

**T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***WILLIOPSIS SATURNUS* VAR. *SATURNUS* ANTAGONİST  
MAYASI EKLENEN YENİLEBİLİR FİLMLERİN ANTİFUNGAL,  
FİZİKSEL VE MEKANİKSEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Gülşah KARABULUT**

**Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Arzu ÇAĞRI MEHMETOĞLU**

**Ocak 2017**

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

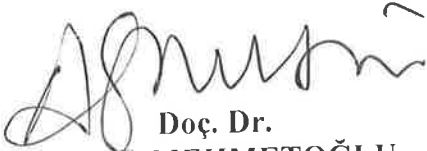
**WILLIOPSIS SATURNUS VAR. SATURNUS ANTAGONİST  
MAYASI EKLENEN YENİLEBİLİR FİLMLEİN ANTİFUNGAL,  
FİZİKSEL VE MEKANİKSEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Gülşah KARABULUT**

Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Bu tez 17/01/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

  
Doç. Dr.  
Arzu Ç. MEHMETOĞLU  
Jüri Başkanı

  
Prof. Dr.  
Zehra AYHAN  
Üye

  
Doç. Dr.  
Seda K. YALÇIN  
Üye

## **BEYAN**

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Gülşah KARABULUT

17/01/2017

## TEŞEKKÜR

Öncelikle lisanüstü eğitimim boyunca araştırmamın gerçekleştirilmesi ve değerlendirilmesi sırasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli danışman hocam Doç. Dr. Arzu ÇAĞRI MEHMETOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar olanakları konusunda yardımlarını esirgemeyen Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölüm Başkanı Prof. Dr. Ahmet AYAR'a ve Prof. Dr. Zehra AYHAN'a teşekkür ederim. Tez değerlendirme jürime değerli katılımları dolayısıyla Doç. Dr. Seda KARASU YALÇIN'a teşekkür ederim. Ayrıca çalışma arkadaşlarım Ayşe SARIÇAM, Hatice SIÇRAMAZ, Elif SEZER, Selime MUTLU, Alev AKÇAY, Eda KILIÇ'a anlayış ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında katkılarından dolayı Sakarya Üniversitesi Malzeme ve Metalurji Mühendisliği Bölümü'nden Prof. Dr. Hatem AKBULUT'a; Arş. Gör. Mahmud TOKUR'a; Uzman Erdem KILIÇASLAN'a ve Uzman Fuat KAYIŞ'a; Kimya Bölümü'nden Doç. Dr. Kudret YILDIRIM'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden Prof. Dr. Hüseyin ERTEN'e teşekkür ederim.

Son olarak çalışmalarım sırasında beni teşvik eden ve sonsuz ilgi, sabır ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Zekeriya KARABULUT ve biricik oğlum M. Kayra KARABULUT'a tüm samimiyetimle sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| TEŞEKKÜR .....                                                  | i   |
| İÇİNDEKİLER .....                                               | ii  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ .....                           | vi  |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                          | vii |
| TABLolar LİSTESİ .....                                          | ix  |
| ÖZET .....                                                      | x   |
| SUMMARY .....                                                   | xi  |
| <br>BÖLÜM 1.                                                    |     |
| GİRİŞ .....                                                     | 1   |
| <br>BÖLÜM 2.                                                    |     |
| LİTERATÜR ARAŞTIRMASI .....                                     | 6   |
| 2.1. Gıda Ambalajlama .....                                     | 6   |
| 2.2. Yenilebilir Film ve Kaplamalar .....                       | 7   |
| 2.2.1. Film yapma tekniği .....                                 | 12  |
| 2.2.1.1. Koaservasyon .....                                     | 12  |
| 2.2.1.2. Çözücünün uzaklaştırılması .....                       | 12  |
| 2.2.1.3. Eritmeyi izleyen katılaştırma .....                    | 13  |
| 2.2.1.4. Isıl jelatinizasyon ve koalügasyon .....               | 13  |
| 2.2.2. Film yapma tekniği .....                                 | 13  |
| 2.2.2.1. Protein temelli yenilebilir filmler .....              | 14  |
| 2.2.3. Yenilebilir film ve kaplamaların fonksiyonları .....     | 15  |
| 2.2.3.1. Aktif özellikteki yenilebilir film ve kaplamalar ..... | 19  |
| 2.3. Biyokontrol Uygulamaları .....                             | 25  |
| 2.3.1. Antagonist mikroorganizmaların tanımı .....              | 25  |

|                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.3.2. Biyokontrol uygulamalarının avantaj ve dezavantajları.....                          | 26 |
| 2.3.3. Antagonist mikroorganizmalarda bulunması istenen özellikler....                     | 27 |
| 2.3.4. Antagonist mayalar.....                                                             | 28 |
| 2.3.4.1. Williopsis saturnus var. saturnus antagonist mayası.....                          | 29 |
| 2.3.5. Antagonist mayaların etkinliğini belirleyen faktörler .....                         | 30 |
| 2.3.5.1. İnokulum etkisi .....                                                             | 31 |
| 2.3.5.2. Kullanılan besiyeri.....                                                          | 31 |
| 2.3.5.3. Uygulandığı gıda kompozisyonunun etkisi.....                                      | 31 |
| 2.3.5.4. Ortamın pH'sı .....                                                               | 32 |
| 2.3.5.5. Ortamın sıcaklığı .....                                                           | 32 |
| 2.3.5.6. Depolama-koruma koşulları .....                                                   | 32 |
| 2.3.6. Antagonist mayaların etkinlik mekanizması.....                                      | 33 |
| 2.3.6.1. Besin ve yer mücadelesi.....                                                      | 33 |
| 2.3.6.2. Antibiyozis etkisi .....                                                          | 34 |
| 2.3.6.3. Parazitik etki.....                                                               | 35 |
| 2.3.6.4. Uyarılmış dayanıklılık etkisi .....                                               | 35 |
| 2.3.6.5. Oksidatif stres etkisi.....                                                       | 36 |
| 2.3.7. Antagonist mayaların ticari olarak kullanımı.....                                   | 36 |
| 2.3.8. Antagonist mayaların yenilebilir filmlerle ilave kullanıldığı bazı çalışmalar ..... | 38 |

### BÖLÜM 3.

|                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| MATERYAL VE YÖNTEM.....                                                                                 | 41 |
| 3.1. Materyal.....                                                                                      | 41 |
| 3.1.1. Yenilebilir film ve kaplamaların üretiminde kullanılan materyaller .....                         | 41 |
| 3.1.2. Mikroorganizmalar .....                                                                          | 41 |
| 3.2. Metot .....                                                                                        | 43 |
| 3.2.1. Antagonist maya içeren film üretimi ve mayanın filmin özelliklerine etkisinin belirlenmesi ..... | 42 |
| 3.2.1.1. Antagonist mayanın gelişim kurvesi.....                                                        | 42 |
| 3.2.1.2. Antagonist mayanın elde edilmesi.....                                                          | 42 |

|                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.1.3. Antagonist maya içeren yenilebilir film üretimi.....                                                       | 43 |
| 3.2.2. Antagonist maya içeren film örneklerinin mikrobiyolojik analizleri .....                                     | 45 |
| 3.2.3. Antagonist maya içeren film örneklerinin antimikrobiyal özellikleri .....                                    | 45 |
| 3.2.4. Antagonist maya içeren film örneklerinin fiziksel özellikleri .....                                          | 46 |
| 3.2.4.1. Antagonist maya içeren film örneklerinin kalınlık ölçümleri.....                                           | 46 |
| 3.2.4.2. Antagonist maya içeren film örneklerinin su buharı geçirgenliğinin ölçülmesi .....                         | 46 |
| 3.2.4.3. Antagonist maya içeren film örneklerinin taramalı elektron mikroskobu ile gözenek yapılarının belirlenmesi | 47 |
| 3.2.4.4. Antagonist maya içeren film örneklerinin renk ölçümleri .....                                              | 47 |
| 3.2.4.5. Antagonist maya içeren film örneklerinin suda çözünübilirlik özellikleri .....                             | 47 |
| 3.2.4.6. Antagonist maya içeren film örneklerinin su aktivitesi ölçümleri .....                                     | 48 |
| 3.2.5. Antagonist maya içeren film örneklerinin mekanik özellikleri.....                                            | 48 |
| 3.2.6. İstatistiksel analiz .....                                                                                   | 49 |

#### BÖLÜM 4.

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....                                                                            | 50 |
| 4.1. Antagonist Maya Katkılı PASP Yenilebilir Film Örneklerinin Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları ..... | 50 |
| 4.1.1. Antagonist maya katkılı film örneklerinde maya sayısının belirlenmesi .....                    | 50 |
| 4.1.2. Antagonist maya katkılı filmlerin TMAB, laktik asit bakterisi ve küf sayımı sonuçları.....     | 53 |
| 4.2. Antagonist Maya Katkılı Filmlerin Antimikrobiyal Etkisi.....                                     | 54 |
| 4.2.1. Antagonist maya katkılı filmlerin Aspergillus niger küfüne karşı antimikrobiyal etkisi .....   | 55 |

|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2.2. Antagonist maya katkılı filmlerin <i>Penicillium expansum</i> küfüne karşı antimikrobiyal etkisi .....          | 58 |
| 4.3. Antagonist Maya İçeren Filmlerin Fiziksel Özellikleri.....                                                        | 61 |
| 4.3.1. Antagonist maya içeren film örneklerinde kalınlık ölçümü .....                                                  | 61 |
| 4.3.2. Antagonist maya içeren film örneklerinde su buharı geçirgenlik analizi .....                                    | 61 |
| 4.3.3. Antagonist maya içeren film örneklerinin taramalı elektron mikroskobu ile yüzey özelliklerinin incelenmesi..... | 63 |
| 4.3.4. Antagonist maya içeren film örneklerinin renk ölçümleri.....                                                    | 66 |
| 4.3.5. Antagonist maya içeren film örneklerinin suda çözünübilirliği....                                               | 68 |
| 4.3.6. Antagonist maya içeren film örneklerinin su aktivitesi ölçümleri                                                | 70 |
| 4.4. Antagonist Maya İçeren Filmlerin Mekaniksel Özellikleri.....                                                      | 71 |
| BÖLÜM 5.                                                                                                               |    |
| GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....                                                                                        | 74 |
| KAYNAKLAR .....                                                                                                        | 76 |
| ÖZGEÇMİŞ.....                                                                                                          | 91 |



## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

|                 |                                  |
|-----------------|----------------------------------|
| a/h             | : Ağırlık/hacim                  |
| dak             | : Dakika                         |
| h/h             | : Hacim/hacim                    |
| kob             | : Koloni oluşturan birim         |
| L               | : Litre                          |
| log             | : Logaritmik birim               |
| mg              | : Miligram                       |
| µg              | : Mikrogram                      |
| µL              | : Mikrolitre                     |
| PAS             | : Peynir altı suyu               |
| PASP            | : Peynir altı suyu proteini      |
| °C              | : Santigrat Derece               |
| cm <sup>2</sup> | : Santimetrekare                 |
| TSA             | : Trytic soya agar               |
| TSB             | : Trytic soya broth              |
| TMAB            | : Toplam mezofil aerobik bakteri |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1. Yenilebilir filmlerin yapıtaşları.....                                                                                                                                                                                                                                | 13 |
| Şekil 2.2. Gerilim- Uzama katsayısı değişim grafiği.....                                                                                                                                                                                                                         | 18 |
| Şekil 2.3. (a) Yenilebilir filmde aktif bileşenlerin kontrollü geçişi b) Aktif<br>bileşenlerin yüzeye direkt uygulanması.....                                                                                                                                                    | 20 |
| Şekil 2.4. <i>Williopsis saturnus</i> var. <i>saturnus</i> biyokontrol mayası (TSA + % 0,6<br>maya özütünde görünümü).....                                                                                                                                                       | 29 |
| Şekil 2.5. Maya katkılı yenilebilir film üretim şeması.....                                                                                                                                                                                                                      | 44 |
| Şekil 3.6. Instron cihazı (Instron Universal Testing 3367, ABD). ....                                                                                                                                                                                                            | 48 |
| Şekil 4.7. Farklı sayılarda <i>W. saturnus</i> var. <i>saturnus</i> mayasını içeren PASP temelli<br>filmlerin antagonist maya sayılarının zamanla değişimi ( $\log_{10}$<br>kob/cm <sup>2</sup> ).....                                                                           | 51 |
| Şekil 4.8. Farklı sayılarda maya içeren PAST temelli filmlerin depolama süresi<br>boyunca toplam mezofil aerobik bakteri sayılarının zamanla değişimi<br>( $\log_{10}$ kob/cm <sup>2</sup> ). ....                                                                               | 54 |
| Şekil 4.9. Farklı sayılarda antagonist maya <i>W. saturnus</i> var. <i>saturnus</i> içeren<br>filmlerin depolamanın 0. ve 7. günlerinde pH 4,5'a ayarlı TSA + %<br>0,6 maya özütü içeren besi ortamında <i>A. niger</i> küf suşuna zamana<br>dayalı inhibisyon etkisi (%).....   | 56 |
| Şekil 4.10. Farklı sayılarda antagonist maya <i>W. saturnus</i> var. <i>saturnus</i> içeren<br>filmlerin depolamanın 0. ve 7. günlerinde pH 5,2'ye ayarlı TSA + %<br>0,6 maya özütü içeren besi ortamında <i>A. niger</i> küf suşuna zamana<br>dayalı inhibisyon etkisi (%)..... | 56 |
| Şekil 4.11. Farklı sayılarda antagonist maya içeren filmlerin <i>A. niger</i> küf suşu<br>üzerine antifungal etkisinin laktik asit ile (a, b) pH 5,2 ve (c) pH 4,5'e<br>ayarlı TSA + % 0,6 maya özütü içeren besiyerlerinde görünümü. ....                                       | 57 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.12. Farklı sayılarda antagonist maya <i>W. saturnus</i> var. <i>saturnus</i> içeren filmlerin <i>P. expansum</i> küfüne antifungal etkisinin laktik asit ile (a) pH 4,5 ve (b) pH 5,2'ye ayarlı TSA + % 0,6 maya özütü içeren besiyerlerinde incelenmesi. .... | 59 |
| Şeki 4.13. Farklı sayılarda antagonist maya <i>W. saturnus</i> var. <i>saturnus</i> içeren filmlerin depolamanın 0. ve 7. günlerinde pH 4,5'e ayarlı TSA + % 0,6 maya özütü içeren besi ortamında <i>P. expansum</i> küf suşuna inhibisyon etkisi (%). ....            | 59 |
| Şekil 4.14. Farklı sayılarda antagonist maya <i>W. saturnus</i> var. <i>saturnus</i> içeren filmlerin depolamanın 0. ve 7. günlerinde pH 5,2'ye ayarlı TSA + % 0,6 maya özütü içeren besi ortamında <i>P. expansum</i> küf suşuna inhibisyon etkisi (%). ....          | 60 |
| Şekil 4.15. PASP temelli film yüzeylerinin elektron mikroskop görüntüleri. ....                                                                                                                                                                                        | 65 |
| Şekil 4.16. Antagonist maya <i>W. saturnus</i> var. <i>saturnus</i> içeren vakum uygulanmadan paketlenmiş film örneklerinin suda çözünübilirlik değerlerinde zamana dayalı değişim (%). ....                                                                           | 69 |
| Şekil 4.17. Antagonist maya <i>W. saturnus</i> var. <i>saturnus</i> içeren vakum uygulanmadan paketlenmiş film örneklerinin suda çözünübilirlik değerlerindeki zamana dayalı değişim (%). ....                                                                         | 69 |
| Şekil 4.18. Farklı sayıda antagonist maya <i>W. saturnus</i> var. <i>saturnus</i> içeren film örneklerinin depolamanın 0., 14. ve 28. günlerinde çekme gerilimi değerlerindeki değişim (MPa). ....                                                                     | 71 |
| Şekil 4.19. Farklı sayıda antagonist maya <i>W. saturnus</i> var. <i>saturnus</i> içeren film örneklerinin depolamanın 0., 14. ve 28. günlerinde çekmede uzama değerlerindeki zamana bağlı değişimi (%). ....                                                          | 72 |

## TABLolar LİSTESİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 2.1. Yenilebilir filmlerle kaplanmış farklı gıdalar üzerine yapılan çalışmalar .....                                                                                                                                                                                     | 15 |
| Tablo 2.2. Antimikrobiyal katkıları içeren yenilebilir filmlerle kaplanmış farklı gıda örnekleri üzerine yapılan bazı çalışmalar.....                                                                                                                                          | 21 |
| Tablo 2.3. Antagonist mayaların farklı gıdalarda uygulanması üzerine yapılan çalışmalar.....                                                                                                                                                                                   | 37 |
| Tablo 4.4. Farklı sayıda antagonist maya <i>W. saturnus</i> var. <i>saturnus</i> içeren vakumlu ve vakumsuz paketlenmiş filmlerin <i>A. niger</i> küf suşunun misel gelişimine TSA + % 0,6 maya özütü içeren besi ortamında 5 günlük inkübasyon sonundaki etkisi (mm). ....    | 55 |
| Tablo 4.5. Farklı sayıda antagonist maya <i>W. saturnus</i> var. <i>saturnus</i> içeren vakumlu ve vakumsuz paketlenmiş filmlerin <i>P. expansum</i> küf suşunun misel gelişimine TSA + % 0,6 maya özütü içeren besi ortamında 5 günlük inkübasyon sonundaki etkisi (mm). .... | 58 |
| Tablo 4.6. Antagonist maya içeren film örneklerinin depolamanın 0. ve 28. gününde su buharı geçirgenlik değerlerindeki değişim (g.mm/m <sup>2</sup> .gün.kPa). ....                                                                                                            | 62 |
| Tablo 4.7. Antagonist maya içeren film örneklerinin L*, a* ve b* değerlerinde zamana bağlı değişim.....                                                                                                                                                                        | 67 |
| Tablo 4.8. Antagonist maya içeren film örneklerinin vakumlu ve vakum uygulanmadan paketlenmesiyle depolamanın 0., 14., ve 28. gününde ölçülen su aktivitesi değerleri.....                                                                                                     | 70 |

## ÖZET

Anahtar kelimeler: Yenilebilir film, biyokontrol, antagonist maya, antifungal

Gıdalarda fiziksel, kimyasal, duyuşsal özelliklerde bozulmalara yol açan ve toksin üretimiyle sağlık riskleri taşıyan küflerin gelişimi gıda endüstrisi açısından önemli bir problemdir. Bu probleme alternatif bir çözüm amaçlanan çalışmamızda, peynir altı suyu proteini temelli yenilebilir filmler farklı sayılarda (0; 3,2; 6,8 ve 8,8 kob/cm<sup>2</sup>) antagonist maya *Williopsis saturnus* var. *saturnus* ile ilave edilerek biyoaktif bir ambalaj materyali geliştirilmiştir. Farklı maya miktarlarını içeren yenilebilir filmler vakumlu ve vakumsuz paketlenerek film yapısındaki antagonist maya canlılığının korunumu başta olmak üzere mikrobiyal özelliklerindeki değişim 28 günlük depolama süresinde incelenmiştir. Elde edilen antagonist maya katkılı film örneklerinin *Penicillium expansum* ve *Aspergillus niger* küf suşlarına iki farklı pH 'daki (4,5 ve 5,2) inhibisyonu disk difüzyon yöntemiyle değerlendirilmiştir. Film yapısındaki antagonist maya sayısının filmlerin fiziksel özelliklerinden; kalınlık, su buharı geçirgenliği, suda çözünabilirlik, su aktivitesi ve gözenek yapısına etkisi (SEM) analiz edilmiştir. Vakumlu-vakumsuz paketlenen film örneklerinin optik özellikleri L\*, a\*, b\* renk ölçümleriyle ve mekaniksel özellikleri ise Instron cihazı ile çekme gerilimi ve çekmede % uzama özelliklerindeki değişimlerle analiz edilmiştir.

Sonuçlar antagonist maya korunumunun 6,8 log kob/cm<sup>2</sup> maya içeren filmlerde % 36'dan; 8,8 log kob/cm<sup>2</sup> maya içeren filmlerde ise % 60'dan fazla olduğunu göstermiştir. Ayrıca elde edilen film örneklerinin iki farklı pH'da *P. expansum* ve *A. niger*'e inhibisyonu incelendiğinde pH 4,5'de 8,8 log kob/cm<sup>2</sup> antagonist maya içeren film örneklerinin *P. expansum*'a karşı % 29; *A. niger*'e karşı % 19'dan fazla antifungal etkisinin olduğu saptanmıştır. Maya sayısı 3,2 log kob/cm<sup>2</sup>'nin üstünde olan Peynir altı suyu protein filmlerin bariyer özelliklerinde önemli derecede düşüş gözlenmiştir ( $P<0,05$ ). Buna karşın 28 günlük depolama süresi filmlerin bariyer özelliklerinde % 9'luk iyileşme meydana getirmiştir. Filmin içerisindeki artan maya sayısı filmlerin suda çözünabilirlik değerlerini önemli derecede artırmıştır ( $P<0,05$ ). Antagonist maya içeren filmlerin gözenek yapıları incelendiğinde mayanın film yapısına tutunarak homojen bir dağılım gösterdiği görülmüştür. Filmlerin optik özelliklerinde, artan maya sayısı beyazlık değerlerinin yanısıra yeşil ve sarı renk değerleri yönünde de önemli derecede artış meydana getirmiştir ( $P<0,05$ ). Mekaniksel özellikler 3,2 log kob/cm<sup>2</sup> maya içeren filmlerde önemli düzeyde değişmezken artan maya sayısı ile birlikte çekme gerilimi yükselmiş tersi yönde çekmede % uzama değeri önemli derecede düşmüştür ( $P<0,05$ ).

Sonuç olarak, bu çalışma biyokontrol ajanlarının ve yenilebilir filmlerin engel teknolojisi kapsamında kombinasyonu ile elde edilen biyoaktif filmlerin özellikle küflenme problemi yaşanan gıdaların kaplanması için kullanım potansiyeline sahip olabileceğini göstermiştir.

# PHYSICAL, MECHANICAL PROPERTIES AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF BIOACTIVE FILM CONTAINING *WILLIOPSIS SATURNUS* VAR. *SATURNUS* ANTAGONISTIC YEAST

## SUMMARY

Keywords: Edible film, biocontrol, killer yeast, antifungal

The mold growth leading physical, chemical and sensory changing in food products and carrying health risks with toxin production is a main problem in the food industry. In our study, as an alternative solution for this problem, bioactive packaging materials were developed by incorporating *Williopsis saturnus* var. *saturnus* at different concentrations (0; 3.2; 6.8 and 8.8 cfu/cm<sup>2</sup>) into whey protein concentrate (WPC) based edible films. Following packaging of the developed edible films with vacuum or non-vacuum packages they were stored at 25 °C for 28 days. Viability of *W. saturnus* var. *saturnus* and the number of total bacteria, lactic acid bacteria, mold and yeast in the films were investigated during the time of the storage. Moreover, the antifungal activity of the films incorporated with *W. saturnus* var. *saturnus* were also tested against *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* at two different pH values (4.5 and 5.2) by disk diffusion method. The effect of the antagonist yeast occurrence in the film on physical properties (thickness, water vapor permeability, water solubility, water activity) and microstructural properties of the films were analyzed using Scanning Electron Microscope (SEM). The optical properties and the mechanical properties in terms of tensile strength and percent elongation at break of the film samples were also observed by L\*, a\*, b\* color measurements and by using the Instron, respectively.

The results showed that bioactive WPC films containing 6.8 and 8.8 log cfu/cm<sup>2</sup> *W. saturnus* var. *saturnus* were able to maintain more than 36 % and 60 % of the initial antagonist yeast population, respectively. In addition, the developed films incorporated with the antagonist yeasts reduced mycelium growth of *P. expansum* and *A. niger* on the medium by more than 29 % and 19 % at pH 4.5, respectively. Incorporation of more than 3.2 log cfu/cm<sup>2</sup> antagonist yeasts significantly increased water vapor permeability of the films ( $P<0.05$ ). However, 28 days of storage has led to 9 % improvement in the barrier properties of the films. Increased population of the yeasts also significantly increased percent water solubility of the films ( $P<0.05$ ). Moreover, the distribution of the antagonistic yeasts in the films presented homogenous microstructure at SEM observation. Increasing concentration of the killer yeasts in the films presented a significant tendency to greenness and yellowness as well as lightness values ( $P<0.05$ ). The concentrations more than 3.2 log cfu/cm<sup>2</sup> of killer yeast population in the films significantly increased tensile strength but decreased percent elongation at break ( $P<0.05$ ).

In conclusion, this study showed that bioactive films in combination with edible films and bioactive agents in the concept of the hurdle technology have a coating potential on the food products to eliminate mold spoilage.

## BÖLÜM 1. GİRİŞ

Son yıllarda tüketicilerin yüksek kalitede, uzun raf ömrüne sahip gıdaya artan talebi ambalaj materyallerinin geliştirilmesiyle karşılanmaya çalışılmaktadır. Gıda ambalajı; içine konulan gıdanın taşınmasından kullanımına kadar geçen süreçte tüketiciye en az toplam maliyetle ve güvenilir bir şekilde ulaştırılmasını sağlayan bir araç olarak tanımlanmaktadır (Üçüncü, 2007). Bu bağlamda; ambalajlama alanında yapılan yeni çalışmalar araştırmacıları yenilebilir film ve kaplamalara yönlendirmiştir. Yenilebilir gıda film ve kaplamaları; biyobozunur gıda maddelerinden yapılan ve gıda ile birlikte tüketilebilen, ince tabakalı bir ambalaj materyalidir. Yenilebilir gıda filmleri, gıdanın yüzeyine veya katmanları arasına yerleştirilebilir (Baldwin, 1994). Yenilebilir film ve kaplamalar yapılarına göre protein (kollajen, buğday proteini, süt proteinleri, soya proteini, mısır zeini vb.), polisakkarit (aljinat, dekstrin, pektin, selüloz vb.), lipit (mum, yağ asiti, açilgliserol vb.) veya bunların karışımı kompozit olarak sınıflandırılabilir (Bourtoom, 2008). Film ve kaplamalar seçici özellikleri (bariyer) ve aktif özellikleri (taşıyıcı) sayesinde gıdanın raf ömrünü artırmanın yanısıra kalitesini de iyileştirmektedir (Biquet ve Guilbert, 1986).

Yenilebilir filmlerin uygulandıkları gıda ürünlerindeki temel fonksiyonları nem, oksijen ve karbondioksit geçişine karşı bariyer sağlamak, solunumu baskılamak, tekstürel kaliteyi iyileştirmek, uçucu aroma bileşenlerinin kaybını engellemek ve mikrobiyal gelişimi önlemek olarak sayılabilir (Donhowe ve Fennema, 1994; Çağrı ve ark., 2001, 2002, 2003a; Diab ve ark., 2001; Lee ve ark., 2003; Cha ve ark., 2004; Bourtoom, 2008). Günümüzde filmlerin kullanımlarının yaygınlaşmasında üretim teknolojisinin basit olması, doğal bileşiklerden elde edilmesi, biyobozunur olması, gıdanın raf ömrü ve kalitesine olumlu katkılarının yanı sıra düşük maliyetli olması da etkili olmaktadır (Labuza ve Breene, 1989; Baldwin, 1994; Çağrı ve ark., 2004;

Ayana ve Turhan, 2010; Işık ve ark., 2013). Örneğin, yaygın olarak kullanılan protein filmler çeşitli protein kaynaklarından saflaştırılan izolatlardan veya konsantre protein ürünlerinden oluşturulduğu gibi işleme proseslerinden açığa çıkan atıkların değerlendirilmesiyle de üretilmektedir (Gennadios ve ark., 1994; Dursun ve Erkan, 2009; Krochta, 2010). Sentetik filmlere kıyasla çoğu protein film ürüne parlaklık kazandırması, duyuşal özelliklerini değiştirmeden besin değerini artırması ve mükemmel bir oksijen bariyeri olmasıyla avantajlıdır (Tomasula, 2009; Işık ve ark., 2013). Günümüzde protein temelli yenilebilir film ve kaplamalar sosis, çerez, et ürünleri, süt ürünleri, sebze-meyve kaplanmasına kadar çok çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır (Işık ve ark., 2013).

Gıdalarda küf gelişimi; bozuk tat, toksin üretimi, renk değişimi gibi bozulmalara neden olmaktadır. Ekonomik kayıplara ve sağlık risklerine de neden olan bu bozulmalar gıda endüstrisi açısından önemli bir problemdir. Örneğin; gıdalarda yaygın olarak bulunabilen *Aspergillus* ve *Penicillium* gibi küf patojenleri ürettikleri aflatoksin, okratoksin A ve patulin gibi ikincil metabolitlerden ve alerjenik sporların oluşumundan sorumludur (Schwenninger ve ark., 2011; Sharma ve Tiwari, 2014). Mikotoksinlerin çoğu gıda işleme sıcaklık aralığına (80-121 °C) dirençli iken, denatüre olması için 237-306 °C gibi çok yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyulmaktadır (Schwenninger ve ark., 2011). Bu nedenle gıdada toksin oluşturan küflerin gelişmesinin farklı tekniklerle önlenmesi önem taşımaktadır.

Gıdalarda küf gelişimini önlemek için yaygın olarak uygulanan yöntemler koruyucu madde kullanımı ve özel ambalajlamaya dayalı yöntemler olarak bilinmektedir (Şahin, 1980). Bu amaçla yenilebilir filmlere doğal ve sentetik kaynaklardan elde edilen katkı maddelerinin koruyucu olarak eklenmesi üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Fakat yenilebilir filmlerde kullanılan kimyasal antimikrobiyallerin çevreye ve insan sağlığına zarar verdiği ve dirençli patojen suşlarının artışına neden olduğu bilinmektedir (Rosenberger ve Meyer, 1981; Spotts ve Cervantes, 1986; Gennadios ve ark., 1994; Chen ve ark., 1996; Palou ve ark., 2002; Min ve Krochta, 2005; Valencia-Chamorro ve ark., 2008; Türe ve ark., 2009; İmamoğlu, 2011; Türe ve ark., 2011). Bilinçsiz artırılan kimyasal koruyucu dozlarının yol açtığı sağlık



problemleri tüketicileri olumsuz etkilerken gıdalarda da tat ve renk değişimlerine neden olarak duyusal kaliteyi düşürmektedir. Ayrıca antimikrobiyal uygulamaların yüksek maliyeti işletmeler açısından bir dezavantaj oluşturmaktadır (Valencia-Chamorro ve ark., 2011). Benzer şekilde küf gelişimini önlemek için başvuru olan bir diğer yöntem ise vakum paketlenme tekniğidir. Yapılan çalışmalarda tek başına vakum paketlenme uygulamasının mikrobiyal açıdan tam koruma sağlayamadığı ve duyusal kaliteyi düşürdüğü ortaya konulmuştur (Demirci ve Dıraman, 1990; Hocking ve Faedo, 1992; Taniwakii ve ark., 2001; Erkan ve Aksu, 2005; Öksüztepe ve ark., 2009; Gün ve ark., 2009; Yılmaz ve Dağdemir, 2012). Bu nedenle gıda ambalajlamada yeni teknikler üzerine çalışmalar yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Günümüzde sentetik kimyasalların yol açabileceği sorunlara duyarlılık, tüketicileri organik ürünlere yönelterek biyolojik kontrolün önem kazanmasını sağlamıştır. Biyolojik kontrol genel anlamda biyolojik mekanizma veya organizmalarla patojenlerin etkisinin ve popülasyon yoğunluğunun azaltılması anlamına gelmektedir. Bunu gerçekleştirme yöntemlerinden birisi de antagonist mikroorganizmaların kullanılmasıdır (Özaktan ve ark., 2010). Antagonist mikroorganizmalar; yüksek inhibitör kapasitesine sahip, hızlı çoğalabilen, basit besin istekleri olan ve kuru yüzeylerde uzun süre canlı kalabilen biyolojik kontrol ajanları olarak tanımlanabilir. Antagonist mikroorganizmaların varlığı fungal gelişimi ve mikotoksin üretimini baskılayabilmektedir (Bullerman ve ark., 1984; Kabak ve Var, 2004). Bu baskılama mekanizmasının antagonist mikroorganizmaların besin ve yer mücadelesi başta olmak üzere ürettikleri antibiyotik benzeri spesifik enzimlerin ve litik enzimlerin salınması gibi hücrenin gelişmesini ve çoğalmasını engelleyen farklı etkileşimlere bağlı olduğu düşünülmektedir (Droby ve ark., 2009; Fan ve ark., 2009; Meng ve ark., 2010; Aloui ve ark., 2015).

Biyokontrol ajanlarının sentetik kimyasalların yerine gıda ürünlerinde başarılı bir şekilde uygulanması üzerine yapılan çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır (Viñas ve ark., 1998; Janisiewicz ve Korsten, 2002). Örneğin; üzüm, çilek, portakal gibi küflenme riski olan meyvelerde *Clonostachys rosea*, *Cryptococcus laurentii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *C. laurentii* ve *Rhodotorula glutinis* gibi farklı tür

antagonist mayaların başarılı bir şekilde kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Zhang ve ark., 2008; Cota ve ark., 2008; Janisiewicz ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2010). Bu tür mayaların kullanıldığı meyvelerde küf gelişimi başta olmak üzere mikrobiyal yönden kontrol sağlanmış olmakla birlikte duyuşal ve kimyasal özelliklerde de olumlu değişimler gözlenmiştir.

