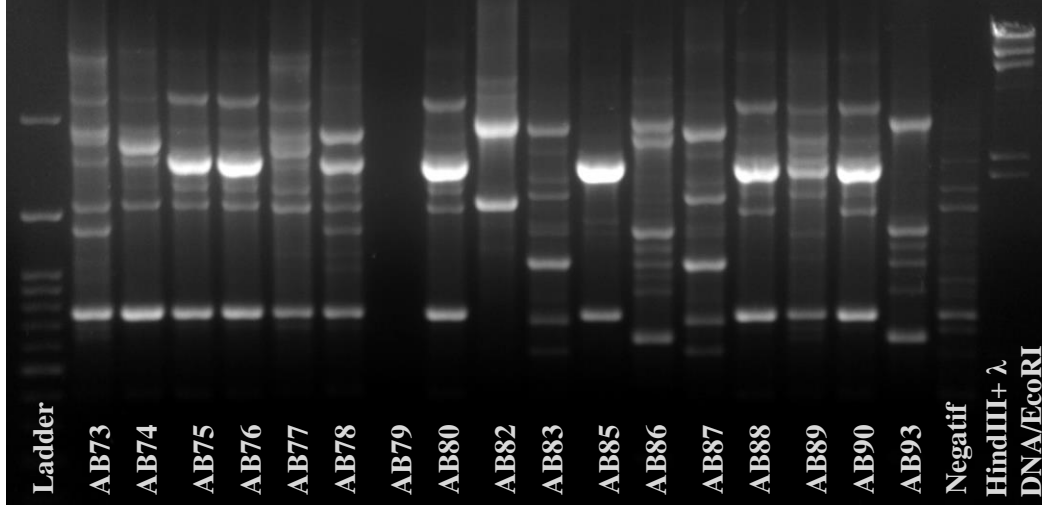
EKLER

EK 1: İzole Edilen Bütün Laktik Asit Bakterilerinin Rep-PCR (GTG5) Jel

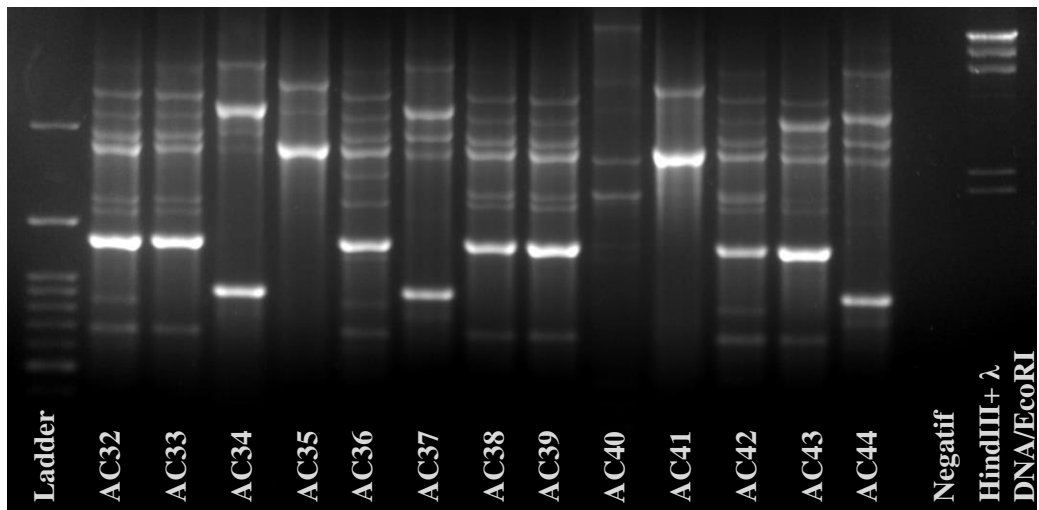
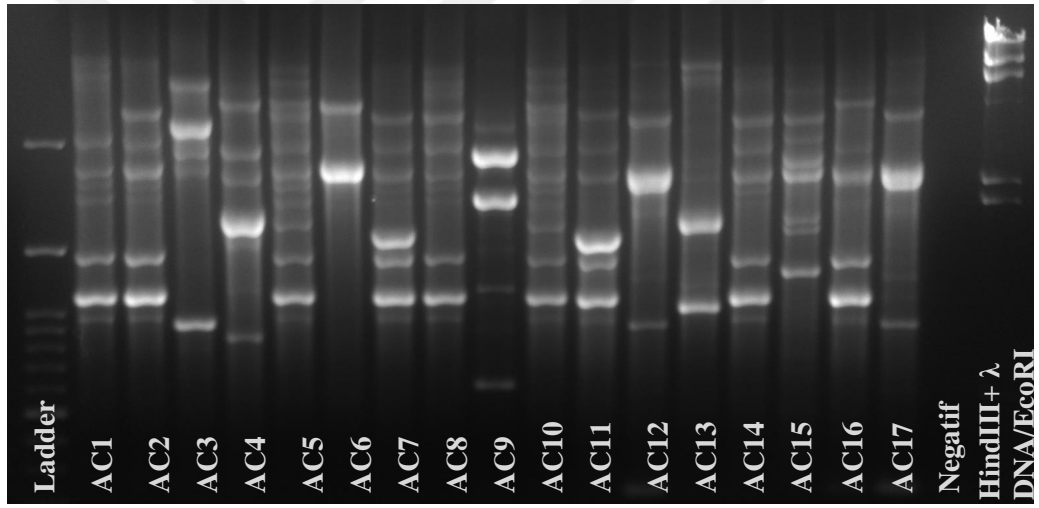
Görüntüleri

