

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KEKİK ESANSİYEL YAĞI İLE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ
KİTOSAN ESASLI FİLMLEİN ANTİMİKROBİYAL ETKİSİNİN
TESPİTİ**

Rahime YILMAZ

**Danışman
Yrd.Doç. Dr. Ali GÜNLÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ AVLAMA VE İŞLEME TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2014**

©2014 [Rahime YILMAZ]

TEZ ONAYI

Rahime YILMAZ tarafından hazırlanan "**Kekik Esansiyel Yağı ile Zenginleştirilmiş Kitosan Esaslı Filmlerin Antimikrobiyal Etkisinin Tespiti**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman **Yrd.Doç.Dr. Ali GÜNLÜ**

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi

Jüri Üyesi **Doç.Dr. Şengül BİLGİN**

Süleyman Demirel Üniversitesi

Jüri Üyesi **Doç.Dr. Levent İZCİ**

Süleyman Demirel Üniversitesi

Enstitü Müdürü **Doç.Dr.Ahmet ŞAHİNER**

TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Rahime YILMAZ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
3. METARYAL ve METOT.....	9
3.1. Materyal.....	9
3.2. Metot.....	9
3.2.1. Kitosan esaslı yenilebilir filmlerin hazırlanması.....	9
3.2.2. Kekik yağı ile zenginleştirilmiş kitosan esaslı yenilebilir filmlerin hazırlanması.....	12
3.2.3. Yenilebilir filmlerin antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi.....	13
3.2.3.1. BHI agar katı besiyerinin hazırlanması.....	13
3.2.3.2. MRS agar katı besiyerinin hazırlanması.....	13
3.2.3.3. TSA katı besiyerinin hazırlanması.....	13
3.2.3.4. Soft Agar katı besiyerinin hazırlanması.....	14
3.2.3.5. Kültür hazırlanması.....	14
3.3. İstatistik Analizler.....	14
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	15
4.1. Kitosan Esaslı Yenilebilir Filmlerin Antimikrobiyal Özellikleri.....	15
4.2. Kekik Yağı ile Zenginleştirilmiş Kitosan Esaslı Yenilebilir Filmlerin Antimikrobiyal Özellikleri.....	15
5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	19
KAYNAKLAR.....	23
ÖZGEÇMİŞ.....	27

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KEKİK ESANSİYEL YAĞI İLE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ KITOSAN ESASLI FİLMLERİN ANTIMİKROBİYAL ETKİSİNİN TESPİTİ

Rahime YILMAZ

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Bölümü

Danışman: Yrd.Doç. Dr. Ali GÜNLÜ

Kitin doğada kabuklu su canlılarının (Yengeç, karides vb.) kabuklarından elde edilen ve ikinci bol bulunan doğal biyopolimerdir. Kitosan ise kitinin deasetile formudur. Kitosan, biyolojik olarak parçalanabilen, toksik olmayan, biyouyumlu olduğu kanıtlanmış, antimikrobiyal karakteristiklere sahip bir bileşiktir.

Bu çalışmada farklı molekül ağırlığına sahip kitosan esaslı yenilebilir filmler ile kekik esansiyel yağı ile zenginleştirilmiş kitosan esaslı yenilebilir filmlerin antimikrobiyal aktiviteleri agar difüzyon testi ile belirlenmiştir. Farklı vizkoziteye sahip kitosan esaslı filmlerin *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila* ve *Lactobacillus acidophilus*'a karşı antimikrobiyal aktivite göstermediği, kekik esansiyel yağı ile zenginleştirilmiş kitosan esaslı yenilebilir filmlerin ise seçili bakterilere karşı *L. acidophilus* hariç önemli oranlarda antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler:Kitosan, Kekik Esansiyel Yağı, Antimikrobiyal Aktivite, Agar Difüzyon Metodu.

2014, 27 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF CHITOSAN-BASED EDIBLE FILMS ENRICHED WITH THYME ESSENTIAL OIL

Rahime YILMAZ

Süleyman Demirel University
Institute of Applied and Natural Sciences
Department of Fisheries and Fish Processing Technology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Ali GÜNLÜ

Chitin is the second most abundant natural biopolymer obtained from skeletons of crustaceans (crab shrimp etc.) in nature. Chitosan is deacetylated form of chitin. Chitosan has been proved to be nontoxic, biodegradable, biocompatible and have antimicrobial characteristics.

In this study, the antimicrobial activities of the chitosan-based edible films with different molecular weights and the chitosan-based edible films enriched with thyme essential oil were determined by agar diffusion test. It was determined that the chitosan-based films with different viscosities did not show antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila* and *Lactobacillus acidophilus*; however, the chitosan-based edible films enriched with thyme essential oil showed significant antimicrobial activity against the selected bacteria except for *L. acidophilus*.

Keyword:Chitosan, Thyme essential oil, Antimicrobial Activity, Agar Diffusion Method.

2014, 27 pages

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan değerli Danışman Hocam Yrd. Doç.Dr. Ali Gnl ye teőekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımda bana yardımını esirgemeyen Arş.Gör. İsmail Yüksel GENÇ'e yardımlarından dolayı teőekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

2402-YL-10No'lu Proje ile maddi desteklerinden dolayı Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Rahime YILMAZ

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 3.1.Kitosan kaplama solüsyonunun eldesi	10
Şekil 3.2.Kaplama solüsyonundaki hava kabarcıklarının uzaklaştırılması	10
Şekil 3.3. Kaplama solüsyonunun strafor tabaklara dökülmesi	11
Şekil 3.4. Kuru havalı sterilizatörde filmlerin kurutulması.....	11
Şekil 3.5. Elde edilmiş yenilebilir kaplama film.....	11

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge.3.1. Yenilebilir filmlerin bileşimi.....	10
Çizelge 3.2. Kekik esansiyel yağı ile zenginleştirilmiş kitosan filmlerin bileşimi.....	12
Çizelge 4.1. Kekik esansiyel yağı ilave edilmiş kitosan esaslı yenilebilir filmin <i>E. coli</i> 'ye karşı antimikrobiyal etkisi	16
Çizelge 4.2. Kekik esansiyel yağı ilave edilmiş kitosan esaslı yenilebilir filmin <i>L. monocytogenes</i> 'e karşı antimikrobiyal etkisi	16
Çizelge 4.3. Kekik esansiyel yağı ilave edilmiş kitosan esaslı yenilebilir filmin <i>S. aureus</i> 'a karşı antimikrobiyal etkisi	17
Çizelge 4.4. Kekik esansiyel yağı ilave edilmiş kitosan esaslı yenilebilir filmin <i>A. hydrophila</i> 'ya karşı antimikrobiyal etkisi.....	18
Çizelge 4.5. Kekik esansiyel yağı ilave edilmiş kitosan esaslı yenilebilir filmin <i>L. acidophilus</i> 'a karşı antimikrobiyal etkisi.....	18

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BHI agar	Brain Heart Infusion Agar (Beyin Kalp İnfüzyon Agar)
cP	Dinamik akma hızının CGS birimi olan poise (P)'nin yüzde birlik miktarıdır (centipoise)
KBr	Potasyum Bromür
MRS agar	Man, Rogosa and Sharpe agar (Tipik bakteri gelişim ortamı)
TSA	Tryptone Soy Agar (Tiriptik Soy Agar)
USFDA	U.S. Food and Drug Administration (U.S. Gıda ve İlaç Dairesi)

1.GİRİŞ

Balık, besleyici bir gıda olarak her zaman önemli sayılmış ve genel diyet önerileri içerisinde yerini daima korumuştur. Balığın bu önemi, esas olarak yüksek değerli protein içeriğinin yanında çoğu balık türünün yağ içeriğinin az olması ve çoklu doymamış yağ asitlerinin ana kaynağını oluşturmasından ileri gelmektedir. Balık ve balık ürünleri çok besleyici özelliklere sahip olmakla birlikte dayanım ömürleri diğer et ve kanatlı etlerine kıyasla oldukça kısadır. Dayanım ömrünü ve kalite özelliklerini korumak için her geçen gün yeni muhafaza teknikleri ve uygulamaları geliştirilmektedir. Bu tekniklerden biri de diğer gıda ürünlerinde de yaygın şekilde kullanılan yenilebilir filmlerden faydalanmaktır (Dursun ve Erkan, 2009).

