



**TÜRKİYE BİLİMSEL VE  
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU**

**THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL  
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY**

**BİYOAKTİF MADDELERİN KONTROLLU SALIMI İÇİN KOMPOZİT VEYA  
KARIŞIMLARDAN OLUŞAN AKTİF YENİLEBİLİR GIDA AMBALAJ  
MALZEMELERİ GELİŞTİRİLMESİ**

**PROJE NO: 108M353**

**Mühendislik Araştırma Grubu (MAG)**

**Engineering Research Group**

**BİYOAKTİF MADDELERİN KONTROLLU SALIMI İÇİN  
KOMPOZİT VEYA KARIŞIMLARDAN OLUŞAN AKTİF  
YENİLEBİLİR GIDA AMBALAJ MALZEMELERİ  
GELİŞTİRİLMESİ**

**PROJE NO: 108M353**

PROF.DR. AHMET YEMENİCİOĞLU  
DOÇ. DR. FİGEN KOREL  
PROF. DR. HALİL İBRAHİM ATABAY  
ARAŞ. GÖR. İSKENDER ARCAN  
DERYA ALKAN (DOKTORA ÖĞRENCİSİ)  
ARAŞ. GÖR. LEVENT AYDEMİR  
ARAŞ.GÖR. İLKE UYSAL ÜNALAN  
ARAŞ. GÖR. DERYA BOYACI

ARALIK 2011  
İZMİR

## ÖNSÖZ

Geçtiğimiz 10 yılda modern dünyadaki tüketim alışkanlıkları büyük bir hızla değişmiş ve gıda katkı maddelerinin sağlık üzerindeki muhtemel olumsuz etkileriyle ilgili endişeler artmıştır. Bunun sonucunda özellikle tüketime hazır, minimal işlem görmüş, taze ve doğal forma en yakın ve kimyasal gıda katkı maddesi içermeyen, ancak mikrobiyolojik açıdan güvenli gıdalara karşı adeta talep patlaması yaşanmaktadır. Bu yoğun talebin karşılanması ve istenilen özelliklerdeki ürünlerin elde edilebilmesi amacıyla mevcut en yeni ve komplike teknolojiler devreye sokulmuş ve farklı muhafaza yöntemleri ve anlayışları oluşturulmuştur. Bu muhafaza anlayışları içerisinde üzerinde en çok durulanlardan birisi engel (hurdle) teknolojisi olup, bu teknoloji geleneksel ve modern pek çok muhafaza tekniğinin kombine edilmesiyle uygulanmaktadır. İşte aktif ambalajlama engel teknolojisinin en büyük destekçisi olan uygulamalardan olup, son on yılda kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Nitekim, bu teknolojinin bir süredir Amerika Birleşik Devletleri ve Japonya'da başarıyla uygulandığı bilinmektedir. Avrupa Birliği'nde ise ambalaj materyallerinin aktif ambalajlamaya uygun hale getirilebilmesi için gerekli düzenleme ve yönetmelik çalışmalarının son aşamaya geldiği çeşitli kaynaklarda belirtilmektedir. Tüm bu gelişmeler aktif ambalajlamayı gıda teknolojisinde büyük bütçelerin ayrıldığı en önemli araştırma başlıklarından biri haline getirmiştir. Bu proje tarafımızdan konuyla ilgili gerçekleştirilmiş 2. TÜBİTAK projesidir. Daha önceki ilk projede biyoaktif ajanlar kullanılarak antimikrobiyel ve antioksidant etkisi olan çok fonksiyonlu ambalaj materyalleri geliştirilmiştir. Bu projede ise daha önceki çalışmalar çok daha ileri bir aşamaya taşınmış ve biyoaktif ajanların salım hızının gıdaya ve planlanan raf ömrüne göre değiştirilebileceği kontrollü salım etkisi olan kompozit veya karışım yapıdaki yenilebilir ambalaj malzemeleri geliştirilmiştir. Proje dünyadaki benzerleriyle kıyaslandığı zaman pek çok ilki barındıran yenilikçi bir çalışma olarak dikkat çekmektedir. Kontrollü salım tekniğine sahip yenilebilir ambalaj malzemeleri halen tüm dünyada araştırma safhasında olan ancak yakın bir gelecekte gıdaların muhafazasında yoğun olarak kullanılması planlanan malzemelerdir. Gerçekleştirilmiş olan bu çalışmayla ülkemizin de bu çalışmalara aktif olarak katılması ve ekonomik olarak büyük bir önem arz eden ambalaj sanayimizin ihtiyaç duyacağı bilgi birikiminin oluşturulması hedeflenmiştir. Ülkemizin bilimsel gelişiminin adeta lokomotifini olmuş olan saygın bilim kurumu TÜBİTAK'a dünyada meydana gelen değişimleri yakından takip ederek bu projeye destek sağladığı için teşekkürlerimizi bir borç biliriz.

Proje Yöneticisi

Prof. Dr. Ahmet Yemenicioğlu

## ÖZET

Bu projede biyoaktif maddelerin kontrollü salımını gerçekleştirebilecek yenilebilir film ve kaplamalar geliştirmek amacıyla zein ve peyniraltı suyu proteinleri (PSP) temelli karışım ve kompozit yapılardan faydalanılmıştır. Zeinden elde edilen karışım filmler zeinin oleik, laurik ve linoleik asit gibi yağ asitleri ile karıştırılmasıyla, kompozit filmler ise karnauba, kandelilla ve balmumu gibi mumlar, mercimek veya soya globülin proteinleri veya mikrokristal selülozla karıştırılmasıyla elde edilmiştir. PSP'den elde edilen karışımlar bu proteinlerin oleik asitle, kompozitler ise balmumu ve kandelilla mumuyla karıştırılmasıyla elde edilmiştir. Zein temelli filmlere ilave edilen biyoaktif maddeler kısmi saf ve saf lizozim, kateşin, gallik asit, p-hidroksibenzoik asit, ferulik asit, kuversetin ve flavon, PSP temelli filmlere ilave edilen biyoaktif maddeler ise saf ve kısmi saf lizozim ve kateşindir. Gösterdikleri kontrollü salım etkileri, antimikrobiyel ve antioksidant performanslar ve mekaniki özellikler dikkate alındığında en uygulanabilir filmlerin lizozimin kateşin ve/veya gallik asitle birlikte kullanıldığı zein-oleik asit karışımları ve zein-karnauba mumu kompozitleri olduğu belirlenmiştir. Ayrıntılı salım deneyleri zein karışım ve kompozitlerinde lizozim, kateşin ve kateşin-gallik asit karışımlarının salım hızının çoğunlukla filmlerin çapraz bağlanma düzeyini artıran fenolik bileşik konsantrasyonu ters ilişkili olduğunu göstermiştir. Karışım ve kompozitleri oluşturan mum, yağ asiti ve fenolik madde tipi de filmlerin morfolojisini, hidrofobitesini ve dolambaçlı difüzyon yolu (tortuosity) gibi özelliklerini değiştirerek salım özelliklerini etkileyebilmektedir. Zein'den elde edilmiş fenolik bileşikler veya lizozim ve fenolik bileşikler birarada içeren karışım ve kompozit filmlerin antimikrobiyel testleri bu filmlerin gıdalardaki en kritik patojen bakterilerden olan *Escherchia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* ve *Campylobacter jejuni*'ye karşı laboratuvar ortamlarında ve/veya seçilmiş et ve süt ürünlerinde antimikrobiyel ve antioksidant etki gösterdiğini doğrulamıştır. Filmlerin performansları bakterilerin gıdadaki gelişim hızından direk olarak etkilenmiş ve bakteri gelişiminin hızlı olduğu gıdalarda salım hızı yüksek, yavaş olduğu gıdalarda salım hızı düşük filmler daha başarılı olmuştur. Diğer yandan ayrıntılı salım deneyleri PSP'den elde edilen filmlerde biyoaktif maddelerin salım hızının kompozit veya karışımlarla kontrol edilmesinin zein filmlerin aksine oldukça güç olduğunu göstermiştir. Hızlı bir şekilde su alıp şişen ve nötrale yakın pH'larda negatif yüklü olan PSP filmlerle negatif yüklü olan fenolik bileşikler arasında doğan itme kuvvetleri bu bileşiklerin filmlerden büyük bir hızla salınmasına neden olurken, PSP filmler ve pozitif yüklü lizozim arasında doğan çekme kuvvetleri enzimi filmler içerisinde immobilize etmektedir. Lizozimle ilgili immobilizasyon sorunları PSP filmlerin karışım ve kompozit haline getirilmesi ve PSP'nin izoelektrik noktası altındaki pH değerlerinde çalışılmasıyla kısmen çözülsede bu durum uygulanabilirliği kısıtlayan bir olumsuzluktur. Bu proje biyoaktif maddelerin kontrollü

salımı açısından zein temelli filmlerin PSP temelli filmere göre daha elverişli olduğunu gstermiştir.

**ANAHTAR SÖZCÜKLER:** Biyoaktif madde, antimikrobiyel paketleme, kontrollu salım, yenilebilir film, karışım film, kompozit film

## ABSTRACT

In this project, zein and whey protein (WP) based blend or composite structures were prepared in order to develop edible films and coatings for controlled release of bioactive agents. The blends of zein were obtained by mixing zein with fatty acids such as oleic, lauric and linolenic acids, while composites were prepared by mixing zein with different waxes such as carbauba, candelilla or beeswax, with legume proteins such as chickpea and soy globulins or with microcrystalline cellulose. The bioactive agents incorporated into zein based films were partially purified or pure lysozyme, catechin, gallic acid, p-hydroxybenzoic acid, ferulic acid, quercetin and flavon, while partially purified lysozyme and catechin were incorporated into WP based films. However, considering the obtained controlled release effects, antimicrobial and antioxidant performances and mechanical properties, the most applicable films were obtained with zein-oleic acid blends and zein-carnauba wax composites containing lysozyme with catechin and/or gallic acid. The release rates of lysozyme, catechin ve catechin-gallic acid mixtures from zein composites and blends were affected inversely from the concentration of phenolic compounds which induced crosslinking within the films. The type of wax, fatty acid and phenolic compounds used in composite and blend structures could also affect the release rates of lysozyme and phenolic compounds by changing film morphology, hydrophobicity or tortuosity. The blends and composites of zein films containing phenolic compounds or lysozyme and phenolic compounds showed antimicrobial activity on critical food pathogenic bacteria including *Escherchia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter jejuni* in laboratory media and/or selected meat and dairy products. In general, the films with fast release rates were suitable for food showing fast bacterial growth, while films with slow release rates were suitable for food showing slow bacterial growth. On the other hand, detailed release tests on WP films, blends and composites clearly showed the difficulties in controlling release rates of bioactive agents from these films. The high swelling rates and repulsion created between the negative charges of WP and phenolic compounds at neutral pHs caused rapid release of phenolic compounds from the films. In contrast, negative charges of WP films caused immobilization of positively charged lysozyme at pH close to neutrality. The release of lysozyme is achieved only when the pH of medium was set below pI of WP and films were turned to blends and composites. These results showed greater potential of zein based films than WP based films for controlled release of bioactive agents.

**KEY WORDS:** antimicrobial packaging, controlled release, edible films, blends, composites

## İÇİNDEKİLER

<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>22</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>26</b>
<b>2.1. AKTİF AMBALAJLAMA.....</b>	<b>26</b>
2.1.1. Aktif Ambalajlamada Kullanılan Paket Sistemleri .....	27
2.1.2. Aktif Ambalajlama Filmleri Geliştirilirken Gözönünde Bulundurulacak Başlıca Hususlar .....	28
2.1.2.1. Ambalaj materyali ve aktif ajanın uyumu .....	28
2.1.2.2. Gıdanın ve aktif ajanın uyumu.....	29
2.1.2.3. Paketlenmiş gıdanın depolanma sıcaklığı .....	30
<b>2.2. AKTİF AMBALAJLAMADA KULLANILABİLECEK BİYOAKTİF AJANLAR .....</b>	<b>31</b>
2.2.1. Antimikrobiyel Enzimler .....	32
2.2.1.1. Lizozim.....	32
2.2.1.2. Diğer antimikrobiyel enzimler (laktoperoksidaz, glukoz oksidaz ve kitinaz) .....	33
2.2.2 Bakteriosinler.....	35
2.2.3. Fenolik bileşikler .....	35
<b>2.3. AKTİF AMBALAJLAMADA KULLANILABİLECEK FİLMER.....</b>	<b>38</b>
<b>2.3.1. Aktif ambalajlamada yenilebilir filmlerin kullanılması.....</b>	<b>38</b>
2.3.1.1. Protein yapısındaki yenilebilir filmler .....	39
2.3.1.1.1. Zein filmler.....	40
2.3.1.1.2. Peynir altı suyu proteinlerinden elde edilen filmler .....	41
2.3.1.2. Karbonhidrat yapısındaki yenilebilir filmler .....	42
2.3.1.3. Lipid yapısındaki yenilebilir filmler .....	44
<b>2.4. AKTİF AMBALAJLAMADA KONTROLLU SALIMIN ÖNEMİ .....</b>	<b>44</b>
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>50</b>
<b>3.1. GEREÇ.....</b>	<b>50</b>
<b>3.2. YÖNTEM .....</b>	<b>50</b>
3.2.1. Biyoaktif Maddelerin Aktivitesinin/Miktarının Belirlenmesi .....	50

3.2.1.1. Lizozim aktivitesinin belirlenmesi.....	50
3.2.1.1.1. Çözünür haldeki lizozimin aktivitesinin belirlenmesi .....	50
3.2.1.1.2. Immobilize haldeki lizozimin aktivitesinin belirlenmesi.....	51
3.2.1.1. Flavonoit madde ve toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi .....	52
3.2.2. Film üretiminde kullanılmış olan baklagil proteinlerinin üretimi.....	53
3.2.3. Zein ve Zein Temelli Filmlerin Üretimi.....	54
3.2.3.1. Zein filmlerin üretimi .....	54
3.2.3.2. Zein-mum kompozit filmlerin üretimi.....	54
3.2.3.3. Zein-baklagil proteini kompozit filmlerin üretimi .....	55
3.2.3.4. Zein-oleik asit karışım filmlerin üretimi.....	55
3.2.4. Peyniraltı Suyu Proteini ve Peyniraltı Suyu Proteini Temelli Filmlerin Üretimi.....	56
3.2.4.1. Peynir altı suyu protein filmlerin üretimi .....	56
3.2.4.2. Peynir altı suyu proteini-mum kompozit ve peyniraltı suyu-oleik asit karışım filmlerin üretimi .....	56
3.2.5. Salım Deneyleri .....	56
3.2.5.1. Su içerisinde yürütülen salım deneyleri .....	56
3.2.5.1.1. Çalkalamalı ortamda su içerisinde serbest bırakılan filmlerle yürütülen salım deneyleri .....	56
3.2.5.1.2. Çalkalamalı ortamda su içerisinde cam çerçeve içerisinde sabitlenmiş filmlerle yürütülen salım deneyleri.....	57
3.2.5.2. Belirli bir pH'daki tampon içerisinde yürütülen salım deneyleri .....	57
3.2.5.3. Bir filmin ard arda farklı pH'lardaki tamponlarda bekletilmesiyle yürütülen salım deneyleri .....	58
3.2.5.4. Katı ortamda yürütülen salım deneyleri .....	59
3.2.6. Filmlerin Antimikrobiyel Aktivitesinin Belirlenmesi .....	59
3.2.6.1. Camphylobacter jejuni'ye karşı yürütülen antimikrobiyel testler .....	59
3.2.6.2. Listeria monocytogenes ve Listeria innocua'ya karşı yürütülen antimikrobiyel testler .....	60
3.2.6.3. Escherichia coli O157:H7'ye karşı yürütülen antimikrobiyel testler .....	61
3.2.7. Filmlerin Antioksidant Aktivitesinin Belirlenmesi.....	61
3.2.7.1. Filmlerin çözünür antioksidant aktivitesinin belirlenmesi (TEAC yöntemi).....	61
3.2.7.2. Filmlerin çözünür antioksidant aktivitesinin belirlenmesi (ORAC yöntemi).....	62



3.2.7.3. Filmlerin bağıli antioksidant kapasitesinin belirlenmesi (TEAC yöntemi).....	62
3.2.8. Seçilmiş Filmlerin Gıdalarda Denenmesi .....	63
3.2.8.1. Lizozim ve fenolik maddeler içeren zein ve zein temelli filmlerin taze kaşarda <i>Listeria monocytogenes</i> 'e etkisi.....	63
3.2.8.1.1. <i>Listeria monocytogenes</i> kültürünün hazırlanması.....	63
3.2.8.1.2. Peynirlerin inokülasyonu ve aktif paketlenmesi .....	63
3.2.8.1.3. Mikrobiyolojik analizler .....	64
3.2.8.2. Lizozim ve fenolik maddeler içeren zein ve zein temelli filmlerin taze kaşarda oksidatif değişimlere etkisi.....	64
3.2.8.3. Lizozim ve fenolik maddeler içeren zein ve zein temelli filmlerin dana burgerde <i>Escherichia coli</i> O157:H7'ye karşı kullanılması .....	65
3.2.8.3.1. <i>Escherichia coli</i> O157:H7 kültürünün hazırlanması.....	65
3.2.8.3.2. Burgerlerin inokülasyonu ve aktif paketlenmesi .....	65
3.2.8.3.3. Mikrobiyolojik analizler.....	66
3.2.9. Filmlerin kalınlığının ve kesit görüntülerinin belirlenmesi.....	66
3.2.10. Filmlerin Mekaniki Özelliklerinin Belirlenmesi.....	67
3.2.11. Filmlerin FTIR Spektroskopisiyle İncelenmesi.....	67
<b>4.BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>68</b>
<b>4.1. FENOLİK MADDELERİN KONTROLLU SALIMI İÇİN KOMPOZİT VE KARIŞIM YENİLEBİLİR ZEİN FİMLER GELİŞTİRİLMESİ .....</b>	<b>68</b>
4.1.1. Zein filmler içerisine ilave edilebilecek uygun fenolik maddelerin belirlenmesi.....	68
4.1.1.1. Farklı fenolik maddelerin zein filmlerin mekaniki özellikleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi.....	69
4.1.1.2. Farklı fenolik maddelerin zein filmlerin morfolojisi ve salım hızı üzerindeki etkilerinin belirlenmesi .....	74
4.1.2. Kateşinin kontrolü salımı için zein-karnauba mumu kompozit filmler geliştirilmesi.....	76
4.1.2.1. Kateşin içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin salım deneyleri.....	77
4.1.2.2. Kateşin içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin antioksidant aktivitesi.....	80
4.1.2.3. Kateşin içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin <i>Listeria innocua</i> 'ya karşı antimikrobiyel etkisi .....	81

4.1.2.4. Kateşin içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin mekaniki özellikleri.....	83
4.1.2.5. Kateşin içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin SEM görüntüleri.....	83
4.1.3. Gallik asitin kontrollu salımı için zein-karnauba mumu kompozit filmler geliştirilmesi.....	84
4.1.3.1. Gallik asit içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin salım deneyleri.....	85
4.1.3.2. Gallik asit içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin Campylobacter jejuni üzerindeki antimikrobiyel etkisi.....	87
4.1.3.3. Gallik asit içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin antioksidant aktivitesi.....	90
4.1.3.4. Gallik asit içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin mekaniki özellikleri.....	91
4.1.3.5. Gallik asit içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin SEM görüntüleri.....	92
4.1.4. Kateşinin kontrollu salımı için zein-oleik asit karışım filmler geliştirilmesi .....	93
4.1.4.1. Kateşin içeren zein-oleik asit karışım filmlerin salım deneyleri .....	95
4.1.5. Kateşin ve Gallik asit'in birarada kontrollu salımı için zein-oleik asit karışım filmler geliştirilmesi.....	97
4.1.5.1. Kateşin ve gallik asit'i birarada içeren zein-oleik asit karışım filmlerin salım deneyleri .....	97
4.1.5.2. Kateşin ve gallik asit'i birarada içeren zein-oleik asit karışım filmlerin mekaniki özellikleri .....	100
4.1.5.3. Kateşin ve gallik asit'i birarada içeren zein-oleik asit karışım filmlerin SEM görüntüleri .....	101
4.1.6. Kateşin ve Gallik asit'in birarada kontrollu salımı için zein-selüloz kompozit filmler geliştirilmesi .....	102
4.1.6.1. Kateşin ve gallik asit'i birarada içeren zein-selüloz kompozit filmlerin salım deneyleri .....	103

## **4.2. LİSOZİM'İN KONTROLLÜ SALIMI İÇİN KOMPOZİT VE KARIŞIM YENİLEBİLİR ZEİN FİMLER GELİŞTİRİLMESİ..... 104**

4.2.1. Lizozim'in kontrollu salımı için fenolik bileşikler içeren zein-mum kompozit filmler geliştirilmesi .....	104
--	-----

4.2.1.1 Lisozim'in kontrollu salımı için kateşin veya gallik asit içeren zein-mum kompozit filmler geliştirilmesi.....	105
4.2.1.1.1. Kısmi saf lisozim ve kateşin içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerden kateşin salımı.....	105
4.2.1.1.2. Kısmi saf lisozim ve kateşin içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerden lisozim salımı .....	106
4.2.1.1.3. Kısmi saf lisozim ve kateşin içeren zein-kandelilla mumu ve zein-balmumu kompozit filmlerin lisozim salımı.....	109
4.2.1.1.4. Kısmi saf lisozim ve kateşin içeren zein-mum kompozit filmlerin mekaniki özellikleri .....	110
4.2.1.1.5. Kısmi saf lisozim ve kateşin içeren zein-mum kompozit filmlerin SEM görüntüleri .....	111
4.2.1.1.6. Saf lisozim ve kateşin içeren zein-kandelilla mumu ve zein-balmumu kompozit filmlerin lisozim salımı.....	113
4.2.1.1.7. Kısmi saf lisozim ve gallik asit içeren zein-karnauba mumu, zein-kandelilla mumu ve zein-balmumu kompozit filmlerin lisozim salımı .....	113
4.2.1.1.8. Kısmi saf lisozim ve kateşin veya kısmi saf lisozim ve gallik asit içeren zein-mum kompozit filmlerin <i>Listeria monocytogenes</i> ve <i>Listeria innocua</i> üzerindeki antimikrobiyel etkisi.....	116
4.2.1.2. Lisozim'in kontrollu salımı için kateşin ve gallik asit'i birarada içeren mum-kompozit filmler geliştirilmesi.....	120
4.2.1.2.1. Kısmi saf lisozim, kateşin ve gallik asit'i birarada içeren zein-mum kompozit filmlerin lisozim salımı.....	120
4.2.1.2.2. Kısmi saf lisozim, kateşin ve gallik asit'i birarada içeren zein-mum kompozit filmlerin fenolik madde salımı .....	122
4.2.1.2.3. Kısmi saf lisozim, kateşin ve gallik asit'i birarada içeren zein-mum kompozit filmlerin <i>Listeria monocytogenes</i> üzerindeki antimikrobiyel etkisi.....	123
4.2.2. Lisozimin'in Kontrollu Salımı İçin Fenolik Bileşikler İçeren Zein-Yağ Asiti Karışım Filmler Geliştirilmesi .....	124
4.2.2.1. Kısmi saf lisozim ve kateşin içeren zein-oleik asit karışım filmlerin lisozim salımı .....	124
4.2.2.2. Kısmi saf lisozim ve kateşin içeren zein-laurik asit ve zein-linoleik asit karışım filmlerin lisozim salımı .....	129
4.2.2.2. Kısmi saf lisozim ve kateşin içeren zein-yağ asiti karışım filmlerin mekaniki özellikleri.....	132

4.2.2.3. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein-yağ asiti karışım filmlerin SEM görüntüleri.....	132
4.2.2.4. Saf lizozim ve kateşin içeren zein-oleik asit karışım filmlerin lizozim salımı.....	133
4.2.2.5. Saf lizozim ve kateşin içeren zein-laurik asit ve zein-linoleik asit karışım filmlerin lizozim salımı .....	136
4.2.2.6 Kısmi saf lizozim ve kateşin veya saf lizozim ve kateşin içeren zein-yağ asiti karışım filmlerin Listeria innocua üzerindeki antimikrobiyel etkisi .....	138
4.2.3. Lizozimin kontrollü salımı için zein-baklagil proteini kompozit filmler geliştirilmesi.....	138
4.2.3.1. Kısmi saf lizozim içeren zein-mercimek proteini kompozit filmlerin farklı pH değerlerindeki yürütülen lizozim salımı .....	140
4.2.3.2. Kısmi saf lizozim içeren zein-mercimek proteini kompozit filmlerin dinamik pH değişimi olan ortamlardaki lizozim salımı .....	141
4.2.3.3. Saf lizozim içeren zein-mercimek proteini kompozit filmlerin dinamik pH değişimi olan ortamlardaki lizozim salımı.....	142
4.2.3.4. Lizozim içeren zein-mercimek protini kompozit filmlerin Listeria innocua üzerindeki antimikrobiyel etkisi .....	146
4.2.3.5. Lizozim içeren zein-mercimek proteini kompozit filmlerin mekanik özellikleri.....	147
4.2.3.6. Lizozim içeren zein-mercimek protini kompozit filmlerin SEM görüntüleri.....	147
4.2.3.7. Kısmi saf lizozim içeren zein-soya proteini kompozit filmlerin dinamik pH değişimi olan ortamlardaki lizozim salımı.....	148
4.2.3.8. Lizozim içeren zein-soya protini kompozit filmlerin Listeria innocua üzerindeki antimikrobiyel etkisi.....	148

#### **4.3. LİSOZİM VE FENOLİK BİLEŞİKLER'İN KONTROLLÜ SALIMI İÇİN KOMPOZİT VE KARIŞIM YENİLEBİLİR PEYNİRALTI SUYU FİMLER GELİŞTİRİLMESİ .....**

4.3.1. Kateşinin peyniraltı suyu proteini filmlerden kontrollü salımı için zein-mum kompozit filmlerin geliştirilmesi .....	151
4.3.1.1. Kateşin içeren peyniraltı suyu proteini-kandelilla mumu ve peyniraltı suyu proteini-balmumu kompozit filmlerin kateşin salımı .....	151
4.3.2. Lizozim'in kontrollü salımı için peyniraltı suyu proteini-mum kompozit filmler geliştirilmesi .....	153

4.3.2.1. Kısmi saf lizozim içeren peyniraltı suyu proteini-kandelilla mumu ve peyniraltı suyu proteini-balmumu kompozit filmlerin lizozim salımı .....	153
4.3.2.2. Saf lizozim içeren peyniraltı suyu proteini filmlerin farklı pH değerlerindeki lizozim salımı .....	155
4.3.2.3. Saf lizozim içeren peyniraltı suyu proteini filmlerin dinamik pH değişimi olan ortamlardaki lizozim salımı .....	155
4.3.2.4. Saf lizozim içeren peyniraltı suyu proteini-balmumu kompozit ve peyniraltı suyu-oleik asit karışım filmlerin lizozim salımı .....	158
4.3.2.5. Saf lizozim içeren peyniraltı suyu proteini-balmumu kompozit ve peyniraltı suyu-oleik asit karışım filmlerin <i>Listeria innocua</i> 'ya karşı antimikrobiyel etkisi.....	161
4.3.2.6. Saf lizozim içeren peyniraltı suyu proteini-balmumu kompozit ve peyniraltı suyu proteini-oleik asit karışım filmlerin mekaniki özellikleri .....	161
4.2.2.6. Saf lizozim içeren peyniraltı suyu proteini-balmumu kompozit ve peyniraltı suyu proteini-oleik asit karışım filmlerin SEM görüntüleri .....	162

#### **4.4. GELİŞTİRİLMİŞ OLAN POTANSİYEL ARZ EDEN FİMLERİN SEÇİLMİŞ GIDALARDA UYGULANMASI..... 163**

4.4.1. Kısmi saf lizozimin ve fenolik bileşikler içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin taze kaşarda <i>Listeria monocytogenes</i> 'e karşı kullanılması .....	163
4.4.1.1. Taze kaşarda aktif ambalajlamanın <i>Listeria monocytogenes</i> üzerindeki antimikrobiyel etkisi.....	164
4.4.1.2. Taze kaşarda aktif ambalajlamanın oksidatif değişimlerin önlenmesi üzerindeki etkisi .....	168
4.4.2. Kısmi saf lizozim ve fenolik bileşikler içeren zein-karnauba mumu kompozit filmler ve zein-oleik asit karışım filmlerin dana burgerlerde <i>E. coli</i> O157:H7'ye karşı kullanılması .....	169
4.4.2.1. Dana burgerlerin aktif ambalajlanmasında kullanılmış olan filmlerin salım deneyleri .....	171
4.4.2.2. Dana burgerlerin aktif ambalajlanmasında kullanılmış olan filmlerin <i>E. coli</i> O157:H7 üzerindeki antimikrobiyel etkisi .....	174
4.4.2.3. Dana burgerlerde aktif ambalajlamanın <i>E. coli</i> O157:H7 üzerindeki antimikrobiyel etkisi.....	175

#### **5.SONUÇLAR ve ÖNERİLER..... 178**

<b>5.1. Zein-mum kompozit ve zein-yağ asiti karışım filmlerle ilgili sonuçlar ve öneriler .....</b>	<b>178</b>
<b>5.2. Zein-baklagil proteini kompozit filmlerle ilgili sonuçlar ve öneriler .....</b>	<b>179</b>
<b>5.3. Peyniraltı suyu proteini (PSP) filmlerle karışım ve kompozitleriyle ilgili sonuçlar ve öneriler.....</b>	<b>180</b>
<b>6. Referanslar .....</b>	<b>181</b>
<b>7. EKLER.....</b>	<b>193</b>

## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 4. 1. Farklı fenolik maddeler içeren zein filmlerin mekanik özellikleri .....	70
Tablo 4. 2. Zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerin bileşiminin antioksidant potansiyellerine olan etkisi .....	81
Tablo 4. 3. Kateşin içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin mekanik özellikleri.....	83
Tablo 4. 4. Destile su ve katı agarda salım deneylerinde zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerden ortama geçen toplam gallik asit miktarları .....	87
Tablo 4. 5. Gallik asit içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerden su ve katı ortamlara geçen toplam gallik asit miktarlarına karşılık gelen antioksidant aktiviteler .....	91
Tablo 4. 6. Gallik asit içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerin mekanik özellikleri.....	92
Tablo 4. 7. Kateşin içeren zein-oleik asit karışım filmlerden salınan toplam kateşin miktarları ve bunlara karşılık gelen antioksidant aktiviteler .....	96
Tablo 4. 8. Kateşin ve gallik asit'i birarada içeren zein-oleik asit karışım filmlerden salınan toplam fenolik madde miktarları.....	99
Tablo 4. 9. Gallik asit ve kateşin içeren zein ve zein-oleik asit karışım filmlerin mekanik özellikleri.....	101
Tablo 4. 10. Zein filmler içerisine ilave edilmiş olan mumları oluşturan bileşenlerin moleküler özellikleri .....	104
Tablo 4. 11. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerde salınan toplam lizozim aktiviteleri, kateşin miktarları ve antioksidant aktiviteler .....	107
Tablo 4. 12. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein-mumu kompozit filmlerin mekanik özellikleri.....	111
Tablo 4. 13. Kısmi saf lizozim ve fenolik madde içeren zein ve zein-mum kompozit filmlerden salınan toplam fenolik madde miktarları ve bunlara karşılık gelen antioksidant aktiviteler.....	116
Tablo 4. 14. Kısmi saf lizozim ve gallik asit içeren zein ve zein-mum kompozit filmlerin Listeria monocytogenes'e karşı antimikrobiyel etkisi.....	119
Tablo 4. 15. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein ve zein-mum kompozit filmlerin Listeria innocua'ya karşı antimikrobiyel etkisi.....	119
Tablo 4. 16. Kısmi saf lizozim, kateşin ve gallik asit'i birarada içeren ve zein-mum kompozit filmlerden salınan lizozim ve fenolik madde düzeyleri ve filmlerin antioksidant potansiyelleri.....	122

Tablo 4. 17. Kısmi saf lizozim, kateşin ve gallik asit'i birarada içeren zein ve zein-mum kompozit filmlerin <i>Listeria monocytogenes</i> üzerindeki antimikrobiyel etkisi .....	124
Tablo 4. 18. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein ve zein-oleik asit karışım filmlerden salınan toplam lizozim aktivite düzeyleri .....	127
Tablo 4. 19. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein ve zein-oleik asit karışım filmlerden salınan toplam lizozim aktivite düzeyleri .....	130
Tablo 4. 20. Karışım oluşturmada kullanılmış olan yağ asitlerinin moleküler yapısı .....	131
Tablo 4. 21. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein ve zein-yağ asiti karışım filmlerden salınan toplam lizozim aktivite düzeyleri .....	132
Tablo 4. 22. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein-yağ asiti karışım filmlerin mekaniki özellikleri.....	133
Tablo 4. 23. Saf lizozim ve kateşin içeren zein ve zein-oleik asit karışım filmlerden salınan toplam lizozim aktivite düzeyleri .....	136
Tablo 4. 24. Saf lizozim ve kateşin içeren zein ve zein-yağ asiti karışım filmlerden salınan toplam lizozim aktivite düzeyleri .....	137
Tablo 4. 25. Kısmi saf lizozim ve kateşin veya saf lizozim ve kateşin içeren zein ve zein-yağ asiti karışım filmlerin <i>Listeria innocua</i> 'ya karşı antimikrobiyel etkisi .....	139
Tablo 4. 26. Kısmi saf lizozim içeren zein ve zein-mercimek proteini kompozit filmlerden farklı pH değerlerinde salınan toplam lizozim aktiviteleri.....	141
Tablo 4. 27. Farklı pH değerlerinde zein filmlerden 24 saat sonunda ortama geçen kısmi saf lizozimin aktivite düzeyleri.....	144
Tablo 4. 28. Farklı pH değerlerinde zein filmlerden 24 saat sonunda ortama geçen saf lizozimin aktivite değerleri .....	145
Tablo 4. 29. Kısmi saf lizozim ve saf lizozim içeren zein-mercimek proteini kompozit filmlerin <i>L. innocua</i> üzerindeki antimikrobiyel etkisi .....	146
Tablo 4. 30. Zein ve zein-mercimek proteini kompozit filmlerin mekaniki özellikleri.....	147
Tablo 4. 31. Farklı pH değerlerinde zein filmlerden 24 saat sonunda ortama geçen saf lizozimin aktivite değerleri .....	150
Tablo 4. 32. Saf lizozim içeren zein-soya proteini kompozit filmlerin <i>L. innocua</i> üzerindeki antimikrobiyel etkisi .....	151
Tablo 4. 33. Kısmi saf lizozim içeren PSP ve PSP-mum kompozit filmlerde immobilize lizozim aktiviteleri .....	154
Tablo 4. 34. Saf lizozim içeren PSP filmlerden farklı pH'larda salınan toplam lizozim aktivite düzeyleri .....	156



Tablo 4. 35. Saf lizozim içeren PSP filminden farklı pH değerlerinde 24 saat sonunda ortama geçen saf lizozimin aktivite değerler .....	157
Tablo 4. 36. Saf lizozim içeren PSP, PSP-balmumu kompozit ve PSP-oleik asit karışım filmlerin farklı pH değerlerinde ortama geçen saf lizozimin aktivite değerler .....	160
Tablo 4. 37. Saf lizozim içeren PSP-balmumu kompozit ve PSP-oleik asit karışım filmlerin <i>Listeri innocua</i> 'ya karşı antimikrobiyel etkisi .....	161
Tablo 4. 38. Saf lizozim içeren PSP-balmumu kompozit ve PSP-oleik asit karışım filmlerin mekaniki özellikleri.....	162
Tablo 4. 39. Lizozim ve fenolik bileşikler içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerle aktif ambalajlamanın +4 °C'de depolanmakta olan taze kaşarlarda <i>Listeria monocytogenes</i> üzerindeki antimikrobiyel etkisi .....	167
Tablo 4. 40. Lizozim ve fenolik bileşikler içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerle aktif ambalajlamanın +4°C'de depolanmakta olan taze kaşarlarda oksidatif değişimler üzerine etkisi .....	170
Tablo 4. 41. Kısmi saf lizozim, kateşin ve disodyum EDTA içeren zein, zein-karnauba mumu kompozit ve zein-oleik asit karışım filmlerden salınan toplam lizozim aktivite düzeyleri.....	172
Tablo 4. 42. Kısmi saf lizozim, kateşin ve disodyum EDTA içeren zein, zein-karnauba mumu kompozit ve zein-oleik asit karışım filmlerden salınan toplam fenolik madde miktarları .....	173
Tablo 4. 43. Kısmi saf lizozim, kateşin ve disodyum EDTA içeren zein, zein-karnauba mumu kompozit ve zein-oleik asit karışım filmlerin <i>E.coli</i> O157:H7 üzerindeki antimikrobiyel etkisi .....	174
Tablo 4. 44. Kısmi saf lizozim, kateşin ve disodyum EDTA içeren zein, zein-karnauba mumu kompozit ve zein-oleik asit karışım filmlerle aktif ambalajlamanın +4°C'de depolanmakta olan dana burgerlerde <i>E. coli</i> O157:H7 üzerindeki antimikrobiyel etkisi .....	177

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4. 1. Çalışmada kullanılmış olan farklı fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları.....	68
Şekil 4. 2. Kateşin ve gallik asitin zein filmlerin uzama değerleri üzerindeki etkisi.....	70
Şekil 4. 3. Kateşin ve gallik asitin zein filmlerin gerilme değeri ve elastik modulus değeri üzerindeki etkisi .....	71
Şekil 4. 4. Fenolik madde içermeyen kontrol zein filmin iki ucundan çekilerek gerdirildiği zaman esneklik göstermeden camsı bir şekilde kopması; (B) 3.0 mg/cm <sup>2</sup> gallik asit içeren aynı uzunluktaki zein filmin iki ucundan çekilerek gerdirildiği zaman %100'e yakın oranda esneyerek kopmadan uzaması .....	71
Şekil 4. 5. Zein filmlere gallik asit ilavesinin neden olduğu hidrojen bağı oluşumunun FTIR spektroskopisiyle gösterilmesi .....	74
Şekil 4. 6. Farklı fenolik maddeler içeren zein filmlerin SEM yan kesit görüntüleri .....	75
Şekil 4. 7. Kateşin ve gallik asit içeren filmlerin +4 °C'deki destile su içerisindeki fenolik maddesalım profilleri .....	76
Şekil 4. 8. Zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerden kateşinin salım profilleri.....	78
Şekil 4. 9. Farklı miktarlarda kateşin içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerin kateşinin salım profilleri .....	80
Şekil 4. 10. Kateşin içeren zein ve zein-karnauba mum kompozit filmlerin L.innocua üzerinde oluşturduğu zonlar.....	82
Şekil 4. 11. Kateşin içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerin SEM yan kesit görüntüleri. ....	84
Şekil 4. 12. Kateşin içeren zein ve zein-karnauba mumu filmlerin SEM yan kesit görüntüleri.....	85
Şekil 4. 13. Gallik asit içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerin destile su içerisindeki gallik asit salım profili.....	88
Şekil 4. 14. Gallik asit içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerin katı ağırdaki gallik asit salım profili .....	88
Şekil 4. 15. Gallik asit içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin C. jejuni üzerinde oluşturduğu zonlar.....	89
Şekil 4. 16. Gallik asit içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerin tarafımızdan tavuk karkasından izole edilmiş C. jejuni ve insandan izole edilmiş referans C. jejuni suşları üzerindeki antimikrobiyel etkisi.....	90
Şekil 4. 17. Gallik asit içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlere ait SEM yan kesit görüntüleri.....	94

Şekil 4. 18. Kateşin içeren zein-oleik asit karışımlarında oleik asit miktarının kateşin salım profiline etkisi .....	96
Şekil 4. 19. Kateşin ve gallik asiti birarada içeren zein ve zein-oleik asit karışım filmlerde fenolik madde salım profilleri .....	98
Şekil 4. 20. Kateşin ve gallik asit'i birarada içeren zein-oleik asit karışım filmlerin fenolik madde salım profilleri .....	100
Şekil 4. 21. Gallik asit ve kateşin içeren zein ve zein-oleik asit karışım filmlere ait SEM yankesit görüntüleri .....	102
Şekil 4. 22. Kateşin ve gallik asiti birarada içeren zein-MKS kompozit filmlerde fenolik madde salım profilleri .....	103
Şekil 4. 23. Kısmi saf lizoim ve kateşin içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerin kateşin salım profili .....	106
Şekil 4. 24. Kısmi saf liozom ve kateşin içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerin liozom salım profilleri .....	109
Şekil 4. 25. Kısmi saf liozom ve kateşin içeren zein ve zein-mum kompozit filmlerin liozom salım profilleri .....	110
Şekil 4. 26. Kısmi saf liozom ve kateşin içeren zein ve zein-mum kompozit filmlere ait SEM yankesit görüntüleri.....	112
Şekil 4. 27. Saf liozom ve kateşin içeren zein ve zein-mum kompozit filmlerin liozom salım profilleri .....	114
Şekil 4. 28. Kısmi saf liozom ve gallik asit içeren zein ve zein-mum kompozit filmlerin liozom salım profilleri .....	115
Şekil 4. 29. Gallik asit ve kateşin'in TEAC metoduyla ABTS serbest radikali kullanılarak ölçülmüş antioksidant aktivitelerini gösteren kurveler .....	117
Şekil 4. 30. Kısmi saf liozom, kateşin ve gallik asit'i birarada içeren zein ve zein-mum kompozit filmlerin liozom salım profilleri .....	121
Şekil 4. 31. Kısmi saf liozom, kateşin ve gallik asit'i birarada içeren zein ve zein-mum kompozit filmlerin fenolik madde salım profilleri .....	123
Şekil 4. 32. Kısmi saf liozom ve kateşin içeren zein ve zein-oleik asit karışım filmlerin liozom salım profilleri .....	125
Şekil 4. 33. Kısmi saf liozom ve kateşin içeren zein-oleik asit karışım filmlerin liozom salım profilleri .....	126
Şekil 4. 34. Kısmi saf liozom ve kateşin içeren zein ve zein-oleik asit karışım filmlerin liozom salım profilleri .....	129
Şekil 4. 35. Kısmi saf liozom ve kateşin içeren zein-yağ asiti karışım filmlerin liozom salım profilleri .....	131

Şekil 4. 36. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein ve zein-yağ asiti karışım filmlerin SEM yan kesit görüntüleri.....	134
Şekil 4. 37. Saf lizozim ve kateşin içeren zein ve zein-oleik asit karışım filmlerin lizozim salım profilleri.....	135
Şekil 4. 38. Saf lizozim ve kateşin içeren zein-yağ asiti karışım filmlerin lizozim salım profilleri.....	137
Şekil 4. 39. Kısmi saf lizozim içeren zein ve zein-mercimek proteini kompozit filmlerin farklı pH değerlerindeki lizozim salım profilleri .....	141
Şekil 4. 40. Kısmi saf lizozim ve mercimek proteinleri (MPE) içeren zein filmlerin ard arda farklı pH değerlerindeki Na-fosfat tamponlar içerisinde salım deneyine tabi tutulması sırasındaki lizozim salım profilleri .....	143
Şekil 4. 41. Kısmi saf lizozimin farklı pH'lardaki Na-fosfat tamponlar içerisindeki (A) ve farklı miktarlarda mercimek proteinleri (MPE) bulunan pH 7.3 Na-fosfat tampon çözeltilerindeki stabilitesi (B).....	144
Şekil 4. 42. Saf lizozim ve mercimek proteinleri (MPE) içeren zein filmlerin ard arda farklı pH değerlerindeki tamponlar içerisinde salım deneyine tabi tutulması sırasındaki lizozim salım profilleri .....	145
Şekil 4. 43. Kısmi saf ve saf lizozim içeren zein ve zein-mercimek protein ekstraktı kompozit filmlerin SEM görüntüleri.....	149
Şekil 4. 44. Saf lizozim ve soya proteinleri (SPE) içeren zein filmlerin ard arda farklı pH değerlerindeki tamponlar içerisinde salım deneyine tabi tutulması sırasındaki lizozim salım profilleri .....	150
Şekil 4. 45. Kateşin içeren PSP, PSP-kandelilla mumu kompozit ve PSP-balmumu kompozit filmlerin kateşin salım profilleri .....	152
Şekil 4. 46. Kateşin içeren PSP-balmumu kompozit filmlerde mum oranının artırılmasının kateşinin salım profiline etkisi.....	153
Şekil 4. 47. Farklı PSP filmlerinin immobilize lizozim aktivitelerini gösteren kurveler.....	154
Şekil 4. 48. Saf lizozim içeren PSP filmlerin farklı pH değerlerindeki lizozim salım profilleri.....	156
Şekil 4. 49. Saf lizozim içeren PSP filmin ard arda farklı pH değerlerindeki Na-asetat tamponlar (0.05 M) içerisinde salım deneyine tabi tutulması sırasındaki lizozim salım profilleri.....	157
Şekil 4. 50. Saf lizozim içeren PSP, PSP-balmumu kompozit ve PSP-oleik asit karışım filmlerin pH 5.5 Na-asetat tampon (0.05 M) içerisindeki lizozim salım profilleri .....	159
Şekil 4. 51. Saf lizozim içeren PSP, PSP-balmumu kompozit ve PSP-oleik asit	

karışım filmlerin pH 5.0 Na-asetat tampon (0.05 M) içerisindeki lizozim salım profilleri .....	159
Şekil 4. 52. Saf lizozim içeren PSP, PSP-balmumu kompozit ve PSP-oleik asit karışım filmlerin pH 4.5 Na-asetat tampon (0.05 M) içerisindeki lizozim salım profilleri .....	160
Şekil 4. 53. Saf lizozim içeren PSP (A), PSP-oleik asit karışım (B) ve PSP-balmumu kompozit (C) filmlerin SEM görüntüleri .....	163
Şekil 4. 54. Lizozim ve fenolik bileşikler içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerle aktif ambalajlamanın +4 °C'de depolanmakta olan taze kaşarlarda <i>Listeria monocytogenes</i> üzerindeki antimikrobiyel etkisi.....	166
Şekil 4. 55. Kısmi saf lizozim, kateşin ve gallik asit' i birarada içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerle aktif ambalajlamanın +4°C'de depolanmakta olan taze kaşarlarda oksidatif değişimler üzerindeki etkisi.....	169
Şekil 4. 56. Burgerlerin aktif ambalajlanmasında kullanılmış olan kısmi saf lizozim, kateşin ve disodyum EDTA içeren zein, zein-karnauba mumu kompozit ve zein-oleik asit karışım filmlerin lizozim salım profilleri .....	172
Şekil 4. 57. Burgerlerin aktif ambalajlanmasında kullanılmış olan kısmi saf lizozim, kateşin ve disodyum EDTA içeren zein, zein-karnauba mumu kompozit ve zein-oleik asit karışım filmlerin lizozim salım profilleri .....	173
Şekil 4. 58. Kısmi saf lizozim, kateşin ve disodyum EDTA içeren zein, zein-karnauba mumu kompozit ve zein-oleik asit karışım filmlerle aktif ambalajlamanın +4°C'de depolanmakta olan dana burgerlerde <i>E. coli</i> O157:H7 üzerindeki antimikrobiyel etkisi .....	176

## 1. GİRİŞ

Özellikle son yıllarda pişirilmiş, kürlenmiş veya minimal işlem görmüş tüketime hazır soğutulmuş gıdaların giderek yaygınlaşmasıyla gıda kaynaklı mikrobiyel zehirlenmelerde kayda değer bir artış olmuştur (De ROEVER, 1998). Bu durum özellikle antimikrobiyel ajanlar içeren aktif ambalaj materyallerinin üretimi konusuna büyük bir ilgi doğurmuş ve son 10 yıl içerisinde bu konuda çok sayıda araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmaların büyük bir kısmında antimikrobiyel madde olarak organik ve inorganik asitler, metaller, alkoller, amonyum bileşikleri ve aminler gibi kimyasallar kullanılarak antimikrobiyel etkisi olan ambalaj filmleri geliştirilmiş ve bunların bazıları özellikle Amerika Birleşik Devletleri'nde ve Japonya'da uygulanmaya başlanmıştır (APPENDINI ve HOTCHKISS, 2002; SUPPAKUL ve ark., 2003). Avrupa Birliği'nde ise ambalaj materyallerinin aktif ambalajlamaya uygun hale getirilebilmesi için gerekli düzenleme ve yönetmelik çalışmalarının son aşamaya geldiği bilinmektedir (COMA, 2008). Diğer yandan tüketicilerin sağlık endişeleri nedeniyle kimyasal gıda katkı maddeleri kullanılan gıdalar yerine doğal katkı maddeleri içeren gıdalara yönelmesi antimikrobiyel paketlenmede de doğal antimikrobiyel ajanların kullanımının ön plana çıkmasına neden olmuştur. Bu anlayış çerçevesinde lizozim ve laktoperoksidaz gibi enzimler; nisin, lacticin ve pediocin gibi bakteriyosinler; çeşitli bitkisel fenolik ekstraktlar ve bitkisel esansiyel yağlar farklı ambalaj materyallerine antimikrobiyel olarak ilave edilmiş ve etkinlik bakımından başarılı sonuçlar elde edilmiştir (VARTIAINEN ve ark., 2005; FERNANDEZ ve ark., 2008; COMA, 2008; DATTA ve ark., 2008; TEERAKARN ve ark., 2002; LOPEZ-RUBIO ve ark., 2006). Antimikrobiyeller içeren aktif ambalaj materyallerinin etkinliğinin ortaya konması ve uygulama potansiyelinin artmasıyla bazı antioksidantların da ambalaj malzemelerine ilave edilmesi giderek daha yoğun bir şekilde çalışılmaya başlanmıştır (MOORE ve ark., 2003; MIN ve KROCHTA, 2007). Bilindiği üzere mikrobiyel bozulma yanında lipid oksidasyonu da gıdalarda raf ömrünü sınırlamakta ve ciddi kalite kaybına neden olmaktadır. Nitekim halen butylated hydroxyanisole (BHA) ve butylated hydroxytoluene (BHT) gibi kimyasallar ambalaj materyallerinde antioksidant olarak kullanılmaktadırlar (RAJALAKSHMI ve NARASIMHAN, 1996; MOORE ve ark., 2003). Ancak, aynen bazı antimikrobiyel kimyasal maddeler gibi, belirtilen sentetik antioksidant maddeler de toksik etkileri konusunda halen araştırılan ciddi şüpheler taşımakta ve bu durum gerek üreticilerde, gerekse bilinçli tüketicilerde ciddi endişelere yol açmaktadır (VERMEIREN ve ark., 1999; MADHAVI ve ark., 1996). Dolayısıyla ambalaj materyallerinde antioksidant olarak fenolik bileşikler, antioksidant proteinler, E ve C vitamini gibi doğal antioksidantların kullanımı kimyasalların kullanımına göre daha büyük ilgi görmektedir (GUCBILMEZ ve ark., 2007; VERMEIREN ve ark., 1999; WU ve ark., 2001; MOORE ve ark., 2003).

Antimikrobiyel veya antioksidantların kullanıldığı aktif paketlemenin uygulama açısından önem kazanmasında en büyük etken hiçkuşkusuz az miktarda antimikrobiyel veya antioksidant kullanılarak gıdanın kalitesinin veya raf ömrünün artırılabilmesidir. Bilindiği üzere gıdaların mikrobiyolojik bozulmaya, patojenlerin bulaşmasına veya oksidasyona en duyarlı bölgeleri yüzeyleridir. İşte aktif ambalajlamada antimikrobiyel veya antioksidant ajanın etkin muhafaza sağladığı konsantrasyonun bozulma açısından kritik olan gıda yüzeyinde oluşturulmasına dayanmaktadır. Geleneksel olarak uygulanmakta olan antimikrobiyel veya antioksidantların gıdalara ilave edilmesinde gıda yüzeyinde etkin muhafaza sağlayan konsantrasyona ulaşabilmek için gıdanın her bölgesinde bu konsantrasyona ulaşmış olmak gerekmektedir. Dolayısıyla gıdaya ilave etmede aktif ambalajlamaya göre çok daha fazla miktarda antimikrobiyel veya antioksidant ajana gereksinim duyulmaktadır. Gıdaların antimikrobiyel veya antioksidant ajanların çözeltilerine daldırılması ise sözkonusu ajanların kısa bir süre içerisinde gıdanın alt katmanlarına difüze etmesi nedeniyle etkinliği kısa süreli olan bir uygulamadır. Bunun aksine, aktif ambalajlamanın kontrollu salım tekniğiyle birleştirilerek kullanımıyla antimikrobiyel veya antioksidantın gıdaya aşamalı olarak geçmesi sağlanabilmekte ve gıda yüzeyindeki etkinlik sağlayan konsantrasyon düzeyi daldırma yöntemine göre çok daha uzun bir süre muhafaza edilebilmektedir. Kontrollu salım özelliğine sahip aktif ambalaj materyalleri kullanılarak antioksidant veya antimikrobiyel ajanların gıdaya aşamalı olarak geçmesi onların gıdadaki kompleks reaksiyonlarla kısa sürede nötralize olmasını da engellemekte ve bu durum özellikle biyoaktif ajanların aktif paketlemede daha etkin olarak kullanılmasını sağlamaktadır. Bilindiği üzere özellikle protein veya fenolik yapıdaki biyoaktif ajanlar çeşitli enzimlerin etkileri veya kompleksleşme reaksiyonları sonucunda aktivitelerini kısmen veya tamamen yitirebilmektedirler (QUINTERO-SALAZAR ve ark., 2005; ROSE ve ark., 1999; ROSE ve ark., 2002). Buna göre aktif ambalajlama açısından en önemli hususun bu uygulamayla antimikrobiyel veya antioksidant ajanların gıdaya raf ömrüne göre aşamalı olarak geçmesi olduğu açıktır.

Ambalaj materyallerine ilave edilen antimikrobiyel veya antioksidant ajanların gıda yüzeyine aşamalı olarak istenilen hızda difüzyonunun sağlanması yani kontrollu salımı (controlled release) aktif paketlemenin adeta temelini oluşturmaktadır. Ancak, pek çok aktif ambalaj materyalinin geliştirilmesinde kontrolsüz salım başlıca sorunu teşkil etmektedir. Bazı durumlarda ise ambalaj materyali içerisine ilave edilen ajan neredeyse tamamen ambalaj içerisinde hapsolmakta ve gıdaya salınmamaktadır. Ancak, yine de en sık görülen durum antimikrobiyel veya antioksidant ajanın ambalaj materyali içerisinden büyük bir süratle önce gıda yüzeyine, ardından da gıdanın derinliklerine difüze olmasıdır (HAN ve FLOROS, 1998; BOUNOCORE ve ark., 2005). Bu durumda mikrobiyel bozulma ve oksidatif değişimlere duyarlı olan gıda yüzeyi kısa sürede korumasız kalmakta ve aktif ambalajlama anlamını

yitirmektedir (APPENDINI ve HOTCHKISS, 2002; COMA, 2008; LA COSTE ve ark., 2005). Fonksiyonel ajanların ambalaj materyalinden gıdaya istenilenden çok daha yavaş geçmesi de ayrı bir sorundur. Bu durumda gıda yüzeyinde kullanılan aktif ajanın etkili olan kritik konsantrasyonuna ulaşamamakta ve uygulamanın gıdanın raf ömrü, güvenliği veya kalitesi üzerindeki etkisi yetersiz kalmaktadır.

Aktif ajanların istenilenden daha hızlı veya yavaş bir şekilde ortama salımı ilaç endüstrisinde kontrollu salım yapabilen materyaller geliştirilmesi ve ilaçların bunlarla kaplanması yoluyla çözülürken, gıda endüstrisinde kontrollu salım yapabilen ambalaj filmleri geliştirilmesi ile ilgili az sayıdaki sistematik çalışma özellikle plastik ambalaj filmleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Buna karşın özellikle son yıllarda kontrollu salım tekniğinin plastik filmler yanında yenibilir filmlerde uygulanması için de çeşitli çalışmalar başlatılmıştır. Bilindiği üzere yenibilir filmler plastik ambalaj malzemelerinin aksine çevre ve insan sağlığı açısından risk oluşturmamakta ve bu özellikleri nedeniyle giderek yaygınlaşan bir hızda iç ambalaj ve gıda tabakaları ile dilimleri arası film olarak kullanımları artmaktadır. Karbonhidrat ve protein yapısındaki biyopolimerlerden veya lipitlerden elde edilen bu filmlerin üretimleri plastiklerin aksine ılımlı sıcaklıklarda gerçekleştirilebilmekte olup bu özellikleriyle ısıya duyarlı biyoaktif ajanların ilave edilmesine oldukça uygundur. Nitekim, özellikle zein, peyniraltı suyu, gluten, soya, jelatin proteinlerinden ve alginat, kitosan, galaktomannan, selüloz, karragenan gibi karbonhidratlardan elde edilmiş olan yenibilir filmler çeşitli biyoaktif ajanların ilave edilmesiyle antimikrobiyel film haline getirilmiştir (COMA, 2008; DATTA ve ark., 2008; DAWSON ve ark., 2000; FERNANDEZ ve ark., 2008; GUCBILMEZ ve ark., 2007; HOFFMAN ve ark., 2001 ; JOERGER, 2007; LI ve ark., 2006; MIN ve ark., 2005; QUINTAVALLA ve VICINI, 2002; TEERAKARN ve ark., 2002; THEIVENDRAN ve ark., 2006). Ancak geliştirilmiş olan bu filmlerden çok azında araştırmacılar biyoaktif ajanların kontrollu salımı üzerinde çalışmışlardır. İşte bu projenin temel amacı biyoaktif ajanların gıdalara kontrollu salımını gerçekleştirebilecek kompozit veya karışım yenibilir filmler üretilmesidir. Yürütülecek çalışmada kontrollu salım elde etmek amacıyla filmlerin hidrofilik/lipofilik dengesinin değiştirilmesi, filmlerin içerisinde farklı boyutlarda lipit globülleri veya çözünür olmayan zerrecikler veya lifler teşkil edilmesi yoluyla difüzyon için dolambaçlı bir yol oluşturulması ve filmlerin çapraz bağlanma düzeyinin değiştirilmesi gibi kontrollu salım stratejileri tek başına veya gerektiği zaman kombine edilerek uygulanacaktır. Çalışmada film matrisini oluşturacak biyopolimerler olarak prolamin sınıfından hidrofobik bir protein olan zein ve bu proteine göre daha hidrofilik olan peyniraltı suyu proteinleri kullanılmıştır. Karışımlar biyopolimerlerin çeşitli yağ ve yağ asitleriyle, kompozitler ise biyopolimerlerin mum, baklagil proteinleri ve selülozla karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Filmlere biyoaktif ajan olarak gıda teknolojisinde kullanımları giderek artan kısmi ve saf lizozim, fenolik bileşikler gibi biyoaktif



ajanlar katılmıştır. Bu projede elde edilmiş olan pek çok veri literatürde ilk kez üretilmiş olup çalışma salım hızı kontrol edilebilen antimikrobiyel ve antioksidant ambalaj materyalleri geliştirilmesi adına katkı sağlamıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. AKTİF AMBALAJLAMA

Gıdaların ambalajlanması, taşınma, depolanma, ve son kullanımları sırasındaki güvenlik ve kalitelerini etkileyen en önemli proseslerden birisidir. Ambalajlamada uygun materyallerin kullanılmasıyla gıdaların kısa sürede bozularak elden çıkması önlenmiş gibi insan sağlığı açısından risk oluşturan mikroorganizmalar, kemirgenler, böcekler ve çeşitli biyolojik ve kimyasal kontaminantların gıdalara bulaşması da önlenmektedir. Ayrıca ambalajlar üzerinde bulunan ve tüketiciyi ürünün içeriği, üretim ve son kullanım tarihi ve üreticisi ile ilgili bilgilendiren açıklamalar da günümüz tüketim anlayışının vazgeçilmez unsurları haline gelmiştir. Aktif ambalajlama ise tüketicilerin giderek artan güvenlik ve kalite taleplerinin bir sonucu olarak ortaya çıkmış modern bir teknolojidir. Bu teknikte temel amaç paketleme koşullarının veya paketlemede kullanılan ambalaj materyallerinin yapısının ürünün raf ömrünü ve güvenliğini geliştirecek, ancak onun kendine has istenen özelliklerini muhafaza edecek şekilde değiştirilmesidir (QUANTAVALLA ve VICINI, 2002). Paketleme koşullarının amaçlanan hedeflere ulaşılacak şekilde değiştirilmesi için pek çok farklı yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemlerden en çok kullanılan istenilen fonksiyonu sağlayan bir ajanın paketlemede kullanılan ambalaj materyali içerisine katılarak onun bir parçası haline getirilmesi veya küçük ikincil paketçikler içerisine konduktan sonra gıdalla birlikte paketlenmesidir. Bunun dışında ambalaj materyali yüzeyinin fonksiyonel ajanla kaplanması, ambalaj materyali yüzeyine fonksiyonel ajanın immobilize edilmesi gibi uygulamalar da mevcuttur. Özellikle son zamanlarda gıdaların paketlenmesinde kendinden doğal olarak antimikrobiyel etki gösteren ambalaj materyallerinin kullanılmasına da büyük bir ilgi doğmuştur. Ancak, bu uygulama şu an için kitosan uygulamalarıyla sınırlıdır.

Aktif ambalajlamanın farklı amaçları bulunabilmekte olup bunlardan başlıcaları gıdalardaki mikroorganizmaların inaktivasyonu veya üremelerinin geciktirilmesi, gıdalardaki oksidatif değişimlerin ve buna bağlı besin değeri, flavor ve renk değişimlerinin engellenmesi ve gıdalarda bulunan istenmeyen tad ve/veya kokuya sahip bileşenlerin veya reaksiyon ürünlerinin selektif olarak etkisiz hale getirilmesidir. Ancak, yine de uygulamada aktif paketlemede öncelikli ve birincil hedef ağırlıklı olarak antimikrobiyel etki elde etmek üzerinde yoğunlaşmıştır. Dolayısıyla bu tür antimikrobiyel etki üzerinde yoğunlaşmış olan aktif ambalajlama uygulamaları “Antimikrobiyel paketleme” veya “Antimikrobiyel ambalajlama” olarak adlandırılmaktadır. Antimikrobiyel paketleme isminden de anlaşılacağı üzere paketlenmiş gıdalarda bulunan patojen veya bozulmaya neden olan mikroorganizmaların inaktivasyonu veya baskılanarak üreme hızlarının düşürülmesini amaçlamaktadır. Bu etki

sonucunda gıdanın raf ömrü uzayabilmekte veya aynı raf ömrü içerisinde daha güvenli bir hale gelebilmektedir.

Antimikrobiyel paketleme uygulamaları içerisinde en yaygını antimikrobiyel ajanların ambalaj materyalleri içerisine katılması olup bu giderek yaygınlaşan bir uygulamadır. Antimikrobiyel ajanların ambalaj materyalleri içerisine katılmasında başlıca iki yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden birincisinde polimer ısıtılarak eritilmekte ve antimikrobiyel ajan erimiş polimer içerisine direk olarak ilave edilmektedir. Ancak erimiş polimerlerin sıcaklığı oldukça yüksek olduğundan bu yöntem özellikle yüksek sıcaklık altında stabil olan antimikrobiyel kimyasallar için kullanılmaktadır (SUPPAKUL ve ark., 2003; HAN, 2000; APPENDINI ve HOTCHKISS, 2002). Antimikrobiyel ajanların ambalaj materyallerine katılmasında kullanılan ikinci yöntem ise ajanın uygun bir solvent içerisinde çözüldürülmüş olan polimer çözeltisi içerisine katılmasıdır. Bu yöntem özellikle ısıya duyarlı biyopolimerler ve biyoprezervatifler gibi doğal yapıdaki antimikrobiyel ajanlar için kullanılmaktadır. Bu projede ısıya duyarlı olan biyoaktif maddeler kullanıldığından bu ikinci yöntem kullanılmıştır.

Aktif paketleme her ne kadar özellikle antimikrobiyel paketleme üzerinde yoğunlaşmış olsa da özellikle son zamanlarda antioksidantların da aktif ambalajlamada kullanılması ile ilgili yoğun çabalar harcanmaktadır (RAJALAKSHMI ve NARASIMHAN, 1996; MADHEVI ve SALUNKHE, 1996; HERALD ve ark., 1996; MOORE ve ark., 2003). Antioksidantların fonksiyonel ambalajlamada kullanım şekli antimikrobiyellerin kullanımındaki gibi farklı yollarla gerçekleştirilebilmektedir. Yani antioksidantlar da ambalaj materyalleri içerisine ilave edilebilecekleri gibi ambalaj materyallerinin antioksidantlarla kaplanması da mümkündür. Ayrıca aynen kitosan gibi doğal olarak antimikrobiyel etkiye sahip filmler gibi, bazı ambalaj materyallerinin kendinden antioksidant etki göstermesi de mümkündür. Nitekin, peynir altı suyu proteinlerinden elde edilen yenilebilir filmlerin kendinden antioksidant etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (LE TIEN ve ark., 2001).

### **2.1.1. Aktif Ambalajlamada Kullanılan Paket Sistemleri**

Aktif ambalajlamada kullanılan paket sistemleri (1) Paket/Gıda sistemleri ve (2) Paket/Tepeboşluğu/Gıda sistemleri olarak ikiye ayrılmaktadır (QUINTAVALLA ve VICINI, 2002). Bu sistemlerden Paket/Gıda sisteminde ambalaj materyali ile gıda arasında sıkı bir temas bulunmakta ve paket içerisinde herhangi bir boşluk bulunmamaktadır. Bu tür paketlerde fonksiyonel ajanın uçucu olması şartı bulunmamakta ve gıdaya geçiş ara yüzeyde meydana gelen difüzyon ve partitasyon (partitioning) ile olmaktadır. Bu tür sistemlere örnek olarak vakumla paketlenmiş gıdalar verilebilir. Diğer yandan Paket/Tepeboşluğu/Gıda sistemlerinde ise isiminden de anlaşılacağı gibi paketin bir tepe boşluğu bulunmaktadır.

Bu tip bir sistemde aktif ajanın gıdaya etkili bir şekilde geçebilmesi onun uçuculuk düzeyine bağlıdır. Uçucu fonksiyonel ajan önce buhar halinde tepe boşluğuna ve daha sonra da gıdaya geçmektedir (QUINTAVALLA ve VICINI, 2002).

## **2.1.2. Aktif Ambalajlama Filmleri Geliştirilirken Gözönünde Bulundurulacak Başlıca Hususlar**

### **2.1.2.1. Ambalaj materyali ve aktif ajanın uyumu**

Aktif ambalaj materyalleri geliştirilirken dikkate alınacak en önemli hususlardan birisi ambalaj materyali ve aktif özelliği sağlayacak aktif ajanın birbirine uyumlu olmasıdır. Bu amaçla farklı koşullarda film üretimi gerçekleştirilmeli ve çeşitli karakterizasyon çalışmalarıyla uyum veya uyumsuzluğun boyutları araştırılmalıdır. İlk aşamada uyumluluğun en belirgin karakteristikleri aktif ajanın ambalaj filmini hazırlamada kullanılacak polimer hazırlama çözeltisi içerisinde çözünmesi veya homojen olarak dağıtılarak süspansiyon edilebilmesidir. Aksi durumda homojen bir filmin üretilmesi mümkün değildir. Ayrıca, film hazırlama çözeltisinin dökülerek yayılması ve kurutulması ardından aktif ajanın elde edilen filmin elastikiyet ve gerilme gücü (tensile strength) gibi mekanik özelliklerini değiştirmemesi (veya daha iyisi geliştirmesi) de temel bir uyumluluk göstergesidir. Belirtilen bu sorunların azaltılması amacıyla ambalaj materyalinin ve kullanılacak fonksiyonel ajanın polariteleri arasındaki farkın birbirine yakın veya en azından çok farklı olmaması gerekmektedir (SUPPAKUL ve ark., 2003). Ambalaj materyali ve aktif ajanın yüklerinin filmlerin kullanılacağı pH değerlerindeki uyumu da ayrı bir önem taşımaktadır. Ambalajlanacak hedef gıdaların tahmini yüzey pH değerlerine yakın değerlerde film ve fonksiyonel ajan arasındaki yük dağılımı güçlü bağlanma (immobilizasyon) yaratacak boyutta zıt yük yoğunluğu içermemelidir. Yoksa fonksiyonel ajan gıdaya geçememekte ve beklenen etki (genellikle antimikrobiyal aktivite) sağlanamamaktadır. Nitekim, antimikrobiyal bir enzim olan lizozimin selüloz triasetat filmler içerisine ilave edilmesi sonucunda bu enzim katyon değiştirme reaksiyonları ile sözkonusu materyale sıkıca bağlandığı ve immobilize olduğu bildirilmektedir (MURATA ve TONIOKA, 1997). Bu tür bir filmin enzimin gıdaya geçmesinin arzulandığı katı gıdalarda olumlu sonuç vermeyeceği açıktır. Ancak, APPENDINI ve HOTCHKISS (1997) immobilize lizozim içeren filmlerin teorik olarak sıvı gıdaların paketlenmesi amacıyla kullanılabileceğini düşünmüşlerdir.

Aktif ambalaj filmi üretiminde önem taşıyan bir diğer husus da filmler üretilirken uygulanan fiziksel işlemlerin fonksiyonel ajanları inaktive etmemesidir. Özellikle plastik ambalajların üretiminde kullanılan ekstrüzyon işlemi sırasında uygulanan yüksek sıcaklık, basınç ve biçme kuvvetleri etkisiyle pek çok antimikrobiyal maddenin destabilize olarak

aktivitesini yitirebildiği bilinmektedir (SUPPAKUL ve ark., 2003). Ayrıca yine ambalaj materyallerinin üretimi sırasında uygulanan laminasyon, baskı ve kurutma gibi işlemler ve film üretiminde kullanılan yapıştırıcılar (adhesives), solventler, plastikleştiriciler ve çapraz bağlayıcılar da fonksiyonel ajanların aktivite düzeyini etkileyebilmektedirler. Belirtilen tüm bu hususlar dikkate alınarak üretilmiş olan aktif ambalaj malzemeleri uygun şekilde paketlenerek depolanmalı ve kullanılana kadar aktivitelerini muhafaza etmeleri sağlanmalıdır. Örneğin antimikrobiyel enzim içeren ambalajlar mutlaka kullanılana dek soğukta depolanmalıdırlar. Yine özellikle uçucu yapıdaki fonksiyonel ajanların gerek film döküm işlemi (casting) gerekse üretilmiş filmin depolanması sırasında buharlaşarak kaybolması engellenmelidir.

Fonksiyonel ajanın moleküler ağırlığı da film üretiminde dikkate alınmalıdır. HAN (2000) polimerik filmler içerisine ilave edilen antimikrobiyel ajanların çoğunlukla polimere göre düşük molekül ağırlığına sahip olduğunu ve bu nedenle film içerisinde kendilerine amorf bölgelerde yer bularak dağıldıklarını ve film yapısını etkilemediklerini iddia etmektedir. Ancak bu varsayım film içerisine ilave edilecek fonksiyonel ajan pek çok biyoaktif maddede olduğu gibi yüksek moleküler ağırlığa sahipse geçerliliğini yitirmektedir (MECITOGLU ve ark ,2007).

#### **2.1.2.2. Gıdanın ve aktif ajanın uyumu**

Bilindiği üzere gıdaların bileşim, su aktivitesi, pH ve asidite gibi özellikleri birbirinden oldukça farklı olabileceği gibi, mikrobiyel yükleri ve içerebilecekleri risk oluşturan mikroorganizmaların spektrumu da farklı olabilmektedir. Dolayısıyla filmlerde kullanılacak antimikrobiyel veya antioksidant ajanın veya diğer fonksiyonel ajanların gıdaların özelliklerine uygun olarak dikkatle seçilmesi gerekmektedir. Dikkat edilecek en önemli husus hiç kuşkusuz antimikrobiyel bir ajan kullanılırken bunun gıdada üremesi veya gıdaya bulaşması muhtemel patojenlere veya bozulmaya neden olan mikroorganizmalara karşı etkili olması ve bu etkisini bizzat gıdada gösterebilmesidir. Örneğin iyonizasyon özellikleri nedeniyle sorbik, benzoik ve propionik asit gibi antimikrobiyel maddeler etkilerini özellikle asidik gıdalarda göstermekte nötrale yakın gıdalarda bu etkilerini büyük oranda kaybetmektedirler (CEMEROGLU ve ark., 1986). Bir gıdanın asitliği yanında su aktivitesi de aktif ambalajlamanın performansını ve başarısını etkileyebilmektedir. Nitekim, SUPPAKUL ve ark. (2003) ilave edildiği polisakkarit bazlı filmlerde sorbik asitin deneysel geçiş ortamına difüzyon hızının su aktivitesi arttıkça arttığını bildirmektedirler. Asitlik ve su aktivitesi gibi özellikler yanında gıdada bulunan fonksiyonel ajanı nötralize edici spesifik bileşenler de dikkate alınmalıdır. Örneğin, ROSE ve ark. (1999) protein yapısında doğal bir antimikrobiyal olan nisin'in taze ette bulunan glutatyonla kompleks yapması nedeniyle bu üründe etkisiz olduğunu rapor etmektedirler. Diğer yandan, ambalaj filmine ilave edilecek antioksidant bir

ajan seçerken ise bu ajanın paketlenecek gıda sistemindeki muhtemel etkinliği mutlaka önceden bilinmelidir. Nitekin, en önemli antioksidantlardan birisi olan askorbik asitin, demirce zengin olan bir gıdada demiri  $Fe^{+3}$  formdan oksidasyonu daha da şiddetlendiren  $Fe^{+2}$  forma indirgemesi ve bir antioksidant değil prooksidant gibi davranması her antioksidantın her gıdaya uygun olmadığını açıkça göstermektedir. Yine askorbik asitin suda, bir diğer antioksidant olan E vitamininin ise ancak yağda çözünmesi antioksidantların uygun gıdalarda kullanılması gerektiğini net bir şekilde vurgulamaktadır (CEMEROGLU ve ark., 1986).

### **2.1.2.3. Paketlenmiş gıdanın depolanma sıcaklığı**

Aktif ambalaj materyalleri geliştirilirken dikkat edilecek en önemli hususlardan birisi de paketlenecek gıdaların muhtemel depolanma sıcaklığıdır. Aktif ambalajlama henüz tek başına bir muhafaza yöntemi olarak görülmemekte ve çoğu zaman bir bariyer veya bir başka deyişle engel konsepti (hurdle concept) çerçevesinde uygulanmaktadır. Nitekim şu an için özellikle antimikrobiyel paketleme ile soğukta depolamanın adeta ayrılmaz bir ikili haline geldiğini söylemek bazı istisnalar dışında yanlış değildir (CAGRI ve ark., 2002; JANES ve ark., 2002; NATTRESS ve BAKER, 2002; SCANNEI ve ark., 2000). SUPPAKUL ve ark. (2003) düşük depolama sıcaklığında bir antimikrobiyelin düşük konsantrasyonlarının, yüksek depolama sıcaklığında bu antimikrobiyelin yüksek konsantrasyonlarından daha etkili olabileceğini bildirmektedir. Depolama sıcaklığının artması ambalaj filmi içerisine ilave edilmiş olan antimikrobiyel ajanın difüzyon hızının da artmasına neden olmakta ve onun hızla gıda yüzeyine ve ardından da gıdanın derinliklerine penetre olmasına neden olmaktadır. Bu durum kontaminasyon ve mikrobiyel üreme riskinin en yüksek olduğu gıda yüzeyinde bir süre sonra antimikrobiyel ajan konsantrasyonunun düşmesine neden olmakta ve gıdanın muhafazası için oluşturulan antimikrobiyel mekanizma devre dışı kalmaktadır. Aynı durum fonksiyonel ajanın bir antioksidant olması durumunda da geçerlidir. Dolayısıyla aktif ambalaj materyalleri geliştirilirken içerdikleri fonksiyonel ajanların salım hızının ayarlanmasında paketlenecek gıdaların muhtemel depolama sıcaklıklarının mutlaka göz önünde bulundurulması şarttır. Günümüz teknolojisinde aktif ambalajlamanın  $+4^{\circ}C$ 'de soğukta depolama ile kombine edilmesi adeta standart bir uygulama haline gelmiş olup geliştirilen filmlerin su, farklı bir model sıvı, katı veya bizzat gıda içerisindeki salım hızları incelenirken bu hususun dikkate alınması gereklidir.

## 2.2. AKTİF AMBALAJLAMADA KULLANILABİLECEK BİYOAKTİF AJANLAR

Aktif ambalajlamada halen organik asitler, metaller, alkoller, amonyum bileşikleri ve aminler gibi kimyasal bileşikler yaygın olarak kullanılmaktadır (APPENDINI ve HOTCHKISS, 2002; SUPPAKUL ve ark., 2003). Ancak tüm dünyada yükselen sağlık endişeleri nedeniyle kimyasalların yerine doğal ajanların muhafazada kullanımı yani biyoprezervasyon ön plana çıkmaya başlamıştır. Gıdaların muhafazasında antimikrobiyal, antioksidant ve diğer benzeri biyolojik aktivitelere sahip doğal bir biyoaktif maddenin, zararsız ve gıdalarda doğal olarak bulunabilen (food grade) bir mikroorganizmanın veya bunun antimikrobiyal ürünlerinin kullanılması kabaca biyoprezervasyon olarak adlandırılmakta olup bu yeni kavram bilim adamlarınca farklı şekillerde tanımlanabilmektedir. Örneğin HUGAS (1998) biyoprezervasyonu “gıdaların raf ömrünün ve güvenliğinin artırılmasında onların doğal veya kontrol edilebilir mikroflorasının ve/veya bu mikrofloraya ait antimikrobiyel bileşiklerin kullanılması” olarak tanımlamaktadır. Bu tanımlama gıdalarda bulunan mikroflora ve bunlardan elde edilen antimikrobiyel ürünlere dayandırılırken, FRANCHI ve ark. (2003) biyoprezervasyonu “gıdalardan elde edilen aktif bileşiklerin veya “food grade” mikroorganizmalardan fermentasyonla elde edilen aktif bileşiklerin gıdaların güvenliği ve kalitesinin artırılması amacıyla kullanılması” olarak tanımlamışlardır. Genel anlamda biyoprezervasyon dendiği zaman akla ilk olarak gıdaların mikrobiyel güvenliğinin artırıldığı bir yöntem gelse de, günümüzde bu kavram gıdalardaki istenmeyen renk ve tekstür değişimleri ile lipid oksidasyonu gibi olumsuz değişimlerin doğal yöntemlerle önlenmesi çalışmalarını da kapsamaktadır. Bunun dışında günümüzde gıdalara uygulanacak aktif ambalajlamanın gıdanın muhafazası yanında insan sağlığına yararlılığını artırmada kullanılması yönünde gelişmeler de olduğu unutulmamalıdır. Dolayısıyla bu projede kullanılmış olan pek çoğu gıdalar yanında canlı sistemlerde de antimikrobiyel ve antioksidant etki gösteren biyomoleküller “**biyoaktif maddeler**” olarak tanımlanmışlardır. Çeşitli kaynaklarda gıdaların muhafazasında kullanılan biyoaktif maddeler daha spesifik olarak biyoprezervatifler olarak da adlandırılmış olup bu da doğru ve kabul edilen bir tanımlamadır. Ancak, biyoaktif madde terimi gıdaya geçen aktif maddenin tüketildikten sonra insan vücudunda da birtakım biyolojik aktiviteler gösterebileceğini çağırıştırırken, biyoprezervatif terimi yalnızca gıdayı koruyucu etkiye odaklanmış bir terimdir.

Aktif ambalajlamada kullanılabilecek başlıca biyoaktif maddeler (biyoprezervatifler) kabaca (1) antimikrobiyel enzimler, (2) fenolik bileşikler ve esansiyel yağlar ve (3) bakteriosinler olarak üçe ayrılabilir. Aşağıda bunlarla ilgili özet bilgiler verilmiştir.

## 2.2.1. Antimikrobiyel Enzimler

Aktif ambalajlamada kullanılan veya kullanılması düşünölen başlıca antimikrobiyel enzimler lizozim, laktoperoksidaz, glukoz oksidaz ve kitinazdır. Bu enzimlerden en önemlisi ve halen gıdaların muhafazasında yoğun olarak kullanılanı lizozimdir. Ancak, gerek lizozimin, gerekse laktoperoksidaz ve glukoz oksidazın aktif ambalajlamada kullanılabileceği gösterilmiştir. Kitinaz ise bu amaçla kullanılabileceği daha önce tartışılmış ancak somut olarak aktif ambalajlamada denenmemiş bir antifungal enzimdir.

### 2.2.1.1. Lizozim

Lizozim (EC 3.2.1.17) bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunan ve moleköl ağırlığı 14400 kDa olan bir antimikrobiyel enzimdir. Ticari olarak yumurta akından üretilen bu enzimin antimikrobiyel aktivitesi bakterilerin hücre duvarında bulunan peptidoglukan (PG) tabakasındaki  $\beta$ -glikozidik bağları hidroliz etmesinden ve hücre duvarının yıkımına ve parçalanmasına neden olmasından kaynaklanmaktadır. Enzim özellikle G(+) bakteriler üzerinde antimikrobiyel etki göstermekte, buna karşın PG tabakası lipopolisakkarit (LPS) tabakasıyla kaplanmış olan G(-) bakteriler üzerinde zayıf veya hiçbir etki göstermemektedir (NAKAMURA ve ark., 1991; İBRAHİM ve ark., 1991). İşte bundan dolayı spesifik olarak G(+) bir bakterinin inaktivasyonu amaçlanmadığı zaman lizozim, EDTA gibi G(-) bakterilerin LPS tabakasını stabilize eden kalsiyum ve magnezyum iyonlarını bağlayan ve bu tabakanın destabilize olmasını sağlayan çelat yapıcı maddelerle kombine edilerek kullanılmaktadır. Bu şekilde bir kombinasyon lizozimi gerek G(+) gerekse G(-) bakteriler üzerinde etki gösterebilen etkin bir biyoprezervatif haline dönüştürmektedir (BRANEN ve DAVIDSON, 2004; PADGETT ve ark., 1998).

Lizozim ticari olarak yumurta akından üretilmekte olup halen Avrupa'da peynirlerde istenmeyen fiziksel ve aromatik bozukluklara yol açan Clostridium tyrobutiricum bakterisine karşı antimikrobiyel olarak ve GRAS (Generally Recognized as Safe) statüsüyle yoğun olarak kullanılmaktadır (DE ROOS ve ark., 1998). Kazein miselleri tarafından absorbe edildiğinden pıhtıda kalan ve peynir altı suyuna geçmeyen lizozimin peynirlerdeki kullanımının gelecekte daha da yaygınlaşması beklenmektedir (DE ROOS ve ark., 1998). Ayrıca Fransa'da yakın bir gelecekte lizozimin şaraplardaki malolaktik fermentasyonu engellemek amacıyla kullanılması ile ilgili yoğun çalışmalar da yürütölmektedir (MARCHAL ve ark., 2000). Lizozimin doğal olarak aynen şeker gibi tatlılık verici bir yapıda olduğunun belirlenmesi ve içecek endüstrisine hem tadlandırıcı hem de antimikrobiyel etkisi olan çift fonksiyonlu bir ingredient olarak önerilmesi de oldukça ilgi çekici bir gelişmedir (MASUDA ve



ark., 2001). İşte gerek endüstriyel olarak üretilebileceği yumurta akı gibi doğal bir kaynağın bulunması gerekse gıdalarda uygulanması için mevcut bir bilimsel birikimin bulunması nedeniyle lizozim bir anda fonksiyonel ambalajlamada biyoprezervatif olarak kullanım için en uygun ajanlardan biri haline gelmiş ve bu konuda yoğun çalışmalar başlatılmıştır (PADGETT ve ark., 1998; CHA ve ark., 2002; APPENDINI ve HOTCHKISS, 1997; PARK ve ark., 2004; MIN ve ark., 2005a).