Çalışmamıza konu olan *W. saturnus* var. *saturnus* mayası, antagonistik özellik gösteren mikroorganizmalardan, öldürücü toksin üreten bir maya olarak bilinmektedir. Özellikle laktoz ve galaktozu fermente edemeyen *Williopsis* spp. mayalar süt ürünlerinde uygulandığında aroma ve yapıya olumlu ya da olumsuz etkide bulunmamasıyla avantajlıdır. Ayrıca patojenik, lipolitik ve proteolitik özellik göstermemeleri ve uçucu metabolit üretmemesi de ideal biyokontrol ajanı olarak kullanılmasına olanak sağlar (Liu ve Tsao, 2009). Buna rağmen temel inhibisyon mekanizması yer yarışı ve 1,3- $\beta$ -glukanaz enzim aktivitesine bağlı olan antagonist *W. saturnus* var. *saturnus* mayası üzerine sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Örneğin; *W. saturnus* var. *saturnus* antagonist mayasının yoğurt (Liu ve Tsao, 2009) ve peynir örneklerine (Liu ve Tsao, 2010) ilave edildiği çalışmalarda *Byssoschlamys*, *Eurotium* ve *Penicillium* gibi küf türlerinin üremesinin önlenildiği ortaya konulmuştur.

Gıdalarda biyokontrol uygulamaları ve yenilebilir film uygulamalarının başarılı sonuçları iki engel teknolojisinin birlikte kullanılarak biyoaktif filmlerin üretildiği yeni çalışmaları ortaya çıkarmıştır (Cañamás ve ark., 2008a, 2008b, 2011; Aloui ve ark., 2015; Marín ve ark., 2016). Filmler biyokontrol ajanlarının stres koşullarına toleransını artırmakta ve ekolojik yarışta öne geçmesini sağlamaktadır (Marín ve ark., 2016). Böylece ajanlar daha uzun süre canlılıklarını korumakta ve uygulandığı gıdanın yüzeyine daha iyi tutunabilmektedir (Droby ve ark., 2009). Yenilebilir filmlerin antagonist mayalarla kombinasyon uygulamaları yeni olmakla birlikte sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda *Candida guilliermondii* US7 ve *Debaryomyces* spp. 230 antagonist mayaları selüloz temelli filmlerle (Potjewijd ve ark., 1995), *C. oleophila* mayası şellak filmlerle (McGuire ve Hagenmaier, 1996 ve 1999), *Cryptococcus laurentii* aljinat ve kitosan filmlerle (Fan ve ark., 2009; Meng ve ark., 2010) birlikte farklı meyvelerin kaplanması

kullanılmış ve bazı küflerin gelişiminin önlenemediği ortaya konulmuştur. Ancak biyokontrol ajanlarının yenilebilir filmlerin içerisindeki canlılıklarının, mikrobiyal aktivitelerinin en yüksek düzeyde korunabildiği ve filmlerin mekaniksel ve fiziksel özelliklerine etkisinin incelendiği çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda literatürdeki bu açığı kapatmak için *W. saturnus* var. *saturnus* katkılı peynir altı suyu proteini temelli yenilebilir film üretilerek antimikrobiyal, mekaniksel ve fiziksel özellikler açısından incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın amaçları: (1) Biyokontrol mayası içeren peynir altı suyu proteini temelli yenilebilir film geliştirmek; (2) Mayanın film içerisindeki canlılığını vakumlu-vakumsuz paketlenen örneklerde incelemek (3) Film içerisinde farklı sayıdaki mayanın farklı küf türlerine karşı antimikrobiyal etkisini ortaya koymak ve bunun için uygun maya miktarını belirlemek (4) Maya katkılı filmlerin fiziksel ve mekaniksel özelliklerini incelemek olarak sıralanabilir.

## **BÖLÜM 2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI**

### **2.1. Gıda Ambalajlama**

Gıda ambalajı; ürünün taşınması, dağıtımı, depolanması, perakende satışı ve kullanımını içeren koordineli bir sistemdir (Yıldırım, 2011). Geçmişte ambalajlama üretim maliyetine ek yük getiren üretim sürecinin bir parçası olarak düşünülse de günümüzde ürünün son kullanımına kadar her aşamada devreye giren ürünün bir parçası haline gelmiştir (Üçüncü, 2007).

Genelde ambalaj; iç ambalaj yani ambalajlanan ürün ile doğrudan temasta bulunan ambalaj ve dış ambalaj yani iç ambalajdaki birimleri bir arada tutan ambalaj olmak üzere iki gruba ayrılır. Gıdaların ambalajlanmasında iç ambalajın özellikleri son derece önemlidir (Üçüncü, 2007). Gıda paketleme teknolojisindeki en önemli eğilim bu iç ambalaj materyalinde yüksek bariyer özelliklerinin geliştirilmesi üzerinedir. Paketlemenin performansı gıda ile depolama alanı arasındaki kütle transferini düşürme etkinliği yani geçirgenlik özelliğiyle değerlendirilir (Debeaufort ve ark.,1998).

Gıda ürünlerinin kalitesi; depolama ve satış aşamasında değişen organoleptik, besinsel ve hijyenik özelliklerine bağlıdır. Bu değişimler gıda ile çevre veya kompozit gıdalarda farklı bileşenler arasındaki geçişler sırasında olabilir (Debeaufort ve ark.,1998). Paketleme gıdayı oksijen, nem, ışık, uçucu bileşikler gibi geçişlere neden olan çevre koşullarına karşı korumalı, kimyasal ve mikrobiyolojik kontaminasyonlara karşı iyi bir bariyer özelliği göstermelidir. Ek olarak gıda bileşenlerinin oksidasyonunu, renk ve besin değerlerindeki kayıpları, tekstürel bozulmaları önleyerek gıdanın raf ömrünü uzatmaktadır (Han, 2005; Yıldırım, 2011).

Paketlemede ince ve hafif yapıdaki yüksek bariyer özellikli ambalaj materyallerinin kullanımı gıdaların işleme, dağıtım ve atık uzaklaştırma maliyetlerini de düşürür (Han, 2005). Gıda da birçok önemli fonksiyonu bulunan paketleme materyallerinin geri döndürülerek doğaya kazanımı, çevre konusunda artan hassasiyetle birlikte önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir (Yıldırım, 2011).

## 2.2. Yenilebilir Film ve Kaplamalar

Tüketicilerin yüksek kalitede, uzun raf ömrüne sahip gıdaya olan talebi ambalaj materyalinin geliştirilmesiyle karşılanmaya çalışılmaktadır (Han, 2005). Plastik ambalajların kullanımıyla artan çevre kirliliğinin yanı sıra artan nüfus ve sınırlı kaynaklar aktif ambalajlamada yapılan yeni çalışmaları doğada kolayca yok olabilen yenilebilir filmler üzerinde yoğunlaştırmıştır (Biquet ve Guilbert, 1986; Krochta, 2002; Çağrı-Mehmetoğlu, 2010).

Yenilebilir film ve kaplamalar; gıdaları korumak ve raf ömürlerini uzatmak amacıyla gıdanın yüzeyi üzerinde oluşturulmuş ince tabakalı, sentetik olmayıp doğal kaynaklardan elde edilen gıda yüzeyine veya gıda katmanları arasına uygulandığında nem, gaz ve katı hareketliliğinin kontrolünü sağlayabilen, yenilebilir nitelikteki ambalaj materyalleri olarak tanımlanır (Baldwin, 1994; Gennadios ve ark., 1994; Krochta, 2002). Genellikle filmlerin kalınlığı 0,3 mm'den daha az olmaktadır (Pavlath ve Orts, 2009).

Yenilebilir filmler kullanım amacına uygun oluşturulan bağımsız yapılardır. Ürünün bir parçası olan film ve kaplamalar kullanım ve tüketim sırasında ürünün üzerinde kalır ve ürün kalitesini düzeltici etki gösterirler (Krochta, 2002). Yenilebilir film ve kaplamalar gıda ürünlerinin paketi açıldıktan sonra da ürünü korumaya devam etmektedir (Temiz ve Yeşilsu, 2006). Dolayısıyla yenilebilir film ve kaplamalar uygulandığı gıdanın raf ömrünü artırır ve ambalajlama materyali olarak kullanılabilirler (Çağrı-Mehmetoğlu, 2010). Tarımsal kökenli bu ambalajlar cam, teneke, polimer gibi ticari ambalajlama materyallerine alternatif olarak geliştirilmiştir. Yenilebilir film ve kaplamalar uygun şekilde hazırlandığı takdirde

fonksiyonel bir ambalajın sahip olabileceği tüm işlevleri yerine getirebilirler (Akbaba, 2006).

İdeal yenilebilir film ve kaplamaların sahip olması gereken özellikler aşağıda gösterilmiştir (Pavlath ve Orts, 2009).

- Toksik, alerjik ve sindirilemeyen bileşenleri içermemelidir. FDA (Food and Drug) tarafından güvenli olarak tanımlanmalı,
- Tüketicinin kabul edebileceği, ürünün kendine has tat ve görünümü değiştirmeden aroma, besin öğeleri ve organoleptik karakterini dengeleyen bileşenlerin alımını ve kaybını önleyebilmeli,
- Gıdada su geçişini kontrol ederek istenen nem içeriğini korumalı,
- Homojen kaplama sağlayabilmek için gıda yüzeyine iyi yapışmalı,
- Yapısal stabilite sağlamalı ve dağıtım, işleme ve satış sırasında ürünü mekaniksel hasarlardan korumalı,
- Aerobik ve anaerobik solunuma dahil olan gazların iç dengesini korumak için yarı geçirgen olmalı, böylece bozulmayı geciktirmeli,
- Kontaminasyon, haşere istilası, mikroorganizma gelişimi ve diğer çeşitli bozulmalara karşı biyokimyasal ve mikrobiyal yüzey stabilitesini sağlamalıdır.

Yenilebilir film ve kaplama uygulamalarının tarihi, yeni gibi görünmekle birlikte yıllar öncesine dayanmaktadır. Çin’de mum kaplamanın turuncgillerde kullanımı 13. yy.’ye dayanmaktadır (Baldwin, 1994). O yıllarda yenilebilir film ve kaplamaların tüm fonksiyonlarının farkına varmasalar da solunumu yavaşlattığını ve mumla kaplı meyvelerin kaplı olmayanlardan daha uzun süre depolanabildiğini fark etmişlerdir

(Park, 2000). Yenilebilir film kullanımına eski bir örnek olan yuba (soya sütü filmi), Asya ülkelerinde 15. yy.'den beri geleneksel olarak kullanılmaktadır (Wu ve Bates, 1972). Kurumayı önlemek için et ve peynirde yağ ile kaplama (larding) 16.yy.'den beri kullanılmaktadır (Kester ve Fennema, 1986; Debeaufort ve ark., 1998) 19.yy.'de sükröz ilk kez fındık, badem ve fıstığı depolama süresince oksidasyon ve acılaşımdan korumak için koruyucu yenilebilir film olarak uygulanmıştır (Debeaufort ve ark.,1998). Sıcak eritilmiş parafin mumu 1930'larda elma ve şeftali gibi taze meyvelerin kaplanmasında ticarileştirilmiştir (Park, 2000). Bu mum emülsiyonlarının meyvelerin parlaklık ve renk gibi fiziksel özelliklerini korumak, yumuşamasını, solgunluğun başlamasını geciktirmek, fungusitlerin taşınmasını sağlamak, meyvelerin olgunlaşmasını daha iyi kontrol etmek ve su kaybını azaltmak gibi birçok fonksiyonu bulunmaktadır (Erbil ve Müftügil, 1986).

Taze, dondurulmuş veya işlenmiş bir çok ürünün raf ömrünü uzatmak ve kalitesini geliştirmek amacıyla yenilebilir film ve kaplamaların kullanımı ile ilgili çalışmalar yoğun bir şekilde yürütölmektedir (Açkar ve ark., 2014). Yenilebilir film ve kaplamalar gıda ürünlerinin kalitesini artırırken gıdaları fiziksel, kimyasal ve biyolojik bozulmalara karşı korumaktadır. Gıdada nem geçişini, yüzeyde mikrobiyal gelişmeyi, kimyasal bozulmayı ve besin öğelerinin oksidasyon yoluyla kaybını önler. Yenilebilir filmlerin bilinen en yaygın özelliğı yağ, gaz ve su buharına karşı bariyer özellik gösterebilmesidir. Ayrıca filmlerin aktif bileşenleri taşıyıcı olarak kullanılabilmesi de önemli bir özelliğidir. Örneğın; antioksidan, antimikrobiyal maddelerin, renk, aroma bileşenlerinin veya kararma tepkimelerini durduran iyonlar ve vitaminlerin filme ilavesiyle gıda yüzeyinde uygulanabilir (Kester ve Fennema, 1986; Wong ve ark.,1994; Guilbert ve ark., 1996; Krochta, 2002).

Yenilebilir film ve kaplamaların avantajları aşağıdaki şekilde özetlenebilir (Kester ve Fennema, 1986; Gennadios ve Curtis, 1990; Debeaufort ve ark., 1998; Krochta, 2002; Han, 2014; Park ve ark.,2014).

- Yenilebilir film ve kaplamalar ambalajlanmış ürün ile birlikte tüketilebilmesi nedeniyle çevre dostu bir ambalaj materyalidir. Biyobozunur materyalden oluştuğu için doğada polimerik materyallerden daha hızlı parçalanabilirler.
- İçine eklenen çeşitli bileşenlerle (aroma, renk ve tatlandırıcı maddeler) desteklenerek uygulandıkları gıdaların organoleptik özelliklerini artırır. Ayrıca gıdaların beslenme değerlerini de destekleyebilir (özellikle protein filmler).
- Bezelye, fasulye, fındık ve çilek gibi ayrı ayrı ambalajlanamayan ürünlerin küçük porsiyonlarla ayrı olarak ambalajlanmasına olanak sağlar.
- Antimikrobiyal, antioksidan ve aroma gibi maddeler için taşıyıcı görevi görmektedir. Gıda yüzeyine uygulanarak yüzeydeki koruyucu maddelerin iç kısımlara difüzyon hızını kontrol etmek amacıyla kullanılır.
- Heterojen gıdalarda farklı tabakalar arasına uygulanabilmektedir. Örneğin; pizza, börek, şeker gibi gıdalarda farklı nitelikteki maddeler arası nem göçünün neden olduğu bozulmaları önlemek için kullanılmaktadır.
- Yenilebilir filmler yenilemeyen filmlerle birlikte kullanılarak ambalaj materyal miktarı ve maliyeti azaltılabilir. Bu durumda yenilebilir filmler gıda ile temasta olan iç kısımda yer alır.
- Yenilebilir filmler taze ürünlerin üzerinde koruyucu bir tabaka oluşturarak iç gaz sayısının modifiyesiyle modifiye atmosfer depolama ile benzer etkiyi gösterebilir. Böylece kalite bileşenlerindeki temel kayıplar önlenabilir.



Örneğin; peynir, balık ve fırıncılık gibi ürünlerin yüzeyine uygulandığında küf gelişimini azaltır.

- Kızartılmış gıda maddelerine yağ geçişinin önlenmesi veya en aza indirilmesi için lipit geçirgenliği düşük olan maddelerle kaplanması yağ emilimini azaltarak kalori alımının düşürülmesine yardımcı olur.
- Ozmotik dehidrasyon sırasında süktroz ya da sodyum kloritin geçişi yenilebilir film ve kaplamalar tarafından sınırlandırılabilir. Film gıda yapısındaki kararlılığın korunmasına yardımcı olur.
- Yenilebilir film ve kaplamalar gıdanın ezilme ve kırılmasını azaltarak mekanik koruma sağlar ve böylece gıdanın bütünlüğüne katkıda bulunur.

Yukarıda değinilen yenilebilir filmlerin avantajlarının yanısıra kullanımlarını sınırlayan bazı geliştirilmesi gereken özellikleri de bulunmaktadır. Yenilebilir film ve kaplamaların dezavantajları ise Baldwin (1994), Skurtys ve ark. (2010) ve Işık ve ark. (2013) tarafından aşağıdaki gibi özetlenmiştir.

- Film ve kaplamaların yapısında bulunan elemanların (katkı maddeleri, bileşenler gibi) şekil ve boyut olarak dağılımında kontrol sağlanamadığından kalite kayıplarının olması,
- Film kalınlığının genellikle sabit olmaması ve kontrol edilememesi,
- Uygulama maliyetlerinin yüksek olması,
- Yeni bir teknoloji olup çoğu tüketicinin tüketmekte tereddütü olması,
- Yenilebilir özellikte olmalarından dolayı tüketici sağlığı için çoğu defa ikinci bir ambalaj materyaline ihtiyaç duyulması,

- Birtakım antioksidan maddelerin ilavesinde kanserojen etkinin ve bazı film materyallerinde alerjen etkilerin ortaya çıkması,
- Petrol türevi materyallere göre daha az fiziksel ve kimyasal dirence sahip olmaları, madde geçişini daha az engellemeleri ve bu yüzden uygulanacakları ürün çeşitliliğinin sınırlanmış olması en önemli dezavantajlardır.

Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar bu dezavantajları ortadan kaldıracabilecek potansiyele sahiptir.

### **2.2.1. Film yapma tekniği**

Film yapmak için birçok teknik geliştirilmiştir. Bunların arasında koaservasyon, ısı jelleşme, çözücü uzaklaştırılarak ve eriyiğin katılaştırılması gibi işlemler sayılabilir.

#### **2.2.1.1. Koaservasyon**

Solüsyon içerisindeki biyopolimerler solüsyonun koşulları ısı, tuz ekleme veya pH değiştirme ile değiştirilerek filme dönüştürülebilir. Böylece film fazı ayrılarak biyopolimerler biraraya gelir (Debeaufort ve ark., 1998; Çağrı-Mehmetoğlu, 2010).

#### **2.2.1.2. Çözücünün uzaklaştırılması**

Hidrokolloid filmlerin yapımında yaygın olarak kullanılan diğer bir yöntem de çözücünün uzaklaştırılmasıdır. Bu işlemde, sürekli bir yapı oluşturulur ve moleküller arası etkileşim değişik fiziksel ve kimyasal muameleler ile kararlı hale getirilir. Film çözeltisindeki makromoleküller su, etanol ya da asetik asit gibi çözücü ortamında dispers durumundadırlar. Bu karışıma filmin özelliklerini geliştirmek için sorbitol, gliserol gibi plastikleştiriciler veya diğer katkı maddeleri eklenir. Bu film karışımı düz bir yüzeye ince bir tabaka şeklinde dökülür, kurutulur ve yüzeyden soyulur (Debeaufort ve ark., 1998; Çağrı-Mehmetoğlu, 2010).

### 2.2.1.3. Eritmeyi izleyen katılaştırma

Eriyiğin soğutmayla katılaştırılmasında soğuma hızı elde edilen filmin fiziksel özelliklerinde önemli rol oynar. Lipit, reçine ve mum filmlerde yaygın olarak uygulanır (Debeaufort ve ark., 1998; Çağrı-Mehmetoğlu, 2010).

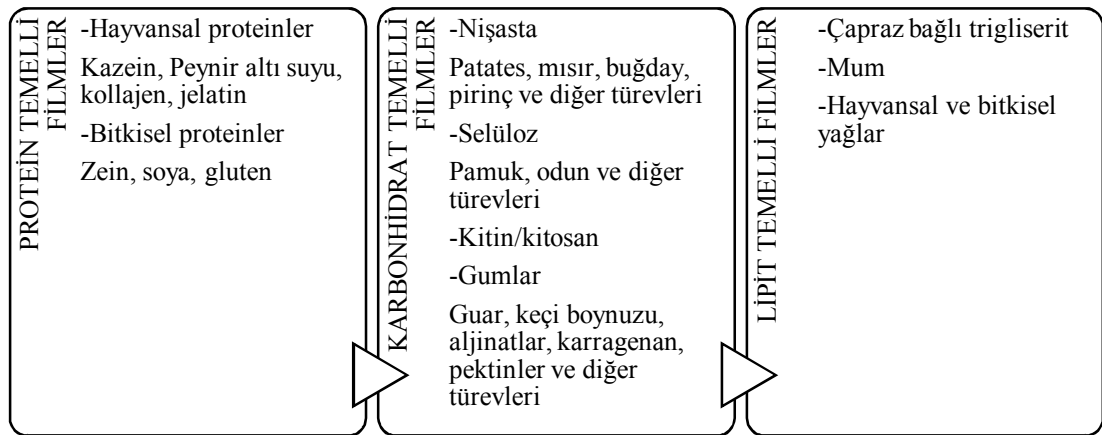
### 2.2.1.4. Isıl jelatinizasyon ve koagülasyon

Bazı protein filmlerin (peynir altı proteini, kazein, soya proteini, buğday gluteni vb.) hazırlanmasında, bu makro moleküllerin karışımları proteinin denatürasyonu, jel oluşumu veya çökme işlemlerini kapsayan jelatinizasyonu ve koagülasyonun gerçekleşmesi için ısıtma işlemi tabi tutulur. Isıtmayı ani bir soğutma işlemi takip eder (Debeaufort ve ark., 1998; Çağrı-Mehmetoğlu, 2010).

### 2.2.2. Film yapma tekniği

Yenilebilir filmlerin temel yapısı protein, lipit, polisakkarit veya bunların karışımı (kompozit) olarak ayrılır (Şekil 2.1.). Ayrıca lipit ve hidrokolloidleri içeren kompozit filmler de geliştirilmiştir. Filmlerin fiziksel veya fonksiyonel özelliklerini modifiye etmek için plastikleştirici veya diğer katkı maddeleri ile birlikte kullanılabilirler (Han ve Gennadios, 2005; Lacroix, 2009).

Şekil 2.1. Yenilebilir filmlerin yapıtaşları (Han ve Gennadios, 2005).



Polisakkarit temelli yenilebilir film ve kaplamalar nişasta ve nişasta türevleri, selüloz türevleri, aljinat, karragenan, kitosan, pektin ve çeşitli gamlardan oluşur. Polisakkaritlerin hidrofilik yapısı zayıf su buharı geçirgenliğine ve düşük gaz bariyer özelliğine neden olur. Polisakkarit kaplamalar iyi su buharı bariyeri sağlamamasına rağmen gıdalardan nem kaybını geciktirici ajanlar gibi rol oynarlar (Guilbert ve ark., 1996; Bourtoom, 2008; Pavlath ve Orts, 2009; Çağrı-Mehmetoğlu, 2010).

Lipit temelli film ve kaplamalar asetillenmiş monogliseritler, doğal balmumu ve yüzey aktif bileşikleri içerirler. En etkili lipit maddeleri parafin ve balmumdur. Lipit kaplamaların öncelikli fonksiyonu düşük polariteleri sayesinde nem geçişini önlemektir. Apolar hidrokarbon içeren filmlerin su buharına karşı bariyer özelliği iyi olmasına karşın gaz geçişine karşı iyi olmadığı bilinmektedir. Ayrıca bu tür filmler opak, oldukça kırılkan ve oksidasyon nedeniyle kararsız olabilirler (Guilbert ve ark., 1996; Pavlath ve Orts, 2009; Çağrı-Mehmetoğlu, 2010).

Protein temelli film ve kaplamalar kollajen, jelatin, zein, kazein, soya proteini ve buğday glütenu gibi hayvansal ve bitkisel yapılardan oluşmaktadır. Protein esaslı filmler genellikle hidrofilik özellikte oldukları için oksijen ve karbondioksit bariyer özellikleri iyiye yakın nem bariyer özelliği düşüktür (Bourtoom, 2008; García ve ark., 2009; Krochta, 2010).

#### **2.2.2.1. Protein temelli yenilebilir filmler**

Yenilebilir protein filmler bitkisel kökenli proteinler (mısır zeini, buğday glütenu, soya proteini, bezelye proteini, ayçiçeği proteini, yer fıstığı proteini ve çığit proteini vb.) ve hayvansal kökenli proteinler (keratin, kollajen, jelatin, balık miyofibriller proteini, yumurta beyazı proteini, kazein ve peynir altı suyu proteini vb.) olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. Yenilebilir protein filmler çeşitli protein kaynaklarından saflaştırılan izolatlardan veya konsantre protein ürünlerinden oluşturulduğu gibi işleme proseslerinden açığa çıkan atıkların değerlendirilmesiyle de üretilmektedir (Gennadios ve ark., 1994; Chen, 1995; Tien ve ark., 2001; Dursun ve Erkan, 2009; Krochta, 2010).

Sentetik filmlere kıyasla çoğu protein film mükemmel bir oksijen bariyeridir (Tomasula, 2009). Ürüne yüksek oranda parlaklık kazandırır ve şellak reçinesi yerine kullanılabilirler (Işık ve ark., 2013). Ancak protein filmlerin aşırı kırılkan yapısı uzama ve esneme yeteneğini sınırlandırmaktadır (Gennadios ve ark., 1994; Chen, 1995; Krochta, 2010). Bir diğer kullanım dezavantajı da bu filmlerin hidrofilik özelliklerinden dolayı su buharı geçirgenlikleri yüksektir, nemli koşullarda şişer veya çözünürler (Tomasula, 2009).

### 2.2.3. Yenilebilir film ve kaplamaların fonksiyonları

Yenilebilir filmlerin bariyer özelliği, taşıyıcı özelliği, mekanik özelliği gibi bazı fonksiyonları ve spesifik özellikleri bulunabilmektedir. Bu özellikleri seçici ve aktif özellikler olmak üzere 2 ana gruba ayrılabilir (Debeaufort ve Voilley, 2009).

Tablo 2.1.'de farklı gıdalarda yapılan çalışmalarda yenilebilir filmler uygulamalarının bazı fonksiyonları özetle verilmiştir.

Tablo 2.1. Yenilebilir filmlerle kaplanmış farklı gıdalar üzerine yapılan çalışmalar.

| Film                   | Gıda               | Faydası                                              | Referans                          |
|------------------------|--------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Kazein                 | Soyulmuş havuç     | Dehidrasyonu ve beyazlaşmayı önlemiştir.             | Avena-Bustillos ve ark. (1993).   |
| Sodyum kazeinat        | Yeşil biber        | Oksijen ve karbondioksit geçişini düşürmüştür.       | Lerdthanangkul ve Krochta (1996). |
| Aljinat ve elma püresi | Elma dilimi        | Raf ömrünü geliştirmiştir.                           | Rojas-Graü ve ark. (2007)         |
| PASP                   | Yumurta kabuğu     | Kabuk sertliğini artırırken m.o. yükünü düşürmüştür. | Xie ve ark. (2002)                |
| Selüloz                | Kızatılmış gıdalar | Yağ absorpsiyonunu düşürmüştür.                      | Holownia ve ark. (2000, 2001)     |
| Kitosan                | Kırmızı biber      | Renk kaybını, solunumu ve küf gelişimini önlemiştir. | El-Ghaouth ve ark. (1991)         |

### **2.2.3.1. Yenilebilir film ve kaplamaların seçici özellikleri**

Yenilebilir film ve kaplamaların seçici özellikleri gibi su buharı geçirgenliği, gaz geçirgenliği ( $O_2$  ve  $CO_2$ ) ve aroma geçirgenliği gibi bariyer özelliklerini kapsamaktadır (Debeaufort ve ark., 1998).

#### **2.2.3.1.1. Yenilebilir film ve kaplamaların su buharı geçirgenlik özelliği**

Yenilebilir film ve kaplamaların en önemli işlevlerinden bir tanesi su buharı geçişine karşı bariyer özelliğidir. Bu sayede gıda maddelerinin depolanmaları sırasında oluşan ağırlık kayıpları azaltılabilmektedir (Akbaba, 2006). Dolayısıyla ürünlerdeki kalite kaybı ve ekonomik zarar minimuma indirgenmektedir. Su buharı geçirgenliği belirli sıcaklık ve nem koşulları altında birim kalınlıktaki maddenin birim alanı başına iki spesifik yüzey arasında buhar basınç farkının birim su buharı iletim oranı olarak tanımlanır (Rogers, 1985). Su buharı geçirgenliği gıdanın gevrekliğinin depolama boyunca korunması için önemli bir faktördür (Cuq ve ark.,1995). Örneğin; su absorpsiyonuyla indüklenen toz gıdalardaki topaklaşma veya kuru pastalardaki gevreklik kaybı film ve kaplamalar tarafından önlenabilir (Debeaufort ve ark., 1998). Özellikle su bariyeri etkisi taze (et, meyve, sebze) ve dondurulmuş ürünlerde yüzeyden su kaybının geciktirilmesinde önem taşır (Debeaufort ve ark., 1998).

Yenilebilir filmler yapılarına göre farklı su buharı geçirgenlik özellikleri göstermektedir. Lipit yapılı filmlerin hidrofobik yapıları su buharı geçirgenliğini düşürdüğünden mükemmel nem bariyerleridir. Matriks içindeki polimer zincirler ve lipitlerin dağılımı film geçirgenliğinde önemli rol oynar. (Letendre ve ark., 2002). Lipit temelli materyallerin dışında kalan yenilebilir filmlerin çoğunun su buharı geçirgenliği yaygın plastik filmlerden çok daha yüksektir (Debeaufort ve ark., 1998). Özellikle protein temelli filmlerin su buharı geçirgenlik özelliği fazladır (Cuq ve ark.,1995). Ancak orta derecede su buharı geçirgenliği bazı durumlarda istenilen bir özelliktir. Örneğin buhar bariyeri gelişmiş olan plastik filmlerde su buharının paketin iç yüzeyinde kondanması taze ürünlerin mikrobiyal kontaminasyonuna yol

açması nedeniyle istenmemektedir. Aşırı geçirgenlik ise depolama sırasında aşırı nem kaybına neden olmaktadır (Park, 2000).

#### **2.2.3.1.2. Yenilebilir film ve kaplamaların gaz geçirgenlik özelliği**

Gıda ürünü ve bünyesinde barındırdığı mikrobiyal metabolizmalar  $O_2$  tüketimi ve  $CO_2$  üretiminden sorumludurlar. Gıdaların bozulması ve raf ömürlerinin sona ermesinde önemli rol oynayan mikrobiyal aktivite  $O_2$  ve  $CO_2$  kompozisyonunu değiştirmektedir (Skurtys ve ark., 2010). Oksidasyona duyarlı doymamış yağları içeren fındık, fıstık gibi çerezlerde ve antioksidan içeren meyvelerde  $O_2$  bariyer özelliği büyük önem taşımaktadır. Ambalajda  $O_2$  değişiminin kontrolü meyvelerde olgunlaşma kontrolünü, oksijene duyarlı gıdaların oksidasyonunu ve çoklu doymamış yağlardaki acılaşmanın azaltılmasını sağlar (Debeaufort ve ark., 1998).

Depolama süresince gıdaların tazeliğini ve toplam kalitesini sürdürebilmek için spesifik atmosfer koşullarına ihtiyaç vardır. Paket içerisinde sabit gaz konsantrasyonunu sağlamak için paketleme materyalinin belirli bir gaz bariyer özelliği sağlaması gerekir (Debeaufort ve ark., 1998). Film ve kaplamalar gıdalarda çürüme ve bozulmayı önlemek amaçlı kontrollü ve modifiye atmosfer depolamaya benzer bir uygulama olarak kullanılabilirler (Skurtys ve ark., 2010).

#### **2.2.3.1.3. Yenilebilir film ve kaplamaların aroma bariyer özelliği**

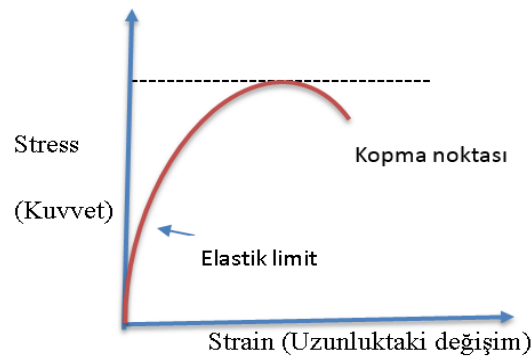
Gıdaların raf ömrü boyunca meydana gelen aroma kayıpları yenilebilir film ve kaplamaların bariyer özellikleri sayesinde önlenmektedir (Miller ve ark., 1997). Örneğin, Miller ve ark. (2008) yenilebilir filmler üzerine yaptıkları çalışmada filmlerin gıda yapısındaki aroma bileşenlerinin kaybını önleme de bariyer özelliğinin önemini vurgulamışlardır.

#### 2.2.3.1.4. Yenilebilir film ve kaplamaların yağ bariyer özelliği

Yenilebilir film ve kaplamaların bir diğer fonksiyonu yağda kızartılan gıdalarda yağ emilimine karşı adsorpsiyon özelliği göstermesidir. Kızartılmış gıdalardan yağ alımı sağlık açısından riskli olmakla birlikte lipidlerin aşırı tüketimi obeziteden kalp damar hastalıklarına kadar birçok probleme neden olmaktadır. Gıdaların kaplanması kızartmalardaki yağ oranını düşürmek için önemli bir uygulamadır (Garcia ve ark., 2008). Bu konuda yapılmış bir çalışmada patateslerin 3 farklı yenilebilir filmle (zein, metil selüloz, hidroksipropilmetilselüloz) kaplanarak kızartılması sonrası yağ absorpsiyonundaki değişim kontrol örneklerine kıyasla incelenmiştir. Kontrol örneklerine göre patates kızartmalarının yağ absorpsiyonunun mısır zeini film ile kaplanan örneklerde % 59, hidroksipropilmetilselüloz film ile kaplanan örneklerde % 61,4 ve metilselüloz film ile kaplanan örneklerde ise % 83,6 oranında azalma gösterdiği kaydedilmiştir (Mallikarjunan ve ark., 1997). Sonuçta özellikle metil selüloz filmle kızartmaların kaplanmasında, yağ absorpsiyonun önlenebildiği vurgulanmıştır.