Son yıllarda tüketici taleplerinin ve satış eğilimlerinin sürekli değişmesi, aktif ambalajlama gibi yeni gıda ambalajlama teknolojilerini karşımıza çıkartmaktadır. Aktif ambalajlama tekniğinde, gıda kalitesini arttırmak ve gıda güvenliğini sağlamak amacıyla farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri de antimikrobiyal ambalajlamadır. Antimikrobiyal ambalajlamada, antimikrobiyal maddeler paketlemede kullanılan film içerisine ilave edilebileceği gibi, küçük paketçikler halinde ambalaj içerisine de yerleştirilebilmektedir. Ancak son zamanlarda üzerinde yoğun çalışılan konulardan biri gıdanın antimikrobiyal etki gösteren filmlerle ambalajlanmasıdır (Ayana, 2007).

Yenilebilir film ve kaplamalar; gıdaları korumak, raf ömürlerini uzatmak amacıyla bir gıdanın yüzeyi üzerinde oluşturulmuş ince tabakalı, gıdayla birlikte yenilebilen, sentetik olmayıp doğal kaynaklardan elde edilen maddelerdir. Uygun şekilde hazırlandığı takdirde fonksiyonel bir ambalajın sahip olabileceği tüm işlevleri yerine getirebilir. Bu ambalajlar, cam, teneke, polimer gibi ticari ambalajlama materyallerine alternatif olarak geliştirilmiştir. Bu tekniğin en önemli işlevlerinden birisi su buharı geçişine karşı gösterdikleri dirençtir. Bu sayede gıda maddelerinin depolanmaları sırasında oluşan ağırlık kayıpları azaltılabilmektedir. Yenilebilir ambalajlarla kaplanmış et ürünlerindeki yağların

oksidasyonu engellendiğinden acılaşmamış, tazeliğini korumuş et ürünlerini market raflarında bulabilmek olasıdır. Kısaca bu ambalajlar, suyun yanı sıra aroma bileşikleri, pigmentler, kararına tepkimelerini durduran iyonlar ve vitaminler gibi maddelerin ürünlerin içinde tutulmasını sağlamaktadır. Ama daha da önemlisi yenilebilir film ve kaplamalar, plastiklerle yapılan gıda ambalajlamasının önemli sorunlarından olan kanserojen riskini taşımamakta ve atık sorunu da oluşturmamaktadır (Akbaba,2006).

Yenilebilir film ve kaplamalar, tüketim sırasında olumsuz etki yaratmamak için mümkün olduğunca kokusuz, tatsız, renksiz, saydam, berrak olmalı, gıda maddesi ile uyum göstermelidir. Filmler genellikle aşınmaya dayanıklı ve esnek olmalıdır. Farklı fonksiyonel ihtiyaçları (nem bariyeri, gaz bariyeri, su ve lipitte çözünürlük, renk ve görünüş, mekanik özellikler vb.) karşılayabilmelidirler (Kandemir, 2006). Ayrıca filmlerin yüzey görünümünün iyileştirilmesi ve yapışkanlığının da azaltılması gerekmektedir (Sarıoğlu, 2005).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, kekik esansiyel yağının antioksidatif etkisinin yanı sıra patojen mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkisinin olduğunu da ortaya çıkarmıştır. Kekik esansiyel yağı bu özelliklerinden dolayı yenilebilir filmlerin antimikrobiyal özelliklerinin geliştirilmesi için kullanılabilir. Bu çalışma ile kekik esansiyel yağı ile zenginleştirilmiş kitosan esaslı yenilebilir filmlerin seçilmiş önemli gıda patojenleri üzerine olan antimikrobiyal etkilerinin agar difüzyon yöntemiyle belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Yiyeceklerin yüksek kaliteli ve uzun ömürlü olması için geliştirilen saklama yöntemleriyle, gıdaların uzun süre taze kalmalarını sağlamak mümkündür. Ürünlerdeki bozulma belirtileri, mikrobiyal artış, renk değişimleri ve oksidatif bozulmalardır. Mikrobiyal kontaminasyonu düşürmek, raf ömrünü, işlenmiş yiyeceklerin kalite ve güvenliklerini düzenlemek için antimikrobiyal olan yenilebilir filmler ile kaplama, özellikle et imalatı için gittikçe artan aktif bir paketleme işlemi olarak günümüzde yer almaktadır. Çalışmalar özellikle doğal antimikrobiyal ajanlar olan nisin, lizozim ve kitosan üzerine odaklanmıştır. Kitosan biyolojik olarak parçalanabilen, toksik olmayan ve genellikle güvenilir olarak tanınmış, USFDA tarafından da güvenilir bir gıda katkı maddesi olarak bildirilmiştir (Yingyuad vd., 2006).

Balık eti gibi çabuk bozulan ürünlerin kalitesini sürdürerek uzun süreli raf ömrü için kullanılacak metotlardan biri "kitosan" maddesi ile balığın muamele edilmesidir. Yenilebilir film ve kaplamalar; gıdaları korumak, raf ömürlerini uzatmak amacıyla bir gıdanın yüzeyi üzerinde oluşturulmuş ince tabakalı, gıdalla birlikte yenilebilen, sentetik olmayıp doğal kaynaklardan elde edilen maddelerdir. Yenilebilir filmler uygun şekilde hazırlandığı takdirde fonksiyonel bir ambalajın sahip olabileceği tüm işlevleri yerine getirebilir. Bu nedenle cam, teneke, polimer gibi ticari ambalajlama materyallerine alternatif olarak geliştirilmiştir. Bu tekniğin en önemli işlevlerinden birisi su buharı geçişine karşı gösterdikleri dirençtir. Bu sayede gıda maddelerinin depolanmaları sırasında oluşan ağırlık kayıpları azaltılabilmektedir. Yenilebilir ambalajlarla kaplanmış et ürünlerindeki yağların oksidasyonu engellendiğinden acılaşmamış, tazeliğini korumuş et ürünlerini market raflarında bulabilmek olasıdır. Kısaca bu ambalajlar, suyun yanı sıra aroma bileşikleri, pigmentler, kararma tepkimelerini durduran iyonlar ve vitaminler gibi maddelerin ürünlerin içinde tutulmasını sağlamaktadır. Ama daha da önemlisi yenilebilir film ve kaplamalar, plastiklerle yapılan gıda ambalajlamasının önemli sorunlarından olan kanserojen riskini taşımamakta ve atık sorunu da oluşturmamaktadır (Akbaba,2006;

Krochta ve DeMulder-Johnston, 1997; Debeaufort vd., 1998; Bourtoom, 2008; Falguera vd., 2011).

Son yıllarda da, endüstriyel uygulamalarda büyük potansiyel sağlamasından dolayı kitin ve deasetile formu olan kitosana olan ilgi artmaktadır (Ornum,1992; No ve Meyers, 1995). Kitosan günümüzde her geçen gün popüleritesi artan bir biyopolimerdir. Gerek ülkemiz gerekse tüm dünyada bu maddelerin kaynakları bol miktarlarda bulunmaktadır. Doğada mantar ve maya hücre duvarlarından, denizel diatomlara ve alglere, krill, ıstakoz, karides ve yengeç kabuklarından, böceklerin epidermisine varana kadar pek çok organizmada bulunmaktadır. Kitosan gıdalarda antimikrobiyal aktiviteye (Cuero, 1999), tekstürü düzenleyici (Benjakul vd., 2003), bağlayıcı (No vd., 2000) ve antioksidan özelliğe (Kamil vd., 2002) sahip olmasından dolayı kaplama materyali olarak kullanıma oldukça uygundur.

