

**Laktik Asit Bakterileri, Lizozim ve Laktoperoksidaz  
Kullanılarak Antimikrobiyal Özellik Taşıyan Yenebilir  
Filmlerin Geliştirilmesi, Plastik Ambalaj Materyallerine ve  
Çeşitli Gıdalara Uygulanması**

**Proje No: 104M386**

Yrd.Doç.Dr. Figen KOREL  
Prof.Dr. Ahmet YEMENİCİOĞLU  
Prof.Dr. Sacide ALSOY ALTINKAYA  
Yrd.Doç.Dr. Alper ARSLANOĞLU  
Fatih Yalçın Güneş YENER

MART 2008  
İZMİR

## ÖNSÖZ

Bu rapor '*Laktik Asit Bakterileri, Liozüm ve Laktoperoksidaz Kullanılarak Antimikrobiyal Özellik Taşıyan Yenebilir Filmlerin Geliştirilmesi, Plastik Ambalaj Materyallerine ve Çeşitli Gıdalara Uygulanması*' başlıklı Tübitak-MAG-104M386 No'lu araştırma projesinin sonuçlarını içermektedir. Çalışma antimikrobiyal özelliğe sahip enzimlerin yenebilir filmlerde kullanılması, geliştirilen filmlerin plastik ambalaj materyalleri ile birleştirilmesi ve bu filmlerin gıdalara uygulanması sonucunda gıda güvenliğini artırması çalışmalarına katkıda bulunmak amacıyla önerilmiştir. Bu çalışma 1 Temmuz 2005 tarihinde, telif bedeli hariç 106.117,00 YTL lik bütçe ile İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Gıda Mühendisliği Bölümünde yürütölmek üzere desteklenmiş ve 8 aylık bir uzatma ile 1 Mart 2008'de tamamlanmıştır.

Proje tarafımdan ve üç araştırmacı ile birlikte yürütölmüştür. Projede bir yüksek lisans öğrencisi proje bütçesi ile desteklenmiş olup bundan başka bir yüksek lisans öğrencisi de projede görev almıştır. Toplam iki yüksek lisans çalışması yapılmıştır. Projeden elde edilen sonuçlar 2007 yılında uluslararası konferanslarda poster ve sözlü sunum olarak sunulmuştur.

Projede, laktoperoksidaz içeren alginat filmlerle liozüm içeren zein filmler geliştirilmiştir. Geliştirilen filmlerin antimikrobiyal etkileri çeşitli patojen ve bozulmaya neden olan mikroorganizmalar üzerinde denenmiştir. Geliştirilen filmler daha sonra selüloz asetat filmle birleştirilerek bu filmlerin antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Aynı zamanda geliştirilen laktoperoksidaz içeren alginat filmler kalamar halkalarının kaplanması, laktik asit bakterisi içeren alginat filmler kuşbaşı etlerin kaplanması ve liozüm içeren zein filmler dana ve hindi burgerlerin kaplanması kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda antimikrobiyal özelliğe sahip enzimlerin ilave edildiği yenebilir filmlerin gıdaların kaplanması olumlu sonuçlar verdiği ve gıdalara uygulanabilme potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

## İÇİNDEKİLER

Özet.....	12
Abstract.....	13
1. Giriş.....	14
2. Genel Bilgiler.....	15
3. Gereç ve Yöntemler.....	19
3.1. Gereçler.....	19
3.2. Yöntemler.....	20
3.2.1. Çalışmada Kullanılan Test Mikroorganizmalarının ve Laktik Asit Bakterilerinin Kullanıma Hazırlanması.....	20
3.2.2. Alginat Filmlerle İlgili Çalışmalar.....	20
3.2.2.1. Laktoperoksidaz İçeren Alginat Filmlerle İlgili Çalışmalar.....	20
3.2.2.1.1. Laktoperoksidaz Üretimi.....	20
3.2.2.1.2. Laktoperoksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	21
3.2.2.1.3. Alginat Film Üretimi.....	21
3.2.2.1.4. Laktoperosidaz İçeren Alginat Filmlerden Laktoperoksidazın Salım Testleri ve Filmlerde Bulunan Immobilize Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi .....	21
3.2.2.1.5. Laktoperoksidaz İçeren Alginat Filmlerin <i>Escherichia coli</i> Üzerindeki Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi Amacıyla Yürütülen İnhibisyon Testleri.....	22
3.2.2.1.6. Laktoperoksidaz İçeren Alginat Filmlerin <i>Listeria innocua</i> Üzerindeki Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi Amacıyla Yürütülen İnhibisyon Testleri.....	23
3.2.2.1.7. Laktoperoksidaz İçeren Alginat Filmlerin <i>Pseudomonas fluorescens</i> Üzerindeki Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi Amacıyla Yürütülen İnhibisyon Testleri.....	23
3.2.2.2. Laktik Asit Bakterisi İçeren Alginat Filmlerle İlgili Çalışmalar.....	23
3.2.2.2.1. Film Üretiminde Kullanılmak Üzere Seçilmiş Laktik Asit Bakterilerinin Hidrojen Peroksit Üretme Yeteneklerinin Test Edilmesi.....	23
3.2.2.2.2. Seçilmiş Olan <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ve <i>L. plantarum</i> 'un H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve Laktik Asit Üretim Yeteneğinin Depolama Sıcaklıklarında Test Edilmesi.....	24
3.2.2.2.3. <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ve <i>L. plantarum</i> 'un Yenebilir Filmlere İlave Edilebilecek Liyofilize Preparat Haline Getirilmesi.....	24
3.2.2.2.4. Laktik Asit Bakterisi İçeren Alginat Filmlerin Üretilmesi ve Bu	

Filmlerdeki Serbest ve İmmobilize Bakteri Sayılarının Belirlenmesi.....	25
3.2.2.2.5. Laktik Asit Bakterisi İçeren Alginat Film Çözeltisinden Elde Edilen Filmlerin Depolanması Sırasında Filmlerdeki Serbest ve İmmobilize Bakteri Sayıları.....	25
3.2.2.2.6. Laktik Asit Bakterisi İçeren Depolanmış Toz Haldeki Alginik Asit Karışımında Bakterilerin Stabilitesi.....	26
3.2.2.2.7. Laktoperoksidaz ve/veya <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> İçeren Alginat Filmlerin <i>Escherichia coli</i> Üzerindeki Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi Amacıyla Yürütülen İnhibisyon Testleri.....	26
3.2.3. Zein Filmlerle İlgili Çalışmalar.....	27
3.2.3.1. Lizozim İçeren Zein Filmlerle İlgili Çalışmalar.....	27
3.2.3.1.1. Lizozim Üretimi.....	27
3.2.3.1.2. Lizozim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	27
3.2.3.1.3. Zein Film Üretimi.....	28
3.2.3.1.4. Lizozim İçeren Zein Filmlerin Üretilmesi.....	28
3.2.3.1.5. Homojenizasyon veya Karıştırma Tekniği ile Üretilmiş Lizozim İçeren Zein Filmlerde Lizozimin Salım Testleri ve Filmlerdeki İmmobilize Lizozimin Aktivitesinin Belirlenmesi.....	29
3.2.3.1.6. Homojenizasyon veya Karıştırma Tekniği ile Üretilmiş Lizozim İçeren Zein Filmlerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi için Sıvı Besiyerinde Gerçekleştirilen İnhibisyon Testleri.....	29
3.2.3.1.7. Homojenizasyon veya Karıştırma Tekniği ile Üretilmiş Lizozim İçeren Zein Filmlerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi için Katı Besiyerinde Gerçekleştirilen Zon İnhibisyon Testleri.....	30
3.2.4. Üretilen Yenebilir Filmlerin Plastik Filmlerle Birleştirilmesi.....	31
3.2.4.1. Karıştırma Tekniği ile Üretilmiş Zein Filmlerin Çift Yönlü Olarak Oriente Edilmiş Polipropilen Filmlerle Birleştirilmesi.....	31
3.2.4.2. Karıştırma Tekniği ile Üretilmiş Zein Filmlerin Selüloz Asetat Filmlerle Birleştirilmesi.....	31
3.2.4.2.1. Karıştırma Tekniği ile Üretilmiş Lizozim İçeren Zein Filmlerin Selüloz Asetat Filmlerle Birleştirildikten Sonraki Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi için Katı Besiyerinde Gerçekleştirilen Zon İnhibisyon Testleri.....	31
3.2.5. Üretilen Yenebilir Filmlerin Gıdalara Uygulanması.....	31
3.2.5.1. Taze Kalamar Halkalarının Laktoperoksidaz İçeren Alginat Filmlerle Kaplanması.....	32

3.2.5.2. Kuşbaşı Etlere Laktik Asit Bakterisi İçeren Alginat Filmlerle Kaplanması.....	33
3.2.5.3. Dana ve Hindi Burgerlerin Lisozim İçeren Zein Filmlerle Kaplanması.....	33
4. Bulgular ve Tartışma.....	35
4.1. Alginat Filmlerle İlgili Çalışmalar.....	35
4.1.1. Laktoperoksidaz İçeren Alginat Filmlerle İlgili Çalışmalar.....	36
4.1.1.1. Laktoperoksidaz İçeren Alginat Filmlerle İlgili Salım Testleri ve Filmlerde Bulunan İmmobilize Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	36
4.1.1.2. Laktoperoksidaz İçeren Alginat Filmlerin <i>Escherichia coli</i> Üzerindeki Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi Amacıyla Yürütülen İnhibisyon Testleri.....	37
4.1.1.3. Laktoperoksidaz İçeren Alginat Filmlerin <i>Listeria innocua</i> Üzerindeki Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi Amacıyla Yürütülen İnhibisyon Testleri.....	40
4.1.1.4. Laktoperoksidaz İçeren Alginat Filmlerin <i>Pseudomonas fluorescens</i> Üzerindeki Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi Amacıyla Yürütülen İnhibisyon Testleri.....	43
4.1.2. Laktik Asit Bakterisi İçeren Alginat Filmlerle İlgili Çalışmalar.....	46
4.1.2.1. Film Üretiminde Kullanılmak Üzere Seçilmiş Laktik Asit Bakterilerinin Hidrojen Peroksit Üretim Yeteneklerinin Test Edilmesi.....	46
4.1.2.2. <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ve <i>L. plantarum</i> 'un H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve Laktik Asit Üretim Yeteneğinin Depolama Sıcaklıklarında Test Edilmesi.....	48
4.1.2.3. <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ve <i>L. plantarum</i> İçeren Alginat Filmlerde Serbest ve İmmobilize Bakteri Sayılarının Belirlenmesi.....	51
4.1.2.4. <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ve <i>L. plantarum</i> İçeren Depolanmış Alginat Film Çözeltisinden Elde Edilen Filmlerde Serbest ve İmmobilize Bakteri Sayılarının Belirlenmesi.....	52
4.1.2.5. <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ve <i>L. plantarum</i> İçeren Depolanmış Toz Haldeki Alginik Asit Karışımında Bakterilerin Stabilitesi.....	53
4.1.2.6. Laktoperoksidaz ve/veya <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> İçeren Alginat Filmlerin <i>E. coli</i> Üzerindeki Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi Amaçla Yürütülen İnhibisyon Testleri.....	54
4.2. Zein Filmlerle İlgili Çalışmalar.....	56
4.2.1. Lisozim İçeren Zein Filmlerle İlgili Çalışmalar.....	57
4.2.1.1. Homojenizasyon veya Karıştırma Tekniği ile Üretilmiş Lisozim İçeren	

Zein Filmlerde Lizozimin Salım Testleri ve Filmlerdeki İmmobilize Lizozimin Aktivitesinin Belirlenmesi.....	57
4.2.1.2. Homojenizasyon veya Karıştırma Tekniği ile Üretilmiş Lizozim İçeren Zein Filmlerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi için Sıvı Besiyerinde Gerçekleştirilen İnhibisyon Testleri.....	61
4.2.1.3. Homojenizasyon veya Karıştırma Tekniği ile Üretilmiş Lizozim İçeren Zein Filmlerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi için Katı Besiyerinde Gerçekleştirilen Zon İnhibisyon Testleri.....	62
4.3. Üretilen Yenebilir Filmlerin Plastik Filmlerle Birleştirilmesi.....	66
4.3.1. Karıştırma Yöntemiyle Üretilmiş Zein Filmlerin Çift Yönlü Olarak Oriente Edilmiş Polipropilen Filmlerle Birleştirilmesi.....	66
4.3.2. Karıştırma Yöntemiyle Üretilmiş Zein Filmlerin Selüloz Asetat Filmlerle Birleştirilmesi.....	67
4.3.2.1. Karıştırma Yöntemiyle Üretilmiş Zein Filmlerin Selüloz Asetat Filmlerle Birleştirildikten Sonraki Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi için Katı Besiyerinde Gerçekleştirilen Zon İnhibisyon Testleri.....	68
4.4. Üretilen Yenebilir Filmlerin Gıdalara Uygulanması.....	69
4.4.1. Taze Kalamar Halkalarının Laktoperoksidaz İçeren Alginat Filmlerle Kaplanması.....	69
4.4.2. Kuşbaşı Etlerin Laktik Asit Bakterisi İçeren Alginat Filmlerle Kaplanması.....	70
4.4.3. Dana ve Hindi Burgerlerin Lizozim İçeren Zein Filmlerle Kaplanması.....	74
4.4.3.1. Dana Burgerlerle İlgili Sonuçlar.....	74
4.4.3.2. Hindi Burgerlerle İlgili Sonuçlar.....	81
5. Sonuç.....	85
Kaynaklar.....	86

## TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1.	Reaksiyon karışımlarının içerikleri.....	38
Tablo 4.2.	Laktoperoksidaz (LPS) içeren alginat filmlerden elde edilmiş disklerin sabit tiyosiyanat, değişken H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> konsantrasyonlarında <i>E. coli</i> üzerindeki antimikrobiyal etkisi.....	39
Tablo 4.3.	Laktoperoksidaz (LPS) içeren alginat filmlerden elde edilmiş disklerin değişken tiyosiyanat, sabit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> konsantrasyonlarında <i>E. coli</i> üzerindeki antimikrobiyal etkisi.....	40
Tablo 4.4.	Laktoperoksidaz (LPS) içeren alginat filmlerden elde edilmiş disklerin sabit tiyosiyanat, değişken H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> konsantrasyonlarında <i>L. innocua</i> üzerindeki antimikrobiyal etkisi.....	42
Tablo 4.5.	Laktoperoksidaz (LPS) içeren alginat filmlerden elde edilmiş disklerin değişken tiyosiyanat, sabit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> konsantrasyonlarında <i>L. innocua</i> üzerindeki antimikrobiyal etkisi.....	43
Tablo 4.6.	Laktoperoksidaz (LPS) içeren alginat filmlerden elde edilmiş disklerin sabit tiyosiyanat, değişken H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> konsantrasyonlarında <i>P. fluorescens</i> üzerindeki antimikrobiyal etkisi.....	44
Tablo 4.7.	Laktoperoksidaz (LPS) içeren alginat filmlerden elde edilmiş disklerin değişken tiyosiyanat, sabit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> konsantrasyonlarında <i>P. fluorescens</i> üzerindeki antimikrobiyal etkisi.....	45
Tablo 4.8.	<i>L. casei</i> ve <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 'nin 37°C'da 24 saat inkübasyon sırasında ürettikleri H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarları ve kültürlerin optik yoğunluklarındaki değişim.....	47
Tablo 4.9.	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 'nin farklı depolama sıcaklıklarındaki H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve laktik asit üretim yeteneği ve pH değerinin değişimi.....	49
Tablo 4.10.	<i>L. plantarum</i> 'un farklı depolama sıcaklıklarındaki H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve laktik asit üretim yeteneği ve pH değerinin değişimi.....	50
Tablo 4.11.	Farklı miktarlarda <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> içeren alginat filmlerde serbest ve immobilize bakteri sayıları.....	52
Tablo 4.12.	Farklı miktarlarda <i>L. plantarum</i> içeren alginat filmlerde serbest ve immobilize bakteri sayıları.....	52
Tablo 4.13.	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> içeren depolanmış alginat çözeltilerinden elde edilmiş filmlerdeki serbest ve immobilize bakteri sayıları.....	53
Tablo 4.14.	<i>L. plantarum</i> içeren depolanmış alginat çözeltilerinden elde edilmiş filmlerdeki serbest ve immobilize bakteri sayıları.....	53
Tablo 4.15.	Soğukta depolanan farklı miktarlarda <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	

	içeren toz haldeki alginik asit karışımındaki laktik asit bakteri sayıları.....	53
Tablo 4.16.	Soğukta depolanan farklı miktarlarda <i>L. plantarums</i> içeren toz haldeki alginik asit karışımındaki laktik asit bakteri sayıları.....	54
Tablo 4.17.	Laktoperoksidaz (LPS) içeren alginat filmlerden hazırlanmış disklerin tiyosiyanat ve hidrojen peroksit bulunan reaksiyon karışımlarında <i>E. coli</i> üzerindeki antimikrobiyal etkisi.....	54
Tablo 4.18.	Laktoperoksidaz (LPS) ve <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> içeren alginat filmlerden hazırlanmış disklerin tiyosiyanat ve hidrojen peroksit bulunan reaksiyon karışımlarında <i>E. coli</i> üzerindeki antimikrobiyal etkisi.....	56
Tablo 4.19.	Laktoperoksidaz (LPS) ve <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> içeren alginat filmlerden hazırlanmış diskler, tiyosiyanat, hidrojen peroksit ve <i>E. coli</i> bulunan reaksiyon karışımında <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> sayısının değişimi.....	56
Tablo 4.20.	Lizozim içeren zein filmlerden salınan toplam aktiviteler ve salım deneyi ardından filmlerdeki immobilize lizozim aktiviteleri.....	61
Tablo 4.21.	Lizozim içeren homojenizasyon ve karıştırma tekniğiyle üretilmiş zein filmlerin sıvı ortamda <i>B. amyloliquefaciens</i> üzerindeki antimikrobiyal etkisi.....	62
Tablo 4.22.	Farklı konsantrasyonlarda lizozim enzimi ve/veya Na <sub>2</sub> EDTA içeren homojenizasyon ve karıştırma tekniği ile üretilmiş zein filmlerin antimikrobiyal etkisi.....	63
Tablo 4.23.	Farklı konsantrasyonlarda lizozim enzimi ve/veya Na <sub>2</sub> EDTA içeren homojenizasyon ve karıştırma tekniği ile üretilmiş zein filmlerin antimikrobiyal etkisi.....	66
Tablo 4.24.	Selüloz asetatla birleştirilmiş kısmi saflaştırılmış lizozim enzimi içeren zein filmlerin antimikrobiyal etkisi.....	69
Tablo 4.25.	Dana burgerlerin depolama sırasındaki toplam canlı mikroorganizma sayıları.....	75
Tablo 4.26.	Dana burgerlerin depolama sırasındaki koliform sayıları.....	76
Tablo 4.27.	Hindi burgerlerin depolama sırasındaki toplam canlı mikroorganizma sayıları.....	82
Tablo 4.28.	Hindi burgerlerin depolama sırasındaki koliform sayıları.....	83



## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1.	Üst ve alt yüzeyleri zein filmle kaplanmış burgerler.....	34
Şekil 3.2.	Su buharı geçirgenliği deneyi için kullanılan deney düzeneği.....	35
Şekil 4.1.	Farklı H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> konsantrasyonlarında belirlenen immobilize laktoperoksidaz enzim aktivitesi.....	37
Şekil 4.2.	Sabit tiyosiyanat, değişken H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> konsantrasyonlarına sahip reaksiyon karışımlarında laktoperoksidaz sisteminin <i>E. coli</i> üzerindeki antimikrobiyal etkisi.....	39
Şekil 4.3.	Değişken tiyosiyanat, sabit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> konsantrasyonlarına sahip reaksiyon karışımlarında laktoperoksidaz sisteminin <i>E. coli</i> üzerindeki antimikrobiyal etkisi.....	40
Şekil 4.4.	Sabit tiyosiyanat, değişken H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> konsantrasyonlarına sahip reaksiyon karışımlarında laktoperoksidaz sisteminin <i>L. innocua</i> üzerindeki antimikrobiyal etkisi.....	42
Şekil 4.5.	Değişken tiyosiyanat, sabit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> konsantrasyonlarına sahip reaksiyon karışımlarında laktoperoksidaz sisteminin <i>L. innocua</i> üzerindeki antimikrobiyal etkisi.....	43
Şekil 4.6.	Sabit tiyosiyanat, değişken H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> konsantrasyonlarına sahip reaksiyon karışımlarında laktoperoksidaz sisteminin <i>P. fluorescens</i> üzerindeki antimikrobiyal etkisi.....	45
Şekil 4.7.	Değişken tiyosiyanat, sabit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> konsantrasyonlarına sahip reaksiyon karışımlarında laktoperoksidaz sisteminin <i>P. fluorescens</i> üzerindeki antimikrobiyal etkisi.....	46
Şekil 4.8.	<i>L. casei</i> 'nin 37°C'daki mikrobiyal gelişimi.....	47
Şekil 4.9.	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 'nin 37°C'daki mikrobiyal gelişimi.....	48
Şekil 4.10.	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 'in 4°C'daki mikrobiyal gelişimi.....	49
Şekil 4.11.	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 'in 23°C'daki mikrobiyal gelişimi.....	49
Şekil 4.12.	<i>L. plantarum</i> 'un 4°C'daki mikrobiyal gelişimi.....	50
Şekil 4.13.	<i>L. plantarum</i> 'un 23°C'daki mikrobiyal gelişimi.....	50
Şekil 4.14.	Homojenizasyon (A) ve karıştırma (B) tekniği ile üretilmiş farklı zein filmlerin fotoğrafları.....	58
Şekil 4.15.	Farklı miktarlarda lizozim içeren zein filmlerden 4°C'deki destile su içerisine lizozim salımı.....	60
Şekil 4.16.	Salım testinden sonra 350 µg/cm <sup>2</sup> lizozim içeren zein filmde immobilize lizozim aktivitesinin belirlenmesi (Homojenizasyon tekniği).....	60
Şekil 4.17.	Salım testinden sonra 350 µg/cm <sup>2</sup> lizozim içeren zein filmde	

	immobilize lizozim aktivitesinin belirlenmesi (Karıştırma tekniği).....	61
Şekil 4.18.	Homojenizasyon tekniği ile üretilmiş zein filmlerin <i>B. amyloliquefaciens</i> üzerindeki antimikrobiyal etkisi.....	64
Şekil 4.19.	Homojenizasyon (A) ve karıştırma (B) tekniği ile üretilmiş zein filmlerin <i>E. coli</i> O157:H7 üzerindeki antimikrobiyal etkisi.....	65
Şekil 4.20.	Homojenizasyon (A) ve karıştırma (B) tekniği ile üretilmiş zein filmlerin <i>S. Typhimurium</i> üzerindeki antimikrobiyal etkisi.....	65
Şekil 4.21.	Zein filmlerin BOPP filmlerin yüzeyine kaplanarak çok katlı film üretimi.....	67
Şekil 4.22.	Zein filmle birleştirilmiş selüloz asetat filmin görünüşü.....	68
Şekil 4.23.	Selüloz asetat ve 350 µg/cm <sup>2</sup> lizozim içeren zein filmin taramalı elektron mikroskobu ile yüzey kesit alanı görüntüsü.....	68
Şekil 4.24.	Laktoperoksidaz içeren alginat filmle kaplanmış kalamar halkalarının depolama sırasındaki mikrobiyal yük değişimi.....	70
Şekil 4.25.	Kaplanmamış, laktik asit bakterisi içermeyen alginat filmle kaplanmış ve iki farklı laktik asit bakterisi içeren alginat filmlerle kaplanmış kuşbaşı et örneklerinin 14 günlük depolama sırasındaki resimleri.....	71
Şekil 4.26.	Depolama sırasında kuşbaşı et örneklerinin L* değerleri.....	72
Şekil 4.27.	Depolama sırasında kuşbaşı et örneklerinin a*/b* değerleri.....	72
Şekil 4.28.	Farklı laktik asit bakterileri içeren alginat filmlerle kaplanmış et örneklerinde 4°C'da depolama sırasında laktik asit bakterisi sayısındaki değişim.....	74
Şekil 4.29.	Homojenizasyon tekniği ile üretilmiş zein filmlerle kaplanmış dana burgerlerin depolama sırasındaki toplam canlı mikroorganizma sayımları.....	75
Şekil 4.30.	Karıştırma tekniği ile üretilmiş zein filmlerle kaplanmış dana burgerlerin depolama sırasındaki toplam canlı mikroorganizma sayımları.....	76
Şekil 4.31.	Homojenizasyon tekniği ile üretilmiş zein filmlerle kaplanmış dana burgerlerin depolama sırasındaki koliform sayımları.....	77
Şekil 4.32.	Karıştırma tekniği ile üretilmiş zein filmlerle kaplanmış dana burgerlerin depolama sırasındaki koliform sayımları.....	77
Şekil 4.33.	Soğukta depolanan dana burgerlerin oksidasyon durumları.....	78
Şekil 4.34.	Zein filmlerin ve 700 µg/cm <sup>2</sup> lizozim+300 µg/cm <sup>2</sup> Na <sub>2</sub> EDTA içeren filmlerin su buharı geçirgenlikleri.....	79
Şekil 4.35.	Kaplanmamış, homojenizasyon ve karıştırma tekniği ile üretilmiş kontrol, 300 µg/cm <sup>2</sup> Na <sub>2</sub> EDTA ve 700 µg/cm <sup>2</sup> lizozim+300 µg/cm <sup>2</sup> Na <sub>2</sub> EDTA içeren zein filmlerle kaplanmış dana burgerlerin 7 günlük depolama sırasındaki görünüşleri.....	80
Şekil 4.36.	Homojenizasyon [H] ve karıştırma tekniği [K] ile üretilmiş zein filmlerle	

	kaplanmış dana burgerlerin depolama sırasındaki L* değerleri.....	80
Şekil 4.37.	Homojenizasyon [H] ve karıştırma [K] tekniği ile üretilmiş zein filmlerle kaplanmış dana burgerlerin depolama sırasındaki a*/b* değerleri.....	81
Şekil 4.38.	Homojenizasyon tekniği ile üretilmiş zein filmlerle kaplanmış hindi burgerlerin depolama sırasındaki toplam canlı mikroorganizma sayımları.....	82
Şekil 4.39.	Karıştırma tekniği ile üretilmiş zein filmlerle kaplanmış hindi burgerlerin depolama sırasındaki toplam canlı mikroorganizma sayımları.....	83
Şekil 4.40.	Homojenizasyon tekniği ile üretilmiş zein filmlerle kaplanmış hindi burgerlerin depolama sırasındaki koliform sayımları.....	84
Şekil 4.41.	Karıştırma tekniği ile üretilmiş zein filmlerle kaplanmış hindi burgerlerin depolama sırasındaki koliform sayımları.....	84

## ÖZET

Gerçekleştirilmiş olan bu çalışma ile tarafımızdan sanayiye aktarılacak ve ekonomik olabilecek yöntemlerle üretilmiş olan lizozim ve laktoperoksidaz enzimleri kullanılarak antimikrobiyal etkisi olan yenebilir zein ve alginat filmler geliştirilmiş ve bunların etkileri *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus amyloliquefaciens* gibi bakteriler üzerinde test edilmiştir. Geliştirilmiş olan zein filmler hidrofobik yapılarıyla plastik filmlerle birleştirilmeye oldukça müsait olup zeinle kaplanmış selüloz asetat filmler lizozim kullanılarak antimikrobiyal film haline getirilmiştir. Alginat filmler ise özellikle laktik asit bakterilerinin ilave edilmesine ve soğukta depolanan et ürünlerinde sıcaklık derecesi yükselmesiyle devreye girecek biyokontrol sistemi oluşturulmasına müsaittirler. Nitekim alginat filmlere ilave edilen *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* bakterileri bu filmler içerisinde oldukça yüksek stabilite göstermişlerdir. Gerçekleştirilmiş olan gıda denemeleri sonucunda laktoperoksidaz içeren alginat filmler soğukta depolanan kalamarlar üzerinde, lizozim içeren zein filmler ise soğukta depolanan dana ve hindi burgerler üzerinde mikrobiyal yükü kontrol etmek amacıyla başarıyla kullanılmıştır. Laktik asit bakterisi içeren alginat filmler ise kuşbaşı şeklindeki etlerin kaplanması amacıyla kullanılmış ve bu üründe doğal olarak bulunan laktik asit bakterisi sayısını kayda değer şekilde artırmıştır. Ortama ilave edilmiş olan laktik asit bakterileri ürünün depolanması sırasında yeterli bir stabilite göstermiş ve arzulandığı gibi üreyerek ürünü bozmamıştır. Gerçekleştirilmiş olan bu çalışma ile aktif yenebilir filmlerin potansiyel uygulama alanları ile ilgili kayda değer bir bilgi birikimi oluşturulmuş ve istenildiği zaman uygulamaya aktarılacak muhafaza sistemleri geliştirilmiştir.

*Anahtar Kelimeler:* Yenebilir filmler, lizozim, laktoperoksidaz, laktik asit bakterileri, aktif paketleme

## ABSTRACT

In this study we have developed antimicrobial edible food packaging films by incorporating lysozyme and lactoperoxidase produced by using industrially scaleable and economic methods. The developed films were tested on different bacteria including *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus amyloliquefaciens*. With their hydrophobic nature, the developed antimicrobial zein films were quite compatible with plastic packaging materials. Thus, antimicrobial films were developed by coating of cellulose acetate films with lysozyme incorporated zein. On the other hand, alginate films were found suitable for incorporation of lactic acid bacteria since *Lactobacillus plantarum* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis* incorporated into these films showed good stability during cold storage. The films incorporated with lactic acid bacteria can be employed for developing a biocontrol system for temperature abuse in cold stored meat and meat products. The application of lactoperoxidase incorporated films on cold stored calamari and lysozyme incorporated zein films on cold stored beef and turkey burgers showed the good potential of these films to control microbial load of these products during cold storage. The lactic acid bacteria incorporated alginate films tested on beef cubes increased the number of lactic acid bacteria counts in this product without causing growth of bacteria but by maintaining their high numbers at the surface. The results of this study showed the good potential of various applications of active edible films and made a contribution to the scientific knowledge in this field. The antimicrobial systems developed in this project were quite applicable in the industry.

*Keywords:* Edible films, lysozyme, lactoperoxidase, lactic acid bacteria, active packaging

## 1. GİRİŞ

Aktif ambalajlama, tüketicinin raf ömrü süresince tazeliğini koruyan ve mikrobiyolojik açıdan güvenilir olan ürünlere olan talebini karşılamak amacıyla gıda teknolojisi, biyoteknoloji ve malzeme bilimlerinin ortak katkılarıyla geliştirilmiş bir ambalajlama tekniğidir. Aktif ambalajlama tekniğinde antimikrobiyal veya antioksidan maddeler yenebilir kaplamalara ve filmlere ilave edilerek ürünün güvenliği veya kalitesi artırılmakta ve raf ömrü uzatılabilmektedir. Özellikle son yıllarda tüketicilerin bilinçlenmesiyle antimikrobiyal kimyasallar yerine filmlerde antimikrobiyal etkisi olan doğal bileşiklerin (bakteriosinler ve enzimler gibi) kullanılması üzerinde yoğun çalışmalar yürütülmekte olup oldukça olumlu sonuçlar alınmaktadır. Yine kimyasal koruyucuların kullanımına karşı oluşan tüketici tepkileri sonucunda özellikle minimal işlem görmüş gıdalarda koruyucu kültürlerin kullanımına karşı da büyük bir ilgi oluşmuş ve biyoprezervasyon olarak adlandırılan bu tekniğin kullanılması bazı ülkelerde başlatılmış, bazılarında ise uygulama aşamasına gelmiştir. Örneğin Avustralya'da koruyucu kültürlerin tüketime hazır gıdalara ve pişirilip soğutulmuş saklanan gıdalara uygulanması başarıyla gerçekleştirilmiştir. Antilisteriyal ve antiklostriyal kültürler yoğurtlarda ve yarı-sert peynirlerde de kullanılmaktadırlar.

Yukarıda da belirtildiği üzere, günümüzde yapılan çalışmalarda antimikrobiyal etkisi olan farklı kimyasal veya biyolojik ajanlar çeşitli yenebilir filmlere ilave edilmiş ve bu filmlerin çeşitli ürünlerin raf ömrünü uzattığı tesbit edilmiştir. Bu projede laktoperoksidaz enzimi alginat filmlere ilave edilerek hidrojen peroksit ve potasyum tiyosiyanat varlığında laktoperoksidaz sisteminin aktive olmasıyla filmlerin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesine çalışılmıştır. Bunun yanısıra zein filmlere antimikrobiyal özelliğe sahip kısmi saflaştırılmış lizozim ilave edilerek Gram(+) ve Gram(-) patojenler ve bozulma yapan mikroorganizmalara karşı göstermiş olduğu antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir.

Bugüne kadar yürülen çalışmalarda görüldüğü üzere koruyucu kültürlerin yalnızca gıdalara ilave edilmesi üzerinde çalışılmış, ancak yenebilir filmlere ilavesiyle ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu projede, laktik asit bakterilerinden oluşan koruyucu kültürlerin yenebilir filmlere ilave edilmesi gerçekleştirilmiştir. Projede elde edilen antimikrobiyal etkisi belirlenmiş yenebilir filmlerin plastik ambalaj materyalleriyle kombine edilmesine yönelik çalışmalarda gerçekleştirilmiştir. Bu yolla yenebilir filmlerin kullanımının daha da yaygınlaştırılmasına ve fonksiyonel plastik kaplamaların kullanımının azaltılmasına olanak sağlanmış olacaktır. Geliştirilen alginat ve zein filmlerin gıdalara uygulanması üzerine yapılan çalışmalarda ise olumlu sonuçlar alınmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Son yıllarda tüm dünyada gıda güvenliğini ve raf ömrünü artırmak amacıyla gıdaların ambalajlanmasında aktif ambalajlama kullanılmaktadır. Bu teknikte amaçlanan fonksiyonu (antimikrobiyal ve/veya antioksidan etki vb. etkiler) sağlamak amacıyla farklı yöntemler kullanılmaktadır. Örneğin fonksiyonel ajanlar paketlemede kullanılan film içerisine katılabileceği gibi, filmin iç yüzeyinin fonksiyonel ajanı içeren bir tabakayla kaplanması da mümkündür. Ayrıca ambalaj içerisine istenilen fonksiyonu yerine getirecek ajanı içeren küçük paketçiklerin yerleştirilmesi şeklinde bir uygulama da oldukça yaygındır (QUINTAVALLA ve Vicini, 2002).

Aktif ambalajlama özellikle minimal işlem görmüş gıdalarda kullanılmakta olup bu tür gıdalarda en temel sorun patojen mikroorganizmaların oluşturduğu güvenlik riskidir. Patojen mikroorganizmaların gıdalara bulaşmasıyla gıda zehirlenmeleri meydana gelmektedir. Nitekim, T.C. Sağlık Bakanlığı istatistiklerine göre Türkiye'de 2001 yılında 7,875 kişi bakteri kaynaklı gıda zehirlenmesi teşhisiyle hastanede yatmış ve bu vakalardan 324'ü ölümlerle sonuçlanmıştır (ANON., 2004). Bunlar sadece kayıtlara geçen bilgiler olup, rapor edilenin yaklaşık 3-4 katı sayıda vakanın istatistiklere girmemiş olduğu tahmin edilmektedir. Gelişmiş ülkelerde de durum pek farklı değildir. Nitekim A.B.D.'de yılda 76 milyon kişi mikrobiyal patojenlerin neden olduğu gıda zehirlenmelerine maruz kalmakta ve bunlardan yaklaşık 5,200'i ölümlerle sonuçlanmaktadır (MEAD ve ark., 1999). Mikrobiyal bulaşma, gıda zehirlenmesi riskinin artmasına neden olduğu gibi ürünün raf ömrünü de kısaltmaktadır. Bulaşma genellikle gıda yüzeyinde meydana gelmekte olup aktif ambalajlama, bu tür bir sorunun önlenmesi için oldukça ümit vadeci bir yöntemdir (APPENDINI ve Hotchkiss, 2002).

Gıda ambalajlarında antimikrobiyal aktiviteyi sağlamak için çeşitli kimyasal ve biyolojik ajanlar test edilmiştir. Bu amaçla kullanılan başlıca kimyasallar sorbat, propionat ve benzoat gibi organik asitler, benomyl, kükürt dioksit ve imazalil gibi fungisitler, EDTA gibi çelat yapıcılar ve etanol gibi maddelerdir (APPENDINI ve Hotchkiss, 2002; SUPPAKUL ve ark., 2003). Ancak, özellikle son zamanlarda tüketicilerin sağlık endişeleri nedeniyle doğal yapıdaki antimikrobiyal maddelerin kullanımı büyük bir artış göstermiş ve bu konudaki hassasiyet artmıştır. Dolayısıyla nisin, pediosin ve laktisin gibi bakteriosinler; lizozim, laktoperoksidaz ve glukoz oksidaz gibi enzimler ve defensin, magainin ve cecropin gibi peptitlerin ambalaj materyallerine ilave edilmesi ile ilgili yoğun çalışmalar yürütülmektedir (APPENDINI ve Hotchkiss, 2002). Bu çalışmalarda doğal antimikrobiyallerin ilave edileceği ambalaj materyallerinin yine doğal olan protein veya karbonhidrat polimerlerinden yapılan

yenebilir filmler arasından seçilmesi üzerinde özellikle durulmaktadır. Bunun pek çok nedenleri bulunmakta olup bunlardan başlıcaları; plastik polimerlerin oluşturduğu sağlık endişeleri ve çevre kirliliğinin azaltılması ve yenebilir filme dönüştürülebilecek tarımsal ürünlerin ve bunların atıklarının değerlendirilebilmesidir (QUINTAVALLA ve Vicini, 2002). Bu şekilde doğal antimikrobiyal ajanlar içeren yenebilir filmler yürütülen laboratuvar çalışmalarında oldukça başarılı olmuş ve gıdaların mikrobiyal yükünü azaltabilmişlerdir. Örneğin, nisin veya pediosin içeren selüloz filmlerin hindi etine, sığır etine ve jambonlara uygulanması sonucunda *L. monocytogenes*'i tamamen yok ettiği belirlenmiştir (MING ve ark., 1997). Nisin ve lizozim içeren soya ve mısır proteinlerinden elde edilen yenebilir filmlerin *L. plantarum*'un gelişmesini engellediği de bilinmektedir (PADGETT ve ark., 2000). Bu tür filmler EDTA ilave edilmesiyle *E. coli*'nin gelişimini de engelleyebilmektedir (HOFFMAN ve ark., 2001).

Laktoperoksidaz enziminin filmlerde antimikrobiyal olarak kullanılması çalışmaları halen oldukça yenidir. Laktoperoksidaz sütlerde laktik asit bakterilerinin oluşturduğu hidrojen peroksiti kullanarak ortamda doğal olarak bulunan tiocyanat'ı güçlü antimikrobiyal etkiye sahip reaktif bileşiklere dönüştürerek bozulmayı geciktiren doğal bir koruma mekanizması oluşturmaktadır. Nitekim teknik ve/veya ekonomik nedenlerden dolayı soğutma sisteminin kullanılmasının mümkün olmadığı yerlerde sütlere bir miktar hidrojen peroksit ilave edilerek laktoperoksidaz sisteminin antimikrobiyal etkisinden yararlanılmaktadır (REITER, 1985). SEIFU ve ark. (2004) gerçekleştirdikleri çalışmada laktoperoksidaz sistemi ile korudukları süttten Gouda peyniri üretmişler ve 90 günlük olgunlaştırma süresinde peynirlerin biyokimyasal, mikrobiyolojik ve duysal özelliklerine bu sistemin etkisini incelemişlerdir. Bu araştırmacılar laktoperoksidaz sisteminin peynirlerde bulunan Gram(+) ve Gram(-) patojenlere karşı etkili olduğunu belirlemişlerdir. Laktoperoksidaz sistemi GRAS olarak kabul edilmekte ve doğal gıda koruyucusu olarak kullanılması önerilmektedir (ELLIOT ve ark., 2004).