#### 2.2.3.1.5. Yenilebilir film ve kaplamaların mekanik özellikleri

Yenilebilir film ve kaplamalar gıda ürünlerini basınç, titreşim gibi dış etkilerin yol açtığı fiziksel hasarlardan korur. Ticari filmlerde kullanılan mekanik değerlendirme yöntemleri yenilebilir film ve kaplamaların yapısal gücünü değerlendirmek için de kullanılmaktadır. Bunlar arasında çekme gerilimi, uzatılabilirlik, çekmede % uzama, yapışma kuvveti gibi mekanik özellikler yer almaktadır (Han, 2014). Çekme gerilimi-çekmede % uzama katsayısı değişim grafiği Şekil 2.2.'te gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Gerilim- Uzama katsayısı değişim grafiği.



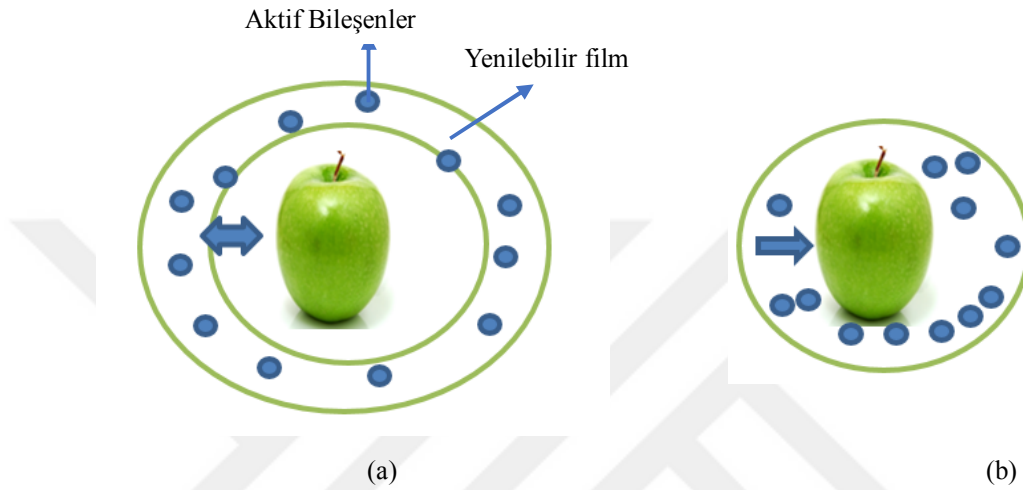
Filmlerin yapıtaşına bağlı olarak mekanik özellikler etkilenmektedir. Buna bağlı olarak protein ve karbonhidrat gibi hidrokarbonların yüksek hidrofobik yapısı istenilen yenilebilir film fonksiyonlarının elde edilmesini sınırlandırmaktadır (Lacroix, 2009; Çağrı-Mehmetoğlu, 2010). Bu filmlerin uzama katsayıları ve uzama özellikleri yok denecek kadar düşüktür (Çağrı-Mehmetoğlu, 2010). Filmlerin mekanik ve fizikokimyasal özellikleri ekstrüzyon uygulaması veya film bileşenleri arasındaki etkileşimin teşvik edilmesiyle geliştirilebilir. Fiziksel (ısı, radyasyon, basınç, ultrases vb.), kimyasal (kimyasal çapraz bağlar, asit, alkali vb.) veya enzimatik uygulamalar filmlerin fonksiyonel özelliklerini değiştirmektedir (Lacroix, 2009). Örneğin; filmlere uzama kazandırmak için film çözeltisine plastikleştirici etki yapan gliserol, sorbitol, mannitol, sakkaroz gibi maddeler eklenebilir. Plastikleştiriciler hidrojen bağlarıyla protein polimer zincirleri arasındaki mesafeyi artırarak hareket kabiliyeti dolayısıyla uzama özelliğini iyileştirir (Çağrı-Mehmetoğlu, 2010). Mekanik özellikleri geliştirmek için kullanılan yöntemler arasında ısıtma işleminin de etkili olduğu rapor edilmiştir. Örneğin; Miller ve ark. (1997) tarafından yapılan çalışmada peynir altı suyu proteininden elde edilen yenilebilir filmlere 60, 70, veya 80 °C olmak üzere 3 farklı sıcaklık uygulanmış ve artan sıcaklık derecesinin filmlerin çekme gerilimini artırdığı fakat uzama ve çözünürlük özelliklerini azalttığı tespit edilmiştir. Bu tespit ısıtma işleminin polimerlerde çapraz bağlama sağlayarak mekaniksel özellikleri etkilemesine bağlanmıştır. Yüksek sıcaklıklarda daha çok fonksiyonel grup oluşumu çekme gerilimini artırırken daha az düzenli yapı meydana gelmesi elastikiyetin azalmasını açıklamaktadır (Lacroix, 2009).

#### **2.2.3.1. Aktif özellikteki yenilebilir film ve kaplamalar**

Aktif paketleme, paket bileşenleri ile gıdanın etkileşime girerek raf ömrünün uzatılmasını, güvenlik ve duyuşal özelliklerin geliştirilmesini ve kalitenin korunmasını sağlayan bir paketleme sistemi olarak tanımlanmaktadır (Yıldırım, 2011). Paketleme materyali olarak da kullanılan yenilebilir filmlerin gıda ile temas halinde olması istenilen özelliklerin elde edilmesi için aktif, interaktif ve akıllı paketlemede kullanımını sağlar (Rooney, 1995). Bu amaçla yenilebilir film ve

kaplamalar gıdaların raf ömrünü artırmak için antimikrobiyal ve antioksidan gibi farklı fonksiyonel ajanların taşıyıcısı olarak kullanılmaktadır (Quezada-Gallo, 2009).

Aktif bileşenlerin yenilebilir filmlerle birlikte kullanımı Şekil 2.3.'te görüldüğü gibi gıdaya aktif bileşenlerin kontrollü geçişini sağlamakta ve direkt uygulanmasından daha fazla etki gösterebilmektedir (Yıldırım, 2011).



Şekil 2.3. (a) Yenilebilir filmde aktif bileşenlerin kontrollü geçişi b) Aktif bileşenlerin yüzeye direkt uygulanması.

Aktif bileşenler gıda ürünlerinin bütünlüğünü bozmadan besleyiciliğini ve estetik özelliklerini geliştirirler (Guilbert ve ark., 1996). Aktif bileşenler (antimikrobiyal, antioksidan vb.) gıda ürününe direkt olarak eklendiğinde gıda maddesinin içine difüze olmakta veya lipit, protein gibi diğer gıda bileşenler ile etkileşime girebilmektedir. Bu gibi nedenlerle bileşenlerin aktivitesinde kayıplar olmaktadır.

#### 2.2.3.3.1. Antimikrobiyal özellikteki yenilebilir filmler

Aktif ambalajlama yöntemlerinden biri olan antimikrobiyal ambalajlama, gıdadaki canlı mikroorganizma sayısını azaltarak gıda güvenliğini sağlayan yeni bir ambalajlama sistemidir (Ayana ve Turhan, 2010). Paketleme materyalleri antimikrobiyallerin gıda içerisine etkin bir şekilde salınımında görev alırlarken antimikrobiyal bileşenler gıda ile temas ettiği zaman yüzeydeki mikroorganizmaların gelişimini de önler (Skurtys ve ark., 2010; Corrales ve ark., 2014).

Tablo 2.2.'de antimikrobiyal katkı filmlerle kaplanmış farklı gıdalarla ilgili çalışmalara örnekler verilmiştir.

Tablo 2.2. Antimikrobiyal katkıları içeren yenilebilir filmlerle kaplanmış farklı gıda örnekleri üzerine yapılan bazı çalışmalar.

| Film              | Antimikrobiyal                  | Gıda                                                                                                     | Referans                   |
|-------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| Kitosan           | Asetik, propiyonik, laurik asit | İşlenmiş et ( <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> )                                | Ouattara ve ark. (2000)    |
| PASP              | p-aminobenzoik asit/sorbik asit | Sosis ( <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella Typhimurium</i> ) | Çağrı ve ark. (2002; 2003) |
| Buğday glüteneini | Sorbik asit                     | Pişmiş tatlı mısır ( <i>L.monocytogenes</i> )                                                            | Carlin ve ark. (2001)      |

Mikrobiyal gelişmeyi geciktirmek ve önlemek için yenilebilir film ve kaplamaların koruyucu bariyer etkisi antimikrobiyallerle güçlendirilebilir (Corrales, 2014). Gıdalarda yaygın olarak kullanılan benzoik asit, propiyonik asit, sodyum benzoat, sorbik asit ve potasyum sorbat gibi kimyasal maddeler yada fenolik bileşiklerin yanısıra bakteriosin, kitosan gibi doğal biyokoruyucular da yenilebilir filmlere eklenebilmektedir (Çağrı ve ark., 2001, 2004; Skurtys ve ark., 2010; Corrales, 2014). Örneğin; Çağrı ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada p-aminobenzoik asit ve sorbik asit karışımını içeren PAS protein esaslı yenilebilir filmlerin *L. monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 ve *Salmonella Typhimurium* üremesine karşı etkisini ve benzer şekilde; Oliveria ve ark.(2007) ise natamisin içeren selüloz esaslı filmlerin *Penicillium roqueforti* üzerine antimikrobiyal etkisini ortaya koymuşlardır. Doğal koruyucuların film bileşenlerine eklendiği bir başka çalışmada ise anason, fesleğen, kişniş, kekik gibi esansiyel yağları içeren kitosan temelli yenilebilir filmlerin *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 gibi patojenlere karşı antimikrobiyal etkisi ortaya konulmuştur (Zivanovic ve ark., 2005). Sonuç olarak yenilebilir filmler doğal veya sentetik antimikrobiyal bileşenler için iyi bir taşıyıcı ortam oluşturmakta ve bu bileşenlerin gıdaya kontrollü difüzyonunu sağlamaktadır.

### 2.2.3.3.2. Antioksidan özellikteki yenilebilir filmler

Gıdaların oksijen ile etkileşimi kalite kayıplarını önlemek amacıyla sınırlandırılmalıdır. Bu amaçla kullanılan antioksidanlar; oksidatif acılaşmayı, bozulma ve renk değişimini önleyerek gıda bileşenlerinin stabilitesini, besin öğelerini ve rengini korurlar. Antioksidanların kullanımı raf ömrünün yanı sıra besleyici özelliklerini ve tüketici tercihini de artırmaktadır (Park, 2014). Antioksidanlar serbest radikallere elektron vererek aktivite göstermektedir. Yaygın olarak kullanılan antioksidanlara asitler ve bütildihidroksiasetil, bütildihidroksitoluen, propil gallat ve tokoferol gibi fenolik bileşenler örnek verilebilir.

Yenilebilir filmlerin gıdaların oksijen ile etkileşimini önleme mekanizması 2 farklı fonksiyona dayanır. İlk olarak oksijene karşı gösterdiği bariyer özelliği, ikinci olarak ise antioksidan ajanların ilavesiyle oluşan ortamda kazanılan spesifik aktivite gıdaların oksidasyonunu engelleyebilmektedir (Bonilla ve ark., 2012). Yenilebilir filmlerde antioksidanların gıda yüzeyinde daha uzun süre tutulması ve kontrollü salınımı oksidasyona karşı daha etkili bir ortam yaratır. Yenilebilir filmler enzimatik oksidasyon gibi enzimatik reaksiyonları da azaltmaktadır (Nisperos-Carriedo ve ark., 1990).

Yenilebilir filmlerin etkinliğini artırmak amacıyla özellikle bitki orijinli doğal antioksidanların araştırılmasının önemi son yıllarda artmıştır. Birçok bitki ve baharatın, yağlarda ve yağlı gıdalarda oksidasyonu geciktirmede etkili olduğu belirtilmiştir (Puertas-Mejía ve ark., 2002; Çalıkoğlu, 2008). Bu konuda kekik, yenibahar veya iki bitki karışımının esansiyel yağlarını içeren süt proteini bazlı yenilebilir filmleri sığır etlerine uygulamalarında (Oussalah ve ark., 2004) yada karanfil ve tarçın esansiyel yağlarını içeren PASP bazlı filmlerle fındıkları kaplayarak (Çalıkoğlu, 2008) yapılan çalışmalarda lipit oksidasyonuna karşı başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Yağ oksidasyonunun yanı sıra oksidasyondan etkilenen çeşitli vitaminlerin korunmasında da film ve kaplamalar önem taşımaktadır. Örneğin; Ayrancı ve Tunç

(2003, 2004), antioksidan (askorbik ve sitrik asit) içeren yenilebilir film ve kaplamaları mantar, karnabahar, kayısı, yeşil biber gibi farklı sebzelere uyguladıkları çalışmalarında sebzelerde C vitamini kaybının azaldığını rapor etmişlerdir. Sonuç olarak yenilebilir filmler bariyer özelliklerinin yanısıra taşıyıcı karakteriyle de besinsel ve duyuşal kalitenin korunumunda önemli bir uygulama olarak görülmektedir.

#### **2.2.3.3.3. PAS (peynir altı suyu) ve PAS proteini temelli filmler**

Ülkemizde 10 milyon ton sütün beşte biri, yani 2 milyon ton süt peynir olarak işlenmektedir. İşlenen sütün yaklaşık % 80'i peynir altı suyuna ayrılır ve ortaya çıkan 1,6 milyon ton gibi azımsanamayacak miktarı yakın tarihlere kadar atık olarak atılmaktadır (TÜİK, 2010). Fakat günümüz teknolojisiyle PAS peynir üretimindeki önemli ürünlerden biri haline gelmiştir. Ultrafiltrasyon ve iyon değişim teknolojileri kullanılarak PAS'dan protein içeriği % 35-85 olan peynir altı suyu protein konsantratları ve % 90'dan fazla olan peynir altı suyu protein izolatları elde edilmektedir. PAS proteinleri 5'e ayrılmaktadır:  $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin, sığır serum albumini (BSA), immunoglobulin ve proteaz peptonları. Ticari izolatlar üretim prosesine bağlı olarak yaklaşık olarak % 30  $\alpha$ -laktalbumin ve % 60  $\beta$ -laktoglobulin, % 7 diğer proteinler ve az miktarda laktoz, kül ve yağdan oluşur (Tomasula, 2009).

PAS proteinleri 65 °C'nin üstündeki sıcaklıklarda denatüre olurlar. Isıl denatürasyon aşaması içeren bir işlem ile üretilen PAS protein filmleri genellikle peynir altı suyu protein izolatlarından meydana gelmektedir (McHugh ve Krochta 1994). Protein izolatları  $\beta$ -laktoglobulinin jelleşme ve çözünürlük özelliklerinden faydalanmak için diğer peynir altı suyu ürünlerine tercih edilir (Tomasula, 2009). Ancak bazı uygulamalarda peynir altı suyu protein konsantratları da kullanılabilir (Chen, 1995; Khwaldia ve ark., 2004; Tomasula, 2009). Ayrıca peynir altı suyu proteininden üretilen filmler, kaplanan gıdaların duyuşal özelliklerine şeffaf ve kokusuz olması nedeniyle fazla etki etmediğinden tercih edilmektedir (Sarıküş, 2006; Çağrı-Mehmetoğlu, 2010).

Peynir altı suyu proteinlerinden hazırlanan filmlerin su buharı geçirgenlik özellikleri hidrofilik yapısı nedeniyle güçlü değildir (Tomasula, 2009; Çağrı-Mehmetoğlu, 2010). Protein filmlerin bariyer özelliklerini güçlendirmek için birçok çalışma yapılmaktadır. Örneğin filmlerin su buharı geçirgenliğini azaltmak için asetillenmiş monogliserid, mumlar gibi lipitler katılarak kompozit filmler elde edilmektedir (Çağrı ve ark., 2003). Yapılan bir çalışmada farklı lipit çeşitleri eklenen PAS protein esaslı filmlerde balmumu emülsiyon filmlerin kandelila mumu, karnauba mumu ve susuz süt yağına kıyasla en düşük su buharı geçirgenlik değerini gösterdiği belirtilmiştir. Bu çalışmada kristal lipitlerin nem transferinde sıvı lipitlere göre daha etkili bir bariyer olduğu ortaya konulmuştur (Shellhammer ve Krochta, 1997). Bir başka çalışmada ise filmlerin bariyer özelliklerine farklı protein ve gliserol konsantrasyonlarının ve pullulan ilavesinin etkisini incelemişlerdir. Çalışmalarında PAS protein sayısının artışı, gliserol ilavesi ve düşük konsantrasyonda pullulan ilavesi ile filmlerin potansiyel bariyer özelliklerini geliştirdiği gözlenmiştir (Gounga ve ark., 2007).

PAS protein filmlerinin uzama katsayıları ve uzama özellikleri yok denecek kadar azdır (Çağrı-Mehmetoğlu, 2010). Bu filmlerin sert ve gevrek yapısına çözüm bulmak amacıyla plastikleştiriciler ilave edilmektedir. Plastikleştiriciler protein zincirleri arasındaki interaksiyonu ve cam geçiş sıcaklığını düşürürken esnekliği artırıcı etki göstermektedir. Bunun yanı sıra filme plastikleştirici eklenmesi çekme gerilimini de ters yönde zayıflatmaktadır. Örneğin; Mc Hugh ve Krochta (1994) çalışmalarında PAS filmlere plastikleştirici olarak farklı konsantrasyonlarda sorbitol ve gliserol ekleyerek uzama ve çekme gerilimine etkisini incelemişlerdir. Hem gliserol hem de sorbitol miktarındaki artış çekme gerilimini azaltırken uzama miktarını artırmıştır.

PAS proteini filmler mükemmel oksijen bariyer özelliğine sahiptir (Tomasula, 2009; Çağrı-Mehmetoğlu, 2010). Bu özelliğinden yararlanarak Tien ve ark. (2001) çalışmalarında oksidatif esmerleşmeyi önlemek için patates ve elma dilimlerinde PAS ve kalsiyum kazeinat filmleri kullanmışlardır. PAS filmlerin kazeinat filmlerden oksidatif esmerleşmeyi önlemede daha iyi olduğunu ve karboksimetilselüloz gibi polisakkaritlerin ilavesiyle de antioksidatif gücün belirgin şekilde arttığını ortaya

koymuşlardır. Bu farklılığın iki protein tipinin de aminoasit bileşiminin çeşitliliğinden kaynaklandığı belirtilmiştir. Ayrıca filmlerin oksijen bariyer özelliğine ek olarak antioksidan etkisini artırmak amacıyla ilave edilen antioksidatif ajanlar bazı işlenmiş gıdalarda hidroperoksit oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu önlemek için kullanılmaktadır. Oksidatif etkinliği artırmak amacıyla yapılan bir çalışmada askorbik palmitat,  $\alpha$ - tokoferol ve gliserol ilave edilmiş PAS proteini film süspansiyonu ile kaplanmış fıstıklarda oksidasyonun önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir edilmiştir (Han ve ark., 2008).

PAS protein filmlerinin aktif bileşenlerle birlikte kullanımı gıdaya aktif bileşenlerin kontrollü geçişini sağlamakta ve direkt uygulanmasından daha fazla etki göstermektedir (Yıldırım, 2011). Filmlerin bu özelliği baz alarak yapılan bir çalışmada p-aminobenzoik asit (PABA) ve sorbik asit (SA) içeren düşük pH'lı PAS temelli filmlerle kaplanan salam ve sosislerin mekanik, nem ve antibakteriyal özellikleri incelenmiştir. Filmlere PABA ve SA ilavesinin, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 ve *Salmonella* Typhimurium patojenlerinin sayısını sırasıyla 3,4, 4,1 ve 3,6 logaritmik birim azalttığı rapor edilmiştir (Çağrı ve ark., 2001). Dolayısıyla gıdaların biyoaktif filmlerle kaplanması üzerine yapılan çalışmalar elde edilen pozitif veriler ışığında hız kazanmıştır.

## **2.3. Biyokontrol Uygulamaları**

### **2.3.1. Antagonist mikroorganizmaların tanımı**

Gıda ve çevreye sentetik kimyasalların zararları hakkında tüketici kaygıları, son on yılda oldukça artmıştır. Gıdaların tüketimi sırasında, insan ve hayvanların bu kimyasallara doğrudan maruz kalma ihtimali vardır (Sharma ve Tiwari, 2014). Tüketicilerin güvenli, yüksek kalitede, sağlıklı ve kimyasal koruyucuları daha az içeren ya da hiç içermeyen ürünlere olan talebi gıda endüstrisini ve araştırmacıları harekete geçirmiştir. Araştırmacılar etkili, güvenli, düşük maliyetli ve çevre dostu gıda üretimi için alternatiflerin geliştirilmesine yönelmiştir. Bu alternatifler “yeşil etiketli” gıdalar olarak adlandırılmaktadır. Dolayısıyla doğal antimikrobiyal

bileşikler ve mekanizmalar üzerinde yapılan çalışmalar hız kazanmıştır (Droby ve ark., 2009; Lacroix, 2011; Schwenninger ve ark., 2011).

Biyolojik kontrol (biyokontrol) genel anlamda insan harici biyolojik mekanizma veya organizmalarla patojenlerin etkisinin ve popülasyon yoğunluğunun azaltılması yoluyla gıda güvenliği ve stabilitesinin geliştirilmesi üzerine çalışılan bir alandır (Droby ve ark., 2009; Özaktan ve ark., 2010; Lacroix, 2011). Bunu gerçekleştirme yöntemlerinden biri de antagonistik mikroorganizmaların (biyokontrol ajanları) kullanımındır (Özaktan ve ark., 2010). Antagonistik etki, bir mikroorganizmanın varlığında diğerinin zarar gördüğü veya etkileşimleri sonucu aktivitesinde, gelişiminde ve çoğalmasında düşüşe neden olan etkileşimler olarak tanımlanmaktadır. Antagonistik etki temelde patojen olmayanlar ile patojenler arasında gıda ve yer rekabet ortamında gerçekleşir. Bu yolla rekabetçi flora antagonistik etkiyle baskılanmakta veya tamamen ortadan kaldırılabilir (Gautam, 2009).

### **2.3.2. Biyokontrol uygulamalarının avantaj ve dezavantajları**

Biyokontrol ajanlarının gıdalarda kullanımının kimyasal koruyuculara göre çeşitli avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Bu avantaj ve dezavantajları Droby (2009); Sharma ve Tiwari (2014)'nın belirttiği gibi aşağıdaki şekilde özetleyebiliriz.

Biyokontrol ajanlarının avantajları;

- Biyokontrol ajanları seçicidir. Genellikle yalnızca hedef zararlıyı ve yakın ilişkili organizmaları etkilerler.
- Toksik kalıntıyı çok az bırakır veya hiç bırakmazlar. Bu sayede çevre dostu bir yaklaşımdır.
- Biyokontrol ajanlarını geliştirme maliyetleri sentetik kimyasal koruyuculara göre daha düşüktür. Ekonomiktir.



- Uygulanabilir, başarılı ve yenilikçi bir uygulamadır.

Biyokontrol ajanlarının dezavantajları;

- Geleneksel kimyasal koruyucular ile karşılaştırıldığında patojen öldürme hızı yavaştır.
- Olumsuz çevre koşullarına duyarlıdır ve dolayısıyla raf ömrü sınırlıdır.
- Laboratuvarı gösterdiği etkiyi gıdada yeterince gösterememektedir.
- Ürünün iç kalitesine etkisi henüz tam olarak bilinmemektedir.

### **2.3.3. Antagonist mikroorganizmalarda bulunması istenen özellikler**

Ticari ölçekte kullanım için ideal biyokontrol ajanlarında bazı özellikler aranmaktadır. Bu özellikler farklı kaynaklardan derlenerek aşağıdaki gibi özetlenmiştir (Bora ve Özaktan, 1998; Droby ve ark., 2009; Özaktan ve ark., 2010, Jones, 2011; Sharma ve Tiwari, 2014).

İdeal antagonist mikroorganizmalar;

- Güvenli olarak tanımlanmış (GRAS) olmalı, hedef dışı canlılara zararlı etkisi olmamalı,
- Kolay kültüre alınabilmeli ve genetik olarak stabil olmalı, kitle üretimi için düşük maliyetli üretim, uygulama ve koruma koşullarına ihtiyaç duymalı,
- Besin isteği spesifik olmamalı ve uygun maliyetli bir besiyerinde gelişme gösterebilmeli,

- Konukçunun olabildiğince çok sayıda patojenine etkili olmalı ve etkinliği tutarlı olmalı,
- Yaşadığı ortamda diğer antagonistler ile uyumlu olmalı ve diğer faydalı mikroorganizmalara olumsuz etkisi olmamalı,
- Duyusal özelliklere negatif etkisi olmamalı, standart fungusitlere dirençli olmalı, diğer kimyasallar ve fiziksel uygulamalardan olumsuz etkilenmemeli,
- Düşük konsantrasyonda etkili olmalı, depolama ve stres koşullarında stabil olmalı, genetik yapısı değişmemeli,
- Biyopreparat haline getirildiğinde pazar potansiyeli olmalıdır.

#### 2.3.4. Antagonist mayalar

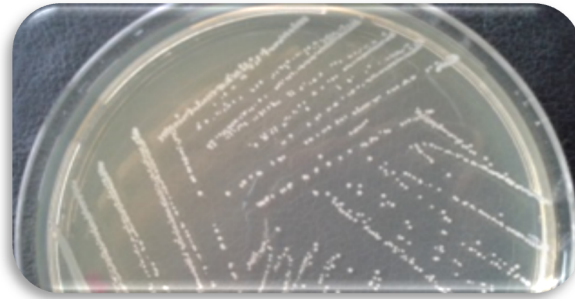
Biyolojik mücadeleye dayalı bilgiler çok eski yıllara gitmesine karşın kimyasallara alternatif olarak kullanımı yaklaşık 20 yıl öncesine dayanmaktadır (Wisniewski ve ark., 2007). Biyokontrol uygulamalarında bakteri, maya, küf gibi farklı ajanlar kullanılabilir. Bazı maya türlerinin öldürücü toksin, öldürücü faktör veya zimosin olarak adlandırılan, hassas suşları inhibe ederken kendilerinin etkilenmediği bir enzim salgıladıkları bilinmektedir. Bu mayalar öldürücü maya olarak adlandırılır (Ohta ve ark., 1984; Komiyama ve ark., 1995, 1998; Kimura ve ark., 1995; Golubev, 1998; Guyard ve ark., 2002). Öldürücü mayalar ilk kez 1963 yılında Bevan ve Makower tarafından *Saccharomyces cerevisiae*'nin aynı türdeki diğer suşlara karşı öldürücü etkisi üzerine rapor edilmiştir (Makower ve Bevan, 1963). Öldürücü mayalar arasında *Candida* (*C. valida*, *C. albicans*), *Cryptococcus* (*C. laurentii*), *Hanseniaspora* (*H. uvarum*), *Hansenula* (*H. anomala*, *H. mrakii*, *H. subpelliculosa*), *Kluyveromyces* (*K. marxianus*, *K. wickerhamii*, *K. phaffii*), *Pichia* (*P. kluyveri*, *P. membrifaciens*), *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. chevalieri*, *S. bayanus*, *S. capensis*, *S. uvarum*) sayılabilir (Vondrejs ve Palkova, 1997; Golubev, 1998).

Biyokontrol uygulamalarında mayaların tercih edilme nedenleri aşağıdaki gibi sıralanabilir (Melin ve ark., 2007):

- Alerjenik spor ve mikotoksin üretmezler. Çoğunlukla patojen değildirler.
- Çoğu maya çeşidi düşük oksijen ve su aktivitesinde gelişebilir.
- Basit besin ortamlarına gereksinim duyarlar.
- Zorlu çevre koşullarında hayatta kalabilme yetenekleri vardır.
- Mayalar gıdanın besin değerini yükseltecek vitamin, mineral ve esansiyel aminoasitleri içerirler.

#### 2.3.4.1. *Williopsis saturnus* var. *saturnus* antagonist mayası

*Williopsis saturnus* var. *saturnus* (eski adıyla *Hansenula saturnus*) öldürücü toksin üreten bir maya olarak bilinmektedir. Laktoz ve galaktozu fermente edemeyen *Williopsis* spp. mayalar gıdalarda aroma ve yapıya olumlu yada olumsuz etkide bulunmazlar. Patojenik, lipolitik ve proteolitik özellik göstermemesi ve uçucu metabolit üretmemesi ideal biyokontrol ajanı olarak kullanımını sağlar (Liu ve Tsao, 2009).



Şekil 2.4. *Williopsis saturnus* var. *saturnus* biyokontrol mayası (TSA + % 0,6 maya özütünde görünümü).

*W. saturnus* var. *saturnus* mayası (Şekil 2.7.) bozulma yapan diğer mikroorganizmaları kontrol ederek kimyasal ve antibiyotik temelli katkıların yerine kullanılabilirler. *W. saturnus* var. *saturnus* antagonist mayasının etkinlik mekanizması üzerine yapılan çalışmalar sonucunda HSK-HYI (Gen kodu, IF0 0117YI) adlı bir toksin salgıladığı ortaya konulmuştur (Ohta ve ark., 1984; Kimura ve ark., 1995, Komiyama ve ark., 1995, 1998; Guyard ve ark., 2002). Bu toksinin öldürücü ve sitosidal etkisi  $\beta$ -1-3 glukan sentezini inhibe ederek mayaların hücre duvarı sentezini önlemesine dayanmaktadır (Komiyama ve ark., 1998). Öldürücü toksini yüksek stabilite gösteren *Williopsis* spp.'nin sıcaklığa dayanıklılığının yüksek olması (80 °C sıcaklığa 1 saate kadar) ve pH 3-11 gibi geniş aralığında çalışmaya imkan vermesi antifungal ajan olarak kullanımını avantajlı kılmıştır (Kimura ve ark., 1995; Marquina ve ark., 2002).

Öldürücü suşların çeşitli maya türlerine karşı etki alanı geniştir (Vondrejs ve Palkova, 1997). *W. saturnus* (*H. saturnus*) mayası *Zygosaccharomyces bailii*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. krusei*, *Kluyveromyces phaffii*, *K. marxianus*, *K. Fragilis*, *K. Lactis* ve *Hansenula* gibi bir çok maya çeşidine karşı öldürücü etki göstermektedir (Vondrejs ve Palkova, 1997). Ayrıca *W. saturnus*'un *Byssochlamys*, *Eurotium* ve *Penicillium* spp.'e karşı antifungal etkisi ortaya konulmuştur (Liu ve Tsao, 2010)

### 2.3.5. Antagonist mayaların etkinliğini belirleyen faktörler

Antagonist mayalar ekonomik açıdan sentetik koruyuculara karşı cazip bir seçenektir. Maya üretiminin geniş çapta gerçekleştirilmesi için mayanın aktivitesini etkileyen faktörleri bilmek önemlidir. Bunlar (besleme oranlarını belirlemek amacıyla) inokulum etkisi, kullanılan besiyeri, uygulandığı gıdanın bileşiminin etkisi, ortam pH'sı, sıcaklık ve depolama-koruma koşulları olarak belirlenmiştir (Rodgers, 2001; Droby ve ark., 2009; Schwenninger ve ark., 2011; Sharma ve Tiwari, 2014).

### 2.3.5.1. İnokulum etkisi

İnokulum miktarı; antimikrobiyal maddelerin üretim oranı ve hızı, duyu kalite ve maliyet-etki ilişkisinde önem taşır. Yapılan çalışmalarda genellikle 6-10 log kob/g düzeyindeki maya miktarları kullanılmıştır (Droby ve ark., 2009; Schwenninger ve ark., 2011; Sharma ve Tiwari, 2014). Mayaların kullanıldığı son üründe miktarın en az 10 log kob/g olması gerekir. İnokulum miktarının yüksek tutulmasının nedeni mayaların gelişme oranı yüksek olsa da gelişme hızının bakterilerden daha düşük olmasıdır. Bu yolla fermentasyon süresinin kısaltılması bakteriler tarafından kontaminasyon riskini azaltacaktır (Rodgers, 2001). Aynı zamanda patojen konsantrasyonuna bağlı olarak antagonistik aktivitede inokulum miktarı büyük önem taşımaktadır (Liu ve Tsao, 2010).

