

Lizozim-Kitosan Bazlı Antimikrobiyal Kaplama Uygulamasının Taze Yumurtanın Mikrobiyolojik Kalitesi Üzerine Etkisi

Muhammed Yüceer, Cengiz Caner ✉

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Çanakkale

Geliş Tarihi (Received): 10.03.2013, Kabul Tarihi (Accepted): 10.04.2013

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): ccaner@comu.edu.tr (C. Caner)

☎ 0 286 218 00 18 📠 0 286 218 05 41

ÖZET

Yumurta, kabuk gibi doğal bir ambalaja sahip olmasına karşın hızla bozulabilen gıdalardandır. Yumurtalarda depolama boyunca mikrobiyal gelişme hızla artmakta ve iç kalite bozulmaktadır. Bu çalışmada, taze yumurtalar farklı konsantrasyonlarda (%0, 10, 20 ve 60 (w/w)) lizozim içeren kitosan kaplama ile kaplanarak yumurtaların mikrobiyal kalitesine etkinliği; *Enterobacteriaceae*, koagülaz pozitif *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) ve küf-maya sayım değerleri oda şartlarında 5 hafta boyunca belirlenmiştir. Depolamanın sonunda, kontrol grubu yumurtalarda *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı ve küf-maya değerleri sırası ile 2.35, 2.33, 2.61 ve 2.76 log kob/yumurta olarak tespit edilmiştir. Aynı şekilde kitosan-lizozim antimikrobiyal kaplanan yumurtalarda sırası ile 0.91-1.6, 0.89-1.43, 1.07-2.07 ve 2.17-2.46 log kob/yumurta sonuçları tespit edilmiştir. Ayrıca antimikrobiyal madde içeren kaplamalarla kontrol grubu arasında aerobik mezofilik toplam bakteri, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus* ve küf-maya sayımları bakımından fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Çalışma sonucunda yumurtaların hiç birisinde *Salmonella spp.* ve *Listeria monocytogenes* varlığına rastlanılmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Yumurta, Lizozim, Kitosan, Antimikrobiyal kaplama, Mikrobiyoloji, Raf ömrü

Effect of Lysozyme-Chitosan Based Coatings on Microbial Quality of Fresh Eggs

ABSTRACT

Hen eggs are perishable, and their quality may change during storage. Eggs are susceptible to microbial degradation, and interior quality may reduce during storage. In this research, fresh eggs were coated with chitosan and chitosan coatings containing lysozyme (0, 10, 20 and 60% (w/w)) and stored at room temperature for 5 weeks. *Enterobacteriaceae*, coagulase positive *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, total mesophilic aerobic bacteria (TMAB) and yeast-mold counts were used for the evaluation of microbial quality of fresh eggs coated with different coatings. At the end of 5 weeks, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, total mesophilic aerobic bacteria and yeast-mold counts of the control samples were 2.35, 2.33, 2.61 and 2.76 log cfu/egg respectively. Similarly, the ranges of *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, total mesophilic aerobic bacteria and yeast-mold counts for eggs coated with lysozyme-chitosan antimicrobial coatings were 0.91-1.6, 0.89-1.43, 1.07-2.07, and 2.17-2.46 log cfu/egg, respectively. In addition, the differences in the logarithmic counts of total aerobic mesophilic bacteria, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus* and mold-yeasts between control and treated fresh eggs were statistically significant. *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* were not detected in any of the eggs.

Key Word: Egg, Lysozyme, Chitosan, Antimicrobial coating, Microbiology, Shelf life

GİRİŞ

Yumurta, kanatlılardan elde edilen, kolay temin edilebilen ucuz, besin değeri yüksek, beslenme ve ülke ekonomisi açısından önemli bir temel gıda maddesidir [1,2,3]. Taze yumurta çok kolay bozulabilen gıdalardan biri olup, yumurtadaki kalite değişimi, yumurtlama olayından hemen sonra başlar. Yumurtalardaki hızlı kalite kayıplarının nedeni kabuk kırılması veya çatlamasıdır. Gözle görünür çatlaklarda yumurtanın bütünlüğü bozulmamasına karşı hızlı bir gaz (özellikle su buharı) geçişi ve mikrobiyal gelişme olmaktadır. Taşıma şekli, muhafaza, ambalajlama ve hava koşulları gibi birçok faktör yumurta kalitesine ve depolama süresine etki etmektedir. Taze yumurtanın depolanması sırasında karşılaşılan sorunların başında ağırlık kaybı, iç kalite bozulması ve mikrobiyal kontaminasyonu gelmektedir. Bazı mikroorganizmalar yumurta kabuğundan içine nüfuz edebilir. Bu nedenle, yumurta kalitesinin korunması için nem kaybı ve mikrobiyal bulaşmaya karşı yumurta kabuğunun korunması önemlidir [4].