Antimikrobiyal ambalajlamada kullanılan bir diğer antimikrobiyal enzim de lizozimdir. Bu enzim Gram(+) mikroorganizmaların hücre duvarını parçalayarak antimikrobiyal etki göstermektedir. Lizozim, Gram(-) mikroorganizmaların hücre duvarını tek başına parçalayamamakta, ancak buna karşın düşük konsantrasyonlarda EDTA gibi çelat yapıcılarla birlikte kullanıldığı zaman oldukça geniş bir antimikrobiyal etki göstermektedir. Lizozim enzim aktivitesi oldukça stabil olup özellikle son zamanlarda endüstriyel boyutlu üretimi ile ilgili başarılı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Dolayısıyla bu enzim antimikrobiyal etkili filmlerin üretimi ile ilgili çalışmalarının adeta gözdesi haline gelmiştir (BUONOCORE ve ark., 2003).



Doğal yapıdaki antimikrobiyal maddelerin yenebilir ambalaj maddeleriyle birleştirilmesi ile ilgili çalışmalar bir yandan yoğun olarak sürdürülürken, diğer yandan da koruyucu kültürlerin minimal işlem görmüş gıdalarda kullanılan muhafaza sistemlerine dahil edilmesi çalışmaları yürütülmektedir (RODGERS, 2003). Tüm bu çalışmaların hedefi, bu gıdaların tamamen olmasa da büyük ölçüde doğal ajanlarla muhafazasının sağlanması ve sağlık endişeleri yaratan kimyasalların kullanımının azaltılmasıdır. Ancak şu an için literatürde koruyucu kültürlerin yenebilir ambalaj materyallerine katılması ile ilgili herhangi bir veri bulunmamaktadır. Bilindiği üzere koruyucu kültürler gıdalara çoğunlukla sıvı veya toz formda püskürtme ile uygulanmaktadır (RODGERS, 2003). Bu işlem işletmelerde ayrı bir hat kurulması ve kültür hazırlık işlemleri gerektirdiğinden oldukça maliyetli ve nitelikli işgücü gerektiren bir işlemdir. Ancak yenebilir filmlerin kullanımı ve özellikle önceden dökülerek hazırlanmış koruyucu kültür içeren filmlerin temin edilmesi, bu işlem için herhangi bir altyapısı olmayan işletmelerin de biyoprezervasyonu kullanmasını mümkün kılacaktır. İşte bu nedenden dolayı laktik asit bakterilerinin özellikle et ve et ürünlerine sıvı kültür yerine yenebilir filmlerle uygulanmasının sanayide daha ekonomik, pratik ve yaygın olarak kullanılabilecek yeni bir uygulama başlatacağı umulmaktadır. Koruyucu kültür denince akla ilk gelen mikroorganizmalar laktik asit bakterileridir. Laktik asit bakterileri antimikrobiyal etkilerini gıdanın mikroflorasına hakim olarak patojenlere üreme fırsatı vermemelerine ve gelişmeleri sırasında oluşturdukları antimikrobiyal etkiye sahip laktik asit, bakteriosinler ve hidrojen peroksit gibi metabolitlere borçludurlar (JARONI ve Brashears, 2000; RODGERS, 2004). Ayrıca koruyucu kültür içeren gıdalarda raf ömrü sonunda veya depolama sırasında sıcaklıkta oluşan istenmeyen ani bir yükselme sonucunda meydana gelen bozulma, insan sağlığı açısından herhangi bir risk oluşturmayan laktik asit bakterilerince gerçekleştirilmekte ve patojenlerin gıdalarda gelişerek risk oluşturmaları engellenmektedir (RODGERS, 2004).

Yenebilir filmlerin plastik ambalaj materyallerinin yüzeyine laminasyon veya kaplama tekniği kullanılarak uygulanması da son yıllarda artış göstermiştir. Bilindiği üzere halen fonksiyonel ajanlar ya direk olarak plastik filmler içerisine ilave edilmekte ya da plastik film yüzeyi fonksiyonel ajanı içeren başka bir plastik materyalle kaplanmakta veya lamine edilmektedir (APPENDINI ve Hotchkiss, 2002). Ancak aşırı hidrofobik yapıları nedeniyle plastik filmlere birçoğu hidrofilik olan biyoprezervatiflerin katılması genellikle filmin mekanik ve geçirgenlik özelliklerinde istenmeyen değişimlere neden olmaktadır (BOUNOCORE ve ark., 2003). Ayrı bir plastik film tabakası uygulanması ise plastik kullanımını artırmakta ve çevresel problemlere neden olabilmektedir. Plastik filmlere biyoprezervatiflerin direk olarak katılmasını zorlaştıran bir diğer husus da bu materyallerin işlenmesi sırasında uygulanan ekstrüzyon ve

erimiş halde injeksiyon gibi termal işleme yöntemlerinin protein yapısındaki biyoprezervatifleri inaktive etmesidir (HAN, 2000). Bilindiği üzere yenebilir filmlerin birçoğu oda sıcaklığında hazırlanabilmekte ve doğal yapıları nedeniyle biyolojik olarak parçalanabilir olduklarından çevresel sorunlara yol açmamaktadırlar. Dolayısıyla üretilen filmlerin plastik filmlere uygulanmasıyla plastik filmlerle biyoprezervatiflerin birarada kullanımı ile ilgili sorunların aşılacağı düşünülmektedir. HONG ve ark. (2005) tarafından yürütülen bir çalışmada polipropilen filmler metil selüloz, hidroksipropil metil selüloz, kitosan,  $\kappa$ -karragenan ve dekstrin gibi polisakkaritlerle kaplanmışlardır. Kitosan ve  $\kappa$ -karragenan ile kaplanan filmlerde saydamlık, gerilme şiddeti, uzama yüzdesi daha yüksek sonuç vermiştir. Nisin ilave edilmiş  $\kappa$ -karragenan-polipropilen filmler *Lactobacillus plantarum*'un gelişimini engellemiştir.

Bu projenin amaçları; (a) laktoperoksidaz, lizozim gibi doğal antimikrobiyal enzimlerin ve koruyucu kültürlerin (laktik asit bakterilerinin) yine doğal olan protein veya karbonhidrat yapısındaki yenebilir filmlere ilave edilmesi, (b) geliştirilen filmlerin Gram(+) ve Gram(-) patojenler ve bozulma yapan mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi, (c) geliştirilen filmlerin plastik ambalaj materyalleri ile birleştirilmesi, ve (d) bu filmlerin su ve et ürünlerine uygulanarak ürünlerin mikrobiyal yüklerindeki ve kalitelerindeki değişikliklerinin belirlenmesidir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Gereçler

Projede geliştirilen yenebilir filmlere ilave etmek amacıyla *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *lactis* (NRRL B-4525) ve *Lactobacillus casei* (NRRL B-441) bakterileri, elde edilen filmlerin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi deneylerinde kullanmak amacıyla da *Escherichia coli* (NRRL B-3008), *Pseudomonas fluorescens* (NRRL B-253), *Listeria innocua* (NRRL B-33314), *Staphylococcus carnosus* (NRRL B-14760), ve *Bacillus amyloliquefaciens* (NRRL NRS-762) Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı Mikrobiyal Genomik ve Biyoproses Araştırma Biriminden (United States Department of Agriculture, Microbial Genomics and Bioprocessing Research Unit, Peoria, Illinois) temin edilmiştir. Bu bakterilere ek olarak *Lactobacillus plantarum* (DSM NR 1954) İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Gıda Mühendisliği Bölümünden, *Staphylococcus aureus* (RSKK No. 95047) İzzet Baysal Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünden Doç.Dr. Gülsün Evrendilek'ten, *Salmonella Typhimurium* (CCM 5445) ve *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 700728) ise İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Gıda Mühendisliği Bölümünden Uzman Dr. A. Handan Baysal'dan temin edilmiştir.

Projede kullanılan potasyum tiyosiyanat Sigma-Aldrich'den (Stenheim, Almanya), toyopearl sulphopropyl cation-exchanger (SP-550C, 100 µm) Supelco'dan (Bellefonte, PA, ABD), diyaliz tübü (cut off: 1200 MW), dekstran, ABTS (2,2-Azino-bis-(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonik asit), zein ve alginik asit Sigma'dan (St. Louis, MO, ADB), rennet ICN Biomedicals Inc.'den (Aurora, Ohio, ABD) satın alınmıştır. Mikrobiyolojik analizler için kullanılan nutrient agar (NA), DeMan, Rogosa ve Sharp (MRS) agar, plate count agar (PCA), violet red bile agar (VRBA), pepton ve tween 80 Fluka'dan (İspanya), nutrient broth, sorbitol MacConkey agar (SMAG), Oxford Listeria selective agar ile supplementi ve MRS broth ise Merck'den (Almanya) satın alınmıştır. Üretilen yenebilir filmlerin plastik filmlerle birleştirilmesi amacıyla kullanılan çift yönlü oriente edilmiş polipropilen filmler Bak Ambalaj Sanayii ve Ticaret A.Ş. (İzmir)'den temin edilmiştir. Gıda denemelerinde kullanılan kontrofile dana eti ile dana ve hindi burgerler Pınar Entegre Et ve Un Sanayii A.Ş. (İzmir)'den temin edilmiştir.

## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1. Çalışmada Kullanılan Test Mikroorganizmalarının ve Laktik Asit Bakterilerinin Kullanıma Hazırlanması

Temin edilen kültürler stok kültür hazırlanana kadar +4°C'da muhafaza edilmiş daha sonra da uygun besiyerleri kullanılarak aktive edilmiş ve stok kültüre ve eğik agara aktarılmıştır. Stok kültürler -80°C'da, eğik agarlar ise +4°C'da muhafaza edilmişlerdir. Eğik agara alınan kültürler her ay canlılıklarını yitirmemeleri amacıyla yeniden steril eğik agarlara aktarılmışlardır.

### 3.2.2. Alginat Filmlerle İlgili Çalışmalar

#### 3.2.2.1. Laktoperoksidaz İçeren Alginat Filmlerle İlgili Çalışmalar

##### 3.2.2.1.1. Laktoperoksidaz Üretimi

Laktoperoksidaz üretimi amacıyla YE ve ark. (2000) tarafından uygulanmış olan yöntem küçük modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır. Bu amaçla öncelikle 1 L kadar inek sütü 5000g ve 30°C'da 20 dakika santrifüjlenmiş ve yağsız süt üretilmiştir. Elde edilen 900 mL kadar yağsız süt tülbentten süzülükten sonra sıcaklığı 37°C'a getirilmiş ve içerisine 90 mg rennet ilave edilmiştir. 37°C'da 1 saat inkübasyon sonrasında kesilen süt içerisindeki pıhtı ve tortular önce tülbentten süzülerek, ardından da 10000g ve 4°C'da 25 dakika santrifüjlenerek ayrılmıştır. Elde edilen peyniraltı suyu daha sonra bekletmeden önceden 0.05 M Na-fosfat tamponu (pH 6.5) ile dengeye getirilmiş olan Toyopearl-SP kolonuna (11.5 cm yükseklik, 2.8 cm çap) yüklenmiş ve 500 mL kadar aynı tamponla yıkanmıştır. Kolonun elüsyonu 600 mL Na-fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış NaCl çözeltisi ile tuz konsantrasyonu 0-0.55 M olacak şekilde ve doğrusal bir gradient uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Kolondan toplanan 10'ar mL lik fraksiyonlar protein miktarının belirlenmesi amacıyla 280 nm'deki absorbans ölçümüne tabi tutulmuş ve laktoperoksidaz aktiviteleri bölüm 3.2.2.1.2.'de belirtilen reaksiyon karışımı kullanılarak ancak kalitatif olarak belirlenmiştir. Laktoperoksidaz aktivitesi içerdiği belirlenmiş olan fraksiyonlar daha sonra birleştirilmiş ve 24 saat boyunca 4°C'da diyaliz edildikten sonra (3 x 2000 mL destile suya karşı) içerisine 250-300 mg kadar dekstran destek maddesi olarak ilave edilerek liyofilize edilmişlerdir. Liyofilizasyon (Labconco, FreeZone 6 litre, Kansas, MO, USA cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiş) sırasında çalışma sıcaklığı -44 ile -47°C, basıncı ise  $50 \times 10^{-3}$  ile  $100 \times 10^{-3}$  mBar arasında değişmiştir. Liyofilizasyonun ardından beyaz bir toz haline gelmiş olan preparatın aktivitesi U/mg olarak belirlenmiş ve renkli şişeler içerisine konduktan sonra -18°C'da depolanmıştır.

#### **3.2.2.1.2. Laktoperoksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi**

Laktoperoksidaz aktivitesi spektrofotometrik olarak 412 nm'de ve 30°C sabit sıcaklıkta belirlenmiştir. Reaksiyon karışımının oluşturulması için önceden 30°C'a getirilmiş olan 2.3 mL, 0.1 M Na-fosfat tamponu (pH 6.0) içerisinde hazırlanmış 0.65 mM ABTS çözeltisi, 0.1 mM enzim çözeltisi ve 0.1 mL, 0.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımının absorbansında laktoperoksidazın ABTS'i okside etmesine bağlı olarak oluşan mavi rengin neden olduğu absorbans artışı 2 dakika boyunca kaydedilmiş ve enzim aktivitesi bu absorbans değerlerinin süreye karşı işlenmesi ile elde edilen kurvenin başlangıç doğrusal kısmının eğiminden hesaplanmıştır. Enzim aktivitesi Unite (absorbans değerinde dakikadaki 0.001 değişim) olarak hesaplanmıştır.

#### **3.2.2.1.3. Alginat Film Üretimi**

Alginat filmlerin hazırlanması amacıyla %2'lik alginik asit çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltinin yavaşça karıştırılması sırasında ortama belli miktarlarda laktoperoksidaz ve/veya *L. delbrueckii* subsp. *lactis* preparatı ilave edilmiştir. Ortama ilave edilen biyoprezervatifin ve bakteri preparatının tam olarak çözünmesinden sonra film hazırlama çözeltisinden 10 g, 9.5 mm çapındaki cam Petri kabı içerisine dikkatlice yayılmıştır. Bu şekilde hazırlanmış Petri kapları oda sıcaklığında 3 gün kadar kurutulmuş ve daha sonra üzerlerine çapraz bağlama amacıyla 0.8 mL, 0.3 M CaCl<sub>2</sub> çözeltisi pipetlenmiştir. Bu aşamadan sonra filmler aşırı CaCl<sub>2</sub>'ün uzaklaşması amacıyla 50 mL steril destile su içerisinde 30 saniye yıkanmışlar ve antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılmışlardır.

#### **3.2.2.1.4. Laktoperosidaz İçeren Alginat Filmlerden Laktoperoksidazın Salım Testleri ve Filmlerde Bulunan İmmobilize Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi**

Filmler, alginat film çözeltisinin içerisine 900 U/cm<sup>2</sup> enzim aktivitesi olacak şekilde laktoperoksidaz ilave edilerek hazırlanmıştır. Filmlerde salım testleri soğutmalı inkübatörde 4°C'da su içerisinde gerçekleştirilmiştir. Denemeler sırasında filmler (10 cm çapında) 50 mL destile su (4°C) bulunan cam Petri kaplarının içerisine yerleştirilmişlerdir. Petri kaplarının üstü nem kaybını sınırlamak için streç filmle kaplandıktan sonra cam kapakları ile de kapatılmış ve 24 saat boyunca ortam 200 rpm hızında manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır. Bu sırada ortamdan farklı süreler sonunda 0.2 mL örnek alınarak çözünür laktoperoksidaz bulunup bulunmadığı aktivite tayini gerçekleştirilerek izlenmiştir. Aktivite tayini amacıyla, 0.2 mL örnek, 2.2 mL 0.65 mM ABTS ve 0.1 mL 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltileri ile karıştırılmış ve spektrofotometrede (Shimadzu, model 2450, Tokyo, Japonya) 412 nm'de absorbans artışları ölçülmüştür.

Alginat filmlerde bulunan immobilize laktoperoksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi için 900 U/cm<sup>2</sup> enzim aktivitesine sahip alginat filmler hazırlanmış ve 0.8 mL CaCl<sub>2</sub> ile çapraz bağlandıktan sonra 10 mL destile suyla 15 saniye yıkanmıştır. Filmler daha sonra tam ortadan ikiye bölünmüş ve herbir parça 23 mL, 0.65 mM ABTS çözeltisi ve 2 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bulunan Petri kaplarına koyulmuştur. Aktiviteler 200, 400 veya 800 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bulunan ortamlarda her konsantrasyonda 3 farklı filmle ikişer kez ölçüm yapılarak belirlenmiştir. Ölçümler 30°C sabit sıcaklıkta ve reaksiyon karışımları 200 rpm'de sürekli karıştırılarak gerçekleştirilmiştir. Aktiviteden kaynaklanan absorbans ölçümleri spektrofotometrede belirli aralıklarla 15 dakika boyunca 412 nm'de gerçekleştirilmiştir. Aktivitenin hesaplanması amacıyla ölçülen absorbans değerleri linear bir kurvenin y-eksenine, ölçüm süresi ise x-eksenine işlenmiş ve elde edilen kurvenin başlangıç doğrusal kısmının eğimi belirlenmiştir. Bu aşamadan sonra aktiviteler U/cm<sup>2</sup> olarak hesaplanmıştır (1 dakikada 0.001 absorbans değişimi 1 Unite olarak kabul edilmiştir).

#### **3.2.2.1.5. Laktoperoksidaz İçeren Alginat Filmlerin *Escherichia coli* Üzerindeki Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi Amacıyla Yürütülen İnhibisyon Testleri**

Laktoperoksidaz enzimi içeren alginat filmlerin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi amacıyla *Escherichia coli* (NRRL B-3008) bakterisi 37°C'da nutrient broth (Fluka, Spain) içerisinde bir gece geliştirilmiştir. Denemeler iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiş ve öncelikle sabit potasyum tiyosiyanat konsantrasyonu (4000 µM) ve 200, 400 ve 800 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Daha sonraki aşamada ise sabit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunda (200 µM) ve 1000 ve 2000 µM potasyum tiyosiyanat konsantrasyonlarında deneyler tekrarlanmıştır. Denemelerin ilk aşamasında filmlerin antimikrobiyal aktivitesinin test edileceği reaksiyon karışımları 0.5 mL *E. coli* kültürü, 3 mL nutrient broth sıvı besiyeri, alginat filmlerden hazırlanmış disk (1.3 cm çapında), 0.1 mL 4000 µM potasyum tiyosiyanat ve 0.1 mL 200, 400 veya 800 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içerecek şekilde hazırlanmıştır. İkinci aşamada ise reaksiyon karışımına ilave edilen bileşenlerin hacimleri aynı kalmak koşuluyla *E. coli* kültürü, sıvı besiyeri, alginat filmlerden hazırlanmış disk, 1000 veya 2000 µM potasyum tiyosiyanat ve 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren reaksiyon karışımları kullanılmıştır. Bu şekilde bir çalışmanın amacı hiç şüphesiz kullanılmakta olan antimikrobiyal mekanizmanın etki sınırlarının daha ayrıntılı olarak belirlenmesidir. Karışımların oluşturulması ve reaksiyonların başlatılmasıyla derhal 0 zamanı ekimleri yapılmış ve karışımların başlangıç bakteri sayıları belirlenmiştir. Ardından karışımlar 37°C'da inkübatöre yerleştirilmiş ve 6. ve 24. saatlerde bunlardan yeniden ekimler gerçekleştirilerek laktoperoksidaz-tiyosiyanat-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sisteminin zaman içerisinde bakteri sayısını nasıl etkilediği incelenmiştir. Ekimler sırasında tüm dilüsyonlar % 0.1 peptonlu su ile hazırlanmış ve ekimler için nutrient agar (Fluka, Spain) kullanılmıştır. Petri kapları 37°C'da 24

saat süre ile inkübe edilmiş ve sayımlar  $\log_{10}$  cfu/mL olarak verilmiştir. Kontrol olarak (1) yalnızca *E. coli* kültürü ve besiyeri içeren tüp; (2) *E. coli* kültürü, besiyeri ve enzim içermeyen alginat filmden hazırlanmış diskler içeren tüp; (3) *E. coli* kültürü, besiyeri, enzim içeren alginat filmden hazırlanmış diskler ve tiyosiyanat içeren tüp kullanılmıştır. Ayrıca, tüm tüplerin hacimlerini eşitlemek amacıyla  $H_2O_2$  ilave edilmeyen tüplere 0.1 mL steril deionize su, tiyosiyanat ve  $H_2O_2$  ilave edilmeyen tüplere ise 0.2 mL steril deionize su ilave edilmiştir.

#### **3.2.2.1.6. Laktoperoksidaz İçeren Alginat Filmlerin *Listeria innocua* Üzerindeki Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi Amacıyla Yürütülen İnhibisyon Testleri**

Laktoperoksidaz enzimi içeren alginat filmlerin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi amacıyla *Listeria innocua* (NRRL B-33314) kullanılmıştır. Bu amaçla tüm denemeler aynen *E. coli*'de uygulanan koşullarda tekrarlanmış, yalnızca *L. innocua* sayılarının belirlenmesinde % 0.1 peptonlu su ile hazırlanmış olan dilüsyonlar için nutrient agar içeren Petri kapları 37°C'da 48 saat inkübe edilmişlerdir. Sayımlar  $\log_{10}$  cfu/mL olarak verilmiştir.

#### **3.2.2.1.7. Laktoperoksidaz İçeren Alginat Filmlerin *Pseudomonas fluorescens* Üzerindeki Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi Amacıyla Yürütülen İnhibisyon Testleri**

Laktoperoksidaz enzimi içeren alginat filmlerin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi amacıyla *Pseudomonas fluorescens* (NRRL B-253) kullanılmıştır. Bu amaçla tüm denemeler aynen *E. coli*'de uygulanan koşullarda tekrarlanmış, yalnızca *P. fluorescens* sayılarının belirlenmesinde % 0.1 peptonlu su ile hazırlanmış olan dilüsyonlar için nutrient agar içeren Petri kapları 26°C'da 48 saat inkübe edilmişlerdir. Sayımlar  $\log_{10}$  cfu/mL olarak verilmiştir.

#### **3.2.2.2. Laktik Asit Bakterisi İçeren Alginat Filmlerle İlgili Çalışmalar**

Laktik asit bakterisi içeren alginat filmlerin üretimi için öncelikle  $H_2O_2$  ve laktik asit üretme yetenekleri yüksek olan suşlar seçilmiştir. Öncelikle  $H_2O_2$  üretme yeteneği olan bakterinin seçilmesi için gerekli testler yapılmıştır.

##### **3.2.2.2.1. Film Üretiminde Kullanılmak Üzere Seçilmiş Laktik Asit Bakterilerinin Hidrojen Peroksit Üretme Yeteneklerinin Test Edilmesi**

Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) üretme yeteneği olduğu belirtilen *L. casei* ve *L. delbrueckii* subsp. *lactis*' in gerçekten bu kimyasalı üretip üretmedikleri test edilmiştir. Buna göre öncelikle *L. casei* ve *L. delbrueckii* subsp. *lactis* stok kültürlerinden 2'şer öze kültür alınarak 25 mL steril MRS broth'lara (Oxoid, Basingstoke, England) aktarılmış ve  $CO_2$ 'li (%5  $CO_2$  ve %50 RH) inkübatör içerisinde (Nuvaire, Plymouth, MN, USA) 37°C'de 24 saat inkübe edilmişlerdir.

İnkübasyon sonunda bu kültürlerden 1'er mL alınarak yeniden 90 mL steril MRS broth'a aktarılmış ve inkübasyon aynı koşullarda bir kez daha tekrar edilmiştir. Gerçekleştirilen bu ikinci inkübasyon sırasında 0, 4, 6, 9 ve 24. saatlerde kültürlerden aseptik koşullarda 0.1 mL örnek alınmış ve gelişme kurvelerinin elde edilmesi amacıyla MRS agar (Oxoid, Basingstoke, England) içeren Petri kaplarına yayma plaka yöntemiyle ekim yapılmıştır. Daha sonra sayım için Petri kapları 37°C'da 48 saat CO<sub>2</sub>'li inkübatörde inkübe edilmiş ve belirlenen koloni sayıları log<sub>10</sub> cfu/mL olarak rapor edilmiştir. Yine belirtilen süreler sonunda alınmış olan ayrı örneklerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarları yarı kantitatif test kağıtları (Quantofix Peroxide 100, Macherey-Nagel Co., Düren, Germany) ile belirlenmiştir. Kültürlerin inkübasyonu sırasında ayrıca belirli aralıklarla 650 nm'deki optik yoğunlukları spektrofotometre (Varian, Cary 100, Mulgrave, Australia) yardımıyla ölçülmüştür.

#### **3.2.2.2.2. Seçilmiş Olan *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ve *L. plantarum*'un H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve Laktik Asit Üretim Yeteneğinin Depolama Sıcaklıklarında Test Edilmesi**

Depolama sıcaklığı olarak buzdolabı sıcaklığı olan 4°C ve oda sıcaklığına oldukça yakın bir değer olan 23°C kullanılmıştır. *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ve *Lactobacillus plantarum* stok kültüründen 2 öze alınarak 25 mL steril MRS broth'lara (Oxoid) inoküle edilmiş ve 37°C'da CO<sub>2</sub> 'li inkübatörde 16 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Daha sonra bu besiyerlerinden 1'er mL alınarak 99 mL steril MRS broth içeren erlenlere aktarılmışlardır. *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ve *Lactobacillus plantarum* içeren erlenler 4°C ve 23°C'da 7 gün (168 saat) inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sırasında belirli aralıklarla pH değerleri, bakteri sayıları, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı ve laktik asit miktarları (D ve L ayrı ayrı) belirlenmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarları ve bakteri sayıları daha önce yukarıda belirtilmiş yöntemler kullanılarak (Bölüm 3.2.2.2.1.), D ve L laktik asit miktarları ise enzimatik yöntemle özel kitler kullanılarak (Boehringer Mannheim / R-Biopharm GmbH, Mannheim, Germany) belirlenmiştir.

#### **3.2.2.2.3. *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ve *L. plantarum*'un Yenebilir Filmlere İlave Edilebilecek Liyofilize Preparat Haline Getirilmesi**

Stok kültür olarak -80°C'da depolanan *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ve *L. plantarum*'dan birer öze alınarak MRS broth'a aktarılmış ve inkübatörde 37°C'da 24 saat inkübe edildikten sonra buradan 10 mL alınarak yeniden 240 mL MRS broth'lara aktarılmışlardır. Yeni besiyerleri inkübatörde bir kez daha 37°C'da 16 saat inkübe edildikten sonra elde edilen kültürler 5000g'de ve 4°C'da 10 dakika santrifüj edilmişler ve hücreler çöktürülmüştür. Daha sonra çöktürülen hücreler 2 kez steril fizyolojik tuzlu su ile yıkanmış ve aynı koşullarda yeniden santrifüj edilmiştir. En sonunda toplanan hücreler %10 (w/v) yağsız süttezu ve % 7 sakkaroz (w/v) içeren ortamda süspanse hale getirilerek liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon (Labconco,



FreeZone 6 litre, Kansas, MO, USA cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiş) sırasında çalışma sıcaklığı -44 ile -47°C, basıncı ise  $50 \times 10^{-3}$  ile  $100 \times 10^{-3}$  mBar arasında değişmiştir. Elde edilen liyofilizatlar kullanılabildiği kadar -18°C'deki bir derin dondurucuda saklanmış ve film üretiminde kullanılacağı zaman içerdiği hücre sayısı her defasında kontrol edilmiştir. Bu amaçla preparat % 0.1 peptonlu su içerisinde süspansiyon edilmiş ve gerekli dilüsyonlar yapılarak MRS agar'da yayma plaka yöntemiyle daha önce belirtildiği şekilde ekim yapılarak hücre sayısı cfu/mg olarak belirlenmiştir.

#### **3.2.2.2.4. Laktik Asit Bakterisi İçeren Alginat Filmlerin Üretilmesi ve Bu Filmlerdeki Serbest ve İmmobilize Bakteri Sayılarının Belirlenmesi**

Laktik asit bakterisi içeren alginat filmlerin hazırlanması amacıyla % 2'lik alginik asit çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltinin yavaşça karıştırılması sırasında ortama belli miktarlarda (2-12 mg) liyofilize laktik asit bakterisi (*L. delbrueckii* subsp. *lactis* ve *L. plantarum*) ilave edilmiştir. Bu çözeltilerden 10 g alınarak steril cam Petri kaplarına (9.5 cm çapında) yayılmışlardır. Bu şekilde hazırlanmış Petri kapları oda sıcaklığında 1 saat kadar kurutulmuşlar ve daha sonra üzerilerine çapraz bağlama amacıyla 5 mL, 0.3 M CaCl<sub>2</sub> çözeltisi pipetlenmiştir.

Üretilen filmlerdeki serbest laktik asit bakteri sayılarının belirlenmesi amacıyla çapraz bağlanmış filmler 25 mL % 0.1 peptonlu su içeren Petri kaplarına koyulmuş ve 25°C'da inkübatörlü çalkalayıcıda (Barnstead International, LabLine 4000, Iowa, USA) (90 rpm) 5 dakika süre ile inkübe edilmişlerdir. Bu süre sonunda Petri kaplarından 1 mL çözelti alınarak seri dilüsyon yapılmış ve MRS agar kullanılarak dökme plaka yöntemiyle ekim yapılmıştır. Petri kapları CO<sub>2</sub>'li inkübatörde (%5 CO<sub>2</sub> ve %50 nemli ortamda) 37°C'da 48 saat inkübe edilmişlerdir ve bakteri sayıları log<sub>10</sub> cfu/g film olarak belirlenmiştir.

Üretilen filmlerde immobilize laktik asit bakteri sayılarının belirlenmesi amacıyla alginat filmler 5 dakika inkübasyonun sonunda blendırda (Waring Commercial Blender, New Hartford, CT, USA) peptonlu suyla homojenize edilmişlerdir. Yine peptonlu suyla (% 0.1) seri dilüsyonlar yapılmış ve MRS agar kullanılarak dökme plaka yöntemiyle ekim yapılmıştır. Petri kapları CO<sub>2</sub>'li inkübatörde (%5 CO<sub>2</sub> ve %50 nemli ortamda) 37°C'da 48 saat inkübe edilmişlerdir ve bakteri sayıları log<sub>10</sub> cfu/g film olarak belirlenmiştir.

#### **3.2.2.2.5. Laktik Asit Bakterisi İçeren Alginat Film Çözeltisinden Elde Edilen Filmlerin Depolanması Sırasında Filmlerdeki Serbest ve İmmobilize Bakteri Sayıları**

Liyofilize laktik asit bakterilerinden (*L. delbrueckii* subsp. *lactis* ve *L. plantarum*) 60 mg alınarak % 2'lik alginik asit çözeltilerine ilave edilmişlerdir. Bu çözeltiler Petri kaplarına

koyularak ağızları sıkıca streç filmle kapatılmış ve 4°C'da 7 gün boyunca depolanmışlardır. Depolama sırasında 0., 1., 3. ve 7. günlerde film çözeltisinden alınarak 5 mL 0.3 M CaCl<sub>2</sub> ile çapraz bağlama yapılmış ve filmlerde serbest ve tutuklu kalan bakteri sayıları bölüm 3.2.2.2.4'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.2.2.6. Laktik Asit Bakterisi İçeren Depolanmış Toz Haldeki Alginik Asit Karışımında Bakterilerin Stabilitesi**

Toz halindeki alginik asit (200 mg), 60 ve 120 mg *L. delbrueckii* subsp. *lactis* veya *L. plantarum* ile karıştırılmış ve 4°C'da 63 gün depolanmıştır. Depolamanın 0., 7., 14., 28. ve 63. günlerinde 50 mg karışımdan alınarak 10 mL steril peptonlu suda çözülmüştür. Laktik asit bakteri sayıları dökme plaka yöntemiyle MRS agar kullanılarak belirlenmiştir. Ekim yapılan Petri kapları CO<sub>2</sub>'li inkübatörde (%5 CO<sub>2</sub> ve %50 nemli ortamda) 37°C'da 48 saat inkübe edilmişlerdir ve bakteri sayıları log<sub>10</sub> cfu/g film olarak belirlenmiştir.

#### **3.2.2.2.7. Laktoperoksidaz ve/veya *L. delbrueckii* subsp. *lactis* İçeren Alginat Filmlerin *Escherichia coli* Üzerindeki Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi Amacıyla Yürütülen İnhibisyon Testleri**

Elde edilen laktoperoksidaz ve/veya *L. delbrueckii* subsp. *lactis* içeren alginat filmlerin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi amacıyla test mikroorganizması olarak *E. coli* kullanılmıştır. Bu amaçla *E. coli*'nin 37°C'de nutrient broth (Merck, Darmstadt, Germany) içerisindeki gecelik kültürleri hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonları literatürde laktoperoksidaz'ın antimikrobiyal etkisini inceleyen pek çok araştırmacı tarafından kullanılan 250-500 µM aralığına uyumlu olarak seçilmiştir (JACOP ve ark., 2000; ZAPICO ve ark., 1998; GARCIA-GRAELLS ve ark., 2003). Kullanılacak tiyosiyanat konsantrasyonunun belirlenmesi için ise biraz daha farklı bir yöntem izlenmiştir. Bu amaçla farklı miktarlarda tiyosiyanat (100, 400, 1000, 4000, 8000, 10000, 20000, 40000 µM), laktoperoksidaz içeren film, *E. coli* kültürü ve belirtilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyon aralığının üst sınırına yakın miktarlarda (333 ve 445 µM) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nutrient broth besiyeri içerisinde karıştırılmış ve 37°C'da 24 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda karışımlar içerisinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarları belirlenmiş ve bu kimyasalın tamamen kullanıldığı en düşük miktarda tiyosiyanat konsantrasyonu 4000 µM olarak belirlenmiştir.

Deney sırasında aseptik koşullarda bir mantar delici yardımıyla kesilmiş alginat diskleri (1.3 cm çapında), 0.5 mL kültür, 0.1 mL potasyum tiyosiyanat (son konsantrasyonu 4000 µM) ve 3.0 mL nutrient broth içeren tüpler içerisine atılmış ve çözeltiler içerisine en son olarak reaksiyonu başlatmak amacıyla 0.1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (son konsantrasyonu 200 µM veya 400 µM)

eklenmiştir. Daha sonra 0. saat ekimleri yapılan tüpler 37°C 'da inkübatöre yerleştirilerek inkübe edilmiş ve 6. ve 24. saatlerde aynen 0. saatte olduğu gibi tüm tüplerde *E. coli* sayıları ve yalnızca *L. delbrueckii* subsp. *lactis* içeren disklerin bulunduğu tüplerde de laktik asit bakterisi sayısı belirlenmiştir. Bu amaçla uygun dilüsyonlar % 0.1 peptonlu su ile hazırlanmış ve *E. coli* için VRBA (çift tabaka), *L. delbrueckii* subsp. *lactis* için MRS agar kullanılarak dökme plaka yöntemiyle ekim yapılmıştır. Tüm Petri kapları 37°C'de inkübe edilmiş, ancak *E. coli* için normal bir inkübatör, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* için ise CO<sub>2</sub>'li inkübatör kullanılmıştır. Sayımlar VRBA agarlarda 24 saat, MRS agarlarda 72 saat sonunda alınmış ve log<sub>10</sub> cfu/mL olarak verilmiştir. Kontrol olarak (1) *E. coli* kültürü ve besiyeri içeren tüp; (2) *E. coli* kültürü, besiyeri, film (enzim ve laktik asit bakterisi ilave edilmemiş) içeren tüp ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hariç tüm bileşenleri (*E. coli* kültürü, besiyeri, enzim ve laktik asit bakterisi ilave edilmemiş film, tiyosiyanat) içeren tüp kullanılmıştır.

### 3.2.3. Zein Filmlerle İlgili Çalışmalar

#### 3.2.3.1. Lizozim İçeren Zein Filmlerle İlgili Çalışmalar

##### 3.2.3.1.1. Lizozim Üretimi

Lizozim, JIANG ve ark. (2001) tarafından verilmiş olan kısmi saflaştırma yöntemi modifiye edilerek yumurta akından üretilmiştir. Bu amaçla öncelikle yumurtalar dikkatlice kırılarak sarılarına hasar vermeksizin ayrılmış ve akları toplanarak hacimlerinin üç katı kadar 0.05 M NaCl çözeltisi ile karıştırma eşliğinde seyreltilmiştir. Daha sonra lizozim haricindeki yumurta akı proteinlerinin çöktürülebilmesi için seyreltilmiş olan karışımın pH'sı 1N asetik asit ile tam olarak 4.0'e ayarlanmış ve aynı hacimde % 60'lık (v/v) etanol çözeltisi ile 1:1 oranında seyreltilmiştir. Bu karışım 6 saat süresince oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve oluşan çökelti 15000g ve 4°C'da 15 dakika santrifujlenerek ayrılmıştır. Elde edilen enzimi içeren süpernatant 21 saat boyunca 4°C'da diyaliz edilmiş (3 x 2000 mL destile suya karşı) ve daha sonra liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon (Labconco, FreeZone 6 litre, Kansas, MO, USA cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiş) sırasında çalışma sıcaklığı -44 ile -47°C, basıncı ise 50 x 10<sup>-3</sup> ile 100 x 10<sup>-3</sup> mBar arasında değişmiştir. Liyofilizasyonun ardından ince beyaz bir toz haline gelmiş olan enzimin aktivitesi U/mg olarak belirlenmiş ve renkli şişeler içerisine konduktan sonra kullanılabilecek kadar -18°C'da depolanmıştır (MECİTOĞLU ve ark., 2006).

##### 3.2.3.1.2. Lizozim Aktivitesinin Belirlenmesi

Lizozim aktivitesi spektrofotometrik olarak 660 nm'de ve 30°C sabit sıcaklıkta belirlenmiş olup bu amaçla sabit sıcaklık hücresi ile donatılmış bir spektrofotometre (Shimadzu, Model

2450, Japan) kullanılmıştır. Reaksiyon karışımının oluşturulması için önceden 30°C'a 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 lizozim enziminin bakteri hücrelerini parçalamasıyla meydana gelen bulanıklık kaybı ve buna bağlı olarak oluşan absorbans azalması 2 dakika boyunca kaydedilmiş ve enzim aktivitesi elde edilen absorbans değerlerinin süreye karşı işlenmesi ile oluşturulan kurvenin başlangıç doğrusal kısmının eğiminden hesaplanmıştır. Enzim aktivitesi Unite (absorbans değerinde dakikadaki 0.001 değişim) olarak hesaplanmıştır (MECİTOĞLU ve ark., 2006).

### **3.2.3.1.3. Zein Film Üretimi**

Zein filmlerin hazırlanmasında PADGETT ve ark., (1998) tarafından verilmiş yöntem kullanılmıştır. Buna göre 1.4 g zein (Darıdan elde edilmiş, Sigma Chem Co., St. Louis, MO, USA) 8.1 mL etanol (% 97) içerisinde çözündürülmüş ve manyetik karıştırıcı yardımıyla 25 dakika kadar karıştırılmıştır. Ardından ortama plastikleştirici olarak 0.39 mL gliserol ilave edilmiş ve karışım kaynaya kadar ısıtılmıştır. Kaynama başladığı zaman karıştırma durdurulmuş ve çözelti 5 dakika daha kaynatıldıktan sonra oda sıcaklığına gelene dek soğutulmuştur. Daha sonra 4.3 g çözelti önceden yıkanmış ve etanolla silinmiş bir cam plakanın üzerine çizilmiş 8.5 x 8.5 cm'lik alana kenarları taşmayacak şekilde yayılmıştır. Cam plakalar daha sonra oda sıcaklığında 24 saat kurutulmuş ve filmler cam plakalar üzerinden dikkatlice ayrılmıştır.