### **2.2.1.2. Diğer antimikrobiyel enzimler (laktoperoksidaz, glukoz oksidaz ve kitinaz)**

Aktif ambalajlamada kullanılabilecek bir diğer antimikrobiyel enzim doğal olarak bulunduğu sütte ve peyniraltı suyundan üretilebilen laktoperoksidazdır. Laktoperoksidaz enzimi yaklaşık % 10'u karbonhidrat olan bir glikoprotein olup moleküler ağırlığı 78.5 kDa kadardır. Bir oksidoredüktaz olan enzim memelilerde süt yanında salya ve terde de bulunan ve bu salgılarda doğal olarak antimikrobiyel etki oluşturan bir enzimdir (JACOB ve ark., 2000; MONZANI ve ark., 1997; PAKKANEN ve AALTO, 1997; WOLF ve ark., 2000). Enzimin temel işlevi memelilerin süt bezlerinin ve yeni doğanların bağırsak sistemlerinin patojenlere karşı korunması olup bu amaçla enzimin oldukça etkili ve komplike bir antimikrobiyel mekanizması bulunmaktadır. Bu mekanizma laktoperoksidaz enziminin biyolojik sistemlerde ve özellikle de sütte doğal olarak bulunan tiyosiyanatı ( $SCN^-$ ), yine biyolojik sistemler ve sütte doğal olarak bulunan  $H_2O_2$  varlığında yüksek antimikrobiyel etkiye sahip hipotiyosiyanit anyonu ( $OSCN^-$ ), hipotiyosiyanoz asit ( $HOSCN$ ) ve diğer yüksek rekativiteye sahip kısa ömürlü oksidasyon ürünlerine dönüştürmesine dayanmaktadır. Oluşan oksidasyon gücü çok yüksek olan bu ürünlerin mikroorganizmalarda bulunan ve yaşamsal öneme sahip olan enzimlerin  $-SH$  guruplarını okside ederek antimikrobel etki gösterdiği düşünülmektedir (PRUITT et al., 1982). Bu sistem genellikle G(-) bakteriler üzerinde bakterisidal, G(+) bakteriler üzerinde ise bakteriyostatik etki göstermektedir (SEIFU ve ark., 2005). Ayrıca laktoperoksidaz sisteminin antifungal (MIN ve KROCHTA, 2005; JACOB ve ark., 2000) ve antiviral (PAKKANEN ve AALTO, 1997; SEIFU ve ark., 2005) etkileri de olduğu ve nisin gibi biyoprezervatiflerle birlikte kullanıldığı zaman sinerjetik etki gösterdiği (ZAPICO ve ark., 1998; BOUSSOUEL ve ark., 2000; DUFOR ve ark., 2003) de bilinmektedir. Laktoperoksidaz enzim sistemi belirtildiği gibi sütte doğal olarak bulunan ve antimikrobiyel etki oluşturan bir mekanizma oluşturmaktadır. Dolayısıyla tiyosiyanat ve/veya hidrojen peroksit ilave edilerek sütlerin ve bu sütlerden üretilecek peynirlerin mikrobiyel kalitesi artırılabilir (SEIFU ve ark., 2004, SEIFU ve ark., 2005). Ayrıca, laktoperoksidazın ve oluşturduğu antimikrobiyel mekanizmanın diğer komponentlerinin termal işlem görmüş yağsız sütlere, et ve sebze ürünlerine ilave edilmesi üzerinde de çeşitli çalışmalar mevcuttur (ZAPICO ve ark., 1998; ELLIOT ve ark., 2004;

KENNEDY ve ark., 2000; TOUCH ve ark., 2004). Laktoperoksidazın antimikrobiyel paketlemede kullanılması ile ilgili çalışmalar ise lizozime göre daha sınırlıdır. Ancak, laktoperoksidaz kullanılarak peyir altı suyu proteininden antimikrobiyel etkisi olan yenilebilir filmler üretilmiştir (MIN ve KROCHTA, 2005; MIN ve ark., 2005a; MIN ve ark., 2005b).

Her ne kadar şu an için antimikrobiyel paketlemede kullanılmaya en yakın antimikrobiyel enzim lizozim gibi görülse de, bir diğer antimikrobiyel etkiye sahip enzim olan glukoz oksidaz da bu konuda kullanılabilir bir adaydır. Glukoz oksidaz enzimi ABD'de 1958 yılında GRAS statüsü kazanmış bir enzim olup o zamandan beri yumurta tozlarında bulunan glukozun uzaklaştırılması amacıyla kullanılmaktadır (LABUZA ve BREENE, 1989). Bu enzim de laktoperoksidaz gibi bir oksidoreduktaz olup antimikrobiyel etkisi glukozu oksitlerken aerobik mikroorganizmalar için gerekli olan oksijeni limite etmesi ve  $H_2O_2$  üretmesiyle ilişkilidir. Enzimin mekanizması glukozun  $-CHOH$  guruplarından iki H atomu uzaklaştırılması ve glukono-delta-lakton ve  $H_2O_2$  üretmesinden ibaret olup, bu mekanizma ile bir mol okside glukozdan bir mol oksijen uzaklaştırılması mümkündür. Enzim ticari olarak glukonik asit fermentasyonu amacıyla uygulanan *Aspergillus niger* ve *Penicillium amagasakiense* fermentasyonu sırasında yan ürün olarak üretilmekte (KARMALI ve ark., 2004) ve bu yolla üretildiği zaman genellikle katalaz enzimi ile bir arada bulunmaktadır. Glukoz oksidaz enziminin katalazla bir arada bulunması onun glukozun oksidasyonu sırasında ürettiği  $H_2O_2$  'in parçalanmasına ve antimikrobiyel aktivitenin düşmesine neden olduğundan arzulanmamaktadır. Dolayısıyla tek başına antimikrobiyel amaçlı olarak kullanılacak glukoz oksidazın ileri derecede saflaştırılması gerekliliğinin maliyet nedeniyle onun antimikrobiyel paketlemede kullanımını sınırladığı bildirilmektedir (LABUZA ve BREENE, 1989). Ancak yine de glukoz oksidazın ürettiği ve tek başına antimikrobiyel etki gösterecek düzeye ulaşamayabilecek olan  $H_2O_2$ 'ten antimikrobiyel paketlemede bir yardımcı olarak faydalanmak mümkündür. Örneğin MİN ve ark. (2005a) glukoz oksidazı peyir altı suyu proteinlerinden elde ettikleri filmler içerisine laktoperoksidazla birlikte ilave etmişler ve bu enzimin ihtiyaç duyacağı  $H_2O_2$  'i biyolojik olarak üreterek antimikrobiyel etkiye sahip filmler elde etmişlerdir. Ancak, iki antimikrobiyel enzimin kullanıldığı bir paketleme uygulamasının maliyetinin ne boyutta olacağını ayrıca araştırılması gerekmektedir.

Aktif ambalajlamada kullanılması fikrinsel olarak tartışılan ancak üretimiyle ilgili proseslerin maliyet ve uygulama yönünden henüz tam olarak optimize edilmemesi nedeniyle literatürde henüz paketleme uygulamalarında kullanımıyla ilgili yayımlanmış somut bir araştırma bulunmayan bir diğer antimikrobiyel enzim ise kitinazdır. Kitinaz funguslarda bulunan ve onların hücre duvarını oluşturan kitinin depolimerizasyonunu katalize eden bir antifungal enzimdir. Enzimin ticari olarak üretimi *Trichoderma harzianum*, *Streptomyces* sp. ve *Penicillium* sp. küflerinden fermentasyonla gerçekleştirilmesine rağmen gıda endüstrisinde

pek bir kullanımı yoktur (NAVANI ve KAPADNIS, 2005; BINOD ve ark., 2005). Bu enzimin gıda endüstrisinde kullanılması ile ilgili nadir araştırmalardan birisi onun *Mucor plumbeus*'a karşı yüksek basınç uygulaması ile kombine edilerek kullanılması çalışmalarıdır (FENICE ve ark., 1999). Ancak, özellikle son zamanlarda gıdalarda küf üremesinin doğal bir antifungal mekanizma ile gerçekteştirilebilmesine dönük ciddi bir ihtiyaç bulunmaktadır. Dolayısıyla gelecekte üretimiyle ilgili proseslerin geliştirilmesiyle bu enzimin aktif ambalajlamada kullanımının mümkün olabileceği düşünölmektedir.

### **2.2.2 Bakteriosinler**

Bakteriosinler laktik asit bakterileri tarafından üretilmekte olan antimikrobiyel etkiye sahip peptid veya proteinler olup (VERMEIREN ve ark., 2004; ROSS ve ark., 2002; HUGAS, 1998) bu bakterilerin fermentasyon ortamından elde edilen ham veya saflaştırılmış preparatların aktif ambalajlamada kullanılması üzerinde yoğun çalışmalar yürütölmektedir. En iyi bilinen bakteriosinler nisin, pediosin ve laktisin olup şu an için bunlardan yalnızca nisin ticari olarak kullanılmaktadır (ROSS ve ark., 2002). Özellikle süt ürünlerinde GRAS statüsünde kullanılan ve 34 aminoasitten oluşan bir peptid olan nisin *C. botulinum*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* gibi G(+) bakterilere karşı antibotulinal, antilisterial ve antistaphylococcal olarak kullanılmaktadır (HUGAS, 1998). Antimikrobiyel etkisi bakterilerin yüzeylerinde bulunan anyonik fosfolipitlerle interaksiyona girmesi ve hücre membranlarında porlar oluşturmasına dayanan nisin, koruyucu lipopolisakkarit tabakaları nedeniyle G(-) bakteriler üzerinde sınırlı bir etkiye sahiptir. Ancak daha önce de belirtildiği üzere taze et ürünlerinde glutatyon S-transferaz enziminin katalize ettiği bir reaksiyonla nisinin glutatyonla kompleks yaparak inaktive olması nedeniyle bu enzimin çiğ etlerde kullanımı önerilmemektedir (ROSE ve ark., 2002). Bunun aksine belirtilen enzim sisteminin inaktif olduğu pişmiş etlerde kullanımı ise mümkündür.

### **2.2.3. Fenolik bileşikler**

Fenolik bileşikler gıdalarda gösterdikleri yüksek antimikrobiyel ve antioksidant aktivite yanında insan sağlığı üzerinde gösterdikleri antioksidant aktivite, antikanserojenik aktivite ve kalp ve damar sağlığını koruyucu etkileriyle günümüzde gıda alanındaki araştırmaların başlıca konusu haline gelmişlerdir. Fenolik bileşikler kabaca fenolik asitler (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) ve flavonoidler (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) olarak iki gruba ayrılmaktadırlar. Fenolik asitler hidroksisinnamik asitler ve hidroksibenzoik asitlerden oluşurken, flavonoidler antosiyanidinler, falvonlar,

flavonollar, flavononlar, kateşinler, löykoantosiyanidinler ve proantosiyanidinlerden oluşmaktadırlar. Fenolik asitlerden özellikle gallik asit sıra dışı güçlü antimikrobiyel ve antioksidant aktivitesiyle bilinirken, flavonoitlerden kateşin gallik asite göre daha az olan biyoaktivitesine karşın gıdalarda en fazla bulunan dolayısıyla en çok tüketilen fenolik bileşiklerden biri olmasıyla öne çıkmaktadır (GANAN ve ark., 2009; Yılmaz, 2006). Nitekim, bu özelliğiyle gıdalarda kateşinlerin kullanımının giderek arttığı bildirilmektedir (YILMAZ, 2006). Fenolik maddelerin antimikrobiyel etkileri mikroorganizmalar üzerinde neden oldukları farklı etkileşimler ve kompleksleşme reaksiyonlarının bir sonucudur. Nitekim, bu bileşikler bakteri hücre duvarlarıyla kompleks oluşturma, membranlarını tahrip etme, bakteriyel tutunmayı engelleme ve hayati bakteriyel enzim sistemlerini inhibe etme gibi etkilerin birini veya birkaçını birarada gösterebilmektedirler (COWAN, 1999). Örneğin gallik asitin Salmonella türleri üzerindeki antimikrobiyel etkisinin bu bakterilerin hücre duvarını tahrip etmesinden kaynaklandığı iddia edilmektedir (NOHYNEK ve ark., 2006).

Fenolik bileşikler genellikle şarapçılık ile meyve ve sebze işleme endüstrisi atıklarından elde edilmekte ve amaca göre gıdalarda ya ham ekstakt olarak ya da kısmen veya ileri düzeyde saflaştırılarak kullanılmaktadırlar. Halen gıdalarda en yaygın olarak kullanılan fenolik bileşikler yeşil çay ve üzüm çekirdeğinden elde edilen ve kateşin ve türevlerini yoğun olarak içeren bileşiklerdir (PERUMALLA ve HETTIARACHCHY, 2011). Kateşin ve kateşin türevleri gösterdikleri yüksek antioksidant ve antimikrobiyel etkiler nedeniyle özellikle kırmızı et, kanatlı etleri ve su ürünleri etlerinin muhafazasında kimyasal maddelerin yerine kullanılabilirler (ALMAJANO ve ark., 2008; O'GRADY ve ark., 2006; KU ve ark., 2008; SAUCIER ve WATERHOUSE, 1999; TANG ve ark., 2001; VAQUERO ve ark., 2007; YILMAZ, 2006). Fenolik bileşiklerin veya ekstraktların aktif paketlemede kullanılabilecek yenilebilir filmlerde başarılı bir şekilde kullanılmaları da dikkat çekmektedir. Nitekim, KU ve ark. (2008) agar bazlı yenilebilir filmlere kateşin ilave etmişler ve bu filmleri sosislere uygulayarak bu ürünün antimikrobiyel ve antioksidant özelliklerini geliştirmişlerdir. ALKAN ve ark (2011) bu proje kapsamında gallik asiti zein filmlere ilave ederek literatürde ilk kez gıda zehirlenmesine en çok neden olan tavuk karkası kaynaklı Campylobacter jejuni bakterisine karşı etkili filmler geliştirmişlerdir. GADANG ve ark (2008) peyniraltı suyu proteini filmlerinde antimikrobiyel etki elde etmek amacıyla üzüm çekirdeğinden elde edilen fenolik bileşiklerini malik asit, nisin ve EDTA gibi maddelerle combine ederek hindi sosislerinde kullanmışlardır. JOERGER (2007) antimikrobiyel filmler üretmek amacıyla üzüm çekirdeği ve yeşil çay fenoliklerinin soya proteinlerinden elde edilen filmlere, grepfuit çekirdeği fenolik bileşiklerinin ise LDPE ve PE gibi plastik filmlere ilave edilebildiğini belirtmektedir. Filmler içerisinde saf, kısmi saf veya ham fenolik bileşiklerin kullanıldığı bu ve benzeri çalışmalar literatürde çok sayıda mevcuttur. Bunun dışında pek çok

çalışmada da bitkilerden elde edilen esansiyel yağlardaki fenolik yapıdaki maddelerin aktif ambalajlamada kullanımı tartışılmıştır. Bu amaçla çeşitli filmlere esansiyel yağlardan elde edilen thymol, carvacrol, cinnamaldehyde gibi antimikrobiyel etkisi olan fenolik yapıdaki maddeler ilave edilebilmektedir. Ancak, oldukça etkili antimikrobiyel ajanlar olan bu maddeleri kullanmanın en büyük dezavantajı oldukça güçlü bir tad ve aromaya sahip olmaları ve ilave edildikleri gıdaların tad ve konusunu güçlü bir şekilde etkilemeleridir (GUTIERREZ ve ark., 2009).

Diğer yandan fenolik bileşiklerin aktif paketlemede kullanılmasında antimikrobiyel etkileri yanında antioksidant etkileri de büyük önem taşımaktadır. Oksidasyon gıdalarda kalite kaybının en büyük nedenleri arasında olup bu yolla bozulma sonucunda gıdalarda istenmeyen tad ve koku bileşikleri oluşmaktadır. Oksidasyon sonucunda oluşan ve bazıları toksik de olabilen çok sayıda reaktif metabolit gıdaların besin değerini oluşturan vitamin ve protein gibi öğeleriyle de reaksiyona girmekte ve onların yararlılığını azaltmaktadır (NAKAMURA ve ark., 1998). Dolayısıyla her ne kadar aktif ambalajlama şu an için büyük oranda antimikrobiyel ambalajlamaya yönelik bir uygulama görüntüsü çizse de özellikle son zamanlarda antioksidantların aktif ambalajlamada kullanılması da büyük bir artış göstermiştir. Antioksidant terimi Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi FDA tarafından oksidasyondan kaynaklanan bozulma, acılaşma ve renk bozulmasını geciktiren koruyucu maddeler olarak tanımlanmakta olup (SPECCHIO, 1992) fonksiyonel paketlemede halen kullanılan başlıca antioksidantlar sentetik bileşikler olan BHA ve BHT dir (RAJALAKSHMI ve NARASIMHAN, 1996). Bu antioksidantların uçuculukları oldukça yüksek olup (steam-volatile) yağda çözünmektedirler. Dolayısıyla kolayca ambalaj materyalinden gıdaya ve oradan da lipit tabakalarının derinliklerine inerek oksidasyonu etkili bir şekilde engelleyebilmektedirler. Ancak her ne kadar BHA ve BHT fonksiyonel paketlemede başarıyla kullanılabilse de fenolik yapıda olan bu sentetik antioksidantların sağlık üzerindeki etkileri ile ilgili çok ciddi endişeler bulunmaktadır. Örneğin BHA'nın fare ve hamsterlerin ön midelerinde papilloma ve karsinomaya neden oldukları bildirilmektedir (MADHAVI ve ark., 1996). İnsanların ön midesi bulunmamasına karşın esophagus gibi organlarında benzer hücrelere sahip olmaları endişelerin giderilmesini önlemektedir. Diğer yandan BHT'nin ise denek hayvanlarında kanın pıhtılaşma yeteneği üzerinde olumsuz etkileri olduğu ve karaciğer hiperplasia ve karsinogenesisine neden olduğu belirlenmiştir (MADHAVI ve ark., 1996). Dolayısıyla aktif ambalajlamada belirtilen sentetik fenolik maddeler yerine doğal fenolik maddelerin kullanılması büyük önem taşımaktadır. Halen antioksidantlar yoğun olarak direk olarak gıdalara ilave edilerek kullanılırken, aktif ambalajlamada kullanımları ile ilgili çalışmalar ise ancak yeni yeni gelişmektedir. Örneğin MOORE ve ark. (2003) LDPE filmler içerisine antioksidant etkisiyle

bilinen biberiye (rosemary) fenolik ekstraktı ileve etmiş ve etlerdeki kırmızı rengin bu filmlerle paketlenmeleriyle bir ölçüde de olsa muhafaza edilebildiğini belirlemişlerdir.

### **2.3. AKTİF AMBALAJLAMADA KULLANILABİLECEK FİMLER**

Aktif ambalajlamada kullanılan ambalaj filmleri plastik ve yenibilir ambalaj materyalleri olarak başlıca iki guruba ayrılabilirler. Antimikrobiyel, antioksidant ve başka spesifik ajanların plastik ambalaj materyallerine ilave edilmesi oldukça yaygın bir uygulamadır. Bu amaçla naylon, naylon/PE, selüloz asetat, PEMA, EVA/LLDPE, PVC, PVOH, HDPE, LDPE, PE, PE-co-MA ve daha pek çok polimerin fonksiyonel paketlemede denendiği bilinmektedir (APPENDINI ve HOTCHKISS, 2002; SUPPAKUL ve ark., 2003; QUANTAVALLA ve VICINI, 2002). Plastik filmlerin fonksiyonel paketleme amacıyla kullanılmasında ortak nokta olarak görülebilecek en önemli husus bu materyallere ilave edilen fonksiyonel ajanların çoğunlukla kimyasal yapıda ve belirli bir termal stabiliteye sahip olmasıdır. Bunun başlıca nedeni genellikle plastik filmlerin üretimi sırasında uygulanan eritme, enjeksiyon ve ekstrüzyon gibi termal işlemlerin yüksek sıcaklıkta yürütülmesi ve bu koşullarda ortama ancak ısıya dirençli ajanların ilave edilebilmesidir (APPENDINI ve HOTCHKISS, 2002; HAN, 2000; SUPPAKUL ve ark., 2003). Ayrıca bazı istisnalar dışında (PVOH gibi) birçok plastik filmin hidrofobik yapıda olması da filmlere ilave edilecek ajanların kullanımını sınırlamakta veya uygulama sırasında hidrofilik olan fonksiyonel ajanlar ve film hazırlamada kullanılan solvent veya polimer arasında uyumsuzluk ortaya çıkmaktadır. Fonksiyonel ambalajlamada plastik filmlerin kullanılmasını caydırıcı olan diğer faktörler ise, insan sağlığı açısından her plastik materyalin gıdalara temas için uygun olmaması ve plastiklerin kullanımı sonucu ortaya çıkan çevresel sorunlardır. Tüm bunların sonucunda yakın bir gelecekte sağlık açısından ve çevre güvenliği açısından bir sorun oluşturmayan biyolojik olarak çözünebilir ve çoğu zaman yenibilir olan ambalaj filmlerinin fonksiyonel paketleme teknolojisine hakim olacağı düşünülmektedir.

#### **2.3.1. Aktif ambalajlamada yenibilir filmlerin kullanılması**

Yenibilir film terimi bir gıdanın yüzeyinde veya tabakaları arasında kaplama ile bir film oluşturmak veya önceden üretilen bir film yerleştirilerek oluşturulan yenibilir ince bir tabakayı tanımlamaktadır (KROCHTA ve JOHNSTON, 1997). Yenibilir özellikte olduklarından bileşimleri gıdalara uygulanan regülasyonlarla uyumlu olması gereken bu filmler nem, yağ veya oksijen gibi unsurlara karşı bariyer etkisi göstererek veya uçucu aroma ve flavor unsurlarının kaybını azaltarak gıdanın kalitesini ve raf ömrünü artırabilmektedirler

(GUILBERT ve ark., 1996; RYU ve ark., 2002; CHOI ve ark., 2003). Ancak, yenilebilir olmaları gıda tüketilirken bu filmlerin her zaman gıdayla birlikte tüketildikleri anlamını taşımamaktadır. Örneğin özellikle Avrupa'da peynirlerin dış yüzeylerine kaplanan mum yapısındaki filmler genellikle ürün tüketilirken gıda yüzeyinden ayrılmaktadırlar. Bunun aksine kuruyemişlerin yüzeyine bayatlamayı geciktirmek amacıyla kaplanan zein, soya proteini veya şekerden yapılmış kaplama filmler gıdayla birlikte tüketilebilmektedirler. Sağladıkları yukarıda belirtilen klasik etkiler dışında yenilebilir filmler aktif ambalajlamaya uygunluklarıyla modern paketleme uygulamaları için en uygun filmler olarak kabul edilmektedirler. Yenebilir filmlerin aktif ambalajlama için sağladığı en büyük avantaj plastik filmlere göre ılımlı koşullarda hazırlanmaları ve doğal yapıdaki protein ve fenolik maddeler gibi termal işlemlerden büyük zarar görebilecek antimikrobiyel veya antioksidantlarla birlikte kullanılabilmesidir. Ayrıca yenebilir filmlerin bileşimlerinin kullanılması düşünülen antimikrobiyel ajana uyumlu veya gıdaya ek bir besin değeri sağlayacak şekilde hazırlanması da mümkündür. Yenebilir filmlerin kullanılmasındaki avantajların en önemlilerinden birisi de belki de tek başına tercih sebebi olmalarına bile yeterli olabilecek olan biyolojik olarak parçalanabilir olmaları ve çevresel sorunlara yol açmamalarıdır.

Yenebilir filmlerin başlıca bileşenleri yüksek molekül ağırlığına sahip polimer veya polimerler ve daha düşük bir molekül ağırlığına sahip olan plastikleştirici ajandır. Plastikleştiriciler temel olarak filmlere belirli bir elastikiyet kazandırmak amacıyla kullanılan ajanlar olup kullanılmadıkları zaman yenebilir filmlerin işlenmesi ve bunlardan elde edilen filmlerin kullanımı güçleşebilmektedir. Nitekim, en popüler yenilebilir filmlerden birisi olan zein kırılabilirliği nedeniyle plastikleştirici bir ajan olmadan kullanılamaz. Kullanılan plastikleştirici ajanın tipi ve miktarı yenebilir filmin nem, sorpsiyon özellikleri, mekanik özellikleri ve su ve oksijen geçirgenliğini de etkilemektedir. Yenebilir filmler protein yapısında olabilecekleri gibi karbonhidratlar ve lipitler de yenebilir film üretiminde kullanılabilir ve aktif özellikleri, mekanik özellikleri ve bariyer etkileri birbirinden tamamen farklı olabilen materyaller elde edilebilmektedir. Örneğin çoğunlukla hidrofilik yapıda olan protein (zein hariç) ve karbonhidratlardan elde edilen filmler neme karşı hassasiyet gösterirken, lipitten yapılan yenebilir filmler bunun aksi özelliktedirler. Yine proteinden elde edilen yenebilir filmlerin oksijen geçirgenliği karbonhidratlardan elde edilenlere göre genellikle daha düşüktür (MILLER ve KROCHTA, 1997; KROCHTA ve JOHNSTON, 1997).

### **2.3.1.1. Protein yapısındaki yenilebilir filmler**

Proteinler film oluşturma yetenekleri ile kolay ve bol bulunabilmeleri nedeniyle yenebilir filmlerin üretiminde en yaygın olarak kullanılan materyallerdir. Özellikle düşük gaz

geçirgenlikleri ile dikkati çeken protein filmleri, hidrofobik prolaminlerden üretilenler dışında neme karşı hassas olmaları ve su buharına karşı zayıf bariyer özellikte olmaları gibi dezavantaj olarak değerlendirilebilecek özellikler de göstermektedirler (RYU ve ark., 2002; PETERSON ve ark., 1999; GUILBERT ve ark., 1996). Literatür incelendiği zaman aktif ambalajlamada en yoğun olarak kullanılan protein filmlerin glüten, zein ve peynir altı suyu proteinlerinden üretilenler olduğu görülmektedir. Bu çalışmada kullanılmış olan zein ve peyniraltı suyu proteini filmlerle ilgili aşağıda temel bilgiler verilmiştir.

#### **2.3.1.1.1. Zein filmler**

Zein mısırlarda bulunan prolamin gurubundan bir depo proteini olup toplam mısır proteinlerinin yaklaşık %45-50'sini oluşturmaktadır. Endüstride mısır yağı üretimi gerçekleştiren rafinerilerin başlıca yan ürünü olan bu protein darıdan da üretilmektedir. Bunun dışında özellikle son zamanlarda giderek dev bir endüstri kolu haline gelen mısırdan biyoetanol üretiminden de kayda değer miktarda zein yan ürün olarak elde edilmektedir (ALKAN ve ark., 2011). Zein lösin, prolin ve alanin gibi hidrofobik amino asitlerce oldukça zengin, buna karşın hidrofilik olan bazik ve asidik amino asitlerce fakirdir. Bu özelliği nedeniyle suda çözünürlüğü az olan protein, alkolde ise oldukça iyi çözünmektedir. Zein'in  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  gibi farklı fraksiyonları olsa da, ticari olarak üretilen formu daha çok moleküler ağırlığı 21 000 ve 25 000 kDa arasında değişen  $\alpha$  formundan oluşmaktadır.

GRAS bir madde olan zeinden elde edilen filmler parlak açık sarı renkte ve yumuşak olup hidrofobik karakterli ve yağa dirençlidirler. Ancak protein yapısında olduklarından bu filmler az da olsa hidrofilik guruplar da içermekte ve ıslak ortamlarda belli oranda hidrate olarak suya karşı mutlak bir bariyer oluşturamamaktadırlar (LINDSTROM ve ark., 1992). Ancak, yine de oldukça hidrofobik olan zein filmlerin suya karşı dayanımı hidrofilik olan diğer pek çok yenilebilir filmle kıyaslanamayacak kadar iyidir. Kuru ortamlarda ise zein filmlerin neme karşı kayda değer bir bariyer etkisi bulunmaktadır. Zein filmler oldukça kırılğan bir yapıda olduklarından üretimlerinde plastikleştirici ajan olarak genellikle gliserol veya oleik asit kullanılmakta ve kısmen de olsa arzulanan minimum esnekliğe sahip filmler üretilebilmektedir. Özellikle oksijen geçirgenliklerinin düşük olması ve yağa karşı bariyer teşkil etmeleri nedeniyle zein filmler meyveler, şekerleme, kuruyemişler ve et ürünlerinde kullanılmaya oldukça uygundur (LINDSTROM ve ark., 1992; HERALD ve ark., 1996; JANES ve ark., 2002). Tüm bu özellikleri nedeniyle özellikle son zamanlarda zein filmlerin aktif ambalajlamada kullanılmasına büyük bir ilgi doğmuş ve nisin, lizozim, polilisin ve thymol gibi doğal yapıdaki antimikrobiyeller veya BHA gibi antioksidantların zein filmlere ilave edilerek gıdalara uygulanması üzerinde çeşitli çalışmalar yürütülmüştür (TEERAKARN ve



ark., 2002; PADGETT ve ark., 1998; JANES ve ark., 2002; HOFFMAN ve ark., 2001; DAWSON ve ark., 2000; MASTROMATTEO ve ark., 2009; UYSAL ve ark., 2011). Aktif ambalajlamada kullanılacak olan zein filmler gıdalara bir kaplama tabakası olarak uygulanabilecekleri gibi, önceden dökülerek hazırlanmış zein filmler gıdaların yüzeyine veya tabakaları arasına yerleştirilerek de rahatlıkla kullanılabilirler (JANES ve ark., 2002; HERALD ve ark., 1996). RAKOTONIRAINY ve ark. (2001) sebzelerin modifiye atmosferde paketlenmesinde kullanılabilir nitelikte zein filmler de geliştirmişlerdir.

Zein filmlerin gıdalardaki uygulamaları giderek artsa da bu filmlerin kullanımının plastik filmlerle rekabet edebilir hale getirilebilmesi için tek başına duran (self-standing) film şeklinde kullanımlarının daha da artırılması gerekmektedir. Bunun için filmlerin aşırı hidrofobik yapılarından kaynaklanan elastikiyet ve kırılabilirlik sorunlarının tam olarak çözülmesi şarttır. Literatürde bu amaçla zein filmleri çerisine plastikleştirici ajan olarak çeşitli organik asitler, şekerler, alkoller, yağ asitleri, çeşitli sentetik polimerler, çapraz bağlayıcı ajanlar ve plastikleştiriciler katılmıştır (LAWTON, 2004; GHANBARZADEH, 2006; LAI, 1997; WOODS, 2009; KIM, 2004; SESSA, 2008). Ancak, gerçekleştirilen pek çok çalışmaya karşın zein filmlerin plastik filmler düzeyinde esnek ve dayanıklı bir yapıya kavuşturulması sağlanamamıştır. Ancak, özellikle gliserol ve oleik asitin bu sorunu kısmen de olsa çözdüğü bilinmektedir.

#### **2.3.1.1.2. Peynir altı suyu proteinlerinden elde edilen filmler**

Peynir altı suyu, süt işleyen tesislerin en önemli atığı olup ortaya çıkan büyük miktardaki atık çoğu zaman yeterince değerlendirilememekte veya arıtılmamakta ve ciddi çevresel sorunlara yol açmaktadır. Ancak özellikle son zamanlarda birçok firma işletmelerinde üretilen peynir altı suyunu püskürterek kurutucular yardımıyla kurutmakta ve peynir altı suyu protein izolatu olarak pazarlamaktadır. Peynir altı suyu proteinleri (PSP) süt proteinlerinin yaklaşık olarak %20 'sini oluşturmaktadır olup bu proteinlerin film oluşturma yeteneği, antioksidant etkileri ve mükemmel bir besin değeri bulunmaktadır (ARCAN ve YEMENICIOGLU, 2010; LE TIEN ve ark., 2001). PSP suda çözünür nitelikte olup film yapımı öncesi denatüre edilseler bile hızla su alıp şişen hidrofilik özellikte filmler yapmaktadırlar. Dolayısıyla bu filmlerin su buharına karşı zayıf bir bariyer özellikleri bulunmaktadır. Buna karşın sözkonusu filmlerin ortam nemine göre değişmekle birlikte oksijene ve aroma maddelerine karşı bariyer özellikleri iyidir. Zein filmlerdeki kadar olmasa da plastikleştirici olmadan PSP'den elde edilen filmler de az da olsa kırılabilirler. Dolayısıyla bu filmlerin üretiminde de uygun miktarda plastikleştirici kullanılmaktadır (LIN ve KROCHTA, 2003; CISNEROS-ZEVALLOS ve KROCHTA, 2003). Özellikle süt sanayinin de desteğiyle PSP film

üretimi çalışmaları oldukça hızlanmış ve bu yönde birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Örneğin KIM ve USTUNOL (2001) PSP ve lipid emülsiyonları kullanarak kompozit filmler üretmiştir. HONG ve KROCHTA (2003) ısıyla denatüre edilmiş PSP'yi oksijen geçirgenliklerini azaltmak amacıyla polipropilen filmlerin kaplanması için kullanmış ve bu amaçla kullanılan sentetik kaplamalara alternatif geliştirmişlerdir. LIN ve KROCHTA, (2003) benzer kaplamaları kağıtlar üzerine uygulanarak yağa karşı dirençli kağıt ambalaj malzemeleri geliştirmeye çalışmışlardır. Bunun yanında PSP'nin adeta mumlar gibi kullanılarak mevelerin kaplanması için kullanımı ve bu yolla söz konusu ürünlerdeki küflenmenin azaltılması, solunumun yavaşlatılması ve enzimatik esmerleşmenin kontrolü üzerinde de çalışılmaktadır (LE TIEN ve ark., 2001; LIN ve KROCHTA, 2003; VACHON ve ark., 2003; CISNEROS-ZEVALLOS ve KROCHTA, 2003). Gerçekleştirilen bütün bu çalışmalar PSP'nin aktif ambalajlamada kullanımını da teşvik etmiş ve bu proteinlerden elde edilen filmlere p-aminobenzoik asit, sorbik asit ve potasyum sorbat gibi kimyasallar (OZDEMİR ve FLOROS, 2001; CAGRI ve ark., 2002) ve lizozim, laktoperoksidaz, laktoferrin ve laktoferrisin gibi biyoaktif maddelerin ilave edilmesi de denenmiştir (MIN ve KROCHTA, 2005; MIN ve ark., 2005a; MIN ve ark., 2005b).

### **2.3.1.2. Karbonhidrat yapısındaki yenilebilir filmler**

Aynen proteinlerden elde edilen filmlerde olduğu gibi karbonhidratlardan elde edilen yenilebilir filmler de hidrofilik olmakta ve suya karşı hassas davranarak su buharına karşı zayıf bariyer oluşturmaktadırlar. Neredeyse tüm karbonhidrat filmlerinin aşırı hidrofilik olması dolayısıyla suyla temas ettikleri zaman hızla su alarak şişmesi bu filmlerin biyoaktif bileşiklerin kontrollü salımında kullanılmalarını oldukça sınırlamaktadır. Dolayısıyla bu metinde karbonhidrat filmlere yalnızca yüzeysel olarak değinilmiştir. Ancak bunun dışında karbonhidratlardan elde edilen filmler oldukça iyi mekaniksel ve optik özellikler göstermektedirler. Karbonhidratlardan film üretilmesinde birçok farklı polisakkaritten faydalanılabilmekte olup bunların başlıcaları alginat, nişasta ve kitosandır. Alginattan üretilen filmler linear yapıya sahip heteropolimer olan ve D-mannuronik asit ve L-guluronik asitten oluşan alginik asitten elde edilmektedir (LINDSTROM ve ark., 1992; HUANG ve ark., 1999). Bu polisakkaritten film elde edilmesinde içerdiği karboksil gruplarının kalsiyum gibi metal atomlarıyla çapraz bağ yaparak jel oluşturması yeteneğinden faydalanılmaktadır. Alginik asidin gıdalarda kullanılan formu sodyum alginat olup toksik olmayan ve suda çözünür bir polisakkarittir (CHA ve ark., 2002). Alginat filmler çoğunlukla gıdalara kaplama şeklinde uygulanmakta olup bu amaçla gıdanın önce alginik asit çözeltisine ardından da film oluşumu için  $CaCl_2$  çözeltisine daldırılması gerekmektedir. Her iki aşaması püskürtme ile de

uygulanabilecek bu işlem sonrasında oluşan film tabakası yüksek miktarda su içermekte ve adeta bir rezervuar gibi görev yaparak gıdanın nem kaybını azaltmaktadır. Bu tür filmler özellikle et, kanatlı ve su ürünlerinde başarıyla kullanılmaktadır (LINDSTROM ve ark., 1992). Literatürde alginat filmlerin aktif ambalajlamada kullanımı ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin CHA ve ark. (2002) lizozim, nisin ve EDTA ajanları kullanılarak yenilebilir antimikrobiyel filmler üretmişlerdir. Gucbilmez ve Yemencioğlu (2007) peyniraltı suyundan saflaştırdıkları laktoperoksidazı alginat filmlere ilave etmiş ve aktif ambalajlamada kullanılabilecek yenilebilir filmler üretmişlerdir.

Film üretiminde kullanılabilecek bir diğer karbonhidrat ise nişastadır. Bu karbonhidrat çeşitli tohumlardan ve kök sebzelerden izole edilebilen ve  $\alpha$  (1→4) bağları içeren linear amiloz ve  $\alpha$  (1→4) ile birlikte  $\alpha$  (1→6) bağları da içeren dallı yapıdaki amilopektinin karışımından oluşan bir polisakkarittir. Kolay bulunması ve oldukça ucuz olması nedeniyle nişastadan üretilen filmler oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (PETERSON ve ark., 1999; GUILBERT ve ark., 1996). Linear yapıda olan amilozun film oluşturma yeteneği dallı olan amilopektinden daha üstün olup amilozun filmleri güçlü ve sıkı bir yapıda, amilopektinin filmleri ise güçsüz, kırılabilir ve süreksiz yapıda olmaktadır (GENNADIOS ve ark., 1997). Ancak amiloz suda çözünmez halde bulunduğu için film üretiminde kullanılacağı zaman bu polisakkaritin ya yüksek sıcaklık ve basınç altında çözünürlüğünün artırılması ya da kimyasal yolla modifiye edilerek daha yüksek çözünürlüğe sahip olan hidroksi propil amiloza dönüştürülmesi gerekmektedir. Amiloz çözeltileri plastikleştirici ve emülsifiye edici ajanlarla birlikte şekerlemeler, meyveler ve kuruyemişlerin kaplanması için kullanılmakta olup bu tür filmlerin oksijen geçirgenliğinin ölçülemeyecek kadar düşük olduğu belirtilmektedir (LINDSTROM ve ark., 1992; GENNADIOS ve ark., 1997; FORSSEL ve ark., 2002).

Yenilebilir film üretiminde kullanılabilecek bir diğer polisakkarit ise kitinden elde edilen kitosandır. Kitin böcekler, kabuklular, mantarlar ve alglerde bulunan yapısal bir polisakkarit olup linear yapıdaki  $\beta$  (1→4) bağlarıyla birleşmiş N-asetilglukozamin moleküllerinden oluşmaktadır. Bu polisakkarit suda çözünmez halde bulunduğu için film üretiminde kullanılmadan önce deasetilasyona tabi tutularak çözünür formu olan kitosan'a dönüştürülmektedir (LINDSTROM ve ark., 1992). Katyonik özellikleri nedeniyle bakterilerin hücre duvarında bulunan negatif yüklü unsurlarla etkileşime giren kitosan filmler kendiliğinden doğal bir antimikrobiyel etkiye sahiptir. Dolayısıyla içlerine antimikrobiyel madde ilavesine ve aktif ambalajlamada kullanıma uygun görünmektedirler. Oldukça yakın bir geçmişte kitosan filmler içerisine lizozim ilave edilmesi gerçekleştirilmiş ve bu filmler farklı mikroorganizmalar üzerinde başarıyla denenmiştir (PARK ve ark., 2004). Ancak, özellikle çözündürülmek için yoğun asidik bir ortamda ihtiyaç duyan kitosan bu asitliğin filmlerine ve dolayısıyla gıdaya geçmesine neden olmaktadır. Bu durum kitosan filmleri yüzeyinde asitlik

oluşmasının pek de önem taşımadığı yumurta gibi kabuklu ürünlere uygulamak açısından ideal filmler haline getirmektedir.

### **2.3.1.3. Lipid yapısındaki yenilebilir filmler**

Lipit yapısındaki filmler özellikle nem bariyeri filmler elde edilmek istendiği zaman kullanılmaktadırlar. Ancak bu filmler oldukça kırılğan ve instabil olup düşük bir esneklik göstermekte ve opak yapıda saydam olmayan filmler oluşturmaktadırlar (RYU ve ark., 2002; GUILBERT ve ark.,1996). Başlıca lipit filmleri mumlar ve asetile edilmiş monogliseritlerden elde edilmekte olup özellikle mumlar peynirlerin kaplanması sıklıkla kullanılmaktadırlar. Mumlar uzun zincirli alkoller ve uzun zincirli yağ asitlerinin esterleri olup bunlardan elde edilen filmler peynirler yanında meyveler ve sebzelerin kaplanması amacıyla da kullanılmaktadır. Bu yolla meyve ve sebzelerde nem kaybı %50 kadar azaltılabilmekte ancak meyve ve sebzelerin bozulması engellenememektedir (LINDSTROM ve ark., 1992). Film üretiminde kullanılan başlıca mumlar balmumu, kandelilla mumu ve karnauba mumudur (BALDWIN ve ark., 1997).

Diğer yandan film üretiminde kullanılan asetile olmuş gliseridler, gliseridlerin asetik anhidridle rekasiyona sokulması veya sıvı veya katı yağların triasetin ile interesterifikasyonu ile üretilmektedirler (GENNADIOS ve ark., 1997). Asetile edilmiş monogliseridlerden elde edilen filmler mumsu bir özellik göstermekte ve oldukça iyi bir nem bariyeri özelliğine sahip olmaktadır (LINSTROM ve ark., 1992; KESTER ve FENNEMA, 1987). Bu tür filmler özellikle dilimlenmiş et ürünlerine ve kanatlı etlerine uygulanmakta ve bu ürünlerde depolama sırasındaki nem kaybını önleyebilmektedirler (KESTER ve FENNEMA, 1987). Ayrıca, kuru kayısılar aşırı nem kaybının önlenmesi için erimiş asetile monogliseride daldırılmakta ve kaplanmaktadır (LINDSTROM ve ark., 1992).

## **2.4. AKTİF AMBALAJLAMADA KONTROLLU SALIMIN ÖNEMİ**

Yeni nesil tüketime hazır veya minimal işlem görmüş soğutulmuş gıdalara olan talep arttıkça aktif ambalajlamaya duyulan ihtiyaç da giderek artmaktadır (DE ROEVER, 1998; DEVLIEGHERE ve ark., 2004). Ancak, halen pek çok gıdanın muhafazasında koruyucu maddeler direk olarak gıda içerisine ilave edilip karıştırılarak veya gıdanın antimikrobiyal çözeltisine daldırılmasıyla uygulanmaktadır. Aktif ambalajlamaya göre bu klasik yöntemler büyük dezavantajlara sahiptirler. Örneğin, antimikrobiyal ajanın gıdaya katılmasında gıdanın tüm noktalarında mikroorganizmaları inhibe edebilecek konsantrasyona ulaşılması zorunluluğu nedeniyle yüksek miktarlarda antimikrobiyal madde kullanılması gerekmektedir.

Bu durum tüketicilerin tepkisini çekmekte ve bu uygulamaya olan ilgi giderek azalmaktadır. Gıdanın antimikrobiyal çözeltisine daldırılması ise yüzeydeki antimikrobiyal maddenin bir süre sonra gıdanın iç katmanlarına difüze olması ve mikrobiyal bozulmaya ve oksidatif değişimlere en hassas olan gıda yüzeyinin bir süre sonra korumasız kalmasına neden olmaktadır. İşte antimikrobiyel ambalajlamanın en önemli fonksiyonu gıdanın bozulmaya en hassas bölgesi olan yüzeyinin mümkün olan en az düzeyde antimikrobiyel madde kullanılarak korunmasıdır (APPENDINI ve HOTCHKISS, 2002). Bunun sağlanabilmesi ise antimikrobiyel maddenin ambalaj filminden gıdaya uygun bir hızla geçmesiyle mümkündür. Antimikrobiyel maddenin filmde gıdaya gereğinden daha yavaş geçmesi durumunda gıda yüzeyinde antimikrobiyel etki sağlayacak kritik konsantrasyona ulaşılamaz. Bunun aksi durumda, yani antimikrobiyel maddenin gıda yüzeyine gereğinden daha hızlı geçmesi durumunda ise aynen gıdanın antimikrobiyel çözeltisine daldırılmasındaki gibi antimikrobiyel madde hızla gıdanın alt katmanlarına geçer ve bozulmaya hassas olan gıda yüzeyi korumasız kalır. Bu ikinci sorun aktif ambalajlamada en sık görülen sorundur (HAN ve FLOROS, 1998; BOUNOCORE ve ark., 2005). İşte bu karmaşık gibi görünen sorunların çözümü ancak aktif ambalajlamada kontrollü salım tekniğinin kullanılmasıyla aşılabılır. Aktif ambalajlamanın uygun şekilde kullanımıyla antimikrobiyel veya antioksidantın gıdaya aşamalı olarak geçmesi sağlanabilmekte ve gıda yüzeyindeki etkinlik sağlayan konsantrasyon düzeyi daldırma yöntemine göre çok daha uzun bir süre muhafaza edilebilmektedir. Aktif ambalajlama ile antioksidant veya antimikrobiyel ajanların gıdaya aşamalı olarak geçmesi onların gıdadaki kompleks reaksiyonlarla kısa sürede nötrale olmasını da engellemekte ve bu durum özellikle biyoaktif ajanların aktif ambalajlamada daha etkin olarak kullanılmasını sağlamaktadır. Bilindiği üzere özellikle protein veya fenolik yapıdaki biyoaktif ajanlar çeşitli enzimlerin etkileri veya kompleksleşme reaksiyonları sonucunda aktivitelerini kısmen veya tamamen yitirebilmektedirler (QUINTERO-SALAZAR ve ark., 2005; ROSE ve ark., 1999; ROSE ve ark., 2002).

Kontrollü salım teknolojisi aslında eczacılık alanında uzun bir süreden beri gündemde olan ve bir süredir oldukça başarılı bir şekilde uygulanan bir teknolojidir (LANGER ve PEPPAS, 1981; LEONG ve LANGER, 1988; BRAYDEN, 2003). Bu teknolojinin ilaç sistemlerinde kullanımıyla ilgili ciddi bir bilgi birikimi sağlanmış ve gelişmiş modelleme çalışmaları yürütülmüştür. Ancak, aktif plastik filmlerle ilgili birtakım çalışmalar gerçekleştirilmiş olsa da bu teknoloji halen gıdaların muhafazasında yaygın olarak kullanılamamaktadır. Bunun başlıca nedenleri günümüzün yeni muhafaza anlayışlarıyla (engel teknolojisi, termal olmayan işleme, biyoprezervasyon, soğutma) üretilen gıda sistemlerinde mikrobiyel açıdan tam bir risk değerlendirmesi yapmanın güçlüğü ve ambalaj filmlerinin plastikten yenilebilir ve biyolojik olarak bozunabilire doğru hızlı bir dönüşüm

geçirmeleridir. Özellikle kullanımı giderek yaygınlaşan ve tüketicilerin de büyük bir ilgi gösterdiği yenilebilir filmlerde kontrollü salım teknolojisinin uygulaması ise henüz araştırma safhasındadır.

Gıda alanında kontrollü salım tekniğinin uygulanmasıyla ilgili ilk kapsamlı çalışmalar HAN ve FLOROS (1998) tarafından başlatılmıştır. Bu araştırmacılar plastik temelli gıda ambalajlarında kontrollü salım etkisi elde etmek amacıyla kullanılacak en etkin yöntemin çok katmanlı filmler elde etmek olduğunu iddia etmişlerdir. Bu tür bir sistemde ambalaj filminin en dışında bariyer özellikteki bir film, orta katmanında antimikrobiyel ajanı içeren bir matriks film ve en içinde ise salım hızını kontrol eden üçüncü bir film tabakası olması gerektiği vurgulanmıştır (HAN ve FLOROS, 1998). BOUNOCORE ve ark. (2003) ve (2004) bu yaklaşımı kabullenmekle birlikte film tasarımında orta katmanda antimikrobiyel ajanı içeren çapraz bağlanma düzeyi ayarlanabilen bir matriks ve bunun her iki yanında kontrollü salımı sağlayan film katmanlarından oluşan yine 3 katmanlı bir plastik film tasarlamışlardır. LACOSTE ve ark (2005) ise kontrollü salım amacıyla kullanılacak farklı film morfolojileri elde etmek amacıyla akıllı karıştırma (smart blending) olarak adlandırılan ve değişik polimer ve bileşenleri kontrollü hızlarda ancak farklı burkma kuvvetleriyle karıştıran bilgisayar kontrollü bir cihaz geliştirmişlerdir. GEMILI ve ark (2009) ve (2010) ise antimikrobiyal ve antioksidant ajanların kontrollü salımı için kullanılacak asimetrik (bir yüzü poroz, diğer yüzü poroz olmayan) selüloz asetat filmler geliştirmişler ve ilaç teknolojisinde yaygın olarak kullanılan asimetrik film teknolojisini ilk kez gıda teknolojisine adapte etmişlerdir.

Yukarıda belirtilen kontrollü salım stratejileri ve tekniklerinin hepsi plastik filmler için geliştirilmiş ve uygulanmış olup üretim tekniklerinin plastik filmlerden farklı olması nedeniyle yenilebilir filmlerde bu teknikler tam olarak uygulanmamaktadır. Ancak, yenilebilir filmlerde kontrollü salım elde etmek için uygulanabilecek bazı stratejiler de vardır. Bu amaçla uygulanabilecek başlıca strateji yenilebilir filmin hidrofobitesinin artırılmasıdır. Bu değişim sonucunda filmin suyla olan teması azalmakta ve su alarak şişmesi (swelling) geciktirilebilmektedir. Su alarak şişmenin azalmasıyla film içerisindeki antimikrobiyel ajanın çözünerek film içerisinden ortama geçmesi yavaşlamaktadır. Yenilebilir filmleri oluşturan biyopolimerlerin büyük bir kısmı aşırı hidrofilik veya zein gibi prolaminlerde kısmen hidrofilik olduğundan bu strateji pekçok yenilebilir filmde işe yaramaktadır. Yenilebilir filmlerin hidrofobitesinin artmasıyla hidrofilik/hidrofobik dengeleri de değişmekte ve bu durum içerdikleri antimikrobiyel ajanla olan etkileşimlerini etkilemektedir. Örneğin filmin içerdiği antimikrobiyel veya antioksidant ajanın kısmen hidrofobik karakterli olması hidrofobikliği artıran filme olan afinitesini de artırmakta ve filmde ortama daha yavaş geçmesini sağlayabilmektedir. Nitekim, TEERAKARN ve ark (2002) hidrofobik karakterli bir antimikrobiyel ajan olan nisin'in yine hidrofobik nitelikli zein protein filmlerinden su içerisine

yavaş bir şekilde difüze olduğunu, buna karşın daha hidrofilik özellikteki gluten proteini filmlerden su içerisine çok daha hızlı bir şekilde difüze olduğunu belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar nisinin hidrofobik karakterli zein filmlerden daha yavaş bir şekilde difüze olmasını kendisi de hidrofobik karakterli olan bu ajanın filmlere daha yüksek afinite göstermesine ve hidrofobik etkileşime girmesine bağlamışlardır. Gerçekten de film ve antimikrobiyel ajan arasında hidrofobik bir etkileşim olması geçiş hızını yavaşlatabilmektedir. Ancak hidrofobik olan filmlerin hidrofilik filmlere göre daha yavaş şekilde su aldığı ve geçiş hızındaki yavaşlamanın temel nedenlerinden birisinin bu olduğu da unutulmamalıdır. Kontrollü salımı istenilen antimikrobiyel ajanın film matrisini oluşturan biyopolimere olan afinitesinin artırılması stratejisi tarafımızdan da uygulanmıştır (GUCBILMEZ ve ark., 2007). Bu çalışmada tarafımızdan hidrofobik zein biyopolimeri içerisine hidrofilik lizozim ilave edilerek antimikrobiyel filmler üretilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre hidrofobik zein filmler içerisine hidrofilik lizozimle birlikte yüzey aktif özelliği olan nohut proteinlerinin ilave edilmesi lizozimin zeine olan afinitesini artırmakta ve su içerisine geçiş hızını yavaşlatmaktadır. Buna karşın yüzey aktif etkisi olan nohut proteinleri yerine ortama hidrofilik özelliği oldukça yüksek olan sığır serum albumini ilave edilmesi ise lizozimin filmlerden su içerisine geçişini hızlandırmıştır (GUCBILMEZ ve ark., 2007).

Hidrofilik bir yenebilir filmin hidrofobikliğinin artırılmasında lipit olarak mumların kullanımı filmler içerisinde uygun boyutta hidrofobik zerrecikler teşkil edilmesi ve kompozitleşen film matrisi içerisinde difüzyon için dolambaçlı bir yol oluşturulması (tortuosity) açısından da önemlidir. Nitekim, ÖZDEMİR ve FLOROS (2003) hidrofilik olan peyniraltı suyu proteinlerinden elde ettikleri yenebilir filmlere hidrofobik karakterli balmumu ilave edilmesiyle bu filmlerden potasyum sorbatın suya difüzyon hızını azaltmışlardır. Söz konusu araştırmacılar hidrofilik film matrisi içerisinde oluşan hidrofobik balmumu zerreciklerinin hidrofilik olan kullandıkları antimikrobiyel ajanın difüzyonu için dolambaçlı bir yol oluşturduğunu iddia etmektedirler. Ancak, filmin hidrofobikliğinin artmasıyla filmin su alma hızının da azaldığına hiç kuşku yoktur. Yenebilir filmlerin içerdiği antimikrobiyel ajanların difüzyon hızının azaltılması için film hidrofobikliğinin artırılması stratejisi QUATTARA ve ark (2000) tarafından da kullanılmıştır. Nitekim bu araştırmacılar kitosan filmlerden asetik asit ve propiyonik asit difüzyonunu filmlerin hidrofobikliğini yağ asitleri ve esansiyel yağ asitleri ilavesiyle artırarak azaltmışlardır. Görüldüğü üzere hidrofilik ve hidrofobik özelliği olan farklı biyopolimerlerin veya lipitlerin belirli bir strateji çerçevesinde karıştırılmasıyla kontrollü salım elde etme açısından farklı olanaklar yaratabilmektedir. Bu tür filmler içlerine ilave edilen unsurların tam olarak birbiriyle karışıp karışmamasına bağlı olarak karışım veya kompozit özellikli filmler olarak adlandırılmaktadırlar. Kompozit veya karışım oluşturacak şekilde birden çok biyopolimerin kullanılması ve bu yolla filmlerin yapısal özelliklerinin içerdikleri

antimikrobiyel ajanın salım hızını modifiye edecek şekilde değiştirilmesi üzerinde oldukça az çalışılmış yeni bir konudur. Ancak, bu teknik yenibilir filmlerin fiziksel özelliklerinin istenilen yönde değiştirilmesi amacıyla kullanılmıştır. Örneğin protein yapısındaki filmlerin su buharı geçirgenliğinin azaltılması için hidrofobik polisakkaritler gibi biyopolimerlerle ve lipitler gibi biyomoleküllerle karıştırılması bilinen bir uygulamadır (GENNADIOS ve ark., 1997).

Aynen plastik filmlerde olduğu gibi yenilebilir filmlerin çapraz bağlanma düzeyinin artırılıp azaltılmasıyla da kontrollu salım gerçekleştirilmesi mümkündür. Ancak, gıda endüstrisine yönelik olarak tasarlanan yenibilir filmlerde çapraz bağlama düzeyinin ayarlanmasıyla kontrollu salım gerçekleştirilmesi üzerinde çalışmalar oldukça sınırlıdır (ZACTITI ve KIECKBUSCH, 2006). Buna karşın çapraz bağlamanın ilaç endüstrisinde kontrollu salımda kullanılması çok daha yaygındır. Nitekim, biyopolimerlerden elde edilen hidrojellerin ve mikroküreciklerin (microsphere) çapraz bağlama uygulanarak ve çapraz bağlanma düzeyini kontrol ederek ilaçların kontrollu salımını gerçekleştirmek amacıyla kullanılması oldukça güncel bir çalışma konusudur (MUNDARGI et al., 2008; PILLAY ve ark., 2005; MWANGI ve OFNER, 2004). Biyoaktif bir ajanın kontrollu salımı amacıyla kompozit veya karışım özellikteki filmler geliştirilmesi çapraz bağlama stratejisinin etkin şekilde uygulanabilmesine olanak sağlamaktadır. Örneğin karıştırılacak olan iki biyopolimerden birinin çift değerli iyonlarla çapraz bağlanabilir olması durumunda (alginat veya düşük esterleşme dereceli pektin gibi) elde edilen filmin çapraz bağlanma düzeyinin teorik olarak iki farklı şekilde değiştirilmesi mümkündür. Bunlardan birisi çapraz bağlanma yeteneğindeki biyopolimerin diğerine göre oranının değiştirilmesi, diğeri ise çapraz bağlayıcı ajan konsantrasyonunun değiştirilmesidir.

Kompozit veya karışım filmler kullanılarak kontrollu salım gerçekleştirebilen çok tabakalı yenibilir filmler elde edilmesi de mümkündür. Bu amaçla karıştırılacak iki biyopolimerden birinin pozitif veya negatif yük taşıyan bir biyopolimer olması yeterlidir. Kompozit veya karışım film oluşturulup kurutulduktan sonra filmin kazandığı yükün zıttı olan bir yükü taşıyan üçüncü bir biyopolimer çözeltisine daldırılmasıyla film üzerinde elektrostatik kuvvetlerle tutunan ince bir kaplama tabakası oluşturulabilir. Bu işlem yani kaplama ve tabaka oluşturma her defasında filmin en dışındaki kaplamayı oluşturan biyopolimerin zıttı yük taşıyan yeni bir biyopolimerle tekrarlanırsa film yüzeyinde çok sayıda tabaka oluşturulabilir. Film yüzeyinde bu şekilde biyopolimer tabakaları oluşturulması içerdiği antimikrobiyel veya antioksidant ajanın kontrollu şekilde salımını sağlayabilecek bir mekanizma elde edilmesi amacıyla kullanılabilir. Tabakaların birbirine tutturulmasında en sık olarak zıt yüklerin oluşturduğu elektrostatik çekim kuvvetlerinden faydalanılmaktadır. Ancak, tabakaların oluşturulmasında hidrojen bağlarından veya hidrofobik etkileşimlerden faydalanılması da olasıdır (WEISS ve ark., 2006). Gıda yüzeylerinin yenibilir filmlerle



kaplanmasında bu şekilde çok katmanlı tabakalar oluşturulması ve bu katmanlar içerisine antimikrobiyel veya antioksidantlar gibi fonksiyonel ajanların ilave edilmesi tartışılmaktadır (WEISS ve ark, 2006). Bu teknolojinin özellikle lipofilik biyoaktif ajanların enkapsülasyonu ve gıdalara kontrollu salımı için de kullanılabilirliği belirtilmektedir (MCCLEMENTS ve ark., 2007). Ancak, gıda alanında bu uygulamalarla ilgili araştırmalar henüz başlangıç safhasındadır. Bunun aksine ilaç endüstrisinde benzer ilkelere göre biyopolimerlerden oluşturulmuş çok tabakalı granüllerle, mikro veya nano yapıların çeşitli maddelerin kontrollu salımı amacıyla kullanımı üzerinde çeşitli uygulamalar ve araştırmalar gerçekleştirilmektedir (ALONSO, 2004; BAJPAI ve TANKHIVALE, 2006). Bu yöntemin en büyük dezavantajı uygulamanın uzun sürmesi ve maliyetinin yüksek olmasıdır. Dolayısıyla bu tür komplike bir teknolojinin gerçekten ihtiyaç duyulmadıkça kullanılması uygulama açışından güçtür.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. GEREÇ

Lisozim üretiminde kullanılan taze yumurtalar ve baklagil proteini üretiminde kullanılmış olan soya (genetik olarak modifiye olmayan) İzmir'deki bir süpermarketten satın alınmışlardır. Baklagil proteini üretiminde kullanılan mercimekler Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) Ankara'dan temin edilmiştir. Darı zeini, saf lisozim, (+)-kateşin, Karnauba mumu (No.1, refined), Oleik asit, Micrococcus lysodeicticus, sığır serum albumini, diyaliz tüpleri (cut-off: 12 000 kDa), ABTS (2,2,-azino-bis-(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic asit) Sigma (St. Louis, MO, USA) firmasından satın alınmıştır. Gliserol ve soya L- $\alpha$ -lesitini Merck (Darmstadt, Germany) firmasından satın alınmıştır. Peyniraltı suyu proteinleri Daisco Food Int., INC. firmasınca bağışlanmıştır (MN, USA).

#### 3.2. YÖNTEM

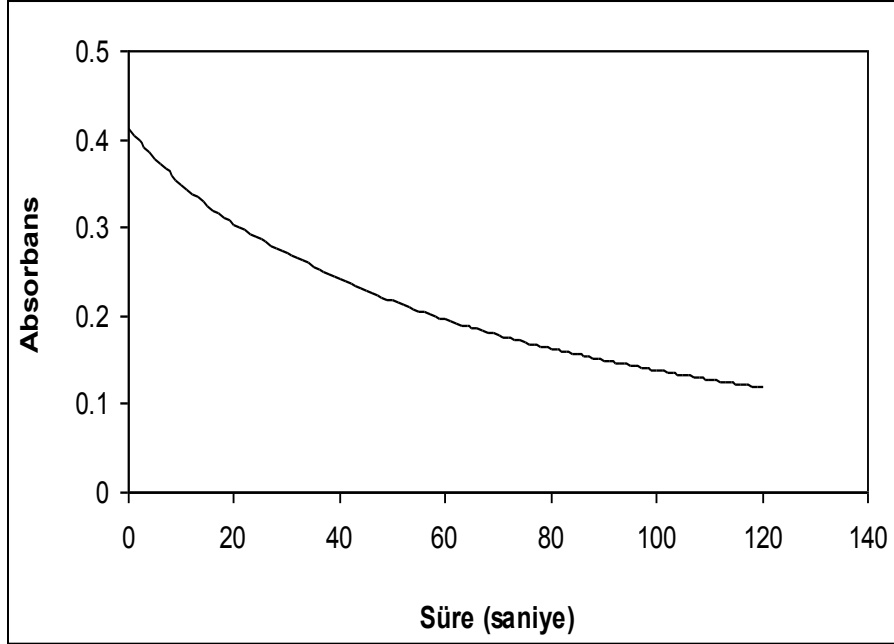
##### 3.2.1. Biyoaktif Maddelerin Aktivitesinin/Miktarının Belirlenmesi

###### 3.2.1.1. Lisozim aktivitesinin belirlenmesi

###### 3.2.1.1.1. Çözünür haldeki lisozimin aktivitesinin belirlenmesi

Lisozim aktivitesi spektrofotometrik olarak 660 nm 'de ve 30 °C sabit sıcaklıkta belirlenmiş olup bu amaçla sabit sıcaklık hücresi ile donatılmış Shimadzu (Model 2450, Japan) spektrofotometre kullanılmıştır. Reaksiyon karışımının oluşturulması için önceden 30 °C'e getirilmiş olan 2.3 mL, 0.05 M Na-fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış Micrococcus lysodeicticus hücre süspansiyonu (0.26 mg/mL) ve 0.2 mL enzim çözeltisi karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımının absorbansında lisozim enziminin bakteri hücre duvarını parçalamasıyla meydana gelen bulanıklık kaybı ve buna bağlı olarak oluşan absorbans azalması 2-5 dakika boyunca kaydedilmiş ve enzim aktivitesi elde edilen absorbans değerlerinin süreye karşı işlenmesi ile oluşturulan kurvenin başlangıç doğrusal kısmının eğiminden hesaplanmıştır (Şekil 3.1). 1 Unite, spektrofotometrik enzim aktivite tayinlerinde genellikle olduğu gibi, 1 dakikada 0.001 absorbans değişimi yaratabilen enzim miktarı olarak belirlenmiştir. Hazırlanan farklı liyofilize enzim preparatlarının bu yolla belirlenmiş aktivitesi 15000-20000 U/mg arasında değişmiştir. Belirtilen bu yöntem geçiş deneylerinde ortama salınan lisozim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla da kullanılmıştır. Ancak bu durumda

reaksiyon karışımı geçiş ortamından mümkün olan en az düzeyde örnek almak amacıyla 0.1 mL enzim ve 2.4 mL, 0.05 M Na-fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış *Micrococcus lysodeicticus* hücre süspansiyonundan oluşturulmuştur.



Şekil 3. 1. Üretilen lizozimin *M. Lysodeicticus* hücre duvarını parçalamasıyla oluşan bulanıklık kaybı hızından aktivitenin belirlendiği örnek bir kurve (Değerler spektrofotometrede 660nm’de elde edilmiştir).

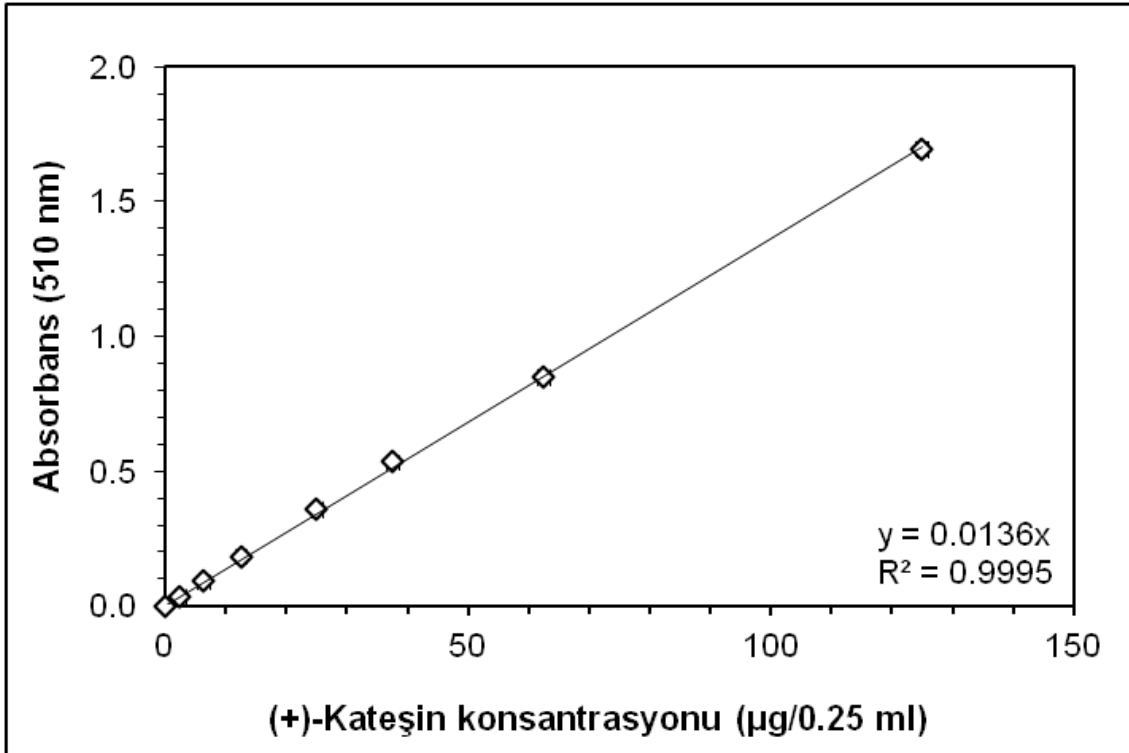
### 3.2.1.1.2. Immobilize haldeki lizozimin aktivitesinin belirlenmesi.

Bu yöntem filmlerde bulunan immobilize (tutuklu) lizozimin aktivitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Bu amaçla filmler 24 saat destile su içerisinde tutulmuş ve içlerindeki çözünür lizozimin uzaklaşması sağlanmıştır. Ardından filmler (4 x 4 cm) ikiye bölünmüş ve her parça ayrı bir petri kabı içerisindeki 50 mL önceden 30 °C’e getirilmiş olan 0.05 M Na-fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış *Micrococcus lysodeicticus* hücre süspansiyonu (0.26 mg/mL) içerisine atılmıştır (GUCBILMEZ ve ark. 2007). Reaksiyon karışımının absorbansında lizozim enziminin bakteri hücre duvarını parçalamasıyla meydana gelen bulanıklık kaybı ve buna bağlı olarak oluşan absorbans azalması 60 dakika boyunca 15 dakikada bir kaydedilmiş ve enzim aktivitesi elde edilen absorbans değerlerinin süreye karşı işlenmesi ile oluşturulan kurvenin başlangıç doğrusal kısmının eğiminden hesaplanmıştır. 1 Unite, 1 dakikada 0.001 absorbans değişimi yaratabilen enzim miktarı olarak belirlenmiştir.

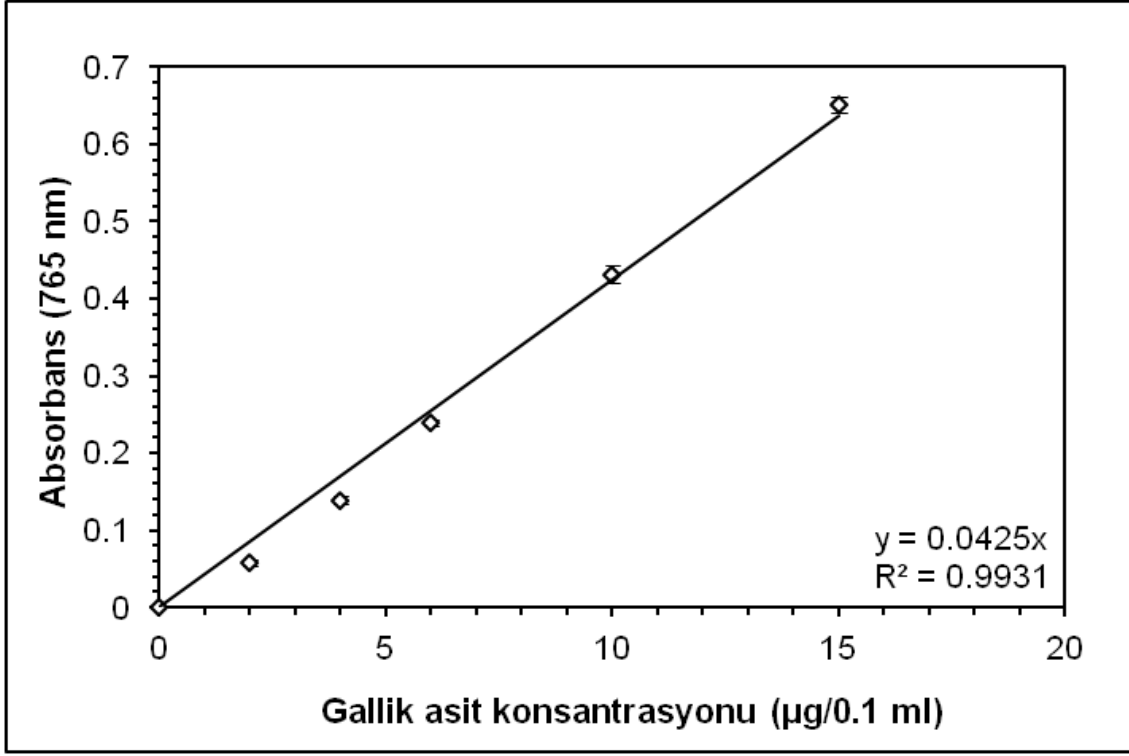
### 3.2.1.1. Flavonoit madde ve toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi

Geçiş deneylerinde kullanılan flavonoitlerin miktarları toplam flavonoit madde tayiniyle belirlenmiştir. Bu amaçla MEYERS ve ark.'ında (2003) verilen spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Buna göre 0.25 mL kadar örnek 1.0 mL deiyonize suyla karıştırılmış ve ardından üzerine 75 µL NaNO<sub>2</sub> (%5) ilave edilmiştir. Bu karışım oda sıcaklığında imkübasyona bırakılmış ve inkübasyonun 5. dakikasında ortama 75 µL AlCl<sub>3</sub> (%10) ilave edilmiştir. İnkübasyona devam edilmiş ve 6. dakikada ortama bu kez 0.5 mL, 1M NaOH ve 0.6 mL deiyonize su ilave edilmiştir. Oluşan renk spektrofotometrede 510 nm'de belirlenmiş ve kateşin miktarı önceden (+) kateşinle hazırlanmış standart kurve yardımıyla belirlenmiştir. Tüm ölçümler 3 kez tekrarlanmış ve ortalamaları kullanılmıştır.

Geçiş deneylerinde toplam fenolik madde tayini Singleton ve Rossi (1965) tarafından verilmiş olan yöntemle göre belirlenmiştir. Bu amaçla uygun şekilde seyreltilmiş 0.1 mL örnek birebir destile su ile seyrelttikten sonra, 1.0 mL 1/10 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu reaktifiyle karıştırılmış ve 3 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ardından karışıma 0.8 mL % 7.5 luk Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklenmiş ve karıştırılarak 2 saat inkübe edildikten sonra spektrofotometrede çözeltinin absorbansı 765 nm de belirlenmiştir. Toplam fenolik madde miktarı filmlerin cm<sup>2</sup> 'sinden salınan mg gallik asit eşdeğeri olarak ifade edilmiştir. Şekil 3.2 ve 3.3'de flavonoit ve toplam fenolik madde tayinlerinde kullanılmış olan standart kurveler verilmiştir.



Şekil 3. 2. Flavonoit madde tayininde kullanılmış (+) kateşin'le hazırlanmış standart kurve



Şekil 3. 3 Toplam fenolik madde tayininde kullanılmış gallik asitle hazırlanmış standart kurve

### 3.2.2. Film üretiminde kullanılmış olan baklagil proteinlerinin üretimi

Baklagil proteinleri mercimek ve soyadan üretilmiş olup bu amaçla öncelikle ARCAN ve YEMENICIOGLU'nda (2007) belirtildiği gibi su içerisinde rehidre edilmiş nohutlardan aseton tozu üretilmiş ve bu ürünlerdeki yağ uzaklaştırılmıştır. Aseton tozuna işleme amacıyla 50 g kadar kuru baklagil 200 mL soğuk asetonla (-20 °C) bir Waring blender yardımıyla 2 dakika homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat, üzerine Watman No 1 filtre kağıdı yerleştirilmiş Buchner hunisinden vakum altında süzülüş ve asetonun uzaklaşmasıyla filtre kağıdı üzerinde kalan katı kısım toplanmıştır. Toplanan katı kısım asetonla aynen yukarıda anlatıldığı şekilde iki kez daha 200 mL soğuk asetonla homojenize edilmiş ve oda sıcaklığında bir gece bekletilerek içerdiği aseton kalıntısının uzaklaşması sağlanmıştır. Elde edilen aseton tozu protein ekstraksiyonunda kullanılmış olup bu amaçla öncelikle 20 g kadar aseton tozu 250 mL su içerisinde süspansiyon edilmiş ve ortamın pH değeri proteinlerin çözündürülmesi amacıyla 9.5'a ayarlanmıştır. Bu aşamadan sonra ekstrakt manyetik karıştırıcı eşliğinde 30 dakika karıştırılmış ve 15000 x g'de ve 4 °C de 30 dakika santrifüjlenerek ortamdaki çözünür olmayan tortular uzaklaştırılmıştır. Ardından ekstraktların pH değeri proteinlerin çökeltilmesi amacıyla izoelektrik noktalarına oldukça yakın olan 4.5'e getirilmiş ve ağırlıklı olarak globülünlerden oluşan proteinler çöktürülerek toplanmıştır.

Ardından ekstrakt yeniden destile su içerisinde çözündürülmüş ve pH 4.5'de bir kez daha çöktürülmüş ve 15 dakika santrifujlemeyle çöken protein tortuları bir kez daha toplanmıştır. Toplanan proteinler su içerisinde süspanse edilmiş ve pH 7.0'ye getirildikten sonra liyofilize edilerek kullanılmak üzere -18 °C de depolanmışlardır. Bu şekilde hazırlanmış olan mercimek ve soya proteinlerinin Kjeldahl yöntemiyle belirlenmiş toplam protein miktarları sırasıyla % 90 ve %92'dir (w/w).

### **3.2.3. Zein ve Zein Temelli Filmlerin Üretimi**

#### **3.2.3.1. Zein filmlerin üretimi**

Zein filmler PADGETT ve ark.'nda (1998) verilmiş olan yöntem modifiye edilerek üretilmiştir. Bu amaçla izlenen yöntem kısaca şöyledir. 1.4 g zein 8.1 mL % 96'lik etanol içerisinde manyetik karıştırıcı eşliğinde çözündürülmüş ve 25 dakika karıştırılmıştır. Ardından ortama plastikleştirici ajan olarak 0.4 mL gliserol ilave edilmiş ve karıştırmaya 5 dakika kadar devam edilmiştir. Daha sonra karışım sıcaklığı kaynama başlayana kadar artırılmıştır. Karışım 5 dakika kadar karıştırılmadan kaynatılmış ve ardından oda sıcaklığında 10 dakika kadar soğutulduktan sonra ortama farklı miktarlarda biyoaktif ajan (lizozim, fenolik madde) ilave edilmiştir. Ardından karışım bir homojenizasyon-dispersiyon cihazı (Heidolph, Almanya, Type 8 F rotor, uç çapı: 6.6 mm) yardımıyla 10000 rpm de 4 dakika homojenize edilmiş ve cam bir kalıp içerisine dökülmüştür (G x U x Y: 8.5 x 8.5 x 0.4 cm). Metinde aksi belirtilmediği sürece filmler 25 °C de % 50 bağıl nemdeki kabin içerisinde 19 saat kurutulmuş ve merkezlerinden elde edilen 4 x 4 cm parçalar salım deneylerinde kullanılmıştır (az sayıdaki film oda sıcaklığında kurutulmuş olup bu istisnai durum ilgili bölümlerde belirtilmiştir).

#### **3.2.3.2. Zein-mum kompozit filmlerin üretimi**

Bu amaçla aynen yukarıda olduğu gibi 1.4 g zein 8.1 mL % 96'lik etanol içerisinde manyetik karıştırıcı eşliğinde çözündürülmüş ve 25 dakika karıştırılmıştır. Ardından ortama plastikleştirici ajan olarak 0.4 mL gliserol ilave edilmiş ve karıştırmaya 5 dakika kadar devam edilmiştir. Daha sonra ortama zein miktarının % 5'i kadar (w/w) karnauba, kandelilla veya bal mumu karıştırılmış ve karışım sıcaklığı kaynama başlayana kadar artırılmıştır. Karışım 5 dakika kadar karıştırılmadan kaynatılmış ve ardından oda sıcaklığında 10 dakika kadar soğutulduktan sonra ortamdaki mumun çözündürülmesi amacıyla emülsifiye edici ajan olarak yine zeinin % 5'i kadar lesitin ilave edilmiştir. Karışım lesitin çözünmesi için 2.5 dakika daha karıştırılmış ve ortama bu kez farklı miktarlarda biyoaktif ajan (lizozim, fenolik madde)

ilave edilmiştir. Ardından karışım 3.2.3.1'de belirtilen homojenizasyon-dispersiyon cihazı yardımıyla 10000 rpm de 4 dakika homojenize edilmiş ve cam bir kalıp içerisine dökülmüştür (G x U x Y: 8.5 x 8.5 x 0.4 cm). Filmler 25 °C de % 50 bağıl nemdeki kabin içerisinde 19 saat kurutulmuş ve merkezlerinden elde edilen 4 x 4 cm parçalar geçiş deneylerinde kullanılmıştır.

### **3.2.3.3. Zein-baklagil proteini kompozit filmlerin üretimi**

Bu amaçla yine 1.4 g zein 8.1 mL % 96'lik etanol içerisinde manyetik karıştırıcı eşliğinde çözündürülmüş ve 25 dakika karıştırılmıştır. Ardından ortama plastikleştirici ajan olarak 0.4 mL gliserol ilave edilmiş ve karıştırmaya 5 dakika kadar devam edilmiştir. Daha sonra karışım sıcaklığı kaynama başlayana kadar artırılmıştır. Karışım 5 dakika kadar karıştırılmadan kaynatılmış ve ardından oda sıcaklığında 10 dakika kadar soğutulduktan sonra ortama zein miktarının % 2.5 – 7.5'i arasında değişen miktarlarda (baklagil proteinlerinin film içerisindeki son konsantrasyonu 1.5 3.0 veya 4.5 mg/cm<sup>2</sup> olacak şekilde) mercimek veya soya proteini ilave edilmiştir. Ardından karışım 3.2.3.1'de belirtilen homojenizasyon-dispersiyon cihazı yardımıyla 10000 rpm de 4 dakika homojenize edilmiş ve cam bir kalıp içerisine dökülmüştür (G x U x Y: 8.5 x 8.5 x 0.4 cm). Filmler 25 °C de % 50 bağıl nemdeki kabin içerisinde 19 saat kurutulmuş ve merkezlerinden elde edilen 4 x 4 cm parçalar geçiş deneylerinde kullanılmıştır.

### **3.2.3.4. Zein-oleik asit karışım filmlerin üretimi**

Bu amaçla yine 1.4 g zein 8.1 mL % 96'lik etanol içerisinde manyetik karıştırıcı eşliğinde çözündürülmüş ve 25 dakika karıştırılmıştır. Ardından ortama plastikleştirici ajan olarak 0.40 mL gliserol ilave edilmiş ve karıştırmaya 5 dakika kadar devam edilmiştir. Daha sonra karışım sıcaklığı kaynama başlayana kadar artırılmıştır. Karışım 5 dakika kadar karıştırılmadan kaynatılmış ve ardından oda sıcaklığında 10 dakika kadar soğutulduktan sonra ortama zein miktarının % 10-40'ı arasında değişen miktarlarda oleik asit ve % 5-10'u arasında değişen oranlarda lesitin ilave edilmiştir. Ardından karışım 3.2.3.1'de belirtilen homojenizasyon-dispersiyon cihazı yardımıyla 10000 rpm de 4 dakika homojenize edilmiş ve cam bir kalıp içerisine dökülmüştür (G x U x Y: 8.5 x 8.5 x 0.4 cm). Filmler 25 °C de % 50 bağıl nemdeki kabin içerisinde 19 saat kurutulmuş ve merkezlerinden elde edilen 4 x 4 cm parçalar geçiş deneylerinde kullanılmıştır.

### **3.2.4. Peyniraltı Suyu Proteini ve Peyniraltı Suyu Proteini Temelli Filmlerin Üretimi**

#### **3.2.4.1. Peynir altı suyu protein filmlerin üretimi**

Bu amaçla % 10'luk peynir altı suyu protein (PSP) çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltiliye plastikleştirici olarak gliserol eklenmiştir (peynir altı suyu gliserol oranı: 1.5/1). Ardından karışım, proteinlerin denatürasyonu amacıyla 90 °C'de 30 dakika ısıtılmıştır. Karışımın sıcaklığı buz banyosu kullanılarak oda sıcaklığına getirildikten sonra, ortama lizozim veya kateşin ilave edilerek film çözeltisi 3.2.3.1'de belirtilen homojenizasyon-dispersiyon cihazı yardımıyla 10000 rpm de 4 dakika homojenize edilmiş ve standart 10 cm çaplı plastik petri kaplarına dökülerek kurutma kabiniinde 25 °C ve % 50 bağıl nemde 19 saat kurutulmuştur.

#### **3.2.4.2. Peynir altı suyu proteini-mum kompozit ve peyniraltı suyu-oleik asit karışım filmlerin üretimi**

Bu amaçla % 10'luk PSP çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltiliye plastikleştirici olarak gliserol eklenmiştir (peynir altı suyu gliserol oranı: 1.5/1). Ardından karışım, proteinlerin denatürasyonu amacıyla 90 °C'de 30 dakika ısıtılmıştır. Daha sonra sıcak protein çözeltisi içerisine PSP-mum kompozit filmi üretilecekse PSP miktarının %30'u kadar balmumu, PSP-yağ asiti karışım filmleri üretilecekse PSP miktarının % 10'u kadar oleik asit ilave edilmiştir. Film çözeltisi daha sonra 3.2.3.1'de belirtilen homojenizasyon-dispersiyon cihazı yardımıyla 10000 rpm de 2 dakika homojenize edilmiştir. Sıcaklığı buz banyosu kullanılarak oda sıcaklığına getirilen film çözeltilisine son aşamada lizozim veya kateşin ilave edilerek film çözeltisi bir kez daha homojenizasyon-dispersiyon cihazı yardımıyla 10000 rpm de 2 dakika homojenize edilmiş ve 10 cm çaplı standart plastik petri kaplarına dökülerek kurutma kabiniinde 25 °C ve % 50 bağıl nemde 19 saat kurutulmuştur.