Yumurtalarda sıklıkla karşılaşılan mikroorganizmalar: *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Aerobacter*, *S. enteritidis* ve *Enterobacter*'dir. Yumurta zengin besin değeri nedeniyle *S. enteritidis* gibi patojen mikroorganizmaların potansiyel taşıyıcısıdır. Gıda kaynaklı *Salmonella* vakalarının çoğunluğu kabuklu yumurta tüketiminden dolayıdır [5]. Fumigasyon, dezenfeksiyon, yumurta yıkama ve tasnifleme gibi çeşitli yöntemler yumurtadaki mikroorganizmaları (patojenleri) kontrol etmek için kullanılsa da daha etkili yöntemlere ihtiyaç vardır [6].

Yumurtanın kalitesini korumak amacıyla çeşitli araştırmalar yapılmaktadır; en yaygın muhafaza yöntemi, belirli ısı işlem (55.6°C'de 6.2 dakika) uygulamak suretiyle mikroorganizmaların inaktive edilmesine karşı, koagülasyon neticesinde yumurtanın fonksiyonel özellikleri arasında yer alan köpük ve emülsiyon oluşturma kapasitesi ile beraber besin değeri olumsuz yönde etkilemektedir [21]. *S. enteritidis* inaktivasyonunda uygulama potansiyeline sahip diğer bir yöntem ışınlama metodudur. Kabuklu yumurtaya Gama ışınlaması (0.5-3.0 kGy) uygulandığında *Salmonella* spp. ve diğer patojen grubu bakterilerin inaktivasyonu için gerekli sürenin en az 1.5 kGy doz olduğu saptanmıştır [6]. Mikrodalga ısıtma fonksiyonel ve duyu özelliklere daha az zarar vererek, kabuklu yumurtada bulunan *S. enteritidis*'in inaktivasyonuna yardımcı olabilmektedir. Mikrodalga ile kabuklu yumurtanın ısıtılmasında 3.5 ve 2.0-0.75 Wg⁻¹ güç 9 dakika pastörizasyon normlarına ulaşmanın gerekli olduğunu bildirilmiştir [7]. Bu sorunların çözümü için ısı olmayan yeni proses (yüksek hidrostatik basınç, ultraviyole ışınlama (UV), vurgulu elektrik, ozon ve kaplama gibi) uygulamalarına veya aktif ambalajlama ya da modifiye atmosferde ambalajlama gibi yaklaşımlar üzerinde çalışılmaktadır.

Kaplamalar, oksijen, karbon dioksit ve nem geçirgenliğine karşı, yarı geçirgen bir bariyer sağlayarak, gıdalarda solunum hızı, su kaybı ve

reaksiyon oranlarını azaltabilir. Bu kaplamalar belirli geçirgenliğine sahip olduklarından kullanıldıkları gıdanın su kaybını önledikleri gibi oksijen geçirgenliğini azalttığı için mikrobiyolojik ve kimyasal bozulmalara karşı da gıdayı korurlar [2,3]. Yenilebilir filmler ve kaplamalara organik asitler, bunların tuzları, uçucu yağlar, ya da doğal bitki ekstralarının katılımı ile üretilen antimikrobiyal kaplamalar mikroorganizmaların gelişmesini geciktirerek depolama ve dağıtım sırasında kalitenin muhafazasında etkili olabilecek etkili bir yöntemdir. Yenilebilir filmlerin bariyer özellikleri, yapıları ve çözücüler ile antimikrobiyal madde içeriği gibi kaplamaların bileşimine bağlıdır [8]. Yumurta kabuğu, üzerindeki gözenekler ile nefes alabilen doğal bir ambalajdır. Fakat yumurta kabuğunun üzerindeki gözenekler buharlaşma (nem kaybı ve gaz transferi) ile mikrobiyal bulaşmaya yol açabilir.