### 2.3.5.2. Kullanılan besiyeri

Antagonistlerin hızlı, verimli ve ucuz fermentasyon ile seri üretimi önemli bir konudur. Bu nedenle, biyolojik kontrol etkinliğini korurken, minimum maliyetle maksimum biyokütle üretimi sağlayan karbon ve azot kaynakları bulmak esastır. Geliştiği besiyeri endüstriyel atıklar veya atık materyaller olabilir (Droby ve ark., 2009). Örneğin; Abadias ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada biyokontrol mayası *Candida sake*'nin gelişiminde şeker kamışı melasını besiyeri olarak kullanmıştır. Ayrıca pamuk çekirdeği unu, mısır ıslatma çözeltisi, kısmen sindirilmiş pepton, maya özütü gibi ucuz endüstriyel atık maddeler maya hücrelerinin çoğalması için besiyeri olarak kullanılabilir (Droby ve ark., 2009).

### 2.3.5.3. Uygulandığı gıda kompozisyonunun etkisi

Gıdanın bileşimi ve yapısı antagonist kültürü destekleyebilir veya engelleyebilir. Örneğin tuzlar, asitler, baharatlar ve eklenen koruyucular kültürle sinerjistik etki gösterebilir (Rodgers, 2001). Örneğin; ortama glukoz ve kalsiyum klorit (Potjewijd ve ark., 1995), reçine ester ve KOH solüsyonları (McGuire ve Dimitroglu, 1996; 1999) ve glukoz, sükroz ve fruktoz,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , fenilalanin ve asparagin (Zhang ve

ark. ,2011) gibi katkıların ilave edilerek biyokontrol mayasının etkinliğinin artırıldığı farklı çalışmalar mevcuttur.

#### 2.3.5.4. Ortamın pH'sı

Mayalar düşük pH'da da (pH 3 altı) gelişebilirler. Mayaların bu özelliği bakteriyel kontaminasyonun kontrolünde kullanılır. Çünkü pH 5'in altında gerçekleşen fermentasyonlarda bakteri kültürlerinin gelişememesi nedeni ile mayaların kontaminasyona uğrama riski düşmektedir (Droby ve ark., 2009; Schwenninger ve ark., 2011). Biyokontrol ajanlarının enzim aktivitesi bakımından da pH değerleri önem taşımaktadır. Örneğin; yapılan bir çalışmada *Wickerhamomyces anomalus* antagonist mayasının antagonistik aktivitesinin pH 4,5'te en yüksek olduğu belirtilmiştir (Muccilli ve ark., 2013).

#### 2.3.5.5. Ortamın sıcaklığı

Sıcaklık antagonist mayaların gelişimlerini ve ürettikleri enzim konsantrasyonlarını etkileyen önemli bir parametredir. Koruyucu kültürlerin (biyokontrol ajanları) depolama koşullarında canlılıklarını ve antagonistik etkilerini koruması istenmektedir. Optimum sıcaklıkta antagonist kültürler aktivitelerini maksimum düzeyde gösterebileceklerdir (Rodgers, 2001). Örneğin; Persons ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* biyokontrol mayasının *Aspergillus flavus* ve *A. parasiticus* küfleri üzerine antagonistik etkisini 3 farklı sıcaklıkta (22 °C, 25 °C ve 32 °C) izlemişlerdir. Optimum gelişme sıcaklığı 15-30 °C aralığında olan *S. cerevisiae*'nin küfler üzerine en yüksek antagonistik etkiyi 22 °C'de gösterebildiği gözlenmiştir. Küflerin optimum gelişme sıcaklığına (25-35°C) yakın olan diğer sıcaklık değerlerinin antagonist mayanın ortamdaki hakimiyetinin baskılanması nedeniyle inhibisyon kapasitesini düşürdüğü belirtilmiştir.

#### 2.3.5.6. Depolama-koruma koşulları

Mayaları kurutmak ve kuru ortamda veya yağ süspansiyonlarında korumak yaygın bir yaklaşımdır. Ürünler ıslatılabilir toz, dondurulmuş hücre konsantreleri veya sıvı

formülasyon halinde kullanılabilirler. Ancak dondurularak kurutulmuş hücreler taze hücrelerden belirgin şekilde daha az etkilidir (Droby ve ark., 2009).

Antagonist kültürler laboratuvar koşullarında gösterdiği etkinliği gıda ortamında da göstermelidir. Bir biyofungusitin ekonomik açıdan 6 ay tercihen 2 yıl etkili olması beklenir. Maya kültürünün koruyucu ve taşıyıcı gibi katkı maddeleri ile desteklenmesiyle etki süresi uzatılabilir. Örneğin fermantasyon sırasında emülsifiyer kullanılarak mayalar hem kullanıma uygun hale getirilir hem de raf ömürleri uzatılabilir (Rodgers, 2001).

### **2.3.6. Antagonist mayaların etkinlik mekanizması**

Patojen ve antagonist arasındaki etkileşim mekanizmasının bilinmesi biyokontrol ajanlarının etkili bir şekilde kullanılması için gereklidir. Ancak bu anlaşıldıktan sonra biyolojik kontrol stratejisinin hangi koşullarda başarılı olunacağı bilinebilir (Özaktan ve ark., 2010).

Mayaların etki mekanizmaları arasında besin ve yer mücadelesi, antibiyozis, parazitizm, antioksidatif stres ve uyarılmış dayanıklılık gibi mekanizmalar sayılabilir (Droby ve ark., 2009).

#### **2.3.6.1. Besin ve yer mücadelesi**

Mayaların patojen mikroorganizmalara karşı antagonist etkisi temelde mikroorganizmaların karbonhidrat, azot, oksijen hatta ışık gibi ortamda az bulunan bir çok faktör için yarışına dayanır (Droby ve ark., 2009; Sharma ve Tiwari, 2014, Lacroix, 2011). Zhang ve ark. (2011) mayaların antagonistik etkisinin, azot ve karbon kaynağı için rekabet, hidrolitik enzimlerin salınması ve konakçı indüksiyon direncinden kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Mayalar topraktaki suda çözünmeyen  $Fe^{+3}$  formunu kullanılabilir form olan  $Fe^{+2}$ ye indirgerken siderofor adlı bir madde üretirler (Özaktan ve ark., 2010). Bu sideroforlar patojenlerin çoğalmasını, gelişmesini ve virülans etkisini önleyerek

biyokontrolü desteklerler. Ayrıca demir eksikliğinde küflerin katalaz aktivitesi düşerken ROS (reaktif oksijen cisimleri) direnci de azalmaktadır (Oberegger ve ark., 2001). Örneğin, Saravanakumar ve ark. (2008)'da yaptıkları çalışmada *Metschnikowia pulcherrima* antagonist mayasının ortamda sınırlı miktarda demir varken çeşitli küfler misellerinin oluşumunu ve tomurcuklanmasını önlediğini ancak dışarıdan yüksek miktarda demir ilave edildiğinde öldürücü etkisinin ortadan kaybolduğu belirtmiştir.

Mayalar yer rekabetinde hızla çoğalarak biyofilm oluşturan ekstraselüler polisakkarit kapsül oluşturabilme özelliği sayesinde avantajlıdır (Spadaro ve Droby, 2016). Biyokontrol mayalarının yüzeye yapışma, kolonize olma konusunda spesifik özellikleri vardır (Spadaro ve Droby, 2016). Bu özelliğin temelinde mayaların biyofilm oluşturabilmesinin olduğu düşünülmektedir.

Biyofilm mayaların hayatta kalma sürelerini uzatırken, patojenlerin gelişme alanlarını daraltmaktadır (Droby ve ark., 2009; Lacroix, 2011; Sharma ve Tiwari, 2014). Bu konuda Ortu ve ark. (2005) ve Giobbe ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmalarda *S. cerevisiae* ve *Pichia fermentans* gibi maya türlerinin tyrosol and farnesol gibi quorum sensing molekülleri salgılayarak ve film oluşturma özellikleri sayesinde küf gelişimini önleyebildiği belirtilmiştir. Benzer şekilde *Pseudozyma flocculosa* mayası salgıladığı yağ asidi temelli antifungal toksinleri sayesinde küflerin hücre duvarlarından girip membran akıcılığını bozarak hücre parçalanmasına yol açabilmektedir (Avis ve Bélanger, 2002).

#### 2.3.6.2. Antibiyozis etkisi

Bazı mayalar ürettikleri öldürücü ekstraselüler protein, glukoprotein ve glikolipit yapıdaki antibiyotik metabolitlerle aynı veya farklı türlerdeki hassas hücreleri yıkıma uğratabilirler (Bora ve Özaktan, 1998). Öldürücü mayaların salgıladıkları öldürücü toksinlerin etki mekanizması;  $\beta$ -1-3 glukan sentezini inhibe ederek hücre membran yapısını bozmak, aminoasit alımını engellemek, DNA sentezini engelleyerek hücre



bölünmesini önlemek ve membranın iyon geçirgenliğini artırmak olarak sayılabilir (Hoover, 2000; Marquina ve ark., 2002).

Öldürücü toksinler hassas hücreleri çoğunlukla gelişme evresinde membrana hasar vererek öldürür. Örneğin; *S. cerevisiae*'dan salgılanan protein yapıdaki K1, K2 ve K28 toksinleri hücre membran yapısını etkiler ve DNA sentezini inhibe ederek hücreyi öldürür. *Hansenula spp. (Williopsis)* ise HSK-HYI toksinleriyle patojenlerin hücre duvar sentezini önlerken, *Kluyveromyces* hassas maya hücrelerinin tomurcuklanma mekanizmasını bozarak üremelerini engeller (Vondrejs ve Palkova, 1997). Benzer şekilde *Pseudozyma flocculosa* mayası salgıladığı yağ asidi temelli antifungal toksinleri sayesinde küflerin hücre duvarlarından girerek hücrenin parçalanmasına yol açarlar (Avis ve Bélanger, 2002).

#### 2.3.6.3. Parazitik etki

Antagonist mayalar küfleri tanıdıktan sonra hiflerine yapışarak parazitik etki gösterir ve ürettiği litik enzimlerle hücreyi eritirler (Wisniewski ve ark., 2007; Sharma ve Tiwari, 2014, Lacroix, 2011). Antagonist mayaların ürettiği 1,3- $\beta$ -glukanaz, kitinaz, ve proteazlar gibi litik enzimlerin biyokontrol aktivitesinde olumlu etkisi vardır (Droby ve ark., 2009; Sharma ve Tiwari, 2014, Lacroix, 2011). Yapılan bir çalışmada *Aureobasidium pullulans* antagonist mayasının *Monilia*, *Botrytis* ve *Penicilium* küflerinin gelişimini 1,3- $\beta$ -glukanaz ve kitinaz enzimlerinin aktivitesiyle önleyebildiği ortaya konulmuştur (Zhang ve ark., 2010). Ayrıca bazı maya türlerinin, gıda ve yem maddelerinde mikotoksin oluşumunun engellenmesinde veya üründe bulunan mikotoksinlerin ortamdan uzaklaştırılmasında kullanımı bulunmaktadır (Bata ve Lasztity, 1999).

#### 2.3.6.4. Uyarılmış dayanıklılık etkisi

Antagonist mayaların diğer bir etki mekanizması, taze meyvelerde patojen üremelerine karşı dayanıklılığın artırılması olarak bilinir. Bu uyarılmış dayanıklılık olarak tanımlanır. Sistem, mayaların, meyvelerde bağışıklık sistemini patojen

bulaşmadan önce çeşitli uyarıcılarla uyarak, harekete geçirmesi prensibine dayanır (Özaktan ve ark., 2010; Spadaro ve Droby, 2016).

#### 2.3.6.5. Oksidatif stres etkisi

Meyvelerin patojen olan veya olmayan mikroorganizmalara karşı ilk tepkisi reaktif oksijen cisimlerindeki artıştır. Antagonist mayaların meyve yüzeyinde oluşan oksidatif strese patojenlere kıyasla dayanımlarının daha yüksek olması diğer bir etki mekanizması olarak sayılmaktadır. Süperoksit anyonların üretimi hücreler arası iletişimden sorumlu quorum sensing sinyalleri ve biyofilm oluşumunu da etkilemektedir (Bolwell ve ark., 2002; Spadaro ve Droby, 2016). Ayrıca etilasetat sentezi ve ortamdaki oksijenin mayalar tarafından hızla tüketilmesi de biyokontrol aktivitesinin altında yatan nedenlerdendir (Melin ve ark., 2007).

#### 2.3.7. Antagonist mayaların ticari olarak kullanımı

Laboratuvarı, bazı maya antagonistlerinin hasat sonrası hastalıkların kontrolü için biyoürün olarak ticarileştirilmesi birçok zirai ilaç şirketinin ilgisini çekmiştir. Aspire™ (*Candida oleophila* suşları 1–182) ve YieldPlus™ (*Cryptococcus albidus*), Shemer™ (*Metschnikowia fructicola*), BoniProtect® (*Aureobasidium pullulans*), CandiFruit (*C. sake*) meyve ve sebze hasat hastalıklarını kontrol etmek için dünya çapında kullanılan etkili biyokontrol ajanlarındandır (Droby ve ark., 2009; Sharma ve Tiwari, 2014; Lacroix, 2011).

Öldürücü mayalar ilk kez 1963 yılında Bevan ve Makower tarafından *Saccharomyces cerevisiae*'nin aynı türdeki diğer suşlara karşı öldürücü etkisi üzerine rapor edilmiştir (Makower ve Bevan, 1963). Ancak gıdalarda ilk biyokontrol çalışmaları Tronsmo ve Dennis (1977) tarafından çileklerde küflenmeye karşı *Trichoderma* antagonist mayasının kullanılmasıyla başlamaktadır.

Günümüze kadar antagonist mekanizmasını çözebilmek ve etkinliğini artırmak amacıyla bir çok araştırma yapılmıştır (Tablo 2.3.).

Tablo 2.3. Antagonist mayaların farklı gıdalarda uygulanması üzerine yapılan çalışmalar.

| Antagonist maya                                 | Mekanizması                                                           | Hedef mikroorganizma                       | Meyve/ Referans                  |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                 | K2 ve Klus toksini                                                    | Bozulma yapan mayalar                      | Şarap (Pfeiffer ve Radler, 1984) |
| <i>Williopsis saturnus</i> var. <i>saturnus</i> | Yer yarışı ve HM1 öldürücü toksini                                    | <i>S. cerevisiae</i> , <i>K. marxianus</i> | Peynir (Liu ve Tsao, 2009)       |
| <i>Candida famata</i>                           | Litik enzim                                                           | <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>      | Papaya (Björnberg ve ark., 1993) |
| <i>C. sake</i>                                  | Azot yarışı                                                           | <i>P. expansum</i>                         | Armut (Nunes ve ark., 2001)      |
| <i>Aureobasidium pullulans</i>                  | 1,3- $\beta$ -glukanaz, ekzokitinaz, endokitinaz, besin ve yer yarışı | <i>B. cinerea</i> , <i>P. expansum</i>     | Elma (Zhang ve ark., 2010)       |
| <i>Wickerhamomyces anomalus</i>                 | Uçucu bileşikler (2-feniletanol)                                      | <i>A. flavus</i>                           | Fıstık (Hua ve ark., 2014)       |

Örneğin; Zhang ve ark. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada *Rhodotorula glutinis* (8 log kob/mL) antagonist mayasını tek başına ve/veya salisilik asitle kombinasyonu ile şeftalilere uygulayarak gri küf üretiminden sorumlu *Botrytis cinerea*'nın gelişiminin önlenmesi ve kalitenin korunması amaçlanmıştır. Çalışmanın sonucunda *R. glutinis* antagonist mayası *B. cinerea*'nın spor üretimini kontrol örneklerine göre % 69,3 oranında azaltmıştır. Kalite parametrelerinde 20 °C'de 7 gün boyunca olumsuz bir değişim gözlenmemiştir.

Farklı biyokoruyucuların farklı küflerin gelişimini önlemedeki etkinlik mekanizmasının incelendiği kapsamlı bir çalışmada 4 farklı antagonist mayanın (*Trichosporon pullulans*, *Cryptococcus laurentii*, *R. glutinis* ve *Pichia membranefaciens*) kirazların depolanması sırasında bulaşabilecek çeşitli küf

patojenlerine (*Alternaria alternata*, *Penicillium expansum*, *B. cinerea* ve *R. stolonifer*) karşı etkisi incelenmiştir. Sonucunda 25 °C biyokontrol aktivitesi en yüksek olan maya *T. pullulans* olarak gözlenmiştir (Qin ve ark., 2004).

Öldürücü mayalar arasında üzüm, çilek ve portakal gibi küflenme riski olan meyvelerde *C. laurentii*, *Candida guilliermondii* ve *Debaryomyces* spp., *Wickerhamomyces anomalus*, *Saccharomyces* spp. ve *Williopsis* spp. gibi farklı tür mayaların ilave edilmesiyle küf gelişimi başta olmak üzere mikrobiyal yönden kontrol sağlandığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Cota ve ark., 2008; Janisiewicz ve ark., 2008, Zhang ve ark., 2008).

### **2.3.8. Antagonist mayaların yenilebilir filmlerle ilave kullanıldığı bazı çalışmalar**

Yenilebilir filmlerin aktif özellikleri üzerine yapılan çalışmalar antagonist mikroorganizmaların film yapısına ilave edildiği biyoaktif film çalışmalarını ortaya çıkarmıştır. Antagonist mikroorganizmaların yenilebilir filmlerle ilave kullanılmasının en önemli avantajı biyokontrol ajanlarının stres koşullarına toleransının artırılarak ekolojik yarışta öne geçmesinin sağlanmasıdır (Marín ve ark., 2016). Böylece ajanlar uygulandığı gıdanın yüzeyine daha iyi tutunarak daha uzun süre canlılıklarını koruyabilmektedir (Droby ve ark., 2009).

Antagonist mikroorganizmaların yenilebilir filmlere ilave edildiği çalışmaların tarihi yeni olmakla birlikte birkaç çalışma mevcuttur. Örneğin; portakalların kaplanması üzerine sodyum aljinat ve keçi boynuzu özü temelli yenilebilir filmler (*Wickerhamomyces anomalus*, 7 log kob/mL) ve selüloz temelli çeşitli kaplamaların (*Candida guilliermondii* US7 veya *Debaryomyces* spp. 230) kullanıldığı farklı çalışmalar mevcuttur. Film yapısındaki antagonist mayaların korunumu *W. anomalus* için % 60 ve *C. guilliermondii* US7 veya *D. hansenii* 230 için ise % 85'den fazla olmuştur. Biyokontrol mayasının meyve yüzeyine direkt püskürtülerek uygulanmasına kıyasla film ile kombinasyonu canlılığın korunumunu artırdığı belirtilmiştir. Aynı zamanda film yapısındaki biyokoruyucu ajanların portakalın doğal florasındaki küflerin yanısıra dışarıdan eklenen *P. digitatum* küfüne karşı

antifungal etkisi ( $4 \log \text{ kob/cm}^2$ ) incelendiğinde % 73'ten fazla inhibisyon gözlenmiştir. Bu inhibisyonun film yapısındaki antagonist mayaların küf suşlarının gelişim ve spor oluşturmalarını önlemesine bağlanmıştır. Ek olarak filmlerin portakalların sertliğini koruduğu ve ağırlık kaybını azalttığı görülmüştür (Potjewijd ve ark., 1995; Aloui ve ark., 2015). Benzer şekilde turuncgil meyvelerinde yapılan bir çalışmada *Pantoea agglomerans* (Cañamás ve ark., 2008a; 2008b) ve *C. sake* mayasının (Cañamás ve ark., 2011) Fungicover® kaplamalarla birlikte kullanımıyla mayaların canlılığının korunduğu görülmüştür. Filmlerin biyokontrol ajanlarının ekolojik yarısını desteklediği ve stres toleransını artırmasının yanı sıra *P. digitatum* küfüne karşı antifungal etkisinin kontrol örneklerinden % 50'den fazla olduğu vurgulanmıştır.

Üzümlerde sıklıkla kalite kayıplarına neden olan *P. digitatum* ve *P. italicum* gelişimini önlemek amacıyla yapılan bir çalışmada şellak temelli yenilebilir kaplamalara *C. oleophila* ( $6 \log \text{ kob/cm}^2$ ) antagonist mayası eklenerek kaplama yapılmıştır. Kaplama bileşiminde mayaların canlılıklarını ve aktivitelerini korumaları için farklı pH ve alkol ilavesi gibi uygulamalar denenmiştir. Kaplanan üzümlerde maya canlılığı  $13^\circ\text{C}$ 'de 4 ay boyunca  $4-5 \log \text{ kob/cm}^2$  seviyesinde korumuştur. Yalnızca kaplama yapılan (biyokontrol ajanı içermeyen) kontrol örneklerine kıyasla maya içeren kaplama ile kaplanan üzümlerin raf ömründe artış gözlenmiştir (McGuire ve Hagenmaier, 1996; 1999). Yine üzümlerde yapılan bir başka çalışmada maya ile film uygulaması ayrı yapılarak kombinasyonu sağlanmıştır. Çalışmada *Cryptococcus laurentii* ( $8 \log \text{ kob/mL}$ ) mayası, üzümlerin hasatı öncesinde yüzeye spreylenebilirken hasat sonrasında kitosan filmle kaplanarak üzümlerin raf ömrüne etkisi incelenmiştir. Hasat öncesi maya spreylenebilir bozulma indeksini düşürürken, hasat sonrası kitosan kaplama spreylemenin etkinliğinin depolama sırasında korunmasını sağlamıştır. Üzüm yüzeyine kaplama uygulaması; mikrobiyal özelliklerin korunmasını sağlamanın yanı sıra kaplamanın bariyer özelliklerine bağlı olarak ağırlık kaybını da azaltmıştır. Ayrıca üzümlerin polifenol oksidaz gibi doğal koruyucu enzimlerinin etkinliği de artmıştır (Meng ve ark., 2010). Benzer şekilde Marín ve ark. (2016) üzümlerdeki küflenme problemine karşı *C. sake* biyokontrol

mayasını farklı kaplamalara ilave ederek *Botrytis cinerea* küf gelişiminin 7-12 gün arasında % 80 oranında önlendiğini sonucuna varılmıştır.

Çileklerin *C. laurentii* (9 log kob/mL) biyokontrol mayası içeren filmle kaplandığı bir çalışmada mayalar 20 günlük depolama süresi boyunca maya canlılığının yarısı korunmuşlardır. Özellikle karbon kaynağı olarak glukoz eklenen örneklerde en az % 75 oranında canlılık tespit edilmiştir. *C. laurentii* meyve yapısındaki küflerin gelişimini % 30 oranında azaltmıştır. Bunun yanı sıra, kaplanan çileklerin renk ve antosiyanin içeriği değişmezkeni, su kaybı önlenmiştir (Fan ve ark., 2009). Yapılan çalışmalar ışığında biyokontrol ajanlarının yenilebilir filmlerin yapısında kullanımının canlılıklarının, dolayısıyla uygun ortamlarda aktivitelerinin de korunumunda etkili olduğu ortaya konulmuştur. Bu yeni engel konsepti, gıdaları mikrobiyal bozulmalardan korumanın yanı sıra ticari kalitesini de geliştirebilecek potansiyele sahiptir.

## BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

### 3.1. Materyal

#### 3.1.1. Yenilebilir film ve kaplamaların üretiminde kullanılan materyaller

Film yapımında kullanılan, peynir altı suyu protein konsantresi (> % 80) Milkaş Gıda San. ve Dış Tic. Ltd. Şti.'den (İstanbul) temin edilmiştir. Film üretiminde plastikleştirici olarak kullanılan gliserol Sigma-Aldrich (Stenheim,Almanya)'den; filmin pH'sını ayarlama da kullanılan NaOH Merck (Almanya)'ten temin edilmiştir.

#### 3.1.2. Mikroorganizmalar

*Williopsis saturnus* var. *saturnus* mayası Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Kültür Koleksiyonu'ndan (Adana, Türkiye) temin edilmiştir. Mayanın çoğaltılması ve korunması amacıyla % 0,6 (a/h) maya özütü (Merck, 103753) içeren Tryptic Soya Agar (Merck, 105458) besiyerinde geliştirilen koloniler öze yardımıyla alınarak % 0,6 maya özütü içeren Tryptic Soya Broth (Merck, 1.05459) tüplerinin içerisine aktarılmıştır. Kültürler 30 °C'de 24 saat inkübasyon ile 2 kez aktifleştirildikten sonra geliştirildikleri sıvı besiyerine % 15 gliserol (h/h) ilave edilerek -18 °C'de depolanmıştır.

Küf suşları *Penicillium expansum* ve *Aspergillus niger* TÜBİTAK-MAM 'dan temin edilmiştir. Küf suşlarının çoğaltılması ve korunması amacıyla TSA (Merck, 105458; Merck, 103753) besiyerinde 30 °C'de 5 gün inkübe edilen küf sporları drigalski spatülü yardımıyla % 0,6 maya özütü içeren TSB içeren sıvı besiyeriyle yüzeyden sıyrılmıştır. Suşlar geliştirildikleri sıvı besiyerine % 15 (h/h) gliserol ilave edilerek -18 °C'de depolanmıştır.

### 3.2. Metot

#### 3.2.1. Antagonist maya içeren film üretimi ve mayanın filmin özelliklerine etkisinin belirlenmesi

##### 3.2.1.1. Antagonist mayanın gelişim kurvesi

Stok kültürden 10 mL TSB + % 0,6 maya özütü besiyerine 1 öze inoküle edilerek 30 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu kültürler 2 kez aktifleştirilmiştir. Besiyerinde geliştirilen aktif kültürün spektrofotometrede (Shimadzu UV-1240, Japonya) spektral taraması yapılarak tepe noktası belirlenmiştir (360 nm). Kültür besiyerinin spektrofotometrede 360 nm'de 2 saatte 1 olacak şekilde okuması yapılmıştır. Aynı zamanda aktif kültürün TSA + % 0,6 maya özütü besiyerine yayma yöntemiyle ekimi yapılarak 24 saat boyunca mayanın gelişim kurvesi elde edilmiştir. Sonuçlar aktifleştirilen *Williopsis saturnus* var. *saturnus* mayasının 10 mL TSB + % 0,6 maya özütü besiyerine 1 öze inokülasyonu sonucu 30 °C'de 24 saat inkübasyonda 7 log/mL kültür elde edileceğini göstermiştir. Filmlere ilave edilecek maya konsantasyonları bu hesap gözönünde bulundurularak yapılmıştır.

##### 3.2.1.2. Antagonist mayanın elde edilmesi

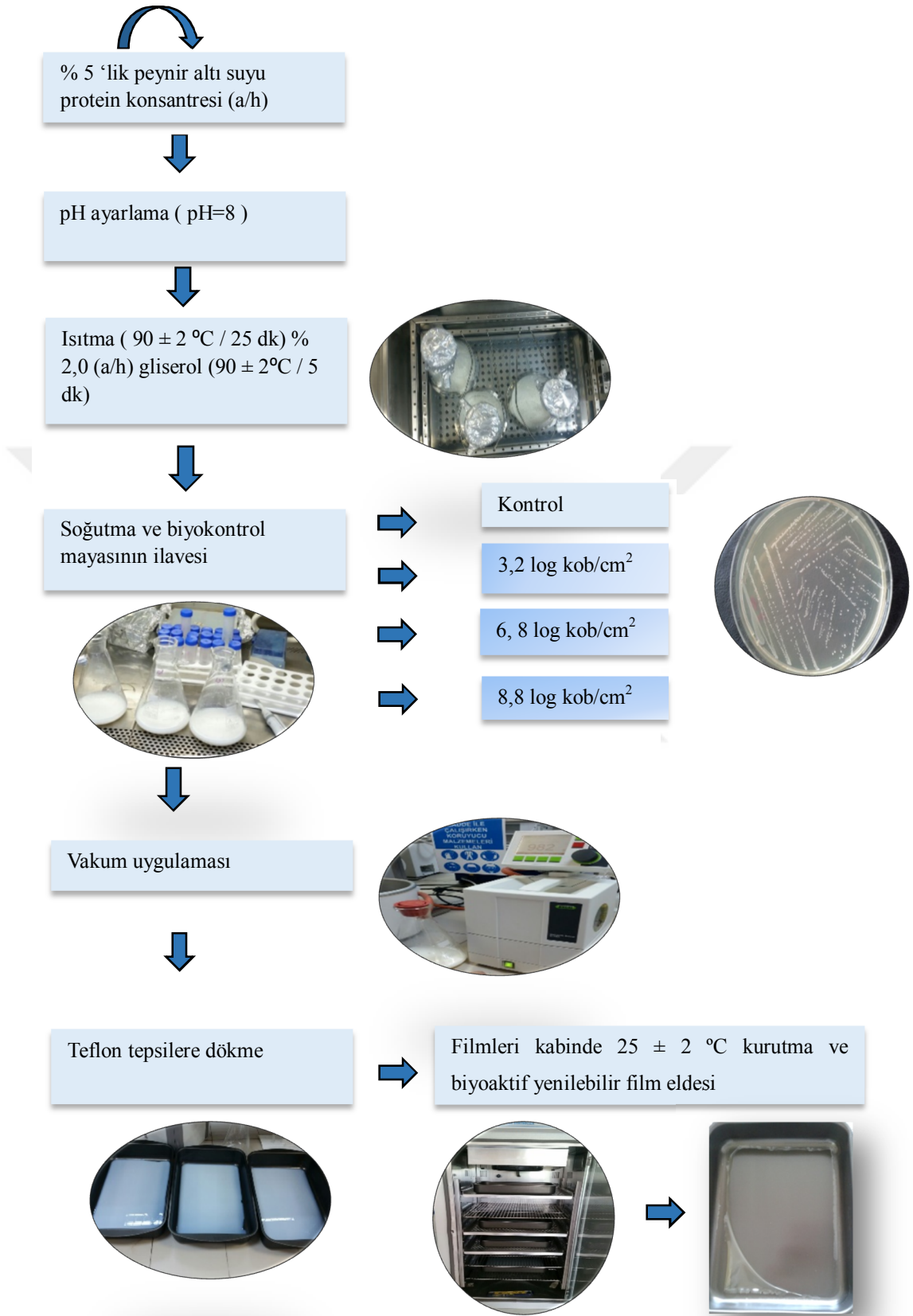
Teflon tepsilere ( 150 x 180 cm<sup>2</sup> ) dökülecek film solüsyonları içerisinde istenilen maya miktarlarına ulaşabilmek için gerekli hesaplamalar kob/cm<sup>2</sup> film üzerinden yapılmıştır. Filmin 8,8 log kob/cm<sup>2</sup> maya içermesi için 1 L TSB + % 0,6 maya özütü besiyerine aktif kültürden 1 mL; 6,8 log kob/cm<sup>2</sup> miktarı için 10 mL besiyerine 1 öze ve son olarak 10 mL besiyerine 1 öze aktifleştirme sonrası uygun seyreltmeler yapılarak 3,2 log kob/cm<sup>2</sup> sayısına ulaşılmıştır. Besiyerleri 30 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 9000 rpm 15 dakika 4 °C'de maya kültürleri santrifüjlenerek (Hettich,Universal-320R, Almanya) üstte kalan besiyeri dökülmüştür. Dipte kalan pelet 2 kez 10 mL steril destile su ile besiyeri içeriğinin



uzaklaştırılması amacıyla santrifüj edilerek yıkanmıştır. Sonucunda; elde edilen pelet film çözeltisine ilave edilmeye hazır hale getirilmiştir.

### 3.2.1.3. Antagonist maya içeren yenilebilir film üretimi

Peynir altı suyunun % 5 (a/h)'lik yüksek proteinli konsantresi destile steril su ile hazırlanmıştır (Şekil 2.11.). PASP solüsyonunun pH'sı 0,5 N NaOH kullanılarak pHmetrede (Mettler Toledo Seven Compact, IonS220, İsviçre) 8,0'e ayarlanmıştır. Asitliği ayarlanan solüsyon  $90 \pm 2$  °C'ye ayarlı çalkalayıcı su banyosunda 30 dakika (JSR, JSSB-30T, Kore) tutulmuştur. Isıtmanın son 5 dakikasında plastikleştirici olarak % 2,0 (a/h) gliserol eklenerek karıştırılmıştır. Film solüsyonu su banyosundan çıkarıldıktan sonra buz kalıpları eklenmiş başka bir su banyosunda hızla soğutulmuştur. Santrifüj işlemiyle elde edilen *W. saturnus* var. *saturnus* (0; 3,2 ;6,8 ve 8,8 log kob/cm<sup>2</sup>) mayası film solüsyonlarına ayarlanan miktarlarda eklenerek vorteksle (IKA,MS3 basic, Amerika) iyice karıştırılmıştır. Daha sonra elde edilen film solüsyonunda çözünmüş hava kabarcıkları 20 dakika süresince vakum pompası yardımıyla uzaklaştırılmıştır (Buchi V700, İsviçre). Elde edilen 4 farklı maya miktarını içeren (0; 3,2; 6,8 ve 8,8 log kob/cm<sup>2</sup>) film solüsyonları 150x180 cm<sup>2</sup> ebatlarındaki önceden steril edilen teflon tepsilere dökülmüştür. İklimlendirme kabiniinde (Binder, KMF 720, Almanya)  $25 \pm 2$  °C ve %  $50 \pm 5$  bağıl nemde 48 saat kurumaya bırakılmıştır. Kurumanın sonunda filmler teflon tepsilerden soyularak çıkarılmıştır. Farklı miktarlarda maya içeren ve içermeyen peynir altı suyu proteininden elde edilmiş filmler uygun boyutlarda kesilip analizler için hazırlanmıştır. Film örnekleri vakum paketlenme makinası (Reepack RV 300, İtalya) ile vakumlu ve vakum uygulanmadan paketlenerek 28 gün boyunca  $25 \pm 2$  °C ve %  $75 \pm 5$ 'te depolanmıştır. Depolamanın 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerinde mikrobiyal (maya/küf, toplam bakteri, laktik asit bakterisi), antimikrobiyal özellikleri, mekanik (çekme dayanıklılığı ve çekmede % uzama), optik ve fiziksel (su buharı geçirgenliği, gaz geçirgenliği, suda çözünübilirlik, kalınlık, su aktivitesi, ve elektron mikroskobu ile gözenek yapılarının belirlenmesi) özellikleri test edilmiştir.