### **3.2.3.1.4. Lizozim İçeren Zein Filmlerin Üretilmesi**

Zein film çözeltisi kaynatılıp oda sıcaklığına gelene dek soğutulduktan sonra farklı miktarlarda lizozim ilave edilmiştir. Bu aşamada lizozimin film çözeltisi içerisinde süspansiyon olması veya emülsiyon oluşturarak çözünmesi amacıyla iki farklı yöntem denenmiştir. Bu yöntemlerden birincisinde lizozim ilave edilmiş film hazırlama çözeltisi bir disperser-homojenizatör cihazı (Heidolph SilentCrasherM, Almanya) yardımıyla 8000 rpm'de 2 dakika homojenize edilmiştir. Bu yöntem lizozimin zein filmler içerisinde büyük oranda emülsiyon oluşturarak homojen dağılmasını sağlamaktadır. İkinci yöntemde ise lizozim ilave edilmiş film hazırlama çözeltisi bir manyetik karıştırıcı (Ika RH D-KT/C, Almanya) kullanılarak 180 rpm'de 25 dakika karıştırılmış ve lizozim film hazırlama çözeltisi içerisinde süspansiyon edilmiştir. Ardından 4.3 g homojenizasyon veya karıştırma tekniğiyle elde edilmiş çözelti önceden yıkanmış ve etanolla silinmiş bir cam plakanın üzerine çizilmiş 8.5 x 8.5 cm'lik alana kenarları taşmayacak şekilde yayılmıştır. Cam plakalar daha sonra oda sıcaklığında 24 saat kurutulmuş ve filmler cam plakalar üzerinden dikkatlice ayrılmıştır.

### **3.2.3.1.5. Homojenizasyon veya Karıştırma Tekniği ile Üretilmiş Lizozim İçeren Zein Filmlerde Lizozimin Salım Testleri ve Filmlerdeki İmmobilize Lizozimin Aktivitesinin Belirlenmesi**

Lizozim içeren zein filmlerde salım testleri soğutmalı inkübatörde 4°C de gerçekleştirilmiştir. Filmler (6 x 6 cm) 50 mL destile su (4°C) bulunan cam Petri kaplarının içerisine yerleştirilmişlerdir. Petri kaplarının üstü streç filmle kaplandıktan sonra ortam 200 rpm hızında manyetik karıştırıcı yardımıyla 1400 dakika karıştırılmıştır. Filmlerden salınan lizozimin aktivitesi belirli aralıklarla Petri kaplarından 0.6 mL örnek alınarak belirlenmiştir. Alınan örnek 0.2 mL'lik 3 kısma ayrılarak her bir kısımda lizozim aktivitesi ölçülmüştür. Lizozim aktivitesi belirlenen zaman aralığında filmlerin cm<sup>2</sup> si başına salınan toplam ünite (U/cm<sup>2</sup>) olarak belirlenmiştir. Tüm hesaplamalar örnekleme sırasında alınan toplam aktivite düşünülerek düzeltilmiştir. Lizozimin salımının izlenmesi alınan test çözeltisinde aktivite artışı görülmeyinceye ve aktivitede biraz düşüş gözleninceye kadar devam etmiştir.

Salım testi sonucunda (1400 dakika sonunda) daha fazla salınan aktivite gözlemlenmediği için filmlerde immobilize halde bulunan lizozimin aktivitesi çözünür aktiviteden daha farklı bir şekilde ölçülmüştür. Bu amaçla 1400 dakika salım deneyine tabi tutulmuş olan film 25 mL'lik 30°C'deki substrat çözeltisi bulunan bir Petri kabına atılmıştır. Substrat çözeltisi, 0.05 M, pH 7.0 sodyum fosfat çözeltisi içerisinde 0.26 mg/mL *M. lysodeikticus* süspansiyonu edilerek hazırlanmıştır. Petri kabı deneme sırasında 30°C lik inkübatörde tutulmuş ve periyodik olarak içerisinden örnek alınarak 660 nm dalga boyunda spektrofotometrede bu örneğin absorbansı ölçülmüştür. Zein filmdeki lizozim aktivitesi absorbansın süreye karşı çizilen kurvesinin eğiminden hesaplanmış ve U/cm<sup>2</sup> olarak belirtilmiştir.

### **3.2.3.1.6. Homojenizasyon veya Karıştırma Tekniği ile Üretilmiş Lizozim İçeren Zein Filmlerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi için Sıvı Besiyerinde Gerçekleştirilen İnhibisyon Testleri**

Zein filmlerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesine yönelik inhibisyon testleri için test mikroorganizması olarak *Bacillus amyloliquefaciens* (NRRL NRS-762) kullanılmıştır. *B. amyloliquefaciens*'in nutrient broth içerisinde 30°C'da gecelik kültürü hazırlanmıştır. Yukarıda belirtilmiş homojenizasyon ve karıştırma tekniği ile ayrı ayrı üretilen zein filmlerden aseptik koşullarda mantar delici yardımıyla 1.3 cm çapında diskler kesilmiştir. Deneylerin gerçekleştirilmesi sırasında steril nutrient broth (2.0 mL) içerisine 0.5 mL %0.1 peptonlu su ile seyreltilmiş kültür ve 2 adet zein film diski ilave edilmiştir. Daha sonra 0. saat ekimleri yapılan tüpler 30°C'da inkübatöre yerleştirilip inkübe edilmiş ve 3., 5. ve 24. saatlerde aynen 0. saatte olduğu gibi tüm tüplerde *B. amyloliquefaciens* sayıları belirlenmiştir. *B.*

*amyloliquefaciens*'in sayılarının belirlenmesi için 0.1% peptonlu su ile uygun dilusyonlar hazırlanmış olup ekimlerde nutrient agar kullanılmıştır. Petri kapları 30°C'da 48 saat süre ile inkübe edilmiş ve sayım sonuçları log<sub>10</sub> cfu/mL olarak verilmiştir. Deney üç paralel olarak yürütülmüştür.

### **3.2.3.1.7. Homojenizasyon veya Karıştırma Tekniği ile Üretilmiş Lizozim İçeren Zein Filmlerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi için Katı Besiyerinde Gerçekleştirilen Zon İnhibisyon Testleri**

Kısmi saflaştırılmış lizozim içeren (175, 350 ve 700 µg/cm<sup>2</sup>) zein filmler homojenizasyon veya karıştırma tekniği kullanılarak ayrı ayrı üretilmişler ve daha sonra bir mantar delici yardımıyla 1.3 cm çapında diskler şeklinde kesilmişlerdir. Ardından, nutrient agar dökülmüş Petri kaplarına 0.1 mL (Nutrient broth içerisinde *E. coli*, *P. fluorescens*, *L. innocua* için 37°C'da *B. amyloliquefaciens* için 30°C'da 16-18 saat inkübe edilerek hazırlanmış) *E. coli*, *P. fluorescens*, *L. innocua* veya *B. amyloliquefaciens* kültürü yayma plaka yöntemi ile inoküle edildikten sonra her film için 4 Petriye 3'er adet disk (toplam 12 disk) yerleştirilmiş ve Petriyer *E. coli*, *P. fluorescens*, *L. innocua* için 37°C'da *B. amyloliquefaciens* için 30°C'da 48 saat inkübe edilmişlerdir.

Bu denemenin yanısıra dana burgerlerde uygulanıp iyi sonuç alınan zein filmlerin içerdiği lizozim miktarına göre katı besiyerinde gerçekleştirilen zon inhibisyon testleri 3 farklı patojen mikroorganizma üzerinde tekrar denenmiştir. Bu deneme için kullanılan patojen mikroorganizmalar *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* ve *Staphylococcus aureus*'dur. Kültürler nutrient broth içinde 37°C'da 18-20 saat inkübe edilerek hazırlanmışlardır. Steril Petri kaplarına yayma plaka yöntemiyle inoküle edildikten sonra her film 4 Petriye 3'er adet disk (toplam 12 disk) gelecek şekilde yerleştirilmişlerdir ve Petri kapları 37°C'da 48 saat inkübe edilmişlerdir.

Bu iki deneme içinde inkübasyonun sonunda filmlerin oluşturduğu zonlar değerlendirilmiştir. Değerlendirme, oluşan zonların sınıflandırılması ile gerçekleştirilmiştir. Buna göre muntazam ve film diskinin tüm çevresi boyunca oluşmuş olan zonlar tam zon (tz) olarak adlandırılmış ve bu zonların alanı dijital bir kumpasla belirlenmiştir. Buna karşın bir diskin yalnızca tek bir kenarında oluşan küçük ve düzgün veya yalnızca tek bir kenarında oluşan küçük ancak şekil bozukluğu olan yarımayı andıran zonlar kısmi zon (kz) olarak isimlendirilmiş ve bunların alanı değil yalnızca sayısı belirlenmiştir. Benzer şekilde her disk grubunda herhangi bir zon oluşturmamış disklerin de sayısı belirlenmiş ve bunlar zon oluşmamış (zo) şeklinde tanımlanmıştır.

### **3.2.4. Üretilen Yenebilir Filmlerin Plastik Filmlerle Birleştirilmesi**

#### **3.2.4.1. Karıştırma Tekniği ile Üretilmiş Zein Filmlerin Çift Yönlü Olarak Oriente Edilmiş Polipropilen Filmlerle Birleştirilmesi**

Protein yapısındaki hidrofobik bir biyomateryal olan zeinden film bölüm 3.2.3.3. de belirtildiği şekilde üretilmiştir. Ancak farklı olarak filmler cam plaka üzerine değil 8.5 x 8.5 cm boyutlarında düzgün bir şekilde yayılmış 30 mikron kalınlığında çift yönlü olarak oriente edilmiş polipropilen (BOPP) filmler üzerine dökülmüştür. Daha sonra filmler oda sıcaklığında 24 saat kurutulmuş ve BOPP filme afinite gösterip göstermedikleri belirlenmiştir.

#### **3.2.4.2. Karıştırma Tekniği ile Üretilmiş Zein Filmlerin Selüloz Asetat Filmlerle Birleştirilmesi**

Selüloz asetat filmlerin üretimi amacıyla 2 g selüloz asetat polimeri 8 g aseton içerisine yavaş yavaş ilave edilmiş ve 300 rpm'de 1 saat karıştırılarak çözündürülmüştür. Ardından karışım film çekme makinesinde 100 mm/saniye hızda 300 mikronluk bıçakla yayılarak cam bir plaka üzerine dökülmüştür ve oda sıcaklığında 1 saat kurutulmuştur. Selüloz asetat filmin kurumasının ardından film olduğu yerden çıkartılmadan üzerine bölüm 3.2.3.3. de belirtilen yöntemle üretilmiş zein film çözeltisi dökülerek yine selüloz asetat film üretiminde kullanılan çekme makinesi yardımıyla, dökme bıçağı bant ile 10 kat sarıldıktan sonra yayılmıştır ve 24 saat kurumaya bırakılmıştır.

##### **3.2.4.2.1. Karıştırma Tekniği ile Üretilmiş Liozüm İçeren Zein Filmlerin Selüloz Asetat Filmle Birleştirildikten Sonraki Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi için Katı Besiyerinde Gerçekleştirilen Zon İnhibisyon Testleri**

Zein filmle selüloz asetat filmin birleştirilmesi çalışmalarının olumlu sonuç vermesi nedeniyle bu çift katlı filmlerin liozüm içeren zein filmle birleştirilerek antimikrobiyal testleri yapılmıştır. Ancak yapılan ön denemeler sonucunda zein film kalınlığının çok ince olması liozümün zein film içerisinde dağılımında problem oluşturmuştur. Bu nedenle liozüm içeren zein film döküleceği sırada dökme bıçağı bant ile 10 kat sarıldıktan sonra film çekme işlemi gerçekleştirilmiştir.

Kısmi saflaştırılmış liozüm içeren (175, 350 ve 700 µg/cm<sup>2</sup>) zein filmle birleştirilmiş selüloz asetat filmi bir mantar delici yardımıyla 1.3 cm çapında diskler şeklinde kesilmişlerdir. Antimikrobiyal testlerde *E. coli* (NRRL B-3008), *Salmonella Typhimurium* (CCM 5445), *L. innocua* (NRRL-B33314) ve *Staphylococcus carnosus* (NRRL B-14760) kültürleri

kullanılmıştır. *E. coli* ve *S. Typhimurium* kültürleri ile çalışılırken zein filmlere lizozimin yanısıra 200 µg/cm<sup>2</sup> Na<sub>2</sub> EDTA ilave edilmiştir. Nutrient broth'da 37°C'da 16-18 saat inkübe edilmişlerdir. Nutrient agar dökülmüş Petri kaplarına 0.1 mL kültür yayma plaka yöntemi ile inoküle edildikten sonra değişik konsantrasyonlarda lizozim içeren zein filmler için 4 Petriye 3 adet disk (toplam 12 disk) yerleştirilmiş ve Petriyer 37°C'da 48 saat inkübe edilmiştir. Diskler, zein filmli kısımları agar ile temas edecek şekilde yerleştirilmişlerdir. İnkübasyonun sonunda (48 saat) filmlerin oluşturduğu zonlar dijital kumpas ile ölçülmüştür.

### 3.2.5. Üretilen Yenebilir Filmlerin Gıdalara Uygulanması

#### 3.2.5.1. Taze Kalamar Halkalarının Laktoperoksidaz İçeren Alginat Filmlerle Kaplanması

Alginat filmler bölüm 3.2.2.1.3. de açıklandığı şekilde üretilmişlerdir. Laktoperoksidaz içeren film çözeltisi 10 g alginat film çözeltisi için 22 mg laktoperoksidaz içerecek şekilde hazırlanmıştır. Taze ve temizlenmiş kalamar (5 kg) satın alındıktan sonra soğuk zincir kırılmadan aynı günde laboratuvara getirilmiştir. Kalamar laboratuvarda yıkandıktan sonra halka şeklinde kesilmiştir. Tesadüfi olarak 4 gruba ayrılmıştır. Birinci grup kalamarlar 45 mL steril deionize su içeren kaplara daldırılarak steril Petri kaplarına yerleştirilmişlerdir. İkinci grup kalamarlar laktoperoksidaz içermeyen alginat çözeltisi içeren kaplara daldırıldıktan sonra 45 mL steril deionize su içeren kaplara daldırıldıktan sonra steril Petri kaplarına yerleştirilmişlerdir. Üçüncü grup laktoperoksidaz içeren (2.2 mg/g film çözeltisi) alginat çözeltisi ve 4000 µM KSCN içeren kaplara daldırılmış ve 0.3 M CaCl<sub>2</sub> çözeltisi ile çapraz bağlama yapıldıktan sonra 45 mL 4000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren kaplara daldırıldıktan sonra steril Petri kaplarına yerleştirilmişlerdir. Dördüncü grup kalamarlar ise laktoperoksidaz içeren (22 mg/10 g film çözeltisi) alginat çözeltisi ve 4000 µM KSCN içeren kaplara daldırılmış ve 0.3 M CaCl<sub>2</sub> çözeltisi ile çapraz bağlama yapıldıktan sonra 45 mL 8000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren kaplara daldırıldıktan sonra steril Petri kaplarına yerleştirilmişlerdir. Örnekler 4°C da 7 gün depolanmıştır. Toplam canlı sayımları depolamanın 0., 1., 2., 3., 5. ve 7. günlerinde gerçekleştirilmiştir. Kalamar örneği (10 g) steril parçalama torbalarına alınarak üzerlerine 90 mL steril peptonlu su (0.1 %) ilave edilmiştir ve 2 dakika orta hızda homojenize edilmiştir (Stomacher, Interscience, Fransa). Gerekli dilüsyonlar yapıldıktan sonra PCA kullanılarak ekim yapılmıştır ve Petri kapları 30°C da 48 saat inkübe edilmiştir. Toplam canlı sayım sonuçları log<sub>10</sub> cfu/g olarak belirtilmiştir.



### 3.2.5.2. Kuşbaşı Etlerin Laktik Asit Bakterisi İçeren Alginat Filmlerle Kaplanması

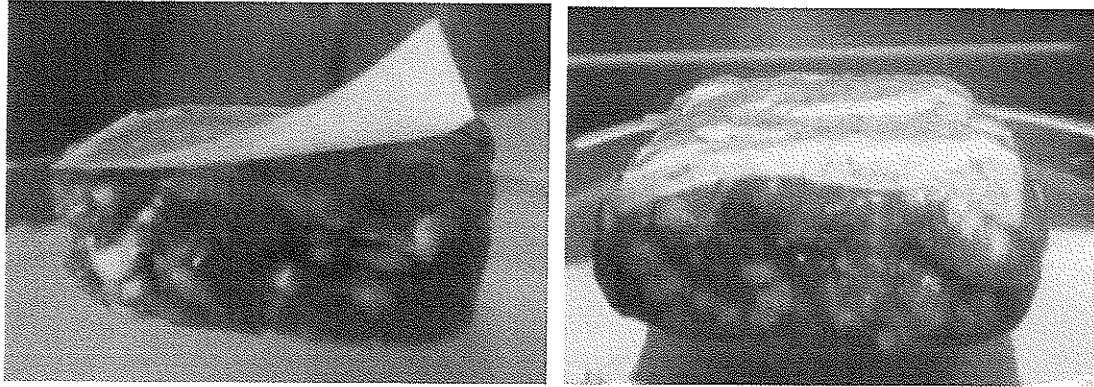
Alginat filmler bölüm 3.2.2.1.3. de açıklandığı şekilde üretilmişlerdir. Ancak bu filmlere laktoperoksidaz yerine liyofilize edilmiş laktik asit bakteri preparatı (*L. delbrueckii* subsp. *lactis* veya *L. plantarum*) ilave edilmiştir. Vakum ambalajda 4 kg taze kontrofile dana eti Pınar Entegre Et ve Un Sanayi A.Ş.'den temin edilmiştir. Et laboratuvarımızda dış yüzeyleri olası bir kontaminasyonu önlemek amacıyla ayrılarak içte kalan kısımları kuşbaşı şeklinde (yaklaşık 8 cm<sup>3</sup> boyutunda küçük küpler şeklinde) kesilmiştir. Uygulama et parçalarının önce 9 mg/g *L. delbrueckii* subsp. *lactis* veya *L. plantarum* içeren %2 alginat çözeltisine, ardından ise 0.3 M CaCl<sub>2</sub> çapraz bağlama çözeltisine daldırılmasıyla yürütülmüştür. Kullanılmış olan kültürlerin içermiş olduğu bakteri sayıları *L. delbrueckii* subsp. *lactis* için 1.0x10<sup>9</sup> cfu/g ve *L. plantarum* için 3.3x10<sup>10</sup> cfu/g düzeyindedir. Buna göre film hazırlama çözeltilerindeki hücre sayıları yaklaşık *L. delbrueckii* subsp. *lactis* için 9.0x10<sup>6</sup> cfu/g film çözeltisi ve *L. plantarum* için 3.0x10<sup>8</sup> cfu/g film çözeltisi düzeyindedir. Denemede dört farklı grup oluşturulmuş olup bunlar; (1) filmle kaplanmamış kontrol, (2) kültür içermeyen alginat filmle kaplanmış kontrol, (3) *L. delbrueckii* subsp. *lactis* içeren alginat filmle kaplanmış örnek ve (4) *L. plantarum* içeren alginat filmle kaplanmış örnektir. Her grupta 3 adet Petri kabının herbirine 3'er parça et örneği yerleştirilerek kapakları kapatılmış ve önce streç filmle daha sonra da alüminyum folyo ile iyice ambalajlanmıştır. Tüm örnekler 4°C'da 14 gün depolanmıştır. Depolama sırasında (0., 2., 3., 7. ve 14. günlerde) örneklerin resimleri kameralı görüntü analiz cihazı (ECS Inc., USA) ile çekilerek örneklerin L\*, a\*, b\* değerlerindeki değişimleri belirlenmiştir. Örneklerde laktik asit bakterisi sayımları da 0., 2., 3., 7. ve 14. günlerde yapılmıştır. Laktik asit bakteri sayımı için Petri kaplarında bulunan her bir 3 parça et 90 mL %0.1 peptonlu su içerisinde homojenizatörde 2 dakika parçalanmış ve gerekli dilüsyonlar yapıldıktan sonra ekimleri MRS agar kullanılarak dökme plaka yöntemine göre yapılmıştır. Petri kapları CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 37°C de 48 saat inkübe edilmiştir. Sonuçlar log<sub>10</sub> cfu/g olarak verilmiştir.

### 3.2.5.3. Dana ve Hindi Burgerlerin Lizozim İçeren Zein Filmlerle Kaplanması

Lizozim içeren zein filmlerin gıdalara uygulanması çalışmalarda kullanılmış olan dana ve hindi burgerler %1 tuz içeriğine sahip ve antimikrobiyal ve antioksidan madde içermeyecek şekilde bu proje için özel olarak Pınar Entegre Et ve Un Sanayi A.Ş. tarafından üretilmiştir. Dana ve hindi burgerlerle ilgili çalışmalar farklı zamanlarda gerçekleştirilmiştir.

Dana ve hindi burgerler 3 x 3 cm boyutunda olacak şekilde hazırlanmış ve tesadüfi olarak 7 gruba ayrılmıştır. 1. grupta burgerler her iki yüzeylerine zein film yerleştirilmeden sadece streç filmle kaplanmış, 2. grupta alt ve üst yüzeylerine karıştırma tekniği ile hazırlanmış zein film yerleştirilerek streç filmle kaplanmış, 3. grupta alt ve üst yüzeylerine homojenize edilerek

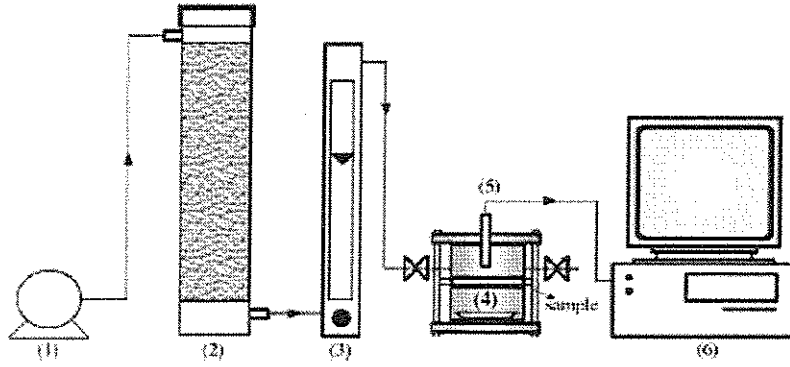
hazırlanmış zein film yerleştirilerek streç filmle kaplanmış, 4. grupta alt ve üst yüzeylerine karıştırma tekniği ile hazırlanmış 300 µg/cm<sup>2</sup> EDTA içeren zein film yerleştirilerek streç filmle kaplanmış, 5. grupta alt ve üst yüzeylerine homojenize edilerek hazırlanmış 300 µg/cm<sup>2</sup> EDTA içeren zein film yerleştirilerek streç filmle kaplanmış, 6. grupta alt ve üst yüzeylerine 700 µg/cm<sup>2</sup> lizozim ve 300 µg/cm<sup>2</sup> EDTA içeren karıştırma tekniği ile hazırlanmış zein film yerleştirilerek streç filmle kaplanmış, 7. grupta yine alt ve üst yüzeylerine 700 µg/cm<sup>2</sup> lizozim ve 300 µg/cm<sup>2</sup> EDTA içeren homojenize edilerek hazırlanmış zein film yerleştirilerek streç filmle kaplanmışlardır. Şekil 3.1 de burgerlerin üst ve alt yüzeylerine yerleştirilen zein filmlerin resmi verilmiştir. Tüm örnekler ayrı ayrı alüminyum folyo ile paketlenildikten sonra 4°C'da 7 gün süreyle depolanmış ve mikrobiyal yük 0., 3., 5. ve 7. günlerde günlerde belirlenmiştir. Dana ve hindi burgerler için zein filmlerde kullanılan lizozimin aktivitesi 6300 U/mg'dır. Mikrobiyal yükün belirlenmesi için plate count agar (PCA) besiyeri kullanılarak toplam canlı sayımı ve violet red bile agar (VRBA) kullanılarak koliform sayımı yapılmıştır. Gerekli dilüsyonlar yapıldıktan sonra ekim gerçekleştirilmiştir. Petri kapları toplam canlı sayımı için 30°C'de 48 saat, koliform sayımı için 35°C'de 24 saat inkübatörde bekletilmişlerdir.



**Şekil 3.1.** Üst ve alt yüzeyleri zein filmle kaplanmış burgerler

Dana burgerlerde mikrobiyal analizle birlikte depolama sırasında (0., 3. ve 7. günlerde) örneklerin oksidasyon stabilitesi de TBA yöntemiyle belirlenmiştir (BEKHIT ve ark., 2003). Analiz için 2.5 g örnek %0.38 TBA and %15 TCA içeren 0.25 N HCl çözeltisi 25 mL içerisinde homojenizatörle 2 dakika süreyle 10000 rpm'de homojenize edilmiştir. Homojenize edilmiş çözülden 3 adet 5'er mL sıvı alınarak 10 dakika su banyosunda kaynatılmıştır. Kaynayan örnekler 4500g de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Örneklerin absorbansları 532 nm de UV-VIS spektrometresi (Varian, Cary 100, Australia) kullanılarak ölçülmüştür. Sonuçlar her burger örneği için üç okumanın ortalaması alınarak 0., 3. ve 7. günlerde verilmiştir.

Dana burgerlerin kaplanmasında kullanılan homojenizasyon ve karıştırma tekniği ile üretilmiş zein filmlerin ve  $700 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  lizozim +  $300 \mu\text{g}/\text{cm}^2$   $\text{Na}_2\text{EDTA}$  içeren filmlerin su buharı geçirgenlikleri de belirlenmiştir. Hazırlanan filmlerin su buharı geçirgenlikleri Şekil 3.2'de gösterilen deney düzeneği kullanılarak ölçülmüştür. Filmlerin yerleştirildiği geçirgenlik hücresi üç kısımdan oluşmaktadır. Alt hücreye bir su kabı yerleştirilirken, filmler iç çapı 5.8 cm bir delikten oluşan orta bölmeye sıkıca tutturulmuştur. Üst hücreye ise nem artışını kaydetmeyi sağlayacak bir nem ölçer yerleştirilmiştir. Nem ölçer zamana karşı nem ve sıcaklık ölçümünü kaydetmek üzere Datalogger SK-L 200 TH'ye bağlanmıştır. Tipik bir su buharı geçirgenlik ölçümü deneyinde hava öncelikle  $\text{CaSO}_4$  ve zeolit 5A'yı adsorbent olarak içeren bir dolgulu kolondan geçirilerek kurutulmuştur. Bu hava  $610 \text{ cm}^3/\text{saniye}$  debide 6 saat süre ile sürekli olarak su buharı geçirgenlik kabının üst hücresine pompalanmıştır. Üst hücrede nem oranı %5'e düştüğü anda kabın giriş ve çıkışındaki vanalar kapatılmıştır. Bilgisayar programı başlatılarak filmin üst hücresindeki nem ve sıcaklık verileri kaydedilmeye başlanmıştır.



**Şekil 3.2.** Su buharı geçirgenliği deneyi için kullanılan deney düzeneği (1) pompa, (2) sabit yataklı kolon, (3) akış ölçer, (4) deionize su banyosu, (5) nem sensörü, (6) bilgisayar (Topçuoğlu ve ark., 2006)

Ayrıca kameralı görüntü analiz cihazı (ECS Inc., USA) ile dana burger örneklerinin depolama sırasındaki (0., 3. ve 7. günlerinde)  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  değerlerindeki değişimler belirlenmiştir.

#### 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

##### 4.1. Alginat Filmlerle İlgili Çalışmalar

Bilindiği üzere alginat filmler halen et ve et ürünlerinin, kanatlı eti ve ürünlerinin, ayrıca deniz ürünlerinin kaplanmasında kullanılmaktadır (LINDSTROM ve ark., 1992). Alginat kaplamalar et ürünlerinin su kaybederek kurummasını engelleyen yani "su rezervuarı" olarak işlev gören filmlerdir. Daha açık bir ifadeyle bu filmler ürünün yüzeyinde adeta matris içerisinde tutulan bir su tabakası oluşturmakta ve su kaybı ürün yerine bu tabakada meydana gelmektedir.

#### **4.1.1. Laktoperoksidaz İçeren Alginat Filmlerle İlgili Çalışmalar**

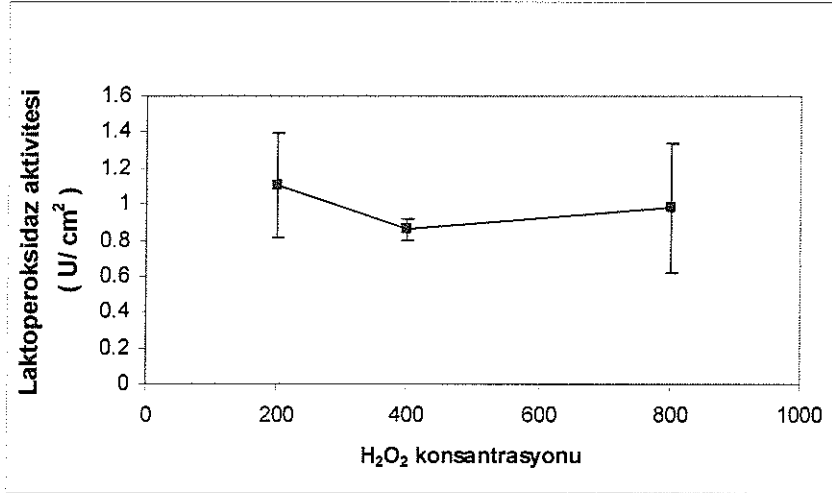
Çalışmada öncelikle antimikrobiyal etkisi olan alginat filmlerin geliştirilmesi üzerinde durulmuştur. Alginat filmlere antimikrobiyal özellik kazandırılması bu filmler içerisine tarafımızdan yöntemler kısmında verildiği şekilde peyniraltı suyundan üretilen laktoperoksidaz enziminin ve ilgili substratlarının ilave edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu filmlerle ilgili sonuçlar aşağıda verilmiştir.

##### **4.1.1.1. Laktoperoksidaz İçeren Alginat Filmlerle İlgili Salım Testleri ve Filmlerde Bulunan İmmobilize Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi**

Laktoperoksidaz içeren alginat filmler üretildikten sonra saf su içerisine atılarak geçiş deneylerine tabi tutulmuştur. +4°C'de yürütülen geçiş deneyi sırasında oldukça duyarlı bir aktivite ölçüm yöntemi kullanıldığı halde su içerisinde herhangi bir laktoperoksidaz aktivitesi ölçülememiştir (sonuçlar verilmemiştir). Elde edilen bu sonuç laktoperoksidazın CaCl<sub>2</sub>'le çapraz bağlanmış olan alginat filmler içerisinde güçlü bir şekilde tutulduğunu ve immobilize olduğunu göstermektedir. Bu sonuç literatürle de uyumludur. Nitekim nötrale yakın pH değerlerinde pozitif yüklü olan laktoperoksidazın alginatı oluşturan polisakkaritlerin karboksil guruplarınca bağlandığı bilinmektedir (GÜÇBİLMEZ ve YEMENİCİOĞLU, 2007). Üretilen laktoperoksidaz hazırlanırken kullanılan destek maddesi olan dekstran polisakkaritinin de film matrisi ve enzim arasında hidrojen bağları oluşturarak immobilizasyonda rol oynamış olması mümkündür. Buna göre tiyosiyanat ve laktoperoksidaz içeren alginat filmlerin antimikrobiyal etkisinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında enzimin oluşturacağı reaktif bileşiklerin gıdaya geçmesiyle oluşacağına şüphe yoktur. Tiyosiyanatın gıdaya eklendiği durumlarda ise antimikrobiyal etki gıda yüzeyindeki tiyosiyanatın dönüştürülmesiyle sınırlı kalacağından arzulanan bir durum değildir. Dolayısıyla tiyosiyanatın film içerisine laktoperoksidazla birlikte ilave edilmesi gerektiği düşünülmektedir. Diğer yandan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in ise filmle kaplanmış gıdanın bu kimyasalı içeren bir çözeltiye daldırılmasıyla veya belirtilen kimyasalın kaplanmış gıda üzerine püskürtülmesiyle uygulanması mümkündür.

Şekil 4.1'den de görüleceği üzere çalışılan konsantrasyon aralığında ölçülen immobilize aktivite değerleri ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu arasında doğrusal bir ilişki belirlenmemiştir. En düşük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu olan 200 µM en yüksek düzeyde laktoperoksidaz aktivitesini vermektedir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunun 400 µM'a yükseltilmesiyle aktivite biraz düşmekte, buna karşın 800 µM'a yükseltilmesiyle ise yeniden biraz yükselmektedir. Bu durum 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üzerinde enzimin substrat inhibisyonuna maruz kaldığını göstermekte olup laktoperoksidaz sisteminin antimikrobiyal etki mekanizmasının ne kadar karmaşık olabileceğini oldukça iyi göstermektedir. Nitekim, enzimin yüksek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonlarında

bir miktar inhibe olması durumunda ortamda tüketim hızı düşen ve kalıntı olarak kalan  $H_2O_2$ 'in de ilave bir antimikrobiyal etki oluşturacağı açıktır. Diğer yandan yavaşlayan enzim aktivitesi nedeniyle tiyosiyanatın kontrollu bir şekilde antimikrobiyal ürünlere dönüşmesi ve bu ürünlerin korunarak daha uzun bir süre antimikrobiyal etki göstermesi de beklenebilir.



**Şekil 4.1.** Farklı  $H_2O_2$  konsantrasyonlarında belirlenen immobilize laktoperoksidaz enzim aktivitesi

#### 4.1.1.2. Laktoperoksidaz İçeren Alginat Filmlerin *Escherichia coli* Üzerindeki Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi Amacıyla Yürütülen İnhibisyon Testleri

Metodlar kısmında da verildiği üzere laktoperoksidaz içeren alginat filmlerin antimikrobiyal etkisi; filmlerin, laktoperoksidaz enzim sistemini oluşturan substratların ve hedef test mikrororganizmasının uygun bir besiyeri içerisinde inkübe edilmesi ve ortamdaki mikroorganizma sayısının görüntülenmesiyle belirlenmiştir. Bu deneme için kullanılan reaksiyon karışımlarının içerikleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Gerçekleştirilen inkübasyonlar sonucunda laktoperoksidaz içeren filmler için elde edilmiş olan sonuçlar Tablo 4.2'de ve mikrobiyal yükdeki değişimler ise Şekil 4.2'de verilmiştir. Üretilmiş olan iki farklı laktoperoksidaz kullanılarak elde edilen veriler incelenecek olursa laktoperoksidaz- $H_2O_2$ -tiyosiyanat antimikrobiyal sisteminin 200  $\mu M$ , 400  $\mu M$  ve 800  $\mu M$   $H_2O_2$  bulunan ortamda *E. coli* üzerinde gelişimi inhibe edici etkisi olduğu ve bu bakterinin üremesini 6. saate kadar engellediği veya özellikle yüksek  $H_2O_2$  konsantrasyonlarında bu bakteriyi bir miktar inhibe ettiği anlaşılmaktadır. İnhibisyon özellikle 2. denemede 400  $\mu M$  ve 800  $\mu M$   $H_2O_2$  konsantrasyonlarında görülmüş olup bu durumun sözkonusu denemede kullanılan laktoperoksidazın 1. denemede kullanılanından daha farklı kinetik özellikler göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Diğer yandan tiyosiyanat konsantrasyonunun 1000 ve 2000  $\mu\text{M}$ 'e,  $\text{H}_2\text{O}_2$  konsantrasyonunun ise 200  $\mu\text{M}$ 'e düşürüldüğü denemelerin sonuçları dikkate alınınca, laktoperoksidaz sisteminin etken unsurlarının konsantrasyonunun azaltılmasıyla beklendiği gibi sistemin inhibisyon etkisinin ortadan kalktığı ve antimikrobiyal etkinin gelişim hızını düşürme veya bakteriyostatik olarak tanımlanabilecek bir hale dönüştüğü görülmektedir (Tablo 4.3 ve Şekil 4.3). Elde edilen antimikrobiyal etki yine 6. saate kadar görülebilmiş, 24. saat sonunda ise tüm reaksiyon karışımlarında yoğun üreme meydana gelmiştir. Gerçekleştirilen bu denemede 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  konsantrasyonunda potasyum tiyosiyanat konsantrasyonunun 1000'den 2000  $\mu\text{M}$ 'e yükseltilmesinin antimikrobiyal etkiyi artırmadığı aksine bir miktar azalttığı görülmüştür.

**Tablo 4.1. Reaksiyon karışımlarının içerikleri**

Reaksiyon karışımları	Disk (1.3 cm)	Laktoperoksidaz içeren disk (1.3 cm)	Nutrient broth	Kültür	Steril deionize su	$\text{H}_2\text{O}_2$ ( $\mu\text{M}$ )	KSCN ( $\mu\text{M}$ )
	-	900 U/cm <sup>2</sup>	3.0 mL	0.5 mL	0.1/0.2 mL	0.1 mL	0.1 mL
<b>1. Aşama</b>							
1	•	-	•	•	-/•	-	-
2	-	•	•	•	-/•	-	-
3	-	•	•	•	•/-	-	• (4000)
4	-	•	•	•	-/-	• (200)	• (4000)
5	-	•	•	•	-/-	• (400)	• (4000)
6	-	•	•	•	-/-	• (800)	• (4000)
<b>2. Aşama</b>							
1'	•	-	•	•	-/•	-	-
2'	-	•	•	•	-/•	-	-
3'	-	•	•	•	•/-	-	• (1000)
4'	-	•	•	•	-/-	• (200)	• (1000)
5'	-	•	•	•	-/-	-	• (2000)
6'	-	•	•	•	-/-	• (200)	• (2000)

**Tablo 4.2.** Laktoperoksidaz (LPS) içeren alginat filmlerden elde edilmiş disklerin sabit tiyosiyanat, değişken H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonlarında *E. coli* üzerindeki antimikrobiyal etkisi

No	Disklerdeki toplam LPS aktivite düzeyi (U/cm <sup>2</sup> ) <sup>1</sup>	Tiyosiyanat kons. (µM)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> kons. (µM)	<i>E. coli</i> sayısı log <sub>10</sub> (cfu/mL)			
				37°C'deki inkübasyon süresi (saat)			
				0	6	24	
1. deneme	1 <sup>2</sup>	-	-	-	3.8 <sup>c</sup>	7.5 <sup>b</sup> (+3.7) <sup>5</sup>	9.3 <sup>a</sup> (+5.5)
	2 <sup>3</sup>	-	-	-	4.3 <sup>c</sup>	7.8 <sup>b</sup> (+3.5)	9.0 <sup>a</sup> (+4.7)
	3	1188 (660) <sup>4</sup>	4000	-	5.7 <sup>c</sup>	8.0 <sup>b</sup> (+2.3)	9.0 <sup>a</sup> (+3.3)
	4	1188 (660)	4000	200	5.7 <sup>b</sup>	5.8 <sup>b</sup> (+0.1)	8.8 <sup>a</sup> (+3.1)
	5	1188 (660)	4000	400	5.0 <sup>c</sup>	5.8 <sup>b</sup> (+0.8)	9.2 <sup>a</sup> (+4.2)
	6	1188 (660)	4000	800	5.6 <sup>c</sup>	6.2 <sup>b</sup> (+0.6)	8.5 <sup>a</sup> (+2.9)
2. deneme	1 <sup>2</sup>	-	-	-	4.2 <sup>c</sup>	8.7 <sup>b</sup> (+4.5)	9.2 <sup>a</sup> (+5.0)
	2 <sup>3</sup>	-	-	-	4.2 <sup>c</sup>	8.7 <sup>b</sup> (+4.5)	9.2 <sup>a</sup> (+5.0)
	3	1188 (788) <sup>4</sup>	4000	-	4.3 <sup>c</sup>	8.6 <sup>b</sup> (+4.3)	9.3 <sup>a</sup> (+5.0)
	4	1188 (788)	4000	200	4.3 <sup>c</sup>	6.7 <sup>c</sup> (+2.4)	9.1 <sup>a</sup> (+4.8)
	5	1188 (788)	4000	400	4.2 <sup>b</sup>	3.0 <sup>c</sup> (-1.2)	8.8 <sup>a</sup> (+4.6)
	6	1188 (788)	4000	800	4.2 <sup>b</sup>	2.0 <sup>c</sup> (-2.2)	8.6 <sup>a</sup> (+4.4)

<sup>1</sup>Disklerin hazırlandığı filmlerdeki laktoperoksidaz aktivitesi 1. denemede 900 U/cm<sup>2</sup> (500 µg/cm<sup>2</sup>), 2. denemede 900 U/cm<sup>2</sup> (597 µg/cm<sup>2</sup>) dir.