Yenilebilir filmler bariyer özelliklerinin yanı sıra antimikrobiyal ve antioksidan maddeler için taşıyıcı bir matris olarak kullanılabilirler. Gıdalarda mikrobiyal gelişmeyi önleyebilmek ya da kontrol altına alabilmek, dolayısıyla kalite kayıplarını azaltarak raf ömrünün artırılmasında son yıllarda antimikrobiyal ambalajlama kullanılabilir. Antimikrobiyal film ve kaplamaların üretiminde kimyasal ve doğal antimikrobiyal maddeler kullanılmaktadır. Antimikrobiyal kaplama uygulamalarında ise kaplama materyali ile kaplanmış gıda yüzeyinde, oksijen yetersizliği ve antimikrobiyal maddelerle doğrudan etkileşim sonucu gelişen antimikrobiyal aktiviteye bağlı olarak mikroorganizma gelişimi minimize edilir. Gıdalarda arzu edilmeyen mikrobiyal gelişme genellikle gıdanın yüzeyinde meydana gelmektedir. Yüzeydeki mikrobiyal gelişmeyi engellemek için antimikrobiyal maddeler doğrudan gıda yüzeyine uygulanabilir [8].

Kitosan, yengeç, karides gibi deniz kabuklarının önemli bir bileşeni olan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen doğal bir biyopolimerdir. Kitosanın antimikrobiyal özellikleri vardır [9] ve mükemmel film [10,11] oluşturuca özelliğe sahiptir. Son yapılan çalışmalar kitosan kaplamanın yumurtanın iç kalitesinin korunmasında etkili olduğunu özellikle ağırlık kaybını azalttığı, pH, Haugh birimi ve sarı indeksini koruyarak, kaplanmamış yumurtalarla kıyaslandığında 2 ile 3 hafta raf ömrünü artırdığı gözlenmiştir [3,12,13]. Antimikrobiyal aktivitesi ve mükemmel film oluşturma özellikleri nedeniyle kitosan, yumurta kabuğuna uygulandığında mikroorganizma kontaminasyon ve gelişimini azaltabilir ve böylelikle yumurtanın tazeliği daha uzun süre muhafaza edilebilir. Kitosanın kendi antimikrobiyal özellikleri ve farklı Antimikrobiyal maddelerle film oluşturma yeteneği biyopolimer ile farklı uygulamaların geliştirilmesinde önemli bir itici güç oluşturabilir. Nisin ve lizozim gibi doğal bileşikler insanların güvenli gıda tüketimi için üzerinde çalışılan potansiyel gıda koruyucularıdır. Lizozim, birçok doğal sistemlerde bulunan bir litik enzimdir. Lizozim geniş bir pH ve sıcaklık aralığında gıda muhafazasında etkili ve yaygın bir kullanım potansiyeline sahiptir [14]. Lizozimin antimikrobiyal aktivitesi soya proteini, mısır zeini [15], aljinat ve karragenan [16] gibi doğal polimerler ile desteklenerek geliştirilmiştir. Kitosana kovalent

bağlanan Lizozimin sinerjik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [17].

Kitosan-lizozim katkılı filmlerin Gram pozitif, bozulma oluşturan ve patojen bakterilere karşı büyük bir antimikrobiyal potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir [18, 19]. Padgett [15] soya proteini ve peynir altı suyu protein filmlerine nisin ve lizozim katıldığında bakterilere karşı inhibitör etki gösterdiğini tespit etmiştir. Fakat taze yumurtaların antimikrobiyal kaplama ile (özellikle kitosan-lizozim) fonksiyonel özellikleri, mikrobiyal yükü azaltmaya ve raf ömrü üzerine etkileri hakkında sınırlı sayıda literatür bulunmaktadır.

Bu çalışmada, kabuklu taze yumurtalar antimikrobiyal madde olarak farklı konsantrasyonlarda lizozim içeren (%0, 10, 20 ve 60 (w/w)) kitosan kaplama solüsyonu ile kaplanarak 25°C'de 5 hafta boyunca depolanmıştır. Kontrol ve kaplama örneklerinde kaplamanın yumurtanın mikrobiyal kalitesine olan etkisinin belirlenmesi için *Enterobacteriaceae*, *Salmonella spp.*, koagülaz pozitif *Staphylococcus aureus*, toplam mezofilik aerobik bakteri, küf-maya ve *Listeria monocytogenes* analiz sonuçları değerlendirilmiştir.