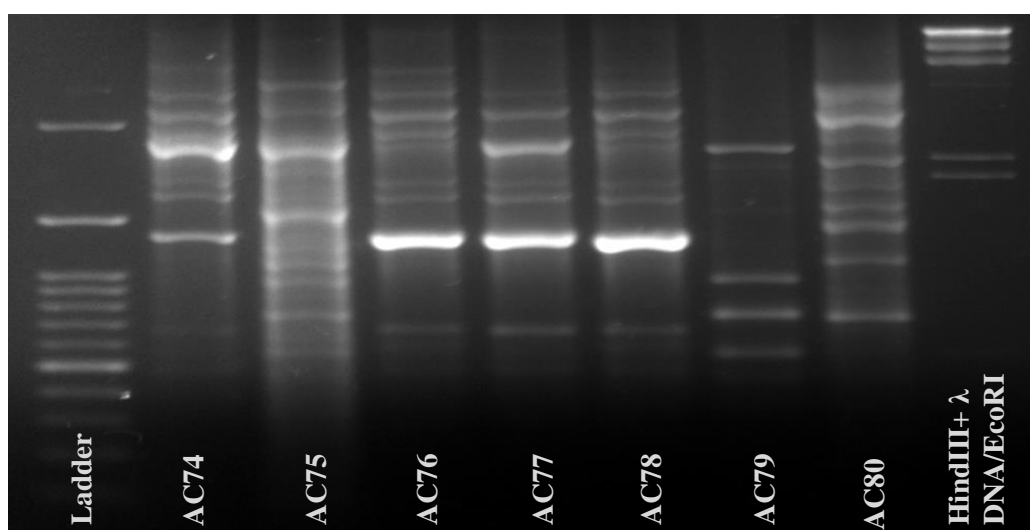
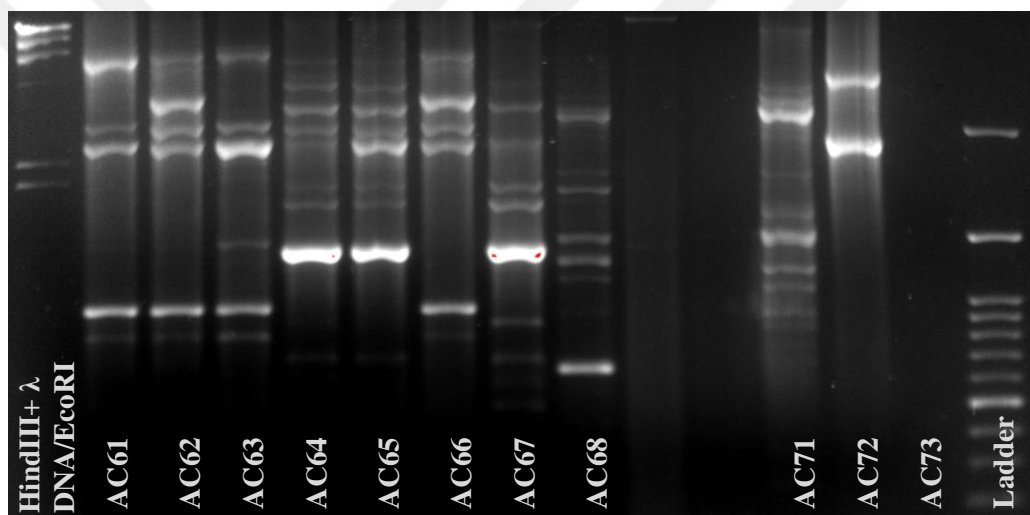
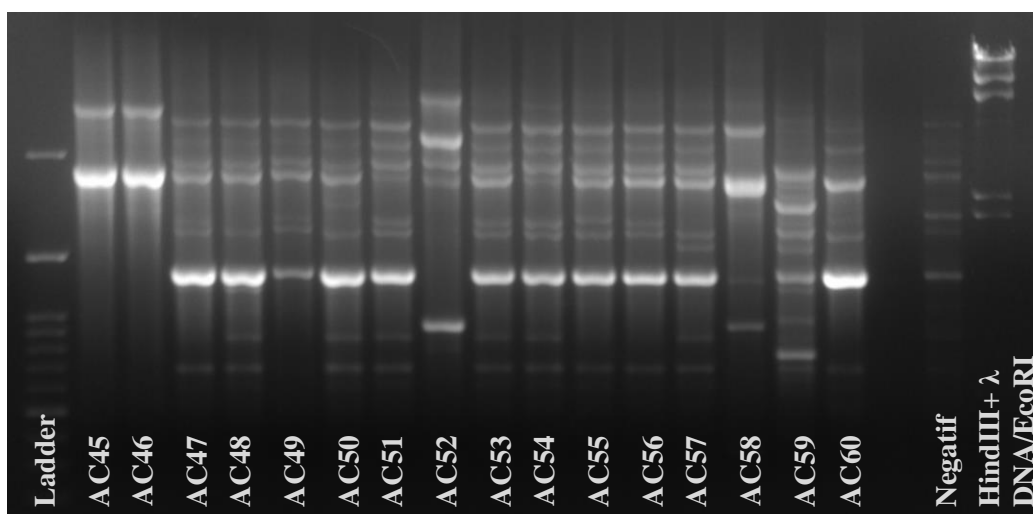


