

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞAL ANTİMİKROBİYAL MADDELER İLE HAZIRLANAN
YENİLEBİLİR VE KAPLANMIŞ PLASTİK FİLMLERİN
GIDA KAYNAKLI BAZI PATOJENLERE ETKİLERİ**

Emrah TORLAK

DOKTORA TEZİ

BESİN HİJYENİ ve TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Mustafa NİZAMLIOĞLU

KONYA-2009

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞAL ANTİMİKROBİYAL MADDELER İLE HAZIRLANAN
YENİLEBİLİR VE KAPLANMIŞ PLASTİK FİMLERİN
GIDA KAYNAKLI BAZI PATOJENLERE ETKİLERİ**

Emrah TORLAK

DOKTORA TEZİ

BESİN HİJYENİ ve TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Mustafa NİZAMLIOĞLU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 09202011 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2009

ÖNSÖZ

Son yıllarda tüketiciler arasında hızla artan gıda güvenliği bilinci ve mikroorganizmaların neden olduğu ekonomik kayıplar gıda endüstrisinde doğrudan gıdalara yönelik uygulamalar yanında antimikrobiyal ambalaj ürünlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmaların artmasına neden olmuştur. Bununla beraber tüketici taleplerinin gıdalarda koruyucu olarak sentetik ürünler yerine doğal kaynaklı ürünlerin kullanımından yana olması, antimikrobiyal gıda ambalajlarına yönelik çalışmalarda doğal kaynaklı antimikrobiyal maddelere olan ilgiyi arttırmıştır.

Bu çalışmada antimikrobiyal özellikte bir biyopolimer olan kitosan ve uçucu yağlar kullanılarak hazırlanan yenilebilir ve kaplanmış plastik filmlerin antimikrobiyal etkisi gerçek gıda matriksi üzerinde önemli gıda patojenlerine karşı değerlendirilmiştir.

Antimikrobiyal özellikte yenilebilir filmler, plastik filmlerin biyopolimerler ile kaplanması ve gıda ambalaj ürünlerinde uçucu yağların kullanılması gıda endüstrisinin yeni çalışma alanları arasındadır. Bu nedenle bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ileride yapılacak çalışmalar için veri teşkil edecektir.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde öncelikle doktora eğitimim boyunca bilgi ve desteklerini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Mustafa NİZAMLIOĞLU' na ve Selçuk Üniversitesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı' nın tüm öğretim üyelerine teşekkürü bir borç bilirim. Doktora eğitimime başladığım günden bu yana desteğini esirgemeyen Konya İl Kontrol Laboratuvarı Müdürü Dr. M. Kürşat IŞIK' a ve tez çalışmalarına katkılarından dolayı mesai arkadaşlarıma, destek talebimi geri çevirmeyen Aspak Ambalaj A.Ş.' ye, Uzmanlar Kalibrasyon Merkezi' ne, Şekersüt A.Ş.' ye, İnan Tarım' a ve Büyük Aygın Süt A.Ş.' ye teşekkür ederim.

Doktora eğitimime yurtiçi doktora burs programı kapsamında sağladığı maddi destekten dolayı TÜBİTAK' a ve bu çalışmanın yapılabilmesi için vermiş olduğu maddi destekten dolayı Selçuk Üniversitesi' ne teşekkür ederim.

Son olarak gösterdikleri anlayış ve manevi destekten dolayı eşim Asuman ve kızım Melissa' ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER ve KISALTMALAR.....	v
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Antimikrobiyal Ambalaj Sistemleri	3
1.2. Sentetik Polimerler	6
1.3. Ambalaj Materyali Olarak Biyopolimerler	7
1.4. Yenilebilir Filmler	10
1.5. Sentetik Filmlerin Biyopolimerler ile Kaplanması	12
1.6. Kitosan.....	13
1.6.1. Kitosanın Antimikrobiyal Etkisi	17
1.6.2. Kitosanın Gıdalar ile Birlikte Kullanım Olanakları	18
1.6.3. Kitosan Filmleri ve Mekanik Özellikleri.....	20
1.6.4. Kitosan Filmlerinin Antimikrobiyal Etkisi.....	22
1.7. Gıda Ambalajlarında Kullanılan Antimikrobiyal Maddeler.....	24
1.8. Uçucu Yağlar.....	26
1.8.1. Uçucu Yağların Antimikrobiyal Etkisi.....	27
1.8.2. Uçucu Yağların Gıdalar ile Kullanım Olanakları.....	28
1.8.3. Uçucu Yağların Ambalaj Materyalleri ile Kullanım Olanakları	29
1.8.4. Kekik (<i>Origanum onites</i>) Uçucu Yağı	30
1.8.5. Karanfil (<i>Syzygium aromaticum</i>) Uçucu Yağı	31
1.9. Gıda Kaynaklı Patojenler	32
1.9.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	33
1.9.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	34
1.9.3. <i>Escherichia coli</i> O157:H7	35
2. GEREÇ ve YÖNTEM	36
2.1. Gereç	36
2.1.1. Filmlerin Hazırlanmasında Kullanılan Gereçler	36
2.1.2. Mikrobiyolojik Analizlerde Kullanılan Gereçler	36
2.1.3. Mikroorganizmalar	37
2.1.4. Kaşar Peyniri Örnekleri	37
2.2. Yöntem	38
2.2.1. Film Solüsyonlarının Hazırlanması	38

2.2.2. Yenilebilir Filmlerin Hazırlanması	38
2.2.3. PP Filmlerin Kaplanması.....	39
2.2.4. Film Kalınlıklarının Ölçülmesi	39
2.2.5. Örneklerin Hazırlanması ve Muhafazası	39
<i>L. monocytogenes</i> aranması.....	40
<i>S. aureus</i> aranması.....	40
<i>E. coli</i> O157:H7 aranması	40
Yapay kontaminasyon	41
Örneklerin ambalajlanması.....	41
Örneklerin muhafazası	42
2.2.6. Mikroorganizma Sayımları.....	42
<i>L. monocytogenes</i> sayımı	42
<i>S. aureus</i> sayımı	42
<i>E. coli</i> O157:H7 sayımı	43
2.2.7. İstatistiksel Değerlendirme.....	43
3. BULGULAR	45
3.1. Kaşar Peyniri Örnekleri.....	45
3.2. Film Kalınlıkları	45
3.3. Yenilebilir Filmlerin Antimikrobiyal Etkileri	46
3.3.1. <i>L. monocytoneges</i>	47
3.3.2. <i>S. aureus</i>	48
3.3.3. <i>E. coli</i> O157:H7.....	49
3.4. Kaplanmış PP Filmlerin Antimikrobiyal Etkileri.....	50
3.4.1. <i>L. monocytoneges</i>	50
3.4.2. <i>S. aureus</i>	51
3.4.3. <i>E. coli</i> O157:H7.....	52
4. TARTIŞMA.....	54
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	65
6. ÖZET	67
7. SUMMARY	68
8. KAYNAKLAR.....	69
9. ÖZGEÇMİŞ.....	79

SİMGELER ve KISALTMALAR

AB: Avrupa Birliđi

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

ATCC: American Type Culture Collection

BOPP: Biaxially oriented polypropylene

CAS: Chemical abstract service

EC: European Commission

EFSA: European Food Safety Authority

EHEC: Enterohaemorrhagic *Esherichia coli*

ELFA: Enzyme linked fluorescence assay

FDA: Food and Drug Administration

GRAS: Generally recognized as safe

HDPE: High density polyethylene

ISO: International Organization for Standardization

LDPE: Low density polyethylene

MIC: Minimum inhibitory concentration

NZFSA: New Zealand Food Safety Authority

OPC: Oxygen permeability coefficient

OPP: Oriented polypropylene

PE: Polyethylene

PP: Polypropylene

RFV: Relative fluorescence value

TGK: Türk Gıda Kodeksi

TSE: Türk Standartları Enstitüsü

USDA: United States Department of Agriculture

WVPC: Water vapour permeability coefficient

a/h: ağırlık/hacim

h/h: hacim/hacim

kob: Koloni oluşturan birim

ppm: Parts per million

rpm: Rotations per minute

Ki: Saf kitosan solüsyonu ile hazırlanmış yenilebilir filmler

KiKe (%0,5): %0,5 oranında kekik uçucu yağı ilave edilmiş kompozit kitosan solüsyonu ile hazırlanmış yenilebilir filmler

KiKe (%1): %1 oranında kekik uçucu yağı ilave edilmiş kompozit kitosan solüsyonu ile hazırlanmış yenilebilir filmler

KiKa (%0,5): %0,5 oranında karanfil uçucu yağı ilave edilmiş kompozit kitosan solüsyonu ile hazırlanmış yenilebilir filmler

KiKa (%1): %1 oranında karanfil uçucu yağı ilave edilmiş kompozit kitosan solüsyonu ile hazırlanmış yenilebilir filmler

PPKi: Tween 20 ilave edilmiş kompozit kitosan solüsyonu ile kaplanmış plastik filmler

PPKe: %1 oranında kekik uçucu yağı ilave edilmiş kompozit kitosan solüsyonu ile kaplanmış plastik filmler

PPKa: %1 oranında karanfil uçucu yağı ilave edilmiş kompozit kitosan solüsyonu ile kaplanmış plastik filmler

1. GİRİŞ

Günümüzde birçok gıda ürününün tüketiciye ambalaj içerisinde sunulmasından dolayı ambalaj materyalleri modern toplumlarda günlük hayatın vazgeçilmez bir parçası haline gelmiştir. Gıda endüstrisinde ambalaj materyalleri gıdalarda bozulmayı önlemek, raf ömrünü uzatmak, kalite ve güvenliği arttırmak amacıyla kullanılmaktadır. Bu nedenle, ambalajlamadaki temel amaç gıdayı mikrobiyal ve kimyasal kontaminasyondan korumak, oksijen, nem ve ışık bariyeri oluşturmaktır (Cha ve Chinnan 2004).

Son yıllarda gıda ambalaj endüstrisinde araştırmalar geleneksel ambalaj materyallerinden farklı olarak gıda maddeleri ve dış ortam ile etkileşim içinde olan ve ürünü korumada aktif olarak görev alan ambalaj materyallerinin geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Bu araştırmaların sonucu olarak başta ABD ve Japonya olmak üzere birçok gelişmiş ülkede gıda endüstrisinde özellikle oksijen ve nem tutucu, karbondioksit ve etanol salıcı ve antimikrobiyal özellikte aktif ambalaj materyallerinin kullanımı yaygınlaşmaktadır (Quintavalla ve Vicini 2002, Coma 2008).

Gıda maddelerinin patojen mikroorganizmalar ile kontaminasyonun halk sağlığı açısından oluşturduğu riskler ve artan tüketici bilinci antimikrobiyal özellikte aktif ambalaj materyallerine olan ilgiyi arttırmıştır. Gıdalarda arzu edilmeyen mikrobiyal gelişme genellikle gıdanın yüzeyinde meydana gelmektedir. Yüzeydeki mikrobiyal gelişmeyi engellemek için antimikrobiyal maddeler püskürtme gibi teknikler ile doğrudan gıda yüzeyine uygulanabilmektedir. Ancak doğrudan yüzey uygulamalarının antimikrobiyal maddenin hızlı bir şekilde difüze olması ve yüksek miktarda antimikrobiyal madde kullanımı gibi dezavantajları mevcuttur. Alternatif olarak antimikrobiyal maddelerin ambalaj materyalleri ile kullanılması ile etken maddenin gıda yüzeyine difüzyonu yavaş bir şekilde gerçekleşmekte ve muhafaza süresi boyunca arzu edilen konsantrasyonda kalması sağlanmaktadır (Min ve Krochta 2005, Kristo ve ark 2008).

Gıda endüstrisinde sentetik polimerlere alternatif olarak biyobozunur özelliklerinden dolayı film oluşturma yeteneğine sahip doğal kaynaklı polimerlerin kullanılması çevrenin korunması açısından büyük avantajlar sağlamaktadır. Ayrıca

tüketici taleplerinin doğal ürünler yönünde artması nedeniyle biyopolimerlerin ambalaj endüstrisinde kullanım olanaklarının araştırılmasına yönelik bilimsel çalışmalar ivme kazanmıştır. Ambalaj materyali olarak biyopolimerler doğrudan oluşturdukları yenilebilir filmler veya plastik filmleri kaplayarak biyoaktif hale getirmek amacıyla kullanım olanaklarına sahiptir. Biyopolimerler ile hazırlanan yenilebilir filmler nem ve oksijen bariyeri oluşturarak ve uçucu aroma bileşiklerinin kaybına engel olarak gıdanın raf ömrünü uzatmaları ve kalitesini korumalarının yanında antimikrobiyal maddeler için bir taşıyıcı olarak kullanılabilirler (Hong ve ark 2005, Rojas-Graü ve ark 2007).

Kitinin deasetilasyonu ile elde edilen doğal kaynaklı bir polimer olan kitosan gıda kaynaklı bakteri, küf ve mantarlara karşı antimikrobiyal aktivitesi ile gıdalar için potansiyel bir koruyucu katkı maddesidir. Bu özelliğinin yanı sıra film oluşturabilme ve bariyer özellikleri kitosanı antimikrobiyal özellikte yenilebilir film ve kaplamalar için ideal bir materyal haline getirmektedir. Yapılan birçok çalışma kitosanın koruyucu ve kaplama materyali olarak kullanımının gıdaların kalite ve raf ömrünü arttırdığını ortaya koymuştur. Kitosanın Kore ve Japonya’ da uzun yıllardır gıda katkı maddesi olarak kullanımı yasaldır. ABD’ de ise GRAS olarak onaylanmıştır (No ve ark 2007).

Son yıllarda yapılan çalışmalar özellikle bileşimlerindeki fenolik maddeler nedeniyle güçlü antimikrobiyal etkiye sahip olan uçucu yağların antimikrobiyal ambalaj sistemlerinde kullanım olanaklarını ortaya koymuştur (Burt 2004, Joerger 2007). Karvakrol, cinnamaldehyd, eugenol, *p*-simen, timol ve mentol gibi birçok uçucu yağ bileşeni tüketici sağlığına yönelik bir risk oluşturmadığından dolayı AB tarafından gıdalarda kullanımı yasal olan aroma maddeleri kapsamında değerlendirilmektedir (EC 2002). AB’ de olduğu gibi ABD’ de birçok uçucu yağ bileşeninin gıda katkı maddesi veya GRAS olarak kullanımı yasaldır (Nedorostova ve ark 2009).

Antimikrobiyal gıda ambalajlarının etkilerinin değerlendirilmesine yönelik farklı in vitro test metotları kullanılmaktadır. Bununla birlikte in vitro test metotlarından elde edilen veriler antimikrobiyal etkinin değerlendirilmesinde yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle gıda örnekleri kullanılarak gerçek şartları yansıtan

denemelerin yapılması antimikrobiyal etkinin değerlendirilmesinde önemlidir (Ha ve ark 2001).

Bu çalışmada, kekik ve karanfil uçucu yağları ve kitosan ile hazırlanan yenilebilir ve kaplanmış polipropilen filmlerin önemli gıda patojenlerinden olan *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* O157:H7' ye karşı etkileri doğrudan yapay kontamine gıda örnekleri ile buzdolabı sıcaklığında muhafaza şartları altında değerlendirilmiştir. Yapay kontaminasyon için yarı sert geleneksel Türk peynirlerinden kaşar peynirinin olgunlaşma uygulanmamış çeşidi olan taze kaşar peyniri örnekleri kullanılmıştır (Koca ve Metin 2004, TSE 2006).

1.1. Antimikrobiyal Ambalaj Sistemleri

Antimikrobiyal ambalaj sistemleri mikroorganizmaların lag fazını uzatarak ve gelişme hızlarını düşürerek gıdaların raf ömrünü uzatmak ve gıda güvenliğini sağlamak için tasarlanmaktadır. Bu amaçla antimikrobiyal maddeler başlıca; doğrudan ambalaj materyalinin üretimi esnasında polimerlere ilave edilerek, taşıyıcı bir matris içinde ambalaj materyallerinin üzerine kaplanarak ve iyonik veya kovalent bağlar ile polimer yüzeylere bağlanarak kullanılmaktadır (Han 2000, López-Rubio ve ark 2004, Coma 2008).

Antimikrobiyal maddeler gibi biyoaktif maddelerin doğrudan polimerlere ilave edilmesi ticari olarak ilaç ve pestisit endüstrisinde, tekstil materyallerinde, cerrahi implantlarda ve bazı biyomedikal cihazlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda ambalaj endüstrisinde ise özellikle 2000 yılından sonra antimikrobiyal maddelerin ambalaj materyallerinin üretimi esnasında doğrudan polimerlere ilave edilmesine yönelik çalışma ve patent sayısı oldukça artmıştır. Yapılan birçok çalışma ile doğal kaynaklı veya sentetik birçok antimikrobiyal özellikteki maddenin kağıt ve plastik polimerlerine ilave edilmesi ile hazırlanan ambalaj materyallerinin *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 serotipi gibi patojenik ve bozulmaya neden olan mikroorganizmalara karşı etkileri değerlendirilmiştir (Appendini ve Hotchkiss 2002).

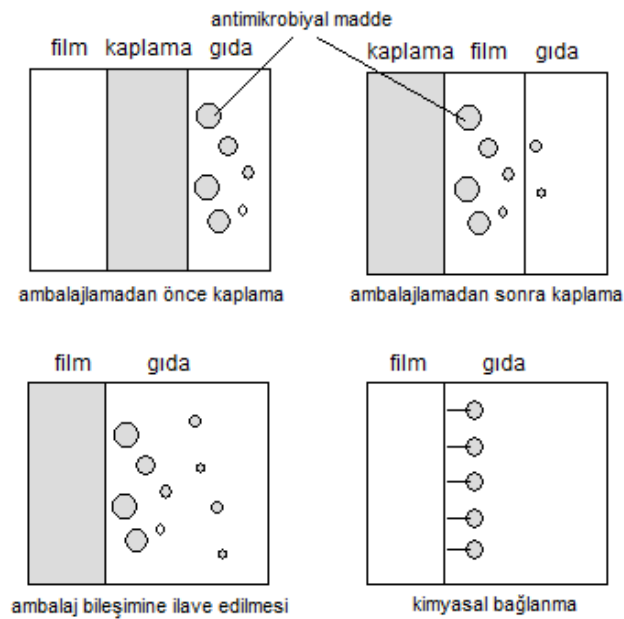
Mikroorganizmaların enzim faaliyetlerine engel olan gümüş zeolitleri polimer katkısı olarak en yaygın kullanılan bileşiklerdir. Gümüş zeolitleri yüksek ısı

işlemlere dayanıklı olmaları nedeniyle özellikle sentetik polimerler ile birlikte rahatlıkla kullanılabilirlerdir. Isıl işlem içeren üretim prosesleri için enzimler ve uçucu bileşikler gibi ısıya duyarlı antimikrobiyal maddeler uygun değildir. Isıya duyarlı maddelerin aynı çözücü içerisinde çözünebildikleri polimerler ile hazırlanan çözeltilerinin solvent evaporasyon yöntemiyle kullanılmaları daha uygundur. Isıya nispeten daha dirençli olan bakteriyosinler ve peptidlerin antimikrobiyal aktiviteleri ısıl işlem içeren üretim prosesleri sonucu azalmaktadır. Örneğin nisin enziminin antimikrobiyal aktivitesi solvent evaporasyon yöntemi ile hazırlanmış filmlerde, ısıl presleme işlemi görmüş filmlere nazaran üç kat yüksektir. Su, etanol ve farklı çözücülerde çözünebilme özelliklerine sahip doğal kaynaklı birçok polimer ısıl işleme ihtiyaç duymaksızın çözeltilerinin solvent evaporasyon yöntemi ile film oluşturabilmelerinden dolayı ısıya duyarlı antimikrobiyal maddelerin ilave edilmesi için ideal polimerlerdir (Appendini ve Hotchkiss 2002).

Antimikrobiyal maddelerin doğrudan polimerlere ilavesi polimerlerin mekanik, bariyer ve optik özelliklerinde değişimlere ve genellikle bariyer özelliklerinin azalmasına neden olmaktadır. Bitkisel ekstraktlar genellikle renk ve opaklık üzerine etki etmektedir (Hong ve ark 2000). Sorbatlar LDPE filmlerin şeffaflığını azaltmaktadır (Han ve Floros 1997). LDPE filmlerde oksijen ve su buharı geçirgenliği kitosan ilavesi ile artarken, benzoik asit ilavesi ile azalmaktadır (Appendini ve Hotchkiss 2002).

Antimikrobiyal ambalajlarda uçucu olmayan antimikrobiyal maddelerin kullanılması durumunda antimikrobiyal maddenin gıda yüzeyine difüze olabilmesi için ambalaj ile gıdanın temas etmesi zorunludur. Uçucu antimikrobiyal maddelerin kullanıldığı ambalajlarda ise gıda ile ambalajın teması zorunlu değildir (Appendini ve Hotchkiss 2002). Antimikrobiyal maddenin ambalaj materyalinden salınımının kontrolü ve migrasyon miktarı antimikrobiyal etkinliğin sağlanmasında önemli bir faktördür. Bu amaçla bazı araştırmacılar çok tabakalı antimikrobiyal ambalaj sistemini önermişlerdir. Üç tabakadan oluşan bu sistemde antimikrobiyal madde orta tabakada bulunmaktadır. Dış tabaka antimikrobiyal maddenin çevreye salınımına engel olmak için bariyer görevi yaparken, iç tabaka kontrollü salınımı sağlamaktadır (Han 2000).

Antimikrobiyal maddeler taşıyıcı bir matriks içinde genellikle LDPE ve PP gibi sentetik polimer yüzeylere kaplanabilirler. Böylece ısıya duyarlı antimikrobiyal maddeler ısı işlem içeren prosesler ile üretilen sentetik polimer filmler ile birlikte kullanılabilirler. Antimikrobiyal kaplamalar sentetik filmlere antimikrobiyal aktivite kazandırmalarının yanı sıra kullanılan taşıyıcı matrikse bağlı olarak mekanik ve bariyer özelliklerini de iyileştirebilmektedir (Hong ve ark 2005). Yapılan çalışmalar LDPE ve PP filmlerde protein kaplamaların oksijen bariyer özelliğini önemli ölçüde arttırdığını ortaya koymuştur (Hong ve Krochta 2003, Hong ve Krochta 2004, Hong ve Krochta 2006).



Şekil 1.1. Antimikrobiyal maddelerin farklı ambalaj sistemlerinden difüzyonu
(Han 2000).

Antimikrobiyal maddelerin ambalaj materyallerine uygulanmasının diğer bir yolu ise kovalent veya iyonik bağlar kullanılarak polimer yüzeylere bağlanmalarıdır. Bu bağlanma için hem antimikrobiyal maddenin hem de polimerin peptidler, enzimler, poliaminler ve organik asitler gibi fonksiyonel gruplara sahip olması gerekmektedir. Bununla birlikte bazı durumlarda “spacer” adı verilen bağlantı moleküllerine ihtiyaç duyulabilir. Örneğin nisin ve laktisin, LDPE film yüzeyine polyamid kullanılarak başarılı bir şekilde bağlanabilmektedir. Antimikrobiyal gıda ambalajlarında düşük toksik özelliklerinden dolayı dekstranlar, polietilen glikol,

etilendiamin ve polietilenim spacer olarak kullanılabilirler (López-Rubio ve ark 2004).

Gram pozitif bakterilere karşı etkin olan lizozim ve kitinaz, glukoz ve oksijenden hidrojen peroksit oluşumunu katalize eden glukoz oksidaz, beta galaktosidaz, laktoferrin ve sülfidril oksidaz gibi enzimler polimer yüzeylere kovalent bağlar ile bağlanabilmektedir. Enzimlerin kullanılmasındaki en önemli problemler ise substratların bulunma zorunluluğu ve reaksiyonlar sonucu arzu edilmeyen ürünlerin oluşmasıdır. Örneğin glukoz oksidaz enzimi için glukoz gereklidir. Ayrıca enzim faaliyetleri sonucu gıdadaki hidrojen peroksit düzeyi limit değerlerin üzerine çıkabilmektedir (Appendini ve Hotchkiss 2002).

1.2. Sentetik Polimerler

Ambalaj endüstrisinde kullanılan sentetik polimerler diğer bir ifadeyle plastikler genel olarak termosetler ve termoplastikler olmak üzere iki kategoriye ayrılmaktadırlar. Termoset polimerler otomobil endüstrisi gibi alanlarda yaygın olarak kullanılan, ısıya maruz kaldıktan sonra eski formunu alamayan, sert ve dayanıklı polimerlerdir. Termoplastikler ise ısıya maruz kaldıktan sonra oda sıcaklığında eski formlarını kazanabilen ve kolay biçimlendirilebilen polimerlerdir. Bu özellikleri nedeniyle gıda ambalaj endüstrisi için ideal polimerlerdir. Termoplastik polimerler eritilerek yeni ürünlerin üretilmesi için hammadde olarak kullanılabilirler (Marsh ve Bugusu 2007).

Plastik filmler tek bir polimerden veya birden çok plastik materyalinin kombinasyonu ile elde edilebilirler. Birden çok materyalin kombinasyonu iki farklı yöntemle sağlanmaktadır; laminasyon ve koekstrüzyon. Laminasyon solvent veya katı bazlı yapışkan uygulaması yapılmış bir film ile ikinci bir filmin basınç altında makara sisteminde sarılarak birleştirilmesi ile gerçekleştirilmektedir. Koekstrüzyon ise iki veya daha fazla erimiş plastik tabakasının film üretimi esnasında birleştirilmesi esasına dayanmaktadır. Koekstrüzyon, laminasyon işlemine göre daha hızlı bir işlemdir. Bununla birlikte kullanılacak materyallerin ısıl özelliklerinin koekstrüzyon işlemine uygun olması gerekmektedir. Laminasyon ve koekstrüzyon işlemleri kullanılan farklı materyallerin avantajlarını birleştirmelerinin yanında

genellikle gerekli olan ambalaj materyali miktarını azaltmaktadır (Marsh ve Bugusu 2007).