MATERYAL ve METOT

Çalışma için gerekli taze-günlük beyaz kabuklu yumurtalar, Balıkesir ili, Manyas ilçesinde bulunan A.B Gıda San. ve Tic. A. Ş. isimli yumurta üreticisinin 41 haftalık aynı yaş grubundaki Lohmann cinsi yumurtacı tavuklarından rastgele olarak alınmıştır. Daha sonra yumurta örnekleri hızlı bir şekilde laboratuvara taşınarak kirli, kırık, çatlak, gizli çatlak, boyut ve ağırlık yönünden tasnif edilerek uygun olmayan örnekler ayıklanmıştır. Tüm analizler 2 tekerrür ve 2 paralel olarak yapılmıştır.

Kaplama Solüsyonunun Hazırlanması

Gıda sınıfı kitosan (25°C'de %1 w/w asetik asit çözeltisinde 11 cps viskoziteye sahip ve 89,9 deasetilasyon değerli, Vanson, Redmond, Wash, USA) kullanılarak kaplama solüsyonu hazırlanmış ve plastikleştirici olarak gliserol (w/w) eklenerek ısıtıcı manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır [2,3]. Lizozim (Sigma Chemical Co. USA) kitosan solüsyonuna %0, 10, 20 ve 60 oranlarında eklenerek karışım solüsyonları hazırlandıktan sonra karışım homojenize edilmiştir. Kaplama solüsyonları 43°C'ye soğutulmuş ve filitre edilerek kaplamaya hazır hale getirilmiştir. Taze yumurtalar doğrudan daldırma yönetmi ile Caner ve Cansız'a [2] göre kaplama işlemine tabii tutulmuştur. Kaplanan yumurtalar steril şartlarda plastik özel viyollere alınarak 24 saat kurutulmuş ve sonrasında depolamaya alınmıştır. Kaplama yapılmayan yumurtalar kontrol olarak ayrılmış ve tüm yumurtalar 25°C ortam koşullarında ortalama %70-75 nisbi rutubette 5 hafta muhafaza edilmiştir. Çalışmada numuneler 5 ayrı gruba ayrılmıştır 1) Kontrol (kaplanmamış), 2) %1 Kitosan, 3) %1 Kitosan-%10 Lizozim, 4) %1 Kitosan-%20 lizozim ve 5) %1 Kitosan-%60 lizozim olarak analizlere alınmıştır.

Mikrobiyolojik Analizler

Kaplama yapılan ve yapılmayan tüm yumurta örneklerine toplam mezofilik aerobik bakteri, *Staphylococcus aureus-koagülaz pozitif*, *Enterobacteriaceae*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* ve küf-maya, mikrobiyolojik analizleri yapılmıştır. Yumurtalar steril stomacher özel poşete 25 mL steril fosfat tampon çözeltisi içeren solüsyon içerisine alınarak, uygun desimal solüsyonlarda seyreltme yapılarak; toplam mezofilik aerobik bakteri (dökme plak - Plate Count Agar-PCA, 37°C'de 48 saat inkübasyon), *Staphylococcus aureus* (Baird Parker Agar + RPF, 37°C'de 48 saat), küf-maya (DRBC Agar, 25 °C'de 5-7 gün), *Enterobacteriaceae* (Violet Red Bile Dextrose Agar, 37°C'de 48 saat), *Listeria monocytogenes* (High Fraizer Broth-30°C'de 48 saat, Otto Gianni Agosti Agar - 24 saat 37°C) ve *Salmonella spp.* (Buffer Peptone Water, RVS, MKTTn, XLD Agar, Brilliant Green Agar, 37°C'de 18+24+24 saat) analizleri kabuklu yumurtalara ISO, AOAC ve BAM'a [20] göre yapılmıştır. Şüpheli koloniler gözlenmediği için bakteri doğrulamasına (identifikasyon) gidilmemiştir. Petri plaklarda tespit edilen tüm koloniler log-koloni oluşumu olarak her bir yumurta için belirlenmiştir. Yumurta örneklerinin analizleri uygulamayı takip eden 0, 1, 2, 3, 4 ve 5. haftalarda yapılmıştır.