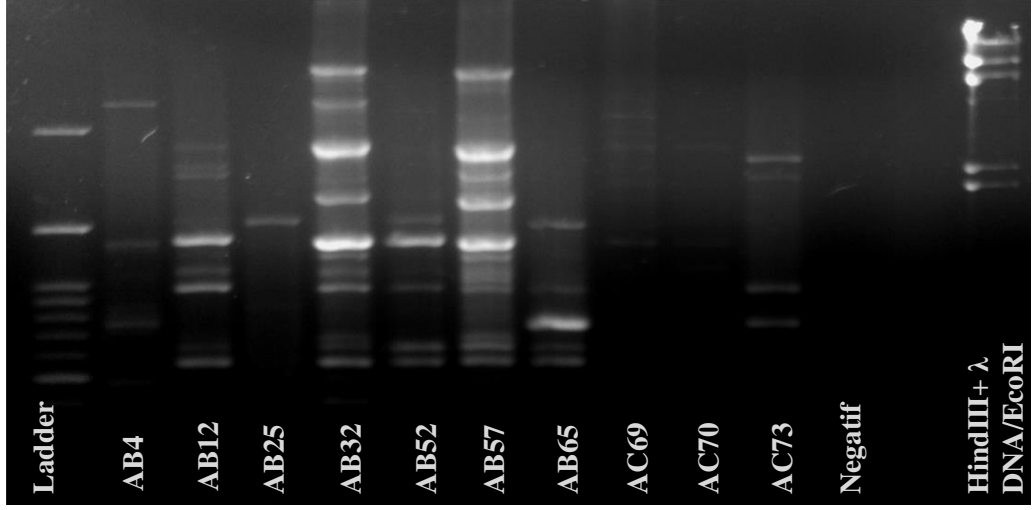




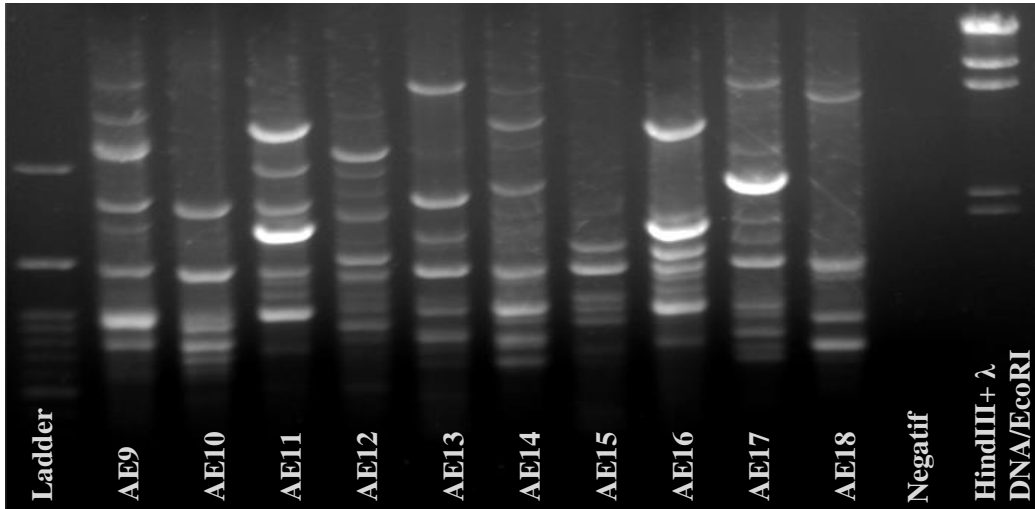
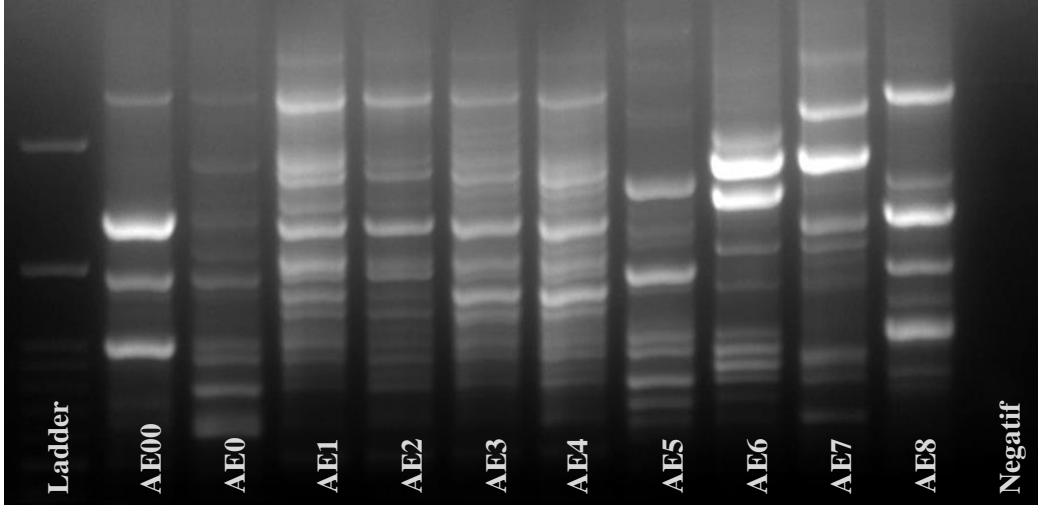
EK 2: İzole Edilen Bütün M17 İzolatların Rep-PCR (GTG5) Jel Görüntüleri