İçerdikleri stabilizer, plastikleştirici ve bisfenol A gibi kondenzasyon komponentlerinin kalıntıları tüketici sağlığı açısından kaygı oluşturmalarına rağmen fonksiyonel avantajları ve maliyetlerinin düşük olmasından dolayı sentetik polimerlerin kullanımları hızla artmaktadır. Günümüzde polyolefin, polyester, polivinil klorid, polisitren, polyamid ve etilen vinil alkol gibi çok çeşitli sentetik polimerler gıda ambalaj materyali olarak kullanılmaktadırlar. Gıda ambalaj materyali olarak otuzun üzerindeki sentetik polimer arasında en çok kullanılanlar polyolefin ve polyesterdir (López-Rubio ve ark 2004, Marsh ve Bugusu 2007)

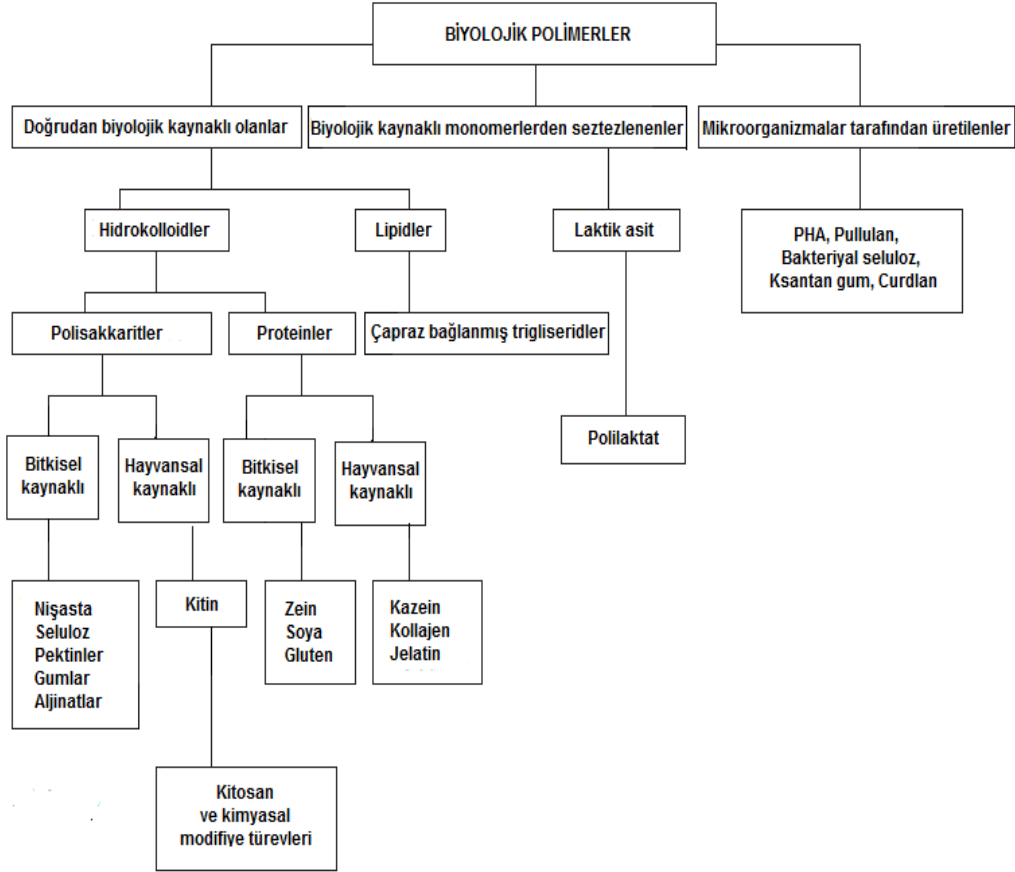
Esneklik, dayanıklılık, şeffaflık, yüksek nem ve kimyasal dayanımı gibi özellikleri ve geri dönüştürülebilir olmaları nedeniyle gıda endüstrisinde en fazla kullanılan ambalaj materyali olan polipropilenler (PP) ve polietilenler (PE) genel olarak polyolefinler olarak isimlendirilmektedir. Etilenin polimerizasyonu ile üretilen polietilen en ucuz sentetik polimerdir. Polietilen yüksek ve düşük yoğunlukta olmak üzere iki temel kategoriye ayrılmaktadır. Düşük yoğunlukta polietilen (LDPE), yüksek yoğunlukta polietilene (HDPE) nazaran daha esnektir ve ısıl kapatma işlemine uygundur. Polietilene nazaran sert, yoğun, kimyasal dayanımı ve su buharı geçirgenliği düşük olan polipropilen yüksek erime sıcaklığı nedeniyle sıcak dolum, mikrodalga uygulamasına uygun paketlenme işlemleri gibi ısı dayanımı gerektiren gıda ambalaj uygulamaları için uygundur (Marsh ve Bugusu 2007).

1.3. Ambalaj Materyali Olarak Biyopolimerler

Tarım, hayvancılık, su ürünleri gibi yenilenebilir kaynaklardan elde edilen biyopolimerlerin ambalaj endüstrisinde kullanımı çevresel kaygılardan ve gelecekte petrokimyasal hammaddelerin maliyetlerindeki artış beklentilerinden dolayı önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir.

Biyopolimerler yenilenebilir kaynaklardan elde edilme metotlarına göre doğrudan biyolojik kaynaklardan elde edilenler, biyolojik kaynaklı monomerlerden sentezlenenler ve mikroorganizmalar tarafından üretilenler olmak üzere üç başlık altında sınıflandırılabilir (Şekil 1.2). Günümüzde her üç kaynaktan elde edilen

biyopolimerler ambalaj materyali olarak kullanılmakta veya kullanım potansiyeli taşımaktadır. Biyolojik kaynaklı monomerlerden sentezlenen ve mikroorganizmalar tarafından üretilen biyopolimerler sentetik filmlere yönelik standart üretim teknikleri ile kolaylıkla film formu alabilir. Ancak maliyetleri sentetik filmlere nazaran yüksektir. Doğrudan biyolojik kaynaklı biyopolimerlerden film üretiminde ise üretim ve performans problemleri ön plana çıkmaktadır (Quintavalla ve Vicini 2002).



Şekil 1.2. Biyopolimerlerin sınıflandırılması (Srinivasa ve Tharanathan 2007).

Doğrudan biyolojik kaynaklı polimerlerden kitosan, aljinat, selüloz, karragenan ve nişasta gibi karbonhidratlar, sodyum kazeinat, peynir altı suyu proteini ve jelatin gibi proteinler, mumlar ve gliseridler gibi lipidler tek başlarına veya kompozit halde kaplama veya film formunda gıda ambalaj materyali olarak kullanılabilir (Cha ve Chinnan 2004, Wang ve ark 2007). Hidrokoloidler ve lipidlerden hazırlanan filmler biyobozunur olmalarının yanı sıra yenilebilir olma, düşük oksijen geçirgenliği ve estetik görünüm gibi avantajlara sahiptirler (Durango ve ark 2006).

Biyopolimerler oksijen bariyer performansı gibi mekanik özelliklerin iyileştirilmesi ve biyoaktif özellik kazandırmak amacıyla sentetik filmlerin üzerine kaplanabilmektedir (Hong ve Krochta 2003, Hong ve Krochta 2004, Hong ve ark 2005, Hong ve Krochta 2006, Duan ve ark 2007, Lee ve ark 2008, Ye ve ark 2008a).

Sentetik polimerler biyopolimerler ile karıştırılarak kısmi biyobozunur hale getirilebilirler (Tharanathan 2003, Briassoulis 2004, Marsh ve Bugusu 2007). Nişasta bu amaçla en fazla çalışılan biyomoleküldür. Yapılan birçok çalışmada nişastanın polivinil asetat, etilen akrilik asit ve LDPE gibi sentetik polimerlere ilavesi ile hazırlanan kısmi biyobozunur filmlerin mekanik özellikleri araştırılmıştır (Briassoulis 2004).

Biyolojik kaynaklı monomerlerden sentezlenen ve ambalaj materyali olarak kullanım olanağına sahip en önemli biyopolimer karbonhidrat fermentasyonu ile oluşan laktik asitten üretilen polilaktidlerdir. Polilaktidler, laktik asit monomerlerinin katalitik polimerizasyonu ile düşük maliyet ve yüksek verimle elde edilebilmektedir. Günümüzde bazı büyük gıda ambalaj üreticileri büyük ölçekte polilaktid üretimi yapmaktadır. Polilaktidlerden üretilen biyobozunur plastikler gıda ambalaj endüstrisi dışında ortopedik uygulamalar, prostetik cihazlar gibi biyomedikal sahada birçok uygulama alanına sahiptirler (Quintavalla ve Vicini 2002, Briassoulis 2004, Marsh ve Bugusu 2007, Srinivasa ve Tharanathan 2007).

Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve ambalaj materyali olarak kullanılabilen biyopolimerlerin başında polihidroksialkanoatlar gelmektedir. Basit yapıda makromoleküller olan polihidroksialkanoatlar birçok mikroorganizma tarafından sentezlenebilir ve yıkımlanabilirler. Doğal termoplastik polyesterler olarak polihidroksialkanoatlar tek olarak veya sentetik ve doğal polimerler ile birlikte iplik ve kozmetik ambalajları gibi tüketici ambalajlarının üretiminde kullanılabilir. Polihidroksialkanoatların geri dönüşümünün petrokimyasal polimerlere nazaran oldukça kolay olması büyük avantaj sağlamaktadır (Srinivasa ve Tharanathan 2007).

Xanthomonas campestris tarafından kontrollü fermentasyon ile üretilen ksantan gum ve siyah mayalar olarak bilinen *Pullularia pullulans* ve *Aureobasidium pullulans* tarafından üretilen pullulan ambalaj materyali olarak kullanılabilen polisakkarit yapıdaki biyomoleküllerdir (Yuen 1974). Ekstrüzyon işlemi ile

pullulandan biyobozunur, toksik olmayan, yağ dayanımı olan ve mükemmel oksijen geçirgenliğine sahip filmler üretilebilmektedir (Tharanathan 2003).

1.4. Yenilebilir Filmler

Yenilebilir filmler, gıda için gaz ve nem bariyeri sağlayan ve gıda ile birlikte tüketilebilir ince bir polimer tabakası olarak tanımlanabilir. Yenilebilir filmler bariyer özelliklerinin yanı sıra antimikrobiyal ve antioksidan maddeler için taşıyıcı bir matriks olarak kullanılabilirler (Bourtoom 2008).

Pullulan gibi bazı istisnalar dışında biyopolimerler sentetik filmlerde olduğu gibi ekstrüzyon işlemine uygun değildir. Bunun nedeni belirli erime sıcaklıklarının olmaması ve ısı ile dekompoze olmalarıdır. Genel olarak yenilebilir filmler biyopolimerlerin sulu çözeltilerinin uygun kalıplara dökülmesi ve kurutulması ile hazırlanmaktadır. Hazırlanan filmlerin kalıptan kolaylıkla ve yırtılmadan çıkartılabilmesi için kalıp materyalinin seçimi önemlidir. Bu amaçla en çok tercih edilen kalıp materyalleri teflon ve polisitrendir. Filmlerin kalıplardan kolaylıkla çıkartılabilmesi için %5 ile %8 arasında nem oranı idealdir (Tharanathan 2003).

Film formasyonu genel olarak molekül içi ve moleküller arası bağlanmalar veya polimer zincirlerinin çapraz bağlanması ile oluşan ve çözücüyü hapseden yarı katı üç boyutlu yapı ile oluşmaktadır. Oluşan bu formasyonun yapısı kullanılan polimerin yapısına, kullanılan çözücüyü, sıcaklığa ve plastikleştiriciler gibi diğer moleküllerin varlığına bağlıdır. Lipidlerin kullanıldığı kompozit solüsyonlardan estetik görümlü camsı filmler elde edilebilmektedir (Tharanathan 2003).

Yalnızca biyopolimerlerden elde edilen yenilebilir filmler zayıf mekanik özelliklere sahiptir, kırılabilir yapıdadır ve kurutma aşamasında çatlama yapabilirler (McHugh ve Krochta 1994, Hong ve ark 2005). Bu problemler gliserol, propilen glikol, sorbitol veya polietilen glikol gibi plastikleştiricilerin film bileşimine eklenmesi ile aşılabılır (Dutta ve ark 2009). Plastikleştirici terimi polimerik materyale moleküller arası kuvveti azaltılarak üç boyutlu yapısını değiştirmek amacıyla ilave edilen uçucu olmayan moleküller olarak tanımlanabilir (Banker ve ark 1996). Plastikleştiriciler polimer zinciri boyunca moleküller arası kuvvetin

azalmasını sağlayarak filmlere elastikiyet kazandırmaktadırlar (Aydınlı ve Tutaş 2000, Ziani ve ark 2008).

Yenilebilir filmler bileşenlerine göre üç farklı kategoride sınıflandırılabilirler; hidrokolloidler, lipidler ve kompozitler. Hidrokolloidler nişasta gibi proteinleri ve aljinat, selüloz türevleri, agar ve kitosan gibi karbonhidratları; lipidler balmumlarını, açilgliserolleri ve yağ asitlerini kapsamaktadır. Kompozitler ise hidrokolloidlerin ve lipidlerin birlikte oluşturduğu filmlerdir (Donhowe ve Fennema 1993, Cha ve Chinnan 2004). Kompozit filmlerin yapımında oluşabilecek faz ayrımı problemi emülsifiyer ilavesi ile önlenir (Srinivasa ve Tharanathan 2007).

Polisakkaritlerin hidrofilik özelliklerinden dolayı oluşturdukları filmlerin su buharı bariyer özellikleri düşüktür. Bununla birlikte gaz bariyer özellikleri yüksektir (Park ve Chinnan 1995, Bourtoom 2008). Polisakkaritler içinde nişasta, selüloz, karboksimetilselüloz, metil selüloz, hidroksipropil metil selüloz, aljinat, karragenan ve kitosanın film oluşturma özellikleri ve oluşturdukları filmlerin mekanik özellikleri üzerine birçok çalışma yapılmıştır (Cha ve Chinnan 2004, Bourtoom 2008).

Proteinler, suda çözünmeyen ve hayvansal dokuların yapısal materyalini oluşturan fibröz proteinler ve su, asit, baz veya tuzların sulu çözeltilerinde çözünebilir, canlılarda fonksiyonel görevleri olan globüler proteinler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Zein ve gluten gibi globüler proteinlerin film oluşturma özelliklerine yönelik birçok araştırma yapılmasına rağmen kollajen gibi fibröz proteinlere yönelik oldukça az sayıda araştırma yapılmıştır. Genel olarak proteinler film formasyonu için ısı, asit ve bazlar ile denatüre edilerek kimyasal yapıları genişletilmektedir. Polimer zincir etkileşimlerinin artması filmlerin sağlamlığını artırırken elastikiyetlerini, gaz ve sıvı geçirgenliklerini azaltmaktadır. Polisakkarit filmlerinde olduğu protein filmlerinin gaz bariyer özellikleri yüksek, su buharı bariyer özellikleri düşüktür (Kester ve Fennemea 1986, Cha ve Chinnan 2004, Bourtoom 2008).

Lipid terimi yağ asitleri, gliserol esterleri ve uzun zincirli monohidrik alkollerin esterlerinden ve yağ asitlerinden oluşan balmumlarını kapsamaktadır. Bu grup içinde asetogliseridler, doğal mumlar ve surfaktantlar yenilebilir kaplamalarda kullanılmaktadır (Cha ve Chinnan 2004). Hidrofobik karakterleri ve düşük

polariteleri nedeniyle lipid filmlerinin su buharı bariyer özellikleri yüksektir. Bununla birlikte lipidlerin oluşturduğu filmler oldukça ince ve kırılabilir özelliktedir. Bu nedenle lipitler hidrokolloidler ile birlikte kullanılmaktadır. Böylece hidrokolloid filmlerin su buharı geçirgenliği lipidlerin hidrofobik karakteri sayesinde iyileştirilmektedir (Debeaufort ve ark 1993, Chick ve Hernandez 2002, Bourtoom 2008).

1.5. Sentetik Filmlerin Biyopolimerler ile Kaplanması

Doğrudan biyolojik kaynaklardan elde edilen biyomoleküllerin oluşturduğu filmler doğal ve biyobozunur olma gibi avantajlara sahiptir. Bununla birlikte özellikle zayıf mekanik ve su buharı bariyer özellikleri nedeniyle yapısal ve fonksiyonel bütünlüklerini korumadaki yetersizliklerinden dolayı sentetik filmlerin işlevlerini bütünüyle yerine getirmede yetersiz kalmaktadır. Sentetik filmlerin ve biyopolimerlerin avantajları sentetik filmlerin biyopolimerler ile kaplanması yoluyla birleştirilebilir (Farris ve ark 2009).

Sentetik filmlerin polar olmayan yüzeyleri polar biyopolimerlerin sulu çözeltileri ile kaplanması için uygun değildir. Biyopolimerlerin sentetik film yüzeyine iyi tutunabilmesi için yüzey modifikasyonu zorunludur. Polar olmayan film yüzeylerinin modifikasyonu için korona deşarjı, alev uygulaması, plazma uygulaması ve kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Sentetik polimerlerin yüzey enerjisini arttıran korona uygulaması etkin bir yüzey modifikasyon yöntemidir (Hong ve Krochta 2003, Hong ve ark 2005, Vartiainen ve ark 2005).

Hong ve ark (2005) PP filmleri metil selüloz, hidroksipropil metil selüloz, dekstrin, karragenan ve kitosan kullanarak kapladıkları çalışmalarında kitosan ve karragenan' ın görsel ve mekanik özellikleri bakımından ideal kaplama materyalleri ve antimikrobiyal maddeler için ideal taşıyıcı matrisler olduğunu ortaya koymuşlardır. Elsabee ve ark (2008) PP filmler üzerine kitosan ve pektin kullanarak yaptıkları çok katlı kaplamanın kullanıma yönelik yeterli mekanik özelliklere ve kitosan miktarına bağlı olarak kayda değer antifungal ve antibakteriyel etkiye sahip olduğunu saptamışlardır.

Oksijen gıdalarda lipidler, vitaminler, aroma ve renk bileşenleri ile geri dönüşümsüz olarak reaksiyona girerek gıdalarda kalıcı değişimlerin oluşmasına neden olmaktadır. Bu nedenle gıda ambalajının oksijen bariyer özelliği gıdanın özelliklerinin muhafaza edilmesi açısından önemlidir. Sentetik polimer filmlerin oksijen bariyer özelliği etilen vinil alkol ve poliviniliden klorid gibi pahalı sentetik bariyer polimerlerin laminasyonu ile arttırılabilmektedir. Çok katlı bariyer filmlerinin maliyetlerinin yüksek olmasının yanında geri dönüşümlerinin zorluğu bir diğer dezavantajlarıdır. Çünkü birden çok polimerden oluşan plastikler geri dönüşüm için uygun değildir. Çok katlı oksijen bariyer filmlerine alternatif olarak hidrokolloidler gibi biyomoleküller ile kaplanmış PP ve LDPE gibi sentetik filmler kullanılabilir (Hong ve Krochta 2003, Hong ve Krochta 2004).

LDPE, PP ve PE filmlerin peynir altı suyu proteinleri ve plastikleştirici olarak gliserol kullanılarak kaplandığı çalışmalarda düşük ve orta nem düzeylerinde protein kaplanmış sentetik filmlerin oksijen bariyer özelliklerinin kaplanmamış sentetik filmlere nazaran oldukça yüksek olduğu saptanmıştır (Hong ve Krochta 2004, Hong ve Krochta 2006). OPP, LDPE ve polyester filmlerinin jelatin ile kaplanması oksijen bariyer özelliklerini sırasıyla %73, %56 ve %40; UV bariyer özelliklerini ise sırasıyla %20, %12 ve %12 oranında yükseltmiştir (Farris ve ark 2009).

Biyopolimerlerin sentetik filmler üzerine kaplanması ekstrüzyon ve diğer ısı uygulamaları ile okside veya denatüre olabilen antimikrobiyal maddelerin sentetik filmler ile birlikte kullanımına imkan sağlamaktadır (Hong ve ark 2005). Yapılan çalışmalar lizozim ve nisin ilavesinin kitosan kaplı sentetik filmlerin antimikrobiyal aktivitelerini önemli düzeyde ($P<0,05$) arttırdığını göstermiştir (Duan ve ark 2007, Ye ve ark 2008a, Ye ve ark 2008b). Cooksey (2005) 2500 IU/ml düzeyinde nisin ilave edilmiş metil selüloz+hidroksipropil metil selüloz solüsyonları ile 0,5 mm ıslak kaplama kalınlığında kaplanmış LDPE filmlerin yapay kontamine sosis örneklerinde *L. monocytogenes*' i tamamen inhibe ettiğini bildirmiştir.

1.6. Kitosan

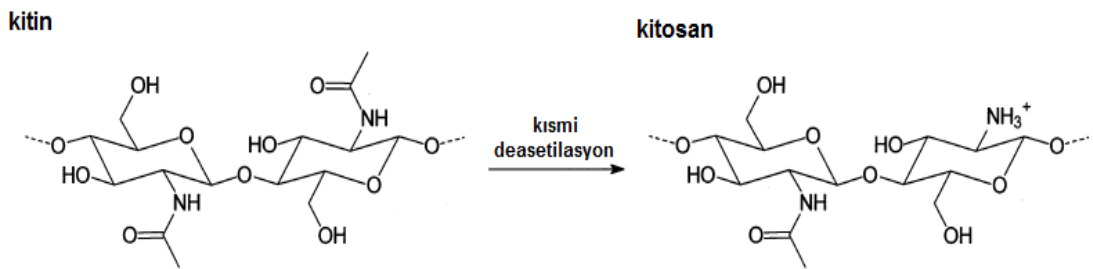
İlk olarak 1884 yılında tanımlanan kitin doğada selülozdan sonra en çok bulunan polimerdir ve organizmaların birçoğu tarafından sentezlenmektedir. Kitinin

deasetilasyonu yaklaşık %50 olduğu zaman asidik çözeltilerde çözünebilir hale gelmektedir ve kitosan olarak isimlendirilmektedir (Rinaudo 2006).

Kitin yengeç, karides ve kerevit gibi omurgasız deniz hayvanlarının dış iskeletlerinin en önemli yapısal bileşenidir. Omurgasız deniz hayvanlarının kabukları, kitinin biyolojik olarak yıkımlanması oldukça yavaş olduğu için deniz ürünleri endüstrisinde önemli bir problem oluşturmaktadır. Deniz ürünlerinin işlenmesi sırasında açığa çıkan atık kabuk miktarı yıllık yaklaşık beş milyon ton civarındadır. Bu nedenle yengeç ve karides gibi hayvanların atık kabuklarından kitin, kitosan ve onların türevleri gibi farklı endüstriyel alanlarda kullanım imkanı olan biyopolimerlerin üretilmesi hem çevresel hem de ekonomik açıdan oldukça büyük yararlar sağlamaktadır (Shadidi ve ark 1999).

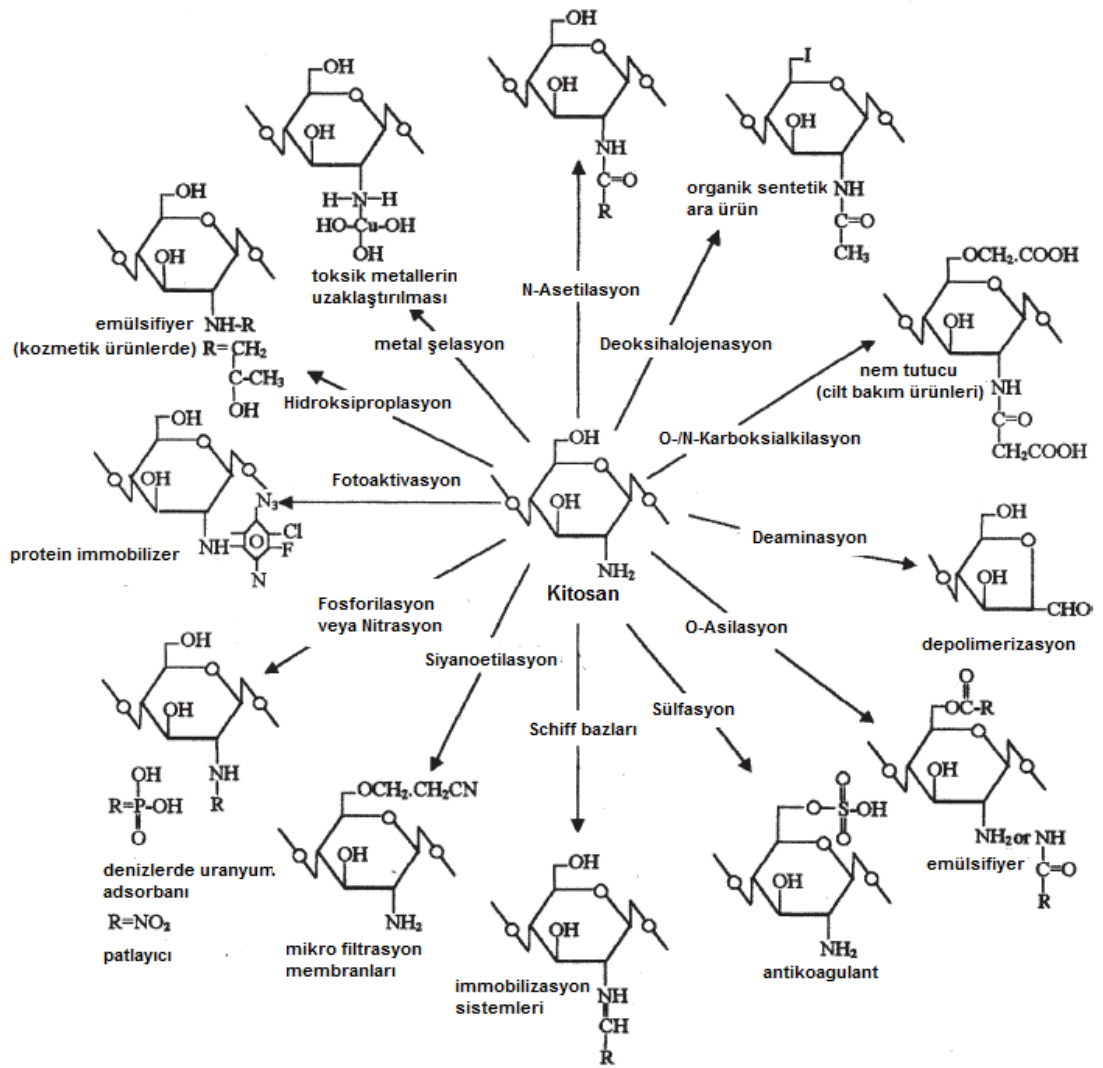
Kitin ve kitosan reaktif hidroksil ve amino gruplarına sahip moleküler yapıları oldukça benzer moleküllerdir. Bununla birlikte kitin kitosana nazaran daha stabil ve kriztalize yapıdadır. Her iki polimerde ısıtıldığı zaman erimeden önce dekompoze olmaları nedeniyle erime sıcaklığı değerine sahip değildir. Kitosan birçok asidin sulu çözeltisinde çözünebilirken, kitin oldukça az çözeltide çözünebilir hale gelmektedir (Tharanathan ve Kittur 2003).

Kitosan üç tip fonksiyonel gruba sahiptir. Bu gruplar C-2 pozisyonundaki amino grubu, C-3 pozisyonundaki primer hidroksil grubu ve C-6 pozisyonundaki sekonder hidroksil grubudur. Bu grupların kimyasal modifikasyonu farklı uygulama alanları için sayısız kullanışlı materyal sağlamaktadır (Shadidi ve ark 1999). Avrupa Patent Ofisi verilerine göre kitosan ile ilgili olarak farklı endüstriyel alanlarda 2000' in üzerinde patent bulunmaktadır (Rhoades ve Rastall 2000).



Şekil 1.3. Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı (Bégin ve Calsteren 1999).

Kitin türevleri arasında kitosan yüksek molekül ağırlığı, polielektrolit özellikleri, kimyasal yapısındaki reaktif fonksiyonel gruplar, jel oluşturma yeteneği, kimyasal ve enzimatik olarak modifiye edilebilir olması ve adsorbisyon kapasitesi ile birçok endüstriyel uygulama alanına (Şekil 1.4) sahiptir. Kitosan doğal kaynaklı, biyobozunur ve hayvan ve insan dokuları ile biyouyumlu olmasından dolayı özellikle tıp, veteriner ve farmosötik alanlarında kullanımı hızla artan bir biyomolekül haline gelmiştir (Synowiecki ve ark 2003, Tharanathan ve Kittur 2003).



Şekil 1.4. Kitosan türevleri ve endüstriyel kullanım alanları (Tharanathan ve Kittur 2003).

Kitosan genel olarak yengeç ve karides kabuklarından elde edilen kitinin deasetilasyonu ile elde edilmektedir. Deasetilasyon için kitin oda sıcaklığında veya daha yüksek sıcaklıklarda yüksek konsantrasyonda sodyum hidroksit ile muamele edilmektedir. Kitosanın üretim şartlarına bağlı olarak değişen deasetilasyon derecesi ve moleküler ağırlığı asidik çözeltilerde çözünebilirliğini, solüsyonlarının viskozitesini ve biyolojik aktivitesini etkilemektedir. Yüksek sıcaklıklarda yapılan üretim deasetilasyon derecesini artırırken molekül büyüklüğünü azaltmaktadır. Alkali ile muamele süresinin uzatılmasının deasetilasyon derecesi üzerine önemli bir etkisi olmamakla beraber depolimerizasyona neden olmaktadır. Kitinin deasetilasyonu sırasında oksijen varlığı polisakkarit parçalanmasını etkileyerek üretilen kitosanın viskozitesinde ve moleküler ağırlığında azalmaya neden olmaktadır. Üretimin azot altında yapılması bu etkileri kısıtlamaktadır (Synowiecki ve ark 2003, Tharanathan ve Kittur 2003).