İstatistiksel Değerlendirme

Depolama boyunca veya depolama sonrasında lizozim-kitosan kaplamalar ve kontrolde (kaplanmamış) belirlenen parametreler arasında herhangi bir farklılık olup olmadığını belirlemek için logaritmaları alınan verilerde (log/kob) varyans analizi (ANOVA) gerçekleştirilmiştir. Çalışma iki tekerrürlü olarak yürütülmüş ve her bir tekerrür için 50 yumurta (n toplam =100 ve n her bir uygulama için =20) kullanılmıştır. Least square means (LSM-PROG GLM) istatistiksel prosedürü ile SAS 9.1.3 istatistik programı (SAS Institute Inc. SAS, ABD) kullanılmıştır. İstatistiksel farklılık p değerinin 0.05 veya daha küçük olmasıyla tanımlanmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Beş haftalık depolama süresince, kaplama materyallerinin toplam mezofil aerob bakteri değerlerini istatistiksel olarak önemli (p<0,05) oranda azalttığı saptanmıştır. Kitosan-lizozim kaplama materyalleri en az mikrobiyal gelişme tespit edilen kaplamalardandır. Mikrobiyal gelişmeyi gösteren analiz değerleri, depolama süresine, depolama sıcaklığına, yumurta ebadına, nisbi neme ve kabuk porları gibi birçok faktöre bağımlı olarak değişiklik gösterebilmektedir.

Enterobacteriaceae sonuçları incelendiğinde son haftada %10 ve 20 kitosan lizozim antimikrobiyal kaplamalarının istatistiksel olarak birbirine benzer olduğu, ayrıca bu haftada yer alan diğer uygulamaların farklı olduğu tespit edilmiştir (p<0.05). 2. Haftada kontrolün; kitosan %0, 10 ve 20 uygulamalardan farklı olduğu fakat kitosan %0, 10 ve 20 uygulamalarının birbirlerinden farksız oldukları belirlenmiştir (Tablo 1). 4. ve 5. haftada kontrolün

uygulamalardan daha yüksek mikrobiyal aktiviteye sahip olduğu; sadece kitosan kaplama yapılan yumurta örneklerinin farklı oranda lizozim (%10, 20 ve 60) içerenlere kıyasla daha yüksek mikrobiyal yük içerdiği gözlenmiştir. Son haftalarda kitosan %20 ve 60 lizozim

uygulamalarının en az mikrobiyal yük içerdiği belirlenmiş olup, bu sonuç lizozim %20 ve 60 ilavenin *Enterobacteriaceae* sayısını önemli ölçüde azaltığını göstermektedir (Tablo 1).

Tablo 1. Depolama süresince (Hafta) *Enterobacteriaceae* sayım sonuçları (log kob/yumurta)

Uygulama ¹	0.Hafta	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta	5. Hafta
Kontrol	0.74±0.16Aa	1.51±0.12BCa	1.73±0.07BCa	1.81±0.12Ca	1.83±0.18Ca	2.35±0.10Da
Kts	0.74±0.16Aa	0.97±0.03ABb	1.15±0.20ACb	1.35±0.19CDb	1.56±0.20DEa	1.68±0.23Eb
Kts ve %10 L	0.74±0.16Aa	0.91±0.09ABb	0.96±0.03ABbc	1.00±0.14ABc	1.09±0.16Bb	1.14±0.02Bc
Kts ve %20 L	0.74±0.16Aa	0.89±0.03ABb	0.93±0.05ABbc	0.95±0.04Abc	1.01±0.12ABb	1.02±0.12Bc
Kts ve %60 L	0.74±0.16Aa	0.73±0.10Ab	0.74±0.10Ac	0.84±0.08Ac	0.87±0.05Ab	0.91±0.04Ac

¹ Kts: Kitosan, L: Lizozim. ^{A-D} Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır (p < 0.05). ^{a-c} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır (p < 0.05).

Tüm kitosan-lizozim kaplama uygulamalarının depolama boyunca (p < 0.05) taze yumurtalardaki toplam mezofil aerobik bakteri sayısını önemli ölçüde azaltığı saptanmıştır. Kitosan-lizozim kaplamanın tek başına kitosan ile karşılaştırıldığında 3. Haftadan sonra TMAB üzerine istatistiki olarak daha etkin olduğu gözlenmiştir. Kabuklu yumurtanın toplam flora sayımını ifade eden TMAB sayımı 0. hafta 0.79 olan değer, depolama sonunda son hafta (5. hafta) kitosan-%60 lizozim kaplaması için 1.07, kitosan-%20 lizozim kaplaması için 1.28, kitosan-%10 lizozim kaplaması için 1.55 olduğu,

sadece kitosan kaplaması için ise 2.07 ve kontrol grubu numunelerde ise 2.61 ile en yüksek artış kaydedildiği gözlenmiştir. Çalışmada kontrol grubunda son iki hafta sayım değerlerinin birbirinden farksız olduğu görülmüştür. Depolama periyodu son haftasında, toplam mezofilik aerobik bakteri yükünün kontrol grubu yumurtalarda en yüksek olduğu belirlenmiştir. Depolama boyunca toplam florada en yüksek azalma 1.07 log/kob ile kitosan %60 örnek grubunda tespit edilmiştir. Bu durum lizozim ve kitosanın sinerjik etkisinden kaynaklanmaktadır (Tablo 2).

Tablo 2. Yumurta örneklerinde depolama süresince (hafta) toplam mezofilik aerobik bakteri sayısı (log kob/yumurta)

Uygulama ¹	0.Hafta	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta	5. Hafta
Kontrol	0.79±0.16Aa	1.25±0.21Ba	1.53±0.29Ba	1.98±0.08Ca	2.37±0.05Da	2.61±0.06Da
Kts	0.79±0.16Aa	1.08±0.16Bab	1.20±0.24Bab	1.55±0.17Cb	1.90±0.11Db	2.07±0.06Db
Kts ve %10 L	0.79±0.16Aa	0.95±0.03BCab	1.19±0.10BCab	1.23±0.15BCDbc	1.40±0.12Cdc	1.55±0.17Dc
Kts ve %20 L	0.79±0.16Aa	0.88±0.06ABb	0.91±0.04ABb	0.99±0.11ABCcd	1.14±0.11BCcd	1.28±0.24Ccd
Kts ve %60 L	0.79±0.16Aa	0.77±0.17Ab	0.88±0.04Ab	0.86±0.13Ad	0.87±0.09Ad	1.07±0.21Ad

¹ Kts: Kitosan, L: Lizozim. ^{A-D} Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır (p < 0.05). ^{a-d} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır (p < 0.05).

Kontrol numunelerinde, depolama sırasında küf büyüme miktarı kitosan kaplamalardan son derece yüksek olduğu; (%) lizozim oranının istatistiksel olarak etkisinin önemli olduğu gözlenmiştir (Şekil 1). Kitosan-lizozim antimikrobiyal kaplama içeren yumurta örneklerinde, küf-maya miktarının ciddi oranda azaldığı tespit edilmiştir. Özellikle son üç haftada lizozim içermeyen kitosan kaplama yumurtadaki küf miktarı farklı oranda lizozim (%10, 20 ve 60) içeren yumurtalara kıyasla daha yüksektir. Son haftalarda kitosan- %20 ve 60 lizozim uygulamaları istatistiki olarak en az mikrobiyal yük içeriğine sahiptir (Şekil 1).

Depolama periyodu boyunca kitosan-lizozim kaplamaların *S. aureus*'a karşı etkinliklerinin kontrol grubuna nazaran önemli düzeyde (p<0.05) olduğu tespit edilmiştir. *Staphylococcus aureus*'a karşı lizozim-kitosan kaplamaların inhibe edici etkisinin lizozimin artan konsantrasyonlarıyla orantılıdır. Kontrol numunelerinde, depolama sırasında *Staphylococcus aureus* sayısının hızla artmasına karşı kitosan kaplanan yumurtalarda az miktarda olduğu; kitosan-lizozim etkisinin önemli olduğu gözlenmiştir (Şekil 2). Kitosan-lizozim antimikrobiyal kaplamanın *Staphylococcus aureus* gelişimini ciddi oranda baskıladığı gözlenmiştir. Özellikle son üç haftada lizozim (%20 ve 60) içerenlerin en etkin şekilde