Şekil 2.5. Maya katkılı yenilebilir film üretim şeması.

### 3.2.2. Antagonist maya içeren film örneklerinin mikrobiyolojik analizleri

Biyoaktif yenilebilir film örneği 10 cm<sup>2</sup> kesilip vakumlu/ vakumsuz olarak paketlenerek 25 ± 2 °C ve % 75 ± 5 bağıl nemde depolanmıştır. Depolamanın 1, 7, 14, 21 ve 28. günlerinde mikrobiyal analizler yapılmıştır. Mikrobiyal analizlerde film örnekleri 99 mL % 0,1 (h/h) peptonlu su (Merck, Almanya) içerisinde parçalayıcı (Interscience, Bagmixer 400, Fransa) ile 2 dakikada homojen hale getirilmiştir. Toplam bakteri, maya/küf, laktik asit bakterisi ve antagonist maya sayısı PCA, OGYE, MRS + % 0,2 Sorbik asit (Acros Organics, Amerika) ve MRS içeren besiyerlerinde yayma ve dökme yöntemleriyle sırasıyla 30 °C, 25 °C, 42 °C ve 25 °C’de 2-5 günlük inkübasyon sonucu sayım yapılmıştır.

### 3.2.3. Antagonist maya içeren film örneklerinin antimikrobiyal özellikleri

Antimikrobiyal özelliklerin tespitinde Aloui ve arkadaşları (2015); Parafati ve arkadaşları (2016)’nın kullandıkları disk difüzyon yöntemi modifiye edilmiştir. Depolamanın 0. ve 7. gününde filmler steril olarak 6 mm çapında yuvarlak disk şeklinde kesilmiştir. Laktik asit kullanılarak 2 farklı pH’a (pH 4,5 ve 5,2) ayarlanmış 15 mL Tryptic Soy Agar + % 0,6 maya özütü besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu besiyerlerinin ortasına önceden aktiveleştirilmiş 4 log kob/mL *Penicillium expansum* ve *Aspergillus niger* küflerinden 10 µL inoküle edilmiştir. Kontrol gruplarına aynı koşullardaki *P. expansum* ve *A. niger*’in misel çaplarının ölçülmesi için sadece küf suşları inoküle edilmiştir. Diğer petrilere farklı miktarlardaki (0; 3,2; 6,8; 8,8 kob/cm<sup>2</sup>) film örnekleri küf suşuna 3 mm uzaklıktaki bir kısma yerleştirilmiştir. Petriler 5 gün 25 °C’de inkübasyona bırakılmıştır ve küflerin misel çapları cetvelle (1/10 mm) ölçülerek 5 ölçümün ortalaması hesaplanmıştır.

Sonuçlar % inhibisyon formülüne göre verilmiştir (Denklem 2.1.).

$$\% I = \frac{C-T}{C} * 100 \quad (2.1)$$

% I= Yüzde inhibisyon.

C= Yalnızca küf gelişiminin olduğu petrilerde küf misel çaplarının ortalaması (mm).

T= Antagonist maya içeren filmlerin bulunduğu besiyerindeki küf misel çaplarının ortalaması (mm).

### **3.2.4. Antagonist maya içeren film örneklerinin fiziksel özellikleri**

#### **3.2.4.1. Antagonist maya içeren film örneklerinin kalınlık ölçümleri**

Film kalınlığı 0,001 mm hassasiyetli Pittsburgh (47257, Amerika) marka dijital mikrometre kullanılarak filmin 5 farklı yerinden ölçülerek yapılmıştır. Ölçümlerin ortalaması su buharı geçirgenliği ve diğer mekanik özelliklerin belirlenmesinde kullanılmıştır.

#### **3.2.4.2. Antagonist maya içeren film örneklerinin su buharı geçirgenliğinin ölçülmesi**

Filmlerin su buharı geçirgenliği standart ASTM 96-80 (ASTM 1992) yöntemi kullanılarak gravimetrik olarak test edilmiştir. “Kap metodu” olarak bilinen bu yöntemde içinde su veya desikant olan bir kabın yüzeyindeki filmlerin zamana dayalı geçirgenlik izlemesi yapılmıştır (McHugh ve Krochta, 1994). Filmler, içerisinde nem çekici olarak 3 gram susuz kalsiyum sülfat bulunan kapların üzerine hava sızdırmaz şekilde sarılmıştır. Kapların derinlikleri 3 cm ve ağız açıklığının alanı 27 cm<sup>2</sup>’dir. Kaplar nem oranı % 85 ve sıcaklığı 37 °C olan çemberde 12 saat bırakılmış ve her iki saatte bir kapların ağırlığı ölçülmüştür. Aynı zamanda kare şeklinde 9 cm<sup>2</sup> ebadında kesilmiş film parçaları da aynı şartlarda altında bekletilip ağırlık değişimi kaydedilmiştir. Tartımlar, ± 0.0001 g duyarlılığa sahip hassas terazi kullanılarak yapılmıştır. Ağırlık-zaman ilişkisinin doğrusal olduğu bilindiğinden, doğruların

eğimleri bulunarak eşitlikte yerine konulmuştur. McHugh ve arkadaşlarının (1993) yaptığı su buharı geçirgenliği hesaplamaları baz alınarak, filmin iki tarafındaki su buharı basınç farkı ve film kalınlığı göz önüne alınarak filmin su buharı geçirme hızından su buharı geçirgenliği hesaplanmıştır. Analizler 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır (Denklem 2.2.).

$$\text{Su buharı geçirgenliği} = \frac{\text{Eğim} \cdot \text{Kalınlık}}{\text{Alan} \cdot \Delta p} \left( \frac{\text{g.mm}}{\text{m}^2 \cdot \text{gün} \cdot \text{kPa}} \right) \quad (2.2)$$

$$\Delta p = 5,942 \text{ kPa.}$$

$\Delta p$ : Gazların kısmi basınç farkı (37 °C ve % 85 nem, kPa).

#### **3.2.4.3. Antagonist maya içeren film örneklerinin taramalı elektron mikroskobu ile gözenek yapılarının belirlenmesi**

Film materyallerinin homojenliği, katman yapısı, yüzey yumuşaklığı ve gözenek yapısını belirlemek amacıyla Jeol JSM 6060 LV( Japonya) marka Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Filmlere altın-paladyum kaplama Polaron Range SC 7620 (İngiltere) cihazıyla yapıldıktan sonra analizler yüksek vakumda ve sıvı azot varlığında 20 kV arasında değişen voltajlarda gerçekleştirilmiştir (McHugh ve Krochta, 1994).

#### **3.2.4.4. Antagonist maya içeren film örneklerinin renk ölçümleri**

Renk Lovibond RT 300 Series Reflectance Tintometer (İngiltere) marka kolorimetre cihazı ile her bir film örneğinin, beyaz standart yüzey üzerinde L\* (beyaz-siyah), a\* (kırmızı-yeşil) ve b\* (sarı-mavi) renk parametreleri ölçülmüştür.

#### **3.2.4.5. Antagonist maya içeren film örneklerinin suda çözünübilirlik özellikleri**

Filmler 2x2 cm<sup>2</sup> kare şeklinde kesilmiştir. Film örnekleri 105 ± 2 °C 24 saat kurutulmuştur. Her bir film hassas terazide tartılmıştır. Sonrasında örneklere 50 mL destile su ilave edilerek 25 °C'deki çalkalayıcılı su banyosunda (JSR, JSSB-30T,

Kore) 24 saat bekletilmiştir. Filtre edilen örneklerden geriye kalan filmlerin suda çözünmeyen kısmı  $105 \pm 2$  °C 24 saat kurutulmuştur. Kurutma sonrası tartılarak Denklem 2.3.'e göre suda çözünübilirlik yüzdesi hesaplanmıştır (Rangel-Marrón ve ark., 2013).

$$\% \text{ Suda çözünübilirlik} = \frac{W_i - W_s}{W_i} * 100 \quad (2.3)$$

$W_i$ =Kuru materyalin ilk ağırlığı (g).

$W_s$ =Kuru materyalin 24 saat suda bekleyen son ağırlığı (g).

#### 3.2.4.6. Antagonist maya içeren film örneklerinin su aktivitesi ölçümleri

Filmlerin su aktivitesi vakumlu ve vakumsuz paketlenen örneklerde depolamanın 0., 14. ve 28. günlerinde ölçülmüştür. Film örnekleri 3 paralelli olacak şekilde küçük parçalara kesilerek örnek kaplarına yerleştirilmiştir. Cihazın kalibrasyonu  $a_w$  (viz.  $\text{LiCl}=0.114$ ,  $\text{MgCl}_2=0.329$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3=0.443$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2=0.536$ ,  $\text{NaBr}=0.653$  ve  $\text{KCl}=0.821$ ) 6 tane doyurulmuş solüsyon ile yapılmıştır. Su aktivitesi değerleri mikrobiyel gelişimin yanısıra filmlerin fiziksel ve mekaniksel özelliklerinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

#### 3.2.5. Antagonist maya içeren film örneklerinin mekanik özellikleri

Film yapısındaki antagonist mayanın mekaniksel özelliklerde meydana getirdiği değişim çekme gerilimi (tensile strength) ve % uzama (elongation) özellikleri ile incelenmiştir. Analizde Instron Universal Testing 3367 (ABD) ile standart method ISO 1924-2-1994 kullanılmıştır (Şekil 3.12.).



Şekil 3.6. Instron cihazı (Instron Universal Testing 3367, ABD).

Filmler öncelikle 100-15 mm ebatlarında şerit şeklinde kesilip analiz öncesinde 25 °C ve % 75  $\pm$  2'de bekletilmiştir. Analizde cihazın iki çenesi arasına yerleştirilen örnekler 200 mm/s çekme hızı ile test edilmiştir (Aloui ve ark., 2015). Filmlerin kopma anında örneğe uygulanan maksimum kuvvet ve kopma anındaki uzama miktarı mekanik test cihazına bağlı bilgisayar programı Bluehill 2 (Norwood, MA, ABD) programı yardımıyla hesaplanmıştır.

### 3.2.6. İstatistiksel analiz

*Williopsis saturnus* var. *saturnus* antagonist mayası ile zenginleştirilen peynir altı suyu proteini temelli yenilebilir film örneklerinin mikrobiyolojik, fiziksel ve mekaniksel özelliklerinden elde edilen veriler IBM SPSS Statistics 20 paket programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA), denemeler arasında önem farklılıklarının karşılaştırılmasında, Duncan çoklu karşılaştırma testi, gruplar arasındaki farklılıkların karşılaştırılmasında kullanılmıştır ( $P < 0,05$ ).

## BÖLÜM 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Farklı sayılarda *W. saturnus* var. *saturnus* antagonist mayası (0; 3,2; 6,8 ve 8,8 kob/cm<sup>2</sup>) ilave edilerek hazırlanan peynir altı suyu proteini temelli biyoaktif filmler vakumlu ve vakumsuz olarak paketlenmiş ve 25 °C ve % 75 bağıl nem depolanmıştır. Antagonist maya katkılı film yapısında meydana gelen mikrobiyal, antimikrobiyal (*Penicillium expansum*, *Aspergillus niger*'e karşı), fiziksel (kalınlık, bariyer, suda çözünübilirlik, renk, gözenek yapısı ve su aktivitesi) ve mekaniksel (çekme gerilimi, % uzama) özelliklerdeki değişimler 28 günlük depolama süresince incelenmiştir.

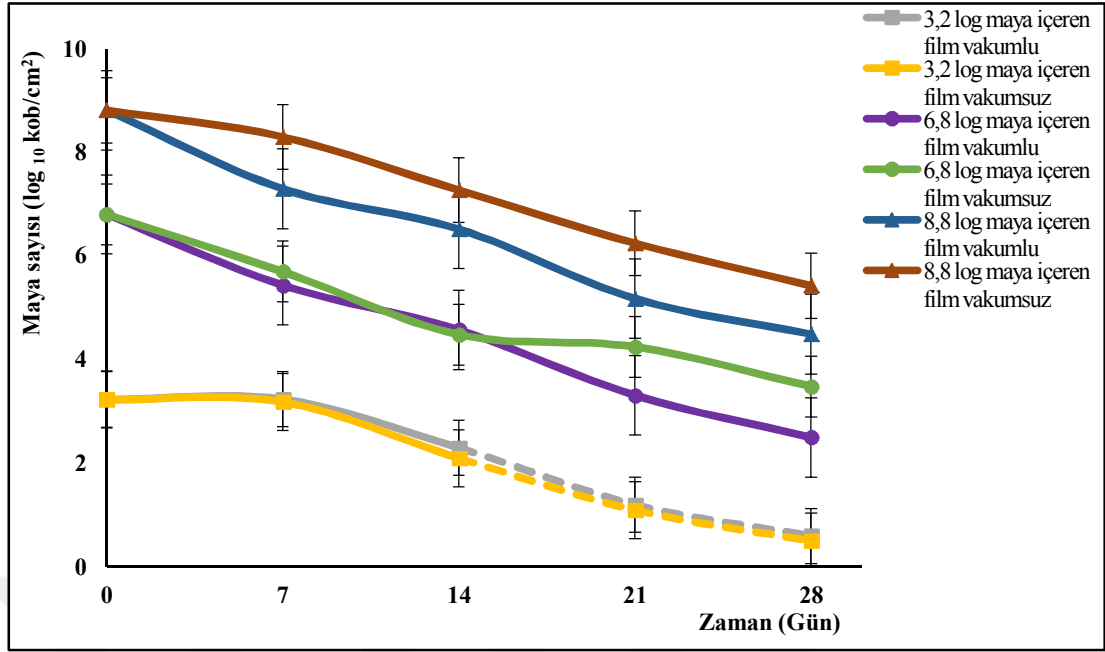
### 4.1. Antagonist Maya Katkılı PASP Yenilebilir Film Örneklerinin Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

#### 4.1.1. Antagonist maya katkılı film örneklerinde maya sayısının belirlenmesi

Antagonist maya *W. saturnus* var. *saturnus* ilave edilen filmlerin yapısındaki maya canlılığı 28 günlük depolama süresinde haftalık yapılan analizlerle incelenmiştir (depolama koşulları, 25 °C ve % 75 bağıl nem). Böylece farklı sayılarda maya içeren filmlerin depolama süresi sonundaki etkin maya miktarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Mayanın sayısındaki değişim depolama süresi ve paketlenme çeşidine bağlı olarak Şekil 4.7.'de gösterilmiştir.

Depolamanın ilk haftasında vakum paketli 3,2 log kob/cm<sup>2</sup> maya içeren film örneklerinin maya sayısında değişim meydana gelmezken; 6,8 ve 8,8 log kob/cm<sup>2</sup> olan film örneklerinde sırasıyla 1,1 ve 1,52 logaritmik birim azalma meydana gelmiştir. Kontrol örneklerinde depolama boyunca maya gelişimine rastlanmamıştır.





Şekil 4.7. Farklı sayılarda *W. saturnus* var. *saturnus* mayasını içeren PASP temelli filmlerin antagonist maya sayılarının zamanla değişimi (log<sub>10</sub> kob/cm<sup>2</sup>).

Depolamanın 14. gününden itibaren 3,2 log kob/ cm<sup>2</sup> maya içeren film örneklerinin vakumlu ve vakumsuz paketlerinde maya sayısı 2 log'un altına düşmüştür. Vakum uygulanan ve uygulanmayan örneklerin maya sayısında istatistiksel açıdan önemli bir fark görülmemiştir ( $P>0,05$ ).

Şekil 4.7. incelendiğinde depolama süresi sonunda bütün film örneklerinin maya sayısında birbiriyle paralel olacak şekilde istatistiksel açıdan önemli derecede azalma meydana gelmiştir ( $P<0,05$ ). Depolamanın sonunda 6,8 ve 8,8 log kob/cm<sup>2</sup> antagonist maya içeren filmlerin vakum paketlerinde 4,3 log; vakum uygulanmayan paketlerinde ise 3,3 log azalma gözlenmiştir. Depolama sonunda maya canlılığının korunumu 8,8 log kob/cm<sup>2</sup> maya içeren filmlerde % 60 (4-5 log); 6,8 log kob/cm<sup>2</sup> maya içeren filmlerde ise % 36 (2-3 log)'dan fazla olmuştur. Maya içeriği 3,2 kob/cm<sup>2</sup> filmlerde ise depolama sonunda canlılık korunamamıştır. McGuire ve Hagenmaier (1996) tarafından yapılan benzer çalışmada antagonistik etki açısından filmlerin içerisindeki antagonist mikroorganizma sayısının 4 log kob/cm<sup>2</sup>, tercihen 6 log kob/cm<sup>2</sup> olması gerektiği belirtilmiştir.

Çalışmamızda film yapısındaki antagonist maya canlılığının  $8,8 \log \text{ kob/cm}^2$  maya içeren filmlerde % 60'dan fazla korunumu yapılan çalışmalarla da paralellik göstermektedir. Örneğin; şellak ve şellak ester yenilebilir film yapısına *Candida oleophila* antagonist mayasının ilave edildiği benzer bir çalışmada maya korunumunun % 65'ten fazla olduğu belirtilmiştir (McGuire ve Hagenmaier, 1996). Aynı şekilde *Wickerhamomyces anomalus* antagonist mayası ilave edilen sodyum aljinat ve keçi boynuzu özü temelli yenilebilir filmlerde maya popülasyonunun % 85'ten fazla korunmuştur (Aloui ve ark., 2015). PASP filmlerin yapısına laktik asit bakterilerinin ilave edildiği bir başka çalışmada ise canlılığın % 65'ten fazla korunduğu belirtilmiştir (Pereira ve ark., 2016). Yapılan çalışmalarda maya canlılığında ortaya çıkan farklılık, antagonist suşların ve film bileşimlerinin farklılığından kaynaklanmaktadır.

Film solüsyonlarına glukoz gibi farklı destekleyicilerin katılarak antagonist mikroorganizmaların depolama boyunca canlılığının korunmaya çalışıldığı çalışmalarda mevcuttur. Örneğin; karbon kaynağı olarak glukoz ilave edilen selüloz temelli kaplamalarda *C. guilliermondii* US7 ve *Debaryomyces* sp. 230 mayalarının canlılığı % 60'dan fazla (Potjewijd ve ark., 1995); sodyum aljinat filmlerde *Cryptococcus laurentii* mayası ise en az % 75 oranında korunmuştur (Fan ve ark., 2009). Film yapısında maya gelişimini teşvik etmek amacıyla eklenen katkıları diğer mikroorganizmaların gelişimini artırabileceği gibi mayanın metabolik faaliyeti sonucu ortaya çıkan metabolit miktarını da artırabilir. Aynı zamanda ortamda fazla miktarda besin bulunması antagonist etkinin temelinde yatan besin mücadelesini de azaltabilir. Sonuç olarak film yapısının duyuşal, kimyasal ve fiziksel özelliklerinde değişime neden olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle olumsuz çevre koşullarında ve düşük besin ortamlarında gelişme gösteren suşlarla çalışmak avantaj taşımaktadır.

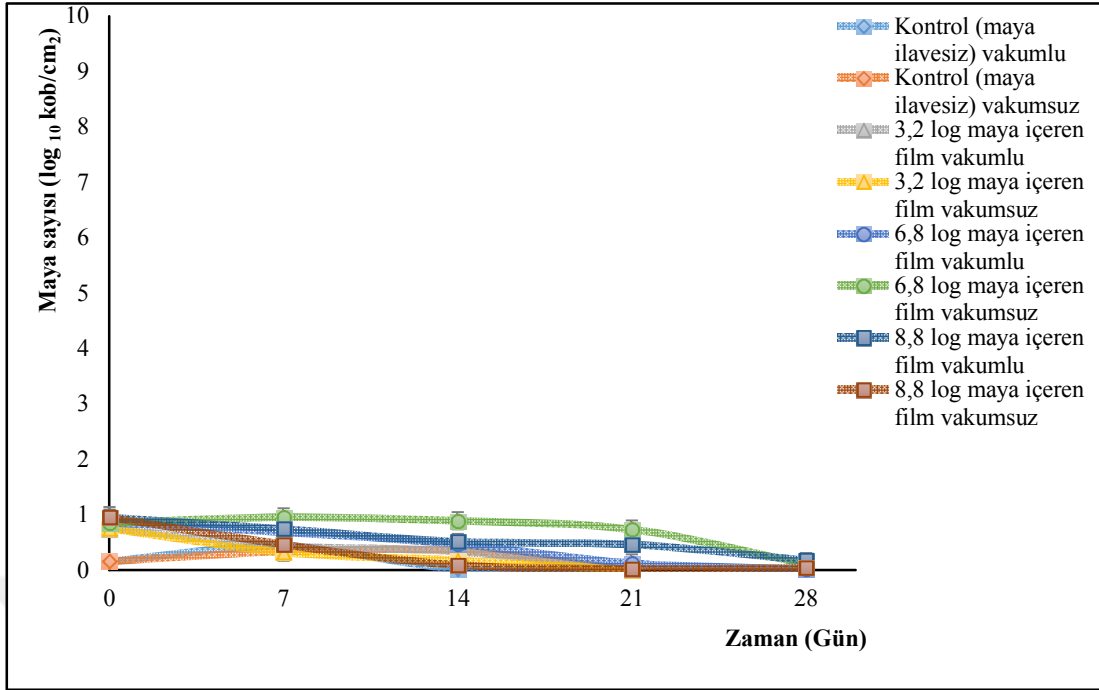
Çalışmamızda kullanılan biyokontrol ajanı *W. saturnus* var. *saturnus* mayası fakültatif anaerobik özellik göstermesinden dolayı vakum uygulaması canlılığını etkilememiştir (Ayhan, 2000). Ayrıca *W. saturnus* var. *saturnus* laktozu ve galaktozu fermente edememesi sebebiyle (Liu ve Tsao, 2009) PASP filmleri besin olarak kullanamamaktadır. Dolayısıyla depolama boyunca ortamda besin bulamayan

antagonist mayaların sayısı filmlerin düşük su aktivitesindeki değerleri (0,59-0,65) nedeniyle düşüş göstermektedir. Ancak antagonist mikroorganizmaların filmlerle birlikte kullanılması biyokontrol ajanlarının stres koşullarına toleransını artırmakta ve ekolojik yarışta öne geçmesi sağlamaktadır (Marín ve ark., 2016). Örneğin; Cañamás ve arkadaşları (2007) *Pantoea agglomerans* mayasını turuncgil meyvelerinin yüzeyine direkt olarak veya film yapısına ilave ederek 2 farklı şekilde uyguladıklarında maya canlılığının film yapısında direkt yüzeye uygulanmasına göre 1,2-2,8 log kob/cm<sup>2</sup> daha fazla korunduğunu ortaya koymuşlardır.

#### 4.1.2. Antagonist maya katkılı filmlerin TMAB, laktik asit bakterisi ve küf sayımı sonuçları

Farklı sayılarda biyokontrol ajanı *W. saturnus* var. *saturnus* ilave edilen vakumlu ve vakumsuz paketlenerek depolamanın 0., 7., 14., 21. ve 28. günlerinde TMAB, küf ve laktik asit bakteri sayımları yapılmıştır. Depolama boyunca tüm film örneklerinde küf ve laktik asit bakterisine rastlanamamıştır. Şekil 4.8.'de PASP film örneklerindeki TMAB sayısındaki değişim zamana bağlı log<sub>10</sub> kob/cm<sup>2</sup> cinsinden gösterilmiştir.

Şekil 4.8. incelendiğinde depolamanın 0. gününde TMAB sayısı kontrol film örneklerinde 0,15 log kob/cm<sup>2</sup> iken maya sayısı 3,2; 6,8; 8,8 log kob/cm<sup>2</sup> olan film örneklerinde sırasıyla 0,74 log; 0,85 log ve 0,95 log kob/cm<sup>2</sup> olduğu gözlenmiştir. Kontrol ve 3,2 log kob/cm<sup>2</sup> maya içeren film örneklerinde TMAB sayısı depolama boyunca azalarak 21. günden itibaren sayılamamıştır. PASP film örneklerinin vakumlu ya da vakumsuz paketlenmesinin TMAB konsantrasyonuna belirgin bir etkisi olmamıştır ( $P>0,05$ ). Depolama süresi sonunda bütün film örneklerinde TMAB sayısında istatistiksel açıdan önemli derecede azalma meydana gelmiştir ( $P<0,05$ ).



Şekil 4.8. Farklı sayılarda maya içeren PAST temelli filmlerin depolama süresi boyunca toplam mezofil aerobik bakteri sayılarının zamanla değişimi ( $\log_{10}$  kob/cm<sup>2</sup>).

Bu azalmada mikroorganizmaların gelişiminde belirli besin maddelerinin, ortam sıcaklığının, su aktivitesi değerlerini ve oksijen durumunun etkisi gösterilebilir. Mikroorganizmaların sınırlı besin ortamında ortaya çıkan rekabet dolayısıyla gelişmeleri için ihtiyaç duydukları belirli besin maddelerine ulaşamamış olmaları bu düşüşe neden olmuş olabilir. TMAB sayısının depolama boyunca düşüş göstermesinde bir diğer önemli faktör ise filmlerin düşük su aktivitesi değerleridir. Çünkü mikrobiyal gelişim, asit üretimi ve sporların çimlenmesi gibi mikrobiyal faaliyetlerde minimum su aktivitesi değerleri önem taşımaktadır (Ayhan, 2000). Filmlerin su aktivitesi değerleri 0,59-0,65 aralığında bulunmuş ve bu düşük su aktivitesi değerlerinin laktik asit bakterilerinin ve diğer mikroorganizmaların gelişmesini engellediği düşünülmüştür.

#### 4.2. Antagonist Maya Katkılı Filmlerin Antimikrobiyal Etkisi

PASP filmlere ilave edilen farklı sayılardaki antagonist (öldürücü toksin üreten) *W. saturnus* var. *saturnus* mayasının *Aspergillus niger* ve *Penicillium expansum*

küflerinin gelişim ve canlılığına karşı antimikrobiyal etkisini saptamak amacıyla depolamanın 0. ve 7. günlerinde analizler yapılmıştır.

#### 4.2.1. Antagonist maya katkılı filmlerin *Aspergillus niger* küfüne karşı antimikrobiyal etkisi

Çalışmada küf suşu ve film örneklerinin aynı besi ortamında 5 günlük inkübasyonu sonucunda küf misellerinin gelişme çapları ölçülerek filmlerin antimikrobiyal etkisi değerlendirilmiştir. Antagonist maya ilave edilen film örneklerinin *A. niger* küfüne karşı antimikrobiyal etkisi Tablo 4.4.'te gösterilmiştir.

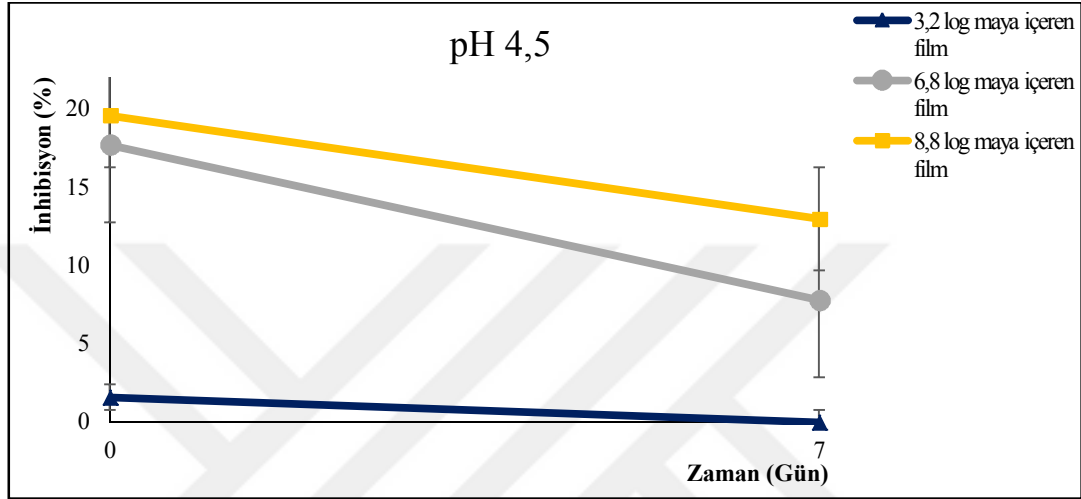
Tablo 4.4. Farklı sayıda antagonist maya *W. saturnus* var. *saturnus* içeren vakumlu ve vakumsuz paketlenmiş filmlerin *A. niger* küf suşunun misel gelişimine TSA + % 0,6 maya özütü içeren besi ortamında 5 günlük inkübasyon sonundaki etkisi (mm).

| Gün | pH       | Küf misellerinin gelişme çapları (mm) |                         |                                |                                |                                |                         |
|-----|----------|---------------------------------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------|
|     |          | Küf                                   | Kontrol<br>(mayasız)    | 3,2 log<br>kob/cm <sup>2</sup> | 6,8 log<br>kob/cm <sup>2</sup> | 8,8 log<br>kob/cm <sup>2</sup> |                         |
| 0   | Vakumsuz | 4,5                                   | 60,30±0,20 <sup>a</sup> | 60,33±0,41 <sup>a</sup>        | 59,33±0,25 <sup>b</sup>        | 49,63±0,15 <sup>c</sup>        | 48,50±0,20 <sup>d</sup> |
|     |          | 5,2                                   | 60,29±0,15 <sup>a</sup> | 60,30±0,25 <sup>a</sup>        | 59,40±0,36 <sup>b</sup>        | 49,71±0,20 <sup>c</sup>        | 48,50±0,25 <sup>d</sup> |
| 7   | Vakumlu  | 4,5                                   | 60,36±0,40 <sup>a</sup> | 60,35±0,30 <sup>a</sup>        | 60,30±0,32 <sup>a</sup>        | 55,53±0,40 <sup>b</sup>        | 52,53±0,20 <sup>c</sup> |
|     |          | 5,2                                   | 60,23±0,25 <sup>a</sup> | 60,21±0,26 <sup>a</sup>        | 60,23±0,47 <sup>b</sup>        | 56,13±0,15 <sup>c</sup>        | 53,36±0,37 <sup>d</sup> |
|     | Vakumsuz | 4,5                                   | 60,33±0,20 <sup>a</sup> | 60,30±0,40 <sup>a</sup>        | 60,31±0,41 <sup>a</sup>        | 55,43±0,15 <sup>b</sup>        | 52,30±0,43 <sup>c</sup> |
|     |          | 5,2                                   | 60,30±0,20 <sup>a</sup> | 60,29±0,25 <sup>a</sup>        | 60,30±0,35 <sup>a</sup>        | 56,50±0,43 <sup>b</sup>        | 52,26±0,37 <sup>c</sup> |

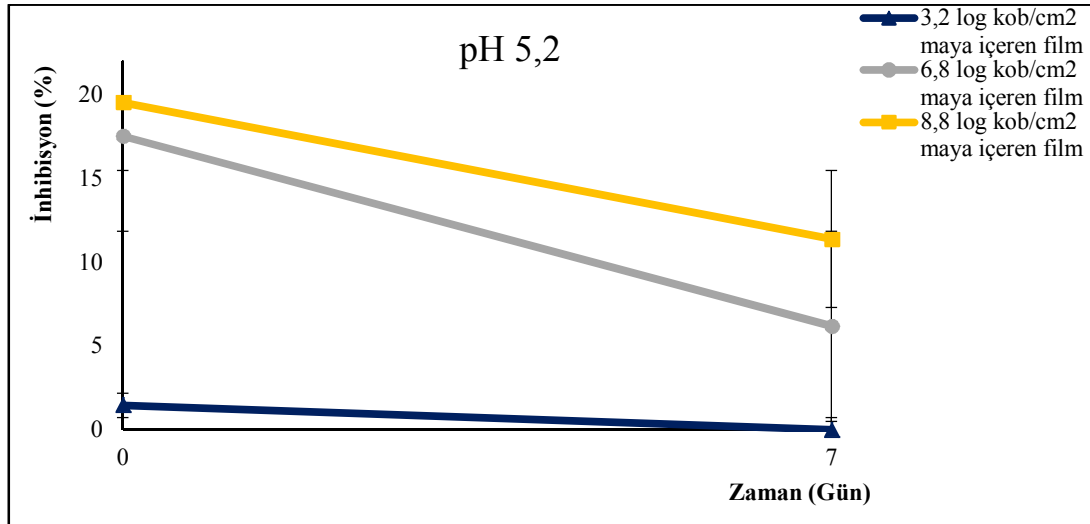
a-d: Aynı satırda yer alan farklı örnekler arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir ( $P<0,05$ ;  $n=6$ ).