Allomyces, Mucor, Aspergilum, Penicillium, Fusarium, Rhizopus, Choanephora, Tamnidium, Zygorrhynchus ve Phycomyces cinsi küflerin hücre duvarları kitinin yanı sıra küf türüne bağlı olarak kayda değer oranlarda kitosan ve farklı asidik polisakkaritler içermektedir (Davis ve Bartnicki-Garcia 1984, Knorr ve Klein 1986, Muzzarelli ve ark 1994, Synowiecki ve ark 2003). Özellikle *Zygomycetes* sınıfı, kitosanın hücre duvarlarının ana bileşenlerinden olması nedeniyle alternatif kitosan kaynaklarıdır. Günümüzde küflerin polisakkaritlerin elde edilmesine yönelik kullanımı oldukça sınırlı olmasına rağmen küflerden kitin ve kitosan elde edilmesine yönelik birçok metot geliştirilmiştir. Kitosan küf misellerinden asetik asit çözeltisi ile tekrarlı ekstraksiyon ve sodyum hidroksit ile presipitasyon ile elde edilebilmektedir. Küfler uygun gelişme şartları altında ve düşük maliyetler ile çok hızlı çoğaltılabilirler. Genellikle fungal biyokütlenin iki katına ulaşma süresi bir ile üç saat arasında değişmektedir. Küflerin bu özellikleri kitin ve kitosan eldesi için avantaj sağlamaktadır. Bunun yanında küflerin yapısında çok az miktarlarda kalsiyum karbonat ve diğer mineral tuzlar bulunması nedeniyle kitinin elde edilmesinde asit ile muamele maliyetleri deniz kabuklularına göre oldukça düşüktür (Tharanathan ve Kittur 2003).

1.6.1. Kitosanın Antimikrobiyal Etkisi

Kitosanın antimikrobiyal etki mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bununla birlikte en çok kabul gören yaklaşım pozitif yüklü kitosan moleküllerinin negatif yüklü mikrobiyal hücre membranları ile etkileşime girerek geçirgenliklerini değiştirmesidir. Bu etkileşim hücre içeriğinin hücre dışına sızmasına neden olmaktadır. Kitosan ayrıca seçici olarak iz elementler ile şelat oluşturarak toksin oluşumuna ve gelişmeye engel olarak, konak dokulardaki bazı savunma mekanizmalarını aktive ederek, hücre içine girerek DNA'ya tutunma ve mRNA ve protein sentezine engel olarak antimikrobiyal etki göstermektedir (Papineau ve ark 1991, Sudarshan ve ark 1992, Shahidi ve ark 1999, No ve ark 2007).

Genel olarak kitosan mantarlara nazaran bakteriler üzerine daha güçlü antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Tsai ve ark 2002). Kitosanın *Zygomycetes* sınıfındaki mantarlar üzerine antimikrobiyal aktivitesi sınırlıdır. Bunun nedeni kitosanın bu sınıf üyesi mantarların hücre duvarlarının ana bileşeni olmasıdır (Tharanathan ve Kittur 2003).

Yapılan çalışmalar kitosanın oligomerlerinden daha güçlü antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu ve kitosan ve oligomerlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin deasetilasyon derecelerine ve moleküler ağırlıklarına bağlı olduğunu göstermiştir (Jeon ve ark 2001, No ve ark 2002).

Bazı araştırmacılar Gram negatif bakterilerde dış membranın makromoleküllerin geçişi için yeterli bariyer özelliği göstermesi nedeniyle kitosanın doğrudan hücre içine girmesinin muhtemel olmadığını ileri sürmüşlerdir (Helander ve ark 2001). Bu yaklaşımdan farklı olarak Dutta ve ark (2009) düşük moleküler ağırlığa sahip kitosanın Gram negatif bir bakteri olan *E. coli* üzerine antimikrobiyal etkinliğini hücre içine girerek gösterdiğini ve kitosanın moleküler ağırlığı azaldıkça etkinliğinin arttığını bildirmişlerdir.

No ve ark (2002) 4 Gram negatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella Typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*) ve 7 Gram pozitif (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus bulgaricus*)

bakteri türü üzerine farklı moleküler ağırlıktaki kitosanların antimikrobiyal aktivitelerini değerlendirdikleri çalışmalarında MIC değerlerini %0,05 ile >%1 arasında saptamışlardır. Yine aynı çalışmada Gram negatif ve *Lactobacillus* türleri dışındaki Gram pozitif bakteriler üzerine en güçlü antimikrobiyal aktiviteyi 470 kDa moleküler ağırlığa sahip kitosanın, *Lactobacillus* türleri üzerine en güçlü antimikrobiyal aktiviteyi ise 1106 kDa moleküler ağırlığa sahip kitosanın gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Genel olarak kitosanın asetik asit ile hazırlanan solüsyonu diğer organik asitler ile hazırlanan solüsyonlarına nazaran bakteri türleri üzerine daha güçlü antimikrobiyal etkinliğe sahiptir. *Lactobacillus* türleri üzerine en güçlü antimikrobiyal etkiyi ise laktik asit ve formik asit solüsyonları göstermektedir (No ve ark 2002).

Kitosanın antimikrobiyal aktivitesine yönelik verilerin büyük bölümü in vitro çalışmalardan elde edilmiştir. Bununla birlikte gıdaları oluşturan protein, karbonhidrat ve yağ gibi bileşenler kitosan ile etkileşime girerek antimikrobiyal aktivitesini etkileyebilmektedir (No ve ark 2007). Bu nedenle kitosanın antimikrobiyal aktivitesinin değerlendirilmesinde gıdalar ile birlikte kullanımına yönelik çalışmalar büyük önem taşımaktadır.

1.6.2. Kitosanın Gıdalar ile Birlikte Kullanım Olanakları

Bir diyet lifi ve fonksiyonel bileşen olarak kitosan gıdalarda çok yönlü işlevlere sahiptir. Kitosan ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından yem katkısı ve GRAS olarak benimsenmiştir. Kitosan Kuzey Kore' de 1995 yılından bu yana, Japonya' da ise 1983 yılından bu yana gıda katkısı olarak, İtalya ve Norveç gibi bazı ülkelerde gıda endüstrisinde kalite arttırıcı olarak kullanılmaktadır (Shahidi ve ark 1999, Tharanathan ve Kittur 2003, No ve ark 2007).

Yapılan çalışmalar kitosanın karaciğer ve serum kolesterol düzeyini etkin bir şekilde azalttığını ve immun sistemi stimüle ettiğini ortaya koymuştur. (Nishimura ve ark 1984, Lehoux ve Grondin 1993). Japonya' da diyet unlu mamüleri, patates cipsleri ve geleneksel makarnalar kolesterol düşürücü etkisi nedeniyle kitosan ile

zenginleştirilmektedir. Yine Japonya' da kolesterol düşürücü etkisi nedeniyle kitosan içeren sirke ürünleri üretilmektedir (No ve ark 2007).

Kitosan ince bağırsağın üst bölümlerinde alkali ortamda kolesterol ile miseller oluşturmaktadır. Bu durum beslenme yolu ile alınan kolesterolün emiliminin azalmasına ve karaciğere kolik asit sirkülasyonunun azalmasına neden olmaktadır. Kolik asit düzeyinde meydana gelen azalma karaciğerde kolesterolden kolik asit sentezine ve kan kolesterol seviyesinin düşmesine neden olmaktadır (Tharanathan ve Kittur 2003).

Kitosan birçok bakteri, küf ve mayaya karşı göstermiş olduğu antimikrobiyal aktivite nedeniyle doğal bir gıda koruyucusu olarak ilgi çekmektedir (Sagoo ve ark 2002). Farklı gıda ürünlerine kitosan ilavesi ile yapılan birçok çalışma antimikrobiyal özelliği sayesinde kitosanın sentetik koruyuculara doğal kaynaklı bir alternatif olduğunu ortaya koymuştur (No ve ark 2007).

Sodyum nitrit sosislerde koruyucu ve renk oluşumunu sağlamak amacıyla kullanılan bir katkı maddesidir. Nitrit ette bulunan aminlerle reaksiyona girerek insan sağlığı açısından oldukça tehlikeli olan nitrozaminlerin oluşmasına neden olabilmektedir. Sosis üretiminde nitrit yerine kitosanın kullanım olanaklarına yönelik çalışmalardan elde edilen sonuçlar kitosanın nitrite alternatif olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Park ve ark 1999, Youn ve 1999, No ve ark 2007).

Diğer diyet liflerinden farklı olarak güçlü antimikrobiyal etkiye sahip olan kitosanın probiyotikler üzerine olan antimikrobiyal aktivitesi patojenlere nazaran oldukça düşük düzeydedir. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinden birçoğunun 500 ppm ve üzerindeki kitosan konsantrasyonlarında %90' ın üzerinde canlı kaldığı saptanmıştır (Tsai ve Hwang 2004).

Özellikle et ve et ürünleri yüksek oranda doymamış yağ asidi içermelerinden dolayı oksidasyona çok hassastırlar (Tharanathan ve Kittur 2003). Kitosan antioksidant özelliği ile gıdalarda lipid oksidasyonunun önlenmesi için kullanılabilir. Kitosanın antioksidan etkisi moleküler ağırlığına bağlı olarak değişim göstermektedir (No ve ark 2007). Darmadji ve Izumimoto (1994) kitosanın

et örneklerine %1 oranında ilavesinin 4°C’ de üç gün muhafaza sonunda kontrol grubuna göre TBA değerini yaklaşık olarak %70 oranında azalttığını bildirmişlerdir.

Diyetle beraber alınan kitosan midede çözülmekte ve mide içindeki yağ damlacıkları ile emülsiyon oluşturmaktadır. Bu emülsiyon yağları lipaz aktivitesinden korumaktadır. Oluşan emülsiyon pH 6,5-6,8 aralığında ince bağırsakta presipite olmaktadır. Biriken polisakkarit zincirleri yağ damlacıklarını matrikslerinde hapsetmekte ve lumenden geçerek gaita ile atılmalarını sağlamaktadır. Bu etkin yağ tutucu özelliği kitosanı kilo kontrolü için ideal bir biyopolimer yapmaktadır (Agullo ve ark 2003, Tharanathan ve Kittur 2003).

1.6.3. Kitosan Filmleri ve Mekanik Özellikleri

Kitosandan film üretimine yönelik ilk patent 1936 yılında ABD’ de Du Pont de Nemours&Co firması çalışanlarından GW Rigby tarafından alınmıştır ve kitosan filmi esnek, dayanıklı, şeffaf, renksiz ve gerilme direnci yaklaşık 9000 psi olarak tanımlanmıştır (Wiles ve ark 2000).

Kitosandan film üretimi için en çok kullanılan metot solvent evaporasyondur. Solvent evaporasyon metodu ile kitosan filmleri hidroklorik, formik, asetik, laktik ve sitrik asit gibi asitlerin sulu çözeltileri içinde çözündürülen kitosanın bir kalıba dökülerek kurutulması ile elde edilmektedir (Bégin ve Calsteren 1999, Dutta ve ark 2009).

Srinivasa ve ark (2004) 100°C’ de etüv, infrared kurutma ve 27°C’ de atmosferik kurutma uygulamalarının kitosan filmlerinin mekanik özellikleri üzerine etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında en yüksek gerilme direnci ve % uzama oranı değerlerini atmosferik kurutma ile en düşük oksijen ve su buharı geçirgenliği değerlerini ise infrared kurutma ile elde etmişlerdir. Etüv ile kurutma uygulaması ile elde edilen filmlerin renk indeksi diğerlerine nazaran daha yüksek bulunmuştur.

Plastikleştirici kullanmadan asetik ve formik asit ile hazırlanan kitosan filmleri sitrik ve laktik asit ile hazırlananlara nazaran daha sert ve kırılğan yapıdadırlar (Bégin ve Calsteren 1999). Caner ve ark (1998) asetik, formik, laktik ve propiyonik asitlerin %1 ve %7,5’ lik çözeltileri ve plastikleştirici olarak farklı konsantrasyonlarda (0,25 ml/g kitosan ve 0,50 ml/g kitosan) polietilen glukol

kullanarak hazırladıkları %3' lük kitosan filmlerinin mekanik özelliklerini araştırdıkları çalışmalarında filmlerin su buharı geçirgenliği katsayılarını (WVPC) $5,35 \times 10^{-1}$ g/m.gün.atm ve $13,20 \times 10^{-1}$ g/m.gün.atm arasında, oksijen geçirgenliği katsayılarını (OPC) $0,08 \times 10^{-3}$ cc O₂/m.gün.atm ve $31,67 \times 10^{-3}$ cc O₂/m.gün.atm arasında, % uzama oranlarını 14,40 ile 71,80 arasında, gerilme dirençleri ise 6,85 Mpa ile 31,88 Mpa arasında tespit etmişlerdir. En düşük WVPC değerini %7,5' lik asetik asit, en düşük OPC değerini %7,5' lik laktik asit, en yüksek % uzama katsayısını %1' lik asetik asit, en yüksek gerilme direnci değerini ise %7,5' lik formik asit çözeltileri kullanılarak hazırlanan filmlerden elde etmişlerdir.

Kitosan filmlerinin hazırlanmasında kullanılan asitler film matriksinden difuze olarak filmlerin antimikrobiyal etkisini arttırmaktadır. Bu nedenle film bileşimindeki asitlerin yavaş bir şekilde difuze olması aktivitelerinin uzun süreli olmasını sağlamaktadır. Ouattara ve ark (2000a) asetik asidin propiyonik aside nazaran kitosan filmlerinden difuzyon hızının oldukça düşük olduğunu bildirmişlerdir. Ouattara ve ark (2000b) su içerisinde kitosan filmlerinden asetik ve propiyonik asitlerin 24°C' de, 4°C' ye göre iki kat hızlı difuze olduklarını ve film bileşimine tarçın uçucu yağının ana bileşeni olan cinnamaldehyd ve karanfil uçucu yağının ana bileşeni olan eugenol ilavesinin asetik asidin difuzyon hızını azalttığını tespit etmişlerdir.

Kitosan filmlerine elastikiyet kazandırmak amacıyla film bileşimlerine ilave edilen plastikleştiriciler filmlerin mekanik özellikleri üzerine etki eden faktörlerdendir. Plastikleştirici etkileri göz önüne alındığında gliserol ve polietilen glikol, etilen glikol ve propilen glikol' e göre kitosan filmleri için daha uygundur. Kitosan miktarının %20' si oranında gliserolün film bileşimine ilavesi yeterli elastikiyeti sağlamaktadır (Suyatma ve ark 2005).

Kitosanın deasetilasyon derecesi ve moleküler ağırlığı kitosan filmlerinin mekanik özelliklerini etkileyen faktörlerdendir (Nunthanid ve ark 2001). Ziani ve ark (2008) %60,9 deasetilasyon derecesine sahip kitosan filmlerinin gerilme direnci ve % uzama oranı değerlerinin %90 deasetilasyon derecesine sahip kitosan filmlerine nazaran daha yüksek olduğunu ve kitosanın asetilasyon derecesinin su buharı geçirgenliği üzerine etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Wiles ve ark (2000) kitosanın deasetilasyon derecesinin su buharı geçirgenliği üzerine bir etkisinin

olmadığını saptamışlardır. Nunthanid ve ark (2001) kitosanın moleküler ağırlığındaki artışa paralel olarak filmlerin gerilme direnci, % uzama oranları ve nem absorpsiyonunun arttığını bildirmişlerdir.

1.6.4. Kitosan Filmlerinin Antimikrobiyal Etkisi

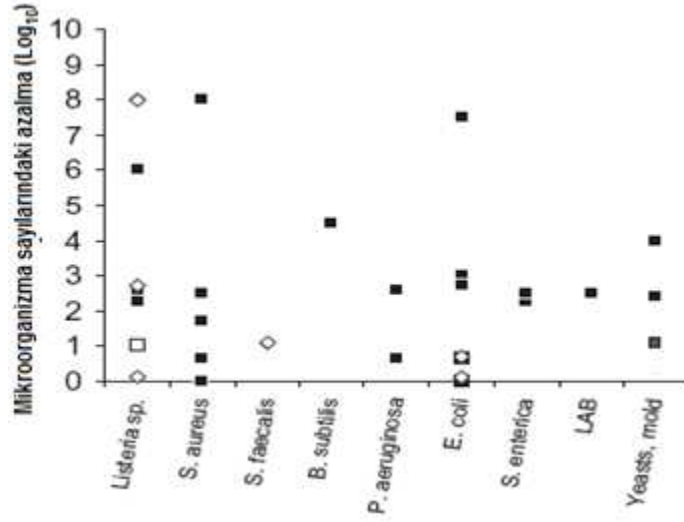
Yapılan birçok çalışma ile yalnızca kitosandan elde edilen filmler, kitosanın diğer doğal kaynaklı polimerler ile oluşturduğu kompozit filmler, kitosanın sentetik polimerlere ilavesi ile elde edilen filmler ve kitosan ile kaplanmış sentetik filmlerin antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirilmiştir (Joerger 2007). Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar (Şekil 1.5) kitosanın antimikrobiyal ambalaj materyali olarak ümit verici bir biyopolimer olduğunu ortaya koymuştur.

Kitosanın film formundaki antimikrobiyal aktivitesi sulu çözeltilerine nazaran sınırlıdır (Ouattara 2000a, Ye ve ark 2008a, Ye ve ark 2008b). Pranoto ve ark (2005) agar difüzyon metodunda kitosan filmlerinin *L. monocytogenes* ve *B. cereus*' un gelişimine yalnızca filmlerin agar ile temas ettiği bölgede engel olduğunu ve kitosanın agara difüze olamaması nedeniyle kitosan filmlerinin inhibisyon zonu oluşturmadığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Coma ve ark (2002) kitosan filmlerinin *Listeria* türleri ile inoküle edilmiş agarlı besiyerlerinde inhibisyon zonu oluşturmadığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte bu çalışmalarda bitkisel ekstraktlar gibi antimikrobiyal maddelerin film bileşimine ilavesi ile agar difüzyon metodu ile kayda değer sonuçlar elde edilmiştir (Joerger 2007).

Zivanovic ve ark (2005) asetik asit ile hazırlanmış kitosan filmlerinin farklı düzeylerde kontamine edilmiş salam örneklerindeki *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 sayısını 10°C' de 5 gün muhafaza sonunda 1-3 Log düzeyinde azalttığını tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada %1 ve %2 oranında kekik uçucu yağı içeren kitosan filmleri her iki mikroorganizma sayısını yaklaşık 4 Log düzeyinde azaltmıştır.

Ouattara ve ark (2000a) asetik asit ile hazırlanmış kitosan filmlerinin 4°C' ve 10°C' de muhafaza edilen pastırma örneklerindeki *Enterobacteriaceae* sayısını önemli ölçüde azalttığını ($P < 0,05$) tespit etmişlerdir. Film bileşimine %1 oranında

cinnamaldehyd ilavesi her iki sıcaklık değerinde 21 gün muhafaza sonunda antimikrobiyal etkinliği önemli ölçüde ($P<0,05$) arttırmıştır.



Şekil 1.5. Kitosan içeren antimikrobiyal filmlerin gıda dışı (■) ve gıda (◇ et ve et ürünleri, □ peynir) örneklerinde farklı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinliği (Joerger 2007).

Duan ve ark (2007) asetik asit ile hazırlanmış %3' lük kitosan solüsyonundan elde edilmiş yenilebilir ve kaplanmış PP filmlerin 10°C' de muhafaza edilmiş mozzarella peynirlerinde *L. monocytogenes*, *E. coli* ve *P. fluorescens* e karşı antimikrobiyal etkilerinin istatistiksel olarak önemli düzeyde ($P<0,05$) olduğunu ve kitosan solüsyonlarına lizozim ilavesinin (%60, lizozim/kitosan) antimikrobiyal etkinliği önemli oranda arttırdığını bildirmişlerdir.

Ouattara ve ark (2000a) yaptıkları çalışmada asetik asit ile hazırlanan kitosan filmlerinin 4°C' de 21 gün muhafaza edilen salam örneklerinde laktik asit bakterileri üzerine antimikrobiyal etkinliğinin önemli düzeyde ($P>0,05$) olmadığını tespit etmişlerdir. Bununla birlikte aynı çalışmada kitosan filmlerinin salam örneklerinde *Enterobacteriaceae* ve *Serratia liquefaciens* üzerine etkinliği önemli düzeyde ($P<0,05$) bulunmuştur. Organik asitler ile hazırlanan kitosan filmlerinin laktik asit bakterileri üzerine antimikrobiyal etkinliğinin diğer bakteri türlerine nazaran daha düşük olmasının nedeni laktik asit bakterilerinin asidik ortama alındıklarında hızlı bir

şekilde salgıladıkları pozitif yüklenmiş laktatlar ile ortamın pH' sını dengeleyebilmeleri ile açıklanmaktadır.

Durango ve ark (2006) yaptıkları çalışmada %3 (0, 132 g) ve %5 (0,153 g) oranında kitosan içeren nişasta filmlerinin sıvı besiyerinde *S. Enteridis* sayısını 37°C' de 24 saat sonunda yaklaşık 1 Log düzeyinde azalttığını tespit etmişlerdir.

Vartiainen ve ark (2005) kitosan ile kaplanmış (1,8 g/m²) BOPP filmlerinin *B. cereus* ve *E. coli*' ye karşı etkisini antimikrobiyal damla testi ile değerlendirdikleri çalışmalarında 30°C' de 24 saat sonunda kitosan kaplanmış filmlerin kaplanmamış filmlere nazaran *B. cereus* sayısını yaklaşık 3 Log, *E. coli* sayısını ise yaklaşık 4 Log düzeyinde azalttığını saptamışlardır.

1.7. Gıda Ambalajlarında Kullanılan Antimikrobiyal Maddeler

Günümüzde bir aktif ambalaj sistemi olarak antimikrobiyal ambalajlara yönelik spesifik bir yasal düzenleme bulunmamaktadır. AB' de gıdalar ile temasta bulunan tüm materyaller ile ilgili direktifleri kapsayan 1935/2004 no' lu çerçeve kanun kapsamındaki 2002/72/EC direktifi ile birçok antimikrobiyal madde için migrasyon limitleri belirlenmiştir. Bununla birlikte bu direktif yalnızca plastik temelli ambalajları kapsamaktadır (Dainelli ve ark 2008). ABD' de ise gıda ambalajlarında kullanılan ve gıdaya difüze olabilen antimikrobiyal maddeler gıda katkı maddesi olarak gıda katkı maddeleri için oluşturulan standartlara göre değerlendirilmektedir (Appendini ve Hotchkiss 2002).

Antimikrobiyal ambalaj sistemlerinde kullanılabilen ve kullanımları yasal olan antimikrobiyal maddeler arasında yapılan çalışma sayıları göz önüne alındığında organik asitler ve tuzları, enzimler, bakteriyosinler ve bitkisel ekstraktlar ön plana çıkmaktadır (Suppakul ve ark 2003, Joerger 2007).

Yapılan birçok çalışmada en yaygın gıda koruyucularından olan asetik asit, laktik asit, sitrik asit ve benzoik asit gibi zayıf organik asitler ve tuzları tek olarak veya nisin gibi farklı antimikrobiyal maddeler ile ambalaj materyalleri ile birlikte kullanılmıştır. Organik asitlerin antibakteriyal etki mekanizmaları tam olarak ortaya konmamıştır. Bununla birlikte bakteriyostatik ve bakterisidal özellikleri hedef bakterinin fizyolojik durumu ve dış çevrenin fizikokimyasal özellikleri ile yakından

ilişkilidir. Organik asitler anyon ve protonlarına ayrışmamış formda iken bakteri hücrelerinin lipid membranlarından kolayca geçebilmekte ve hücre sitoplazmasının nötral pH'ında anyon ve protonlarına ayrışabilmekte ve RNA, DNA protein ve hücre duvarı sentezini azaltabilmektedir (Cherrington ve ark 1990, Ricke 2003).

Zayıf organik asitler, polar olmayan film matrislerinde çözünürlükleri kısıtlı olması nedeniyle genellikle sulu çözeltilerden hazırlanan yenilebilir film bileşimlerine ilave edilmiştir. Yapılan çalışmalarda organik asit içeren filmlerin gıdalarda bakteriler, mayalar ve küfler üzerine antimikrobiyal etkisinin olduğunu ve bazı hedef mikroorganizma sayılarında 5 Log düzeyinde azalma sağladığını ortaya koymuştur (Cha ve Chinnan 2004, Joerger 2007).

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen antimikrobiyal peptidler olan bakteriyosinler arasında nisin ticari olarak elde edilebilirliği ve kullanımı yasal olarak onaylanmış bir gıda katkı maddesi olması nedeniyle önem taşımaktadır. *Lactococcus lactis* tarafından üretilen ve 1960' lı yıllardan bu yana gıda endüstrisinde kullanılan, özellikle *Clostridium* türlerine karşı etkin bir antimikrobiyal madde olan nisin ambalaj materyalleri ile kullanımına yönelik birçok çalışma yapılmış olmasına karşın diğer bakteriosinler ile ilgili olarak 2007 yılı itibari ile yalnızca altı adet çalışma mevcuttur (Cha ve Chinnan 2004, Joerger 2007, Coma 2008).

Antimikrobiyal bir enzim olan ve birçok hayvan tarafından üretilen lizozim bakterilerin hücre duvarı bileşeni olan peptidoglukan yapıdaki beta 1-4 glikozid bağlarını parçalayarak etki göstermektedir. Lizozim ve diğer enzimlerin aktiviteleri sıcaklık ve pH gibi çevresel şartlardan önemli derecede etkilenmektedir. Enzimlerin bu özellikleri ambalaj materyalleri ile kullanımlarını sınırlamaktadır. Yapılan çalışmalarda lizozim saflaştırılmış ve kısmen saflaştırılmış halde ve EDTA ve nisin gibi farklı antimikrobiyal maddeler ile birlikte antimikrobiyal film bileşimlerinde kullanılmıştır (Cha ve Chinnan 2004, Joerger 2007, Coma 2008).

Karvakrol, timol ve eugenol gibi uçucu yağların ana bileşenleri, uçucu yağlar ve üzüm çekirdeği ekstraktı gibi bitkisel ekstraktlar güçlü antimikrobiyal etkileri ve doğal kaynaklı olmaları nedeniyle ilgi çeken antimikrobiyal maddelerdendir (Ha ve ark 2001, Cha ve Chinnan 2004).

1.8. Uçucu Yağlar

Uçucu yağlar aromatik bitkilerin tomurcuk, çiçek, yaprak ve gövde gibi tüm organları tarafından sekonder metabolitler olarak sentezlenebilen ve keskin kokuları ile karakterize olan doğal, uçucu, berrak, organik çözücülerde çözünebilen ve genellikle yoğunlukları sudan düşük olan kompleks bileşiklerdir. Bitkilerde sentezlenen uçucu yağlar salgı hücreleri, kanallar, epidemik hücreler ve glandular çıkıntılarda depolanırlar. Günümüzde bilinen yaklaşık 3000 uçucu yağın yaklaşık %10' u özellikle eczacılık, ziraat, gıda, kozmetik ve parfüm endüstrileri için ekonomik açıdan önem taşımaktadır (Bakkali ve ark 2008).

Uçucu yağların ekstraksiyonu için sıvı karbon dioksit, mikrodalga uygulaması, düşük veya yüksek basınç altında buhar veya su buharı distilasyonu gibi metotlar kullanılmaktadır. Kimyasal profile olan etkileri nedeniyle ekstraksiyon metodu ile kullanım amacı yakından ilişkilidir. Örneğin parfüm bileşiminde kullanılacak uçucu yağların lipofilik çözücüler ve süperkritik karbon dioksit metodu ile ekstraksiyonu tercih edilmektedir. Ekstraksiyon metotlarının uçucu yağların kimyasal profillerine olan etkileri yalnızca organeleptik değişiklikler ile sınırlı kalmamakta aynı zamanda antimikrobiyal aktivitelerini de etkilemektedir. Uçucu yağların bitkilerden elde edildiği organlar kimyasal profillerini etkileyen diğer bir faktördür (Burt 2004, Bakkali ve ark 2008).