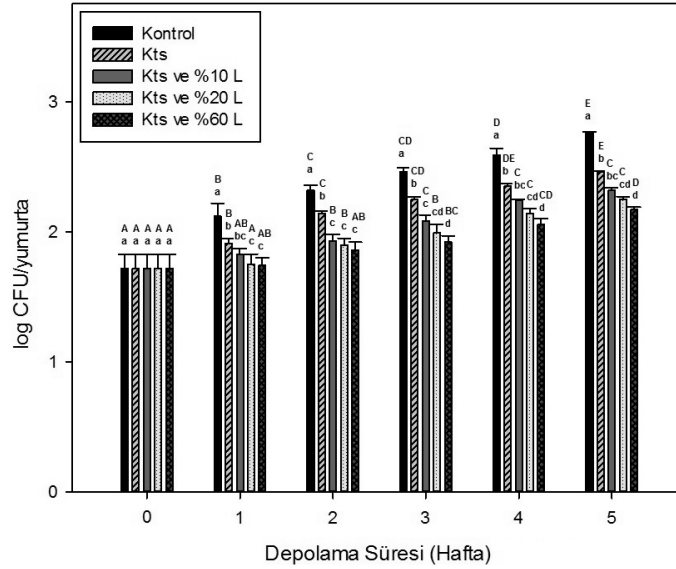
Staphylococcus aureus miktarını baskıladığı gözlenmiştir. Son 3, 4 ve 5. haftalarda kitosan- %20 ve 60 lizozim uygulamaların istatistiksel olarak *Staphylococcus aureus* bakımından benzer olduğu gözlenmiştir. Kabuklu yumurtanın *Staphylococcus aureus* sayımı 0. hafta 0.55 olan değerinin depolama sonunda kitosan- %60 lizozim kaplaması için 0.89, kitosan-%20 lizozim kaplaması için, 1.01, kitosan-%10 lizozim kaplaması için 1.08, sadece kitosan kaplaması için ise 1.48 ve kontrol grubu numunelerde ise 2.33 ile en yüksek oranda olduğu kaydedilmiştir (Şekil 2).

SONUÇ

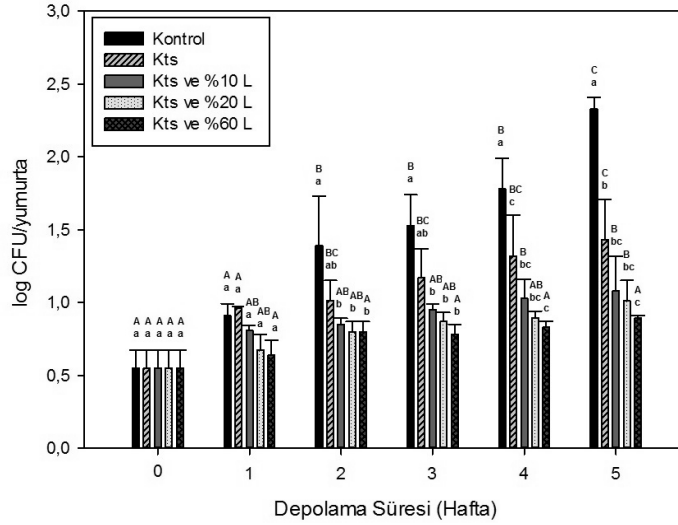
Depolama boyunca kaplama yapılan taze kabuklu yumurtalarda kaplama yapılmayanlara göre mikrobiyal yük daha düşük çıkmış ve kaplamanın mikroorganizmalar üzerine etkileri önemli bulunmuştur. Yumurtalarda, *Salmonella spp.* ve *Listeria monocytogenes* izole edilmemesine rağmen antimikrobiyal kaplamanın *Enterobacteriaceae*, *koagülaz pozitif Staphylococcus aureus*, aerob mezofil toplam bakteri ve küf-maya popülasyonu üzerine önemli düzeyde redüksiyon sağladığı tespit edilmiştir. Buna göre antimikrobiyal katkılı kaplamaların taze yumurtaların raf ömrü üzerine pozitif etkisi olduğu tespit

edilmiştir. Sonuç olarak kitosan-lizozim antimikrobiyal etkisinin artan lizozim konsantrasyonlarında artış

gösterdiği ayrıca yapılan tüm mikrobiyolojik analiz sonuçları bu tespiti desteklemektedir.