Tablo 4.4.'teki küf misel çapları incelendiğinde depolamanın 0. gününde pH 4,5 ve pH 5,2'de *A. niger*'in önemli derecedeki en düşük inhibisyonu için gerekli antagonist maya sayısının 3,2 log kob/cm<sup>2</sup> olduğu görülmektedir ( $P<0,05$ ). Depolamanın 7. gününde yapılan analizde ise pH 4,5; 5,2'de *A. niger* küfüne karşı 6,8 log kob/cm<sup>2</sup> ve üstünde maya içeren film örneklerinde önemli düzeyde antifungal etkinin olduğu söylenebilir.

*W. saturnus* var. *saturnus* içeren filmlerin *A. niger* küf suşuna inhibisyon etkisi (%) Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir. En yüksek inhibisyon pH 4,5'te 8,8 log kob/cm<sup>2</sup> maya içeren filmlerde % 19 olarak ortaya çıkmıştır (Şekil 4.9). Filmlere vakum paketlenme uygulamasının maya canlılığını etkilememesi dolayısıyla *A. niger* küfünün inhibisyonunu da önemli derecede değiştirmemiştir ( $P>0,05$ ).

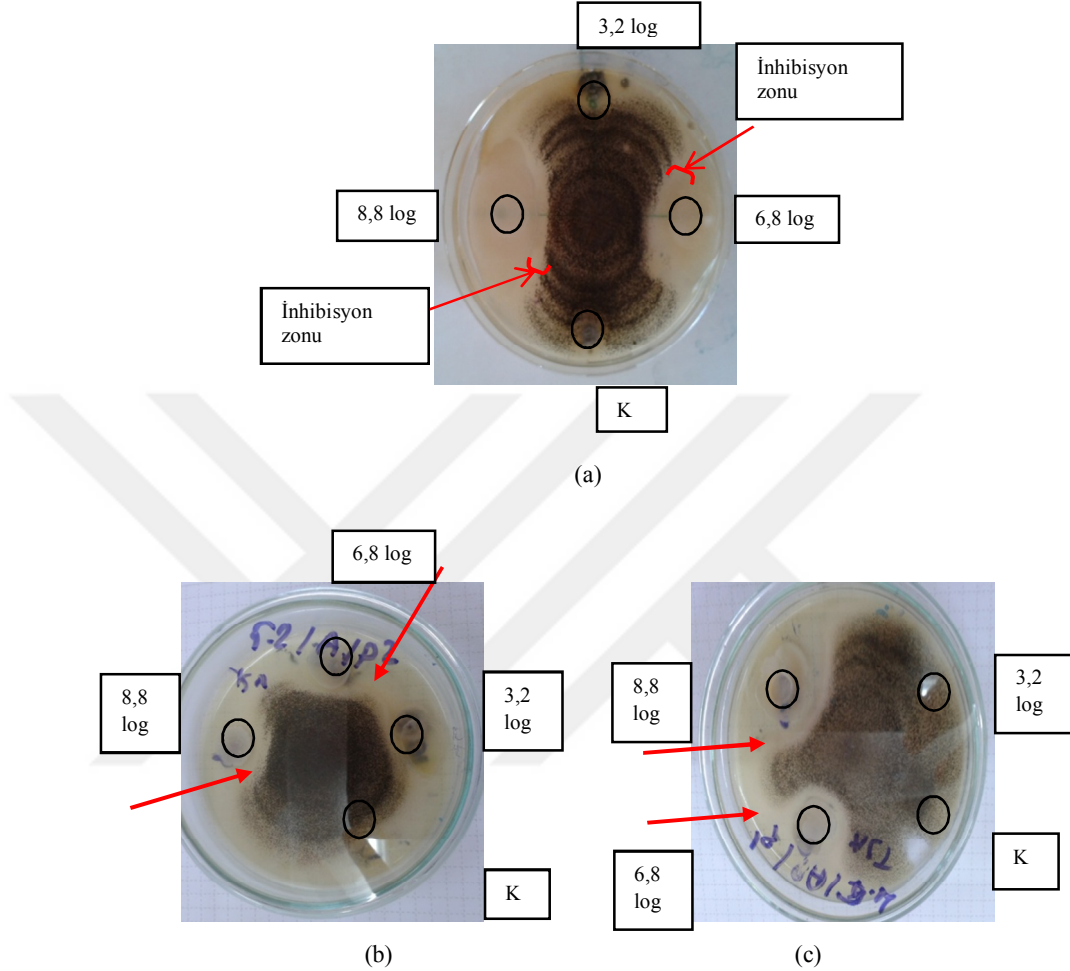


Şekil 4.9. Farklı sayılarda antagonist maya *W. saturnus* var. *saturnus* içeren filmlerin depolamanın 0. ve 7. günlerinde pH 4,5'a ayarlı TSA + % 0,6 maya özütü içeren besi ortamında *A. niger* küf suşuna zamana dayalı inhibisyon etkisi (%).



Şekil 4.10. Farklı sayılarda antagonist maya *W. saturnus* var. *saturnus* içeren filmlerin depolamanın 0. ve 7. günlerinde pH 5,2'ye ayarlı TSA + % 0,6 maya özütü içeren besi ortamında *A. niger* küf suşuna zamana dayalı inhibisyon etkisi (%).

Şekil 4.11.'de farklı sayılarda antagonist maya içeren filmler ve mayasız (kontrol) film örneklerinin *A. niger* küfüne karşı inhibisyon etkisi görülmektedir.



Şekil 4.11. Farklı sayılarda antagonist maya içeren filmlerin *A. niger* küf suşu üzerine antifungal etkisinin laktik asit ile (a, b) pH 5,2 ve (c) pH 4,5'e ayarlı TSA + % 0,6 maya özütü içeren besiyerlerinde görünümü. K: Kontrol film örnekleri; 3,2 log: 3,2 log kob/cm<sup>2</sup> antagonist maya içeren film örnekleri; 6,8 log: 6,8 log kob/cm<sup>2</sup> antagonist maya içeren film örnekleri; 8,8 log: 8,8 log kob/cm<sup>2</sup> antagonist maya içeren film örnekleri.

*W. saturnus* var. *saturnus* biyokoruyucu mayasının *A. niger* küf suşuna inhibisyonun incelendiği bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Buna karşın yapılan benzer çalışmalarda *A. flavus* ve *A. parasiticus* K7 küflerinin gelişimini inhibe etmede *Debaryomyces hansenii* (Dönmez, 2010) ve *Saccharomyces cerevisiae* (Persons ve ark., 2013) mayalarının etkili olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca *Pichia guiliermondii* (Paster ve ark., 1993) ve *P. anomala* (Petersson ve Schnurer, 1995) mayalarının da *Aspergillus* spp. üzerine antifungal etki gösterdiği tespit edilmiştir.

#### 4.2.2. Antagonist maya katkılı filmlerin *Penicillium expansum* küfüne karşı antimikrobiyal etkisi

Film örneklerinin *P. expansum* küfüne karşı gösterdiği antimikrobiyal etki Tablo 4.5.'te gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Farklı sayıda antagonist maya *W. saturnus* var. *saturnus* içeren vakumlu ve vakumsuz paketlenmiş filmlerin *P. expansum* küf suşunun misel gelişimine TSA + % 0,6 maya özütü içeren besi ortamında 5 günlük inkübasyon sonundaki etkisi (mm).

| Gün | pH       | Küf misellerinin gelişme çapları (mm) |                         |                          |                         |                         |
|-----|----------|---------------------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
|     |          | Küf                                   | Kontrol (mayasız)       | 3,2 log                  | 6,8 log                 | 8,8 log                 |
| 0   | Vakumsuz | 4,5                                   | 27,63±0,15 <sup>a</sup> | 27,60±0,25 <sup>ab</sup> | 27,62±0,25 <sup>b</sup> | 23,53±0,15 <sup>c</sup> |
|     |          | 5,2                                   | 26,43±0,30 <sup>a</sup> | 26,42±0,40 <sup>a</sup>  | 26,46±0,40 <sup>a</sup> | 23,50±0,26 <sup>b</sup> |
| 7   | Vakumlu  | 4,5                                   | 27,56±0,25 <sup>a</sup> | 27,52±0,47 <sup>a</sup>  | 27,55±0,77 <sup>a</sup> | 24,33±0,25 <sup>b</sup> |
|     |          | 5,2                                   | 27,33±0,25 <sup>a</sup> | 27,30±0,25 <sup>a</sup>  | 27,29±0,77 <sup>a</sup> | 24,23±0,32 <sup>b</sup> |
|     | Vakumsuz | 4,5                                   | 27,50±0,20 <sup>a</sup> | 27,53±0,15 <sup>a</sup>  | 27,51±0,25 <sup>a</sup> | 24,56±0,25 <sup>b</sup> |
|     |          | 5,2                                   | 27,36±0,15 <sup>a</sup> | 27,30±0,36 <sup>a</sup>  | 27,36±0,25 <sup>a</sup> | 24,33±0,25 <sup>b</sup> |
|     | Vakumlu  | 4,5                                   | 27,56±0,25 <sup>a</sup> | 27,52±0,47 <sup>a</sup>  | 27,55±0,77 <sup>a</sup> | 24,33±0,25 <sup>b</sup> |
|     |          | 5,2                                   | 27,33±0,25 <sup>a</sup> | 27,30±0,25 <sup>a</sup>  | 27,29±0,77 <sup>a</sup> | 24,23±0,32 <sup>b</sup> |

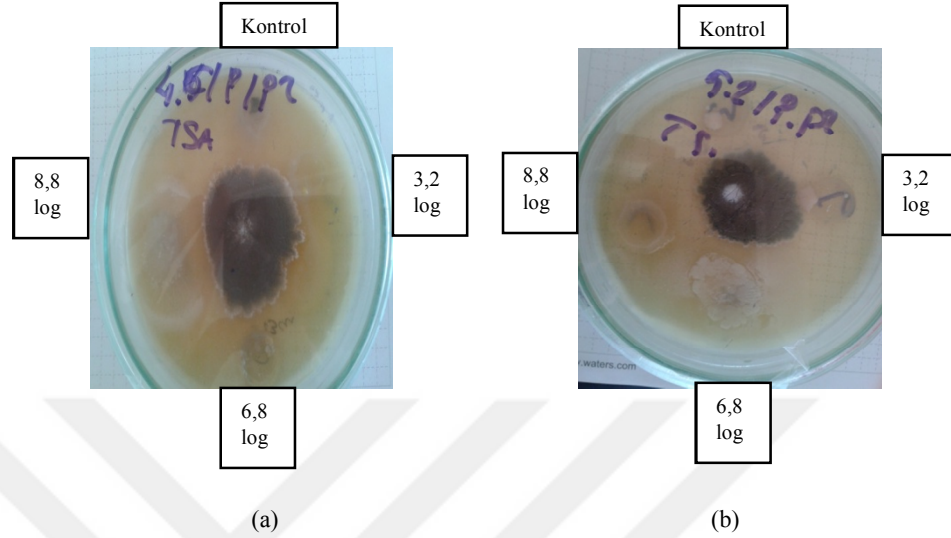
a-d: Aynı satırda yer alan farklı örnekler arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir ( $P<0,05$ ;  $n=6$ ).

Tablo 4.5.'teki küf misel çapları incelendiğinde depolamanın 0. gününde *P. expansum* 'un inhibisyonu için önemli derecedeki en düşük antagonist maya sayısı pH 4,5'de 3,2 log kob/cm<sup>2</sup> iken pH 5,2 'de 6,8 log kob/cm<sup>2</sup> olduğu görülmektedir ( $P<0,05$ ).

Depolamanın 7. gününde yapılan analizde pH 4,5; 5,2'de antifungal etki 6,8 log kob/cm<sup>2</sup> ve 8,8 log kob/cm<sup>2</sup> maya içeren filmlerde ortaya çıkmıştır. *P. expansum* küf suşuna en yüksek inhibisyon ise pH 4,5'te 8,8 log kob/cm<sup>2</sup> maya içeren filmlerde % 29'dur (Şekil 4.13). Filmlere vakum paketlenme uygulaması maya canlılığını etkilememesi dolayısıyla *P. expansum* küfünün inhibisyonunu da önemli derecede değiştirmemiştir ( $P>0,05$ ).

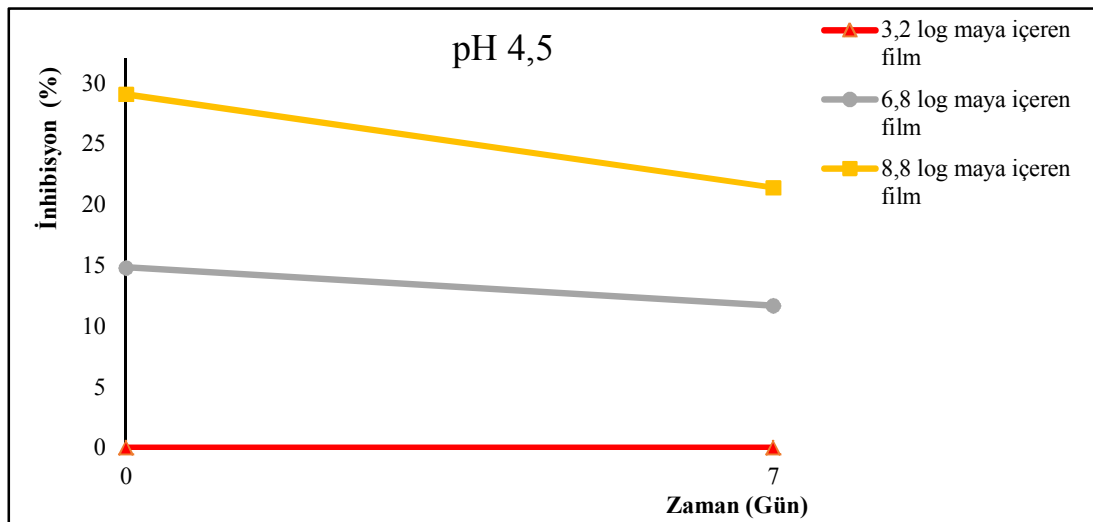


Şekil 4.12.'de farklı sayılarda antagonist maya içeren ve kontrol film örneklerinin *P. expansum* küfüne karşı inhibisyon etkisi görülmektedir.

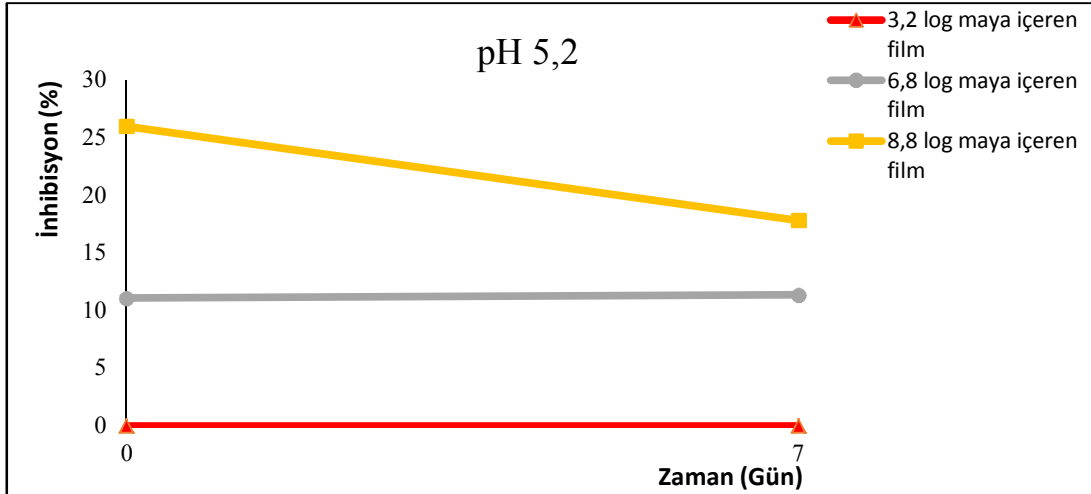


Şekil 4.12. Farklı sayılarda antagonist maya *W. saturnus* var. *saturnus* içeren filmlerin *P. expansum* küfüne antifungal etkisinin laktik asit ile (a) pH 4,5 ve (b) pH 5,2'ye ayarlı TSA + % 0,6 maya özütü içeren besiyerlerinde incelenmesi.

Şekil 4.13. ve Şekil 4.14.'de *W. saturnus* var. *saturnus* mayasının *P. expansum* küfüne inhibisyon etkisini (%) gösteren grafikler verilmiştir.



Şeki 4.13. Farklı sayılarda antagonist maya *W. saturnus* var. *saturnus* içeren filmlerin depolamanın 0. ve 7. günlerinde pH 4,5'e ayarlı TSA + % 0,6 maya özütü içeren besi ortamında *P. expansum* küf suşuna inhibisyon etkisi (%).



Şekil 4.14. Farklı sayılarda antagonist maya *W. saturnus* var. *saturnus* içeren filmlerin depolamanın 0. ve 7. günlerinde pH 5,2'ye ayarlı TSA + % 0,6 maya özütü içeren besi ortamında *P. expansum* küf suşuna inhibisyon etkisi (%).

Biyokontrol mayası *W. saturnus* var. *saturnus*'un *P. roqueforti* ve *P. candidum*'a karşı antifungal etkisi Liu ve Tsao (2010) tarafından yoğurt örneklerinde yapılan bir çalışmada ortaya konulmuştur. Farklı antagonist mayalarla yenilebilir filmlerin kombinasyonunun *Penicillium* spp.'nin inhibisyonu üzerine yapılan bazı çalışmalar da mevcuttur. Örneğin; Aloui ve ark. (2015) sodyum aljinat ve keçiyoynuzu özü temelli filmlere *Wickerhamomyces anomalus* mayası ilave ettikleri çalışmalarında *P. digitatum* küfünün gelişiminin %36'nın üstünde inhibe olmuştur. Benzer şekilde Parafati ve ark. (2016) keçiyoynuzu özü temelli kaplamaları farklı antagonist mayalarla (*W. anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima* ve *Aureobasidium pullulans*) ve McGuire ve Hagenmaier (1996) ise *Candida oleophila*'yı şellak kaplamalara ilave edilmesiyle *Penicillium* spp.'nin inhibe olduğunu ortaya konulmuştur.

Sonuç olarak; film yapısındaki antagonist mayanın *P. expansum* pH 4,5'te pH 5,2'den daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durum *W. saturnus* var. *saturnus* antagonist mayasının salgıladığı, küf suşlarının hücre duvarlarını parçalayarak inhibe eden 1,3- $\beta$ -glukanaz enziminin optimum pH değerleri ile ilişkilendirilebilir. Benzer şekilde Parafati ve ark. (2016) ve Muccilli ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada antagonist mayaların pH 4,5'te maksimum düzeyde toksin salgıladığı vurgulanmıştır.

*W. saturnus* var. *saturnus* antagonist mayasının *A. niger* ve *P. expansum* küflerini inhibisyonunda besin/yer yarışı başta olmak üzere salgıladığı HYI (HSK) toksini ile küflerin hücre duvarı sentezinde görev alan 1-3-  $\beta$ -glukan sentezini inhibe etmesi, patojenin hiflerine yapışarak parazitik etki göstermesi gibi mekanizmaların etkili olduğu düşünülmektedir (Komiyama ve ark., 1995, 1998; Guyard ve ark., 2002; Liu ve Tsao, 2009). Sonuç olarak antagonist mayanın ürettiği 1,3- $\beta$ -glukanaz enziminin film yapısında etkin dağılım gösterdiği söylenebilir.

### **4.3. Antagonist Maya İçeren Filmlerin Fiziksel Özellikleri**

#### **4.3.1. Antagonist maya içeren film örneklerinde kalınlık ölçümü**

Depolama boyunca farklı sayılarda maya içeren ve kontrol film örneklerinin kalınlık değerleri arasında önemli bir fark gözlenmemiş ve film örneklerinin ortalama kalınlığı  $136,8 \pm 0,008 \mu\text{m}$  olarak bulunmuştur ( $P>0,05$ ). Film kalınlığı filmlerin su buharı geçirgenliği gibi bariyer özelliklerinde önem taşımaktadır (Baldwin ve Hagenmaier, 2012).

#### **4.3.2. Antagonist maya içeren film örneklerinde su buharı geçirgenlik analizi**

Yenilebilir film ve kaplamalar gıdanın taşınması ve depolanması sırasında çevre ile arasındaki nem transferini kontrol altına almakta dolayısıyla kuruma ve nem çekme gibi kalite kayıplarını önleyebilmektedir. Film eldesindeki uygulama farklılıklarının yanısıra yapıya ilave edilen katkılar da filmlerin geçirgenlik özelliklerini etkileyebilmektedir. Bu nedenle artan maya sayısının PASP temelli film örneklerinin su buharı geçirgenlik değerlerine etkisi deolamanın 0. ve 28. günlerinde analiz edilmiştir (Tablo 4.6.).

Tablo 4.6. Antagonist maya içeren film örneklerinin depolamanın 0. ve 28. gününde su buharı geçirgenlik değerlerindeki değişim (g.mm/m<sup>2</sup>.gün.kPa).

| Su Buharı Geçirgenliği (g.mm/m <sup>2</sup> .gün.kPa) |          |                         |                                                    |                                                    |                                                    |
|-------------------------------------------------------|----------|-------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Gün                                                   |          | Kontrol<br>(Mayasız)    | 3,2 log<br>kob/cm <sup>2</sup> maya<br>içeren film | 6,8 log<br>kob/cm <sup>2</sup> maya<br>içeren film | 8,8 log<br>kob/cm <sup>2</sup> maya<br>içeren film |
| 0                                                     | Vakumsuz | 21,68±2,48 <sup>b</sup> | 23,58±2,46 <sup>b</sup>                            | 28,91±1,63 <sup>a</sup>                            | 31,91±3,31 <sup>a</sup>                            |
| 28                                                    | Vakumsuz | 19,27±2,05 <sup>b</sup> | 22,10±2,21 <sup>b</sup>                            | 26,05±2,39 <sup>a</sup>                            | 28,90±2,55 <sup>a</sup>                            |
|                                                       | Vakumlu  | 19,74±2,43 <sup>b</sup> | 22,06±2,46 <sup>b</sup>                            | 26,25±2,36 <sup>a</sup>                            | 28,99±2,49 <sup>a</sup>                            |

a-b: Aynı satırda yer alan farklı örnekler arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir ( $P<0,05$ ; n=6).

Tablo 4.6. incelendiğinde depolamanın 0. gününde filmlerin su buharı geçirgenlikleri kontrol örneklerinde 21,68 g.mm/m<sup>2</sup>.gün.kPa olarak ölçülmüştür. Artan maya sayısı ile birlikte 3,2; 6,8 ve 8,8 log kob/cm<sup>2</sup> maya içeren filmlerde su buharı geçirgenlikleri sırasıyla 23,58; 28,91 ve 31,91 g.mm/m<sup>2</sup>.gün.kPa olarak belirlenmiştir. Maya sayısı 6,8 ve 8,8 log kob/cm<sup>2</sup> olan filmlerin su buharı geçirgenlikleri arasında önemli bir fark gözlenmemişken bu filmlerin kontrol ve 3,2 log kob/ cm<sup>2</sup> maya içeren filmlerden istatistiksel açıdan daha fazla geçirgenliğe sahip olduğu görülmüştür ( $P<0,05$ ).

Yapılan benzer bir çalışmada Aloui ve ark. (2015) sodyum aljinat ve keçi boynuzu özü filmlere antagonist maya ilavesinin su buharı bariyer özelliklerinde istatistiksel açıdan fark meydana getirmediğini belirtmiştir ( $P>0,05$ ). Benzer şekilde Sánchez-González ve ark. (2013) ise sodyum kazeinat ve metil selüloz temelli filmlere *Lactobacillus acidophilus* ve *L. sakei* bakterilerini ilave ettikleri çalışmalarında su buharı geçirgenliğinin önemli derecede arttığını gözlemlemişlerdir ( $P<0,05$ ). Araştırmacılar film yapısında maya varlığı dolayısıyla polimer matrikslerde ortaya çıkan düzensizliklerin su buharı geçirgenliğini artırabileceğini vurgulamışlardır.

Yenilebilir filmlerin bariyer özellikleri film kompozisyonu ve çevre koşullarından (nem, sıcaklık gibi) etkilenmektedir (Guilbert ve ark., 1996). Ayrıca film yapısına eklenen antioksidan, antimikrobiyal ve besin değerini artırıcı bileşenlerin polar-

apolar olması ve molekül ağırlıklarına bağlı olarak film bariyer özellikleri değişebilmektedir (Çağrı-Mehmetoğlu, 2010). Protein filmlerden PASP filmlerin su buharı geçişine düşük direnci, hidrofilik yapısı ve yüksek suda çözünübilirliğinden kaynaklanmaktadır (Donhowe ve Fennema, 1994). Film yapısına mayaların ilavesiyle film konsantrasyonunun artışı su buharı bariyer özelliğini zayıflattığı düşünülmektedir. Örneğin; Gounga ve ark. (2010) film konsantrasyonunun artışının hava kabarcıklarının artışına ve geniş porlara neden olduğunu belirtmişlerdir. Bu da su molekülleri için hidrofilik geçiş noktaları oluşturarak su buharı geçirgenliğini artırmıştır. Maya ilave edilen filmlerin su buharı geçirgenliğinin yüksek olmasında bir diğer etken ise mayanın heterojen bileşenlerinin filmlerde kohezyon kuvvetini düşürmesidir (Ramos ve ark., 2012).

#### **4.3.3. Antagonist maya içeren film örneklerinin taramalı elektron mikroskobu ile yüzey özelliklerinin incelenmesi**

Taramalı elektron mikroskobu görüntüleri (SEM) filmlerin yüzey homojenitesi, katman yapısı, por ve çukurları, yüzey pürüzsüzlüğü ve kalınlığı hakkında bilgi vermektedir (Garcia ve ark., 2009). Taramalı elektron mikroskobunda gözlenen film yapısı filmlerin kaplandıkları yüzeye yapışma özellikleri, su buharı geçirgenlik değerleri ile ilişkilendirilebilir (Garcia ve ark., 1999; Ramos ve ark., 2012).

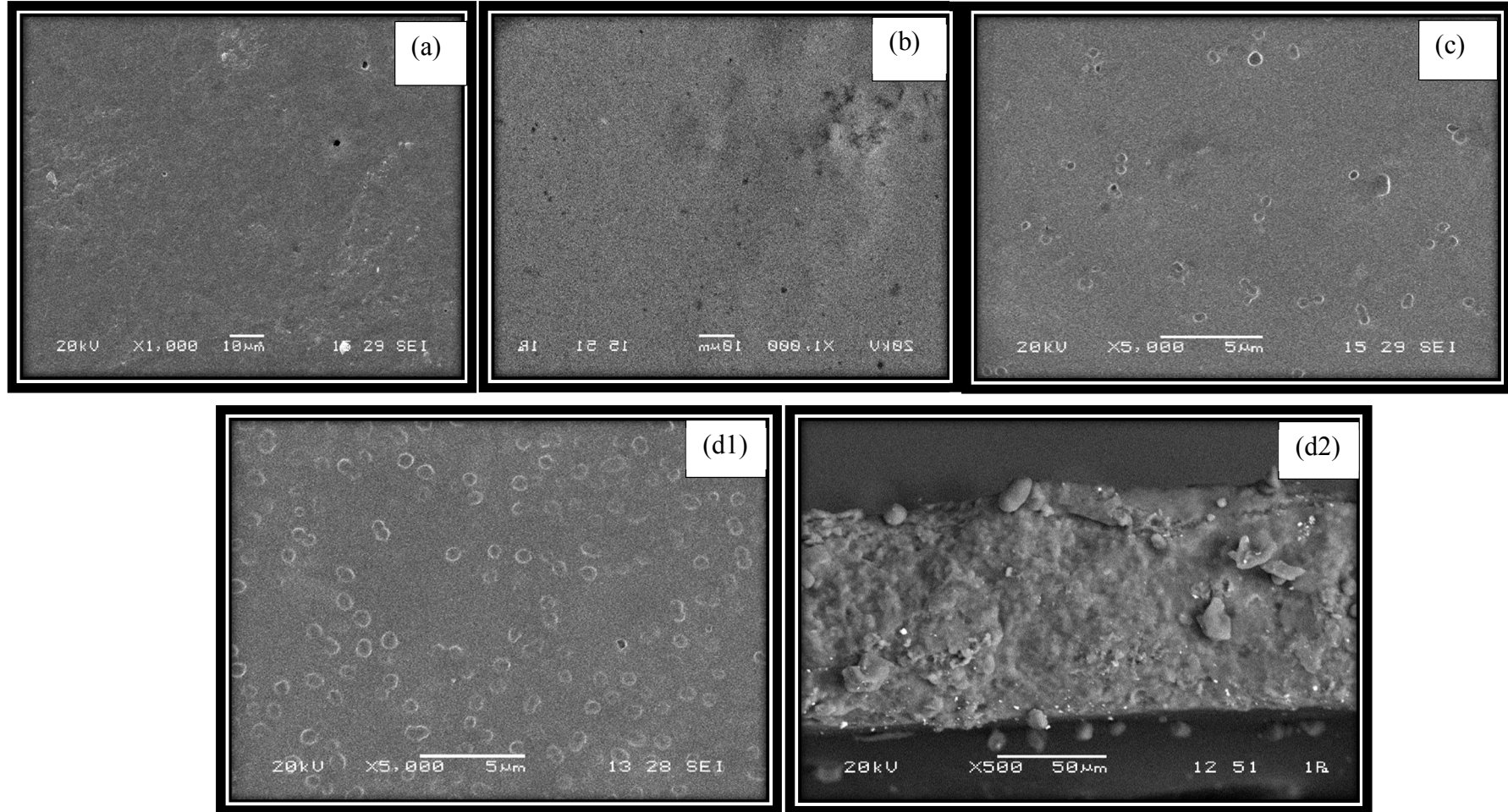
Farklı sayılarda antagonist maya içeren ve maya içermeyen PASP film örneklerinin yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. SEM’de belirlenen yüzey yapıları şekil 4.15.’te gösterilmiştir.

Yüzey mikrografları incelendiğinde, maya içermeyen kontrol ve  $3,2 \log \text{ kob/cm}^2$  maya içeren PASP filmlerin homojen, parlak ve pürüzsüz bir yüzey yapısına sahip olduğunu söylemek mümkündür. Filmlerde iğne deliği ya da hava kabarcığına rastlanmamıştır. Maya sayısı  $6,8$  ve  $8,8 \log \text{ kob/cm}^2$  filmlerde ise mayanın film yapısı içerisine tutunabildiği ve homojen bir dağılım gösterdiği görülmüştür. Yüzey mikrograflarındaki yapısal bütünlük aynı zamanda bileşenlerin birbiriyle uyumunun

göstergesi olarak düşünülebilir (Kibar, 2010). Yüzey yapısı pürüzlü olmasına rağmen sıkı bir film yapısı gözlenmiştir.

PASP temelli film yapısına laktik asit bakterilerinin ilave edildiği Tavera-Quiroz ve ark. (2015) ve Pereira ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmalarda da yüzey özellikleri açısından benzer sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin; Marín ve ark. (2016) farklı kaplama formülasyonlarına *Candida sake* biyokontrol ajanını ilave ettikleri film örneklerinde mayaların homojen dağıldığını belirtmişlerdir.





Şekil 4.15. PASP temelli film yüzeylerinin elektron mikroskop görüntüleri. (a) Kontrol (maya içermeyen) film, (b) 3,2 log kob/cm<sup>2</sup> maya içeren film, (c) 6,8 log kob/cm<sup>2</sup> maya içeren film, (d1) 8,8 log kob/cm<sup>2</sup> maya içeren film yüzey alanları (d2) 8,8 log kob/cm<sup>2</sup> maya içeren film kesit alanı.

#### 4.3.4. Antagonist maya içeren film örneklerinin renk ölçümleri

Filmlerin renk değerleri kaplandığı gıda yüzeyinde tüketici tarafından kabul edilebilirliğini etkilemektedir. Farklı sayılarda biyokontrol ajanı *W. saturnus* var. *saturnus* ilave edilen ve vakumlu-vakumsuz paketlenen filmlerin depolamanın 0., 14. ve 28. günlerinde  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  parametreleri analiz edilmiştir.  $L^*$  aydınlık (+) ve karanlık (-) değeri (0-100);  $a^*$  değeri kırmızılık (+), yeşillik (-) ve  $b^*$  değeri sarılık (+), mavilik (-) değerlerini belirtmektedir.

Tablo 4.7. incelendiğinde  $L^*$  (aydınlık) değerleri depolamanın 0. gününde kontrol örneklerinde  $91,22 \pm 0,08$  iken 3,2; 6,8 ve 8,8 log kob/cm<sup>2</sup> maya içeren filmlerde sırasıyla  $90,45 \pm 0,01$ ;  $88,24 \pm 0,07$  ve  $85,32 \pm 0,12$  olarak ölçülmüştür. Artan maya sayısı  $L^*$  değerlerinde önemli derecede düşüşe neden olmuştur ( $P<0,05$ ). Kontrol filmlerinde ve 8,8 log kob/cm<sup>2</sup> maya içeren filmlerde depolamanın başında sırasıyla  $91,22 \pm 0,08$  ve  $85,32 \pm 0,12$  olan  $L^*$  değeri depolama sonunda vakumsuz örneklerde  $91,14 \pm 0,08$  ve  $85,18 \pm 0,10$  değerlerine düşmüştür. Bu düşüş istatistiksel açıdan önem taşımaktadır ( $P<0,05$ ). Depolamanın 14. ve 28. günlerinde filmlerin  $L^*$  değerleri ölçüldüğünde zamana bağlı düşüş gözlenmiştir ( $P<0,05$ ).