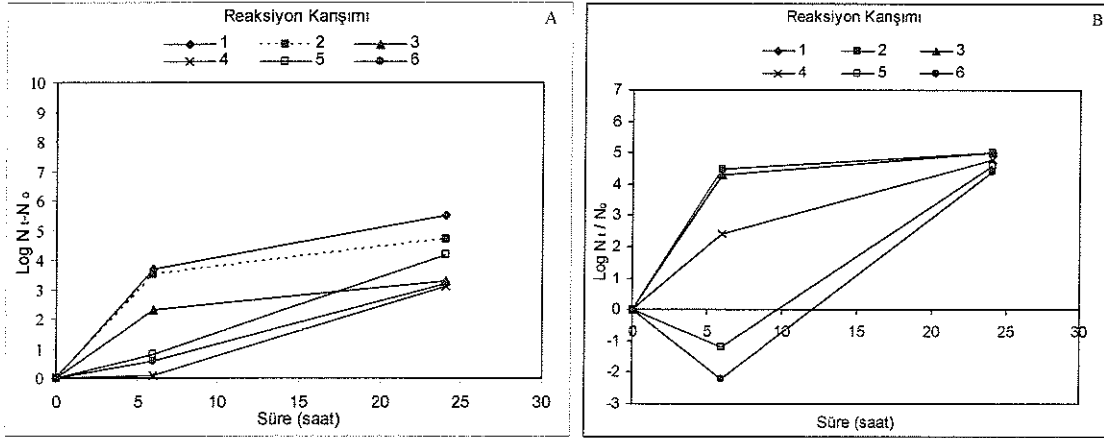
<sup>2</sup>yalnızca *E. coli* ve besiyeri içeren karışım

<sup>3</sup>yalnızca *E. coli*, besiyeri ve film (enzim ilave edilmemiş) içeren karışım

<sup>4</sup>LPS enziminin disk içerisindeki µg olarak miktarı

<sup>5</sup>reaksiyon karışımı içerisinde başlangıç sayısına göre mikrobiyal yükte meydana gelen desimal artış (+) veya azalış (-)

<sup>a-c</sup>: aynı reaksiyon karışımı içerisinde farklı harfler inkübasyon süreleri arasında istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05).



**Şekil 4.2.** Sabit tiyosiyanat, değişken H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonlarına sahip reaksiyon karışımlarında laktoperoksidaz sisteminin *E. coli* üzerindeki antimikrobiyal etkisi [A:1. deneme B:2. deneme]

**Tablo 4.3.** Laktoperoksidaz (LPS) içeren alginat filmlerden elde edilmiş disklerin değişken tiyosiyanat, sabit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonlarında *E. coli* üzerindeki antimikrobiyal etkisi

No	Disklerdeki toplam LPS aktivite düzeyi (U/cm <sup>2</sup> ) <sup>1</sup>	Tiyosiyanat kons. (µM)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> kons. (µM)	<i>E. coli</i> sayısı log <sub>10</sub> (cfu/mL)		
				37°C'deki inkübasyon süresi (saat)		
				0	6	24
1. deneme	1 <sup>2</sup>	-	-	3.0 <sup>c</sup>	7.4 <sup>b</sup> (+4.4) <sup>5</sup>	9.2 <sup>a</sup> (+6.2)
	2 <sup>3</sup>	-	-	3.0 <sup>c</sup>	7.5 <sup>b</sup> (+4.5)	9.3 <sup>a</sup> (+6.3)
	3'	1188 (454) <sup>4</sup>	1000	-	4.1 <sup>c</sup>	7.8 <sup>b</sup> (+3.7)
	4'	1188 (454)	1000	200	4.9 <sup>c</sup>	6.3 <sup>b</sup> (+1.4)
	5'	1188 (454)	2000	-	4.3 <sup>c</sup>	7.8 <sup>b</sup> (+3.5)
	6'	1188 (454)	2000	200	4.3 <sup>c</sup>	6.2 <sup>b</sup> (+1.9)
2. deneme	1 <sup>2</sup>	-	-	3.2 <sup>c</sup>	8.1 <sup>b</sup> (+4.9)	9.2 <sup>a</sup> (+6.0)
	2 <sup>3</sup>	-	-	3.2 <sup>c</sup>	8.3 <sup>b</sup> (+5.1)	9.3 <sup>a</sup> (+6.1)
	3'	1188 (788) <sup>4</sup>	1000	-	3.4 <sup>c</sup>	8.2 <sup>b</sup> (+4.8)
	4'	1188 (788)	1000	200	3.3 <sup>b</sup>	3.5 <sup>b</sup> (+0.2)
	5'	1188 (788)	2000	-	3.5 <sup>c</sup>	8.4 <sup>b</sup> (+4.9)
	6'	1188 (788)	2000	200	3.2 <sup>c</sup>	5.8 <sup>b</sup> (+2.6)

<sup>1</sup>Disklerin hazırlandığı filmlerdeki laktoperoksidaz aktivitesi 1. denemede 900 U/cm<sup>2</sup> (344 µg/cm<sup>2</sup>), 2. denemede 900 U/cm<sup>2</sup> (597 µg/cm<sup>2</sup>) dir.

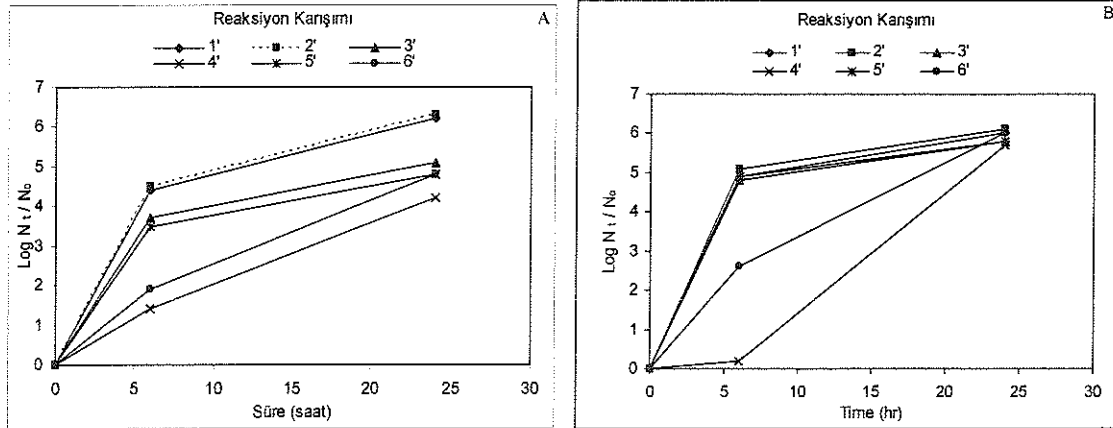
<sup>2</sup>yalnızca *E. coli* ve besiyeri içeren karışım

<sup>3</sup>yalnızca *E. coli*, besiyeri ve film (enzim ilave edilmemiş) içeren karışım

<sup>4</sup>LPS enziminin disk içerisindeki µg olarak miktarı

<sup>5</sup>reaksiyon karışımı içerisinde başlangıç sayısına göre mikrobiyal yükte meydana gelen desimal artış (+) veya azalış (-)

<sup>a-c</sup>: aynı reaksiyon karışımı içerisinde farklı harfler inkübasyon süreleri arasında istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05).



**Şekil 4.3.** Değişken tiyosiyanat, sabit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonlarına sahip reaksiyon karışımlarında laktoperoksidaz sisteminin *E. coli* üzerindeki antimikrobiyal etkisi [A:1. deneme B:2. deneme]

#### 4.1.1.3. Laktoperoksidaz İçeren Alginat Filmlerin *Listeria innocua* Üzerindeki Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi Amacıyla Yürütülen İnhibisyon Testleri

Gerçekleştirilen inkübasyonlar sonucunda laktoperoksidaz içeren filmlerin *L. innocua* üzerindeki etkisi için elde edilmiş olan sonuçlar Tablo 4.4'de ve mikrobiyal yüklerindeki değişim Şekil 4.4'de verilmiştir. (Reaksiyon karışımlarının içerikleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir.) Inkübasyon deneylerinin 6. saat sonundaki değerler dikkate alındığı zaman



farklı zamanlarda üretilmiş olan laktoperoksidazlar içeren alginat filmler kullanılarak gerçekleştirilen iki denemede de laktoperoksidaz-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-tiyosiyanat antimikrobiyal sisteminin 200 µM ve 400 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bulunan ortamda *L. innocua* üzerinde gelişimi inhibe edici etkisi olduğu, buna karşın 800 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bulunan ortamda ise sistemin bu bakteri üzerinde bir miktar da inhibisyona neden olduğu anlaşılmaktadır. Buna karşın 6-24 saatler arasında, 2. denemede 800 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bulunan reaksiyon karışımı haricinde ortamdaki tüm tüplerde *L. innocua* sayıları kayda değer şekilde artmıştır. 2. denemede 800 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bulunan reaksiyon karışımında 24. saatte bile bir üreme görülmemesi bu denemede görülen en yüksek düzeyde inhibisyona ulaşıldığını göstermektedir. Bu aşamaya kadar elde edilmiş olan sonuçlar farklı sütlerden değişik tarihlerde üretilmiş laktoperoksidaz enzimlerinin kinetik özelliklerindeki farklılıkların filmlerin antimikrobiyal etkilerinde de belirli bir farklılık yarattığını göstermektedir. Ancak, bu durum geliştirilen sistemin gelecekteki potansiyel bir uygulaması sırasında karşılaşılabilecek sorunları da şimdiden görmek açısından faydalı veriler sağlamaktadır.

Laktoperoksidaz içeren alginat filmlerin *L. innocua* üzerindeki antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi amacıyla yürütülen inhibisyon testlerinin ikinci aşaması ortamdaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 µM) ve tiyosiyanat (1000 µM veya 2000 µM) konsantrasyonlarının daha düşük tutulmasıyla gerçekleştirilmiştir. Tablo 4.5'de verilmiş olan sonuçlar düşük tiyosiyanat ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonlarında inkübasyonun 6. saatinde görülen inhibe edici etkinin ortadan kalktığı ve üremeyi geciktirme veya bakteriyostatik olarak adlandırılabilir bir forma dönüştüğünü göstermektedir. 24. saatin sonunda ise herhangi bir antimikrobiyal etki görülmemekte ve tüm reaksiyon karışımlarında yoğun üreme meydana gelmektedir. Diğer yandan farklı laktoperoksidazlar kullanılarak yürütülen denemelerde tiyosiyanat konsantrasyonunun 1000 µM'den 2000 µM'ye yükseltilmesiyle bakteriyostatik etkide az da olsa bir artış görülmüştür (Şekil 4.5).

**Tablo 4.4.** Laktoperoksidaz (LPS) içeren alginat filmlerden elde edilmiş disklerin sabit tiyosiyanat, değişken H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonlarında *L. innocua* üzerindeki antimikrobiyal etkisi

No	Disklerdeki toplam LPS aktivite düzeyi (U/cm <sup>2</sup> ) <sup>1</sup>	Tiyosiyanat kons. (µM)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> kons. (µM)	<i>L. innocua</i> sayısı log <sub>10</sub> (cfu/mL)			
				37°C'deki inkübasyon süresi (saat)			
				0	6	24	
1. deneme	1 <sup>2</sup>	-	-	4.1 <sup>c</sup>	5.6 <sup>b</sup> (+1.5) <sup>5</sup>	9.2 <sup>a</sup> (+5.1)	
	2 <sup>3</sup>	-	-	4.2 <sup>c</sup>	5.8 <sup>b</sup> (+1.6)	8.9 <sup>a</sup> (+4.7)	
	3	1188 (660) <sup>4</sup>	4000	-	5.3 <sup>c</sup>	7.3 <sup>b</sup> (+2.0)	8.9 <sup>a</sup> (+3.6)
	4	1188 (660)	4000	200	5.3 <sup>b</sup>	5.2 <sup>b</sup> (-0.1)	8.8 <sup>a</sup> (+3.5)
	5	1188 (660)	4000	400	5.0 <sup>c</sup>	5.3 <sup>b</sup> (+0.3)	9.0 <sup>a</sup> (+4.0)
	6	1188 (660)	4000	800	5.4 <sup>b</sup>	4.9 <sup>c</sup> (-0.5)	8.7 <sup>a</sup> (+3.3)
2. deneme	1 <sup>2</sup>	-	-	4.0 <sup>c</sup>	6.5 <sup>b</sup> (+2.7)	9.0 <sup>a</sup> (+5.0)	
	2 <sup>3</sup>	-	-	4.3 <sup>c</sup>	7.1 <sup>b</sup> (+2.7)	9.1 <sup>a</sup> (+4.8)	
	3	1188 (453) <sup>4</sup>	4000	-	4.1 <sup>c</sup>	7.2 <sup>b</sup> (+3.0)	9.3 <sup>a</sup> (+5.2)
	4	1188 (453)	4000	200	4.6 <sup>c</sup>	5.9 <sup>b</sup> (+1.3)	9.2 <sup>a</sup> (+4.6)
	5	1188 (453)	4000	400	4.1 <sup>b</sup>	3.9 <sup>b</sup> (-0.2)	9.2 <sup>a</sup> (+5.1)
	6	1188 (453)	4000	800	4.1 <sup>a</sup>	3.1 <sup>c</sup> (-1.0)	3.6 <sup>b</sup> (-0.5)

<sup>1</sup> Disklerin hazırlandığı filmlerdeki laktoperoksidaz aktivitesi 1. denemede 900 U/cm<sup>2</sup> (459 µg/cm<sup>2</sup>), 2. denemede 900 U/cm<sup>2</sup> (343 µg/cm<sup>2</sup>) dir.

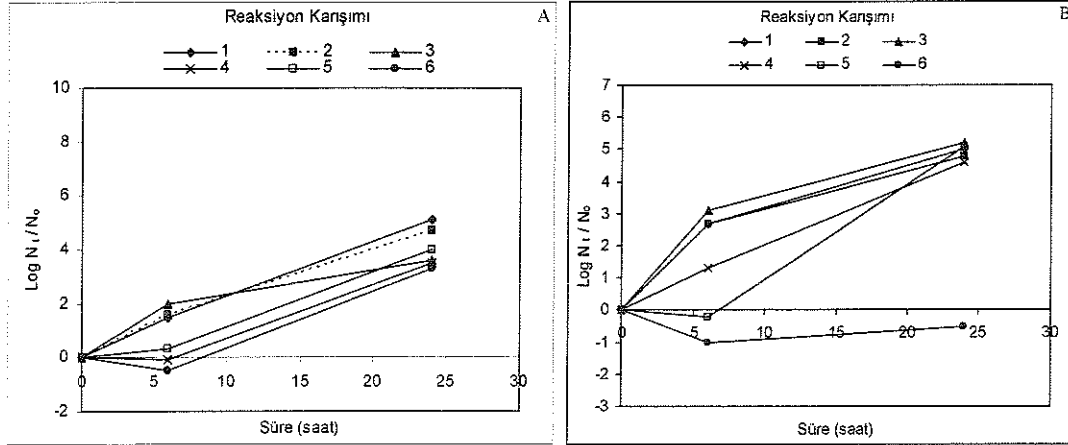
<sup>2</sup> yalnızca *L. innocua* ve besiyeri içeren karışım

<sup>3</sup> yalnızca *L. innocua*, besiyeri ve film (enzim ilave edilmemiş) içeren karışım

<sup>4</sup> LPS enziminin disk içerisindeki µg olarak miktarı

<sup>5</sup> reaksiyon karışımı içerisinde başlangıç sayısına göre mikrobiyal yükte meydana gelen desimal artış (+) veya azalış (-)

<sup>a-c</sup>: aynı reaksiyon karışımı içerisinde farklı harfler inkübasyon süreleri arasında istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05).



**Şekil 4.4.** Sabit tiyosiyanat, değişken H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonlarına sahip reaksiyon karışımlarında laktoperoksidaz sisteminin *L. innocua* üzerindeki antimikrobiyal etkisi [A:1. deneme B:2. deneme]

**Tablo 4.5.** Laktoperoksidaz (LPS) içeren alginat filmlerden elde edilmiş disklerin değişken tiyosiyanat, sabit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonlarında *L. innocua* üzerindeki antimikrobiyal etkisi

No	Disklerdeki toplam LPS aktivite düzeyi (U/cm <sup>2</sup> ) <sup>1</sup>	Tiyosiyanat kons. (µM)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> kons. (µM)	<i>L. innocua</i> sayısı log <sub>10</sub> (cfu/mL)			
				37°C'deki inkübasyon süresi (saat)			
				0	6	24	
1. deneme	1 <sup>1,2</sup>	-	-	3.0 <sup>c</sup>	5.4 <sup>b</sup> (+2.4) <sup>5</sup>	8.8 <sup>a</sup> (+5.8)	
	2 <sup>3</sup>	-	-	3.0 <sup>c</sup>	5.5 <sup>b</sup> (+2.5)	8.8 <sup>a</sup> (+5.8)	
	3'	1188 (479) <sup>4</sup>	1000	3.8 <sup>c</sup>	6.3 <sup>b</sup> (+2.5)	8.9 <sup>a</sup> (+5.1)	
	4'	1188 (479)	1000	200	3.5 <sup>c</sup>	4.8 <sup>b</sup> (+1.3)	8.9 <sup>a</sup> (+5.4)
	5'	1188 (479)	2000	-	3.5 <sup>c</sup>	6.2 <sup>b</sup> (+2.7)	9.0 <sup>a</sup> (+5.5)
	6'	1188 (479)	2000	200	3.5 <sup>c</sup>	4.5 <sup>b</sup> (+1.0)	8.9 <sup>a</sup> (+5.4)
2. deneme	1 <sup>1,2</sup>	-	-	3.1 <sup>c</sup>	5.5 <sup>b</sup> (+2.4)	8.8 <sup>a</sup> (+5.7)	
	2 <sup>3</sup>	-	-	3.1 <sup>c</sup>	5.7 <sup>b</sup> (+2.6)	8.6 <sup>a</sup> (+5.5)	
	3'	1188 (453) <sup>4</sup>	1000	-	3.2 <sup>c</sup>	5.9 <sup>b</sup> (+2.7)	9.3 <sup>a</sup> (+6.1)
	4'	1188 (453)	1000	200	3.8 <sup>c</sup>	4.7 <sup>b</sup> (+0.9)	9.1 <sup>a</sup> (+5.3)
	5'	1188 (453)	2000	-	3.3 <sup>c</sup>	6.2 <sup>b</sup> (+2.9)	9.1 <sup>a</sup> (+5.8)
	6'	1188 (453)	2000	200	3.4 <sup>b</sup>	3.9 <sup>b</sup> (+0.5)	9.1 <sup>a</sup> (+5.7)

<sup>1</sup> Disklerin hazırlandığı filmlerdeki laktoperoksidaz aktivitesi 1. denemede 900 U/cm<sup>2</sup> (363 µg/cm<sup>2</sup>), 2. denemede 900 U/cm<sup>2</sup> (343 µg/cm<sup>2</sup>) dir.

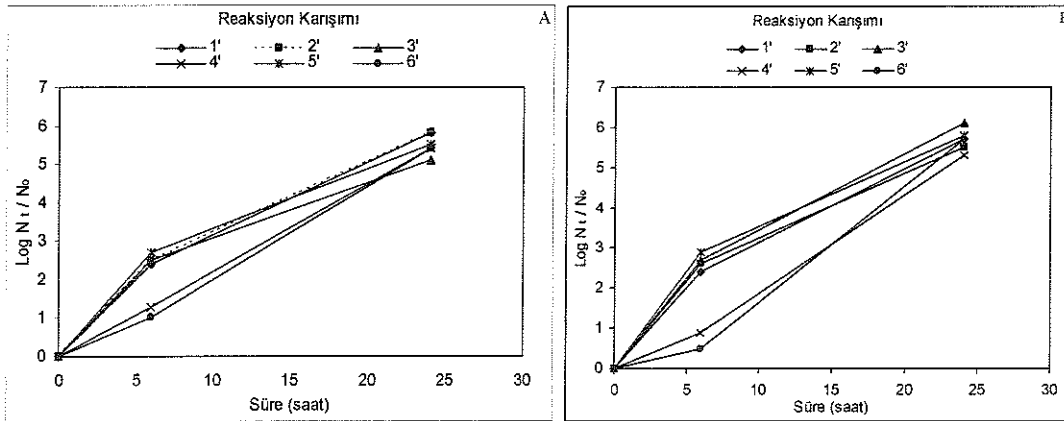
<sup>2</sup> yalnızca *L. innocua* ve besiyeri içeren karışım

<sup>3</sup> yalnızca *L. innocua*, besiyeri ve film (enzim ilave edilmemiş) içeren karışım

<sup>4</sup> LPS enziminin disk içerisindeki µg olarak miktarı

<sup>5</sup> reaksiyon karışımı içerisinde başlangıç sayısına göre mikrobiyal yükte meydana gelen desimal artış (+) veya azalış (-)

<sup>a-c</sup>: aynı reaksiyon karışımı içerisinde farklı harfler inkübasyon süreleri arasında istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05).



**Şekil 4.5.** Değişken tiyosiyanat, sabit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonlarına sahip reaksiyon karışımlarında laktoperoksidaz sisteminin *L. innocua* üzerindeki antimikrobiyal etkisi [A:1. deneme B:2. deneme]

#### 4.1.1.4. Laktoperoksidaz İçeren Alginat Filmlerin *Pseudomonas fluorescens* Üzerindeki Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi Amacıyla Yürütülen İnhibisyon Testleri

Gerçekleştirilen inkübasyonlar sonucunda laktoperoksidaz içeren filmlerin *P. fluorescens* üzerindeki antimikrobiyal etkisini gösteren sonuçlar Tablo 4.6'da görülmektedir. Buna göre 4000 µM tiyosiyanat ve 200 µM, 400 µM veya 800 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bulunan reaksiyon karışımlarında laktoperoksidaz içeren alginat filmlerin *P. fluorescens*'a karşı gösterdiği

antimikrobiyal etkinin daha önce *E. coli* ve *L. innocua*'ya karşı görülen düzeyin üzerinde olduğu anlaşılmaktadır. Nitekim 1. denemede inkübasyonun 6. saatinde tüm tiyosiyanat ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> karışımlarında *P. fluorescens*'de inhibisyon görülürken, 2. denemede 6. saatte 4000 µM tiyosiyanat ve 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bulunan karışımda inhibisyon gözlemlenmeyip 400 ve 800 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bulunan ortamda üremenin 6. saatinde beklenen antimikrobiyal etki görülmüştür (Şekil 4.6). Laktoperoksidaz içeren alginat filmlerin 4000 µM tiyosiyanat varlığında 24 saat sonundaki etkisi 1. denemede H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu 400 µM olduğu zaman üremeyi geciktirme şeklinde, 800 µM olduğu zaman ise inhibisyon etkisi olarak görülürken; 2. denemede tüm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> karışımlarında 24. saatin sonunda antimikrobiyal etkinin ortadan kalkmış olduğu açıktır. Buna göre sözkonusu bakterinin laktoperoksidaz-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-tiyosiyanat sistemine karşı oldukça duyarlı olduğu açıktır.

Laktoperoksidaz içeren alginat filmlerin antimikrobiyal etkisinin düşük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 µM) ve tiyosiyanat (1000 µM veya 2000 µM) konsantrasyonlarında incelendiği testlere ait sonuçlar Tablo 4.7'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar düşük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve tiyosiyanat konsantrasyonlarında inkübasyonun 6. saatinde *P. fluorescens*'de inhibisyon görüldüğünü göstermektedir. Bu durum benzer koşullarda inkübasyonun 6. saatinde inhibisyon göstermeyen *E. coli* ve *L. innocua*'ya göre *P. fluorescens*'in laktoperoksidaz sistemine daha duyarlı olduğunu bir kez daha doğrular niteliktedir. Diğer yandan düşük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve tiyosiyanat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen tüm denemelerde olduğu gibi inhibisyon denemelerinin 24. saatinde hemen hemen tüm tüplerde yoğun üreme görülmüştür (Şekil 4.7).

**Tablo 4.6.** Laktoperoksidaz (LPS) içeren alginat filmlerden elde edilmiş disklerin sabit tiyosiyanat, değişken H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonlarında *P. fluorescens* üzerindeki antimikrobiyal etkisi

No	Disklerdeki toplam LPS aktivite düzeyi (U/cm <sup>2</sup> ) <sup>1</sup>	Tiyosiyanat kons. (µM)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> kons. (µM)	<i>P. fluorescens</i> sayısı log <sub>10</sub> (cfu/mL) 26°C'deki inkübasyon süresi (saat)			
				0	6	24	
1. deneme	1 <sup>2</sup>	-	-	-	3.1 <sup>c</sup>	4.0 <sup>b</sup> (+0.9) <sup>5</sup>	8.4 <sup>a</sup> (+5.3)
	2 <sup>3</sup>	-	-	-	2.7 <sup>b</sup>	4.3 <sup>b</sup> (+1.6)	8.2 <sup>a</sup> (+5.5)
	3	1188 (398) <sup>4</sup>	4000	-	3.6 <sup>c</sup>	4.8 <sup>b</sup> (+1.2)	9.1 <sup>a</sup> (+5.5)
	4	1188 (398)	4000	200	2.8 <sup>b</sup>	2.5 <sup>b</sup> (-0.3)	8.7 <sup>a</sup> (+5.9)
	5	1188 (398)	4000	400	2.5 <sup>b</sup>	2.0 <sup>c</sup> (-0.5)	4.0 <sup>a</sup> (+1.5)
	6	1188 (398)	4000	800	3.4 <sup>a</sup>	0.7 <sup>b</sup> (-2.7)	0.7 <sup>b</sup> (-2.7)
2. deneme	1 <sup>2</sup>	-	-	-	4.0 <sup>c</sup>	5.1 <sup>b</sup> (+1.1)	8.7 <sup>a</sup> (+4.7)
	2 <sup>3</sup>	-	-	-	4.1 <sup>c</sup>	5.5 <sup>b</sup> (+1.4)	8.2 <sup>a</sup> (+4.1)
	3	1188 (344) <sup>4</sup>	4000	-	4.9 <sup>c</sup>	6.5 <sup>b</sup> (+1.6)	9.0 <sup>a</sup> (+4.1)
	4	1188 (344)	4000	200	5.3 <sup>c</sup>	6.4 <sup>b</sup> (+1.1)	9.0 <sup>a</sup> (+3.7)
	5	1188 (344)	4000	400	4.8 <sup>b</sup>	4.3 <sup>c</sup> (-0.5)	9.1 <sup>a</sup> (+4.3)
	6	1188 (344)	4000	800	4.1 <sup>b</sup>	2.4 <sup>c</sup> (-1.7)	8.8 <sup>a</sup> (+4.7)

<sup>1</sup>Disklerin hazırlandığı filmlerdeki laktoperoksidaz aktivitesi 1. denemede 900 U/cm<sup>2</sup> (301 µg/cm<sup>2</sup>), 2. denemede 900 U/cm<sup>2</sup> (260 µg/cm<sup>2</sup>) dir.

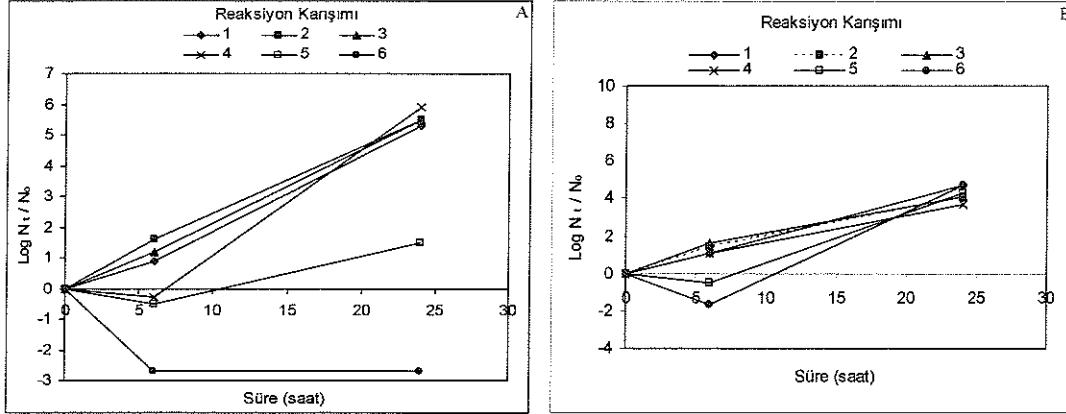
<sup>2</sup>yalnızca *P. fluorescens* ve besiyeri içeren karışım

<sup>3</sup>yalnızca *P. fluorescens*, besiyeri ve film (enzim ilave edilmemiş) içeren karışım

<sup>4</sup>LPS enziminin disk içerisindeki µg olarak miktarı

<sup>5</sup>reaksiyon karışımı içerisinde başlangıç sayısına göre mikrobiyal yükte meydana gelen desimal artış (+) veya azalış (-)

<sup>a-c</sup>: aynı reaksiyon karışımı içerisinde farklı harfler inkübasyon süreleri arasında istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05).



**Şekil 4.6.** Sabit tiyosiyanat, değişken H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonlarına sahip reaksiyon karışımlarında laktoperoksidaz sisteminin *P. fluorescens* üzerindeki antimikrobiyal etkisi [A:1. deneme B:2. deneme]

**Tablo 4.7.** Laktoperoksidaz (LPS) içeren alginat filmlerden elde edilmiş disklerin değişken tiyosiyanat, sabit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonlarında *P. fluorescens* üzerindeki antimikrobiyal etkisi

No	Disklerdeki toplam LPS aktivite düzeyi (U/cm <sup>2</sup> ) <sup>1</sup>	Tiyosiyanat kons. (µM)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> kons. (µM)	<i>P. fluorescens</i> sayısı log <sub>10</sub> (cfu/mL)			
				26°C'deki inkübasyon süresi (saat)			
				0	6	24	
1. deneme	1 <sup>2</sup>	-	-	2.5 <sup>c</sup>	3.2 <sup>b</sup> (+0.7) <sup>5</sup>	8.4 <sup>a</sup> (+5.9)	
	2 <sup>3</sup>	-	-	2.6 <sup>b</sup>	2.9 <sup>b</sup> (+0.3)	8.2 <sup>a</sup> (+5.6)	
	3'	1188 (545) <sup>4</sup>	1000	3.3 <sup>c</sup>	5.3 <sup>b</sup> (+2.0)	8.3 <sup>a</sup> (+5.0)	
	4'	1188 (545)	1000	200	2.7 <sup>b</sup>	1.5 <sup>b</sup> (-1.2)	5.6 <sup>a</sup> (+2.9)
	5'	1188 (545)	2000	-	3.0 <sup>c</sup>	5.5 <sup>b</sup> (+2.5)	8.9 <sup>a</sup> (+5.9)
	6'	1188 (545)	2000	200	2.7 <sup>c</sup>	1.4 <sup>b</sup> (-1.3)	7.1 <sup>a</sup> (+4.4)
2. deneme	1 <sup>2</sup>	-	-	3.6 <sup>b</sup>	3.6 <sup>b</sup> (+0.0)	7.5 <sup>a</sup> (+3.9)	
	2 <sup>3</sup>	-	-	3.6 <sup>c</sup>	4.7 <sup>b</sup> (+1.1)	7.8 <sup>a</sup> (+4.2)	
	3'	1188 (398) <sup>4</sup>	1000	-	3.8 <sup>c</sup>	4.8 <sup>b</sup> (+1.0)	8.9 <sup>a</sup> (+5.1)
	4'	1188 (398)	1000	200	3.7 <sup>b</sup>	3.4 <sup>b</sup> (-0.3)	8.6 <sup>a</sup> (+4.9)
	5'	1188 (398)	2000	-	3.7 <sup>c</sup>	4.7 <sup>b</sup> (+1.0)	8.9 <sup>a</sup> (+5.2)
	6'	1188 (398)	2000	200	3.7 <sup>b</sup>	3.1 <sup>c</sup> (-0.6)	8.5 <sup>a</sup> (+4.8)

<sup>1</sup>Disklerin hazırlandığı filmlerdeki laktoperoksidaz aktivitesi 1. denemede 900 U/cm<sup>2</sup> (413 µg/cm<sup>2</sup>), 2. denemede 900 U/cm<sup>2</sup> (260 µg/cm<sup>2</sup>) dir.

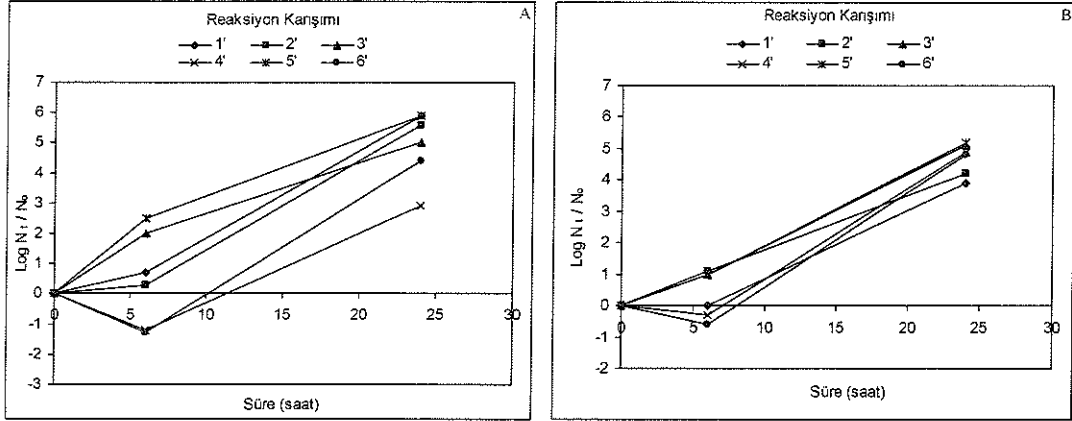
<sup>2</sup>yalnızca *P. fluorescens* ve besiyeri içeren karışım

<sup>3</sup>yalnızca *P. fluorescens*, besiyeri ve film (enzim ilave edilmemiş) içeren karışım

<sup>4</sup>LPS enziminin disk içerisindeki µg olarak miktarı

<sup>5</sup>reaksiyon karışımı içerisinde başlangıç sayısına göre mikrobiyal yükte meydana gelen desimal artış (+) veya azalış (-)

<sup>a-c</sup>: aynı reaksiyon karışımı içerisinde farklı harfler inkübasyon süreleri arasında istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05).



**Şekil 4.7.** Değişken tiyosiyanat, sabit  $H_2O_2$  konsantrasyonlarına sahip reaksiyon karışımlarında laktoperoksidaz sisteminin *P. fluorescens* üzerindeki antimikrobiyal etkisi [A:1. deneme B:2. deneme]

#### 4.1.2. Laktik Asit Bakterisi İçeren Alginat Filmlerle İlgili Çalışmalar

Çalışmanın bu kısmında laktik asit bakterilerinin et ürünlerinde koruyucu amaçlı kullanımının yenibilir filmler aracılığıyla gerçekleştirilip gerçekleştirilemeyeceği araştırılmıştır. Bilindiği üzere teknolojiye halen laktik asit bakterileri et ürünlerine daldırma veya sprey yöntemiyle uygulanmaktadır. Bu uygulamanın başlıca amacı herhangi bir bozulma sırasında eti uygulanmış patojen olmayan, zararsız laktik asit bakterilerinin bozmasıdır. Bu şekilde laktik asit bakterilerinin bozduğu et ürünüde patojen bakteriler gelişmemekte ve bozuk eti tüketen kişilerin zehirlenmesi engellenmektedir. Aslında laktik asit bakterilerinin bozduğu et ürününün tüketilmesi de çok mümkün görülmemektedir. Bu bakterilerin gelişmesiyle et ürünüde yoğun bir asitlik oluşmakta ve tadda bozulma meydana gelmektedir. Bu durum adeta tüketiciyi bozulmaya karşı uyarıcı bir biyokontrol mekanizması teşkil etmektedir.

##### 4.1.2.1. Film Üretiminde Kullanılmak Üzere Seçilmiş Laktik Asit Bakterilerinin Hidrojen Peroksit Üretme Yeteneklerinin Test Edilmesi

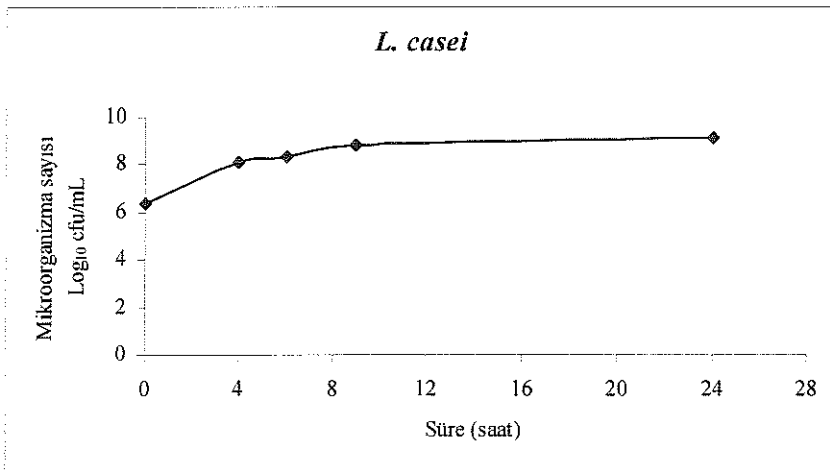
Bilindiği üzere laktik asit bakterilerinin koruyucu amaçlı olarak kullanılması bir ortamda gelişerek laktik asit gibi antimikrobiyal metabolitler üretmelerine ve patojenleri inhibe etmelerine dayandırılmaktadır. Özellikle son zamanlarda laktik asit bakterilerinin  $H_2O_2$  gibi antimikrobiyal maddeleri üretme yeteneği de ilgi çekmekte ve incelenmektedir. İşte tarafımızdan yürütülmüş olan bu çalışmada laktik asit bakterilerinin laktik asit üretme yeteneği yanında  $H_2O_2$  üretme yeteneği de incelenmiştir. Yürütülen denemeler sonucunda *L. delbrueckii* subsp. *lactis*'in  $37^\circ C$ 'da 24 saat inkübasyonu sırasında 6. saatten itibaren  $H_2O_2$  ürettiği, 9. ve 24. saatlerde ise üretilen  $H_2O_2$ 'in düzeyinin 10 mg/L'ye ulaştığı belirlenmiştir (Tablo 4.8). *L. casei* için ise 24 saat içerisinde  $H_2O_2$  oluşumu gözlenememiştir. Anlaşıldığı kadarıyla bu bakteri ya çalışılan koşullarda  $H_2O_2$  üretimi gerçekleştirilememiş, ya da bakteri

tarafından üretilmiş olan  $H_2O_2$  miktarı tarafımızdan kullanılmakta olan test kağıtlarının duyarlılık sınırının (1 mg/L) altında kalmıştır. Bu iki kültürün üremeleri sonucu besiyerlerindeki bulanıklık artışları dikkate alınacak olursa *L. casei*'nin hızla bulanıklık artışına neden olduğu, buna karşın *L. delbrueckii* subsp. *lactis*'in önce uzun bir süre çok az bir bulanıklık artışı oluşturduğu ancak son aşamada diğer bakteri gibi bulanıklığı artırdığı görülmektedir. *L. casei* ve *L. delbrueckii* subsp. *lactis*'in  $37^\circ C$ 'da 24 saat inkübasyon sırasındaki hücre sayıları da Şekil 4.8 ve 4.9'de görülmektedir. Bu şekillerden de anlaşılacağı üzere *L. casei*'de bulanıklık ve hücre sayısı arasındaki ilişki daha güçlü, ancak buna karşı *L. delbrueckii* subsp. *lactis*'de bulanıklık ve hücre sayısı arasındaki ilişki oldukça zayıftır. Ancak istenildiği şekilde  $H_2O_2$  üretim yeteneği gösteren bakteri *L. delbrueckii* subsp. *lactis* olup bakterinin bu yeteneğini hızlı üremesini tamamladığı ve üreme hızının durağan bir hale geldiği istasyonel fazda gösterdiği açıktır.