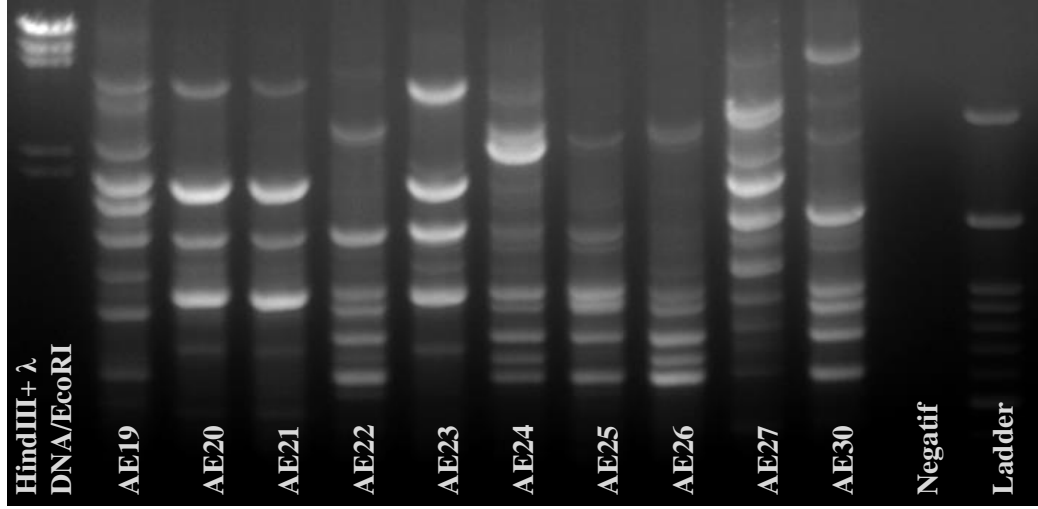




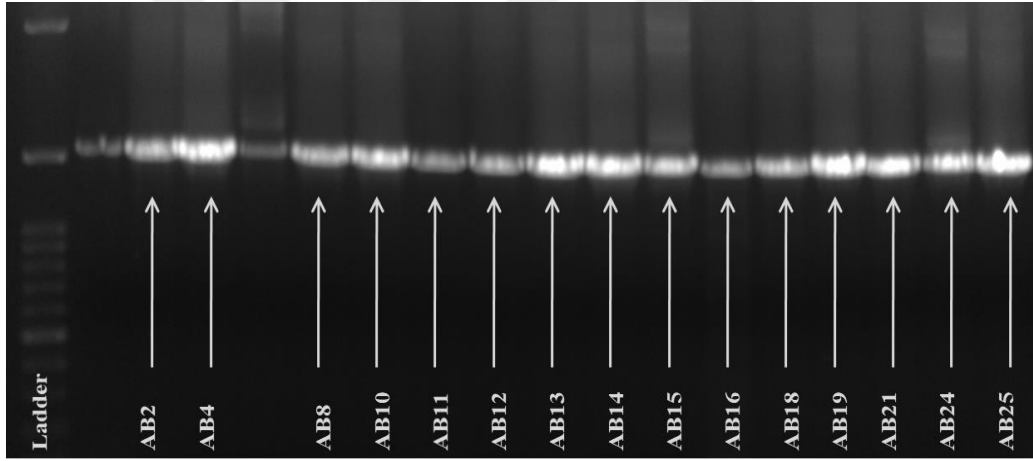


EK 3: İzole Edilen Bütün Enterobacteriaceae Grubu Bakterilerinin Rep-PCR (GTG5) Jel Görüntüleri