Uçucu yağlar farklı konsantrasyonlarda yaklaşık 20 ile 60 arasında bileşenden oluşan oldukça kompleks karışımlardır. Bu bileşenlerden diğerlerine nazaran oldukça yüksek konsantrasyonda olan bileşenleri uçucu yağların biyolojik özelliklerini belirlemektedir. Uçucu yağların bileşenleri terpenler ve aromatik bileşikler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Beş karbonlu isopren birimlerinin kombinasyonundan oluşan terpenler yapısal ve fonksiyonel özelliklerine göre farklı sınıflara ayrılmaktadır. Genel olarak uçucu yağların bileşiminde en yüksek konsantrasyonda bulunan terpenler iki isopren biriminin birleşmesi ile oluşan (C₁₀) monoterpenlerdir. Fenilpropan türevleri olan aromatik bileşikler terpenlere nazaran daha az sayıda uçucu yağın bileşiminde bulunmaktadır (Bakkali ve ark 2008).

Yapılan çalışmalar uçucu yağlar ve bileşenlerinin çok uzun yıllardır bilinen antimikrobiyal etkileri yanında antiviral (Bishop 1995), antitoksijenik (Juglal ve ark

2002), antiparazitik (Pessoa ve ark 2002) ve insektisidal (Karpouhtsis ve ark 1998) özelliklerinin olduğunu ortaya koymuştur.

1.8.1. Uçucu Yağların Antimikrobiyal Etkisi

Uçucu yağların ve bileşenlerinin antimikrobiyal özellikleri ile ilgili birçok çalışma yapılmasına rağmen antimikrobiyal etki mekanizmaları ile ilgili detaylı çalışma sayısı yetersizdir (Dorman ve Deans 2000, Burt 2004, Viuda-Martos ve ark 2007). Conner ve Beuchat (1984) uçucu yağların ve bileşenlerinin mikroorganizmalarda enzimatik faaliyetlere, enerji üretimine ve yapısal bileşiklerin sentezlenmesine engel olduklarını bildirmişlerdir. Uçucu yağlar ve bileşenleri hidrofobik özellikleri sayesinde bakteriyal hücre membranları ve mitokondrilerdeki lipidleri parçalayarak yapısal bütünlüklerinin bozulmasına, iyonların ve diğer hücre içeriğinin hücre dışına sızmasına neden olmaktadır (Cox ve ark 2000).

Becerril ve ark (2007) elektron mikroskobu ile yaptıkları çalışmada kekik ve karanfil uçucu yağlarının *S. aureus* ve *E. coli* hücreleri üzerine sitoplazmik içeriğin koagülasyonu, hücre membranlarında yapısal bozukluklar, hücresel yapının yıkıma uğraması ve sitoplazmik materyal kaybı gibi farklı birçok önemli etkilerinin olduğunu saptamışlardır. Burt ve Reinders (2003) kekik uçucu yağının bakterisidal konsantrasyonunun *E. coli* O157:H7 hücrelerine geri dönüşümsüz hasar vermesi için bir dakika temasın yeterli olduğunu bildirmişlerdir.

Uçucu yağlara antimikrobiyal özellik kazandıran başlıca bileşenler fenolik bileşiklerdir. Genel olarak yüksek oranda karvakrol, eugenol ve timol gibi fenolik bileşikler içeren uçucu yağlar patojenlere karşı güçlü antimikrobiyal etki göstermektedir (Cosentino ve ark 1999; Lambert ve ark 2001).

Yapılan çalışmalar kekik, çay ağacı ve nane uçucu yağlarının metisiline dirençli *S. aureus*, glikopeptide dirençli Enterokoklar, aminoglikozide dirençli *Klebsiella* türleri, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *E. coli* ve *Shigella* türlerinin de içinde bulunduğu antibiyotiklere karşı çoklu direnç kazanmış mikroorganizmalara karşı etkinliğini ortaya koymuştur (Edris 2007).

Smith-Palmer ve ark (1998) broth dilüsyon metodu ile farklı uçucu yağların gıda kaynaklı patojenlere (*E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* Enteridis, *L. monocytogenes*,

Campylobacter jejuni) karşı aktivitelerini değerlendirdikleri çalışmalarında kekik, karanfil, tarçın ve defne uçucu yağlarının bakteriyostatik konsantrasyonlarını %0,075 ve daha düşük düzeyde tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada uçucu yağlara en dirençli patojen *C. jejuni*, en duyarlı patojen ise *L. monocytogenes* olarak saptanmıştır. Bununla birlikte Nedorostova ve ark (2009) *S. aureus* ve *E. coli*' nin uçucu yağlara *L. monocytogenes*' e nazaran daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmalar genel olarak Gram pozitif bakterilerin Gram negatif bakterilere nazaran uçucu yağlara daha hassas olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum Gram negatif bakterilerin hidrofobik bileşiklerin hücre içine girişi için bariyer özelliği gösteren hidrofilik dış membrana sahip olmaları ile açıklanabilir (Smith-Palmer ve ark 1998, Kotzekidou ve ark 2008, Nedorostova ve ark 2009).

1.8.2. Uçucu Yağların Gıdalar ile Kullanım Olanakları

Karvakrol, cinnamaldehyd, eugenol, *p*-simen, timol ve mentol gibi birçok uçucu yağ bileşeni tüketici sağlığına yönelik bir risk oluşturmadığından dolayı AB tarafından gıdalarda kullanımı yasal olan aroma maddeleri kapsamında değerlendirilmektedir (EC 2002). AB' de olduğu gibi ABD' de birçok uçucu yağ bileşeninin gıda katkı maddesi veya GRAS olarak kullanımı yasaldır. Günümüzde uçucu yağ içeren gıda koruyucularını ticari ürün olarak elde etmek mümkündür. Bu ticari ürünlere Bavaria Corp. (ABD) firması tarafından üretilen "Protecta One" ve "Protect Two" ve DOMCA SA (İspanya) firması tarafından üretilen "DMC Base Natural" örnek verilebilir (Nedorostova ve ark 2009).

Son yıllarda uçucu yağların gıdalarda doğal kaynaklı koruyucular olarak kullanım olanağı olduğunu ortaya koyan birçok çalışma yapılmıştır (Burt 2004, Joerger 2007). Uçucu yağların antimikrobiyal aktivitesine yönelik in vitro çalışmalardan elde edilmiş veriler gıdalardaki aktivitelerine yönelik değerlendirmeler yapabilmek için yetersizdir. Bu nedenle doğrudan gıdalar ile birlikte kullanımlarına yönelik çalışmalara ihtiyaç vardır (Moreira ve ark 2005). Yapılan çalışmalar uçucu yağların gıdalardaki antimikrobiyal aktivitesinin in vitro çalışmalara nazaran düşük düzeyde olduğunu ortaya koymuştur (Burt 2004).

Gıdaların kimyasal kompozisyonu, kullanılan antioksidanlar ve koruyucular, muhafaza şartları ve ambalaj özellikleri uçucu yağların antimikrobiyal aktivitesi üzerine etki etmektedir (Burt 2004). Gıdalarda besiyerlerine nazaran su içeriğinin düşük olması uçucu yağların hedef mikroorganizma hücrelerine ulaşmasını kısıtlamaktadır (Smith-Palmer ve ark 2001). Gutierrez ve ark (2008) uçucu yağların düşük pH, yüksek protein ve düşük yağ ve karbonhidrat oranına sahip gıdalarda daha etkin olduğunu bildirmişlerdir.

Uçucu yağların gıdalar ile birlikte kullanımlarının önündeki en büyük kısıtlayıcı faktör gıdaların organoleptik özelliklerindeki muhtemel değişimlerdir. Organoleptik değişimler uçucu yağlar yerine uçucu yağların en aktif bileşenlerinin kullanılması, birden çok uçucu yağın birlikte kullanımı ve özellikle yüksek yağ oranına sahip gıdalarda uçucu yağların gıda içinde daha iyi dağılmasını ve mikroorganizmalar ile temasın artmasını sağlayan polietilen glikol gibi maddelerin kullanımı ile azaltılabilir (Smith-Palmer ve ark 2001).

1.8.3. Uçucu Yağların Ambalaj Materyalleri ile Kullanım Olanakları

Uçucu yağların ambalaj materyalleri ile birlikte kullanımına yönelik çalışma sayısı gıdalar ile birlikte kullanımına yönelik çalışmalara nazaran daha az sayıdadır (Becerril ve ark 2007, Rojas-Graü ve ark 2007).

Uçucu yağların ambalaj materyalleri ile kullanımda gıdalardaki muhtemel organoleptik değişimler göz önünde bulundurulmalıdır. Chi ve ark (2006) %1 kekik yağı içeren kitosan filmleri ile kaplanmış salam örneklerinde beş günlük muhafaza sonunda karvakrol konsantrasyonunu 13,3 ppm olarak saptamışlardır. Yine aynı çalışmada salam örneklerinde 45 ppm ve daha düşük düzeylerde karvakrol konsantrasyonu duyusal özellikler bakımından kabul edilebilir olarak tespit edilmiştir.

Uçucu yağların protein ve polisakkarit filmlerine ilavesi antimikrobiyal özellik kazandırmanın yanında hidrofobik yapıları nedeniyle filmlerin su buharı geçirgenliklerinin azalmasını sağlamaktadır. Bununla birlikte uçucu yağların protein ve polisakkarit filmlerine ilaveleri filmlerin gerilme direnci gibi bazı mekanik

özelliklerini olumsuz etkilemektedir (Zivanovic ve ark 2005, Rojas-Graü ve ark 2007).

Zivanovic ve ark (2005) %1 ve %2 oranında kekik yağı içeren kitosan filmlerinin *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 ile farklı düzeylerde kontamine edilmiş salam örneklerinde 10°C' de 5 gün muhafaza sonunda *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 sayılarını 3-4 Log azalttığını tespit etmişlerdir. Rojas-Graü ve ark (2007) agar difüzyon metodu ile yaptıkları çalışmada kekik, tarçın, limonotu uçucu yağları ve bu uçucu yağların ana bileşenleri olan karvakrol, cinnamaldehyd ve sitral içeren aljinat ve elma püresinden hazırlanmış filmlerin *E. coli* O157:H7' ye karşı önemli düzeyde antibakteriyal etki gösterdiklerini tespit etmişlerdir.

Ouattara ve ark (2000b) uçucu yağların bileşenlerinden olan cinnamaldehyd ve eugenolün organik asitler ile hazırlanan kitosan filmlerine ilavesinin antimikrobiyal etkinliği arttırmasının yanında organik asitlerin film matriksinden difüzyon hızlarını azalttığını bildirmişlerdir.

Uçucu yağlar ve bileşenlerinin ısıya duyarlı olması nedeniyle sentetik polimerlerde olduğu gibi film formu için yüksek sıcaklık uygulamalarına ihtiyaç duyulan polimerlere ilavesi antimikrobiyal aktivitelerinin önemli düzeyde azalmasına neden olmaktadır (Del Nobile ve ark 2009). Bu nedenle ısıya duyarlı antimikrobiyal maddelerin ısı işlem olmaksızın taşıyıcı bir polimer matriksi içinde plastik filmlerin yüzeyine kaplanmaları ideal bir yöntemdir (Lee ve ark 2008). Bununla birlikte son yıllarda uçucu yağların doğrudan polimerlere ilavesi ile antimikrobiyal plastik filmlerin üretimine yönelik alınan patentler, bu filmlerin mekanik özellikleri ve antimikrobiyal etkilerine yönelik yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar ümit vericidir (Becerril ve ark 2007, Gutierrez ve ark 2009).

1.8.4. Kekik (*Origanum onites*) Uçucu Yağı

Günümüzde *Origanum* (Kekik) türleri ihraç eden ülkeler arasında Türkiye ilk sıralarda yer almaktadır. *Origanum* cinsi Türkiye' de 22 tür ve 32 takson ile temsil edilmektedir. Türkiye' de yetiştirilen *Origanum* türleri arasında ekonomik açıdan en önemli olanı ise İzmir Kekığı olarak bilinen *Origanum onites*' dir (Ceylan ve ark 1999, Azcan ve ark 2000, Dündar ve ark 2008).

Azcan ve ark (2000) Muğla bölgesinden elde edilen *O. onites* örneklerinin uçucu yağındaki karvakrol, timol, *p*-simen ve γ -terpinen oranlarını sırasıyla %71,22, %5,97, %4,18 ve %2,20 olarak saptamışlardır. Ozel ve ark (2004) Türkiye’ de Denizli bölgesinden elde edilen *O. onites* örneklerinden yüksek sıcaklıkta su ekstraksiyonu, buhar ekstraksiyonu, sokslet ekstraksiyonu metotları ile elde ettikleri uçucu yağlarda karvakrol oranını %68,21 ve %80,17 arasında tespit etmişlerdir. Baydar ve ark (2004) Isparta bölgesinden elde edilen *O. onites* örneklerinde karvakrol oranını %86,9 olarak tespit etmişlerdir.

Karvakrol Gram negatif bakterilerin dış membranlarının yapısal bütünlüğünü bozarak lipopolisakkaritlerin serbest kalmasına, sitoplazmik membranların ATP geçirgenliklerinin artmasına, hücre içi ATP miktarının azalmasına ve hücre dışı ATP miktarının artmasına neden olmaktadır (Helander ve ark 1998).

Baydar ve ark (2004) *O. onites* uçucu yağının aralarında *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *B. cereus* gibi gıda kaynaklı patojenlerinde bulunduğu 15 farklı bakteri türü üzerine antimikrobiyal etkinliğini değerlendirdikleri çalışmalarında <1/100 (*h/h*) konsantrasyonunun tüm bakteri türlerini inhibe ettiğini saptamışlardır.

Körüklüoğlu ve ark (2009) *O. onites* uçucu yağının broth dilusyon metodu ile *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor* ve *Penicillium* türlerine karşı antifungal aktivitesini değerlendirdikleri çalışmalarında minimum fungisidal konsantrasyon değerlerini 0,5 ile 9 $\mu\text{g/ml}$ arasında tespit etmişlerdir.

1.8.5. Karanfil (*Syzygium aromaticum*) Uçucu Yağı

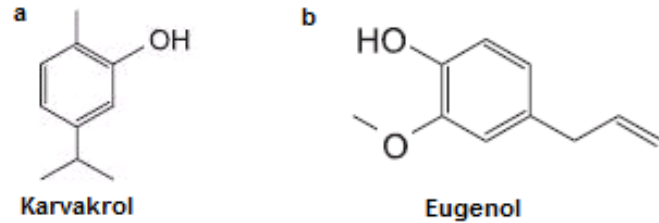
Karanfil yağı, ana vatanı Endonezya olan herdem yeşil *Syzygium aromaticum* ağacının açılmamış tomurcuklarından, yapraklarından ve olgunlaşmamış meyvelerinden elde edilmektedir. (Raina ve ark 2001). Karanfil yağı antimikrobiyal etkisinin yanı sıra göstermiş olduğu farklı biyolojik aktivitelerden dolayı dış hekimliğinde ve kozmetik endüstrisinde yoğun olarak kullanılmaktadır (Srivastava ve ark 2005).

Karanfil yağının ana bileşenleri eugenol, β -karyofilen, α -humulen ve humulen epoksittir. Yapılan çalışmalarda karanfil yağındaki eugenol oranı bitkisel materyal ve ekstraksiyon metoduna bağlı olarak %68 ve %94,4 arasında tespit edilmiştir.

Eugenolden sonra en yüksek oranda tespit edilen bileşen β -karyofilen' dir (Raina ve ark 2001, Srivastava ve ark 2005, Fu ve ark 2007).

Karanfil yağının ana bileşeni olan eugenolün bakterilerde enzim sentezine engel olduğu, hücre duvarının yapısını bozduğu ve hücrenin lize olmasına neden olduğu bildirilmiştir (Thoroski ve ark 1989).

Fu ve ark (2007) broth mikrodilasyon metodu ile karanfil yağının bakteri (*Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *P. aruginosa*) ve küf (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*) türlerine karşı MIC değerlerini 0,062 ile 0,5 (h/h) arasında bulmuşlardır. Smith-Palmer ve ark (1998) karanfil uçucu yağının broth dilasyon metodu ile gıda kaynaklı patojen bakterilere (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. Enteritidis*, *C. jejuni*) karşı bakteriyostatik konsantrasyonunu %0,03 ile %0,05 arasında, bakteriyosidal konsantrasyonunu ise %0,075 ile %0,1 arasında saptamışlardır. Hammer ve ark (1999) broth mikrodilasyon metodu ile karanfil uçucu yağının *S. aureus*, *E. coli* ve *C. albicans* için MIC değerini her üç mikroorganizma için %0,12 olarak tespit etmişlerdir.



Sekil 1.6. Kekik (a) ve karanfil (b) uçucu yağlarının ana bileşenleri karvakrol ve eugenolün kimyasal yapısı (Burt 2004).

1.9. Gıda Kaynaklı Patojenler

Gıda kaynaklı patojen terimi gıdalar ile insanlara bulaşan ve insanlarda hastalık oluşturan çok hücreli parazitleri, protozoaları, mantarları, bakterileri, virusleri ve prionları kapsamaktadır. Bununla birlikte gıda kaynaklı patojenler arasında neden oldukları hastalık sayıları göz önüne alındığında bakteriler ön plana çıkmaktadır (Jay 2000).

ABD’ de her yıl gıda kaynaklı patojenlerden kaynaklanan hastalık vaka sayısı yaklaşık 76 milyon ve bu vakalardan dolayı ölüm sayısı 5000 civarındadır (Mead ve ark 1999). Bu vakalarda hastalık etkeni olarak en sık izole edilen patojenler *Salmonella*, *C. jejuni* ve *E. coli* O157:H7’ dir. *E. coli* O157:H7’ nin neden olduğu ve böbreklerde kalıcı fonksiyon kaybına neden olabilen hemolitik anemi ile karakterize olan hemolitik üremik sendromdan özellikle çocuk ve gençlerin etkilendiği görülmüştür. *L. monocytogenes*’ in neden olduğu vaka sayısı *Salmonella*, *C. jejuni* ve *E. coli* O157:H7’ ye nazaran düşük olmakla beraber ölüm oranı oldukça yüksektir (FDA 2003). AB tarafından gıda güvenliğini tehdit eden risklere zamanında müdahale edilebilmesi amacıyla oluşturulan Hızlı Alarm Sistemi’ nin 2007 yılı verilerine göre patojen mikroorganizmalar nedeniyle yapılan bildirimlerin tüm bildirimler içindeki oranı %20’ dir. Patojenler nedeniyle yapılan bildirim sayısı ağır metal, pestisit ve antibiyotik kalıntıları gibi diğer tüm bildirim kategorileri arasında ilk sıradadır (EFSA 2007). ABD’ de 2008 yılı verilerine göre *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 ile kontamine et ve et ürünleri tüketiciler için oluşturdukları riskler nedeniyle dağıtım ve satış noktalarından geri çekilen et ve ürünlerinin yaklaşık %50’ sini oluşturmaktadır (USDA 2008). Bu durum gıda güvenliği açısından patojen mikroorganizmaların önemini açıkça ortaya koymaktadır.

ABD’ de beş önemli gıda kaynaklı patojenin (*E. coli* O157:H7, diğer Shiga toksin üreten *E. coli* serotipleri, *Campylobacter*, *L. monocytogenes* ve *Salmonella*) neden olduğu ekonomik kayıp yıllık 6,9 milyar doların üzerindedir (USDA 2000).

1.9.1. *Listeria monocytogenes*

Listeria cinsinin üyesi altı tür arasında patojen olan iki tür bulunmaktadır; *Listeria ivanovii* ve *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* özellikle immun sistemi baskılanmış kişilerin duyarlı olduğu ve invaziv formda %20-30 oranında ölümle sonuçlanan listeriozis’ e neden olan önemli bir gıda kaynaklı patojendir. *L. ivanovii* ise çok nadir olarak insanlarda listeriozis’ e neden olur ve daha çok ruminantlarda hastalık etmenidir. *L. monocytogenes* düşük pH ve yüksek konsantrasyonda NaCl varlığında canlı kalabilmesi ve düşük sıcaklıklarda çoğalabilmesi gibi özelliklerinden dolayı gıda sektörü açısından oldukça önemli bir patojendir (Faleiro ve ark 2003, Reissbrodt 2004, Walls ve Buchanan 2005).

Fakültatif, intraselüler bir bakteri olan *L. monocytogenes* psikotrof olma özelliğinden dolayı 0°C ile 45°C aralığında, muhafaza sıcaklığına bağlı olarak %10 tuz konsantrasyonunda ve 4,3-9,6 pH aralığında üreyebilmektedir. Etkenin en önemli virulens faktörü spesifik bir hemolizin olan listeriolizin-O' dur (Erol 2007).

İmmun sistemi baskılanmış bireylerde septisemi, menenjit ve hamile bayanlarda düşüklere neden olan invaziv formun şekillenebilmesi 100-1000 bakteri hücresi yeterlidir. Ateş, ishal, baş, kas ve karın ağrısı ve kusma ile karakterize invaziv olmayan form ise $>10^5$ kob/g düzeyinde kontamine gıdaların tüketilmesiyle oluşabilmektedir (NZFSA 2001a).

1.9.2. *Staphylococcus aureus*

Gıda mikrobiyolojisi yönünden *Staphylococcus* cinsi içindeki en önemli patojen tür *S. aureus*' dur. Termonükleaz, katalaz, hemoliz ve koagülaz aktivitesine sahip olan *S. aureus* suşlarının yaklaşık %50-70' i enterotoksin sentezleyebilmektedir. Süperantijenik yapıdaki *S. aureus* enterotoksinleri gelişmiş ülkelerdeki gıda zehirlenmelerinin başlıca nedenlerinden biridir (Granum 2005, Erol 2007).

Fakültatif ve mezofil özellikte bir bakteri olan *S. aureus* 6-48°C aralığında, 4,2-9,3 pH aralığında, %25 tuz konsantrasyonunda ve 0,85 a_w değerinde üreyebilir. Aerobik koşullarda toksin oluşturma yeteneği fazla olan *S. aureus* 10-45°C aralığında, 5,3-7,0 pH aralığında ve 0,85 a_w değerinde enterotoksin sentezleyebilmektedir (NZFSA 2001b).

S. aureus enterotoksinleri kimyasal ve antijenik özellikleri esas alınarak alfabetik sıraya göre adlandırılmaktadırlar. Stafilakokal intoksikasyonların yaklaşık %80' inden A tipi toksin sorumludur. *S. aureus* enterotoksinleri protein yapısında olmasına rağmen molekülün aktif kısmı ısıya dayanıklıdır. Bu nedenle yüksek ısıya maruz kalan ürünler dahi *S. aureus* enterotoksinleri açısından riskli ürünlerdir (Granum 2005, Erol 2007).

1.9.3. *Escherichia coli* O157:H7

Gıda kaynaklı bir patojen olarak tanımlandığı 1982 yılından bu yana ölümlerle sonuçlanan çoğu gıda kaynaklı enfeksiyonlardan sorumlu tutulan *E. coli* O157:H7'nin neden olduğu hemorajik kolitis ve hemolitik üremik sendrom başta çocuklar olmak üzere tüm yaş gruplarını etkilemektedir. *E. coli* O157:H7 enfeksiyonlarının en önemli kaynağı kontamine et ve et ürünleridir. Minimal enfeksiyon dozunun oldukça düşük olması ve asit adaptasyon yeteneği gıda kaynaklı bir patojen olarak *E. coli* O157:H7'nin önemini arttırmaktadır (Erol 2007, Simsek ve ark 2007)

Patojenik *E. coli* gruplarından biri olan Enterohemorajik (EHEC) grup üyesi olan *E. coli* O157:H7 serotipinin optimum üreme sıcaklığı 37°C olmakla beraber 8-46°C aralığında üreyebilir ve oldukça düşük (3,6) pH değerlerinde canlılığını sürdürebilir. Etken asidik gıdalarda canlılığını koruyabilme özelliği fermente sucuk ve elma suyu gibi asidik gıdaların tüketilmesinden kaynaklanan enfeksiyonlara açıklık getirmektedir. Etkenin gelişimi %8,5' lik tuz konsantrasyonu ile baskılanmaktadır (NZFSA 2001c, Erol 2007).

E. coli O157:H7 serotipi yapısal ve etki mekanizması olarak *Shigella* toksinlerine oldukça benzer iki tip toksin sentezleyebilmektedir. Bu benzerlikten dolayı Shiga toksin olarak isimlendirilen sitotoksik *E. coli* O157:H7 toksinleri insanlarda kolon ve böbrek glomerlerini etkileyerek hemorajik kolitis ve hemolitik üremik sendroma neden olmaktadır (Granum 2005, Erol 2007).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Filmlerin Hazırlanmasında Kullanılan Gereçler

Film solüsyonlarının hazırlanmasında kullanılan yengeç kabuklarından elde edilmiş, orta moleküler ağırlıkta ve %75-85 deasetilasyon derecesinde kitosan (CAS no; 9012-76-49) Sigma-Aldrich (Milwaukee, ABD)' den temin edilmiştir. *Origanum onites* türünden su buharı distilasyonu ile elde edilmiş ve Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmokokinetik Uygulama ve Araştırma Merkezi analiz raporuna göre % 79,87 oranında karvakrol içeren kekik uçucu yağı (CAS no; 8007-11-2) İnan Tarım (Antalya, Türkiye)' dan, *Syzygium aromaticum* türünün tomurcuklarından elde edilmiş ve sertifikasına göre % 88 oranında eugenol içeren karanfil uçucu yağı (CAS no; 8000-34-8) ise Sigma-Aldrich' den temin edilmiştir. Gliserol, Tween 20 ve glasiyal asetik asit Merck Co. (Darmstadt, Almanya)' dan temin edilmiştir.

Yenilebilir filmlerin hazırlanmasında kalıp olarak kullanılan 85 mm çapında pileksiglas petri kutuları Isolab GMBH (Wertheim, Almanya)' den temin edilmiştir. Hazırlanan film solüsyonlarının kaplandığı 20 µm kalınlığında, bir yüzü korona uygulamasına tabi tutulmuş, çift taraflı gerdirilmiş PP filmler Polinas A.Ş. (Manisa, Türkiye)' den temin edilmiştir.

2.1.2. Mikrobiyolojik Analizlerde Kullanılan Gereçler

Referans mikroorganizma kültürlerinin hazırlanması ve muhafazası için kullanılan Nutrient Broth; mikroorganizma sayımlarında örneklerin dilusyonu için kullanılan Buffered Peptone Water ve Maximum Recovery Diluent; *S. aureus* sayımında kullanılan Baird Parker Agar ve Egg Yolk Tellurite Emulsion; *L. monocytogenes* sayımında kullanılan Oxford Agar ve Oxford Listeria Selective Supplement; *E. coli* O157:H7 aranması ve sayımında kullanılan Sorbitol MacConkey (SMAC) Agar Merck Co.' dan temin edilmiştir.

E. coli O157:H7 aranmasında kullanılan EHEC Enrichment Broth ve Vancomycin Cefixime Cefsulodin Supplement; *L. monocytogenes* aranmasında

kullanılan Fraser Broth, Half Fraser Supplement ve Fraser Supplement Oxoid Limited (Cambridge, İngiltere)' den temin edilmiştir.

E. coli O157:H7 aranmasında ve sayımında kullanılan Cefixime-Tellurite (CT) supplement; *L. monocytogenes* aranmasından kullanılan ELFA temelli VIDAS LMO II test kiti; identifikasyon amacıyla VITEK II otomatize biyokimyasal identifikasyon sisteminde kullanılan VITEK II GN ve VITEK II GP kartları bioMérieux Co. (Marcy l'Etoile, Fransa) firmasından temin edilmiştir.