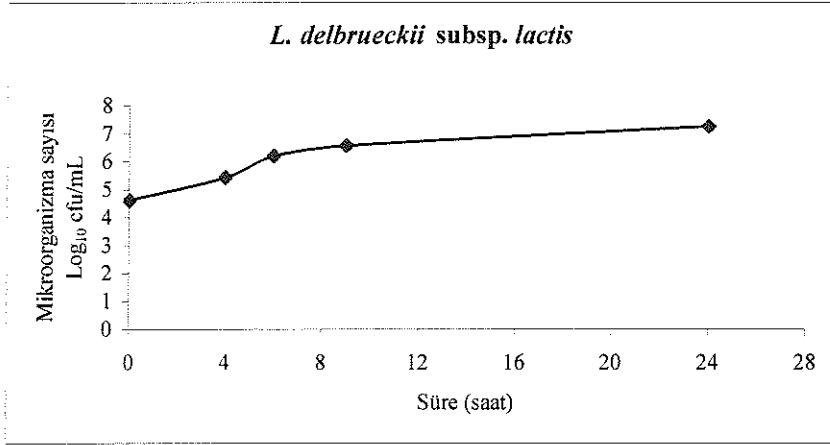
**Tablo 4.8.** *L. casei* ve *L. delbrueckii* subsp. *lactis*'nin  $37^\circ C$ 'da 24 saat inkübasyon sırasında ürettikleri  $H_2O_2$  miktarları ve kültürlerin optik yoğunluklarındaki değişim

Süre (saat)	<i>L. casei</i>		<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	
	$H_2O_2$ (mg/L)	OD <sub>650 nm</sub>	$H_2O_2$ (mg/L)	OD <sub>650 nm</sub>
0	0	0.0426	0	-0.0012
3	0	0.1647	0	0.0093
4	0	0.3339	0	-
5	0	0.5056	0	0.0157
6	0	0.7957	1	0.0365
7	0	1.1127	3	0.0608
8	0	1.4875	3	0.0981
9	0	1.9528	10	0.1546
24	0	2.5127	10	1.491

OD: Optik yoğunluk



**Şekil 4.8.** *L. casei* 'nin  $37^\circ C$ 'daki mikrobiyal gelişimi



**Şekil 4.9.** *L. delbrueckii* subsp. *lactis*'nin 37°C'daki mikrobiyal gelişimi

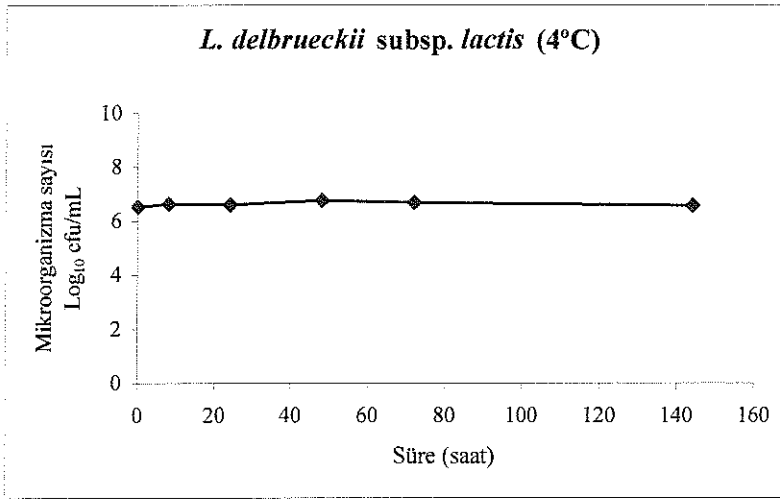
#### 4.1.2.2. *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ve *L. plantarum*'un H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve Laktik Asit Üretim Yeteneğinin Depolama Sıcaklıklarında Test Edilmesi

Çalışmanın ikinci aşamasında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretme yeteneği gösterilmiş olan *L. delbrueckii* subsp. *lactis* bakterisi ile laktik asit üretim yeteneğinin yüksek olduğu bilinen *L. plantarum* bakterilerinin farklı sıcaklıklardaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve laktik asit üretme yetenekleri kıyaslanmıştır. *L. delbrueckii* subsp. *lactis* için elde edilen farklı sıcaklıktaki gelişme kurveleri Şekil 4.10 ve 4.11'de; laktik asit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve pH değerleri ise Tablo 4.9'da görülmektedir. Buna göre *L. delbrueckii* subsp. *lactis*'in 4°C'da herhangi bir üreme göstermediği ve laktik asit ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretmediği açıktır. Diğer yandan 23°C'da bakteri belirli bir gelişim göstermekte ve üremenin 24. saatinden itibaren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 144. saatinden itibaren ise laktik asit üretmeye başlamaktadır. Bu arada üretilen laktik asidin tamamının D formunda olduğu ve çalışılan koşullarda bakterinin (L)-laktik asit üretme yeteneğinde olmadığı da özellikle belirtilmelidir. Diğer yandan 23°C'da üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının 10 mg/L düzeyine ulaşma süresinin daha önce 37°C'da gerçekleştirilen denemedeğine göre 5 kat daha uzun sürdüğü ve 48 saat içerisinde gerçekleştiği de üzerinde durulması gereken bir sonuçtur. Buna göre gelişme sıcaklığı ne kadar yüksekse üremenin o kadar hızlı geliştiği ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretiminin gerçekleştiği hücre üremesinin yavaşladığı istasyonel safhaya o kadar çabuk ulaşıldığı anlaşılmaktadır.

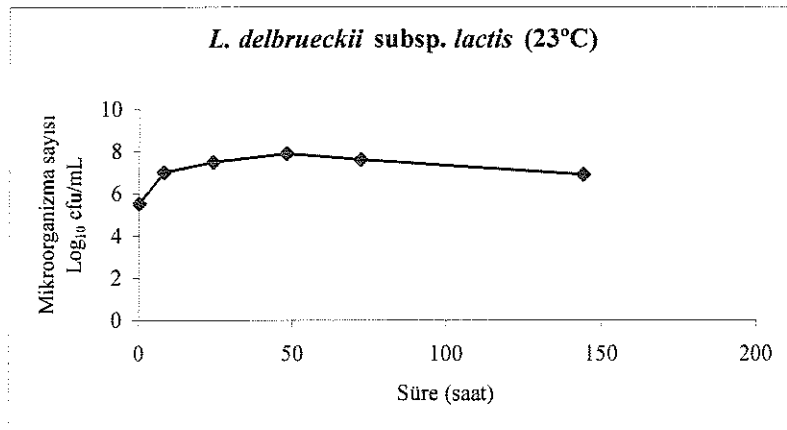


**Tablo 4.9.** *L. delbrueckii* subsp. *lactis*'nin farklı depolama sıcaklıklarındaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve laktik asit üretim yeteneği ve pH değerinin değişimi

Süre (saat)	İnkübasyon sıcaklığı							
	4°C				23°C			
	pH	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg/L)	D-Laktik asit (mg/L)	L-Laktik asit (mg/L)	pH	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg/L)	D-Laktik asit (mg/L)	L-Laktik asit (mg/L)
0	6.59	0	0	0	6.57	0	0	0
8	6.60	0	0	0	6.58	0	0	0
24	6.61	0	0	0	6.45	3	0	0
48	6.60	0	0	0	6.14	10	0	0
72	6.60	0	0	0	5.93	10	0	0
144	6.64	0	0	0	5.72	3-10	0.05	0



**Şekil 4.10.** *L. delbrueckii* subsp. *lactis*'in 4°C'daki mikrobiyal gelişimi



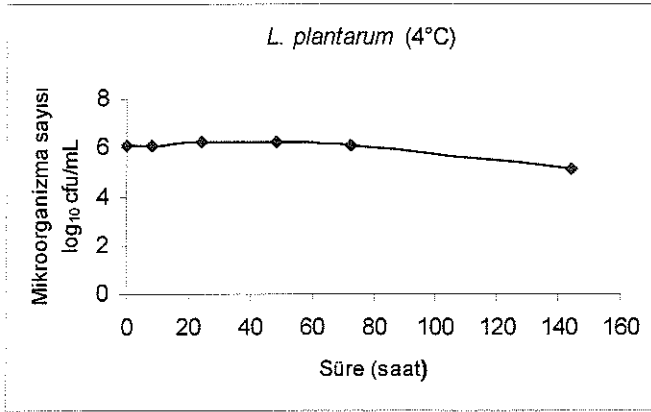
**Şekil 4.11.** *L. delbrueckii* subsp. *lactis*'in 23°C'daki mikrobiyal gelişimi

*L. plantarum* için elde edilen farklı sıcaklıktaki gelişme kurveleri Şekil 4.12 ve 4.13'de laktik asit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve pH değerleri ise Tablo 4.10'da görülmektedir. Buna göre *L. plantarum* da 4°C'de 48 saat boyunca herhangi bir üreme göstermemekte aksine 48. saatten sonrada

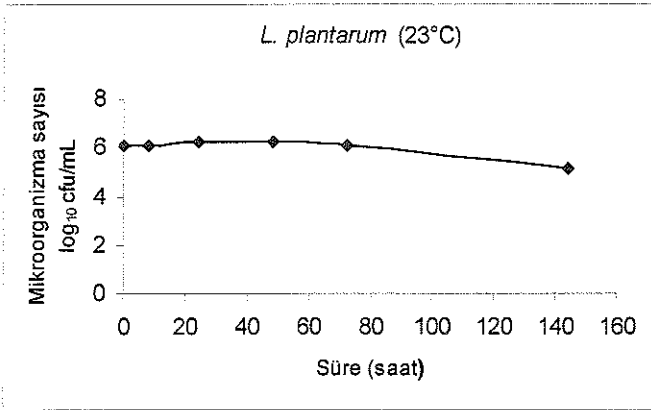
mikrobiyal yükünde düşüş görülmektedir. Diğer yandan 23°C'da bakteri belirli bir gelişim göstermekte ve üremenin 24. saatinden itibaren L- ve D-laktik asit ürettiği görülmektedir. Ancak, bu bakterinin *L. delbrueckii* subsp. *lactis*'in aksine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretmediği de gözlemlenmiştir.

**Tablo 4.10.** *L. plantarum*'un farklı depolama sıcaklıklarındaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve laktik asit üretim yeteneği ve pH değerinin değişimi

Süre (saat)	İnkübasyon sıcaklığı							
	4°C				23°C			
	pH	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg/L)	D-Laktik asit (mg/L)	L-Laktik asit (mg/L)	pH	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg/L)	D-Laktik asit (mg/L)	L-Laktik asit (mg/L)
0	6.78	0	0	0	6.78	0	0	0
8	6.80	0	0	0	6.71	0	0	0
24	6.82	0	0	0	6.33	0	0.048	0.307
48	6.83	0	0	0	5.80	0	0.495	0.663
72	6.86	0	0	0	5.46	0	0.735	0.953
144	6.86	0	0	0	4.87	0	1.695	2.569



**Şekil 4.12.** *L. plantarum*'un 4°C'daki mikrobiyal gelişimi



**Şekil 4.13.** *L. plantarum*'un 23°C'daki mikrobiyal gelişimi

Elde edilen bu sonuçlara göre test edilen bakterilerden özellikle *L. plantarum*'un yüksek asit üretme yeteneği ile soğukta depolanan ürünlerde sıcaklık yükselmesi durumunda devreye girerek ürünü bozacak bir koruyucu kültür olarak güvenle kullanılabilceği açıktır. *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ise daha düşük asit üretme yeteneği olmasına karşın, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de üretebilen bir bakteridir. Bu bakterinin asit üretme yeteneğinin daha düşük olması güvenli bir kontrol mekanizması oluşturup oluşturamayacağı konusunda şüphe yaratmaktadır. Ancak, bu bakterinin özellikle soğukta depolanacak gıdalarda kayda değer bir süre sıcaklık artışına maruz kalmaları durumunda bozulma yaratacak bir kontrol mekanizması oluşturmaya müsait olabileceği de açıktır. Ayrıca, sözkonusu bakterinin aktivitesi için H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'e ihtiyaç duyan laktoperoksidaz enzimiyle birlikte kullanılabilceği ve bu enzimin antimikrobiyal etkisini destekleyebileceğini de düşünülmektedir.

#### **4.1.2.3. *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ve *L. plantarum* İçeren Alginat Filmlerde Serbest ve İmmobilize Bakteri Sayılarının Belirlenmesi**

Çalışmanın bu aşamasında alginat filmler içerisine *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ve *L. plantarum* bakterileri ilave edilmiş ve filmlerdeki serbest ve immobilize bakteri sayıları belirlenmiştir. Bu amaçla filmler peptonlu suda 5 dakika bekletilmiş ve sonra çıkartılarak yine peptonlu suyla homojenize edilmiştir. Filmlerin 5 dakika bekletildiği peptonlu su içerisindeki bakteri sayıları serbest bakteri sayısı, homojenize edildikleri peptonlu su içerisindeki bakteri sayıları ise immobilize bakteri sayısı olarak değerlendirilmiştir. Filmlere farklı miktarlarda bakteri ilave edilmesi durumunda belirlenmiş olan serbest ve immobilize bakteri sayıları Tablo 4.11 ve 4.12'de verilmiştir. Görüldüğü üzere filmlerde immobilize bakteri sayıları filmlerden serbest kalan bakteri sayılarına kıyasla en az 1000 kat daha fazladır. Ancak, filmlerden serbest kalan bakteri sayıları da kayda değer miktardadır. Diğer yandan belirtilmesi gereken bir diğer husus ise filmlerde sayılan serbest ve immobilize bakteri sayısında yaklaşık 1 desimallik (% 90 'lık) bir artış sağlayabilmek için filmlere ilave edilen liyofilize haldeki kültür miktarının 6 kat (2-12 mg) artırılması gerektiğidir. Bu durum şüphesiz liyofilize kültürün ancak bir kısmının kültürden, geri kalanın ise kullanılan destek maddeleri olan sakkaroz ve süt tozundan oluşmasından kaynaklanmaktadır.

**Tablo 4.11.** Farklı miktarlarda *L. delbrueckii* subsp. *lactis* içeren alginat filmlerde serbest ve immobilize bakteri sayıları

Filmlere başlangıçta ilave edilen kültür miktarı (mg/g film çözeltisi) <sup>a</sup>	Filmlerdeki serbest bakteri sayıları (log <sub>10</sub> cfu/g film)	Filmlerdeki immobilize bakteri sayıları (log <sub>10</sub> cfu/g film)
2	2.98	6.16
4	3.61	6.84
6	3.74	6.76
8	3.18	7.10
10	3.76	7.04
12	3.98	7.25

<sup>a</sup> *L. delbrueckii* subsp. *lactis* in liyofilize preparattaki sayısı  $3.0 \times 10^9$  cfu/g

**Tablo 4.12.** Farklı miktarlarda *L. plantarum* içeren alginat filmlerde serbest ve immobilize bakteri sayıları

Filmlere başlangıçta ilave edilen kültür miktarı (mg/g film çözeltisi) <sup>a</sup>	Filmlerdeki serbest bakteri sayıları (log <sub>10</sub> cfu/g film)	Filmlerdeki immobilize bakteri sayıları (log <sub>10</sub> cfu/g film)
2	3.61	7.77
4	4.78	7.62
6	4.77	7.78
8	4.60	8.11
10	4.98	8.29
12	4.85	8.91

<sup>a</sup> *L. plantarum* un liyofilize preparattaki sayısı  $3.3 \times 10^{10}$  cfu/g

#### 4.1.2.4. *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ve *L. plantarum* İçeren Depolanmış Alginat Film Çözeltisinden Elde Edilen Filmlerde Serbest ve Immobilize Bakteri Sayılarının Belirlenmesi

Bu amaçla liyofilize haldeki laktik asit bakterileri alginat film hazırlama çözeltisine ilave edilmiş ve çözeltiler Petri kaplarına döküldükten sonra kurutulmadan ağızları kapatılarak 4°C'da 7 gün boyunca depolanmıştır. Film çözeltileri 0., 1., 3. ve 7. günlerde CaCl<sub>2</sub> 'le çapraz bağlandıktan sonra filmlerde serbest ve immobilize bakteri sayıları daha önce yukarıda belirtildiği gibi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ve *L. plantarum* içeren filmler için sırasıyla Tablo 4.13 ve 4.14 da verilmiştir. Görüldüğü üzere filmlerdeki immobilize bakteri sayıları filmlerdeki serbest kalan bakteri sayılarına kıyasla yine yukarıda verilen bir önceki deneydeki gibi en az 1000 kat daha fazladır. Diğer yandan filmlerdeki gerek serbest gerekse immobilize bakteri sayıları film çözeltilerinin soğukta depolanması sırasında kayda değer bir değişim göstermemiştir. Bu sonuç gıdaları kaplamada kullanılacak olan laktik asit bakterisi içeren film çözeltilerinin en az 1 hafta raf ömrü olan ticari preparatlar şeklinde kullanılabileceğini göstermektedir.

**Tablo 4.13.** *L. delbrueckii* subsp. *lactis* içeren depolanmış alginat çözeltilerinden elde edilmiş filmlerdeki serbest ve immobilize bakteri sayıları

Depolama süresi (gün)	Filmlerdeki serbest bakteri sayıları ( $\log_{10}$ cfu/g film)	Filmlerdeki immobilize bakteri sayıları ( $\log_{10}$ cfu/g film)
0	3.13	6.61
1	3.05	6.64
3	3.05	6.73
7	3.02	6.62

**Tablo 4.14.** *L. plantarum* içeren depolanmış alginat çözeltilerinden elde edilmiş filmlerdeki serbest ve immobilize bakteri sayıları

Depolama süresi (gün)	Filmlerdeki serbest bakteri sayıları ( $\log_{10}$ cfu/g film)	Filmlerdeki immobilize bakteri sayıları ( $\log_{10}$ cfu/g film)
0	4.81	8.72
1	5.01	8.30
3	4.77	8.39
7	4.79	7.75

#### 4.1.2.5. *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ve *L. plantarum* İçeren Depolanmış Toz Haldeki Alginik Asit Karışımında Bakterilerin Stabilitesi

Toz halinde preparat hazırlamak amacıyla 60 ve 120 mg liyofilize laktik asit bakteri kültürü alginik asitle (toz halinde) karıştırılarak depolanmış ve bu sırada içerdiği bakteri sayısı görüntülenmiştir. Toz halindeki preparatın gıda endüstrisindeki uygulamalar için kullanımı kolaylık yaratmakla birlikte sıvı film çözeltilerinin depolanmasına göre kontaminasyon riskini de azaltmaktadır. Laktik asit bakterisinin 60 mg veya 120 mg olarak ilave edilmesi bakteri sayımlarında istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturmamıştır (Tablo 4.15 ve 4.16). Depolama sırasında da bakteri sayımlarında önemli bir fark gözlemlenmemiştir. Bu deneme sonucunda toz şeklinde hazırlanacak preparatların uygulama olanağının yüksek olduğu görülmektedir.

**Tablo 4.15.** Soğukta depolanmış farklı miktarlarda *L. delbrueckii* subsp. *lactis* içeren toz haldeki alginik asit karışımındaki laktik asit bakteri sayıları

Depolama süresi (gün)	60 mg <i>L. del. subsp. lactis</i> içeren preparattaki laktik asit bakteri sayıları ( $\log_{10}$ cfu/g )	120 mg <i>L. del. subsp. lactis</i> içeren preparattaki laktik asit bakteri sayıları ( $\log_{10}$ cfu/g )
0	8.82	9.07
7	9.04	9.04
14	8.36	8.72
28	8.44	8.80
63	8.52	9.12

**Tablo 4.16.** Soğukta depolanan farklı miktarlarda *L. plantarums* içeren toz haldeki alginik asit karışımındaki laktik asit bakteri sayıları

Depolama süresi (gün)	60 mg <i>L. del. subsp. lactis</i> içeren preparattaki laktik asit bakteri sayıları ( $\log_{10}$ cfu/g)	120 mg <i>L. del. subsp. lactis</i> içeren preparattaki laktik asit bakteri sayıları ( $\log_{10}$ cfu/g)
0	9.81	10.08
7	9.79	10.00
14	9.81	9.94
28	9.82	9.85
63	9.81	9.74

#### 4.1.2.6. Laktoperoksidaz ve/veya *L. delbrueckii* subsp. *lactis* İçeren Alginat Filmlerin *E. coli* Üzerindeki Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi Amacıyla Yürütülen İnhibisyon Testleri

Çalışmanın bu kısmında laktoperoksidaz sisteminin  $H_2O_2$  üretme yeteneği belirlenmiş olan *L. delbrueckii* subsp. *lactis* bakterisi varlığında *E. coli* üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Çalışmada aynı üretimden elde edilmiş olan laktoperoksidazların kıyaslanması için tek başına laktoperoksidaz içeren filmler de bir kez daha *E. coli* 'ye karşı test edilmiştir. Gerçekleştirilen inkübasyonlar sonucunda laktoperoksidaz içeren filmler için elde edilmiş olan sonuçlar Tablo 4.17'de verilmiştir. Elde edilen veriler incelenecek olursa laktoperoksidaz- $H_2O_2$ -tiyosiyanat antimikrobiyal sisteminin gerek 200  $\mu M$ , gerekse 400  $\mu M$   $H_2O_2$  bulunan ortamda *E. coli* üzerinde gelişimi inhibe edici etkisi olduğu ve bu bakterinin üremesini 6. saate kadar engellediği anlaşılmaktadır. Buna karşın 6-24 saatler arasında tüm tüplerdeki *E. coli* sayıları yaklaşık olarak aynı düzeyde artmıştır. Bu sonuçlar daha önce *E. coli* için elde edilenlerle benzerlik göstermektedir.

**Tablo 4.17.** Laktoperoksidaz (LPS) içeren alginat filmlerden hazırlanmış disklerin tiyosiyanat ve hidrojen peroksit bulunan reaksiyon karışımlarında *E. coli* üzerindeki antimikrobiyal etkisi (tüm reaksiyon karışımları mutlaka *E. coli* kültürü ve besiyeri içermektedir)

No	Disklerdeki toplam LPS aktivite düzeyi ( $U/cm^2$ ) <sup>a</sup>	Tiyosiyanat kons. ( $\mu M$ )	$H_2O_2$ kons. ( $\mu M$ )	<i>E. coli</i> sayısı $\log_{10}$ (cfu/mL)		
				37°C'deki inkübasyon süresi (saat)		
				0	6	24
1 <sup>b</sup>	-	-	-	5.9	8.1 (+2.2) <sup>e</sup>	8.6 (+2.7)
2 <sup>c</sup>	-	-	-	5.8	8.0 (+2.2)	8.8 (+2.8)
3	1188 (660) <sup>d</sup>	4000	-	5.5	8.0 (+2.5)	8.8 (+3.3)
4	1188 (660)	4000	200	5.8	5.4 (-0.4)	8.9 (+3.1)
5	1188 (660)	4000	400	5.8	5.7 (-0.1)	8.6 (+2.8)

<sup>a</sup>Disklerin hazırlandığı filmlerdeki laktoperoksidaz aktivitesi 900  $U/cm^2$  ( $500 \mu g/cm^2$ ) dir

<sup>b</sup>yalnızca *E. coli* ve besiyeri içeren karışım

<sup>c</sup>yalnızca *E. coli*, besiyeri ve film (enzim ilave edilmemiş) içeren karışım

<sup>d</sup>LPS enziminin disk içerisindeki  $\mu g$  olarak miktarı

<sup>e</sup>reaksiyon karışımı içerisinde başlangıç sayısına göre mikrobiyal yükte meydana gelen desimal artış (+) veya azalış (-)

Diğer yandan laktoperoksidaz ile birlikte *L. delbrueckii* subsp. *lactis* bulunan filmlerle ilgili antimikrobiyal aktivite testlerinin sonuçları Tablo 4.18'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiği zaman laktoperoksidazın *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ile birlikte kullanıldığı filmlerde daha önce incelenmiş olan tek başına laktoperoksidaz içeren filmlerdeki 6. saatte oluşan üremeyi geciktirme etkisinin görülmediği anlaşılmaktadır. Nitekim 6. saat sonunda tüm tüplerde *E. coli* sayısında başlangıca göre yaklaşık aynı düzeyde bir artış meydana gelmektedir. Buna karşın 24. saat sonunda laktoperoksidaz ve *L. delbrueckii* subsp. *lactis* 'i birarada içeren ve 400 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bulunan tüplerde canlı sayısının da biraz azalmasıyla başlangıca göre bakteri sayılarında diğer örneklere göre daha az bir artış görülmektedir. Bu durum aslında laktoperoksidaz-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-tiyosiyanat sisteminin *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ile birarada kullanıldığı zaman etkili olabileceğini ancak bu etkinin laktoperoksidazın tek başına kullanıldığından farklı olarak daha geç ortaya çıkabileceğini göstermektedir. Laktik asit bakterisi bulunan filmlerde laktoperoksidazın etkinliğinin değişim gösterme nedeninin açıklanması reaksiyon karışımlarında oluşan kompleks etkileşimler ve reaksiyonlar nedeniyle oldukça güçtür. Ancak, bu durumun ortamda *E. coli* yanında çok miktarda *L. delbrueckii* subsp. *lactis* bakterisi de bulunması ve laktoperoksidaz sistemi tarafından tiyosiyanattan oluşturulan hipotiyosiyanit iyonu, hipotiyosiyanoz asit ve ömür süresi çok kısa olduğu bilinen reaktif oksidasyon ürünlerinin daha çok harcanması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Nitekim oksidatif bileşiklerin organik madde miktarı arttıkça ömür süresinin kısaldığı bilinen bir gerçektir.

Tablo 4.19'da laktoperoksidaz (LPS) sisteminin testler sırasında *L. delbrueckii* subsp. *lactis* sayısına olan etkisini gösteren sonuçlar da verilmiştir. Görüldüğü üzere deneyin daha başından itibaren filmlerden reaksiyon ortamına oldukça yüksek sayıda laktik asit bakterisi geçmiştir. Zamana göre laktik asit bakterilerinin sayısındaki değişimin tüm tüplerde benzer olması laktik asit bakterisinin laktoperoksidaz sisteminden etkilenmediğini göstermektedir.

**Tablo 4.18.** Laktoperoksidaz (LPS) ve *L. delbrueckii* subsp. *lactis* içeren alginat filmlerden hazırlanmış disklerin tiyosiyanat ve hidrojen peroksit bulunan reaksiyon karışımlarında *E. coli* üzerindeki antimikrobiyal etkisi (tüm reaksiyon karışımları mutlaka *E. coli* kültürü ve besiyeri içermektedir)

No	Disklerdeki toplam LPS aktivite düzeyi veya <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> bakteri sayısı <sup>a</sup>		Tiyosiyanat kons. (µM)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> kons. (µM)	<i>E. coli</i> sayısı log <sub>10</sub> (cfu/mL)		
	LPS (U)	Bakteri (cfu)			37°C'deki inkübasyon süresi (saat)		
					0	6	24
1	-	3.3 x 10 <sup>6</sup>	-	-	6.3	8.1 (+1.8) <sup>c</sup>	8.9 (+2.6)
2	1188 (660) <sup>b</sup>	3.3 x 10 <sup>6</sup>	4000	-	6.8	8.5 (+1.7)	8.6 (+1.8)
3	1188 (660)	3.3 x 10 <sup>6</sup>	4000	200	6.8	8.4 (+1.6)	8.5 (+1.7)
4	1188 (660)	3.3 x 10 <sup>6</sup>	4000	400	6.9	8.4 (+1.5)	7.7 (+0.8)

<sup>a</sup>Disklerin hazırlandığı filmlerdeki laktoperoksidaz aktivitesi 900 U/cm<sup>2</sup> (500 µg/cm<sup>2</sup>) laktik asit bakterisi sayısı 2.5 x 10<sup>6</sup> cfu/cm<sup>2</sup> dir.

<sup>b</sup>LPS enziminin disk içerisindeki µg olarak miktarı

<sup>c</sup>Reaksiyon karışımı içerisinde başlangıç sayısına göre mikrobiyal yükte meydana gelen desimal artış (+) veya azalış (-)

**Tablo 4.19.** Laktoperoksidaz (LPS) ve *L. delbrueckii* subsp. *lactis* içeren alginat filmlerden hazırlanmış diskler, tiyosiyanat, hidrojen peroksit ve *E. coli* bulunan reaksiyon karışımında *L. delbrueckii* subsp. *lactis* sayısının değişimi

No	Disklerdeki toplam LPS aktivite düzeyi veya <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> bakteri sayısı <sup>a</sup>		Tiyosiyanat kons. (µM)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> kons. (µM)	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> sayısı log <sub>10</sub> (cfu/mL)		
	LPS (U)	Bakteri (cfu)			37°C'deki inkübasyon süresi (saat)		
					0	6	24
1	-	3.3 x 10 <sup>6</sup>	-	-	6.2	8.4 (+2.2) <sup>c</sup>	9.9 (+3.7)
2	1188 (660) <sup>b</sup>	3.3 x 10 <sup>6</sup>	4000	-	7.1	8.6 (+1.5)	9.0 (+1.9)
3	1188 (660)	3.3 x 10 <sup>6</sup>	4000	200	7.3	8.4 (+1.1)	9.1 (+1.8)
4	1188 (660)	3.3 x 10 <sup>6</sup>	4000	400	7.0	8.5 (+1.5)	9.0 (+2.0)

<sup>a</sup>Disklerin hazırlandığı filmlerdeki laktoperoksidaz aktivitesi 900 U/cm<sup>2</sup> (500 µg/cm<sup>2</sup>) laktik asit bakterisi sayısı 2.5 x 10<sup>6</sup> cfu/cm<sup>2</sup> dir.

<sup>b</sup>LPS enziminin disk içerisindeki µg olarak miktarı

<sup>c</sup>Reaksiyon karışımı içerisinde başlangıç sayısına göre mikrobiyel yükte meydana gelen desimal artış (+) veya azalış (-)

#### 4.2. Zein Filmlerle İlgili Çalışmalar

Çalışmaların bu kısmında zeinden antimikrobiyal özelliği olan yenibilir filmler geliştirilmesi üzerinde çalışılmıştır. Zein filmler alginat filmlere göre oldukça farklı özelliklere sahiptirler. Örneğin bu filmler alginat filmlerin aksine hidrofobik özelliktedirler. Bu yapılarıyla zein filmler pek çok plastik filme benzerlik göstermektedirler. Ancak, ağırlıklı olarak hidrofobik oldukları halde su içerisine atıldıkları zaman zein filmler içerdikleri az sayıda hidrofilik grubun da etkisiyle zamanla hidrate olarak içlerine bir miktar su almaktadırlar. Bu durum başlangıçta



oldukça camsı ve bir miktar da kırılğan olan filmlerin ıslandığı zaman elastik ve kırılğan olmayan bir yapıya dönmesine neden olmaktadır.

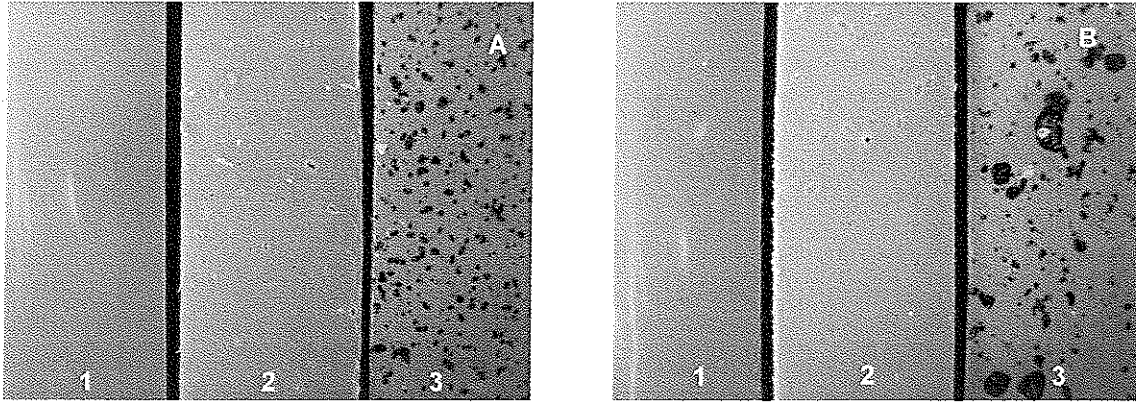
#### **4.2.1. Lizozim İçeren Zein Filmlerle İlgili Çalışmalar**

Zein filmlere antimikrobiyal özellik kazandırmak amacıyla yine tarafımızdan üretilmiş olan lizozim enziminden faydalanılmıştır. Lizozim laktoperoksidaz enziminin aksine antimikrobiyal etki göstermek için substratı olan bakterilerin hücre duvarıyla direk etkileşime girmek zorundadır. Bu özelliği nedeniyle ilave edildiği filmler içerisinde kayda değer bir miktar lizozimin serbest formda kalması istenmektedir. Bu açıdan hidrofobik özelliği nedeniyle zein filmler hidrofilik lizozimin ilave edilmesine müsaittirler.

##### **4.2.1.1. Homojenizasyon veya Karıştırma Tekniği ile Üretilmiş Lizozim İçeren Zein Filmlerde Lizozimin Salım Testleri ve Filmlerdeki İmmobilize Lizozimin Aktivitesinin Belirlenmesi**

Çalışmada lizozim zein filmler içerisine karıştırma ve homojenizasyon olmak üzere iki farklı şekilde ilave edilmiştir. Lizozim literatürde daha önce zein filmler içerisine karıştırma tekniği kullanılarak ilave edilmiştir (MECİTOĞLU ve ark., 2006). Bu yöntemin en büyük dezavantajı hidrofilik enzimin hidrofobik filmler içerisinde homojen olarak dağılmamasıdır. Tarafımızdan gerçekleştirilen bu çalışmada ise homojenizasyon tekniği uygulanarak lizozimin filmler içerisindeki dağılımı daha homojen hale getirilmiştir. Bu gelişim sanayii boyutlu uygulama açısından büyük önem taşımaktadır.

Şekil 4.14'de verilmiş olan resimden de görüldüğü gibi lizozim protein agregatları homojenizasyon tekniği ile üretilmiş zein filmde daha homojen ve küçük partiküller şeklinde dağılmıştır. Karıştırma tekniği ile üretilmiş filmlerde ise lizozimin zein filmde dağılımı homojen değildir.



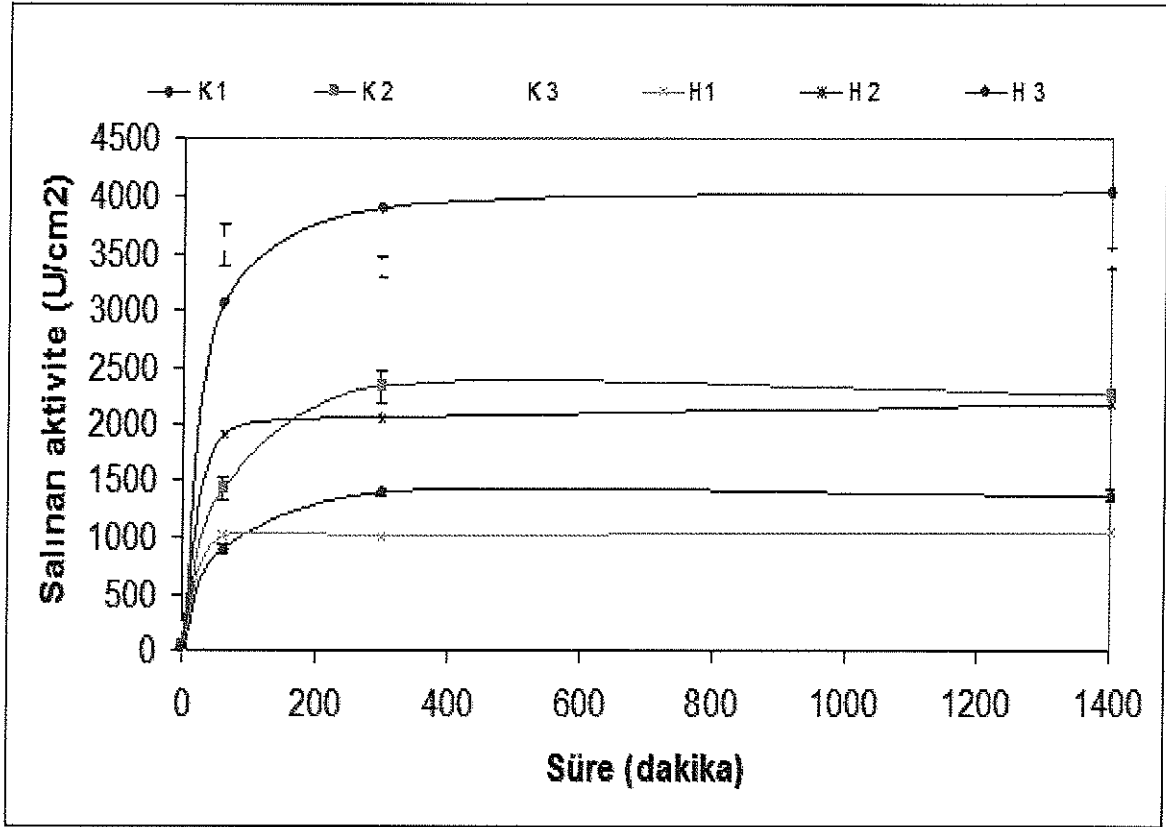
**Şekil 4.14.** Homojenizasyon (A) ve karıştırma (B) tekniği ile üretilmiş farklı zein filmlerin fotoğrafları (Filmler 1: kontrol film; 2: 300 µg/cm<sup>2</sup> Na<sub>2</sub>EDTA içeren film; 3: 700 µg/cm<sup>2</sup> lizozim + 300 µg/cm<sup>2</sup> Na<sub>2</sub>EDTA içeren film)

Üretilmiş olan filmlerin su içerisindeki salım testlerinde lizozimin aktivitesi homojenizasyon ve karıştırma tekniği ile üretilmiş filmlerde belirli bir sürede cm<sup>2</sup> 'den geçen toplam ünite (U) olarak verilmiştir. Tüm hesaplamalar örnekleme sırasında alınan hacimdeki toplam aktivite düşünülerek düzeltilmiştir. Lizozimin salımının izlenmesi alınan test çözeltisinde aktivite artışı görülmeyinceye ve aktivitede biraz düşüş gözleninceye kadar devam etmiştir. Bu kurvelerde salınan aktivitenin süreye karşı çizilen grafiğinde tepe noktası yani ortama geçen en yüksek aktivite "salınan toplam aktiviteyi", bir başka ifadeyle "salınan maksimum aktiviteyi" göstermektedir (Şekil 4.15). Salım testi sonucunda (1400 dakika sonunda) daha fazla salınan aktivite gözlemlenmediği için filmlerde kalan aktivite "immobilize aktivite" olarak isimlendirilmiştir (Şekil 4.16 ve 4.17).