Çalışmamızda film yapısına ilave edilen biyokontrol mayası aydınlık değerinde ( $L^*$ ) düşüşe neden olmuştur. Ancak Pereira ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada laktik asitlerinin film yapısına ilave edilmesi sonucu renk parametrelerinde bir değişim gözlenmediğini vurgulamışlardır ( $P<0,05$ ). Buna karşın filmlerin renk parametreleri çalışmamıza paralellik ( $L \geq 90,88$ ) göstermektedir. Film yapısına ilave edilen antimikrobiyal gibi katkı maddelerinin renk parametrelerini etkilediği bilinmektedir. PASP film yapısına antimikrobiyal maddelerin ilave edildiği Çağrı ve ark. (2003) tarafından yapılan çalışmada benzer şekilde  $L^*$  değerlerinde düşüş olduğu ortaya konulmuştur.



Tablo 4.7. Antagonist maya içeren film örneklerinin L\*, a\* ve b\* değerlerinde zamana bağlı değişim (depolamanın 0., 14. ve 28. günlerinde, vakumlu-vakumsuz paketli)

| L*  |                             |                            |                                              |                            |                                              |                             |                                              |                            |
|-----|-----------------------------|----------------------------|----------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------|----------------------------|
| Gün | Kontrol                     |                            | 3,2 log kob/cm <sup>2</sup> maya içeren film |                            | 6,8 log kob/cm <sup>2</sup> maya içeren film |                             | 8,8 log kob/cm <sup>2</sup> maya içeren film |                            |
|     | Vakumlu                     | Vakumsuz                   | Vakumlu                                      | Vakumsuz                   | Vakumlu                                      | Vakumsuz                    | Vakumlu                                      | Vakumsuz                   |
| 0   | 91,22 ± 0,08 <sup>aA</sup>  | 91,22 ± 0,08 <sup>aA</sup> | 90,45 ± 0,01 <sup>bA</sup>                   | 90,45 ± 0,01 <sup>bA</sup> | 88,24 ± 0,07 <sup>cA</sup>                   | 88,24 ± 0,07 <sup>cA</sup>  | 85,32 ± 0,12 <sup>dA</sup>                   | 85,32 ± 0,12 <sup>dA</sup> |
| 14  | 91,20 ± 0,07 <sup>aAB</sup> | 91,23 ± 0,08 <sup>aA</sup> | 90,32 ± 0,03 <sup>bB</sup>                   | 90,34 ± 0,03 <sup>bB</sup> | 88,17 ± 0,05 <sup>cB</sup>                   | 88,21 ± 0,09 <sup>cAB</sup> | 85,19 ± 0,04 <sup>dB</sup>                   | 85,19 ± 0,05 <sup>dB</sup> |
| 28  | 91,13 ± 0,07 <sup>aB</sup>  | 91,14 ± 0,08 <sup>aB</sup> | 90,18 ± 0,06 <sup>bC</sup>                   | 90,20 ± 0,09 <sup>bC</sup> | 88,15 ± 0,04 <sup>cB</sup>                   | 88,15 ± 0,04 <sup>cB</sup>  | 85,21 ± 0,04 <sup>dB</sup>                   | 85,18 ± 0,10 <sup>dB</sup> |
| a*  |                             |                            |                                              |                            |                                              |                             |                                              |                            |
| 0   | -0,94 ± 0,01 <sup>aA</sup>  | -0,94 ± 0,01 <sup>aA</sup> | -0,70 ± 0,02 <sup>bA</sup>                   | -0,70 ± 0,02 <sup>bA</sup> | -0,80 ± 0,03 <sup>cA</sup>                   | -0,80 ± 0,03 <sup>cA</sup>  | -0,82 ± 0,01 <sup>dA</sup>                   | -0,82 ± 0,01 <sup>dA</sup> |
| 14  | -0,94 ± 0,01 <sup>aA</sup>  | -0,94 ± 0,02 <sup>aA</sup> | -0,70 ± 0,01 <sup>bA</sup>                   | -0,70 ± 0,01 <sup>bA</sup> | -0,80 ± 0,01 <sup>cA</sup>                   | -0,80 ± 0,01 <sup>cA</sup>  | -0,82 ± 0,01 <sup>dA</sup>                   | -0,82 ± 0,01 <sup>dA</sup> |
| 28  | -0,95 ± 0,01 <sup>aA</sup>  | -0,95 ± 0,02 <sup>aA</sup> | -0,71 ± 0,01 <sup>bA</sup>                   | -0,70 ± 0,02 <sup>bA</sup> | -0,81 ± 0,01 <sup>bA</sup>                   | -0,80 ± 0,01 <sup>bA</sup>  | -0,82 ± 0,01 <sup>cA</sup>                   | -0,82 ± 0,01 <sup>cA</sup> |
| b*  |                             |                            |                                              |                            |                                              |                             |                                              |                            |
| 0   | 19,47 ± 0,01 <sup>dA</sup>  | 19,47 ± 0,01 <sup>dA</sup> | 20,14 ± 0,02 <sup>cA</sup>                   | 20,14 ± 0,02 <sup>cA</sup> | 23,17 ± 0,02 <sup>bA</sup>                   | 23,17 ± 0,02 <sup>bA</sup>  | 25,74 ± 0,05 <sup>aA</sup>                   | 25,74 ± 0,05 <sup>aA</sup> |
| 14  | 19,49 ± 0,02 <sup>dA</sup>  | 19,48 ± 0,05 <sup>dA</sup> | 20,16 ± 0,03 <sup>cA</sup>                   | 20,12 ± 0,07 <sup>cA</sup> | 23,13 ± 0,04 <sup>bA</sup>                   | 23,14 ± 0,08 <sup>bA</sup>  | 25,69 ± 0,06 <sup>aA</sup>                   | 25,68 ± 0,05 <sup>aA</sup> |
| 28  | 19,48 ± 0,03 <sup>dA</sup>  | 19,50 ± 0,03 <sup>dA</sup> | 20,15 ± 0,05 <sup>cA</sup>                   | 20,12 ± 0,06 <sup>cA</sup> | 23,18 ± 0,1 <sup>bA</sup>                    | 23,26 ± 0,06 <sup>bA</sup>  | 25,32 ± 0,07 <sup>aA</sup>                   | 25,65 ± 0,09 <sup>aA</sup> |

a-d: Aynı satırda yer alan farklı örnekler arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir ( $P < 0,05$ ;  $n=6$ ).A-D: Aynı sütunda yer alan analiz günleri arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir ( $P < 0,05$ ;  $n=6$ ).

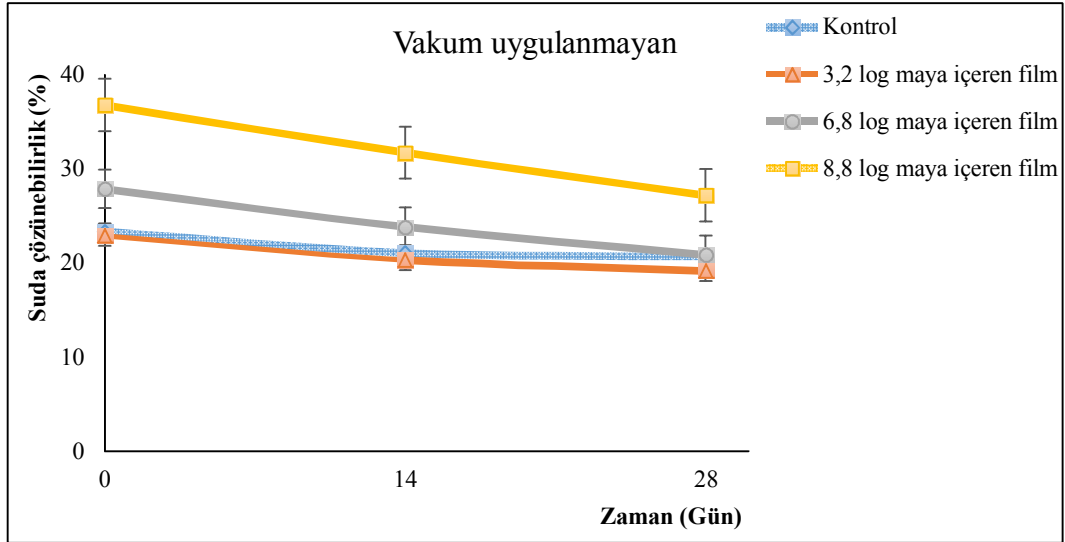
Filmlerin  $a^*$  kırmızılık (+)/yeşillik (-) değerleri depolamanın 0. gününde kontrol örneklerinde  $-0,94 \pm 0,01$  iken 3,2; 6,8 ve 8,8 log kob/cm<sup>2</sup> maya içeren filmlerde sırasıyla  $-0,70 \pm 0,02$ ;  $-0,80 \pm 0,03$  ve  $-0,82 \pm 0,01$  olarak ölçülmüştür. En yüksek  $a^*$  değeri kontrol örneklerinde gözlenirken artan maya sayısı  $a^*$  değerlerinde önemli derecede artışa neden olmuştur ( $P < 0,05$ ). Kırmızılık/yeşillik değerleri çeşitli dalga boylarındaki radyal enerjinin film yüzeyindeki absorpsiyonundaki farklılıktan kaynaklanmaktadır (Çağrı ve ark., 2003). Filmlerin  $a^*$  değerlerinin artan maya sayısına dayalı olarak (-) değerlerde azalan yönde çıkması yeşillik yönünde azalmanın olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Filmlerin  $b^*$  sarı (+)/mavi (-) değerleri depolamanın 0. gününde kontrol örneklerinde  $19,47 \pm 0,01$  iken 3,2; 6,8 ve 8,8 log kob/cm<sup>2</sup> maya içeren filmlerde sırasıyla  $20,14 \pm 0,02$ ;  $23,17 \pm 0,02$  ve  $25,74 \pm 0,05$  olarak ölçülmüştür. Maya sayısının artışı  $b^*$  değerlerinde önemli derecede artışa neden olmuştur ( $P < 0,05$ ). Sarılık/Mavilik değerlerinin ölçüldüğü  $b^*$  değerlerinin artan maya sayısına dayalı olarak (+) değerlerde artış göstermesi sarılık yönünde eğilimin olduğunu ortaya çıkarmıştır. Mayaların doğal krem-sarı rengi de filmde bu değişime neden olmuş olabilir. Filmlerin 14. ve 28. analiz günlerinde  $a^*$  ve  $b^*$  değerleri arasında önemli bir fark bulunamamıştır ( $P > 0,05$ ).

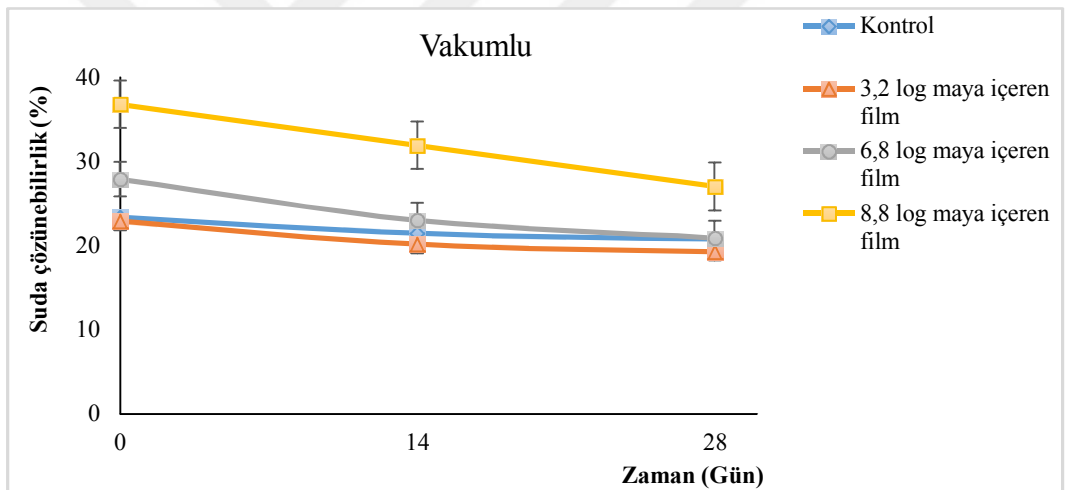
Vakumlu paketlenme uygulamasının film örneklerinin  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  değerlerine önemli bir etkisi ortaya çıkmamıştır ( $P > 0,05$ ). Sonuç olarak film yapısındaki artan maya sayısı mavi dalga boyundaki ışığı absorplarken yeşil ve sarı dalga boyundaki ışığı yansıtmıştır.

#### 4.3.5. Antagonist maya içeren film örneklerinin suda çözünübilirliği

Suda çözünübilirlik yenilebilir filmlerin depolama veya işlem esnasında su ile temasta bulunabilmesi nedeniyle önemli bir özelliktir (Pérez-Gago ve ark., 1999). Yenilebilir film örneklerinin suda çözünübilirlik değerlerindeki değişim Şekil 4.16. ve Şekil 4.17.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.16. Antagonist maya *W. saturnus* var. *saturnus* içeren vakum uygulanmadan paketlenmiş film örneklerinin suda çözünübilirlik değerlerinde zamana dayalı değişim (%).



Şekil 4.17. Antagonist maya *W. saturnus* var. *saturnus* içeren vakum uygulanmadan paketlenmiş film örneklerinin suda çözünübilirlik değerlerindeki zamana dayalı değişim (%).

Suda çözünübilirlik değeri depolamanın 0. gününde kontrol örneklerinde  $22,32 \pm 2,15$  olarak ölçülmüştür. Artan maya sayısına bağlı olarak 3,2; 6,8 ve 8,8 log kob/cm<sup>2</sup> antagonist maya içeren film örneklerinde ise suda çözünübilirlik değerleri sırasıyla  $22,88 \pm 3,41$ ;  $27,85 \pm 3,62$  ve  $36,75 \pm 2,13$  olarak ölçülmüş ve değerler artan maya konsatrasyonuna bağlı olarak önemli derecede artış göstermiştir ( $P < 0,05$ ). Depolamanın 14. ve 28. günlerinde kontrol ve 3,2 log kob/cm<sup>2</sup> maya içeren film örneklerinin suda çözünübilirlik değerlerinde istatistiksel açıdan önemli bir fark meydana gelmemiştir ( $P > 0,05$ ). Maya sayısı 6,8 ve 8,8 log kob/cm<sup>2</sup> film örneklerinde

ise depolama süresi filmlerin suda çözünübilirlik değerlerini önemli derecede düşürmüştür ( $P<0,05$ ). Filmlerin vakumlu yada vakumsuz paketlenmesi suda çözünübilirlik değerlerinde önemli bir fark ortaya çıkarmamıştır ( $P>0,05$ ).

Yenilebilir film yapısına eklenen maddeler hidrofilik filmlerde artan nem oranıyla suda çözünübilirlik ve su buharı geçirgenliğini artırmaktadır. Bu durum eklenen maddenin camsılık geçiş sıcaklığını düşürmesiyle ilgilidir. Ayrıca eklenen maddenin molekül ağırlığı kadar şekli de film özelliklerini etkilemektedir (Çağrı-Mehmetoğlu, 2010). Biyokontrol mayasının film yapısına kolayca difüze olamaması suda çözünübilirlik değerini artırmaktadır. Filmlerin suda çözünübilirliğinin yüksek olmasının bazı avantajlı durumları da bulunmaktadır. Örneğin; protein esaslı filmler gıdanın tüketim öncesi ısıtılması sırasında kolayca çözünmesiyle gıdanın tadında değişime neden olmamaktadır (Donhowe ve Fennema, 1994).

#### 4.3.6. Antagonist maya içeren film örneklerinin su aktivitesi ölçümleri

Filmler 25 °C’de % 75 bağıl nemde depolanarak su aktivitesi ölçümleri 0., 14. ve 28. günlerde vakumlu ve vakumsuz örneklerde yapılmıştır. Tablo 4.8.’de depolama boyunca  $a_w$  0,59 - 0,65 aralığında ölçülmüştür.

Tablo 4.8. Antagonist maya içeren film örneklerinin vakumlu ve vakum uygulanmadan paketlenmesiyle depolamanın 0., 14., ve 28. gününde ölçülen su aktivitesi değerleri.

| Gün |          | Kontrol<br>(Mayasız)       | 3,2 log kob/cm <sup>2</sup><br>maya içeren film | 6,8 log kob/cm <sup>2</sup><br>maya içeren film | 8,8 log kob/cm <sup>2</sup><br>maya içeren film |
|-----|----------|----------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 0   | Vakumsuz | 0,643±0,017 <sup>aAB</sup> | 0,633±0,025 <sup>aAB</sup>                      | 0,628±0,019 <sup>aB</sup>                       | 0,652±0,004 <sup>aA</sup>                       |
| 14  | Vakumsuz | 0,613±0,004 <sup>bA</sup>  | 0,615±0,005 <sup>abA</sup>                      | 0,608±0,024 <sup>abA</sup>                      | 0,601±0,010 <sup>bB</sup>                       |
|     | Vakumlu  | 0,616±0,008 <sup>bA</sup>  | 0,619±0,016 <sup>aA</sup>                       | 0,611±0,013 <sup>abA</sup>                      | 0,618±0,016 <sup>bA</sup>                       |
| 28  | Vakumsuz | 0,611±0,004 <sup>bA</sup>  | 0,596±0,026 <sup>bA</sup>                       | 0,595±0,012 <sup>bA</sup>                       | 0,613±0,014 <sup>bA</sup>                       |
|     | Vakumlu  | 0,613±0,004 <sup>bA</sup>  | 0,611±0,008 <sup>aAB</sup>                      | 0,607±0,010 <sup>bAB</sup>                      | 0,624±0,0208 <sup>bA</sup>                      |

a-d: Aynı satırda yer alan farklı örnekler arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir ( $P<0,05$ ; n=6).

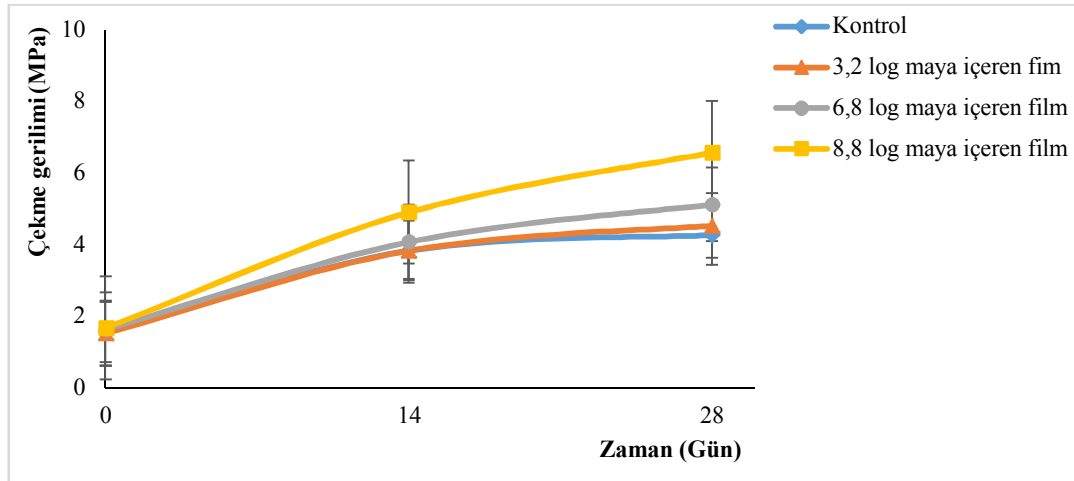
A-D: Aynı sütunda yer alan analiz günleri arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir ( $P<0,05$ ; n=6).

Yapılan benzer çalışmalarda laktik asit bakterisinin ilave edildiği film örneklerinin su aktivitesi değerleri benzer şekilde 0,549-0,738 aralığındadır (Pereira ve ark., 2016).

Maya sayısına ve depolama süresine bağlı olarak örneklerin su aktivitesi değerlerinde önemli bir değişim gözlenmemiştir ( $P>0,05$ ). Su aktivitesi değerlerinde önemli bir değişim gözlenmemiş olmasının depolama koşullarında nem ve sıcaklığın sabit olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Filmlerin su aktivitesinin düşük olmasının mekaniksel özelliklerden çekme gerilimini artırırken, uzama katsayısını düşürdüğü ayrıca mikrobiyal gelişimi baskıladığı düşünülmüştür.

#### 4.4. Antagonist Maya İçeren Filmlerin Mekaniksel Özellikleri

Yenilebilir film ile kaplanan gıdaların taşınması, depolanması ve kullanımı sırasında bütünlüğünün korunması amacıyla mekaniksel özellikler önem taşımaktadır. Filmlerin kimyasal yapıları ile ilişkili olan mekaniksel direnci tanımlamak için maksimum stresi belirleyen çekme gerilimi ve kopma anından önceki elastikiyeti belirleyen yüzde uzama katsayısı gibi parametrelerden faydalanılır. Film içerisindeki mayaların aktivite ve canlılığının depolama süresi boyunca mekaniksel özelliklerden çekme gerilimi ve çekmede yüzde uzama değerlerinde zamana bağlı meydana getirdiği değişimi şekil 4.18. ve şekil 4.19.'da gösterilmiştir.

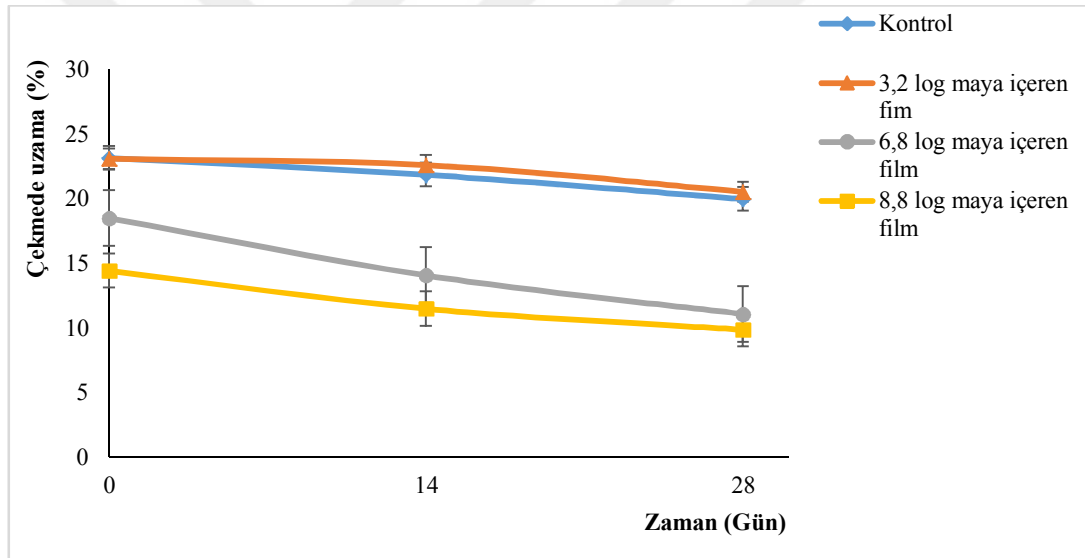


Şekil 4.18. Farklı sayıda antagonist maya *W. saturnus* var. *saturnus* içeren film örneklerinin depolamanın 0., 14. ve 28. günlerinde çekme gerilimi değerlerindeki değişim (MPa).

Şekil 4.18.'deki verilere dayanarak çekme gerilimi depolamanın 0. gününde kontrol filmlerinde  $1,564 \pm 0,22$  MPa olarak ölçülürken maya ilave edilen film örneklerinden istatistiksel açıdan değişim olmamıştır ( $P>0,05$ ). Depolamanın 14. gününde 6,8 ve

8,8 log kob/cm<sup>2</sup> maya içeren film örnekleri; kontrol ve 3,2 log maya içeren film örneklerine kıyasla daha yüksek çekme gerilimi değerleri göstermiştir. Benzer şekilde depolamanın 28. gününde 8,8 log maya içeren film örneği  $6,57 \pm 0,77$  mPA ile diğer örneklerden daha yüksek çekme gerilim özelliklerine sahiptir. Analiz edilen tüm film örneklerinin çekme gerilimi değerlerinde depolama süresi arttıkça önemli derecede artışın meydana geldiği görülmüştür ( $P<0,05$ ).

Farklı maya sayılarını içeren filmlerin çekmede % uzama değerlerinin depolama süresine bağlı olarak değişimi Şekil 4.19.'da verilmiştir. Depolamanın 0. gününde kontrol filmlerinde  $23,15 \pm 4,50$  mPa olarak ölçülen uzama değeri filmlere maya ilavesi ile istatistiksel açıdan değişmemiştir ( $P>0,05$ ).



Şekil 4.19. Farklı sayıda antagonist maya *W. saturnus* var. *saturnus* içeren film örneklerinin depolamanın 0., 14. ve 28. günlerinde çekmede uzama değerlerindeki zamana bağlı değişimi (%).

Filmlerde çekme gerilimi ile çekmede % uzama katsayısı birbirine zıt yönde gelişme göstermekte ve bu iki değer belli bir dengede olması istenmektedir. Çekme gerilimi değerleri depolamanın 0. gününde örnekler arasında fark meydana getirmemişken, 28. gününde 8,8 log kob/cm<sup>2</sup> maya içeren film örneklerinin daha yüksek olduğu ortaya çıkmıştır ( $P<0,05$ ). Çekmede % uzama katsayısı ise depolama süresinde değişim göstermemiştir ( $P>0,05$ ). Bunun nedeninin depolama boyunca film materyalindeki kuvvetli düsülfit bağlarının sayısının artmasıyla filmin mekaniksel

özelliklerinin iyileşmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür (McHugh and Krochta, 1994). Aloui ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada maya katkılı filmlerin çekme gerilimi ve uzama katsayısı değerlerindeki değişim önemli bulunmamıştır. Pereira ve ark. (2016) ise laktik asit bakterisi ilave ettikleri PASP izolatu temelli filmlerin çekme gerilimi değerlerinin düştüğünü, uzama katsayısının değişmediğini belirtmişlerdir.



## BÖLÜM 5. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- Antagonist maya *Williopsis saturnus* var. *saturnus*'un peynir altı suyu proteini temelli yenilebilir filmlere farklı konsantrasyonlarda ilavesiyle biyoaktif film materyalleri geliştirilmiştir.
- Geliştirilen  $8,8 \log \text{ kob/cm}^2$  antagonist maya içeren filmlerin yapısında antagonist mayanın canlılığı 28 günlük depolama süresinin sonunda % 60'ın üstünde korunabilmiştir.
- Film yapısındaki *W. saturnus* var. *saturnus* antagonist mayasının *Penicillium expansum* küfüne % 29; *Aspergillus niger* küfüne % 19 oranında antifungal etkisinin olduğu rapor edilmiştir.
- Filmlerin vakumlu veya vakum uygulanmadan paketlenmesi film özelliklerinde önemli bir değişime neden olmamıştır.
- Artan maya konsantrasyonuna bağlı filmlerin su buharı geçirgenliği, suda çözünübilirlik ve çekme kuvveti değerleri artarken, uzama katsayısı değerleri düşüş göstermiştir. Renk parametrelerinden  $L^*$  değeri azalmış,  $a^*$  ve  $b^*$  değerleri ise sarı ve yeşil renk yönünde eğilim göstermiştir.
- Gıdaların maya katkılı yenilebilir filmlerle kaplanması küf gelişimini engellediği gibi fiziksel, kimyasal ve mekaniksel özelliklerini geliştirme potansiyeline de sahiptir. Dolayısıyla gıda endüstrisine bu çalışmada geliştirilen antagonist maya *W. saturnus* var. *saturnus* içeren biyoaktif filmler özellikle küf gelişimine duyarlı gıda ürünlerinin kaplanmasında kullanımı önerilmektedir.



- Sonraki alışmalar için film yapısını geliştirebilecek farklı katkıların ilavesinin önerilebilir.
- *W. saturnus* var. *saturnus* antagonist mayasının farklı kf suşlarına karşı antifungal etkisini yüksek düzeyde gösterebildiği farklı yenilebilir film yapılarıyla kombinasyonları üzerine çalışmalar yapılabilir.



## KAYNAKLAR

- Abadias, M., Teixidó, N., Usall, J., Viñas, I., Magan, N. 2001. Improving water stress tolerance of the biocontrol yeast *Candida sake* grown in molasses-based media by physiological manipulation. Canadian Journal of Microbiology, 47 (2), 123-129.
- Ačkar, Đ., Šubarić, D., Babić, J., Jozinović, A., Jokić, S. 2014. Edible films and coatings-production and application. Technologica acta, 7(2).
- Akbaba, G., 2006. Yenilebilir ambalajlar, Bilim ve Teknik Dergisi, 30-32.
- Aloui H., Licciardello F., Khwaldia K., Hamdi M., Restuccia C. 2015. Physical properties and antifungal activity of bioactive films containing *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast and their application for preservation of oranges and control of postharvest greenmold caused by *Penicillium digitatum*. International Journal of Food Microbiology, 22–30.
- ASTM 1992. Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia, Pa.: American Society for Testing and Materials, 313-321.
- Avena-Bustillos, R. J., Cisneros-Zevallos L. A., Krochta J. M., Saltveit M. E. 1993. Optimization of edible coatings on minimally processed carrots using response surface methodology. Trans. Am. Soc. Agric. Eng. 36:801–805.
- Avis, T. J., Bélanger, R. R. 2002. Mechanisms and means of detection of biocontrol activity of *Pseudozyma* yeasts against plant-pathogenic fungi. Fems Yeast Research, 2(1), 5-8.
- Ayana, B., Turhan, K. N. 2010. Gıda ambalajlamasında antimikrobiyal madde içeren yenilebilir filmler/ kaplamalar ve uygulamaları. Gıda, 35 (2): 151-158.
- Ayhan, K. 2000. Gıda mikrobiyolojisi ve uygulamaları. İçinde: 02. Bölüm, 02. Kısım. Genişletilmiş 2. Baskı; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Sim Matbaası, Ankara, 522 .
- Ayrancı E., Tunç S. 2003. A method for the measurement of the oxygen permeability and the development of edible films to reduce the rate of oxidative reactions in fresh foods, Food Chemistry, 80, 423–431.
- Ayrancı E., Tunc S. 2004. The effect of edible coatings on water and vitamin C loss of apricots (*Armeniaca vulgaris* Lam.) and green peppers (*Capsicum annuum* L.), Food Chemistry, 87, 339–342.

- Baldwin E. A. 1994. Edible Coatings for fresh fruits and vegetables: past, present and future, In: Edible Coatings and Films to Improve Food Quality. Technomic Publishing Company Inc., Lancaster, 25-64.
- Bata, A., Lasztity, R. 1999. Detoxification of Mycotoxin-Contaminated Food and Feed by Microorganisms. Trends in Food Science - Technology, 10: 223-228.
- Biquet, B., Guilbert, S. 1986. Relative diffusivities of water in model intermediate moisture foods. Lebensm. Wiss. Technol. Food Sci. Technol. 19:208–214.
- Björnberg, A., Schnürer, J. 1993. Inhibition of the growth of grain-storage molds in vitro by the yeast *Pichia anomala*. (Hansen) Kurtzman. Can. J. Microbiol., 39, 623–628.
- Bolwell, P. G., Bindschedler, L. A., Blee, K. A., Butt, V. S., Davies, D. R., Gardner, S. L. 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three component system. Journal of Experimental Botany, 53, 1367-1376.
- Bonilla J., Atarés L., Vargas M., Chiralt A. 2012. Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: Possibilities and limitations. Journal of Food Engineering 110, 208–213.
- Bourtoom, T. 2008. Edible films and coatings characteristics and properties. Int Food. Res. J., 15, 3.
- Bora, T., Özaktan H. 1998. Bitki hastalıklarıyla biyolojik savaş. Prizma Matbaası, İzmir. 205.
- Bullerman, L. B., Schroeder, L. L., Park, K.Y. 1984. Formation and control of mycotoxins in food. Journal of Food Protection 47: 637-646.
- Cañamás, T. P., Viñas, I., Usall, J., Casals, C., Solsona, C., Teixidó, N. 2008a. Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest application of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. Part I. Study of different formulation strategies to improve survival of cells in unfavourable environmental conditions. Postharvest Biol. Technol. 49, 86–95.
- Cañamás, T. P., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Anguera, M., Teixidó, N. 2008b. Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest applications of biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. Part II. Effectiveness of different cell formulations. Postharvest Biol. Technol. 49, 96–106.
- Cañamás, T. P., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., Solsona, C., Teixidó, N. 2011. Field applications of improved formulations of *Candida sake* CPA-1 for control of *Botrytis cinerea* in grapes. *Biological Control*, 56(2), 150-158.
- Carlin, E., Gontard N., Reich M., Nguyen C. 2001. Utilization of zein coating and sorbic acid to reduce *Listeria monocytogenes* growth on cooked sweet corn. J. Food Sci. 66:1385–1389.