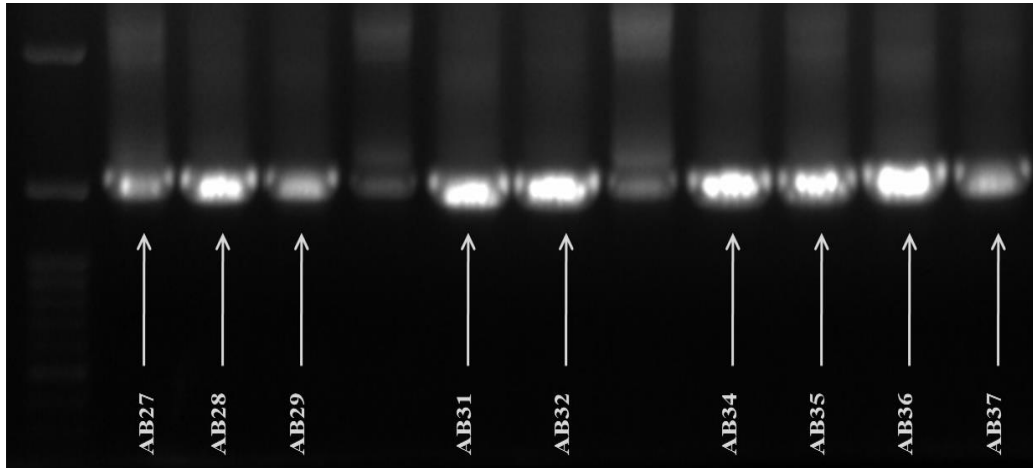




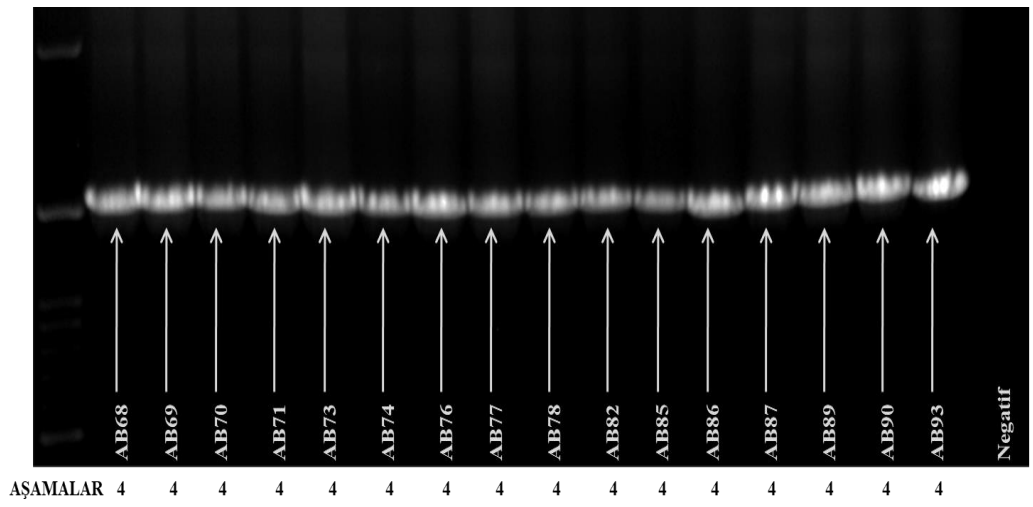
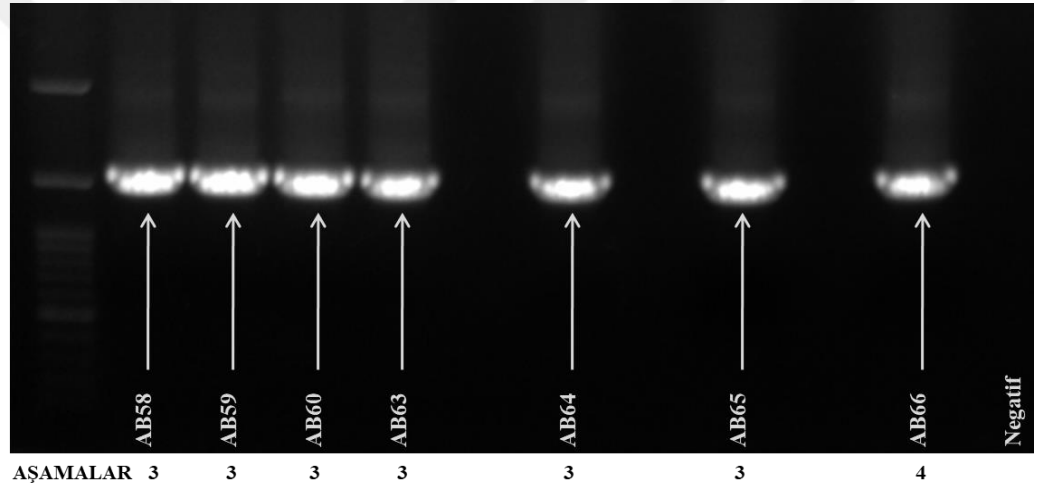
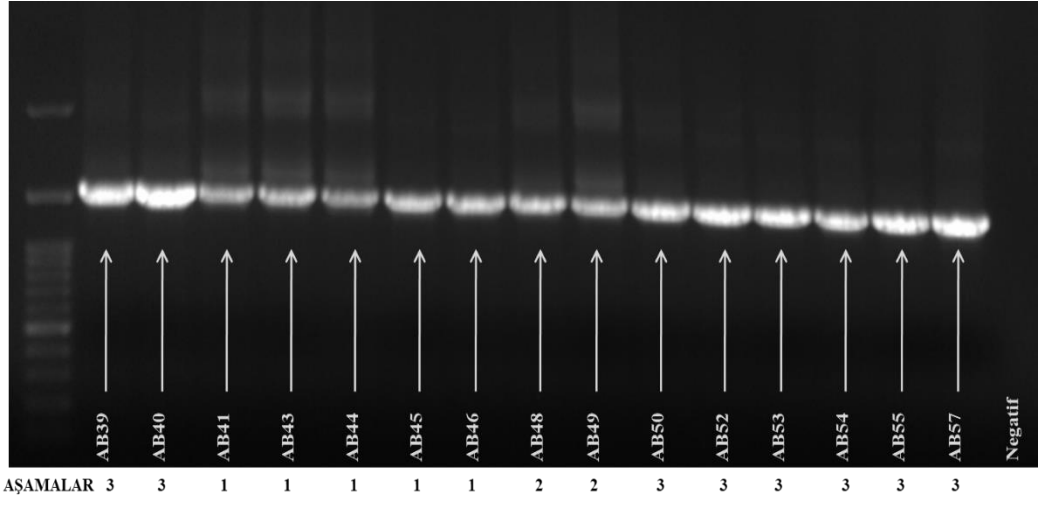
EK 4: Laktik Asit Bakterilerinin 16S PCR Elektroferez Görüntüsü