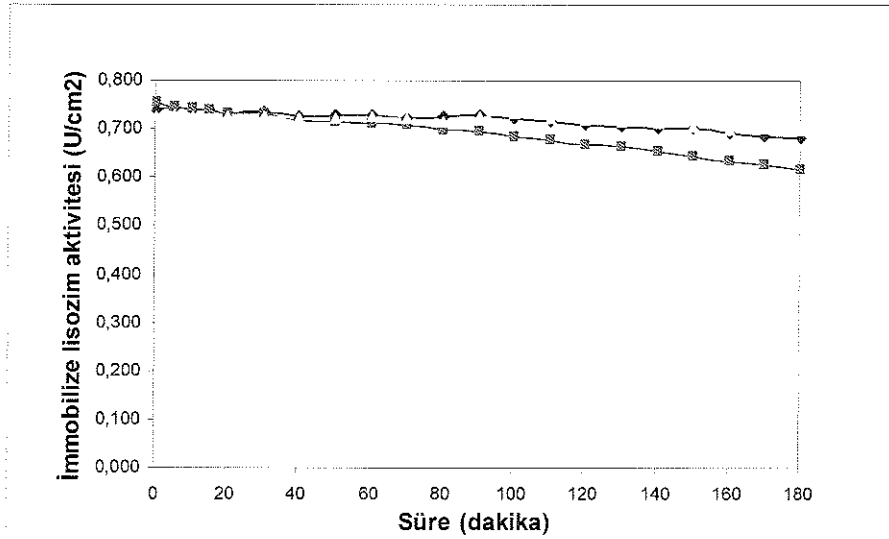
Şekil 4.15'de homojenizasyon ve karıştırma tekniği ile üretilmiş filmler için elde edilmiş olan salım kurveleri ve Şekil 4.16'da homojenizasyon tekniği ile üretilmiş filmlerde salım testi sonucunda kalan immobilize lizozim aktiviteleri verilmiştir. Elde edilen bu grafiklerle, lizozimin homojenizasyon tekniği ile filmlere ilave edilmesi sonucunda filmlerden su içerisine geçişinin karıştırma tekniği ile elde edilenlere göre bir miktar daha yavaş olduğu görülmüştür. Nitekim, homojenizasyon tekniğiyle üretilmiş filmlerde suya geçen lizozim aktivitesinin ancak 1400 dakikanın sonunda maksimum düzeye ulaştığı, karıştırma tekniği ile üretilen filmlerde ise benzer sonuca 300 dakika veya daha önce ulaşıldığı görülmektedir. Tablo 4.20'de verilmiş olan hesaplamalar incelendiği zaman özellikle 175, 350 ve 700 µg/cm<sup>2</sup> lizozim içeren filmlerden ortama geçen aktivitenin filmlere ilave edilmiş olan aktivite düzeyinin üzerinde olduğu anlaşılmaktadır. Bu durum filmlerin hazırlanmasında kullanılan etanolün lizozimi aktive etmesinden kaynaklanmakta olup daha önce MECİTOĞLU ve ark.'nca (2006) da ayrıntılı olarak irdelenmiştir. Tablo 4.20'de verilmiş olan filme ilave edilen lizozim

aktivitelerinin filmde salınan aktivitelere oranları dikkate alınacak olursa, homojenizasyon tekniği ile üretilmiş olan filmlerde aktivasyon oranları 175 µg/cm<sup>2</sup> lizozim içeren filmlerde %19, 350 µg/cm<sup>2</sup> lizozim ilave edilmiş olan filmlerde %22 ve 700 µg/cm<sup>2</sup> lizozim ilave edilmiş olan filmlerde ise %13 düzeyindedir. Bu durumda en yüksek konsantrasyonda lizozim içeren filmlerde aktivasyon olayının daha az meydana geldiği düşünülebilir. Ancak, lizozimin bir miktar emülsifiye edici özelliği olan bir protein olduğu bilindiği için yüksek konsantrasyonlarda daha fazla miktarda enzimin filmler içerisinde immobilize olmuş olması da mümkündür. Bu ihtimal 700 µg/cm<sup>2</sup> lizozim ilave edilmiş olan filmlerde immobilize lizozim aktivitesinin yüksek olmasıyla da desteklenmektedir.

Şekil 4.17 da karıştırma tekniği ile üretilen filmlerde immobilize lizozim aktiviteleri verilmiştir. Karıştırma tekniği ile üretilen zein filmlerden su içerisine geçen lizozim aktivitesi homojenizasyon tekniği ile üretilmiş olan filmlere kıyasla çok daha fazladır. Tablo 4.20'de verilmiş olan hesaplamalar incelendiği zaman 175 ve 350 µg/cm<sup>2</sup> lizozim içeren filmlerde ortama geçen aktivitenin filmlere ilave edilmiş olan aktivite düzeyinin üzerinde olduğu görülmektedir. Bu durum yukarıda da açıklandığı gibi filmlerin hazırlanmasında kullanılan etanolün lizozimi aktive etmesinden kaynaklanmaktadır. Tablo 4.20'de verilmiş olan filme ilave edilen lizozim aktivitelerinin filmde salınan aktivitelere oranları dikkate alınacak olursa, aktivasyon oranları 175 µg/cm<sup>2</sup> lizozim içeren filmlerde %57 ve 350 µg/cm<sup>2</sup> lizozim ilave edilmiş olan filmlerde ise %31 düzeyindedir. Buna karşın 700 µg/cm<sup>2</sup> lizozim içeren filmlerde herhangi bir aktivasyon görülmemektedir. Bu konsantrasyonda lizozim aktivitesinin artmamasının başlıca nedeninin yukarıda da belirtildiği üzere emülsifiye edici özelliği de olan lizozimin yüksek konsantrasyonlarda film yapısını değiştirmesi ve film içerisindeki immobilize lizozim miktarının artması olduğu tahmin edilmektedir. Bu tahminin tutarlı olduğu lizozim aktivasyonu görülmeyen 700 µg/cm<sup>2</sup> lizozim ilave edilerek üretilmiş filmlerde immobilize enzim aktivitesinin yine yüksek olmasıyla bir kez daha görülmektedir.



**Şekil 4.15.** Farklı miktarlarda lizozim içeren zein filmlerden 4°C'deki destile su içerisine lizozim salımı (K: Karıştırma tekniği, H: Homojenizasyon tekniği; K1-H1: 175 µg/cm<sup>2</sup> lizozim, K2-H2: 350 µg/cm<sup>2</sup>, K3-H3: 700 µg/cm<sup>2</sup>)

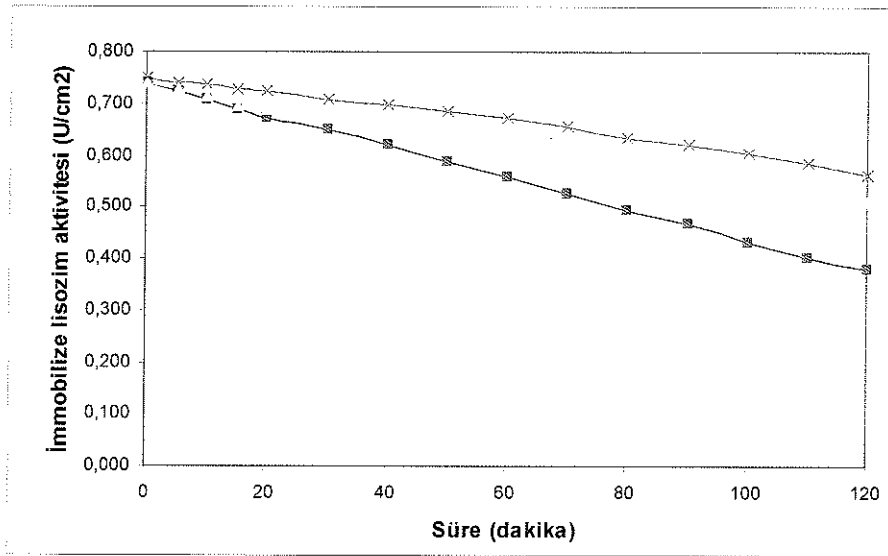


**Şekil 4.16.** Salım testinden sonra 350 µg/cm<sup>2</sup> lizozim içeren zein filmde immobilize lizozim aktivitesinin belirlenmesi (Homojenizasyon tekniği)

**Tablo 4.20.** Lisozim içeren zein filmlerden salınan toplam aktiviteler ve salım deneyi ardından filmlerdeki immobilize lisozim aktiviteleri

No	Lisozimin filmlere ilave edilmiş tekniği	Filme ilave edilen lisozim miktarı ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Filmden salınan toplam lisozim aktivitesi ( $\text{U}/\text{cm}^2$ )	Filmden kazanılan aktivite (%)	Filmde immobilize lisozim aktivitesi ( $\text{U}/\text{cm}^2$ )
1	Homojenizasyon	175	$1054 \pm 31$ (1400) <sup>a</sup>	119	2.2
2	Homojenizasyon	350	$2128 \pm 84$ (1400)	122	2.7
3	Homojenizasyon	700	$4030 \pm 121$ (1400)	113	5.5
4	Karıştırma	175	$1399 \pm 31$ (300)	157	4.4
5	Karıştırma	350	$2339 \pm 145$ (300)	131	5.5
6	Karıştırma	700	$3573 \pm 185$ (60)	100	7.2

<sup>a</sup> Filmden salınan maksimum lisozimin aktivitesinin belirlendiği süre



**Şekil 4.17.** Salım testinden sonra  $350 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  lisozim içeren zein filmde immobilize lisozim aktivitesinin belirlenmesi (Karıştırma tekniği)

#### 4.2.1.2. Homojenizasyon veya Karıştırma Tekniği ile Üretilmiş Lisozim İçeren Zein Filmlerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi için Sıvı Besiyerinde Gerçekleştirilen İnhibisyon Testleri

Gerçekleşen deney sonucunda elde edilmiş olan veriler Tablo 4.21'de verilmiştir. Deney 3'er tüp kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve tüm tüplerin sonuçları verilmiştir. Kullanılmadan önce  $10^{-5}$  oranında seyreltilmesinden dolayı *B. amyloliquefaciens*'in başlangıç yükü çok düşüktür. Lisozim ilave edilmiş zein film içeren tüplerde *B. amyloliquefaciens*'in sayımı  $<0.1 \log \text{cfu}/\text{mL}$  olarak belirlenmiştir. Buna karşın film içermeyen tüplerde *B. amyloliquefaciens*'in sayımı  $8.16-9.51 \log \text{cfu}/\text{mL}$  olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla lisozim içeren zein filmlerin *B. amyloliquefaciens*'a karşı sıvı ortamda antimikrobiyal etki gösterdiği açıktır. *B. amyloliquefaciens*'in mikrobiyal yükünün çok düşük olması nedeniyle homojenizasyon ve karıştırma teknikleri ile üretilmiş filmler arasında etkinlik bakımından bir fark gözlemlenememiştir.

**Tablo 4.21.** Lizozim içeren homojenizasyon ve karıştırma tekniğiyle üretilmiş zein filmlerin sıvı ortamda *B. amyloliquefaciens* üzerindeki antimikrobiyal etkisi

No	Lizozim aktivitesi <sup>a</sup> µg/cm <sup>2</sup>	<i>B. amyloliquefaciens</i> sayısı log <sub>10</sub> (cfu/mL)			
		30°C'deki inkübasyon süresi (saat)			
		0	3	5	24
<b>Karıştırma</b>					
1 <sup>b</sup>	-	2.61	3.37	5.41	9.43
2 <sup>b</sup>	-	2.88	3.10	5.34	9.32
3 <sup>b</sup>	-	2.71	3.25	4.65	9.51
4	290	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
5	290	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
6	290	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
<b>Homojenizasyon</b>					
7	-	3.24	3.30	4.88	8.89
8	-	3.11	3.11	4.45	9.28
9	-	3.16	3.21	4.97	8.16
10	290	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
11	290	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
12	290	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0

<sup>a</sup> Kullanılan lizozimin aktivitesi 6170 U/mg dir.

<sup>b</sup> Kontrol (Lizozim içermeyen zein film diskleri)

#### 4.2.1.3. Homojenizasyon veya Karıştırma Tekniği ile Üretilmiş Lizozim İçeren Zein Filmlerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi için Katı Besiyerinde Gerçekleştirilen Zon İnhibisyon Testleri

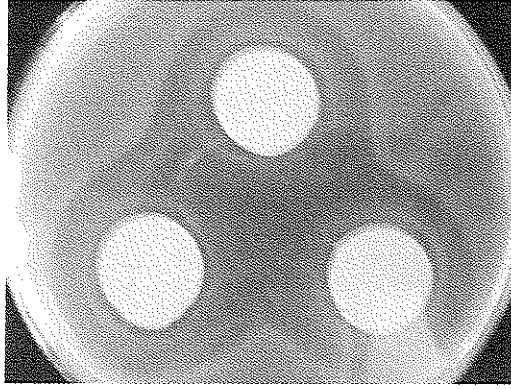
Lizozim içeren zein filmlerin farklı bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkisini gösteren toplu sonuçlar Tablo 4.22'de verilmiştir. Farklı filmlerin *E. coli*, *P. fluorescens*, *L. innocua* ve *B. amyloliquefaciens*'a karşı oluşturduğu tam zon sayıları dikkate alındığı zaman beklendiği gibi homojenizasyon tekniği ile üretilmiş filmlerin içerdiği antimikrobiyal ajanların (lizozim ve Na<sub>2</sub>EDTA), karıştırma tekniği ile üretilmiş olanlara göre film yüzeyine daha iyi dağılmış olduğu anlaşılmaktadır. Zon alanları dikkate alındığında ise karıştırma tekniği ile üretilen filmlerde zon alanları daha büyüktür. Bu durum söz konusu filmlerden lizozimin biraz daha hızlı ve yüksek miktarda (düşük lizozim konsantrasyonlarında) salındığını doğrular niteliktedir. Bu durumun homojenize edilmiş olan filmlerde hidrofilik lizozimin hidrofobik zein filmler içerisinde daha iyi dağılmasından ve enzimin salım hızının yavaşlamasından kaynaklandığı sanılmaktadır. Nitekim, daha önce de belirtildiği gibi temelde hidrofilik olan lizozimin bir miktar emülsifiye edici etkisi de olduğu bilinen bir gerçektir (TAKAHASHI ve ark., 2000). Bu durum en açık bir şekilde *L. innocua* bakterisi üzerinde denenmiş olan lizozim içeren filmlerde lizozim konsantrasyonu arttıkça oluşan zon alanının bir miktar azalmasıyla

da kendini göstermektedir. Lizozimin Gram(-) bakteriler üzerindeki etkinliğinin artırılması amacıyla Na<sub>2</sub>EDTA ile kombine edildiği testlerde *P. fluorescens* üzerinde *E. coli* 'ye göre daha yüksek antimikrobiyal etki gözlemlenmiştir. Lizozimin Gram(+) bakteriler üzerinde tek başına kullanıldığı testlerde ise *B. amyloliquefaciens* üzerinde (Şekil 4.18) *L. innocua*'ya göre daha yüksek bir antimikrobiyal aktivite belirlenmiştir.

**Tablo 4.22.** Farklı konsantrasyonlarda lizozim enzimi ve/veya Na<sub>2</sub>EDTA içeren homojenizasyon ve karıştırma tekniği ile üretilmiş zein filmlerin antimikrobiyal etkisi (Zon tipleri: tz: tam zon; kz: kısmi zon; zo: zon oluşmamış)

Filmlere ilave edilen ajanların miktarları		Zon tipleri ve bu zonların sayıları		Ortalama tam zon alanı (cm <sup>2</sup> )	
Lizozim <sup>a</sup> (µg/cm <sup>2</sup> )	Na <sub>2</sub> EDTA µg/cm <sup>2</sup>	Homojenizasyon tekniği	Karıştırma tekniği	Homojenizasyon tekniği	Karıştırma tekniği
<b><i>E. coli</i></b>					
-	-	12 zo	12 zo	0	0
-	200	6 tz / 6 zo	4 tz / 8 zo	1.28	1.46
175	200	8 tz / 3 kz / 1 zo	8 tz / 4 kz	1.37	2.40
350	200	9 tz / 2 kz / 1 zo	8 tz / 2 kz / 2 zo	1.75	2.81
700	200	12 tz	11 tz / 1 kz	1.55	2.72
<b><i>P. fluorescens</i></b>					
-	-	12 zo	12 zo	0	0
-	200	12 tz	7 tz / 5 zo	2.43	2.89
175	200	12 tz	10 tz / 2 kz	1.96	2.62
350	200	12 tz	11 tz / 1 kz	2.64	3.09
700	200	12 tz	11 tz / 1 kz	2.36	2.25
<b><i>L. innocua</i></b>					
-	-	12 zo	12 zo	0	0
175	-	12 tz	11 tz / 1 kz	1.54	1.99
350	-	10 tz / 2 kz	10 tz / 1 kz / 1 zo	1.62	2.42
700	-	11 tz / 1 kz	10 tz / 2 kz	1.25	2.02
<b><i>B. amyloliquefaciens</i></b>					
-	-	12 zo	12 zo	0	0
175	-	12 tz	12 tz	5.78	4.66
350	-	12 tz	12 tz	6.16	6.72
700	-	12 tz	12 tz	6.79	5.43

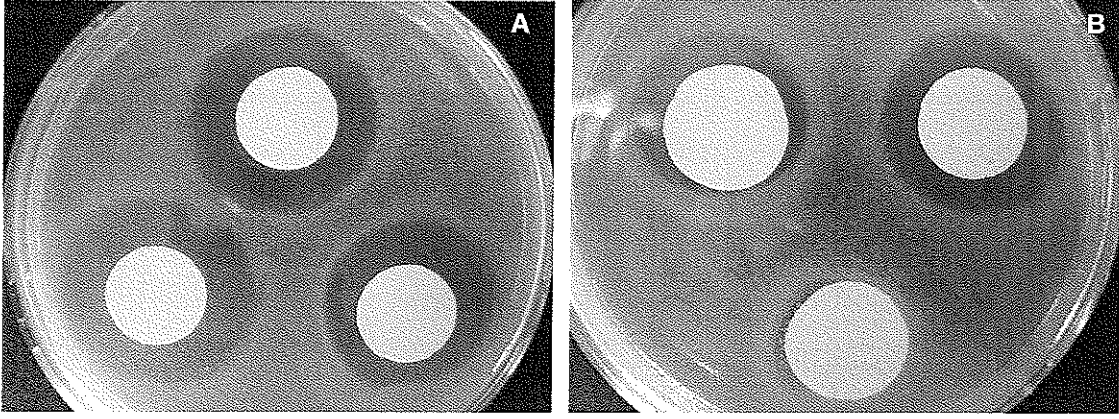
<sup>a</sup>Zein filmlerin içerisindeki lizozimin aktivitesi 5050 U/mg dir.



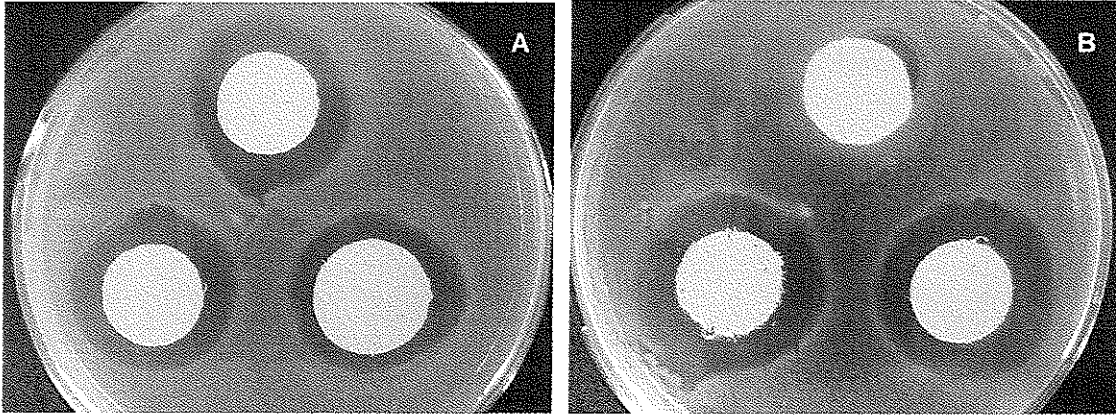
**Şekil 4.18.** Homojenizasyon tekniği ile üretilmiş zein filmlerin *B. amyloliquefaciens* üzerindeki antimikrobiyal etkisi (Filmler  $175 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  lizozim içermektedir.)

Homojenizasyon ve karıştırma tekniği ile üretilmiş lizozim içeren zein filmler en yüksek lizozim konsantrasyonu kullanılarak ve  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  konsantrasyonu  $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  'den  $300 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  'ye yükseltilerek *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* ve *Staphylococcus aureus* gibi patojen mikroorganizmalara karşı da denenmiştir (Tablo 4.23). *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella Typhimurium*'a karşı oluşan zonların resimleri sırasıyla Şekil 4.19 ve 4.20'de görülmektedir. Farklı filmlerin tam zon ve kısmi zon sayıları dikkate alındığı zaman *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella Typhimurium*'a karşı homojenizasyon tekniği ile üretilmiş filmlerde antimikrobiyal ajanların karıştırma tekniği ile üretilmiş olanlara göre yine filmler içerisinde daha iyi dağıldığı görülmektedir. Zon alanları dikkate alındığında ise karıştırma tekniği ile üretilen filmlerde yine zon alanları daha büyüktür, ancak lizozimin diskler içerisinde homojen dağılmaması ve bu nedenle tam zon sayısının homojenizasyonla elde edilen filmlerdekine göre daha az olduğu bir kez daha görülmektedir. Bu durum homojenizasyon uygulamasının uygulama açısından daha yararlı bir teknik olduğunu gösterir niteliktedir. Elde edilen sonuçlar lizozimin  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  ile kombine edildiği testlerde *S. Typhimurium* ve *E. coli* O157:H7 üzerinde benzer düzeyde bir antimikrobiyal etki elde edildiğini göstermektedir. Buna karşın tek başına lizozimin kullanıldığı filmlerde *Staphylococcus aureus*'a karşı hiçbir antimikrobiyal etki gözlemlenmemiştir.





**Şekil 4.19.** Homojenizasyon (A) ve karıştırma (B) tekniği ile üretilmiş zein filmlerin *E. coli* O157:H7 üzerindeki antimikrobiyal etkisi (Filmler  $700 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  lizozim +  $300 \mu\text{g}/\text{cm}^2$   $\text{NA}_2\text{EDTA}$  içermektedir.)



**Şekil 4.20.** Homojenizasyon (A) ve karıştırma (B) tekniği ile üretilmiş zein filmlerin *S. Typhimurium* üzerindeki antimikrobiyal etkisi (Filmler  $700 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  lizozim +  $300 \mu\text{g}/\text{cm}^2$   $\text{NA}_2\text{EDTA}$  içermektedir.)

**Tablo 4.23.** Farklı konsantrasyonlarda lizozim enzimi ve/veya Na<sub>2</sub>EDTA içeren homojenizasyon ve karıştırma tekniği ile üretilmiş zein filmlerin antimikrobiyal etkisi (Zon tipleri: tz: tam zon; kz: kısmi zon; zo: zon oluşmamış)

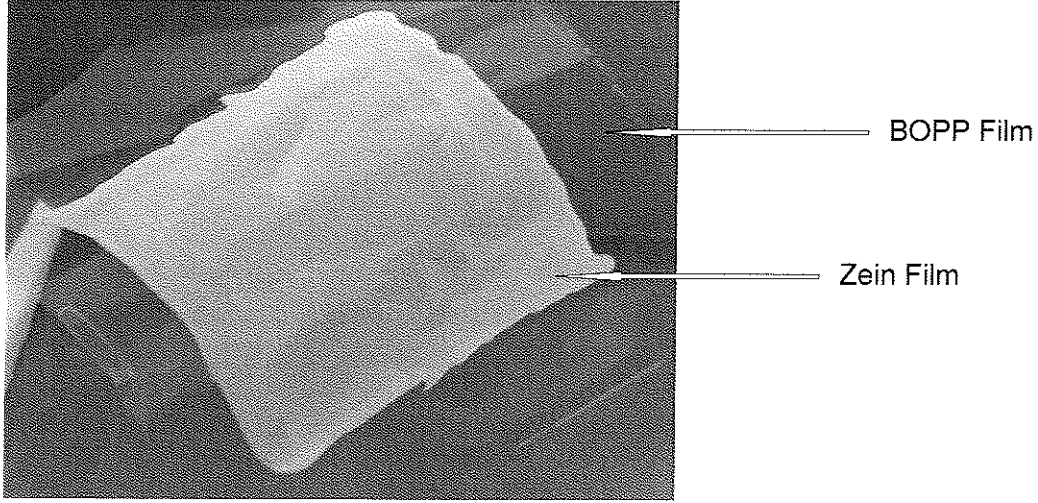
Filmlere ilave edilen ajanların miktarları		Zon tipleri ve bu zonların sayıları		Ortalama tam zon alanı (cm <sup>2</sup> )	
Lizozim <sup>a</sup> (µg/cm <sup>2</sup> )	Na <sub>2</sub> EDTA µg/cm <sup>2</sup>	Homojenizasyon tekniki	Karıştırma tekniki	Homojenizasyon tekniki	Karıştırma tekniki
<b><i>E. coli</i> O157:H7</b>					
-	-	12 zo	12 zo	0	0
-	300	9 tz / 2 kz / 1 zo	10 tz / 2 zo	2.28	2.89
700	300	10 tz / 1 kz / 1 zo	9 tz / 1 kz / 2 zo	3.04	3.61
<b><i>S. Typhimurium</i></b>					
-	-	12 zo	12 zo	0	0
-	300	10 tz / 2 zo	5 tz / 1 kz / 6 zo	2.60	3.63
700	300	12 tz	6 tz / 3 kz / 3 zo	3.27	3.71
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>					
-	-	12 zo	12 zo	0	0
700	-	12 zo	12 zo	0	0

### 4.3. Üretilen Yenebilir Filmlerin Plastik Filmlerle Birleştirilmesi

Tarafımızdan üretilmiş olan alginat filmler hidrofilik yapılarıyla özellikle gıdaların kaplanması için kullanılabilecek filmlerdir. Pek çoğu hidrofobik yapıda olan plastik filmler bu filmle uyumlu değildirler. Ancak yine de hidrofilik özellikleriyle bilinen polivinilalkol filmlerin alginat filmlerle birleştirilmesi için birtakım ön denemeler gerçekleştirilmiş ancak her iki filmin çapraz bağlanması için gerekli farklı ajanların uygulamasıyla ilgili sorunlar nedeniyle düzgün yüzeye sahip birleştirilmiş filmler elde edilmesinde istenilen düzeyde başarı elde edilememiştir. Diğer yandan üretilmiş olan zein filmlerin hidrofobik yapısı nedeniyle plastik filmlerle oldukça uyumlu olduğu belirlenmiş ve çalışmalar bu filmler üzerinde yoğunlaştırılmıştır.

#### 4.3.1. Karıştırma Tekniği ile Üretilmiş Zein Filmlerin Çift Yönlü Olarak Oriente Edilmiş Polipropilen Filmlerle Birleştirilmesi

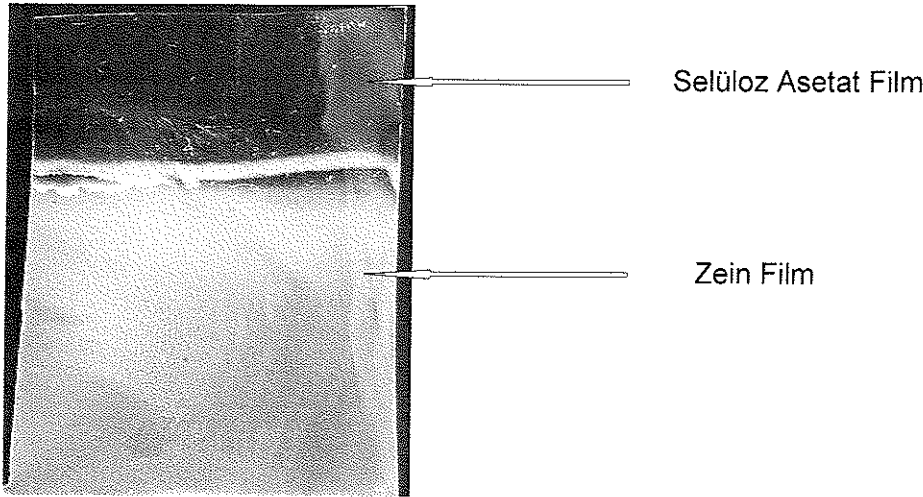
Yapılan çalışmalar sonucunda zein filmlerin çift yönlü olarak oriente edilmiş polipropilen (BOPP) filmlerle uyumlu oldukları ve bu filmlerin yüzeyine dökülünce düzgün bir film tabakası oluşturarak plastik filme tutundukları belirlenmiştir (Şekil 4.21). Elde edilmiş olan bir yüzü zein, diğer yüzü polipropilenden oluşan film elde eğilip büküldüğü ve hafifce buruşturulduğu zaman iki film birbirinden ayrılmamaktadır. Ancak, filmin bir köşesinden iki film arasına ince uçlu bir kesici cisimle zorlama yapıldığında filmler birbirinden ayrılabilir.



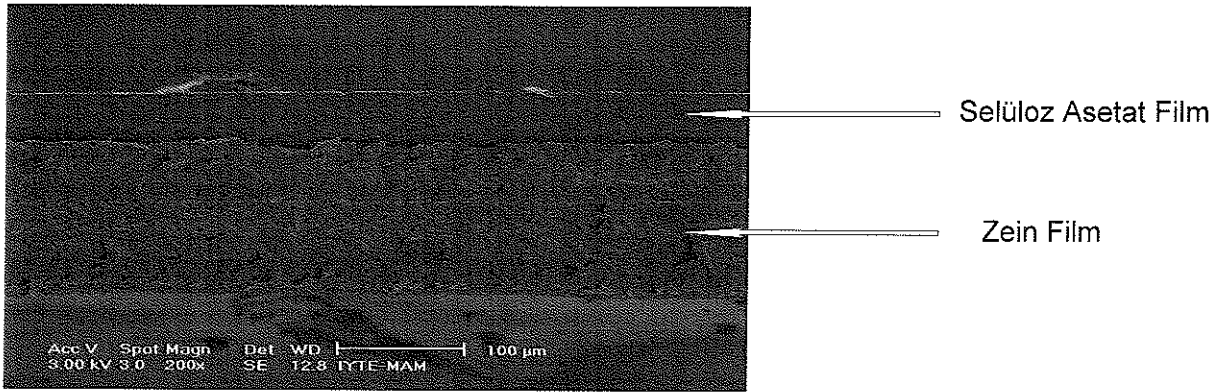
**Şekil 4.21.** Zein filmlerin BOPP filmlerin yüzeyine kaplanarak çok katlı film üretimi

#### **4.3.2. Karıştırma Tekniği ile Üretilmiş Zein Filmlerin Selüloz Asetat Filmlerle Birleştirilmesi**

Zein filmin selüloz asetat filmle birleştirilmesi çalışmaları iki filmin birbirine çok güçlü bir şekilde tutunması ve sıkıca yapışması nedeniyle oldukça başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilmiş olan zein filmle birleştirilmiş bir selüloz asetat filmin fotoğrafı Şekil 4.22'de verilmiştir. Bu filmin taramalı elektron mikroskobu (TEM) ile yüzey kesit alanı da görüntülenmiş (Şekil 4.23) ve yapıyı oluşturan selüloz asetat ve zein film tabakalarının kalınlıkları (toplam 10 ölçüm ortalaması) sırasıyla 60  $\mu\text{m}$  ve 180  $\mu\text{m}$  olarak belirlenmiştir. Üretilmiş olan bu çift tabakalı filmde her iki tabakanın birbirinden elle ayrılması mümkün olmamıştır. Aynı girişim yani zein filmin selüloz asetat yüzeyinden kaldırılması, film 24 saat boyunca su içerisinde bekletildikten sonra bile başarısız olmuş ancak bu kez ıslanarak belli oranda yumuşamış zein film plastik film yüzeyinden tırnakla daha kolay bir şekilde kazınabilmiştir. Gerçekleştirilmiş olan bu çalışma selüloz asetat filmlerin zein filmlerle kaplanmaya oldukça müsait olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.22. Zein filmle birleştirilmiş selüloz asetat filmin görünüşü



Şekil 4.23. Selüloz asetat ve 350 µg/cm<sup>2</sup> lizozim içeren zein filmin taramalı elektron mikroskobu ile yüzey kesit alanı görüntüsü

#### 4.3.2.1. Karıştırma Tekniği ile Üretilmiş Lizozim İçeren Zein Filmlerin Selüloz Asetat Filmle Birleştirildikten Sonraki Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi için Katı Besiyerinde Gerçekleştirilen Zon İnhibisyon Testleri

Antimikrobiyal testlerle selüloz asetat filmle birleştirilmiş kısmi saflaştırılmış lizozim içeren (175, 350 ve 700 µg/cm<sup>2</sup>) zein filmlerden kesilen 1.3 cm çapındaki disklerin *E. coli*, *L. innocua*, *Salmonella Typhimurium* ve *Staphylococcus carnosus* ekilmiş Petri kaplarında oluşturduğu zonlar belirlenmiştir (Tablo 4.24). Lizozimin Gram(-) bakteriler üzerindeki etkinliğinin artırılması amacıyla Na<sub>2</sub>EDTA ile kombine edildiği testlerde elde edilmiş olan sonuçlar zein-selüloz asetat filmlerin antimikrobiyal etkisinin daha önce test edilmiş olan aynı bileşimdeki zein filmlerden daha düşük olduğunu göstermektedir. Özellikle 700 µg/cm<sup>2</sup> lizozim içeren filmlerde antimikrobiyal etki Na<sub>2</sub>EDTA içermeyen *Staphylococcus carnosus* üzerinde test edilmiş olanlar haricindeki filmlerde beklenenin aksine artmamış düşmüştür. *L. innocua* üzerinde de yüksek lizozim konsantrasyonu kullanıldığında şaşırtıcı bir şekilde antimikrobiyal etki elde edilememiştir. Her ne kadar bu durum açıklanması zor kompleks bir

olay gibi görünse de zein filmlerdeki lizozim oranı arttıkça bu filmlerin hidrofiliğinin arttığı açıktır. Bu durumun geçiş deneyi sırasında daha çok hidrate olan yüksek miktarda lizozim içeren filmlerde özellikle düşük molekül ağırlıklı Na<sub>2</sub>EDTA'nın ve belli miktar lizozimin agarla temas eden zein tabakasından üstte kalan selüloz asetat tabakasına difüze ettiği ve bu durumun filmlerin antimikrobiyal kapasitesini düşürdüğü tahmin edilmektedir.

**Tablo 4.24.** Selüloz asetatla birleştirilmiş kısmi saflaştırılmış lizozim enzimi içeren zein filmlerin antimikrobiyal etkisi (Zon tipleri: tz: tam zon; kz: kısmi zon; zo: zon oluşmamış)

Test edilen mikroorganizma	Lizozim miktarı $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ <sup>a</sup>	Na <sub>2</sub> EDTA $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	İnkübasyon süresi (48 saat)	
			Ortalama tam zon alanı (cm <sup>2</sup> )	Zon tipleri ve bu zonların sayıları
<b><i>Escherichia coli</i></b>				
	-	-	0	12 zo
	-	200	1.45	2 tz / 10 zo
	175	200	1.54	6 tz / 1 kz / 5 zo
	350	200	1.18	11 tz / 1 kz
	700	200	1.05	4 tz / 4 kz / 4 zo
<b><i>Salmonella Typhimurium</i></b>				
	-	-	0	12 zo
	-	200	1.58	5 tz / 1 kz / 6 zo
	175	200	1.94	1 tz / 2 kz / 9 zo
	350	200	2.39	6 tz / 6 zo
	700	200	1.58	7 tz / 1 kz / 4 zo
<b><i>Listeria innocua</i></b>				
	-	-	0	12 zo
	175	-	1.12	11 tz / 1 kz
	350	-	1.13	5 tz / 5 kz / 2 zo
	700	-	0	12 zo
<b><i>Staphylococcus carnosus</i></b>				
	-	-	0	12 zo
	175	-	0	12 zo
	350	-	0.76	8 tz / 4 kz
	700	-	0.86	10 tz / 2 kz

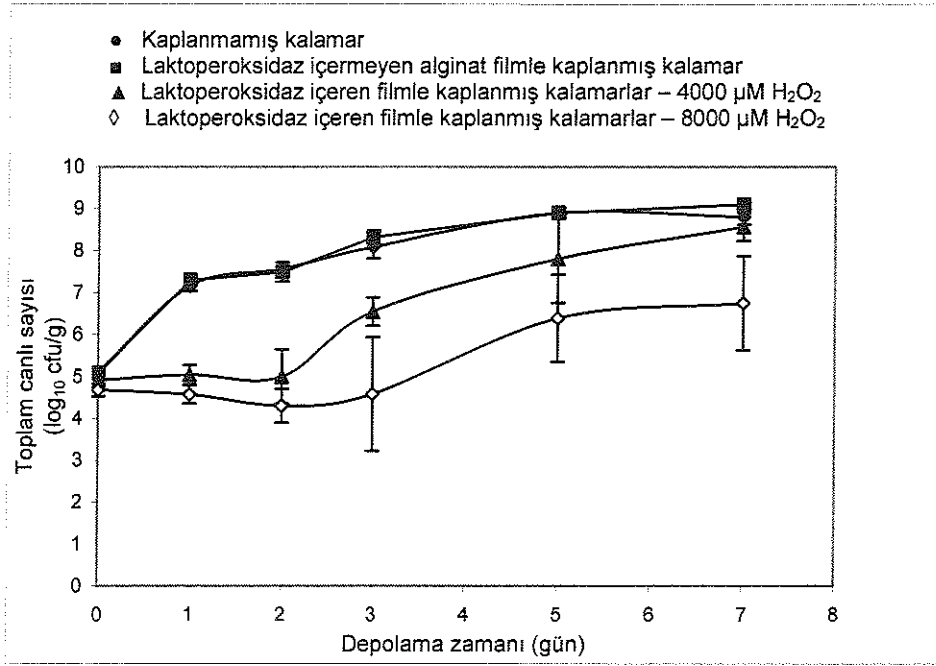
<sup>a</sup>Zein filmlerin içerisindeki lizozimin aktivitesi 5780 U/mg dır.

#### 4.4. Üretilen Yenebilir Filmlerin Gıdalara Uygulanması

##### 4.4.1. Taze Kalamar Halkalarının Laktoperoksidaz İçeren Alginat Filmlerle Kaplanması

Alginat filmlerle birleştirilmiş laktoperoksidaz sisteminin antimikrobiyal etkisinin gıdalarda belirlenmesi amacıyla kalamar halkaları kullanılmıştır. Laktoperoksidaz içeren alginat filmle kaplanmış kalamarların depolama boyunca (4 °C da 7 gün süreyle) toplam canlı mikroorganizma sayıları belirlenmiştir. Kalamarların daldırıldığı alginat film çözeltileri içerisinde

aktivitesi 2921 U/mg olarak belirlenmiş olan laktoperoksidazdan 2.2 mg/g film çözeltisi kadar ilave edilmiştir. Bu çözelti aynı zamanda 4000  $\mu\text{M}$  KSCN içermektedir. Alginat filmle kaplanmış ve sonra  $\text{CaCl}_2$ 'le çapraz bağlanmış olan kalamar parçaları 4000 veya 8000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  içeren su içerisinde soğukta depolanmışlardır. Kontrol olarak kaplanmadan ve laktoperoksidaz içermeyen alginat filmle kaplandıktan sonra su içerisinde depolanan kalamar parçaları kullanılmıştır. Elde edilmiş olan sonuçlar Şekil 4.24'de görülmektedir. Buna göre Laktoperoksidaz, KSCN ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  içeren laktoperoksidaz sistemi bulunan ortamda depolanmış olan örneklerde daha az bir mikrobiyal üreme olduğu açıkça görülmektedir. Öyle ki kontrol örneklerde mikrobiyal bozulma sınırı sayılan toplam canlı mikroorganizma sayısının 6-7  $\log_{10}$  cfu/g düzeyine ulaşması ve bu değeri aşması yalnızca 1 gün sürerken, aynı değere ulaşılması 4000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  kullanılmış olan sistemde 3-4 gün, 8000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  kullanılan sistemde 5-6 gün sürmektedir.