### **3.2.5. Salım Deneyleri**

#### **3.2.5.1. Su içerisinde yürütülen salım deneyleri**

##### **3.2.5.1.1. Çalkalamalı ortamda su içerisinde serbest bırakılan filmlerle yürütülen salım deneyleri**

Bu salım deneylerinde kesilmiş olan 4x4 cm boyutundaki film parçaları kullanılmıştır.



bu amaçla filmler 50 mL deiyonize su (4 °C) içeren cam Petri kapları (10 cm çapında) içerisine yerleştirilmiştir. Petri kapları daha sonra 4 °C'deki bir inkübatör içerisine yerleştirilmiş olan ve 80 rpm de çalışan bir çalkalayıcı üzerine konmuş ve deney başlatılmıştır. Denemeler aktif paketlenme çoğunlukla soğutulmuş gıdalara uygulandığından buzdolabı sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Salım deneyine ortama geçen biyoaktif madde aktivitesi (lisozim) veya miktarı (fenolik bileşiklerde) dengeye ulaşana kadar veya kayda değer düzeyin altına inene kadar devam edilmiştir. Örnekleme, metin içerisinde aksi belirtilmediği sürece ortamdan farklı sürelerde 0.3 mL sıvı alınması ve bunda her defasında 3 kez (her test için 0.1 mL) aktivite veya konsantrasyon tayini yapılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Salım kurvesi oluşturulurken konsantrasyon veya aktivite hesabında alınan örnekler dikkate alınmıştır.

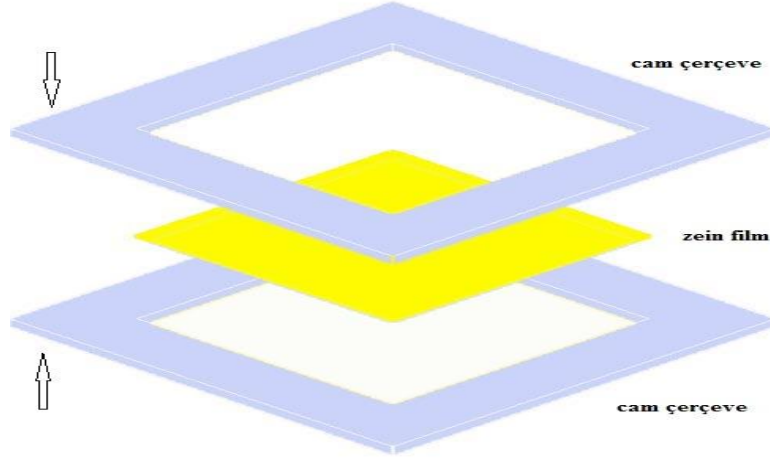
### **3.2.5.1.2. Çalkalamalı ortamda su içerisinde cam çerçeve içerisine sabitlenmiş filmlerle yürütülen salım deneyleri**

Oleik asit içeren filmlerde salım testleri hem 3.2.5.1.1'de belirtildiği şekilde hem de filmi su içerisine batık haldede tutan bir cam çerçeveden oluşan özel bir düzenek kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4). Bu düzeneğin tasarlanma nedeni oleik asit içeren bazı filmlerin yoğunluğunun değişmesi ve salım deneyi için suya bırakıldıklarında filmlerin su yüzeyine doğru yaklaşmalarıdır. Bu durum hiç kuşkusuz 3.2.5.1.1'de anlatılmış klasik salım düzeneğindeki çalkalamanın etkinliğini azaltmaktadır. Çerçeveleli salım düzeneğinde yürütülen testler şu şekilde gerçekleştirilmiştir. 4.2 x 4.2 cm boyutundaki film parçaları çerçeveye yerleştirilmiştir. Ardından cam çerçeve 150 mL deiyonize su (4 °C) içeren cam beher içerisine yerleştirilmiştir. Beherler daha sonra 4 °C'deki bir inkübatör içerisine yerleştirilmiş olan ve 80 rpm de çalışan bir çalkalayıcı üzerine konmuş ve deney başlatılmıştır. Salım deneyine ortama geçen biyoaktif madde aktivitesi (lisozim) veya miktarı (fenolik bileşiklerde) dengeye ulaşana kadar veya kayda değer düzeyin altına inene kadar devam edilmiştir. devam edilmiştir. Örnekleme, ortamdan farklı sürelerde 0.75 mL sıvı (3 x 0.25 mL) alınması ve bunda her defasında 3 kez aktivite veya konsantrasyon tayini yapılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Salım kurvesi oluşturulurken konsantrasyon veya aktivite hesabında alınan örnekler dikkate alınmıştır.

### **3.2.5.2. Belirli bir pH'daki tampon içerisinde yürütülen salım deneyleri**

Bu deneyler aynen 3.2.5.1'de belirtildiği gibi ancak destile su yerine farklı pH'larda 0.05M Na-fosfat tamponu (zein filmlerde) veya 0.05M Na-asetat tamponu (PSP filmlerde)

kullanılarak yürütülmüştür.



Şekil 3. 4. Yüzme problemi olan oleik asit içeren filmlerin batık halde salım deneylerinin gerçekleştirildiği düzenek (not: Çerçevenin boyutları: dıştan dışı 6 x 6 cm, içten içe 4 x 4 cm, çerçevenin alt bölümüne köşelere deney sırasında 4 mm yüksekliğinde 4 adet küçük cam ayak yerleştirilmektedir).

### 3.2.5.3. Bir filmin ard arda farklı pH'lardaki tamponlarda bekletilmesiyle yürütülen salım deneyleri

Bu salım deneylerinde dinamik pH değişimi gösteren bir ortamda filmlerin göstereceği salım profilinin belirlenmesi amacıyla farklı bir yöntem uygulanmıştır. Buna göre öncelikle su yerine 4 farklı pH'da (4.3, 5.3, 6.3 ve 7.3) 0.05 M Na-fosfat tamponu (zein filmlerde) veya Na-asetat tamponu (3.0, 4.0, 4.5 ve 5.0) hazırlanmıştır. Deneyler sırasında test edilecek film 4 x 4 cm boyutunda kesilmiş ve öncelikle 4 °C'de bir petri kabında tutulan 50 mL, pH 7.3'deki tampon içerisinde 24 saat tutulmuştur. Bu sırada ortamdan farklı zamanlarda örnek alınmış ve ortama geçen lizozimin aktivite düzeyi belirlenmiştir. 24 saatin sonunda film tampon içerisinde alınarak ilk önce 4 °C'de bir petri kabında tutulan 50 mL, pH 6.3'deki (veya pH 5.0) tampon içerisinde 24 saat, ardından 4 °C'de bir petri kabında tutulan 50 mL, pH 5.3'deki (veya pH 4.0) tampon içerisinde 24 saat ve 50 mL, pH 4.3'deki (veya pH 3.0) tampon içerisinde 3-4 gün kadar bekletilmiş ve bu süre zarfında ortamdan yine örnek alınarak filmde geçen lizozim aktivitesi izlenmiştir. Gerçekleştirilmiş olan tek filmin ard arda 4 farklı pH değerinde salım deneyine tabi tutulduğu deney boyunca petri kapları 4 °C'deki bir inkübatör içerisine yerleştirilmiş olan ve 80 rpm de çalışan bir çalkalayıcı yardımıyla çalkalanmıştır. Salım deneyinde ortama geçen lizozimin aktivitesi ortamdan farklı sürelerde 0.3 mL tampon

alınması ve bunda her defasında 3 kez (her test için 0.1 mL) lizozim aktivitesi tayini yapılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Salım kurvesi oluşturulurken aktivite hesabında zaman içerisinde alınan örnekler dikkate alınmıştır.

#### **3.2.5.4. Katı ortamda yürütülen salım deneyleri**

Bu amaçla SEBTI ve ark.'ları (2003) peptitler için geliştirdiği katı ortam salım deneyi tarafımızdan fenolik maddelere uyarlanmıştır. Katı ortamın hazırlanması için % 3'lük (w/w) agar çözeltisi ultrasaf su içerisinde süspanse edilmiş ve sonra karışım sürekli karıştırma ile 80 °C'ye ısıtılarak agarın tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Ardından, oda koşullarında soğumaya bırakılan agar 15 g'lık porsiyonlar halinde mini Petri kaplarına (Ø=3.5 cm) dökülmüş ve oda sıcaklığında katılaşmaya bırakılmıştır. Daha sonra, salım deneyinde kullanılacak olan filmler 1.5 x 1.5 cm boyutlarında kesilmiş ve agar tabakası hafifçe kaldırılarak agar ile petri kabı arasına gelecek şekilde, yani agar tabakasının altına yerleştirilmiş ve petri +4 °C depolanarak geçiş deneyleri başlatılmıştır. Belirli süreler sonunda (1, 2, 3, 6, 10, ve 14 gün) film parçaları agarlardan uzaklaştırılarak agar içerisine geçen fenolik madde miktarı belirlenmiştir. Salım deneyleri her zaman aralığı için 3 paralel olarak yürütülmüştür. Agar içerisine geçen fenolik maddelerin ekstraksiyonu için film parçaları uzaklaştırıldıktan sonra agarlar 40 mL soğuk etanol (100%) ile karıştırılıp, blender ile 1 dakika süreyle homojenize edilmiştir. Ekstrakt daha sonra 4500 x g'de 15 dakika (+4 °C) santrifüjlenmiş ve tortusu uzaklaştırılmıştır. Sıvı fazda toplam fenolik madde tayini bölüm 3.2.2.2'de verilmiş SINGLETON ve ROSSI (1965) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, her örnek için 3 ayrı tayin sonucunun ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

#### **3.2.6. Filmlerin Antimikrobiyel Aktivitesinin Belirlenmesi**

##### **3.2.6.1. Camphylobacter jejuni'ye karşı yürütülen antimikrobiyel testler**

Bu çalışmalarda kullanılmış olan iki C. jejuni şışundan birisi bizzat bu çalışmada isole edilerek tanımlanmıştır. Bu amaçla farklı marketlerde taze olarak satışa sunulan derisi ayrılmamış çiğ tavuk karkaslarından C. jejuni izolasyonu için öncelikle steril swablarla farklı karkasların yüzeylerinden örnekleme yapılmıştır. Elde edilen örneklerin direk olarak Campylobacter selektif agara (modified Cefoerazone Charchol Deoxycholate Agar (mCCDA), CM739, Oxoid, selektif SR155 katkılı) ekimleri yapılmıştır. mCCDA petripleri mikroaerobik olarak, 37 °C'de 48-72 saat anaerobik kavanozlar içerisinde inkübe edilmişlerdir. Mikroaerobik atmosfer oluşturmak amacıyla Anoxomat Mikroaerobik/Anaerobik

Sistem cihazı (Anoxomat, Mart Microbiology, Holland) kullanılmıştır. Agar yüzeyinde gelişen tipik koloniler gram boyamaya alınarak hücre morfolojisi ve hareket yönünden incelenmiş ve birkaç seri pasajla saflaştırmanın ardından katalaz testi, sıcaklık toleransı, hippurate hidrolizi ve indoksil asetat hidrolizi testleriyle daha ileri düzeyde biokimyasal karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Son aşamada cins ve tür düzeyinde kesin identifikasyon amacıyla kısmi DNA sekanslaması yapılmıştır. Çalışmada kullanılmış olan insandan izole edilmiş standart *Camphylobacter jejuni* suşu TC. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı kültür koleksiyonundan getirilmiştir.

Filmlerin antimikrobiyel aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Bu bakteriye karşı antimikrobiyel olarak gallik asit kullanıldığından filmler 0.625, 1.25, 2.5, 5 ve 10 mg/cm<sup>2</sup> düzeyinde gallik asit içerecek şekilde hazırlanmış ve her filminden aseptik koşullarda bir mantar delici yardımıyla 15 adet 13mm çapında disk kesilmiştir. *C.jejuni* kültürü 37 °C'de 48 saat Nutrient agarda mikroaerobik koşullarda geliştirilmiş ve % 0.1 peptonlu su içerisinde süspansiyon edilerek absorbansı McFarland 1 standart bulanıklığına karşı gelecek şekilde peptonlu su kullanılarak seyreltilmiştir. İnokulum kullanılmadan önce %0.1 peptonlu suyla bir kez daha 1/10 oranında seyreltilmiştir. Elde edilen kültürden 200 mikrolitre kadar alınarak Nutrient agar içeren petriyer üzerine yayılmış ve agar üzerine film diskleri her petriye 3 disk olacak şekilde yerleştirilmiştir. Ardından Petriyer 37 °C'de 48 saat mikroaerobik ortamda inkübe edilmiştir. Sonuçlar diskler etrafında üremenin engellendiği berrak zonların alanları dijital bir kumpas yardımıyla ölçülerek belirlenmiştir. Her konsantrasyonda 15 disk test edilmiş ve kontrol olarak fenolik bileşik içermeyen zein filmler kullanılmıştır. Tüm mikrobiyolojik testler 3 kez baştan tekrarlanmış ve elde edilmiş zon alanlarının ortalamaları kullanılmıştır.

### **3.2.6.2. *Listeria monocytogenes* ve *Listeria innocua*'ya karşı yürütülen antimikrobiyel testler**

Bu amaçla *C. jejuni*'de olduğu gibi geleneksel disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Filmler hazırlanmış ve her filminden aseptik koşullarda bir mantar delici yardımıyla 15 adet 13 mm çapında disk kesilmiştir. *L. monocytogenes* (ATCC 7644) veya *L. innocua* (NRRL B-33314) kültürü 37 °C'de 48 saat Oxford *Listeria* selektif agar veya Nutrient agar üzerinde geliştirilmiş ve alınan koloniler % 0.1 peptonlu su içerisinde süspansiyon edilerek absorbansı McFarland 0.7 standart bulanıklığına karşı gelecek şekilde seyreltilmiştir (bu bulanıklık 50 x 10<sup>6</sup> CFU/ml'ye karşılık gelmektedir). Elde edilen kültürden 100 µL kadar alınarak Nutrient agar içeren petriyer üzerine yayılmış ve agar üzerine film diskleri her petriye 3 disk olacak şekilde yerleştirilmiştir. Ardından Petriyer önce 4 °C 'de 6 saat, ardından da 37 °C'de 36 saat

inkübe edilmiştir. Sonuçlar disklerin ve disklerin etrafında üremenin engellendiği berrak zonların çapları bir kumpas yardımıyla ölçülerek ve zon alanları belirlenerek değerlendirilmiştir.

### **3.2.6.3. Escherichia coli O157:H7'ye karşı yürütülen antimikrobiyel testler**

Bu çalışmada da Escherichia coli O157:H7'ye karşı geleneksel disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Deneylerde kullanılacak Escherichia coli O157:H7 (ATCC 700728) kültürünün hazırlanması amacıyla donmuş halde -80°C'de muhafaza edilen kültürden 1 defa 10 µl'lik halka öze ile alınarak %0.6 maya ekstraktı içeren 6 ml triptik soy broth (TSBYE) içerisine aktarılmış ve sıvı besiyeri 37 °C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Deneylerde kullanılmadan önce daha önceden hazırlanmış olan Macfarland kurvesi yardımıyla bakteri sayısı 10<sup>8</sup> CFU/ml'ye ayarlanmıştır. Elde edilen kültürden 100 µL kadar alınarak Nutrient agar içeren petriyer üzerine yayılmış ve agar üzerine film diskleri her petriye 3 disk olacak şekilde yerleştirilmiştir. Ardından Petriyer önce 4 °C 'de 4 saat, ardından da 37 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir. Sonuçlar disklerin ve disklerin etrafında üremenin engellendiği berrak zonların çapları bir kumpas yardımıyla ölçülerek ve zon alanları belirlenerek değerlendirilmiştir.

### **3.2.7. Filmlerin Antioksidant Aktivitesinin Belirlenmesi**

#### **3.2.7.1. Filmlerin çözünür antioksidant aktivitesinin belirlenmesi (TEAC yöntemi).**

Filmlerin içerisinde bulunan serbest fenolik bileşiklerden kaynaklanan antioksidant kapasiteleri geçiş deneyinde dengeye ulaşıldığı zaman ölçülen toplam kateşin veya gallik asit miktarları dikkate alınarak TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) yöntemiyle belirlenmiştir. Kateşin ve gallik asitin antioksidant kapasitesi RE ve ark.'na (1999) göre ve ABTS serbest radikali kullanılarak belirlenmiştir. Antioksidant kapasitenin belirlenmesinde kurve altında kalan alan (AUC, area under the curve) yöntemi uygulanmıştır. AUC hesabında test süreleri olarak 1,3,6,9,12 ve 15. dakikalar sonundaki ABTS inhibisyon değerleri kullanılmıştır. Standart olarak Trolox antioksidantından faydalanılmıştır. Bu yöntemle antioksidant kapasite tayininin ilkesi koyu mavi renki ABTS serbest radikal çözeltisinin örnek tarafından indirgenmesine ve renksiz hale dönüştürülmesine dayanmaktadır. Serbest radikalın inhibisyon düzeyi renk kaybı ile doğru orantılı olup spektrofotometrede 734 nm'de belirlenmektedir. Filmlerin çözünür antioksidant kapasiteleri cm<sup>2</sup> başına µmol trolox eşdeğeri olarak ifade edilmiştir (Not: gallik asit-kateşin karışımı içeren filmlerde TEAC'ın belirlenmesi için dengeye ulaşıldığı zaman örnek alınarak direk olarak ölçüm yapılmıştır).

### **3.2.7.2. Filmlerin çözüdür antioksidant aktivitesinin belirlenmesi (ORAC yöntemi).**

Filmlerin içerisinde bulunan serbest fenolik bileşiklerden kaynaklanan antioksidant kapasiteleri geçiş deneyinde dengeye ulaşıldığı zaman ölçülen toplam kateşin veya gallik asit miktarları dikkate alınarak ORAC (Oxygen Radical Absorption Capacity) yöntemiyle de belirlenmiştir. Kateşin ve gallik asitin antioksidant kapasitesi XU ve CHANG'e (2007) göre ve AAPH peroksil üreticisi kullanılarak belirlenmiştir. Antioksidant kapasitenin belirlenmesinde kurve altında kalan alan (AUC, area under the curve) yöntemi uygulanmıştır. AUC hesabında test süreleri olarak 10, 20, 30 ve 40. dakikalar sonundaki inhibisyon değerleri kullanılmıştır. Standart olarak Troloks antioksidantından faydalanılmıştır. Bu yöntemle antioksidant kapasite tayininin ilkesi AAPH azo-bileşiğinin parçalanması sonucu indüklenmiş olan oksidasyonun floresin üzerine olan olumsuz etkisini örneğin antioksidant kapasitesine bağlı olarak engellemesi ve süreçte açığa çıkan floresan ışıkta meydana gelen değişimin izlenmesine dayanmaktadır. Floresan ışıkta meydana gelen azalma örneğin antioksidant aktivitesi ile ters orantılı olup 485 nm'deki uyarımda ve 520 nm'deki ışımada belirlenmektedir.

(Not: gallik asit-kateşin karışımı içeren filmlerde ORAC'ın belirlenmesi için dengeye ulaşıldığı zaman örnek alınarak direk olarak ölçüm yapılmıştır).

### **3.2.7.3. Filmlerin bağlı antioksidant kapasitesinin belirlenmesi (TEAC yöntemi).**

Filmlerin matrislerine bağlanan fenolik maddelerden kaynaklanan bağlı antioksidant kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla geçiş deneyinde dengeye ulaşmış yani serbest fenolik maddesini büyük oranda salmış filmler kullanılmıştır. Ancak, yine de filmler deneylerde kullanılmadan önce yüzeylerinde bulunması muhtemel çözüdür fenolik madde kalıntılarının uzaklaştırılması için iki kez daha suyla yıkanmıştır. Bu amaçla filmler 50 mL deiyonize su içerisine atılmış ve 80 rpm 'de çalışan bir çalkalayıcı içerisinde 30 dakika kadar yıkanmıştır. Ardından aynı yıkama işlemi temiz su kullanılarak bir kez daha tekrarlanmış ve filmler 2 x 2 cm boyutunda parçalara ayrılarak 50 mL ABTS serbest radikali içeren 30 °C'deki çözelti içerisine atılmıştır. Bağlı antioksidant kapasite, filmlerin 15 dakika içerisinde inhibe ettiği ABTS serbest radikali düzeyinin 734 nm 'de ölçümü ve  $\text{cm}^2$  başına troloks eşdeğeri olarak ifade edilmesiyle belirlenmiştir.

### **3.2.8. Seçilmiş Filmlerin Gıdalarda Denenmesi**

#### **3.2.8.1. Liozüm ve fenolik maddeler içeren zein ve zein temelli filmlerin taze kaşarda *Listeria monocytogenes*'e etkisi**

##### **3.2.8.1.1. *Listeria monocytogenes* kültürünün hazırlanması**

Deneylerde kullanılacak *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) kültürünün hazırlanması amacıyla donmuş halde -80 °C'de muhafaza edilen kültürden 4 defa 10 µl'lik halka öze ile alınarak %0.6 maya ekstraktı içeren 20 ml triptik soy broth (TSBYE) içerisine aktarılmış ve sıvı besiyeri 37 °C'de 21 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra kültürden 0.2 ml alınarak %0.6 maya ekstraktı içeren 20 ml TSBYE içerisine 2. kez alınarak 37 °C'de 21 saat inkübe edilmiştir. Deneylerde kullanılmadan önce daha önceden hazırlanmış olan Macfarland kurvesi yardımıyla bakteri sayısı 10<sup>8</sup> CFU/ml'ye ayarlanmıştır. Kültür deneylerde kullanılırken tamponlanmış peptonlu suyla 1 desimal daha seyreltilmiş ve son konsantrasyonu 10<sup>7</sup> CFU/ml'ya getirildikten hemen sonra kullanılmıştır.

##### **3.2.8.1.2. Peynirlerin inokülasyonu ve aktif paketlenmesi**

Deneylerde piyasadan temin edilen Pınar Süt firmasına ait paketlenmiş taze kaşar peyniri kullanılmıştır. Peynir paketi aseptik koşullarda açılmış ve denemelerde kullanılmak üzere özel çelik telli giyotin tipi bir peynir dilimleyicisiyle dilim ağırlığı ortalama 25 gr olacak şekilde 4 x 8.3 cm boyutunda 0.65-70 cm kalınlığında dilimlenmiştir. Peynir dilimleri daha sonra bir mikrobiyolojik güvenlik kabini içerisine yerleştirilmiş ve üst yüzeylerine 0.125 ml *L. monocytogenes* kültürü ilave edilerek steril bir cam çubukla yayılmıştır. Peynirler yüzeylerindeki kültürün kurumaması için 15 dakika kabin içerisinde bekletilmiş ve ardından diğer yüzleri çevrilerek 0.125 ml kültür bu yüzlerine de ilave edilerek yayılmış ve benzer şekilde kurumaması için bekletilmiştir. Daha sonra inoküle edilmiş olan örnekler tesadüfi olarak 6 farklı gruba ayrılmış ve bunlardan 1 grup hiç film uygulanmadan kontrol olarak ayrılmıştır. Geriye kalan 5 farklı gruba yenilebilir film uygulanmıştır. Çalışma 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Uygulama için peynirlerin her iki yüzeyine üretilmiş olan 5 farklı filmden kesilen iki adet 4.25 x 8.5 cm boyutunda film yerleştirilmiştir. Gıda uygulamasında kullanılmış olan kontrol ve 6 farklı zein filmin bileşimi aşağıda verilmiştir.

- (1) Kontrol (zein film içermeyen kaplanmamış örnek)
- (2) 0.7 mg/cm<sup>2</sup> liozüm içeren zein filmle kaplanmış örnek
- (3) 6 mg/cm<sup>2</sup> kateşin + 0.7 mg/cm<sup>2</sup> liozüm içeren zein filmle kaplanmış örnek

- (4) Zein'in % 5'i kadar karnauba mumu + zein'in % 5'i kadar lesitin + 6 mg/cm<sup>2</sup> kateşin + 0.7 mg/cm<sup>2</sup> lizozim içeren zein-karnauba mumu kompozit filmle kaplanmış örnek
- (5) 3 mg/cm<sup>2</sup> kateşin + 3 mg/cm<sup>2</sup> gallik asit + 0.7 mg/cm<sup>2</sup> lizozim içeren zein filmle kaplanmış örnek
- (6) Zein'in % 5'i kadar karnauba mumu + zein'in % 5'i kadar lesitin + 3 mg/cm<sup>2</sup> kateşin + 3 mg/cm<sup>2</sup> gallik asit içeren zein-karnauba mumu kompozit filmle kaplanmış örnek

Her iki yüzeylerine de film kaplandıktan sonra peynir parçaları ilk önce filmlerin ürünle sıkı şekilde temasının sağlanması amacıyla streç naylon filmle, ardından ise alüminyum folyo ile sarılarak paketlenmiş ve mikrobiyolojik olarak analiz edilene kadar +4 °C'de depolanmışlardır.

### **3.2.8.1.3. Mikrobiyolojik analizler**

Depolanan ürünlerdeki *Listeria monocytogenes* sayısının belirlenmesi amacıyla 25 g ürün steril "stomacher" poşetleri içerisine yerleştirilmiş ve 225 mL % 0.1'lik steril peptonlu su ile birlikte "stomacher" parçalayıcı (BagMixer® 400, Interscience, France) ile 180 saniye parçalanmıştır. Her depolama süresi sonunda her gruptan 2 örnek bu yolla parçalanarak hazırlanmıştır. Örnekler uygun şekilde seyreltikten sonra her bir dilüsyondan 2 x 0.1 mL alınarak yayma yöntemiyle iki paralel olarak "specific supplement" (Merck, Darmstadt, Germany) içeren "Oxford Listeria Selective Agar" (Merck, Darmstadt, Germany) besiyerine ekim yapılmış ve 37 °C'de 48 saat sonra agarlarda oluşan holografik siyah koloniler sayılmıştır. Sonuçlar ortalamalar alındıktan sonra log CFU g<sup>-1</sup> olarak verilmiştir (n=2).

### **3.2.8.2. Lizozim ve fenolik maddeler içeren zein ve zein temelli filmlerin taze kaşarda oksidatif değişimlere etkisi**

Geliştirilmiş olan filmlerin aktif ambalajlama uygulanmış peynirlerdeki oksidatif değişimlere olan etkisinin belirlenmesi amacıyla bölüm 3.2.8.1'de verilmiş paketlenme uygulaması baştan itibaren bir kez daha tekrarlanmıştır. Bu uygulamadan farklı olarak örnekler dilim ağırlığı ortalama 10 gr olacak şekilde 4 x 4 cm boyutunda dilimlenmiş ve *L. monocytogenes* kültürü inokule edilmeden paketlenme yapılmıştır. Ancak, örneklerde bu kez mikrobiyolojik analizler değil oksidasyon durumunu görüntülemek amacıyla TBA tayini yapılmıştır. Örneklerin TBA değerini belirlemek için BEKHIT ve ark. (2003) tarafından önerilen, üründe yağ oksidasyonu sonucu oluşan malonaldehitin spektrofotometrik olarak belirlenmesi esasına dayanan yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde 10 g peynir örneği 50 ml



%0.38 TBA and %15 TCA (trikloroasetik asit) içeren 0.25 N HCL (hidroklorik asit) çözeltisiyle blenderda (Waring Blender) homojenize edilmiştir. Daha sonra her bir homojenizattan 3 x 5 ml örnek alınarak kapaklı cam tüplere aktarılmıştır. Tüpler 95 °C'deki su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir. Sıcak su banyosundan alınarak soğutulan örnekler 4500 x g de 25 dakika santrifüj edilmiş ve spektrofotometrede (Shimadzu, Model 2450, Japan) 532 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Ölçülen absorbans değerleri standart eğriden hesaplanan katsayı ile çarpılarak kg örnek başına mg malonaldehit miktarı yani TBA değeri hesaplanmıştır (n=2).

### **3.2.8.3. Lisozim ve fenolik maddeler içeren zein ve zein temelli filmlerin dana burgerde Escherichia coli O157:H7'ye karşı kullanılması**

#### **3.2.8.3.1. Escherichia coli O157:H7 kültürünün hazırlanması**

Deneylerde kullanılacak Escherichia coli O157:H7 (ATCC 700728) kültürünün hazırlanması amacıyla donmuş halde -80 °C'de muhafaza edilen kültürden 4 defa 10 µl'lik halka öze ile alınarak %0.6 maya ekstraktı içeren 20 ml triptik soy broth (TSBYE) içerisine aktarılmış ve besiyeri 37 °C' de 19 saat inkübe edilmiştir. Konsantrasyonu deneylerde kullanılmadan önce daha önceden hazırlanmış olan Macfarland kurvesi yardımıyla 10<sup>8</sup> CFU/ml'ye ayarlanmıştır. Kültür deneylerde kullanılırken tamponlanmış peptonlu suyla 3 desimal daha seyreltilmiş ve son konsantrasyonu 10<sup>5</sup> CFU/ml'ya getirildikten hemen sonra kullanılmıştır.

#### **3.2.8.3.2. Burgerlerin inokülasyonu ve aktif paketlenmesi**

Deneylerde Pınar Et (İzmir) firmasından temin edilmiş özel üretim antimikrobiyel içermeyen burgerler kullanılmıştır. Burgerler aseptik koşullarda steril edilmiş bıçak yardımıyla 4 x 4 cm boyutunda ortalama ağırlığı 10 gram gelecek şekilde kesilmiştir. Burger parçaları daha sonra bir mikrobiyolojik güvenlik kabini içerisine yerleştirilmiş ve üst yüzeylerine 0.075 ml E. coli O157:H7 kültürü ilave edilerek steril üçgen çubukla yayılmıştır. Örnekler yüzeylerindeki kültürün kuruması için 15 dakika kabin içerisinde bekletilmiş ve ardından diğer yüzleri çevrilerek 0.075 ml kültür bu yüzlerine de ilave edilerek yayılmış ve benzer şekilde kuruması için bekletilmiştir. Daha sonra inoküle edilmiş olan örnekler tesadüfi olarak 6 farklı gruba ayrılmış ve bunlardan 1 grup hiç film uygulanmadan kontrol olarak ayrılmıştır. Geriye kalan 5 farklı gruba yenilebilir film uygulanmıştır. Çalışma 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Uygulama için burgerlerin her iki yüzeyine üretilmiş olan 5 farklı filmden

kesilen iki adet 4.25 x 4.25 cm boyutunda film yerleştirilmiştir. Gıda uygulamasında kullanılmış olan kontrol ve 5 farklı zein filmin bileşimi aşağıda verilmiştir.

- (1) Kontrol (zein film içermeyen kaplanmamış örnek)
- (2) Zein filmle kaplanmış örnek
- (3) 0.7 mg/cm<sup>2</sup> lizozim içeren zein filmle kaplanmış örnek
- (4) 6 mg/cm<sup>2</sup> kateşin + 0.7 mg/cm<sup>2</sup> lizozim içeren zein filmle kaplanmış örnek
- (5) Zein'in % 5'i kadar karnauba mumu + zein'in % 5'i kadar lesitin + 6 mg/cm<sup>2</sup> kateşin + 0.7 mg/cm<sup>2</sup> lizozim içeren zein-karnauba mumu kompozit filmle kaplanmış örnek
- (6) Zein'in % 10'ı kadar oleik asit + zein'in % 10'i kadar lesitin + 6 mg/cm<sup>2</sup> kateşin + 0.7 mg/cm<sup>2</sup> lizozim içeren zein-oleik asit karışım filmle kaplanmış örnek

Her iki yüzeylerine de film kaplandıktan sonra burger parçaları ilk önce filmlerin ürünle sıkı şekilde temasının sağlanması amacıyla streç naylon filmle, ardından ise alüminyum folyoyla sarılarak paketlenmiş ve mikrobiyolojik olarak analiz edilene kadar +4 °C'de depolanmışlardır.

### **3.2.8.3.3. Mikrobiyolojik analizler**

Depolanan ürünlerdeki *Escherichia coli* O157:H7 sayısının belirlenmesi amacıyla 10 gr ürün steril "stomacher" poşetleri içerisine yerleştirilmiş ve 90 ml %0.1'lik steril peptonlu su ile birlikte "stomacher" parçalayıcı (BagMixer® 400, Interscience, France) ile 60 saniye parçalanmıştır. Her depolama süresi sonunda her gruptan 2 örnek bu yolla parçalanarak hazırlanmıştır. Örnekler uygun şekilde seyreltikten sonra her bir dilüsyondan 2 x 0.1 ml alınarak yayma yöntemiyle iki paralel olarak "specific supplement" (Merck, Darmstad, Germany) içeren "Sorbitol-MacConkey agar" (Merck, Darmstad, Germany) besiyerine ekim yapılmış ve 37 °C'de 24/48 saat sonra agarlarda oluşan renksiz koloniler sayılmıştır. Sonuçlar ortalamalar alındıktan sonra log CFU g<sup>-1</sup> olarak verilmiştir (n=2).

### **3.2.9. Filmlerin kalınlığının ve kesit görüntülerinin belirlenmesi**

Geliştirilen filmlerin kesit yüzeyleri sıvı azot ile kırma işleminin ardından İYTE-MAM'da bulunan elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmiştir (Philips XL 30S FEG, FEI Company, Eindhoven, Netherlands). Elde edilen görüntülerden; SEM için geliştirilen bir bilgisayar programı (Scandium software- Olympus Soft Imaging Solutions) kullanılarak filmlerin kalınlıkları ölçülmüştür.

### **3.2.10. Filmlerin Mekanik Özelliklerinin Belirlenmesi**

Geliştirilen filmlerin mekanik özellikleri TA-XT2 (Stable Microsystems, UK) tekstür ölçüm cihazı kullanılarak hesaplanmıştır. Bu amaçla ASTM D 882-02 standardına göre hazırlanan örnekler genişliği 5 mm uzunluğu 80 mm olacak şekilde şeritler halinde kesilmiştir. Test parametreleri; gerilme hızı için 50 mm / dak, film kavrama mesafesi için 50 mm olarak belirlenip (elastikiyeti fazla olan örneklerde kopma olmadığında kavrama mesafesi 30 mm'ye düşürülmüştür), her film örneği için en az 7 film şeridi test edilmiş ve ölçümlerin ortalamaları alınmıştır. Elde edilen ölçümlerden filmlerin gerilme gücü (tensile strength), yüzde uzama (elongation), ve elastik modülüs (Young's modulus) özellikleri belirlenmiştir.

### **3.2.11. Filmlerin FTIR Spektroskopisiyle İncelenmesi**

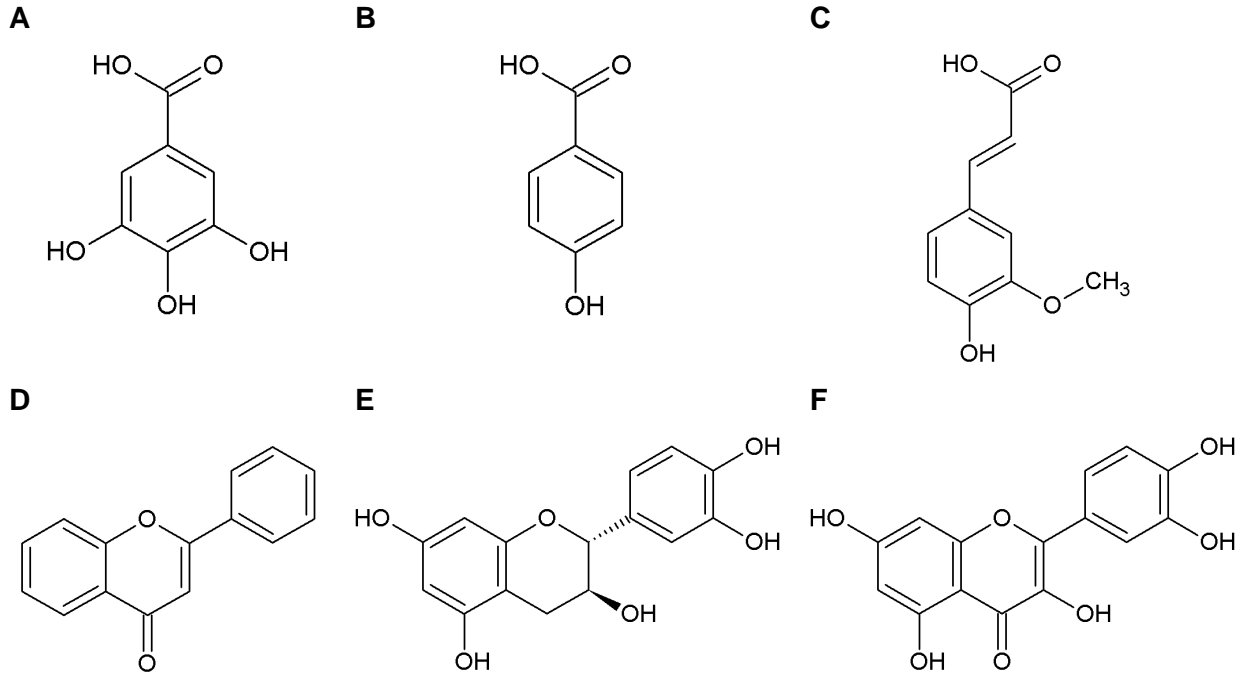
Geliştirilen filmler yapı içindeki olası hidrojen bağı oluşumunu belirlemek amacıyla DTGS detektörlü bir FTIR spektrofotometresi ile incelenmiştir (Spectrum 100 Instrument, Perkin-Elmer Inc., Wellesley, MA). Filmler ATR (attenuated total reflectance) örnekleme aksesuarı (ZnSe kristal plaka) kullanılarak, 4000 ile 600  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyları arasında analiz edilmiştir. Her spektrum, 4  $\text{cm}^{-1}$  çözünürlükte 32 taramanın ortalaması alınarak oluşturulmuş ve her film örneği için 9 farklı tarama yapılarak bu taramaların ortalaması kullanılmıştır.

## 4.BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. FENOLİK MADDELERİN KONTROLLU SALIMI İÇİN KOMPOZİT VE KARIŞIM YENİLEBİLİR ZEİN FİMLER GELİŞTİRİLMESİ

#### 4.1.1. Zein filmler içerisine ilave edilebilecek uygun fenolik maddelerin belirlenmesi

Çalışmanın ilk aşamasında zein filmlere hangi fenolik bileşiklerin katılabileceğinin belirlenmesi amacıyla farklı fenolik asitler (gallik, p-hidroksi benzoik ve ferulik asit) ve flavonitler (kateşin, flavon ve kuversetin) denenmiştir. Şekil 4.1.'de seçilmiş fenolik bileşiklerin kimyasal formülleri görülmektedir. Zein filmlere hangi fenolik bileşiklerin ilave edileceği bu bileşiklerin zein filmlerin mekaniki özellikleri, morfolojisi ve ıslatıldıkları zaman yapısal bütünlüğü üzerindeki etkileri dikkate alınarak belirlenmiştir. Bu ön çalışmadan sonra ise seçilmiş fenolik bileşikler zein ve zein bazlı kompozit ve karışım filmlere ilave edilerek filmlerin salım profilleri ve antimikrobiyel etkileri incelenmiştir.



Şekil 4. 1. Çalışmada kullanılmış olan farklı fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları (A: Gallik asit; p-hidroksibenzoik asit; C: ferulik asit; D: flavon; E: kateşin; C: Kuversetin)

#### 4.1.1.1. Farklı fenolik maddelerin zein filmlerin mekanik özellikleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi

Çalışmada ilk olarak gerçekleştirilmiş olan ön denemelerde antimikrobiyel aktivite ve film yapma özellikleri açısından en uygun konsantrasyonlardan birisi olabileceği belirlenmiş olan 3 mg/cm<sup>2</sup> düzeyinde fenolik madde içeren zein filmler üretilmiştir. Elde edilmiş olan sonuçlar kateşin, gallik asit, p-hidroksi benzoik asit ve ferulik asitin zein filmlerin fleksibilitesini artırdığını ve geleneksel kırılma sorununun çözerek uzama değerlerinde %100'ün üzerinde bir artış sağladığını göstermiştir (Tablo 4.1). Zein filmlerin ambalajlamada kullanılmasındaki en büyük dezavantaj fleksibil olmamaları ve kırılma güçleridir. Dolayısıyla zein filmlerin fenolik maddelerce plastikleşmesi oldukça önemli bir bulgudur. Ancak, filmler ıslatıldıkları zaman ferulik asit ve p-hidroksibenzoik asit içeren filmlerin hızla su alarak şiştiği ve yapısal bütünlüklerini kaybederek adeta dağıldıkları gözlemlenmiştir. Buna karşın kateşin ve gallik asit içeren filmlerde bu durum görülmemiş bu filmler ıslatıldığı zaman bile yapı bütünlüğünü oldukça iyi bir şekilde muhafaza etmişlerdir. Ferulik asit ve p-hidroksibenzoik asit içeren filmlerde ıslatılınca görülen yapısal bütünlük sorunlarının bu fenolik maddelerin H bağı yaparak film yapısını güçlendirecek az sayıda hidroksil veya karboksil grubu içermesi, buna karşın kateşin ve gallik asit'in zeinle yoğun H bağı oluşturarak daha sağlam ancak esnek bir ağyapı oluşturabilecek çok sayıda hidroksil grubu içermesiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Diğer yandan uzamanın arttığı filmlerde beklendiği gibi gerilme gücü ve elastik modulus değerleri de kayda değer şekilde düşmektedir. Filmler içerisine flavon ve kuversetin fenolik maddelerinin ilavesi ise bu fenolik maddelerin kuruyan filmler içerisinde çözünmez hale geçmesi ve gözle rahatça görülen boyutta agregatlar oluşturması nedeniyle başarılı olamamıştır. Flavon ve kuversetin içeren filmlerin, mekanik özellikleri kontrol filmlere en yakın olan filmler olması da bu fenolik maddelerin çözünürlük sorunu nedeniyle filmle yeterince etkileşime giremediğini göstermektedir. Elde edilen bu ön verilere göre zein filmlere ilave edilebilecek en uygun fenolik maddelerin kateşin ve gallik asit olduğu belirlenmiştir.

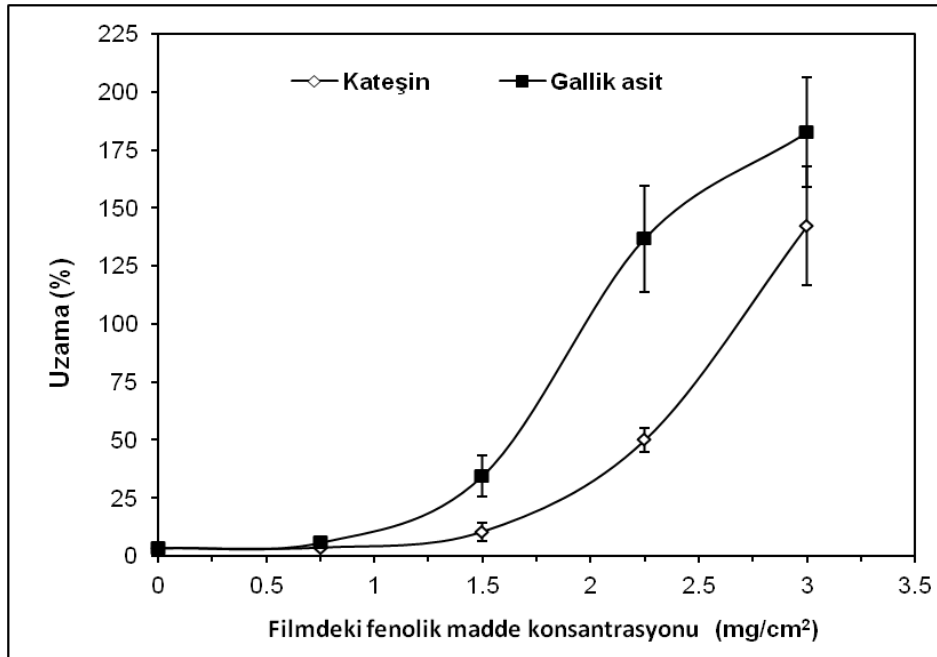
Şekil 4.2 ve 4.3'de farklı miktarlarda kateşin ve gallik asit'in zein filmlerin mekanik özellikleri üzerindeki etkileri görülmektedir. Buna göre gerek kateşin gerek gallik asit'in konsantrasyonu artırıldıkça filmlerin uzama değeri artmakta ve filmler daha fleksibil hale gelmektedir. Sağlanan uzama değerlerinin konsantrasyonla ilişkisi düşünüldüğü zaman gallik asit'in kateşin'e göre zein filmler için daha iyi bir plastikleştirici olduğu anlaşılmaktadır. Esnek hale gelmiş gallik asit içeren bir filmin görüntüsü Şekil 4.4'de verilmiştir. Ancak, özellikle yüksek kateşin ve gallik asit konsantrasyonlarında filmlerin gerilme gücü ve elastik modulus değerlerinin kayda değer şekilde düştüğü görülmektedir. Bu durum filmlerin kaplama şeklinde uygulanmasında büyük bir sorun yaratmazken kendi kendine duran (free standing film veya

self-standing film) film üretimi açısından sorun teşkil edebilmektedir.

Tablo 4. 1. Farklı fenolik maddeler içeren zein filmlerin mekaniki özellikleri (tüm filmler 3 mg/cm<sup>2</sup> fenolik madde içermektedirler)

Fenolik maddeler	Gerilme gücü (MPa)	Uzama (%)	Elastik modulus (MPa)	Film kalınlığı (µm)
Kontrol	10.2 ±0.83a <sup>a</sup>	3.34 ±0.66c	528 ±39a	132 ±2.0
Kateşin	1.16 ±0.16d	142 ±25.52b	45 ±14d	132 ±3.5
Gallik asit	0.48 ±0.12e	182 ±23.61a	12 ±4e	117 ±0.8
p-Hidroksi benzoik asit	0.45 ±0.02e	188 ±25.10a	12 ±1e	120.1 ±0.7
Ferulik asit	0.70 ±0.05e	135 ±50.21ab	24 ±3de	124 ±0.5
Flavon	6.70 ±0.31b	2.2 ±0.26c	398 ±15c	143 ±1.4
Kuversetin	5.28 ±0.29c	1.23 ±0.18c	474 ±15b	126 ±3.5

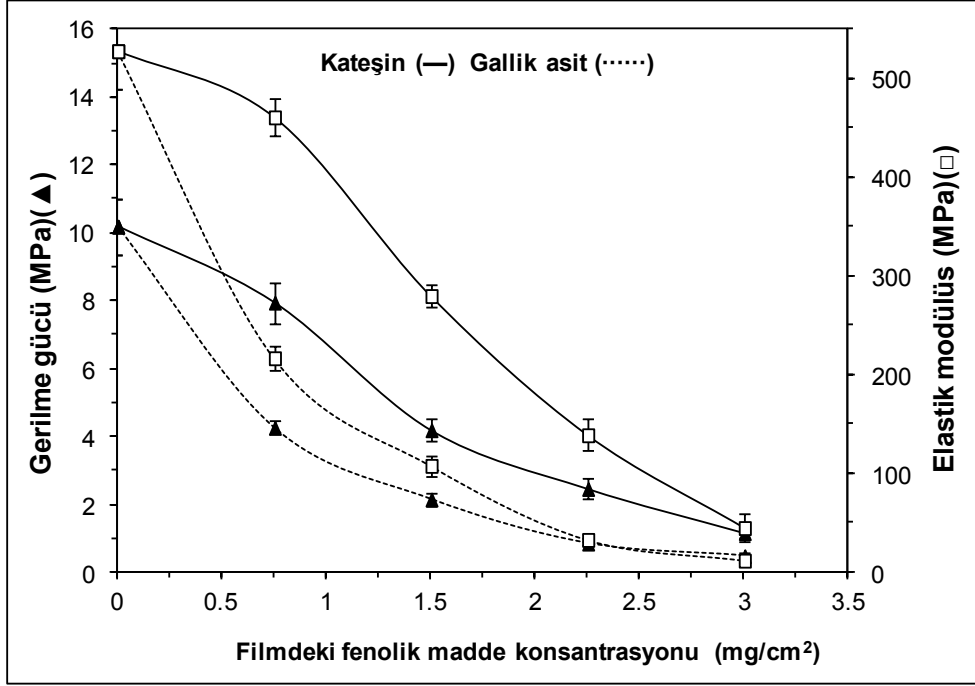
<sup>a</sup>kolonlardaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir (P<0.05).



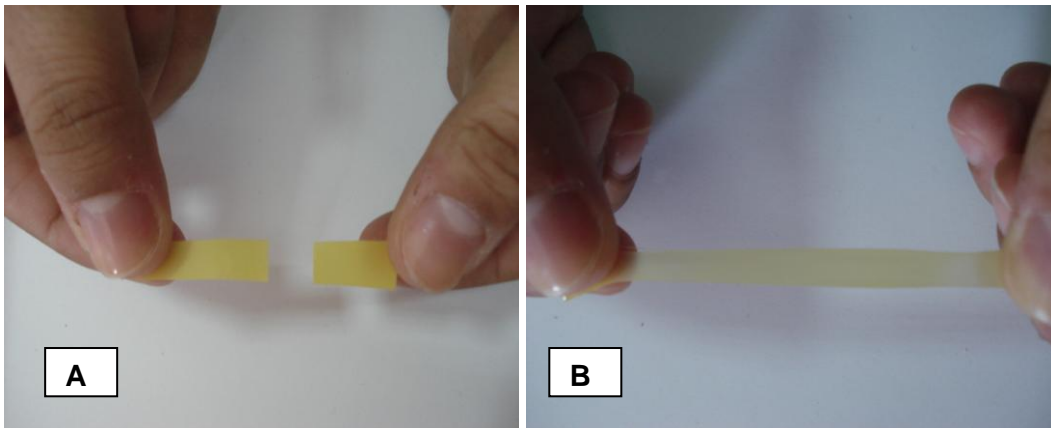
Şekil 4. 2. Kateşin ve gallik asitin zein filmlerin uzama değerleri üzerindeki etkisi

Literatür dikkatli bir şekilde incelendiği zaman fenolik bileşiklerin yenilebilir filmlerin mekaniki özellikleri üzerinde farklı etkilere neden olabildiği görülmektedir. Örneğin OU ve ark. (2005) soya proteininden elde edilmiş olan filmlere ferulik asit ilave edilince bu filmlerin uzama

değerlerinde sınırlı bir artış gözlemlemişlerdir. Buna karşın aynı yazarlar soya proteini filmlerinin gerilme değerinin kayda değer şekilde arttığını bildirmektedirler. KU ve ark. (2008) agar bazlı filmlere kateşin ilavesinin bu filmlerde plastikleştirici bir etkisini gözlemleyememişlerdir. Ancak, bu çalışmalarda kullanılan filmlerin aşırı hidrofilik yapıda



Şekil 4. 3. Kateşin ve gallik asitin zein filmlerin gerilme değeri ve elastik modülüs değeri üzerindeki etkisi



Şekil 4. 4. Fenolik madde içermeyen kontrol zein filmin iki ucundan çekilerek gerdirildiği zaman esneklik göstermeden camsı bir şekilde kopması; (B) 3.0 mg/cm<sup>2</sup> gallik asit içeren aynı uzunluktaki zein filmin iki ucundan çekilerek gerdirildiği zaman %100'e yakın oranda esneyerek kopmadan uzaması

olması hidrofobik yapıdaki zeinle kıyaslanmalarını mümkün kılmamaktadır. Fenolik bileşiklerin zein filmleri neden plastikleştirilmiş olduğunun anlaşılabilmesi için zeinin yapısının çok daha iyi bilinmesi gerekmektedir. GUO ve ark. (2005) zeinin karakteristik film yapısını ileri görüntüleme teknikleriyle ayrıntılı şekilde araştırmış ve bu filmlerin asimetrik çubuklar şeklindeki zein moleküllerinin yan yana dizilerek simit halkası şeklinde kümelenmesi ve çok sayıda halkanın da yan yana gelerek adeta süzgeç görünümünde bir yapı oluşturmasıyla meydana geldiğini belirlemişlerdir. Zein moleküllerini birarada tutan güç hidrofobik etkileşimler olup filmlerin klasik kırılma ve elastikiyet sorunları da bundan kaynaklanmaktadır (GUO ve ark., 2005).

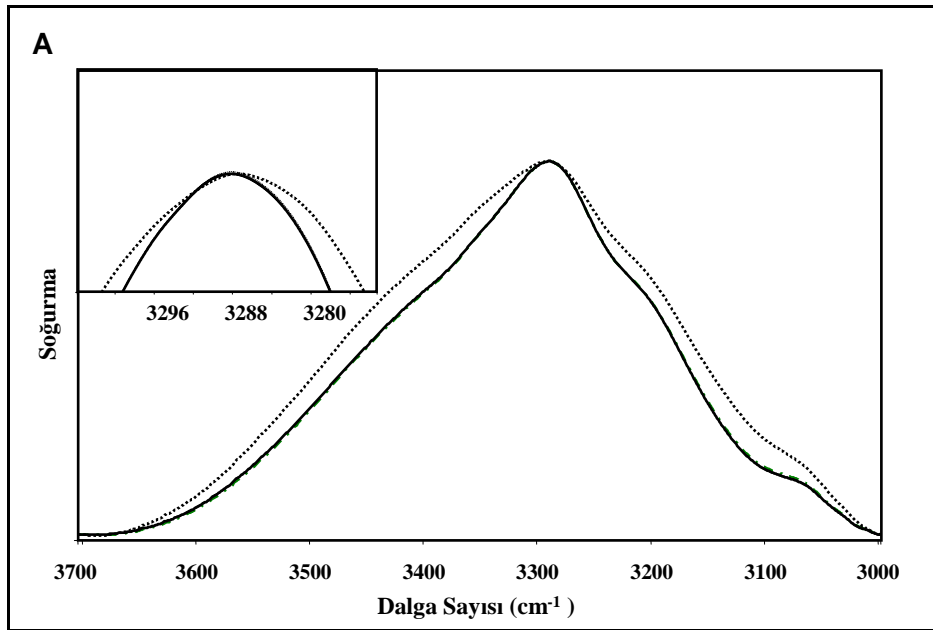
Mevcut bilgiler ışığında zein filmlerin elastikiyetinin artmasındaki en büyük nedenlerden birisinin yapılarına amfifilik yapıdaki fenolik bileşiklerin girmesi ve filmlerin hidrofobikliğinin bir miktar azalması olduğu düşünülmektedir. Bunun yanında zeinde bulunan bir miktar iyonik grubun da fenolik bileşiklerle hidrojen bağı yaparak zayıf ancak esnek bir ağyapı meydana getirdiği ve bu esnek ağyapının filmlere elastikiyet kazandırdığı da akla gelmektedir. Literatürde de belirtildiği üzere fenolik hidroksil gruplarının, proteinlerin peptid guruplarındaki karbonilleriyle veya karboksil gurupları ile H bağı oluşturması mümkündür (DAMODARAN, 1996). Diğer yandan plastikleştirici ajanların sağladıkları bu etkiyi çoğu zaman polimerlerle hidrojen bağı yapmaları ve onlara bağlanarak film matrisindeki serbest hacmi (free volume) artırmalarıyla ilgili olduğu bilinmektedir (SOTHORNVIT ve ark., 2010). Tüm bu veriler ve değerlendirmeler kateşin ve gallik asit gibi fenolik maddelerin zein filmlerin elastikiyetini artırma etkisinin yukarıda belirtilen hidrofobikliği azaltma, zein moleküllerine bağlanarak film matrisinin serbest hacmini artırma ve zayıf ancak elastik bir ağyapı oluşturma gibi etkenlerden kaynaklanmış olabileceğini göstermektedir.

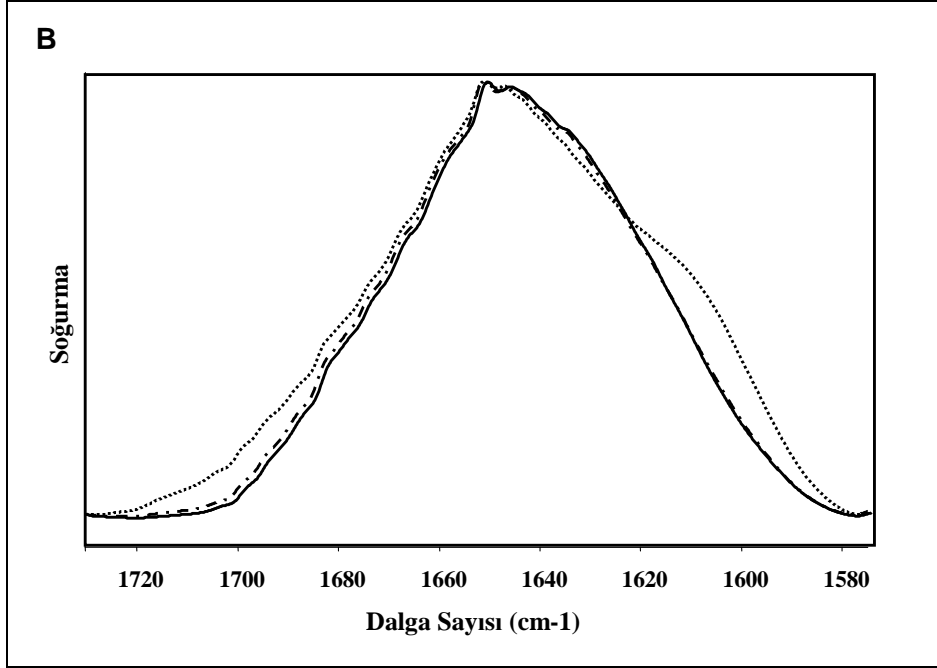
Bir film içerisine ilave edilen ajanın hidrojen bağı gibi esnek ve zayıf bağlar dışında kovalent bağlar oluşturması durumunda genellikle filmlerin gerilme gücü (tensile strength) artmakta ve filmlerde elastikiyet yönünden bir gelişme sağlanmamaktadır. Zein filmlerde de çapraz bağlayıcı ajanlarca kovalent bağlar oluşturulduğu zaman bu açıklamalara uygun sonuçlar görülmektedir. Nitekin, KIM ve ark. (2004) zein filmlerin kırılma gücünü azaltmak amacıyla 1-[3-dimethylaminopropyl]-3-ethyl-carbodiimide hydrochloride (EDC) gibi zein molekülleri arasında kovalent bağ oluşturan bir çapraz bağlayıcı kullanmışlardır. Bu ajan zein filmlerin gerilme (tensile) gücünü artırmış ve bu şekilde daha zor kırılmalarını sağlamıştır. Ancak, EDC kovalent bağlar oluşturduğundan filmlerin yapısını güçlendirerek sağlamlığını artırıp, kırılmalarını güçleştirirse de filmlerin elastikiyetlerinde kayda değer herhangi bir değişime neden olmamaktadır. Bu veriler zein filmlerin elastikiyet artışının esnek ve zayıf hidrojen bağlarından kaynaklandığı düşüncesini desteklemektedir.

Zein ve fenolik bileşikler arasında hidrojen bağı oluşup oluşmadığının daha iyi



anlaşılabilmesi amacıyla farklı miktarlarda gallik asit içeren filmlerin FTIR spektroskopisi de incelenmiştir. Bu amaçla bir adet control film ve iki adet gallik asit içeren filmin FTIR spektrumları elde edilmiştir. Gallik asit içeren filmlerden birisine herhangi bir mekaniki özelliği değiştirmeden 0.25 mg/cm<sup>2</sup> gallik asit, diğerine ise uzamayı ve elastikiyeti %100'ün üzerinde artırdığından 2.5 mg/cm<sup>2</sup> gallik asit ilave edilmiştir. Gallik asit'in verdiği pikler tüm spektra üzerinde girişime neden olduğundan 2.5 mg/cm<sup>2</sup> üzerinde gallik asit içeren filmler incelenememiştir. FTIR spektroskopisinde bir proteindeki N-H guruplarından kaynaklanan amid A spektral bölgesi ve C=O guruplarından kaynaklanan amid I spectral bölgesinde oluşan piklerin genişliğinin artması ve A bandındaki pik değerlerinin düşük değerlere kayması hidrojen bağı oluşumunun işaretleri olarak kabul edilmektedir (CAKMAK ve ark., 2006; MOHAMMED-ZIEGLER ve BILLES, 2002; HE ve ark., 2011; MARECHAL ve CHANZY, 2000). Şekil 4.5A ve 4.5B incelenecek olursa elastikiyeti artmış olan 2.5 mg/cm<sup>2</sup> gallik asit içeren filmlerde belirtilen bölgelerde bant genişlemesi olduğu, buna karşın 0.25 mg/cm<sup>2</sup> gallik asit içeren filmlerde ölçülen bant genişliğinde bir değişim meydana gelmediği görülmektedir. Elde edilen bu veri elastikiyeti artmış olan filmlerde hidrojen bağı oluşumunun rolü olduğunu desteklemektedir. Diğer yandan amid A band değerinin kontrol film için 3288.14 ±0.12 cm<sup>-1</sup> olan değerinin, 0.25 mg/cm<sup>2</sup> gallik asit içeren film için 3287.98 ±0.10 'a (P= 0.0078) ve 2.5 mg/cm<sup>2</sup> gallik asit içeren film içinse 3287.51 ±0.30'a (P<0.001) düşmesi de gallik asit ilavesiyle filmler içerisinde hidrojen bağı oluşumu meydana geldiğini güçlendiren bulgulardır.



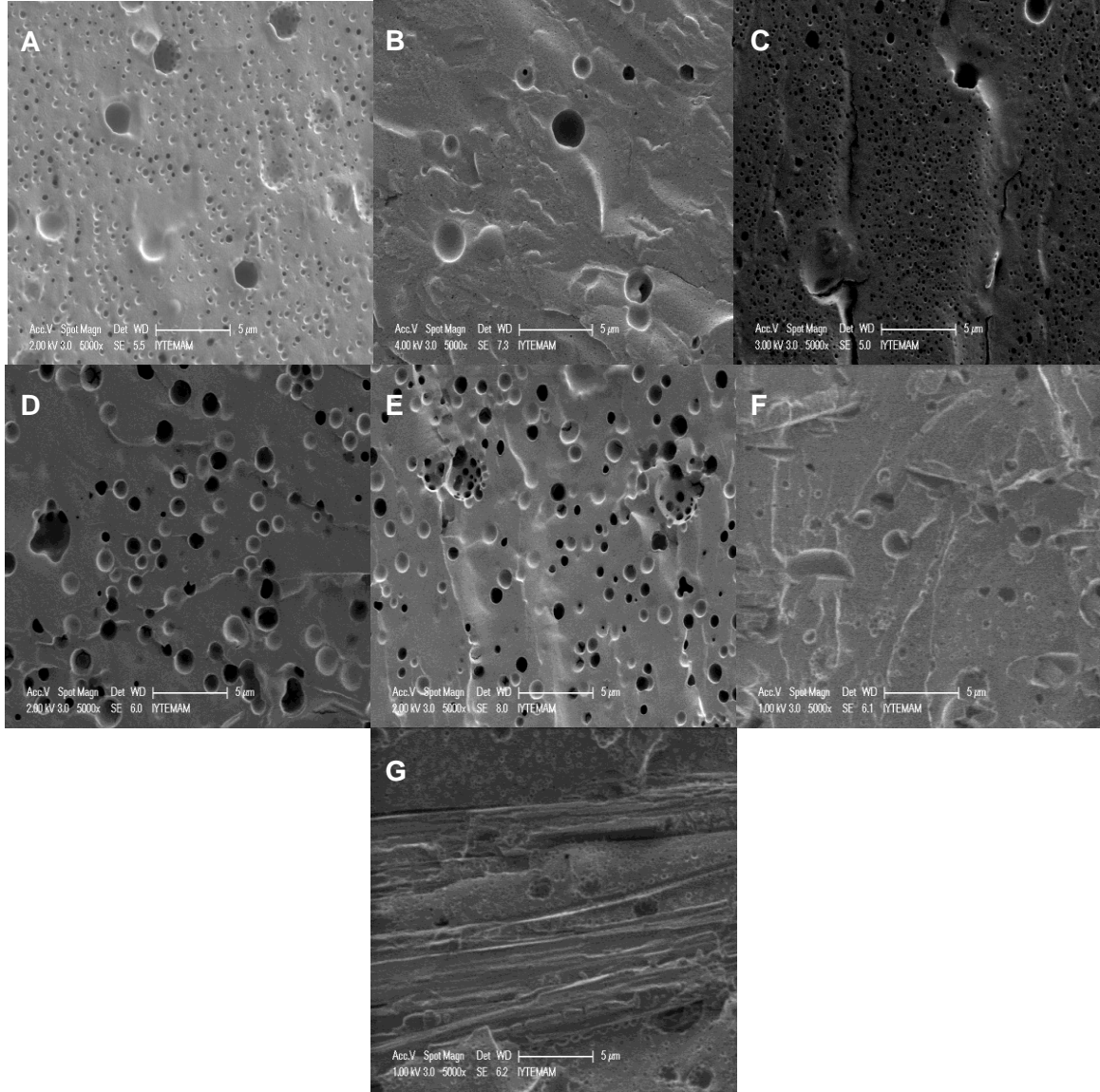


Şekil 4. 5. Zein filmlere gallik asit ilavesinin neden olduğu hidrojen bağı oluşumunun FTIR spektroskopisiyle gösterilmesi (Ortalama spektralar: kontrol zein film (—), 0.25 mg/cm<sup>2</sup> gallik asit içeren zein film (- - -); 2.5 mg/cm<sup>2</sup> gallik asit içeren zein film (.....) (A) Amid A spektral bölgesi (spektra 3287 cm<sup>-1</sup> bandına göre “baseline” çizgisine getirilmiş ve normalize edilmiştir), (B) Amid I spektral bölgesi (spektra 1651 cm<sup>-1</sup> bandına göre “baseline” çizgisine getirilmiş ve normalize edilmiştir).

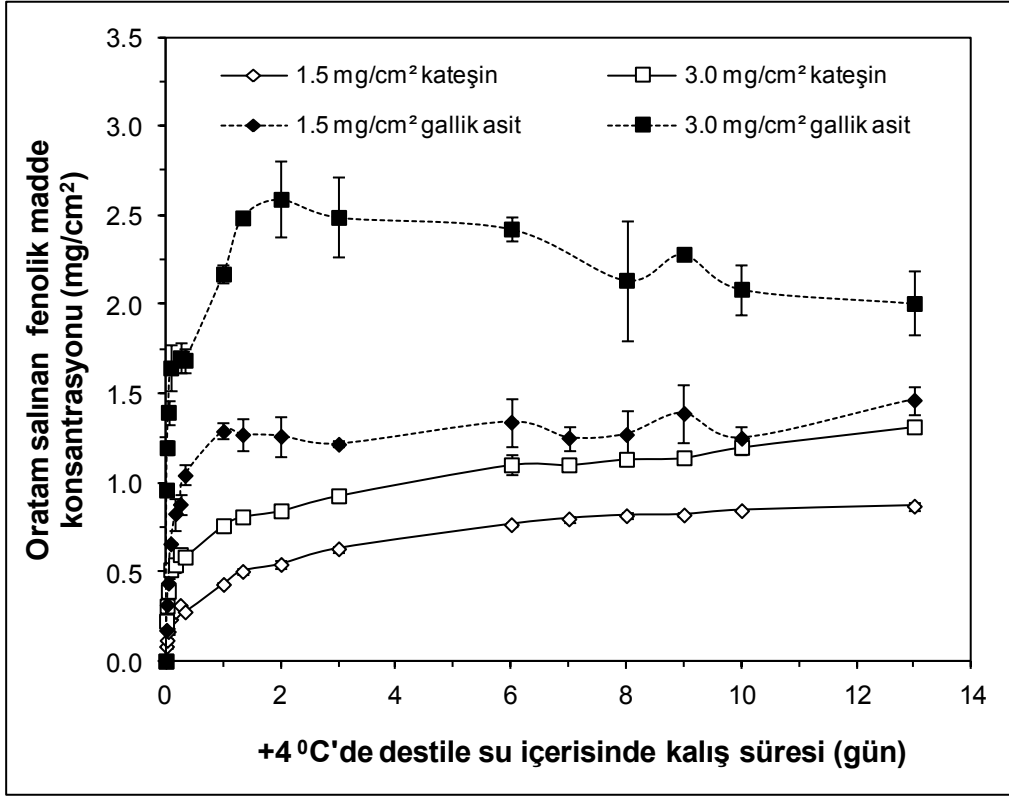
#### 4.1.1.2. Farklı fenolik maddelerin zein filmlerin morfolojisi ve salım hızı üzerindeki etkilerinin belirlenmesi

Bu amaçla sıvı azotla dondurulduktan sonra kırılan filmlerin yan kesit görüntüleri incelenmiştir. Buna göre kateşin ilavesi zein filmlerin porozitesini azaltırken, gallik asit ilavesinin filmlerin porozitesini artırdığı anlaşılmaktadır. Bu değişimler hiç kuşkusuz sözkonusu fenolik bileşiklerin filmlerden ortama geçiş hızlarını etkileyecek önemli değişimlerdir. Nitekim, Şekil 4.7’de verilmiş olan salım kurveleri incelendiği zaman aynı miktarda gallik asit ve kateşin içeren filmlerde gallik asit geçişinin kateşin geçişine göre çok daha hızlı olduğu açıkça görülmektedir. Diğer yandan p-hidroksibenzoik asit ve ferulik asit içeren filmlerin fotoğrafları incelendiği zaman bu filmlerde çok sayıda iri porlar bulunduğu görülmektedir (Şekil 4.6D ve 4.6E). Bu görüntüler p-hidroksibenzoik asit ve ferulik asit içeren filmlerin ıslatıldıkları zaman neden hızla su alıp şiştiğini ve yapısal bütünlüğünü kaybettiğini açıklar niteliktedir. Diğer yandan flavon ve kuversetin içeren filmlerde bu maddelerin filmler içerisinde çözünmemesiyle ilgili olduğu düşünülen birtakım şekilsiz agregatlar, uzun çubuksu

yapılar gözlemlenmiştir. Bu filmlerin de kateşin içeren filmlere benzer şekilde az gözenekli olduğu dikkati çekmektedir.



Şekil 4. 6. Farklı fenolik maddeler içeren zein filmlerin SEM yan kesit görüntüleri (Filmlerin fenolik madde konsantrasyonları: 3.0 mg/cm<sup>2</sup>; Büyütme x 5000; A: Kontrol; B: Kateşin; C: Gallik asit; D: p-Hidroksi benzoik asit; E: Ferulik asit; F: Kuversetin; G: Flavon)



Şekil 4. 7. Kateşin ve gallik asit içeren filmlerin +4 °C'deki destile su içerisindeki fenolik madde salım profilleri (filmler destile su içerisinde serbest halde çalkalanmaktadır)

#### 4.1.2. Kateşinin kontrolü salımı için zein-karnauba mumu kompozit filmler geliştirilmesi

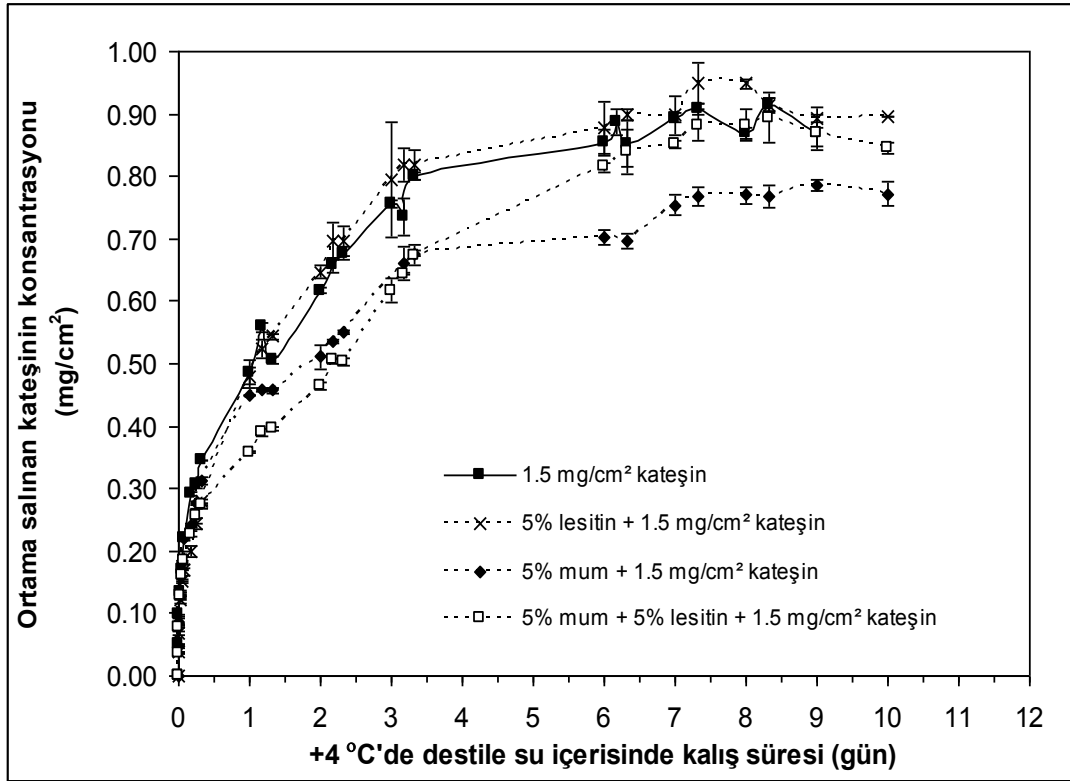
Kontrollü salım çalışmalarına zein filmlere ilave edilmesi uygun bulunan kateşin farklı hızlarda salabilecek filmler geliştirilmesi ile başlanmıştır. Güçlü antioksidant etkisiyle (YILMAZ, 2006) bilinen ancak *Listeria monocytogenes* gibi gıdalarda önemli risk oluşturan bakteriler (VAQUERO ve ark., 2007) üzerinde antimikrobiyel etkisi olduğu da belirlenmiş olan kateşin bu amaçla zein ve karnauba mumu temel alınarak geliştirilen kompozit filmlere ilave edilmiştir. Kontrollü salım stratejisi olarak (1) lesitin gibi yüzey aktif bir madde kullanarak zein filmler içerisinde mümkün olduğunca küçük karnauba mum globülleri oluşturma ve (2) kullanılacak fenolik bileşiğin zeini ve kullanılan yüzey aktif maddenin uygun gruplarını çapraz bağlayarak ağyapı oluşturma stratejilerinin birarada uygulanması planlanmıştır. Bu stratejilerden filmler içerisinde çok sayıda lipit globülleri oluşturma bilindiği üzere bir yandan filmlerin hidrofobikliğini artırarak su alıp şişmelerini geciktirmekte, diğer yandan da filmler içerisinde difüzyonu yavaşlatıcı engelleri (tortuosity) artırmaktadır. Bu strateji daha önce OZDEMİR ve FLOROS (2003) tarafından peyniraltı suyu proteinlerinden üretilmiş olan

filmlerden potasyum sorbatın difüzyonunu azaltmak amacıyla başarıyla kullanılmıştır. Ancak, bu çalışmada ilave olarak filmler içerisine GRAS statüsünde doğal bir yüzey aktif madde olan soya lesitini de katılmıştır. Bunun amacı belirtildiği gibi oldukça etkili bir yüzey aktif madde olan lesitin yardımıyla filmler içerisinde homojenizasyonla dağıtılacak olan karnauba mumu'na ait globüllerinin mümkün olduğunca küçük zerrecikler halinde dağılmasını sağlamaktır. Bilindiği üzere mumlar homojenizasyon durumunda polar bir çözügen içerisinde küçük globüller halinde dağılmakta, ancak bir süre sonra birleşerek daha iri zerrecikler teşkil etme eğilimine girmektedirler. İşte lesitin gibi yüzey aktif maddeler hidrofobik zincirleriyle oluşturulan mum globüllerine tutunmakta ve yüzeylerinde karboksil gurupları yardımıyla negatif yüklü bir film teşkil etmektedirler. Bu durum farklı globüllerin elektrostatik olarak birbirini itmesini sağlamakta ve birleşmelerini önlemektedir. Filmler içerisine ilave edilen lesitinin mum globülleri dışında mumdaki daha az hidrofobik olan zein globülleriyle de etkileşmesi ve onların yüzeyindeki hidrojen bağı yapabilecek iyonik gurupları artırması da beklenen bir durumdur. Bu çalışmada kullanılmış olan çapraz bağlama stratejisi ise filmler içerisine ilave edilmiş olan kateşin moleküllerinin bir kısmının fenolik hidroksil guruplarının, zein proteininin peptit guruplarındaki karbonilleriyle veya karboksil guruplarıyla H bağı oluşturmasına dayanmaktadır. Gallik asit'in zeinle hidrojen bağı oluşturduğu FTIR spektroskopisiyle gösterildiğinden kateşin'in de benzer bağları oluşturduğu kabul edilmiştir. Ayrıca, lesitince mum ve zein globülleri yüzeylerinde oluşturulan karboksil guruplarının da kateşinle H bağı oluşturması ve ağyapıya ciddi bir katkı sağladığı düşünülmektedir. Fenolik hidroksil guruplarıyla belirtilen guruplar arasında kolaylıkla H bağı oluşabileceği literatürde de belirtilmektedir (DAMODARAN, 1996).

#### **4.1.2.1. Kateşin içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin salım deneyleri**

Filmler içerisine karnauba mumu ve lesitinin ayrı ayrı ve birarada ilave edilmesinin filmlerden kateşin geçiş hızına etkisi Şekil 4.8'de görülmektedir. Anlaşılacağı üzere kontrol zein filmlerden ve yalnızca lesitin içeren zein filmlerden kateşin geçişi diğer filmlere göre daha hızlı olmaktadır. Filmler içerisine zein-mum kompozit yapı oluşturmak amacıyla yalnızca karnauba mumu ilave edilmesi ise beklendiği gibi kateşinin suya geçiş hızını belli oranda azaltmaktadır. Karnauba mumunun lesitinle birarada kullanılması ise özellikle başlangıç aşamasında tek başına mum içeren filmlere göre geçiş hızında düşüşe neden olmuştur. Ancak, karnauba mumunun tek başına ilave edilmesine göre mum ve lesitini birarada içeren kompozit filmlerde ortama geçen toplam kateşin miktarı daha yüksektir. Nitekim, mum ve lesitini birarada içeren kompozit filmlerde 4. günden sonra da geçişin devam ettiği, yalnızca mum içeren kompozit filmlerde ise 4. günden sonra geçişin oldukça

yavaşladığı görülmektedir. Bu durumun tek başına mum içeren kompozit filmlerde kateşin'in lesitin içeren kompozit filmlere göre daha iri olan mum zerrecikleri arasında veya içerisinde oluşan hidrofobik ceplerde hapsolmesiyle meydana geldiği düşünülmektedir. Geçiş hızının çok hızlı olması istenmediği gibi, gereğinden yavaş olması da istenilmeyen bir durumdur. Özellikle ambalajlanmış gıdanın depolanmasının son evrelerinde aktif madde geçişinin devam etmesi, sağlanan faydanın devam etmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Gerçekleştirilmiş olan bu denemeler sonucunda 9 günlük salım testi boyunca depolamanın ileri safhalarında da kateşin geçişi sağlayan tek film lesitin içeren zein-mum kompozit filmler olmuştur. Bu istenilen etkinin mum partiküllerinin lesitin varlığında daha küçük zerrecikler halinde dağılması ve hidrofobik agregatlar ve cepler oluşturarak kateşinin filmler içerisinde hapsolmesini engellemesinden kaynaklandığı sanılmaktadır.



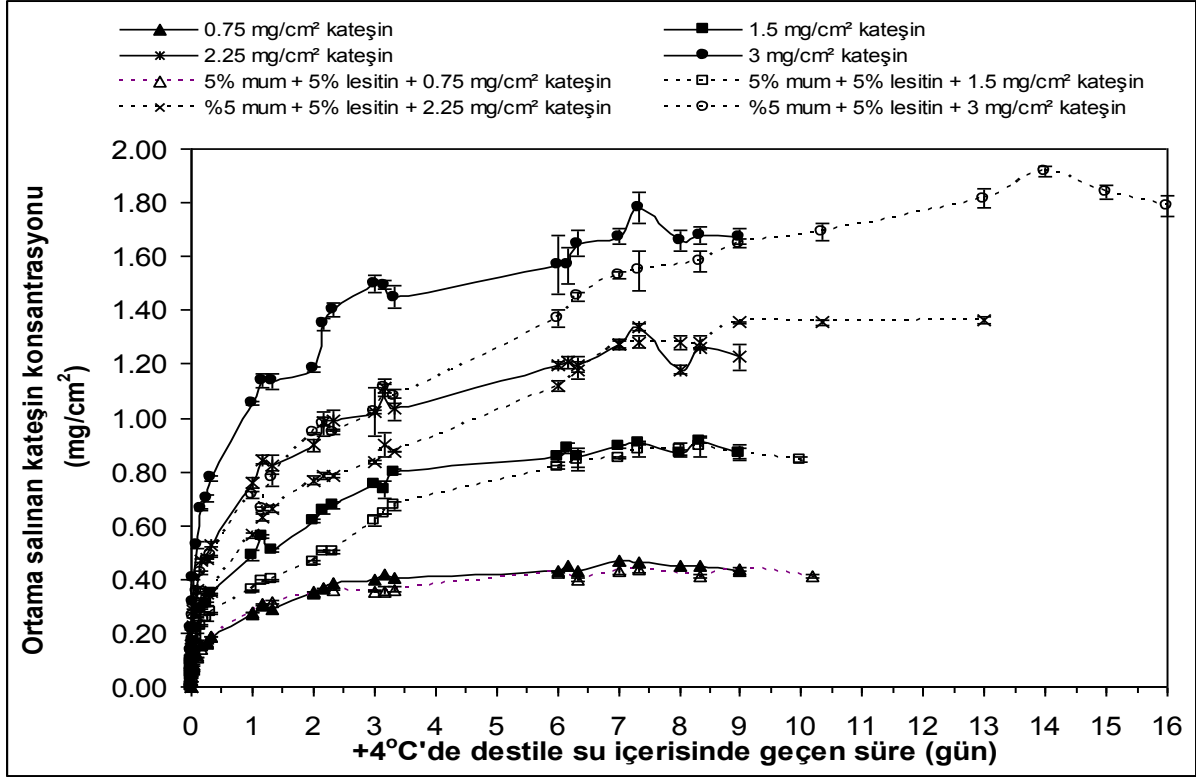
Şekil 4. 8. Zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerden kateşinin salım profilleri (filmler destile su içerisinde serbest halde çalkalanmaktadır)

Çalışmanın ikinci aşamasında zein-mum kompozit filmler içerisindeki kateşin konsantrasyonunun geçiş hızına ne şekilde etki ettiği incelenmiştir. Şekil 4.9'da farklı miktarlarda kateşin içeren lesitin kullanılarak üretilmiş zein-karnauba mumu kompozit filmler ve yalnızca farklı miktarlarda kateşin içeren kontrol filmlerde kateşin geçiş profilleri görülmektedir. Şekilden de anlaşılacağı üzere en düşük kateşin konsantrasyonunda zein-

mum kompozit filmlerle kontrol zein filmlerin geçiş hızları arasında herhangi bir farklılık bulunmamaktadır. Buna karşın kateşin konsantrasyonu arttıkça mum ve lesitin içeren kompozit filmlerde geçiş hızı giderek kontrol filmlere göre daha yavaş şekilde meydana gelmektedir. Nitekim, örneğin en yüksek kateşin konsantrasyonu olan 3 mg/cm<sup>2</sup> kateşin içeren filmlerde 3 günün sonunda zein-karnauba mumu kompozit filmlerden suya geçen kateşin miktarı aynı konsantrasyonda kateşin içeren standart zein filmlere göre yaklaşık % 47 daha azken, 1.5 veya 2.25 mg/cm<sup>2</sup> kateşin içeren kompozit zein filmlerde aynı süre sonunda suya geçen kateşin düzeyi standart zein filmlere göre yaklaşık %22 kadar daha düşüktür. Literatürde de belirtildiği üzere fenolik hidroksil gruplarının, proteinlerin peptit gruplarındaki karbonilleriyle veya karboksil grupları ile H bağı oluşturması mümkündür (DAMODARAN, 1996). Dolayısıyla kontrollü salım etkisinin mum ve lesitin içeren filmlerde kateşin konsantrasyonunun belirli bir eşik değerini aşmasıyla filmler içerisinde bu fenolik maddenin oluşturduğu H bağlarının daha yoğun bir ağyapı (network) oluşturması ve daha çok engelle karşılaştıran kateşinin film içerisindeki difüzyon hızının giderek yavaşlamasından kaynaklanması mümkündür. Ancak, mum ve lesitin içermeyen filmlerde bu mekanizmanın tek başına etkin bir kontrollü geçiş mekanizması sağlayamadığı da açıktır. Dolayısıyla H-bağlarının oluşturduğu ağ yapısının işlevliliğinin kompozit film içerisinde dağılmış çok sayıda mum globüllerinin sağladığı hidrofobisite artışı ve engelleme etkisiyle güçlendiği ve kendini gösterdiği düşünülmektedir. Bir başka ifadeyle bir miktar kateşinin kompozit filmlere bağlanarak oluşturduğu ağ yapısının filmdeki serbest kateşin moleküllerinin ortama kontrollü geçişinin sağlanmasında temel bir etken olduğu, ancak bu niteliğinin mum zerreciklerinin oluşturduğu hidrofobisite ve difüzyon engelleri artışı etkisiyle hissedilir hale geldiği sanılmaktadır. Bu durumda bir miktar kateşinin film matrisi içerisinde bağlanarak onun bir parçası olarak yapısal görev yaptığı, geriye kalan kateşinin ise çözünür halde kalarak ortama geçtiği açıktır.

Hatırlanacağı üzere yakın bir geçmişte yürütülen çalışmalarla zein filmlerin nanoyapısının ayrıntılı olarak açığa kavuşturulduğu daha önce belirtilmişti (GUO ve ark., 2005). Bir kez daha vurgulamak gerekirse zein proteinleri agrege olarak hafif şişkin asimetric çubuk şeklinde zerrecikler oluşturmakta ve uçuca dizilerek zincirler oluşturmaktadır. Bu zincirler yer yer düzensizce kıvrılıp bükülmekte, yer yer ise simit şeklinde halkasal yapılar oluşturarak bir film matrisi oluşturmaktadırlar. Tahminimizce filmlerde kateşince oluşturulan H-bağları ağırlıklı olarak uçuca dizilen asimetric zein çubuklarından oluşan zincirlerin kendi içerisinde veya arasında oluşmaktadır. Filmler içerisine mum ilave edilmesiyle büyük ihtimalle matriks içerisinde yüzeyi lesitinle kaplı mum zerrecikleri oluşmaktadır. Lesitinin teorik olarak mum zerreciklerinin yüzeyine hidrofobik kuyruk kısımlarıyla bağlanması ve çok sayıda lesitin yan yana gelmesiyle mum yüzeyinde en dışta hidrofilik karboksil gruplarının

yer aldığı bir film oluşması beklenmektedir. Ancak, zein-karnauba mumu içeren filmlerde bu yapıların ne düzeyde oluştuğu tam olarak bilinmemektedir.



Şekil 4. 9. Farklı miktarlarda kateşin içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerin kateşinin salım profilleri (filmler destile su içerisinde serbest halde çalkalanmaktadır)

#### 4.1.2.2. Kateşin içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin antioksidant aktivitesi

Üretilmiş olan zein filmlerde kateşin bağlı (hidrojen bağlarıyla veya fiziksel olarak tutuklanma ile) veya serbest formada bulunmaktadır. Dolayısıyla bu çalışmada geçiş deneylerinde suya geçen kateşinin oluşturduğu antioksidant aktivite çözümlü antioksidant aktivite, deneyin ardından film içerisinde kalan bağlı formdaki kateşinden kaynaklanan antioksidant aktivite ise bağlı antioksidant aktivite olarak adlandırılmıştır. Her iki antioksidant aktivitenin ölçüm yöntemi metodlar kısmında verilmiş olup, zein filmlerde çözümlü antioksidant aktivite bağlı olana göre çok daha yüksek bulunmuştur (Tablo 4.2). Bağlı antioksidant aktivitenin filmin antioksidant aktivite ölçümünde kullanılan serbest radikal çözeltisiyle temas ettiği yüzey alanıyla sınırlandırıldığı düşünülürse bunun oldukça beklenen bir sonuç olduğu anlaşılmaktadır. Diğer yandan filmlerdeki kateşin konsantrasyonu arttıkça çözümlü antioksidant aktivitenin benzer oranda arttığı görülmektedir. Bağlı antioksidant aktivite ise



kateşin konsantrasyonunda artış olduğu zaman, kontrol zein filmlerde önce artıp sonra hafif bir azalış göstermekte; mum ve lesitin içeren filmlerde ise önce sabit kalıp, daha sonra kısmi bir artış göstermektedir.

Tablo 4. 2. Zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerin bileşiminin antioksidant potansiyellerine olan etkisi

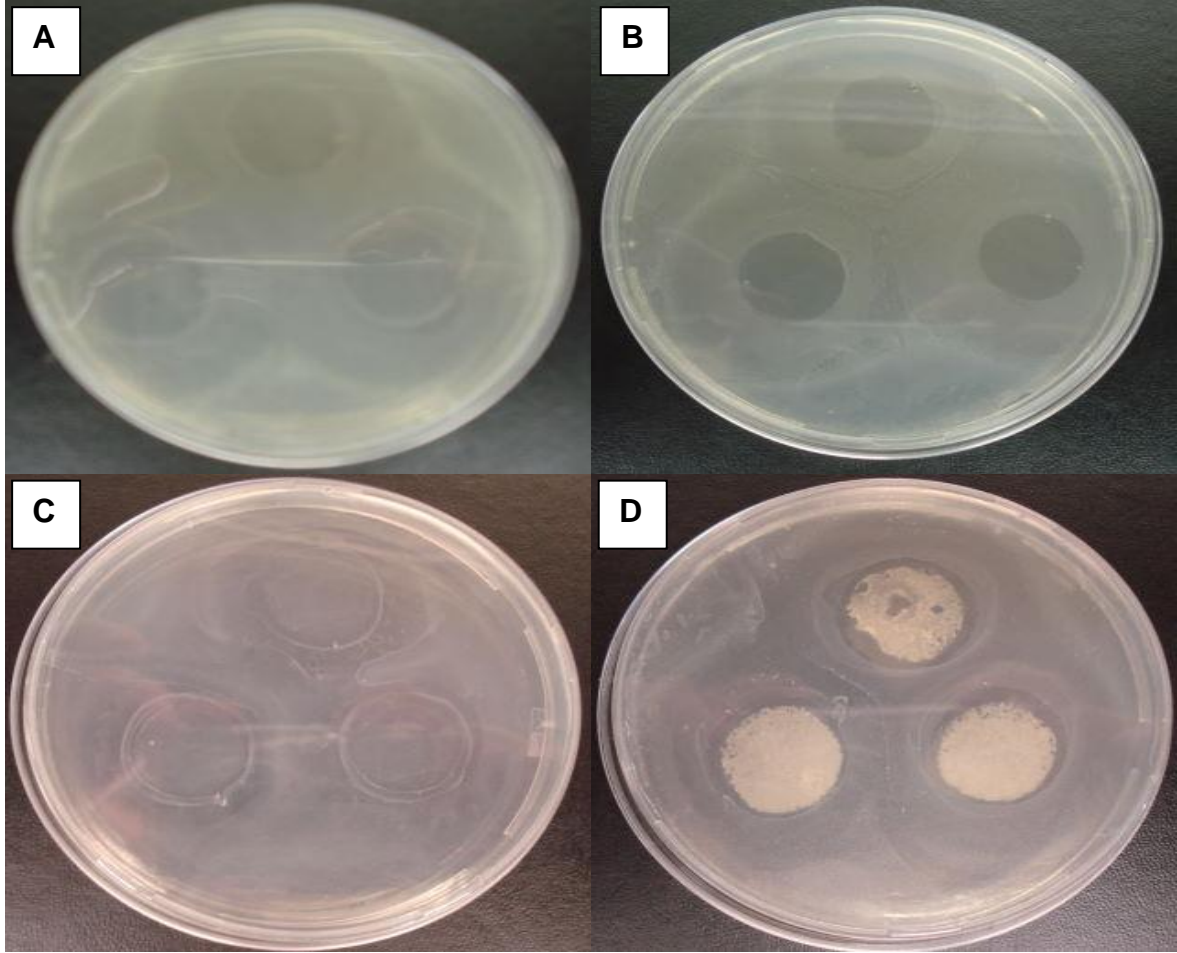
Filmlerin bileşimi <sup>a</sup>			Antioksidant aktivite ( $\mu\text{mol troloks}/\text{cm}^2$ )	
Kateşin ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ )	KAR (%) <sup>a</sup>	Lesitin (%) <sup>a</sup>	TEAC (çözünür)	TEAC (bağlı)
1.5	-	-	12.4	0.27
1.5	5	5	14.1	0.26
2.25	-	-	20.2	0.34
2.25	5	5	21.9	0.26
3.0	-	-	27.4	0.31
3.0	5	5	29.7	0.33

<sup>a</sup>Karnauba mumu (KAR) ve lesitin konsantrasyonu zein'e göre yüzde oran olarak verilmiştir

#### 4.1.2.3. Kateşin içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin *Listeria innocua*'ya karşı antimikrobiyel etkisi

Literatürde (+) kateşin'in patojenik bir bakteri olan *Listeria monocytogenes*'e karşı antimikrobiyel etkisi olduğu belirtildiğinden (VAQUERO ve ark., 2007) antimikrobiyel testler bu bakterinin indikatörü gibi kullanılan ancak patojenik olmayan *Listeria innocua* bakterisi kullanılarak belirlenmiştir. Testler sırasında  $3.0 \text{ mg}/\text{cm}^2$  kateşin içeren kontrol filmler ve aynı miktarda kateşin içeren zein-karnauba mumu kompozit filmler kullanılmıştır. Özellikle mum ve lesitin içermeyen filmlerde herhangi bir zon oluşumu gözlenmemiş olup, bu duruma disklerden hızlı bir kateşin geçişi olması ve çok geniş bir alana yayılan kateşinin etkinliğini yitirmesinin neden olduğu sanılmaktadır. Nitekim, bu durum petrilere neredeyse tüm yüzeye dağılan kateşinin zamanla esmer-koyu turuncu bir renk almasıyla da kendini belli etmektedir. Diğer yandan, diskler agar yüzeylerinden dikkatlice kaldırıldığı zaman kontrol filmlerde diskler altında yoğun bakteriyel üreme olduğu, kateşin içeren zein disklerinde ise disk temas bölgesinde herhangi bir üreme olmadığı gözlemlenmiştir (bak Şekil 4.10A ve 4.10B). Kateşin içeren zein-karnauba mumu kompozit film disklerinde ise küçük de olsa zon oluşmuş, ancak mumun bakteri gelişimi için uygulanan  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ' inkübasyon sıcaklığında erimesi nedeniyle özellikle kateşin içeren kompozit filmler kaldırılarak altlarında üreme olup olmadığı

gözlemlenememiştir (bak Şekil 4.10C ve 4.10D). Bu sonuçlar geliştirilen kateşin içeren filmlerin antioksidant aktivite yanında test edilen bakteriye karşı sınırlı bir antimikrobiyel aktivitesinin de olduğunu ancak zon inhibisyon tekniğiyle bu sınırlı antimikrobiyel etkinin ancak kantitatif olarak gözlenebildiğini göstermektedir.



Şekil 4. 10. Kateşin içeren zein ve zein-karnauba mum kompozit filmlerin *L.innocua* üzerinde oluşturduğu zonlar (Not: A,B ve C'deki şekillerde filmlere ait disklerin agar yüzeyinden uzaklaştırıldıktan sonraki görüntüsü görülmektedir. D şeklinde filmler inkübasyon sırasında erimiş ve yüzeyden uzaklaştırılamamıştır. Ancak burada diskler etrafında küçük de olsa berrak bir zon bölgesi mevcuttur) A: Kontrol film, B: 3 mg/cm<sup>2</sup> kateşin içeren zein film, C: Zein-karnauba mumu kompozit kontrol film, D: 3 mg/cm<sup>2</sup> kateşin içeren zein-karnauba mumu kompozit film.

#### 4.1.2.4. Kateşin içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin mekaniki özellikleri

Zein filmler içeresine kateşin ilave edilmesinin bu filmlerin mekaniki özelliklerinde ciddi gelişmeler sağladığı daha önceki mekaniki testlerle de gösterilmişti (bak Şekil 4.2 ve 4.3). Bu çalışmada kateşin yanında filmlere mum ilavesinin mekaniki özelliklere olan etkisi belirlenmiştir. Tablo 4.3 incelenecek olursa kateşin içeren zein ve zein-mum kompozit filmlerin gerilme gücü ve elastik modulus değerleri arasında istatistiksel açıdan bir fark bulunmamıştır ( $P>0.05$ ). Buna karşın kateşin içeren zein-mum kompozit filmlerin uzama değerinin kateşin içeren zein filme göre önemli ölçüde azaldığı görülmektedir ( $P<0.05$ ). Buna göre  $3 \text{ mg/cm}^2$  kateşin içeren filmlerde zein film matrisi içeresine mum ilave edilmesinin film içeresinde oluşan ağyapıda yer yer esnek olmayan zerrecikler oluşturduğu ve elastik ağyapıyı zedelediği açıktır.

Tablo 4. 3. Kateşin içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin mekaniki özellikleri

Film bileşimi			Gerilme gücü (MPa)	Uzama (%)	Elastik modulus (MPa)	Film kalınlıkları ( $\mu\text{m}$ )
Kateşin ( $\text{mg/cm}^2$ )	Karnauba mumu (%) <sup>a</sup>	Lesitin (%) <sup>a</sup>				
-	-	-	$10.2 \pm 0.8\text{a}^b$	$3.3 \pm 0.6\text{b}$	$528 \pm 39\text{a}$	$131.8 \pm 2.0$
3.0	-	-	$1.8 \pm 0.2\text{b}$	$136.8 \pm 27.4\text{a}$	$86 \pm 14\text{b}$	$123.2 \pm 0.4$
3.0	5	5	$1.5 \pm 0.2\text{b}$	$30.8 \pm 11.7\text{b}$	$84 \pm 20\text{b}$	$140.3 \pm 0.9$

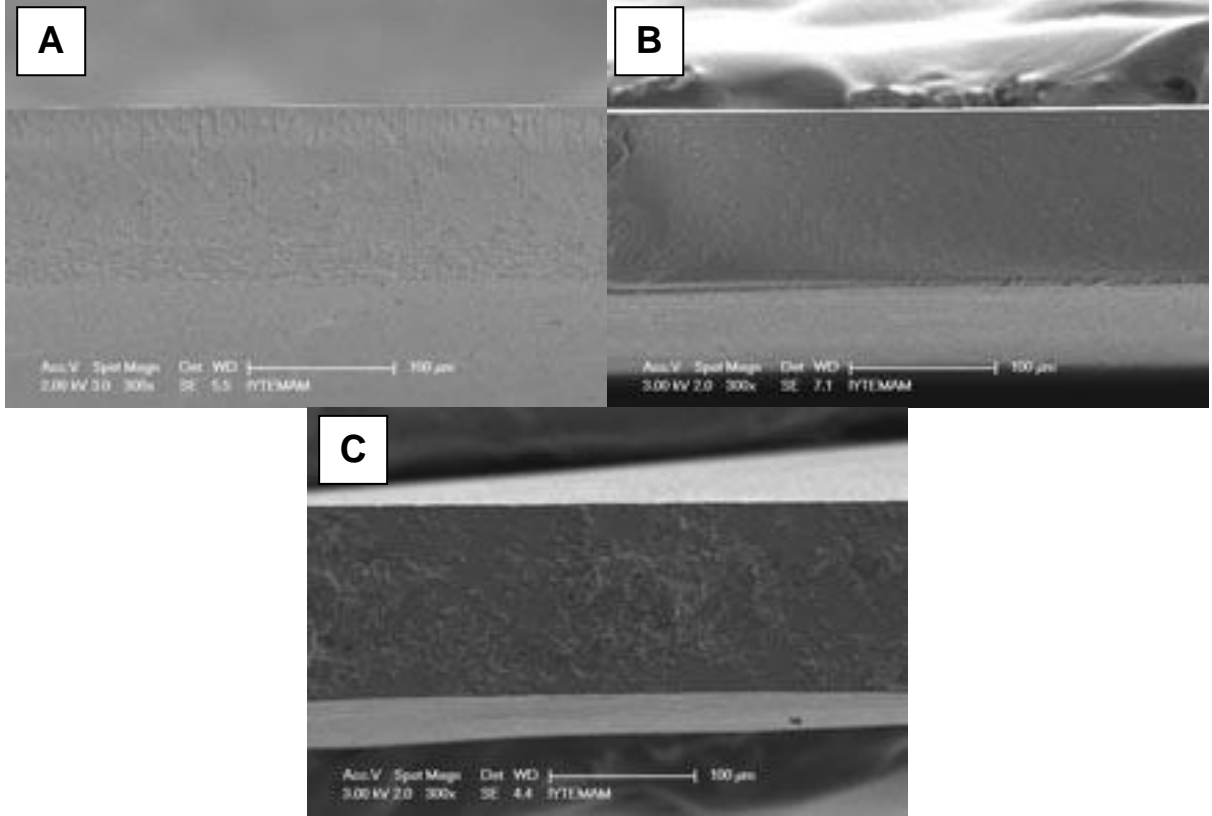
<sup>a</sup> zeinin yüzdesi olarak mum ve lesitin miktarları; <sup>b</sup>Kolonlardaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir ( $P<0.05$ )

#### 4.1.2.5. Kateşin içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin SEM görüntüleri

Kateşin içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerin 300 kez büyütülmüş yan kesitleri Şekil 4.11'de görülmektedir. Bu fotoğraflar kompozit yapıdaki zein-karnauba mumu filmlerin iç yüzeyinin ne denli pütürlü olduğunu açıkça göstermektedir.

Özellikle Şekil 4.12B'de göze çarpan zein agregatlarının da fenolik madde ilavesiyle boyutunun küçüldüğü görülmektedir. Diğer yandan mum ilavesiyle film yapısının radikal bir şekilde değiştiği ve mumun oluşturduğu agregatlar ve şekilsiz ince uzun yapılarla dolu

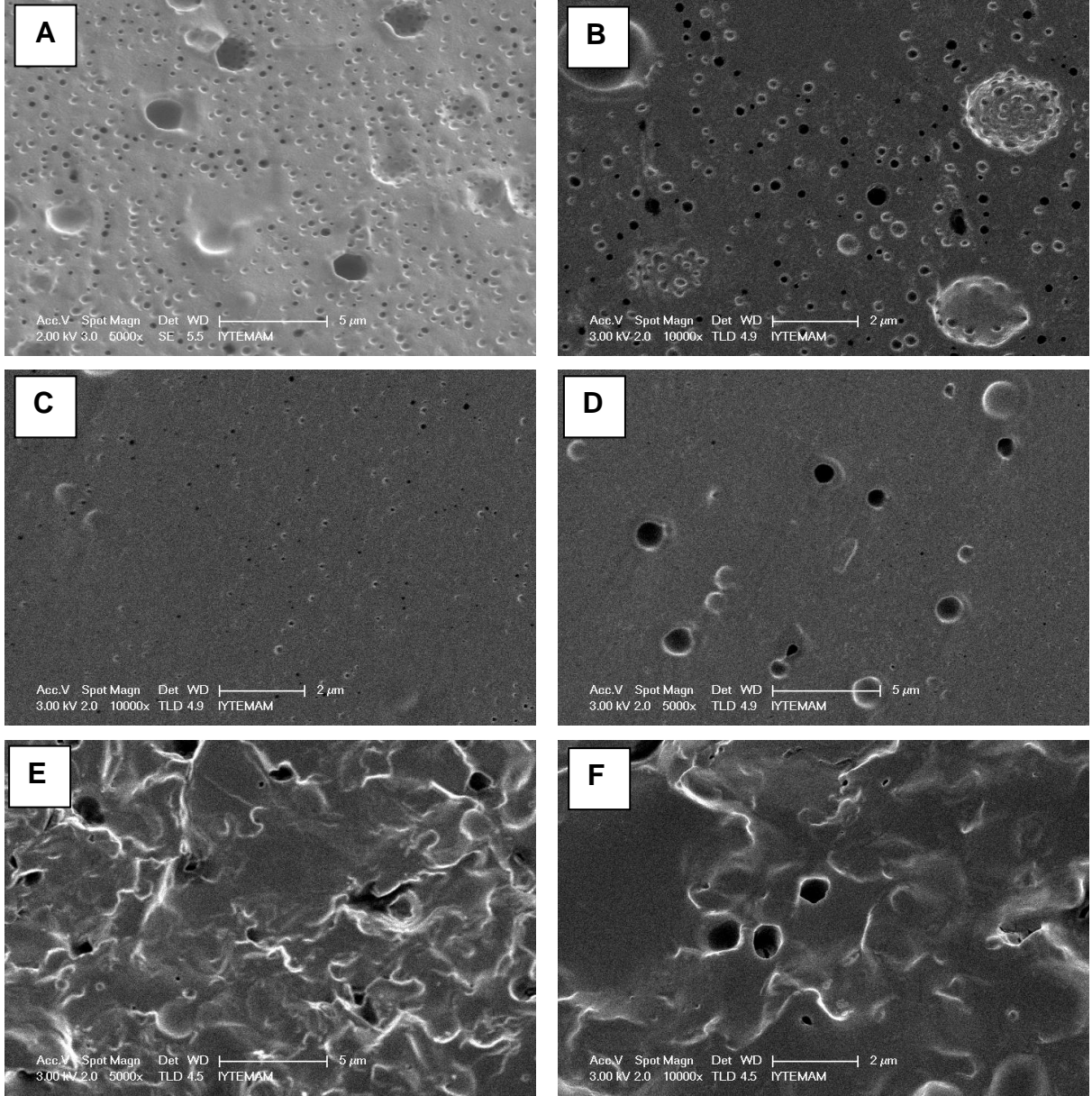
kompozit bir yapının olduğu görülmektedir. Kateşin içeren kompozit filmlerde de gözenekliliğin kontrol filmlere göre daha az olduğu açıkça görülmektedir.



Şekil 4. 11. Kateşin içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerin SEM yan kesit görüntüleri (Filmler sıvı azotla dondurulup kırılmıştır; Büyütme: 300X, A: Kontrol film, B:3.0 mg/cm<sup>2</sup> kateşin içeren film, C: 3.0 mg/cm<sup>2</sup> kateşin içeren kompozit film yapısı oluşmasına neden olduğunu göstermektedir.)

#### 4.1.3. Gallik asitin kontrollü salımı için zein-karnauba mumu kompozit filmler geliştirilmesi

Çalışmanın bu aşamasında zein-karnauba mumu kompozit filmler içerisine kateşin yerine zein filmlerde kullanılabileceği belirlenmiş olan bir diğer fenolik bileşik olan gallik asit ilave edilmiştir. Etkili bir antioksidant ve antimikrobiyal olan gallik asit *Campylobacter jejuni* bakterisi üzerindeki güçlü antimikrobiyel etkisiyle bilinmektedir.



Şekil 4. 12. Kateşin içeren zein ve zein-karnauba mumu filmlerin SEM yan kesit görüntüleri (Filmler sıvı azotla dondurulup kırılmıştır; A,C,E fotoğraflarında büyütme: 5000x; B,D,F fotoğraflarında büyütme: 10000x; A,B: Kontrol film; C,D: 3.0 mg/cm<sup>2</sup> kateşin içeren film; E,F: 3.0 mg/cm<sup>2</sup> kateşin içeren kompozit film)

#### 4.1.3.1. Gallik asit içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin salım deneyleri

+ 4°C'deki destile su içerisinde yürütülmüş olan geçiş deneyleri kateşin içeren filmlerin aksine özellikle 5 ve 10 mg/cm<sup>2</sup> gallik asit bulunan filmlerde mum ilave edilerek filmlerin kompozitleştirilmesinin fenolik madde salım hızını kısmen artırdığını göstermiştir. Her ne kadar 5 mg/cm<sup>2</sup> gallik asit içeren zein-karnauba mumu filmler zein filmlere göre daha ince olsa da, 10 mg/cm<sup>2</sup> gallik asit içeren zein ve zein-karnauba mumu filmlerde film

kalınlıklarının neredeyse aynı olması salım hızı artışının film kalınlığının azalmasının dışında film morfolojisiyle ilgili bir nedeni olabileceğini göstermektedir (Şekil 4.13). Diğer yandan destile suya geçen toplam gallik asit miktarları dikkate alındığı zaman filmlere ilave edilmiş olan gallik asit miktarının yaklaşık % 60-75 kadarının serbest, geri kalanının ise filmler içerisine bağlı veya hapsolmuş halde bulunduğu görülmektedir (Tablo 4.4). Filmler içerisindeki gallik asit konsantrasyonu arttıkça filmlerdeki bağlı fenolik madde miktarının da arttığı göze çarpmaktadır. Bu durum yüksek konsantrasyonda kullanıldığı zaman fenolik maddelerin filmler içerisinde kısmi polimerizasyona neden olduğu izlenimini doğurmaktadır.

Gallik asit içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin destile su içerisinde yürütülen salım deneyi sonuçlarının kateşin içerenlerden farklı olması nedeniyle bu fenolik maddeye ait salım deneyleri bir kez de katı ortamda yürütülmüştür. Ancak, Şekil 4.14'de verilmiş olan sonuçlara göre katı agar içerisinde yürütülen salım deneyinde zein ve zein-karnauba mumu filmlerin salım profilleri arasında belirgin bir farklılık bulunamamıştır. Elde edilmiş olan bu sonuç gallik asit'in agar içerisindeki difüzyon hızının oldukça yavaş olduğunu ve zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerin salım hızı arasındaki farklılıkların bu nedenle belirlenemediğini göstermektedir. Esas olarak bu çalışmada salım deneylerinin suda yürütülmesinin nedeni de su içerisindeki filmlerin salım hızları arasındaki farkların morfolojileri ve su alma hızları (swelling rate) tarafından belirlenmesidir. Agar içerisinde yürütülen deneylerde ise film ve agar arasındaki gallik asit konsantrasyon gradienti bu fenolik maddenin agar içerisindeki difüzyon hızının düşük olması nedeniyle salım hızını etkileyen ilave bir faktör haline gelmekte ve filmlerin salım hızı arasındaki farkları belirlemek güçleşmektedir. Diğer yandan katı ortamda yürütülen salım deneylerinde filmlere ilave edilen gallik asit'in yaklaşık %60-80'inin agara geçtiği belirlenmiştir. Bu durumun gallik asit'in agar maddesi içerisindeki çözünürlüğüyle ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Salım deneylerinin gösterdiği bir diğer sonuç da gallik asit konsantrasyonu arttıkça gallik asit'in filmlerden ortama geçiş hızının daha da artmasıdır. Nitekim  $2.5 \text{ mg/cm}^2$  gallik asit içeren filmlerde 10 günde ulaşılmış olan salım değerine ( $1.8-1.9 \text{ mg/cm}^2$ ),  $5 \text{ mg/cm}^2$  gallik asit içeren filmlerde 1.5-3 gün arasında,  $10 \text{ mg/cm}^2$  gallik asit içeren filmlerde ise yaklaşık 0.5 günde ulaşıldığı görülmektedir. Elde edilen bu veriler filmlere ilave edilecek gallik asit konsantrasyonu belirlenirken gıdanın risk düzeyi yanında raf ömrünün, yani muhtemel depolanma süresinin de dikkate alınması gerektiğini göstermektedir.

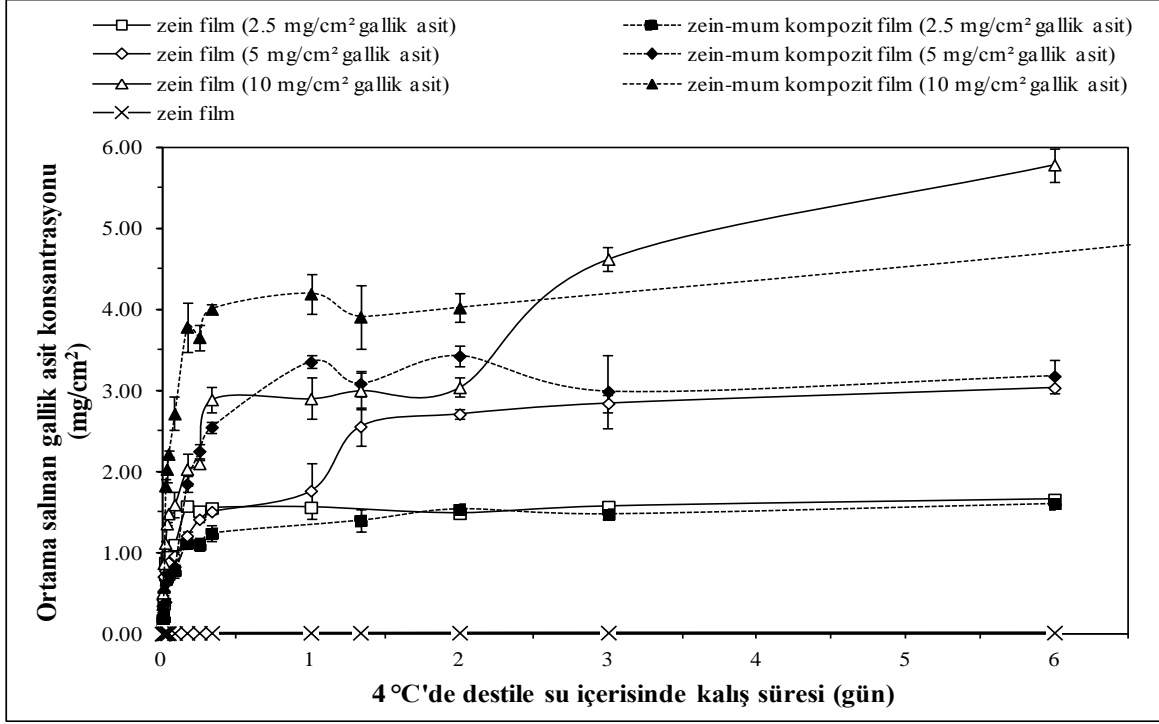
#### 4.1.3.2. Gallik asit içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin *Campylobacter jejuni* üzerindeki antimikrobiyel etkisi

Gallik asit içeren filmlerin antimikrobiyal aktivitesi Dünya'da en sık gıda zehirlenmesine neden olduğu bilinen tarafımızdan tavuk karkasından izole edilmiş *Campylobacter jejuni* bakterisine karşı test edilmiştir. Bilindiği üzere ABD'de ve AB ülkelerinde her yıl nüfusun %1'e yakını bu bakterinin neden olduğu gıda zehirlenmelerine maruz kalmaktadır (HUMPHREY ve ark., 2007). Zehirlenme vakalarının büyük kısmında kaynak broiler türü tavuklardır (CORRY ve ATABAY, 2001; ZORMAN ve ark., 2006). Ön denemelerde filmlere ilave edilmiş olan 1.25 mg/cm<sup>2</sup> düzeyinde gallik asit'in *C. jejuni* üzerinde herhangi bir antimikrobiyel etkisi belirlenememiştir. Ancak Şekil 4. 15'de görüldüğü gibi 2.5-10 mg/cm<sup>2</sup> düzeyinde gallik asit içeren filmlerde kayda değer bir antimikrobiyel aktivite belirlenmiştir. Filmlerin antimikrobiyel aktivitesi gallik asit konsantrasyonu artırıldıkça artmaktadır.

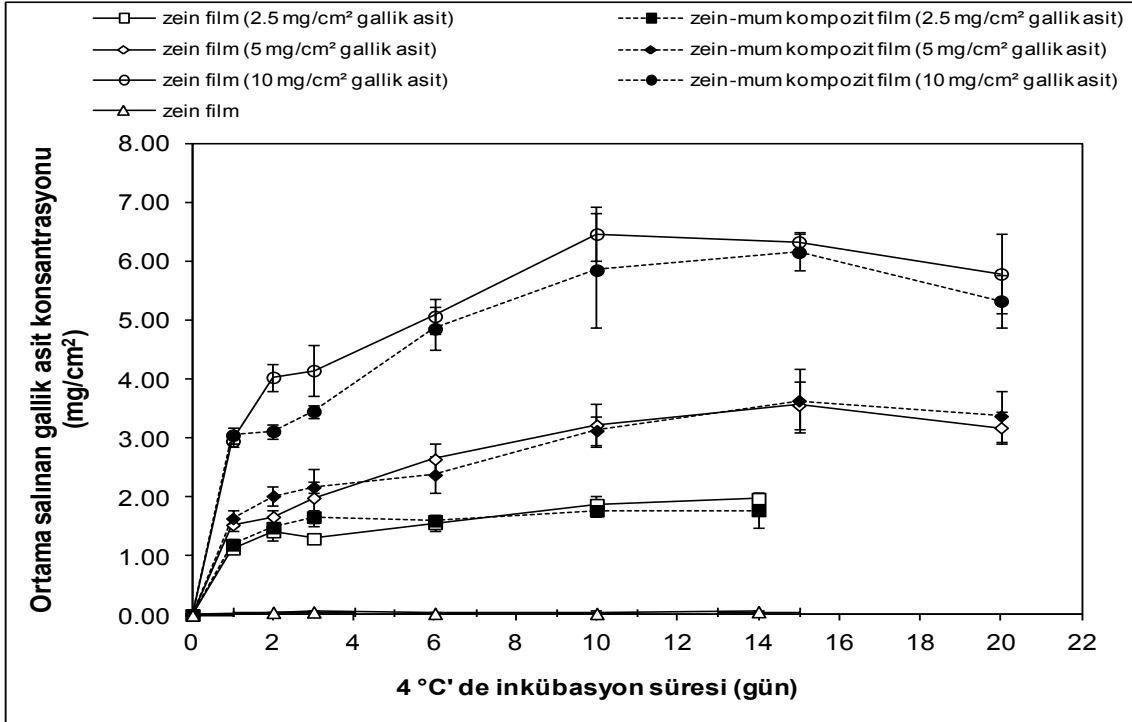
Tablo 4. 4. Destile su ve katı agarda salım deneylerinde zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerden ortama geçen toplam gallik asit miktarları

Film bileşimi		Salınan toplam gallik asit (mg/cm <sup>2</sup> )	
Gallik asit (mg/cm <sup>2</sup> )	Karnauba mumu (%) <sup>a</sup>	Destile su içerisinde	Katı agar üzerinde
-	-	-	-
2.5	-	1.86 ± 0.11a <sup>b</sup> (74) <sup>c</sup>	1.98 ± 0.08a(79)
2.5	5	1.68 ± 0.13a(67)	1.77 ± 0.29a(71)
5.0	-	3.24 ± 0.05b(65)	3.56 ± 0.41b(71)
5.0	5	3.54 ± 0.10b(71)	3.64 ± 0.55b(73)
10.0	-	5.88 ± 0.04c(59)	6.47 ± 0.46c(65)
10.0	5	6.21 ± 0.03c(62)	6.16 ± 0.31c(62)

<sup>a</sup>zeinin yüzdesi olarak mum miktarı; <sup>b</sup>kolonlardaki farklı harfler önemli istatistiksel farkları göstermektedir (P<0.05); <sup>c</sup>Filmlere ilave edilmiş olan gallik asit'in ortama geçme yüzdesi (geriye kalan gallik asit filmler içerisinde tutuklanmıştır).

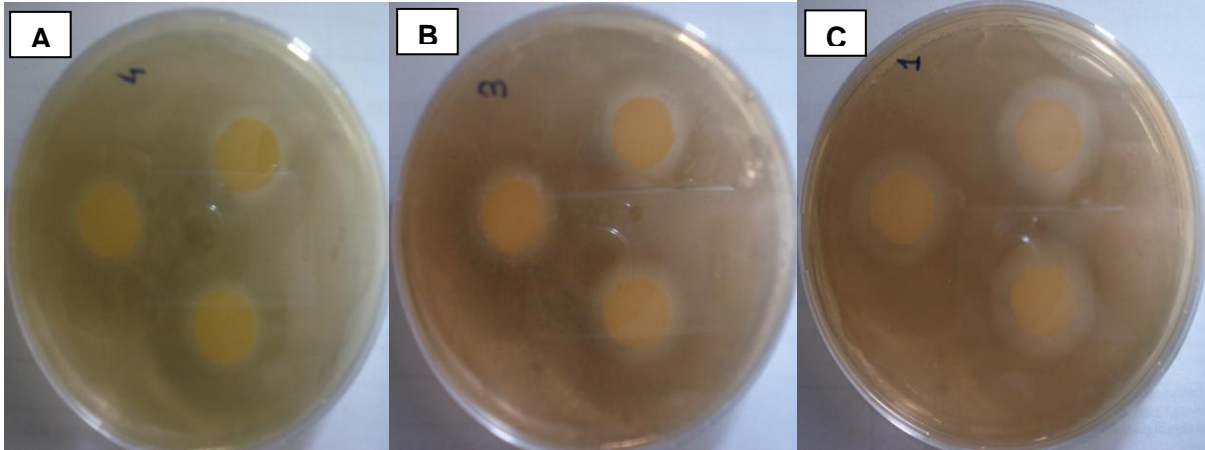


Şekil 4. 13. Gallik asit içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerin destile su içerisindeki gallik asit salım profili (filmler destile su içerisinde serbest halde çalkalanmaktadır)



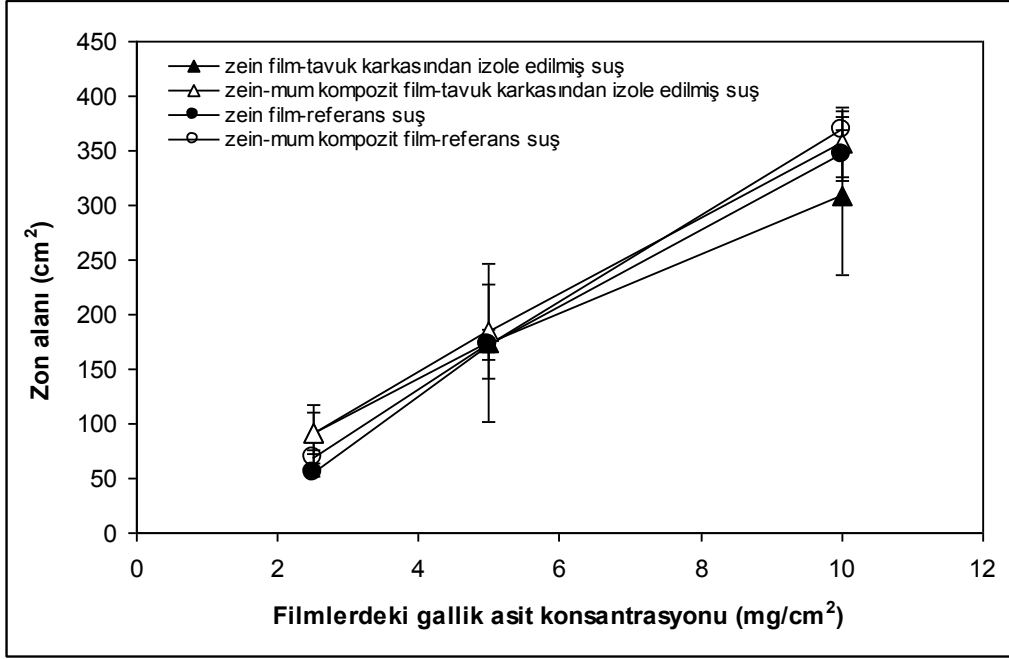
Şekil 4. 14. Gallik asit içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerin katı agardaki gallik asit salım profili (filmler agar altında sabit şekilde durmaktadır)





Şekil 4. 15. Gallik asit içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin *C. jejuni* üzerinde oluşturduğu zonlar (Gallik asit konsantrasyonları: A: 2.5 mg/cm<sup>2</sup>; B: 5 mg/cm<sup>2</sup>; C: 10 mg/cm<sup>2</sup>)

Nitekim bu durum Şekil 4.16'dan da açıkça görülmektedir. Elde edilmiş olan kurveler çalışılmış olan konsantrasyon aralığında gallik asit konsantrasyonu 2 kat artırıldığı zaman antimikrobiyel aktivitenin 1.8-3 kat arasında arttığını göstermektedir. Ancak, zein ve zein-karnauba kompozit filmlerin antimikrobiyel aktiviteleri arasında istatistiksel bir farklılık belirlenememiştir ( $P>0.05$ ). Özellikle gallik asitin hem tavuk kaynaklı, hem de hasta insan kaynaklı referans suş üzerinde aynı düzeyde antimikrobiyel aktivite göstermesi filmlerin kullanımıyla insanlarda zehirlenme yapan suşların inhibe edilebileceğini gösteren kayda değer bir sonuçtur. Literatürde *C. jejuni*'ye karşı antimikrobiyel film geliştirilmesiyle ilgili herhangi bir veriye rastlanmamıştır. Ancak, gallik asitin *C. jejuni*'ye karşı en etkili fenolik maddelerden birisi olduğu daha önce GANAN ve ark. (2009) tarafından rapor edilmiştir. Esas olarak test bakterisi olarak *C. jejuni*'nin seçilmiş olması bu rapordan kaynaklanmıştır. Gallik asit'in *C. jejuni* üzerindeki antimikrobiyel etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ancak, fenolik maddelerin hücre duvarıyla kompleks oluşturma, membran hasarına neden olma, bakteriyel tutunmanın engellenmesi ve bakteriyel enzimlerin inaktivasyonuna neden olma gibi etkileri bulunmaktadır (COWAN, 1999). NOHYNEK ve ark. (2006) G(-) bakteriler olan *Salmonella* türleri üzerinde yaptıkları çalışmalarda gallik asitin antimikrobiyel etkisinin hücre membranını tahrip etmelerinden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Dolayısıyla bu çalışmada da G(-) *C. jejuni* üzerinde gallik asit'in benzer bir etki gösterdiği düşünülebilir.



Şekil 4. 16. Gallik asit içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerin tarafımızdan tavuk karkasından izole edilmiş C. jejuni ve insandan izole edilmiş referans C. jejuni suşları üzerindeki antimikrobiyel etkisi

#### 4.1.3.3. Gallik asit içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin antioksidant aktivitesi

Gallik asit içeren filmlerin antioksidant aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla filmlerden salınan toplam gallik asit miktarlarına karşılık gelen ORAC ve TEAC değerleri belirlenmiştir. Gallik asit salındığı gıdalarda antioksidant etki gösterebildiği gibi bu gıdayı tüketen kişilerde de antioksidant aktivite gösterebilecek bir maddedir. Nitekim, gallik asit'in kalp-damar hastalıklarından ve kanserden koruyucu özellikleri iyi bilinmektedir (Madlener, 2007 #24;Shahrzad, 2001 #35). Tablo 4.5'den de görüldüğü üzere 2.5-10 mg/cm<sup>2</sup> GA içeren filmlerden destile suya salınmış GA miktarlarına karşılık gelen TEAC ve ORAC değerleri 57.5-212.5  $\mu\text{mol}$  troloks/cm<sup>2</sup> ve 72.3-267.1  $\mu\text{mol}$  troloks/cm<sup>2</sup> arasında değişmiştir. Katı agara salınan gallik asit miktarlarına karşılık gelen TEAC ve ORAC değerleri de buna oldukça yakındır. Dolayısıyla teorik olarak 10 cm<sup>2</sup> 2.5 mg/cm<sup>2</sup> gallik asit içeren zein-karnauba mumu kompozitinden bir gıdaya geçebilecek troloks esdeğeri antioksidant aktivite TEAC cinsinden yaklaşık 575  $\mu\text{mol}$  trolox/cm<sup>2</sup>, ORAC cinsinden ise yaklaşık 723  $\mu\text{mol}$  trolox/cm<sup>2</sup> kadardır. Troloks biriminden günlük gıda tüketimiyle alınan antioksidant aktivitenin 1500-5000  $\mu\text{mol}$  arasında değişebildiği düşünülürse gallik asitin ne denli güçlü bir antioksidant olduğu

Tablo 4. 5. Gallik asit içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerden su ve katı ortamlara geçen toplam gallik asit miktarlarına karşılık gelen antioksidant aktiviteler

Film bileşimi		Salınan gallik asit' e karşılık gelen antioksidant aktiviteler ( $\mu\text{mol Trolox}/\text{cm}^2$ )			
Gallik asit ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ )	Karnauba Mumu (%) <sup>a</sup>	Destile su içerisinde		Katı agar üzerinde	
		TEAC	ORAC	TEAC	ORAC
-	-	-	-	-	-
2.5	-	63.7 $\pm$ 3.8a <sup>b</sup>	80.3 $\pm$ 4.8a	67.6 $\pm$ 2.9a	85.2 $\pm$ 3.6a
2.5	5	57.4 $\pm$ 4.4a	72.3 $\pm$ 5.5a	60.7 $\pm$ 9.9a	76.5 $\pm$ 12.5a
5.0	-	110.7 $\pm$ 1.6b	139.5 $\pm$ 2.0b	108.8 $\pm$ 9.3b	137 $\pm$ 11.7b
5.0	5	121.1 $\pm$ 3.6b	152.5 $\pm$ 4.5b	115.5 $\pm$ 14.7b	145.5 $\pm$ 18.5b
10.0	-	201.2 $\pm$ 1.2c	253.4 $\pm$ 1.5c	198.1 $\pm$ 23.2c	249.6 $\pm$ 29.2c
10.0	5	212.5 $\pm$ 9.1c	267.6 $\pm$ 11.5c	182.4 $\pm$ 15.5c	229.7 $\pm$ 19.5c

<sup>a</sup>zeinin yüzdesi olarak mum miktarı; <sup>b</sup>kolonlardaki farklı harfler önemli istatistiksel farkları göstermektedir (P<0.05)

daha iyi anlaşılacaktır. Ancak, uygulamada zein filmle kaplanması düşünülen gıdaların sığır karkası, büyük ölçekli salam sosis batonları ve büyük peynir diskleri gibi büyük kitleli ürünler olacağı düşünülünce tüketime göre alınacak antioksidant aktivitenin bunun çok altında olacağı açıktır. Ayrıca pişirmeyle antioksidant aktivitenin azalması da beklenmektedir.

#### 4.1.3.4. Gallik asit içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin mekaniki özellikleri

2.5-10  $\text{mg}/\text{cm}^2$  gallik asit içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerin mekaniki özellikleri Tablo 4.6'da verilmiştir. Görüldüğü üzere filmlere 2.5 veya 5  $\text{mg}/\text{cm}^2$  düzeyinde gallik asit ilavesi gerek zein filmlerde, gerekse zein-karnauba mumu kompozit filmlerde elastikiyeti dolayısıyla uzama değerlerini %200'ün üzerinde artırmakta, elastik modulus ve gerilme gücü değerlerini ise kayda değer şekilde azaltmaktadır. En esnek filmler 5  $\text{mg}/\text{cm}^2$  gallik asit içerenlerken, 10  $\text{mg}/\text{cm}^2$  gallik asit içeren filmlerde kazanılmış olan elastikiyet bir anda azalmakta ve adeta kaybolmaktadır. Bu ilginç gözlem yüksek konsantrasyonda gallik asit'in filmler içerisinde polimerize olduğu ve birtakım güçlü ve yoğun etkileşimler kurarak film matrisinin elastikiyetini azalttığını göstermektedir. Diğer yandan gallik asit içeren zein filmlerin zein-karnauba mumu kompozitlerden bir miktar daha yüksek

elastikiyet göstermesi mum zerreciklerinin elastikliği kısmen de olsa azalttığını göstermektedir. Zein ve zein-karnauba mumu filmlerin elastik modulus değerlerinde ise küçük

Tablo 4. 6. Gallik asit içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerin mekanik özellikleri

Film bileşimi		Gerilme gücü (MPa)	Uzama (%)	Elastik modulus (MPa)	Film kalınlıkları ( $\mu$ m)
Gallik asit (mg/cm <sup>2</sup> )	Mum (%) <sup>a</sup>				
-	-	9.50 $\pm$ 1.07 <sup>a</sup> <sup>b</sup>	3 $\pm$ 1a	545 $\pm$ 46a	137 $\pm$ 2b
2.5	-	1.73 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	220 $\pm$ 28 <sup>b</sup>	45 $\pm$ 19 <sup>c</sup>	123 $\pm$ 1c
5.0 <sup>c</sup>	-	0.1 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	620 $\pm$ 48 <sup>c</sup>	2 $\pm$ 1 <sup>c</sup>	133 $\pm$ 2b
10	-	0.79 $\pm$ 0.12 <sup>bc</sup>	20 $\pm$ 6a	105 $\pm$ 15 <sup>b</sup>	134 $\pm$ 2b
-	5	5.78 $\pm$ 2.1a	1 $\pm$ 0.4a	610 $\pm$ 60a	98 $\pm$ 4e
2.5	5	1.24 $\pm$ 0.16 <sup>bc</sup>	205 $\pm$ 47 <sup>b</sup>	35 $\pm$ 5 <sup>c</sup>	171 $\pm$ 20a
5.0 <sup>c</sup>	5	0.12 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	576 $\pm$ 44 <sup>c</sup>	4 $\pm$ 1 <sup>c</sup>	168 $\pm$ 7a
10	5	0.88 $\pm$ 0.19 <sup>bc</sup>	5 $\pm$ 2a	123 $\pm$ 23 <sup>b</sup>	137 $\pm$ 2b

<sup>a</sup>zeinin yüzdesi olarak mum miktarı; <sup>b</sup>kolonlardaki farklı harfler önemli istatistiksel farkları göstermektedir (P<0.05); <sup>c</sup>Çok elastik olan bu filmlerde cihazın maksimum gerdirme mesafesi boyunca kopma sağlanamadığından standart film kavrama mesafesi 5 cm 'den 3 cm 'e düşürülmüştür.

farklılıklar bulunsa da bu farklılıklar kayda değer düzeyde değildir. Dolayısıyla elde edilmiş olan elastikiyet avantajının kaybedilmemesi için zein filmlerdeki gallik asit düzeyinin 2.5-5 mg/cm<sup>2</sup> düzeyinde tutulmasının faydalı olacağı değerlendirilmiştir.

#### 4.1.3.5. Gallik asit içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin SEM görüntüleri

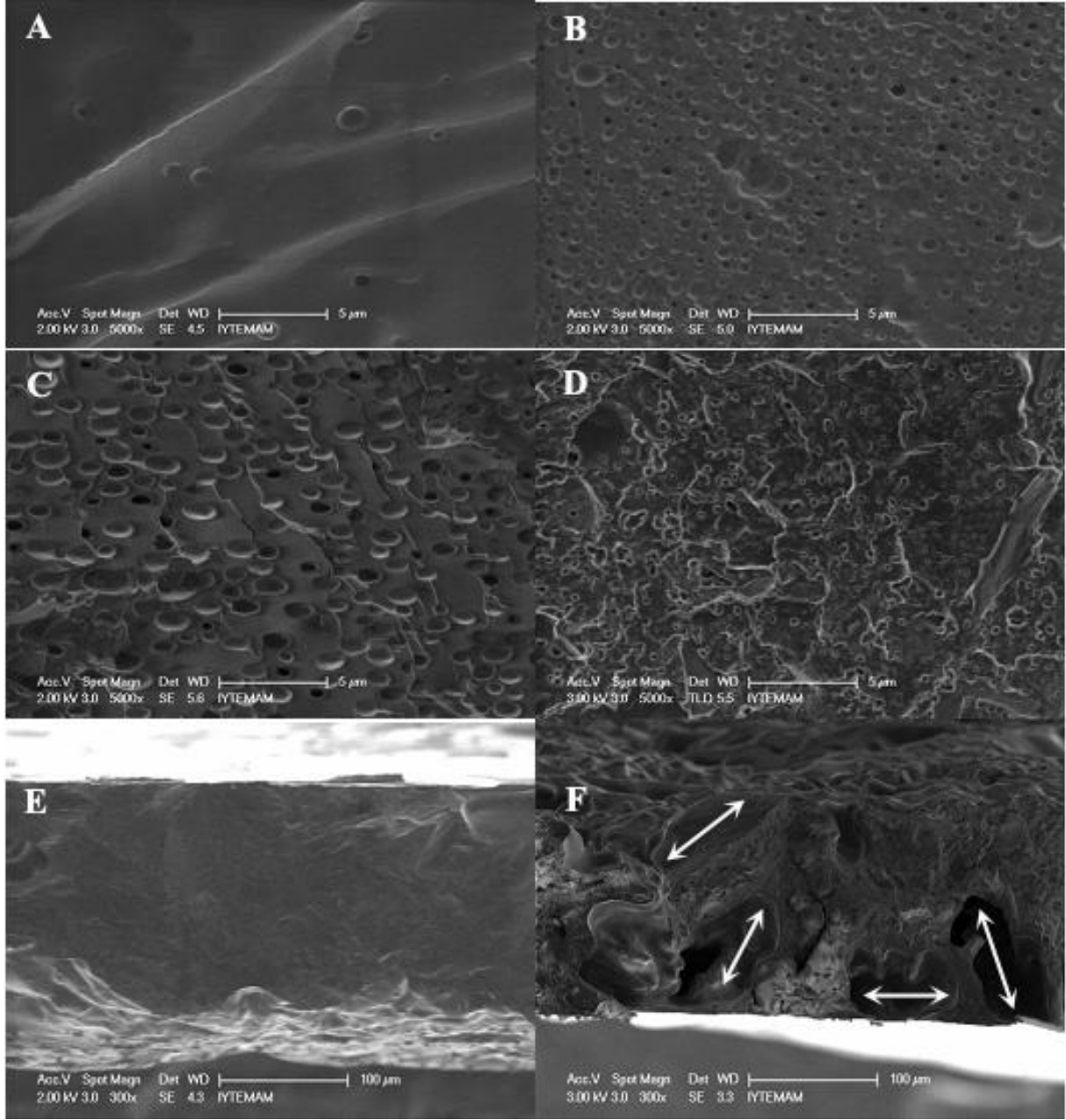
Farklı miktarlarda gallik asit içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerin SEM görüntüleri Şekil 4.17 A-F'de verilmiştir. Şekil 4.17A ve 4.17B'den de görüleceği üzere filmler içerisine tek başına gallik asit ilavesi filmleri daha gözenekli hale getirmektedir. Tek başına filmlerde mum ilave edilmesi de filmleri daha gözenekli hale getirmekte ancak bu durumda daha az sayıda ve iri porlar oluşmaktadır (Şekil 4.17C). Mum ve gallik asitin filmlere birarada ilave edilmesi ise filmlerde ince, uzun ve şekilsiz yarıklar, seyrek şekilde dağılmış iri porlar ve çok sayıda küçük por oluşumuna neden olmaktadır (Şekil 4.17D). Şekil 4.17E'de F

birarada incelendiği zaman özellikle yüksek konsantrasyonda gallik asit içeren kompozit filmlerde (5 ve 10 mg/cm<sup>2</sup>) zein-mum kompozit filmlerde gallik asit salımının zein filmlere kıyasla neden daha yüksek hızda gerçekleştiği net bir şekilde anlaşılmaktadır (Not: Şekil 4.17A-D X5000, Şekil 4.17E-F x300 büyütmededir. Bu filmler kıyaslanmamalıdır).

Özellikle 10 mg/cm<sup>2</sup> gallik asit içeren zein-karnauba mumu filmlerde 300x büyütmede bile açıkça görülen oldukça iri yarıklar ve gözenekler bu filmlerin destile su içerisindeki salım deneylerinde zein filmlere göre hızlı gallik asit salımının başlıca nedenidir.

#### **4.1.4. Kateşinin kontrollu salımı için zein-oleik asit karışım filmler geliştirilmesi**

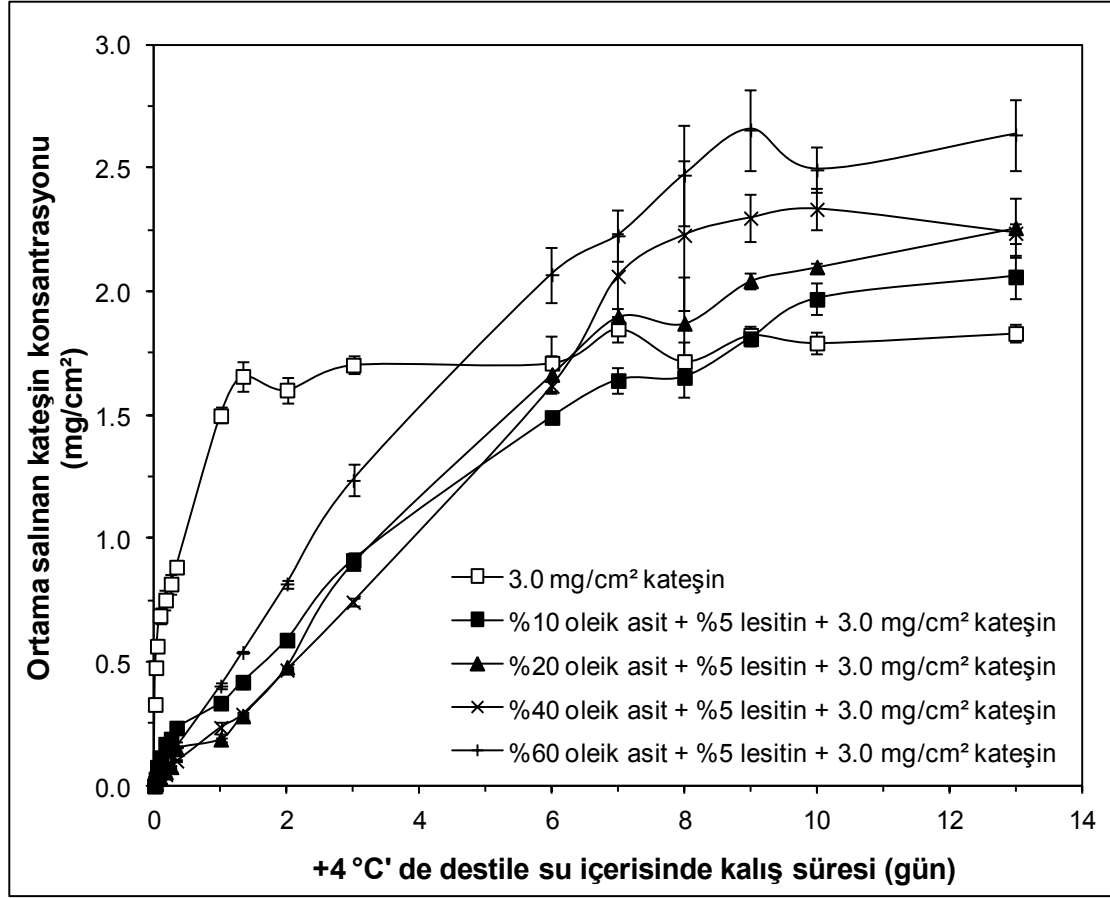
Zein filmler için kontrollu salım mekanizması geliştirilmesi ile ilgili en büyük potansiyel uygulamalardan birisi de bu filmlerin oleik asitle birlikte karışım film (blend film) olarak kullanılmasıdır. Lesitin emülgatörü varlığında zeinle mükemmel bir şekilde karıştığı ve sıvı olduğundan bir kompozitleşmeye neden olmadığından zein-oleik asit filmleri kompozit yerine karışım film olarak isimlendirilmiştir. WANG ve ark. (2008) yeni biyomateryaller üretmek amacıyla yürüttükleri karakterizasyon çalışmaları sırasında zein filmler içerisine oleik asit katıldığı zaman zein zerreciklerinin bu yağ asitiyle kaplandığını ve film oluşumu sırasında yeniden biraraya gelerek gözenekli süngerimsi bir yapı oluşturduğunu belirlemişlerdir. Elde edilmiş olan bu yapının bazı biyomoleküllerin taşınması (carrier) amacıyla kullanılabileceği bu araştırmacılarca belirtilmiş ancak bugüne kadar bu yapının aktif ambalajlamada kontrollu salım amacıyla kullanılması üzerinde durulmamıştır. Bunun başlıca nedeni oleik asitin zeinin klasik kırılma ve elastikiyet sorunlarını bir ölçüde azaltması nedeniyle çalışmaların daha çok plastikleştirici ajan olarak kullanılması üzerinde edilmiş olan bu yapının bazı biyomoleküllerin taşınması (carrier) amacıyla kullanılabileceği bu araştırmacılarca belirtilmiş ancak bugüne kadar bu yapının aktif ambalajlamada kontrollu salım amacıyla kullanılması üzerinde durulmamıştır. Bunun başlıca nedeni oleik asitin zeinin klasik kırılma ve elastikiyet sorunlarını bir ölçüde azaltması nedeniyle çalışmaların daha çok plastikleştirici ajan olarak kullanılması üzerinde yoğunlaşmasıdır. Dolayısıyla çalışmanın bu aşamasında zein- oleik asit karışım filmlerin fenolik maddelerden kateşinin kontrollu salımı amacıyla kullanılıp kullanılmayacağı araştırılmıştır. Film üretimi aşamasında oleik asit filmler içerisine emülgatör lesitin kullanarak ve kullanmadan ilave edilmiştir. Ancak, nihai denemelerde lesitinli filmlerin daha homojen bir yapıda olduğunun anlaşılmasıyla bu emülgatör tüm oleik asit içeren filmlerde kullanılmıştır. Nitekim, WANG ve ark.'da (2005) zein-oleik asit karışım filmlerde emülgatör kullanmanın oleik asitin film içerisinde daha iyi dağılmasını sağladığını ve daha üniform filmler üretilmesine olanak tanıdığını belirlemişlerdir.



Şekil 4. 17. Gallik asit içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlere ait SEM yankesit görüntüleri (filmler sıvı azotla dondurulup kırılmıştır; A: Kontrol zein; B: Kontrol zein-karnauba mumu kompozit; C: 5 mg/cm<sup>2</sup> gallik asit içeren zein; D: 5 mg/cm<sup>2</sup> gallik asit içeren zein-karnauba mumu kompozit; E: 10 mg/cm<sup>2</sup> gallik asit içeren zein; F: 10 mg/cm<sup>2</sup> gallik asit içeren zein-karnauba mumu kompozit; Büyütmeler A, B, C ve D için x 5000; E ve F için x 300; oklar zein-karnauba mumu kompozit filmde yüksek konsantrasyonda gallik asit ilavesiyle oluşan iri gözenekleri göstermektedir)

#### 4.1.4.1. Kateşin içeren zein-oleik asit karışım filmlerin salım deneyleri

Şekil 4.18'de biyoaktif ajan olarak kateşinin kullanıldığı, oleik asit ve lesitin ilave edilmiş karışım filmlerden kateşin salımı görülmektedir. Buna göre zein filmler içerisinde oleik asit ilave edilmesinin kateşinin geçiş hızını kayda değer şekilde azalttığı ortadadır. Oleik asit oranı %10, 20 veya 40 olan zein-oleik asit karışım filmlerde kateşin geçiş hızı oleik asit içermeyen kontrol filmlere kıyasla çok daha düşük ve birbirine oldukça yakındır. Nitekim 2 günün sonunda %10-40 arasında oleik asit içeren zein-oleik asit karışım filmlerden geçen toplam kateşin miktarı oleik asit içermeyen kontrol filme göre yaklaşık 2.5-3 kat daha azdır. Buna karşın yağ oranının %60'a çıkmasıyla kateşin geçiş hızı bir miktar artmaktadır. Anlaşıldığı kadarıyla oleik asit miktarının aşırı yükseltilmesi film bütünlüğünü bir miktar azaltmaktadır. Oleik asit ilavesiyle kateşinin geçiş hızının azalmasının temelinde filmlerin hidrofobikliğinin artarak su almasının yavaşlamasıyla ilgili olduğu düşünülmektedir. Nitekim, yenebilir filmlerde hidrofilik/hidrofobik bileşen oranının azaltılmasının filmin içerdiği fonksiyonel ajanların daha yavaş salımına neden olduğu iyi bilinmektedir (OZDEMİR ve FLOROS, 2003; QUATTARA ve ark., 2000). Ancak, bizzat kateşinin zein molekülleriyle hidrojen bağı yaparak oluşturduğu düşünülen ağyapının da kontrollu salıma katkı sağlaması mümkündür. Hatırlanacağı üzere daha önce hidrofobik mum ve lesitin ilave edilmiş zein filmlerde kateşinin salım hızının azalması da elde edilen salım deneyi verilerine dayanılarak hidrofobisite artışı ve fenolik maddenin film matrisinde oluşturduğu ağyapıya bağlanmıştı. Ancak, bunun yanında literatürde de belirtildiği gibi oleik asit ilavesinin zein filmlerde yapısal değişimlere neden olması (süngerimsi yapı) ve bunun kontrollu salıma bir ölçüde katkı sağlaması da mümkündür. Bunun dışında salım deneyinde dikkat çeken bir husus da oleik asit miktarı arttıkça filmlerden geçen maksimum fenolik madde miktarının ve buna bağlı antioksidant aktivitenin bir miktar artmasıdır (Tablo 4.7). Bu durum oleik asitin kateşinin zein agregatları içerisinde tutuklanmasını önlediğini göstermektedir.



Şekil 4. 18. Kateşin içeren zein-oleik asit karışımlarında oleik asit miktarının kateşin salım profiline etkisi (filmler destile su içerisinde serbest halde çalkalanmaktadır)

Tablo 4. 7. Kateşin içeren zein-oleik asit karışım filmlerden salınan toplam kateşin miktarları ve bunlara karşılık gelen antioksidant aktiviteler

Filmlerin bileşimi			Salınan toplam kateşin (mg/cm <sup>2</sup> )	Antioksidant aktivite (µmol Trolox/cm <sup>2</sup> )
Kateşin (mg/cm <sup>2</sup> )	Oleik asit (%) <sup>a</sup>	Lesitin (%) <sup>a</sup>		TEAC
3	-	-	1.83 ± 0.04	30 ± 1
3	10	5	2.06 ± 0.09	36 ± 2
3	20	5	2.26 ± 0.12	36 ± 1
3	40	5	2.24 ± 0.04	43 ± 1
3	60	5	2.65 ± 0.16	43 ± 3

<sup>a</sup>zeinin yüzdesi olarak oleik asit ve lesitin miktarları

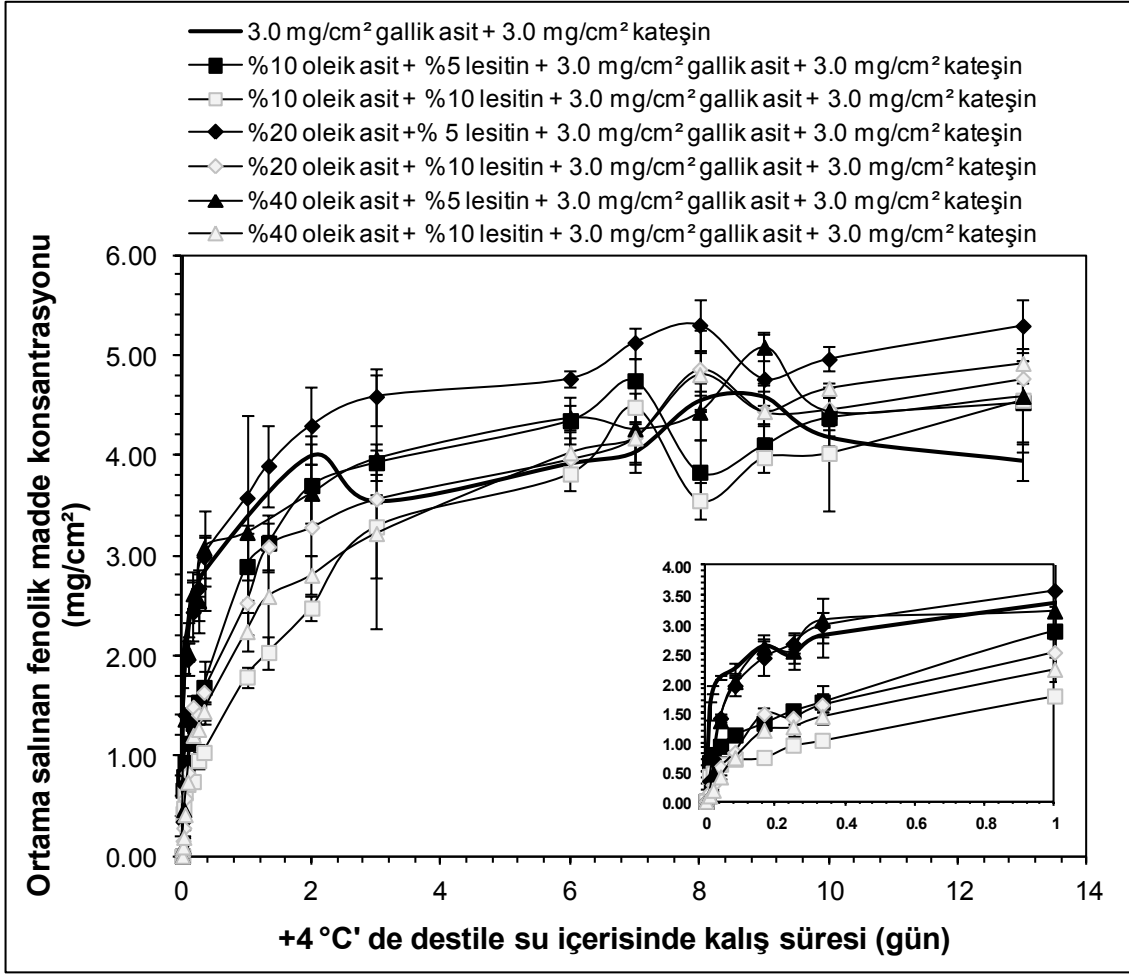


#### **4.1.5. Kateşin ve Gallik asit'in birarada kontrollu salımı için zein-oleik asit karışım filmler geliştirilmesi**

Antimikrobiyal filmlerde en büyük sorun çoğu zaman filmlere ilave edilen aktif ajanların büyük bir hızla gıdaya geçmesidir. Zein-oleik asit karışım filmler kullanılarak kateşin geçiş hızının etkili bir şekilde azaltılması bu filmlerin fenolik bileşiklerin kontrollu salımında başarılı bir şekilde kullanılabilceğini göstermektedir. Dolayısıyla çalışmanın kapsamının artırılması ve alternatif filmler geliştirilmesi amacıyla daha önce ayrı ayrı kullanılmış olan kateşin ve gallik asit filmlere karışım olarak ilave edilmeye başlanmıştır. Gallik asit düşük moleküler ağırlığı (MW: 170) ve zein filmlerin gözenekliliğini artırmasıyla salım hızının yavaşlatılması oldukça güç bir fenolik maddedir. Buna karşın daha yüksek molekül ağırlığı (MW: 290) ve özellikle zein-mum kompozit filmlerin gözenekliliğini azaltmasıyla kateşin'in geçiş hızının yavaşlatılması daha kolaydır. Buna rağmen gallik asit kateşine göre çok daha güçlü bir antimikrobiyel ve antioksidant etkiye sahiptir. İşte her iki fenolik bileşiğin karıştırılmasıyla antimikrobiyel ve antioksidant etkisi yüksek olan ancak bir kısım fenolik bileşiğin (kateşin fraksiyonu) düşük hızda gıdaya geçtiği filmler elde edilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca kateşinin zein filmlerin gözenek yapısını azaltmasının gallik asitin yarattığı tam tersi etkiyi kısmen dengeleyebileceği de düşünülmüştür.

##### **4.1.5.1. Kateşin ve gallik asit'i birarada içeren zein-oleik asit karışım filmlerin salım deneyleri**

Şekil 4.19'te farklı miktarlarda oleik asit ilavesinin  $3.0 \text{ mg/cm}^2$  gallik asit ve  $3.0 \text{ mg/cm}^2$  kateşin içeren filmlerden fenolik madde geçişine etkisi görülmektedir. Filmlere zeinin %10'u kadar oleik asitin zeinin %5'i kadar lesitinle birlikte ilavesi, başlangıç salım hızında kontrole göre az da olsa bir azalmaya neden olmaktadır. Ancak, aynı lesitin konsantrasyonunda (5%) oleik asit miktarının sırasıyla %20 veya %40'a çıkarılmasıyla geçiş hızı yine artmakta ve kontrolünkine benzerlik göstermektedir. Diğer yandan lesitin miktarının zein miktarının %10'u düzeyine çıkarılmasıyla geçiş hızı yine yavaşlamakta ve kontrolünkünün altına düşmektedir. Özellikle %10 oleik asit ve %10 lesitin içeren filmlerde salım hızı kayda değer şekilde azalmaktadır. Nitekim, 1 gün sonunda belirtilen oranda oleik asit ve lesitin içeren filmlerden salınan toplam fenolik madde miktarı kontrole göre yarı yarıya daha azdır. %10 lesitin içeren filmlerde oleik asit miktarının %20 ve %40'a çıkarılmasıyla salım hızı yeniden artış göstermektedir. Ancak, geçiş hızı hala kontrolünkünden düşüktür. Buna göre tek başına kateşin içeren filmlere göre gallik asit ve kateşini birarada içeren filmlerde salım hızının



Şekil 4. 19. Kateşin ve gallik asiti birarada içeren zein ve zein-oleik asit karışım filmlerde fenolik madde salım profilleri (filmler destile su içerisinde serbest halde çalkalanmaktadır)

azaltılabilmesi için oleik asitin filmler içerisinde daha fazla emülgatör kullanılarak iyi bir şekilde dağıtılması gerektiği açıktır. Ayrıca, elde edilen sonuçlar oleik asit miktarının da oldukça kritik olduğunu ve yüksek konsantrasyonda oleik asitin kontrollu salım etkisini nispeten azalttığını göstermiştir. Bu etki şeklinin yüksek konsantrasyonda oleik asitin zein film matris bütünlüğünü (sıklığını) azaltarak aşırı plastikleştirici etki göstermesinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

Tablo 4.8'de farklı filmlerden salım deneyinde ortama geçen toplam fenolik madde miktarları da verilmiştir. %10 oleik asit ve %10 lesitin içeren filmler haricinde oleik asit ilave edilmemiş kontrol filmlerde toplam fenolik madde geçişi diğer filmlerinkinden daha düşüktür. Aynı miktarda oleik asit içeren filmlerde lesitin miktarının salınan toplam fenolik madde miktarına belirgin bir etkisi yokken %20 ve %40 oleik asit içeren filmlerden %10 oleik asit içerenlere göre daha fazla fenolik madde geçişi olmuştur. Bu durum daha önceki oleik asit

miktarının artmasının film bütünlüğünü azaltarak toplam fenolik madde geçişini artırdığı yani tutuklu fenolik madde miktarını azalttığı gözlemimizle uyumludur.

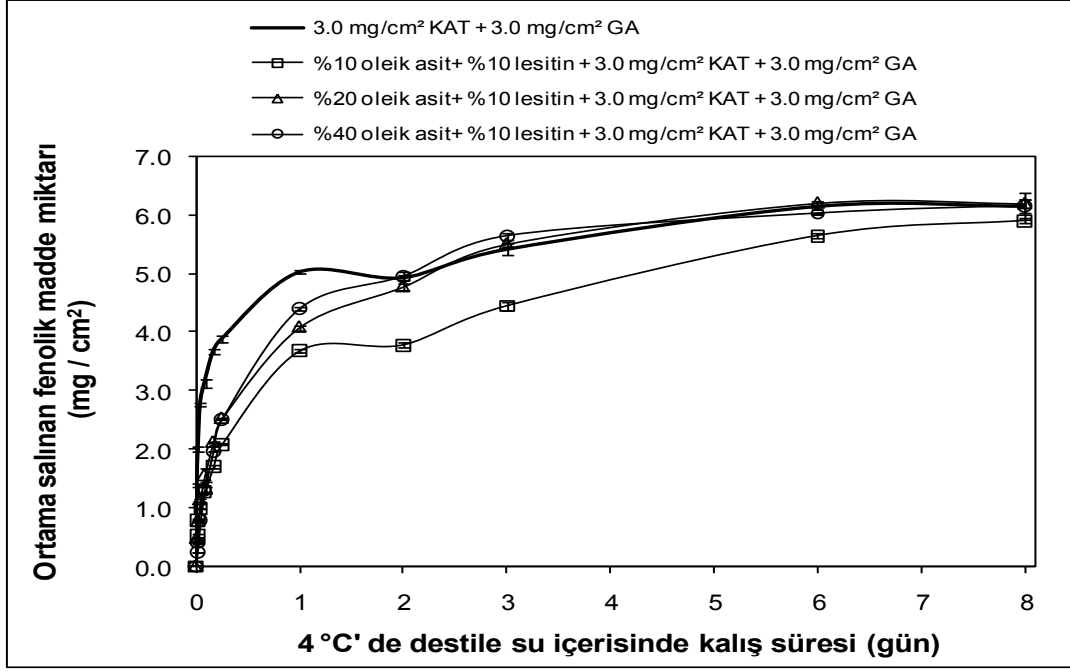
Tablo 4. 8. Kateşin ve gallik asit'i birarada içeren zein-oleik asit karışım filmlerden salınan toplam fenolik madde miktarları

Filmlerin bileşimi				Salınan toplam fenolik madde miktarı (mg/cm <sup>2</sup> )
Kateşin (mg/cm <sup>2</sup> )	Gallik asit (mg/cm <sup>2</sup> )	Oleik asit (%) <sup>a</sup>	Lesitin (%) <sup>a</sup>	
3	3	-	-	4.58 ± 0.09
3	3	10	5	4.75 ± 0.22
3	3	10	10	4.55 ± 0.51
3	3	20	5	5.30 ± 0.24
3	3	20	10	4.86 ± 0.39
3	3	40	5	5.08 ± 0.14
3	3	40	10	4.92 ± 0.15

<sup>a</sup>zeinin yüzdesi olarak oleik asit ve lesitin miktarları

Zein-oleik asit karışım filmlerle yürütülen geçiş deneylerinde karşılaşılan en önemli sorun filmler içerisine ilave edilmiş olan oleik asitin film yoğunluğunu azaltması ve bu durumun bazı filmlerin destile su içerisinde tam olarak batıkken, bazılarının ise yüzerek askıda kalmasına veya yüzeye yaklaşmasına neden olmasıdır. Ancak, etkili bir çalkalama olduğundan tüm filmler su içerisinde yavaşça batıp çıkarak hareket etmekte ve salım deneyi sağlıklı bir şekilde devam etmektedir. Buna karşın elde edilen verilerin kontrol edilmesi amacıyla oleik asit içeren bazı filmlerin geçiş deneyleri filmleri tam olarak batık halde tutan özel bir düzenekle tekrarlanmıştır. Bu özel düzenek filmlerin cam bir çerçeve içerisine uç kısımlarından tutturulması ve çerçevenin çalkalanan destile suya atılmasıyla oluşturulmuş olup kullanımının tek amacı farklı yoğunluktaki filmleri suda aynı düzeyde batık halde tutmaktır (bak Şekil 3.5). Şekil 4.20'de verilmiş olan sonuçlar incelendiği zaman aynen destile su içerisinde serbest çalkalanan filmlerde olduğu gibi gallik asit ve kateşin içeren %10 oleik asit %10 lesitin ilave edilmiş zein-oleik asit karışım filmlerde fenolik madde salım hızının azaldığı, oleik asit miktarının %20 veya %40'a çıkarılmasıyla ise (kontrole göre yine az olmakla birlikte) salım hızının arttığı görülmektedir. Elde edilen bu sonuçlar filmlere zeinin %10'u oranında oleik asit katılmasıyla filmlerde meydana gelen hidrofobisite artışının fenolik madde salımını azalttığı, buna karşın oleik asit miktarının %20 veya %40'a çıkmasıyla film matrisinde deformasyonlar başladığı ve filmlerin yapısal bütünlüğünün azalmasıyla (veya gözenekliliğinin artmasıyla) fenolik madde geçişinin arttığını işaret etmektedir. Bu düşünce

WANG ve ark.'ın (2008) zein filmler içerisinde belli oranda oleik asit katıldığı zaman zein zerreciklerinin bu yağ asitiyle kaplandığı ve yeniden biraraya gelerek gözenekli süngerimsi bir yapı oluşturduğu bulgularıyla paralellik göstermektedir. Bu durumda oleik asit miktarının değiştirilmesiyle fenolik madde geçiş hızının değiştirilebileceği açıktır.



Şekil 4. 20. Kateşin ve gallik asit'i birarada içeren zein-oleik asit karışım filmlerin fenolik madde salım profilleri (not-1: filmler çerçeve içerisinde yerleştirilmiş halde destile suda tutulurken tüm düzenek çalkalanmaktadır; not-2: KAT: kateşin; GA: gallik asit)

#### 4.1.5.2. Kateşin ve gallik asit'i birarada içeren zein-oleik asit karışım filmlerin mekanik özellikleri

Kateşin ve gallik asiti birarada filmlere ilave edilmesinin filmlerin mekanik özellikleri üzerine olan etkisi Tablo 4.9'da görülmektedir. Hatırlanacağı üzere filmler içerisinde kateşin veya gallik asit ilave edilmesi elastikiyeti kayda değer şekilde artırmakta, ancak filmlerin gerilme gücü ve elastik modulus değerlerini azaltmaktaydı (Şekil 4.2 ve 4.3). Film yapısına kateşin ve gallik asit birlikte ilavesinin de benzer bir sonuç doğurduğu görülmektedir. Kateşin ve gallik asiti bir arada içeren filmlere zeinin %10 'u düzeyinde oleik asit ilavesi filmin mekanik özelliklerinde önemli bir değişiklik yaratmazken; zeinin %20 'si düzeyinde oleik asit ilavesi filmin uzama değerini önemli ölçüde arttırmıştır ( $P < 0.05$ ). Oleik asitin zein film için plastikleştirici etkisi LAI ve PADUA (1997) tarafından gösterilmiştir. Ancak oleik asit

miktarının daha da arttırılması ile filmin uzama değeri belirgin bir şekilde düşmüştür. Bu durum yapı içinde bulunan oleik asit miktarının kritik seviyeyi aşması ve film yapısı içerisinde homojen dağıtılamaması ile açıklanabilir.

(Not: yüksek fenolik madde içeriği nedeniyle mekanik testler öncesi uygulanan kurutma işlemi 24 saatten 48 saate çıkarılmıştır)

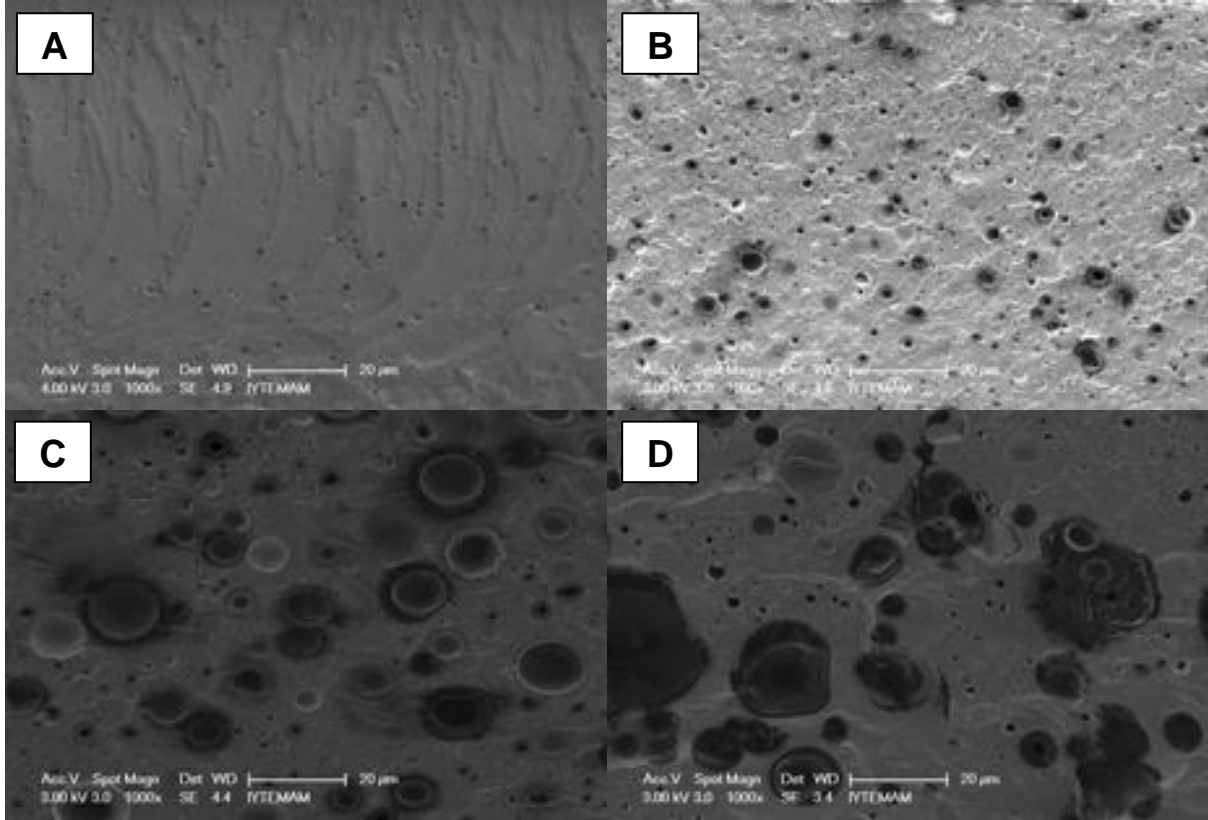
Tablo 4. 9. Gallik asit ve kateşin içeren zein ve zein-oleik asit karışım filmlerin mekanik özellikleri

Film bileşimi				Gerilme gücü (MPa)	Uzama (%)	Elastik modulus (MPa)	Film kalınlıkları ( $\mu$ m)
Gallik asit (mg/cm <sup>2</sup> )	Kateşin (mg/cm <sup>2</sup> )	Oleik asit (%) <sup>a</sup>	Lesitin (%) <sup>a</sup>				
-	-	-	-	17.67 $\pm$ 0.93a <sup>b</sup>	4 $\pm$ 1d	775 $\pm$ 44a	113 $\pm$ 1
3.0	3.0	-	-	0.51 $\pm$ 0.14b	196 $\pm$ 15b	17 $\pm$ 8b	175 $\pm$ 2
3.0	3.0	10	10	0.19 $\pm$ 0.02b	209 $\pm$ 28b	5 $\pm$ 1b	204 $\pm$ 3
3.0	3.0	20	10	0.20 $\pm$ 0.01b	352 $\pm$ 24a	5 $\pm$ 1b	145 $\pm$ 4
3.0	3.0	40	10	0.15 $\pm$ 0.04b	151 $\pm$ 51c	3 $\pm$ 1b	222 $\pm$ 9

<sup>a</sup>zeinin yüzdesi olarak oleik asit ve lesitin miktarları; <sup>b</sup>Kolonlardaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir (P<0.05)

#### 4.1.5.3. Kateşin ve gallik asit'i birarada içeren zein-oleik asit karışım filmlerin SEM görüntüleri

Şekil 4.21 'deki SEM görüntüleri zein film yapısında oleik asit ilavesi ve oleik asitin film yapısındaki konsantrasyonunun artması ile meydana gelen değişiklikleri göstermektedir. Kateşin ve gallik asiti bir arada içeren zein film içerisinde gözenek sayısı ve boyutu az iken, oleik asit ilavesi ve konsantrasyon artışı ile film yapısındaki gözenek sayısı ve boyutları artmaktadır. Zeinin %40 'ı kadar oleik asit içeren film de ise (Şekil 4.21D) gözenekler çok büyük boyutlara ulaşmakta ve yapılarındaki deformasyon diğer görüntülerde ki yuvarlak şekillerlerinden uzaklaşmaları ile anlaşılmaktadır. Lesitin (emülgatör), oleik asit oranının azalması yukarıda belirtilen yapısal değişikliğin bir nedeni olarak görülmektedir



Şekil 4. 21. Gallik asit ve kateşin içeren zein ve zein-oleik asit karışım filmlere ait SEM yankesit görüntüleri (filmler sıvı azotla dondurulup kırılmıştır; A: 3.0 mg/cm<sup>2</sup> kateşin ve 3.0 mg/cm<sup>2</sup> gallik asit içeren film; B: 3.0 mg/cm<sup>2</sup> kateşin, 3.0 mg/cm<sup>2</sup> gallik asit, zeinin %10 u kadar oleik asit ve zeinin %10 u kadar lesitin içeren karışım film; C: 3.0 mg/cm<sup>2</sup> kateşin, 3.0 mg/cm<sup>2</sup> gallik asit, zeinin %20 si kadar oleik asit ve zeinin %10 u kadar lesitin içeren karışım film; D: 3.0 mg/cm<sup>2</sup> kateşin, 3.0 mg/cm<sup>2</sup> gallik asit, zeinin %40 ı kadar oleik asit ve zeinin %10 u kadar lesitin içeren karışım film; Büyütme: 1000X)

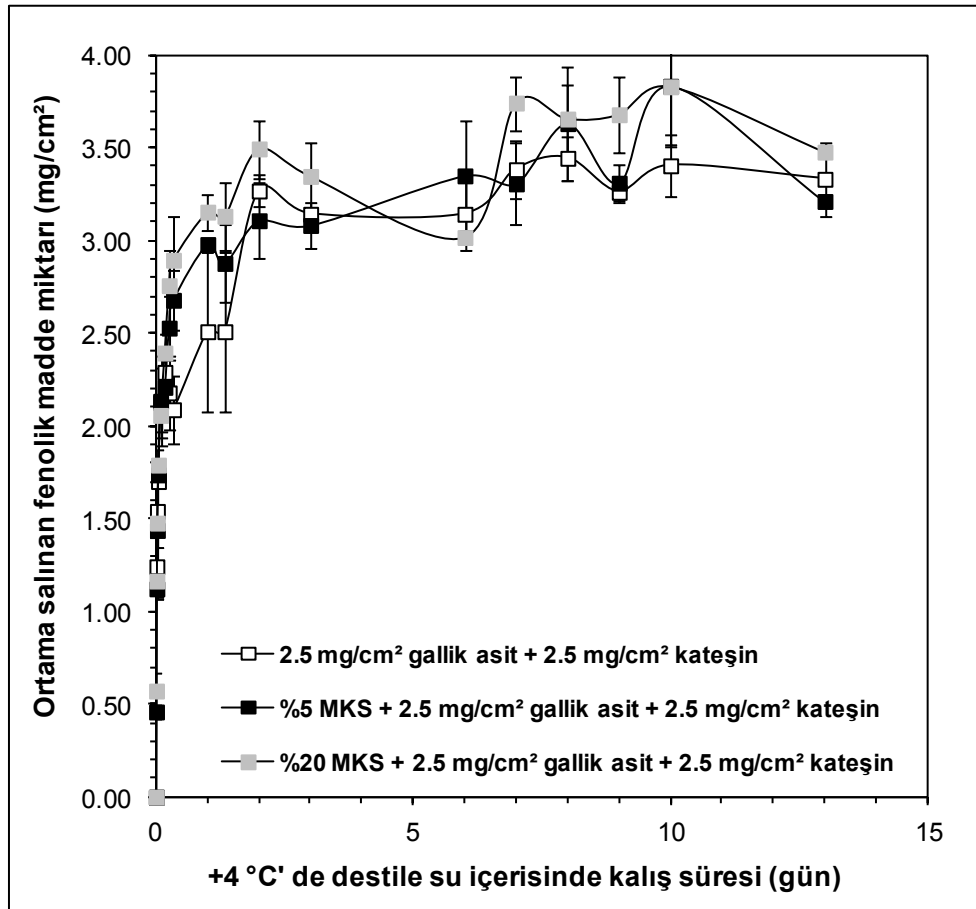
#### 4.1.6. Kateşin ve Gallik asit'in birarada kontrollü salımı için zein-selüloz kompozit filmler geliştirilmesi

Zein filmler içerisine mikrokristal yapıda selüloz (MKS) katılmasıyla amaç filmler içerisinde fenolik maddelerin difüzyonu için dolambaçlı bir yol oluşturulması ve salım hızının azaltılmasıdır. Ayrıca, selülozun fenolik maddelerle H bağı oluşturabileceği çok sayıda glikozidik oksijen ve hidroksil grubu içermesinin de fenolik madde salımını yavaşlatabileceği değerlendirilmiştir. Gerçekleştirilen ön denemeler sonucunda filmler içerisine yapısal bir sorun oluşmadan katılabilecek maksimum MKS miktarının yaklaşık %20 kadar olduğu belirlenmiştir. Bu konsantrasyon üzerinde MKS ilavesi filmlerin matriks bütünlüğünü

bozmakta ve filmler gerdirildiği zaman kolayca yırtılmalarına neden olmaktadır.

#### 4.1.6.1. Kateşin ve gallik asit'i birarada içeren zein-selüloz kompozit filmlerin salım deneyleri

Şekil 4.22'de MKS ilavesinin gallik asit ve kateşin ilave edilmiş zein-selüloz kompozit filmlerde fenolik madde salımı üzerine etkisi görülmektedir. Elde edilen sonuçlar MKS ilavesinin fenolik madde geçişini yavaşlatmadığı, aksine hızlandırdığını göstermektedir. Buna göre MKS tarafından film içerisinde oluşturulmuş muhtemel bir ağyapının fenolik madde salım hızı üzerine bir etkisi olmadığı açıktır. Anlaşıldığı kadarıyla filmlerde MKS ilavesiyle meydana gelen hidrofilitik artışıyla filmlerin su alma hızı (swelling) artmış ve buna bağlı fenolik madde geçişi de hızlanmıştır. Elde edilen bu sonuçla MKS kullanımının özellikle fenolik madde geçişinin hızlandırılması gerektiği durumlarda kullanılabilecek bir kontrollü salım mekanizması oluşturduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4. 22. Kateşin ve gallik asiti birarada içeren zein-MKS kompozit filmlerde fenolik madde salım profilleri (MKS: mikrokristal yapıda selüloz)

## 4.2. LİSOZİM'İN KONTROLLÜ SALIMI İÇİN KOMPOZİT VE KARIŞIM YENİLEBİLİR ZEİN FİLMLER GELİŞTİRİLMESİ

### 4.2.1. Lisozim'in kontrollü salımı için fenolik bileşikler içeren zein-mum kompozit filmler geliştirilmesi

Bu çalışmalarda tarafımızdan üretilmiş olan kısmi saf lisozimin konsantrasyonu en az 0.7 mg/cm<sup>2</sup> düzeyinde tutulmuştur. Bu konsantrasyon tarafımızdan daha önce gerçekleştirilmiş aktif paketlenme ile ilgili 2 ayrı TÜBİTAK projesinde (TÜBİTAK-MISAG Proje No : 102M021 ve TÜBİTAK-MAG 104M386) laboratuvar ortamında patojen, patojen indikatörü ve bozulma yapan bakterilerle, gerçek gıdalar üzerinde zein filmlerle yürütülen detaylı denemeler sonucunda optimal etkin konsantrasyon olarak belirlenmiştir (UYSAL ve ark., 2011)

Çalışmanın bu aşamasında kateşin ve gallik asitin kontrollü salımı için kullanılmış olan zein-karnauba mumu kompozit filmler lisozimin kontrollü salımı için de denemiştir. Ancak, gerek filmlerin çapraz bağlanarak ağyapılarının güçlendirilmesi ve dolayısıyla kontrollü salım etkisi elde edilebilmesi, gerekse antimikrobiyel ve antioksidant etkileri nedeniyle filmler içerisinde fenolik bileşikler muhafaza edilmiş ve lisozim ortama ikinci bir biyoaktif ajan olarak katılmıştır. Ayrıca, çalışmanın kapsamı ve filmlerin özelliklerinin çeşitlendirilebilmesi amacıyla lisozim içeren zein filmler karnauba mumu yerine kandelilla mumu veya bal mumu ilavesiyle de kompozitleştirilmiştir. Denemiş olan yeni mumlar karnauba mumuna göre farklı zincir uzunluğunda yağ asitleri ve alkoller içermektedir (Tablo 4.10). Dolayısıyla bu farklı mumların biyoaktif ajanların salım hızına etkisinin farklı olacağı düşünülmüştür.

Tablo 4. 10. Zein filmler içerisine ilave edilmiş olan mumları oluşturan bileşenlerin moleküler özellikleri

Mum tipi	Mumun içerdiği alkollerin zincir uzunluğu	Mumun içerdiği yağ asitlerinin zincir uzunluğu
Karnauba mumu	C <sub>24</sub> -C <sub>34</sub>	C <sub>22</sub> -C <sub>28</sub>
Kandelilla mumu	C <sub>28</sub> -C <sub>34</sub>	C <sub>28</sub> -C <sub>34</sub>
Bal mumu	C <sub>16</sub> -C <sub>18</sub>	C <sub>24</sub> -C <sub>34</sub>



#### **4.2.1.1 Lisozim'in kontrollu salımı için kateşin veya gallik asit içeren zein-mum kompozit filmler geliştirilmesi**

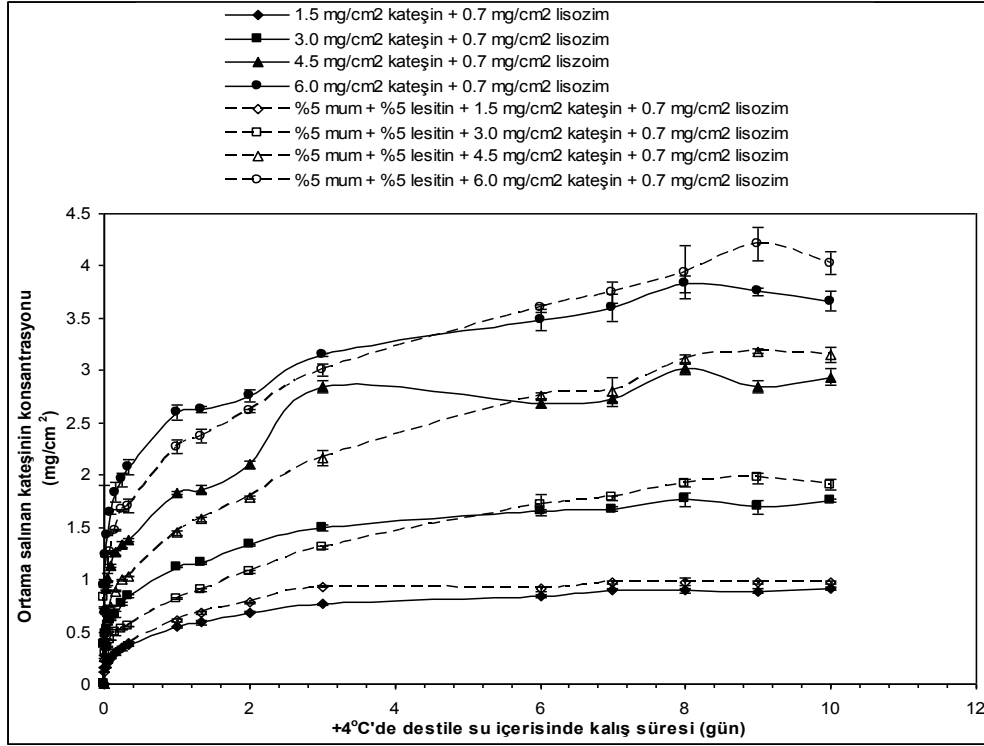
##### **4.2.1.1.1. Kısmi saf lisozim ve kateşin içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerden kateşin salımı**

Şekil 4.23'den de anlaşılacağı üzere lisozim ve 1.5 mg/cm<sup>2</sup> düzeyinde kateşin içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerde kateşin salım hızı birbirinden çok da farklı değildir. Ancak, daha yüksek düzeyde yani 3.0, 4.5 ve 6.0 mg/cm<sup>2</sup> kateşin ilave edilmiş zein-karnauba mumu kompozit filmlerde kateşin salımı zein filmlere kıyasla daha yavaş şekilde gerçekleşmektedir. Önceki bölümlerden hatırlanacağı üzere biyoaktif ajan olarak yalnızca kateşini içeren filmlerde, lesitin yardımıyla filmlere karnauba mumu ilave edilmiş ancak 0.75 mg/cm<sup>2</sup> düzeyinde kateşin içeren filmlerde kontrollu salım etkisi elde edilememiştir. Buna karşın 1.5 veya 3.0 mg/cm<sup>2</sup> kateşin içeren filmlerde karnauba mumu ve lesitin kullanımıyla kompozit yapı oluşturulması bu ajanları içermeyen standart zein filmlere göre kateşin geçişini kayda değer şekilde yavaşlatmıştır (bak Şekil 4.9). Buna göre lisozim ve kateşin içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerde kateşin için oluşan kontrollu salım etkisi, tek başına kateşin içeren zein-karnauba mumu filmlere göre daha yüksek kateşin konsantrasyonunda oluşmuştur (3.0 mg/cm<sup>2</sup> kateşin konsantrasyonundan itibaren). Lisozimin fenolik bileşikleri kısmen bağladığı ve onlarla kompleks oluşturduğu RAWEL ve ark (2000) tarafından gösterilmiştir. Dolayısıyla lisozim varlığında kateşinin bir kısmının lisozimce bağlanması ve film matrisinde istenilen düzeyde çapraz bağlama gerçekleşmesi için gerekli kateşin miktarının artması mümkündür.

Lisozim ve kateşinin birarada kullanıldığı zein-karnauba mumu kompozit filmlerde zein filmlere göre en yüksek kontrollu salım etkisi 3 ve 4.5 mg/cm<sup>2</sup> düzeyinde kateşin içeren filmlerde elde edilmiştir. Nitekim, kompozit zein filmlerde 3.0 veya 4.5 mg/cm<sup>2</sup> kateşin içeren filmlerde 1. gün sonunda ortama geçen kateşin miktarı, zein filmlerdekine göre sırasıyla % 28 ve % 22 daha azdır. Kateşin konsantrasyonunun 6 mg/cm<sup>2</sup>'ye yükseltilmesi ise kateşinin kontrollu salımı üzerinde beklendiği düzeyde olumlu bir etki yapmamakta ve zein ve zein – mum kompozit filmler arasındaki salım hızı farkı nispeten azalmaktadır. Bu durumun karnauba mumuna kıyasla hidrofilik sayılabilecek kateşinin film içerisindeki oranının çok yükselmesiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca yüksek kateşin konsantrasyonu nedeniyle filmler içerisinde serbest, yani herhangi bir etkileşim içerisinde (H bağı ve iyonik etkileşimler) olmayan ve kolayca ortama salınabilecek kateşin oranı da artmaktadır.

Tablo 4.11'da lisozim ve kateşin içeren filmlerde salım deneyleri sonucunda ortama geçen toplam kateşin miktarları ve bunlara karşılık gelen antioksidant aktivite değerleri

görülmektedir. Buna göre gerek zein, gerekse zein-mum kompozit filmlerde ortama geçen toplam kateşin miktarlarının birbirine yakın olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4. 23. Kısımlı saf lizoim ve kateşin içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerin kateşin salım profili (filmler destile su içerisinde serbest halde çalkalanmaktadır)

#### 4.2.1.1.2. Kısımlı saf lizoim ve kateşin içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerden lizoim salımı

Lizoim ve kateşin içeren filmlerden lizoim salımı yeniden film üretimi ve ayrı salım deneyleri düzenlenerek kateşin miktarı yerine bu kez lizoim aktivitesinin görüntülenmesiyle belirlenmiştir. Daha önce tarafımızdan yürütülen çalışmalardan da bilindiği kadarıyla lizoim hidrofilik yapısı nedeniyle zein filmlerden hızla su içerisine geçen bir enzimdir (GUCBILMEZ ve ark. 2007; MECITOGLU ve ark 2006). Zein filmlerden lizoim salımı sırasında zamanla ortama geçen aktivite maksimum düzeye ulaşarak bir pik yapmakta ve bazı durumlarda aktivite yaklaşık sabit kalırken, bazı durumlarda da aktivitede bazı dalgalanmalar yaşanmaktadır. Herhangi bir kontrollü salım mekanizması içermeyen ve yalnızca lizoim içeren zein filmlerde bu tipik davranış Şekil 4.24'de de görülmektedir. Burada lizoimin

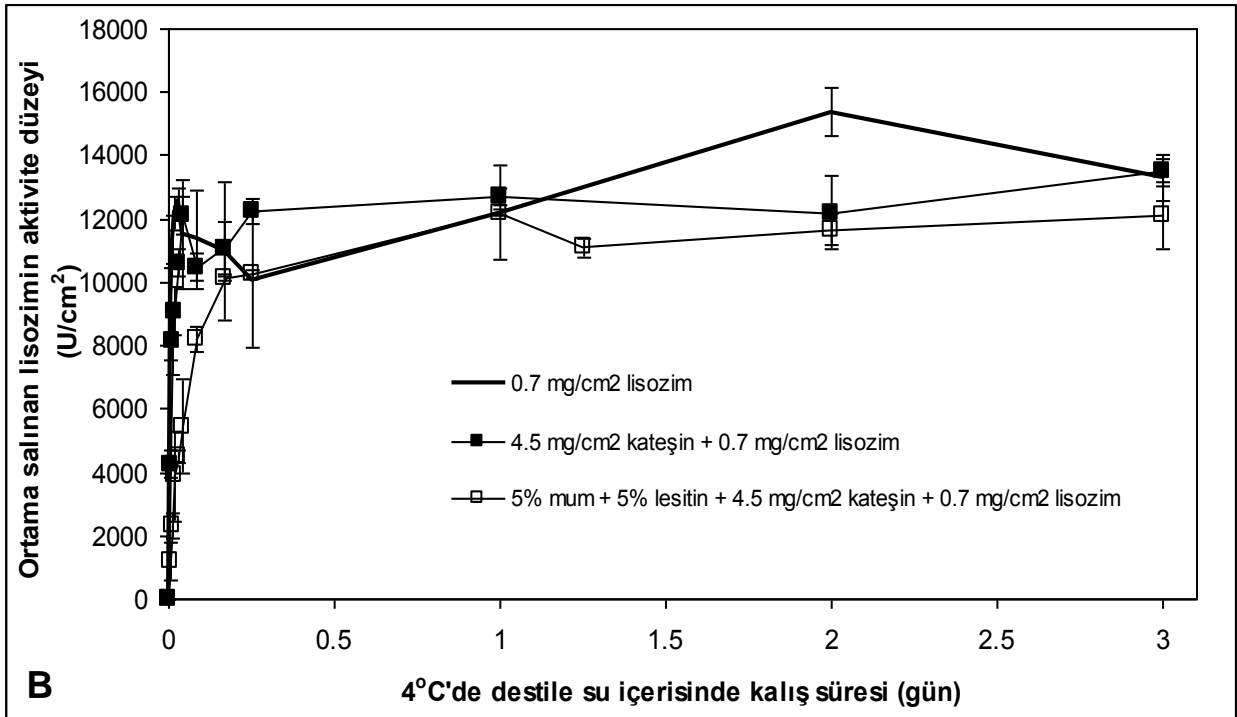
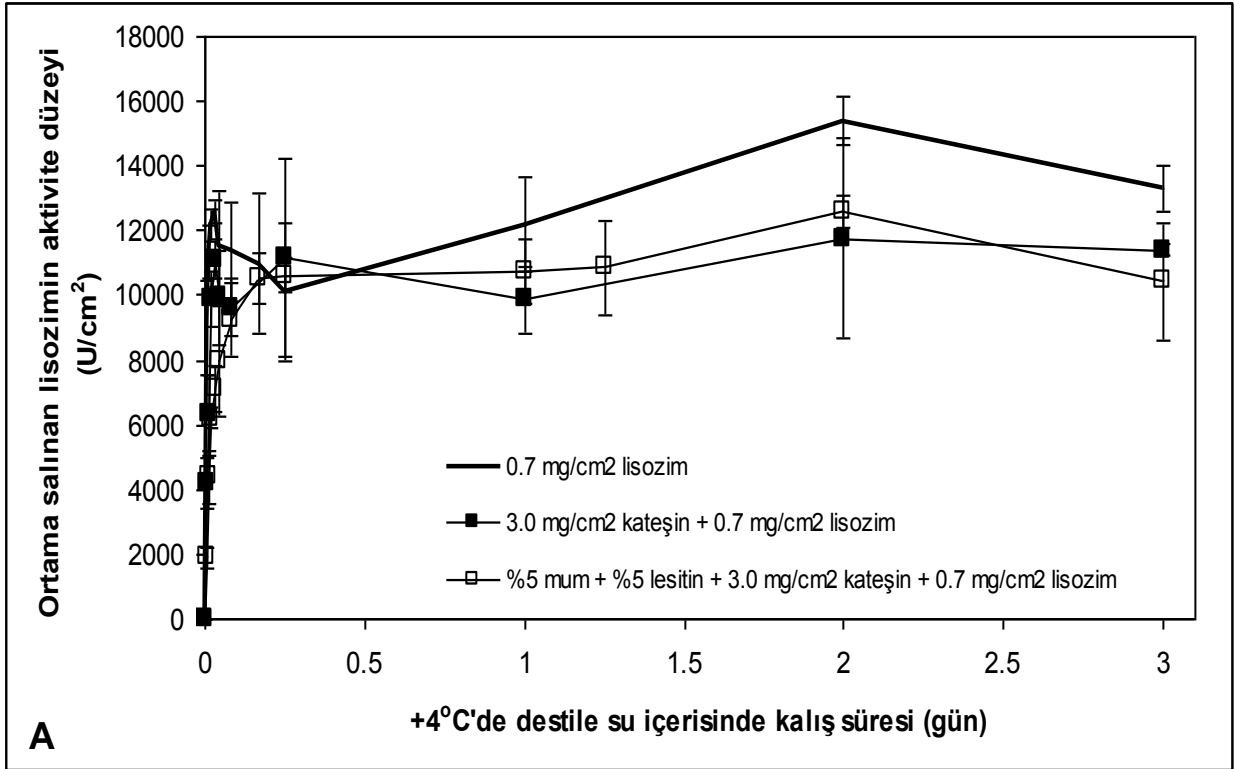
Tablo 4. 11. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerde salınan toplam lizozim aktiviteleri, kateşin miktarları ve antioksidant aktiviteler

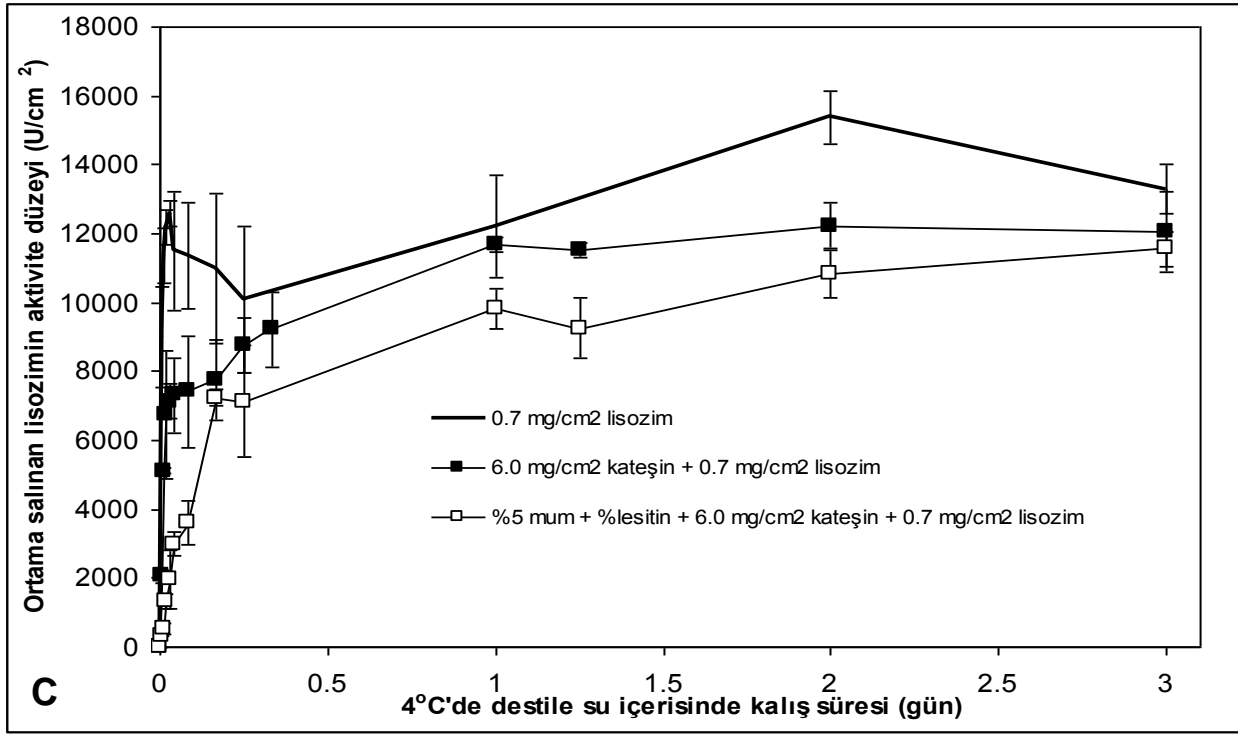
Film bileşimi				Salınan toplam lizozim aktivitesi (U/cm <sup>2</sup> )	Salınan toplam kateşin miktarı (mg/cm <sup>2</sup> )	Salınan toplam antioksidant aktivite, TEAC (µmol Troloks/cm <sup>2</sup> )
Kateşin (mg/cm <sup>2</sup> )	Lizozim (mg/cm <sup>2</sup> )	Mum (%) <sup>a</sup>	Lesitin (%) <sup>a</sup>			
-	0.7	-	-	15372 ±748	- <sup>b</sup>	-
1.5	0.7	-	-	13524 ±928	0.91 ±0.02(61) <sup>c</sup>	14.3
3.0	0.7	-	-	11758 ±194	1.77 ±0.06(59)	27.4
4.5	0.7	-	-	13481 ±419	3.02 ±0.06(67)	46.0
6.0	0.7	-	-	12221 ±655	3.83 ±0.08(64)	60.5
1.5	0.7	5	5	13076 ±1091	0.98 ±0.03(65)	15.7
3.0	0.7	5	5	12603 ±498	1.97 ±0.05(66)	31.8
4.5	0.7	5	5	12205 ±75	3.19 ±0.02(71)	51.4
6.0	0.7	5	5	11551 ±488	4.21 ±0.16(70)	67.9

<sup>a</sup>zeinin yüzdesi olarak mum ve lesitin miktarları; <sup>b</sup>ölçülmemiştir; <sup>c</sup> filmlerden salınan toplam fenolik maddenin filmlere ilave edilen toplam fenolik maddeye yüzde oranı

kantitatif olarak miktarının değil, miktarla doğru orantılı olan kantitatif aktivite düzeyinin ölçüldüğü özellikle hatırlatılmalıdır. Dolayısıyla ölçümlerde özellikle salım deneyinin uzayan dönemlerinde oluşan bazı dalgalanmaların lizozim miktarından çok aktivitesindeki değişimleri yansıttığı unutulmamalıdır. Verilmiş olan Şekil 4.24A, 4.24B ve 4.24C arka arkaya dikkatlice incelenecek olursa, kateşin konsantrasyonu arttıkça zein-karnauba mumu kompozit filmlerde lizozim geçişinin kontrol zein filmler ve yalnızca kateşin içeren kontrol zein filmlere kıyasla giderek yavaşladığı görülmektedir. Buna göre filmler içerisine mum ilave edilmesiyle oluşan hidrofobiklik artışı ve kateşinin oluşturduğu ağyapının birarada gösterdiği etki sayesinde elde edilen kontrollü salım stratejisinin gerek lizozim, gerekse kateşinin kontrollü salımı için kullanılabilmesi anlaşılmalıdır. Özellikle 4.5 mg/cm<sup>2</sup> kateşin düzeyinde zein-karnauba mumu kompozit filmlerde gerek kateşinin, gerekse lizozimin geçişinin yavaşlatılabildiği bir kontrollü salım etkisi oluşması dikkat çekicidir. Diğer yandan bir tek lizozimin kontrollü salımı düşünülünce en yüksek konsantrasyon olan 6.0 mg/cm<sup>2</sup> düzeyinde kateşin içeren, zein-mum kompozit filmlerde lizozim geçiş hızının diğer tüm filmlerdekinden daha yavaş olması da kayda değer bir sonuçtur. Bu sonuç birden fazla kontrollü salım mekanizması içeren (mum nedeniyle oluşan hidrofobiklik ve "tortuosity" artışı ile fenolik maddece oluşturulan ağyapı) filmlerin tek kontrollü salım mekanizması içeren (fenolik maddece oluşturulan ağyapı) filmlere

göre daha avantajlı olduğunu bir kez daha göstermektedir.



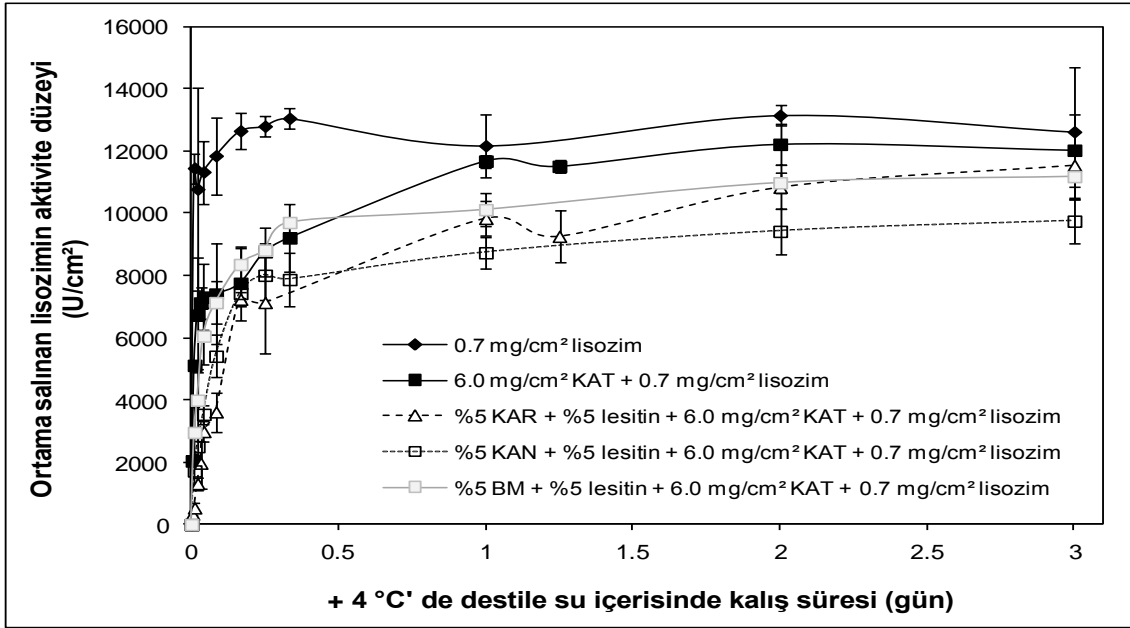


Şekil 4. 24. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerin lizozim salım profilleri (Not-1: filmler destile su içerisinde serbest halde çalkalanmaktadır; Not-2: 3 (A); 4.5 (B) ve 6 (C) mg/cm<sup>2</sup> kateşinin salım hızına etkisi)

#### 4.2.1.1.3. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein-kandelilla mumu ve zein-balmumu kompozit filmlerin lizozim salımı

Şekil 4.25'de farklı mumlar ve daha önce çalışılmış olan karnauba mumu ve en iyi kontrollü salım etkisinin sağlandığı 6 mg/cm<sup>2</sup> düzeyinde kateşin içeren filmlerde lizozimin salım profilleri görülmektedir. Salım kurveleri incelenecek olursa lizozimin salım hızının yavaşlatılması için filmler içerisine bal mumu ilave edilmesinin karnauba mumuna göre etkisinin daha az olduğu görülmektedir. Ancak, bal mumu ve kateşin içeren kompozit filmlerden lizozim salımının, tek başına kateşin içeren filmlerinkinden daha yavaş olması bu mumun da az da olsa lizozim salımını yavaşlatabildiğini göstermektedir. Buna karşın kateşin içeren kompozit filmlerde kandelilla mumu kullanılması lizozimin geçiş hızının yavaşlatılmasında en az karnauba mumu kadar etkili olmuştur. Ancak, karnauba mumu içeren kompozit filmlerden ortama geçen toplam lizozim aktivitesinin kandelilla mumu içeren kompozit filmlere göre biraz daha yüksek olması karnauba mumu kullanımının daha avantajlı olabileceğini işaret etmektedir. Genel olarak mum içeren kompozit filmlerde salım deneyleri sırasında filmlerden ortama geçen toplam kısmi saf lizozim aktivitesinin yüksek olması kayda

değer miktarda enzimin filmler içerisinde tutuklanmadığını gösteren olumlu bir veridir.



Şekil 4. 25. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein ve zein-mum kompozit filmlerin lizozim salım profilleri (not-1: karnauba mumuna ait salım kurvesi bu şekilde kıyaslama amacıyla 2. kez kullanılmıştır; not-2: KAR: karnauba mumu, KAN: kandelilla mumu, BM: bal mumu, KAT: kateşin; not-3: filmler destile su içerisinde serbest halde çalkalanmaktadır)

#### 4.2.1.1.4. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein-mum kompozit filmlerin mekanik özellikleri

Lizozim ve kateşinin birarada filmlere ilave edilmesinin filmlerin mekanik özellikleri üzerine olan etkisi Tablo 4.12'de görülmektedir. Hatırlanacağı üzere filmler içerisine kateşin ilave edilmesi elastikiyeti kayda değer şekilde artırmakta, ancak filmlerin gerilme gücü ve elastik modulus değerlerini azaltmaktaydı. Bu filmlerde yüksek kateşin içeriği nedeniyle mekanik testler öncesi uygulanan kurutma işlemi 24 saatten 48 saate çıkarılmıştır, dolayısıyla filmlere sadece kateşin ilavesinin etkisini görebilmek ve geliştirilen zein-mum kompozit filmlerle karşılaştırabilmek için farklı konsantrasyonlarda sadece kateşin içeren filmlerin mekanik özellikleri tekrar incelenmiştir. Lizozimin kontrollü salımı açısından en yüksek etkinin sağlandığı 6.0 mg/cm<sup>2</sup> kateşin içeren filmlerde, gerek zein-karnauba mumu kompozit filmlerde, gerekse zein filmlerde tek başına kateşin ilave edilmiş zein filmlerdekine benzer etkiler görülmüş yani elastikiyet artmış ancak gerilme ve elastik modulus düşmüştür. Zein-mum kompozit filmlerde farklı mumlar kullanılması ise filmlerin gerilme gücü ve elastik

modulus gibi değerlerini değiştirmesede; filmlerin uzama değerinin karnauba mumu ilavesinden daha az etkilendiği belirlenmiştir.

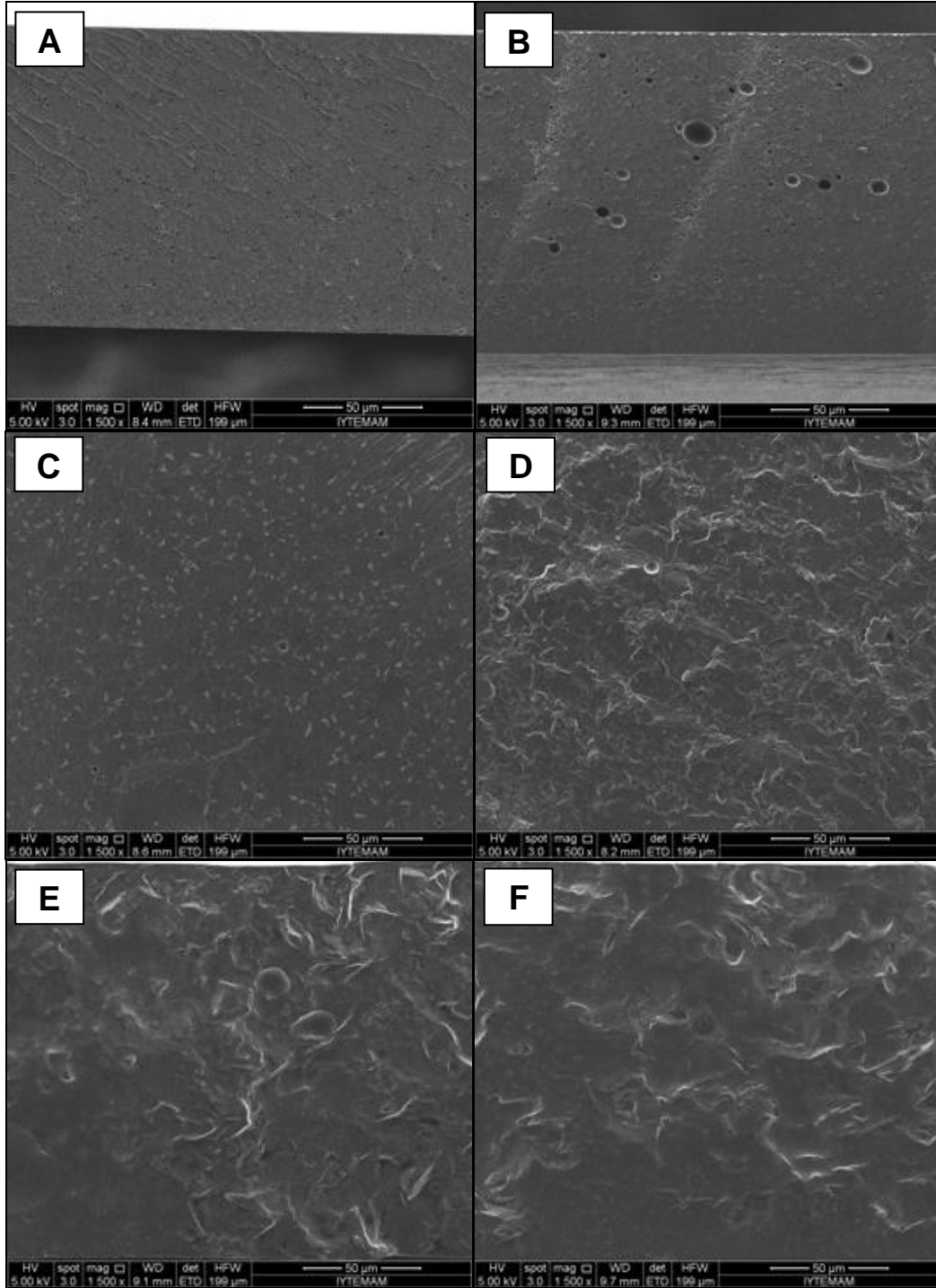
Tablo 4. 12. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein-mumu kompozit filmlerin mekanik özellikleri

Film bileşimi				Gerilme gücü (MPa)	Uzama (%)	Elastik modulus (MPa)	Film kalınlıkları ( $\mu$ m)
Kateşin (mg/cm <sup>2</sup> )	Lizozim (mg/cm <sup>2</sup> )	Mum (%) <sup>a</sup>	Lesitin (%) <sup>a</sup>				
-	-	-	-	17.67 $\pm$ 0.93a <sup>b</sup>	4 $\pm$ 1f	775 $\pm$ 44a	113 $\pm$ 1
1.5	-	-	-	7.93 $\pm$ 0.61c	4 $\pm$ 2f	397 $\pm$ 25c	163 $\pm$ 4
3.0	-	-	-	3.23 $\pm$ 0.58d	33 $\pm$ 5e	167 $\pm$ 40d	191 $\pm$ 3
6.0	-	-	-	0.93 $\pm$ 0.20e	172 $\pm$ 23a	31 $\pm$ 7e	186 $\pm$ 3
-	0.7	-	-	13.80 $\pm$ 1.26b	3 $\pm$ 1f	670 $\pm$ 45b	138 $\pm$ 1
6.0	0.7	-	-	1.02 $\pm$ 0.21e	136 $\pm$ 26b	42 $\pm$ 8e	189 $\pm$ 2
6.0	0.7	5(KAR) <sup>c</sup>	5	1.11 $\pm$ 0.08e	95 $\pm$ 7c	66 $\pm$ 6e	176 $\pm$ 2
6.0	0.7	5(KAN) <sup>c</sup>	5	0.89 $\pm$ 0.08e	65 $\pm$ 15d	56 $\pm$ 6e	179 $\pm$ 2
6.0	0.7	5(BM) <sup>c</sup>	5	0.77 $\pm$ 0.07e	62 $\pm$ 18d	39 $\pm$ 9e	172 $\pm$ 2

<sup>a</sup>zeinin yüzdesi olarak mum ve lesitin miktarları; <sup>b</sup>Kolonlardaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir (P<0.05); <sup>c</sup>Zein filme ilave edilen mum türleri: KAR: karnauba mumu; KAN: kandelilla mumu; BM: balmumu

#### 4.2.1.1.5. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein-mum kompozit filmlerin SEM görüntüleri

Şekil 4.26 'daki SEM görüntüleri zein film yapısında lizozim, kateşin, mum, ve lesitin ilavesiyle meydana gelen değişiklikleri göstermektedir. Sadece kateşin ilavesinin zein filmin gözenekli yapısını değiştirdiği tekrar görülmektedir (Şekil 4.26C). Mum ilave edilen filmlerin görüntüleri incelendiğinde, yapıda çok sayıda kıvrım ve yarı oluşumu ile birlikte pürüzlü oluşum dikkat çekmektedir. Daha önce de belirtildiği gibi filmlere mum ilavesi ile hem filmlerde hidrofobikliğin artması hem de "tortuosity" artışı hedeflenmektedir. SEM görüntüleri göstermektedir ki lizozimin difüzyon yolunun dolambaçlı hale gelmesi için yapılan mum ilavesi işleminin yapıda istenilen değişiklikleri meydana getirdiği gözlemlenmektedir.



Şekil 4. 26. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein ve zein-mum kompozit filmlere ait SEM yankesit görüntüleri (filmler sıvı azotla dondurulup kırılmıştır; A: kontrol zein film; B: 0.7 mg/cm<sup>2</sup> lizozim içeren zein film; C: 6.0 mg/cm<sup>2</sup> kateşin ve 0.7 mg/cm<sup>2</sup> lizozim içeren zein film; D: zein-karnauba mumu kompozit film; E: zein-kandellilla mumu kompozit film; F: zein- balmumu kompozit film (D, E, ve F görüntüleri için film bileşimi: 6.0 mg/cm<sup>2</sup> kateşin, 0.7 mg/cm<sup>2</sup> lizozim, zeinin %5 'i kadar mum ve zeinin %5 'i kadar lesitin içeren kompozit film); Büyütme: 1500X)

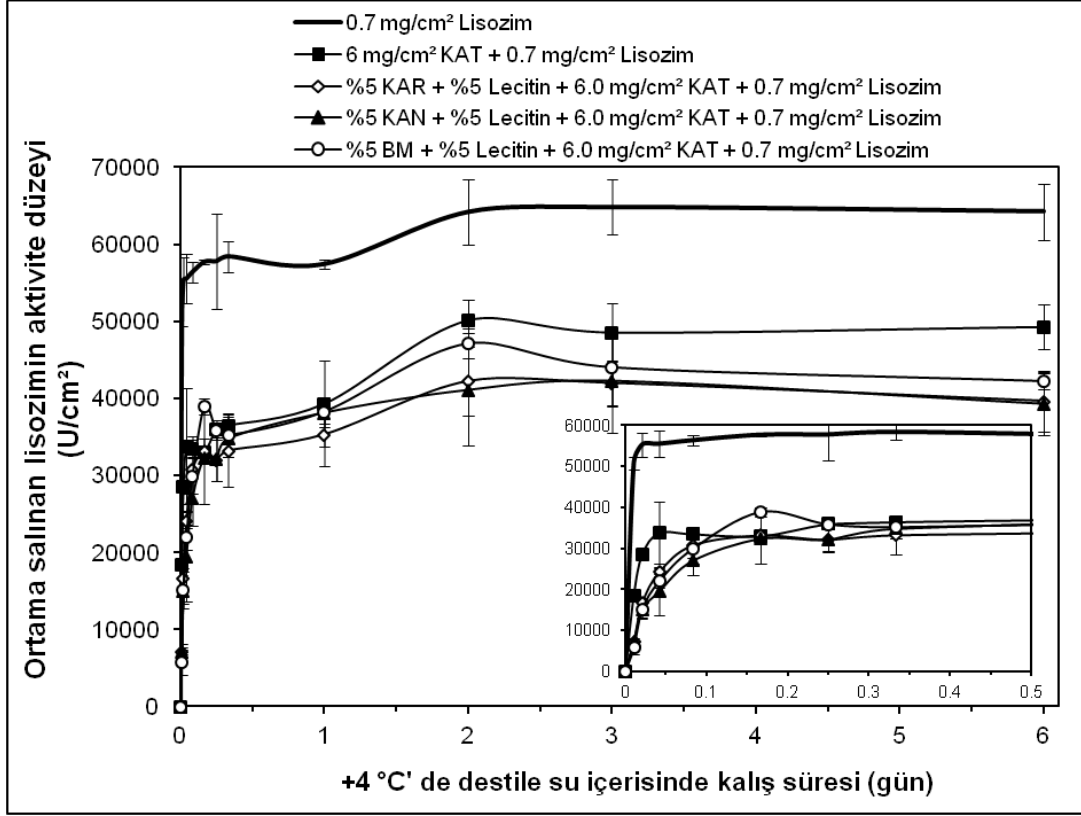


#### **4.2.1.1.6. Saf lizozim ve kateşin içeren zein-kandelilla mumu ve zein-balmumu kompozit filmlerin lizozim salımı**

Farklı mumlar içeren kompozit filmlerin salım deneyleri bir kez de saf lizozim kullanılarak yürütülmüştür (Şekil 4.27). Elde edilen sonuçlar mum-kompozit filmlerin kısmi saf lizozim gibi saf lizozim'in de geçiş hızını etkilediğini göstermektedir. Ancak, saf lizozimin zein-mum kompozit filmlerden salım profili kısmi saf lizoziminkinden oldukça farklıdır. Ayrıca kısmi saf lizozime göre saf lizozimin film içerisinde tutuklanma oranı daha yüksektir. Elde edilen kurveler incelendiği zaman tutuklanma oranının en az olduğu filmlerin yalnızca kateşin içeren zein filmler ve kateşin içeren zein-balmumu kompozit filmler olduğu ve tek başına kateşin ilavesinin bile saf lizozimin salım hızını etkili bir şekilde yavaşlattığı açıktır. Kateşin içeren zein filmlerin lizozimi salım profilinin kateşin içeren zein-mum kompozitlerinininkine oldukça benzer olması kateşinin film matrisinde oluşturduğu çapraz bağların istenilen kontrollü salım etkisini yaratabildiği ve filmlere mum ilavesiyle kompozit yapı oluşturmanın bu açıdan sınırlı bir fayda sağladığını göstermektedir. Saf lizozimin tarafımızdan etanol çöktürme yöntemiyle üretilmiş olan kısmi saf enzime göre farklı salım profilleri göstermesinin en büyük nedeni tahminimizce tuzla kristalizasyon yöntemiyle üretilen bu enzimin farklı moleküler ağırlığa ve konformasyona sahip olmasıdır. Moleküler ağırlığı ve konformasyonu farklı olan bir enzim film matrisiyle daha az veya çok etkileşime girerek farklı bir salım profili sergileyebilir. Nitekim, saf lizozimin zein filmlere göre daha hidrofobik olan zein-mum kompozit filmlerde kısmi safa göre daha fazla tutuklanması ve immobilizasyonu onun daha hidrofobik bir yapıya sahip olmasıyla ilgili olabilir. Tarafımızdan üretilmiş olan lizozim etanolla muamele edilerek üretilmiş olduğundan tuzla çöktürülmüş saf lizozime göre tersiyer ve kuaternar yapısında değişimler olması beklenen bir durumdur. Nitekim, etanolün lizozimin konformasyonunda ciddi değişimlere neden olduğu bilinmektedir (MECITOGLU ve ark., 2006).

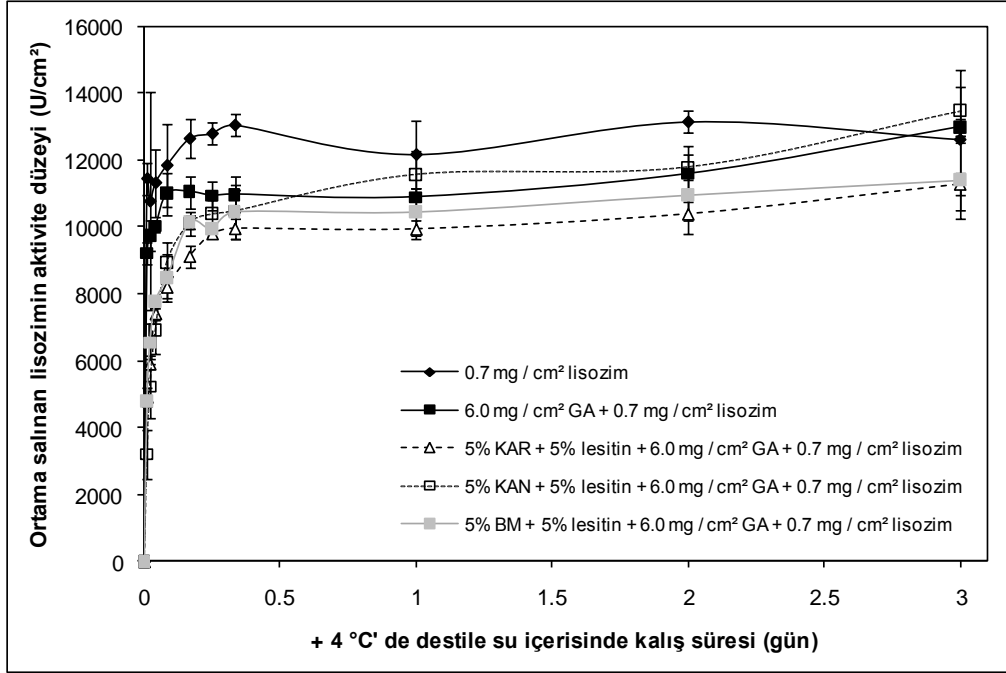
#### **4.2.1.1.7. Kısmi saf lizozim ve gallik asit içeren zein-karnauba mumu, zein-kandelilla mumu ve zein-balmumu kompozit filmlerin lizozim salımı**

Diğer yandan Şekil 4.28'da ise yine farklı mumlar içeren ancak kateşin yerine gallik asit ilave edilmiş filmlerin lizozim salım profilleri görülmektedir. Kurvelerden de görüldüğü üzere zein filmler içerisinde mum ve gallik asit ilavesinin mum ve kateşin ilavesine göre lizozim salımını yavaşlatmada daha düşük bir etki sağladığı açıktır. Özellikle mum içermeyen ve tek başına gallik asit içeren zein filmlerin başlangıç lizozim geçiş hızının tek başına kateşin içeren zein filmlerinkine göre daha yüksek olması dikkat çekicidir. Elde edilen bu sonuç tarafımızdan daha önce elde edilen gallik asit'in kateşin'e göre zein filmleri daha



Şekil 4. 27. Saf lisozim ve kateşin içeren zein ve zein-mum kompozit filmlerin lisozim salım profilleri (not-1: karnauba mumuna ait salım kurvesi bu şekilde kıyaslama amacıyla 2. kez kullanılmıştır; not-2: KAR: karnauba mumu, KAN: kandelilla mumu, BM: bal mumu, KAT: kateşin; not-3: filmler destile su içerisinde serbest halde çalkalanmaktadır)

gözenekli hale getirdiği bulgusunu doğrular niteliktedir. Ancak, kontrol filmlerin salım profilleri dikkate alındığı zaman gallik asit'in zein-mum kompozit filmlerde oluşturduğu ağ yapının da lisozim için sınırlı bir kontrollü salım etkisi yarattığı görülmektedir. Özellikle gallik asit içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerde başlangıç aşamalarında lisozimin kontrole göre ortama daha yavaş geçtiği açıktır. Yine gallik asit içeren zein-kandelilla mumu kompozit filmlerde lisozimin başlangıçta ortama aşamalı olarak yavaş bir şekilde geçtiği ve ilerleyen aşamalarda lisozim geçişinin devam ederek ortama salınan aktivite düzeyinin kontrol filmlerden salınan düzeye ulaştığı görülmektedir. Ancak, buna karşın karnauba ve bal mumu içeren filmlerde lisozim salımı 0.5. günden sonra oldukça yavaşlamakta ve adeta durmaktadır. Bu durum sözkonusu filmlerde az da olsa bir miktar lisozimin tutuklu kaldığını göstermektedir. Elde edilen tüm bu sonuçlar lisozimin salım hızının yavaşlatılması açısından kateşin içeren zein-mum kompozit filmlerin gallik asit içerenlere göre daha etkili olduğunu göstermiştir. Her ne kadar bunun başlıca nedeni yukarıda da değinildiği gibi gallik asitin zein filmleri daha



Şekil 4. 28. Kısmi saf lizozim ve gallik asit içeren zein ve zein-mum kompozit filmlerin lizozim salım profilleri (not-1: KAR:karnauba mumu, KAN: kandelilla mumu, BM: bal mumu, GA: gallik asit; not-2: filmler destile su içerisinde serbest halde çalkalanmaktadır)

gözenekli hale getirmesiye de, gallik asit içeren filmlerde lesitin kullanılmamasının da bunda bir miktar katkısı olması mümkündür. Tek başına gallik asit içeren filmlerde mum dağılımının daha homojen olmasını sağlayan lesitin'in ilavesi filmlerin kuruma süresini artırmaktadır. Dolayısıyla bu filmlerde lesitin kullanılmamış ve mum ilavesi yalnızca homojenizasyonla gerçekleştirilmiştir. Buna rağmen gallik asit'in kateşin'e göre daha yüksek biyoaktiviteye (antimikrobiyel ve antioksidant aktivite) sahip olması film üretiminde neden olduğu güçlüklerle rağmen caziptir.

Tablo 4.13'de lizozim dışında filmlerden ortama salınan ve antimikrobiyel ve antioksidant etki gösterebilecek fenolik madde miktarları da verilmiştir. Zein filmlerden lizozim geçişinin dengeye ulaşması 2-3 günde tamamlanırken, fenolik madde geçişinin bir dengeye ulaşması veya ortama geçen miktarın kayda değer düzeyin altına inmesi 14 gün kadar sürmektedir. Dolayısıyla verilen fenolik madde miktarları 14 gün sonra destile su içerisinde ölçülen miktarlardır. Elde edilen sonuçlar filmlerden gallik asit geçişinin kateşin geçişine göre biraz daha yüksek olduğunu göstermektedir. Nitekim, gallik asit içeren filmlerde ilave edilen fenolik maddenin %67-85 kadarı ortama geçerken, kateşin içeren filmlerde ilave edilen bu fenolik maddenin %62-72 kadarı destile suya geçmektedir. Bu durum hiç kuşkusuz daha önce belirtildiği gibi gallik asit'in kateşin'e göre zein filmlerin gözeneklilik düzeyini kayda

değer şekilde artırması ve gallik asit'in molekül ağırlığının kateşin'e göre düşük olmasıyla ilişkilidir. Diğer yandan gallik asit kateşin'den daha iyi bir antioksidant olduğundan (gallik asit'in antioksidant aktivitesi kateşin'e göre 2.1 kat daha fazladır) bu fenolik maddeyi içeren filmlerden ortama geçen antioksidant potansiyel de kateşin içeren filmlere göre 2-2.5 kat daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.29).

Tablo 4. 13. Kısmi saf lizozim ve fenolik madde içeren zein ve zein-mum kompozit filmlerden salınan toplam fenolik madde miktarları ve bunlara karşılık gelen antioksidant aktiviteler

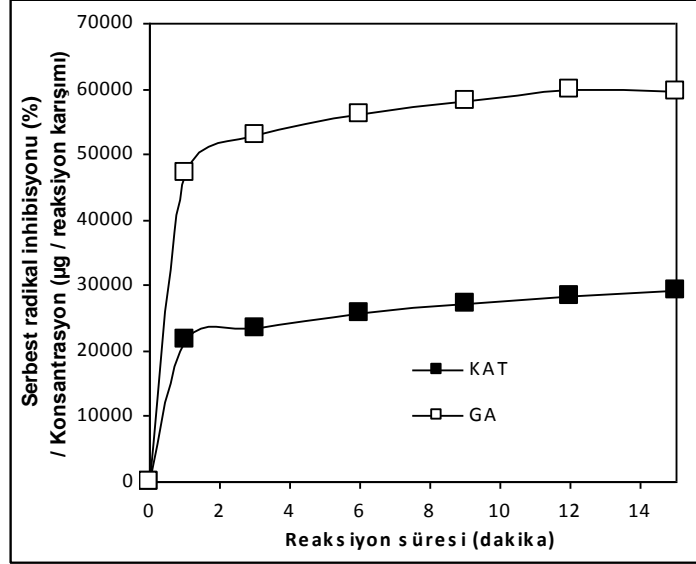
Fenolik madde (6.0 mg/cm <sup>2</sup> )	Film bileşimi			Salınan toplam GA veya KAT (mg/cm <sup>2</sup> )	Salınan toplam antioksidant akt. (µmol Trolox/cm <sup>2</sup> )  TEAC
	Lizozim (mg/cm <sup>2</sup> )	Mum (%5) <sup>a</sup>	Lesitin (%) <sup>a,b</sup>		
Kateşin	0.7	-	-	3.7 ± 0.1 (%62) <sup>d</sup>	59.1 ± 6.8
Kateşin	0.7	KAR <sup>c</sup>	5	4.2 ± 0.2 (%70)	67.3 ± 3.2
Kateşin	0.7	KAN	5	4.3 ± 0.1 (%72)	69.2 ± 1.4
Kateşin	0.7	BM	5	4.3 ± 0.1 (%72)	69.0 ± 1.5
Gallik asit	0.7	-	-	5.1 ± 0.2 (%85)	175.6 ± 6.8
Gallik asit	0.7	KAR	-	5.1 ± 0.3 (%85)	177.3 ± 11.0
Gallik asit	0.7	KAN	-	4.0 ± 0.3 (%67)	137.5 ± 8.8
Gallik asit	0.7	BM	-	5.0 ± 0.3 (%83)	172.9 ± 9.9

<sup>a</sup>Zeinin yüzdesi olarak mum ve lesitin miktarları; <sup>b</sup>tek başına gallik asit içeren filmlerde kuruma süresini uzattığından lesitin kullanılmamıştır; <sup>c</sup>KAR:karnauba mumu, KAN: kandelilla mumu, BM: bal mumu; <sup>d</sup>filmlerden salınan toplam fenolik maddenin filmlere ilave edilen toplam fenolik maddeye yüzde oranı

#### 4.2.1.1.8. Kısmi saf lizozim ve kateşin veya kısmi saf lizozim ve gallik asit içeren zein-mum kompozit filmlerin *Listeria monocytogenes* ve *Listeria innocua* üzerindeki antimikrobiyel etkisi

Çalışmanın bu aşamasında ilk olarak kısmi saf lizozim ve gallik asit içeren zein ve zein-mum kompozit filmlerin *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyel aktivitesi belirlenmiştir. Gallik asit yüksek antimikrobiyel aktivitesi yanında lizozime göre çok daha düşük bir moleküler ağırlığa sahiptir. Dolayısıyla agar üzerinde daha kısa bir süre içerisinde daha geniş bir alana difüze etme ve daha büyük zonlar oluşturma yeteneğindedir. Ayrıca, özellikle bazı mum içeren

filmlerde lizozim salım hızı diğer filmlere göre çok daha düşüktür. İşte bu dezavantajların azaltılması ve daha iyi bir kıyaslama yapılabilmesi amacıyla bu çalışmada literatürdeki



Şekil 4. 29. Gallik asit ve kateşin'in TEAC metoduyla ABTS serbest radikali kullanılarak ölçülmüş antioksidant aktivitelerini gösteren kurveler (not-1: AUC yöntemine göre eğrisi altında kalan alan büyük olan madde daha yüksek antioksidant aktivite göstermektedir; not-2: gallik asit ve kateşin'in antioksidant aktiviteleri sırasıyla 34.6 ve 16.1  $\mu\text{mol}$  troloks/mg'dır; not-3: KAT: kateşin, GA: gallik asit)

diğer bazı araştırmacıların da yaptığı gibi inkübasyondan önce tüm disk içeren agarlar 4 °C'de 6 saat bekletilmiş ve bakteri gelişimi için inkübasyon bundan sonra başlatılmıştır. Bu işlemin amacı üreme başlamadan önce farklı filmlerden geçen madde miktarları arasındaki farklılığın bir ölçüde azaltılmasıdır. Ancak, seçilen inkübasyon süresi ancak bakteriyel gelişimi önlemeyecek kadar uzun tutulabildiğinden bu yöntemin de kendi içerisinde belirli bir kısıtlaması bulunmaktadır. Tablo 4.14'den de anlaşılacağı üzere gerek tek başına lizozim, gerekse tek başına gallik asit içeren zein filmler *L. monocytogenes* üzerinde antimikrobiyel aktivite göstermektedirler. Ancak, beklendiği gibi tek başına gallik asit içeren filmler, tek başına lizozim içerenlerden yaklaşık 7 kat daha büyük zon oluşturmuşlardır. Diğer yandan lizozim ve gallik asiti birarada içeren zein ve zein-mum kompozit filmler tek başına gallik asit içeren zein filmlerle benzer veya biraz daha az antimikrobiyel aktivite göstermektedirler. Ancak, bu filmlerin iki farklı biyoaktif ajan içerdiği ve antimikrobiyel spektrumunun tek başına gallik asit içeren filmlere göre çok daha geniş olabileceği unutulmamalıdır. Özellikle oksidasyonun hızlı gerçekleşeceği lipidlerce zengin gıdalarda aynı zamanda antioksidant olan gallik asitin hızla okside olarak tükenebileceği veya gıdalardaki proteinlerle kompleks

yaparak nörtalize olabileceği (tanning effect) dolayısıyla filmlerdeki antimikrobiyel aktivitenin liozime daha çok bağılı hale gelebileceği özellikle belirtilmelidir.

Geçmiş çalışmamızda liozimin zein filmler içerisindeki antimikrobiyel aktivitesinin oldukça stabil olduğu ve 3-4 aylık bir depolamayla bile değişmediği belirlenmiştir (MECITOGLU ve ark., 2006). Ayrıca, gerçekleştirilen çok sayıdaki geçiş deneyinde de liozimin kateşin bulunan ortamlarda oldukça stabil olduğu belirlenmiştir. Ancak, gallik asit ve liozim-gallik asit karışımının zein filmler içerisindeki stabilitesi tam olarak bilinmemektedir. İşte bu nedenle gallik asit ve liozim-gallik asit içeren filmlerin yarısı ilk deneyden bir hafta sonra bir kez daha test edilmiş ve antimikrobiyel aktivitelerinin nasıl değiştiği gözlenmiştir. Depolanmış filmlerle elde edilen sonuçlar filmlerin *L. monocytogenes*'e karşı olan antimikrobiyel aktivitesinde 7 gün içerisinde kayda değer bir değişim olmadığını doğrular niteliktedir (Tablo 4.14). Bu sonuç geliştirilen filmlerin üretilip kullanım için dağıtılması için belirli bir zaman olduğunu gösteren uygulama açısından anlamlı bir veridir.

*L. monocytogenes*'e karşı yürütölen antimikrobiyel test çalışmalarının ikinci aşamasında liozim ve kateşin içeren zein ve zein-mum kompozit filmlerin antimikrobiyel etkileri test edilmiştir. Ancak, tek başına liozim içeren filmler haricinde bu filmlerin oluşturduğu zonların berrak değil bulanık olduğu belirlenmiştir (ölçüm alınmadığından sonuçlar verilmemiştir). Bu sonuç kateşin içeren zein-mum kompozit filmlerde liozim salım hızının oldukça düşük olmasının bu filmlerin test sırasındaki antimikrobiyel etkisini azalttığını göstermektedir. Kateşinin *L. monocytogenes*'e karşı etkili bir fenolik madde olduğu literatürde belirtilmektedir (VAQUERO ve ark., 2007). Bununla birlikte çalışılmış olan suşunun tesadüfi olarak deneysel ortamda kateşine karşı direnç gösteren bir suş olması da mümkündür. Ancak, filmler içerisinde kateşine ilaveten yine bu bakteriye karşı etkili olan liozim de bulunmaktadır ve bu sonuç sözkonusu bakterinin gerçek bir gıda uygulamasında liozim ve kateşin karışımına karşı direnç göstereceği anlamına gelmemektedir. Nitekim, bu raporda sözkonusu liozim ve kateşin içeren zein filmlerin kullanıldığı peynirlerde *L. monocytogenes* gelişimi engellenebilmiştir (bak bölüm 4.3).

Geliştirilmiş olan liozim ve kateşin içeren filmlerin antimikrobiyel etkisinin somut olarak görölebilmesi amacıyla bu filmlerin antimikrobiyel testleri bir kez de *L. innocua* bakterisi test mikroorganizması olarak kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.15). Elde edilen sonuçlar çalışılan konsantrasyonda tek başına kateşin içeren filmlerde *L. innocua*'ya karşı zon oluşmadığını göstermiştir. Ancak, diskler kaldırıldığı zaman kateşin içeren zein filmlerin yerleştirildiği bölgelerde bakteri üremesi olmadığı, buna karşın kontrol filmlerde disklerin altında da yoğun üreme olduğu belirlenmiştir. Bu daha önceki deneylerde tek başına kateşin içeren filmler için de elde edilmiş olana benzer ve sınırlı bir antimikrobiyel etkiyi ifade eden bir sonuçtur. Liozim ve kateşini birarada içeren filmlerde ise diskler etrafında berrak zonlar

Tablo 4. 14. Kısmi saf lizoim ve gallik asit içeren zein ve zein-mum kompozit filmlerin *Listeria monocytogenes*'e karşı antimikrobiyel etkisi

Filmlerin bileşimi			Ortalama zon alanı (mm <sup>2</sup> ) <sup>b</sup>	
Gallik asit (mg/cm <sup>2</sup> )	Lizozim (mg/cm <sup>2</sup> )	Mum ve lesitin (%) <sup>a</sup>	Yeni üretilmiş filmler	7 gün depolan- mış filmler
-	-	-	-	Test edilmedi
-	0.7	-	98 ± 14a <sup>c</sup>	Test edilmedi
6.0	-	-	690 ± 88c	588 ± 45a
6.0	0.7	-	621 ± 88bc	624 ± 96a
6.0	0.7	5 (KAR) <sup>d</sup>	601 ± 52bc	665 ± 65a
6.0	0.7	5 (KAN) <sup>d</sup>	514 ± 75b	610 ± 78a
6.0	0.7	5 (BW) <sup>d</sup>	633 ± 96bc	554 ± 127a

<sup>a</sup>Zeinin yüzdesi olarak mum ve lesitin miktarları; <sup>b</sup>filmlerin bir kısmı üretimin hemen ardından bir kısmı ise bileşenlerin stabilitesini test etmek amacıyla 4°C'de 7 gün depolama ardından test edilmiştir; <sup>c</sup>Kolonlardaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir (P<0.05); <sup>d</sup>KAR:karnauba mumu, KAN: kandelilla mumu, BM: bal mumu;

Tablo 4. 15. Kısmi saf lizoim ve kateşin içeren zein ve zein-mum kompozit filmlerin *Listeria innocua*'ya karşı antimikrobiyel etkisi

Filmlerin bileşimi				Ortalama zon alanı (mm <sup>2</sup> )
Lizozim (mg/cm <sup>2</sup> )	Kateşin (mg/cm <sup>2</sup> )	Mum (%) <sup>a</sup>	Lesitin (%) <sup>a</sup>	
-	-	-	-	Zon yok disk altında üreme var
0.7	-	-	-	119 ± 32a
-	6.0	-	-	Zon yok disk altında üreme yok
0.7	6.0	-	-	115 ± 27a
0.7	6.0	5 (KAR) <sup>c</sup>	5	89 ± 46a
0.7	6.0	5 (KAN) <sup>c</sup>	5	90 ± 28a
0.7	6.0	5 (BM) <sup>c</sup>	5	127 ± 31a

<sup>a</sup>Zein miktarının yüzdesi olarak filmlere ilave edilen mum ve lesitin miktarları; <sup>b</sup>Kolonlardaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir (P<0.05) <sup>c</sup>Zein filme ilave edilen mum türleri: KAR: karnauba mumu; KAN: kandelilla mumu; BM: bal mumu

meydana gelmiştir. Ancak, bu zonların alanı daha önce lizozim ve gallik asit karışımının L. monocytogenes üzerinde oluşturduklarına göre oldukça küçüktür. Geliştirilmiş olan lizozim ve kateşin içeren filmlerin gerçek antimikrobiyel potansiyelinin anlaşılması için bu filmlerin antimikrobiyel aktivite testlerine gerçek gıda uygulamalarında da yer verilmiştir.

#### **4.2.1.2. Lizozim'in kontrollu salımı için kateşin ve gallik asit'i birarada içeren mum-kompozit filmler geliştirilmesi**

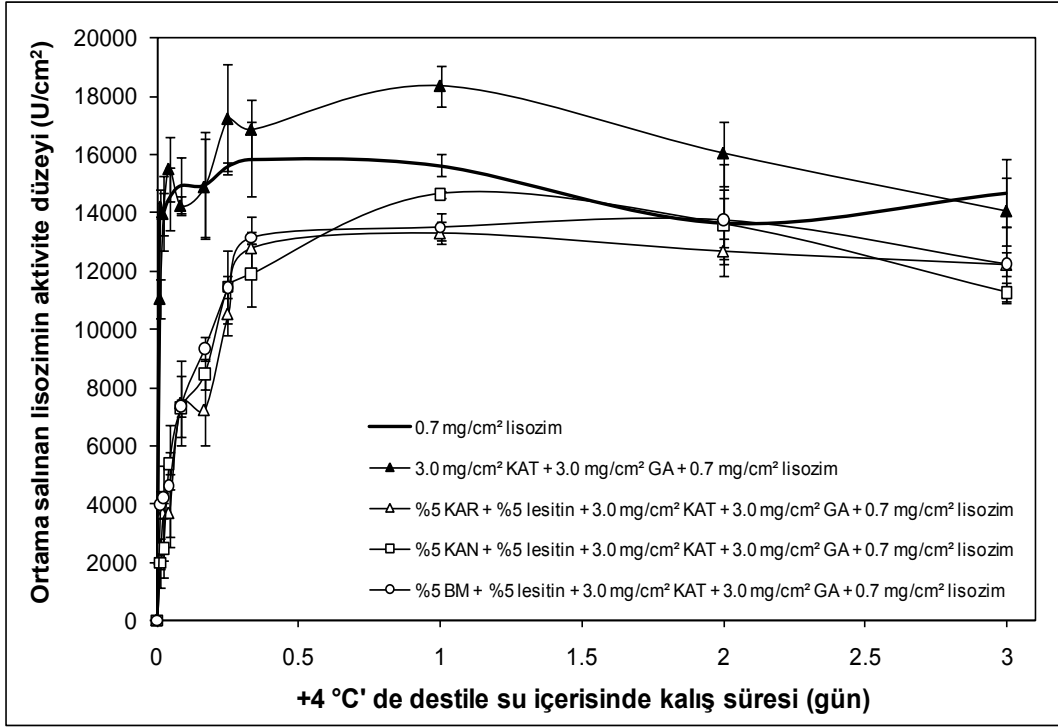
Bu bölümde farklı mumlarla oluşturulan zein-mum kompozit filmler içerisine lizozim ve kateşin-gallik asit karışımı ilave edilmiştir. Daha önceki bölümlerden hatırlanacağı üzere kateşine göre çok daha güçlü bir antioksidant ve antimikrobiyal olan gallik asit filmler içerisinde tek başına ve yüksek konsantrasyonda kullanıldığı zaman filmlerin gözenekliliğini oldukça artırmakta ve filmlerin lizozim ve fenolik madde salımı hızlanabilmekte veya beklenenden daha az yavaşlamaktadır. Dolayısıyla gallik asitle birlikte filmlerdeki gözenekliliği kısmen azaltan kateşinin birarada kullanımı gerek istenen kontrollu salım etkisinin gerekse arzulanan güçlü antimikrobiyal ve antioksidant etkinin sağlanabilmesi açısından önemli görülmüştür. Ayrıca, farklı moleküler yapılara ve molekül ağırlıklarına sahip olan gallik asit (Fenolik asit,  $C_6C_3$ , MW:170) ve kateşin'in (Flavonoit,  $C_6C_3C_6$ , MW:290) birarada kullanımıyla zein filmlerin çapraz bağlanma özelliklerinin değiştirilmesi ve lizozim geçiş hızının bu fenolik maddeleri tek tek içeren filmlere göre farklılaştırılması da hedeflenmiştir. Hiç kuşkusuz farklı spektrumlarda antimikrobiyel ve antioksidant etki gösteren bu iki fenolik bileşiğin karışım halde kullanımıyla filmlerden sağlanan etki spektrumunun artırılması ve her bir bileşenin uygulama dozunun azaltılması da sağlanması düşünülen faydalardır.

##### **4.2.1.2.1. Kısmi saf lizozim, kateşin ve gallik asit'i birarada içeren zein-mum kompozit filmlerin lizozim salımı**

Şekil 4.30 incelenecek olursa zein filmler içerisine mum olmadan, toplam fenolik madde miktarı  $6 \text{ mg/cm}^2$  olacak şekilde kateşin-gallik asit karışımı eklenmesinin kısmi saf lizozimin geçiş hızını azaltmadığı görülmektedir. Daha önce elde edilmiş olan sonuçlar hatırlanırsa zein filmlere mum olmadan tek başına  $6 \text{ mg/cm}^2$  düzeyde kateşin katılması kısmi saf lizozimin geçiş hızını belirgin olarak yavaşlatmakta, yine mum olmadan tek başına  $6 \text{ mg/cm}^2$  gallik asit ilave edilmesi ise geçiş hızında belirgin bir fark yaratmamaktaydı. Bunun en büyük nedeni daha önce gallik asit içeren filmlerin SEM görüntülerinde de görüldüğü gibi gallik asitin filmler içerisindeki çapraz bağlanmayı artırsa da filmleri gözenekli hale



getirmesidir (bak Şekil 4.6). Diğer yandan filmler içerisine karnauba mumu, kandelilla mumu veya balmumu ilave edilerek filmlerin kompozitlenmesi beklendiği gibi lizozim salım hızını yavaşlatmaktadır. Zein'in farklı mumlarla elde edilen kompozit filmlerinin lizozim salım profilinin oldukça benzer olması karışım haldeki fenolik bileşikler varlığında kullanılan mum tipinin lizozim geçiş hızına etkisinin oldukça düşük olduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 30. Kısmi saf lizozim, kateşin ve gallik asit'i birarada içeren zein ve zein-mum kompozit filmlerin lizozim salım profilleri (not-1: KAT: kateşin, GA: gallik asit, KAR: karnauba mumu, KAN: kandelilla mumu, BM: bal mumu; not-2: filmler destile su içerisinde serbest halde çalkalanmaktadır)

Buna göre karışım halde fenolik bileşik içeren filmlere mum ilavesiyle filmlerin hidrofobikliğinin artırılması ve su alarak şişmelerinin geciktirilmesi (swelling) lizozim için kontrolü salım etkisi yaratmak açısından yeterlidir. Bu tür filmlerde antimikrobiyel etki lizozim ve filme bağlanmayan serbest fenolik bileşiklerce, antioksidant etki ise yine fenolik bileşiklerce sağlanmaktadır.

Salım deneyleri sırasında filmlerden destile su içerisine geçen lizozim aktiviteleri Tablo 4.16'de verilmiştir. Buna göre filmler içerisine mum ilave edilmeden fenolik madde ilavesinin ortama geçen toplam lizozim miktarını bir miktar artırdığı, buna karşın mum ilavesinin ise lizozimin bir kısmının filmler içerisinde tutuklanmasına neden olduğu açıktır.

#### 4.2.1.2.2. Kısmi saf lizozim, kateşin ve gallik asit'i birarada içeren zein-mum kompozit filmlerin fenolik madde salımı

Geliştirilmiş olan zein-mum kompozit filmlerin fenolik madde salım profilleri Şekil 4.31'da görülmektedir. Buna göre tüm zein-mum kompozitleri kontrol filmere göre fenolik madde geçişini az veya çok yavaşlatmaktadır. Ancak, özellikle zein-balmumu ve zein-

Tablo 4. 16. Kısmi saf lizozim, kateşin ve gallik asit'i birarada içeren ve zein-mum kompozit filmlerden salınan lizozim ve fenolik madde düzeyleri ve filmlerin antioksidant potansiyelleri

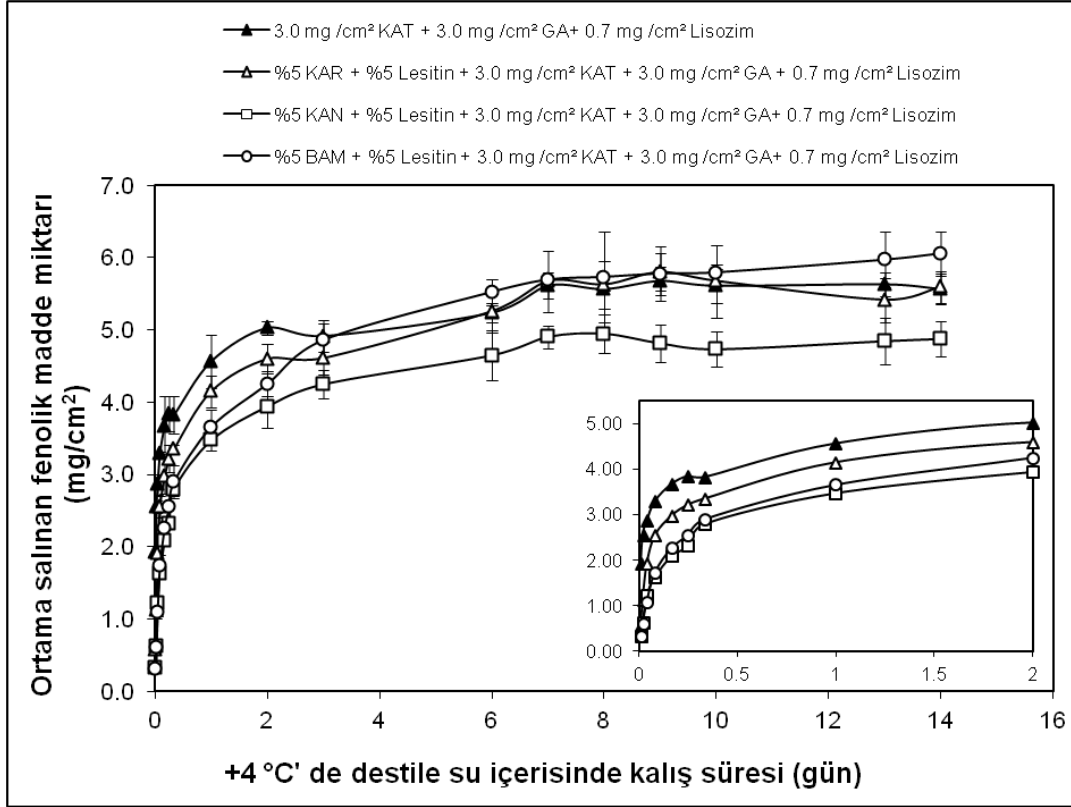
Filmlerin bileşimi				Salınan toplam lizozim akt. (U/cm <sup>2</sup> )	Salınan toplam fenolik madde miktarı (mg/cm <sup>2</sup> )	Salınan toplam antioksidant akt. (µmol Trolox/cm <sup>2</sup> )	
Lizozim (mg/cm <sup>2</sup> )	Kateşin (mg/cm <sup>2</sup> )	Gallik asit (mg/cm <sup>2</sup> )	Mum ve lesitin (%) <sup>a</sup>			TEAC	ORAC
0.7	-	-	-	15859±1265	4.9 ±0.2(82) <sup>c</sup>	86	60
0.7	3.0	3.0	-	18365±690	5.4 ±0.1(90)	91	63
0.7	3.0	3.0	5 (KAR) <sup>b</sup>	13327±399	5.6 ±0.0(93)	89	74
0.7	3.0	3.0	5 (KAN)	14645±98	5.2 ±0.1(87)	92	74
0.7	3.0	3.0	5 (BM)	13751±1914	4.9 ±0.2(82)	86	60

<sup>a</sup>Zeinin yüzdesi olarak mum ve lesitin miktarları; <sup>b</sup>KAR:karnauba mumu, KAN: kandelilla mumu, BM: bal mumu; <sup>c</sup> filmlerden salınan toplam fenolik maddenin filmlere ilave edilen toplam fenolik maddeye yüzde oranı

kandelilla mumu kompozit filmlerde kateşin ve gallik asit geçişinin zein-karnauba mumu içeren filmlere göre daha yavaş olduğu açıktır. Elde edilen bu veriler zein-mum kompozitlerinin hem lizozim hem de fenolik bileşiklerin ayrı ayrı, veya aynı anda kontrollü salımını gerçekleştirebilecek filmler olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.16'de zein ve zein-mum kompozit filmlerden geçen toplam fenolik madde miktarları ve bunlara karşılık gelen TEAC ve ORAC metodlarıyla belirlenmiş antioksidant aktiviteleri de verilmiştir. Şekil 4.31'daki salım kurveleri temel alınarak belirlenmiş toplam salınan fenolik madde miktarları özellikle zein-kandelilla mumu kompozit yapıların bir miktar fenolik maddeyi bağladığı izlenimini doğurmaktadır. Ancak, daha önce benzer filmlerle yürütülen ön denemeler deneyler salım süresi uzadıkça filmlerin saldırdığı toplam fenolik madde miktarının arttığı görülmektedir. Bu tür salım süresine bağlı artışlar lizozim için

gözlenmemekte ve aktivite çoğu kez ya sabit kalmakta ya da sınırlı bir azalma göstermektedir.