E. coli O157:H7' nin serolojik identifikasyonunda kullanılan lateks test kiti Remel Inc. (Lenexa, ABD)' den temin edilmiştir.

2.1.3. Mikroorganizmalar

Kaşar peynirleri örneklerinin yapay kontaminasyonu için kullanılan *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) ve *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) referans mikroorganizma kültürleri liyofilize halde Microbiologics Inc. (Saint Cloud, ABD)' den temin edilmiştir. Bir gıda numunesinden izole edilerek biyokimyasal ve serolojik olarak identifiye edilen *Escherichia coli* O157:H7 serotipi Konya İl Kontrol Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

2.1.4. Kaşar Peyniri Örnekleri

Hazırlanan filmlerin antimikrobiyal etkisinin değerlendirilmesinde matriks olarak kullanılan kaşar peyniri örnekleri Büyük Aygın A.Ş. (Konya, Türkiye)' den temin edilmiştir.

Yapay kontaminasyon için kullanılacak kaşar peynirleri tam otomatik dilimleme makinesi (Bizerba, Almanya) ile 3 mm kalınlığında dilimlenmiştir. Mikrobiyolojik analizlerde ve bakteri sayılarının hesaplanmasında kolaylık sağlaması amacıyla ≈ 10 g ağırlığında (5,5×5,5 cm) dilimler kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Film Solüsyonlarının Hazırlanması

Kitosanın (%2, *a/h*) asetik asit (%1, *h/h*) çözeltisi içinde çözündürülmesi ile saf kitosan solüsyonu hazırlanmıştır. Solüsyona plastikleştirici olarak %0,7 (*h/h*) oranında gliserol ilave edilmiştir. Hazırlanan solüsyon manyetik karıştırıcı (Heidolph, Almanya) ile 6 saat boyunca karıştırılmıştır. Kitosan solüsyonundan çözünmeyen partiküllerin uzaklaştırılması için 50 ml' lik santrifüj tüplerinde 5000 rpm' de 5 d santrifüj (Hettich, Almanya) edilmiştir (Ponce ve ark 2008).

Tween 20 içeren kompozit kitosan solüsyoları %0,1 (*h/h*) oranında Tween 20 ilave edilen saf kitosan solüsyonunun homojenizer (Ika, Almanya) ile 20000 rpm' de 1 d homojenize edilmesi ile elde edilmiştir.

Uçucu yağ içeren kompozit kitosan solüsyonları hazırlanan saf kitosan solüsyonuna kekik ve karanfil uçucu yağlarının %0,5 ve %1 (*h/h*) oranında ilave edilmesi ile elde edilmiştir. Kekik ve karanfil uçucu yağlarının film solüsyonu içinde homojen bir şekilde dağılması için uçucu yağlar öncelikle Tween 20 ile vortex (Heidolph, Almanya) yardımı ile karıştırılmışlardır (Zivanovic ve ark 2005). Tween 20 (%0,5, *h/h*) ile karıştırılan uçucu yağların ilavesinden sonra kompozit film solüsyonları homojenizer ile 20000 rpm' de 1 d homojenize edilmiştir.

2.2.2. Yenilebilir Filmlerin Hazırlanması

Yenilebilir filmler solvent evaporasyon metodu ile hazırlanmıştır. Hazırlanan film solüsyonları 28 ml (10 mg kitosan/cm²) olarak 85 mm çapında pleksiglas petri kutularına taksim edilmiş ve 20 saat boyunca 25°C' de biyogüvenlik kabini (Faster, İtalya) içerisinde evaporasyona tabi tutulmuştur. Evaporasyon sonunda oluşan filmler kullanım aşamasına kadar petri kutularında 4°C' de muhafaza edilmiştir. Antimikrobiyal etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla 5 farklı yenilebilir film hazırlanmıştır;

Ki; Saf kitosan solüsyonu ile hazırlanmış yenilebilir filmler

KiKe (%0,5); %0,5 oranında kekik uçucu yağı ilave edilmiş kompozit kitosan solüsyonu ile hazırlanmış yenilebilir filmler

KiKe (%1); %1 oranında kekik uçucu yağı ilave edilmiş kompozit kitosan solüsyonu ile hazırlanmış yenilebilir filmler

KiKa (%0,5); %0,5 oranında karanfil uçucu yağı ilave edilmiş kompozit kitosan solüsyonu ile hazırlanmış yenilebilir filmler

KiKa (%1); %1 oranında karanfil uçucu yağı ilave edilmiş kompozit kitosan solüsyonu ile hazırlanmış yenilebilir filmler

2.2.3. PP Filmlerin Kaplanması

Kaplanmış plastik filmler film solüsyonlarının manüel ince tabaka kaplayıcısı (Desaga, Almanya) ile 20×20 cm ebadındaki çift taraflı gerdirilmiş PP filmlerin korona uygulaması yapılmış yüzlerine kaplanması ile elde edilmiştir. Kaplama işleminden önce filmlerin korona uygulaması yapılmış yüzleri korona test kalemi (Arcotest, Almanya) ile doğrulanmıştır. Kaplama işlemi ıslak kaplama kalınlığı 500 µm' ye ayarlanarak yapılmıştır. Kaplama işlemi sonrası filmler 25°C' de 6 saat evaporasyona bırakılmıştır. Evaporasyon sonunda kaplanmış PP filmler kullanım aşamasına kadar stomacher poşetleri içinde 4°C' de muhafaza edilmiştir. Antimikrobiyal etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla 3 farklı kaplanmış plastik film hazırlanmıştır;

PPKi; Tween 20 ilave edilmiş kompozit kitosan solüsyonu ile kaplanmış plastik filmler

PPKe; %1 oranında kekik uçucu yağı ilave edilmiş kompozit kitosan solüsyonu ile kaplanmış plastik filmler

PPKa; %1 oranında karanfil uçucu yağı ilave edilmiş kompozit kitosan solüsyonu ile kaplanmış plastik filmler

2.2.4. Film Kalınlıklarının Ölçülmesi

Film kalınlıkları, her film tipinden 3 film örneğinin 5 farklı noktasından dijital mikrometre (Preisser, Almanya) ile 1 µm hassasiyetinde ölçülmüştür ve ölçüm sonuçlarının ortalaması alınmıştır.

2.2.5. Örneklerin Hazırlanması ve Muhafazası

Kontaminasyon çalışması öncesinde kaşar peyniri örneklerinin pH değerleri pH metre (WTW, Almanya) ile tespit edilmiştir.

Yapay kontaminasyon için *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 ve *S. aureus* ile doğal olarak kontamine olmayan kaşar peyniri örnekleri kullanılmıştır. Bu nedenle yapay kontaminasyon öncesinde örneklerde *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7 varlığı araştırılmıştır.

***L. monocytogenes* aranması**

Selektif ön zenginleştirme amacıyla 225 ml Half Fraser Broth' a 25 g örnek ilave edilerek stomacher (IUL, İspanya) yardımı ile homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sonrası $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de 25 ± 1 saat inkübe edilmiştir. Selektif ikincil zenginleştirme amacıyla Half Fraser Broth besiyerinden 1 ml, 10 ml Fraser Broth' a ilave edilmiş ve $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de 25 ± 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda ikincil zenginleştirmenin 0,5 ml' si ELFA tekniği için kullanılmıştır. Bu amaçla VIDAS cihazı (bioMérieux, Fransa) ve LMO II test kiti kullanılmış ve sonuçlar örneklerden elde edilen RFV değerlerinin test kiti ile sağlanan kontrol antijeninden elde edilen RFV değerine oranı ile kalitatif olarak değerlendirilmiştir (Health Canada 2003).

***S. aureus* aranması**

225 ml Buffered Peptone Water' a 25 g örnek ilave edilerek stomacher yardımı ile homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sonrası süspansiyonun 0,5 ml' si paralel olarak Baird Parker Agar' a inoküle edilerek yayılmıştır. $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de 48 ± 2 saat inkübasyon sonunda Baird Parker Agar üzerinde siyah ve çevresinde zon oluşturan koloniler şüpheli olarak değerlendirilmektedir (HPA 2005a).

***E. coli* O157:H7 aranması**

Selektif zenginleştirme amacıyla 225 ml EHEC Enrichment Broth' a 25 g örnek ilave edilerek stomacher yardımı ile homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sonrası $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de 24 ± 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda EHEC Enrichment Broth' dan CT-SMAC Agar besiyerine öze ile geçiş yapılmış ve $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de 24 ± 1 saat inkübe edilmiştir. CT-SMAC Agar üzerinde 1-2 mm çapında ve renksiz koloniler şüpheli olarak değerlendirilmektedir (FDA 2002).

Yapay kontaminasyon

L. monocytogenes, *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7 stok kültürleri %15 gliserol içeren nutrient broth içinde -18°C’ de muhafaza edilmiştir. Alt kültürleme aşamalarında saflık ve biyokimyasal kontrolleri yapılmıştır (ISO 2000).

Yapay kontaminasyon için öncelikle mikroorganizmaların stok kültürlerinden nutrient broth’ a geçiş yapılmıştır. 37±1°C’ de 16-18 saat inkübasyon sonunda Nutrient Broth’ dan Maximum Recovery Diluent ile dilusyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan dilusyonlardaki mikroorganizma sayıları *L. monocytogenes* için Oxford Agar, *E. coli* O157:H7 için CT-SMAC Agar ve *S. aureus* için Baird Parker Agar kullanılarak 37±1°C’ de 18-20 saat inkübasyon sonunda tespit edilmiştir. Uygun sayıda mikroorganizma içeren dilusyonlardaki mikroorganizma sayısı Maximum Recovery Diluent yardımıyla yaklaşık 10⁷ kob/ml düzeyine ayarlanmıştır. Uygun dilusyonların belirlenmesine kadar dilusyonlar 4°C’ de muhafaza edilmişlerdir.

Steril petri kutuları içine konulan kaşar peyniri dilimleri (≈10 g) inokulum olarak hazırlanan dilusyonun 0,1 ml’ si ile kontamine edilmiştir. İnoküle edilen hacim örneklerin yüzeyine drigalski spatülü yardımı ile yayılmıştır. Böylece yaklaşık 10⁵ kob/g (5 Log kob/g) düzeyinde kontamine edilen örnekler inokulumun absorbe olması ve bakteriyal tutunmayı sağlamak amacıyla 4°C’ de 15 d bekletilmişlerdir.

Kontamine edilmiş örneklerin ambalajlanmasından önce başlangıç kontaminasyon düzeyleri 2.6.3’ de anlatıldığı şekilde belirlenmiştir.

Örneklerin ambalajlanması

Yenilebilir filmler için kontrol grubu olarak kontamine edilmiş ve kitosan filmleri ile kaplanmamış, kaplanmış filmler için kontamine edilmiş ve kaplanmamış PP filmler ile kaplanmış kaşar peyniri dilimleri kullanılmıştır.

Kontamine kaşar peyniri dilimlerinin kaplanması için 6×6 cm ebadında filmler kullanılmıştır. Böylece kaşar peyniri dilimlerinin filmler ile tamamen teması sağlanmıştır. Örneklerin kaplanmasından önce filmlerin örnekler ile temas edecek yüzleri biyogüvenlik kabini içinde 2 d UV ışık altında tutularak sterilize edilmiştir (Ye ve ark 2008b). Filmlerin sterilizasyonu sonrası kontamine kaşar peyniri dilimleri

iki film arasında steril stomacher poşetleri içine alınmış ve ısı kapatma cihazı (Uzvac, Türkiye) ile ambalajlanmıştır.

Örneklerin muhafazası

Hazırlanan örnekler soğutmalı inkübatörde (Binder, Almanya) $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de 14 gün süreyle muhafaza edilmişlerdir. Muhafazanın 1., 7. ve 14. günlerinde örneklerdeki *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7 sayıları saptanmıştır.

2.2.6. Mikroorganizma Sayımları

Örneklerdeki *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7 sayıları 10 g örnek kullanılarak tespit edilmiştir. Kontaminasyon için kullanılan örneklerin ≈ 10 g olması nedeniyle muhafazanın 1., 7. ve 14. günlerinde mikroorganizma sayımları için bir adet örnek kullanılmıştır.

Mikroorganizma sayımları için 90 ml Maximum Recovery Diluent' e 10 g örnek ilave edilerek stomacher yardımı ile homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sonrası 10^{-2} ve 10^{-3} ' lük dilasyonlar Maximum Recovery Diluent ile hazırlanmıştır. Mikroorganizma sayıları dilasyonlardan paralel ekimlerden elde edilen sonuçlar ile belirlenmiştir (HPA 2005b). Gerekli görüldüğünde karakteristik koloniler otomatize identifikasyon sistemi VITEK II ile doğrulanmıştır.

***L. monocytogenes* sayımı**

Hazırlanan dilasyonlardan Oxford Agar' a 0,1 ml inoküle edilerek yayılmıştır. $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de 24 ± 1 saat inkübasyon sonunda eskulin hidrolizi ve eskulinin hidrolizi sonucu oluşan eskuletinin ferrik demir ile reaksiyonu sonucu siyah zon oluşturmuş kahverengi-yeşil koloniler sayılarak örneklerdeki *L. monocytogenes* sayısı tespit edilmiştir (ISO 1998).

***S. aureus* sayımı**

Hazırlanan dilasyonlardan Baird Parker Agar' a 0,1 ml inoküle edilerek yayılmıştır. $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de 48 ± 2 saat inkübasyon sonunda telluritin indirgenmesi ve lesitinaz aktivitesi sonucu oluşan siyah renkli ve zon oluşturmuş koloniler sayılarak örneklerdeki *S. aureus* sayısı tespit edilmiştir (HPA 2005a).

***E. coli* O157:H7 sayımı**

Hazırlanan dilusyonlardan CT-SMAC Agar besiyerine 0,1 ml inoküle edilmiştir. $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de 24 ± 1 saat inkübasyon sonunda sorbitol negatif olan renksiz koloniler sayılarak örneklerdeki *E. coli* O157:H7 sayısı tespit edilmiştir (FDA 2002).

2.2.7. İstatistiksel Değerlendirme

Bağımsız üç tekrar olarak yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar istatistik analiz yazılımı (SPSS 2000) kullanılarak tek yönlü varyans analizi (One way ANOVA) ile değerlendirilmiş ve ortalama değerler %95 güven düzeyinde Duncan çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırılmıştır.



Resim 2.1. A; yapay kontaminasyon, B; kaplanmış plastik filmlerin hazırlanması, C; yenilebilir filmlerin UV ışık ile sterilasyonu, D; film ile kaplanmış kaşar peyniri örneği, E; ısıtma için hazırlanan örnekler, F; muhafaza için hazır örnek.

3. BULGULAR

3.1. Kaşar Peyniri Örnekleri

Hazırlanan filmlerin antimikrobiyal etkisinin değerlendirilmesinde matriks olarak kullanılan kaşar peyniri örneklerinde yapay kontaminasyon öncesi *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7 tespit edilmemiştir.

Yapay kontaminasyon öncesinde kaşar peyniri örneklerinin pH değerleri $5,52 \pm 0,08$ ($n=3$) olarak tespit edilmiştir.

3.2. Film Kalınlıkları

Hazırlanan yenilebilir filmlerin kalınlıkları $87,93 \mu\text{m}$ ile $114,00 \mu\text{m}$ arasında tespit edilmiştir (Çizelge 3.1). En düşük ve en yüksek kalınlık değerleri sırasıyla saf kitosan filmlerinden (Ki) ve %1 kekik uçucu yağı içeren kitosan filmlerinden (KiKe %1) elde edilmiştir. Uçucu yağ ve Tween 20 ilavesinin film kalınlıklarını önemli düzeyde arttırdığı görülmüştür ($P < 0,05$).

Kaplanmış plastik filmlerin kalınlıkları $35,93 \mu\text{m}$ ile $39,40 \mu\text{m}$ arasında tespit edilmiştir (Çizelge 3.1). En düşük ve en yüksek kalınlık değerleri sırasıyla Tween 20 içeren kitosan solüsyonu ile kaplanmış filmlerden (PPKi) ve %1 kekik uçucu yağı içeren kitosan solüsyonu ile kaplanmış filmlerden (PPKe) elde edilmiştir. Uçucu yağ ilavesinin film kalınlıklarını önemli düzeyde arttırdığı görülmüştür ($P < 0,05$).

Çizelge 3.1. Film kalınlıkları.

Film tipi	Kalınlık (μm) [*]
<i>Yenilebilir</i>	
Ki	$87,93 \pm 7,63^a$
KiKe (%0,5)	$104,67 \pm 10,70^b$
KiKe (%1)	$114,00 \pm 7,86^c$
KiKa (%0,5)	$100,33 \pm 7,83^b$
KiKa (%1)	$111,00 \pm 8,77^c$
<i>Kaplanmış plastik</i>	
PPKi	$35,93 \pm 1,98^a$
PPKe	$39,40 \pm 1,68^b$
PPKa	$38,40 \pm 1,59^b$

* Ortalama \pm standart sapma ($n=15$)

^a Farklı üssel ifadeye sahip değerler arasında fark istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0,05$)

3.3. Yenilebilir Filmlerin Antimikrobiyal Etkileri

Hazırlanan tüm yenilebilir film tiplerinin kaşar peyniri örneklerindeki *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7 sayılarını 4°C’ de 14 günlük muhafaza periyodu sonunda kontrol grubuna göre önemli düzeyde ($P<0,05$) azalttığı tespit edilmiştir. Örneklerde muhafaza periyodunun 1., 7. ve 14. gününde yapılan sayımlar sonucu belirlenen mikroorganizma sayıları Çizelge 3.2’ de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Yenilebilir filmlerin kaşar peyniri örneklerinde *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7’ ye karşı etkileri.

Film tipi	Kontaminasyon düzeyi	Muhafaza süresi (gün)		
		1	7	14
<i>L. monocytogenes</i>				
Kontrol		5,15±0,23 ^a	5,36±0,14 ^a	5,41±0,21 ^a
Ki		4,88±0,15 ^{ab}	4,46±0,21 ^b	4,23±0,36 ^b
KiKe (%0,5)	5,11±0,22 [*]	4,52±0,17 ^c	3,82±0,27 ^{cd}	3,22±0,81 ^c
KiKe (% 1)		4,32±0,16 ^c	3,46±0,57 ^d	3,02±0,38 ^c
KiKa (% 0,5)		4,63±0,16 ^{bc}	4,13±0,26 ^{bc}	3,62±0,33 ^{bc}
KiKa (% 1)		4,43±0,18 ^c	3,77±0,17 ^{cd}	3,32±0,42 ^c
<i>S. aureus</i>				
Kontrol		4,95±0,27 ^a	4,92±0,23 ^a	4,75±0,23 ^a
Ki		4,67±0,24 ^{ab}	4,16±0,16 ^b	3,85±0,34 ^b
KiKe (%0,5)	4,92±0,31	4,45±0,30 ^{bc}	3,62±0,23 ^{cd}	3,06±0,37 ^c
KiKe (% 1)		4,28±0,06 ^c	3,48±0,14 ^d	2,09±0,36 ^d
KiKa (% 0,5)		4,52±0,11 ^{abc}	3,94±0,15 ^{bc}	3,11±0,07 ^c
KiKa (% 1)		4,28±0,22 ^{bc}	3,68±0,26 ^{cd}	2,74±0,68 ^{cd}
<i>E. coli</i> O157:H7				
Kontrol		4,79±0,23 ^a	4,76±0,15 ^a	4,51±0,11 ^a
Ki		4,62±0,13 ^b	4,17±0,19 ^b	3,76±0,20 ^b
KiKe (%0,5)	4,88±0,21	4,24±0,06 ^b	3,82±0,18 ^c	2,99±0,13 ^c
KiKe (% 1)		4,16±0,24 ^b	3,31±0,09 ^e	2,19±0,20 ^d
KiKa (% 0,5)		4,46±0,20 ^{ab}	3,75±0,26 ^{cd}	2,87±0,66 ^c
KiKa (% 1)		4,24±0,26 ^b	3,46±0,22 ^{de}	2,75±0,08 ^c

* Ortalama ± standart sapma (n=3), Log kob/g

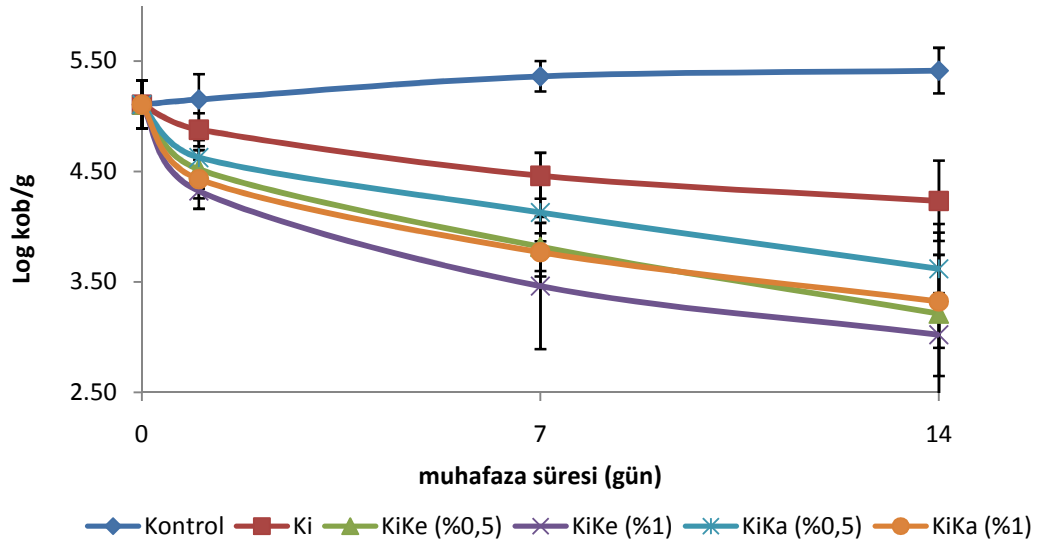
^a Aynı sütunda farklı üssel ifadeye sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0,05$)

3.3.1. *L. monocytogenes*

Kontrol grubu olarak yenilebilir filmler ile kaplanmamış kaşar peyniri örneklerinde *L. monocytogenes* sayısının 14 günlük muhafaza periyodu sonunda 5,11 Log kob/g' dan 5,41 Log kob/g' a yükseldiği görülmüştür.

Yenilebilir filmler ile kaplanmış kaşar peyniri örneklerinde *L. monocytogenes* sayısının 14. gün sonunda kontrol grubuna nazaran 1,18 Log ile 2,39 Log arasında azaldığı ve muhafaza periyodu boyunca yapılan sayım sonuçlarına göre tüm film tiplerinin kontrol grubuna göre antimikrobiyal etkisinin önemli düzeyde ($P<0,05$) olduğu tespit edilmiştir. Muhafaza periyodu sonunda en düşük ve en yüksek *L. monocytogenes* sayıları sırasıyla %1 oranında kekik uçucu yağı ile hazırlanan kitosan (KiKe (%1)) ve saf kitosan (Ki) filmleri ile kaplanmış örneklerde tespit edilmiştir.

Film solüsyonuna %0,5 ve %1 oranında kekik ve %1 oranında karanfil uçucu yağı ilavesinin kitosan filmlerinin *L. monocytogenes*' e karşı etkisini önemli düzeyde arttırdığı ($P<0,05$) tespit edilmiştir. Bununla birlikte %0,5 oranında karanfil uçucu yağı ilavesinin *L. monocytogenes* üzerine etkisinin önemli düzeyde ($P>0,05$) olmadığı saptanmıştır.



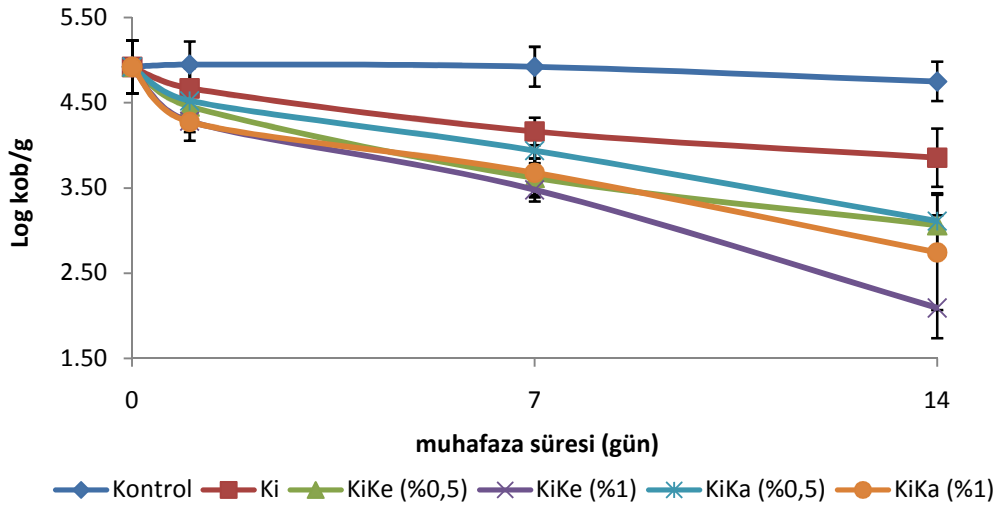
Şekil 3.1. Yenilebilir filmler ile kaplanmış kaşar peyniri örneklerinde *L. monocytogenes* sayısındaki değişimler.

3.3.2. *S. aureus*

Kontrol grubu olarak yenilebilir filmler ile kaplanmamış kaşar peyniri örneklerinde *S. aureus* sayısının 14 günlük muhafaza periyodu sonunda 4,92 Log kob/g' dan 4,75 Log kob/g' a düştüğü görülmüştür.

Yenilebilir filmler ile kaplanmış kaşar peyniri örneklerinde *S. aureus* sayısının 14. gün sonunda kontrol grubuna nazaran 0,90 Log ile 2,66 Log arasında azaldığı ve tüm film tiplerinin kontrol grubuna göre antimikrobiyal etkisinin önemli düzeyde ($P<0,05$) olduğu tespit edilmiştir. Muhafaza periyodu sonunda en düşük ve en yüksek *S. aureus* sayıları sırasıyla %1 oranında kekik uçucu yağı içeren kitosan (KiKe (%1)) ve saf kitosan (Ki) filmleri ile kaplanmış örneklerde tespit edilmiştir.

Muhafaza periyodu sonunda yapılan sayım sonuçlarına göre film solüsyonlarına %0,5 ve %1 oranında kekik ve karanfil uçucu yağı ilavesinin kitosan filmlerinin *S. aureus*' a karşı etkisini önemli düzeyde arttırdığı ($P<0,05$) tespit edilmiştir. Örneklerinde *S. aureus* sayısında en fazla azalmayı sağlayan %1 oranında kekik uçucu yağı ile hazırlanan kitosan filmlerinden elde edilen sonuçlar ile %0,5 oranında kekik (KiKe (%0,5)) ve karanfil uçucu yağı (KiKa (%0,5)) ile hazırlanan filmlerden elde edilen sonuçlar arasındaki fark önemli düzeyde ($P<0,05$) bulunmuştur.