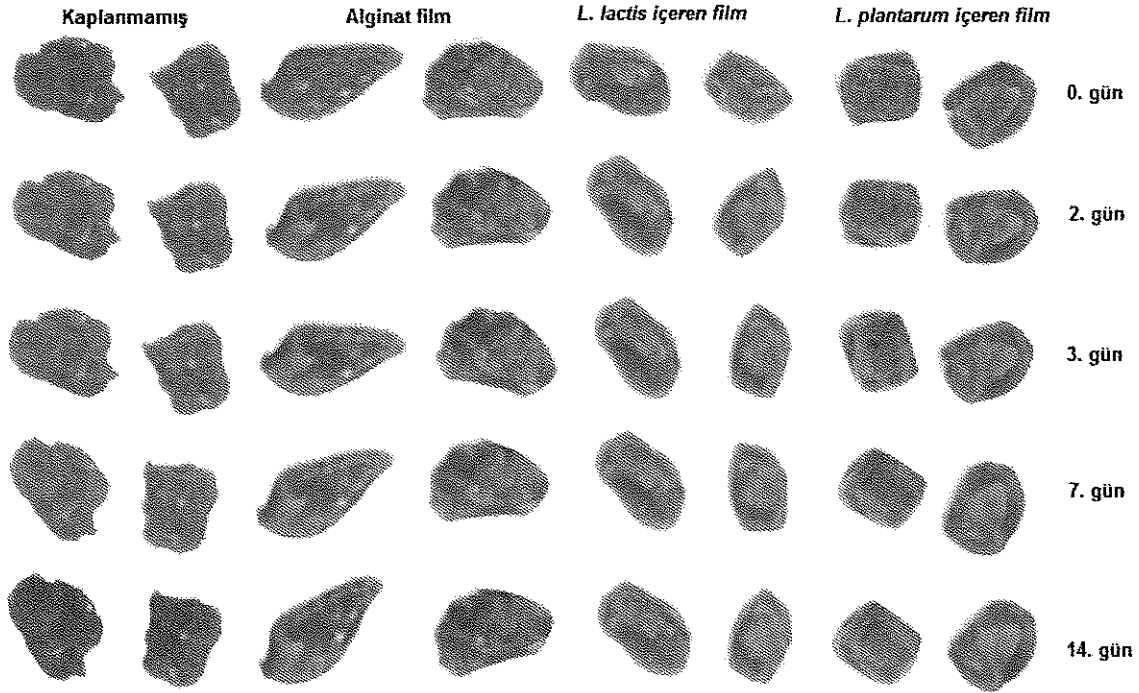


**Şekil 4.24.** Laktoperoksidaz içeren alginat filmle kaplanmış kalamar halkalarının depolama sırasındaki mikrobiyal yük değişimi

#### 4.4.2. Kuşbaşı Etlere Laktik Asit Bakterisi İçeren Alginat Filmlerle Kaplanması

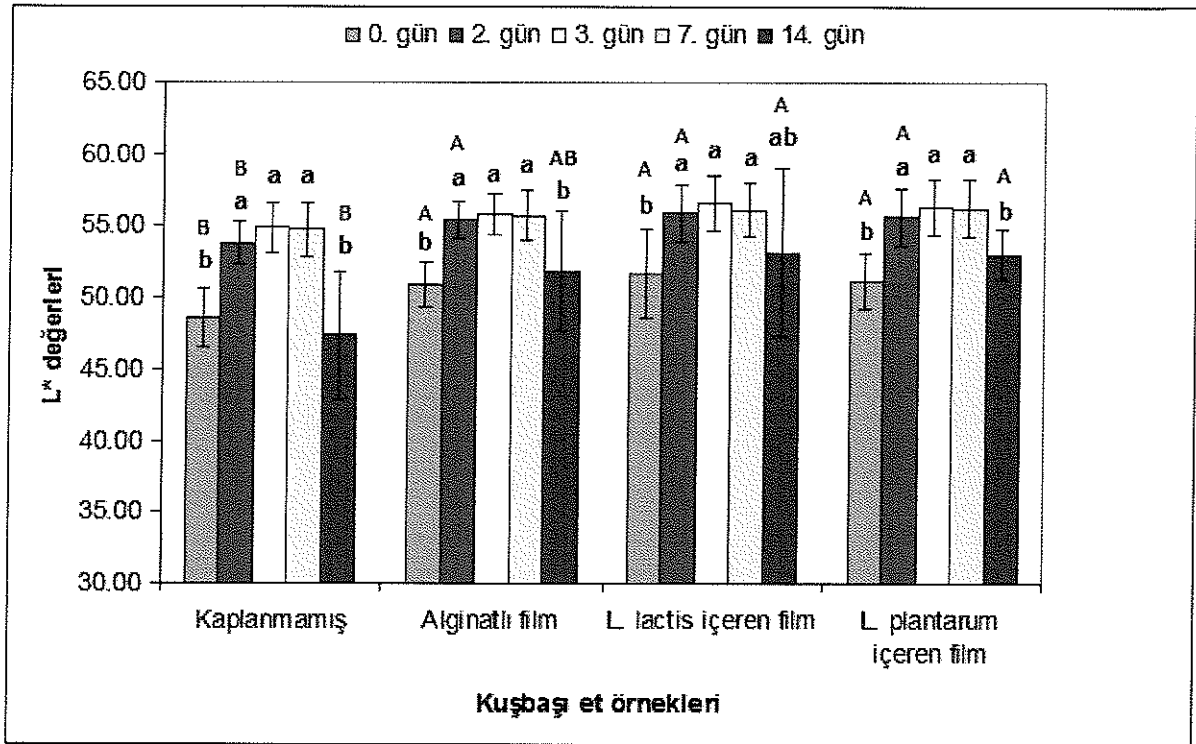
Kuşbaşı etler *L. delbrueckii* subsp. *lactis* veya *L. plantarum* (9 mg/g) içeren %2 alginat çözeltisine daldırılarak kaplanmışlar ve 4 °C'da 14 gün süreyle depolanmıştır. Kaplanmamış kuşbaşı et örnekleri, bakteri içermeyen alginat filmle kaplanmış örnekler ve *L. delbrueckii* subsp. *lactis* veya *L. plantarum* içeren alginat filmle kaplanmış kuşbaşı örneklerin depolama sırasında renklerdeki değişimi belirlemek amacıyla 0., 2., 3., 7. ve 14. günlerde kameralı

görüntü analiz cihazı ile resimleri çekilmiştir. Herbir uygulama için temsili 2 örnek seçilerek depolamanın 14. güne kadar örneklerin toplu olarak resmi Şekil 4.25'de verilmiştir.

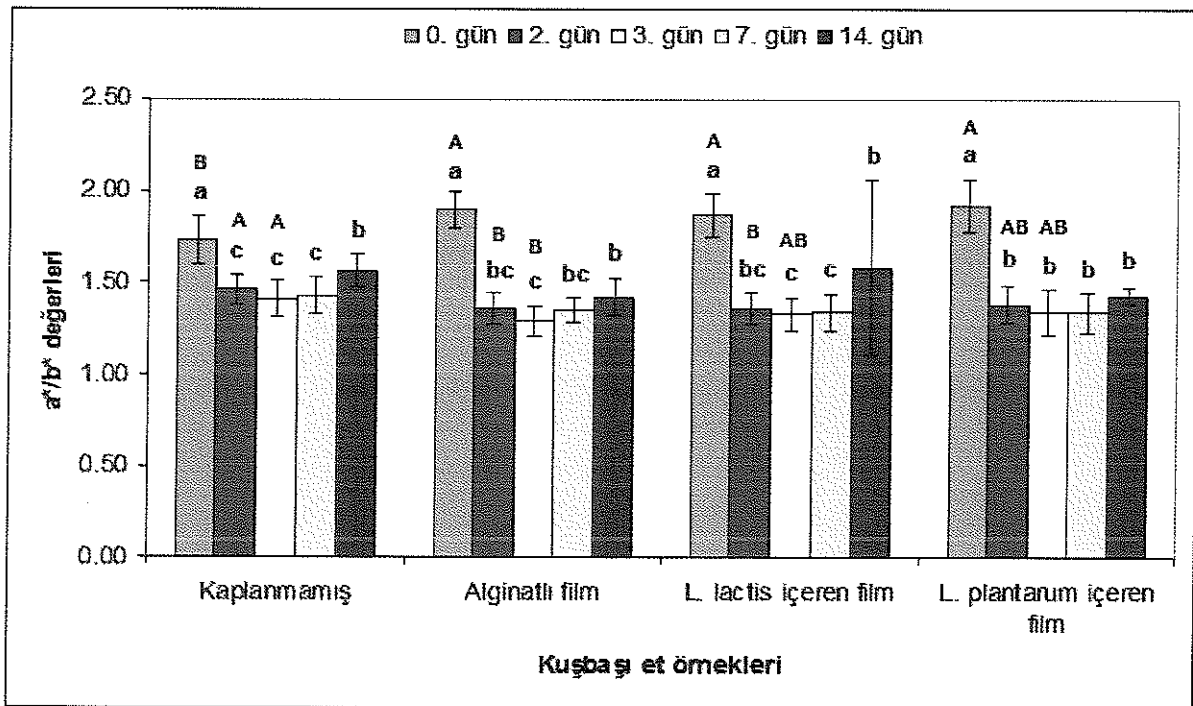


**Şekil 4.25.** Kaplanmamış, laktik asit bakterisi içermeyen alginat filmle kaplanmış ve iki farklı laktik asit bakterisi içeren alginat filmlerle kaplanmış kuşbaşı et örneklerinin 14 günlük depolama sırasındaki resimleri

Örneklerin depolama süresince  $L^*$  (aydınlık değeri) ve  $a^*/b^*$  (kırmızılık indeksi) değerleri belirlenmiştir (Şekil 4.26 ve 4.27). Şekil 4.25'de görüldüğü üzere tüm örnekler 0. günde daha koyu renkli olmakla birlikte 14. günde sadece kaplanmamış örnekler koyu renkli görülmektedir.  $L^*$  değerlerine bakıldığında 0. günde tüm örneklerin  $L^*$  değerleri 48.62-51.73 arasında değişim göstermektedir. Ancak depolama sırasında kaplanmamış örneklerin  $L^*$  değerlerinde yükselme gözlemlenmiş ancak 14. günde tekrar 0. güne yakın bir değere düşüş olmuştur. Laktik asit bakterisi içermeyen alginat filmle kaplanmış örneklerde 0. günden sonra  $L^*$  değerlerinde yükselme olmakla birlikte 14. günde  $L^*$  değeri 0. gündekine yakın bir değere düşmüştür. Laktik asit bakteri içeren alginat filmlerle kaplanan diğer örneklerde  $L^*$  değerlerinde artış gözlemlenmiştir. Kırmızılık indeksi 0. günde tüm örneklerde en yüksek değerlerde olup depolama sırasında kırmızılık indeksinde düşüş gözlemlenmektedir. Kaplanmamış örneklerin 0. gün dışındaki günlerde kırmızılık indeksi diğer örneklerle kıyasla daha yüksektir.



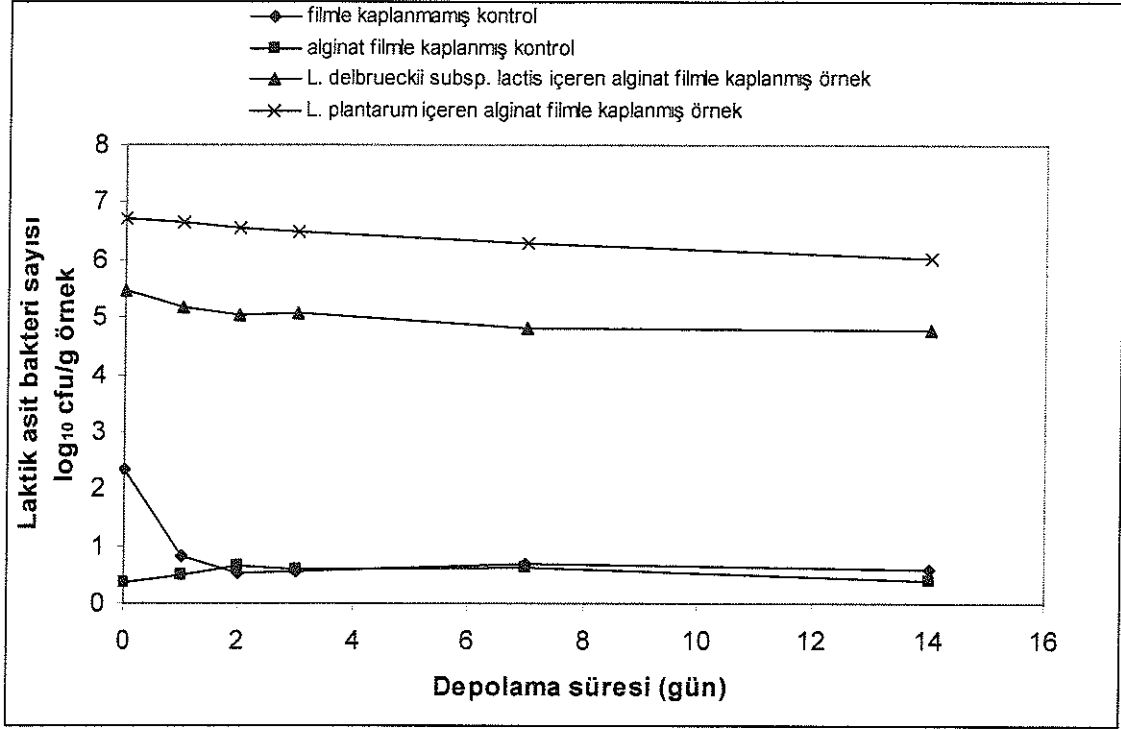
**Şekil 4.26.** Depolama sırasında kuşbaşı et örneklerinin L\* değerleri (<sup>a-b</sup>: Farklı harfler aynı filmle kaplanmış örneklerin depolama sırasında istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir. <sup>A-B</sup>: Farklı harfler aynı depolama gününde farklı filmlerle kaplanmış örnekler arasında istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.)



**Şekil 4.27.** Depolama sırasında kuşbaşı et örneklerinin a\*/b\* değerleri (<sup>a-b</sup>: Farklı harfler aynı filmle kaplanmış örneklerin depolama sırasında istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir. <sup>A-B</sup>: Farklı harfler aynı depolama gününde farklı filmlerle kaplanmış örnekler arasında istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.)



Şekil 4.28'de kültür ilave edilmiş alginat filmlerle kaplanmış etlerdeki laktik asit bakterisi sayısındaki artış net bir şekilde görülmektedir. Kültür içeren alginat filmle kaplanmış etlerde laktik asit bakterisi sayısı hiçbir alginat filmle kaplanmamış örneklere göre en az 3-4 desimal daha yüksek bir düzeydedir. 2 haftalık depolama süresince, kültür ilave edilmiş alginat filmlerle kaplanmış örneklerde laktik asit bakterisi sayısında hafif bir azalma olmuştur. Ancak, bu azalış kayda değer bir düzeyde değildir. Depolama sırasında kültür içermeyen alginat filmle kaplanmış et örneklerinde laktik asit bakterisi sayısı oldukça düşük bir düzeyde olup bu durum depolama boyunca değişmemiştir. Herhangi bir filmle kaplanmamış et örneklerinde başlangıçtaki laktik asit bakterisi sayısı alginat filmle kaplanmamış örneklere göre daha yüksek bir düzeydedir. Buna karşın depolamanın hemen ardından bu örneklerin laktik asit bakterisi sayısında neredeyse 2 desimali (% 99) bulan bir azalış meydana gelmiştir. Kontrol örneğindeki laktik asit bakterisi sayısındaki bu dikkat çekici düşüş depolama sırasındaki herhangi bir sıcaklık derecesi yükselişi durumunda sözkonusu örnekte doğal olarak bulunan laktik asit bakterilerinin hızla üreyerek ette patojenlerin gelişmesini engelleyebilecek potansiyele sahip olduğu konusunda kuşku yaratmaktadır. Diğer yandan kültür içermeyen alginat filmlerle kaplanmış örneklerde laktik asit bakterisi sayısının başlangıçtan itibaren düşük olmasının ise literatürde bazı araştırmacılarca belirtildiği şekilde alginat filmlerin gıda yüzeyindeki bakterileri matrisi içerisine alarak tutuklaması ve gelişimlerini engellemesiyle ilgili olduğu düşünülmektedir (LINDSTROM, 1992). Özetlenecek olursa kültür eklenmiş filmle kaplama yapılarak etlerin yüzeydeki laktik asit bakterisi sayısı baştan itibaren yüksek tutulmuş ve depolama sırasında laktik asit bakterisi sayısı çok az bir azalma göstermiştir. Bu örneklerde depolama sırasında herhangi bir sıcaklık artışı olması durumunda bozulmanın hızla üreyecek laktik asit bakterilerince gerçekleştirilmesi beklenmektedir. Elde edilmiş olan bu sonuç film içerisine ilave edilmiş laktik asit bakterilerinin patojenlerin üremesini bastıran-engelleyen gıda güvenlik sistemleri oluşturulmasında kullanılabilmesi adına olumludur.



Şekil 4.28. Farklı laktik asit bakterileri içeren alginat filmlerle kaplanmış et örneklerinde 4°C'da depolama sırasında laktik asit bakterisi sayısındaki değişim

#### 4.4.3. Dana ve Hindi Burgerlerin Lisozim İçeren Zein Filmlerle Kaplanması

##### 4.4.3.1. Dana Burgerlerle İlgili Sonuçlar

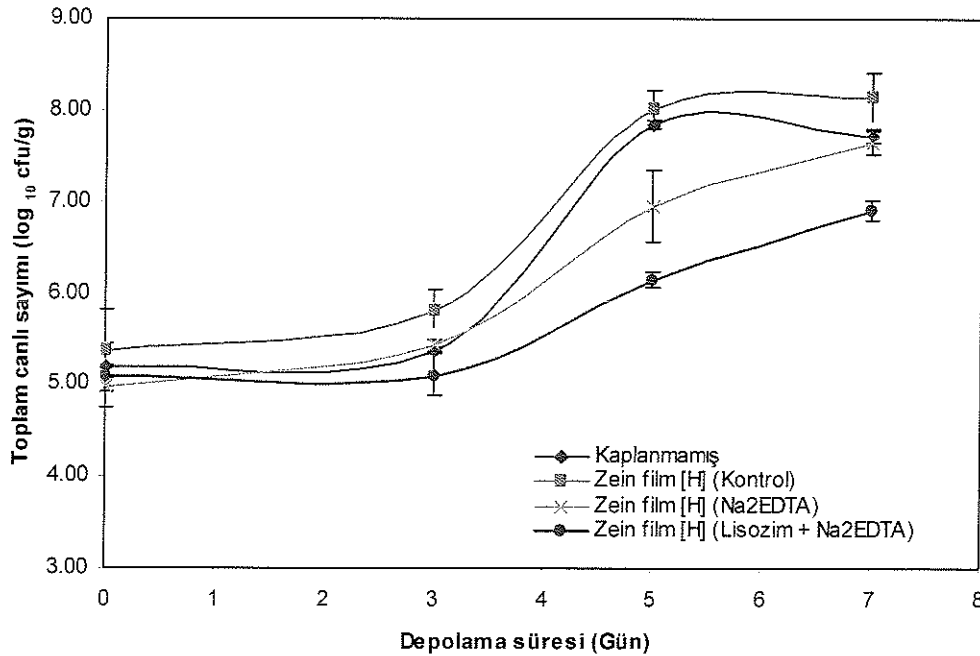
Dana burgerler için toplam canlı sayımı sonuçları Tablo 4.25 ve Şekil 4.29 ile 4.30'da ve verilmiştir. Elde edilmiş olan verilere göre aktif paketlenmenin burgerlerin başlangıç mikrobiyal yükü üzerine kayda değer bir etkisi yoktur. Ancak, lisozim ve Na<sub>2</sub>EDTA içeren karıştırma veya homojenizasyonla üretilmiş zein filmlerle kaplanmış burgerlerde toplam canlı mikroorganizma sayısı 5. günde diğer örneklerle kıyasla yaklaşık 1-2 log, 7. günde ise 0.5-1 log daha düşüktür. Diğer örnekler mikrobiyal yüklerinin limit değeri olan 7 log<sub>10</sub> cfu/g değerine yaklaşık 5. günün sonunda ulaşmıştır, ancak lisozim ve Na<sub>2</sub>EDTA içeren filmlerle kaplanmış örnekler bu değere 7. günün sonunda ulaşmaktadır. Özet olarak dana burgerlerde raf ömrünün geliştirilen lisozim ve Na<sub>2</sub>EDTA içeren filmler sayesinde yaklaşık 2 gün arttığını söylemek mümkündür. Depolama sırasında koliform sayılarındaki değişim de Tablo 4.26 ve Şekil 4.31 ve 4.32 de verilmiştir. Koliform sayımlarında aynı depolama gününde lisozim ve Na<sub>2</sub>EDTA içeren zein filmle kaplanmış örneklerde yaklaşık 0.5-1 log düşüş gözlemlenmiştir. Bu denemede homojenizasyon veya karıştırma tekniği ile üretilmiş lisozim içeren filmlerin antimikrobiyal performansı arasında belirgin bir farklılık belirlenememiştir. Ancak,

antimikrobiyal aktivitenin film yüzeyine daha heterojen olarak dağıldığı karıştırma tekniği ile üretilmiş filmlerde lokal olarak filmin ölü noktalarında patojen gelişme riskinin homojenizasyon tekniği ile üretilmiş filmlere göre daha yüksek olduğu tartışılmazdır.

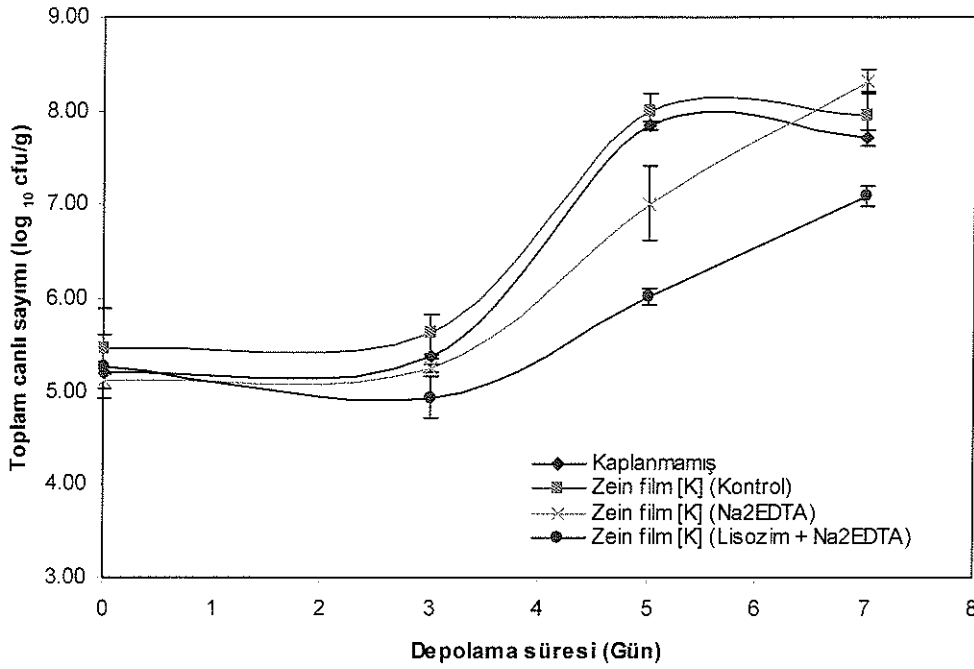
**Tablo 4.25.** Dana burgerlerin depolama sırasındaki toplam canlı mikroorganizma sayıları

Dana burger örnekleri	Toplam Canlı Mikroorganizma Sayısı, $\log_{10}$ cfu/g			
	0. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün
Kaplanmamış	5.20±0.01	5.38±0.02	7.84±0.04	7.71±0.08
Zein film [H] (Kontrol)	5.39±0.17	5.82±0.24	8.02±0.30	8.15±0.03
Zein film [H] (300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )	4.99±0.09	5.44±0.08	6.94±0.49	7.65±0.42
Zein Film [H] (700 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ lizozim + 300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )	5.09±0.02	5.10±0.16	6.14±0.14	6.90±0.34
Zein film [K] (Kontrol)	5.46±0.43	5.63±0.21	7.99±0.19	7.96±0.26
Zein film [K] (300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )	5.12±0.08	5.25±0.05	7.02±0.39	8.31±0.13
Zein Film [K] (700 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ lizozim + 300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )	5.28±0.35	4.94±0.22	6.01±0.09	7.10±0.10

[H]: Homojenizasyon tekniğiyle üretilmiş film, [K]: Karıştırma tekniğiyle üretilmiş film



**Şekil 4.29.** Homojenizasyon tekniği ile üretilmiş zein filmlerle kaplanmış dana burgerlerin depolama sırasındaki toplam canlı mikroorganizma sayımları

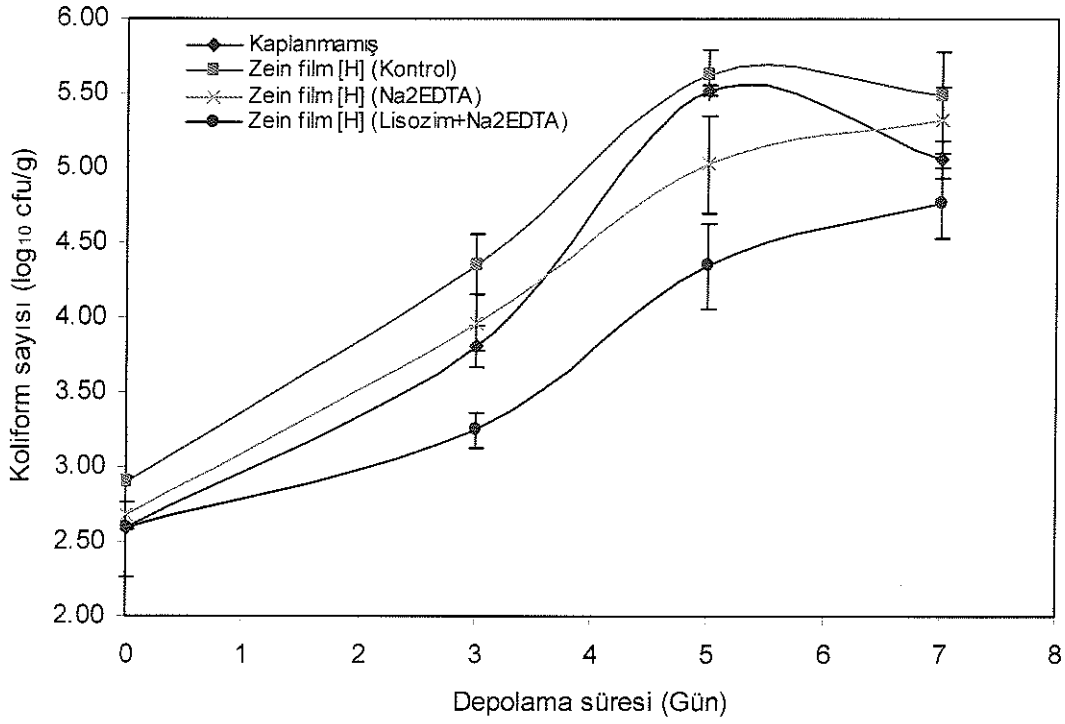


**Şekil 4.30.** Karıştırma tekniği ile üretilmiş zein filmlerle kaplanmış dana burgerlerin depolama sırasındaki toplam canlı mikroorganizma sayımları

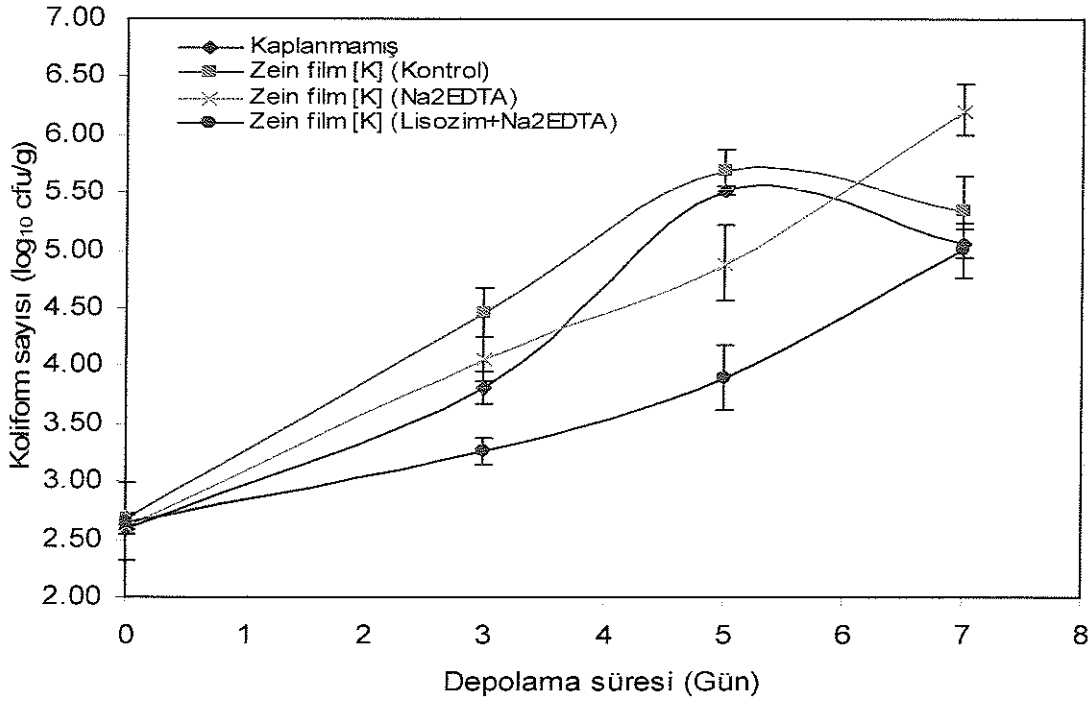
**Tablo 4.26.** Dana burgerlerin depolama sırasındaki koliform sayıları

Dana burger örnekleri	Koliform Sayısı, log <sub>10</sub> cfu/g			
	0. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün
Kaplanmamış	2.60±0.02	3.81±0.14	5.52±0.04	5.06±0.12
Zein film [H] (Kontrol)	2.90±0.34	4.35±0.09	5.62±0.10	5.48±0.07
Zein film [H] (300 µg/cm <sup>2</sup> Na <sub>2</sub> EDTA)	2.68±0.04	3.96±0.41	5.02±0.12	5.32±0.36
Zein Film [H] (700 µg/cm <sup>2</sup> lisozim + 300 µg/cm <sup>2</sup> Na <sub>2</sub> EDTA)	2.60±0.10	3.25±0.06	4.34±0.02	4.76±0.48
Zein film [K] (Kontrol)	2.68±0.03	4.46±0.21	5.70±0.17	5.35±0.30
Zein film [K] (300 µg/cm <sup>2</sup> Na <sub>2</sub> EDTA)	2.62±0.08	4.06±0.19	4.89±0.33	6.21±0.22
Zein Film [K] (700 µg/cm <sup>2</sup> lisozim + 300 µg/cm <sup>2</sup> Na <sub>2</sub> EDTA)	2.66±0.33	3.26±0.12	3.90±0.29	5.01±0.24

[H]: Homojenizasyon tekniğiyle üretilmiş film, [K]: Karıştırma tekniğiyle üretilmiş film

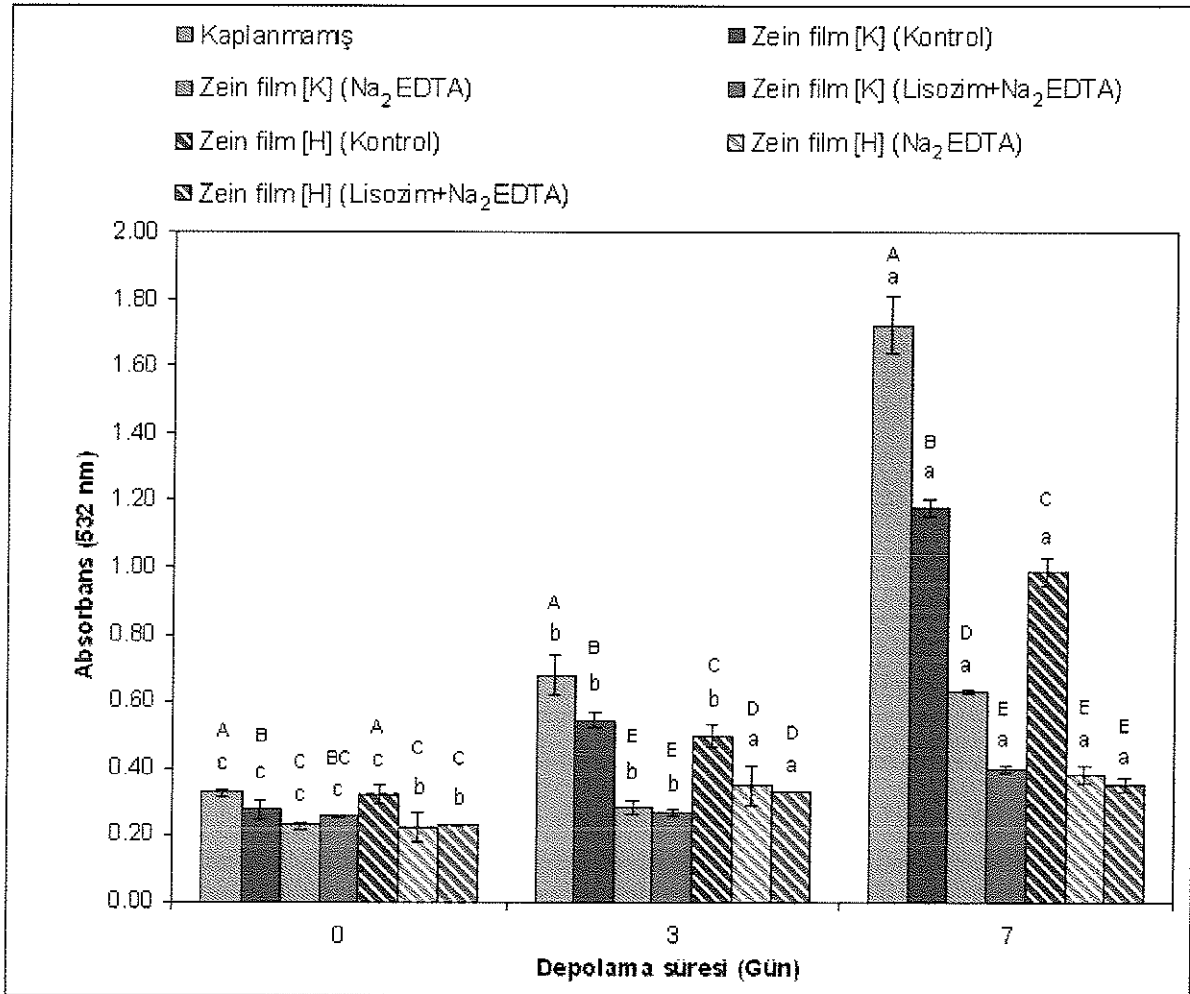


**Şekil 4.31.** Homojenizasyon tekniği ile üretilmiş zein filmlerle kaplanmış dana burgerlerin depolama sırasındaki koliform sayımları



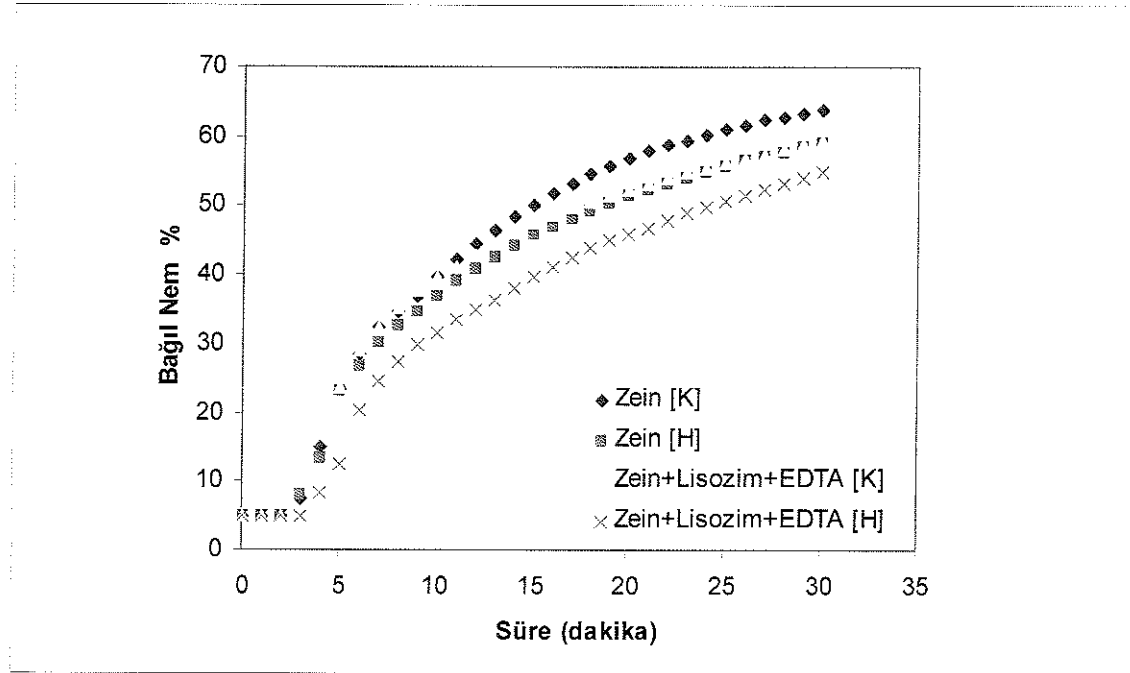
**Şekil 4.32.** Karıştırma tekniği ile üretilmiş zein filmlerle kaplanmış dana burgerlerin depolama sırasındaki koliform sayımları

Homojenizasyon ve karıştırma tekniği ile üretilmiş farklı zein filmlerle kaplanmış dana burgerlerin depolama sırasındaki oksidasyon durumları Şekil 4.33'de verilmiştir. Zein filmlerle kaplanmamış kontrol örneklerde oksidasyon düzeyi depolama sırasında artış gösterirken lisozim+Na<sub>2</sub>EDTA içeren filmlerle kaplanmış örneklerde oksidasyonun göstergesi olan absorbans değerlerinin daha düşük olduğu görülmektedir. Sadece Na<sub>2</sub>EDTA içeren filmle kaplanmış örneklerde de oksidasyon zein filmle kaplanmış veya kaplanmamış kontrol örneklere göre oldukça düşüktür. Bu durum oksidatif stabilitenin antioksidant etkisi olduğu zaten bilinen Na<sub>2</sub>EDTA'dan kaynaklandığını açıkça göstermektedir. Depolamanın 3. gününde homojenizasyon ve karıştırma teknikleri arasında istatistiksel açıdan fark görülürken 7. gündeki örneklerde herhangi bir farka rastlanmamıştır. Buna göre geliştirilmiş olan lisozim ve Na<sub>2</sub>EDTA içeren filmlerin antimikrobiyal etki yanında antioksidan etkiye de sahip oldukları açıktır.