Şekil 1: Depolama süresince (hafta) yumurtalarda küf-maya sayıları



Şekil 2. Depolama süresinde (hafta) yumurtalarda *Staphylococcus aureus* sayım sonuçları

Kaplanmış yumurtaların ve özellikle antimikrobiyal özelliğe sahip lizozim ile kaplamanın daha düşük mikrobiyal yüke (*Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, TMAB ve küf-maya) sahip olması, kaplamanın yüzeysel bakteri gelişimi üzerinde inhibisyon etkisini ve kontrollü salınım sağladığını göstermektedir. Bu durum ile kitosan-lizozim kaplamaların kütle transferini azaltarak bariyer görevi yaptığı ayrıca kaplama materyalinin Antimikrobiyal etkisi ile yumurtanın tazeliğini koruduğu (raf ömrünü artırdığı) görülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, 00729.STZ.2010-2 no'lu SAN-TEZ projesi ile Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, Bilim ve Teknoloji Genel Müdürlüğü, tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Watkins, B.A., 1995. The nutritive valor of the egg, Egg Science and Technology (4th ed.), Edited by Stadelman WJ and Cotterill OJ, Doof Products Press, Binghamton, NY, 177-194.
- [2] Caner, C., Cansız, O., 2007. Effectiveness of chitosan-based coating in improving shelf-life of eggs. *Journal of The Science of Food and Agriculture* 87(2): 227-232.
- [3] Caner, C., Cansız, O., 2008. Chitosan coating minimises eggshell breakage and improves egg quality. *Journal of The Science of Food and Agriculture* 88: 56-61.
- [4] USDA, 1998. *Salmonella enteritidis* risk assessment – Shell eggs and egg products.

- (Washington, DC, USDA, Food Safety Inspection Service).
- [5] James, C., Lechevalier, V., Ketteringham, L., 2002. Surface pasteurisation of shell eggs. *Journal of Food Engineering* 53: 193-197.
- [6] Meszaros, L., Horti, K., Farkas, J., 2006. Changes of hen eggs and their components caused by non-thermal pasteurizing treatments. I. Gamma Irradiation of shell eggs. *Acta Alimentaria* 35: 229-236.
- [7] Dev, S.R.S., Raghavan, G.S.V., Garipey, Y., 2008. Dielectric properties of egg components and microwave heating for in-shell pasteurisation of eggs. *Journal of Food Engineering* 86: 207-214.
- [8] Valencia-Chamorro, Silvia A.; Palou, Lluís, del Rio, Miguel A., Maria B., Perez-Gago, 2011. Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: A Review . *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51 (9): 872-900.
- [9] Wang, G.H., 1992. Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. *Journal of Food Protection* 55: 916-919.
- [10] Nadarajah, K., Prinyawiwatkul, W., No, H.K., Sathivel, S., 2006. Sorption behavior of crawfish chitosan films as affected by chitosan extraction processes and film casting solvents. *Journal of Food Science* 71: 33-39.
- [11] Butler, B.L., Vergano, P.J., Testin, R.F., Bunn, J.M., Wiles, J.L. 1996. Mechanical and barrier properties of edible chitosan films as affected by composition and storage. *Journal of Food Science* 61: 953-961.
- [12] Bhale, S., No, H.K., Prinyawiwatkul, W., Farr, A.J., Nadarajah, K., Meyers, S.P., 2003. Chitosan coating improves shelf life of eggs. *Journal of Food Science* 68(7): 2378-2383.
- [13] Caner, C., 2005. Whey protein isolate coating and concentration effects on egg shelf life. *Journal of The Science of Food and Agriculture* 85: 2143-2148.
- [14] Proctor, V.A., Cunningham, F.E., 1988. The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 26: 359-395.
- [15] Padgett, T., Han, I.Y., Dawson, P.L., 1998. Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. *Journal of Food Protection* 61: 1330-1335.
- [16] Cha, D.S., Choi, J.H., Chinnan, M.S., Park, H.J., 2002. Antimicrobial films based on Na-alginate and κ-carrageenan. *LWT* 35: 715- 719.
- [17] Song, Y., Babiker, E.E., Usui, M., Saito, A., Kato, A., 2002. Emulsifying properties and bactericidal action of chitosan-lysozyme conjugates. *Food Researc International* 35: 459-466.
- [18] Anker, M., 1996. Edible and biodegradable films and coatings for food packaking. *The Swedish Institute for Food and Biotechnology*. Goteborg, Sweden.
- [19] Han, J.H., 2000. Antimicrobial food packaging. *Food Technology* 54(3): 56-65.
- [20] BAM, 1998. Bacteriological Analytical Manual. FDA, 8th Ed. Revision A, AOAC Gaithersburg, MD 20877, USA.
- [21] Hou, H., Sing, R.K., Muriana, P.M., Stadelman, P.J., 1996. Pasteurization of intact eggs. *Food Microbiology* 13: 93-101.
-