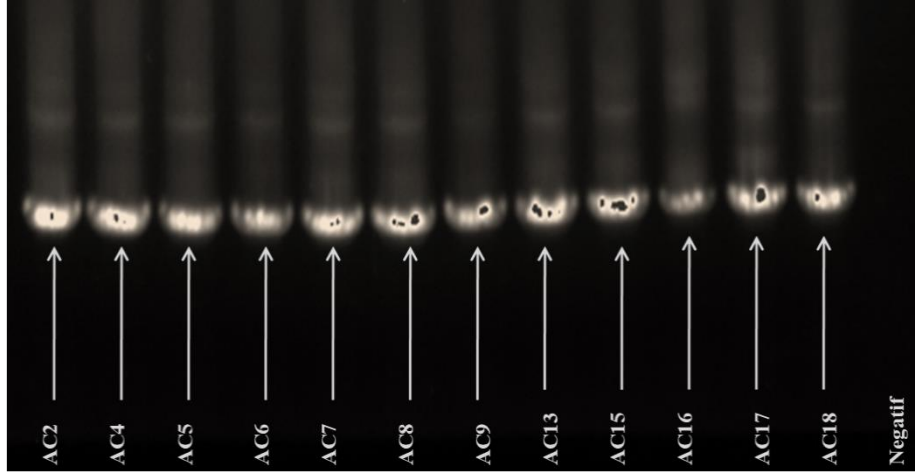
AŞAMALAR 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2