Şekil 4. 31. Kısmi saf lisozim, kateşin ve gallik asit'i birarada içeren zein ve zein-mum kompozit filmlerin fenolik madde salım profilleri (not-1: KAT: kateşin, GA: gallik asit, KAR: karnauba mumu, KAN: kandelilla mumu, BM: bal mumu; not-2: filmler destile su içerisinde serbest halde çalkalanmaktadır)

#### 4.2.1.2.3. Kısmi saf lisozim, kateşin ve gallik asit'i birarada içeren zein-mum kompozit filmlerin *Listeria monocytogenes* üzerindeki antimikrobiyel etkisi

Gıdalarda bulunan patojenitesi en yüksek bakterilerden birisi olan ve çevresel koşullar ve antimikrobiyallara duyarlılığı az olan *Listeria monocytogenes* bakterisi üzerinde yürütülen testler, geliştirilmiş olan filmlerin bu bakteriye karşı olan antimikrobiyel aktivitelerinin oldukça yüksek olduğunu ve filmlerden ortama geçen antimikrobiyel ajanların miktarlarının bu bakterinin deneysel koşullardaki inaktivasyonu açısından yeterli olduğunu göstermiştir (Tablo 4.17). Elde edilmiş olan test sonuçlarına göre tek başına lisozim içeren filmlerin antimikrobiyel etkisi kateşin-gallik asit ilavesiyle önemli ölçüde artmaktadır ( $P < 0.05$ ). Daha önceki deneylerde kateşinin *L. innocua* ve *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyel etkisinin gallik asite göre daha az olduğu belirtilmiştir. Ancak, kateşinin kullanımının antimikrobiyel

aktivite dışında lizozim için kontrollü salım etkisi elde etmek üzere zeinin çapraz bağlanma düzeyini artırmak, film gözenkliliğini azaltmak ve filmlerin antioksidant kapasitesini geliştirmek gibi işlevleri de bulunduğu unutulmamalıdır. Diğer yandan kullanılmış olan mumlardan, karnauba mumu içeren kompozit filmlerin kandelilla ve bal mumu içerenlere kıyasla daha yüksek antimikrobiyel etki gösterdiği de belirlenmiştir ( $P<0.05$ ).

Tablo 4. 17. Kısmi saf lizozim, kateşin ve gallik asit'i birarada içeren zein ve zein-mum kompozit filmlerin *Listeria monocytogenes* üzerindeki antimikrobiyel etkisi

Filmlerin bileşimi					Oluşan ortalama
Lizozim (mg/cm <sup>2</sup> )	Kateşin (mg/cm <sup>2</sup> )	Gallik asit (mg/cm <sup>2</sup> )	Mum (%) <sup>a</sup>	Lesitin (%) <sup>a</sup>	zonların çapı (mm <sup>2</sup> )
0.7	-	-	-	-	98 ± 14a <sup>b</sup>
-	3.0	3.0	-	-	254 ± 32c
0.7	3.0	3.0	-	-	232 ± 51bc
0.7	3.0	3.0	5(KAR) <sup>c</sup>	5	249 ± 32c
0.7	3.0	3.0	5(KAN) <sup>c</sup>	5	151 ± 63ab
0.7	3.0	3.0	5(BM) <sup>c</sup>	5	166 ± 60ab

<sup>a</sup>Zeinin yüzdesi olarak mum ve lesitin miktarları; <sup>b</sup>Kolonlardaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir ( $P<0.05$ ) <sup>c</sup>KAT: kateşin, GA: gallik asit, KAR: karnauba mumu, KAN: kandelilla mumu, BM: bal mumu, KAT:kateşin, GA:gallik asit

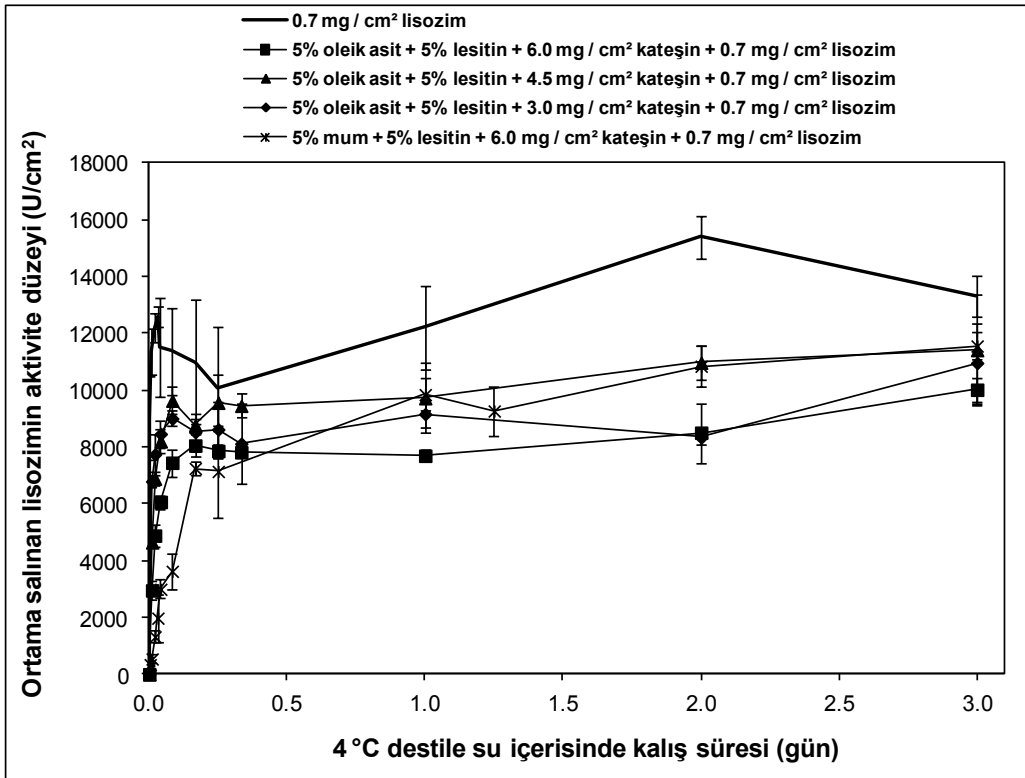
#### 4.2.2. Lizozimin'in Kontrollü Salımı İçin Fenolik Bileşikler İçeren Zein-Yağ Asiti Karışım Filmler Geliştirilmesi

##### 4.2.2.1. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein-oleik asit karışım filmlerin lizozim salımı

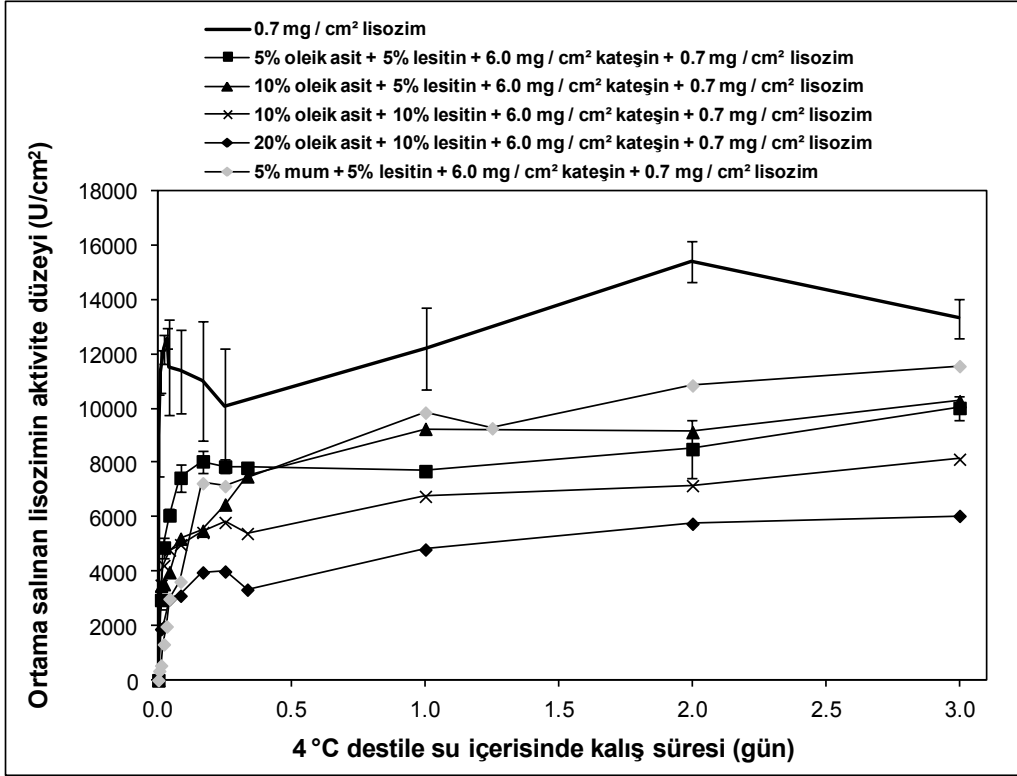
Hatırlanacağı üzere daha önceki çalışmalarda zein-oleik asit karışım filmlerin fenolik maddelerin kontrollü salımı amacıyla kullanılabileceği belirlenmişti. Çalışmanın bu aşamasında fenolik maddeler içeren zein-oleik asit filmlerden lizozim salımı incelenmiştir. Şekil 4.32 incelenecek olursa %5 oleik asit ve %5 lesitin içeren filmlerde fenolik madde olarak kullanılmış olan kateşinin miktarı artırıldıkça lizozimin filmlerden daha yavaş salındığı görülmektedir. Bu durum daha önce zein-mum kompozit filmlerde ulaşılmış olduğumuz fenolik madde ilavesinin zein filmler içerisinde bir ağyapı oluştuğu ve bu ağyapının fenolik madde miktarı arttıkça güçlendiği sonucunu bir kez daha doğrulamaktadır. Ancak en düşük salım hızının görüldüğü 6.0 mg/cm<sup>2</sup> kateşin içeren filmlerde bile lizozim salım hızı halen geçmiş

gönemde aynı miktarda kateşin ile %5 mum ve %5 lesitin kullanılarak elde edilmiş filmlerinkinden fazladır. Filmler içerisindeki kateşin miktarı  $6 \text{ mg/cm}^2$  olarak, lesitin miktarı ise zeinin %5'i düzeyinde sabit tutularak oleik asit miktarının zeinin %10'u düzeyine çıkartılması ise lizozim salım hızını daha da azaltmakta ve mum ve lesitin içeren filmin lizozim salım hızı düzeyine yaklaştırmaktadır (Şekil 4.33). Fenolik madde miktarının sabit tutulması, oleik asit miktarının ve lesitin miktarının her ikisinin de %10 düzeyine çıkartılmasıyla da benzer şekilde yavaş hızda salım yapan filmler elde edilmiştir. Ancak, özellikle  $6 \text{ mg/cm}^2$  kateşin, %20 oleik asit ve %10 lesitin içeren filmlerde bugüne kadar çalışmalarda ulaşılan en düşük lizozim salım hızına ulaşılmıştır.

Kateşin ilave edilmiş zein-oleik asit karışım filmlerde kontrollü salım üzerinde etkili olan mekanizmalar daha önce de belirtildiği üzere oleik asitçe sağlanan hidrofobisite artışı ve fenolik maddenin film içerisinde oluşturduğu ağyapıyla ilişkilidir. Ayrıca oleik asit içeren filmlerde bazı ajanların taşınmasında (carrier) kullanılabilir süngerimsi bir yapı oluştuğu da literatürde belirtilmektedir (WANG ve ark., 2008).



Şekil 4. 32. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein ve zein-oleik asit karışım filmlerin lizozim salım profilleri (not-1:zein-karnauba mumu kompozit filme ait kurve kıyaslama amacıyla konmuştur; not-2: filmler destile su içerisinde serbest halde çalkalanmaktadır)



Şekil 4. 33. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein-oleik asit karışım filmlerin lizozim salım profilleri (Not-1: zein-karnauba mumu kompozit filme ait kurve kıyaslama amacıyla konmuştur; Not-2: filmler destile su içerisinde serbest halde çalkalanmaktadır)

Diğer yandan Tablo 4.18 incelenecek olursa özellikle oleik asiti ve lesitini %10 üzerinde içeren filmlerde ortama salınan lizozim miktarının daha önce incelenmiş zein-mum kompozitleri ve kontrol filmlere göre daha düşük olduğu görülmektedir. Buna göre zein-oleik asit karışım filmlerin lizozimin bir miktar immobilizasyonuna neden olduğu açıktır.

Hatırlanacağı üzere zein-oleik asit karışım filmlerin destile su içerisine serbest şekilde atılması ve çalkalama uygulanarak yürütülen salım deneyleri filmlerde oluşan yoğunluk farklılıkları nedeniyle deneyler sırasında bazı filmlerin tam olarak batık (kontrol), bazılarının askıda (birçok film), bazılarının ise yüzer formda (az sayıda film) kalmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla bu filmlerde salım deneyleri hem filmlerin serbest yüzdüğü klasik salım düzeneği, hem de filmlerin cam bir çerçeveye tutturularak su içerisinde batık halde tutulduğu ancak yine çalkalandığı özel bir düzeneğe yürütülmüştür (bak Şekil 3.4).

Tablo 4. 18. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein ve zein-oleik asit karışım filmlerden salınan toplam lizozim aktivite düzeyleri

Oleik asit (%) <sup>a</sup>	Lesitin (%) <sup>a</sup>	Kateşin (mg/cm <sup>2</sup> )	Lizozim (mg/cm <sup>2</sup> )	Filmlerden salınan toplam lizozim aktivitesi (U/cm <sup>2</sup> )
-	-	-	0.7	15372 ±748
5	5	3	0.7	10953 ±1402
5	5	4.5	0.7	11408 ±1965
5	5	6.0	0.7	10012 ±425
10	5	6.0	0.7	10263 ±348
10	10	6.0	0.7	8126 ±92
20	10	6.0	0.7	6041 ±572

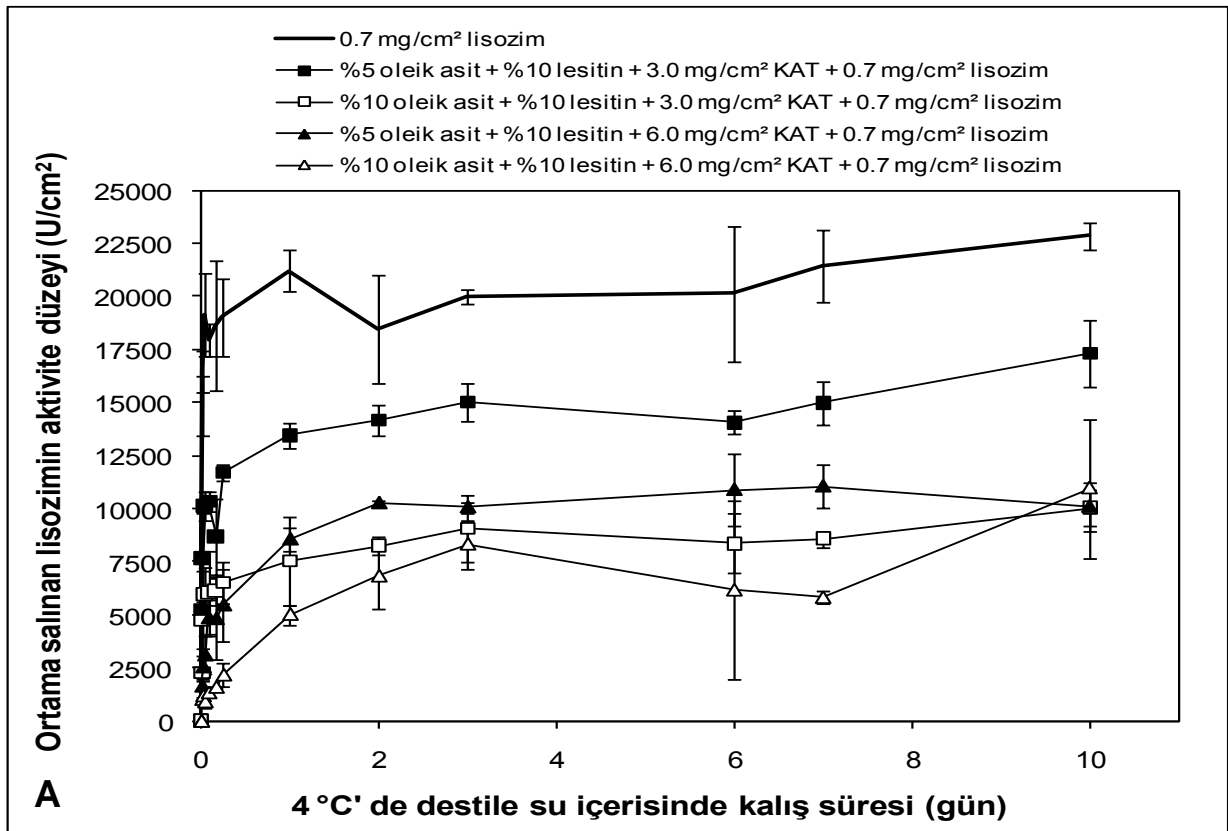
<sup>a</sup>zeinin yüzdesi olarak oleik asit ve lesitin miktarları

Şekil 4.34A'de lizozimin salım profili üzerine kateşin ve oleik asit konsantrasyonunun etkisi bir kez daha görülmektedir. Elde edilen sonuçlar özellikle 3 mg/cm<sup>2</sup> kateşin içeren filmlerde lizozimin ortama hızla geçtiğini ve bir süre sonra enzim geçişinin durduğunu veya çok yavaşladığını göstermektedir. Buna karşın 6 mg/cm<sup>2</sup> kateşin içeren filmlerde lizozimin ortama geçiş hızı oldukça yavaşlamaktadır. Bu sonuç daha önce filmlerin destile su içerisinde serbest olarak bulunduğu çalkalamalı düzenkete elde edilenlerle uyumludur. Kateşin miktarı 6 mg/cm<sup>2</sup>'de sabitken oleik asit miktarının %5'ten %10'a yükseltilmesi lizozimin salım hızını biraz daha azaltmaktadır. Buna göre uygun konsantrasyonda kullanıldıkları zaman gerek kateşinin, gerekse oleik asitin lizozimin salım hızını etkilediği ortadadır. Daha önceki rapor dönemlerinde de belirtildiği gibi çok sayıda OH grubu içeren (5 adet) kateşinin zein moleküllerinde bulunan karbonil gruplarıyla H bağı yaparak filmin ağı yapısını, yani çapraz bağlanma düzeyini artırarak, oleik asitin ise filmin hidrofobikliğini artırıp su alıp şişmesini geciktirerek kontrollü salım etkisi yarattığı düşünülmektedir.

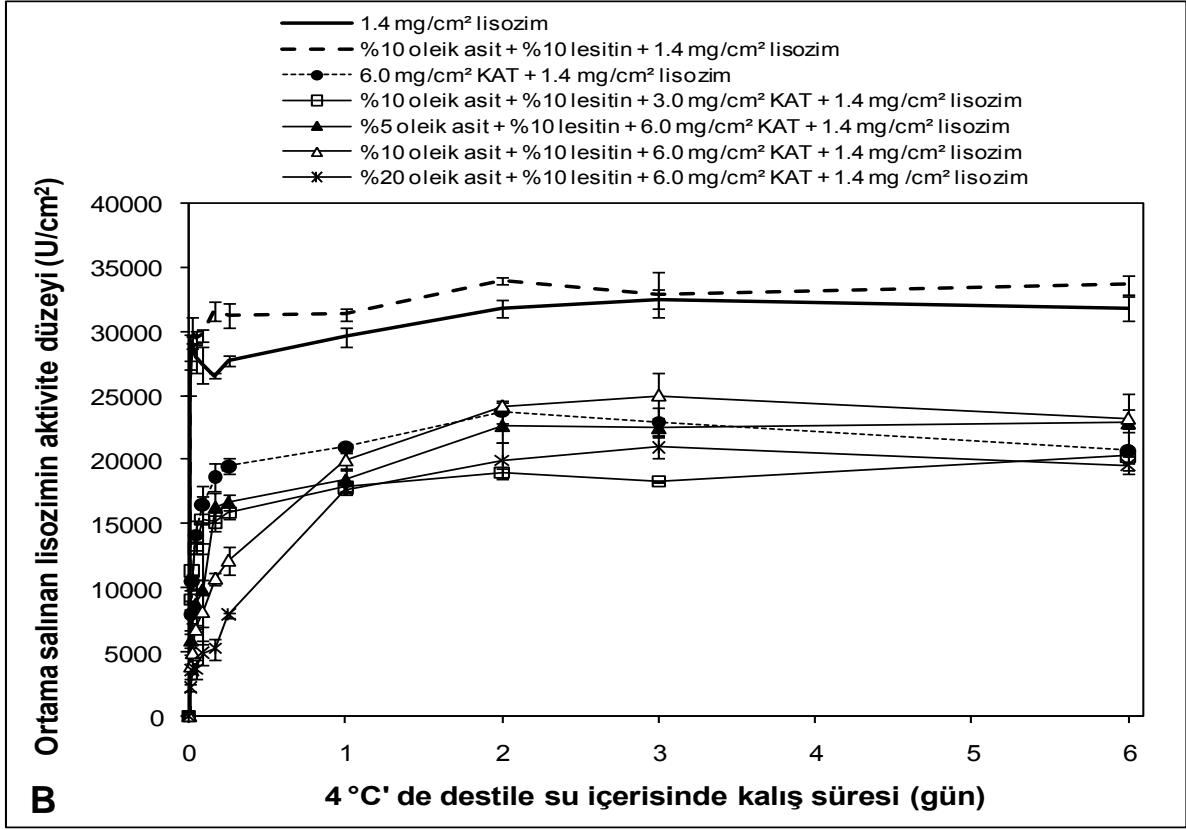
Ortama salınan toplam lizozim aktiviteleri dikkate alındığı zaman özel cam düzenek kullanılarak yürütülen geçiş deneylerinde de aynen klasik salım deneylerindeki gibi zein-oleik asit karışım filmlerde önemli miktarda lizozimin filmler içerisinde tutuklu kaldığı açıkça görülmektedir. Nitekim özellikle lizozim salım hızının oldukça yavaş olduğu 6 mg/cm<sup>2</sup> kateşin içeren filmlerde ortama geçen toplam lizozim aktivitesinin kontrol filmlerden ortama geçen toplam aktivitenin neredeyse yarısı kadar olması dikkat çekicidir (Tablo 4.19). Bu nedenle lizozim geçişinin yavaş bir hızda gerçekleştiği, ancak ortama geçen toplam enzim aktivitesinin daha yüksek olduğu filmler elde edilmesi amacıyla filmler içerisindeki lizozim düzeyi 2 kat artırılarak 0.7 mg/cm<sup>2</sup>'den 1.4 mg/cm<sup>2</sup>'ye yükseltilmiş ve salım deneyleri bir kez daha tekrarlanmıştır. Lizozim konsantrasyonunun yükselmesiyle zein-oleik asit karışım

filmlerde lizozim salım profilinin daha rahat incelenebileceği düşünülmüştür. Ayrıca, bu denemelerde zein-oleik asit karışımlarında kateşin bulunmadığı zaman kontrollü salım etkisinin nasıl değiştiği de incelenmiştir.

Şekil 4.34B incelenecek olursa zein-oleik asit karışım filmler içerisinde kateşin olmadan tek başına oleik asit ilavesinin lizozim salım hızı üzerinde herhangi bir etki sağlamadığı görülmektedir. Aynı şekilde filmlere tek başına kateşin katılması da yüksek konsantrasyonda kullanıldığı zaman lizozimin salım hızını istenilen düzeyde azaltmamaktadır. Buna göre çalışılan yüksek lizozim konsantrasyonunda ( $1.4 \text{ mg/cm}^2$ ) lizozim için bir kontrollü salım etkisi elde edilmesi için hem oleik asitin yarattığı hidrofobisite artışı, hem de kateşinin yarattığı çapraz bağlama etkisinin gerekli olduğu açıktır. Filmlerdeki lizozim düzeyinin  $1.4 \text{ mg/cm}^2$ 'ye yükseltilmesiyle özellikle %10 ve %20 düzeyinde oleik asit içeren filmlerde lizozim salım hızının oldukça yavaşladığı, ancak salınan toplam aktivite düzeyi  $20000 \text{ U/cm}^2$ 'nin üzerinde olan filmler elde edildiği görülmektedir (Tablo 4.19).  $15000\text{-}16000 \text{ U/cm}^2$  düzeyinde lizozim salabilen içerisinde tek başına lizozim bulunan filmlerin antimikrobiyel aktivite gösterdiği düşünülünce (bak Tablo 4.17) elde edilen bu sonuçların oldukça olumlu olduğu düşünülmektedir.







Şekil 4. 34. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein ve zein-oleik asit karışım filmlerin lizozim salım profilleri (not-1: A: 0.7 mg/cm<sup>2</sup>; B: 1.4 mg/cm<sup>2</sup> lizozim içeren filmler; not-2: KAT: kateşin; not-3: filmler çerçeve içerisine yerleştirilmiş halde destile suda tutulurken tüm düzenek çalkalanmaktadır)

#### 4.2.2.2. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein-laurik asit ve zein-linoleik asit karışım filmlerin lizozim salımı

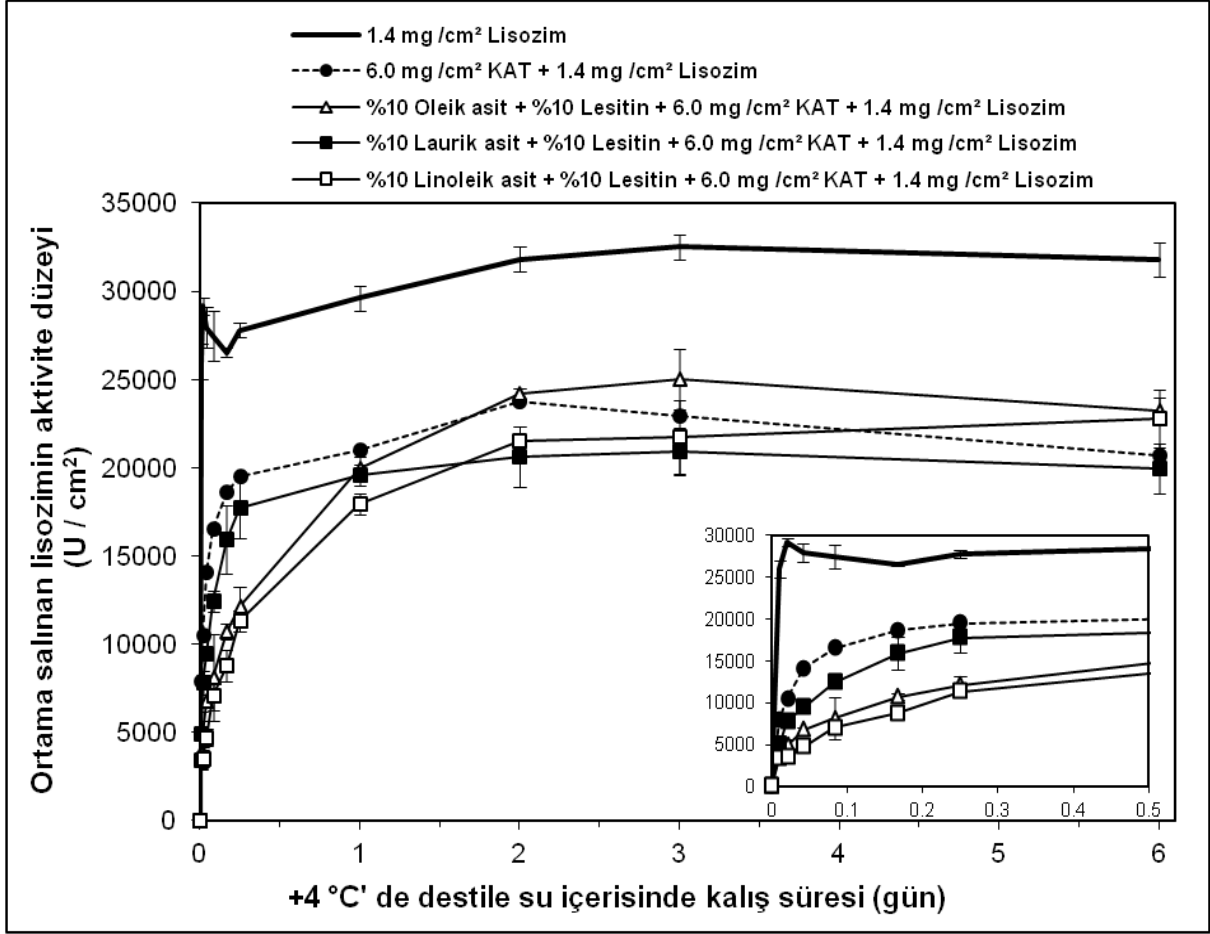
Zein filmlerle karışım oluşturmak amacıyla oleik asit yerine laurik asit ve linoleik asit ilave edilerek elde edilmiş olan karışım filmlerin kısmi saf lizozim salımı Şekil 4.35'de görülmektedir. Filmler daha önce oleik asit için uygun olduğu belirlenen %10 yağ asiti ve %10 lesitin ilavesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlar filmler içerisinde farklı yağ asitleri kullanımıyla lizozimin salım hızının değiştirilebileceğini bir kez daha göstermektedir. Yağ asiti alifatik zincir uzunluğu aynı olan oleik ve linoleik asitler (Tablo 4.20) benzer salım kurveleri vermiş ve en yavaş lizozim salım hızını göstermiştir. Buna karşın bunlardan daha kısa alifatik zincir içeren dolayısıyla daha az hidrofobik olması beklenen laurik asit içeren karışım filmler oleik asit ve linoleik asit içeren filmlerden daha hızlı lizozim salmıştır. Özellikle laurik asit içeren filmlerde salım hızının tek başına kateşin içeren filmlerinkine yakın olması bu yağ asitinin salım hızını etkileyecek bir hidrofobisite artışı veya yapısal bir değişime neden

olmadığını göstermektedir. Ayrıca Tablo 4.21 göz önüne alındığında, deney süresince ortama geçen toplam lizozim miktarının laurik asit içeren karışım filmlerde diğer karışım filmlerle karşılaştırıldığında en düşük seviyede kaldığı belirlenmiştir.

Tablo 4. 19. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein ve zein-oleik asit karışım filmlerden salınan toplam lizozim aktivite düzeyleri

Film kompozisyonu				Salınan toplam
Lizozim (mg/cm <sup>2</sup> )	Kateşin (mg/cm <sup>2</sup> )	Oleik asit (%) <sup>a</sup>	Lesitin (%) <sup>a</sup>	lizozim aktivitesi (U/cm <sup>2</sup> )
0.7	-	-	-	22854 ±632
0.7	3.0	5	10	17323 ±1550
0.7	3.0	10	10	10048 ±853
0.7	6.0	5	10	11055 ±1036
0.7	6.0	10	10	10962 ±3289
1.4	-	-	-	32501 ±753
1.4	-	10	10	34002 ±294
1.4	6.0	-	-	23725 ±867
1.4	6.0	5	10	22861 ±2337
1.4	6.0	10	10	25011 ±1718
1.4	6.0	20	10	20972 ±886
1.4	3.0	10	10	20309 ±576

<sup>a</sup>Zeinin yüzdesi olarak oleik asit ve lesitin miktarları



Şekil 4. 35. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein-yağ asiti karışım filmlerin lizozim salım profilleri (Not-1: daha önce incelenmiş %10 oleik asit ve %10 lesitin içeren filmlerin sonuçları kıyaslama amacıyla verilmiştir; Not-2: filmler çerçeve içerisine yerleştirilmiş halde destile suda tutulurken tüm düzenek çalkalanmaktadır)

Tablo 4. 20. Karışım oluşturmada kullanılmış olan yağ asitlerinin moleküler yapısı

Yağ asitinin adı	Kapalı formülü (RCOOH yapısı)
Laurik asit	$C_{12}$
Oleik asit	$(C_{18:1}) \Delta^9$
Linoleik asit	$(C_{18:2}) \Delta^{9,12}$

Tablo 4. 21. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein ve zein-yağ asiti karışım filmlerden salınan toplam lizozim aktivite düzeyleri

Film bileşimi				Salınan toplam lizozim aktivitesi (U/cm <sup>2</sup> )
Lizozim (mg/cm <sup>2</sup> )	Kateşin (mg/cm <sup>2</sup> )	Yağ asiti (%) <sup>a</sup>	Lesitin (%) <sup>a</sup>	
1.4	-	-	-	32501 ±723
1.4	6.0	-	-	22924 ±1152
1.4	6.0	10 (OLE) <sup>b</sup>	10	25011 ±1718
1.4	6.0	10 (LAU)	10	20941 ±1301
1.4	6.0	10 (LİNO)	10	22789 ±1632

<sup>a</sup>Zein miktarının yüzdesi olarak filmlere ilave edilen yağ asiti ve lesitin miktarları; <sup>b</sup>Zein filme ilave edilen yağ asiti türleri: OLE: oleik asit; LAU: Laurik asit; LİNO: Linoleik asit

#### 4.2.2.2. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein-yağ asiti karışım filmlerin mekanik özellikleri

Farklı yağ asitleri ilavesiyle üretilmiş zein-yağ asidi karışım filmlerinin mekanik özellikleri Tablo 4.22 'de verilmiştir. 6.0 mg/cm<sup>2</sup> kateşin ve 0.7 mg/cm<sup>2</sup> lizozim içeren zein filmin uzama değeri ortalama %136 iken (bak Tablo 4.12); lizozim miktarının 2 katına çıkarılması filmin uzama değerini etkilemiş ve değer ortalama %70 'e kadar düşürmüştür. Diğer taraftan farklı yağ asitleri kullanılması kateşin ve lizozim bir arada içeren filmlerin mekanik özelliklerinde bir değişiklik yaratmamıştır (P>0.05).

(Not: yüksek fenolik madde içeriği nedeniyle mekanik testler öncesi uygulanan kurutma işlemi 24 saatten 48 saate çıkarılmıştır)

#### 4.2.2.3. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein-yağ asiti karışım filmlerin SEM görüntüleri

Şekil 4.36 'da kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein ve zein-yağ asiti karışım filmlerin SEM yan kesit görüntüleri verilmiştir. Daha önce bahsedildiği gibi yağ asiti ilavesiyle oluşan süngerimsi yapı verilen bu görüntülerle tespit edilmiştir. Zein film de oluşan bu süngerimsi yapı sayesinde hem kateşin hem de lizozim salım hızının azaltıldığı düşünülmektedir.

Tablo 4. 22. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein-yağ asiti karışım filmlerin mekanik özellikleri

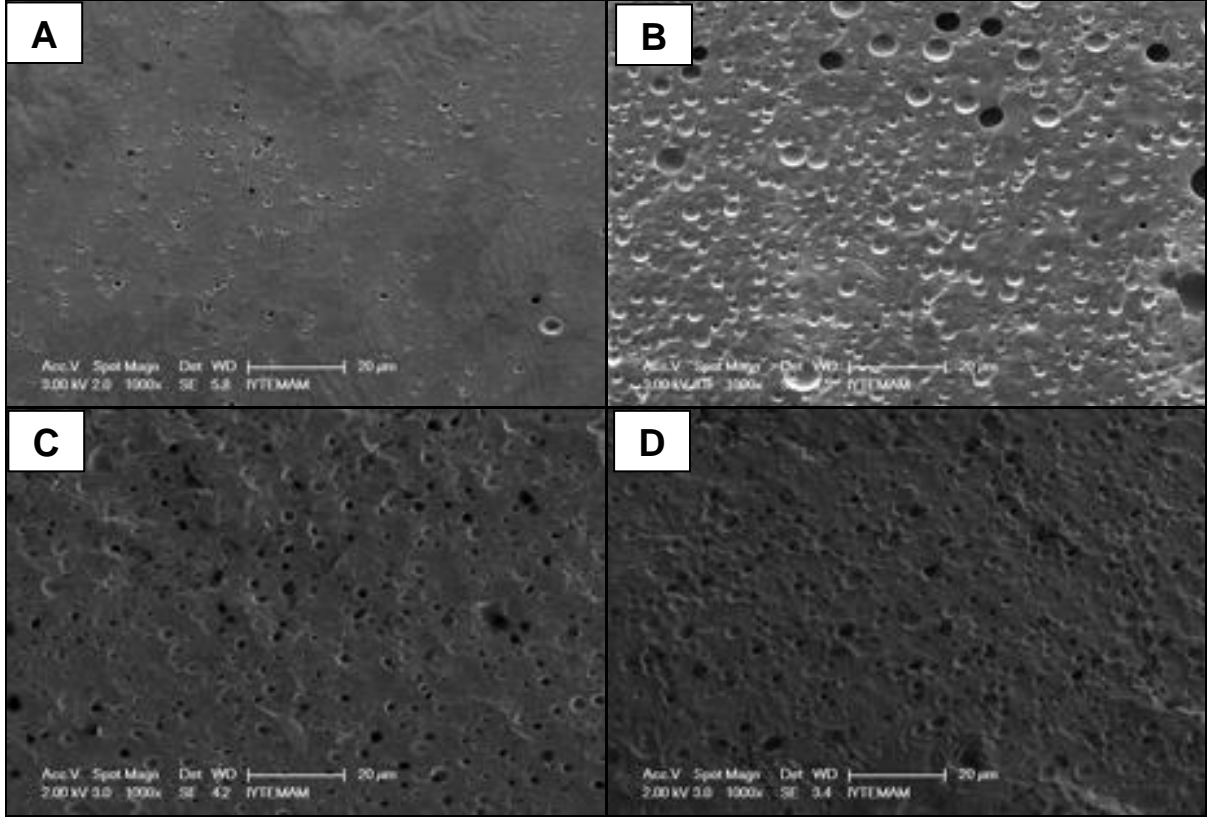
Film bileşimi				Gerilme gücü (MPa)	Uzama (%)	Elastik modulus (MPa)	Film kalınlıkları (µm)
Kateşin (mg/cm <sup>2</sup> )	Lizozim (mg/cm <sup>2</sup> )	Yağ asiti (%) <sup>a</sup>	Lesitin (%) <sup>a</sup>				
-	-	-	-	17.67 ± 0.93a <sup>b</sup>	4 ± 1b	775 ± 44a	113 ± 1
-	1.4	-	-	10.98 ± 0.96b	3 ± 1b	530 ± 32b	143 ± 1
6.0	1.4	-	-	0.98 ± 0.14c	71 ± 15a	55 ± 12c	167 ± 1
6.0	1.4	10 (OLE) <sup>c</sup>	10	1.17 ± 0.26c	70 ± 10a	55 ± 19c	160 ± 2
6.0	1.4	10 (LAU) <sup>c</sup>	10	0.88 ± 0.10c	61 ± 18a	37 ± 9c	159 ± 2
6.0	1.4	10 (LINO) <sup>c</sup>	10	1.23 ± 0.10c	53 ± 9a	63 ± 9c	192 ± 5

<sup>a</sup> zeinin yüzdesi olarak mum ve lesitin miktarları; <sup>b</sup> Kolonlardaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir (P<0.05); <sup>c</sup> Zein filme ilave edilen yağ asiti türleri: OLE: oleik asit; LAU: Laurik asit; LİNO: Linoleik asit

#### 4.2.2.4. Saf lizozim ve kateşin içeren zein-oleik asit karışım filmlerin lizozim salımı

Zein-oleik asit karışım filmlerin lizozim salım profilleri tarafımızdan üretilen kısmi saf lizozim yerine bir kez de saf lizozim kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Saf lizozim her ne kadar gıda uygulamalarında kullanılabilecek kadar ekonomik olmasa da geliştirilen filmlerin etkinliğinin farklı özelliklerdeki lizozim için belirlenmesi açısından bu enzimden faydalanılmıştır. Saf lizozim doğal olarak tarafımızdan üretilene göre aktivitesi ve antimikrobiyel etkisi daha yüksek bir enzimdir.

Şekil 4.36'de görülen salım deneyi sonuçlarına göre tarafımızdan üretilmiş kısmi saf lizozimde de olduğu gibi zein filmler içerisinde kateşin olmadan tek başına oleik asit katılmasının saf lizozimin kontrollü salımı üzerinde bir etkisi yoktur. Oleik asit ve kateşin veya tek başına kateşin zein filmlere katıldığı zaman ise saf lizozimin başlangıç salım hızında (ilk 1 gün içerisinde) bir yavaşlama olmazken, salım deneyinin 3. gününden sonra kontrol filmlere göre zein-oleik asit karışım filmlerden destile suya kayda değer miktarda lizozim salınmıştır. Saf lizozim için elde edilmiş olan salım profilleri tarafımızdan üretilmiş kısmi saf lizoziminkilere göre oldukça farklıdır. Nitekim, daha önce elde edilen kurveler incelenirse kısmi saf lizozimin salımının 3. günden sonra büyük oranda dengeye ulaştığı görülmektedir.

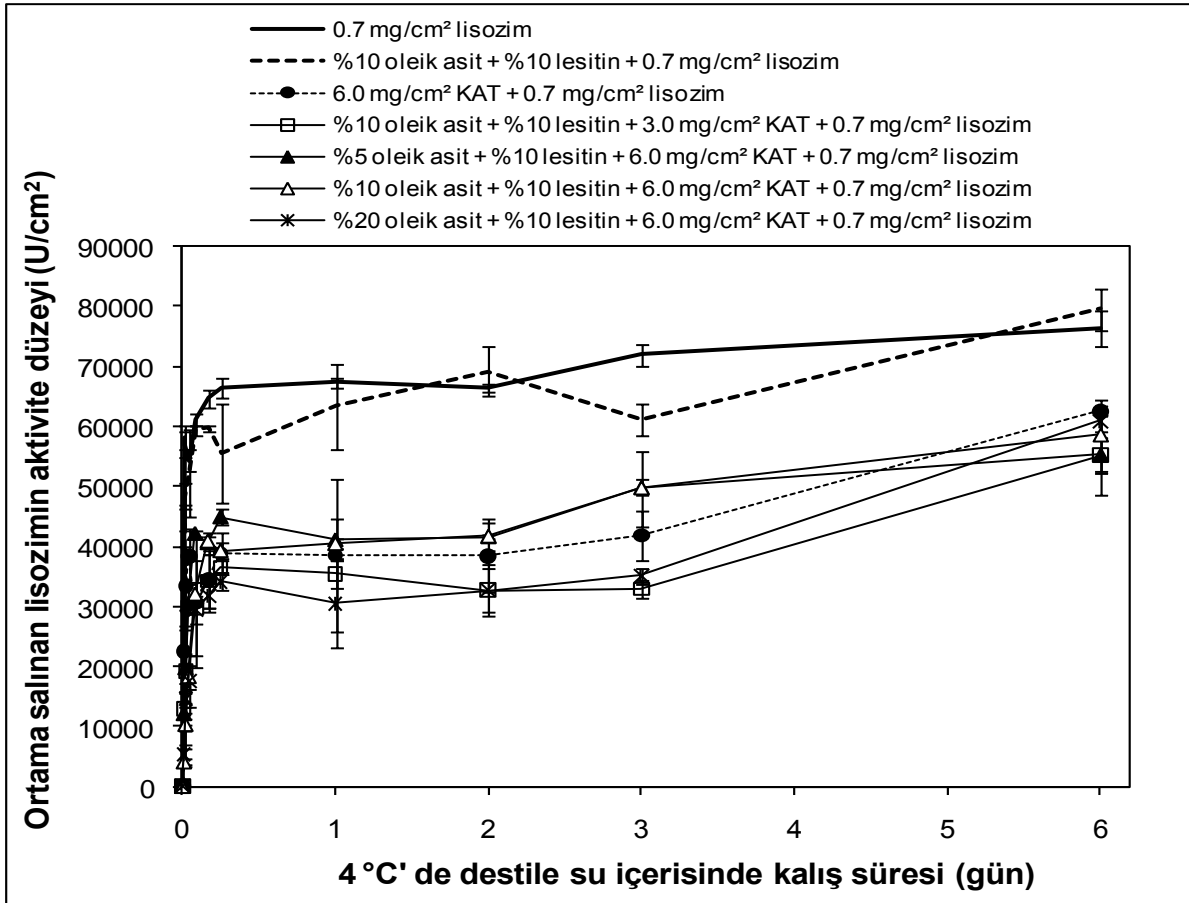


Şekil 4. 36. Kısmi saf lizozim ve kateşin içeren zein ve zein-yağ asiti karışım filmlerin SEM yan kesit görüntüleri (Filmler sıvı azotla dondurulup kırılmıştır; A: 6.0 mg/cm<sup>2</sup> kateşin ve 1.4 mg/cm<sup>2</sup> lizozim içeren film, B: oleik asit içeren karışım film, C: laurik asit içeren karışım film; D: linoleik asit içeren karışım film (B, C, ve D görüntüleri için film bileşimi: 6.0 mg/cm<sup>2</sup> kateşin, 1.4 mg/cm<sup>2</sup> lizozim, zeinin %10 'u kadar yağ asiti, ve zeinin %10 'u kadar lesitin içeren karışım filmler); Büyütme:1000X).

Saf lizozim içeren filmlerde ise salım deneyinin 3. gününden sonra, (6. günde) yalnızca saf lizozim içeren zein filmlerden; saf lizozim ve 6 mg/cm<sup>2</sup> kateşin içeren zein filmlerden; saf lizozim ve 3 mg/cm<sup>2</sup> kateşin içeren zein-oleik asit (%10 oleik asit ve %10 lesitin) içeren filmlerden ve saf lizozim ve 6 mg/cm<sup>2</sup> kateşin içeren zein-oleik asit (%20 oleik asit ve %10 lesitin) içeren filmlerden büyük miktarda lizozim geçişi olmaktadır. Anlaşıldığı kadarıyla saf lizozim zein filmler içerisinde tarafımızdan üretilmiş olan kısmi saf lizozim gibi enkapsüle olmamakta ve salım deneyinin ilerleyen aşamalarında (3. günden sonra) yavaşça ortama geçmekte ve bu yolla bir kontrollü salım etkisi elde edilmektedir. Deneyin hemen başında saf lizozimin büyük bir kısmının hızla filmlerden suya geçmesi sözkonusu enzimin tarafımızdan üretilmiş olan kısmi saf enzime göre daha düşük moleküler ağırlığa sahip olduğunu veya film matrisiyle daha az etkileşime girdiğini (filme afinitesinin az olduğunu) göstermektedir. Tarafımızdan üretilmiş olan lizozim etanolle muamele edilerek üretilmiş

olduğundan tuzla çöktürülmüş saf lizoziime göre tersiyer ve kuaternar yapısında değışimler olması mümkündür. Nitekim, etanolün lizoziimin konformasyonunda ciddi değışimlere neden olduğu bilinen bir durumdur (MECİTOGLU ve ark., 2006). Dolayısıyla saf ve kısmi saf enzimlerin moleküler ağırlık veya yüzey özelliklerinin farklı olması ve bunun salım profillerini etkilemesi mümkündür.

Diğler yandan ticari lizoziimin saflık oranının yüksek olması ortama salınan enzim aktivitesinin de oldukça yüksek olmasını sağlamaktadır. Tablo 4.23'da verilen salınan aktivite değıerleri incelendiğı zaman bu durum daha iyi anlaşılacaktır.



Şekil 4. 37. Saf lizoziim ve kateşin içeren zein ve zein-oleik asit karışım filmlerin lizoziim salım profilleri (filmler çerçeve içersine yerleştirilmiş halde destile suda tutulurken tüm düzenek çalkalanmaktadır)

Tablo 4. 23. Saf lizozim ve kateşin içeren zein ve zein-oleik asit karışım filmlerden salınan toplam lizozim aktivite düzeyleri

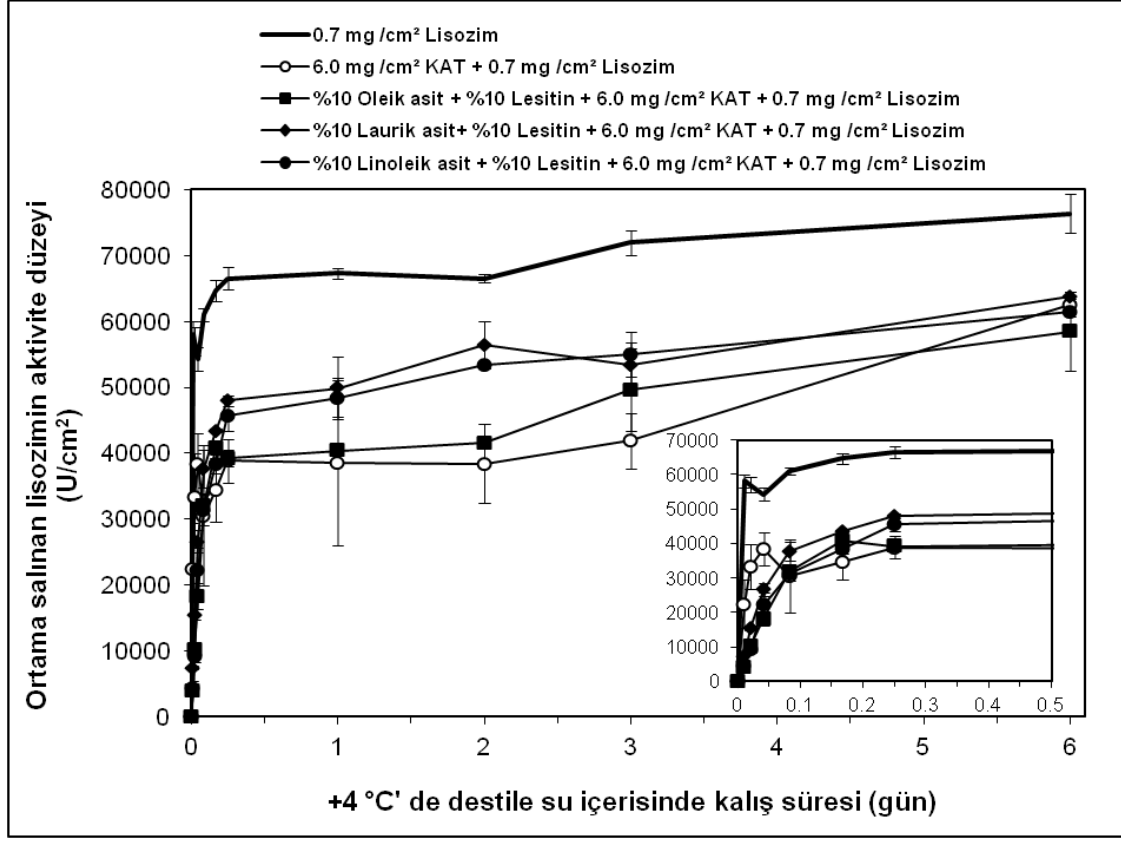
Film bileşimi				Filmlerden salınan toplam lizozim aktivitesi (U/cm <sup>2</sup> )
Lizozim (mg/cm <sup>2</sup> )	Kateşin (mg/cm <sup>2</sup> )	Oleik asit (%) <sup>a</sup>	Lesitin (%) <sup>a</sup>	
0.7	-	-	-	76408 ±2987
0.7	-	10	10	79468 ±3524
0.7	6.0	-	-	62576 ±810
0.7	6.0	5	10	55255 ±6622
0.7	6.0	10	10	58513 ±6041
0.7	6.0	20	10	60868 ±1608
0.7	3.0	10	10	55179 ±2855

<sup>a</sup>Zeinin yüzdesi olarak oleik asit ve lesitin miktarları

#### 4.2.2.5. Saf lizozim ve kateşin içeren zein-laurik asit ve zein-linoleik asit karışım filmlerin lizozim salımı

Kısmi saf lizozim yerine saf lizozim kullanılarak elde edilmiş olan kateşin içeren zein ve zein-yağ asiti karışım filmlere ait salım kurveleri Şekil 4.37’de verilmiştir. Görüldüğü üzere saf lizozimin salım profili kısmi saf olana kıyasla yine daha farklı olmuştur. Gerek tek başına kateşin içeren zein filmler, gerekse kateşin içeren zein-yağ asiti filmlerde salım hızı kontrol filmlere göre daha yavaştır. Tek başına kateşin içeren filmlerde başlangıç salım hızı kontrolden sonra en hızlı gerçekleşmiş ancak sonradan bu filmlerin lizozim geçiş hızı azalmış ve zein-oleik asit içeren filmlerin düzeyine düşmüştür. Oleik asit içeren filmler hem başlangıç geçiş hızı hem de 1. günden itibaren gerçekleşen yavaş geçiş döneminde düşük geçiş hızı gösteren tek filmlerdir. Buna karşın laurik ve linoleik asit içeren filmlerde saf lizozimin geçiş hızı oleik asit ve kateşin ve tek başına kateşin içeren filmlere göre daha yüksektir. Saf ve kısmi saf lizozimin oldukça farklı salım profilleri göstermesi bu enzimlerin farklı moleküler ve yüzey özellikleri gösterdiğini bir kez daha doğrulamaktadır. Buna göre gerek saf, gerekse kısmi saf lizozimin salım hızını düşürebilecek filmlerin zein-oleik asit kompozitleri olduğu açıktır. Diğer yandan Tablo 4.24 ‘de filmlerden salınan toplam lizozim aktivitesi de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar saf lizozimin filmler içerisinde bir miktar tutuklandığı ve bunun yağ asiti ilavesinden çok kateşin ilavesinden kaynaklandığını göstermiştir.





Şekil 4. 38. Saf lizozim ve kateşin içeren zein-yağ asiti karışım filmlerin lizozim salım profilleri (Not-1: daha önce incelenmiş lizozim; kateşin ve lizozim; kateşin, lizozim, oleik asit ve lesitin içeren filmlerin sonuçları kıyaslama amacıyla verilmiştir; Not-2: filmler çerçeve içerisine yerleştirilmiş halde destile suda tutulurken tüm düzenek çalkalanmaktadır)

Tablo 4. 24. Saf lizozim ve kateşin içeren zein ve zein-yağ asiti karışım filmlerden salınan toplam lizozim aktivite düzeyleri

Film bileşimi				Salınan toplam lizozim aktivitesi (U/cm <sup>2</sup> )
Lizozim (mg/cm <sup>2</sup> )	KAT (mg/cm <sup>2</sup> )	Yağ asiti (%) <sup>a</sup>	Lesitin (%) <sup>a</sup>	
0.7	-	-	-	76408 ±2987
0.7	6.0	-	-	62576 ±810
0.7	6.0	10(OLE) <sup>b</sup>	10	58513 ±6041
0.7	6.0	10(LAU)	10	63786 ±749
0.7	6.0	10(LİNO)	10	61427 ±696

<sup>a</sup>Zeinin yüzdesi olarak oleik asit ve lesitin miktarları; <sup>b</sup>Zein filme ilave edilen yağ asiti türleri: OLE: oleik asit; LAU: Laurik asit; LİNO: Linoleik asit

#### **4.2.2.6 Kısmi saf lizozim ve kateşin veya saf lizozim ve kateşin içeren zein-yağ asiti karışım filmlerin *Listeria innocua* üzerindeki antimikrobiyel etkisi**

Geliştirilmiş olan kısmi saf lizozim ve kateşin veya saf lizozim ve kateşin içeren karışım filmlerin antimikrobiyel etkisi *L.innocua* bakterisi test mikroorganizması olarak kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.25). Kısmi saf lizozim içeren zein filme kateşin ilavesi oluşan ortalama zon çapını bir miktar düşürsede, filmin antimikrobiyel etkisini istatistiksel açıdan anlamlı olacak şekilde değiştirmemiştir ( $P>0.05$ ). Fakat filmlere oleik asit ve linoleik asit ilavesi filmlerin antimikrobiyel etkilerini azaltmıştır ( $P<0.05$ ). Laurik asitin içern zein filmlerin antimikrobiyel etkisi zaten bilinmektedir (PADGETT ve ark., 2000), dolayısıyla laurik asit içeren filmlerin büyük zon oluşturması literatür bilgisini doğrular niteliktedir. Benzer sonuçlar saf lizozim içeren filmler için de bulunmuştur. Diğer bir taraftan, elde edilen sonuçlar çalışılan konsantrasyonlarda saf lizozim ile kısmi saf lizozim içeren filmlerin antimikrobiyel etkilerinin farklı olmadığını ortaya koymuştur. Geliştirilmiş olan lizozim ve kateşin içeren filmlerin gerçek antimikrobiyel potansiyelinin anlaşılması için bu filmlerin antimikrobiyel aktivite testlerine gerçek gıda uygulamalarında da yer verilmiştir.

#### **4.2.3. Lizozimin kontrollü salımı için zein-baklagil proteini kompozit filmler geliştirilmesi**

Bilindiği üzere mercimek ve soya gibi baklagillerde bulunan proteinler yüzey aktivitesi yüksek olan yani hidrofilik ve hidrofobik moleküllerle etkileşime girerek onlara bağlanabilen ve çözünürlüklerini değiştirebilen fonksiyonel ajanlardır (ARCAN ve YEMENICIOGLU, 2009; PEARCE VE KINSELLA, 1978; BOYE ve ark., 2010). Zein aşırı hidrofobik bir protein olduğundan içerisine ilave edilen hidrofilik lizozimle çok az etkileşime girmekte ve lizozimin geç de olsa zamanla kısmen hidrate olan zein filmlerden su içerisine geçişi oldukça hızlı olmaktadır. Esasen bugüne kadar lizozimin zein filmlerden salımının yavaşlatılması ile ilgili çalışmalara bu denli önem verilmesi bundan kaynaklanmaktadır. Filmler içerisine yüzey aktif özelliği ile bilinen baklagil proteinlerinin ilave edilmesiyle lizozim ve zeinin birbirine olan afinitesinin artacağı ve enzimin ortama salım profilinin değişeceği düşünülmüştür. Yine izoelektrik noktaları pH 4.5-5.5 arasında olan baklagil proteinlerinin potansiyel gıda uygulamaları sırasında yüksek izoelektrik noktaya sahip, dolayısıyla gıdalarda pozitif yüklü olarak bulunan lizozimle ( $pI \approx 11.0$ ) ortamın pH değerine göre farklı şiddetlerde yük-yük etkileşimlerine gireceği ve bu durumun da enzimin filmler içerisindeki çözünür formunun bağlı forma oranını veya salım profilini etkileyeceği de açıktır. Bu durumda teorik olarak pH değişimine göre salım özellikleri değişen filmler üretilmesi ve bunların özellikle dinamik bir pH

Tablo 4. 25. Kısmi saf lizoziim ve kateşin veya saf lizoziim ve kateşin içeren zein ve zein-yağ asiti karışım filmlerin *Listeria innocua*'ya karşı antimikrobiyel etkisi

Filmlerin bileşimi				Ortalama zon alanı (mm <sup>2</sup> )
Lizoziim (mg/cm <sup>2</sup> )	Kateşin (mg/cm <sup>2</sup> )	Yağ asiti (%) <sup>a</sup>	Lesitin (%) <sup>a</sup>	
Kısmi saf lizoziim				
1.4	-	-	-	65 ± 10b,C
1.4	6.0	-	-	55 ± 26ab,A
1.4	6.0	10 (OLE) <sup>b</sup>	10	35 ± 4a,AB
1.4	6.0	10 (LAU) <sup>b</sup>	10	537 ± 52*,*
1.4	6.0	10 (LINO) <sup>b</sup>	10	34 ± 7a,ABC
Saf lizoziim				
0.7	-	-	-	73 ± 26b,BC
0.7	6.0	-	-	38 ± 7a,ABC
0.7	6.0	10 (OLE) <sup>b</sup>	10	43 ± 10a,A
0.7	6.0	10 (LAU) <sup>b</sup>	10	506 ± 71*,*
0.7	6.0	10 (LINO) <sup>b</sup>	10	46 ± 7ab,A

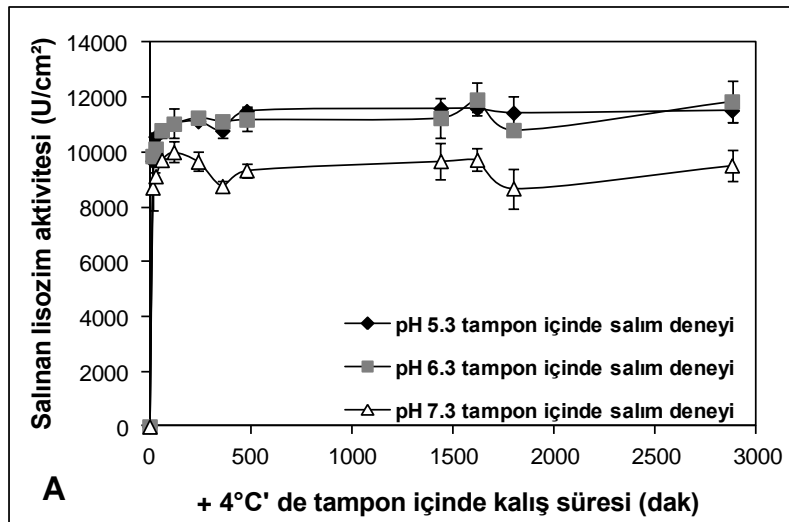
<sup>a</sup>Zein miktarının yüzdesi olarak filmlere ilave edilen mum ve lesitin miktarları; <sup>b</sup>Zein filme ilave edilen yağ asiti türleri: OLE: oleik asit; LAU: Laurik asit; LİNO: Linoleik asit; a-b: kısmi saf veya saf lizoziim içeren filmlerin kendi aralarında yapılan harflendirmeler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir (P<0.05); A-C kısmi saf ve saf lizoziim içeren filmler arasında yapılan harflendirmeler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir (P<0.05); \*Laurik asit içeren filmler istatistiksel analize sokulmamıştır.

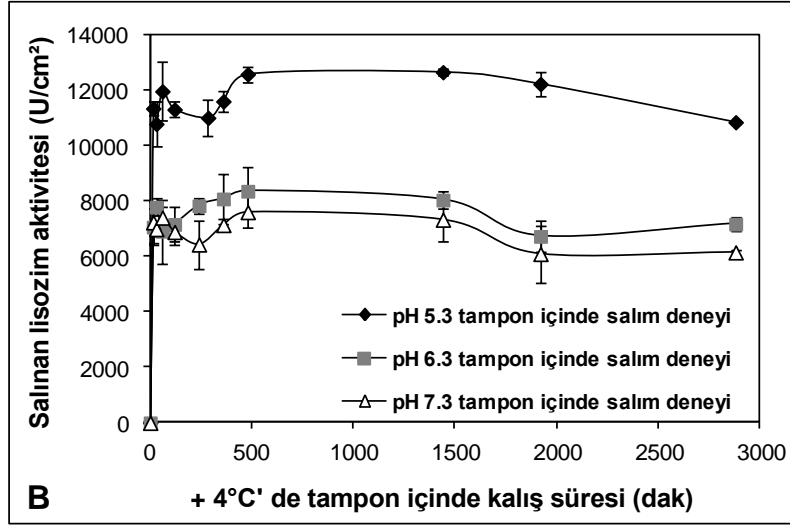
değişimi içerisinde olan ürünlerin kaplanması amacıyla tasarlanması mümkün olabilir. Örneğin, bilindiği üzere kesimden sonra etlerin pH değeri laktik asit oluşumundan dolayı fizyolojik pH değeri olan 7.3 civarından zamanla pH 5.3'e doğru düşmektedir. Bunun dışında filmle kaplanmış herhangi bir üründe istenilen bir anda, depolama, taşıma veya sergileme öncesi, ürün pH değerinin asit-baz çözeltisine daldırmayla salımı başlatacak uygun bir değere getirilmesi de mümkündür. Ete uygulanacak aktif bir kaplama içerisinde bulunacak biyoaktif ajanın paketlemenin başlangıcında et pH değeri yüksekken ortama tamamen salınmaması, pH değeri zamanla düşükten sonra da salınmaya devam etmesi (yani gecikerek salım) veya et pH değeri değiştikçe salım hızının değişmesi uygulama açısından anlamlı olabilecek etkilerdir. Dolayısıyla kesimden sonraki pH değeri dinamik bir değişim halinde olan karkaslarda veya pH 'sı ayarlanabilen gıdalarda kullanılabilir aktif film

kaplamalarının farklı pH 'lardaki salım profilinin bilinmesi şarttır. İşte tüm bu hususlar dikkate alınarak çalışmanın bu aşamasında üretilmiş filmlerin salım deneyleri farklı pH değerlerinde düzenlenmiştir.

#### 4.2.3.1. Kısmi saf lizozim içeren zein-mercimek proteini kompozit filmlerin farklı pH değerlerindeki yürütülen lizozim salımı

Şekil 4.38A ve 4.38B'de zein filmlere mercimek protein ekstraktı katılmasının lizozimin salım profiline etkisi görülmektedir. Anlaşılacağı üzere tek başına lizozim içeren filmlerde pH'nın salım hızına etkisi oldukça düşüktür. Buna karşın salım deneyinin yürütüldüğü pH'nın değişmesi ortama geçen toplam lizozim düzeyini etkilemektedir. Nitekim, pH 5.3 ve pH 6.3'de ortama salınan toplam lizozim aktiviteleri yüksek ve birbirine oldukça yakınken, pH 7.3'de ortama salınan toplam lizozim aktivitesi diğer pH değerlerinde salınanlardan düşüktür (Tablo 4.26). Zein filmlere mercimek proteini ilavesi lizozimin salım hızında kayda değer bir değişikliğe neden olmamıştır. Ancak, tahmin edildiği gibi pH'ya göre ortama salınan toplam lizozim miktarları mercimek proteini ilavesiyle değişmektedir. Buna göre mercimek proteini ilavesinin özellikle pH 6.3 ve 7.3'de salınan toplam lizozim miktarını azalttığı, buna karşın pH 5.3'de salınan lizozim miktarına etkisinin daha az olduğu açıktır. Esas olarak bu beklenen bir sonuçtur. Tarafımızdan 2 boyutlu elektroforezde belirlendiği kadarıyla mercimek proteinlerinin büyük kısmını oluşturan globülinlerin izoelektrik noktası pH 5-6 arasındadır (Bak Ek-1). Dolayısıyla pH 6.3 ve 7.3'de zein filmler içerisindeki proteinlerin büyük kısmı negatif yüklüken, izoelektrik noktası pH 11 civarında olan yumurta akı lizozimi pozitif yüklüdür. Bu durumda pH 6.3 ve 7.3'de lizozimin bir kısmının filmler içerisindeki mercimek proteinlerince tutulması ve bu tutulmuş enzimin filminden ortama geçmemesi normaldir.





Şekil 4. 39. Kısmi saf lizozim içeren zein ve zein-mercimek proteini kompozit filmlerin farklı pH değerlerindeki lizozim salım profilleri (A: 0.7 mg/cm<sup>2</sup> lizozim içeren kontrol; B: 0.7 mg/cm<sup>2</sup> lizozim ve 1 mg/cm<sup>2</sup> mercimek proteini içeren kompozit filmler) (Not-1: her film farklı bir tampon içerisinde serbest halde çalkalanmaktadır)

Tablo 4. 26. Kısmi saf lizozim içeren zein ve zein-mercimek proteini kompozit filmlerden farklı pH değerlerinde salınan toplam lizozim aktiviteleri

Filmlerin lizozim miktarı (mg/cm <sup>2</sup> )	Filmlerin mercimek proteini miktarları (mg/cm <sup>2</sup> )	Salım deneyi pH değeri	Salınan toplam lizozim aktivitesi (U/cm <sup>2</sup> )
0.7	-	5.3	11600 ± 126
0.7	-	6.3	11920 ± 597
0.7	-	7.3	10009 ± 395
0.7	1	5.3	10850 ± 57
0.7	1	6.3	7172 ± 234
0.7	1	7.3	6153 ± 112

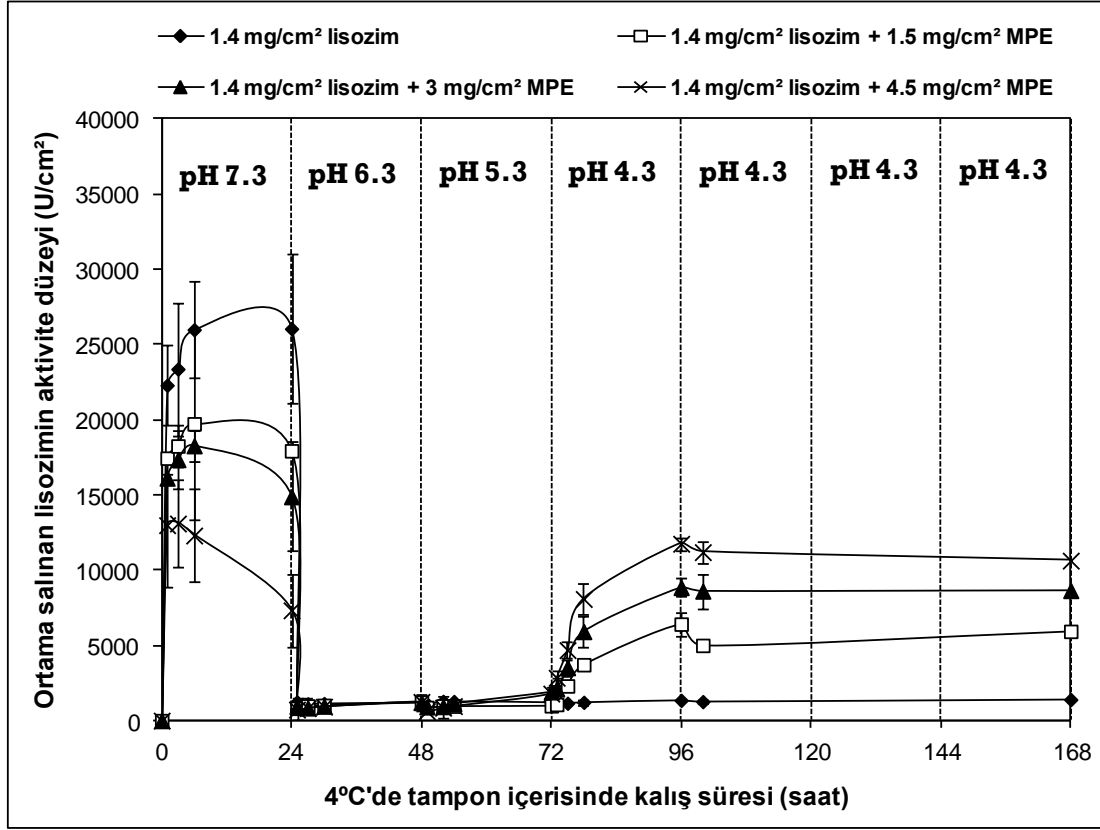
#### 4.2.3.2. Kısmi saf lizozim içeren zein-mercimek proteini kompozit filmlerin dinamik pH değişimi olan ortamlardaki lizozim salımı

Şekil 4.39'de verilmiş olan salım profillerine göre tarafımızdan üretilmiş olan kısmi saf lizozimin filmlerden pH 7.3 ve 4.3 'de salındığı, buna karşın pH 6.3 ve 5.3'de ise filmlerden lizozim salımı gerçekleşmediği görülmektedir. Lizozim (pI ≈ 11) ve mercimek proteinlerinin pI değerleri (pI: 5-6) dikkate alındığı zaman bu durumun beklenen bir sonuç olduğu açıktır.

Buna göre pH 7.3'de mercimek proteinleri negatif yüklüysen lizozim pozitif yüklü olduğundan bir miktar lizozim film matrisindeki mercimek proteinlerine bağlanmaktadır. Filmler içerisindeki mercimek proteini miktarı arttıkça pH 7.3'de filmlerden salınan lizozim düzeyinin azalması bunun doğal bir sonucudur (Tablo 4.27). Diğer yandan pH 7.3'de filmlerdeki bağlanmamış lizozimin ortama geçtikten bir süre sonra aktivitesinin MPE düzeyine bağlı olarak azalması bu protein ekstraktının içerisindeki bazı safsızlıkların lizozimde kısmi bir inaktivasyona yol açmış olabileceği veya enzimin bu pH değerinde stabil olmadığı izlenimi yaratmaktadır. Ancak, gerek farklı pH değerlerinde yürütülen stabilite deneyleri (Şekil 4.40A), gerekse pH 7.3'de MPE varlığında yürütülen stabilite deneyleri (Şekil 4.40B) lizozimin deney koşullarında oldukça stabil olduğunu göstermiştir. Buna göre pH 7.3'de salınan lizozimin bir kısmının daha sonra yeniden filmlerdeki mercimek proteinlerince bağlanmış olabilmesi mümkündür. Diğer yandan pH 7.3'de mercimek proteinlerince tutulamayan serbest lizozim filmlerden uzaklaştığı için filmler bu pH'dan pH 6.3, ve ardından pH 5.3 tampon içerisine yerleştirildiği zaman lizozim salımı gerçekleşmemektedir. pH değerinin 4.3'e, yani mercimek proteinlerinin izoelektrik noktasının altına düşmesinin ardından ise mercimek proteinleri pozitif yüklü hale gelmekte ve bu proteinler negatif yüklüysen tutulmuş olan pozitif yüklü lizozim serbest kalarak filmlerden salınmaya başlamaktadır. Kontrol filmler ise içerdikleri lizozimin tamamını pH 7.3'de saldıklarından, pH 6.3 ve 5.3'de olduğu gibi pH 4.3'de de lizozim salmamaktadır.

#### **4.2.3.3. Saf lizozim içeren zein-mercimek proteini kompozit filmlerin dinamik pH değişimi olan ortamlardaki lizozim salımı**

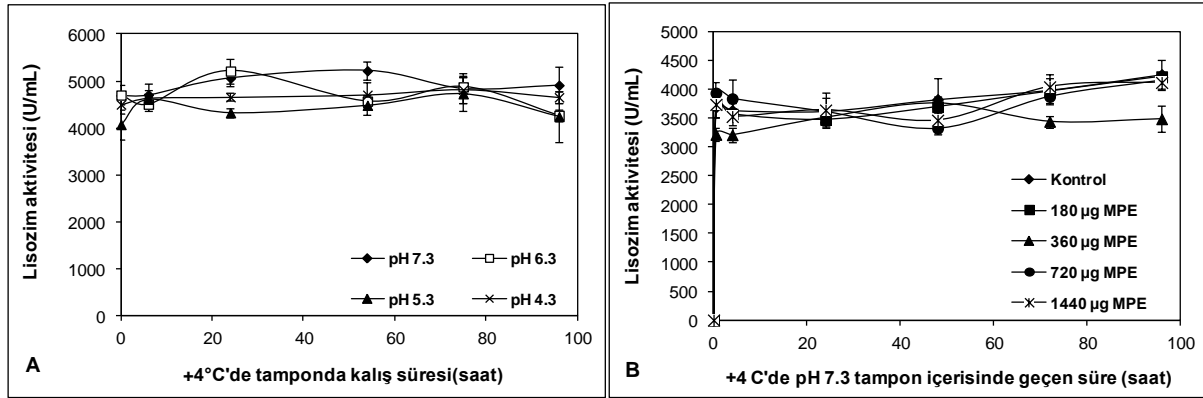
Şekil 4.41'de kısmi olarak saflaştırılmış lizozim yerine yüksek saflıktaki ticari lizozim kullanılarak aynı deneyin tekrarlanmasıyla elde edilmiş olan sonuçlar görülmektedir. Saf lizozimin aktivitesi tarafımızdan üretilmiş olan kısmi saf lizozime göre oldukça yüksek olduğundan, bu filmlere ilave edilen lizozim miktarı 2 kat daha az tutulmuştur (1.4 mg/cm<sup>2</sup>'den 0.7 mg/cm<sup>2</sup>'ye düşürülmüştür). Buna göre yüksek saflıktaki lizozim için de pH'ya bağlı salımın aynı şekilde gerçekleştiği açıktır (Tablo 4.28). Ancak, saf olan lizozimde pH 7.3'de geçiş sonrası aktivite düşüşü oldukça azdır. Bu durum saf lizozimin ortamdaki etkileşimlerinin kısmi saf lizoziminkinden daha farklı olduğunu bir kez daha göstermiştir. Buna göre zein filmler içerisine mercimek proteini katılarak kompozit filmler elde edilmesinin lizozimin salım hızını etkilemediği ancak filmlere pH'ya göre değişen miktarlarda lizozim salma yeteneği kazandırdığı açıktır. Bir başka ifadeyle zein-mercimek proteini kompozit filmler lizozimin pH'ya bağlı olarak salımını kontrol eden filmlerdir. Bu filmlerin örneğin sıgır karkaslarına kaplama



Şekil 4. 40. Kısmi saf lizozim ve mercimek proteinleri (MPE) içeren zein filmlerin ard arda farklı pH değerlerindeki Na-fosfat tamponlar içerisinde salım deneyine tabi tutulması sırasındaki lizozim salım profilleri (Not-1: 0-24 saatler arasında her film pH'sı 7.3 olan tampon içerisinde; 24-48 saatler arasında her film pH'sı 6.3 olan tampon içerisinde; 48-72 saatler arasında her film pH'sı 5.3 olan tampon içerisinde; 72-168 saatler arasında her film pH'sı 4.3 olan tampon içerisinde tutulmuştur; Not-2: yürütülen geçiş deneyinde salım deneyi pH'ları farklı olsa da aktivite ölçüm pH değerleri tüm örneklerde pH 7.0'dir; Not-3: filmler tampon içerisinde serbest halde çalkalanmaktadır)

şekilde uygulanması durumunda başlangıç pH'sı 7.3 civarında olan karkasa filmlerden lizozim geçişi olacağı ve belirli bir antimikrobiyel aktivite elde edileceği öngörülmektedir. Bir miktar lizozim ise filmler içerisindeki mercimek proteinlerine bağlı olarak kalacak ve karkas yüzeyinin asitlendirilerek pH değerinin bu proteinlerin pl değeri olan pH 5-6 altına düşürülmesine bağlı olarak ortama salınarak ete geçebilecektir. Bu şekilde bir kaplama materyaliyle asitlendirme işleminin zamanlamasına bağlı olarak istenildiği zaman örneğin etin depolanması, nakliyesi veya satış için sergilenmesi öncesinde antimikrobiyel etki elde edilmesi mümkündür. Gıda teknolojisinde bu tür pH'ya bağlı olarak salım yapan filmler geliştirilmesi ve et ürünlerine uygulanması ile ilgili literatürde herhangi bir veri bulunmayıp, bu

tarfımızdan tasarlanmış yeni bir düşüncedir.

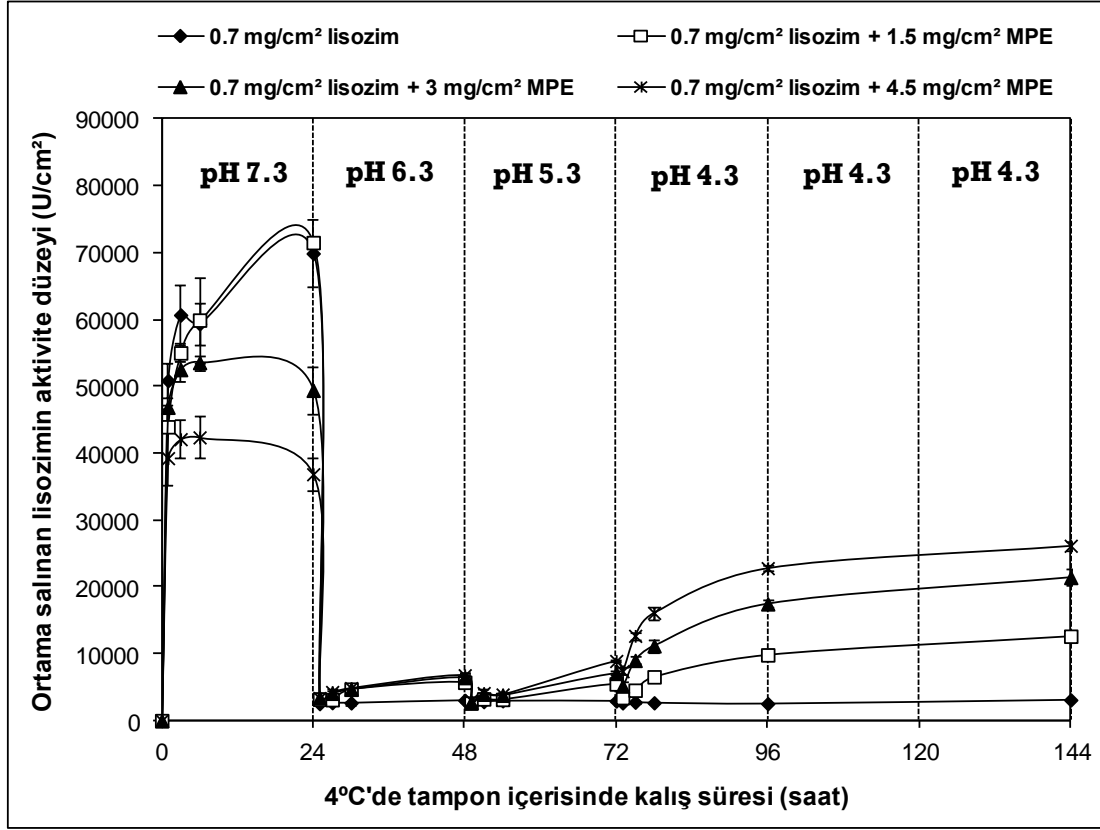


Şekil 4. 41. Kısmi saf lizozimin farklı pH'lardaki Na-fosfat tamponlar içerisindeki (A) ve farklı miktarlarda mercimek proteinleri (MPE) bulunan pH 7.3 Na-fosfat tampon çözeltilerindeki stabilitesi (B)

Tablo 4. 27. Farklı pH değerlerinde zein filmlerden 24 saat sonunda ortama geçen kısmi saf lizozimin aktivite düzeyleri (Tüm filmler 1.4 mg/cm<sup>2</sup> kısmi saf lizozim içermektedirler)

Salım deneyi pH'sı	Filmlerdeki mercimek proteini miktarları (mg/cm <sup>2</sup> ) ve ortama geçen lizozim aktiviteleri (U/cm <sup>2</sup> )			
	Kontrol	1.5	3.0	4.5
7.3	26060±1339	17942±647	14892±920	7333±774
6.3	1195±185	1228±84	1203±74	1244±189
5.3	1213±121	986±69	1911±446	1799±684
4.3	1346±228	6418±937	8855±739	11762±1559





Şekil 4. 42. Saf lizozim ve mercimek proteinleri (MPE) içeren zein filmlerin ard arda farklı pH değerlerindeki tamponlar içerisinde salım deneyine tabi tutulması sırasındaki lizozim salım profilleri (Not 1: 0-24 saatler arasında her film pH'sı 7.3 olan tampon içerisinde; 24-48 saatler arasında her film pH'sı 6.3 olan tampon içerisinde; 48-72 saatler arasında her film pH'sı 5.3 olan tampon içerisinde; 72-144 saatler arasında her film pH'sı 4.3 olan tampon içerisinde tutulmuştur; Not-2: yürütülen geçiş deneyinde salım deneyi pH'ları farklı olsa da aktivite ölçüm pH değerleri tüm örneklerde pH 7.0'dir; Not-3: filmler tampon içerisinde serbest halde çalkalanmaktadır).

Tablo 4. 28. Farklı pH değerlerinde zein filmlerden 24 saat sonunda ortama geçen saf lizozimin aktivite değerleri (Tüm filmler 0.7 mg/cm<sup>2</sup> saf lizozim içermektedirler)

Salım deneyi pH'sı	Filmlerdeki mercimek proteini miktarları (mg/cm <sup>2</sup> ) ve ortama geçen lizozim aktiviteleri (U/cm <sup>2</sup> )			
	Kontrol	1.5	3.0	4.5
7.3	69910±4991	71533±245	49429±3630	36865±2397
6.3	3033±117	5733±370	6436±586	6785±419
5.3	2938±66	5488±311	7067±294	8923±246
4.3	2535±17	9834±761	17469±613	22815±433

#### 4.2.3.4. Lizozim içeren zein-mercimek protini kompozit filmlerin *Listeria innocua* üzerindeki antimikrobiyel etkisi

Geliştirilmiş olan zein-mercimek proteini kompozit filmlerin antimikrobiyel aktivitesinin belirlenmesinde *L. innocua* bakterisi kullanılmıştır. Tablo 4.29 incelenecek olursa geliştirilen kısmi saf ve saf ticari lizozim içeren zein ve zein-mercimek proteini filmlerin hepsinin antilisteriyal aktivitesi olduğu görülmektedir. Saf ve kısmi saf lizozim içeren zein-mercimek proteini kompozit filmler farklı miktarlarda lizozim içermekte olduklarından bunların kıyaslanması doğru değildir. Ancak, 0.7 mg/cm<sup>2</sup> saf lizozim içeren filmlerin aynı miktarlarda kısmi saf lizozim içerenlerden yalnızca biraz daha büyük zon oluşturması iki enzimin aktiviteleri oldukça farklı olsa da antimikrobiyel aktiviteleri arasında çok büyük farklar olmadığını göstermektedir. Lizozimin antimikrobiyel aktivitesinin enzim konsantrasyonu, aktif yanda yüzey özellikleri ve bakteri membranına olan afinitesiyle de yakından ilgili olduğu düşünülürse bu durum daha açık anlaşılmaktadır.