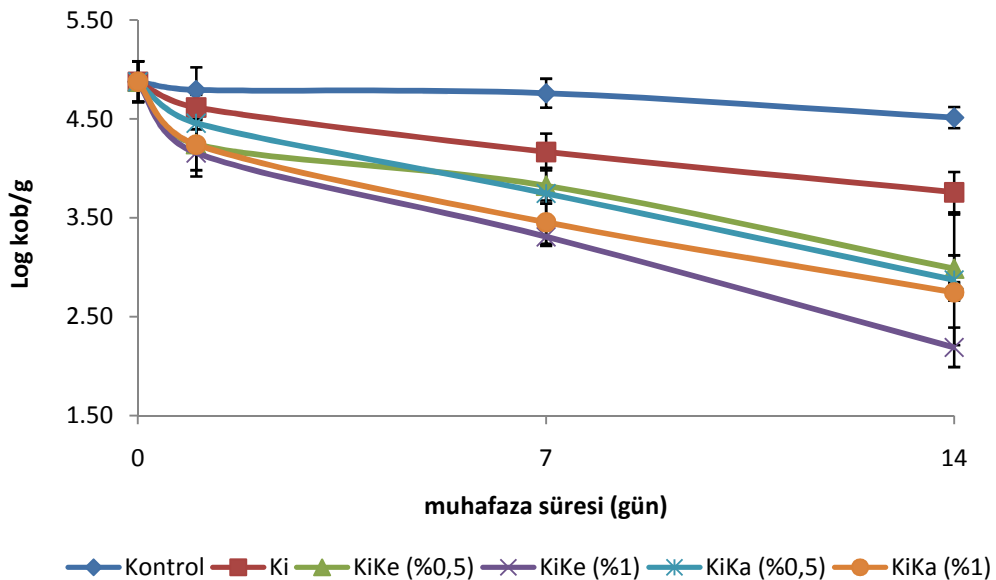
Şekil 3.2. Yenilebilir filmler ile kaplanmış kaşar peyniri örneklerinde *S. aureus* sayısındaki değişimler.

3.3.3. *E. coli* O157:H7

Kontrol grubu olarak yenilebilir filmler ile kaplanmamış kaşar peyniri örneklerinde *E. coli* O157:H7 sayısının 14 günlük muhafaza periyodu sonunda 4,88 Log kob/g' dan 4,51 Log kob/g' a düştüğü görülmüştür.

Yenilebilir filmler ile kaplanmış kaşar peyniri örneklerinde *E. coli* O157:H7 sayısının 14. gün sonunda kontrol grubuna nazaran 0,75 Log ile 2,32 Log arasında azaldığı ve tüm film tiplerinin kontrol grubuna göre antimikrobiyal etkisinin önemli düzeyde ($P<0,05$) olduğu tespit edilmiştir. Muhafaza periyodu sonunda en düşük ve en yüksek *E. coli* O157:H7 sayıları sırasıyla %1 oranında kekik uçucu yağı ile hazırlanan kitosan (KiKe (%1)) ve saf kitosan (Ki) filmleri ile kaplanmış örneklerde tespit edilmiştir.

Muhafaza periyodu sonunda yapılan sayım sonuçlarına göre %0,5 ve %1 oranında kekik ve karanfil uçucu yağı ilavesinin kitosan filmlerin *E. coli* O157:H7' ye karşı etkisini önemli düzeyde arttırdığı ($P<0,05$) tespit edilmiştir. Kaşar peyniri örneklerinde %1 oranında kekik uçucu yağı ile hazırlanan kitosan filmlerinden elde edilen sonuçlar ile uçucu yağ içeren diğer filmlerden elde edilen sonuçlar arasındaki fark önemli düzeyde ($P<0,05$) bulunmuştur.



Şekil 3.3. Yenilebilir filmler ile kaplanmış kaşar peyniri örneklerinde *E. coli* O157:H7 sayısındaki değişimler.

3.4. Kaplanmış PP Filmlerinin Antimikrobiyal Etkileri

Hazırlanan tüm kaplanmış plastik film tiplerinin kaşar peyniri örneklerindeki *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7 sayılarını 4°C’ de 14 günlük muhafaza periyodu boyunca kontrol grubuna göre önemli düzeyde ($P<0,05$) azalttığı tespit edilmiştir. Örneklerde muhafaza periyodunun 1., 7. ve 14. gününde yapılan sayımlar sonucu belirlenen mikroorganizma sayıları Çizelge 3.3’ de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Kaplanmış plastik filmlerin kaşar peyniri örneklerinde *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7’ ye karşı etkileri.

Film tipi	Kontaminasyon düzeyi	Muhafaza süresi (gün)		
		1	7	14
<i>L. monocytogenes</i>				
Kontrol (PP)		5,11±0,25 ^a	5,26±0,20 ^a	5,34±0,16 ^a
PPKi	5,11±0,22 [*]	4,99±0,16 ^{ab}	4,74±0,15 ^b	5,64±0,25 ^b
PPKe		4,68±0,16 ^b	4,27±0,17 ^c	4,02±0,30 ^c
PPKa		4,80±0,17 ^{ab}	4,38±0,24 ^c	4,28±0,24 ^{bc}
<i>S. aureus</i>				
Kontrol (PP)		5,00±0,10 ^a	4,89±0,24 ^a	4,71±0,21 ^a
PPKi	4,92±0,31	4,66±0,34 ^{ab}	4,38±0,14 ^b	4,10±0,15 ^b
PPKe		4,45±0,30 ^b	4,02±0,19 ^b	3,31±0,43 ^c
PPKa		4,56±0,26 ^{ab}	4,04±0,43 ^b	3,47±0,40 ^c
<i>E. coli</i> O157:H7				
Kontrol (PP)		4,85±0,13 ^a	4,78±0,16 ^a	4,47±0,29 ^a
PPKi	4,88±0,21	4,74±0,16 ^{ab}	4,36±0,20 ^b	3,98±0,17 ^b
PPKe		4,40±0,10 ^b	3,86±0,25 ^c	3,29±0,32 ^c
PPKa		4,43±0,28 ^b	4,16±0,24 ^{bc}	3,69±0,25 ^{bc}

* Ortalama ± standart sapma ($n=3$), Log kob/g

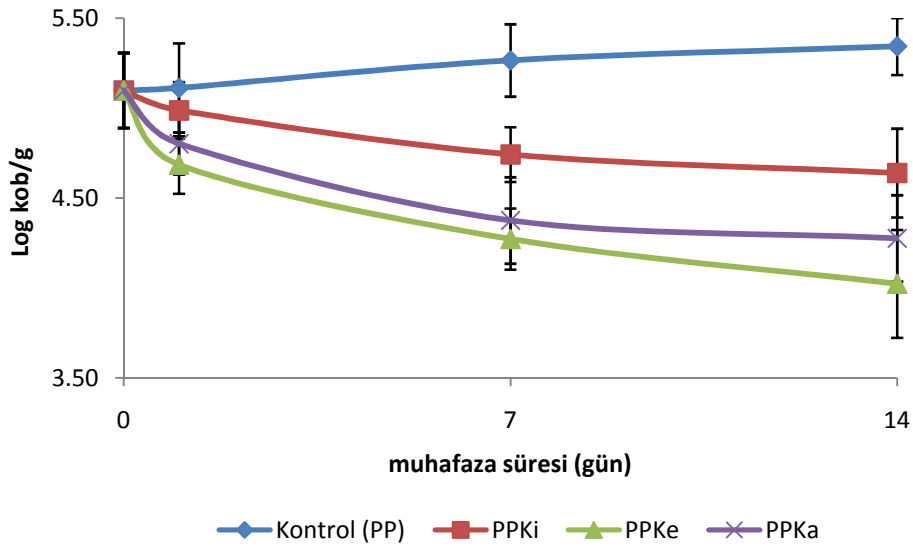
^a Aynı sütunda farklı üssel ifadeye sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0,05$)

3.4.1. *L. monocytogenes*

Kontrol grubu olarak kitosan solüsyonları ile kaplanmamış PP filmler ile kaplanmış kaşar peyniri örneklerinde *L. monocytogenes* sayısının 14 günlük muhafaza periyodu sonunda 5,11 Log kob/g’ dan 5,34 Log kob/g’ a yükseldiği görülmüştür.

Kaplanmış plastik filmler ile kaplanmış kaşar peyniri örneklerinde *L. monocytogenes* sayısının 14. gün sonunda 0,70 Log ile 1,32 Log arasında azaldığı ve tüm film tiplerinin kontrol grubuna göre antimikrobiyal etkisinin önemli düzeyde ($P<0,05$) olduğu tespit edilmiştir. Muhafaza periyodu sonunda en düşük ve en yüksek *L. monocytogenes* sayıları sırasıyla %1 oranında kekik uçucu yağı içeren kitosan solüsyonu (PPKe) ve Tween 20 içeren kitosan solüsyonu (PPKi) ile hazırlanan filmler ile kaplanmış örneklerde tespit edilmiştir.

Muhafaza periyodu sonunda PPKi ile kaplanmış örneklerdeki *L. monocytogenes* sayısı PPKe ile kaplanmış örneklerdeki *L. monocytogenes* sayısına nazaran önemli düzeyde ($P<0,05$) yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte muhafaza periyodu sonunda PPKi ve %1 oranında karanfil uçucu yağı içeren kitosan solüsyonu (PPKa) ile kaplanmış örneklerdeki *L. monocytogenes* sayıları arasındaki farkın önemli düzeyde olmadığı ($P>0,05$) tespit edilmiştir.



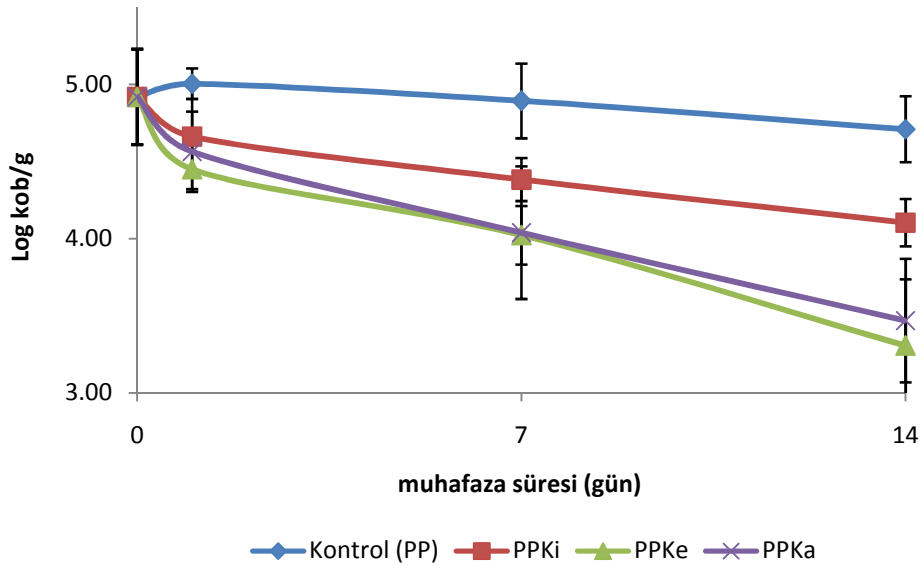
Şekil 3.4. Kaplanmış plastik filmler ile kaplanmış kaşar peyniri örneklerinde *L. monocytogenes* sayısındaki değişimler.

3.4.2. *S. aureus*

Kontrol grubu olarak kitosan solüsyonları ile kaplanmamış PP filmler ile kaplanmış kaşar peyniri örneklerinde *S. aureus* sayısının 14 günlük muhafaza periyodu sonunda 4,92 Log kob/g' dan 4,71 Log kob/g' a düştüğü görülmüştür.

Kaplanmış plastik filmler ile kaplanmış kaşar peyniri örneklerinde *S. aureus* sayısının 14. gün sonunda 0,61 Log ile 1,41 Log arasında azaldığı ve tüm film tiplerinin kontrol grubuna göre antimikrobiyal etkisinin önemli düzeyde ($P<0,05$) olduğu tespit edilmiştir. Muhafaza periyodu sonunda en düşük ve en yüksek *S. aureus* sayıları sırasıyla %1 oranında kekik uçucu yağı içeren kitosan solüsyonu (PPKe) ve Tween 20 içeren kitosan solüsyonu (PPKi) ile hazırlanan filmler ile kaplanmış örneklerde tespit edilmiştir.

Muhafaza periyodu sonunda uçucu yağ içeren filmler ile kaplanmış örneklerdeki *S. aureus* sayısı PPKi ile kaplanmış örneklerdeki *S. aureus* sayısına nazaran önemli düzeyde ($P<0,05$) yüksek bulunmuştur.



Şekil 3.5. Kaplanmış plastik filmler ile kaplanmış kaşar peyniri örneklerinde *S. aureus* sayısındaki değişimler.

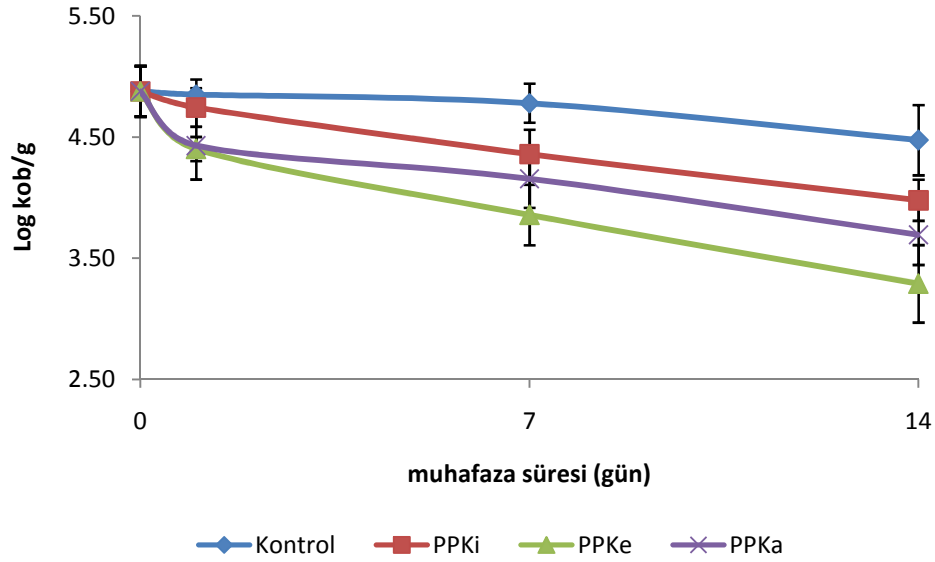
E. coli O157:H7

Kontrol grubu olarak kitosan solüsyonları ile kaplanmamış PP filmler ile kaplanmış kaşar peyniri örneklerinde *E. coli* O157:H7 sayısının 14 günlük muhafaza periyodu sonunda 4,88 Log kob/g' dan 4,47 Log kob/g' a düştüğü görülmüştür.

Kaşar peyniri örneklerinde *E. coli* O157:H7 sayısının 14. gün sonunda 0,50 Log ile 1,19 Log arasında azaldığı ve tüm film tiplerinin kontrol grubuna göre

antimikrobiyal etkisinin önemli düzeyde ($P<0,05$) olduğu tespit edilmiştir. Muhafaza periyodu sonunda yenilebilir filmler ile kaplanmış örneklerde en düşük ve en yüksek *E. coli* O157:H7 sayıları sırasıyla %1 oranında kekik uçucu yağı içeren kitosan solüsyonu (PPKe) ve Tween 20 içeren kitosan solüsyonu (PPKi) ile hazırlanan filmler ile kaplanmış örneklerde tespit edilmiştir.

Muhafaza periyodu sonunda PPKi ile kaplanmış örneklerdeki *E. coli* O157:H7 sayısı PPKe ile kaplanmış örneklerdeki *E. coli* O157:H7 sayısına nazaran önemli düzeyde ($P<0,05$) yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte film solüsyonlarına karanfil uçucu yağı ilavesinin filmlerin *E. coli* O157:H7 üzerine antimikrobiyal etkisini önemli düzeyde arttırmadığı ($P>0,05$) tespit edilmiştir.



Şekil 3.6. Kaplanmış plastik filmler ile kaplanmış kaşar peyniri örneklerinde *E. coli* O157:H7 sayısındaki değişimler.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada doğal kaynaklı antimikrobiyal maddeler ile hazırlanan yenilebilir ve kaplanmış plastik filmlerin önemli gıda patojenlerinden olan *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7' ye karşı antimikrobiyal etkileri gerçek gıda matriksi kullanılarak buzdolabı sıcaklığında iki haftalık muhafaza periyodu boyunca değerlendirilmiştir.

Gıda matriksi olarak yarı sert bir peynir olması nedeniyle homojen örneklerin hazırlanmasında kolaylık sağlamasından dolayı geleneksel Türk peynirlerinden kaşar peyniri kullanılmıştır. Benzer şekilde antimikrobiyal filmlerin etkilerinin değerlendirildiği çalışmalarda cheddar peyniri, mozzarella peyniri, salam ve jambon gibi homojen örneklerin kolaylıkla hazırlanabileceği gıdalar matriks olarak tercih edilmiştir (Ouattara 2000a, Cagrı ve ark 2002, Duan ve ark 2007, Marcos ve ark 2008, Pires ve ark 2008, Suppakul ve ark 2008, Ye ve ark 2008b).

Kaplanmış plastik filmlerin hazırlanmasında korona uygulaması yapılmış PP filmler kullanılmıştır. PP esneklik, dayanıklılık, şeffaflık, yüksek nem ve kimyasal dayanımı gibi özellikleri ve geri dönüştürülebilir olması nedeniyle gıda endüstrisinde en fazla kullanılan ambalaj materyalleri arasındadır (Marsh ve Bugusu 2007). Plastik filmlerin polar biyopolimerler ile kaplanmasına yönelik yapılan çalışmalar ile (Hong ve Krochta 2003, Hong ve ark 2005, Hong ve Krochta 2006, Lee ve ark 2008) uyumlu olarak korona uygulamasının film solüsyonlarının PP filmlerin polar olmayan yüzeyine tutunması için yeterli yüzey modifikasyonu sağladığı gözlenmiştir.

Antimikrobiyal filmlerin hazırlanmasında ABD ve Japonya başta olmak üzere birçok ülkede gıdalar ile birlikte kullanımının yasal olması (Shahidi ve ark 1999, Tharanathan ve Kittur 2003, No ve ark 2007), antimikrobiyal aktivitesi (Wang 1992, Jeon ve ark 2001, Tsai ve ark 2002, No ve ark 2002), film oluşturabilme yeteneği (Tharanathan ve Kittur 2003) ve PP filmlerin kaplanması için ideal bir biyopolimer olması (Hong ve ark 2005, Vartiainen ve ark 2005) nedeniyle kitosan kullanılmıştır. Hazırlanan filmlerin antimikrobiyal etkilerinin artırılması amacıyla yüksek fenolik içerikleri nedeniyle güçlü antimikrobiyal etkiye sahip olan (Burt 2004) karanfil ve kekik uçucu yağları film bileşimlerine eklenmiştir. Filmlerin antimikrobiyal etkisinin

arttırılması amacıyla uçucu yağların seçiminde ana bileşenlerinin gıdalar ile birlikte kullanılmalarının yasal olması (EC 2002, Suppakul ve ark 2003) göz önünde bulundurulmuştur.

Saf su veya organik solventlerde çözünmeyen kitosan organik veya mineral asitlerin sulu çözeltilerinde çözünmektedir (Kim ve ark 2006). Kim ve ark (2006) plastikleştirici olarak gliserol ilave edilen farklı organik asitler ile hazırlanan kitosan filmleri ile yaptıkları çalışmada en düşük su buharı geçirgenliği ve en yüksek gerilme direnci değerlerini asetik asit ile hazırlanan filmlerden elde etmişlerdir. No ve ark (2002) genel olarak kitosanın asetik asit ile hazırlanan solüsyonlarının diğer organik asitler ile hazırlanan solüsyonlarına nazaran bakteri türleri üzerine daha güçlü antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ouattara ve ark (2000b) film matriksinden asetik asidin difüzyonunun film bileşimine uçucu yağların bileşenlerinin ilavesi ile azaldığını saptamışlardır. Asetik asidin film matriksinden difüzyon hızının azalması filmlerin antimikrobiyal aktivitelerinin daha uzun süre korunmasına katkıda bulunmaktadır. Bu nedenlerden dolayı film solüsyonlarının hazırlanmasında bir gıda katkı maddesi olan (TGK 2003) asetik asit kullanılmıştır.

Film solüsyonlarına kırılma gibi mekanik problemlerin üstesinden gelmek amacıyla %0,7 (*h/h*) oranında gliserol ilave edilmiştir. Gliserol polimer zincirlerinde moleküller arası etkileşimleri azaltarak kitosan filmlerine elastikiyet kazandırmaktadır (Ziani ve ark 2008). Aynı zamanda bir gıda katkı maddesi olan (TGK 2003) gliserol ilavesi ile hazırlanan yenilebilir filmlerin gıda ambalaj materyali olarak yeterli elastikiyete sahip olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde Suyatma ve ark (2005) gliserolün kitosan filmleri için ideal bir plastikleştirici olduğunu ve kitosan miktarının %20' si oranında gliserolün film bileşimine ilavesinin yeterli elastikiyeti sağladığını tespit etmişlerdir. Hong ve ark (2005) uygun plastikleştirici ilavesi ile kitosanın plastik filmler için mükemmel bir kaplama materyali olduğunu bildirmişlerdir.

Fenolik maddeler içeren birçok bileşiğin sulu ortamlarda çözünürlüğü ve dağılımı zayıftır (Holley ve Patel 2005). Bu çalışmada fenolik içerikleri yüksek olan kekik ve karanfil uçucu yağlarının emulsifiyer ilavesi olmadan kitosan solüsyonu içinde homojen olarak dağılmadığı gözlenmiştir. Benzer şekilde Zivanovic ve ark (2005) uçucu yağların kitosan solüsyonu içinde homojen olarak dağılabilmesi için bir

emulsifiyer olan Tween 20' yi kullanmışlardır. Bu nedenle uçucu yağ içeren kitosan solüsyonlarının hazırlanmasında bir gıda katkı maddesi (TGK 2003) olan Tween 20 kullanılmıştır. Bununla birlikte antimikrobiyal aktivitesinin olmamasından (Senatore ve ark 2005) dolayı Tween 20 ilavesi hazırlanan filmlerin antimikrobiyal etkilerinin karşılaştırılmasında bir problem oluşturmamaktadır.

Çift taraflı gerdirilmiş PP filmlerin korona uygulaması yapılmış yüzlerine Tween 20 içeren kitosan solüsyonları düzgün bir satıh halinde kaplanabilmiştir. Saf kitosan solüsyonunun Tween 20 içeren kitosan solüsyonlarına nazaran PP filmlerin yüzeyine yayılma özelliğinin daha düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir. Bu durum kitosan solüsyonlarının yüksek yüzey gerilimi ile açıklanabilir. Kitosan solüsyonuna surfaktant ilavesi solüsyonun yüzey geriliminin ve katı yüzey ile temas noktasında temas açısının azalmasına neden olmaktadır. Böylece kitosan solüsyonlarının katı yüzeylere daha kolay ve düzgün bir satıh halinde kaplanması mümkün olmaktadır (Choi ve ark 2002, Ziani ve ark 2008). Ziani ve ark (2008) kitosan solüsyonlarına kitosan miktarının %5' i oranında Tween 20 ilavesinin yüzey gerilimini önemli düzeyde ($P<0,05$) azalttığını tespit etmişlerdir. Kitosan solüsyonunun düzgün bir satıh halinde PP film yüzeyine yayılabilmesi amacıyla uçucu yağ içermeyen kitosan solüsyonlarına kitosan miktarının %5' i oranında Tween 20 ilave edilmiştir.

Yapılan çalışmalardan asetik asit ile hazırlanan kitosan solüsyonlarının plastik film yüzeylerine kaplanabilirliğine yönelik farklı sonuçlar elde edilmiştir (Hong ve ark 2005, Duan ve ark 2007, Elsabee ve ark 2008, Ye ve ark 2008). Elde edilen bu farklı sonuçlar plastik filmlerin yüzey enerjisinin yanında kullanılan plastikleştirici ve kitosan miktarındaki farklılıklar ile açıklanabilir. Casariego ve ark (2008) kitosan solüsyonlarında gliserol ve kitosan miktarının artırılması solüsyonun katı yüzeylere yayılma ve tutunma özelliklerinin azalmasına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Saf kitosan filminin kalınlığı $87,93 \pm 7,63$ μm olarak tespit edilmiştir. Film solüsyonlarına Tween 20 ve uçucu yağ ilavesinin film kalınlıklarını önemli düzeyde ($P<0,05$) arttırdığı görülmüştür. Benzer şekilde Zivanovic ve ark (2005) kitosan filmlerine Tween 20 ve uçucu yağ ilavesinin film kalınlıklarını önemli düzeyde arttırdığını tespit etmişlerdir. Ouattara ve ark (2000b) kitosan filmlerine karanfil yağının ana bileşeni olan eugenol ilavesinin film kalınlığını arttırdığını

bildirmişlerdir. Ziani ve ark (2008) Tween 20 ilavesinin kitosan filmlerinin kalınlıkları üzerine etkisinin kitosanın deasetilasyon derecesine göre farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir.

Kaplanmış PP filmlerin kalınlıkları $35,93 \pm 1,98$ ile $39,40 \pm 1,68$ μm arasında arasında tespit edilmiştir. Uçucu yağ ilavesi yenilebilir filmlerde olduğu gibi kaplama kalınlıklarını önemli düzeyde ($P<0,05$) arttırmıştır. Polisakkaritler ile kaplanmış PP filmlerde kaplama kalınlığı ıslak kaplama kalınlığı, polisakkarit konsantrasyonu ve plastikleştirici tipine bağlıdır. Bununla birlikte kaplama solüsyonlarında gliserol gibi sıvı-faz plastikleştiricilerin kullanımı kaplama kalınlığının azalmasını sağlamaktadır (Hong ve ark 2005).

Muhafaza periyodu sonunda yenilebilir fimler ve kaplanmış plastik filmler için kontrol grubu örneklerinde *L. monocytogenes* sayısı sırasıyla 0,31 Log ve 0,24 Log artış göstermiştir. Benzer şekilde Çetinkaya ve Soyutemiz (2007) farklı düzeylerde kontamine edilmiş süt örneklerinden hazırlanan ve 5°C' de 7 gün muhafaza edilen vakum paketlenmiş kaşar peyniri örneklerindeki *L. monocytogenes* sayısının muhafaza periyodu boyunca 0,19 Log ve 0,44 Log arasında artış gösterdiğini bildirmişlerdir. *L. monocytogenes*' in peynirlerde canlılığını korumasında en önemli faktörler üretim ve muhafaza aşamalarındaki pH ve sıcaklıktır (Linton ve ark 2008). Diğer bir faktör ise rekabetçi flora olarak laktik asit bakterilerinin varlığıdır (Duan ve ark 2007). Genigeorgis ve ark (1991) 4 ile 30°C arasında farklı sıcaklıklarda muhafaza edilen farklı tipteki peynir örneklerinde *L. monocytogenes*' in canlılığı üzerine yaptıkları çalışmada örneklerin pH değerleri ile *L. monocytogenes*' in gelişimi arasındaki korelasyonun önemli düzeyde ($P<0,05$) olduğunu ve genel olarak pH' sı 5,5 ve üzerinde olan örneklerde *L. monocytogenes*' in canlılığını koruyabildiği ve çoğalabildiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan kaşar peynirlerinin pH değerleri ve *L. monocytogenes*' in gelişebildiği sıcaklık değerleri (Erol 2007) göz önüne alındığında kontrol grubu örneklerinde *L. monocytogenes* sayısında 0,31 Log ve 0,24 Log düzeyindeki artış beklenen bir sonuçtur.

Saf kitosan yenilebilir filmi ile kaplanmış kaşar peyniri örneklerinde *L. monocytogenes* sayıları muhafaza periyodu boyunca kontrol grubuna nazaran önemli düzeyde ($P<0,05$) azalmıştır. Benzer şekilde in vitro olarak ve farklı gıda

matriksleri ile yapılan çalışmalar kitosan solüsyonlarının ve filmlerinin *L. monocytogenes*' e karşı etkilerini ortaya koymuştur (Joerger 2007). Duan ve ark (2007) asetik asit ile hazırlanan kitosan filmleri ile kaplanmış mozarella peynirlerinde *L. monocytogenes* sayısının 10°C' de 14 gün muhafaza periyodu sonunda önemli düzeyde ($P<0,05$) azaldığını bildirmişlerdir. Zivanovic ve ark (2005) asetik asit ile hazırlanan kitosan filmlerinin salam örneklerinde *L. monocytogenes* sayısını 5°C' de 10 gün muhafaza sonunda yaklaşık 2 Log düzeyinde azalttığını tespit etmişlerdir.