Kitosanın hipokolesterolemik etkisi iyi bilinen bir fonksiyonel gıda özelliğidir. Bu fonksiyondan dolayı Japonya'da kitosan katkı bisküvi, patates cipsi, makarna, soya sosu ve soya keki üretilmiştir. Diyetlerinde günde 3-6 g kadar kitosanı 4 hafta süreyle alan deneklerin serum toplam kolesterol seviyesi önemli derecede düşmüştür. Ayrıca kitosan kalın bağırsaktaki kokuşma bakterilerinin gelişimini önlediği için, bağırsak tümörlerine karşı da koruyucudur. Benzer şekilde, diyet lifiyle beraber bu materyallerin ağırlık kontrolünde ve zayıflama ürünlerinde de fonksiyonel olabileceği düşünülmektedir. Kitin ve kitosan, katkı olarak hiperürisemiye karşı koruyucu ve tedavi edici olarak da kullanılmaktadır. Bu ürünlerin anti-gastritis etkilerinin varlığı da rapor edilmiştir. Bir diğer fonksiyonel kullanım alanları da enkapsülasyon malzemesi olarak kullanılmalarıdır ki, özel besin öğelerinin veya ilaçların zamana bağlı olarak emilimi için gereklidir. Ayrıca bu ürünlerin oto-bağışıklık sistemini stimüle ettiği, iltihaplanmalara karşı iyi geldiği ve antifungal etki gösterdikleri de bildirilmiştir (Shahidi vd., 1999; Alasalvar vd., 2002).

1907 yılından 2005 yılına kadar kitin ve kitosan ile ilgili 22600 adet çeşitli araştırma sonuçlarının yayınlandığı özellikle son 40 yılda yapılan bilimsel

araştırma yayınlarının sayısına bakıldığında üzerinde en fazla araştırmanın yapıldığı konuların başında gelmektedir (Khor, 2002). Bu yayınların öncelikli olarak kitosanın çok çeşitli gıda ürünlerinin kalitesini koruduğu raf ömrünü uzattığı ve yenilebilir bir film olması üzerinedir. Diğer araştırmalar bu özelliklerinin geliştirilmesi kitosanın elde edilmesi ile ilgili geliştirilen metotlar, kimyasal ve fiziksel özellikleri, moleküler ağırlığına ve deasetilasyon derecelerindeki değişimlerin koruyuculuk etkisi üzerine etkileri, endüstriyel açıdan elde edilme maliyetleri ve ekonomik konuları, farklı muhafaza teknikleri ile birleştirilerek koruyuculuk etkisinin ve raf ömrünün artırılması ve antibakteriyel ve antifungal özellikleri üzerinde yoğunlaşmaktadır (No vd., 2007).

Gagné, (1993), kabuklu deniz canlıları artıklarından kitin-kitosan üretimi ve onların gıda işleme amacıyla kullanılması isimli tezi çalışmasında, kitosanın seçilmiş uygun mikroorganizmalara antimikrobiyal etkisini ele almıştır.

Cho vd. (1998) balık ezme ürünlerinin korunmasında kitosan hidrolizatlarının kullanımı üzerine yapmış oldukları çalışmalarında, kitosanın vizkozitesinin 1000 cP'den 10 cP'ye düşmesi sonucunda *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivitenin arttığı rapor edilmiştir.

Gua-jane vd. (2002), kitosanın antimikrobiyal aktivitesi üzerine hazırlama yöntemlerinin ve deasetile derecesinin etkisini araştırmışlardır. Kimyasal yöntemlerle hazırlanan kitin (CH-kitin) ve mikrobiyal yöntemlerle hazırlanan kitin (MO-kitin) yengeç kabuğundan elde edilmiştir. Kitinin deasetile değeri arttıkça antimikrobiyal aktivite artmış ve mantarlardan ziyade bakterilere karşı etkili olmuştur. Sonuç olarak yüksek deasetile derecesine sahip kitosan balık filetoalarını çeşitli bakterilere karşı korumuş ve raf ömrünü uzatmıştır.

Jeon vd. (2002), üç farklı viskoziteye (360, 57, and 14 cP) sahip kitosan solüsyonu ile kaplanma işleminin taze morina (*Gadus morhua*) ve ringa (*Clupea harengus*) balıklarının buzdolabı şartlarında (4 °C) raf ömrü üzerine etkileri çalışılmıştır. Her iki balık türünde de kitosan ile kaplanmış filetoaların yağ

oksidasyonu, kimyasal bozulma ve mikroorganizmaların gelişiminin kontrol grubuna göre önemli derecede azaldığını ve yenilebilir bir film olarak kitosanın su ürünlerinin raf ömrünü uzattığını belirtmişlerdir.

Taha vd. (2002), *Aeromonas hydrophila*'ya karşı farklı konsantrasyonlarda (%0,0, 0,02, 0,04, 0,06, 0,10, 0,12 ve 0,14) hazırlanan kitosanın antibakteriyel etkisi konulu çalışmalarında % 0,04 kitosan içeren solüsyonun *Aeromonas hydrophila*'nın hemolisin üretimini inaktive etmek ve gelişimini durdurmak için yeterli olduğunu belirtmişlerdir.

Nicholas (2003), farklı molekül ağırlıklı ve %1'lik hazırlanan kitosan solüsyonuna daldırılarak kaplanan Atlantik salmon filetoalarının raf ömrü ve mikrobiyolojik analizlerini 4°C'de 2 hafta süre ile araştırmıştır. Yüksek molekül ağırlıklı kitosan solüsyonu filetoaların yüzeyinde nispeten kalın bir yüzey oluştururken, düşük molekül ağırlıklı solüsyonun daha ince bir tabaka oluşturduğu gözlenmiştir. Depolama sonucunda yüksek molekül ağırlığına sahip kitosana kaplanmış deneme grubunda bakteri yükü önemli oranda düşük bulunmuştur.

No vd., (2003) farklı vizkoziteye sahip kitosan çözeltilerinin üç gram-negatif bakteri (*Escherichia coli* ATCC 11775, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802) ve dört gram-pozitif bakteriye (*Bacillus megaterium* KCTC 3007, *Bacillus cereus* ATCC 21366, *Listeria monocytogenes* Scott A, and *Staphylococcus aureus* ATCC 29737) karşı antimikrobiyal etkinliği sıvı kültür ortamlarında çalışılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre, tüm bakterilerin gelişimi kitosan ilave edilmiş ortamlarda önemli oranda azalmıştır. Kitosan ilave edilmiş gruplarda bakterisidal etki gram negatif bakterilere göre gram pozitif bakterilerde nispeten daha kuvvetli bulunmuştur. % 0,1'lik kitosana muamele sonucunda *L. monocytogenes*, *V. parahaemolyticus* ve *S. aureus*'un gelişimi önemli oranda engellenmiş, *E. coli*'nin gelişiminde ise 4-5 log'luk bir azalış sağlanmıştır (No vd., 2003).

Dadalıoğlu ve Evrendilek (2004) yaptıkları çalışmalarında kekik esansiyel yağını *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* and *S. aureus* gibi gıda patojenlerine karşı kullanmış ve bu mikroorganizmalara karşı yüksek oranda inhibitör etki tespit etmişlerdir.

Baydar vd. (2004) 1/100 konsantrasyonunda kekik yağının *E. coli* zerinde inhibitör etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bu inhibitör etkinin karvakrol ile psimen'den kaynaklandığını belirtmişlerdir. Karvakrol, gram negatif bakterilerin dış membranlarını parçalayarak lipopolisakkaritleri hcrenden ayırırken sitoplazma membranından ATP geçişini arttırmaktadır.

Oussallah vd. (2004), % 1 kekik esansiyel yağı içeren kalsiyum kazeinat PPI-karboksimetil selüloz filmin et yüzeyi üzerinde *E. coli* O157:H7 ve *Pseudomonas* sp.'ye karşı etkili olduğu tespit edilmiştir.

Zivanovic vd. (2005) tarafından yapılan çalışmada kekik ile zenginleştirilmiş kitosan filmlerin *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 gibi mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel aktivitesi belirlenmiştir. Bu iki mikroorganizma türüne karşı kekik esansiyel yağının güçlü antimikrobiyel etkiye sahip olduğu bulunmuş ve kekik esansiyel yağı (% 1 ve % 2), kitosan filmlere ilave edilip Bologna tipi sosis dilimleri arasına uygulanmıştır. Kitosan filmlerle ambalajlanmış ve 10 C'de 5 gün süreyle depolanmış ürünlerde kitosan filmler, *L. monocytogenes* sayısını 2 logaritmik evre azaltırken, %1 ve %2 oranında kekik esansiyel yağı içeren kitosan filmlerin *L. monocytogenes* sayısını sırayla 3,6 ve 4,0 logaritmik evre azalttığı görülmüştür. Kitosan filmler *E. coli* O157:H7 sayısını 3,0 logaritmik evre azalttığı saptanmıştır.