Tablo 4. 29. Kısmi saf lizozim ve saf lizozim içeren zein-mercimek proteini kompozit filmlerin *L. innocua* üzerindeki antimikrobiyel etkisi

Filmlerin lizozim miktarı (mg/cm <sup>2</sup> )	Filmlerin mercimek proteini miktarları (mg/cm <sup>2</sup> )	Ortalama zon çapları (mm <sup>2</sup> )
<b>Saf lizozim</b>		
0.7	-	74 ± 27a <sup>a</sup>
0.7	1.5	68 ± 22a
0.7	3.0	78 ± 26a
0.7	4.5	78 ± 19a
<b>Kısmi saf lizozim</b>		
0.7	-	63 ± 14a
1.4	-	61 ± 15a
1.4	1.5	64 ± 11a
1.4	3.0	68 ± 15a
1.4	4.5	75 ± 13b

<sup>a</sup>farklı kolonlardaki harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir (P<0.05).

#### 4.2.3.5. Lisozim içeren zein-mercimek proteini kompozit filmlerin mekaniki özellikleri

Tablo 4.30'dan da görüleceği üzere zein filmler içerisine mercimek proteini ilave edilmesi filmlerin mekaniki özellikleri üzerinde fenolik bileşiklerde olduğu gibi sıra dışı değişimlere neden olmamaktadır. Ancak, gerek saf, gerekse kısmi saf lisozim kullanıldığı zaman özellikle 3.0 ve 4.5 mg/cm<sup>2</sup> gibi yüksek konsantrasyonda mercimek proteini içeren filmlerde elastikiyette bir miktar artış ve elastik modulus değerinde bir miktar azalış meydana gelmektedir. Zein filmlerin en önemli dezavantajı elastik olmamaları ve kırılabilirlik sorunları olduğundan zein filmlerin mercimek proteinleriyle kompozitleştirilmesinin sınırlı da olsa mekaniki özelliklerde bir gelişme sağladığı söylenebilir.

Tablo 4. 30. Zein ve zein-mercimek proteini kompozit filmlerin mekaniki özellikleri

Film bileşimi		Gerilme gücü (MPa)	Uzama (%)	Elastik modulus (MPa)
Lisozim (mg/cm <sup>2</sup> )	Mercimek prot. (mg/cm <sup>2</sup> )			
<b>Saf lisozim<sup>b</sup></b>				
-	-	6.40 ± 0.89a <sup>a</sup>	1.36 ± 0.13a	470.29 ± 38.64a
0.7	-	5.61 ± 0.32a	1.52 ± 0.12a	370.14 ± 30.45b
0.7	1.5	4.39 ± 0.82b	2.44 ± 0.38a	180.59 ± 26.68c
0.7	3	5.62 ± 0.57a	3.45 ± 0.73b	168.31 ± 31.70c
0.7	4.5	5.00 ± 1.29ab	3.46 ± 1.24b	138.75 ± 23.10c
<b>Kısmi saf lisozim<sup>b</sup></b>				
-	-	6.40 ± 0.89a	1.36 ± 0.13a	470.29 ± 38.64a
1.4	-	5.88 ± 1.08a	1.56 ± 0.22a	376.77 ± 56.28b
1.4	1.5	7.11 ± 0.68a	2.91 ± 0.54b	248.29 ± 27.48c
1.4	3	7.31 ± 0.15a	3.64 ± 0.26c	201.71 ± 12.51c
1.4	4.5	8.37 ± 0.46b	3.98 ± 0.73c	216.27 ± 41.03c

<sup>a</sup>farklı kolonlardaki harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir (P<0.05); <sup>b</sup>Saf ve kısmi saf enzim kullanılan filmlere ait veriler kendi içinde değerlendirilmiştir.

#### 4.2.3.6. Lisozim içeren zein-mercimek protini kompozit filmlerin SEM görüntüleri

Mercimek proteinleri emülsiyeye edici özellikleriyle hidrofobik zein film çözeltileri içerisine oldukça rahat karıştırılabilmekte ve homojenizasyonla kolaylıkla dağıtılabilmektedir. Ancak yine de dikkatli bir şekilde çıplak gözle film yüzeyine bakıldığında filmler içerisinde dağılmış mercimek protein globülleri belli belirsiz seçilebilmektedir. Kompozitleşme çıplak

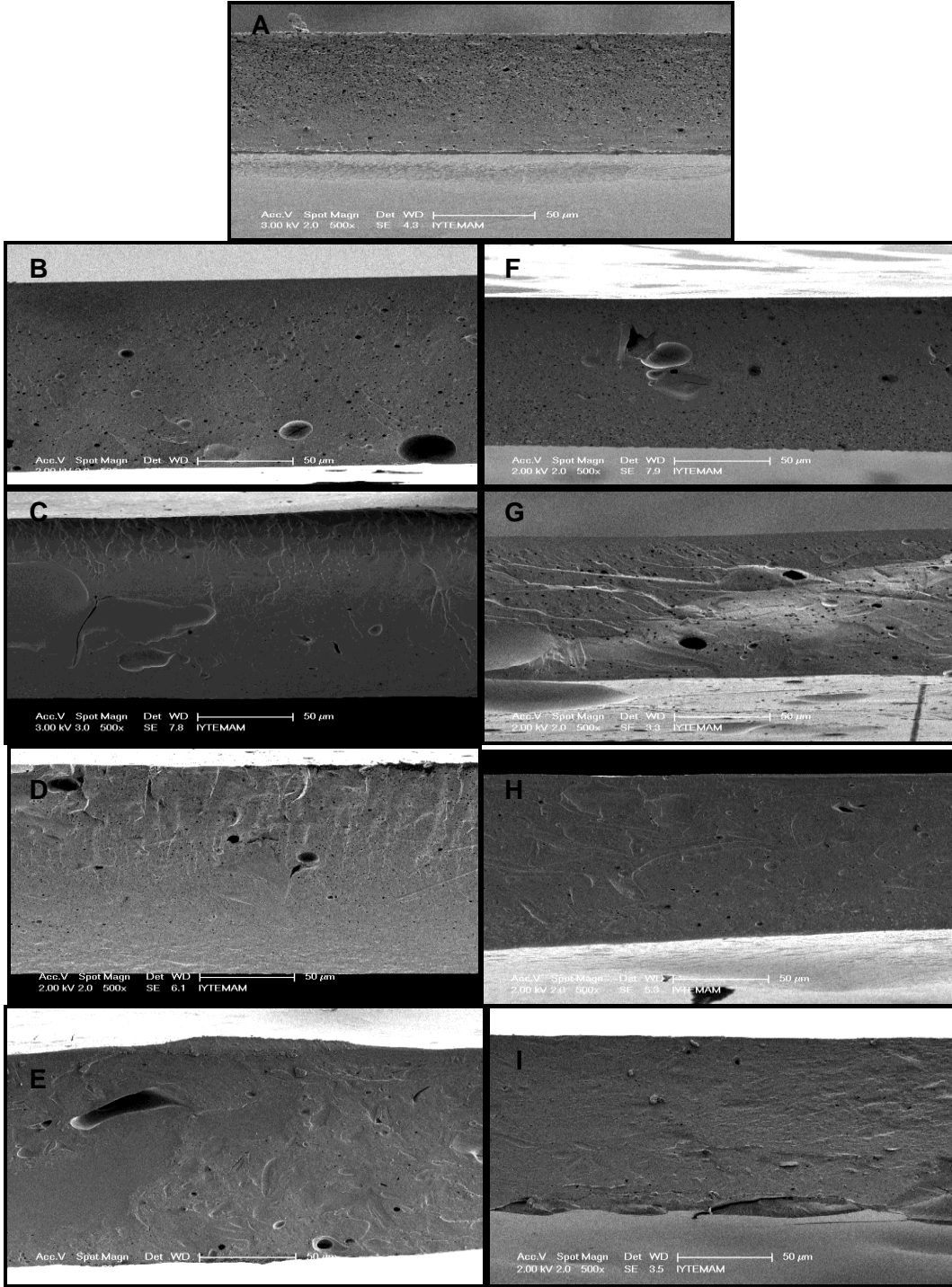
gözle özellikle 3.0 ve 4.5 mg/cm<sup>2</sup> mercimek proteini içeren filmlerde seçilebilmektedir. Ancak, zein filmlerin SEM yan kesit görüntülerinden kompozitleşme tam olarak görülememektedir (Şekil 4.42A-4.42I). Kısmi saf lizozim içeren filmlerde mercimek proteini konsantrasyonu arttıkça film içerisinde ince çatlakları andıran yapılar, yer yer şekilsiz oluşumlar meydana gelmektedir. Ancak, özellikle saf lizozim içeren filmlerde zein-lizozim-mercimek proteinleri mükemmel bir emülsiyon oluşturmaktadır. Dolayısıyla aslında zein-mercimek protein filmleri karışım olarak bile adlandırılabilirlerdir. Ancak, özellikle yüksek konsantrasyonlarda mercimek proteini içeren filmlerde çıplak gözle incelenince film içerisine dağılmış olan çok sayıda protein zerreciklerinin seçilmesi nedeniyle filmler kompozit olarak adlandırılmıştır.

#### **4.2.3.7. Kısmi saf lizozim içeren zein-soya proteini kompozit filmlerin dinamik pH değişimi olan ortamlardaki lizozim salımı**

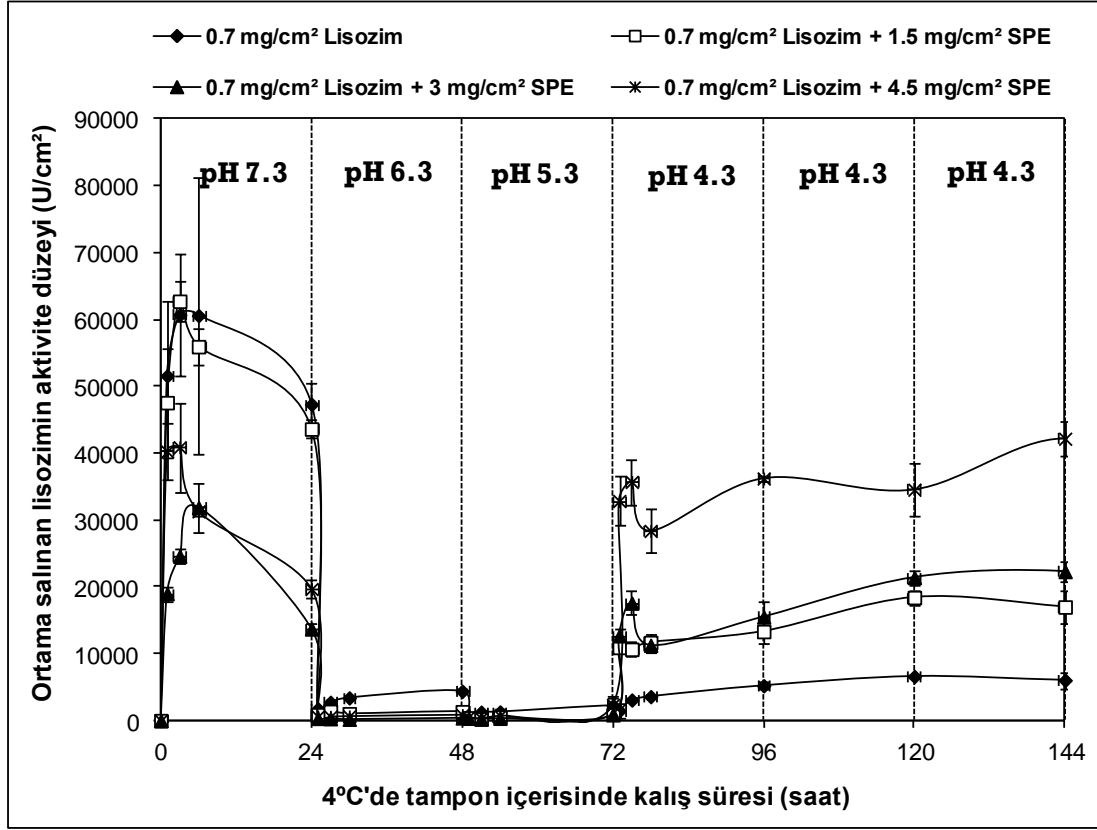
Şekil 4.43'de yüksek saflıktaki ticari lizozimin; mercimek proteini içeren kompozit zein filmler (bölüm 4.2.3.3) yerine tarafımızdan üretilmiş soya proteinleri katılarak elde edilmiş kompozit filmlerden salım profilleri gösterilmiştir. İçerisine soya proteini katılarak kompozit filmler elde edilmesinin aynı mercimek proteinleri ilavesinde olduğu gibi lizozimin salım hızını etkilemediği ancak filmlere pH'ya göre değişen miktarlarda lizozim salma yeteneği kazandırdığı açıktır (Tablo 4.31). Bir başka ifadeyle hem zein-mercimek proteini hem de zein-soya proteini kompozit filmler lizozimin pH'ya bağlı olarak salımını kontrol eden filmlerdir. Daha önce de belirtildiği gibi gıda teknolojisinde bu tür pH'ya bağlı olarak salım yapan filmler geliştirilmesi ve et ürünlerine uygulanması tarafımızdan tasarlanmış yeni bir düşüncedir.

#### **4.2.3.8. Lizozim içeren zein-soya proteini kompozit filmlerin *Listeria innocua* üzerindeki antimikrobiyel etkisi**

Geliştirilmiş olan zein-soya proteini kompozit filmlerin antimikrobiyel aktivitesinin belirlenmesinde *L. innocua* bakterisi kullanılmıştır. Tablo 4.32 incelenecek olursa geliştirilen saf ticari lizozim içeren zein ve zein-soya proteini filmlerin hepsinin antilisteriyal aktivitesi olduğu görülmektedir. Kompozit film içerisindeki soya proteini miktarının artması, geliştirilen filmlerin antilisteriyal özelliklerini istatistiksel olarak önemli ölçüde değiştirmemiştir.



Şekil 4. 43. Kısmi saf ve saf lizozim içeren zein ve zein-mercimek protein ekstraktı kompozit filmlerin SEM görüntüleri (Büyütme: x500; A: Kontrol; B: 1.4 mg/cm<sup>2</sup> kısmi saf lizozim, C: 1.5 mg/cm<sup>2</sup> MPE ve 1.4 mg/cm<sup>2</sup> kısmi saf lizozim; D: 3 mg/cm<sup>2</sup> MPE ve 1.4 mg/cm<sup>2</sup> kısmi saf lizozim; E: 4.5 mg/cm<sup>2</sup> MPE ve 1.4 mg/cm<sup>2</sup> kısmi saf lizozim; F: 0.7 mg/cm<sup>2</sup> saf lizozim; G: 1.5 mg/cm<sup>2</sup> MPE ve 0.7 mg/cm<sup>2</sup> saf lizozim; H: 3 mg/cm<sup>2</sup> MPE ve 0.7 mg/cm<sup>2</sup> saf lizozim; I: 4.5 mg/cm<sup>2</sup> MPE ve 0.7 mg/cm<sup>2</sup> saf lizozim (MPE: mercimek protein ekstraktı)



Şekil 4. 44. Saf lizozim ve soya proteinleri (SPE) içeren zein filmlerin ard arda farklı pH değerlerindeki tamponlar içerisinde salım deneyine tabi tutulması sırasındaki lizozim salım profilleri (Not 1: 0-24 saatler arasında her film pH'sı 7.3 olan tampon içerisinde; 24-48 saatler arasında her film pH'sı 6.3 olan tampon içerisinde; 48-72 saatler arasında her film pH'sı 5.3 olan tampon içerisinde; 72-144 saatler arasında her film pH'sı 4.3 olan tampon içerisinde tutulmuştur; Not-2: yürütülen geçiş deneyinde salım deneyi pH'ları farklı olsa da aktivite ölçüm pH değerleri tüm örneklerde pH 7.0'dir; Not-3: filmler tampon içerisinde serbest halde çalkalanmaktadır).

Tablo 4. 31. Farklı pH değerlerinde zein filmlerden 24 saat sonunda ortama geçen saf lizozimin aktivite değerleri (Tüm filmler 0.7 mg/cm<sup>2</sup> saf lizozim içermektedirler)

Salım deneyi pH'sı	Filmlerdeki soya proteini miktarları (mg/cm <sup>2</sup> ) ve ortama geçen lizozim aktiviteleri (U/cm <sup>2</sup> )			
	Kontrol	1.5	3.0	4.5
7.3	47134 ± 3069	43628 ± 1381	13715 ± 857	19687 ± 1446
6.3	4389 ± 282	1331 ± 748	406 ± 202	844 ± 314
5.3	2227 ± 1171	868 ± 257	959 ± 533	2344 ± 1306
4.3	5214 ± 483	13331 ± 1849	15511 ± 2375	36232 ± 390

Tablo 4. 32. Saf lizozim içeren zein-soya proteini kompozit filmlerin *L. innocua* üzerindeki antimikrobiyel etkisi

Filmlerin lizozim miktarı (mg/cm <sup>2</sup> )	Filmlerin soya proteini miktarları (mg/cm <sup>2</sup> )	Ortalama zon çapları (mm <sup>2</sup> )
<b>Saf lizozim</b>		
0.7	-	247 ± 47a
0.7	1.5	116 ± 39b
0.7	3.0	96 ± 26b
0.7	4.5	91 ± 15b

<sup>a</sup>farklı kolonlardaki harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir (P<0.05).

### 4.3. LİSOZİM VE FENOLİK BİLEŞİKLER'İN KONTROLLÜ SALIMI İÇİN KOMPOZİT VE KARIŞIM YENİLEBİLİR PEYNİRALTI SUYU FİMLER GELİŞTİRİLMESİ

#### 4.3.1. Kateşinin peyniraltı suyu proteini filmlerden kontrollü salımı için zein-mum kompozit filmlerin geliştirilmesi

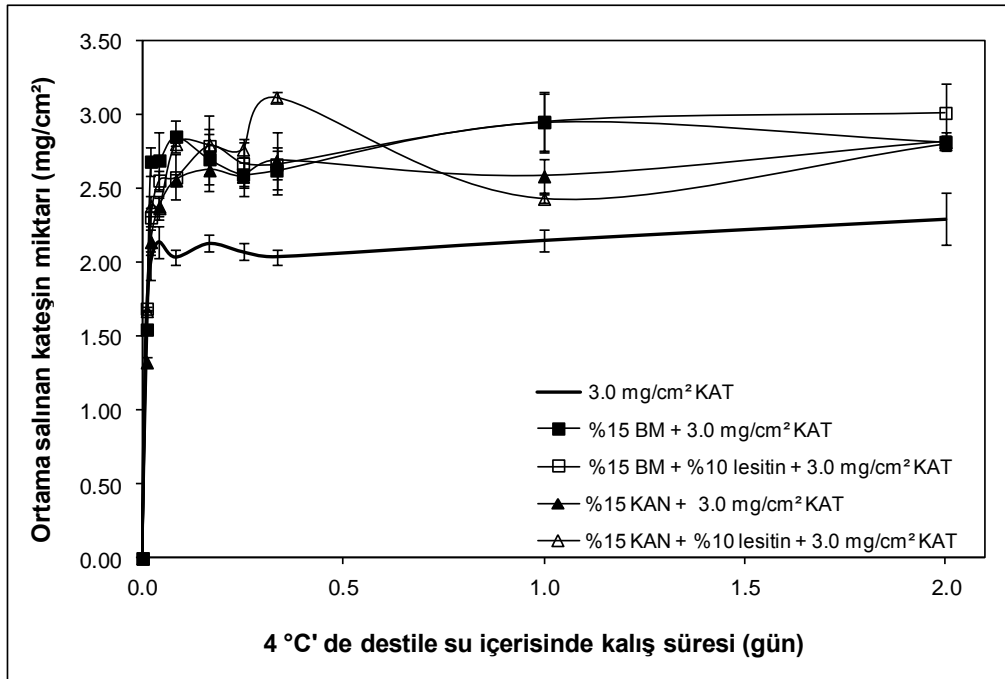
Çalışmanın bu aşamasında peynir altı suyu proteinlerinden (PSP) elde edilen filmlerle de çalışılmış ve bugüne kadar zein filmlerde kullanılmış mumlarla (balmumu ve kandelilla mumu) kompozit yapılar oluşturulması yoluyla kontrollü salım etkisi geliştirilmesi stratejisi bu filmlere de uyarlanmaya çalışılmıştır. Aşağıda bu çalışmalar kapsamında elde edilen bazı sonuçlar verilmiştir.

##### 4.3.1.1. Kateşin içeren peyniraltı suyu proteini-kandelilla mumu ve peyniraltı suyu proteini-balmumu kompozit filmlerin kateşin salımı

Şekil 4.44 incelendiği zaman PSP filmlerden fenolik madde geçişinin büyük bir hızda gerçekleştiği ve filmler içerisine PSP'nin %15 'i oranında balmumu veya kandelilla mumu (lesitinle veya lesitinsiz) katılmasının fenolik madde geçiş hızını herhangi bir şekilde yavaşlatmadığı görülmektedir. Bu durum PSP'nin çok hidrofilik olması ve filmlerin büyük bir hızla su alıp şişmesiyle ilgilidir. Nitekim, salım deneyinin hemen başında petri kapları içerisine yerleştirilen filmlerin başlangıçtaki boyutunun 1.5-2.0 katı kadar genişleyerek büyümesi de filmlerin ne kadar hidrofilik olduğunu ve hızla şişerek su aldığını göstermektedir. Salım deneylerinde özellikle dikkat çeken bir husus da mum ilave edilen filmlerden ortama geçen toplam kateşin miktarının mum içermeyen kontrol filmlere kıyasla daha yüksek

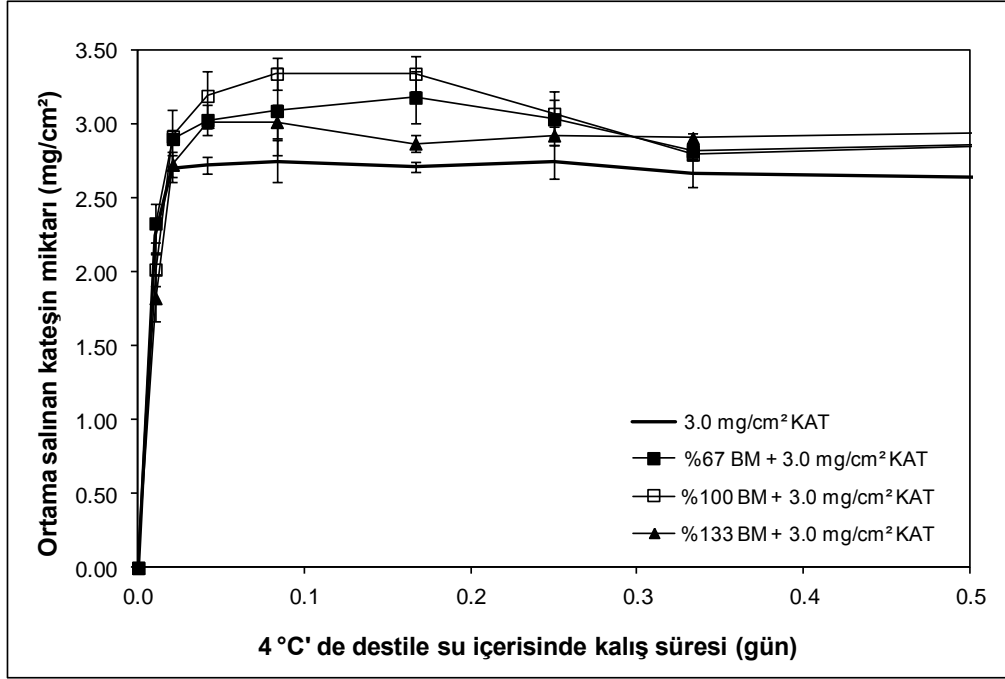
olmasıdır. Bu sonuç mum ilavesiyle PSP filmlerin yapısal bütünlüğünün bozulduğunu ve mum zerreciklerinin girmesiyle gevşeyen film matrisinin kateşini tutamadığını göstermektedir.

Çalışmanın ikinci aşamasında PSP ile kandelilla mumuna göre daha kolay karışan balmumu kullanılarak kompozit filmler içerisindeki mum oranı kayda değer şekilde artırılmış ve filmler su alma hızlarını yavaşlatmak amacıyla daha hidrofobik hale getirilmeye çalışılmıştır. Yüksek oranda mum ilave edebilmek amacıyla PSP çözeltileri 90°C' de 30 dakika ısıtıldıktan sonra aynı sıcaklıktaki su banyosuna alınarak bu sıcaklık korunmuş ve ortama mum ilave edildikten sonra film çözeltileri sıcak olarak homojenize edilmiştir. Film çözeltileri soğutulduktan sonra içlerine gliserol ve kateşin ilave edilmiş ve homojenizasyon işlemi bir kez daha uygulanmıştır (bu prosedürün normal yöntemden farklılık anlamak için bak bölüm 3.2.4.2). Ancak, Şekil 4.45'den de açıkça görüldüğü gibi PSP'nin %133'ü düzeyinde mum katılan kompozit filmlerde bile kateşinin geçiş hızı azaltılamamaktadır. Buna göre kateşin gibi küçük molekül ağırlıklı ve sudaki çözünürlüğü yüksek olan fenolik bileşiklerin kontrollü salımının zein-mum kompozit filmlerle sağlanmasının oldukça güç olduğu açıktır.



Şekil 4. 45. Kateşin içeren PSP, PSP-kandelilla mumu kompozit ve PSP-balmumu kompozit filmlerin kateşin salım profilleri (Not-1: KAT: kateşin, BM: Bal mumu; KAN: Kandelilla mumu; Not-2:filmler destile su içerisinde serbest halde çalkalanmaktadır)





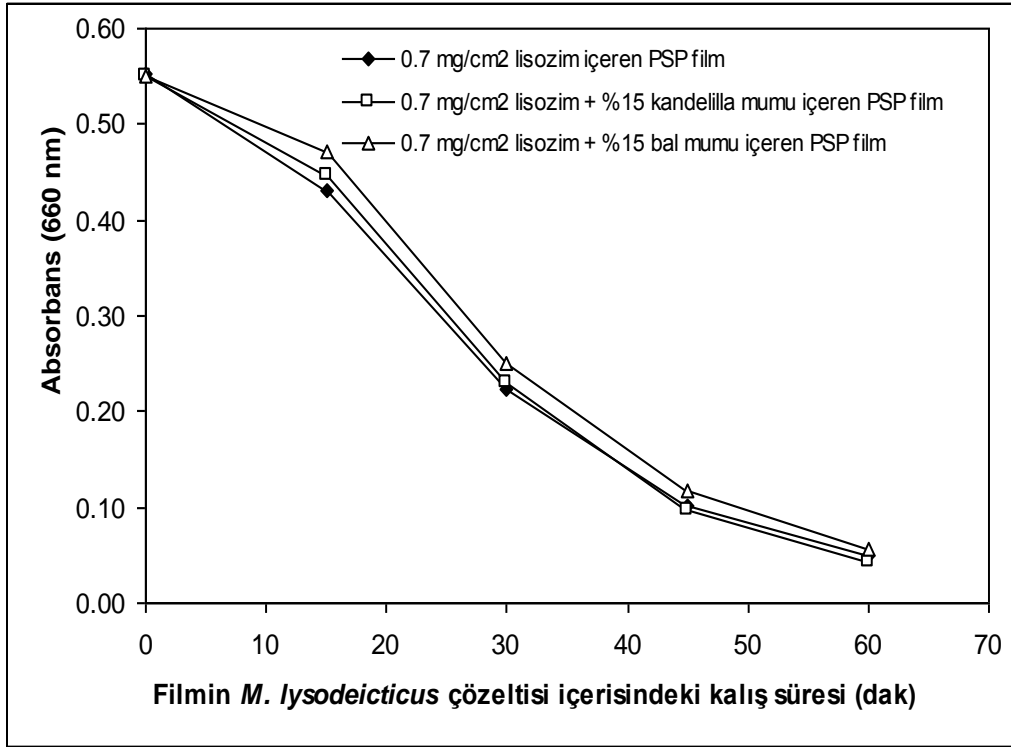
Şekil 4. 46. Kateşin içeren PSP-balmumu kompozit filmlerde mum oranının artırılmasının kateşinin salım profiline etkisi (Not-1: KAT: kateşin, BM: Bal mumu; Not-2: filmler destile su içerisinde serbest halde çalkalanmaktadır)

#### 4.3.2. Lisozim'in kontrollu salımı için peyniraltı suyu proteini-mum kompozit filmler geliştirilmesi

##### 4.3.2.1. Kısmi saf lisozim içeren peyniraltı suyu proteini-kandelilla mumu ve peyniraltı suyu proteini-balmumu kompozit filmlerin lisozim salımı

PSP filmler ve bunların farklı mumlarla karıştırılmasıyla elde edilen kompozit filmlerde kateşin'in kontrollu salımı ile ilgili güçlükler görülünce benzer filmlerin lisozimin kontrollu salımında kullanım potansiyeli incelenmiştir. Ancak, gerçekleştirilen denemelerde gerek üretilmiş olan kontrol PSP filmlerde, gerekse PSP-kandelilla mumu ve PSP-balmumu kompozit filmlerde filmlerden destile su içerisine 24saat boyunca herhangi bir lisozim geçişi görülmemiştir. Elde edilen bu sonuç lisozimin PSP filmler içerisinde immobilize olduğunu ve ortamda bağlı olarak kalarak salınmadığını göstermektedir. Bu durumun doğrulanması amacıyla üretilen filmlerde immobilize lisozim aktivitesi ölçümleri gerçekleştirilmiş ve enzimin PSP filmlerde bağlı halde bulunduğu doğrulanmıştır. Şekil 4.46'dan de görüleceği üzere üretilen PSP filmler oldukça yüksek düzeyde immobilize lisozim aktivitesi içermektedir (Tablo 4.33). Salım deneyleri nötrale yakın bir pH değerinde ve destile su içerisinde yürütülmüştür. Lisozimin izoelektrik noktası oldukça yüksek ve  $pI \approx 11$  civarında, PSP'yi oluşturan

proteinlerin isoelektrik noktası ise  $pI \approx 5$  civarındadır. Dolayısıyla lizozimin salım deneyi koşullarında pozitif yüklü, PSP filmin ise büyük oranda negatif yüklü olduğu düşünülerek enzimin filme bağlanmasının yük-yük etkileşimi nedeniyle meydana geldiği düşünülmektedir. Literatür incelendiği zaman özellikle plastik filmler için immobilize halde enzim içeren aktif ambalajlama malzemeleri geliştirilmesi üzerinde çalışmalar olduğu görülmektedir (APPENDINI ve HOTCHKISS, 1997). Ancak, bu durum kontrollü salım açısından bir olumsuzluk teşkil etmektedir.



Şekil 4. 47. Farklı PSP filmlerinin immobilize lizozim aktivitelerini gösteren kurveler (filmler 0.7 mg/cm<sup>2</sup> kısmi saf lizozim içermektedirler)

Tablo 4. 33. Kısmi saf lizozim içeren PSP ve PSP-mum kompozit filmlerde immobilize lizozim aktiviteleri

Filmlerdeki lizozim miktarı (mg/cm <sup>2</sup> )	Mum (%15) <sup>a</sup>	İmmobilize lizozim aktivitesi (U/cm <sup>2</sup> )
0.7	-	0.90 ±0.02
0.7	Kandelilla mumu	0.84 ±0.09
0.7	Bal mumu	0.81 ±0.03

<sup>a</sup> PSP' nin yüzdesi olarak filmlere ilave edilen mum miktarı

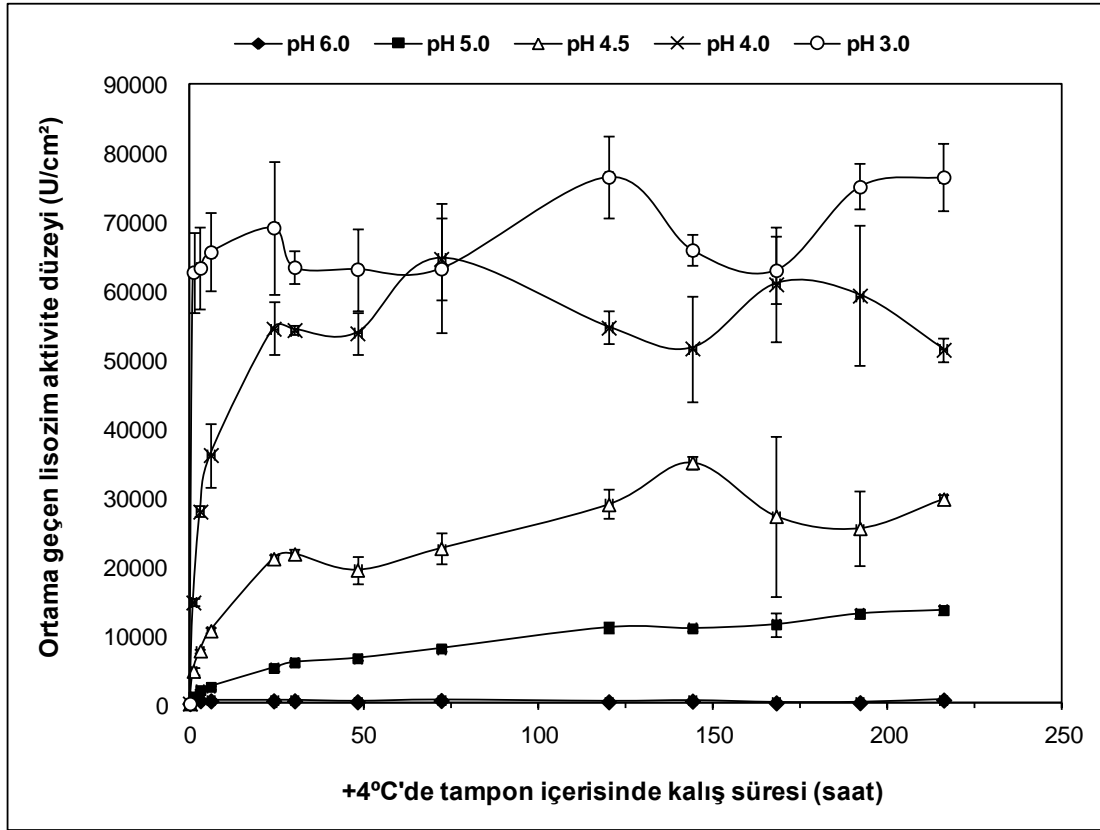
#### **4.3.2.2. Saf lizozim içeren peyniraltı suyu proteini filmlerin farklı pH değerlerindeki lizozim salımı**

Negatif yüklü lizozimin yine negatif yüklü PSP filmler içerisinde aynen lizozimin zein-mercimek proteini kompozit filmlerde olduğu gibi yük-yük etkileşimleriyle tutulduğunun anlaşılmasıyla bu filmlerden lizozim salımının gerçekleştiği pH değerlerinin belirlenmesi için farklı pH değerlerindeki tamponlar içerisinde salım deneyleri yürütülmüştür. Çalışmanın bu aşamasında aktivitesinin yüksekliği dolayısıyla oldukça hassas bir şekilde ölçülebilmesi nedeniyle özellikle saf lizozim kullanılmıştır. Şekil 4.47’de farklı pH’daki tamponlar içerisinde PSP filmlerin lizozim salım profilleri görülmektedir. Buna göre PSP’nin pl değerinin üzerinde olan ( $pI \approx 5.0$ ) pH 6.0’da beklediği gibi filmlerden lizozim geçişi olmadığı, ancak buna karşın salım deneyinin pH 5.0’ de yürütülmesiyle filmlerden az da olsa lizozim salımı başladığı görülmektedir. Salım deneyinin pH 4.5 veya 4.0’ te gerçekleştirilmesiyle ise lizozim geçişi hızlanmış ve enzim serbest kalmıştır. Elde edilen bu sonuçlar pl değerinin altındaki pH değerlerinde negatif yüklerini kaybeden PSP’nin pozitif yüklü lizozimi serbest bıraktığını ve pH’ya bağlı bir kontrollü salım gerçekleştiğini göstermektedir (Tablo 4.34). Bu durumda PSP filmlerin aynen zein-baklagil proteini kompozit filmlerde olduğu gibi lizozimin pH’ya bağlı kontrollü salımını gerçekleştirmek amacıyla kullanılabilirliği açıktır. Bu amaçla daha önce zein-baklagil kompozit filmlerinde belirtildiği gibi lizozim içeren PSP filmlerle kaplanmış ürünlerin pH değerinin asidik bir çözeltiliye daldırma ile düşürülmesi yeterlidir. Bu işlemin antimikrobiyel aktiviteye ihtiyaç duyulan taşıma, depolama veya sergileme öncesinde gerçekleştirilmesi uygun olabilir.

#### **4.3.2.3. Saf lizozim içeren peyniraltı suyu proteini filmlerin dinamik pH değişimi olan ortamlardaki lizozim salımı**

Lizozim içeren tek bir PSP filmin ard arda farklı pH değerlerindeki tamponlarda en az 24 saat bekletilmesiyle elde edilen lizozim salım profilleri Şekil 4.48’de görülmektedir. Buna göre pH 5.0’te meydana gelen lizozim salımından sonra film içerisindeki serbest hale gelmiş lizozimin azaldığı ve bunun ardından aynı filmde pH 4.5’te meydana gelen salımın buna bağlı olarak daha da düştüğü görülmektedir. Filmin pH 4.0 tampon içerisine aktarılmasıyla ise lizozim salımı biraz artmış ve salınan lizozim aktivitesi  $10000 \text{ U/cm}^2$ ’nin biraz üzerine çıkmıştır (Tablo 4.35). Bir sonraki aşamada pH 3.0’de filmde bu kez büyük bir lizozim geçişi olmuş ve filmde bağlanmış lizozimin büyük bir kısmı ortama geçmiştir. Buna göre çeşitli proteinlerin karışımından oluşan PSP içerisinde pl değeri 5.0 ve 3.0 arasında değişen farklı proteinler bulunduğu ve pl değeri en düşük olan proteini en yüksek miktarda lizozim

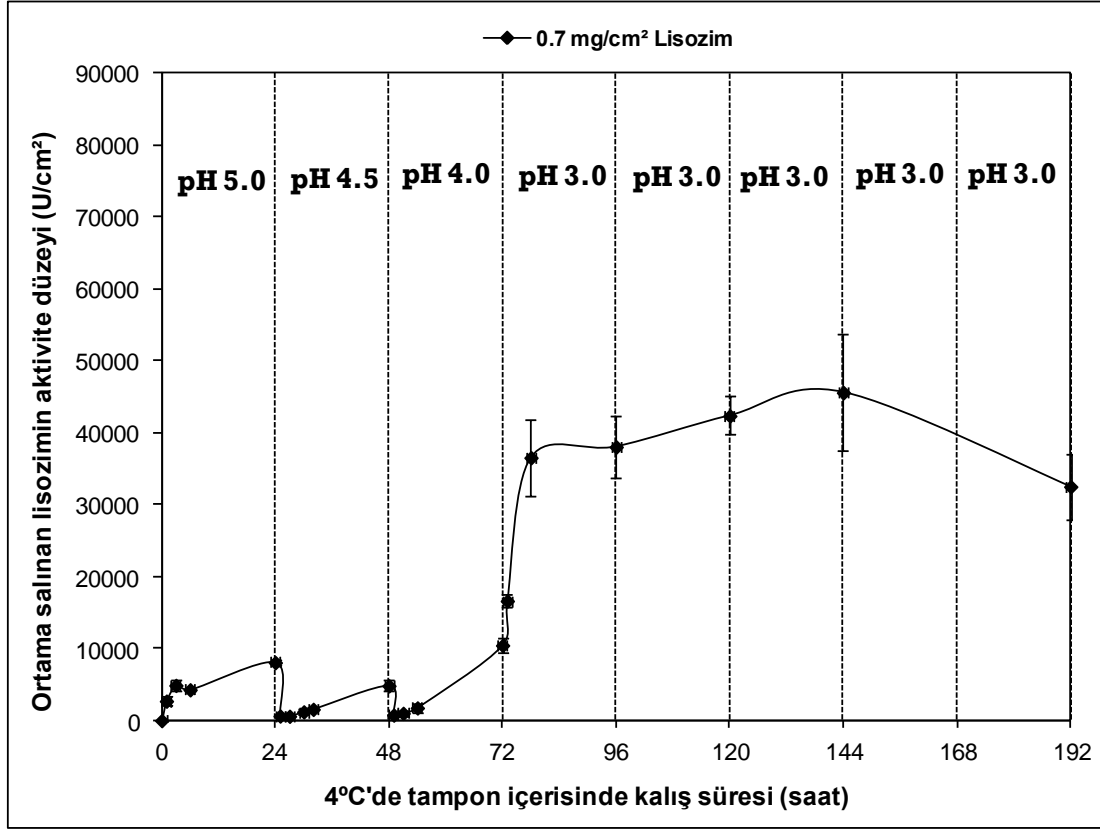
bağladığı açıktır.



Şekil 4. 48. Saf lizozim içeren PSP filmlerin farklı pH değerlerindeki lizozim salım profilleri (Not-1: filmler  $0.7 \text{ mg/cm}^2$  saf lizozim içermektedir; Not-2: her film farklı bir Na-asetat tamponu (0.05 M) içerisinde serbest halde çalkalanmaktadır)

Tablo 4. 34. Saf lizozim içeren PSP filmlerden farklı pH'larda salınan toplam lizozim aktivite düzeyleri

Filmlerdeki lizozim miktarı ( $\text{mg/cm}^2$ )	Salım ortamı pH değeri	Salınan toplam lizozim aktivitesi ( $\text{U/cm}^2$ )
0.7	6.0	$510 \pm 129$
0.7	5.0	$13587 \pm 670$
0.7	4.5	$29708 \pm 677$
0.7	4.0	$51395 \pm 1733$
0.7	3.0	$76481 \pm 4930$



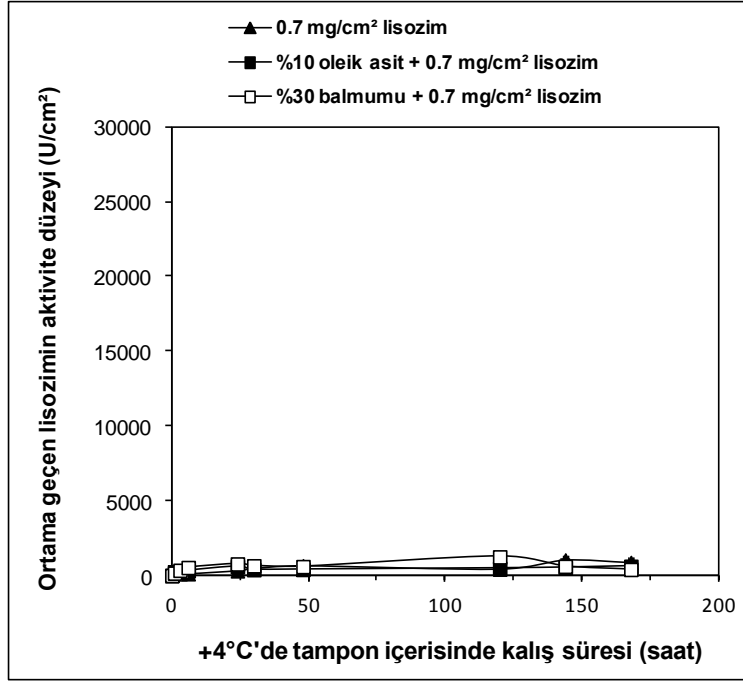
Şekil 4. 49. Saf lisozim içeren PSP filmin ard arda farklı pH değerlerindeki Na-asetat tamponlar (0.05 M) içerisinde salım deneyine tabi tutulması sırasındaki lisozim salım profilleri (Not-1: 0-24 saatler arasında film pH'sı 5.0 olan tampon içerisinde; 24-48 saatler arasında film pH'sı 4.5 olan tampon içerisinde; 48-72 saatler arasında film pH'sı 3.0 olan tampon içerisinde; 72-192 saatler arasında film pH'sı 4.3 olan tampon içerisinde tutulmuştur; Not-2: yürütülen geçiş deneyinde salım deneyi pH'ları farklı olsa da aktivite ölçüm pH değerleri tüm örneklerde pH 7.0'dir; Not-3: filmler tampon içerisinde serbest halde çalkalanmaktadır)

Tablo 4. 35. Saf lisozim içeren PSP filmde farklı pH değerlerinde 24 saat sonunda ortama geçen saf lisozimin aktivite değerler (0.7 mg/cm<sup>2</sup> lisozim içermektedirler)

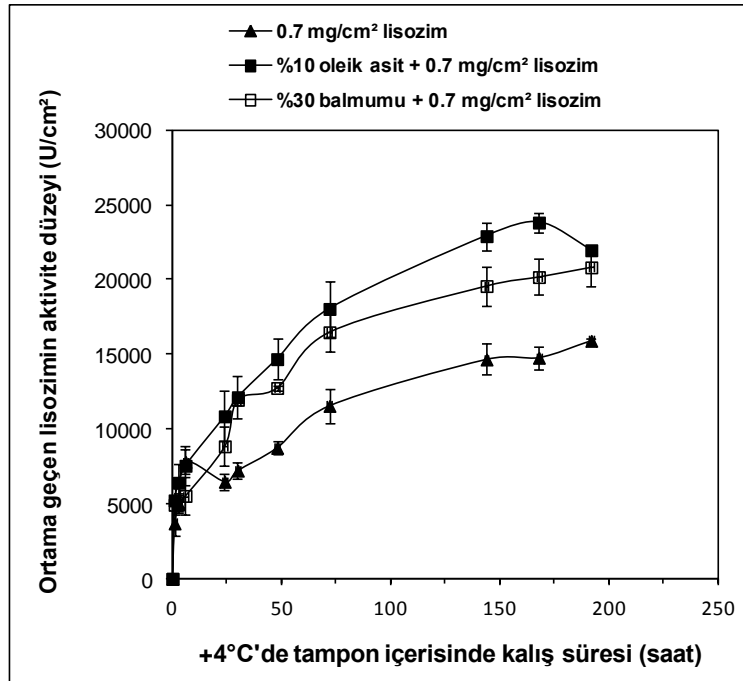
Filmlerdeki lisozim miktarı (mg/cm <sup>2</sup> )	Salım ortamı pH değeri	Salınan toplam lisozim aktivitesi (U/cm <sup>2</sup> )
0.7	5.0	8061 ± 402
0.7	4.5	4832 ± 726
0.7	4.0	10450 ± 913
0.7	3.0	38031 ± 4212

#### 4.3.2.4. Saf lizozim içeren peyniraltı suyu proteini-balmumu kompozit ve peyniraltı suyu-oleik asit karışım filmlerin lizozim salımı

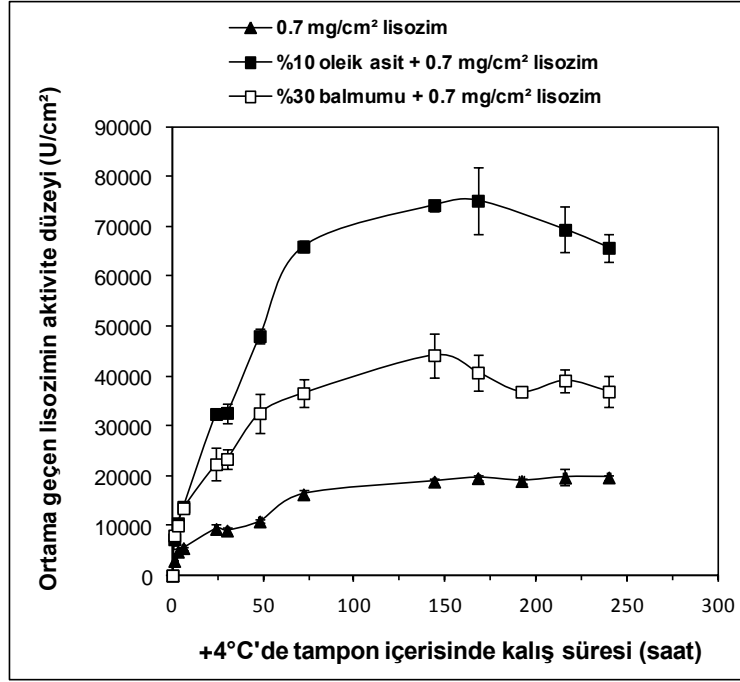
PSP filmlerde lizozimin pH'ya bağlı salım kinetiği hakkında ayrıntılı denemeler yürüttükten sonra PSP-balmumu kompozit ve PSP-oleik asit karışım filmlerin lizozim geçişi olması beklenen pH değerlerindeki salım profilleri incelenmiştir. Şekil 4.49'da görüldüğü üzere pH 5.5'da beklendiği gibi lizozim geçişi olmamaktadır. Ancak gerek pH 5.0'de, gerekse pH 4.5'de tüm filmlerden lizozim geçişi olmaktadır (Şekil 4.50 ve 4.51). Ancak beklenenin aksine PSP filmler içerisine balmumu ve oleik asit katılması lizozim geçiş hızını ve ortama geçen toplam lizozim miktarlarını artırmaktadır. Bu durum yağ asiti ve mum ilavesinin PSP filmlerin gözenekliliğini artırdığını veya lizozimi bağlayan negatif yüklü protein gruplarının lipitlerce maskelendiğini göstermektedir. Bu ilginç durum kompozit veya karışım PSP filmle kaplanmış bir üründe PSP filme göre daha hafif bir asitlendirmeye lizozim salımının başlatılabilmesini sağlayacağından oldukça anlamlı bulunmuştur. Gerek pH 4.5'te, gerekse pH 5.0'te oleik asitin PSP filmlerin lizozim salım hızını ve salınan toplam miktarını artırıcı etkisi balmumu içeren filmlere göre daha yüksektir (Tablo 4.36). Homojenizasyon sırasında oleik asitin balmumuna göre filmler içine daha kolay ve homojen şekilde katıldığı düşünülürse bu durumun sözkonusu yağ asitinin PSP film yüzeylerindeki çok sayıdaki negatif yüklü grupları daha etkin şekilde kaplamasından kaynaklandığı düşünülebilir. Oleik asit içerdiği karboksil grubu nedeniyle kendisi de negatif yüklüdür, ancak yük içeren grubu yalnızca 1 adettir (-COOH grubu) ve uzun hidrofobik zincirinin PSP yüzeylerini kaplayarak çok sayıdaki negatif yükünü maskeleyebilmesi mümkündür.



Şekil 4. 50. Saf lizozim içeren PSP, PSP-balmumu kompozit ve PSP-oleik asit karışım filmlerin pH 5.5 Na-asetat tampon (0.05 M) içerisindeki lizozim salım profilleri (Not-1: her film farklı bir tampon içerisinde serbest halde çalkalanmaktadır)



Şekil 4. 51. Saf lizozim içeren PSP, PSP-balmumu kompozit ve PSP-oleik asit karışım filmlerin pH 5.0 Na-asetat tampon (0.05 M) içerisindeki lizozim salım profilleri (Not-1: her film farklı bir tampon içerisinde serbest halde çalkalanmaktadır)



Şekil 4. 52. Saf lizozim içeren PSP, PSP-balmumu kompozit ve PSP-oleik asit karışım filmlerin pH 4.5 Na-asetat tampon (0.05 M) içerisindeki lizozim salım profilleri (Not-1: her film farklı bir tampon içerisinde serbest halde çalkalanmaktadır)

Tablo 4. 36. Saf lizozim içeren PSP, PSP-balmumu kompozit ve PSP-oleik asit karışım filmlerin farklı pH değerlerinde ortama geçen saf lizozimin aktivite değerleri (0.7 mg/cm<sup>2</sup> lizozim içermektedirler)

Salım ortamı pH değeri	Film bileşimi			Salınan toplam lizozim aktivitesi (U/cm <sup>2</sup> )
	Lizozim (mg/cm <sup>2</sup> )	Oleik asit (%) <sup>a</sup>	Balmumu (%) <sup>a</sup>	
5.5	0.7	-	-	872 ± 194
	0.7	10	-	611 ± 262
	0.7	-	30	403 ± 385
5.0	0.7	-	-	15910 ± 131
	0.7	10	-	21966 ± 240
	0.7	-	30	20821 ± 1215
4.5	0.7	-	-	18532 ± 763
	0.7	10	-	61032 ± 2912
	0.7	-	30	45114 ± 4818

<sup>a</sup>PSP' nin yüzdesi olarak filme katılan mum ve yağ asiti miktarı



#### 4.3.2.5. Saf lizozim içeren peyniraltı suyu proteini-balmumu kompozit ve peyniraltı suyu-oleik asit karışım filmlerin *Listeria innocua*'ya karşı antimikrobiyel etkisi

Tablo 4.37' de elde edilen verilere göre lizozim içermeyen PSP filmler kendiliğinden antimikrobiyel bir etkiye sahiptir. Bu veri daha önce UYSAL ve ark (2011) tarafından bu mikroorganizma üzerinde gerçekleştirilmiş olan antimikrobiyel testleri doğrulamaktadır. Bu araştırmacılar PSP filmlerin sahip olduğu antimikrobiyel aktivitenin süttten gelen laktoferrin gibi antimikrobiyel peptitlerden kaynaklandığını iddia etmişlerdir. Filmler içerisine lizozim ilave edilmesi filmlerin antimikrobiyel aktivitesini artırmaktadır. En yüksek antimikrobiyel etki lizozim salımını en fazla artırdığı belirlenmiş olan PSP-oleik asit karışım filmlerce gösterilmiştir. PSP-balmumu kompozit filmler ise lizozim içeren PSP filmlerle aynı düzeyde antimikrobiyel aktivite göstermiştir. Literatür incelendiği zaman MIN ve ark'nın (2005) lizozim içeren PSP filmler kullanarak *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyel etki elde etmeyi başardıkları görülmektedir. Ancak, lizozim içeren PSP kompozit ve karışım filmlerin daha önce başka araştırmacılarca üretildiği belirlenmemiştir.

Tablo 4. 37. Saf lizozim içeren PSP-balmumu kompozit ve PSP-oleik asit karışım filmlerin *Listeria innocua*'ya karşı antimikrobiyel etkisi

Filmlerin bileşimi		Ortalama zon alanı (mm <sup>2</sup> )	
Lizozim (mg/cm <sup>2</sup> )	Mum veya yağ asiti (%) <sup>a</sup>	24 saat inkübasyon için	48 saat inkübasyon için
-	-	62 ± 5 a <sup>b</sup>	70 ± 5 a
0.7	-	83 ± 2 b	95 ± 2 a
0.7	10 (OLE) <sup>c</sup>	125 ± 7 c	145 ± 14 b
0.7	30 (BM) <sup>c</sup>	89 ± 2 b	74 ± 13 a

<sup>a</sup>PSP' nin yüzdesi olarak filme katılan mum ve yağ asiti miktarı; <sup>b</sup>farklı kolonlardaki harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir (P<0.05); <sup>c</sup>PSP filme ilave edilen mum ve yağ asiti türleri: OLE: oleic asit; BM: balmumu

#### 4.3.2.6. Saf lizozim içeren peyniraltı suyu proteini-balmumu kompozit ve peyniraltı suyu proteini-oleik asit karışım filmlerin mekaniki özellikleri

Tablo 4.38'den de görüldüğü üzere PSP filmlere balmumu ve oleik asit katılarak kompozit ve karışım yapılar oluşturmak filmlerin mekaniki özellikleri üzerinde dramatik değişimlere neden olmamaktadır. Filmlerin uzama miktarının ve gerilme gücünün özellikle

mum ilavesiyle bir miktar azaldığı açıktır. Ancak, bu değişimlerden uzama miktarındaki azalış istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ( $P>0.05$ ).

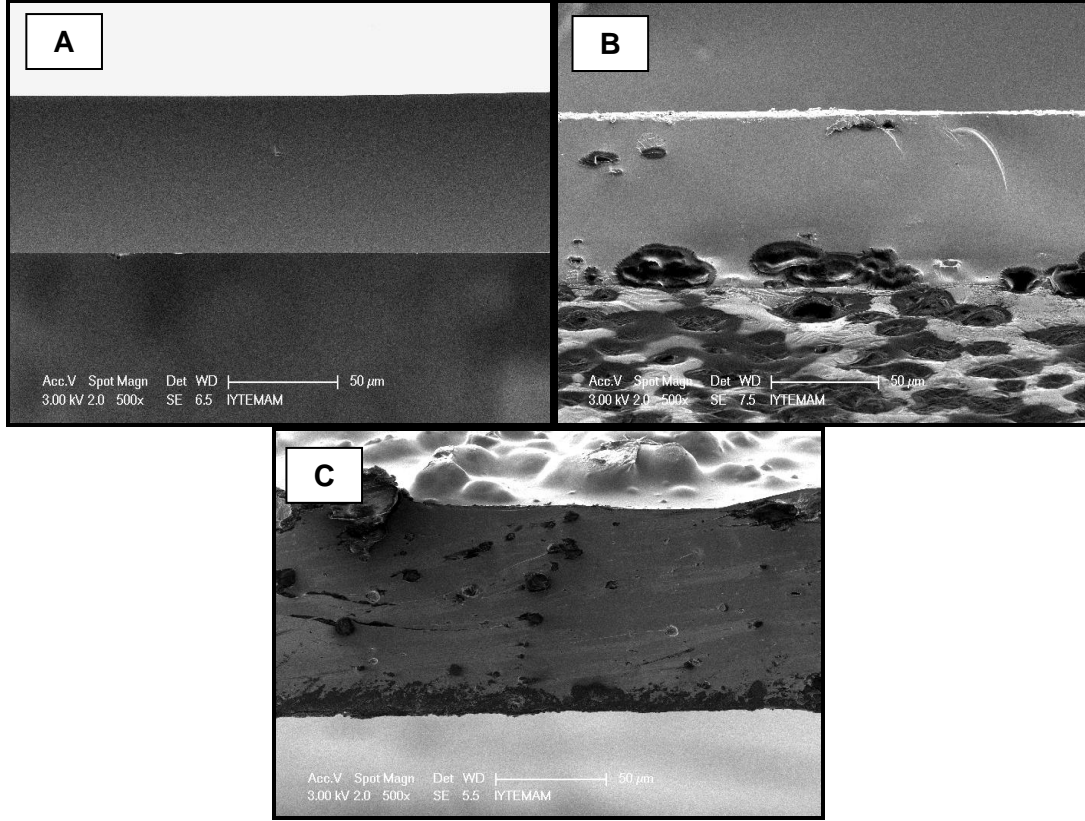
Tablo 4. 38. Saf lizozim içeren PSP-balmumu kompozit ve PSP-oleik asit karışım filmlerin mekaniki özellikleri

Filmlerin bileşimi		Gerilme gücü (MPa)	Uzama (%)	Elastik modulus (MPa)
Lizozim (mg/cm <sup>2</sup> )	Mum veya yağ asiti (%) <sup>a</sup>			
0.7	-	2.80 ± 0.44 a <sup>b</sup>	33.23 ± 14.79 a	10.14 ± 5.79 a
0.7	10 (OLE) <sup>c</sup>	2.77 ± 0.26 a	30.12 ± 11.81 a	10.72 ± 5.06 a
0.7	30 (BM) <sup>c</sup>	2.13 ± 0.14 b	14.13 ± 3.54 a	15.66 ± 3.31 a

<sup>a</sup>PSP' nin yüzdesi olarak filme katılan mum ve yağ asiti miktarı; <sup>b</sup>farklı kolonlardaki harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir ( $P<0.05$ ); <sup>c</sup>PSP filme ilave edilen mum ve yağ asiti türleri: OLE: oleic asit; BM: balmumu

#### 4.2.2.6. Saf lizozim içeren peyniraltı suyu proteini-balmumu kompozit ve peyniraltı suyu proteini-oleik asit karışım filmlerin SEM görüntüleri

Şekil 4.52.'de görülen SEM görüntüleri PSP filmler içerisine oleik asit ve balmumu katılmasının filmlerin morfolojik özelliklerine kayda değer değişimler meydana getirdiğini göstermektedir. Özellikle filmler içerisine oleik asit katılması filmlerin yüzeyindeki gözenekliliği ve küçük çukurcukları andıran yapıları artırırken, mum katılması yüzeyinde kabarık pütürler oluşmasına neden olmuştur. PSP filmlere oleik asit katılması filmlerin içerisinde sınırlı bir değişime neden olurken, balmumu katılması filmler içerisinde çözünür halde olmayan şekilsiz ve küçük mum zerrecikleri oluşmasına neden olmuştur. Bu görüntüler oleik asit ve balmumu için filmlerin niye karışım ve kompozit olarak adlandırıldıklarında göstermektedir. Özellikle oleik asit içeren filmlerde yüzeyin daha gözenekli olan görüntüsü bu filmlerin lizozim geçişini kayda değer şekilde artırması bulgusuyla uyumludur. Ancak yük-yük etkileşimiyle tutuklanma olan pH değerlerinde tek başına gözeneklilik artışının bile lizoimin filmlerden geçişini artırması beklenmemektedir. Bunun için oleik asitin PSP'nin yüzeyini kaplayarak içerdiği negatif yükleri maskeleyen etkisi olduğu ve bu durumun filmlerin lizozim bağlama yeteneğini azalttığı da düşünülmektedir. Ancak, şu an için elimizde bu hususta somut bir delil yoktur.



Şekil 4. 53. Saf lizozim içeren PSP (A), PSP-oleik asit karışım (B) ve PSP-balmumu kompozit (C) filmlerin SEM görüntüleri (Filmler  $0.7 \text{ mg/cm}^2$  lizozim içermektedir; Büyütme: 500x)

#### 4.4. GELİŞTİRİLMİŞ OLAN POTANSİYEL ARZ EDEN FİMLERİN SEÇİLMİŞ GIDALARDA UYGULANMASI

##### 4.4.1. Kısmi saf lizozimin ve fenolik bileşikler içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin taze kaşarda *Listeria monocytogenes*'e karşı kullanılması

Projenin bu aşamasında geliştirilmiş olan seçilmiş bazı filmler gıdalara uygulanmıştır. Gerçekleştirilmiş olan ayrıntılı denemeler ışığında öncelikli olarak lizozimin ve fenolik bileşiklerin kontrollü salımının başarılı bir şekilde sağlandığı düşünülen mum ve fenolik madde içeren zein filmlerin taze kaşar peynirine uygulanması kararlaştırılmıştır. Mum olarak deneysel olarak başarılı bulunmuş olan karnauba mumu, fenolik bileşik olarak da kateşin ve kateşin-gallik asit karışımı seçilmiştir. Seçilen filmlerde kısmi saf lizozimin konsantrasyonu  $0.7 \text{ mg/cm}^2$  düzeyinde tutulmuştur (bu değer seçilme nedeni ayrıntılı bir şekilde bölüm 4.2.1' de açıklanmıştır). Test bakterisi olarak gıdalarda bulunabilecek en kritik patojenlerden birisi olan *Listeria monocytogenes* seçilmiştir. Çeşitli kimyasallara ve çevresel faktörlere dirençli olan bu bakteri soğukta depolama sıcaklıklarında bile üreyebilmekte ve özellikle yeni

gelişmekte olan termal olmayan muhafaza yöntemleriyle üretilmiş soğutulmuş gıdalar açısından tehdit oluşturmaktadır. Buna göre çalışmada kullanılan örnekler ve film bileşimleri aşağıdaki gibidir:

- (1) Zein film içermeyen kaplanmamış örnek
- (2) 0.7 mg/cm<sup>2</sup> kısmi saf lizozim içeren zein filmle kaplanmış örnek
- (3) 6 mg/cm<sup>2</sup> kateşin + 0.7 mg/cm<sup>2</sup> kısmi saf lizozim içeren zein filmle kaplanmış örnek
- (4) Zein'in % 5'i kadar karnauba mumu + zein'in % 5'i kadar lesitin + 6 mg/cm<sup>2</sup> kateşin + 0.7 mg/cm<sup>2</sup> kısmi saf lizozim içeren zein-karnauba mumu kompozit filmle kaplanmış örnek
- (5) 3 mg/cm<sup>2</sup> kateşin + 3 mg/cm<sup>2</sup> gallik asit + 0.7 mg/cm<sup>2</sup> kısmi saf lizozim içeren zein filmle kaplanmış örnek
- (6) Zein'in % 5'i kadar karnauba mumu + zein'in % 5'i kadar lesitin + 3 mg/cm<sup>2</sup> kateşin + 3 mg/cm<sup>2</sup> gallik asit + 0.7 mg/cm<sup>2</sup> kısmi saf lizozim içeren zein-karnauba mumu kompozit filmle kaplanmış örnek

Her iki yüzeylerine de film kaplandıktan sonra peynir parçaları ilk önce filmlerin ürünle sıkı şekilde temasının sağlanması amacıyla streç naylon filmle, ardından ise alüminyum folyo ile sarılarak paketlenmiş ve mikrobiyolojik olarak analiz edilene kadar +4°C'de depolanmışlardır.

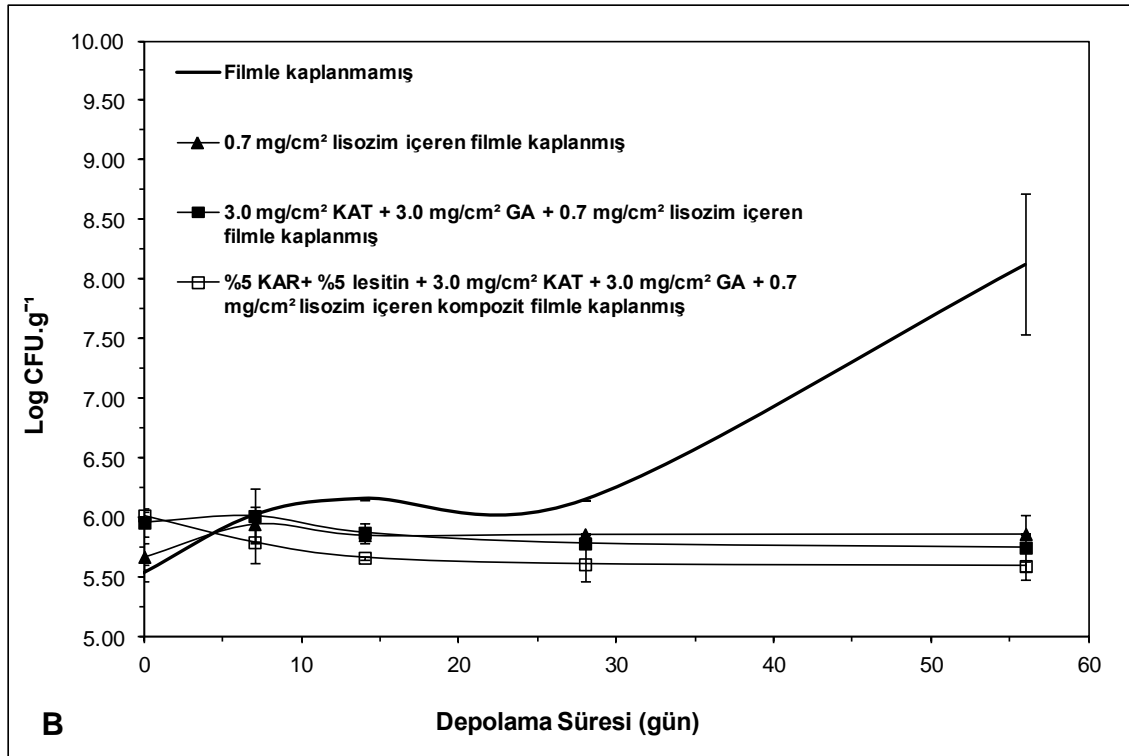
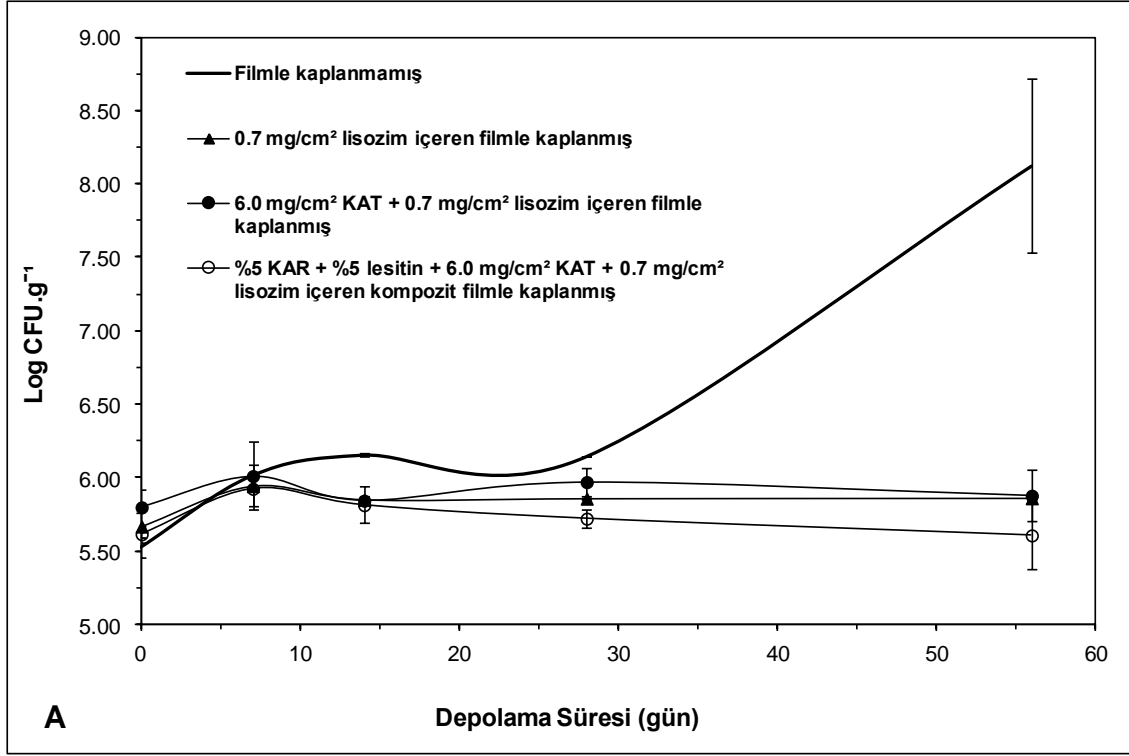
#### **4.4.1.1. Taze kaşarda aktif ambalajlamanın *Listeria monocytogenes* üzerindeki antimikrobiyel etkisi**

Şekil 4.53A ve 4.53B'de yaklaşık 2 ay yürütülen depolama deneyi sırasında peynirlerdeki *L. monocytogenes* yükünün değişimi görülmektedir. Elde edilen verilere göre inokülasyon sonunda yani depolamanın 0. gününde farklı peynir örneklerinde *L. monocytogenes* düzeyi 5.5-6.0 desimal (log CFU/g) düzeyinde değişmiştir. Depolamanın ilk haftasında kontrol örneklerde bakteri sayısı başlangıca göre 0.5 desimal kadar artarken, lizozim-kateşin-gallik asit içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerle kaplanmış peynirlerde bakteri sayısı 0.2 desimal kadar azalmış diğer tüm filmlerle kaplanmış peynirlerde ise bakteri sayısı 0.2-0.3 desimal artmıştır. Bu aşamadan sonra filmle kaplanmamış kontrol örneklerde bakteri sayısı bir miktar daha artarak sabit kalmış, lizozim-kateşin-gallik asit içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerle kaplanmış peynirlerde bakteri sayısındaki düşüş depolamanın 28. gününe kadar yavaşça devam etmiş, lizozim-kateşin içeren kompozit filmler ve diğer filmlerle kaplanmış peynirlerde ise bakteri sayısı çok

sınırlı bir azalış göstermiş veya neredeyse sabit kalmıştır. 28. gün itibarıyla lizozim-kateşin-gallik asit içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerle kaplanmış örneklerin mikrobiyel yükü aynı süre depolanmış filmle kaplanmamış kontrol örneklerinkine göre 0.55 desimal (yaklaşık 3.6 kat) daha azdır ( $P<0.05$ ). Yine başlangıca göre kontrol örneklerde 28 gün sonunda bakteri sayısı yaklaşık 4 kat artarken, lizozim-kateşin-gallik asit içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerle kaplanmış örneklerin mikrobiyel yükü aynı süre zarfında başlangıca göre 2.5 kat azalmıştır. Diğer filmlerle kaplanmış örneklerde ise 28 gün depolama sonunda filmle kaplanmamış kontrol örneklere göre mikrobiyel yük 0.2-0.4 desimal arasında daha azdır. 28. günden itibaren ise kontrol örneklerde *L. monocytogenes* sayısında sıra dışı bir artış meydana gelirken, aktif paketlenmiş peynir örneklerinde *L. monocytogenes* sayısı herhangi bir artış göstermemiş veya sınırlı da olsa bir azalış göstermiştir. Tablo 4.39'da farklı peynir örneklerinde depolama sırasında elde edilen *L. monocytogenes* sayılarıyla ilgili istatistiksel açıdan önemli farklılıklar görülmektedir. Elde edilen sonuçlar lizozim-gallik asit-kateşin içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin depolanmanın 14. ve 28. günlerinde mikrobiyel yükün kaplanmamış ve diğer filmlerle kaplanmış olanlardan istatistiksel olarak önemli düzeyde düşük olduğunu göstermiştir ( $P<0.05$ ). Depolamanın son gününde (56.gün) ise lizozim-gallik asit-kateşin içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin sadece kaplanmamış olan örneklerden istatistiksel olarak önemli düzeyde düşüktür ( $P<0.05$ ).

#### **Peynirlerin aktif ambalajlanmasında mikrobiyolojik açıdan ulaşılmış olan başlıca sonuçlar şunlardır:**

- (1) Geliştirilmiş olan lizozim-kateşin-gallik asit içeren zein-karnauba mumu kompozit filmler, lizozim-kateşin-gallik asit içeren zein filmlere göre *Listeria monocytogenes*'e karşı daha etkili bulunmuşlardır. Lizozim-kateşin-gallik asit içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin lizozim ve fenolik bileşik salım hızının Lizozim-kateşin-gallik asit içeren zein filmlere göre çok daha yavaş olması (bak Şekil 4.30 ve Şekil 4.31) depolama sırasında aktif paketlenmede salım hızının azaltıldığı olumlu bir etki sağladığını doğrular niteliktedir. Tarafımızdan zon inhibisyon deneyleri düzenlenerek gerçekleştirilmiş antimikrobiyel testler sonucunda lizozim-kateşin-gallik asit içeren zein ve zein-karnauba mumu filmlerin *Listeria monocytogenes*'e karşı birbirine yakın düzeyde antimikrobiyel etki gösterdiğinin bulunması (bak Tablo 4.17) bu sonucu doğrulamakta ve gıda uygulamasındaki farklılığın filmlerin antimikrobiyel etki farklılığından değil antimikrobiyel maddelerin salım hızı farkından kaynaklandığı bulgusunu desteklemektedir.



Şekil 4. 54. Lizozim ve fenolik bileşikler içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerle aktif ambalajlamanın +4 °C'de depolanmakta olan taze kaşarlarda *Listeria monocytogenes* üzerindeki antimikrobiyel etkisi (A: kısmi saf lizozim ve kateşin içeren filmlerin kullanıldığı uygulama; B: kısmi saf lizozim, kateşin ve gallik asit' i birarada içeren filmlerin kullanıldığı uygulama)

Tablo 4. 39. Liozüm ve fenolik bileşikler içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerle aktif ambalajlamanın +4 °C'de depolanmakta olan taze kaşarlarda *Listeria monocytogenes* üzerindeki antimikrobiyel etkisi

Uygulama	Depolama süresi (gün) ve <i>Listeria monocytogenes</i> koloni sayımı (Log (CFU).g <sup>-1</sup> )				
	1	7	14	28	56
(1) Filmle kaplanmamış	5.53±0.07 <sup>a,A</sup>	6.02±0.23 <sup>a,A</sup>	6.16±0.01 <sup>c,A</sup>	6.15±0.01 <sup>c,A</sup>	8.13±0.59 <sup>b,B</sup>
(2) 0.7 mg/cm <sup>2</sup> liozüm	5.67±0.11 <sup>a,A</sup>	5.94±0.14 <sup>a,A</sup>	5.85±0.03 <sup>b,A</sup>	5.86±0.00 <sup>b,A</sup>	5.86±0.00 <sup>a,A</sup>
(5) 3.0 mg/cm <sup>2</sup> KAT + 3.0 mg/cm <sup>2</sup> GA + 0.7 mg/cm <sup>2</sup> liozüm	5.96±0.12 <sup>a,A</sup>	6.01±0.00 <sup>a,A</sup>	5.87±0.08 <sup>b,A</sup>	5.79±0.01 <sup>b,A</sup>	5.75±0.28 <sup>a,A</sup>
(6) %5 KAR+ %5 lesitin + 3.0 mg/cm <sup>2</sup> KAT + 3.0 mg/cm <sup>2</sup> GA + 0.7 mg/cm <sup>2</sup> liozüm	6.02±0.04 <sup>a,B</sup>	5.79±0.17 <sup>a,AB</sup>	5.66±0.01 <sup>a,AB</sup>	5.60±0.07 <sup>a,A</sup>	5.59±0.04 <sup>a,A</sup>

<sup>a-c</sup>Her depolama günündeki değerler arasında yapılan harflendirmeler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir (P<0.05); <sup>A-B</sup>Her uygulama içerisindeki değerler arasında yapılan harflendirmeler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir (P<0.05)

**Peynirlerin aktif ambalajlanmasında mikrobiyolojik açıdan ulaşılmış olan başlıca sonuçlar şunlardır (devam):**

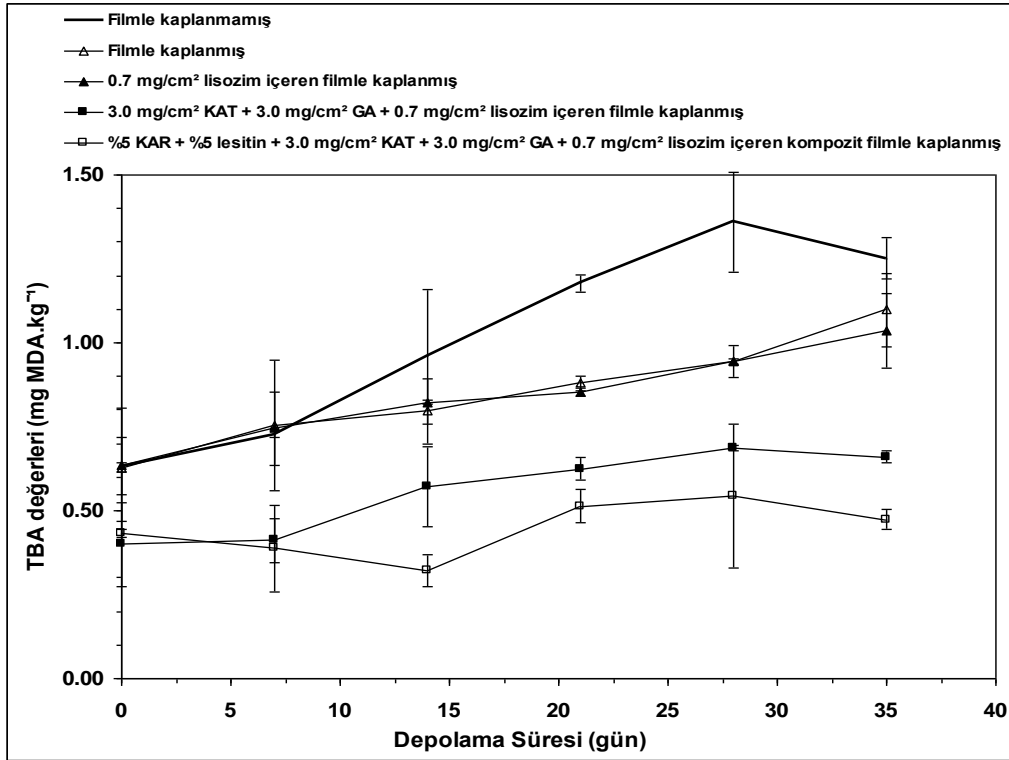
(2) Liozüm-kateşin içeren zein ve liozüm-kateşin içeren zein-karnauba mumu kompozit filmler bu filmlerde *Listeria monocytogenes*'e karşı antimikrobiyel etki sağlayan tek ajan liozüm olduğundan, ve liozüm bu filmlerden çok yavaş şekilde salındığından bu bakteriye karşı daha düşük antimikrobiyel etki göstermektedirler. Bu durum *Listeria monocytogenes*'in peynirlerde üremesini kısmen engellese de bu bakterinin inaktivasyonunu yeterince sağlayamamaktadır. Dolayısıyla hedef bakteri *Listeria monocytogenes* olduğu zaman kateşin içeren filmlerdeki liozüm aktivitesinin artırılması veya liozümün gallik asit gibi *Listeria monocytogenes*'e karşı daha etkili ikinci bir antimikrobiyel ajanla desteklenmesi gereklidir.

#### 4.4.1.2. Taze kaşarda aktif ambalajlamanın oksidatif değişimlerin önlenmesi üzerindeki etkisi

Oksidatif değişimler en yüksek antimikrobiyel etkinin görüldüğü lizozim-kateşin-gallik asit içeren kompozit zein-karnauba filmlerde incelenmiştir. Depolanan aktif ambalajlama uygulanmış taze kaşar örneklerinde oluşan oksidatif değişimler Şekil 4.54'de görülmektedir.

Buna göre herhangi bir filmle kaplanmamış örneklerde oksidatif değişimlerin büyük bir hızla gerçekleştiği açıktır. Kontrol zein filmle kaplama örneğinin oksijenle temasını kısmen azaltarak oksidatif değişimleri bir ölçüde azaltmıştır. Tek başına lizozim içeren filmlerle kaplanmış örneklerin de zein filmle kaplanmış olanlarla benzer oksidasyon hızı göstermesi lizozimin antioksidant etkisi olmadığını göstermektedir ( $P>0.05$ ). Diğer yandan lizozim-kateşin-gallik asit içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmler ile kaplanmış örneklerde antioksidant fenolik bileşikler nedeniyle oksidasyon hızı diğer örneklere göre istatistiksel olarak daha düşük olmuştur ( $P<0.05$ ). Oksidasyon hızının en düşük olduğu lizozim-kateşin-gallik asit içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerde fenolik madde geçiş hızının lizozim-kateşin-gallik asit içeren zein filmlere göre önemli ölçüde daha düşük ( $P<0.05$ ) olduğu düşünülürse antioksidantların aşamalı olarak salımının da gıda kalitesi üzerinde olumlu bir etki yarattığı açıkça görülmektedir (Tablo 4.40). Elde edilen bu sonuçlar lizozim-kateşin-gallik asit karışımı içeren zein-karnauba mumu kompozit filmlerin, uygun salım hızına sahip antimikrobiyel ve antioksidant açıdan etkili filmler olduğunu açıkça göstermiştir.