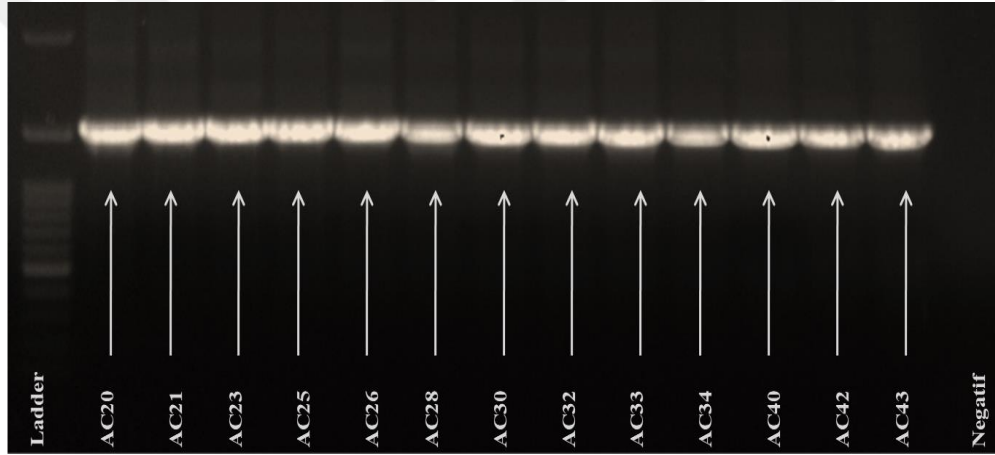
AŞAMALAR 2 2 2 2 2 3 3 3 3



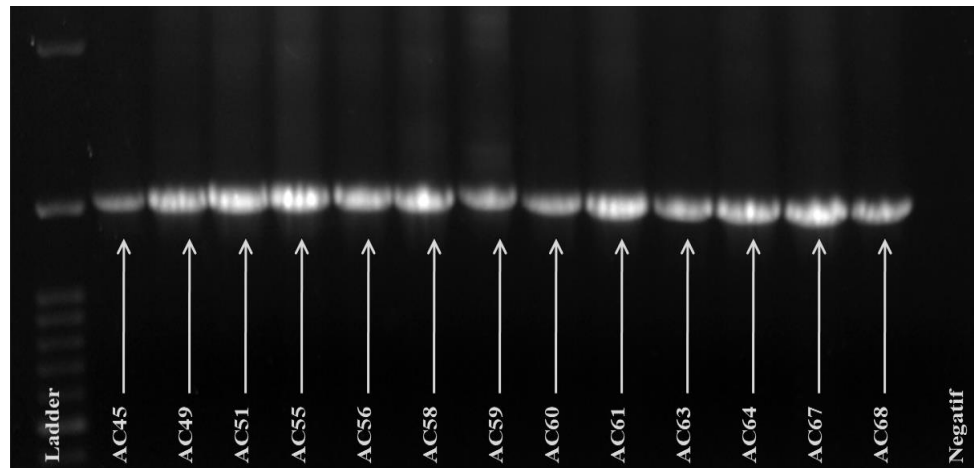
EK 5: M17 İzolatları İçin 16S PCR Elektroforez Görüntüsü



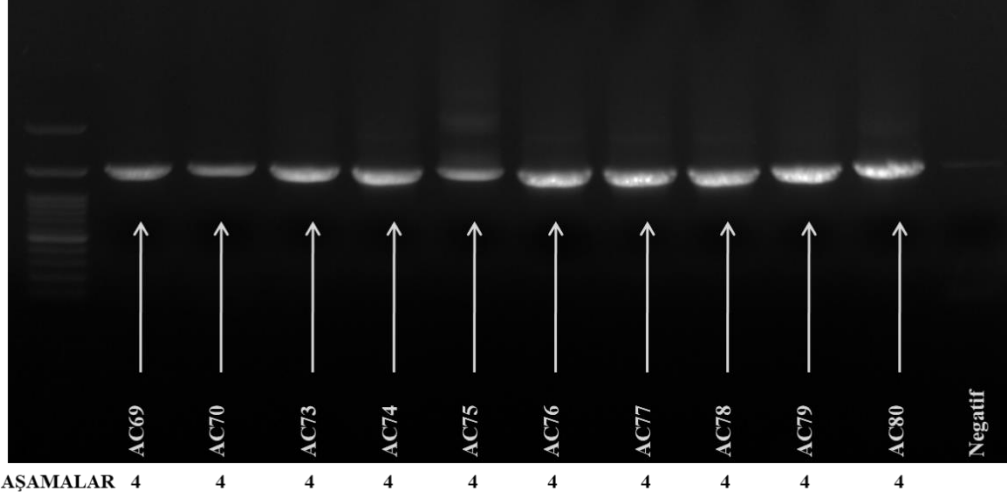
AŞAMALAR 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1