**Şekil 4.33.** Soğukta depolanan dana burgerlerin oksidasyon durumları (<sup>a-b</sup>: Farklı harfler aynı bileşimdeki filmle kaplanmış örneklerin depolama sırasında istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir. <sup>A-B</sup>: Farklı harfler aynı depolama gününde farklı filmlerle kaplanmış örnekler arasında istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.) [H]: Homojenizasyon tekniğiyle üretilmiş film, [K]: Karıştırma tekniğiyle üretilmiş film

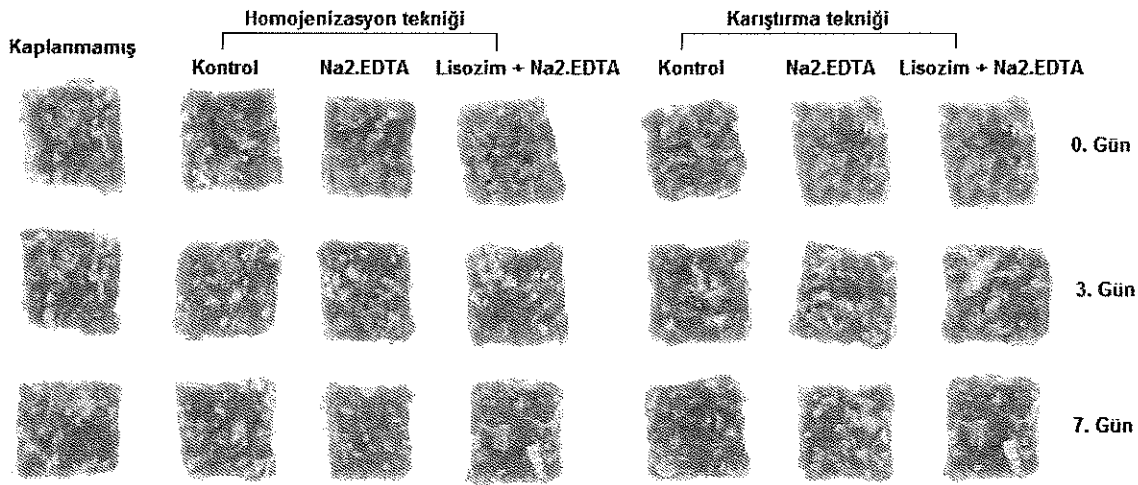
Homojenizasyon veya karıştırma tekniği ve  $700 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  lizozim +  $300 \mu\text{g}/\text{cm}^2$   $\text{Na}_2\text{EDTA}$  ilavesinin zein filmlerin su buharı geçirgenliklerine olan etkilerini incelemek amacıyla, üretilen filmler 100% doymuş su buharına maruz bırakılmıştır. Filmlerin üst kısmıyla temas eden hücrede geçen su buharı nedeni ile zamana karşı bağıl nemdeki artış kaydedilmiştir ve sonuçlar Şekil 4.34'de gösterilmiştir. Şekilden görüleceği gibi karıştırma tekniği ile üretilen filmlerin su buharı geçirgenlikleri homojenizasyon tekniği ile üretilen filmlerinkine kıyasla daha yüksektir. Bu durum karıştırma tekniğinde kullanılan karıştırıcının film çözeltisinde yeterince homojen bir karışım sağlayamaması ve bunun sonucu filmde mikro gözeneklerin oluşmasından kaynaklanmaktadır. Zein filmlere  $700 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  lizozim +  $300 \mu\text{g}/\text{cm}^2$   $\text{Na}_2\text{EDTA}$  ilavesi filmlerin su buharı geçirgenliğini azaltmaktadır. Hidrofilik karakterdeki lizozimin hidrofobik bir biyopolimer olan zeine ilave edilmesi zein filmlerin hidrofilik karakterini artırmakla birlikte, lizozimin film içinde agregatlar oluşturması su buharının filmden geçişini zorlaştırmakta, böylece lizozimli zein filmlerin su buharı geçirgenliği azalmaktadır. Diğer taraftan zein filmlerin 133 mikron civarındaki kalınlıkları lizozim ve  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  ilavesi ile 214 mikrona çıkmıştır. Bu durumda su buharının filmlerden geçmesi için gerekli olan süre uzamış, dolayısıyla filmlerin üst hücredeki nem artışı daha yavaş gerçekleşmiştir.



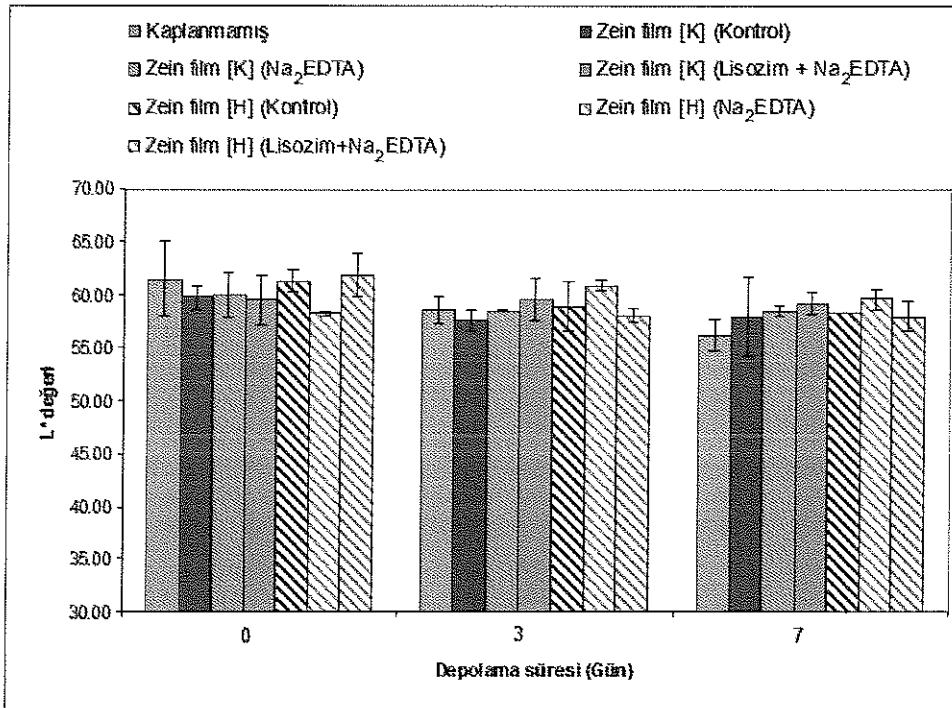
**Şekil 4.34.** Zein filmlerin ve  $700 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  lizozim +  $300 \mu\text{g}/\text{cm}^2$   $\text{Na}_2\text{EDTA}$  içeren filmlerin su buharı geçirgenlikleri [K]: Karıştırma tekniği ile hazırlanan filmler [H]: Homojenizasyon tekniği ile hazırlanan filmler

Hiç kaplanmamış ve homojenizasyon ve karıştırma tekniği ile üretilmiş zein filmlerle kaplanmış dana burgerlerin resimleri Şekil 4.35'de verilmiştir. Örneklerin  $L^*$  ve  $a^*/b^*$  değerleri Şekil 4.36 ve 4.37'da görülmektedir. Farklı bileşimdeki filmlerin kullanımı ve farklı depolama

süreleri örneklerin L\* değerlerinde istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturmamıştır. L\* değerleri 56.17-61.80 arasında değişmiş ve genel olarak depolama sırasında düşüş göstermiştir. Film üretiminde homojenizasyon ve karıştırma tekniğinin kullanılmasının örneklerin L\* değerleri üzerinde bir etkisi olmamıştır. Örneklerin a\*/b\* değerleri depolama sırasında düşüş göstermiştir. Tek başına Na<sub>2</sub>EDTA ve lizozim+Na<sub>2</sub>EDTA içeren zein filmlerle kaplanmış örneklerin a\*/b\* değerleri diğer örneklere kıyasla daha düşük bulunmuştur.

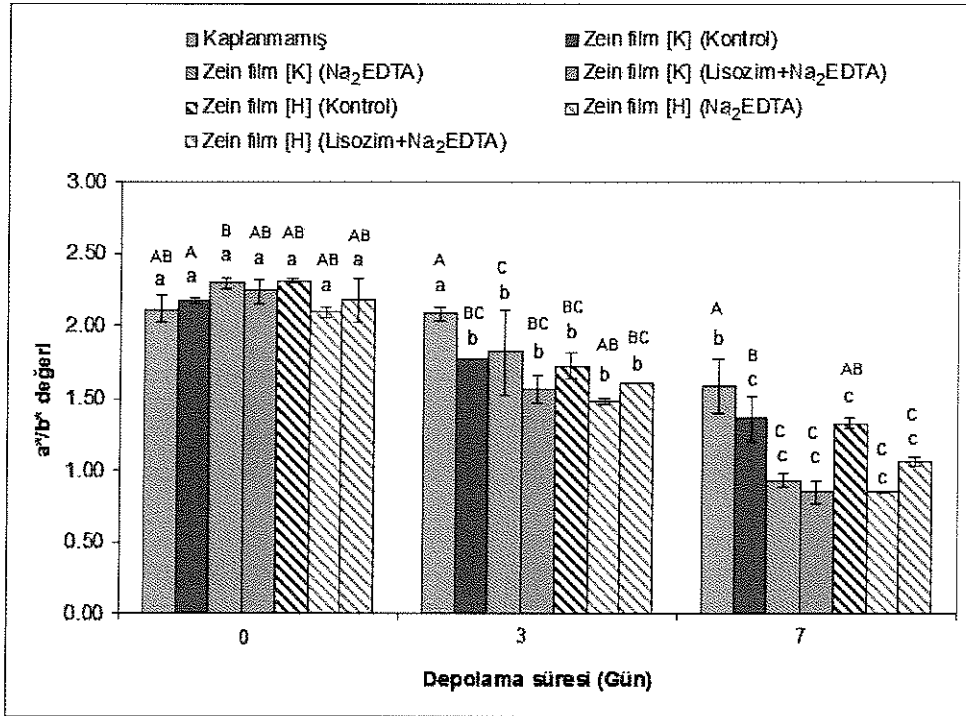


**Şekil 4.35.** Kaplanmamış, homojenizasyon ve karıştırma tekniği ile üretilmiş kontrol, 300 µg/cm<sup>2</sup> Na<sub>2</sub>EDTA ve 700 µg/cm<sup>2</sup> lizozim+300 µg/cm<sup>2</sup> Na<sub>2</sub>EDTA içeren zein filmlerle kaplanmış dana burgerlerin 7 günlük depolama sırasındaki görünüşleri



**Şekil 4.36.** Homojenizasyon [H] ve karıştırma tekniği [K] ile üretilmiş zein filmlerle kaplanmış dana burgerlerin depolama sırasındaki L\* değerleri





**Şekil 4.37.** Homojenizasyon [H] ve karıştırma [K] tekniği ile üretilmiş zein filmlerle kaplanmış dana burgerlerin depolama sırasındaki a\*/b\* değerleri (<sup>a-b</sup>:Farklı harfler aynı bileşimdeki filmle kaplanmış örneklerin depolama sırasında istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir. <sup>A-B</sup>:Farklı harfler aynı depolama gününde farklı filmlerle kaplanmış örnekler arasında istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.)

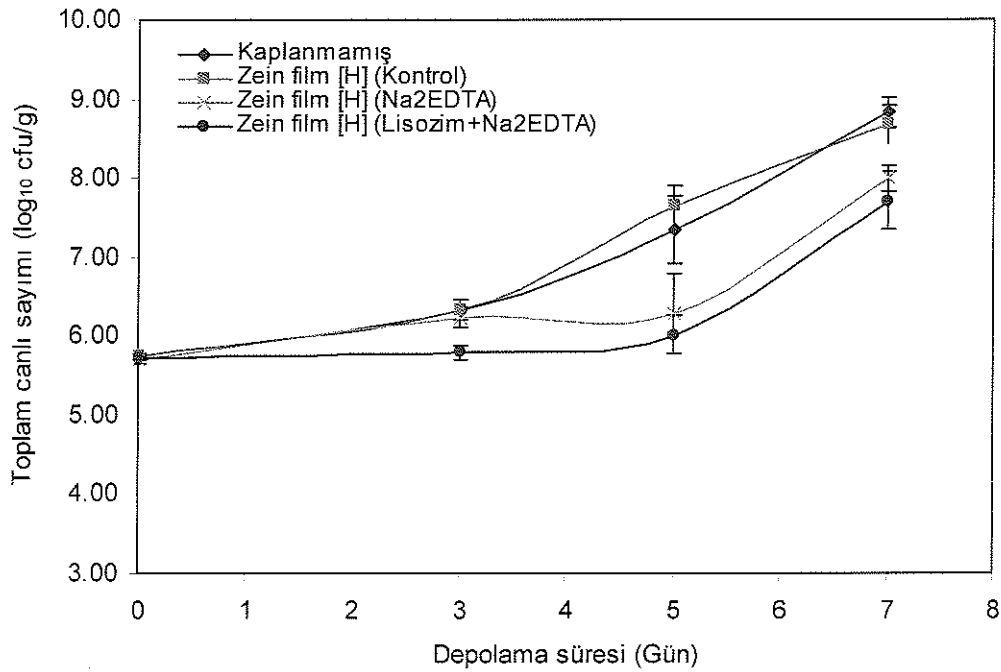
#### 4.4.3.2. Hindi Burgerlerle İlgili Sonuçlar

Dana burgerlere uygulanmış olan benzer paketleme denemesi aynen hindi burgerler için de uygulanmış, ancak bu kez yalnızca mikrobiyolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre depolamanın başında antimikrobiyal paketlemenin mikrobiyal yük üzerinde bir etkisi yoktur (Tablo 4.27 ve Şekil 4.38 ve 4.39). Ancak depolamanın 3. gününde bir tek lisozim ile Na<sub>2</sub>EDTA'nın birlikte kullanıldığı filmlerle paketlenmiş ürünlerde mikrobiyal yük 6 log düzeyinin altındadır. Depolamanın 5. gününde yalnızca Na<sub>2</sub>EDTA içeren filmlerle ve lisozim ile Na<sub>2</sub>EDTA içeren filmlerle paketlenmiş ürünlerin mikrobiyal yükleri kontrol örneklere göre 1-1.5 log daha düşüktür. 7. günde ise tüm örneklerin mikrobiyal yükleri limit değeri olan 7 log değerini aşmıştır. Bu şartlar altında lisozim ve EDTA içeren zein filmle kaplanmış hindi burgerlerin depolama süresinin 3 ile 5 gün arasında olduğu açıktır. Hindi burgerlerin koliform sayıları Tablo 4.28 ve Şekil 4.40 ve 4.41'de verilmiştir. Koliform sayıları depolama sırasında lisozim+Na<sub>2</sub>EDTA içeren filmle kaplanmış örneklerde diğer örneklere kıyasla yaklaşık 0.5-1 log arasında düşme gözlemlenmiştir. Ancak bu denemede de homojenizasyon ve karıştırma tekniğiyle üretilmiş zein filmlerin antimikrobiyal etkinlikleri arasında belirgin bir farklılık belirlenememiştir.

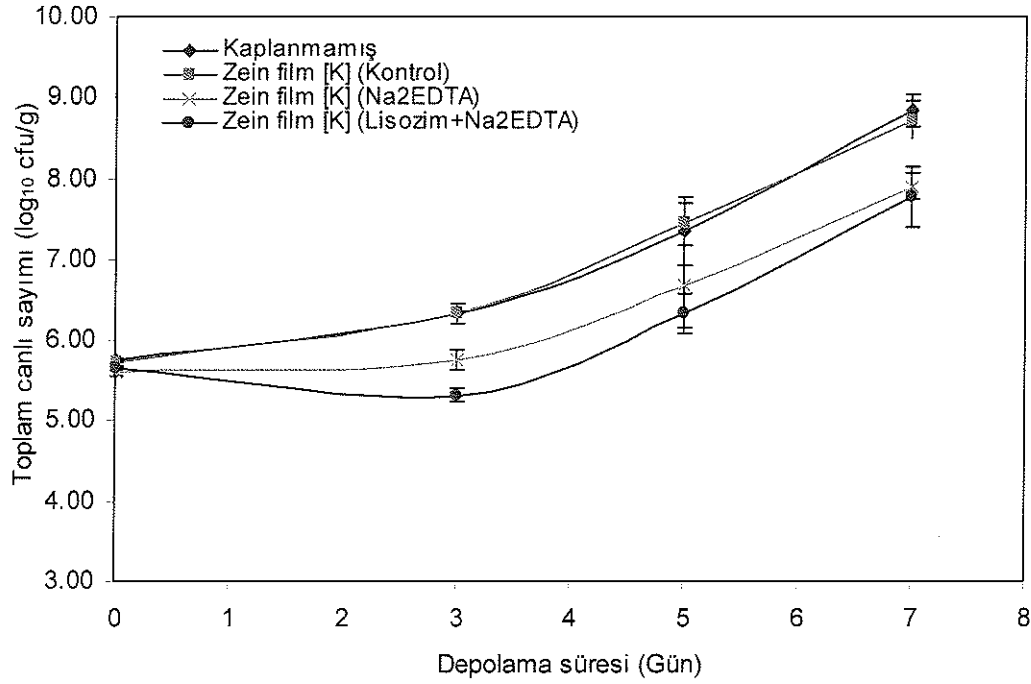
**Tablo 4.27.** Hindi burgerlerin depolama sırasındaki toplam canlı mikroorganizma sayıları

Hindi burger örnekleri	Mikrobiyal Yük, $\log_{10}$ cfu/g			
	0. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün
Kaplanmamış	5.76±0.02	6.33±0.12	7.34±0.43	8.83±0.20
Zein film [H] (Kontrol)	5.74±0.02	6.33±0.09	7.66±0.10	8.68±0.22
Zein film [H] (300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )	5.71±0.02	6.25±0.13	7.30±0.49	7.99±0.15
Zein Film [H] (700 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ lizozim + 300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )	5.72±0.02	5.79±0.46	6.01±0.09	7.71±0.54
Zein film [K] (Kontrol)	5.74±0.02	6.33±0.03	7.44±0.24	8.72±0.24
Zein film [K] (300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )	5.61±0.05	5.76±0.13	6.67±0.51	7.90±0.16
Zein Film [K] (700 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ lizozim + 300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )	5.66±0.03	5.32±0.08	6.32±0.25	7.77±0.37

[H]: Homojenizasyon tekniğiyle üretilmiş film, [K]: Karıştırma tekniğiyle üretilmiş film



**Şekil 4.38.** Homojenizasyon tekniği ile üretilmiş zein filmlerle kaplanmış hindi burgerlerin depolama sırasındaki toplam canlı mikroorganizma sayımları

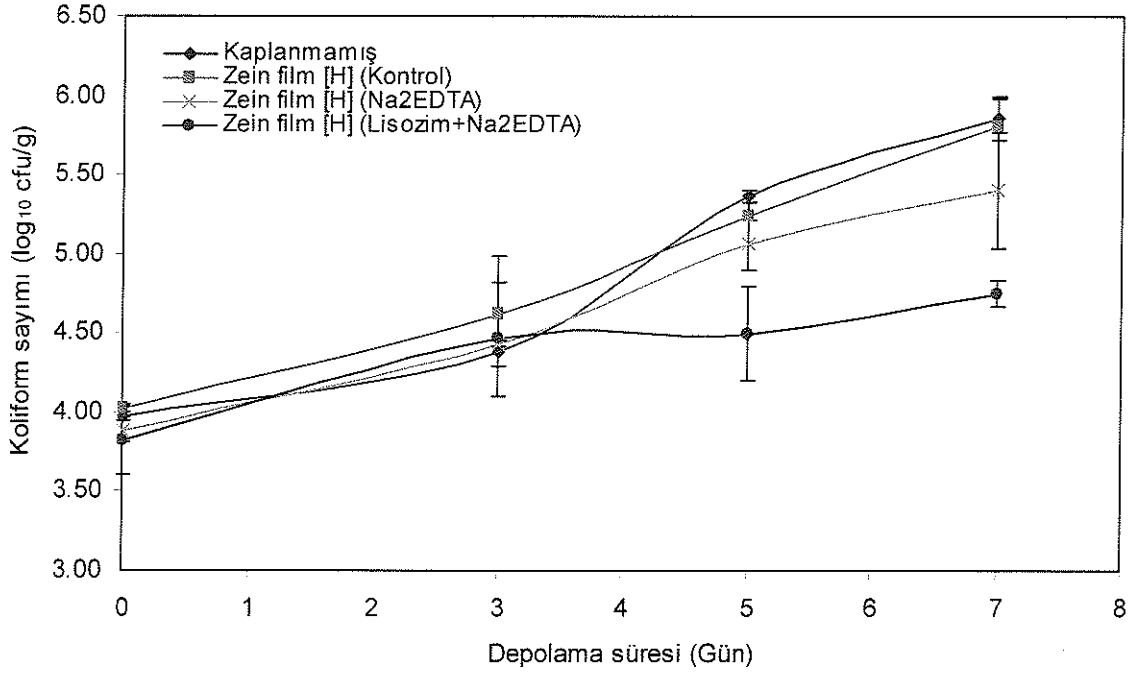


**Şekil 4.39.** Karıştırma tekniği ile üretilmiş zein filmlerle kaplanmış hindi burgerlerin depolama sırasındaki toplam canlı mikroorganizma sayıları

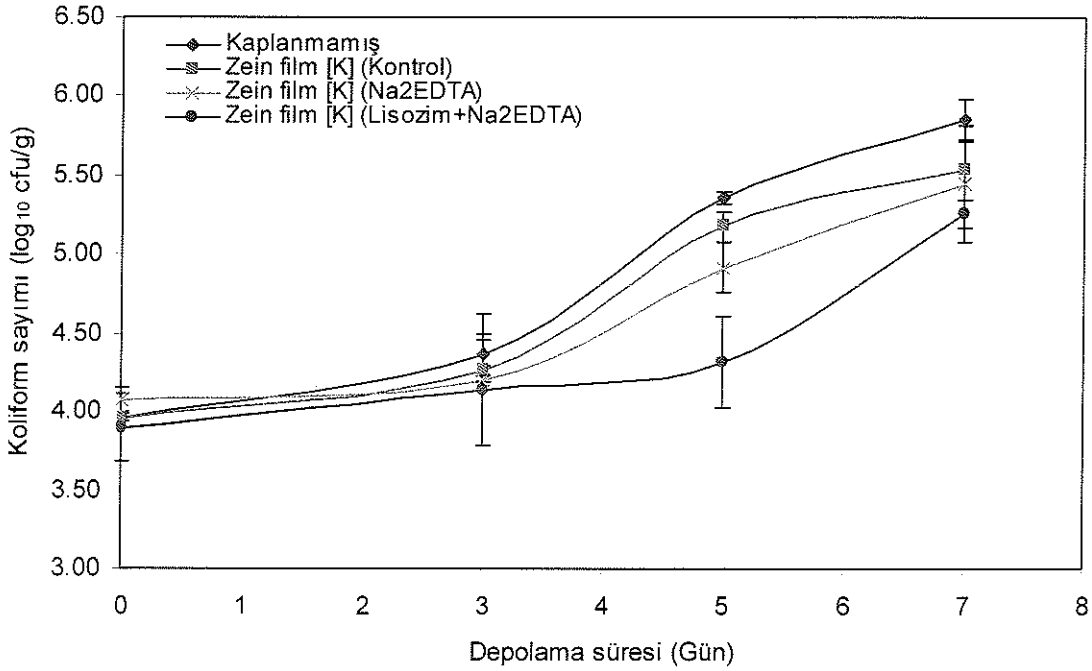
**Tablo 4.28.** Hindi burgerlerin depolama sırasındaki koliform sayıları

Dana burger örnekleri	Koliform Sayısı, log <sub>10</sub> cfu/g			
	0. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün
Kaplanmamış	3.97±0.03	4.37±0.08	5.36±0.04	5.85±0.13
Zein film [H] (Kontrol)	4.03±0.07	4.62±0.14	5.23±0.02	5.80±0.21
Zein film [H] (300 µg/cm <sup>2</sup> Na <sub>2</sub> EDTA)	3.89±0.02	4.43±0.31	5.05±0.08	5.40±0.17
Zein Film [H] (700 µg/cm <sup>2</sup> lisozim + 300 µg/cm <sup>2</sup> Na <sub>2</sub> EDTA)	3.82±0.14	4.46±0.10	4.49±0.23	4.75±0.25
Zein film [K] (Kontrol)	3.97±0.03	4.27±0.36	5.18±0.09	5.54±0.19
Zein film [K] (300 µg/cm <sup>2</sup> Na <sub>2</sub> EDTA)	4.07±0.09	4.21±0.02	4.92±0.16	5.45±0.37
Zein Film [K] (700 µg/cm <sup>2</sup> lisozim + 300 µg/cm <sup>2</sup> Na <sub>2</sub> EDTA)	3.90±0.22	4.14±0.36	4.32±0.29	5.26±0.09

[H]: Homojenizasyon tekniğiyle üretilmiş film, [K]: Karıştırma tekniğiyle üretilmiş film



**Şekil 4.40.** Homojenizasyon tekniği ile üretilmiş zein filmlerle kaplanmış hindi burgerlerin depolama sırasındaki koliform sayımları



**Şekil 4.41.** Karıştırma tekniği ile üretilmiş zein filmlerle kaplanmış hindi burgerlerin depolama sırasındaki koliform sayımları

## 5. SONUÇ

Gerçekleştirilmiş olan bu çalışma ile lizozim ve laktoperoksidaz enzimleri kullanılarak antimikrobiyal etkisi olan yenebilir zein ve alginat filmler geliştirilmiş ve bunların etkileri pek çok farklı bakteri üzerinde gösterilmiştir. Geliştirilmiş olan antimikrobiyal yenebilir filmlerden lizozim içeren zein filmler hidrofobik özellikleriyle plastik filmlerin kaplanmasına oldukça elverişli bulunmuştur. Özellikle zein filmlerin selüloz asetat filmlerle birleştirilmesiyle antimikrobiyal etkisi olan filmler geliştirilmiş, ancak bunların etkinlikleri tek başına yenebilir filmlerden daha az bulunmuştur. Geliştirilmiş olan yenebilir filmlerden laktoperoksidaz içeren alginat filmler soğukta depolanmış olan kalamarlar üzerinde antimikrobiyal etki elde etmek amacıyla başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Bu filmlerin farklı deniz ürünlerinde de benzer şekilde kullanılabilmesi değerlendirilmektedir. Lizozim içeren zein filmler ise Na<sub>2</sub>EDTA ile desteklendikleri zaman özellikle dana burgerlerde etkili bir aktif paketleme sağlamış ve hem antimikrobiyal etki, hem de antioksidan etki göstermiştir. Lizozim içeren zein filmler hindi burgerlerde daha sınırlı bir antimikrobiyal etki sağlamıştır. Zein filmlerle ilgili en büyük uygulama gücü, bu filmler içerisine lizozim gibi hidrofilik protein yapısındaki ajanların sınırlı bir şekilde ilave edilmesidir. Ancak bu çalışmada literatürde ilk kez hidrofilik karakterli bir antimikrobiyal enzim zein filmler içerisine homojenizasyon tekniği kullanılarak ilave edilmiştir. Dolayısıyla geliştirilmiş olan lizozim ve Na<sub>2</sub>EDTA içeren homojenizasyon tekniği ile üretilmiş zein filmlerin özellikle kırmızı et ürünlerinde yüzey kaplaması ve dilimler arası tabakalarda kullanılabilmesi düşünülmektedir. Çalışmada elde edilen son sonuç iki farklı laktik asit bakterisinin preparat haline getirilerek alginat filmler içerisine ilave edilmiş olmasıdır. Laktik asit bakterileri alginat filmler içerisinde oldukça yüksek bir stabilite göstermiştir. Laktik asit bakterilerini içeren alginat filmler kuşbaşı şeklindeki et ürünlerinin kaplanması amacıyla kullanılmış ve bu ürünlerdeki laktik asit bakterisi sayısını kayda değer bir şekilde artırmıştır. Laktik asit bakterileri soğukta depolama sırasında üründe gelişmemektedir. Geliştirilmiş olan bu sistemin etlerin soğukta depolanması sırasında oluşacak bir sıcaklık yükselmesi durumunda zehirlenmeyi önleyici biyogüvenlik mekanizması olarak kullanılması planlanmaktadır. Laktik asit bakterileri et ürünlerinde literatürde ilk kez bu şekilde kullanılmış olup bu uygulama geleneksel yöntemler olan bakteri süspansiyonlarının ürün üzerine püskürtülmesine kıyasla uygulama kolaylığına sahiptir.

## KAYNAKLAR

- ANON., 2004. T.C. Sağlık Bakanlığı  
[http://www.saglik.gov.tr/sb/extras/istatistikler/apk\\_2002/s\\_059\\_064.htm](http://www.saglik.gov.tr/sb/extras/istatistikler/apk_2002/s_059_064.htm) (erişim tarihi 8 Aralık 2004).
- APPENDINI, P., Hotchkiss, J.H., Review of antimicrobial food packaging, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3, 113-126, (2002).
- 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).
- BUONOCORE, G.G., Del Nobile, M.A., Panizza, A., Corbo, M.R., Nicolas, L., A general approach to describe the antimicrobial agent release from highly swellable films intended for food packaging applications, *Journal of Controlled Release*, 90, 97-107, (2003).
- BUONOCORE, G.G., Del Nobile, M.A.; Panizza, A.; Bove, S., Battaglis, G., Nicolais, L., Modeling of the lysozyme release kinetics from antimicrobial films intended for food packaging applications, *Journal of Food Science*, 68, 1365-1370. (2003).
- ELLIOT, R.M., McLay, J.C., Kennedy, M.J., Simmond, R.S., Inhibition of foodborne bacteria by the lactoperoxidase system in a beef cube system, *International Journal of Food Microbiology*, 91, 73-81, (2004).
- GARCIA-GRAELLS C., Opstal, I.V., Vanmuysen, S.C.M., Michiels, C.W., The lactoperoxidase system increases efficacy of high-pressure inactivation of foodborne bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, 81, 211-221, (2003).
- GÜÇBİLMEZ, Ç.M., Yemenicioğlu, A., Arslanoğlu, A., Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein films incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA, *Food Research International*, 40, 80-91, (2007).
- HOFFMAN, K.L., Han, I.Y., Dawson, P.L., Antimicrobial effects of corn zein films impregnated with nisin, lauric acid, and EDTA, *Journal of Food Protection*, 64, 885-889, (2001).
- HAN, J.H., Antimicrobial food packaging, *Food Technology*, 54, 56-65, (2000).
- HONG, B.S.-I., Lee, J.-W., Son, S.-M., Properties of polysaccharide-coated polypropylene films as affected by biopolymer and plasticizer types, *Packaging Technology and Science*, 18, 1-9, (2005).
- JACOB, B.M., Antony, E., Sreekumar, B., Haridas, M., Thiocyanate mediated antifungal and antibacterial property of goat milk lactoperoxidase, *Life Sciences*, 66, 2433-2439. (2000).
- JARONI, D., Brashears, M.M., Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* as influenced by media used for propagation of cells, *Journal of Food Science*, 65, 1033-1036, (2000).
- JIANG, C.M., Wang, M.C., Chang, W.H., Chang, H.M., Isolation of lysozyme from hen egg albumen by alcohol-insoluble cross-linked pes pod solid ion-exchange chromatography, *Journal of Food Science*, 66, 1089-1092, (2001).

LINDSTROM, T.R., Morimoto, K., Cante, C.J. Edible films and coatings. Encyclopedia of Food Science and Technology, ed: Y.H. Hui, Vol. 2 John Wiley and Sons. Inc., New York, (1992), pp. 659-663.

MEAD, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V., Food related illness and death in the United States, *Emerging Infectious Disease*, Sep-Oct, 5(5), 607-625, (1999).

MECİTOĞLU, Ç., Yemenicioğlu, A., Arslanoğlu, 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, 12-21, (2006).

MING, X., Weber, G.H., Ayres, J.W., Sandine, W.E., Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats, *Journal of Food Science*, 62, 413-415, (1997).

PADGETT, T., Han I.Y., Dawson, P.L., Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films, *Journal Food Protection*, 61,1330-1335, (1998).

PADGETT, T.R., 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).

QUINTAVALLA, S., Vicini, L., Antimicrobial food packaging in meat industry, *Meat Science*, 62, 373-380, (2002).

REITER, B., The lactoperoxidase system of bovine milk, The lactoperoxidase system, chemistry and biological significance, ed: K.M. Pruitt, J.O. Tenovuo, Marcel Dekker, New York, (1985), pp. 123-142.

RODGERS, S., Potential applications of protective cultures in cook-chill catering, *Food Control*, 14, 35-42, (2003).

RODGERS, S., Novel approaches in controlling safety of cook-chill meals, *Trends in Food Science and Technology*, 15, 366-372, (2004).

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).

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).

TAKAHASHI, K., Lou, X.-F., Ishii, Y., Hattori, M., Lysozyme-Glucose stearic acid monoester conjugate formed through the Maillard reaction as an antibacterial emulsifier, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2044-2049, (2000).

TOPÇUOĞLU, Ö., Altınkaya, S.A., Balköse, D., Characterization of waterborne acrylic based paint films and measurement of their water permeabilities, *Progress in Organic Coatings*, 56, 269-78, (2006).

YE, X., Yoshida, S., Ng, T.B., Isolation of lactoperoxidase, lactoferrin,  $\alpha$ -lactalbumin B,  $\beta$ -lactoglobulin A from bovine rennet whey using ion exchange chromatography, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 32, 1143-1150, (2000).

ZAPICO, P., Medina, M., Gaya, P., Nunez, M., Synergistic affect of nisin and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in skim milk, *International Journal Food Microbiology*, 40, 35-42, (1998).



**TÜBİTAK  
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

<b>Proje No:</b> MAG 104M386
<b>Proje Başlığı:</b> Laktik Asit Bakterileri, Lizozim ve Laktoperoksidaz Kullanılarak Antimikrobiyal Özellik Taşıyan Yenebilir Filmlerin Geliştirilmesi, Plastik Ambalaj Materyallerine ve Çeşitli Gıdalara Uygulanması
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Proje Yürütücüsü: Yrd.Doç.Dr. Figen KOREL Araştırmacılar: Prof.Dr. Ahmet YEMENİCİOĞLU Prof. Dr. Sacide ALSOY ALTINKAYA Yrd.Doç.Dr. Alper ARSLANOĞLU
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Urla, 35430, İzmir
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b> Bak Ambalaj Sanayii ve Ticaret A.Ş., Atatürk Organize Bölgesi, 10002 Sk. No. 45 Çiğli, 35620, İzmir Pinar Entegre Et ve Un Sanayi A.Ş., Ankara Asfaltı 25. km, 35170, Kemalpaşa, İzmir
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b> 01/07/2005 – 01/03/2008
<b>Öz (en çok 70 kelime)</b> Projede lizozim ve laktoperoksidaz enzimleri kullanılarak zein ve alginat filmler geliştirilmiş ve antimikrobiyal etkileri farklı bakteriler üzerinde test edilmiştir. Laktik asit bakterisi içeren alginat filmler üretilip kuşbaşı etlerin kaplanmasında kullanılmış ve üründe laktik asit bakterisi sayısını artırmıştır. Zeinle kaplanmış selüloz asetat filmler lizozim kullanılarak antimikrobiyal film haline getirilmiştir. Laktoperoksidaz içeren alginat filmler kalamarlar üzerinde, lizozim içeren zein filmler dana ve hindi burgerler üzerinde mikrobiyal yükü kontrol etmek amacıyla başarıyla kullanılmıştır.
<b>Anahtar Kelimeler:</b> Yenebilir filmler, lizozim, laktoperoksidaz, laktik asit bakterileri, aktif paketlenme
<b>Projeden Yapılan Yayınlar:</b> 1- Yener, F.Y.G., F. Korel, A. Yemenicioğlu, "Antimicrobial Activity of Lactoperoxidase System Incorporated into Cross-linked Alginate Films," <i>Journal of Food Science</i> , 2008. (Revizyonda-JFS-2008-0157) 2- Uysal, İ., F. Korel, A.Yemenicioğlu, "Test of Antimicrobial Activity of Zein Films Incorporated with Partially Purified Lysozyme on <i>Bacillus amyloliquefacies</i> ," <i>2<sup>nd</sup> International Congress on Food and Nutrition</i> , 109, October 24-26, Istanbul, 2007. (özet bildiri-Poster) 3- Yener, F.Y.G., F. Korel, A. Yemenicioğlu, "Incorporation of Lactoperoxidase System into

Alginate Films to Inhibit *E. coli* and *L. innocua*," *IFT Annual Meeting*, 293, July 28-August 1, Chicago, IL, 2007. (özet bildiri – Sözlü sunum)

- 4- Yener, F.Y.G., F. Korel, A. Yemencioğlu, "Inhibition of *Pseudomonas fluorescens* by Alginate Films Incorporating Lactoperoxidase System," *Microbial contaminants and contamination routes in food industry, 1<sup>st</sup> Open Seminar arranged by SAFOODNET – Food Safety and Hygiene Networking within New Member States and Associated Candidate Countries, VTT Symposium 248*, 67-68, January 22-23, Espoo, Finland, 2007. (özet bildiri)

**TÜBİTAK  
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

<b>Proje No:</b> MAG 104M386
<b>Proje Başlığı:</b> Laktik Asit Bakterileri, Lizozim ve Laktoperoksidaz Kullanılarak Antimikrobiyal Özellik Taşıyan Yenebilir Filmlerin Geliştirilmesi, Plastik Ambalaj Materyallerine ve Çeşitli Gıdalara Uygulanması
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Proje Yürütücüsü: Yrd.Doç.Dr. Figen KOREL Araştırmacılar: Prof.Dr. Ahmet YEMENİCİOĞLU Prof. Dr. Sacide ALSOY ALTINKAYA Yrd.Doç.Dr. Alper ARSLANOĞLU
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Urla, 35430, İzmir
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b> Bak Ambalaj Sanayii ve Ticaret A.Ş., Atatürk Organize Bölgesi, 10002 Sk. No. 45 Çiğli, 35620, İzmir Pınar Entegre Et ve Un Sanayi A.Ş., Ankara Asfaltı 25. km, 35170, Kemalpaşa, İzmir
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b> 01/07/2005 – 01/03/2008
<b>Öz (en çok 70 kelime)</b> Projede lizozim ve laktoperoksidaz enzimleri kullanılarak zein ve alginat filmler geliştirilmiş ve antimikrobiyal etkileri farklı bakteriler üzerinde test edilmiştir. Laktik asit bakterisi içeren alginat filmler üretilip kuşbaşı etlerin kaplanmasında kullanılmış ve üründe laktik asit bakterisi sayısını artırmıştır. Zeinle kaplanmış selüloz asetat filmler lizozim kullanılarak antimikrobiyal film haline getirilmiştir. Laktoperoksidaz içeren alginat filmler kalamarlar üzerinde, lizozim içeren zein filmler dana ve hindi burgerler üzerinde mikrobiyal yükü kontrol etmek amacıyla başarıyla kullanılmıştır.
<b>Anahtar Kelimeler:</b> Yenebilir filmler, lizozim, laktoperoksidaz, laktik asit bakterileri, aktif paketlenme
<b>Projeden Yapılan Yayınlar:</b> 1- Yener, F.Y.G., F. Korel, A. Yemenicioğlu, "Antimicrobial Activity of Lactoperoxidase System Incorporated into Cross-linked Alginate Films," <i>Journal of Food Science</i> , 2008. (Revizyonda-JFS-2008-0157) 2- Uysal, İ., F. Korel, A.Yemenicioğlu, "Test of Antimicrobial Activity of Zein Films Incorporated with Partially Purified Lysozyme on <i>Bacillus amyloliquefacies</i> ," 2 <sup>nd</sup> <i>International Congress on Food and Nutrition</i> , 109, October 24-26, Istanbul, 2007. (özet bildiri-Poster) 3- Yener, F.Y.G., F. Korel, A. Yemenicioğlu, "Incorporation of Lactoperoxidase System into Alginate Films to Inhibit <i>E. coli</i> and <i>L. innocua</i> ," <i>IFT Annual Meeting</i> , 293, July 28-August 1,

Chicago, IL, 2007. (özet bildiri – Sözlü sunum)

- 4- Yener, F.Y.G., F. Korel, A. Yemenicioğlu, "Inhibition of *Pseudomonas fluorescens* by Alginate Films Incorporating Lactoperoxidase System," *Microbial contaminants and contamination routes in food industry, 1<sup>st</sup> Open Seminar arranged by SAFOODNET – Food Safety and Hygiene Networking within New Member States and Associated Candidate Countries, VTT Symposium 248, 67-68, January 22-23, Espoo, Finland, 2007.* (özet bildiri)