Şekil 4. 55. Kısmi saf lizozim, kateşin ve gallik asit' i birarada içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerle aktif ambalajlamanın +4°C'de depolanmakta olan taze kaşarlarda oksidatif değişimler üzerindeki etkisi

#### 4.4.2. Kısmi saf lizozim ve fenolik bileşikler içeren zein-karnauba mumu kompozit filmler ve zein-oleik asit karışım filmlerin dana burgerlerde E. coli O157:H7'ye karşı kullanılması

Projenin bu aşamasında geliştirilmiş lizozim-kateşin içeren zein, zein-karnauba mumu kompozit ve zein-oleik asit karışım filmler dana burgerlerde E. coli O157:H7'ye karşı denemiştir. Bilindiği üzere belirtilen bakteri özellikle son zamanlarda hamburgerden çocuk ve yetişkin ölümlerinde baş rolü oynamıştır. Dolayısıyla bu bakterinin dana burgerlerde aktif ambalajlamayla gelişiminin engellenmesi uygulama açısından büyük bir önem taşımaktadır. Özellikle ette yüksek oranda protein bulunması ve bu proteinlerin fenolik bileşiklerle kompleks oluşturarak onları nötralize etmesi ihtimali düşünülerek bu ambalajlama uygulamasında antimikrobiyel etki lizozime dayandırılmıştır. Tarafımızdan gerçekleştirilen ön denemelerde kateşin'in E. coli O157:H7'ye karşı herhangi bir antimikrobiyel etkisi belirlenememiştir. Dolayısıyla filmlerde kullanılma amacı lizozim salımının yavaşlatılması için zein matrisinin çapraz bağlanmasıdır. Lizozim'in G(-) bir bakteri olan E. coli O157:H7'ye karşı antimikrobiyel aktivite göstermesi için ortamda EDTA gibi çelat yapıcı maddelerin bulunması

Tablo 4. 40. Lizozim ve fenolik bileşikler içeren zein ve zein-karnauba mumu kompozit filmlerle aktif ambalajlamanın +4°C'de depolanmakta olan taze kaşarlarda oksidatif değişimler üzerine etkisi

Uygulama	Depolama süresi (gün) ve TBA değerleri (mg MDA.kg <sup>-1</sup> )					
	0	7	14	21	28	35
(1) Filmle kaplanmamış	0.63±0.08 <sup>a,A</sup>	0.73±0.01 <sup>ab,A</sup>	0.96±0.20 <sup>b,AB</sup>	1.18±0.03 <sup>c,B</sup>	1.36±0.14 <sup>b,B</sup>	1.26±0.06 <sup>c,B</sup>
(2) 0.7 mg/cm <sup>2</sup> lizozim	0.64±0.17 <sup>a,A</sup>	0.75±0.11 <sup>b,AB</sup>	0.83±0.01 <sup>b,AB</sup>	0.85±0.01 <sup>b,AB</sup>	0.95±0.05 <sup>ab,AB</sup>	1.04±0.11 <sup>bc,B</sup>
(5) 3.0 mg/cm <sup>2</sup> KAT +3.0 mg/cm <sup>2</sup> GA +0.7 mg/cm <sup>2</sup> lizozim	0.40±0.13 <sup>a,A</sup>	0.42±0.06 <sup>ab,A</sup>	0.58±0.12 <sup>ab,AB</sup>	0.63±0.04 <sup>a,AB</sup>	0.69±0.01 <sup>a,B</sup>	0.66±0.01 <sup>ab,AB</sup>
(6) %5 KAR+ %5 lesitin + 3.0 mg/cm <sup>2</sup> KAT +3.0 mg/cm <sup>2</sup> GA + 0.7 mg/cm <sup>2</sup> lizozim	0.43±0.01 <sup>a,A</sup>	0.39±0.13 <sup>a,A</sup>	0.32±0.04 <sup>a,A</sup>	0.52±0.05 <sup>a,A</sup>	0.55±0.22 <sup>a,A</sup>	0.55±0.22 <sup>a,A</sup>

<sup>a-c</sup>Her depolama günündeki değerler arasında yapılan harflendirmeler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir (P<0.05); <sup>A-B</sup>Her uygulama içerisindeki değerler arasında yapılan harflendirmeler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir (P<0.05)

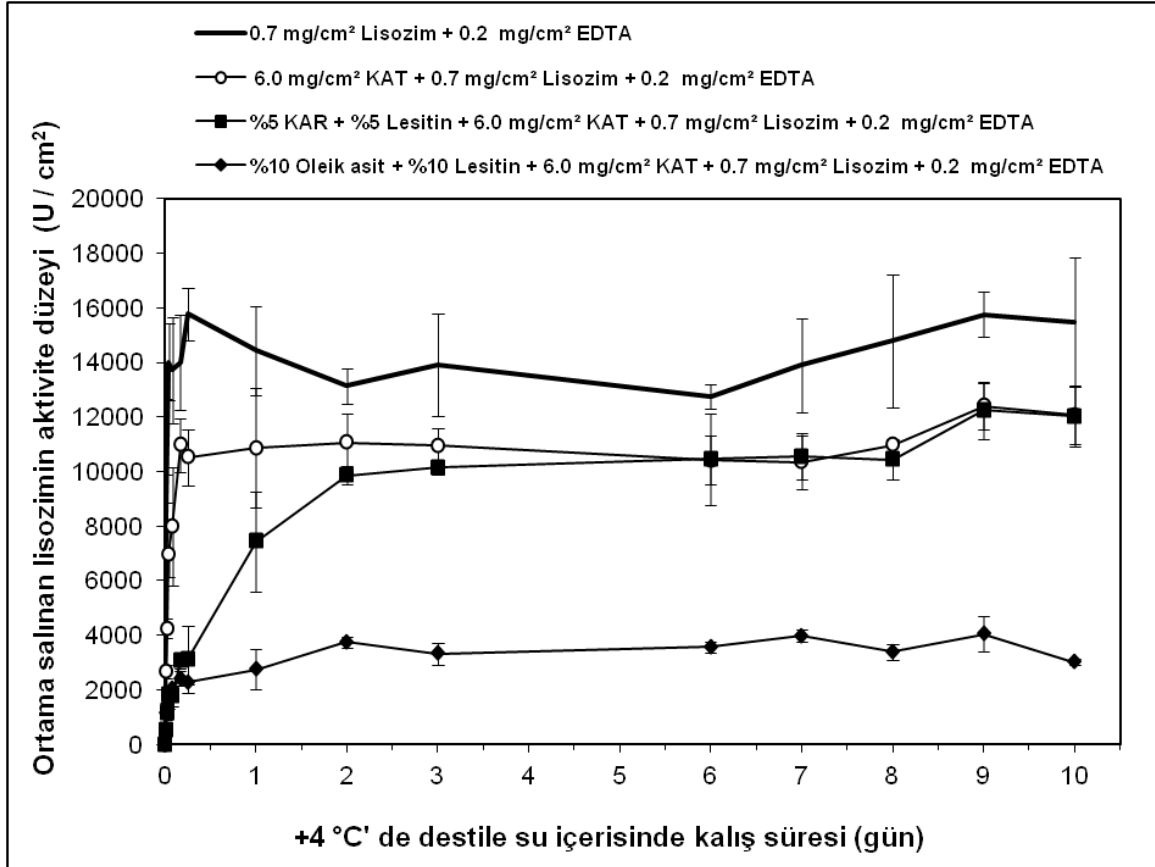
şarttır. Çelat yapıcı bir gıda katkı maddesi olan EDTA G(-) bakterilerin hücre duvarında bulunan ve lizozimden etkilenmelerini önleyen lipopolisakkarit (LPS) tabakasını stabilize eden Ca<sup>+2</sup> iyonlarını bağlamakta ve bu tabakanın dağılmasını sağlamaktadır. LPS tabakası olmayan veya hasar gören G(-) bakterilerin peptidoglukan tabakası lizozim tarafından hidrolize edilebilmekte ve bakteriyel inaktivasyon sağlanmaktadır (GÜÇBİLMEZ ve ark., 2007). Esas olarak bu özelliğiyle EDTA lizozimin kullanıldığı aktif ambalajlama uygulamalarında antimikrobiyel sistemin ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir (ÜNALAN ve ark., 2011). Buna göre çalışmada kullanılan örnekler ve film bileşimleri aşağıdaki gibidir:

- (1) Zein film içermeyen kaplanmamış örnek
- (2) Zein filmle kaplanmış örnek
- (3) 0.7 mg/cm<sup>2</sup> kısmi saf lizozim + 0.2 mg/ cm<sup>2</sup> disodyum EDTA içeren zein filmle kaplanmış örnek

- (4) Zein'in %10'u kadar oleik asit + zein'in %10'u kadar lesitin + 6 mg/cm<sup>2</sup> kateşin + 0.7 mg/cm<sup>2</sup> kısmi saf lizozim + 0.2 mg/ cm<sup>2</sup> disodyum EDTA içeren zein-oleik asit karışım filmle kaplanmış örnek
- (5) Zein'in % 5'i kadar karnauba mumu + zein'in % 5'i kadar lesitin + 6 mg/cm<sup>2</sup> kateşin + 0.7 mg/cm<sup>2</sup> kısmi saf lizozim + 0.2 mg/ cm<sup>2</sup> disodyum EDTA içeren zein-karnauba mumu kompozit filmle kaplanmış örnek

#### **4.4.2.1. Dana burgerlerin aktif ambalajlanmasında kullanılmış olan filmlerin salım deneyleri**

Daha önceki denemelerde lizozim ve kateşin içeren zein, zein-karnauba mumu kompozit ve zein-oleik asit karışım filmlerde salım deneyleri disodyum EDTA ilave edilmeden gerçekleştirilmiştir. Dolayısıyla aktif ambalajlama denemesi öncesinde disodyum EDTA ilavesiyle filmlerin salım özelliklerinin değişip değişmediği ve bu çelat yapıcının özellikle lizozimin aktivitesi üzerinde bir etkiye sahip olup olmadığı salım testleri bir kez daha tekrarlanarak belirlenmiştir. Şekil 4.55 ve 4.56'da aktif ambalajlamada kullanılmış olan farklı filmlerin lizozim ve kateşin salım profilleri görülmektedir. Daha önceki denemelerdeki gibi zein-karnauba mumu kompozit filmler lizozim ve kateşinin geçiş hızını azaltmakta ve kayda değer bir tutuklanmaya neden olmamaktadırlar. Ortama salınan lizozimde EDTA etkisiyle zamanla bir inaktivasyon ve azalma da olmamaktadır. Buna karşın zein-oleik asit karışım filmlerde ise EDTA ilavesinin filmlerdeki lizozim tutuklanmasını artırdığı görülmektedir. Hatırlanacağı üzere zein filmlere %10 oleik asit ve %10 lesitin ilavesi bir miktar lizozimin tutuklanmasına neden olmakta ancak bu oran kontrol filmlen salınan toplam aktivite düzeyinin yaklaşık %50'si düzeyinde kalmaktaydı. EDTA içeren zein-oleik asit karışım filmlerde ise ortama salınan toplam lizozim aktivite düzeyi kontrol filmlerden salınanın yaklaşık %25'i düzeyine inmektedir (Tablo 4.41). Bu durum zein-oleik asit filmlere EDTA ilavesinin tutuklu enzim oranını yaklaşık 2 kat artırdığını ve EDTA-oleik asit-lizozim arasında film içerisinde birtakım etkileşimler olduğunu göstermektedir. Diğer yandan filmler içerisine EDTA ilavesiyle fenolik madde salım profillerinde daha öncekine göre bir miktar yavaşlama olsa da kayda değer bir tutuklanma olmamış ve tüm filmlerde kateşinin tamamı ortama salınmıştır (Tablo 4.42).

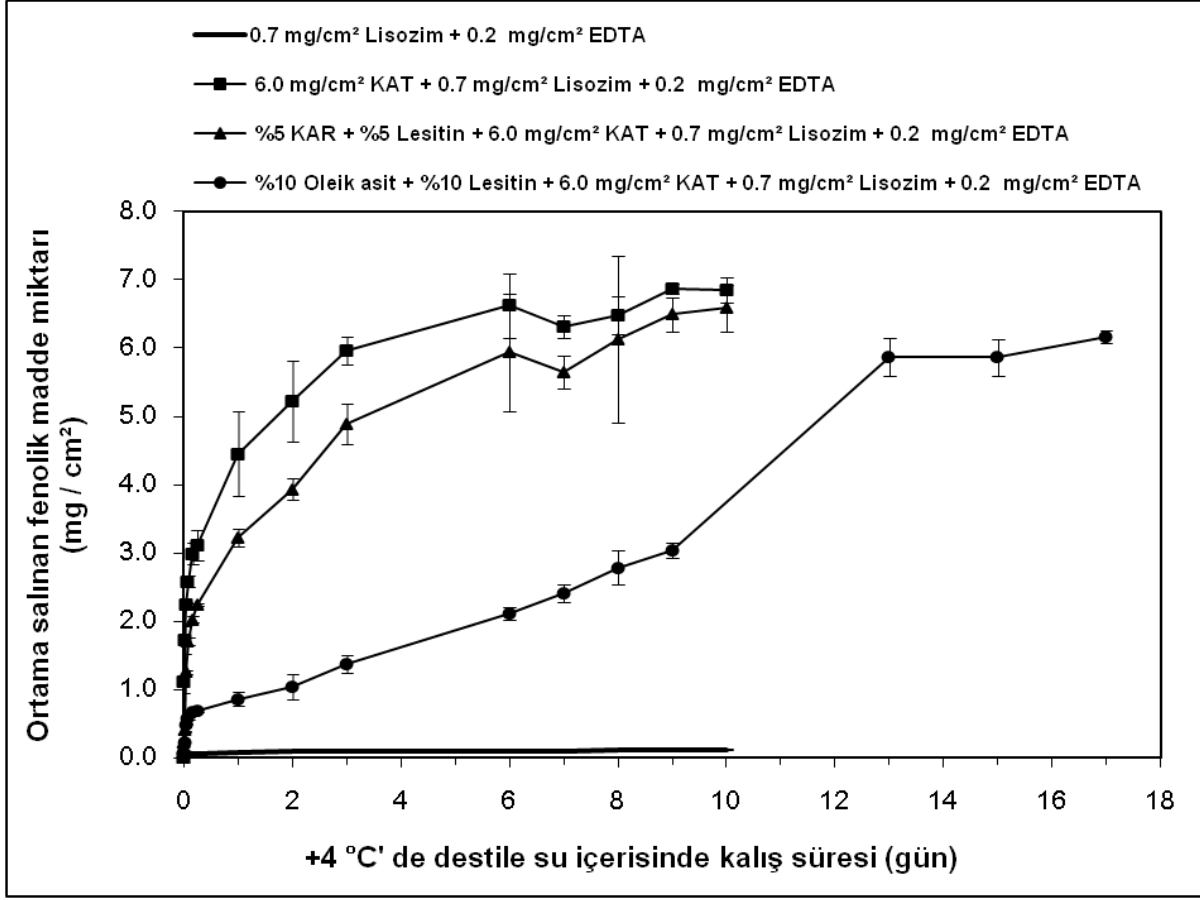


Şekil 4. 56. Burgerlerin aktif ambalajlanmasında kullanılmış olan kısmi saf lizozim, kateşin ve disodyum EDTA içeren zein, zein-karnauba mumu kompozit ve zein-oleik asit karışım filmlerin lizozim salım profilleri (Not: filmler çerçeve içerisine yerleştirilmiş halde destile suda tutulurken tüm düzenek çalkalanmaktadır)

Tablo 4. 41. Kısmi saf lizozim, kateşin ve disodyum EDTA içeren zein, zein-karnauba mumu kompozit ve zein-oleik asit karışım filmlerden salınan toplam lizozim aktivite düzeyleri

Film bileşimi					Salınan toplam lizozim aktivitesi (U/cm <sup>2</sup> )
Lizozim (mg/cm <sup>2</sup> )	Na <sub>2</sub> EDTA (mg/cm <sup>2</sup> )	Kateşin (mg/cm <sup>2</sup> )	Mum veya Yağ asiti (%) <sup>a</sup>	Lesitin (%) <sup>a</sup>	
0.7	0.2	-	-	-	15765 ±823
0.7	0.2	6.0	-	-	12410 ±854
0.7	0.2	6.0	5 (KAR) <sup>b</sup>	5	12248 ±1060
0.7	0.2	6.0	10 (OLE) <sup>b</sup>	10	4036 ±649

<sup>a</sup>Zeinin yüzdesi olarak filmlere ilave edilen mum, yağ asiti ve lesitin miktarları; <sup>b</sup>Zein filme ilave edilen mum ve yağ asiti türleri: KAR: karnauba mumu; OLE: oleik asit.



Şekil 4. 57. Burgerlerin aktif ambalajlanmasında kullanılmış olan kısmi saf lisozim, kateşin ve disodyum EDTA içeren zein, zein-karnauba mumu kompozit ve zein-oleik asit karışım filmlerin lisozim salım profilleri (Not: filmler çerçeve içerisine yerleştirilmiş halde destile suda tutulurken tüm düzenek çalkalanmaktadır)

Tablo 4. 42. Kısmi saf lisozim, kateşin ve disodyum EDTA içeren zein, zein-karnauba mumu kompozit ve zein-oleik asit karışım filmlerden salınan toplam fenolik madde miktarları

Film bileşimi					Salınan toplam
Lisozim (mg/cm <sup>2</sup> )	EDTA (mg/cm <sup>2</sup> )	Kateşin (mg/cm <sup>2</sup> )	Mum veya Yağ asiti (%) <sup>a</sup>	Lesitin (%) <sup>a</sup>	fenolik madde miktarı (mg/cm <sup>2</sup> )
0.7	0.2	-	-	-	-
0.7	0.2	6.0	-	-	6.85 ±0.18
0.7	0.2	6.0	5 (KAR) <sup>b</sup>	5	6.58 ±0.34
0.7	0.2	6.0	10 (OLE) <sup>b</sup>	10	6.17 ±0.09

<sup>a</sup>Zeinin yüzdesi olarak filmlere ilave edilen mum, yağ asiti ve lesitin miktarları; <sup>b</sup>Zein filme ilave edilen mum ve yağ asiti türleri: KAR: karnauba mumu; OLE: oleik asit.

#### 4.4.2.2. Dana burgerlerin aktif ambalajlanmasında kullanılmış olan filmlerin E. coli O157:H7 üzerindeki antimikrobiyel etkisi

Dana burherlerin aktif ambalajlanmasında kullanılmış olan filmlerin E.coli O157:H7 üzerindeki etkisi disk difüzyon metoduyla test edilmiştir (Tablo 4.43). Disodyum EDTA içermeyen filmlerin test mikroorganizması üzerine herhangi bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. Sadece disoyum EDTA içeren zein film yüksek antimikrobiyel etki gösterirken, oluşan tam zon sayısının azlığı disodyum EDTA nın film içinde homojen olarak dağılamadığını göstermiştir. Daha öncede belirttiği gibi lizozim ve EDTA nın sinerjistik etkisi dolayısıyla; lizozim ve disodyum EDTA' yı bir arada içeren zein filmin atimikrobiyel aktivitesinin sadece EDTA içeren zein filme oranla istatistiksel olarak arttığı gözlemlenmiştir (P<0.05). Bununla birlikte, lizozim ve disodyum EDTA' yı bir arada içeren zein filmde EDTA nın film içerisinde dağılımının daha homojen hale geldiği oluşan tam zon sayısının artmasıyla

Tablo 4. 43. Kısmi saf lizozim, kateşin ve disodyum EDTA içeren zein, zein-karnauba mumu kompozit ve zein-oleik asit karışım filmlerin E.coli O157:H7 üzerindeki antimikrobiyel etkisi

Lizozim (mg/cm <sup>2</sup> )	Na <sub>2</sub> EDTA (mg/cm <sup>2</sup> )	Kateşin (mg/cm <sup>2</sup> )	Film bileşimi		Oluşan ortalama zon alanı (mm <sup>2</sup> )	Oluşan zon sayı ve tipleri
			Mum veya Yağ asiti (%) <sup>a</sup>	Lesitin (%) <sup>a</sup>		
-	-	-	-	-	-	15 zy <sup>b</sup>
0.7	-	-	-	-	-	15 zy
0.7	-	6.0	-	-	-	15 zy
0.7	-	6.0	5(KAR) <sup>c</sup>	5	-	15 zy
0.7	-	6.0	10(OLE) <sup>c</sup>	10	-	15 zy
-	0.2	-	-	-	245±63b <sup>d</sup>	5 zy/1 kz/9 tz
0.7	0.2	-	-	-	350±64a	2 zy/1 kz/12 tz
0.7	0.2	6.0	-	-	140±73c	1 k*z/14 tz
0.7	0.2	6.0	5(KAR) <sup>c</sup>	5	160±20bc	2 zy/1 kz/12 tz
0.7	0.2	6.0	10(OLE) <sup>c</sup>	10	190±54bc	15 tz

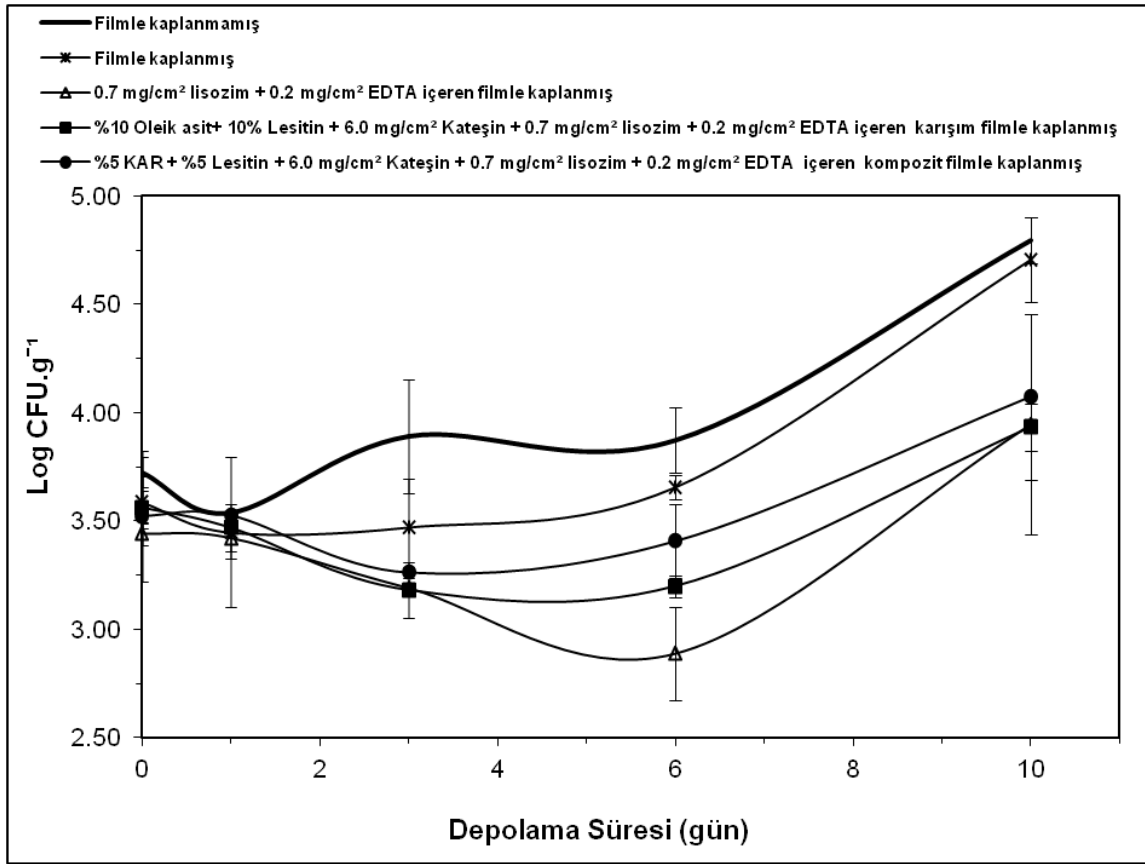
<sup>a</sup>Zeinin yüzdesi olarak filmlere ilave edilen mum, yağ asiti ve lesitin miktarları; <sup>b</sup>Oluşan zon tipleri: zy: zon oluşumu yok; kz: kısmi zon oluşumu; tz: tam zon oluşumu; <sup>c</sup>Zein filme ilave edilen mum ve yağ asiti türleri: KAR: karnauba mumu; OLE: oleik asit; <sup>d</sup> kolonlardaki farklı harfler önemli istatistiksel farkları göstermektedir (P<0.05); \*örneklerde zon oluşumu gözlemlenmemiştir.

anlaşılmaktadır. Geliştirilen kompozit ve karışım zein filmlerin antimikrobiyel etkisinin, lizozim ve disodyum EDTA'yu birarada içeren zein filmlerin antimikrobiyel etkisinden istatistiksel açıdan anlamlı olacak şekilde az olduğu saptanmıştır ( $P<0.05$ ). Etkinliği antimikrobiyel ajanın difüzyon hızına bağlı olan disk difüzyon metodu göstermiştir; lizozimin kompozit ve karışım zein filmlerden salımı yavaşlamaktadır. Bununla birlikte geliştirilen karışım zein filmlerin test edilen bütün film disklerinde zon oluşturduğu gözlemlenmiştir.

#### **4.4.2.3. Dana burgerlerde aktif ambalajlamanın E. coli O157:H7 üzerindeki antimikrobiyel etkisi**

Gerçekleştirilen salım deneylerinden sonra gıda uygulamalarına geçilmiş ve burgerlerin her iki yüzeylerine de film kaplandıktan sonra burgerler ilk önce filmlerin ürünle sıkı şekilde temasının sağlanması amacıyla streç naylon filmle, ardından ise alüminyum folyoyla sarılarak paketlenmiş ve mikrobiyolojik olarak analiz edilene kadar  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de depolanmışlardır. Geliştirilmiş olan farklı filmlerin depolama sırasında E. coli O157:H7 üzerindeki antimikrobiyel etkileri Şekil 4.57'de görülmektedir. Buna göre herhangi bir zein filmle kaplanmamış veya kontrol zein filmle kaplanmış burgerlerde E. coli O157:H7 sayısında 6. güne kadar önce yavaş, ancak 6. günden sonra oldukça hızlı bir artış meydana geldiği açıktır. Depolama sırasında 6. güne kadar E. coli O157:H7 üzerindeki en yüksek antimikrobiyel etkiyi lizozim ve EDTA içeren zein filmler göstermiş ve bu filmlerde belirtilen süre içerisinde bakteri sayısında sürekli bir azalma meydana gelmiştir (başlangıca göre 6. gün sonunda 0.55 desimal kadar). Lizozim-kateşin içeren zein-karnauba mumu kompozit ve zein-oleik asit karışım filmlerle depolanmış burgerlerde ise depolamanın 3. gününe kadar bakteri sayısında bir azalış olmuş (0.3-0.4 desimal), 3-6. gün arasında ise bu filmlerle ambalajlanmış burgerlerin E. coli O157:H7 sayısında istatistiksel olarak önemli bir değişim olmamıştır ( $P<0.05$ ) (Tablo 4.44). Elde edilen bu sonuçlar burgerlerde depolamanın başında beklendiği gibi lizozimin zein filmlerden kompozit ve karışım zein filmlerdekine göre daha hızlı salındığını ve bunun sonucunda diğer filmlere göre daha yüksek bir antimikrobiyel etki elde edildiğini göstermektedir. Depolamanın 6 ve 10. günleri arasında zein filmle kaplanmış veya kaplanmamış kontrol örneklerde ve lizozim ve EDTA içeren zein filmle kaplanmış örneklerde E. coli O157:H7 sayısında yaklaşık 1 desimal (10 kat kadar) bir artış olmuştur. Depolamanın 10. gününde bakteri sayısındaki artış lizozim, kateşin ve EDTA içeren zein-karnauba mumu ve zein-oleik asit karışım filmlerle ambalajlanmış örneklerde de görülmektedir. Ancak, bu filmlerle kaplanmış ürünlerde 6-10 gün arasında meydana gelen artış 0.6-0.7 desimal kadardır (4.5-5.5 kat kadar). Buna göre lizozimin hızlı veya yavaş salımının üründeki bakteri sayısını nasıl etkilediği açıktır. Lizozimin salım hızının yüksek

olduğu standart zein filmlerde başlangıçta daha yüksek bir antimikrobiyel etki elde edilirken, oluşan antimikrobiyel etki depolamanın devam eden aşamalarında ortadan kalkmakta ve bu aşamadan sonra aktif ambalajlama uygulanmış ürünlerdeki bakteri sayısındaki artış aktif ambalajlama uygulanmamış kontrollerdekilerle aynı hızda olmaktadır. Buna karşın lizozim salım hızı yavaş olan kompozit ve karışım filmlerde başlangıçta sınırlı bir antimikrobiyel etki elde edilmekte ancak depolamanın ilerleyen aşamalarında ürünlerdeki bakteri sayısındaki artış hızı aktif ambalajlama uygulanmamış kontrollere ve lizozim içeren zein filmle ambalajlanmış olanlara göre daha yavaş olmaktadır.



Şekil 4. 58. Kısmi saf lizozim, kateşin ve disodyum EDTA içeren zein, zein-karnauba mumu kompozit ve zein-oleik asit karışım filmlerle aktif ambalajlamanın +4°C'de depolanmakta olan dana burgerlerde E. coli O157:H7 üzerindeki antimikrobiyel etkisi (Not: kullanılmış olan burger örneklerinde yapılan ekimlerde inoküle edilmemiş örneklerde E. coli O157:H7 belirlenmemiştir)

#### **Burgerlerin aktif ambalajlanmasında mikrobiyolojik açıdan ulaşılmış olan başlıca sonuçlar şunlardır:**

- (1) Et ürünleri gibi ürünün raf ömrünün kısa olduğu durumlarda salım hızı yüksek olan filmler salım hızı yavaş olanlara göre E. coli O157:H7 üzerinde daha yüksek



antimikrobiyel etki göstermektedirler. Dolayısıyla özellikle hızlı mikrobiyel gelişim görülen et ürünlerinde biyoaktif ajanların salım hızının hızlı olduğu filmler kullanılabilir. Ancak, salım hızının yüksek olduğu filmlerde filmlerin antimikrobiyel etkisinin tükendiği depolama sürelerinin hassas bir şekilde belirlenmesi ve gıdanın bu süreyi aşmayacak kadar depolanması büyük önem taşımaktadır.

- (2) Lizozim-EDTA sistemi zein ve zein temelli filmlerde antimikrobiyel ambalajlamada E. coli O157:H7'ye karşı kullanılabilir. Ancak, lizozim salım hızının ve filmlerdeki lizozim konsantrasyonunun ürünün depolanma süresine göre hassas bir şekilde ayarlanması gerekmektedir.

Tablo 4. 44. Kısmi saf lizozim, kateşin ve disodyum EDTA içeren zein, zein-karnauba mumu kompozit ve zein-oleik asit karışım filmlerle aktif ambalajlamanın +4°C'de depolanmakta olan dana burgerlerde E. coli O157:H7 üzerindeki antimikrobiyel etkisi

Uygulama	Depolama süresi (gün) ve E. coli O157:H7 koloni sayımı (Log (CFU).g <sup>-1</sup> )				
	0	1	3	6	10
(1) Zein filmle kaplanmamış	3.73±0.07 <sup>a,A</sup>	3.54±0.01 <sup>a,A</sup>	3.89±0.26 <sup>b,A</sup>	3.87±0.15 <sup>d,A</sup>	4.79±0.11 <sup>b,B</sup>
(2) Zein filmle kaplanmış	3.59±0.12 <sup>a,A</sup>	3.45 ±0.35 <sup>a,A</sup>	3.47±0.22 <sup>ab,A</sup>	3.66±0.06 <sup>cd,A</sup>	4.71±0.20 <sup>b,B</sup>
(3) 0.7 mg/cm <sup>2</sup> lizozim + 0.2 mg/ cm <sup>2</sup> EDTA	3.44±0.05 <sup>a,A</sup>	3.42 ±0.10 <sup>a,A</sup>	3.19±0.02 <sup>a,A</sup>	2.89±0.21 <sup>a,A</sup>	3.95±0.51 <sup>ab,A</sup>
(4) %10 OLE + %10 lesitin + 6 mg/cm <sup>2</sup> KAT+ 0.7 mg/cm <sup>2</sup> lizozim + 0.2 mg/ cm <sup>2</sup> EDTA	3.56±0.08 <sup>a,BC</sup>	3.47 ±0.11 <sup>a,AB</sup>	3.18±0.13 <sup>a,A</sup>	3.20±0.05 <sup>ab,A</sup>	3.93±0.11 <sup>ab,C</sup>
(5) % 5 KAR + % 5 lesitin + 6 mg/cm <sup>2</sup> KAT+ 0.7 mg/cm <sup>2</sup> lizozim + 0.2 mg/ cm <sup>2</sup> EDTA	3.52±0.30 <sup>a,A</sup>	3.53 ±0.00 <sup>a,A</sup>	3.26±0.02 <sup>a,A</sup>	3.41±0.17 <sup>bc,A</sup>	4.07±0.38 <sup>ab,A</sup>

<sup>a-d</sup>Her depolama günündeki değerler arasında yapılan harflendirmeler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir (P<0.05); <sup>A-C</sup>Her uygulama içerisindeki değerler arasında yapılan harflendirmeler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir (P<0.05).

## 5.SONUÇLAR ve ÖNERİLER

### 5.1. Zein-mum kompozit ve zein-yağ asiti karışım filmlerle ilgili sonuçlar ve öneriler

1. Zein filmler içerisinde biyoaktif ajan olarak ayrı ayrı veya karışım halde kateşin ve gallik asit gibi fenolik maddeler ilave edildiğinde fenolik maddelerin bir kısmı (çalışılan konsantrasyonlarda %50'den az) protein yapısındaki film matrisiyle hidrojen bağları yaparak immobilize olmakta (bağlanmakta) ve plastikleştirici etki göstererek normalde aşırı kırılğan olan ve esnek olmayan zein filmlerin oldukça esnek bir yapı kazanmasını sağlamaktadırlar. Fenolik madde konsantrasyonu arttıkça elastikiyet belli bir sınıra kadar artmakta ancak aşırı yüksek konsantrasyonda oluşan yoğun etkileşimler nedeniyle filmler elastikiyetini yeniden kaybetmektedirler.
2. Zein filmler içerisinde ilave edilen fenolik bileşiklerin büyük bir kısmı (çalışılan konsantrasyonlarda %50'den fazla) film matrisiyle etkileşime girmeden filmler içerisinde serbest formda bulunmaktadır. Dolayısıyla filmler bu serbest fenolik bileşiğin salımına bağlı olarak antimikrobiyel ve antioksidant aktivite göstermektedirler.
3. Zein filmler içerisinde mum veya yağ asitleri katılarak filmlerin daha hidrofobik kompozit veya karışım bir yapıya dönüştürülmesi ve filmler içerisindeki çapraz bağlanma düzeyinin fenolik madde ilavesiyle artırılması içerdikleri biyoaktif ajanların salım hızını değiştirmekte ve kontrollü salım özellikleri olan filmler elde edilmesine olanak vermektedir.
4. Kateşin içeren zein filmlerde zein-mum kompozitleri ve zein-oleik asit karışımları, kateşin-gallik asit karışımı içeren filmlerde ise zein-oleik asit karışımları kullanılarak bu fenolik maddelerin salım hızı azaltılabilmektedir. Ancak, tek başına gallik asit içeren filmlerde gözeneklilik artırdığı için kompozit filmlerin kullanılması salım hızını artırmaktadır.
5. Lizozim ve fenolik bileşikleri birarada içeren zein-karnauba mumu kompozit ve zein-oleik asit karışım filmlerde fenolik madde konsantrasyonu artırıldıkça film matrisinde bu bileşiklere bağlı olarak oluşan ağyapı sıkılaşmakta ve lizozim salım hızı azalmaktadır. Kateşin ve kateşin-gallik asit karışımları lizozim salım hızını azaltmada gallik asite göre daha büyük bir etki göstermektedir. Bunun nedeni kateşin olmadan gallik asit'in kullanıldığı filmlerde gözenekliliğin artmasıdır. Dolayısıyla fenolik madde konsantrasyonu yanında fenolik madde tipi de lizozim salım hızını etkilemektedir.
6. Zein-mum kompozit ve zein-yağ asiti karışımlarında lizozim ve fenolik bileşiklerin salım hızını değiştirmek için bir diğer alternatif ise mum ve yağ asiti tipini değiştirmek ve alifatik zincir uzunluğu farklı lipitler kullanmaktır.

7. Gerçekleştirilmiş olan ayrıntılı karakterizasyon çalışmaları ve filmlerin üretim ve uygulanabilirliğinin değerlendirilmesi sonucunda üretilen en yüksek antimikrobiyel ve antioksidant potansiyel içeren filmlerin lizozim-kateşin-gallik asit içeren zein, zein-karnauba mumu kompozit ve zein-oleik asit karışım filmler olduğu değerlendirilmiştir. Yüksek antimikrobiyel aktiviteye sahip gallik asitin kullanılmadığı durumlarda lizozim-kateşin içeren filmler EDTA gibi bir şelat yapıcı ile desteklenmeli ve lizozimin antimikrobiyel etkinliği artırılmalıdır.
8. Seçilmiş et ve süt ürünleri üzerinde gerçekleştirilmiş olan gıda uygulamaları bozulma hızı yüksek olan ve patojenlerin hızlı şekilde geliştiği gıdalarda salım hızı yüksek olan filmlerin, bozulma hızı düşük olan ve patojenlerin yavaş geliştiği gıdalarda ise salım hızı düşük olan filmlerin diğerlerine göre daha avantajlı olduğu belirlenmiştir.

## **5.2. Zein-baklagil proteini kompozit filmlerle ilgili sonuçlar ve öneriler**

9. Zein filmlere mercimek veya soya proteinleri gibi baklagil proteinleri eklenmesiyle normalde sınırlı sayıda iyonik grup içeren zein filmler çok sayıda iyonize olabilir grup içeren kompozit filmlere dönüşmektedir. Bu tür kompozit filmler lizozimin salım hızını yavaşlatmak veya artırmak açısından belirgin bir etki yaratmamakta ancak bu enzimin pH'ya bağlı olarak kontrollü salımının gerçekleştirilebilmesine olanak vermektedir. Öyle ki pl değeri 4.5-6 arasında olan baklagil proteinleri pH 7.0 civarında negatif yüklü olduklarından, pl değeri yaklaşık 11 olan dolayısıyla nötral ve nötrale yakın ortamlarda pozitif yüklü olan lizozimi bağlamakta ve salmamaktadır. Filmler içerisindeki bağlı lizozim oranı baklagil proteini oranı arttıkça artmaktadır. Ortamda serbest bulunan lizozim herhangi bir pH değerinde serbestçe ortama geçerken, bağlı lizozim pH değerinin ancak 4.5'in altına düşürülmesiyle salınmakta ve ortama geçmektedir.
10. Zein-baklagil proteini içeren lizozim ilave edilmiş kompozit filmler gıdaların kaplanması zaman serbest lizozimin gıdaya geçmesiyle antimikrobiyel aktivite elde edilmesi mümkündür. Geriye kalan filmler içerisindeki bağlı lizozim gıdaya antimikrobiyel aktivite elde edilmesi istendiği zaman geçirilebilir. Bu amaçla filmle kaplanmış gıdanın pH 4.0-4.5 arasındaki asidik bir çözeltiliye daldırılması yeterlidir. Asitlendirme işleminin donmuş ürünlerin çözündürülmesi sonrasında, ürünün pazara transferi veya market parakente dolabına yerleştirilmesinden önce uygulanması mümkündür.

### 5.3. Peyniraltı suyu proteini (PSP) filmlerle karışım ve kompozitleriyle ilgili sonuçlar ve öneriler

11. Doğal olarak yoğun şekilde iyonize olabilen gruplar içeren peyniraltı suyu proteininden elde edilmiş olan filmlerin lizozim ve fenolik bileşikler gibi belirli bir negatif veya pozitif yüke sahip biyoaktif maddelerin kontrollü salımı için kullanımı oldukça güçtür. Hızlı bir şekilde su alıp şişen ve nötrale yakın pH'larda negatif yüklü olan PSP filmlerle negatif yüklü olan fenolik bileşikler arasında doğan itme kuvvetleri bu bileşiklerin filmlerden büyük bir hızla salınmasına neden olurken, PSP filmler ve pozitif yüklü lizozim arasında doğan çekme kuvvetleri enzimi filmler içerisinde immobilize etmektedir.
12. Ancak, PSP filmlerin aynen zein-baklagil kompozit filmler gibi lizozimin pH'ya bağlı kontrollü salımı için kullanılması mümkündür. PSP'nin pI değeri 5.0 civarında olduğundan bu pH üzerinde filmler lizozimi bağlamaktadır. Yük yoğunluğu oldukça yüksek olan PSP filmler pH'nın 5.0'in üzerinde olduğu durumlarda ortamdaki tüm lizozimi bağlayarak immobilize etmektedirler. pH'nın 5.0'e düşürülmesiyle lizozim salımı başlamakta ve pH düşürüldükçe ortama geçen lizozimin miktarı artmaktadır. Buna göre aynen zein-baklagil proteini kompozit filmlerde olduğu gibi PSP filmle kaplanmış bir gıdanın da asitlendirilmesiyle gıdaya lizozim salımının başlatılabilmesi teorik olarak mümkündür. Yine asitlendirme işleminin donmuş ürünlerin çözündürülmesi sonrasında, ürünün pazara transferi veya market parakente dolabına yerleştirilmeden önce, yani gıda güvenliğinin risk altında olabileceği durumlarda uygulanması önerilebilir.
13. PSP-oleik asit ve PSP-balmumu kompozit filmlerin hazırlanmasıyla pH 4.5-5.0 arasında filmlerden lizozim salım hızının artırılması ve ortama geçen serbest lizozim düzeyinin artırılması mümkündür.

## 6. Referanslar

- ALKAN, D., Aydemir L.Y., Arcan I., Yavuzdurmaz, H., Atabay, H.I., Ceylan, C., Yemenicioglu, A., Development of Flexible Antimicrobial Packaging Materials against *Campylobacter jejuni* by Incorporation of Gallic Acid into Zein-Based Films, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, (20), 11003-11010, (2011).
- ALMAJANO M.P., Carbo, R. Jimenez J.A.L., Gordon, M.H., Antioxidant and Antimicrobial Activities of Tea Infusions, *Food Chemistry*, 108, (1), 55-63, (2008).
- ALONSO, M.J., Nanomedicines for Overcoming Biological Barriers, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58, (3), 168-172, (2004).
- APPENDINI, P., Hotchkiss, H. J., Review of Antimicrobial Food Packaging, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, 113-26, (2002).
- APPENDINI, P., Hotchkiss, J.H., Immobilization of Lysozyme on Food Contact Polymers as Potential Antimicrobial Films, *Packaging Technology and Science*, 10, 271-279, (1997).
- ARCAN, I., Yemenicioglu, A., Antioxidant Activity of Protein Extracts from Heat-Treated or Thermally Processed Chickpeas and White Beans. *Food Chemistry*, 103, (2), 301-312, (2007).
- ARCAN, I., Yemenicioglu, A., Antioxidant Activity and Phenolic Content Of Fresh and Dry Nuts with or without the Seed Coat. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, (3), 184-188, (2009).
- ARCAN, I., Yemenicioglu, A., Effects of Controlled Pepsin Hydrolysis on Antioxidant Potential and Fracitonal Changes of Chickpea Proteins, *Food Research International*, 43, 140-147, (2010)
- BAJPAI, S.K., Tankhiwale, R., Investigation of Dynamic Release of Vitamin B-2 from Calcium Alginate/Chitosan Multilayered Beads: Part II Reactive & Functional Polymers, 66, (12), 1565-1574, (2006).
- BALDWIN, E.A., Nisperos, M.O., Hagenmaier, R.D., Baker, R.A., Use of Lipids in Coatings for Food Products, *Food Technology*, 51, (6), 56-64, (1997).
- BEKHIT, A.E.D., Geesink, G.H., Ilian, M.A., Morton, J.D., Bickerstaffe, R., The Effects of Natural Antioxidants on Oxidative Processes and Metmyoglobin Reducing Activity in Beef Patties, *Food Chemistry*, 81, 175-87, (2003).
- BINOD, P., Pusztahelyi, T., Nagy, V., Sandhya, C., Szakács, G., Pócsi, I., Pandey, A., Production and Purification of Extracellular Chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRRL 2129 under Solid-State Fermentation, *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 880-7, (2005).
- BOUNOCORE, G.G., Del Nobile, M.A., Panizza, A., Bove, S., Battaglia, G., Nicolas, L., Modeling the Lysozyme Release Kinetics from Antimicrobial Films Intended for Food Packaging Applications, *Journal of Food Science*, 68, 1365-70, (2003).

- BOUNOCORE, G.G., Sinigaglia, M., Corbo, M.R., Bevilacqua, A., La Notte, E., Del Nobile, M.A., Controlled Release of Antimicrobial Compounds from Highly Swellable Polymers, *Journal of Food Protection*, 67, 1190-94, (2004).
- BOUNOCORE, G. G., Conte, A., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., Del Nobile, M. A., Mono- and Multilayer Active Films Containing Lysozyme as Antimicrobial Agent, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6, (4), 459-464, (2005).
- BOUSSOUEL, N., Mathieu, F., Revol-Junells, A.M., Milliere, J.B., Effects of Combinations of Lactoperoxidase System and Nisin on the Behaviour of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in Skim Milk, *International Journal of Food Microbiology*, 61, 169-75, (2000).
- BOYE, J.I., Aksay, S., Roufik, S., Ribereau, S., Mondor, M., Franworth, E., Rajamohamed, S.H., Comparison of the Functional Properties of Pea, Chickpea and Lentil Protein Concentrates Processed Using Ultrafiltration and Isoelectric Precipitation Techniques, *Food Research International*, 43, 537-546. (2010)
- BRANEN, J.K., Davidson, P.M., Enhancement of Nisin, Lysozyme, and Monolaurin Antimicrobial Activities by Ethylenediaminetetraacetic Acid and Lactoferrin, *International Journal of Food Microbiology*, 90, 63-74, (2004).
- BRAYDEN, D.J., Controlled Release Technologies for Drug Delivery, *Drug Discovery Today*, 8, 21, 976–978, (2003).
- CAGRI, A., Ustunol, Z., Ryser, E.T., Inhibition of Three Pathogens on Bologna and Summer Sausage Using Antimicrobial Edible Films, *Journal of Food Science*, 67, (6), 2317-24, (2002).
- CAKMAK, G., Togan, I., Severcan, F., 17[ $\beta$ ]-Estradiol Induced Compositional, Structural and Functional Changes in Rainbow Trout Liver, Revealed by FT-IR Spectroscopy: A Comparative Study with Nonylphenol, *Aquatic Toxicology*, 77 (1), 53-63, (2006).
- CEMEROGLU, B., Acar, J., *Konserve Üretim Teknolojisi, Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi*, ed: B. Cemeroğlu, Gıda Teknolojisi Derneği, Senem Matbaacılık, Ankara, (1986) pp 158.
- CHA, D.S., Choi, J.H., Chinnan, M.S., Park, H.J., Antimicrobial Films Based on Na-Alginate and  $\kappa$ -Carrageenan, *LWT- Food Science and Technology*, 35, 715-19, (2002).
- CHOI, S.G., Kim, K.M., Hanna, C.L., Weller, C.L. Kruw, W.L., Molecular Dynamics of Soy-Protein Isolate Films Plasticized by Water and Glycerol, *Journal of Food Science*, 68, 2516-22, (2003).
- CISNEROS-ZEVALLOS, L. Krochta, J.M., Whey Protein Coatings for Fresh Fruits and Relative Humidity Effects, *Journal of Food Science*, 68, 176-81, (2003).
- COMA, V., Bioactive Packaging Technologies for Extended Shelf Life of Meat-Based Products, *Meat Science*, 78, (1-2), 90-103, (2008).
- CORRY J.E.L. and Atabay, H.I., Poultry as a Source of *Campylobacter* and related organisms, *Journal of Applied Microbiology*, 90, 96-114, (2001).

- COWAN, M. M., Plant Products as Antimicrobial Agents, *Clinical Microbiology Reviews*, 12, (4), 564-582, (1999).
- DAMODARAN, S., Amino Acids, Peptides and Proteins. In O.R. Fennema, *Food Chemistry* (pp. 347). New York: Marcel Decker Inc., (1996).
- DATTA, S.; Janes, M. E.; Xue, Q. G.; Losso, J.; La Peyre, J. E., Control of *Listeria Monocytogenes* and *Salmonella Anatum* on the Surface of Smoked Salmon Coated with Calcium Alginate Coating Containing Oyster Lysozyme and Nisin, *Journal of Food Science*, 73, (2), 67-71,(2008).
- DAWSON, P. Hoffman, K. & Han, I., Biocide-impregnated Food Films to Inhibit Food Pathogens, Second NSF International Conference on Food Safety, Savannah,GA, October, pp 11-13, (2000).
- DE ROEVER, C., Microbiological Safety Evaluations and Recommendations on Fresh Produce, *Food Control*, 9, 321-47, (1998).
- DE ROOS, A.L., Walstra, P., Geurts, T.J., The Association of Lysozyme with Casein, *International Dairy Journal*, 8, 319-24, (1998).
- DEVLIEGHIERE, F., Vermeiren, L. & Debevere, J, New Preservation Technologies: Possibilities and Limitations, *International Dairy Journal*, 14, 273–285, (2004).
- DUFOUR, M., Simmonds, R.S., Bremer, P.J., Development of a Method to Quantify in Vitro the Synergistic Activity of “Natural” Antimicrobials, *International Journal of Food Microbiology*, 85, 249-58, (2003).
- ELLIOT, R.M., McLay, J.C., Kennedy, M.J., Simmons, R.S., Inhibition of Foodborne Bacteria by the Lactoperoxidase System in a Beef Cube System, *International Journal of Food Microbiology*, 91, 73-81, (2004).
- FENICE, M., Giambattista, R.D., Leuba, J., Federici, F., Inactivation of *Mucor plumbeus* by the Combined Actions of Chitinase and High Hydrostatic Pressure, *International Journal of Food Microbiology*, 52, 109-13, (1999).
- FERNANDEZ, A., Cava, D., Ocio, M. J., Lagaron, J. M., Perspectives for Biocatalysts in Food Packaging, *Trends in Food Science & Technology*, 19, (4), 198-206, (2008).
- FORSSEL, P., Lahtinen, R., Lahelin, M., Mylläriinen, P., Oxygen Permeability of Amylose and Amylopectin Films, *Carbohydrate Polymers*, 47, 125-29, (2002).
- FRANCHI, M.A., Serra, G.E., Cristianini, M., The Use of Biopreservatives in the Control of Bacterial Contaminants of Sugarcane alcohol Fermentation, *Journal of Food Science*, 68, 2310-15, (2003).
- GADANG V. P., Hettiarachchy N. S., Johnson M. G., Owens, C., Evaluation of Antibacterial Activity of Whey Protein Isolate Coating Incorporated with Nisin, Grape Seed Extract, Malic Acid, and EDTA on a Turkey Frankfurter System, *JOURNAL Of Food Science*, 7, (8), 389-394, (2008).
- GANAN, M., Martinez-Rodriguez, A.J., Carrascosa, A.V., Antimicrobial Activity of Phenolic Comounds of Wine Against *Campylobacter jejuni*, *Food Control*, 20, 739-742, (2009).

- GEMILI, S., Yemenicioglu, A., Altinkaya, S. A., Development of Cellulose Acetate Based Antimicrobial Food Packaging Materials For Controlled Release of Lysozyme, *Journal of Food Engineering*, 90 (4), 453-462, (2009).
- GEMILI, S., Yemenicioglu, A., Altinkaya, S. A., Development of Antioxidant Food Packaging Materials with Controlled Release Properties, *J. Food Eng*, 96 (3), 325-332, (2010).
- GENNADIOS, A., Hanna, M.A., Kurth, L.B., Application of Edible Coatings on Meats, Poultry and Seafoods: A review, *LWT- Food Science and Technology*, 30, 337-50, (1997).
- GHANBARZADEH, B., Oromiehie, A.R., Musavi, M., D-Jomen, Z.E., Rad, E.R., Milani, J., Effect of Plasticizing Sugars on Rheological and Thermal Properties of Zein Resins and Mechanical Properties of Zein Films, *Food Research International*, 39, 882-890, (2006).
- GUCBILMEZ, C. M., Yemenicioglu, A., Arslanoglu, A., Antimicrobial and Antioxidant Activity of Edible Zein Films Incorporated with Lysozyme, Albumin Proteins and Disodium EDTA, *Food Research International*, 40, (1), 80-91, (2007).
- GUCBILMEZ, Ç.M., Yemenicioglu, A., Partial Purification and Preparation of Bovine Lactoperoxidase and Characterization of Kinetic Properties of its Immobilized Form Incorporated into Cross-linked Alginate Films, *Food Chemistry*, 104, (2), 726-733, (2007).
- GUILBERT, S., Gontard, N., Gorris, L.G.M., Prolongation of the Shelf-Life of Perishable Food Products Using Biodegradable Films and Coatings, *LWT- Food Science and Technology*, 29, 10-17, (1996).
- GUO, Y. C., Liu, Z. D., An, H. J., Li, M. Q., Hu, J., Nano-structure and properties of Maize Zein Studied by Atomic Force Microscopy, *Journal of Cereal Science*, 41, (3), 277-281, (2005).
- GUTIERREZ, L., Escudero, A., Batlle, R., Nerin, C., Effect of Mixed Antimicrobial Agents and Flavors in Active Packaging Films, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57,(18), 8564-8571, (2009).
- HAN, J. H., Floros, J. D., Simulating Diffusion Model and Determining Diffusivity of Potassium Sorbate Through Plastics to Develop Antimicrobial Packaging Films, *Journal of Food Processing and Preservation*, 22, (2), 107-122, (1998).
- HAN, J.H., Antimicrobial Food Packaging, *Food Technology*, 54, 56-65, (2000).
- HE, L., Mu, C., Shi, J., Zhang, Q., Shi, B., Lin, W., Modification of Collagen with a Natural Cross-linker, Procyanidin, *International Journal of Biological Macromolecules*, 48, (2), 354-359, (2011).
- HERALD, T.J., Hachmeister, K.A., Huang, S., Bowers, J.R., Corn Zein Packaging Materials for Cooked Turkey, *Journal of Food Science*, 61, 415-18, (1996).
- HOFFMAN, KL., Han, I.Y., Dawson, P.L., Antimicrobial Effects of Corn Zein Films Impregnated with Nisin, Lauric Acid, and EDTA, *Journal of Food Protection*, 64, 885-89, (2001).



- HONG, S.I. and Krochta, J.M., Oxygen Barrier Properties of Whey Protein Isolate Coatings on Poly Propylene Films, *Journal of Food Science*, 68, 224-28, (2003).
- HUANG, R.Y.M., Pal, R., Moon, G.Y., Characteristics of Sodium Alginate Membranes for the Pervaporation Dehydration of Ethanol-Water and Isopropanol-Water Mixtures, *Journal of Membrane Science*, 160, 101-13, (1999).
- HUGAS, M., Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria for the Biopreservation of Meat and Meat Products, *Meat Science*, 49, 39-50, (1998).
- HUMPHREY, T., O'Brien, S., Madsen, M., Campylobacters as Zoonotic Pathogens: A Food Production Perspective, *International Journal of Food Microbiology*, 117, 237-257, (2007).
- IBRAHIM, H.R., Kato, A., Kobayashi, K., Antimicrobial Effects of Lysozyme against Gram-Negative Bacteria due to Covalent Binding of Palmitic Acid, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 2077-2082, (1991).
- JACOB, B.M., Antony, E.K., Sreekumar, B., Haridas, M., Thiocyanate Mediated Antifungal and Antibacterial Property of Goat Milk Lactoperoxidase, *Life Sciences*, 66, 2433-2439, (2000).
- JANES, M.E., Kooshesh, S., Johnson, M.G., Control of *Listeria Monocytogenes* on the Surface of Refrigerated, Ready-To-Eat Chicken Coated With Edible Zein Film Coatings Containing Nisin and/or Calcium Propionate, *Journal of Food Science*, 67, 2754-2757, (2002).
- JOERGER, R. D., Antimicrobial Films for Food Applications: A Quantitative Analysis of Their Effectiveness, *Packaging Technology and Science*, 20 (4), 231-273, (2007).
- KARMALI, K., Karmali, A., Teixeira, A., Curto, M.J.M., Assay for Glucose Oxidase From *Aspergillus Niger* And *Penicillium Amagasakiense* by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Analytical Biochemistry*, 333, 320-27, (2004).
- KENNEDY, M., O'Rourke, A.L., McLay, J., Simmonds, R., Use of Ground Beef Model to Assess the Effect of The Lactoperoxidase System on The Growth of *Escherichia Coli* O157:H7, *Listeria Monocytogenes* and *Staphylococcus Aureus* in Red Meat, *International Journal of Food Microbiology*, 57, 147-58, (2000).
- KESTER, J.J., Fennema, O.R., Edible Films and Coatings: A Review, *Food Technology*, 40, (12), 47-59, (1987).
- KIM, S.J., Ustünol, Z., Thermal Properties, Heat Sealability and Seal Attributes of Whey Protein Isolate/ Lipid Emulsion Edible Films, *Journal of Food Science*, 66, 985-90, (2001).
- KIM, S., Sessa, D.J., Lawton, J.W.. Characterization of Zein Modified with a Mild Cross-linking Agent, *Industrial Crops and Products*, 20, 291-300, (2004).
- KROCHTA, K.M., Johnston De Mulder, C., Edible and Biodegradable Polymer Films: Challenges and Opportunities, *Food Technology*, 51, 60-74, (1997).
- KU, K.-J., Hong, Y.-H., Song, K. B., Mechanical Properties of a *Gelidium corneum* Edible

- Film Containing Catechin and Its Application in Sausages, *Journal of Food Science*, 73, (3), 217-221, (2008).
- LABUZA, T.P., Breene, W.M., Applications of Active Packaging for Improvement of Shelf-Life and Nutritional Quality of Fresh and Extended Shelf-Life Foods, *Journal of Food Processing and Preservation*, 13, 1-69, (1989).
- LACOSTE, A., Schaich, K. M., Zumbrunnen, D., Yam, K. L., Advancing Controlled Release Packaging Through Smart Blending, *Packaging Technology and Science*, 18, (2), 77-87, (2005).
- LAI, H. M., Padua, G. W., Properties and Microstructure of Plasticized Zein Films, *Cereal Chemistry*, 74, (6), 771-775, (1997).
- LANGER, R.S., Peppas, N.A, Present and Future Applications of Biomaterials in Controlled Drug Delivery Systems, *Biomaterials*, 2, (4), 201-21, (1981).
- LAWTON, J. W., Plasticizers for Zein: Their Effect on Tensile Properties and Water Absorption of Zein Films, *Cereal Chemistry*, 81, (1), 1-5, (2004).
- LE TIEN, C., Vacho, C., Mateescu, A., Lacroix, M., Milk Protein Coatings Prevent Oxidative Browning of Apples and Potatoes, *Journal of Food Science*, 66, 512-16, (2001).
- LEONG, K.W., Langer, R., Polymeric Controlled Drug Delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1, (3), 199-233, (1988).
- LI, B., Peng, J. L., Yie, X., Xie, B. J., Enhancing Physical Properties and Antimicrobial Activity of Konjac Glucomannan Edible Films by Incorporating Chitosan and Nisin, *Journal of Food Science*, 71, (3), 174-178, (2006).
- LIN, S.Y., Krochta, J.M., Plasticizer Effect on Grease Barrier and Color Properties of Whey-Protein Coatings on Paperboard, *Journal of Food Science*, 68, 229-33, (2003).
- LINDSTROM, T.R., Morimoto, K., Cante, C.J., Edible Films and Coatings, *Encyclopedia of Food Science and Technology*, ed: Hui, Y.H., Vol. 2, John Wiley and Sons. Inc., New York, (1992), pp 659.
- LOPEZ-RUBIO, A., Almenar, E., Hernandez-Munoz, P., Lagaron, J. M., Catala, R., Gavara, R., Bioactive Packaging: Turning Foods into Healthier Foods Through Biomaterials, *Trends in Food Science & Technology*, 17, (10), 567-575, (2006).
- MADHAVI, D. L., Singhal, R. S., Kulkarni, P. R., Technological Aspects of Food Antioxidants. In *Food Antioxidants*, Madhavi, D. L., Deshpande, S. S., Salunke, D. K., Eds. Marcel Dekker, Inc.: New York, (1996), pp 159-265.
- MADHAVI, D.L., Deshpande, S.S., Salunkhe, D.K., Toxicological Aspects of Food Antioxidants, *Food Antioxidants*, ed: Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., Salunke, D.K., Marcel Dekker Inc., New York, (1996) pp 267.
- MADHAVI, D.L., Salunkhe, D.K., Summary, Conclusions, and Future Research Needs, *Food Antioxidants*, ed: Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., Salunke, D.K., Marcel Dekker Inc., New York, (1996), pp 471.

- MADLENER, S., Illmer, C.; Horvath, Z., Saiko, P., Losert, A., Herbacek, I., Grusch, M., Elford, H. L., Krupitza, G., Bernhaus, A., Fritzer-Szekeres, M., Szekeres, T., Gallic acid inhibits ribonucleotide reductase and cyclooxygenases in human HL-60 promyelocytic leukemia cells, *Cancer Letters*, 245, (1-2), 156-162, (2007).
- MARCHAL, R., Chaboche, D., Marchal-Delahaut, L., Gerland, C., Gandon, J.P., Jeandet, P., Detection and Qualification of Lysozyme in Champagne Wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3225-3231, (2000).
- MARÉCHAL, Y., Chanzy, H., The Hydrogen Bond Network in L-[beta] Cellulose as Observed by Infrared Spectrometry, *Journal of Molecular Structure*, 523, (1-3), 183-196, (2000).
- MASTROMATTEO, M., Barbuzzi, G., Conte, A., Del Nobile, M. A., Controlled Release of Thymol from Zein Based Film, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10, (2), 222-227, (2009).
- MASUDA, T., Ueno, Y., Kitabatake, N., Sweetness and Enzymatic Activity of Lysozyme, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4937-4941, (2001).
- MCCLEMENTS, D. J., Decker, E. A., Weiss, J., Emulsion-Based Delivery Systems for Lipophilic Bioactive Components, *Journal of Food Science*, 72, (8), 109-124, (2007).
- MECITOGLU, Ç., Yemenicioglu, A., Arslanoglu, A., Elmacı, Z. S., Korel, F., Çetin, A. E., Incorporation of partially purified hen egg white lysozyme into zein films for Antimicrobial Food Packaging, *Food Research International*, 39, (1), 12-21, (2006).
- MEYERS, K.J., Watkins, C.B., Pritts, M.P., Liu, R.H.. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Strawberries, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, (23), 6887-6892, (2003).
- MILLER, K.S., Krochta, J.M., Oxygen and Aroma Barrier Properties of Edible Film: A Review, *Trends in Food Science & Technology*, 8, 228-237, (1997).
- MIN, S., Harris, L., Krochta, J.M., Antimicrobial Effects of Lactoferrin, Lysozyme, and the Lactoperoxidase System and Edible Whey Protein Films Incorporating the Lactoperoxidase System Against *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7, *Journal of Food Science*, 70, 332-338, (2005a).
- MIN, S., Harris, L., Krochta, J.M., *Listeria monocytogenes* inhibition by Whey Protein Films and Coatings Incorporating the Lactoperoxidase System, *Journal of Food Science*, 70, 317-324, (2005b).
- MIN, S., Krochta, J.M., Inhibition of *Penicillium Commune* by Edible Whey Protein Films Incorporating Lactoferrin, Lactoferrin Hydrolysate, and Lactoperoxidase Systems, *Journal of Food Science*, 70, (2), 87-94, (2005).
- MIN, S.; Krochta, J. M., Ascorbic Acid-Containing Whey Protein Film Coatings for Control of Oxidation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, (8), 2964-2969, (2007).
- MOHAMMED-ZIEGLER, I., Billes, F., Vibrational Spectroscopic Calculations on Pyrogallol and Gallic Acid, *J. Mol. Struct. : THEOCHEM*, 618, (3), 259-265, (2002).

- MONZANI, E., Gatti, A.L., Profumo, A., Casella, L., Gullotti, M., Oxidation of Phenolic Compounds by Lactoperoxidase. Evidence for the Presence of A Low-Potential Compound II During Catalytic Turnover, *Biochemistry*, 36, 1918-1926, (1997).
- MOORE, M.E., Han, I.Y., Action, J.C., Ogale, A.A., Barmore, C.R., Dawson, P.L., Effects of Antioxidants in Polyethylene Film on Fresh Beef Color, *Journal of Food Science*, 68, 99-104, (2003).
- MUNDARGI, R.C., Shelke, N.B., Rokhade, A.P., Patil, S.A., Aminabhavi, T.M., Formulation And In-Vitro Evaluation of Novel Starch-Based Tableted Microspheres for Controlled Release of Ampicillin, *Carbohydrate Polymers*, 71, (1), 42-53, (2008).
- MURATA, T., Tonioka, A., Interfacial State Change of Cellulose Triacetate Membrane by Adsorption of Polyelectrolyte, *Journal of Colloid and Interface Science*, 192, 26-36, (1997).
- MWANGI, J.W., Ofner, C.M., Crosslinked Gelatin Matrices: Release of a Random Coil Macromolecular Solute, *International Journal Of Pharmaceutics*, 278, (2), 319-327, (2004).
- NAKAMURA, S., Kato, A., Kobayashi, K., New Antimicrobial Characteristics of Lysozyme-Dextran Conjugate, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 647-650, (1991).
- NAKAMURA, S., Ogawa, M., Nakai, S., Kato, A., Kitts, D.D., Antioxidant Activity of A Maillard-Type Phosvitin-Galactomannan Conjugate with Emulsifying Properties and Heat Stability, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3958-3963, (1998).
- NATTRESS, F.M., Baker, L.P., Effects of Treatment with Lysozyme and Nisin on the Microflora and Sensory Properties of Commercial Pork, *International Journal of Food Microbiology*, 85, 259-267, (2003).
- NAVANI, N.N. and Kapadnis, B.P., Optimization of Chitinase Production Using Statistics Based Experimental Designs, *Process Biochemistry*, 40, 651-660, (2005).
- NOHYNEK, L. J., Alakomi, H. L., Kahkonen, M. P., Heinonen, M., Helander, K. M., Oksman-Caldentey, K. M., Puupponen-Pimia, R. H., Berry Phenolics: Antimicrobial Properties and Mechanisms of Action against Severe Human Pathogens, *Nutrition and Cancer-an International Journal*, 54, (1), 18-32. (2006)
- O'GRADY, M.N., Maher, M., Troy, D.J., Moloney, A.P., Kerry, J.P., An Assessment of Dietary Supplementation with Tea Catechins and Rosemary Extract on the Quality of Fresh Beef, *Meat Science*, 73, (1), 132-143, (2006).
- OU, S., Wang, Y., Tang, S., Huang, C., Jackson, M.G., Role of Ferulic Acid in Preparing Edible Films from Soy Protein Isolate, *Journal of Food Engineering*, 70, 205-210, (2005).
- OZDEMIR, M., Floros, J.D., Film Composition Effects on Diffusion of Potassium Sorbate Through Whey Protein Films, *Journal of Food Science*, 68, 511-516, (2003).
- PADGETT, T., Han, I.Y., Dawson, P.L., Incorporation of Food-Grade Antimicrobial Compounds into Biodegradable Packaging Films, *Journal of Food Protection*, 61, 1330-1335, (1998).

- PADGETT, T., Han, I.Y., Dawson, P.L., Effect Of Lauric Acid Addition on the Antimicrobial Efficacy and Water Permeability of Corn Zein Films Containing Nisin, *Journal of Food Processing and Preservation*, 24, 423-432, (2000).
- PAKKANEN, R. and Aalto, J., Growth Factors and Antimicrobial Factors of Bovine Colostrum, *International Dairy Journal*, 7, 285-297, (1997).
- PARK, S.I., Daeschel, M.A., Zhao, Y., Functional Properties of Antimicrobial Lysozyme-Chitosan Composite Films, *Journal of Food Science*, 69, 215-221, (2004).
- PEARCE, K.N., Kinsella, J.E., Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, (3), 716-723, (1978).
- PERUMALLA A.V.S., Hettiarachchy, N.S., Green Tea and Grape Seed Extracts - Potential Applications in Food Safety And Quality, *Food Research International*, 44, (4), 827-839, (2011).
- PETERSON, K., Nielsen, P.V., Bertelsen, G., Lawther, M., Olsen, M.B., Nilsson, N.H., Mortensen, G., Potential of Biobased Materials for Food Packaging, *Trends in Food Science & Technology*, 10, 52-68, (1999).
- PILLAY, V., Sibanda, W., Danckwerts, M.P., Sequential Design of a Novel PVA-Based Crosslinked Ethylenic Homopolymer for Extended Drug Delivery, *International Journal Of Pharmaceutics*, 301, (1-2), 89-101, (2005).
- PONGTHARANGKUI T., Demirci, A., Evaluation of Agar Diffusion Bioassay for Nisin Quantification Source, *Applied Microbiology And Biotechnology*, 65, (3), 268-272, (2004).
- PRUITT, K.M., Tenovuo, J., Andrews, R.W., McKane, T., Lactoperoxidase-Catalyzed Oxidation of Thiocyanate: Polarographic Study of the Oxidation Products, *Biochemistry*, 21, 562-567, (1982).
- QUATTARA, B., Simrad, R.E., Piette, G., Begin A., Holley, R.A. Diffusion of Acetic Acid and Propionic Acids from Chitosan-Based Antimicrobial Packaging Films, *Journal of Food Science*, 65, (5), 768-773. (2000).
- QUINTERO-SALAZAR, B., Vernon-Carter, E. J., Guerrero-Legarreta, I., Ponce-Alquicira, E., Incorporation of the Antilisterial Bacteriocin-Like Inhibitory Substance From *Pediococcus parvulus* VKMX133 into Film-Forming Protein Matrices with Different Hydrophobicity, *Journal of Food Science*, 70, (9), 398-403, (2005).
- QUINTAVALLA, S., Vicini, L., Antimicrobial Food Packaging in Meat Industry, *Meat Science*, 62, 373-380, (2002).
- RAJALAKSHMI, D., Narasimhan, S., Food Antioxidants: Sources and Methods of Evaluation, *Food Antioxidants*, ed: Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., Salunke, D.K. Marcel Dekker Inc., New York, (1996), Pp: 65.
- RAKOTONIRAINY, A.M., Wang, Q., Padua, G.W., Evaluation of Zein Films as Modified Atmosphere Packaging for Fresh Broccoli, *Journal of Food Science*, 66, 1108-1111, (2001).

- RAWEL, H.M., Kroll, J., Riese B., Reaction of Chlorogenic Acid with Lysozyme: Physicochemical Characterization and Proteolytic Digestion of the Derivatives, *Journal of Food Science*, 65, (6), 1091-1098. (2000)
- RE R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Evans-Rice C., Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay, *Free radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237, (1999).
- ROSE, N.L., Sporns, P., Stiles, M.E., McMullen, L.M., Inactivation of Nisin by Glutathione in Fresh Meat, *Journal of Food Science*, 64, 759-62, (1999).
- ROSE, N.L., Palcic, M.M., Sporns, P., McMullen, L.M., Nisin: A Novel Substrate for Glutathione S-Transferase Isolated from Fresh Beef, *Journal of Food Science*, 67, 2288-2293, (2002).
- ROSS, R.P., Morgan, S., Hill, C., Preservation and Fermentation: Past, Present And Future, *International Journal of Food Microbiology*, 79, 3-16, (2002).
- RYU, S.Y., Rhim, J.W., Roh, J.H., Kim, S.S., Preparation and Physical Properties of Zein-Coated High-Amylose Corn Starch Film, *LWT- Food Science and Technology*, 35, 680-86, (2002).
- SAUCIER, C. T., Waterhouse, A. L., Synergetic Activity of Catechin and other Antioxidants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, (11), 4491-4494. (1999).
- SCANNEL, A.G.M., Hill, C., Ross, R.P., Marx, S., Hartmeier, W., Arendt, E.K., Development of Bioactive Food Packaging Materials Using Immobilized Bacteriocins Lacticin 3147 and Nisaplin, *International Journal of Food Microbiology*, 60, 241-249, (2000).
- SEBTI, I., Carnet, A. R., Blanc, D., Saurel, R., Coma, V., Controlled Diffusion of an Antimicrobial Peptide from a Biopolymer Film, *Chemical Engineering Research & Design*, 81, 1099-1104, (2003).
- SEIFU, E., Buys, E.M., Donkin, E.F., Quality Aspects of Gouda Cheese Made from Goat Milk Preserved by the Lactoperoxidase System, *International Dairy Journal*, 14, 581-589, (2004).
- SEIFU, E., Buys, E.M., Donkin, E.F., Significance of the Lactoperoxidase System in the Dairy industry and its Potential Applications: A Review, *Trends in Food Science & Technology*, 1-18, (2005).
- SESSA, D. J., Mohamed, A., Byars, J. A., Chemistry and Physical Properties of Melt-Processed and Solution-Cross-Linked Corn Zein, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, (16), 7067-7075, (2008).
- SHAHRZAD, S.; Aoyagi, K., Winter, A., Koyama, A., Bitsch, I., Pharmacokinetics of Gallic Acid and Its Relative Bioavailability from Tea in Healthy Humans, *The Journal of Nutrition*, 131, (4), 1207-1210, (2001).
- SINGLETON, V.L., Rossi, J.A., Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolibdic-Phosphotungstic Acid Reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158, (1965).

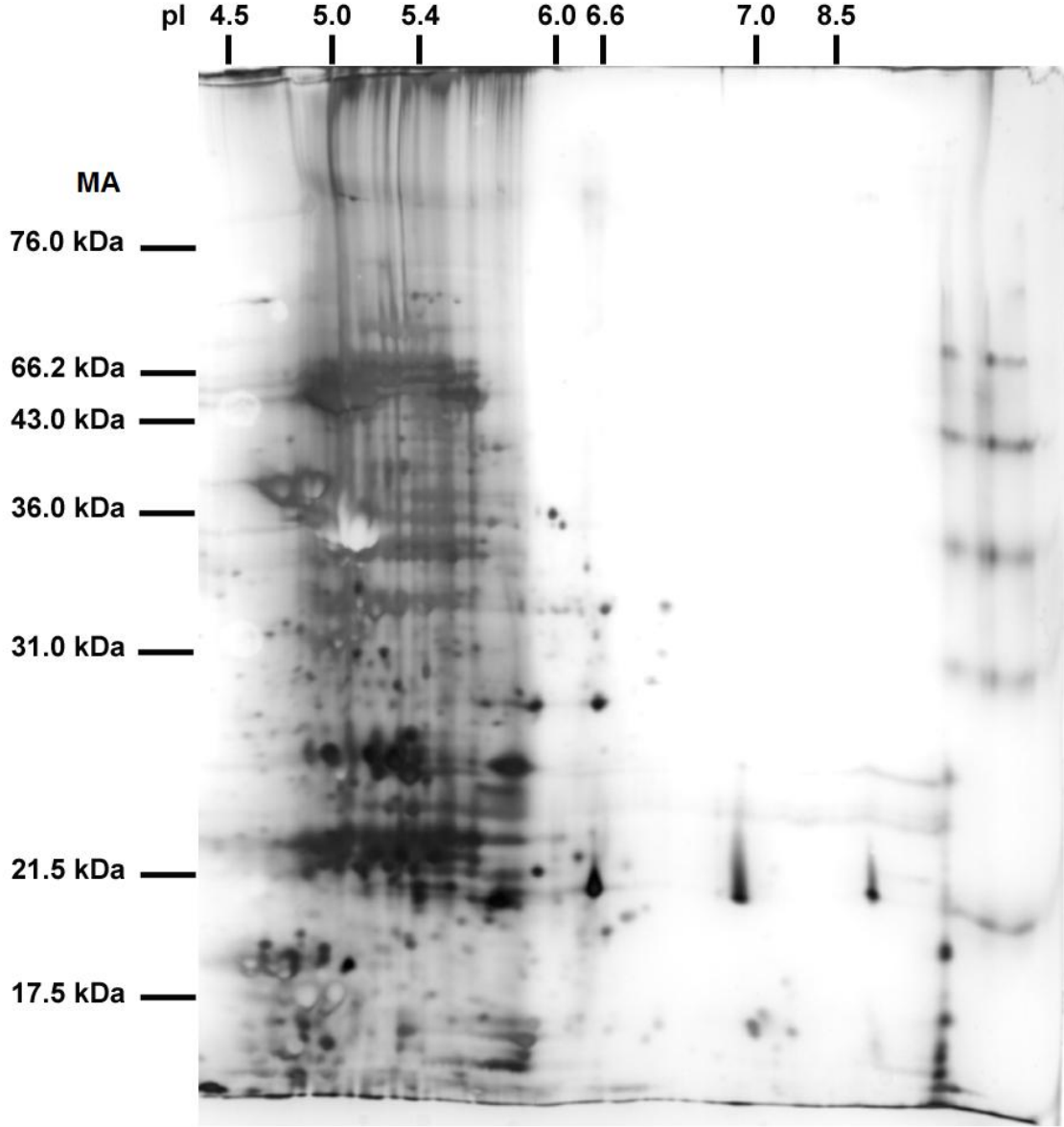
- SOTHORNVIT, R., Hong, S.-I., An, D. J., Rhim, J.-W., Effect of Clay Content on the Physical and Antimicrobial Properties of Whey Protein Isolate/Organo-Clay Composite Films, *LWT - Food Science and Technology*, 43 (2), 279-284. (2010)
- SPECCHIO, J.J., 1992. Antioxidants, *Encyclopedia of Food Science and Technology*, ed: Hui Y.H., Vol 1, John Wiley and Sons Inc., New York, (1992) Pp:73.
- SUPPAKUL, P., Miltz, J., Sonneveld, K., Bigger, S.W., Active Packaging Technologies with an Emphasis on Antimicrobial Packaging and Its Applications, *Journal of Food Science*, 68, 408-420, (2003).
- TANG S.Z., Sheehan, D., Buckley, D.J., Morrissey, P.A., Kerry, J.P., Anti-Oxidant Activity of Added Tea Catechins on Lipid Oxidation of Raw Minced Red Meat, Poultry and Fish Muscle, *International Journal of Food Science And Technology*, 36, (6), 685-692, (2001).
- TEERAKARN, A., Hirt, D.E., Acton, J.C., Rieck, J.R., Dawson, P.L., Nisin Diffusion in Protein Films: Effects of Film Type and Temperature, *Journal of Food Science*, 67, 3019-3025, (2002).
- THEIVENDRAN, S., Hettiarachchy, N. S., Johnson, M. G., Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Nisin Combined with Grape Seed Extract or Green Tea Extract in Soy Protein Film Coated on Turkey Frankfurters, *Journal of Food Science*, 71, (2), 39-44, (2006).
- TOUCH, V., Hayakawa, S., Yamada, S., Kaneko, S., Effects of a Lactoperoxidase-Thiocyanate-Hydrogen Peroxide System on *Salmonella enteritidis* in Animal or Vegetable Foods, *International Journal of Food Microbiology*, 93, 175-183, (2004).
- TÜBİTAK-MAG Proje No: 104 M 386. Laktik Asit Bakterileri, Lizozim ve Laktoperoksidaz Kullanılarak Antimikrobiyel Özellik Taşıyan Yenebilir Filmlerin Geliştirilmesi, Plastik Ambalaj Materyallerine ve Çeşitli Gıdalara Uygulanması.
- TÜBİTAK-MISAG Proje No : 102M021. Biyoprezervatifler Kullanılarak Antimikrobiyel ve Antioksidant Etkisi Bulunan Çok Fonksiyonlu Gıda Ambalajlarının Üretilmesi.
- UNALAN, I.U., Korel, F., Yemenicioglu, A., Active Packaging of Ground Beef Patties by Edible Zein Films Incorporated with Partially Purified Lysozyme and Na(2)EDTA, *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 6, 1289-1295, (2011).
- VAQUERO, R. M. J., Alberto, M. R., Manca de Nadra, M. C., Influence of Phenolic Compounds from Wines on the Growth of *Listeria monocytogenes*, *Food Control*, 18, (5), 587-593, (2007).
- VARTIAINEN, J., Ratto, M., Paulussen, S., Antimicrobial Activity of Glucose Oxidase-Immobilized Plasma-Activated Polypropylene Films, *Packaging Technology and Science*, 18, (5), 243-251, (2005).
- VERMEIREN, L., Devlieghere, F., van Beest, M., de Kruijf, N., Debevere, J., Developments in the Active Packaging of Foods, *Trends in Food Science & Technology*, 10, (3), 77-86, (1999).

- WANG, Y., Filho, F.L., Geil, P., Padua, G.W., Effects of Processing on the Structure of Zein/Oleic Acid Films Investigated by X-Ray Diffraction, *Macromolecular Bioscience*, 5, 1200-1208, (2005).
- WANG, Q., Yin, L., Padua, G. W., Effect of Hydrophilic and Lipophilic Compounds on Zein Microstructures, *Food Biophysics*, 3, 174-181, (2008).
- WEISS, J., Takhistov, P., McClements, J., Functional Materials in Food Nanotechnology, *Journal of Food Science*, 71, (9), 107-116, (2006).
- WOLF, S.M., Ferrari, R.P., Traversa, S., Biemann, K., Determination of the Carbohydrate Composition and the Disulfide Bond Linkages of Bovine Lactoperoxidase by Mass Spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 35, 210-217, (2000).
- WOODS, K.K., Selling, G.W., Cooke, P.H., Compatible Blends of Zein and Polyvinylpyrrolidone, *Journal of Polymers and the Environment*, 17, 115-122, (2009).
- WU, Y., Weller, C.L., Hamouz, F., Schnepf, M., Moisture Loss and Lipid Oxidation for Precooked Ground-Beef Patties Packaged in Edible Starch-Alginate-Based Composite Films, *Journal of Food Science*, 66, 486-493, (2001).
- YILMAZ, Y., Novel Uses of Catechins in Foods, *Trends in Food Science & Technology*, 17, 64-71, (2006).
- ZACTITI, E. M., Kieckbusch, T. G., Potassium Sorbate Permeability in Biodegradable Alginate Films: Effect of the Antimicrobial Agent Concentration and Crosslinking Degree, *Journal of Food Engineering*, 77, (3), 462-467, (2006).
- ZAPICO, P., Medina, M., Gaya, P., Nunez, M., Synergistic Affect of Nisin and the Lactoperoxidase System on *Listeria Monocytogenes* in Skim Milk, *International Journal of Food Microbiology*, 40, 35-42, (1998).
- ZORMAN T., Heyndrickx, M., Uzunovic-Kamberovic, S., Mozina, S.S., Genotyping of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* from Retail Chicken Meat and Humans with Campylobacteriosis in Slovenia and Bosnia and Herzegovina, *International Journal of Food Microbiology*, 110, (1), 24-33, (2006).



## 7. EKLER

EK 1. Mercimek proteinlerinin 2 boyutlu elektroforez görüntüsü



**TÜBİTAK  
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

<b>Proje No: 108M353</b>
<b>Proje Başlığı: Biyoaktif Maddelerin Kontrollü Salımı İçin Kompozit Veya Karışımlardan Oluşan Aktif Yenilebilir Gıda Ambalaj Malzemeleri Geliştirilmesi</b>
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Prof. Dr. Ahmet Yemenicioğlu (Yürütücü), Doç. Dr. Figen Korel, Prof. Dr. Halil İbrahim Atabay, Araş. Gör. İskender Arcan, Araş. Gör. Levent Yurdaer Aydemir, Araş. Gör. Derya Boyacı, Derya Alkan (Doktora öğrencisi), Araş. Gör. İlke Uysal
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Gülbahçe Köyü, 35430 Urla, İzmir
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: -</b>
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b> 01/11/2008-01/11/2011
<b>Öz (en çok 70 kelime)</b> Bu projede lizozim ve çeşitli fenolik bileşiklerden oluşan biyoaktif maddelerin kontrollü salımını gerçekleştirebilecek yenilebilir film ve kaplamalar geliştirmek amacıyla zein ve peyniraltı suyu proteinleri (PSP) temelli karışım ve kompozit yapılardan faydalanılmıştır. Elde edilen karışım filmler zein veya PSP'nin oleik, laurik ve linoleik asit gibi yağ asitleri ile karıştırılmasıyla, kompozit filmler ise karnauba, kandelilla ve balmumu gibi mumlar, mercimek ve soya globülin proteinleri veya mikrokristal selülozla karıştırılmasıyla elde edilmiştir.
<b>Anahtar Kelimeler:</b> Zein, peyniraltı suyu proteinleri, karışım, kompozit, kontrollü salım, antimikrobiyel ambalajlama, antimikrobiyel paketleme
<b><a href="#">Fikri Ürün Bildirim Formu</a> Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/></b> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
<b>Projeden Yapılan Yayınlar:</b> <b>SCI Makaleler</b> Arcan, I., Yemenicioğlu, A. (2010). Incorporating phenolic compounds opens a new perspective to use zein films as flexible bioactive packaging materials. Food Research International. 44(2): 550-556. Alkan, D., Aydemir, L.Y., Arcan, I., Yavuzdurmaz, H., Atabay, H.I., Ceylan, C., Yemenicioğlu, A. (2011). Development of flexible antimicrobial packaging materials against Campylobacter jejuni by incorporation of gallic acid into zein-

based films. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 59(20)11003-11010.

### **Uluslararası Konferanslar**

- Yemenicioğlu, A., Arcan, I. Controlled release of catechin from edible zein films intended for meat bioactive packaging. 55th International Congress of Meat Science and Technology, Copenhagen, Denmark, 16-21 August 2009.
- Arcan, I, Yemenicioğlu, A. Controlled release of phenolic compounds from zein based composites and blends intended for food bioactive packaging. 3rd International Conference on Biodegradable and Biobased Polymers, Strasbourg, France, 29-31 August 2011
- Arcan, I, Yemenicioğlu, A. Development of antilisterial zein films with controlled release properties. 3rd International Conference on Biodegradable and Biobased Polymers, Strasbourg, France, 29-31 August 2011
- Arcan, I, Incorporating phenolic compounds opens a new perspective to use zein films as flexible bioactive packaging materials. 3rd International Congress on Food and Nutrition and 3rd SAFE Consortium International Congress on Food Safety. İstanbul, Turkey, 12-14th October 2011
- Arcan, I, Yemenicioğlu, A. Release profiles of phenolic compounds from composite or blend films for food packaging 3rd International Congress on Food and Nutrition and 3rd SAFE Consortium International Congress on Food Safety. İstanbul, Turkey, 12-14th October 2011