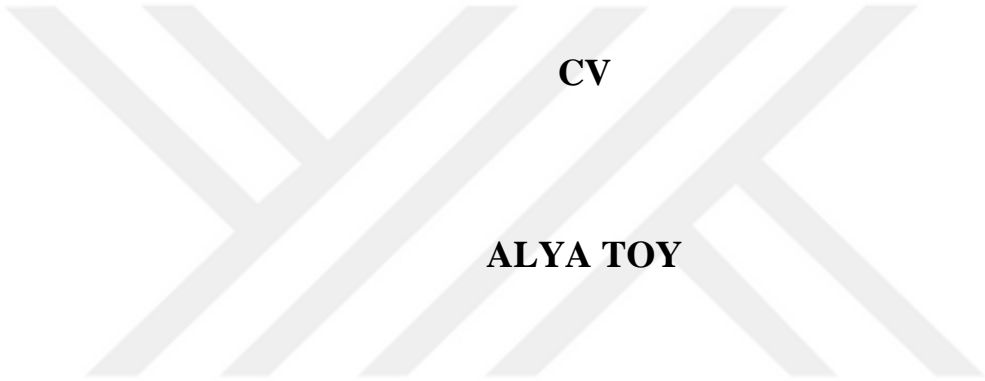


AŞAMALAR 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2



AŞAMALAR 2 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 4 4





CV

ALYA TOY

KİŞİSEL BİLGİLER

Ad Soyad: Alya TOY

Doğum Tarihi: 15.09.1995

Doğum Yeri: Bahçelievler/İSTANBUL

Uyruğu: T.C.

Medeni Durumu: Bekâr

Ehliyet/Veriliş Tarihi: B sınıfı/31.10.2014

Sigara Kullanımı: Yok

Seyahat: Seyahat engeli yok

İLETİŞİM BİLGİLERİ

Adres: Başak Mah. Reşat Nuri Güntekin Cad. Vadi Park Evleri A1 Kapısı 4.Etap 2.
Kısım Blok B:8 D:18 BAŞAKŞEHİR/İSTANBUL

Cep Telefonu: 0544 228 88 36

E-posta: toyalya@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

2009 - 2013: Başakşehir Anadolu Lisesi

2013 - 2017: Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü
(Lisans eğitimi). Derece: 3,46 (sınıf ve bölüm üçüncülüğü)

2017 - 2019: İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi / Matematik ve Doğa Bilimleri
Fakültesi / Gıda Mühendisliği bölümü (Yüksek Lisans eğitimi)

PROJELER

Lisans Tezi

Proje Adı: Probiyotik Gıdaların Alerjik Reaksiyonlar Üzerine Etkisi (Poster)

Yazarlar: Alya TOY, Gizem LİMON, Nevzat Tuğçe DUHAN, Çisil CEBECİ

Proje Tarihi: Nisan - Haziran, 2017

Poster

Proje Adı: Determination of the Microbial Diversity of Pastırma, A Turkish Traditional Meat Product

Yazarlar: Alya Toy, Banu METİN

Yayınlandığı yer: Food Micro Conference Berlin

Yayın Tarihi: Eylül, 2018

Makale/Yüksek lisans tezi

Proje Adı: Pastırma Üretim Sürecinde Yer Alan Mikrobiyatanın Moleküler Yöntemlerle Tayini

Yayın Tarihi: Proje yürütme devam etmekte.

Çalışılan Analiz ve Cihazlar: Laktik asit, laktik streptokok ve *Enterobacteriaceae* grubunda DNA izolasyonu, BioRad PCR ve Rep PCR, BioRad Jel Elektroforez, Nanodropt

Poster

Proje Adı: Determination of the Bacterial Profile During the Production Process of Pastırma

Yazarlar: Alya TOY, Banu METİN

Yayınlandığı Yer: 11. Ulusal/ 1. Uluslararası Gıda Mühendisliği Kongresi, Antalya

Yayın Tarihi: 7-9 Kasım, 2019

YABANCI DİL

İngilizce: Yazma: iyi, Konuşma: orta

YÖKDİL 2020: 81,25

İŞ DENEYİMİ

İstanbul Halk Ekmek Fabrikası AR-GE/ Laboratuvar

Bel Karper Gıda SAN. A.Ş. Çorlu Fabrikası (Gönüllü Stajyer)

İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı (Proje Kapsamında Bursiyer Olarak)

CHR Doğal Yaşam ve Sağlık Ürünleri/ Immunflex (Gıda Mühendisi)

YETKİNLİKLER

ISO 9001:2008 (Türkçe-İngilizce /2015-ETC)

OHSAS 18001:2008 (Türkçe-İngilizce/ 2015- ETC)

ISO 14001:2008 (Türkçe-İngilizce/ 2015- ETC)

Microsoft Programları (Excell- Power Point- Word 2014)

Doğru Türkçe Kullanımı (2015-Ayşenur Yazıcı)

Hitabet Sanatı (2015-Ayşenur Yazıcı)

İnsanlar Etkileme Yöntemleri (2015-Ayşenur Yazıcı)

Topluluk Önünde Konuşma (2015-Ayşenur Yazıcı)

BRC (Türkçe-İngilizce/ 2017-Namık Kemal Üniversitesi)

ISO 22000 (Türkçe-İngilizce/ 2017-Namık Kemal Üniversitesi)

2. Uluslararası Balkan Tarım Kongresi Teşekkür Belgesi (2017-Namık Kemal Üniversitesi)

2. Uluslararası Balkan Tarım Kongresi Katılım Belgesi (2017-Namık Kemal Üniversitesi)