Gomez-Esteca vd., (2007) soğuk dumanlanmış sardalyenin (*Sardina pilchardus*) raf ömrünü uzatmak için yüksek basınc (300 MPa/20C/15 dk) ve kekik otu ekstraktı veya biberiye ya da kitosan eklenerek zenginleştirilen jelatin bazlı fonksiyonel yenilebilir filmler tek başına ya da kombinasyon halinde uygulanmıştır. Jelatin-kitosan filmi mikrobiyal gelişmeyi azaltmada en etkin yöntem olduğu bildirilmiştir. Yüksek basınc ve yenilebilir film kombinasyonu

hem oksidasyonu önleme hem de mikrobiyal gelişmeyi önleme açısından en iyi sonucu gösterdiği tespit edilmiştir.

Kim vd. (2007), kaplanmış yumurtaların raf ömrü ve kalitesi üzerinde moleküler ağırlığı, kitosan tipi ve kitosan solüsyonunun pH'sının etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmalarında, 25°C de 4 haftalık depolama süresi esnasında, moleküler ağırlığın, kitosan tiplerinin ve kitosan solüsyonunun pH'sının *Salmonella enterica*'ya karşı antibakteriyel aktivitesi belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, yumurtalarda *S. enteritidis* kontaminasyonuna karşı kitosanın koruyucu bir bariyer olarak kullanılabileceğini bildirilmişlerdir.

Fan vd. (2009), -3 °C'de 30 günlük depolama süresince %2 kitosan solüsyonu ile kaplanan gümüşi sazanların kalitesi ve raf ömrü üzerine yaptıkları çalışmada, kitosan ile kaplanmış örneklerin mikrobiyolojik özellikleri incelenmiştir. Analiz sonuçlarına göre, depolama süresince kontrol grubu ile karşılaştırıldığında raf ömrünün uzadığı ve iyi kalite özelliklerinin muhafaza edildiği tespit edilmiştir.

Altıok vd. (2010) kekik yağı ilave edilmiş kitosan esaslı filmlerin fiziksel, antibakteriyel ve antioksidant özelliklerini çalışmışlardır. Çalışma sonuçlarına göre % 1,2 kekik yağı ilave edilmiş kitosan filmlerin *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *S. aureus*'a karşı minimum antimikrobiyal etki dozu olarak bildirilmiştir. Ayrıca bu konsantrasyonun yüksek antioksidant özellik gösterdiği saptanmışlardı. Bu nedenle kekik yağının antimikrobiyal kitosan esaslı filmlerin yapımında kullanılabileceğini bildirilmişlerdir.

Gomez-Esteca vd. (2010) balıkların korunmasında, antimikrobiyal ajan olarak esansiyel yağlarla birleştirilmiş jelatin-kitosan esaslı geri dönüşümlü filmleri kullandıkları çalışmada seçilen 8 gıda patojeni mikroorganizmanın tamamına karanfil esansiyel yağı eklenmiş jelatin-kitosan esaslı filmin antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir. Karanfil esansiyel yağı eklenmiş filmle kaplanmış balıkların soğukta depolanması sonucunda gram negatif bakterilerin, özellikle enterobakterlerin gelişimini önemli oranda azalttığını tespit etmişlerdir.

3. METARYAL ve METOT

3.1. Materyal

Farklı moleköl ağırlığına sahip kitosan esaslı yenilebilir filmlerin antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesinde Refik Saydam Hijyen Merkezi, Bulaşıcı Hastalıkları Araştırma Merkezi (Ankara, Türkiye)'nden temin edilen gıda patojenleri (*Escherichia coli* -ATCC 35218, *Listeria monocytogenes* -NCTC 2167, *Staphylococcus aureus* -ATCC43300, *Aeromonas hydrophila* -ATCC 19570 ve *Lactobacillus acidophilus* -ATCC 11975 kullanılmıştır. Clevenger tip destilasyon cihazıyla buharladestilasyon yöntemiyle elde edilmiş olan kekik (*Origanum minutiflorum*) esansiyel yağı ise Gıda San. ve Tic. Ltd Şti (Antalya)' den temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1.Kitosan esaslı yenilebilir filmlerin hazırlanması

Kitosan esaslı yenilebilir filmlerin eldesinde yengeç kabuklarından üretilen düşük (Sigma 50494), orta (Sigma 28191) ve yüksek (Sigma 48165) vizkoziteye sahip ticari kitosan kullanılmıştır. Kitosan esaslı yenilebilir filmlerin hazırlanmasında küçük değişikliklerle Günlü ve Koyun (2012) tarafından bildirilen yöntem kullanılmıştır. Her kitosan grubundan %1'lik asetik asit içerisinde % 1 - % 1,5 - % 2 ve % 2,5 (v/w)'luk kitosan çözeltileri oluşturulmuş ve plastikleştirici olarak da kullanılan kitosan miktarına eşit miktarda gliserol kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Homojen bir karışım eldesi için tüm bileşenler 40°C'de 15 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmış (Şekil 3.1) ve ardından solüsyon içerisindeki hava kabarcıklarının giderilmesi için 30 dk. vakum pompası altında tutulmuştur (Şekil 3.2). Elde edilen film solüsyonundan eşit kalınlıkta biyofilmlerin eldesi için, 200cm² (20cmx10cm)'lik strafor tabaklara 110ml döküldükten (Şekil 3.3) sonra 45°C'de kuru havalı sterilizatörde 12 saat kurutulmuştur (Şekil 3.4). Tabaklardan dikkatlice çıkarılan biyofilmler (Şekil

3.5), mikrobiyolojik çalışmalar yapılana kadar içinde doymuş KBr bulunan desikatörlerde tutulmuştur.

Çizelge.3.1. Yenilebilir filmlerin bileşimi

% Asetik asit	%Kitosan	% Gliserol
1	1	1
	1,5	1,5
	2	2
	2,5	2,5



Şekil 3.1. Kitosan kaplama solüsyonunun eldesi



Şekil 3.2. Kaplama solüsyonundaki hava kabarcıklarının uzaklaştırılması



Şekil 3.3. Kaplama solüsyonunun strafor tabaklara dökülmesi



Şekil 3.4. Kuru havalı sterilizatörde filmlerin kurutulması



Şekil 3.5. Elde edilmiş yenilebilir kaplama film

3.2.2. Kekik yağı ile zenginleştirilmiş kitosan esaslı yenilebilir filmlerin hazırlanması

Kekik yağı ile zenginleştirilmiş kitosan esaslı yenilebilir filmler, orta viskoziteye sahip ticari kitosan (Sigma 28191) ile Günlü ve Koyun (2012) tarafından bildirilen yöntem kullanılarak hazırlanmıştır. Her kitosan grubundan %1'lik asetik asit içerisinde % 1 ve % 2'lik kitosan çözeltileri oluşturulmuş ve plastikleştirici olarak da kullanılan kitosan miktarına eş gliserol kullanılmıştır. Ayrıca kitosan çözeltileri 6 gruba ayrılmış her guruba sırasıyla %0 - %2 arasında değişen oranlarda kekik esansiyel yağı ilave edilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge3.2.Kekik esansiyel yağı ile zenginleştirilmiş kitosan filmlerin bileşimi

% Asetik asit	% Kitosan	% Gliserol	% Kekik Yağı
			0,0
			0,4
	1	1	0,8
			1,2
			1,6
1			2,0
			0,0
			0,4
	2	2	0,8
			1,2
			1,6
			2,0

Homojen bir karışım eldesi için tüm bileşenler 40°C'de 15 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve ardından solüsyon içerisindeki hava kabarcıklarının giderilmesi için 30 dk vakum pompası altında tutulmuştur. Elde edilen film solüsyonundan eşit kalınlıkta biyofilmlerin eldesi için 200cm² (10cmx20cm)'lik strafor tabaklara 110ml döküldükten sonra 45°C'de kuru havalı sterilizatör de 12 saat kurutulmuştur. Tabaklardan dikkatlice çıkarılan biyofilmler mikrobiyolojik çalışmalar yapılana kadar içinde doymuş KBr bulunan desikatörlerde tutulmuştur.

3.2.3. Yenilebilir filmlerin antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi

3.2.3.1. BHI agar katı besiyerinin hazırlanması

BHI (Brain Heart Infusion) agardan katı besiyeri hazırlanırken, 500 ml'lik erlenlere 15,6 g BHI agar tartılmış ve üzerine 300 ml saf su ilave edilerek homojen bir çözelti elde edilinceye kadar kaynatılmıştır. Kaynama işlemi başlayınca erlen ısıtıcıdan alınmış, ağzı alüminyum folyo ile sıkıca kapatılıp 121°C'de 15 dak. otoklavlanmıştır. Daha sonra, otoklavdan çıkartılan sıvı besiyeri, mikrobiyolojik ekim kabininde petri kaplarına eşit olarak paylaştırılmıştır.

3.2.3.2. MRS agar katı besiyerinin hazırlanması

Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agardan katı besiyeri hazırlanırken, 500 ml'lik erlenlere 20,46 gram MRS agar tartılmış ve üzerine 200 ml saf su ilave edilerek homojen bir çözelti elde edilinceye kadar kaynatılmıştır. Kaynama işlemi başlayınca erlen ısıtıcıdan alınmış, ağzı alüminyum folyo ile sıkıca kapatılıp 121°C'de 15 dak. otoklavlanmıştır. Daha sonra, otoklavdan çıkartılan sıvı besiyeri, mikrobiyolojik ekim kabininde petri kaplarına eşit olarak paylaştırılmıştır.

3.2.3.3. TSA katı besiyerinin hazırlanması

Triptik soy agardan (TSA) katı besiyeri hazırlanırken, 500 ml'lik erlenlere 12 gram TSA agar tartılmış ve üzerine 300 ml saf su ilave edilerek homojen bir çözelti elde edilinceye kadar kaynatılmıştır. Kaynama işlemi başlayınca erlen ısıtıcıdan alınmış, ağzı alüminyum folyo ile sıkıca kapatılıp 121°C'de 15 dak. otoklavlanmıştır. Daha sonra, otoklavdan çıkartılan sıvı besiyeri, mikrobiyolojik ekim kabininde petri kaplarına eşit olarak paylaştırılmıştır.

3.2.3.4. Soft Agar katı besiyerinin hazırlanması

Soft Agar katı besiyerinin hazırlanırken, 500 ml'lik erlenlere 2,4 gram Nütrient agar ve 11,25 gram BHI agar tartılmış ve üzerine 300 ml saf su ilave edilerek homojen bir çözelti elde edilinceye kadar kaynatılmıştır. Kaynama işlemi başlayınca erlen ısıtıcıdan alınmış, ağzı alüminyum folyo ile sıkıca kapatılıp 121°C'de 15 dak. otoklavlanmıştır. Daha sonra, otoklavdan çıkartılan sıvı besiyeri, mikrobiyolojik ekim kabininde petri kaplarına eşit olarak paylaştırılmıştır.

3.2.3.5. Kültür hazırlanması

L. acidophylus MRS buyyonda 32°C'de, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* ve *S. aureus*, BHI buyyon içerisinde 37°C'de 24 saat süreyle geliştirilmiştir. Uygun sıvı besiyerlerinde inkübasyon sonucunda gelişen her bir kültürden 200 µl bakteri kültür (ortalama 10⁵-10⁸ CFU/ml)'lerinden 10ml *L. acidophylus* MRS agar'a, *L. monocytogenes* BHI agar'a *E. coli* ile *A. hydrophila* TS agar'a ve *S. aureus* Soft agar'a aşılanmıştır (Gomez-Estaca vd., 2009; Gomez-Estaca vd., 2010). Disk şeklinde kesilen kitosan esaslı farklı yoğunluk ve kekik esansiyel yağı ile zenginleştirilmiş filmler petri kutusunun ortasına gelecek şekilde besiyeri üzerine yerleştirilip bakterilerin biyolojik özelliklerine göre uygun sıcaklıklarda ve 36-48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda disk şeklinde kesilen filmlerin etrafındaki zonlar ölçülerek inhibisyon zonu (mm) olarak belirlenmiştir (Pranoto vd., 2005).

3.3. İstatistik Analizler

Bu çalışmada denemeler dört tekerrürlü yapılmış ve her tekerrürün ortalaması standart hataları ile birlikte çizelgelerde verilmiştir. Araştırma sonuçları varyans analizi (General Linear Model) ile incelenmiş ve ortalamalar arasındaki farkların önemli (p<0,05) olup olmadığı SPSS 19.0 istatistik programı kullanılarak DUNCAN çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kitosan Esaslı Yenilebilir Filmlerin Antimikrobiyal Özellikleri

Yengeç kabuklarından üretilen düşük (Sigma 50494), orta (Sigma 28191) ve yüksek (Sigma 48165) vizkoziteye sahip ticari kitosandan, %1'lik asetik asit içerisinde % 1 - % 1,5 - % 2 ve % 2,5 oranında kitosan ilave edilerek elde edilen kitosan esaslı yenilebilir filmlerin, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *A. hydrophila* ve *L. acidophilus*'a karşı antimikrobiyal özellikleri agar disk diffüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Yapılan antimikrobiyal analiz sonuçlarına göre, farklı vizkozite ve farklı oranlarda kitosan içeren yenilebilir filmlerin, seçilmiş olan gıda patojenlerine karşı her hangi bir zon inhibisyon alanı göstermediği belirlenmiştir. Bu nedenle farklı vizkoziteye sahip kitosan filmlerin seçilmiş patojenlere karşı antimikrobiyal etki göstermediği tespit edilmiştir.

4.2. Kekik Yağı ile Zenginleştirilmiş Kitosan Esaslı Yenilebilir Filmlerin Antimikrobiyal Özellikleri

Kekik esansiyel yağı artan oranlarda %1 ve %2 kitosan içeren yenilebilir filmler içerisine ilave edilmiş ve *E. coli*'ye karşı zon inhibisyon alanları ölçülmüştür (Çizelge 4.1). Ölçüm sonuçlarına göre zon inhibisyonu % 1'lik kitosan esaslı yenilebilir filmde sadece % 2 oranında kekik esansiyel yağı içeren grupta filmde tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). % 2 kitosanlı grupta ise zon inhibisyonu % 1,2 oranında kekik esansiyel yağı içeren grupta başlamış ve kekik esansiyel yağ oranının artışına paralel olarak önemli ($P<0,05$) oranda artış belirlenmiştir.

Kekik esansiyel yağı artan oranlarda % 1 ve % 2 kitosan içeren yenilebilir filmler içerisine katılmış, *L. monocytogenes* ve *S. aureus*'akarşı zon inhibisyon alanları ölçülmüştür (Çizelge 4.2-3). Ölçüm sonuçlarına göre zon inhibisyonu sadece % 2'lik kitosan esaslı yenilebilir filmde % 2 oranında kekik esansiyel yağı içeren grupta tespit edilmiştir (Çizelge 4.2-3).

Çizelge 4.1. Kekik esansiyel yağı ilave edilmiş kitosan esaslı yenilebilir filmin *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal etkisi

	% Kitosan	Zon İnhibasyonu (mm)					Ortalama±S.H.*
		% Kekik	1	2	3	4	
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)	1	0,0	0	0	0	0	0,00e
		0,4	0	0	0	0	0,00e
		0,8	0	0	0	0	0,00e
		1,2	0	0	0	0	0,00e
		1,6	0	0	0	0	0,00e
	2	2,0	7	8	8	9	8,00±0,41d
		0,0	0	0	0	0	0,00e
		0,4	0	0	0	0	0,00e
		0,8	0	0	0	0	0,00e
		1,2	10	12	12	13	11,75±0,63c
	1,6	17	16	18	19	17,50±0,65b	
	2,0	19	27	20	28	23,50±2,33a	

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen inhibisyon alanları istatistiksel olarak farklıdır (P<0,05).

Çizelge 4.2. Kekik esansiyel yağı ilave edilmiş kitosan esaslı yenilebilir filmin *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal etkisi

	% Kitosan	Zon İnhibasyonu (mm)					Ortalama±S.H.
		% Kekik	1	2	3	4	
<i>Listeria monocytogenes</i> (NCTC 2167)	1	0,0	0	0	0	0	0,00b
		0,4	0	0	0	0	0,00b
		0,8	0	0	0	0	0,00b
		1,2	0	0	0	0	0,00b
		1,6	0	0	0	0	0,00b
	2	2,0	0	0	0	0	0,00b
		0,0	0	0	0	0	0,00b
		0,4	0	0	0	0	0,00b
		0,8	0	0	0	0	0,00b
		1,2	0	0	0	0	0,00b
	1,6	0	0	0	0	0,00b	
	2,0	11	14	11	15	12,75±1,03a	

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen inhibisyon alanları istatistiksel olarak farklıdır (P<0,05).

Çizelge 4.3. Kekik esansiyel yağı ilave edilmiş kitosan esaslı yenilebilir filmin *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal etkisi

	%	Zon İnhibasyonu (mm)					Ortalama±S.H.*	
		Kitosan	% Kekik	1	2	3		4
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC43300)	1		0,0	0	0	0	0	0,00b
			0,4	0	0	0	0	0,00b
			0,8	0	0	0	0	0,00b
			1,2	0	0	0	0	0,00b
			1,6	0	0	0	0	0,00b
		2,0	0	0	0	0	0,00b	
	2		0,0	0	0	0	0	0,00b
			0,4	0	0	0	0	0,00b
			0,8	0	0	0	0	0,00b
			1,2	0	0	0	0	0,00b
		1,6	0	0	0	0	0,00b	
	2,0	13	14	11	14	13,00±0,71a		

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen inhibisyon alanları istatistiksel olarak farklıdır (P<0,05).

Kitosan esaslı (% 1 - % 2) yenilebilir filmler içerisine artan oranlarda kekik esansiyel yağı ilavesi sonucunda *A. hydrophila*'ya karşı ölçülen zon inhibisyon alanları Çizelge 4.4'de verilmiştir. Ölçüm sonuçlarına göre; % 1 kitosan ve % 1,6 ve % 2,0 oranında kekik esansiyel yağı içeren gruplarda önemli (P<0,05) zon inhibisyonu belirlenmiştir. %2 kitosanlı grupta ise zon inhibisyonu % 1,2 oranında kekik esansiyel yağı içeren grupta başlamış ve yağ oranının artışına paralel olarak önemli (P<0,05) oranda artışlar belirlenmiştir. Ayrıca çalışma sonuçlarına göre, farklı oranlarda kitosan ve kekik esansiyel yağı içeren gruplarda *L. acidophilus*'a karşı her hangi bir zon inhibisyonu belirlenmemiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.4. Kekik esansiyel yağı ilave edilmiş kitosan esaslı yenilebilir filmin *A. hydrophila*'ya karşı antimikrobiyal etkisi

	% Kitosan	Zon İnhibasyonu (mm)					Ortalama±S.H.*
		% Kekik	1	2	3	4	
<i>Aeromonas hydrophila</i> (ATCC 19570)	1	0,0	0	0	0	0	0,00e
		0,4	0	0	0	0	0,00e
		0,8	0	0	0	0	0,00e
		1,2	0	0	0	0	0,00e
		1,6	8	9	8	10	8,75±0,48d
	2,0	10	11	8	11	10,00±0,71d	
	2	0,0	0	0	0	0	0,00e
		0,4	0	0	0	0	0,00e
		0,8	0	0	0	0	0,00e
		1,2	15	17	15	16	15,75±0,48c
1,6		21	22	23	24	22,50±0,65b	
	2,0	25	26	26	30	26,75±1,11a	

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen inhibisyon alanları istatistiksel olarak farklıdır (P<0,05).

Çizelge 4.5. Kekik esansiyel yağı ilave edilmiş kitosan esaslı yenilebilir filmin *L. acidophilus*'a karşı antimikrobiyal etkisi

	% Kitosan	Zon İnhibasyonu (mm)					Ortalama±S.H.*
		% Kekik	1	2	3	4	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (ATCC 11975)	1	0,0	0	0	0	0	0,00a
		0,4	0	0	0	0	0,00a
		0,8	0	0	0	0	0,00a
		1,2	0	0	0	0	0,00a
		1,6	0	0	0	0	0,00a
	2,0	0	0	0	0	0,00a	
	2	0,0	0	0	0	0	0,00a
		0,4	0	0	0	0	0,00a
		0,8	0	0	0	0	0,00a
		1,2	0	0	0	0	0,00a
1,6		0	0	0	0	0,00a	
	2,0	0	0	0	0	0,00a	

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen inhibisyon alanları istatistiksel olarak farklıdır (P<0,05).

5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Antimikrobiyel maddeler ile zenginleştirilmiş yenilebilir filmler, gıda yüzeyine uygulanan yenilebilir nitelikteki polimerlerden üretilen ince film tabakaları olarak tanımlanır. Yenilebilir filmlerin aktif ambalajlamada kullanımı gıda güvenliğinde yeni bir yaklaşımdır. Basit üretim teknolojisi gerektirmeleri, ucuz olmaları, doğal bileşiklerden elde edilmeleri, fonksiyonel özelliklerindeki çeşitlilik ve biyolojik olarak bozunabilmeleri nedeniyle son yılların dikkat çeken ambalaj materyalleri olarak görülmektedirler (Appendini ve Hotchkiss, 2002; Cha ve Chinnan, 2004; Ayana ve Turhan, 2010).

Yapılan bu çalışmada, farklı vizkoziteye sahip kitosan örnekleri ve farklı oranda kitosan ilavesi ile hazırlanan kitosan esaslı yenilebilir filmlerin, seçilmiş olan gıda patojenleri üzerine zon inhibisyon alanı gelişmediği için herhangi bir antimikrobiyal aktivite göstermediği belirlenmiştir. Benzer şekilde Leceta vd. (2013) tarafından agar diffüzyon metodu ile farklı molekül ağırlığına sahip kitosandan ve farklı oranda gliserol ilavesi ile oda sıcaklığında ya da kurutma kabininde (105°C'de 24 saat) kurutularak elde edilen kitosan esaslı filmlerin, gram negatif bir bakteri olan *E. coli* 0517H ve gram pozitif bakteri olan *L. plantarum* CECT748 üzerine antimikrobiyal aktivite göstermediği bildirilmiştir. Yazarlar, Coma vd., (2002) tarafından da bildirildiği gibi antimikrobiyal etki eksikliğinin, katı agar ortamına kitosanın diffüzyonunun sınırlı olmasından kaynaklanabileceğini vurgulamışlardır. Bununla birlikte aynı çalışmada oda sıcaklığında kurutularak elde edilen filmlerin katı agar üzerinde bulunduğu noktalarda *E. coli* ve *L. plantarum*'un üremediği bulunmuş, bu bulgu yazarlar tarafından iki bakteri üzerine kitosan esaslı filmlerin bakteriyostatik etkisi olarak bildirilmiştir (Leceta vd., 2013). Ayrıca yazarlar bulgular ışığında kitosanın antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesinde agar diffüzyon yönteminin çok uygun bir yöntem olmadığı, yerine sıvı kültür ortamlarının kullanılması gerektiğini vurgulamışlardır. No vd., (2003) farklı vizkoziteye sahip kitosan çözeltilerinin gram-negatif ve gram-pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesinin sıvı kültür ortamlarında belirlendiği çalışılmalarında, tüm bakterilerin gelişimini kitosanın önemli oranda azalttığı

saptanmış, ayrıca, % 0,1'lik kitosanla muamele sonucunda da *L. monocytogenes*, *V. parahaemolyticus* ve *S. aureus*'un gelişimi önemli oranda engellenmiş, *E. coli*'nin gelişiminde ise 4-5 log'luk bir azalış sağlandığı bildirilmiştir (No vd., 2003).

Bu çalışma ile kitosan esaslı yenilebilir filmler, farklı oranlarda kekik esansiyel yağı ile zenginleştirilmiş ve agar disk difüzyon metodu ile seçilmiş önemli gıda patojenlerine karşı antimikrobiyal etki belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre; *E. coli*'ye karşı % 1'lik kitosanlı grupta sadece % 2 esansiyel kekik yağı ile zenginleştirme sonucunda antimikrobiyal etki belirlenmiş, %2'lik kitosanlı grupta ise minimum antimikrobiyal etki % 1,2 oranında esansiyel kekik yağı içeren grupta belirlenmiş yağ oranı artışına paralel olarak etki oranının arttığı saptanmıştır (Çizelge 4.1). Benzer şekilde; Altıok vd. (2010) kekik yağı ilave edilmiş kitosan esaslı filmlerin antibakteriyel özelliklerini belirledikleri çalışmalarında, % 1,2 kekik yağı ilave edilmiş kitosan filmlerin *E. coli*'ye karşı minimum antimikrobiyal etki dozu olarak bildirilmiştir. Sarıkuş (2006), farklı antimikrobiyal maddeler içeren yenilebilir film üretimi ve kaşar peynirinin muhafazasında mikrobiyal inaktivasyon etkisi üzerine yapmış olduğu çalışmasında, *E. coli*'ye karşı esansiyel kekik yağının minimum etki dozu %2 olarak bulunmuş ve doz artıkça etkininde arttığı bildirilmiştir. Dadaloğlu ve Evrendilek (2004) yaptıkları çalışmalarında, kekik esansiyel yağını *E. coli* (O157:H7)'ye karşı yüksek oranda inhibitör etki tespit etmişlerdir. Baydar vd. (2004) 1/100 konsantrasyonunda kekik yağının *E. coli* üzerinde inhibitör etki gösterdiğini saptamıştır. Araştırmacılar bu inhibitör etkinin karvakrol ile psimen'den kaynaklandığını belirtmişlerdir. Karvakrol gram negatif bakterilerin dış membranlarını parçalayarak lipopolisakkaritleri hücreden ayırırken sitoplazma membranından ATP geçişini arttırmaktadır (Burt, 2004). Bir başka çalışmada ise % 1'lik kekik esansiyel yağı içeren kalsiyum kazeinat PPI-karboksümetil selüloz filmin etyüzeyi üzerinde *E. coli* O157:H7 karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Qussallah vd., 2004). Zivanovic vd. (2005) tarafından kekik esansiyel yağı ile zenginleştirilmiş kitosan filmlerin *E. coli* O157:H7'ye karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, bu çalışmada, kekik esansiyel yağı (% 1 ve % 2, h/h), kitosan filmlere ilave edilip Bologna tipi

sosis dilimleri arasına uygulanmış, sadece kitosan filmlerle ambalajlanmış ve 10 °C'de 5 gün süreyle depolanmış ürünlerde *E. coli* O157H7 sayısını 3.0 logaritmik evre azaltmıştır (Zivanovic vd., 2005).

Yapılan agar disk difüzyon testi sonuçlarına göre; *L. monocytogenes* ve *S. aureus*'a karşı, sadece % 2'lik kitosan ve % 2 oranında kekik esansiyel yağı içeren yenilebilir filmde antimikrobiyal etki belirlenmiştir (Çizelge 4.2,3). Benzer şekilde, Sarıkuş (2006), farklı antimikrobiyal maddeler içeren yenilebilir film üretimi ve kaşar peynirinin muhafazasında mikrobiyal inaktivasyona etkisi üzerine yapmış olduğu çalışmada, *L. monocytogenes* ve *S. aureus*'a esansiyel kekik yağının minimum etki dozu %2 olarak bulunmuş ve doz arttıkça etkininde arttığı bildirilmiştir. Dadaloğlu ve Evrendilek (2004) tarafından yapılan diğer bir çalışmada da, kekik esansiyel yağının *L. monocytogenes*'e karşı yüksek oranda inhibitör etki tespit edilmiştir. Zivanovic vd. (2005) tarafından kekik esansiyel yağı ile zenginleştirilmiş kitosan filmlerin *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 gibi mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca, kekik esansiyel yağının, tek başına ve film içerisinde kullanıldığında aynı antimikrobiyal aktiviteyi gösterdiği gözlenmiştir. Bu çalışmada, kekik esansiyel yağı (% 1 ve % 2, h/h), kitosan filmlere ilave edilip Bologna tipi sosis dilimleri arasına uygulanmış, sadece kitosan filmlerle ambalajlanmış ve 10 °C'de 5 gün süreyle depolanmış ürünlerde *L. monocytogenes* sayısı 2 logaritmik evre azaltırken, % 1 ve % 2 (h/h) oranında kekik esansiyel yağı içeren kitosan filmlerde ise *L. monocytogenes* sayısını sırayla 3.6 ve 4.0 logaritmik evre azalttığı görülmüştür (Zivanovic vd., 2005). Altıok vd. (2010) kekik yağı ilave edilmiş kitosan esaslı filmlerin antibakteriyel özelliklerini belirledikleri çalışmalarında, % 1,2 kekik yağı ilave edilmiş kitosan filmlerin *S. aureus*'a karşı minimum antimikrobiyal etki dozu olarak bildirilmiştir.

A. hydrophila'ya karşı minimum antimikrobiyal etki % 1'lik kitosanlı grupta % 1,6 oranında esansiyel kekik yağı ilavesi ile, % 2'lik kitosanlı grupta ise % 1,2 oranında esansiyel kekik yağı ilavesi ile sağlanmış, yağ oranı artışına paralel olarak etki oranının arttığı da belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Taha ve Swailam

(2002), *A. hydrophila*'ya karşı kitosanın antibakteriyel etkisi isimli çalışmalarında, % 0,04'lük kitosanın gelişimi baskıladığı bildirilmiştir. Baydar vd. (2004) tarafından <1/100 (v/v) oranında siyah kekik esansiyel yağının *A. hydrophila*'nın gelişimini engellediği saptanmıştır.

Çalışma sonuçlarına göre *L. acidophilus*'a karşı farklı oranlarda kekik esansiyel yağı ile zenginleştirilmiş kitosan filmlerin antimikrobiyal bir etkiye sahip olmadığı bulunmuştur (Çizelge 4.4).

Sonuç olarak; farklı vizkoziteye sahip kitosan esaslı filmlerin agar diffüzyon testi ile *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *A. hydrophila* ve *L. acidophilus*'a karşı antimikrobiyal aktivite göstermediği, kekik esansiyel yağı ile zenginleştirilmiş kitosan esaslı yenilebilir filmlerde ise seçili bakterilere karşı *L. acidophilus* hariç önemli oranlarda antimikrobiyal aktivite belirlenmiştir. Bu veriler ışığında, kekik esansiyel yağı ile zenginleştirilmiş kitosan esaslı yenilebilir filmlerin önemli antimikrobiyal aktivitelerinden dolayı gıda muhafazasında kullanılabileceği ortaya çıkmıştır. Ayrıca, bu çalışmanın, muhafazasında kullanılacak gıdanın duyuşal özellikleri üzerine kekik esansiyel yağının olumlu yada olumsuz etkilerinin belirleneceği ilave çalışmalara da ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

- Akbaba, G., 2006. Yenilebilir Ambalajlar, Bilim ve Teknik Dergisi, Ankara, 30-32.
- Alasalvar, C., Taylor, K. D. A., Zubcov, E., Shahidi, F., & Alexis, M., 2002. Differentiation of Cultured and Wild Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*): Total Lipid Content, Fatty Acid and Trace Mineral Composition. Food Chemistry, 79, 145-150.
- Altıok, D., Altıok, E., Tihminlioglu, F., 2010. Physical, Antibacterial and Antioxidant Properties of Chitosan Films Incorporated with Thyme Oil for Potential Wound Healing Applications. The Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 21, 2227-2236.
- Appendini P, Hotchkiss J.H., 2002. Review of Antimicrobial Food Packaging. Innovative Food Science and Emerging, 3, 113-126.
- Ayana, B., 2007, Antimikrobiyal Yenilebilir Filmlerin Üretimi ve Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Mersin, pp.61.
- Ayana, B., Turhan, K.N., 2010. Gıda Ambalajlamasında Antimikrobiyel Madde İçeren Yenilebilir Filmler/ Kaplamalar ve Uygulamaları. Gıda, 35, 151-158.
- Baydar, H., Sağdıç, O., Özkan, G., Karadoğan, T., 2004. Antibacterial Activity and Composition of Essential Oils from Origanum, Thymbra and Satureja Species with Commercial Importance in Turkey. Food Control., 15, 169-172.
- Benjakul S, Visessanguan W, Tueksuban J.,2003. Changes in Physico-Chemical Properties and Gel-Forming Ability of Lizardfish (*Saurida tumbil*) during Post-Mortem Storage in Ice. Food Chemistry, 80, 535-544
- Bourtoom, T., 2008. Edible films and coatings: characteristics and properties. International Food Research Journal, 15, 237-248.
- Burt, S.A., 2004. Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods: A Review. International Journal of Food Microbiology, 94, 223-253.
- Cha D. S, Chinnan M.S., 2004. Biopolymer-based Antimicrobial Packaging: A Review. Food Science & Nutrition, 44: 223-237.
- Cho, H.R., Chang, D.S., Lee, W.D., Jeong, E.T., Lee, E.W.,1998. Utilization of chitosan hydrolysate as a natural food preservative for fish meat paste products. Korean Journal of Food Science and Technology.,30, 817-822.
- Cuero, R.G., 1999. Antimicrobial Action of Exogenous Chitosan. In P. Jolles, & R.A.A. Muzarelli, Chitin and Chitinases (pp 315-333). Switzerland: Birkhauser Verlag. Basel.

- Dadalıoğlu, I., Evrendilek, G.A., 2004. Chemical Compositions and Antibacterial Effects of Essential Oils of Turkish Oregano (*Origanum minutiflorum*), Bay Laurel (*Laurus nobilis*), Spanish Lavender (*Lavandula Stoechas* L.) and Fennel (*Foeniculum vulgare*) on Common Foodborne Pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8255-8260.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J.A., Voilley, A. 1998. Edible Films and Coatings: Tomorrow's Packagings: A Review. *Critical Reviews in Food Science*, 38, 299-313.
- Dursun, S., Erkan, N., 2009. Yenilebilir Protein Filmler ve Su Ürünlerinde Kullanımı. *Journal of FisheriesSciences.com*, 3, 352-373.
- Falguera V, Quintero J.P, Jiménez A, Muñoz J.A, Ibarz A. 2011. Edible Films and Coatings: Structures, Active Functions and Trends in Their Use. *Trends Food Science and Technology*, 22, 292-303.
- Fan , W., Sun, J., Chen, Y., Qiu, J., Zhang, Y., Chi, Y. 2009. Effects of Chitosan Coating on Quality and Shelf Life of Silver Carp during Frozen Storage. *Food Chemistry*, 115, 66-70.
- Gagné, N., 1993. Production of Chitin and Chitosan Film Crustacean Waste and Their Use as a Food Processing Aid. Department of Food Science and Agricultural Chemistry, Master Thesis, 97 pp, McGill University, Montreal.
- Gómez-Estaca, J., Montero, P., Giménez, B., Gómez-Guillén, M.C., 2007. Effect of Functional Edible Films and High Pressure Processing on Microbial and Oxidative Spoilage in Cold-Smoked Sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*, 105, 511-520.
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., Gómez-Guillén, M.C., López-Caballero, M.E., Montero, P., 2009. Antimicrobial Activity of Composite Edible Films Based on Fish Gelatin and Chitosan Incorporated with Clove Essential Oil. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 18, 1-2, 46-52.
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M.C., Montero, P., 2010. Biodegradable Gelatine Chitosan films Incorporated with Essential Oils as Antimicrobial Agents for fish Preservation. *Food Microbiology*, 27, 889-896.
- Gua-Jane, T., Su, W.H., Chen, H.C. and Pan, C.L., 2002. Antimicrobial Activity of Shrimp Chitin and Chitosan from Different Treatments and Applications of Fish Preservation. *Fisheries Science*, 68, 170-177.
- Günlü, A., and Koyun, E., 2013. Effects of Vacuum Packaging and Wrapping With Chitosan-Based Edible Film on The Extension of The Shelf Life of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Fillets in Cold Storage (4 °C). *Food and Bioprocess Technology*. 6, 1713-1719.

- Jeon, Y.J, Kamil J.Y.V.A., Shahidi, F., 2002. Chitosan as An Edible Invisible Film for Quality Preservation of Herring and Atlantic Cod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5167-78.
- Kamil, J., Shahidi, F., Jeon, Y., J, Kim, S.K., 2002. Antioxidant Role of Chitosan in Cooked Cod (*Godus morhua*) Model System. *Journal of Food Lipids*, 9, 57-64.
- Kandemir, N. S., 2006. Doğal Antimikrobiyal Madde İçeren Yenilebilir Pullulan Film Uygulamanın Hazır Salatanın Raf Ömrüne Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Khor, E., 2002. Chitin: A Biomaterial in Waiting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6, 313-317.
- Kim, S.H., No, H.K., Prinyawiwatkul, W., 2007. Effect of Molecular Weight, Type of Chitosan, and Chitosan Solution pH on The Shelf-Life and Quality of Coated Eggs. *Journal of Food Science*, 72, 044-048.
- Krochta, J.M., DeMulder-Johnston, C., 1997. Edible and Biodegradable Polymer Films: Challenges and Opportunities. *Food Technologie*, 51, 61-74.
- Leceta, I., Guerrero, P., Ibarburu, I., Dueñas, M.T., de la Caba, K., 2013. Characterization and Antimicrobial Analysis of Chitosan-Based Films. *Journal of Food Engineering*, 116, 889-899.
- Nicholas, T.A., 2003. Antimicrobial Use of Native and Enzymatically Degraded Chitosans for Seafood Applications. Master Thesis. B.S. University of Maine, 144 s.
- No H. K, Meyers S. P., 1995. Preparation and Characterization of Chitin and Chitosan - A review. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 4, 27-52.
- No, H.K., Cho, Y.I., Kim, H.R., Meyers S.P., 2000. Effective Deacetylation of Chitin under Conditions of 15 psi/121 °C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2625-2627.
- No, H.K., Lee, S.H., Park, N.Y., Meyers, S.P., 2003. Comparison of Physicochemical, Binding, and Antibacterial Properties of Chitosans Prepared Without and with Deproteinization Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7659-7663.
- No, H.K., Meyers, S.P., Prinyawiwatkul, W., Xu, Z., 2007. Applications of Chitosan for Improvement of Quality and Shelf Life of Foods: A Review. *Journal of Food Science*, 72, 5, 87-100.
- Ornum Van, J.V., 1992. Shrimp Waste-Must It Be Wastes? *INFOFISH International*, 6, 48-52.

- Qussallah, M., Caillet, S., Salmieri, S., Saucier, L., Lacroix, M., 2004. Antimicrobial and Antioxidant Effects of Milk Protein Based Film Containing Essential Oils for The Preservation of Whole Beef Muscle. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 5598-5605.
- Pranoto, Y., Rakshit, S.K., Salokhe, V.M. 2005. Enhancing Antimicrobial Activity of Chitosan films by Incorporating Garlic Oil, Potassium Sorbate and Nisin. *LWT - Food Science and Technology*, 38, 859-865.
- Sarıkuş, G., 2006. Farklı Antimikrobiyel Maddeler İçeren Yenilebilir Film Üretimi ve Kaşar Peynirinin Muhafazasında Mikrobiyel İnaktivasyona Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta, 69 s.
- Sarıoğlu, T., 2005. Yenilebilir Filmlerin Kaşar Peynirinin Kaplanması Kullanılma Olanakları ve Peynir Kalitesi Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta
- Shahidi, F., Arachchi, J.K.V., Jeon, Y.J., 1999. Food Applications of Chitin and Chitosan. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 37-51.
- Taha, S.M. A., Swailam, H.M. H. 2002. Antibacterial Activity of Chitosan Against *Aeromonas hydrophila*. *Nahrung/Food* 46, 5, 337-340.
- Yingyuad, S., Ruamsin, S., Leekprokok, T., Douglas, S., Pongamphai, S., Siripatrawan, U., 2006. Effect of Chitosan Coating and Vacuum Packaging on The Quality of Refrigerated Grilled Pork. *Packaging Technology and Science*, 19, 149-157.
- Zivanovic, Z, Chi, S, Draughon, A.F., 2005. Antimicrobial Activity of Chitosan Films Enriched with Essential Oils. *Journal of Food Science*, 70, 45-51.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Rahime YILMAZ

Doğum Yeri ve Yılı : Yalvaç-1980

Medeni Hali :Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : rahime_8889@hotmail.com

Eğitim Durumu

Lise :Yalvaç Atatürk Lisesi

Lisans :SDÜ, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi

Yüksek Lisans : -