Muhafaza periyodunun 7. ve 14. gününde yapılan sayımlar kontrol grubuna nazaran kitosan ile kaplanmış PP filmlerin kaşar peyniri örneklerinde *L. monocytogenes* sayısını önemli düzeyde ($P<0,05$) azalttığını göstermiştir. Benzer şekilde Duan ve ark (2007) asetik asit ile hazırlanan kitosan solüsyonları ile kaplanmış PP filmlerin 10°C' de muhafaza edilen mozarella peyniri örneklerinde *L. monocytogenes* sayısını 14 günlük muhafaza periyodu sonunda önemli düzeyde ($P<0,05$) azalttığını tespit etmişlerdir. Joerger ve ark (2008) kitosan ile kaplanmış plastik filmlerin *L. monocytogenes* sayısını fosfat buffer içinde 2-3 Log düzeyinde, 4°C' de 10 gün muhafaza edilen hindi göğüs eti örneklerinde 1,7 Log düzeyinde azalttığını bildirmişlerdir. Bu çalışmaların sonuçlarından farklı olarak Ye ve ark (2008b) asetik asit ile hazırlanan kitosan solüsyonları ile kaplanmış plastik filmlerin 20°C' de muhafaza edilen jambon örneklerinde *L. monocytogenes* üzerine antimikrobiyal etkilerinin önemli düzeyde ($P>0,05$) olmadığını bildirmişlerdir. Ye ve ark (2008b) tarafından yapılan çalışmanın sonuçları değerlendirilirken jambon örneklerinin inokülasyonu amacıyla kitosana duyarlılıkları değerlendirilmiş 11 farklı *L. monocytogenes* suşu arasında kitosana karşı en dirençli suşun kullanıldığı göz ardı edilmemelidir.

Film solüsyonlarına %0,5 ve %1 oranında kekik ve %1 oranında karanfil uçucu yağı ilavesi yenilebilir filmlerin muhafaza periyodu sonunda *L. monocytogenes*' e karşı antimikrobiyal etkilerini önemli düzeyde ($P<0,05$) arttırmıştır. Karanfil uçucu yağının %0,5 oranında ilavesinin yenilebilir filmlerin *L. monocytogenes* üzerine etkisini önemli düzeyde arttırmadığı ($P>0,05$) tespit edilmiştir. Kaplanmış plastik filmlerin *L. monocytogenes*' e karşı etkisi bakımından kekik uçucu yağı ilavesi önemli ($P<0,05$) bulunurken karanfil uçucu yağı ilavesinin

önemli düzeyde bir etkisinin olmadığı ($P>0,05$) saptanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar ile uyumlu olarak Oussalah ve ark (2007) *Origanum* türleri başta olmak üzere yüksek karvakrol oranına sahip uçucu yağların karanfil uçucu yağına nazaran *L. monocytogenes*' e karşı daha güçlü antimikrobiyal etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Zivanovic ve ark (2005) kekik, kişniş, anason ve reyhan uçucu yağları ilave edilmiş kitosan filmleri arasında *L. monocytogenes*' e karşı en güçlü antimikrobiyal etkiyi kekik uçucu yağı içeren kitosan filmlerinin gösterdiğini ve %1 ve %2 oranında kekik uçucu yağı ilave edilmiş kitosan filmlerinin salam örneklerinde *L. monocytogenes* sayısını 5°C' de 10 gün muhafaza sonunda 3,6 Log ve 4 Log düzeyinde azalttığını bildirmişlerdir. Seydim ve Sarıkuş (2006) farklı oranlarda kekik, biberiye ve sarımsak uçucu yağı ilave edilmiş peynir altı suyu proteini ile hazırlanmış filmlerin antimikrobiyal aktivitesini in vitro olarak değerlendirdikleri çalışmalarında *L. monocytogenes*' e karşı en etkin sonuçları kekik uçucu yağı ile elde etmişlerdir.

Yenilebilir fimler ve kaplanmış plastik filmler için kontrol grubu olarak antimikrobiyal filmler ile kaplanmamış kaşar peyniri örneklerinde *S. aureus* sayısı 4°C' de muhafaza periyodu sonunda sırasıyla 0,17 Log ve 0,21 Log düzeyinde azalmıştır. Bu durum *S. aureus*' un zayıf rekabetçi özelliği ile açıklanabilir (Erol 2007). Benzer şekilde Meyrand ve ark (1998) 4°C' de 30 gün muhafaza edilen camembert peyniri örneklerinde *S. aureus* sayısında yaklaşık 1 Log düzeyinde azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Bachmann ve Spahr (1995) *S. aureus* ile yaklaşık 7 Log kob/g düzeyinde kontamine olan yarı sert peynir örneklerinde 11-13°C' de 90 gün muhafaza sonunda *S. aureus*' un tamamen inhibe olduğunu bildirmişlerdir.

Muhafaza periyodu sonunda tüm yenilebilir ve kaplanmış plastik filmlerin *S. aureus*' a karşı etkilerinin kontrol grubuna nazaran önemli düzeyde ($P<0,05$) olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar kitosan ve kitosan temelli kompozit filmlerin *S. aureus*' a karşı antimikrobiyal etkilerini ortaya koymuştur (Joerger 2007). Fernandez-Saiz ve ark (2006) asetik asit ile hazırlanan ve oda sıcaklığında 48 saat muhafaza edilen kitosan yenilebilir filmlerinin *S. aureus*' a karşı etkinliğini sıvı besiyerinde in vitro olarak değerlendirdikleri çalışmalarında kitosan filmlerinin *S. aureus* sayısını kontrol grubuna nazaran yaklaşık 2,5 Log düzeyinde azalttığını bildirmişlerdir.

Muhafaza periyodu sonunda yapılan sayım sonuçları film solüsyonlarına kekik ve karanfil uçucu yağı ilavesinin yenilebilir ve kaplanmış filmlerin *S. aureus*' a karşı etkisini önemli düzeyde ($P>0,05$) arttırdığını göstermiştir. Genel olarak kekik uçucu yağı ilavesinin örneklerde *S. aureus* üzerine inhibe edici etkisi daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç ile uyumlu olarak Dorman ve Deans (2000) kekik uçucu yağı ve ana bileşeni olan karvakrolün karanfil uçucu yağı ve ana bileşeni olan eugenole nazaran *S. aureus*' a karşı daha güçlü antibakteriyal etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Becerril ve ark (2007) kekik uçucu yağı içeren plastik filmlerin *S. aureus* hücrelerinde hücresel bütünlüğün bozulması ve stoplazmik içeriğin koagülasyonu gibi önemli değişimlere neden olduğunu gözlemlemişlerdir.

Muhafaza periyodu sonunda yenilebilir fimler ve kaplanmış plastik filmler için kontrol grubu örneklerinde *E. coli* O157:H7 sayısı sırasıyla 0,36 Log ve 0,40 Log düzeyinde azaldığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar buzdolabı sıcaklığında muhafaza edilen farklı peynir örneklerinde *E. coli* O157:H7 sayısının örneklerin pH' sı ve rekabetçi floraya bağlı olarak azaldığını ortaya koymuştur. Lekkas ve ark (2006) 4°C' de 28 gün muhafaza edilen ve pH' sı 3,9 olan Galotyri tipi peynir örneklerinde *E. coli* O157:H7 sayısında yaklaşık 1,5 Log düzeyinde bir azalma olurken pH' sı 3,7 olan örneklerde *E. coli* O157:H7' nin tamamen inhibe olduğunu saptamışlardır. Spano ve ark (2003) *E. coli* O157:H7 ile kontamine süt ile üretilen ve üretim sonunda 2 Log düzeyinde *E. coli* O157:H7 içeren mozzarella örneklerinde *E. coli* O157:H7' nin 4°C' de 7 gün muhafaza sonunda tamamen inhibe olduğunu bildirmişlerdir. Govaris ve ark (2001) 2°C' de 20 gün muhafaza edilen peyniraltı suyundan üretilen peynirlerde *E. coli* O157:H7 sayısının yaklaşık 2,5 Log düzeyinde azaldığını tespit etmişlerdir.

Çalışmada kitosan solüsyonları ile hazırlanan yenilebilir ve kaplanmış plastik filmlerin kontamine kaşar peyniri örneklerinde *E. coli* O157:H7 sayısını muhafaza periyodu sonunda önemli düzeyde ($P<0,05$) azalttığı tespit edilmiştir. Bu sonuç katyonik yapıdaki kitosan moleküllerinin Gram negatif hücre membranındaki anyonik komponentler ile etkileşimi ile membran bütünlüğünü bozmaları ile açıklanabilir (Helander ve ark 2001, Chung ve ark 2004). Joerger ve ark (2008) kitosan ile kaplanmış plastik filmlerin et eksudatı örneklerinde *E. coli* O157:H7 sayısını yaklaşık 2 Log düzeyinde azalttığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte

Zivanovic ve ark (2005) asetik asit ile hazırlanan kitosan filmlerinin 10°C’ de 5 gün muhafaza edilen salam örneklerinde *E. coli* O157:H7 sayısında kontrol grubuna nazaran önemli bir değişime neden olmadığını bildirmişlerdir.

Muhafaza periyodu sonunda yapılan sayım sonuçlarına göre film solüsyonlarına kekik uçucu yağı ilavesi filmlerin *E. coli* O157:H7 üzerine etkilerini önemli düzeyde ($P<0,05$) arttırmıştır. Karanfil uçucu yağı ilavesi ise yenilebilir filmlerin *E. coli* O157:H7 üzerine etkisini önemli düzeyde ($P<0,05$) arttırırken kaplanmış plastik filmlerin etkisini önemli düzeyde arttırmamıştır ($P>0,05$). Bu sonuç ile uyumlu olarak Burt ve Reinders (2003) kekik uçucu yağının *E. coli* O157:H7 üzerine karanfil uçucu yağına nazaran daha güçlü antimikrobiyal etkinliğinin olduğunu ve kekik uçucu yağının bakterisidal konsantrasyonun *E. coli* O157:H7 hücrelerinde bir dakika içinde geri dönüşümü mümkün olmayan hasarlara neden olduğunu bildirmişlerdir. Doğrudan kontamine gıda örnekleri ve in vitro olarak yapılan çalışmalar kekik uçucu yağı ve ana bileşeni olan karvakrol içeren farklı filmlerin *E. coli* O157:H7 üzerine güçlü antibakteriyal etkilerinin olduğunu ortaya koymuştur (Oussalah ve ark 2004, Zivanovic ve ark 2005, Seydim ve Sarıküş 2006, Rojas-Graü ve ark 2007). Zivanovic ve ark (2005) %1 ve %2 oranında kekik uçucu yağı ilave edilmiş kitosan filmlerinin salam örneklerinde *E. coli* O157:H7 sayısını 5°C’ de 10 gün muhafaza sonunda yaklaşık 3 Log düzeyinde azalttığını bildirmişlerdir. Oussalah ve ark (2004) %1 oranında kekik uçucu yağı içeren süt proteininden hazırlanmış yenilebilir filmler ile kaplanmış sığır etlerinde *E. coli* O157:H7 sayısının 4°C’ de 7 gün muhafaza sonunda 1,2 Log düzeyinde azaldığını bildirmişlerdir.

Kaplanmış plastik filmlerin kontamine kaşar peyniri örneklerinde *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7’ ye karşı antimikrobiyal etkileri yenilebilir filmlere nazaran daha düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Bu durum yenilebilir filmlerin hazırlanmasında daha fazla kitosan, asetik asit ve uçucu yağ kullanılması ile açıklanabilir. Benzer şekilde Duan ve ark (2007) kitosan ve asetik asit ile hazırlanan yenilebilir filmlerin kaplanmış PP filmlere nazaran mozarella peyniri örneklerinde *L. monocytogenes*, *E. coli* ve *P. fluorescens*’ e karşı daha güçlü antimikrobiyal etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Kitosan filmlerinin antimikrobiyal aktivitesinde kitosanın asetilasyon derecesi ve molekül ağırlığı, film yapım tekniği ve muhafaza şartları, kullanılan organik asidin tipi ve konsantrasyonu gibi birçok faktör etkili olmaktadır (Fernandez-Saiz ve ark 2009). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar uçucu yağ ilave edilmeyen kitosan solüsyonları ile hazırlanan yenilebilir ve kaplanmış plastik filmlerin Gram pozitif bakterilerden *L. monocytogenes* ve *S. aureus* ve Gram negatif bakterilerden *E. coli* O157:H7' ye karşı güçlü antimikrobiyal etkisinin olduğunu göstermektedir. Yapılan birçok çalışmadan elde edilen sonuçlar kitosanın bakteriler üzerine antimikrobiyal aktivitesini ortaya koymuştur. Bununla birlikte yine aynı çalışmalardan Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere yönelik farklı sonuçlar elde edilmiştir. Fernandez-Saiz ve ark (2009) Gram pozitif bakterilerin hücre duvarlarında fosfat grupları ile negatif olarak yüklenmiş teikoik asidin kitosan ile elektrostatik etkileşimleri nedeniyle Gram pozitif bakterilerin kitosana karşı Gram negatif bakterilere nazaran daha duyarlı olduklarını ileri sürmüşlerdir. Bu yaklaşım ile uyumlu olarak No ve ark (2002) kitosanın Gram pozitif bakteriler üzerine antimikrobiyal aktivitesinin Gram negatif bakterilere nazaran daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bu yaklaşımdan farklı olarak Chung ve ark (2004) Gram negatif bakterilerin hücre yüzeylerinin sahip olduğu yüksek negatif yük nedeniyle kitosan ile etkileşimlerinin daha güçlü olduğunu ileri sürmüşlerdir. Benzer şekilde Devlieghere ve ark (2004) Gram negatif bakterilerin kitosana Gram pozitiflere nazaran daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada kitosan filmlerinin göstermiş olduğu antimikrobiyal etki filmlerin peynir matriksinden su absorbe ederek kitosanın temas yüzeyinde aktif duruma geçmesi ile açıklanabilir (Zivanovic ve ark 2005). Ayrıca kaşar peyniri örnekleri kitosanın antimikrobiyal aktivitesi için ideal pH değerine sahiptir. Yapılan çalışmalar kitosanın nötral pH değerlerine nazaran düşük pH değerlerinde pozitif yüklenmiş aktif gruplarının sayısındaki artış nedeniyle antimikrobiyal aktivitesinin daha güçlü olduğunu ortaya koymuştur (Wang 1992, No ve ark 2002, Fernandes-Saiz ve ark 2009). Ayrıca düşük pH düzeylerinde bakteri hücre yüzeyinde anyonik hale geçen karboksil ve fosfat grupları kitosana daha fazla elektrostatik bağlanma noktası sunmaktadır (Helander ve ark 2001).

Zivanovic ve ark (2005) film solüsyonlarının hazırlanmasında kullanılan ve bakteri hücrelerinde DNA, RNA ve hücre duvarı sentezini azaltan (Cherrington ve ark 1990, Ricke 2003) asetik asidin filmlerin antimikrobiyal etkilerine katkıda bulunduğunu bildirmişlerdir. Bunun tersine Fernandes-Saiz ve ark (2009) asetik asit ile hazırlanan kitosan filmlerinin antimikrobiyal etkisinin yalnızca film matriksinden serbest kalan aktif amin gruplarından ileri geldiğini öne sürmüşlerdir.

Kitosanın toz formunda aktif amin gruplarına sahip olmaması nedeniyle antimikrobiyal etkisi göz ardı edilebilecek düzeydedir. Kitosanın amin gruplarının aktif duruma gelerek antimikrobiyal aktivite kazanabilmesi için film yapımında olduğu gibi düşük pH değerlerine sahip jel veya viskoz solüsyonları hazırlanmalıdır (Fernandes-Saiz ve ark 2009). Kitosan filmlerinin gıda örneğinde antimikrobiyal etki gösterebilmesi için kitosanın film matriksinden gıda matriksine difüzyonu zorunludur (Ouattara ve ark 2000a). Bu çalışmadan ve mozzarella peyniri, salam, jambon ve pastırma gibi farklı gıda matriksleri ile yapılan çalışmalardan (Ouattara ve ark 2000, Zivanovic ve ark 2005, Duan ve ark 2007) elde edilen sonuçlar kitosanın film matriksinden gıda matriksine difuze olabildiğini ortaya koymaktadır. Bunun tersine Ye ve ark (2008a, 2008b) kitosanın film formunda jambon ve somon gibi gıda matrikslerine difuze olamadığını ve bu nedenle kitosanın film formunda antimikrobiyal etkinliğinin bulunmadığını öne sürmüşlerdir.

Fernandes-Saiz ve ark (2009) kitosan filmlerine film matriksinden serbest hale geçen pozitif yüklü glukozamin moleküllerinin antimikrobiyal etki kazandırdığını bildirmişlerdir. Yine Fernandes-Saiz ve ark (2008) yaptıkları çalışmada kitosan filmlerinden serbest hale geçen glukozamin miktarı ile filmlerin antimikrobiyal etkileri arasındaki korelasyonu ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte agar difüzyon metodu ile yapılan çalışmalarda kitosan filmlerinin antimikrobiyal etkileri önemli düzeyde bulunmamıştır (Coma ve ark 2002, Pranoto ve ark 2005). Bu durumu inoküle edilen bakteri sayısının oldukça yüksek olması veya agar yüzeyinde film matriksinden aktif grupların serbest hale geçememesi ile açıklanabilir (Fernandes-Saiz ve ark 2009). Ancak Lagaron ve ark (2007) ATR-FTIR spektroskopisi ile yaptıkları çalışmada agar yüzeyinin kitosan filmlerinden kayda değer miktarda aktif grubun serbest kalması için yeterli su aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu durum kitosan filmlerinin antimikrobiyal etkilerini agar difüzyon

gibi in vitro metotlar yerine bu çalışmada olduğu gibi gerçek gıda matrisleri kullanarak değerlendirilmesinin önemini ortaya koymaktadır (Ha ve ark 2001).

Bu çalışmada kekik ve karanfil uçucu yağlarının film bileşimlerine ilavesinin filmlerin Gram pozitif bakterilerden *L. monocytogenes* ve *S. aureus* ve Gram negatif bakterilerden *E. coli* O157:H7' ye karşı antimikrobiyal etkilerini önemli düzeyde arttırdığı görülmüştür. Gram negatif bakterilerin membran yapılarının daha kompleks olması nedeniyle Gram pozitif bakterilere nazaran uçucu yağlara karşı daha dirençli oldukları bildirilmektedir (Smith-Palmer ve ark 1998, Holley ve Patel 2005). Bununla birlikte bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ile uyumlu olarak yüksek fenolik içerikleri nedeniyle kekik ve karanfil uçucu yağlarının her iki grup üyesi bakterilere karşı güçlü antimikrobiyal etkilerinin olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (Holley ve Patel 2005).

Genel olarak kekik uçucu yağı içeren filmlerin karanfil uçucu yağı içeren filmlere nazaran her üç patojene karşı etkisi daha yüksek düzeyde bulunmuştur. Benzer şekilde yapılan in vitro çalışmalar kekik türlerinin uçucu yağı ve anabileşeni olan karvakrolün karanfil uçucu yağı ve anabileşeni olan eugenole nazaran daha güçlü antimikrobiyal etkinliğinin olduğunu ortaya koymuştur (Burt 2004, Becerril ve ark 2007, Oussalah ve ark 2007). Bu sonuç eugenole nazaran daha hidrofobik yapıda olan karvakrolün hücre membranlarında birikebilmesi ve serbest hidroksil grubu sayesinde proton değişimi yapabilmesi nedeniyle eugenole nazaran bakteri hücre membran yapısına daha fazla zarar vermesi ile açıklanabilir (Arfa ve ark 2006).

Kekik uçucu yağı, güçlü antimikrobiyal aktivitesi nedeniyle uçucu yağların gıda ambalaj materyalleri ile birlikte kullanımına yönelik çalışmalarda kullanılan uçucu yağların başında gelmektedir (Joerger 2007). Yapılan in vitro çalışmalar ile uyumlu olarak ambalaj materyalleri ile birlikte farklı uçucu yağların kullanıldığı çalışmalarda en etkin sonuçlar kekik uçucu yağı ile elde edilmiştir (Oussalah ve ark 2004, Zivanovic ve ark 2005, Becerril ve ark 2007, Rojas-Graü ve ark 2007).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Gıdalarda mikroorganizma kontaminasyonunun tüketici sağlığı üzerine oluşturduğu riskler ve neden oldukları ekonomik kayıplar antimikrobiyal ambalaj sistemlerine yönelik çalışmaların hız kazanmasına neden olmuştur. Son yıllarda artan tüketici bilinci ve sentetik kimyasal koruyucuların neden olduğu kaygılar antimikrobiyal ambalaj sistemlerinde doğal kaynaklı antimikrobiyal maddelerin kullanımına olan ilgiyi arttırmıştır.

Günümüzde yıllık yaklaşık 40 milyon ton sentetik polimer ambalaj materyali kullanılmaktadır. Bu miktar bir yılda ortaya çıkan atık materyalin yaklaşık %20' sini oluşturmaktadır. Bu durum sentetik polimerlerin doğada kalıcılıkları nedeniyle ciddi çevresel kaygıları beraberinde getirmektedir (Srinivasa ve Tharanathan 2007). Bu nedenle film oluşturma yeteğine sahip biyopolimerlerin ambalaj materyali olarak kullanım olanaklarının değerlendirilmesine yönelik çalışmalar çevrenin korunması bakımından büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar antimikrobiyal özellikte ve biyobozunur bir biyopolimer olan kitosan ile hazırlanan yenilebilir ve kaplanmış plastik filmlerin gıda kaynaklı patojenlere karşı etkinliğini ortaya koymuştur. Kitosanın gıda endüstrisinde ambalaj materyali olarak kullanımı tüketici sağlığı ve çevrenin korunmasındaki faydalarının yanında önemli bir kitosan kaynağı olarak deniz ürünleri endüstrisi atıklarının ekonomiye kazandırılmasına katkı sağlayacaktır.

Yüksek fenolik içerikleri nedeniyle güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olan kekik ve karanfil uçucu yağlarının (Burt 2004) film solüsyonlarına ilavesinin filmlerin antimikrobiyal etkisini kaydadeğer oranda arttırdığı görülmüştür. Elde edilen sonuçlar ısıtma işlemi gerektirmemesi nedeniyle plastik filmlerin biyopolimerler ile kaplanmasının uçucu yağların plastik filmler ile birlikte kullanılmasına yönelik ideal bir yöntem olduğunu göstermiştir.

Kekik uçucu yağı içeren filmlerin antimikrobiyal etkisinin karanfil uçucu yağı içeren filmlere nazaran daha güçlü olduğu tespit edilmiştir. Ülkemizin kekik ihrac eden ülkelerin başında gelmesi ve ülkemizde yetişen kekik türlerinin yüksek karvakrol içeriğine sahip olması (Azcan ve ark 2000, Baydar ve ark 2004, Ozel ve

ark 2004) kekik uçucu yağının ambalaj materyalleri ile birlikte kullanımına yönelik araştırmaların önemini arttırmaktadır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar kitosan ve uçucu yağların farklı kullanım alanlarına sahip olan yenilebilir ve kaplanmış plastik filmlerin hazırlanmasında kullanım potansiyeli olduğunu ortaya koymuştur.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Doğal Antimikrobiyal Maddeler ile Hazırlanan Yenilebilir ve Kaplanmış Plastik Filmlerin Gıda Kaynaklı Bazı Patojenlere Etkileri

Emrah TORLAK

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2009

Bu çalışmada kitosan ve uçucu yağ içeren kitosan solüsyonları ile hazırlanan yenilebilir ve kaplanmış plastik filmlerin *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* O157:H7' ye karşı antimikrobiyal etkileri gerçek gıda matrisi üzerinde değerlendirilmiştir. Kekik ve karanfil uçucu yağları yenilebilir film solüsyonlarına %0,5 ve %1 oranında, kaplanmış plastik film solüsyonlarına %1 oranında ilave edilmiştir. Yenilebilir filmler solvent evaporasyon yöntemi ile hazırlanmıştır (10 mg/cm² kitosan). Kaplanmış plastik filmler film solüsyonlarının PP filmlerin korona uygulaması görmüş yüzlerine manuel ince tabaka kaplayıcısı ile ıslak kaplama kalınlığı 500 µm olarak kaplanması ile hazırlanmıştır.

Gıda matrisi olarak kullanılan kaşar peyniri dilimleri *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7 ile Log 5 kob/g düzeyinde kontamine edilmiştir. Yapay olarak kontamine edilen örnekler hazırlanan filmler ile kaplanmış ve 4°C' de 14 gün muhafaza edilmiştir. Muhafazanın 1. 7. ve 14. günlerinde yapılan sayımlar ile filmlerin her üç patojene karşı antimikrobiyal etkileri değerlendirilmiştir.

Muhafaza periyodu sonunda tüm film tiplerinin her üç patojene karşı antimikrobiyal etkisi kontrol grubuna nazaran önemli düzeyde bulunmuştur ($P<0,05$). Kontrol grubuna nazaran yenilebilir filmler ile kaplanmış örneklerde *L. monocytogenes* sayısı 1,18 Log ile 2,39 Log arasında, *S. aureus* sayısı 0,90 Log ile 2,66 Log arasında ve *E. coli* O157:H7 sayısı 0,75 Log ile 2,32 Log arasında düşük tespit edilmiştir. Kontrol grubuna nazaran kaplanmış plastik filmler ile kaplanmış örneklerde *L. monocytogenes* sayısı 0,70 Log ile 1,32 Log arasında, *S. aureus* sayısı 0,61 Log ile 1,41 Log arasında ve *E. coli* O157:H7 sayısı 0,50 Log ile 1,19 Log arasında düşük tespit edilmiştir.

Genel olarak kekik uçucu yağı içeren filmlerin karanfil uçucu yağı içeren filmlere nazaran daha güçlü antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir. Film solüsyonlarına kekik uçucu yağı ilavesinin muhafaza periyodu sonunda yenilebilir ve kaplanmış plastik filmlerin her üç patojene karşı antimikrobiyal etkisini önemli düzeyde ($P<0,05$) arttırdığı görülmüştür.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar kitosanın antimikrobiyal filmler için ideal bir biyopolimer olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte uçucu yağların biyopolimerler ile hazırlanan antimikrobiyal yenilebilir ve kaplanmış plastik filmler için kullanım olanaklarının olduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar Sözcükler: Antimikrobiyal film; Kitosan; Uçucu yağ; Gıda kaynaklı patojenler; Kaşar peyniri

7. SUMMARY

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Effects of Edible and Coated Plastic Films Prepared with Natural Antimicrobials on Certain Foodborne Pathogens

Emrah TORLAK

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2009

In this study antimicrobial efficiency of edible and coated plastic films prepared with chitosan solutions and chitosan solutions enriched with essential oils against *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 were evaluated on real food matrix. Oregano and clove oil were added to edible film solutions at %0,5 and %1, coated plastic film solutions at %1. Edible films were prepared by solvent evaporation method (10 mg/cm² chitosan). Coated plastic films were prepared by coating of film solutions with manual thin layer coater on corona treatment side of PP films at 500 µm wet coating thickness.

Kashar cheese slices used as food matrix were contaminated with *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7 at 5 Log cfu/g. Artificially contaminated cheese samples were wrapped with prepared films and stored at 4°C for 14 days. Antimicrobial effectiveness of films against each of three pathogens were evaluated by counts performed on 1, 7 and 14 days of storage period.

At the end of storage period antimicrobial effectiveness of all film types against three pathogens were determined as significant ($P<0,05$). Application of edible films to samples were resulted 1,18 to 2,39 Log reduction in count of *L. monocytogenes*, 0,90 to 2,66 Log reduction in count of *S. aureus* and 0,75 to 2,32 Log reduction in count of *E. coli* O157:H7 compared to control samples. Application of coated plastic films to samples were resulted 0,70 to 1,32 Log reduction in count of *L. monocytogenes*, 0,61 to 1,41 Log reduction in count of *S. aureus* and 0,50 to 1,19 Log reduction in count of *E. coli* O157:H7 compared to control samples.

Generally oregano oil added films were showed greater antimicrobial effect on pathogens than clove oil added films. Result obtained at the end of store period showed that addition of oregano oil to film solutions increased antimicrobial activity of edible and coated plastic films at significant degree ($P<0,05$).

Results suggest that chitosan is an ideal biopolymer for antimicrobial films. Additionally essential oils have the potential to be used in antimicrobial edible and coated plastic film prepared with biopolymers.

Key Words: Antimicrobial film; Chitosan; Essential oil; Foodborne pathogens; Kashar cheese

8. KAYNAKLAR

1. Agullo E, Rodriguez MS, Ramos V, Albertengo L. Present and future role of chitin and chitosan in food. *Macromol Biosci.* 2003;3:521-30.
2. Appendini P, Hotchkiss JH. Review of antimicrobial food packaging. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2002;3:113-26.
3. Arfa AB, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett Appl Microbiol.* 2006;43:149-54.
4. Aydın M, Tutas M. Water sorption and water vapor permeability properties of polysaccharide (Locust Bean Gum) based edible films. *LWT Food Sci Technol.* 2000;33(1):63-7.
5. Azcan N, Kara M, Asilbekova DT, Ozek T, Baser KHC. Lipids and essential oil of *Origanum onites*. *Chem Nat Compd.* 2000;36(2):132-36.
6. Bachmann HP, Spahr U. The fate of potentially pathogenic bacteria in swiss hard and semihard cheeses made from raw milk. *J Dairy Sci.* 1995;78:476-83.
7. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils-a review. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(2):446-75.
8. Banker GS, Gore AY, Swarbrick J. Water vapor transmission properties of free polymer films. *J Pharm Pharmacol.* 1996;18:457-66.
9. Baydar H, Sağdıç O, Özkan G, Karadoğan T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control.* 2004;15:169-72.
10. Becerril R, Gómez-Lus R, Goñi P, López P, Nerín C. Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E. coli* and *S. aureus*. *Anal Bioanal Chem.* 2007;388:1003-11.
11. Bégin A, Calsteren MRV. Antimicrobial films produced from chitosan. *Int J Biol Macromol.* 1999;26:63-7.
12. Bishop CD. Antiviral activity of the essential oil of *Elaleuca alternifolia* (Maiden and Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. *J Essent Oil Res.* 1995;7:641-44.
13. Bourtoom T. Edible films and coatings: characteristics and properties. *Int Food Res J.* 2008;15(3).
14. Briassoulis D. An overview on the mechanical behaviour of biodegradable agricultural films. *J Polym Environ.* 2004;12(2):65-81.
15. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int J Food Microbiol.* 2004;94:223-53.
16. Burt SA, Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol.* 2003;36(3):162-67.
17. Cagrı A, Ustunol Z, Ryser ET. Inhibition of three pathogens on bologna and summer sausage using antimicrobial edible films. *J Food Sci.* 2002;67(6):2317-24.
18. Caner C, Vergano PJ, Wiles JL. Chitosan film mechanical and permeation properties as affected by acid, plasticizer, and storage. *J Food Sci.* 1998;63(6):1049-53.

19. Casariego A, Souza BWS, Vicente AA, Teixeira JA, Cruz L, Diaz R. Chitosan coating surface properties as affected by plasticizer, surfactant and polymer concentrations in relation to the surface properties of tomato and carrot. *Food Hydrocolloid*. 2008;22:1452-59.
20. Ceylan A, Bayram E, Geren H, İzmir kekiği (*Origanum onites* L.) ıslahında geliştirilen klonların agronomik ve kalite özellikleri üzerine araştırma. *Turk J Agric For*. 1999;23(5):1163-68.
21. Cha DS, Chinnan MS. Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2004;44:223-37.
22. Cherrington CA, Hilton M, Chopra I. Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1990;68:69-74.
23. Chi S, Zivanovic S, Penfield MP. Application of chitosan films enriched with oregano essential oil on bologna - active compounds and sensory attributes. *Food Sci Technol Int*. 2006;12:111-17.
24. Chick J, Hernandez RJ. Physical, Thermal, and barrier characterization of casein-wax-based edible films. *J Food Sci*. 2002;67(3):1073-79.
25. Choi WY, Park HJ, Ahn DJ, Lee J, Lee CY. Wettability of chitosan coating solution on 'fuji' apple skin. *J Food Sci*. 2002;67(7):2668-72.
26. Chung Y C, Su YP, Chen CC, Jia G, Wang HL, Wu JC, Lin JG. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin*. 2004;25:932-36.
27. Coma V, Martial-Gros A, Garreau S, Copinet A, Salin F, Deschamps A. Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *J Food Sci*. 2002;67:1163-69.
28. Coma V. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Sci*. 2008;78:90-113.
29. Conner DE, Beuchat LR. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *J Food Sci*. 1984;49:429-34.
30. Cooksey K. Effectiveness of antimicrobial food packaging materials. *Food Addit Contam*. 2005;22(10):980-87.
31. Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, Palmas F. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Lett Appl Microbiol*. 1999;29:130-35.
32. Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol*. 2000;88:170-75.
33. Çetinkaya F, Soyutemiz GE. Evaluation of *Listeria monocytogenes* populations during the manufacture and vacuum-packaged storage of kashar cheese. *Acta Vet Brno*. 2007;76:143-48.
34. Dainelli D, Gontard N, Spyropoulos D, Beuken EZ, Tobback P. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends Food Sci Tech*. 2008;19:103-12.
35. Darmadji P, Izumimoto M. Effect of chitosan in meat preservation. *Meat Sci*. 1994;38:243-54.
36. Davis L, Bartnicki-Garcia S. Chitosan synthesis by the tandem action of chitin synthetase and chitin deacetylase from *M. rouxii*. *Biochemistry*. 1984;23:1065-73.
37. Debeaufort F, Martin-Polo M, Voilley A. Polarity homogeneity and structure affect water vapor permeability of model edible films. *J Food Sci*. 1993;58:426-34.

38. Del Nobile MA, Conte A, Buonocore GG, Incoronato AL, Massaro A, Panza O. Active packaging by extrusion processing of recyclable and biodegradable polymers. *J Food Eng.* 2009;93:1-6.
39. Devlieghere F, Vermeulen A, Debevere J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruits and vegetables. *Food Microbiol.* 2004;21:703-14.
40. Donhowe IG, Fennema OR. The effects of plasticizers on crystallinity, permeability and mechanical properties of methylcellulose films. *J Food Process Pres.* 1993;17:247-57.
41. Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol.* 2000;88:308-16.
42. Duan J, Park SI, Daeschel MA, Zhao Y. Antimicrobial chitosan-lysozyme (CL) films and coatings for enhancing microbial safety of mozzarella cheese. *J Food Sci.* 2007;72:355-62.
43. Durango AM, Soares NFF, Benevides S, Teixeira J, Carvalho M, Wobeto C, Andrade NJ. Development and evaluation of an edible antimicrobial film based on yam starch and chitosan. *Packag Technol Sci.* 2006;19:55-9.
44. Dutta PK, Tripathi S, Mehrotra GK. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chem.* 2009;114(4):1173-82.
45. Dündar E, Olgun EG, Işıksoy S, Kürkcüoğlu E, Başer KHC, Bal C. The effects of intra-rectal and intra-peritoneal application of *Origanum onites* L. essential oil on 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in the rat. *Exp Toxicol Pathol.* 2008;59:399-408.
46. EC, Commission Decision of 23 January (2002) amending Commission Decision 1999/217/EC as regards the register of flavouring substances used in or on foodstuffs. 2002/113/EC. *Official Journal L49 20/02/2002*:1-160.
47. Edris AE. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Res.* 2007;21:308-23.
48. EFSA, European Food Safety Authority, Rapid Alert System for Food and Feed. Annual Report. 2007 [cited 2009 February 28] Available from URL: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2007_en.pdf
49. Elsabee MZ, Abdou ES, Nagy KSA, Eweis M. Surface modification of polypropylene films by chitosan and chitosan/pectin multilayer. *Carbohydr Polym.* 2008;71:187-95.
50. Erol İ. Gıda hijyeni ve mikrobiyolojisi. Ankara. Pozitif Matbaacılık. 2007.
51. Faleiro ML, Andrew PW, Power D. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *Int J Food Microbiol.* 2003;84:207-16.
52. Farris S, Introzzi L, Piergiovanni L. Evaluation of a bio-coating as a solution to improve barrier, friction and optical properties of plastic films. *Packag Technol Sci.* 2009;22(2):69-83.
53. FDA, Bacteriological analytical manual, Diarrheogenic *Escherichia coli*. New Hampshire; 2002.
54. FDA. Bad bug book. 2003 [cited 2009 February 19] Available from URL: <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html>
55. Fernandez-Saiz P, Lagaron JM, Hernandez-Muñoz P, Ocio MJ. Characterization of antimicrobial properties on the growth of *S. aureus* of novel renewable blends of gliadins and chitosan of interest in food packaging and coating applications. *Int J Food Microbiol.* 2008;124:13-20.

56. Fernandez-Saiz P, Lagaron JM, Ocio MJ. Optimization of the biocide properties of chitosan for its application in the design of active films of interest in the food area. *Food Hydrocolloid*. 2009;23:913-921.
57. Fernandez-Saiz P, Ocio MJ, Lagaron JM. Filmforming process and biocide assessment of highmolecular-weight chitosan as determined by combined ATR-FTIR spectroscopy and antimicrobial assays. *Biopolymers*. 2006;83:577-83.
58. Fu YJ, Zu YG, Chen LY, Shi XG, Wang Z, Sun S, Efferth T. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytother Res*. 2007;21:989-94.
59. Genigeorgis C, Carniciu M, Dutulescu D, Farver TB. Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in market cheeses stored at 4 to 30°C. *J Food Prot*. 1991;54(9):662-68.
60. Govaris A, Koidis P, Papatheodorou K. The fate of *Escherichia coli* O157:H7 in myzithra, anthotyros, and manouri whey cheeses during storage at 2 and 12°C. *Food Microbiol*. 2001;18:565-70.
61. Granum PE. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*. Chapter 57: Bacterial toxins as food poisons. New York. Elsevier. 2005.
62. Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Int J Food Microbiol*. 2008;124(1):91-7.
63. Gutierrez L, Sanchez C, Batlle R, Nerin. New antimicrobial active package for bakery products. *Trends Food Sci Tech*. 2009;20:92-9.
64. Ha JU, Kim YM, Lee DS. Multilayered antimicrobial polyethylene films applied to the packaging of ground beef. *Packag Technol Sci*. 2001;15:55-62.
65. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol*. 1999;86:985-90.
66. Han JH, Floros JD. Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. *J Plast Film Sheet*. 1997;13:287-98.
67. Han JH. Antimicrobial food packaking. *Food Technol*. 2000;54(3):56-65.
68. Health Canada, Detection of *Listeria monocytogenes* in food and environmental samples by Vidas LMO2 method, MFLP 33. Ottawa;2003.
69. Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, Gorris LGM, von Wright A. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J Agric Food Chem*. 1998;46:3590-95.
70. Helander IM, Nurmiäho-Lassila EL, Ahvenainen R, Rhoades J, Roller S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int J Food Microbiol*. 2001;71:235-44.
71. Holley RA, Patel D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiol*. 2005;22: 273-92.
72. Hong SI, Krochta JM. Oxygen barrier performance of whey-protein-coated plastic films as affected by temperature, relative humidity, base film and protein type. *J Food Eng*. 2006;77:739-45.
73. Hong SI, Krochta JM. Oxygen barrier properties of whey protein isolate coatings on polypropylene films. *J Food Sci*. 2003;68:224-28.
74. Hong SI, Krochta JM. Whey protein isolate coating on LDPE film as a novel oxygen barrier in the composite structure. *Packag Technol Sci*. 2004;17:13-21.

75. Hong SI, Lee JW, Son SM. Properties of polysaccharide-coated polypropylene films as affected by biopolymer and plasticizer types. *Packag Technol Sci.* 2005;18:1-9.
76. Hong SI, Park JD, Kim DM. Antimicrobial and physical properties of food packaging films incorporated with some natural compounds. *Food Sci Biotechnol.* 2000;9:38-42.
77. HPA, Health Protection Agency, Enumeration of *Staphylococcus aureus*, F12. Londra; 2005a.
78. HPA, Health Protection Agency, Preparation sample and dilutions, F2. Londra; 2005b.
79. ISO, Microbiology of food and animal feeding stuffs-Guidelines on preparation and production of culture media-Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory, 11133-1. Cenevre; 2000.
80. ISO, Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*-Part 2: Enumeration method, 11290-2. Cenevre; 1998.
81. Jay JM. *Modern Food Microbiology*. Berlin. Springer-Verlag. 2000.
82. Jeon YJ, Park PJ, Kim SK. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydr Polym.* 2001;44:71-6.
83. Joerger RD, Sabesan S, Visioli D, Urian D, Joerger MC. Antimicrobial activity of chitosan attached to ethylene copolymer films. *Packag Technol Sci.* 2008;22(3):125-38.
84. Joerger RD. Antimicrobial films for food applications: A quantitative analysis of their effectiveness. *Packag Technol Sci.* 2007;20:231-73.
85. Juglal S, Govinden R, Odhav B. Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. *J Food Protect.* 2002;65(4):683-87.
86. Karpouhtsis I, Pardali E, Feggou E, Kokkini S, Scouras ZG, Mavragani-Tsipidou P. Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. *J Agr Food Chem.* 1998;46:1111-15.
87. Kester JJ, Fennema OR. Edible films and coatings: a review. *Food Technol.* 1986;40(12):47-59.
88. Kim KM, Son JH, Kim SK, Weller CL, Hanna MA. Properties of chitosan films as a function of pH and solvent type. *J Food Sci.* 2006;71(3):E119-24.
89. Knorr D, Klein J. Production and conversion of chitosan with cultures of *Mucor rouxii* or *Phycomyces blakesleeanus*. *Biotechnol Lett.* 1986;8:691-96.
90. Koca N, Metin M. Textural, melting and sensory properties of low-fat fresh kashar cheeses produced by using fat replacers. *Int Dairy J.* 2004;14:365-73.
91. Kotzekidou P, Giannakidis P, Boulamatsis A. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. *LWT Food Sci Technol.* 2008;41:119-27.
92. Körüklüoğlu M, Gürbüz O, Sahan Y, Kaçar O, Rouseff R. Chemical characterization and antifungal activity of *Origanum onites* L. essential oils and extracts. *J Food Safety.* 2009;29:144-61.
93. Kristo E, Koutsoumanis KP, Biliaderis CG. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloid.* 2008;22(3):373-86.
94. Lagaron JM, Fernandez-Saiz P, Ocio MJ. Using ATR-FTIR spectroscopy to design active antimicrobial food packaging structures based on high molecular weight chitosan polysaccharide. *J Agric Food Chem.* 2007;55:2554-62.

- 95.Lambert RJW, Skandamis PN, Coote P, Nychas GJE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol.* 2001;91:453-62.
- 96.Lee JW, Son SM, Hong SI. Characterization of protein-coated polypropylene films as a novel composite structure for active food packaging application. *J Food Eng.* 2008;86(4):484-93.
- 97.Lehoux JG, Grondin F. Some effects of chitosan on liver function in the rat. *Endocrinology.* 1993;132:1078-84.
- 98.Lekkas C, Kakouri A, Paleologos E, Voutsinas LP, Kontominas MG, Samelis J. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Galotyri cheese stored at 4 and 12°C. *Food Microbiol.* 2006;23:268-76.
- 99.Linton M, Mackle AB, Upadhyay VK, Kelly AL, Patterson MF. The fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of camembert-type cheese: a comparison between raw milk and milk treated with high hydrostatic pressure. *Innovat Food Sci Emerg Tech.* 2008;9:423-28.
- 100.López-Rubio A, Almenar E, Hernandez-Munoz P, Lagarón JM, Catalá R, Gavara R. Overview of active polymer-based packaging technologies for food applications. *Food Rev Int.* 2004; 20(4):357-87.
- 101.Marcos B, Aymerich T, Monfort JM, Garriga M. High-pressure processing and antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham. *Food Microbiol.* 2008;25:177-82.
- 102.Marsh K, Bugusu B. Food packaging-roles, materials, and environmental issues. *J Food Sci.* 2007;72(3):39-55.
- 103.McHugh TH, Krochta JM. Milk-protein-based edible films and coatings. *Food Technol.* 1994;48:97-103.
- 104.Mead P, Slutsker L, Dietz V, McCaig L, Bresee J, Shapiro C, Griffin P, Tauxe R. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases.* 1999 [cited 2009 February 19]. Available from URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol5no5/mead.htm>
- 105.Meyrand A, Boutrand-Loei S, Ray-Gueniot S, Mazuy C, Gaspard CE, Jaubert G, Perrin G, Lapeyre C, Vernozy-Rozand C. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of camembert-type cheeses from raw goats' milk. *J App Microbiol.* 1998;85:537-44.
- 106.Min S, Krochta JM. Inhibition of *Penicillium commune* by edible whey protein films incorporating lactoferrin, lactoferrin hydrolysate, and lactoperoxidase systems. *J Food Sci.* 2005;70:87-94.
- 107.Moreira MR, Ponce AG, del Valle CE, Roura SI. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT Food Sci Technol.* 2005;38:565-70.
- 108.Muzzarelli RAA, Ilari P, Tarsi R, Dubini B, Xia W. Chitosan from *Absidia coerulea*. *Carbohydr Polym.* 1994;25:45-50.
- 110.Nedorostova L, Kloucek P, Kokoska L, Stolcova M, Pulkrabek J. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control.* 2009;20:157-60.
- 111.Nishimura K, Nishimura S, Nishi N, Saiki I, Tokura S, Azuma I. Immunological activity of chitin and its derivatives. *Vaccine.* 1984;2:93-9.

- 112.No HK, Meyers SP, Prinyawiwatkul W, Xu Z. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: a review. *J Food Sci.* 2007;72(5):87-100.
- 113.No HK, Park NY, Lee SH, Meyers SP. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol.* 2002;74:65-72.
- 114.Nunthanid J, Puttipipatkachorn S, Yamamoto K, Peck GE. Physical properties and molecular behavior of chitosan Films. *Drug Dev Ind Pharm.* 2001;27(2):143-57.
- 115.NZFSA, New Zealand Food Safety Authority, *Escherichia coli* O157:H7. Wellington; 2001c.
- 116.NZFSA, New Zealand Food Safety Authority, *Listeria monocytogenes*. Wellington; 2001a.
- 117.NZFSA, New Zealand Food Safety Authority, *Staphylococcus aureus*. Wellington; 2001b.
- 118.Ouattara B, Simard RE, Piette G, Bégin A, Holley RA. Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films. *J Food Sci.* 2000b;65(5):768-73.
- 119.Ouattara B, Simard RE, Piette G, Bégin A, Holley RA. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *Int J Food Microbiol.* 2000a;62:139-48.
- 120.Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control.* 2007;18:414-20.
- 121.Oussalah M, Caillet S, Salmieri S, Saucier L, Lacroix M. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *J Agric Food Chem.* 2004;52(18):5598-605.
- 122.Ozel MZ, Kaymaz H. Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*. *Anal Bioanal Chem.* 2004;379:1127-33.
- 123.Papineau AM, Hoover DG, Knorr D, Farkas DF. Antimicrobial effect of watersoluble chitosans with high hydrostatic pressure. *Food Biotechnol.* 1991;5:45-57.
- 124.Park HJ, Chinnan MS. Gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials. *J Food Eng.* 1995;25:497-507.
- 125.Park SM, Youn SK, Kim HJ, Ahn DH. Studies on the improvement of storage property in meat sausage using chitosan. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 1999;28(1):167-71.
- 126.Pessoa LM, Morais SM, Bevilaqua CML, Luciano JHS. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol.* 2002; 109(1):59-63.
- 127.Pires ACS, Soares NFF, Andrade NJ, Silva LHM, Camilloto GP, Bernardes PC. Development and evaluation of active packaging for sliced mozzarella preservation. *Packag Technol Sci.* 2008;21(7):375-83.
- 128.Ponce AG, Roura SI, del Valle CE, Moreira MR. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: *In vitro* and *in vivo* studies. *Postharvest Biol Tec.* 2008;49:294-300.
- 129.Pranoto Y, Rakshit SK, Salokhe VM. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlilc oil, potassium sorbate and nisin. *LWT Food Sci Technol.* 2005;38:859-65.
- 130.Quintavalla S, Vicini L. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Sci.* 2002; 62: 373-80.

- 131.Raina VK, Srivastava SK, Aggarwal KK, Syamasundar KV, Kumar S. Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman, India. *Flavour Fragr J.* 2001;16:334-36.
- 132.Reissbrodt R. New chromogenic plating media for detection and enumeration of pathogenic *Listeria* spp.- an overview. *Int J Food Microbiol.* 2004;95(1):1-9.
- 133.Rhoades J, Rastall B. Chitosan as antimicrobial agent. *Food Technology International-Ingredients&Additives.* 2000; 32-3.
- 134.Ricke SC. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Sci.* 2003;82:632-39.
- 135.Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog Polym Sci.* 2006;31:603-32.
- 136.Rojas-Graü AM, Avena-Bustillos RJ, Olsen C, Friedman M, Henika PR, Martin-Belloso O, Pan Z, McHugh T. Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films. *J Food Eng.* 2007;81:634-41.
- 137.Sagoo S, Board R, Roller S. Chitosan inhibits growth of spoilage micro-organisms in chilled pork products. *Food Microbiol.* 2002;19:175-82.
- 138.Senatore F, Napolitano F, Arnold NA, Bruno M, Herz W. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea falcata* L. (Asteraceae). *Flavour Fragr J.* 2005; 20:291-94.
- 139.Seydim AC, Sarıkuş G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Res Int.* 2006;39:639-44.
- 140.Shahidi F, Arachchi JKV, Jeon YJ. Food applications of chitin and chitosans. *Trends Food Sci Tech.* 1999;10:37-51.
- 141.Simsek B, Sagdic O, Ozcelik S. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the storage of Ayran produced with different spices. *J Food Eng.* 2007;78:676-80.
- 142.Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett Appl Microbiol.* 1998;26:118-22.
- 143.Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiol.* 2001;18:463-70.
- 144.Spano G, Goffredo E, Beneduce L, Tarantino D, Dupuy A, Massa S. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of mozzarella cheese. *Lett Appl Microbiol.* 2003;36:73-6.
- 145.SPSS, Statistical Package for the Social Sciences Version 10.0. SPSS Inc, Chicago; 2000.
- 146.Srinivasa PC, Ramesh MN, Kumar KR, TharanathanRN. Properties of prepared under different drying conditions. *J Food Eng.* 2004;63:79-85.
- 147.Srinivasa PC, Tharanathan RN. Chitin/chitosan-safe, ecofriendly packaging materials with multiple potential uses. *Food Rev Int.* 2007;23(1):53-72.
- 148.Srivastava AK, Srivastava SK, Syamsundar KV. Bud and leaf essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from India and Madagascar. *Flavour Fragr J.* 2005;20:51-3.
- 149.Sudarshan NR, Hoover DG, Knorr D. Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnol.* 1992; 6:257-72.
- 150.Suppakul P, Miltz J, Sonneveld K, Bigger SW. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *J Food Sci.* 2003;68:408-20.

151. Suppakul P, Sonneveld K, Bigger SW, Miltz J. Efficacy of polyethylene-based antimicrobial films containing principal constituents of basil. *LWT Food Sci Technol.* 2008; 41: 779-88.
152. Suyatma NE, Tighzert L, Copinet A, Coma V. Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal and surface properties of chitosan films. *J Agr Food Chem.* 2005;53:3950-57.
153. Synowiecki J, Al-Khateeb NA. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit Rev Food Sci.* 2003;43(2):145-71.
154. TGK, Türk Gıda Kodeksi, Renklendiriciler ve Tatlandırıcılar Dışındaki Gıda Katkı Maddeleri Tebliği. Ankara; 2003.
155. Tharanathan RN, Kittur FS. Chitin-the undisputed biomolecule of great potential. *Crit Rev Food Sci.* 2003;43(1):61-87.
156. Tharanathan RN. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends Food Sci Tech.* 2003;14:71-8.
157. Thoroski J, Blank G, Biliaderis C. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *J Food Protect.* 1989;52(6):399-03.
158. Tsai GJ, Hwang S. In vitro and in vivo antibacterial activity of shrimp chitosan against some intestinal bacteria. *Fish Sci.* 2004;70:675-81.
159. Tsai GJ, Su WH, Chen HC, Pan CL. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fish Sci.* 2002;68:170-77.
160. TSE, Türk Standartları Enstitüsü, Kaşar Peyniri, TS 3272. Ankara; 2006.
161. USDA, US Department of Agriculture, Economic Research Service. Economics of foodborne diseases. 2000 [cited 2009 February 19] Available from URL: <http://www.ers.usda.gov/briefing/foodbornedisease>
162. USDA, US Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. Recall case archive. 2008 [cited 2009 March 05] Available from URL: http://www.fsis.usda.gov/fsis_recalls/Recall_Case_Archive_2008/index.asp
163. Vartiainen J, Rättö M, Tapper U, Paulussen S, Hurme E. Surface modification of atmospheric plasma activated BOPP by immobilizing chitosan. *Polym Bull.* 2005;54:343-52.
164. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-Lopez J, Pérez-Alvarez JA. Antifungal activities of Thyme and Oregano essential oils. *J Food Safety.* 2007;27:91-101.
165. Walls I, Buchanan RL. Use of food safety objectives as a tool for reducing foodborne listeriosis. *Food Control.* 2005;16:795-99.
166. Wang GH. Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. *J Food Protect.* 1992;55:916-19.
167. Wang L, Liu L, Holmes J, Kerry JF, Kerry JP. Assessment of film-forming potential and properties of protein and polysaccharide-based biopolymer films. *Int J Food Sci Tech.* 2007;42:1128-38.
168. Wiles JL, Vergano PJ, Barron FH, Bunn JM, Testin RF. Water vapor transmission rates and sorption behavior of chitosan films. *J Food Sci.* 2000;65(7):1175-79.
169. Ye M, Neetoo H, Chen H. Effectiveness of chitosan-coated plastic films incorporating antimicrobials in inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon. *Int J Food Microbiol.* 2008a;127:235-40.

170. Ye M, Neetoo H, Chen H. Control of *Listeria monocytogenes* on ham steaks by antimicrobials incorporated into chitosan-coated plastic films. *Food Microbiol.* 2008b;25:260-68.
171. Youn SK, Park SM, Kim YJ, Ahn DH. Effect on storage property and quality in meat sausage by added chitosan. *J Chitin Chitosan.* 1999;4(4):189-95.
172. Yuen S. Pullulan and its application. *Process Biochem.* 1974; 9:14-9.
173. Ziani K, Oses J, Coma V, Maté JI. Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. *LWT Food Sci Technol.* 2008;41:2159-65.
174. Zivanovic S, Chi S, Draughton AE. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *J Food Sci.* 2005;70:M45-51.

9. ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Konya Ladik Kasabası' nda doğmuştur. İlköğretimi Konya' da tamamlamıştır. 1996 yılında Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Ankara Laborant Meslek Lisesi' nden ve 2000 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi' nden mezun olmuştur. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde başladığı yüksek lisans eğitimini 2005 yılında tamamlamıştır. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı' nda doktora programına kabul edilmiştir.

1997 yılından bu yana Tarım ve Köyişleri Bakanlığı' nda görev yapmaktadır. Ankara İl Kontrol Laboratuvarı, İstanbul İl Kontrol Laboratuvarı ve Konya Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü' nde çalışmıştır. Askerlik vazifesini Yedek Subay olarak Şırnak Uludere İlçesi' nde tamamlamıştır. Halen Konya İl Kontrol Laboratuvarı' nda görev yapmaktadır. Evli ve bir çocuk babasıdır.