- Cha D. S., Chinnan M. S. 2004. Biopolymer-based antimicrobial packaging: A review. *Food Sci Nutr*, 44: 223-237.
- Chen, H. 1995. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins, *J. Dairy Sci.*, 78, 2563-2583.
- Chen, M. C., Yeh, G. H. C., Chiang, B.H. 1996. Antimicrobial and physicochemical properties of methylcellulose and chitosan films containing a preservative. *J. Food Process. Preserv.* 20:379–390.
- Colla, E., Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C. 2006. Effect of composite edible coating from *Amaranthus cruentus* flour and stearic acid on refrigerated strawberry (*Fragaria ananassa*) quality. *Latin American Applied Research*, 36, 249-254.
- Corrales, M., Fernandez, A., Han, J.H. 2014. Antimicrobial Packaging Systems, In: *Innovations in Food Packaging*, Academic Press., USA, 134-158.
- Cota, L. V., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S., Macedo, P. E., Antunes, R. F. 2008. Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. *Biological Control*, 46(3), 515-522.
- Cuq, B., Gontard, N., Guilbert, S., 1995. Edible films and coatings as active layers. *Active Food Packagings*, edited by M. L. Rooney. Glasgow: Blackie Academic-Professional.
- Çağrı, A., Ustunol, Z., Ryser, E.T., 2001. Antimicrobial, Mechanical, and Moisture Barrier Properties of Low pH Whey Protein-based Edible Films Containing p-Aminobenzoic or Sorbic Acids. *Journal of Food Science*, 66(6): 865-870.
- Çağrı, A., Üstünol Z., Ryser E.T., 2002. Inhibition of three pathogens on Bologna and summer sausage using antimicrobial edible films. *J Food Sci*, 67 (6): 2317-2324.
- Çağrı, A., Üstünol, Z., Ryser, E.T., 2003a. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on Hot Dogs Using Antimicrobial Whey Protein-based Edible Casings. *Journal of Food Science*, 68: 1.
- Çağrı, A., Ustunol, Z., Ryser, E.T. 2003b. Antimicrobial whey protein-based casings – coming to a store near you?. *Michigan Dairy Review*, April , 8: 2.
- Çağrı, A., Üstünol, Z., Ryser, E. T. 2004. Antimicrobial edible films and coatings. *Journal of Food Protection*, 67 (4), 833-848.
- Çağrı-Mehmetoğlu, Demirkol, O. 2008. Yenilebilir Antimikrobiyal Filmlerin ve Kaplamaların Et Ürünlerine Kullanılabilirliği. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, Erzurum, 541.
- Çağrı-Mehmetoğlu, A. 2010. Yenilebilir Filmlerin ve Kaplamaların Özelliklerini Etkileyen Faktörler. *Akademik gıda*, 8- 5 / 37-43.

- Çalıkoglu, E. 2008. Fındıkların uçucu yağ içeren yenilebilir protein filmlerle kaplanmasının depolama sırasındaki oksidatif stabilite ve duyu kalite üzerine etkisi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Doktora Tezi.
- Debeaufort, F., Voilley, A. 2009. Lipid-Based Edible Films and Coatings, In: Edible Films and Coatings for Food Applications. Springer Dordrecht Heidelberg, London, 1-25.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. A., Voilley, A. 1998. Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review. Critical Reviews in Food Science, 38(4): 299-313.
- Demirci, M., Diraman, H. 1990. Trakya bölgesinde üretilen vakum paketlenmiş taze Kaşar peynirlerinin yapım tekniği fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik nitelikleri ve enerji değerleri üzerinde bir çalışma. Gıda Derg., 15 (2): 83-88.
- Dhall, R.K. 2013. Advances in Edible Coatings for Fresh Fruits and Vegetables: A Review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 53:5, 435-450.
- Diab, T., Biliaderis, C. G., Gerasopoulos, D., Sfakiotakis, E. 2001. Physicochemical properties and application of pullulan edible films and coatings in fruit preservation. J. Sci. Food Agric. 81, 988-1000.
- Donhowe, F., Fennema, O. 1994. Edible films and coating: characteristics, formation, definition, and testing methods. In: Edible Coatings and Films to Improve Food Quality, Technomic Publishing Company, USA, 1-24.
- Droby, S., Wisniewski M., Macarasin D., Wilson C. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? Postharvest Biology and Technology 52, 137-145.
- Dönmez, D. 2010. Gıdalarda bozulma etkeni olan bazı fungusların *Debaryomyces hansenii* ile biyokontrolü. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Doktora Tezi.
- Duan, J., Park, S. I., Daeschel, M.A., Zhao, Y. 2007. Antimicrobial chitosan-lysozyme (CL) films and coatings for enhancing microbial safety of Mozzarella cheese. Food Microbiol Safe, 72 :355-361.
- Dursun S., Erkan N. 2009. Yenilebilir protein filmler ve su ürünlerinde kullanımı. Journal of Fisheries Sciences, 3(4): 352-373.
- El-Ghaouth, A., Arul J., Ponnampalam R. 1991. Use of chitosan coating to reduce water loss and maintain quality of cucumber and bell pepper fruits. J. Food Process. Preserv. 15:359-368.
- Erbil H.Y., Muftugil N. 1986. Lengthening the Postharvest Life of Peaches by Coating with Hydrophobic Emulsions. J. Food Pro. and Pre, 10, 269-279.

- Erkan, M. E., Aksu, H. 2005. Modifiye atmosfer paketlenme tekniğinin dilimlenmiş taze kaşar peynirinin mikrobiyolojik ve duysal özellikleri üzerine etkisi. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg. 32(1), 57-68.2006.
- Fajardo, P., Martins, J. T., Fucinos, C., Pastrana, L., Teixeira, J. A., Vicente, A. A. 2010. Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. J Food Eng 101:349–356.
- Fan, Y., Xu, Y. Wang, D., Zhang, L., Sun, J., Sun, L., Zhang, B. 2009. Effect of alginate coating combined with yeast antagonist on strawberry (*Fragaria×ananassa*) preservation quality. Postharvest Biology and Technology 53, 84–90.
- García, M. A., Martino, M. N., Zaritzky, N. E. 1999. Edible starch films and coatings characterization: scanning electron microscopy, water vapor and gas permeabilities. Scanning, 21(5), 348-353.
- García M., Bifani V., Campos C., Martino M. N., Sobral P., Flores S., Ferrero C., Bertola N., Zaritzky N. E., Gerschenson L., Ramírez C., Silva A., Ihl M., Menegalli F. 2008. Edible Coating as an Oil Barrier or Active System. In: Food Engineering: Integrated Approaches, Springer, Newyork, 225-243.
- García M.A., Pinotti A., Martino M.N., Zaritzky N.E. 2009. Characterization of Starch and Composite Edible Films and Coatings. In: Edible Films and Coatings for Food Applications, London, 169-211.
- Gautam S. 2009. Biocontrol of cereal pathogens. Boca Raton, Florida.
- Gennadios, A., McHugh, T.H., Weller, C. L., Krochta, J. M. 1994. Edible coatings and films based on proteins. In: Edible coatings and films to improve food quality. Technomic Publishing Company, USA, 201-277.
- Gennadios, A. W., Curtis L. 1990. Edible films and coatings from wheat and corn proteins. Food Technology. 44, (10), 63, 7.
- Giobbe, S., Marceddu S., Scherm B., Zara G., Mazzarello V. L., Budroni M., Migheli Q. 2007. The strange case of a biofilm-forming strain of *Pichia fermentans*, which controls *Monilinia* brown rot on apple but is pathogenic on peach fruit, Fems Yeast Research., 7, (8), 1389, 10.
- Golubev, W. I. 1998. Mycocins (Killer Toxins). In: The Yeasts - A Taxonomic Study. Elsevier Science B.V., Netherlands, 55-63.
- Gounga M. E., Xu S. Y., Wang Z. 2007. Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation, Journal of Food Engineering 83, 521–530.

- Gounga, M. E., Xu, S. Y., Wang, Z. 2010. Film forming mechanism and mechanical and thermal properties of whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan content. *Journal of food biochemistry*, 34(3), 501-519.
- Guilbert S., Gontard N., Gorris L. G. M. 1996. Prolongation of the Shelf-life of Perishable Food Products using Biodegradable Films and Coatings: Review Article. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 29, 10–17.
- Guyard, C., Dehecq, E., Tissier, J. P., Polonelli, L., Cas, E. D., Cailliez, J. C., Menozzi, F. D. 2002. Involvement of  $\beta$ -Glucans in the wide-spectrum antimicrobial activity of *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 killer toxin. *Molecular Medicine* 8 (11) : 686–694.
- Güleç, F., Bayram, M., Yıldırım, M., Yıldırım, Z. 2004. Some properties of kaşar cheese coated with casein. Süleyman Demirel University, Recent Developments In Dairy Science and Technology, International Dairy Symposium, Isparta, 58-66.
- Gün, I., Güzel-Seydim, Z., Seydim, A. C. 2009. Modifiye atmosferde paketlemenin farklı tipteki peynirlerin bazı niteliklerine etkisi. *Gıda*, 34 (5): 309-316.
- Halkman, K. 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd. Şti., Ankara.
- Han J. H. 2005. Fundamental theories regarding the physical and chemical background and quality preservation of foods. In: *Innovations in Food Packaging*, Elsevier Academic Press, London, 3-45.
- Han J. H. 2014. Edible films and coatings: A Review. In: *Innovations in Food Packaging*, Academic Press., USA, pp. 214-241.
- Han J. H., Gennadios A. 2005. Edible films and coatings: a review. In: *Innovations in Food Packaging*, Elsevier Academic Press, London, 239-434.
- Han, J. H., Hwang, H.M., Min, S., Krochta, J. M. 2008. Coating of peanuts with edible whey protein film containing  $\alpha$ -tocopherol and ascorbyl palmitate. *Journal of Food Science*. 73 : 8.
- Hayaloğlu, A. A. 2009. Volatile composition and proteolysis in traditionally produced mature Kashar cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1388–1394.
- Hocking, A. D., Faedo, M. 1992. Fungi causing thread mould spoilage of vacuum packaged Cheddar cheese during maturation. *Int. J. Food Microbiol.* 16, 123–130.
- Holownia, K. I., Chinnan M. S., Erickson M. C., Mallikarjunan P. 2000. Quality evaluation of edible-coated chicken strips and frying oils. *J. Food Sci.* 65:1087–1090.

- Hoover, D. G. 2000. Microorganisms and their products in the preservatons of foods. In: Microbiological Safety and Quality of Food, Aspen Publishers, USA.
- Hua, S. S. T., Beck, J. J., Sarreal, S. B. L., Gee, W. 2014. The major volatile compound 2-phenylethanol from the biocontrol yeast, *Pichia anomala*, inhibits growth and expression of aflatoxin biosynthetic genes of *Aspergillus flavus*. Mycotoxin Res., 30, 71–78.
- Işık, H. Dağhan, Ş., Gökmen, S. 2013. Gıda endüstrisinde kullanılan yenilebilir kaplamalar üzerine bir araştırma. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi Cilt: 8, No: 1, 26-35.
- İmamoğlu, Ö. 2011. Biyokontrolde doğal ürünlerin kullanılması; Kitosan. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji, 68: 4, 8, 215-222.
- Janisiewicz, W. J., Korsten, L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruit. Annu. Rev. Phytopathol. 40, 411–441.
- Janisiewicz, W. J., Saftner, R. A., Conway, W. S., Yoder, K. S. 2008. Control of blue mold decay of apple during commercial controlled atmosphere storage with yeast antagonists and sodium bicarbonate. Postharvest Biology and Technology, 49 (3), 374-378.
- Janjarasskul, T., Tananuwong, K., Krochta, J. M. 2011. Whey protein film with oxygen scavenging function by incorporation of ascorbic acid. Journal of food science, 76(9), 561-568.
- Jones R. J. 2011. Food biopreservation. Identifying new protective cultures and culture components for food biopreservation. In: Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation. Wood head publishing, UK.
- Kabak, B., Var, I. 2004. Binding of aflatoxin M1 by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. Milchwissenschaft, 59(5-6), 301-303.
- Kalkan, S. 2014. Farklı Antimikrobiyal maddeler içeren yenilebilir flim kaplamaların macar salamında kullanım olanakları ve *Listeria innocua* inaktivasyonu üzerine etkileri. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Doktora Tezi.
- Kester, J. J., Fennema, O. R. 1986. Edible films and coatings: A review. Food Technology 40 (12): 47-59.
- Khwaldia K., Perez C., Banon S., Desobry S., Hardy J. 2004. Milk proteins for edible films and coatings. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44:239–251.



- Kibar, E. A. A. 2010. Biyobozunur metilselüloz-mısır nişastası ve karboksimetilselüloz-mısır nişastası esaslı filmlerin üretimi ile geçirgenlik, mekanik ve yapısal özelliklerinin belirlenmesi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Doktora Tezi.
- Kimura, T. Kitamoto N., Ohta Y., Kito Y., Iimura Y. 1995. Structural relationships among killer toxins secreted from the killer strains of the genus *Williopsis*. Journal of Fermentation and Bioengineering Vol. 80, No. I, 8.5-87.
- Komiyama T., Shirai T., Ohta T., Urakami H., Furuichi Y., Ohta Y., Tsukada Y., 1995. Structure and activity of HYI öldürücü toxin from *Hansenula saturnus*. Biol Pharm Bull. 18 (8) 1057-1059.
- Komiyama T., Shirai T., Ohta T., Urakami H., Furuichi Y., Ohta Y., Tsukada Y., 1998. Action properties of HYI öldürücü toxin from *Williopsis saturnus* var. *saturnus* and antibiotics, aculeacin A and papulacandin B. Biol Pharm Bull. Oct; 21 (10):1013-9.
- Krochta, J. M., Baldwin E. A., Nisperos-Carriedo M. O. 1994. Edible coatings and films to improve food quality. CRC Press LLC, Boca Raton, FL.
- Krochta, J. M. 1997. Edible protein films and coatings. In: Food Proteins and Their Applications, eds: S. Damodaran and A. Paraf, Marcel Dekker, New York, 529-549.
- Krochta, J. M. 2002. Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status, and opportunities. *Protein-based films and coatings*, 1-41.
- Krochta J. M. 2010. Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status, and opportunities, In: Protein-Based Films and Coatings, CRC Press, New York, 1-43.
- Labuza, T. P., Breene, W. M. 1989. Applications of active packaging for improvement of shelf life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods. J. Food Process. Preserv. 13:1-69.
- Lacroix C. 2011. Food biopreservation. In: Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation. Wood head publishing, UK.
- Lacroix M. 2009. Edible films and coatings: why, what, and how? In: Edible Films and Coatings for Food Applications, Springer Dordrecht Heidelberg, London, 347-366.
- Lee, J. Y., Park, H. J., Lee, C.Y., Choi, W. Y. 2003. Extending shelf life of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents. Lebensm. -Wiss. U. Technol. 36, 323-329.
- Lerdthanangkul, S., Krochta J. M. 1996. Edible coating effects on postharvest quality of green bell peppers. J. Food Sci. 61:176- 179.113.

- Letendre, M., D'Aprano G., Delmas-Patterson G., Lacroix M. 2002. Isothermal calorimetry study of calcium caseinate and whey protein isolate edible films cross-linked by heating and gamma irradiation. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6053 - 6057.
- Liu S. Q., Tsao M. 2009. Inhibition of spoilage yeasts in cheese by killer yeast *Williopsis saturnus* var. *saturnus*. *International Journal of Food Microbiology* 131 (2009) 280–282.
- Liu S.Q., Tsao M. 2010. Biocontrol of spoilage yeasts and moulds by *Williopsis saturnus* var. *saturnus* in yoghurt. *Nutrition & Food Science* Vol. 40 No. 2, 2010 pp. 166-175.
- Makower, M., Bevan, E. A. 1963. The inheritance of a killer character in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). In *Proc Int Congr Genet XI*, Vol. 1, No. 202, 235-44.
- Mallikarjunan, P., Chinnan, M. S., Balasubramaniam, V. M., Phillips, R. D. 1997. Edible coatings for deep-fat frying of starchy products. *Lebensm.-Wiss. U Technol.* 30:709–714.
- Marín, A., Cháfer, M., Atarés, L., Chiralt, A., Torres, R., Usall, J., Teixidó, N. 2016. Effect of different coating-forming agents on the efficacy of the biocontrol agent *Candida sake CPA-1* for control of *Botrytis cinerea* on grapes. *Biological Control*, 96, 108-119.
- Marquina, D., Santos, A., Peinado, J. 2002. Biology of killer yeasts. *International Microbiology*, 5(2), 65-71.
- McGuire, R. G., Hagenmaier, R. D. 1996. Shellac coatings for grapefruits that favor biological control of *Penicillium digitatum* by *Candida oleophila*. *Biol. Control* 7, 100–106.
- McGuire, R. G., Dimitroglu, D. A. 1999. Evaluation of shellac and sucrose ester fruit coating formulations that support biological control of post-harvest grapefruit decay. *Biocontrol Sci. Technol.* 9, 53–65.
- McHugh, T. H., Krochta, J. M. 1994. Water vapor permeability properties of edible whey protein-lipid emulsion films. *Journal of the American Oil Chemists's Society*, 71(3), 307-312.
- McHugh T. H., Bustillos R. A., Krochta, J. M. 1993. Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*, Volume 58, Issue 4, 899–903.
- McHugh, T. H., Krochta, J. M. 1994. Sorbitol-versus glycerolplasticized whey proteins edible films: Integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *J. Agric. Food Chem.*, 42(4):841–845.

- Melin P., Sundh I., Hakansson S., Schnürer J. 2007. Biological preservation of plant derived animal feed with antifungal microorganisms: safety and formulation aspects. *Biotechnol Lett*, 29:1147–1154.
- Meng, X. H., Qin, G. Z., Tian, S. P. 2010. Influences of preharvest spraying *Cryptococcus laurentii* combined with postharvest chitosan coating on postharvest diseases and quality of table grapes in storage. *LWT - Food Science and Technology* 43 (2010) 596–601.
- Miller, K. S., Chiang, M. T., Krochta, J. M. 1997. Heat curing of whey protein films. *J. Food Sci* 62:1189- 1193.
- Miller K. S., Upadhyaya S. K., Krochta J. M. 2008. Permeability of d-Limonene in Whey Protein Films, *Journal of Food Science* Volume 63, Issue 2, 244–247.
- Min, S., Krochta, J. M. 2005. Inhibition of *Penicillium commune* by edible whey protein films incorporating lactoferrin, lactoferrin hydrolysate and lactoperoxidase system. *J. Food Sci.* 70:87–94.
- Muccilli, S., Wemhoff, S., Restuccia, C., Meinhardt, F. 2013. Exoglucanase-encoding genes from three *Wickerhamomyces anomalus* killer strains isolated from olive brine. *Yeast* 30, 33–43.
- Nisperos-Carriedo M. O., Shaw P. E., Baldwin E. A. 1990. Changes in volatile flavor components of pineapple orange juice as influenced by the application of lipid and composite films. *J Agric. Food Chem.* 38 : 1382 – 1387.
- Nunes, C., Usall, J., Teixidó, N., Viñas, I. 2001. Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Int. J. Food Microbiol.*, 70, 53–61.
- Oberegger, H., Schoeser, M., Zadra, I., Abt, B., Haas, H. 2001. SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis, utilization and uptake in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 41,1077-1089.
- Ohta, Y., Tsukada, Y., Sugimori, T. 1984. Production, purification and characterization of HYI, an anti-yeast substance, produced by *Hansenula saturnus*. *Agricultural and biological chemistry*, 48(4), 903-908.
- Oliveira T.M., Soares N.F.F., Pereira R.M., Fraga K.F. 2007. Development and evaluation of antimicrobial natamycin-incorporated natamycin-incorporated film in gorgonzola cheese con- servation. *Packag Technol Sci*, 20: 147-153. 35.
- Ortu, G., Demontis, M. A., Budroni, M., Goyard, S., D’Enfert, C., Migheli, Q. 2005. Study of biofilm formation in *Candida albicans* may help understanding the biocontrol capability of a flor strain of *Saccharomyces cerevisiae* against the phytopathogenic fungus *Penicillium expansum*. *J. Plant Pathol.* 87, 300.

- Ouattara, B., Simard R. E., Piette G., Begin A., Holley R. A. 2000. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *Int. J. Food Microbiol.* 62:139–148.140.
- Oussalah M., Caillet S., Salmiéri S., Saucier L., Lacroix M. 2004. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 52 (18), pp. 5598-605.
- Öksüztepe, G., Padır, B., Dikici, A., İlhak, O. İ. 2009. Elazığ’da tüketime sunulan vakum paketli taze Kaşar peynirlerinin mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesi. *F. Ü. Sağ. Bil. Vet. Derg.*, 23 (2): 89 – 94.
- Özaktan, H., Aysan, Y., Yıldız, F., Kınay, P. 2010. Fitopatolojide biyolojik mücadele. *Türk. Biyo. мү. derg.*, 1 (1): 61-78.
- Palou, L., Usall, J., Munoz, J. A., Smilanick, J. L., Vinas, I. 2002. Hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate for the control of postharvest green and blue molds of clementine mandarins. *Postharvest Biology and Technology* 24, 93–96.
- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., Cirvilleri, G. 2016. The effect of locust bean gum (LBG)-based edible coatings carrying biocontrol yeasts against *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* causal agents of postharvest decay of mandarin fruit. *Food microbiology*, 58, 87-94.
- Park H.Y., Byun Y.J., Kim Y.T., Whiteside W.S., Bae H.J. 2014. Processes and Applications for Edible Coating and Film Materials from Agropolymers. In: *Innovations in Food Packaging*, Academic Press., USA, 214-241.
- Park, H.J. 2000. Development of advanced edible coatings for fruits. *Trends Food Sci.Technol.* 10, 254-260.
- Paster, N., Droby, S., Chalutz, E., Menasherov, M., Nitzan, R., Wilson, C. L. 1993. Evaluation of the potential of the yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent against *Aspergillus flavus* and fungi of stored soya beans. *Mycological Research*, 97(10), 1201-1206.
- Pavlath A. E., Orts W. 2009. Edible films and coatings: why, what, and how?. In: *Edible Films and Coatings for Food Applications*, Springer Dordrecht Heidelberg, London, 1-25.
- Pereira, J. O., Soares, J., Sousa, S., Madureira, A. R., Gomes, A., Pintado, M. 2016. Edible films as carrier for lactic acid bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 73, 543-550.
- Pérez - Gago, M. B., Nadaud, P., Krochta, J. M. 1999. Water vapor permeability, solubility, and tensile properties of heat-denatured versus native whey protein films. *Journal of Food Science*, 64(6), 1034-1037.

- Persons K., Raines J. M., Rodriguez J. M. 2013. Antagonistic effects of *Saccharomyces cerevisiae* on the growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* at varying temperatures. *Mycology*, 4: 1, 38–43.
- Pfeiffer, P., Radler, F. 1984. Comparison of the killer toxin of several yeasts and the purification of a toxin of type K2. *Arch. Microbiol.*, 137, 357–361.
- Petersson, S., Schnürer, J. 1995. Biocontrol of mold growth in high-moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3), 1027-1032.
- Potjewijd, R., Nisperos, M. O., Burns, J. K., Parish, M., Baldwin, E. A. 1995. Cellulose-based coatings as carriers for *Candida guilliermondii* and *Debaryomyces sp.* in reducing decay of oranges. *HortScience*, 30(7), 1417-1421.
- Puertas-Mejía, M., Hillebrand, S., Stashenko, E., Winterhalter, P. 2002. In vitro radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. *Flavour Fragr. J.*, 17, 380–384.
- Qin G., Tian S., Xu Y. 2004. Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeasts in different storage conditions. *Postharvest Biology and Technology* 31 (2004) 51–58.
- Quezada-Gallo, J.A. 2009. Delivery of Food Additives and Antimicrobials Using Edible Films and Coatings. In: *Edible Films and Coatings for Food Applications*, London, 347-366.
- Ramos, O. L., Pereira, J. O., Silva, S. I., Fernandes, J. C., Franco, M. I., Lopes-da-Silva, J. A., Intado, M. E., Alcata, F. X. 2012. Evaluation of antimicrobial edible coatings from a whey protein isolate base to improve the shelf life of cheese. *J. Dairy Sci.* 95 : 6282–6292.
- Rangel-Marrón, M., Montalvo-Paquini, C., Palou, E., López-Malo, A. 2013. Optimization of the moisture content, thickness, water solubility and water vapor permeability of sodium alginate edible films.
- Rodgers, S. 2001. Preserving Non-Fermented Refrigerated Foods with Microbial Cultures-a review. *Food Science and Technology*, 12, 276-284.
- Rojas-Graü M.A., Olsen C., Avena-Bustillos R.J., Friedman M., Henika P.R., Martín-Belloso O., Pan Z., McHugh T.H. 2007. Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films. *J Food Eng* 81 : 634 – 641
- Rooney, M. L. 1995. Overview of active food packaging. In *Active Food Packaging*, 1–37. Rooney, M.L. Ed., Blackie Academic, Professional, an imprint of Chapman and Hall, Glasgow, U.K.

- Rosenberger, D. A., Meyer, F. W. 1981. Postharvest fungicides for apples: development of resistance to benomyl vinclozolin, and iprodione. *Plant Disease* 65, 1010-1013.
- Sánchez-González, L., Saavedra, J. I. Q., Chiralt, A. 2013. Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing *Lactobacillus plantarum*. *Food Hydrocolloids*, 33(1), 92-98.
- Sarıkuş, G., 2006, Farklı Antimikrobiyal maddeler içeren yenilebilir film üretimi ve kaşar peynirinin muhafazasında mikrobiyal inaktivasyona etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.
- Schwenninger S. M., Meile L., Lacroix C. 2011. Food biopreservation. Antifungal lactic acid bacteria and propionibacteria for food biopreservation. In: Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation. Wood head publishing, UK.
- Sharma N., Tiwari R. 2014. Biological Controls for Preventing Food Deterioration Strategies for Pre- and Postharvest Management. Woodhead publishing Wiley Blackwell, UK.
- Shellhammer, T. H., Krochta, J. M. 1997. Whey protein emulsion film performance as affected by lipid type and amount. *J. Food Sci.*, 62(2):390–394.
- Skurtys, O., Acevedo, Pedreschi, C., Enronoef, Osorio J., Aguilera J. M. 2010. Properties of hydrocolloid edible films and coatings, In: Food Hydrocolloid Edible Films and Coatings, Nova Science Publishers, New York, 15-34.
- Spotts, R. A., Cervantes, L. A. 1986. Population pathogenicity and benomyl resistance of *Botrytis spp.*, *Penicillium spp.* and *Mucor piriformis* in packinghouse. *Plant Disease* 70, 106–108.
- Spadaro, D., Droby S. 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science - Technology* 47 (2016) 39-49.
- Şahin, M. 1980. Beyaz, Kaşar ve tulum peynirlerinde meydana gelen fire ve nedenleri üzerinde araştırmalar. A. Ü. Zir. Fak. Yayın No: 732, Ankara, 44 .
- Taniwakii M. H., Hocking A. D., Pitt J. I., Fleet G. H. 2001. Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 68-2001.125–133.
- Temiz H., Yeşilsu A. F. 2006. Bitkisel protein kaynaklı yenilebilir film ve kaplamalar, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2, 41-50.
- Tien L., Vachon C., Mateescu C., Lacroix, M. 2001. Milk Protein Coatings Prevent Oxidative Browning of Apples and Potatoes. *Journal of Food Science*; May2001, Vol. 66 Issue 4, p512-516, 5p.

- Tomasula, P. M. 2009. Using dairy ingredients to produce edible films and biodegradable packaging materials. In: Dairy-Derived Ingredients. Food and Nutraceutical Uses, CRC Press: Boca Raton, F.L., USA, 589–624.
- Torres, J. A., J. O. Bouzas, Karel M. 1985. Microbial stabilization of intermediate moisture food surfaces. II. Control of surface pH. J. Food Process. Preserv. 9:93–106.
- Tronsmo, A., Dennis, C. 1977. The use of *Trichoderma* species to control strawberry fruit rots. Neth. J. Plant Pathol. 83, 449–455.
- TÜİK, 2010. Türkiye İstatistik Kurumu. <http://www.tuik.gov.tr>.
- Ture, H., Eroglu, E., Soyer, F., Ozen, B. 2009. Antifungal activity of biopolymers containing natamycin and rosemary extract against *Aspergillus niger* and *Penicillium roquefortii*. Int. J. Food Sci. Technol. 43:2026–2032.
- Ture, H., Eroglu, E., Ozen, B., Soyer, F. 2011. Effect of biopolymers containing natamycin against *Aspergillus niger* and *Penicillium roquefortii* on fresh kashar cheese. International Journal of Food Science & Technology, 46(1), 154-160.
- Üçüncü, M. 2007. Gıda ambalajlama teknolojisi. Ege Üniversitesi.
- Xie, L., Hettiarachchy N. S., Ju Z. Y., Meullenet J., Wang H., Slavik M. F., M. E. Janes 2002. Edible film coating to minimize eggshell breakage post-wash bacterial contamination measured by penetration in eggs. J. Food Sci. 67:280–284.204.
- Valencia-Chamorro, S. A., Palou, L., Del R'io, M. A., P'erez-Gago, M. B. 2008. Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* by hydroxypropyl methylcellulose-lipid edible composite films containing food additives with antifungal properties. J. Agric. Food Chem. 56:11270–11278.
- Valencia-Chamorro, S. A., Silvia A., Palou L., Del Río M. A. Pérez-Gago M. A. 2011. Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 51:9, 872-900.
- Vila, T. V. M., Rozental, S. 2016. Biofilm Formation as a Pathogenicity Factor of Medically Important Fungi. In: Fungal Pathogenicity. Intech Publisher. Edt: Sadia Sultan, 1-13.
- Vinas, I., Usall, J., Teixidó, N., Sanchis, V. 1998. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. Int. J. Food Microbiol. 40, 9–16.
- Vondrejs, V., Palkova, Z., 1997. Chemical warfare among the yeast: the killer phenomenon, genetics and applications. In: Yeasts in Natural and Artificial Habitats, edt: John F. T. Spencer, Dorothy M. Spencer, Springer, Argentina, 153-171.

- Wisniewski, M., Wilson C., Droby S., Chalutz E., Ghaouth A. E., Stevens C. 2007. Postharvest biocontrol: new concepts and applications, In: Biological Control: A Global Perspective : Case Studies from Around the World, editör Charles Vincent, marks. Goattel, George Lazarovits, CABI, UK, 262-273.
- Wong, W. S., Camirand W. M., Pavlath A. E. 1994. Development and edible coatings for minimally processed fruits and vegetables. In: Edible Coatings and films to Improve Food Quatlity, CRC press LLC., Florida, 65-88.
- Wu, L. C., Bates, R. P. 1972. Soy protein-lipid films. Studies on the film formation phenomenon. J. Food. Sci. 37 (1), 36-39.
- Yılmaz F., Dağdemir E. 2012. The effects of beeswax coating on quality of Kashar cheese during ripening. International Journal of Food Science and Technology 2012, 47, 2582–2589.
- Yıldırım, S. 2011. Active packaging for food biopreservation. In: Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation. Wood head publishing, UK.
- Zhang, D., Spadaro, D., Garibaldi A., Gullino M. L. 2011. Potential biocontrol activity of a strain of *Pichia guilliermondii* against grey mold of apples and its possible modes of action. Biological Control 57, 193–201.
- Zhang, H. Y., Zheng, X. D., Fu, C. X., Xi, Y. F. 2003. Biocontrol of postharvest blue mould rot of pear by *Cryptococcus laurentii*. J. Hortic. Sci. Biotechnol. 78, 888–893.
- Zhang, H., Zheng, X., Yu, T. 2007. Biological control of postharvest diseases of peach with *Cryptococcus laurentii*. Food Control, 18(4), 287-291.
- Zhang, H., Ma, L., Wang, L., Jiang, S., Dong, Y., Zheng, X. 2008. Biocontrol of gray mold decay in peach fruit by integration of antagonistic yeast with salicylic acid and their effects on postharvest quality parameters. Biological Control 47, 60–65.
- Zhang, H., Ma, L., Jiang, S., Lin, H., Zhang, X., Ge, L., Xu, Z. 2010. Enhancement of biocontrol efficacy of *Rhodotorula glutinis* by salicyclic acid against gray mold spoilage of strawberries. International Journal of Food Microbiology, 141, 122–125.
- Zivanovic Z., Chi, S., Draughon A.F. 2005. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. J. Food Sci, 70 (1): 45-51.



## ÖZGEÇMİŞ

Gülşah KARABULUT, 02.06.1988 tarihinde Ankara’da doğdu. İlköğretim ve lise eğitimini Ankara’da tamamladı. 2006 yılında Ankara Süleyman Demirel Anadolu Lisesi’nden mezun oldu. Aynı yıl Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nü kazandı ve 2011 yılında lisans eğitimini tamamladı. Erasmus Staj Hareketliliği programı dahilinde 2010 yılında IRTA/İSPANYA’da (3 ay) staj yaptı. 2014 yılında Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünde yüksek lisans eğitime başladı ve aynı yıl araştırma görevlisi olarak Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünde çalışmaya başladı. Halen Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünde araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır.