

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**BİYOAKTİF MADDE YÜKLENMİŞ NANOKİLLERLE
GÜÇLENDİRİLMİŞ AKTİF AMBALAJ ÜRETİMİ VE
GIDA AMBALAJLAMADA KULLANIMI**

**Hazırlayan
Fatih TÖRNÜK**

**Danışman
Prof. Dr. Hasan YETİM**

Doktora Tezi

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
FDK-2013-4235 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Ocak 2014
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tez çalışmasındaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

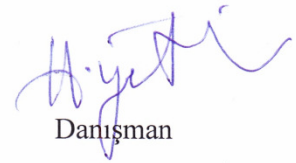
Fatih TÖRNÜK



YÖNERGEYE UYGUNLUK

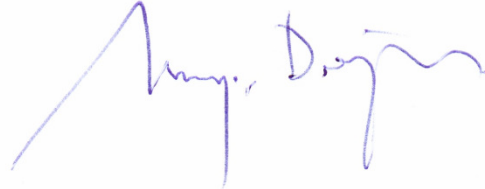
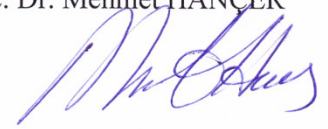
“Biyoaktif Madde Yüklenmiş Nanokillerle Güçlendirilmiş Aktif Ambalaj Üretimi ve Gıda Ambalajlamada Kullanımı” adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Fatih TÖRNÜK



Danışman
Prof. Dr. Hasan YETİM

Danışman
Doç. Dr. Mehmet HANCER



Gıda Mühendisliği ABD Başkanı
Prof. Dr. Mahmut DOĞAN

KABUL VE ONAY

Prof. Dr. Hasan YETİM ve Doç. Dr. Mehmet HANÇER danışmanlığında **Fatih TÖRNÜK** tarafından hazırlanan “**Biyookatif Madde Yüklendi Nanokillerle Güçlendirilmiş Aktif Ambalaj Üretimi ve Gıda Ambalajlamada Kullanımı**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

15/01/2014

JÜRİ:

Danışman : Prof. Dr. Hasan YETİM
 Üye : Prof. Dr. Hüseyin BOZKURT
 Üye : Prof. Dr. Mehmet HAYTA
 Üye : Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ
 Üye : Prof. Dr. Ahmed KAYACIER

(Handwritten signatures of the jury members)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 11/02/2014 tarih ve 2014/08-09 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

11/02/2014
 Prof. Dr. Kâzım KEŞLİOĞLU
 Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, planlanması ve çalışmanın yürütülmesinde maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Hasan YETİM'e sonsuz teşekkürü bir borç bilirim. Yine tez konusunun belirlenmesi, çerçevesinin çizilmesi ve altyapısının oluşturulmasına bilimsel yetkinliği sayesinde vermiş olduğu katkının yanı sıra maddi ve manevi desteği nedeniyle 2. danışmanım sayın hocam Doç. Dr. Mehmet HANÇER'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Akademik hayatımın başından bu zamana kadar her noktada emeği olan ve bugünlere gelmemdeki katkısını hiçbir zaman unutamayacağım değerli hocam Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ'a çok teşekkür ediyorum. Ayrıca tezin takibi hususunda çok emeği geçen, değerli tavsiyeleriyle tezin yönlendirilmesinde önemli katkıları olan Prof. Dr. Ahmed KAYACIER hocama da teşekkürü bir borç bilirim. Laboratuvar çalışmalarımın devam etmesinde ve takıldığım noktalarda oluşan problemlerin aşılmasında yardımını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. İsmet ÖZTÜRK, Yrd. Doç. Dr. Lütfiye EKİCİ, Araş. Gör. Safa KARAMAN, Araş. Gör. Ömer Said TOKER, Öğr. Gör. Hasan CANKURT, Araş. Gör. Ferhat YÜKSEL ve Araş. Gör. Lemiye ATABEK'e şükranlarımı sunuyorum. Yine laboratuvar işlerinde ihtiyaç duyduğum anda zamanını ayırmakta tereddüt etmeyen Araş. Gör. Ceyda BİRİŞİK ve yüksek lisans öğrencisi Öznur ÇALIŞKAN'a da teşekkürlerimi belirtmek istiyorum. Bu tez çalışması, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FDK-2013-4235 kodu ile desteklenmiş olup desteklerinden dolayı üniversitemiz Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederim. Hayatım boyunca her anımda yanımda olan, sevgilerini ve ilgilerini hiçbir zaman esirgemeyen, maddi ve manevi destekleri ile bugünlere gelmemde büyük emekleri olan anneme, babama ve kardeşlerime, doktora süresince sabrı, sevgisi ve ilgisiyle beni sürekli motive eden hayat arkadaşım sevgili eşim Tuba TÖRNÜK ile moral ve yaşam kaynağım güzel kızım Zeynep Rana TÖRNÜK'e teşekkür ediyorum.

Fatih TÖRNÜK
Kayseri, Ocak 2014

BİYOAKTİF MADDE YÜKLENMİŞ NANOKİLLERLE GÜÇLENDİRİLMİŞ AKTİF AMBALAJ ÜRETİMİ VE GIDA AMBALAJLAMADA KULLANIMI

Fatih TÖRNÜK

Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Doktora Tezi, Ocak 2014

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hasan YETİM

ÖZET

Bu çalışmada; biyoaktif maddeler [karvakrol (CRV), timol (THY) ve öjenol (EUG)], sürfaktan (Tween 80) vasıtasıyla nanokil [montmorillonit (MMT) ve halloysit (HNT)] yüzey ve aralıklarına taşınmış ve aktif kil nanopartikülleri (AKNP) üretilmiştir. Daha sonra bu AKNP'ler, düşük yoğunluklu polietilen (LDPE) bazlı aktif nanokompozit film (ANF) üretiminde kullanılmış ve üretilen ANF'lerin çeşitli gıdaların (kıyma, kaşar peyniri, parça et, fermente sucuk ve salça) raf ömürlerini etkileyen bazı parametreler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Araştırmada kullanılan kil, sürfaktan ve aktif maddelerin, zetapotansiyelleri ve partikül boyutları ölçülerek karakterize edilmiştir. Hem MMT ve hem de HNT, farklı pH'larda negatif zetapotansiyel değerleri sergilerken MMT'nin partikül boyutu pH 2.00-13.00 arasında 316.77 nm ile 378.25 nm arasında değişmiştir. CRV, THY ve EUG ile Tween 80'in noniyonik yapıda olduğu ve kullanılan killerin zetapotansiyellerinde kayda değer bir değişime neden olmadıkları belirlenmiştir. Nanokil, sürfaktan ve aktif maddeler ile üretilen AKNP'lerin, 7 farklı bakteriye (*Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus casei* ve *Lb. rhamnosus*) karşı antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiştir. CRV, EUG ve THY yüklenmiş AKNP'ler test edilen bakterilere karşı değişik düzeylerde antibakteriyel etki göstermişlerdir. Bunların arasında, sadece EUG-HNT örneğinin etkisi diğerlerine göre çok düşük bulunmuştur. *B. cereus*, bakteriler içerisinde AKNP'lere karşı en duyarlı mikroorganizma olarak belirlenmiştir. Yüksek antimikrobiyal aktivite gösteren AKNP'ler, LDPE ile %5 oranında karıştırılmış ve çift vidalı ekstrüder kullanılarak ANF'ler üretilmiştir. Elde edilen ANF'lerin antibakteriyel ve antiradikal aktiviteleri, mekanik özellikleri, 4°C ve 24°C'de 40 günlük depolama sırasında kalan aktif madde miktarları, renk özellikleri, DSC (diferansiyel taramalı

kalorimetre) ve TGA (termogravimetrik analiz) özellikleri, film kalınlıkları ile FTIR spektrumları test edilerek karakterizasyonları yapılmıştır. ANF'ler test edilen bakterilere karşı yüksek etkinlik göstermiş ve antibakteriyel etkinlikleri şu şekilde sıralanmıştır: THY-HNT > THY-MMT > CRV-MMT > CRV-HNT > EUG-MMT. ANF'lerin en düşük ve en yüksek 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radikali yakalama aktiviteleri, sırasıyla %65.59 ve %87.92 ile THY-MMT ve EUG-MMT'de elde edilmiştir. ANF'lerde aktif madde miktarı, 4°C'ye kıyasla 24°C'de depolama sırasında çok daha hızlı kaybolmuştur, 4°C'de 40 günlük depolama sonunda en yüksek aktif madde miktarları CRV-HNT ve THY-HNT'de belirlenmiştir. SEM (taramalı elektron mikroskopisi) fotoğrafları, AKNP'lerin polimer matriksinde büyük ölçüde homojen bir dağılım gösterdiklerini, ancak bazı bölgelerde kil aglomeratlarının oluştuğunu ortaya koymuştur. Ambalajların opaklık değerleri arasında istatistiksel olarak bir fark ($P>0.05$) bulunmazken en düşük ve en yüksek toplam renk farklılığı (ΔE) değerleri sırasıyla saf LDPE ve THY-MMT'de belirlenmiştir. TGA sonucunda en yüksek ve en düşük T_{50} değerleri sırasıyla 491.45°C ve 481.64°C ile CRV-MMT ve THY-MMT'de tespit edilmiştir. EUG-MMT ve saf LDPE ambalaj ise diğerlerinden daha erken termal yıkıma uğramıştır. DSC analizi sonucunda, LDPE ambalajın ANF'lere kıyasla daha düşük erime sıcaklığı ile daha yüksek erime entalpisi ve %kristalizasyon değerlerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Aktif madde ve nanokil çeşidi, ambalajın mekanik özellikleri üzerinde etkili olmuştur. Tüm AKNP yüklenmiş filmler, saf LDPE ambalajlara kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek ($P<0.05$) çekme dayanımı (TS) ve kopma anındaki uzama (EB) değeri sergilerken MMT kilinin mekanik özellikler üzerindeki olumlu etkisi HNT'den fazla bulunmuştur. Gıda denemeleri sonuçlarına göre ANF'ler; kaşar peynirinin doğal mikrobiyal yükü ile kaşara kontamine edilen *Aspergillus niger* küf ve *L. monocytogenes* bakterisinin gelişimini baskılamıştır. Kıymada doğal mikrobiyal yükün ve kontamine edilen *E. coli* O157:H7'nin inhibisyonunda THY-HNT, TBA oluşumunun geciktirilmesinde ise THY-HNT ve EUG-MMT etkili olmuştur. Dilimlenmiş fermente sucukların ANF'lerle ambalajlanıp depolanması ile TMAB (toplam mezofilik aerobik bakteri), MK (maya-küf) ve LAB (laktik asit bakterisi) sayıları başlangıca göre istatistiksel olarak önemli düzeyde ($P<0.05$) düşmüştür. Ancak ANF'ler, sucukta kontrole kıyasla TBA oluşumunun geciktirilmesi üzerine herhangi bir ilave etki yapmamıştır. Yine domates salçasına kontamine edilen *A. niger* küfünün inaktivasyonunda ANF'ler, kontrole kıyasla ilave bir ($P>0.05$) inhibisyon

sağlamamıştır. Parça etin yüzeyine kontamine edilen *E. coli* O157:H7'nin inaktivasyonunda, özellikle THY-MMT ve THY-HNT önemli derecede ($P<0.05$) etkili bulunmuştur. ANF'ler, parça etlerin arzu edilen yüzey renginin devamlılığında 4. güne kadar başarılı olmuş, ancak depolamanın 7. gününde tüm örnekler kırmızı yüzey renklerini kaybetmiştir. Bu araştırmanın sonucunda, CRV, THY ve EUG ile aktif kil nanopartikülleri başarılı bir şekilde üretilmiş ve ANF üretiminde kullanılmıştır. Neticede ANF'lerin bazı gıdaların ambalajlanmasında başarılı bir şekilde kullanılma potansiyeli taşıdıkları belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Montmorillonit, halloysit, nanokil, nanokompozit, öjenol, timol, karvakrol, aktif ambalajlama, gıda ambalajlama

**PRODUCTION AND FOOD PACKAGING APPLICATIONS OF ACTIVE
PACKAGING MATERIALS REINFORCED WITH NANOCCLAYS GRAFTED
WITH SOME BIOACTIVE COMPOUNDS**

Fatih TÖRNÜK

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

Ph.D. Thesis, January 2014

Thesis Supervisor: Prof. Hasan YETİM

ABSTRACT

In this study; some bioactive compounds [carvacrol (CRV), thymol (THY) and eugenol (EUG)] were transferred into the gaps and surface of nanoclays [(montmorillonite (MMT) and halloysite (HNT)] using a surfactant (Tween 80) and thereby active clay nanoparticles (ACNPs) were produced. Those ACNPs were used in the production of low density polyethylene (LDPE) based active nanocomposite films (ANFs). Finally, the ANFs were evaluated for their efficiency on some parameters affecting the shelf life of some foods (ground beef, kashar cheese, beef cuts, fermented sucuk and tomato paste). In the first step, nanoclays were characterized by measuring their zetapotential values and particle size. Both MMT and HNT exhibited negative zetapotential values in different pH values while particle size of MMT ranged from 316.77 nm to 378.25 nm between pH of 2.00 and 13.00. It was found that CRV, EUG and THY were in nonionic character, and they did not remarkably change the zetapotential values of the nanoclays. Antimicrobial activity of ACNPs was tested against 7 different bacterial strains (*Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus casei* and *Lb. rhamnosus*). CRV, EUG or THY grafted ACNPs showed variable antibacterial activities. Among them, the antibacterial activity of EUG-HNT was the lowest. It was determined that *B. cereus* was the most sensitive strain among the bacteria tested against ACNPs. ACNPs showing high antimicrobial activity were mixed with LDPE in a ratio of 5%, and ANFs were produced using a twin-screw extruder. ANFs were characterized by analyzing their antibacterial and antiradical activity, mechanical properties, residual amounts of active compounds, color properties, DSC and TGA properties, film thickness and FTIR spectra. In the results, ANFs exhibited

strong antibacterial activity by the following order: THY-HNT > THY-MMT > CRV-MMT > CRV-HNT > EUG-MMT. The lowest and highest 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activities were 65.59% and 87.92%, which belonged to THY-MMT and EUG-MMT, respectively. Active compounds were released from the ANFs more rapidly at 24°C than at 4°C. CRV-HNT and THY-HNT had the highest active compound amounts after storage at 4°C for 40 days. SEM images showed that ACNPs dispersed well in the polymer matrix, but some agglomerations were also present in some areas. There was no difference ($P > 0.05$) statistically between the opacity values of the films while the lowest and highest total color difference values (ΔE) were obtained in neat LDPE and THY-MMT, respectively. TGA results revealed that the highest and lowest T_{50} values were 491.45°C and 481.64°C for the samples CRV-MMT and THY-MMT, respectively. Thermal degradation of EUG-MMT and neat LDPE films occurred earlier than that of the other samples. DSC analysis indicated that neat LDPE film had lower melting temperature and higher melting enthalpy and %crystallization values than those of the ANFs. Mechanical properties of packaging film were affected from diversity of the active compounds and the nanoclays. All ANFs showed higher ($P < 0.05$) tensile strength (TS) and elongation at break (EB) values than the neat LDPE film while contribution of MMT to mechanical improvement was more than that of the HNT. Considering the results of food packaging tests, the ANFs suppressed the growth of native microbial load of kashar cheese and growth of *A. niger* and *L. monocytogenes* which were inoculated to the cheese surface. THY-HNT was effective on inhibition of native microbial load and inoculated *E. coli* O157:H7 of ground meat while THY-HNT and EUG-MMT retarded TBA formation in the ground meat samples. Counts of total mesophilic aerobic bacteria (TMAB), yeasts and molds (YM) and lactic acid bacteria (LAB) of sliced fermented sucuk samples which were packaged with ANFs at the end of the storage were statistically lower ($P < 0.05$) than those at the beginning of the storage. However, ANFs did not make additional contribution to the retardation of TBA formation in the sliced sucuk samples as compared to the control. For the inactivation of *A. niger* inoculated to tomato paste, the ANFs did not show any additional inhibitive effect when compared to neat LDPE film. Especially THY-MMT and THY-HNT showed considerable inactivation effect on *E. coli* O157:H7 inoculated to the surface of the beef cut. The ANFs were successful for sustaining the desired surface color of the meat up to 4 days, but all meat samples lost

their red color at the 7th day of the refrigerated storage. The present study demonstrated the successful production of, THY, EUG or CRV grafted active clay nanoparticles and their use in ANF manufacture. It could be concluded that the ANFs had the potential for the successfully use in various food packaging applications.

Keywords: Montmorillonite, halloysite, nanoclay, nanocomposite, eugenol, thymol, carvacrol, active packaging, food packaging

İÇİNDEKİLER

BİYOAKTİF MADDE YÜKLENMİŞ NANOKİLLERLE GÜÇLENDİRİLMİŞ AKTİF AMBALAJ ÜRETİMİ VE GIDA AMBALAJLAMADA KULLANIMI

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	İ
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	İİ
KABUL VE ONAY	İİİ
TEŞEKKÜR.....	İV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	Vİİİ
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	XVİ
TABLolar LİSTESİ.....	XİX
ŞEKİLLER LİSTESİ	XXİİ
GİRİŞ	1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.2. Gıda ambalajlamada nanoteknolojinin kullanımı	6
1.2.1. Nanokiller, tanımı ve gıda ambalajlamada önemi	7
1.2.1.1. Montmorillonit (MMT)	7
1.2.1.2. Halloysit nanotüpleri (HNT)	10
1.2.2. Polimer-kil nanokompozit (PKN) üretimi ve gıda ambalajlamada kullanımı	13
1.2.2.1. Güçlendirilmiş PKN'ler	15
1.2.2.2. Aktif PKN'ler.....	17

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyaller	25
2.1.1. Sarf malzemeler.....	25
2.1.2. Gıda denemelerinde kullanılan malzemelerin temini.....	25
2.2. Yöntem	26
2.2.1. Nanokillerin karakterizasyonu	26
2.2.1.1. Yüzey zetapotansiyel ölçümü	26
2.2.1.2. Ortalama partikül boyutu ve dağılımı	26
2.2.2. Aktif maddelerin ve sürfaktanların karakterizasyonu.....	26
2.2.3. Biyoaktif madde içeren aktif kil nanopartiküllerinin (AKNP) üretimi ve karakterizasyonu.....	27
2.2.3.1. AKNP üretimi.....	27
2.2.3.2. AKNP'lerin antimikrobiyal aktivitelerinin tespiti	28
2.2.4. Biyoaktif madde içeren aktif nanokompozit film (ANF) üretimi ve karakterizasyonu.....	29
2.2.4.1. ANF üretimi.....	29
2.2.4.2. ANF'lerin antimikrobiyal aktivitesinin tespiti	29
2.2.4.3. ANF'lerin antiradikal aktivitelerinin tespiti.....	30
2.2.4.4. ANF'lerde kalan aktif madde miktarının belirlenmesi	31
2.2.4.5. ANF'lerin mekanik özellikleri.....	32
2.2.4.6. ANF'lerin morfolojik (SEM) özellikleri.....	32
2.2.4.7. ANF'lerin renk ve opaklık özellikleri.....	33
2.2.4.8. Film kalınlığı.....	33
2.2.4.9. Termogravimetrik (TGA) analiz	33
2.2.4.10. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC)	34
2.2.4.11. Fourier transform infrared (FTIR) spectra analizi	34
2.2.5. Gıda denemeleri	34
2.2.5.1. Kaşar peyniri	34
2.2.5.2. Kıyma	38
2.2.5.3. Fermente sucuk	40
2.2.5.4. Parça et.....	41

2.2.5.4.1. Parça etin analize hazırlanması ve ANF'lerle paketlenmesi.....	41
2.2.5.4.2. Mikrobiyolojik analizler.....	42
2.2.5.5. Salça.....	42
2.2.5.5.1. Salçanın analize hazırlanması ve ANF'lerle paketlenmesi.....	42
2.2.5.5.2. Mikrobiyolojik analizler.....	43
2.2.6. İstatistiksel analiz ve değerlendirme	43

3. BÖLÜM

BULGULAR

3. BÖLÜM.....	44
BULGULAR.....	44
3.1. Nanokillerin karakterizasyonu	44
3.1.1. Nanokiller ve silikanın yüzey zetapotansiyelleri	44
3.1.2. Nanokillerde partikül boyutu analizi	45
3.2. Aktif maddelerin ve sürfaktanın karakterizasyonu	46
3.3. Aktif kil nanopartiküllerinin karakterizasyonu.....	48
3.3.1. Aktif kil nanopartiküllerinin antimikrobiyal aktivitesi	48
3.4. Aktif nanokompozit filmlerin karakterizasyonu.....	56
3.4.1. ANF'lerin antimikrobiyal aktivitesi	56
3.4.2. ANF'lerin antiradikal aktivitesi	64
3.4.3. ANF'lerdeki aktif madde miktarının depolama süresince değişimi.....	64
3.4.4. ANF'lerin mekanik özellikleri.....	66
3.4.5. ANF'lerin morfolojik özellikleri	67
3.4.6. ANF'lerin renk ve opaklık değerleri	69
3.4.7. Film kalınlığı.....	69
3.4.8. Termogravimetrik analiz (TGA)	70
3.4.9. DSC analizi	71
3.4.10. FTIR analizi.....	73
3.5. Gıda denemeleri	74
3.5.1. Kaşar peyniri	74
3.5.1.1. ANF'lerin doğal mikrobiyal yük üzerindeki etkisi	74
3.5.1.2. ANF'lerin <i>Aspergillus niger</i> yükü üzerindeki etkisi.....	77
3.5.1.3. ANF'lerin <i>Listeria monocytogenes</i> yükü üzerindeki etkisi	78

3.5.1.4. ANF'lerin kaşar peynirinin pH'sı üzerindeki etkisi.....	79
3.5.2. Kıyma	80
3.5.2.1. ANF'lerin kıymanın doğal mikrobiyal yükü üzerindeki etkisi.....	80
3.5.2.2. ANF'lerin kıymada <i>E. coli</i> O157:H7 üzerindeki etkisi.....	82
3.5.2.3. ANF'lerin kıymada TBA oluşumu üzerindeki etkisi	83
3.5.2.4. ANF'lerin kıymanın pH değeri üzerindeki etkisi.....	84
3.5.3. Sucuk	84
3.5.3.1. Sucuğun fermentasyonu ile doğal yükü, pH'sı ve TBA değerinde meydana gelen değişimler.....	85
3.5.3.2. ANF'lerin dilimlenmiş sucuğun doğal mikrobiyal yükü üzerindeki etkisi	86
3.5.3.3. ANF'lerin dilimlenmiş sucukta TBA oluşumu üzerindeki etkisi.....	88
3.5.3.4. ANF'lerin dilimlenmiş sucuğun pH değeri üzerindeki etkisi.....	88
3.5.4. Domates salçası.....	89
3.5.4.1. ANF'lerin salçada <i>A. niger</i> üzerindeki etkisi.....	89
3.5.5. Parça et.....	90
3.5.5.1. ANF'lerin parça ette <i>Escherichia coli</i> O157:H7 üzerindeki etkisi	90
3.5.5.2. ANF'lerin parça etin yüzey rengi üzerindeki etkisi	91

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1. Nanokillerin karakterizasyonu	94
4.2. Aktif madde ve sürfaktanların karakterizasyonu.....	96
4.3. Aktif kil nanopartiküllerinin antimikrobiyal aktivitesi	99
4.4. ANF'lerin karakterizasyonu	101
4.4.1. ANF'lerin antimikrobiyal özellikleri.....	101
4.4.2. ANF'lerin antiradikal aktivitesi	103
4.4.3. ANF'lerde kalan aktif madde miktarı.....	105
4.4.4. ANF'lerin mekanik özellikleri.....	107
4.4.5. ANF'lerin morfolojik özellikleri	108
4.4.5. ANF'lerin renk-opaklık değerleri.....	110
4.4.6. Film kalınlığı.....	111
4.4.7. Termogravimetrik analiz (TGA)	111

4.4.10. DSC analizi	112
4.4.11. FTIR analizi.....	113
4.5. Gıda denemeleri	114
4.5.1. Kaşar peyniri	114
4.5.1.1. ANF'lerle ambalajlamanın kaşar peynirinin doğal mikrobiyal yükü üzerindeki etkisi	114
4.5.1.2. ANF'lerin kaşar peynirine kontamine edilen <i>Aspergillus niger</i> küf'ünün gelişimi üzerindeki etkisi	116
4.5.1.3. ANF'lerin kaşar peynirinde <i>L. monocytogenes</i> gelişimi üzerindeki etkisi	117
4.5.1.4. ANF'lerin kaşar peynirinin pH değeri üzerindeki etkisi.....	118
4.5.2. Kıyma	119
4.5.2.1. ANF'lerin kıymanın doğal mikrobiyal yükü üzerindeki etkisi.....	119
4.5.2.2. ANF'lerin kıymada <i>E. coli</i> O157:H7 canlılığı üzerindeki etkisi	122
4.5.2.3. ANF'lerin kıymada TBA oluşumu üzerindeki etkisi	124
4.5.3. Fermente sucuk	126
4.5.3.1. Fermentasyon sırasında meydana gelen değişimler	126
4.5.3.2. ANF'lerin dilimlenmiş sucuğun doğal mikrobiyal yükü üzerindeki etkisi	128
4.5.3.3. ANF'lerin dilimlenmiş sucuğun TBA değeri üzerindeki etkisi.....	130
4.5.3.4. ANF'lerin dilimlenmiş sucuğun pH değeri üzerindeki etkisi.....	131
4.5.4. Domates salçası.....	133
4.5.4.1. Aktif nanokompozit filmlerin domates salçasına kontamine edilen <i>Aspergillus niger</i> canlılığı üzerindeki etkisi	133
4.5.5. Parça et.....	134
4.5.5.1. Aktif nanokompozit filmlerin parça et yüzeyine kontamine edilen <i>Escherichia coli</i> O157:H7 canlılığı üzerindeki etkisi	134
4.5.5.2. ANF'lerin parça etin yüzey rengi üzerindeki etkisi.....	137
4.6. Bu araştırmada elde edilen önemli sonuçlar	138
4.7. Bu araştırma sonucunda sunulabilecek bazı öneriler	141
KAYNAKLAR	143
ÖZGEÇMİŞ.....	163

KISALTMALAR ve SİMGELER

<u>Sembol</u>	<u>Anlamı</u>
Ag-NP	Gümüş nanopartikülü
AKNP	Aktif kil nanopartikülü
ANF	Aktif nanokompozit film
ANOVA	Varyans analizi
BHA	Bütillenmiş hidroksi anisol
BPA	Baird Parker Agar
CRV	Carvacrol - karvakrol
Cm	Santimetre
Dk	Dakika
DLS	Dynamic light scattering - dinamik ışık saçılımı
DMSO	Dimetilsülfoksit
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DRBC	Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol
DSC	Differential scanning calorimetry - diferansiyel taramalı kalorimetre
EB	Elongation at break - kopma anındaki uzama
EM	Elasticity modulus - esneklik modülü
ERÜTAM	Erciyes Üniversitesi Tarımsal Araştırma Merkezi
EUG	Eugenol - öjenol
EVOH	Etilen vinil kopolimer
FGI	Fungal growth inhibition - fungal gelişim inhibisyonu
FID	Flame ionization detector - alev iyonizasyon detektörü
FTIR	Fourier transform infrared – fourier dönüşüm kızılötesi
g	Gram
GC	Gaz kromatografisi
GRAS	Generally recognized as safe - genellikle güvenilir kabul edilen
HDPE	High density polyethylene - yüksek yoğunluklu polietilen
HNT	Halloysit nanotüpleri
HPMC	Hidroksipropilmetilselüloz

KNT	Karbon nanotüpleri
Kob	Koloni oluşturan birim
LAB	Laktik asit bakterileri
LDPE	Low density polyethylene - düşük yoğunluklu polietilen
M	Molar
MC	Metilselüloz
MEA	Malt Ekstrakt Agar
MEB	Malt Extract Broth
Mg	Miligram
MK	Maya-küf
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MMT	Montmorillonit
MRD	Maximum Recovery Diluent
MRS	DeMan Rogosa Sharpe
mV	Milivolt
PCL	Polikaprolakton
PKN	Polimer kil nanokompozit
PP	Polipropilen
PP/EVOH	Polipropilen / etilen vinil alkol
PVOH-b-PAN	Polivinil alkol-b-poliakrilonitril
s	Saniye
SEM	Scanning electron microscopy - taramalı elektron mikroskobu
SFM	Scanning force microscopy - taramalı kuvvet mikroskobu
SMAC	Sorbitol MacConkey
TBA	Tiyobarbitürik asit
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
TGA	Termogravimetrik analiz
THY	Thymol - timol
TK	Toplam koliform
TMAB	Toplam mezofilik aerobik bakteri
TPAB	Toplam psikrofilik aerobik bakteri
TS	Tensile strength - çekme dayanımı

XRD	X-Ray Diffraction - X ışını difraksiyonu
VRBD	Violet Red Bile Dextrose
Å	Angström

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. HNT'nin bazı özellikleri [32].....	11
Tablo 2. HNT ve KNT'nin karşılaştırması	11
Tablo 3. HNT’de çeşitli sürfaktanların etkileri sonucu oluşan bazal boşluk değerleri [33]......	12
Tablo 4. Çeşitli PKN'lerde tespit edilen geçirgenlik özellikleri.....	16
Tablo 5. Ag-NP'lerin ve Ag içeren nanokompozit filmlerin antimikrobiyal özellikleri.	19
Tablo 6. Uçucu yağ ve bileşenleri ile elde edilen bazı aktif ambalajlar.	21
Tablo 7. Uçucu yağ ve bileşenleri ile elde edilen aktif ambalajların gıdalarda kullanımı.	22
Tablo 8. Aktif madde-sürfaktan-nanokil etkileşiminin tespiti için kullanılan aktif madde ve sürfaktan konsantrasyonları.....	27
Tablo 9. Test edilen bakteriler.	29
Tablo 10. GC analiz koşulları.	31
Tablo 11. Aktif madde tayini yapılan filmler.....	32
Tablo 12. Farklı konsantrasyonlarda aktif madde ilavesinin silika, MMT ve HNT’nin zetapotansiyeli üzerindeki etkisi.	48
Tablo 13. AKNP'lerin farklı inokulum seviyelerinde <i>L. monocytogenes</i> 'e karşı antimikrobiyal etkisi.....	49
Tablo 14. AKNP'lerin farklı inokulum seviyelerinde <i>Sal. Typhimurium</i> 'a karşı antimikrobiyal etkisi.....	50
Tablo 15. AKNP'lerin farklı inokulum seviyelerinde <i>E. coli</i> O157:H7'ye karşı antimikrobiyal etkisi.....	51
Tablo 16. AKNP'lerin farklı inokulum seviyelerinde <i>S. aureus</i> 'a karşı antimikrobiyal etkisi.	52
Tablo 17. AKNP'lerin farklı inokulum seviyelerinde <i>B. cereus</i> 'a karşı antimikrobiyal etkisi.	53
Tablo 18. AKNP'lerin farklı inokulum seviyelerinde <i>Lb. casei</i> 'ye karşı antimikrobiyal etkisi.	54
Tablo 19. AKNP'lerin farklı inokulum seviyelerinde <i>Lb. rhamnosus</i> 'a karşı antimikrobiyal etkisi.....	55
Tablo 20. Aktif nanokompozit filmlerin bazı mekanik özellikleri.	67
Tablo 21. ANF'lerin renk ve opaklık değerleri.	69

Tablo 22. ANF'lere ait kalınlık değerleri.	70
Tablo 23. ANF'lerin termal �zellikleri.	72
Tablo 24. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen kaşar peynirlerinin toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) yüklerinin depolama sırasındaki değişimi.	74
Tablo 25. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen kaşar peynirlerinin laktik asit bakterisi (LAB) yüklerinin depolama sırasındaki değişimi.	75
Tablo 26. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen kaşar peynirlerinin toplam koliform (TK) yüklerinin depolama sırasındaki değişimi.	76
Tablo 27. Farklı ANF'lerle paketlenen kaşar peynirinin toplam maya-küf (MK) yükünün depolama sırasındaki değişimi.	76
Tablo 28. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen kaşar peynirlerinin <i>S. aureus</i> yükünün depolama sırasındaki değişimi.	77
Tablo 29. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen kaşar peynirine inoküle edilen <i>Aspergillus niger</i> sayısının depolama sırasındaki değişimi.	78
Tablo 30. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen kaşar peynirine inoküle edilen <i>Listeria monocytogenes</i> sayısının depolama sırasındaki değişimi.	79
Tablo 31. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen kaşar peynirinin pH değerinin depolama sırasındaki değişimi.	80
Tablo 32. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen kıymaların toplam mezofilik aerobik bakteri yükünün (TMAB) depolama sırasındaki değişimi.	81
Tablo 33. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen kıymaların laktik asit bakterisi (LAB) sayısının depolama sırasındaki değişimi.	81
Tablo 34. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen kıymaların toplam <i>Enterobacteriaceae</i> yükünün depolama sırasındaki değişimi.	82
Tablo 35. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen kıyılmış etlere inoküle edilen <i>E. coli</i> O157:H7 sayısının depolama sırasındaki değişimi.	83
Tablo 36. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen kıyılmış etlerde TBA değerinin depolama sırasındaki değişimi.	83
Tablo 37. Farklı ANF'lerle paketlenen kıyılmış etlerde pH değerinin depolama sırasındaki değişimi.	84
Tablo 38. Sucukta fermentasyon öncesi ve sonrasında mikrobiyal yükü, TBA ve pH değerinde meydana gelen değişmeler.	85

Tablo 39. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen dilimlenmiş sucukların toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayısının depolama sırasındaki değişimi.	86
Tablo 40. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen dilimlenmiş sucukların laktik asit bakterisi (LAB) sayısının depolama sırasındaki değişimi.....	87
Tablo 41. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen dilimlenmiş sucukların toplam maya-küf (MK) sayısının depolama sırasındaki değişimi.	87
Tablo 42. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen dilimlenmiş sucukların TBA değerinin depolama sırasındaki değişimi.	88
Tablo 43. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen dilimlenmiş sucukların pH değerinin depolama sırasındaki değişimi.	89
Tablo 44. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen domates salçasının <i>Aspergillus niger</i> yükünün depolama sırasındaki değişimi.....	90
Tablo 45. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen parça etin <i>Escherichia coli</i> O157:H7 yükünün depolama sırasındaki değişimi.	91
Tablo 46. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen parça etin renginin depolama sırasındaki değişimi.....	92

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Nanoteknolojinin Gıda Bilimi ve Teknolojisi alanındaki uygulamaları [10].	2
Şekil 2. MMT kil tabakasının şematik yapısı [1].	8
Şekil 3. Kil-polimer interaksiyonu sonucu elde edilen kompozit tipleri [3].	9
Şekil 4. HNT'nin yapısı ve boyutları.	10
Şekil 5. HNT'nin TEM görüntüsü [4].	12
Şekil 6. PKN içerisinde geçiş yapan maddenin aldığı yol [3].	15
Şekil 7. Nanokil takviyeli PKN'lerde antimikrobiyal ajanın kontrollü salımı.	18
Şekil 8. HNT, MMT ve Silikanın zetapotansiyel değerlerinin pH'ya göre değişimi.	45
Şekil 9. Montmorillonitin (MMT) partikül boyutunun pH'ya bağlı olarak değişimi.	46
Şekil 10. Farklı konsantrasyonlardaki Tween 80'in MMT'nin zetapotansiyeli üzerine etkisi.	47
Şekil 11. Aktif nanokompozit filmlerin <i>Listeria monocytogenes</i> 'e karşı antimikrobiyal aktiviteleri.	57
Şekil 12. Aktif nanokompozit filmlerin <i>Salmonella Typhimurium</i> 'a karşı antimikrobiyal aktiviteleri.	58
Şekil 13. Aktif nanokompozit filmlerin <i>Escherichia coli</i> O157:H7'ye karşı antimikrobiyal aktiviteleri.	59
Şekil 14. Aktif nanokompozit filmlerin <i>Staphylococcus aureus</i> 'a karşı antimikrobiyal aktiviteleri.	60
Şekil 15. Aktif nanokompozit filmlerin <i>Bacillus cereus</i> 'a karşı antimikrobiyal aktiviteleri.	61
Şekil 16. Aktif nanokompozit filmlerin <i>Lactobacillus casei</i> 'ye karşı antimikrobiyal aktiviteleri.	62
Şekil 17. Aktif nanokompozit filmlerin <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 'a karşı antimikrobiyal aktiviteleri.	63
Şekil 18. Uçucu yağ bileşenleri ile üretilen ANF'lerin DPPH radikali yakalama aktiviteleri (%).	64
Şekil 19. 4°C'de (A) ve 24°C'de (B) muhafaza edilen ANF'ler kalan aktif madde miktarının zamana bağlı olarak değişimi (ppm)*.	65
Şekil 20. 4°C'de (A) ve 24°C'de (B) muhafaza edilen ANF'lerdeki kalan aktif madde miktarı üzerinde nanokilin etkisi.	66

Şekil 21. Aktif nanokompozit filmlerin SEM (taramalı elektron mikroskobu)	
görüntüleri.	68
Şekil 22. Sıcaklığa bağlı olarak ANF'lerin ağırlıklarında meydana gelen kayıp.	70
Şekil 23. ANF'lerin DSC termogramları.	72
Şekil 24. ANF'lere ait FTIR spektraları.	73

GİRİŞ

"Nano" kelimesi, Latince cüce anlamına gelen "nanus" kelimesinden türetilmiştir. Nanometre (nm), milimetrenin milyonda biri (10^{-6} mm = 10^{-9} m)'dir. Normal bir kâğıdın kalınlığı 10.000 nm, bir DNA molekülünün çapı ise 2.5 nm'dir. Nanopartiküller ise genellikle 100 nm'nin altında partikül boyutuna sahip materyallerdir. Yoğun araştırmalara konu olan nanopartiküller, aynı kimyasal kompozisyona, ancak daha büyük partikül boyutuna sahip tozlara göre çok farklı özellikler sergileyen nanomateriyallerden ibaret olan tozlardır [1]. Nanopartiküllerin elektronik, optik ve diğer reaktif özellikleri mikroyapıya sahip emsallerinden daha farklıdır. Ayrıca nanopartiküller, boyutları itibarıyla, daha geniş yüzey alanı ve bunun sonucunda daha fazla yüzey atomuna sahiptirler [2-4].

Maddeyi atomik ve moleküler düzeyde kontrol etme bilimi olarak tanımlanan nanoteknoloji, günümüzde bilgisayar, elektronik, iletişim, enerji üretimi, tıp, farmakoloji ve gıda endüstrisi gibi çok çeşitli alanlarda kullanılan yeni bir teknolojidir [5]. Tüm dünyada yaklaşık 4 trilyon dolarlık bir ekonomik hacme sahip olan gıda endüstrisi, nanoteknoloji alanındaki yeni gelişmelerden de pay alabilecek önemli bir konumdadır [6].

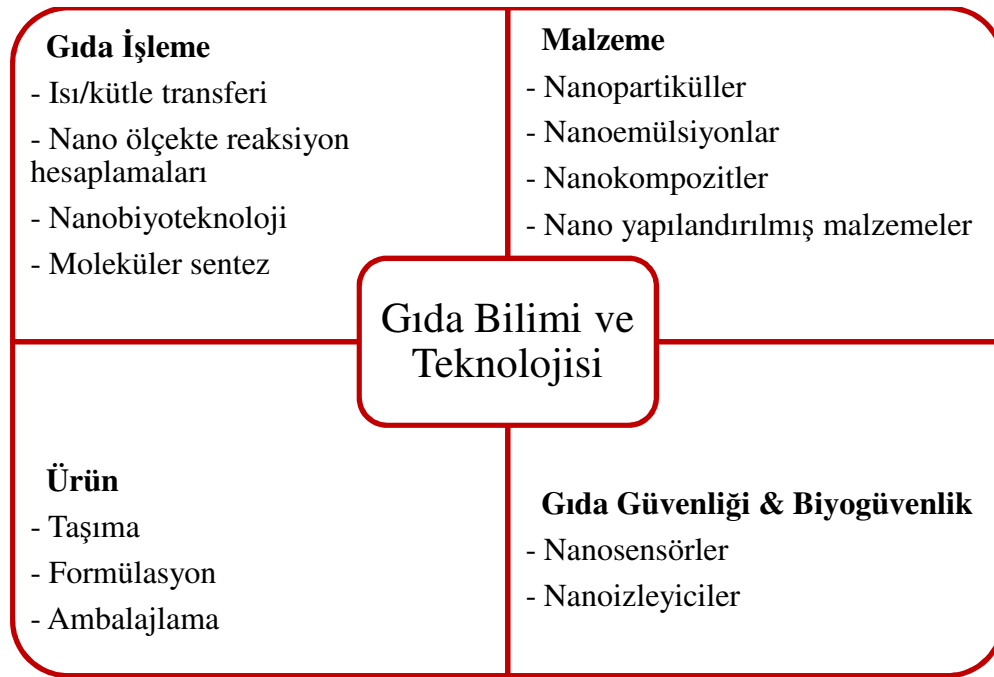
Gıda endüstrisi, güvenli ve yüksek kaliteli gıdaların elde edilmesi için geliştirilen tekniklerin kullanımı konusunda çoğu zaman büyük sorunlarla karşılaşmaktadır. Gıda endüstrisi ve nanoteknoloji, dünyadaki nüfus ve gelir artışından kaynaklanan ve giderek yükselen taleplerin karşılanmasında önemli bir potansiyele sahiptir. Gelecekte nanoteknolojinin gıda ve biyoteknolojide fonksiyonel gıdaların elde edilmesi için gıda üretim proseslerinde iyileşmeler sağlayacağı düşünülmektedir [7, 8].

Nanoteknoloji, son yıllarda gıda ve tarım sistemlerine büyük yenilikler getirebilme potansiyeline sahip bir alan olarak görülmüştür. Gıda bileşenlerinin nano ölçekte

kontrol edilmesi; tekstür, duyuşal özellikler, işlenebilirlik ve raf ömrü gibi gıdaların makro ölçekli karakteristiklerinin de modifikasyonuna imkân sağlayabilmektedir [9].

Nanoteknolojinin gıda bilimi ve teknolojisi alanındaki uygulamaları 4 temel başlık altında incelenebilir:

1. Yeni fonksiyonlara sahip materyallerin geliştirilmesi
2. Mikro- ve nano ölçekli işleme
3. Ürün geliştirme
4. Gıda güvenliği ve biyogüvenlik için yeni yöntem ve enstrümanların geliştirilmesi. Şekil 1'de nanoteknolojinin gıda bilimindeki uygulamaları şematik olarak görölmektedir.



Şekil 1. Nanoteknolojinin Gıda Bilimi ve Teknolojisi alanındaki uygulamaları [10].

Nanoteknolojinin gıda teknolojisi alanındaki başlıca uygulaması ambalajlama alanında olup bir ölçeği nanoboyutta olan nanokiller, ambalaj polimeri içerisine karıştırılarak polimer nanokompozitlerini meydana getirmektedir. Nanokiller, ambalajlara düşük miktarlarda dahi ilave edildiklerinde, ambalajların bariyer özelliklerini iyileştirirler. Buna ek olarak, killer, Ag, Zn gibi çeşitli metaller ile bağlanarak antimikrobiyal özellik kazanmakta ve aktif ambalaj üretiminde kullanılmaktadır. Nanokillerin diğeri bir avantajı ise ambalaj üretimi sırasında ambalaja ilave edilen ısıya duyarlı biyoaktif

maddelerin termal degradasyonuna karşı da koruyucu etki sağlamasıdır [10]. Aynı zamanda, biyoaktif maddelerin ambalaj içerisinde daha geniş bir yüzey alanında daha homojen dağılımı ile ambalajdan kontrollü salımını sağlayarak etkinliklerinin daha yüksek ve uzun süreli olmasına da imkân vermektedir.

Bazı baharatların, uçucu yağların ve türevlerinin antimikrobiyal etkileri uzun zamandır bilinmektedir ve bunların pek çok gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaya karşı inhibitör etkileri de çok sayıda çalışma tarafından ortaya konulmuştur [11]. Örneğin timol (thymol, THY) ve karvakrol (carvacrol, CRV), kekik ve oregano uçucu yağlarının temel bileşenleri olup kimyasal yapıları bakımından birbirlerine oldukça benzerdirler. THY'nin CRV'den farkı, fenolik halkasının üzerinde farklı bir yerde sahip olduğu hidroksil grubudur. Araştırmalar, THY ve CRV'nin antimikrobiyal etkisinin, mikrobiyal hücre zarının geçirgenliğini artırmaları ile lipopolisakkaritlerin serbest kalması sonucu ortaya çıktığı bildirilmektedir [12]. Öjenol (eugenol, EUG) ise karanfil uçucu yağının ana bileşenidir. EUG'nin bakterilerin amilaz ve proteaz üretimini inhibe ettiği, aynı zamanda hücre duvarına zarar vererek hücrenin ölümüne yol açtığı bildirilmiştir [13].

Uçucu yağ ve türevleri, yapay antioksidanların yerine gıdalarda kullanım potansiyeline sahip doğal antioksidanlar olarak da dikkate alınabilir. EUG'nin antioksidan aktivitesinin diğer bir doğal antioksidan olan α -tokoferol kadar yüksek olmadığı, ancak özellikle başlangıç aşamasında lipid oksidasyonunu engelleyebileceği bildirilmiştir [14]. CRV ve THY'nin konsantrasyonlarına bağlı olarak lipid peroksidasyonunu önlediği bildirilmiştir. Bu iki bileşiğin antioksidan aktivitesi ise birbirine yakın bulunmuştur [15].

Aktif ambalajlama kapsamında ambalaja antimikrobiyal ve antioksidan özellik kazandırma yollarından bir tanesi, çeşitli uçucu ya da uçucu olmayan biyoaktif maddelerin taşıyıcı polimere bağlanmasıdır. Gıda ambalajlamada, ambalaj materyali polimer içerisine ilave edilen aktif maddeler arasında organik asitler (propiyonik, laktik, benzoik, asetik, sorbik ve malik asit), nisin, pediosin gibi bakteriyosinler, lizozim gibi enzimler, çeşitli uçucu yağlar ve üzüm çekirdeği ekstraktı gibi fitokimyasallar yer almaktadır [16]. Bu alanda yapılan çalışmaların çoğunluğunda biyoaktif maddeler doğrudan biyobozunur ya da plastik ambalaj materyalleri içerisine karıştırılırken, son

yıllarda biyoaktif maddelerin nanokillerin taşıyıcı olarak kullanıldığı sistemlerle ambalaj polimeri içerisine ilave edilmesi yönünde çalışmalar da ortaya çıkmıştır.

Hazırdaki çalışma kapsamında; öncelikle antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri bilinen bitkisel kaynaklı saf materyallerden THY, EUG ve CRV'nin GRAS statüsünde yer alan Tween 80 sürfaktanı vasıtasıyla saf bentonit (montmorillonit - MMT) tabakaları ve halloysit nanotüpleri (HNT) içerisine tutunması sağlanmıştır. Böylece aktif nanopartiküller elde edilmiştir. Daha sonra, aktif madde içeren bu nanopartiküllerin bazı patojen ve patojen olmayan bakterilere (*Salmonella enterica* ssp. Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus casei* ve *Lb. rhamnosus*) karşı etkinlikleri belirlenmiştir. Ardından elde edilen bu materyallerden etkisi düşük olanlar elenerek geriye kalanlar, düşük yoğunluklu polietilen (low density polyethylene, LDPE) ile %5 oranında karıştırılarak çift vidalı bir ekstrüder vasıtasıyla aktif ambalaj materyalleri üretiminde kullanılmıştır. Elde edilen aktif nanokompozit LDPE filmlerin yukarıda zikredilen bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteleri, antioksidan aktiviteleri, içerdikleri aktif madde miktarlarının değişimi, mekanik özellikleri ve mikroskopik görüntüleri tespit edilmiştir. Son olarak bu filmler, belirlenen bazı model gıdaların (kıyma, parça et, kaşar peyniri, fermente sucuk ve domates salçası) ambalajlanmasında kullanılarak gerçek gıda maddelerinin depolanması sürecindeki koruyucu etkileri test edilmiştir.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

Ambalaj, içerisine konulan ürünleri dış etkenlerden koruyan ve depolama süresince ürünlerin özelliklerini kaybetmemesini sağlayan bir sistemin adıdır. Geçmişte gıda ambalajları, gıda maddelerini fiziksel ve çevresel etmenlere karşı korumak için bariyer oluşturması amacıyla kullanılmıştır [17, 18]. Ancak günümüzde çok daha farklı amaçlara da hizmet etmektedir. Klasik ambalajlar, gıdalarda istenmeyen bazı mikroorganizmaların gelişimi ile gıdaların sağlık açısından ve/veya duyuşsal yönden tüketilemez hale gelmesini engellemede yetersiz kalmaktadır. Gıda maddelerinin kalitesinin devamlılığının sağlanması yanında raf ömrünün de uzatılması için ambalaj materyalinde çeşitli modifikasyonların yapıldığı ambalajlama tipi olarak tanımlanan aktif ambalajlama, sürekli değişen tüketici talepleri ve piyasa eğilimleri doğrultusunda ortaya çıkan yenilikçi gıda ambalaj konseptlerinden bir tanesidir. Antimikrobiyal ambalajlama, aktif ambalajlamanın gelecek vadeden çeşitlerinden olup ambalaj materyallerine antimikrobiyal maddelerin ilavesi, hedef mikroorganizmanın lag fazını uzatarak ve/veya gelişme oranını azaltarak ya da temas yoluyla onları inaktive ederek mikrobiyal kontaminasyonu kontrol altına alır [18].

Nanoteknoloji, dünyada yükselmekte olan alanlardan birisi olup gıda nanoteknolojisinin toplam nanoteknoloji içerisindeki payı henüz fazla değildir. Bununla birlikte gıda teknolojisi; bariyer, termal ve mekanik özellikleri iyileştirilmiş gıda ambalajlarının geliştirilmesi, nanopartikül bazlı antimikrobiyallerin üretimi, gıdaya bulaşan kontaminantların tespiti gibi konularda nanoteknoloji ile ortak uygulama alanlarına sahiptir [1]. Gıda nanoteknolojisi içerisinde, en büyük ekonomik büyüklüğe ve en geniş uygulama alanına sahip olan kısım, gıda ambalajlama bilimi ve teknolojisidir.

1.2. Gıda ambalajlamada nanoteknolojinin kullanımı

Geleneksel ambalaj materyali üretiminde yaygın olarak biyobozunur olmayan ya da doğada bozunumu çok uzun süren plastikler kullanılmakta olup bunların en büyük dezavantajları üretiminde fosil yakıtların kullanılmasının yanı sıra çevre kirliliğine neden olmalarıdır. Ambalajlamada plastik hammaddelerin yerine biyobozunur özellikli maddelerin alması konusunda son yıllarda ciddi bir efor sarf edilmektedir. Bununla birlikte, biyobozunur ambalajların zayıf mekanik ve bariyer özelliklerine sahip olmaları ve yüksek maliyetleri kullanımlarının önündeki en büyük engeli teşkil etmektedir [3].

Plastiklerden ya da biyobozunur özellikteki diğer herhangi bir materyalden ambalaj üretilirken, ambalajın kuvvetlendirilmesi, mekanik ve bariyer özelliklerinin iyileştirilmesi gibi amaçlarla ambalaj içerisine belirli geometrilere sahip organik ya da inorganik dolgu maddeleri ilave edilmektedir. Bu maddelerin ilavesi ile elde edilen bu karışımlar, polimer kompozitler adını almaktadır. Ambalaj formülasyonunda en az bir boyutu nanometrik ölçekte olan dolgu maddelerinin kullanımı durumunda ise oluşan kompozit, polimer nanokompozit olarak isimlendirilmektedir [19].

Gıda ambalajlarında kullanılan dolgu maddeleri sahip oldukları nanometrik boyut sayısına bağlı olarak 3'e ayrılır:

1. **Eşboyutlu nanopartiküller:** 3 nanometrik boyuta sahip dolgu maddeleri olup küresel silika nanopartikülleri bu gruba örnek olarak verilebilir.
2. **Nanotüpler:** 2 boyutu nanometrik ölçekte, üçüncü boyutu daha büyük olan uzamış yapılardır.
3. **Polimer - tabakalı kristal yapılar:** Eğer sadece bir boyut nanometrik ise kompozitler bu isimle bilinirler ve bu nanokompozitler, tabakalı kristal galerilerinin içine polimerin girmesi (intercalation) sonucu elde edilirler [3, 19].

Nano boyutlu dolgu materyallerinin üniform dağılımı, çok yüksek bir matriks/dolgu maddesi ara yüzey alanı meydana getirir. Bu durum, malzemenin moleküler hareketlilik, termal (özellikle cam geçiş sıcaklığı), bariyer ve mekanik özelliklerini geliştirir [20]. Başlıca fonksiyonu ambalaj materyalinin mekanik ve bariyer özelliklerini geliştirmek olan kuvvetlendirici nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivite ve enzim immobilizasyonu gibi bazı ek fonksiyonları da söz konusudur ve bu nanoyapılar aktif ya da akıllı ambalaj üretilmesinde önemli rol oynayabilirler.

1.2.1. Nanokiller, tanımı ve gıda ambalajlamada önemi

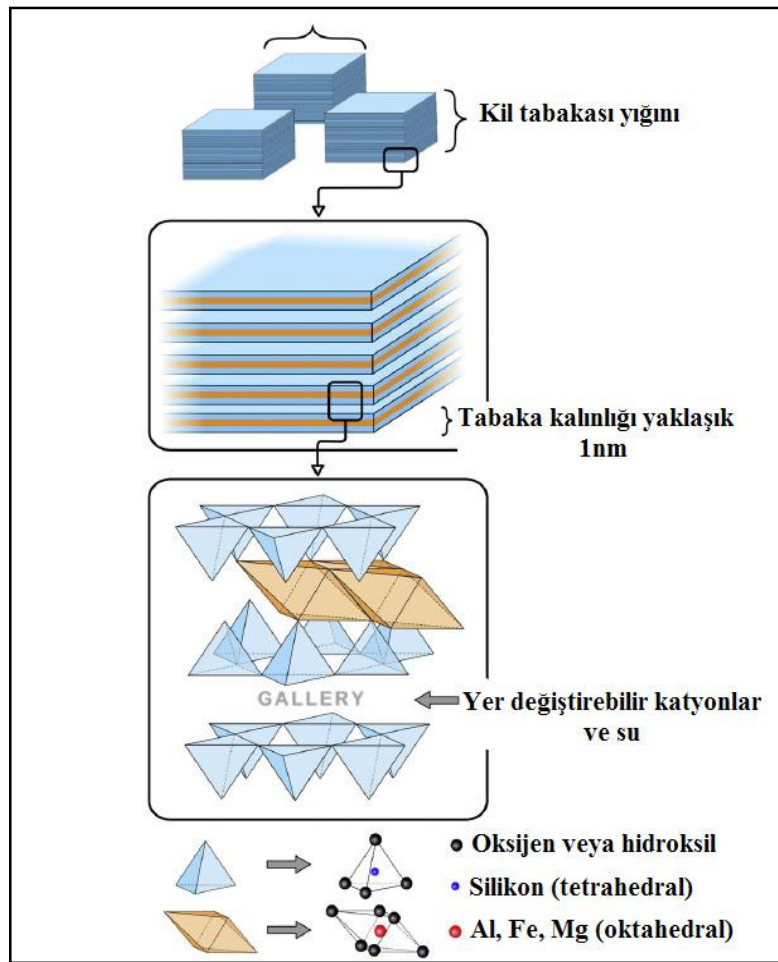
Kil mineralleri, yeryüzünün yüzeye yakın kısımlarının karakteristik kayaçlarındandır. Toprakta, sedimentlerde ve kayalarda diagenetik ve hidrotermal değişim sonucu oluşurlar. Doğada saf halde bulunmayan killer, malzeme özelliklerinde güçlü etkiler sergilemektedir. Bu etkinin ortaya çıkmasında killerin kimyasal ve yapısal karakteristikleri önemli rol oynamaktadır. Yapısal olarak kil mineralleri, tetrahedral ve oktahedral birimlerin sıra ile dizilimi sonucu oluşan katyon düzlemlerinden oluşmaktadır. Düzlemler, 2 tetrahedral ve 1 oktahedral birim sıra ile dizilirse 2:1; 1 tetrahedral ve 1 oktahedral birimler peş peşe sıralanırsa 1:1 düzlem olarak isimlendirilmektedir [21]. Killer bu dizilimler baz alınarak 4 gruba ayrılırlar:

1. **Kaolin grubu:** Kil gruplarından birincisi kaolin grubu olup kimyasal formülü $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$ 'tür. Halloysit ve kaolinit bu grupta yer alır. Bu grubun üyeleri aynı kimyasal formüle sahip olmalarına rağmen polimorfizm gösterirler.
2. **Montmorillonit (MMT) / smektit:** İkinci grup, kimyasal formülü $(\text{Ca}, \text{Na}, \text{H})(\text{Al}, \text{Mg}, \text{Fe}, \text{Zn})_2(\text{Si}, \text{Al})_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2\text{XH}_2\text{O}$ olan MMT/smektit grubudur. MMT ve saponit bu grupta yer almaktadır. Grup üyeleri arasındaki en önemli fark, kimyasal karakteristiklerindedir.
3. **İllit:** İllit grubunun kimyasal formülü $(\text{K}, \text{H})\text{Al}_2(\text{Si}, \text{Al})_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2\text{XH}_2\text{O}$ şeklinde olup sadece illit mineralini kapsamaktadır. Kayaların oluşum döneminde rol oynayan illit, sondaj çamurunda dolgu maddesi olarak da kullanılmaktadır.
4. **Klorit:** Klorit grubu ise çok geniş olup genel bir kimyasal yapıya sahip değildir. Amesit ve dafnit klorit grubunda yer alsa da kimyasal yapıları birbirinden farklıdır. Aslında klorit grubu tam olarak kil sınıflandırması içerisinde de yer almamaktadır [22].

1.2.1.1. Montmorillonit (MMT)

Polimer performansını artırmak için olası katkı malzemesi olarak birden fazla nanopartikül tanımlanmış olmasına rağmen, gıda ambalajlama alanında yapılan çalışmalar büyük ölçüde tabakalı inorganik killer üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu killerin avantajları; doğada yaygın olarak bulunmaları, düşük maliyetleri, yüksek performansları ve kısmen daha kolay işlenebilir özellik taşımalarıdır [3]. Tabakalı killer içerisinde ise en yaygın olanı MMT'dir. MMT kili, 1 nm kalınlığı ve yaklaşık 100-500 nm tabaka

uzunluğu sayesinde yüksek kalınlık-boy oranına (aspect ratio) sahip bir yapıdır. Kilin yapısı, yüzlerce tabakanın 8-10 μm *partikül* ya da *taktoid* oluşturacak şekilde üst üste yığılması sonucu oluşur. Üst üste binmiş tabakalar arasında ise *galeri* denilen boşluklar bulunmaktadır (Şekil 2). MMT kilinin tabaka yüzeyleri negatif yüklüdür ve bu yüzeyler yer değiştirebilir Na^+ ve Ca^{2+} iyonları ile kaplıdır. Paralel tabakalar birbirine zayıf elektrostatik kuvvetlerle bağlıdır [23].

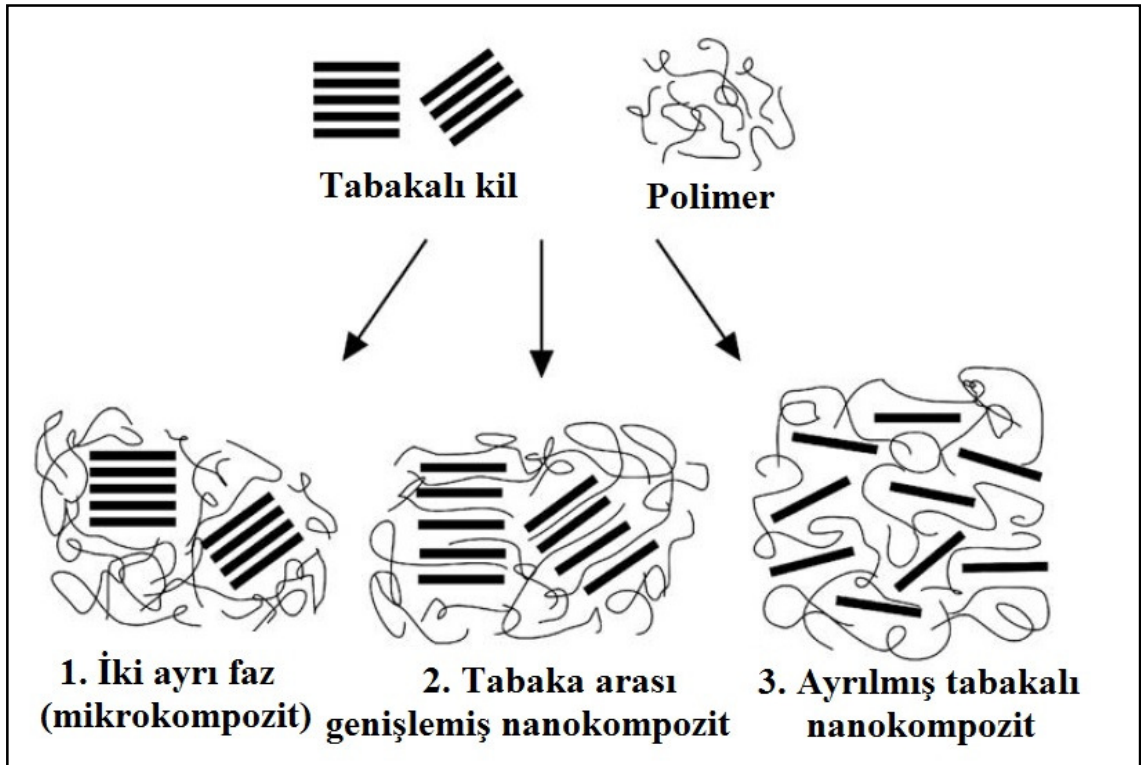


Şekil 2. MMT kil tabakasının şematik yapısı [1].

MMT gibi tabakalı yapıdaki killer, polimer matriks içerisinde dispers hale getirildiklerinde, 3 farklı dağılım söz konusu olur (Şekil 3) [24]:

1. Klasik mikrokompzit (not-intercalated): Polimer, silika tabakaları arasına girmemişse, mikrokompzit yapı elde edilir.
2. Tabaka arası genişlemiş nanokompzit (intercalated): Galerilerin kısmen açılması ve polimerin tabaka aralarına girmesi sonucu bu yapı ortaya çıkar.

3. Ayrılmış tabakalı nanokompozit (exfoliated): Kil tabakaları, birbirlerinden tamamen ayrılmış ve rastgele bir dağılım sergilemiştir. Bu yapı, ideal nanokompozit yapısı olmakla birlikte sentez ve/veya işleme ile elde edilmesi oldukça zordur.



Şekil 3. Kil-polimer interaksiyonu sonucu elde edilen kompozit tipleri [3].

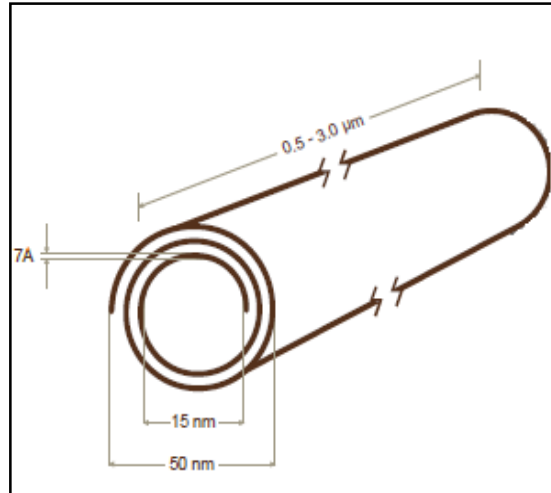
Killerin doğal olarak polietilen gibi hidrofobik polimer matriks içerisinde dağılımları, tabaka yüzeylerinin hidrofilik yapısından dolayı oldukça zordur. Tabakalı yapıdaki killerin doğal yapısının modifikasyonu (organokil elde edilmesi - organofilizasyon) ve böylece galerilerin genişletilerek nanokompozit uygulamalarına uygun hale getirilmeleri polimer nanokompozit üretiminde en önemli noktalardan birisidir. Organofilizasyon, kil tabakalarının enerjisini azaltarak organik polimerlerle uyumlu hale getirir. Killerin organofilizasyonu amacıyla liyofilizasyon, asitle muamele, ultrason, kalsinizasyon gibi çok sayıda yöntem denenmiştir [25]. Noniyonik ya da iyonik sürfaktanlar da kilin polimer içinde dağılımını iyileştirmek amacıyla kullanılabilir. Kuarterner amonyum tuzları, katyonik sürfaktanlar olup organokil üretiminde en yaygın kullanılan organik maddelerdir. Örneğin; Liu ve ark. [26], Na-MMT'yi alkil amonyum ile muamele ederek kilin tabaka aralığını 1.24 nm'den 2.98 nm'ye kadar genişletmiştir. Bu

amaçla farklı çalışmalarda kullanılan katyonik sürfaktanlar arasında alkil benzil dimetil amonyum bromid, oktadesil amonyum, hegzadesil trimetilamonyum ve tetradesil trimetilamonyum da yer almaktadır ve böylece killerde farklı tabakalanma derecelerine ulaşılabilmiştir [27-29].

Tabakalı MMT yapısı, kilin ıslandığı zaman genişlemesini sağlar. Tabaka yüzeylerindeki Na^+ ve Ca^{2+} iyonları, su varlığında hızlı bir şekilde hidrate olurlar. Bu durum, kil etrafında hidrofilik bir ortamın oluşmasına neden olur. Sonuç olarak, yüksek bir yüzey alanına sahip olmasına rağmen MMT, noniyonik organik sürfaktanlar için iyi bir sorbent değildir. Noniyonik sürfaktanlar, düşük toksisiteye sahip olma ve biyobozunur özellik taşıma gibi avantajlara sahiptir. Bunların MMT'nin modifikasyonunu sağlayarak kilin yüksek bir iyon değişim kapasitesine ulaşmasını sağladıkları bildirilmiştir. Ayrıca, bu sürfaktanların katyonik sürfaktanlara nazaran MMT'ye daha yüksek adsorpsiyon kapasitesi ve kimyasal stabilite sağladıkları ifade edilmektedir [30].

1.2.1.2. Halloysit nanotüpleri (HNT)

HNT [$\text{Al}_2(\text{OH})_4\text{Si}_2\text{O}_5(2\text{H}_2\text{O})$], volkanik kayaların aşınmasıyla oluşmuş, doğada yaygın şekilde bulunan, kaolin grubunda yer alan iki tabakalı (1:1) bir alüminasilikat kildir. Kimyasal yapısı kaoline benzese de kaolinden en önemli farkı mikron altı boyutlara sahip olmasıdır. Halloysit tüplerinin uzunluğu 500-1000 nm iken iç çapları 15-100 nm arasında değişmektedir (Şekil 4).



Şekil 4. HNT'nin yapısı ve boyutları.

Halloysit tüplerinin kalınlığı normal bir saç teline kıyasla 50 bin kat daha incedir. HNT'deki birbirine komşu alumina ve silika katmanları ve bunların hidrasyona uğramaları, dizilim düzensizliği ortaya çıkarır. Bunun sonucunda ise tüp bükülür, sarmal oluşturur ve çok katmanlı bir yapı meydana gelir [31]. Tablo 1, HNT'ye ait çeşitli fiziksel ve kimyasal özellikler hakkında bilgi vermektedir.

Tablo 1. HNT'nin bazı özellikleri [32]

Yüzey alanı	~ 65 m ² /g
Gözenek hacmi	~ 1.25 mL/g
Refraktif indeks	1.54
Özgül ağırlık	2.53 g/cm ³
Dış yüzey yükü (zetapotansiyel)	Negatif (pH 6-7)
İç yüzey yükü	Hafif pozitif (pH 6-7)

HNT: Halloysit nanotüpleri.

Karbon nanotüpleri (KNT), HNT'ler gibi tubüler yapıda olan, yüksek bir uzunluk-iç çap oranına sahip ve birçok alanda uygulaması bulunan kullanışlı materyallerdir. HNT'ler, KNT ile kıyaslandığında çeşitli avantajlara sahiptir. Tablo 2, KNT ile HNT'lerin bir karşılaştırmasını içermektedir.

Tablo 2. HNT ve KNT'nin karşılaştırması

	HNT	KNT
İç çap/uzunluk	15 nm / ~1000 nm	2 nm / ~1000 nm
Biyoyumluluk	Uyumlu	Toksik
Fiyat	~4\$/kg	~500\$/kg
Bulunuş	Tonlarca	Gram

HNT: Halloysit nanotüpleri; KNT: Karbon nanotüpleri.

Tubüler nanometrik materyallerin karakterizasyonunda Scanning Electron Microscopy (SEM), Scanning Force Microscopy (SFM) ve Transmission Electron Microscopy (TEM) teknikleri çok önemli yer tutmaktadır. Yapılan ölçümler, HNT'lerin yaklaşık 40-50 nm çapında ve 0.5-2 µm uzunluğunda olduklarını ve uzunluk olarak oldukça polidispers bir durum arz ettiklerini göstermektedir [32]. Şekil 5'te, HNT'nin TEM görüntüsü verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi, HNT'nin tubüler yapısının yanı sıra bazı noktalarda kümelenmeler de yer almaktadır.



Şekil 5. HNT'nin TEM görüntüsü [4].

HNT de kaolin grubunda yer alan diğer tüm kil mineralleri gibi organik ve inorganik materyallerle adsorpsiyon, intercalation ve katyon değişimi gibi birçok yolla interaksiyona girebilir. HNT'nin bazal boşluğu (galeriler arası mesafesi) yaklaşık 10 Å'dür. Amidler, dimetil sülfoksit (DMSO), potasyum asetat, anilin, hidrazin, sodyum asetat ve formamid gibi çeşitli maddeler HNT'lerde galerilerin genişletilmesi işlemi için denenmiştir [33-39]. Tablo 3'te farklı maddelerin HNT'nin galerilerini genişletmeleri sonucunda oluşturdıkları bazal boşluk ölçüleri görülmektedir.

Tablo 3. HNT'de çeşitli sürfaktanların etkileri sonucu oluşan bazal boşluk değerleri [33].

Kullanılan ajan	Bazal boşluk (Å)
Su (hidrate olmuş HNT)	10.1
Formamid	10.4
<i>N</i> -methylformamide	10.9
Acetamide	11.0
<i>N,N</i> -dimethylformamide	12.2
<i>N</i> -methylacetamide	11.3
Propionamide	11.2
<i>N,N</i> -dimethylacet amide	12.4

HNT: Halloysit nano tüpleri.

Tablo 3'ten de anlaşılabacağı üzere, sürfaktanlar, HNT'nin bazal boşluğunu birbirinden farklı derecelerde genişletmişlerdir. Bununla birlikte suyun HNT'nin bazal boşluğu üzerindeki etkisi ise sınırlı kalmıştır.

1.2.2. Polimer-kil nanokompozit (PKN) üretimi ve gıda ambalajlamada kullanımı

Modifiye edilmiş nanokiller; polimer nanokompozit üretimi, boya, mürekkep, kozmetik ürünleri ve makine yağı gibi ürünlerin reolojik özelliklerinin modifiye edilmesi, toksik maddelerin tutulması, atık maddelerin arıtılması ve ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi gibi birçok konuda uygulama alanı bulmuştur [40].

Ambalaj polimerlerinin performanslarının artırılması amacıyla dolgu materyali olarak birden fazla nanokilin kullanılma potansiyelinin olduğu belirlenmiştir. Polimer-kil nanokompozitlerinin (PKN); katkısız polimerlere kıyasla daha yüksek mekanik dirençleri, artan ısı dirençleri ve yanmazlık, O₂, CO₂, UV ışınları ve su buharı geçirgenliğine karşı yüksek bariyer özellikleri gibi bazı avantajları vardır [24]. PKN'ler, ilk olarak bir otomotiv kuruluşu olan Toyota tarafından imal edilmiş araçlara ait triger kayışlarının üretiminde kullanılmıştır. Toyota'yı daha sonraki süreçte Mitsubishi, General Motors, Basell ve Chevrolet gibi otomotiv şirketleri takip etmiştir. [41]. PKN'lerin gıda ambalajlama alanında kullanımı ise 1990'lı yılların sonlarına rastlamaktadır [3].

PKN sentezi amacıyla çok değişik yöntemler denenmiş ve elde edilen ürünlerin özellikleri hazırlama yöntemlerine bağlı olarak birbirinden farklı bulunmuştur. PKN hazırlanmasında, polimer ve kil arasındaki interaksiyon; polimerin polaritesi, molekül ağırlığı, hidrofobikliği ve reaktif grupları gibi özellikleri ile kilin türü ve solvent tipi gibi bazı faktörlere bağlıdır [42, 43]. PKN üretiminde temel olarak 3 yöntem izlenmektedir:

1. **In situ polimerizasyon:** Bu yöntemde öncelikle kil ile monomer bir araya getirilir ve ardından monomer polimerize edilir. Bu yöntemde ayrılmış tabakalı kil partikülleri polimer matriksi içerisinde ideal şekilde hapsolür.
2. **Solvent polimerizasyon:** Bu yöntemde, kil öncelikle bir solvent içerisinde şişirilir, sonra polimer bu solvent içinde çözülür. Her iki çözelti daha sonra kombine edilir ve polimer zincirleri kil tabakalarının arasına girer ve onlarla yer değiştirir.
3. **Eriterek birleştirme:** Bu yöntemde ise kil ve polimer, polimerin erime sıcaklığının üzerinde bir sıcaklıkta sisteme birlikte ilave edilir ve bir süre bu

sıcaklıkta kesme-sıkıştırma etkisi altında veya kilin tabakalarının genişlemesini ya da birbirinden ayrılmasını (intercalation/exfoliation) teşvik eden şartlar altında tutulur. Eriterek birleştirme; çok yönlülüğü, ekstrüzyon ve enjeksiyon kalıplama gibi polimer işleme ekipmanları ile uyumluluğu ve solvent kullanılmamasından dolayı çevresel zararı olmaması nedeniyle en çok tercih edilen yöntem olmuştur [44, 45]. Eriterek birleştirmenin bir diğer avantajı da in situ polimerizasyon ya da solvent polimerizasyona uygun olmayan polimerlerin kullanımına olanak sağlamasıdır [45]. Bununla birlikte bu yöntemde tabaka ayrılması in situ polimerizasyondaki kadar yüksek değildir ve üretilen kompozitler sıklıkla tabaka arası genişlemiş yapılar da içerirler [41]. Bu durum, nanokil ile polimer arasında herhangi bir uyumsuzluktan dolayı kilin polimer içerisinde yeterli dağılamaması gibi sonuçlara yol açabilir.

Nanokil takviyeli nanokompozitlerin, hem saf ve hem de konvensiyonel dolgu maddesi içeren polimerlere kıyasla bir takım özellikleri bakımından üstünlüklere sahip oldukları belirlenmiştir. Söz konusu özellikler şu şekilde sıralanabilir [46]:

- ✓ Modulus ve kuvvet gibi mekanik özellikler
- ✓ Gaz, su buharı ve hidrokarbon geçirgenliği
- ✓ Termal stabilite ve ısı ile bozulma sıcaklığı
- ✓ Yanmaya dayanıklılık ve azalan duman emisyonu
- ✓ Kimyasal direnç
- ✓ Yüzey görünümü
- ✓ Elektrik iletkenliği
- ✓ Konvensiyonel dolgulu polimerlere kıyasla daha iyi optik berraklık.

Gıda ambalaj endüstrisi açısından bakıldığında ise PKN'lerin temel olarak 3 başlıkta uygulamalarının olduğu görülmektedir:

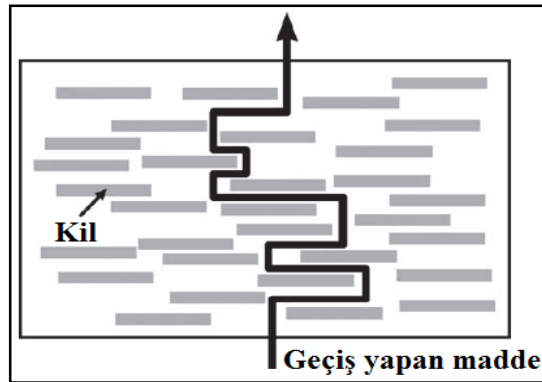
1. "Güçlendirilmiş" PKN'ler: Nanopartiküllerin polimer matriksindeki mevcudiyeti polimer esnekliği, gaz geçirgenlik özellikleri ve sıcaklık/nem stabilitesi gibi özelliklerini iyileştirmektedir.

2. "Aktif" PKN'ler: Nanopartiküllerin mevcudiyeti, ambalajın gıda ve çevre ile interaksiyona girmesini sağlayarak gıdaların muhafazasında dinamik bir rol oynamaktadır.
3. "Akıllı" PKN'ler: Nanopartiküllerin polimer matriksinde bulunması sayesinde paketlenmiş gıdanın veya gıdayı çevreleyen ortamın koşulları takip edilebilir. Ayrıca PKN'ler gıda hilelerine karşı koruyucu görevi üstlenebilir [47].

1.2.2.1. Güçlendirilmiş PKN'ler

Nanopartikül ilavesiyle polimerlerin gıda ambalajı olarak kullanımı hususundaki performanslarının artırılmasına yönelik çok sayıda PKN üretilmiştir. Bu çalışmalarda poliamid, naylon, poliolefinler, polistiren, etilen-vinil asetat kopolimeri, epoksi resin poliüretan ve polietilen gibi çok farklı polimerler kullanılmıştır. Kil dolgu materyalleri arasında en çok kullanılan ise MMT'dir. Daha önceden de ifade edildiği gibi, MMT doğadan elde edildiği haliyle değil, organomodifikasyona uğratıldıktan sonra PKN üretimine uygun hale getirilmektedir.

Nanokillerin PKN üretiminde kullanımının asıl avantajı, ambalaj malzemesinin gaz ve su buharı geçirgenliğine karşı bariyer özelliğini artırmasıdır. PKN'lerin bariyer özelliklerini açıklayan en önemli yaklaşım Nielsen teoremidir [48]. Bu teoreme göre, geçiş yapacak olan gaz, film içerisinden difüze olmaya çalışırken kil tabakaları arasındaki dolambaçlı bölgeden dolayı daha uzun bir yol almak zorunda kalmaktadır (Şekil 6). Böylece malzemenin gaz ve su buharı geçirgenliği azalmaktadır.



Şekil 6. PKN içerisinde geçiş yapan maddenin aldığı yol [3].

Malzemelerin gaz ve su buharı geçirgenliklerinin, nanokil ilavesi ile değişimi üzerine literatürde çok sayıda bilimsel çalışma mevcuttur. Tablo 4, bu çalışmaların bir özetini sunmaktadır.

Tablo 4. Çeşitli PKN'lerde tespit edilen geçirgenlik özellikleri.

Polimer	Kil %	Permeant	Geçirgenlik	Referans
Agar	-	Su buharı	2.22 g m/m ² s Pa	Rhim [49]
Agar	MMT %20	Su buharı	1.07 g m/m ² s Pa	Rhim [49]
<i>Gelidium corneum</i>	-	Su buharı	1.59 ng m/m ² s Pa	Lim ve ark. [50]
<i>Gelidium corneum</i>	Cloisite Na %3	Su buharı	1.30 ng m/m ² s Pa	Lim ve ark. [50]
<i>Gelidium corneum</i>	Cloisite Na %5	Su buharı	1.24 ng m/m ² s Pa	Lim ve ark. [50]
<i>Gelidium corneum</i>	Cloisite Na %7	Su buharı	1.19 ng m/m ² s Pa	Lim ve ark. [50]
<i>Gelidium corneum</i>	Cloisite Na %7	Su buharı	1.07 ng m/m ² s Pa	Lim ve ark. [50]
<i>Gelidium corneum</i>	Cloisite 30B %1	Su buharı	1.50 ng m/m ² s Pa	Lim ve ark. [50]
<i>Gelidium corneum</i>	Cloisite 30B %3	Su buharı	1.42 ng m/m ² s Pa	Lim ve ark. [50]
<i>Gelidium corneum</i>	Cloisite 30B %5	Su buharı	1.43 ng m/m ² s Pa	Lim ve ark. [50]
<i>Gelidium corneum</i>	Cloisite 30B %7	Su buharı	1.37 ng m/m ² s Pa	Lim ve ark. [50]
HDPE	-	Su buharı	0.127 g su/m ² gün/μm	Lotti ve ark. [51]
HDPE	Cloisite 20A %5	Su buharı	0.053 g su/m ² gün/μm	Lotti ve ark. [51]
Kitosan	-	Su buharı	0.71 g/msPa	Abdollahi ve ark. [52]
Kitosan	MMT %1	Su buharı	0.43 g/msPa	Abdollahi ve ark. [52]
Kitosan	MMT %3	Su buharı	0.39 g/msPa	Abdollahi ve ark. [52]
Kitosan	MMT %5	Su buharı	0.45 g/msPa	Abdollahi ve ark. [52]
LDPE	-	Su buharı	2.40 x 10 ⁻¹³ g m/m ² s Pa	Hong ve Rhim [53]
LDPE	Cloisite 30B	Su buharı	5.95 x 10 ⁻¹³ g m/m ² s Pa	Hong ve Rhim [53]
LDPE	Cloisite 20A	Su buharı	3.30 x 10 ⁻¹³ g m/m ² s Pa	Hong ve Rhim [53]
Mısır zeini kaplı PP film	-	Su buharı	6.02 x 10 ⁻² g mm/m ² gün mmHg	Ozcalik ve Tihminlioglu [54]
Mısır zeini kaplı PP film	Cloisite 10A %1	Su buharı	5.39 x 10 ⁻² g mm/m ² gün mmHg	Ozcalik ve Tihminlioglu [54]
Mısır zeini kaplı PP film	Cloisite 10A %3	Su buharı	4.96 x 10 ⁻² g mm/m ² gün mmHg	Ozcalik ve Tihminlioglu [54]
Mısır zeini kaplı PP film	Cloisite 10A %5	Su buharı	4.57 x 10 ⁻² g mm/m ² gün mmHg	Ozcalik ve Tihminlioglu [54]
Jelatin	-	Su buharı	0.86 g mm/kPa m ² h	Farahnaky ve ark. [55]
Jelatin	Cloisite 20A%18	Su buharı	0.42 g mm/kPa m ² h	Farahnaky ve ark. [55]
HDPE	-	Oksijen	67.25 mL/m ² gün/μm	Lotti ve ark. [51]
HDPE	Cloisite 20A %5	Oksijen	23.92 mL/m ² gün/μm	Lotti ve ark. [51]
LDPE	-	Oksijen	3.4 x 10 ⁻¹⁰ cm ³ /cm ² /s cm/Hg	Dadfar ve ark. [56]
LDPE	Cloisite 15A %4	Oksijen	3.1 x 10 ⁻¹⁰ cm ³ /cm ² /s cm/Hg	Dadfar ve ark. [56]

HDPE:Yüksek yoğunluklu polietilen; LDPE: Düşük yoğunluklu polietilen; PP: Polipropilen; PKN: Polimer-kil nanokompozit; MMT: Montmorillonit.

Tablo 4'te görüldüğü gibi, kil takviyeli ambalaj materyalleri, kil takviyesi olmayanlara göre daha düşük su buharı ve gaz geçirgenliği değerlerine sahiptir. Bununla birlikte, bu çalışmalarda farklı konsantrasyonlarda kil takviyeleri yapılarak ambalaj materyallerinin bariyer özelliklerinin karşılaştırıldığı da görülmektedir. Bu karşılaştırmaların sonuçlarına bakıldığında, konsantrasyona bağımlı olarak geçirgenliğin azaldığı

anlaşılmaktadır. Literatürde yer alan çalışmaların çoğunda buna benzer sonuçlar elde edilmiş olmakla birlikte bir takım çalışmalarda tam tersi sonuçlar elde edilmiş ve nanokil ilavesinin geçirgenliği artırdığı rapor edilmiştir. Bu farklılıkların sebepleri olarak ise kil ve ambalaj polimerinin cinsi, kil-polimer etkileşimi, film kalınlığı, kil tabakalarının kalınlık-boy oranı gibi faktörler gösterilmiştir [57].

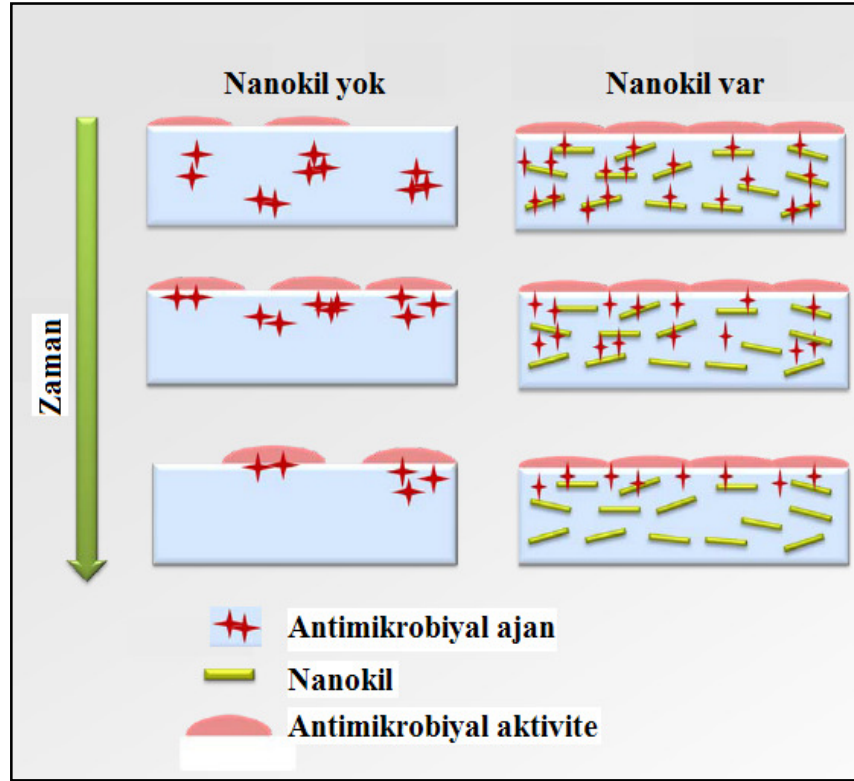
1.2.2.2. Aktif PKN'ler

Aktif ambalajlama; içerisindeki gıda maddesinin kalitesi muhafaza edilirken aynı zamanda onun raf ömrünü uzatmak veya güvenliğini artırmak amacıyla paket, ürün veya ortam ile etkileşimde olan ambalajlama şekli olarak tanımlanan yenilikçi bir yaklaşımdır. Antimikrobiyal ambalajlama, aktif ambalajlama sisteminin en çok gelecek vadeden versiyonudur. Bununla birlikte ambalajın içerisinde oksijen bulunması da gıdaların raf ömürlerini sınırlandıran önemli faktörlerden bir tanesidir. Çünkü oksidasyon sonucunda gıdaların tat, lezzet, renk ve koku gibi duyuşal özellikleri olumsuz yönde değişirken besin bileşenlerindeki kayıp ve oksijen varlığı nedeniyle aerobik bakteri, küf ve böceklerin gelişebilme olasılığı da dikkate değer noktalardır [58]. Bu sorunların ortadan kaldırılması amacıyla aktif ambalajlamaya getirilen yeni yaklaşımlardan bir tanesi de ambalaja antioksidan özellik taşıyan maddelerin ilavesiyle antioksidan ambalajlama formlarının elde edilmesidir.

PKN üretimi açısından bakıldığında, geliştirilen aktif PKN'lerin önemli bir kısmını antimikrobiyal ambalajlar oluşturmaktadır. Diğer önemli uygulamalar ise oksijen yakalayıcılar, etilen uzaklaştırıcılar ve karbondioksit emicilerdir. Antimikrobiyaller ile nanokompozitlerin kombinasyonu, ambalaj teknolojisine uygulandığında sinerjistik etki göstererek ambalajın bazı özellikleri ve fonksiyonelliği geliştirilebilmektedir [59]. Antimikrobiyal PKN geliştirilmesinde üzerinde en fazla çalışılan maddeler, antimikrobiyal metal nanopartikülleri, metaloksit nanopartikülleri ve karbon nanotüpleridir. Bu materyaller ya doğrudan temas ile fonksiyon gösterir ya da gıda maddesi bileşimindeki organik maddeler ile interaksyona girerek yavaş bir şekilde migrasyona uğrar [47].

Antimikrobiyal filmlerin etkinlikleri, antimikrobiyal maddelerin salım oranlarına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Çok yavaş salımda mikrobiyal gelişim yeterince inhibe edilemezken çok hızlı salımda da inhibisyon devamlılığı sağlanamaz [60, 61]. İstenilen

etkinliğin sürekliliğinin sağlanması, *kontrollü salım* ifadesi ile açıklanmaktadır. Ambalaj filmlerde salım oranı; kullanılan polimerin cinsi, film üretim yöntemi, polimer ile antimikrobiyal madde arasındaki interaksiyon ve çevresel koşullar gibi çeşitli faktörlere bağlıdır [62, 63].



Şekil 7. Nanokil takviyeli PKN'lerde antimikrobiyal ajanın kontrollü salımı.

Kontrollü salım, nanokillere dayalı nanokompozitlerin önemli fonksiyonlarından bir tanesidir. Şekil 7, polimerlere nanokil takviyesi ile sağlanan kontrollü salımı şematize etmektedir. Şekilde görüldüğü gibi, iyi organomodifikasyona uğramış nanokiller, yüksek yüzey alanına sahip olmaları sayesinde aktif materyallerin polimer içerisine homojen dağılımını sağlamıştır. Buna ek olarak kontrollü salım sayesinde antimikrobiyal etkinliğin daha geniş bir yüzey alanında ve daha uzun bir periyotta devam etmesine olanak sağlamışlardır.

1.2.2.2.1. Metal nanopartiküllerin PKN üretiminde kullanımı

Gümüş, altın ve çinko nanopartikülleri en fazla araştırılan antimikrobiyal aktiviteye sahip metal nanopartiküllerdir. Gümüş; yüksek ısıl stabilitesi ve düşük seviyedeki uçuculuğu sayesinde halen çok sayıda endüstriyel uygulamada kullanılan güçlü bir antibakteriyel ve antifungal maddedir. Gümüş nanopartiküllerinin (Ag-NP)

antimikrobiyal aktivitelerini açıklayan bazı yaklaşımlar şu şekildedir: (1) Ag-NP'nin hücre yüzeyine yapışarak lipopolisakkaritleri parçalaması ve zarda boşluk oluşturmaları; (2) Ag-NP'nin bakteri hücresine girmesi ve DNA'ya zarar vermesi ve (3) kükürt, oksijen ve azot içeren moleküllerdeki elektron alıcısı gruplara bağlanan Ag⁺ iyonlarının serbest bırakılması [47, 64-66].

Ag-NP'nin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi, birçok çalışmanın konusu olmuştur. Tablo 5, Ag-NP'lerin *in vitro* şartlarda sahip olduğu antimikrobiyal etkileri ve Ag-NP içeren aktif nanokompozitlerin sahip oldukları antimikrobiyal etkileri göstermektedir.

Tablo 5. Ag-NP'lerin ve Ag içeren nanokompozit filmlerin antimikrobiyal özellikleri.

Malzeme	Hedef mikroorganizma	Sonuç	Referans
Kitosan bazlı Ag-NP	<i>Escherichia coli</i>	10 µg/mL ¹	Wei ve ark. [67]
Kitosan bazlı Ag-NP	<i>Staphylococcus aureus</i>	10 µg/mL ¹	Wei ve ark. [67]
Kitosan bazlı Ag-NP	<i>Bacillus subtilis</i>	48 µg/mL ¹	Wei ve ark. [67]
PVOH-b-PAN bazlı Ag-NP	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	2.88 µg/mL ¹	Bryaskova ve ark. [68]
PVOH-b-PAN bazlı Ag-NP	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.36 µg/mL ¹	Bryaskova ve ark. [68]
PVOH-b-PAN bazlı Ag-NP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.36 µg/mL ¹	Bryaskova ve ark. [68]
Pullulan-Ag NK film ²	<i>Aspergillus niger</i>	%76 FGI ³	Pinto ve ark. [69]
HPMC-Ag NK film	<i>E. coli</i> ATCC 25922	2.75 cm ⁴	de Moura ve ark. [70]
HPMC-Ag NK film	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3.11 cm ⁴	de Moura ve ark. [70]
Polietilen-Ag NK film	<i>E. coli</i> DH5 α	%99.9 inhibisyon ⁵	Zapata ve ark. [71]

¹: Minimum bakterisidal konsantrasyon; PVOH-b-PAN: poly(vinyl alcohol)-b-poly(acrylonitrile); ²: Filmin Ag içeriği 1.71 mg/g; ³: %FGI (fungal gelişim inhibisyon) = ((kontrol popülasyon — film uygulanan ortam popülasyon) / kontrol popülasyon) x 100; ⁴: 1 cm çapındaki film etrafında oluşan inhibisyon zonu; ⁵: %5 oranında Ag içeren NK filmin 24 saat inkübasyon sonundaki antibakteriyel etkisi.

Tablo 5'ten anlaşıldığı üzere, Ag içeren nanokompozit filmler, çeşitli bakteri ve funguslar üzerinde antimikrobiyal etkinliğe sahiptir. Ancak, antimikrobiyal etkinliklerin mikroorganizmalara göre farklılık gösterdiği de görülmektedir. Bu değişikliklerde mikroorganizmaların hücre yapılarındaki farklılıkların yanı sıra elde edilen kompozit filmlerin elde edilme yöntemleri ve film üretiminde kullanılan polimerlerin farklı olması da etkili olabilir.

Gümüş ve diğer metalleri içeren PKN filmlerin çeşitli gıda maddelerinin hasat sonrası dayanıklılıkları ve raf ömürleri üzerindeki etkileri test edilmiştir. Hu ve ark. [72], taze kivi meyvelerini Ag-NP içeren polietilen içerisinde ambalajlayarak kivi'nin depolama sırasındaki olgunlaşmasını, dolayısıyla da ağırlık ve renk kaybı ile yumuşamasını önemli ölçüde geciktirmiştir. Emamifar ve ark. [73], ZnO ve Ag-NP içeren LDPE

filmlerin taze portakal suyunun mikrobiyal stabilitesi, esmerleşme indeksi, askorbik asit içeriği ile renk ve duyu parametreleri üzerindeki etkisini araştırmıştır. Nanometal içeren LDPE filmler, 28 gün boyunca portakal suyunun doğal mikrobiyal yükünü mikrobiyal sınır olan 6 log altında tutmuş ve raf ömrünü uzatmıştır. Diğer bir çalışmada, TiO₂ ve Ag-NP içeren ambalajların jujube bitkisinin bozulmasını geciktirdiği ve hasat sonrası kalitesinin korunmasına yardımcı olduğu tespit edilmiştir [74]. Wang ve ark. [75] tarafından yapılan çalışmada ise Çin defne meyvesinde sıcak hava ile TiO₂ ve Ag-NP içeren polietilen bazlı ambalaj kombinasyonunun hem doğal ve hem de *Penicillium citrinum* kaynaklı bozulmaları geciktirdiği bildirilmiştir.

1.2.2.2.2. Doğal biyoaktif maddelerin PKN üretiminde kullanımı

Aktif PKN üretiminde antimikrobiyal özellik taşıyan Ag gibi metallerin yanı sıra, GRAS statüsünde yer alan bazı antimikrobiyal özellikli biyoaktif maddelerin kullanımı üzerine de çalışmalar yapılmıştır. Bu antimikrobiyal maddeler arasında uçucu yağlar ile bunların etken maddeleri, bakteriyosinler, enzimler, inorganik asitler, fenoller, peptitler ve diğer bitkisel ekstraktlar yer almaktadır [58]. Biyoaktif maddeler polimer içerisine çoğunlukla %0.1-5 arasındaki oranlarda solvent polimerleşme ya da eriterek birleştirme teknikleri kullanılarak karıştırılmaktadır [16].

Uçucu yağlar, farklı bitki ve baharatlardan su/buhar destilasyonu yoluyla elde edilen aromatik özellikli doğal biyoaktif materyallerdir. Sentetik gıda koruyucularının kullanımının sağlık üzerindeki olumsuz etkilerinin ortaya çıkması ve tüketicilerin gıda güvenliği ve sağlık standartları konusunda daha da bilinçlenmeleri üzerine, diğer doğal gıda katkı maddeleri gibi uçucu yağların da gıda maddelerinde kullanımı giderek yaygınlaşmıştır. GRAS statüsünde yer alan uçucu yağların sağlık üzerinde herhangi bir olumsuz etkisi bildirilmemiştir. Uçucu yağlar, çok eski zamanlardan beri insanlar tarafından gıdalarda aroma verici ve koruyucu olarak kullanılmasının yanı sıra geleneksel tıpta tedavi edici ajan olarak da değerlendirilmektedir. Yapılan bilimsel araştırmalar, uçucu yağların ve onların aktif bileşenlerinin *Salmonella*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Bacillus cereus* ve *Pseudomonas* gibi çok sayıda patojen bakteri üzerindeki antibakteriyel etkisinin yanı sıra antifungal özelliklerinin olduğunu da ortaya koymuştur [12, 76].

Uçucu yağların veya aktif bileşenlerinin biyoaktif materyal olarak doğrudan polimer içerisine ilave edilmesi ile klasik antimikrobiyal ambalajların elde edilmesi ve bunların gıdaların raf ömürlerinin uzatılması amacıyla kullanımı üzerine literatürde çok sayıda çalışma mevcuttur. Tablo 6’da uçucu yağ-polimer ile üretilen bazı aktif ambalajlar görülmektedir. Tablo 7’de ise bu ambalajların gıda sistemlerinde test edildiği bazı çalışmalar özetlenmiştir.

Tablo 6. Uçucu yağ ve bileşenleri ile elde edilen bazı aktif ambalajlar.

Uçucu yağ/bileşen	Miktar	Polimer / taşıyıcı	Hedef mikroorganizma	Referans
Oregano, sarımsak, biberiye	%1-4	Peyniraltı suyu proteini izolatu	<i>Lb. plantarum</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i>	Seydim ve Sarikus [77]
Limonotu	%0.1-0.4	Sago nişastası ve aljinat	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Maizura ve ark. [78]
Sarımsak	100 µL/g	Kitosan yenilebilir film	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Sal. Typhimurium</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cereus</i>	Pranoto ve ark. [79]
CRV	%15	Buğday gluteni	-*	Mascheroni ve ark. [80]
THY	%5-35	Zein	<i>B. cereus</i> , <i>Candida lusitanae</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>S. thermophilus</i>	Del Nobile ve ark. [81]
THY	%4.8-28.6	Reçine disk	-	Pilati ve ark. [82]
Tarçın	%2-8	Polietilen tetrafitalat	<i>A. flavus</i>	Manso ve ark. [83]
Tarçın, oregano		Plastik film	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Becerril ve ark. [84]
THY, CRV	%(1+1)-(10+10)	Polipropilen	<i>S. aureus</i> , <i>L. innocua</i> , <i>E. coli</i> O157:H7, <i>A. niger</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Guarda ve ark. [85]
CRV, cinnamaldehyde	%30	Soya proteini izolatu, modifiye nişasta	<i>E. coli</i> , <i>Botrytis cinerea</i>	Ben Arfa ve ark. [86]
THY, CRV	%4-8	Polipropilen	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Ramos ve ark. [87]

THY: Timol; CRV: Karvakrol; *: Ambalajın antimikrobiyal testi yapılmamıştır.

Tablo 6’dan da görülebildiği gibi, çeşitli bitkilerden elde edilen uçucu yağlar ve/veya bileşenleri, plastik ve biyobozunur birbirinden farklı özelliklere sahip ambalaj materyallerine katılmış ve antimikrobiyal ambalajlar elde edilmiştir. Bu tabloda dikkat edilecek diğer bir husus ise ambalajların aktif maddele konsantrasyonlarının %0.1’den %28.6’ya kadar çok geniş bir aralıkta olmasıdır.

Tablo 7. Uçucu yağ ve bileşenleri ile elde edilen aktif ambalajların gıdalarda kullanımı.

Uçucu yağ/bileşen	Miktar (%)	Polimer / taşıyıcı	Hedef Mikroorganizma	Gıda materyali	Referans
Kekik, oregano	1-5	Yenilebilir soya film	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> O157:H7, <i>P. aeruginosa</i> , <i>Lb. plantarum</i>	Taze köfte	Emiroglu ve ark. [88]
Karanfil, tarçın, oregano	2-8	Parafin bazlı kâğıt kaplama	<i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. choleradis</i> , <i>A. flavus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Penicillium roqueforti</i> , <i>P. Nalgiovense</i>	Çilek	Rodriguez ve ark. [89]
Tarçın, oregano	2-8	Parafin bazlı kâğıt kaplama	<i>Alternaria alternata</i>	Çeri domates	Rodriguez-Lafuente ve ark. [90]
Oregano, yenibahar	1	Süt proteini bazlı yenilebilir film	<i>E. coli</i> O157:H7, <i>Pseudomonas</i> spp.	Dilimlenmiş kırmızı et	Oussalah ve ark. [91]
Oregano, citral	7.5	PP/EVOH	TMAB ² , maya-küf, <i>Enterobacteriaceae</i> , LAB	Mevsim salatası	Muriel-Galet ve ark. [92]
Limonotu, oregano	0.1-0.5	Elma püresi-aljinat bazlı yenilebilir film	<i>Listeria innocua</i>	Elma	Rojas-Graü ve ark. [93]
Limonotu, tarçın, karanfil, cinnamaldehyde, öjenol, citral	0.5	Aljinat bazlı yenilebilir film	<i>E. coli</i> O157:H7, TMAB, TPAB, maya-küf	Elma	Raybaudi-Massilia ve ark. [94]

PP/EVOH: Polipropilen/etilen vinil alkol kopolimer; TMAB: toplam mezofilik aerobik bakteri; LAB: laktik asit bakterisi; TPAB: Toplam psikrofilik aerobik bakteri.

Tablo 7’de görüldüğü gibi, uçucu yağ ve bileşenleri ilave edilerek üretilen aktif ambalaj materyalleri, bitkisel ve hayvansal kökenli bazı gıdalarda bakteri, maya ve küf gelişiminin önlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Uçucu yağ ve bileşenlerinin PKN üretiminde değerlendirilmesi üzerine ise oldukça sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Persico ve ark. [10], organomodifiye MMT (%5 wt) ve LDPE bazlı karvakrol (CRV, %10 wt) içeren aktif PKN ambalaj materyalleri üretmişlerdir. Sonuçta, ambalajda CRV ile organosilikat arasında etkili bir interaksiyon olduğu ve uçucu yağın kil galerilerine

daha iyi bir şekilde dağıldığı belirlenmiştir. Bu çalışmada, nanokil CRV'yi ekstrüderde termal degradasyona karşı korumuş ve salım süresini uzatmıştır. Ayrıca PKN film, test edilen bakterilere (*Brochothrix thermosphacta*, *Listeria innocua*, *Pseudomonas fragi* ve *Carnobacterium* spp.) karşı antibakteriyel etki göstermiştir.

Metil selüloz (MC)/CRV/MMT ambalaj film üreterek antimikrobiyal özellik, salım, kalınlık ve opaklık testlerini yapan Tunç ve Duman [61], MMT konsantrasyonunun CRV salımında azalmaya yol açtığını bildirmiş ve salımın sıcaklıkla birlikte arttığı sonucuna varmıştır. *E. coli* ve *S. aureus* gelişimi, 11.1 ± 0.2 mg CRV içeren filmin bulunduğu sıvı besiyeri ortamında tamamen inhibe edilmiştir. Çalışmada test edilen MC/CRV ve MC/CRV/MMT filmler, sosiste *E. coli* ve *S. aureus* sayısını sırasıyla 0.9 ve 0.7 log azaltmıştır.

Cerisuelo ve ark. [95], etilen vinil kopolimer (EVOH) ambalajdan (%5) CRV salımını azaltmak için %2 MMT içeren PKN ambalaj tasarlamış ve aktif ambalajın salım, geçirgenlik, termal ve mikroyapısal özelliklerini incelemiştir. Neticede PKN filmlerin su buharı, O₂ ve CO₂ geçirgenlikleri ile CRV difüzyonu daha düşük bulunmuştur. MMT ilavesi ise ambalajdan CRV'nin kontrollü salımında kısmi bir iyileşme sağlamıştır.

Lim ve ark. [50], *Gelidium corneum* (agar, GC) filmin fiziksel özelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla filme Cloisite Na⁺ ve 30B (%3), filme antimikrobiyal özellik kazandırmak amacıyla da timol (THY) ve üzüm çekirdeği ekstraktı (%0.8-1.0-1.2) ilave etmiştir. Filmin kopma direnci, kopma uzaması ve su buharı geçirgenliği, kil ilavesi ile iyileşmiştir. THY ve üzüm çekirdeği ekstraktı ilavesi ile *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 gelişimi inhibe edilmiştir. Sonuç olarak elde edilen PKN filmlerin, gıdaların raf ömürlerinin uzatılmasında kullanılma potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir.

Yine başka bir araştırmada, Sanchez-Garcia ve ark. [96], nanokil konsantrasyonuna bağlı olarak polikaprolakton (PCL) bazlı filmden THY salımını araştırmıştır. Mika kili PCL matriksinde THY'nin dağılımını iyileştirmiş ve difüzyon katsayısını düşürmüştür. Böylece kil sayesinde filmden kontrollü salımın sağlanabileceği sonucuna varılmıştır. Mascheroni ve ark. [80] ise %20 buğday gluteni içeren film solüsyonunda bulunan farklı konsantrasyonlarda MMT (%0-10) içeriğinin CRV (%15) salımına etkisini araştırmıştır. Sonuçta, %5'in üzerindeki kil konsantrasyonları söz konusu olduğunda

gluten matriksinde kil agregatları oluştuğu ve bu yapıların CRV'yi hapsederek daha uzun süre alıkonulmasına sebep olduğu bulunmuştur.

Uçucu yağlar ve aktif bileşenleri göz önüne alındığında, bu aktif maddelerin klasik aktif polimer ambalaj üretimi konusundaki etkinliklerinin yaygın olarak araştırıldığı bilinmektedir. Bununla birlikte, bu maddeler ile üretilen klasik ambalajlarda, istenilen aktivitenin elde edilmesi için genellikle yüksek aktif madde konsantrasyonu söz konusu olmaktadır. Uçucu yağların ambalajda yüksek miktarda bulunması, aromatik özelliklerinden dolayı ambalajlanan gıdanın duysal özelliklerini olumsuz etkilemektedir. Buna ek olarak klasik ambalajların gıdaların raf ömrü üzerindeki etkileri, aktif maddenin kısa sürede ambalajı terk etmesinden dolayı yetersiz kalmaktadır. Nanokil takviyesi ile üretilen PKN ambalajlar, sayılan bu dezavantajları bertaraf etme ve iyileştirilmiş bariyer özellikleri sayesinde gıdaların raf ömürlerinin uzatılması konusunda ek fayda sağlama potansiyeli taşımaktadır. Bununla birlikte literatüre göz atıldığında PKN film üretimi ve gıda ambalajlamada kullanımı için yapılan çalışmaların sınırlı olduğu görölmektedir. Bu çalışmada, bahsedilen bu boşluğun doldurulması amaçlanmış, bu amaçla THY, öjenol (EUG) ve CRV içeren LDPE bazlı nanokil (MMT ve HNT) dolgulu PKN filmler üretilmiş ve elde edilen bu aktif PKN ambalajların taze parça et, kıyma, kaşar peyniri, salça ve fermente sucuğun raf ömürleri üzerindeki etkinlikleri test edilmiştir.

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyaller

2.1.1. Sarf malzemeler

Araştırma sırasında aktif ambalaj üretiminde kullanılan biyoaktif maddeler timol (THY, 2-[(CH₃)₂CH]C₆H₃-5-(CH₃)OH, >%99.5, 150.22 g/mol) ve karvakrol (CRV, (CH₃)₂CHC₆H₃(CH₃)OH, >%98, 150.22 g/mol), nanokiller [sodyum bentonit (montmorillonit – MMT, H₂Al₂O₆Si, <25 µm partikül boyutu, 180.1 g/mol) ve halloysit (HNT, Al₂Si₂O₅(OH)₄ · 2 H₂O, 30-70 nm × 1-3 µm, nanotüp, yüzey alanı 64 m²/g)] ile silika (SiO₂, 60.08 g/mol, 12 nm partikül boyutu, yüzey alanı 175-225 m²/g) Sigma'dan (Almanya); öjenol ise (EUG) Merck'ten (Almanya) temin edilmiştir. Ambalaj üretiminde kullanılan polimer, lineer düşük yoğunluklu polietilen (LDPE) Qatofin Company Ltd.'den (Lotrene, Doha, Katar) satın alınmıştır. LDPE'nin bazı özellikleri şöyledir: Erime akış indeksi: 2.000 g/10 dk; yoğunluk (23°C'de): 0.918 g/cm³, kristal erime noktası: 121°C.

2.1.2. Gıda denemelerinde kullanılan malzemelerin temini

Kaşar peyniri üretiminde kullanılan tam yağlı (~%3.5) taze inek sütü Erciyes Üniversitesi Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezinden (ERÜTAM) temin edilmiştir. Süt, hemen pastörizasyona alınarak kaşar üretiminde kullanılmıştır. Taze kıyılmış ve parça et ile yapılan denemelerde ve sucuk üretiminde kullanılan taze parça et ve baharatlar Kayseri'de bulunan yerel bir kesimhaneden kontrollü olarak sağlanmıştır. Etler, usulüne uygun olarak kesilmiş ve ölüm sertliğini geçirmesi amacıyla 24 saat dinlendirilmiş ve ortalama 2.5 yaşındaki sığır karkasına ait *Longissimus dorsi* kasından bütün halinde alınarak aseptik ve soğuk şartlarda hızlı bir şekilde laboratuvara transfer edilmiş ve testlerde kullanılabilecek kadar (en fazla 1 gece) buzdolabında (4°C) muhafaza edilmiştir. Ev yapımı domates salçası (27° Briks, pH 4.21), Kayseri'deki yerel bir üreticiden sağlanmış ve -18 °C'de saklanmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Nanokillerin karakterizasyonu

2.2.1.1. Yüzey zetapotansiyel ölçümü

Killerin yüzey iyon değiştirme potansiyelleri (mV - zetapotansiyel) pH'nın bir fonksiyonu olarak Zetasizer ZS90 cihazı (Malvern Instruments, UK) kullanılarak ölçülmüştür. Bu amaçla 100 mL saf su içerisine 0.25 g nanokil ilave edilerek manyetik karıştırıcıda 10 dk karıştırılmış ve su içerisinde askıda kalan koloidal kil partiküllerinin zetapotansiyelleri belirlenmiştir [97]. Süspansiyonun pH'sı, 0.01M NaOH veya 0.01M HCl kullanılarak pH 2 ve 12 arasında değiştirilmiştir. Nanokillerin zetapotansiyelleri, Henry Denklemi ve Smoluchowski model yaklaşımını esas alan enstrüman yazılımı tarafından 25°C'de tekrar kullanılabilir dip cell içerisinde yapılan ölçümler sonucunda hesaplanmıştır. Nanokiller ile yapılan zetapotansiyel ölçümü, silika ile de yapılarak silikanın yüzey zetapotansiyeli tespit edilmiş ve nanokillerle karşılaştırılmıştır.

2.2.1.2. Ortalama partikül boyutu ve dağılımı

Nanokillerin partikül boyutu ve dağılımı, pH'nın bir fonksiyonu olarak dinamik ışık saçılımı (dynamic light scattering - DLS, Malvern nano Zetasizer ZS90, UK) kullanılarak 90°'lik saçılım açısında ölçülmüştür. Bu yöntemle Brownian hareketi yapan partiküllerin difüzyonu ölçülmekte ve difüzyon parametresi Stokes-Einstein ilişkisi kullanılarak boyut ve boyut dağılımına çevrilmektedir [98].

Partikül boyutu ölçümü amacıyla 2.2.1.1'deki gibi saf su içerisinde hazırlanan koloidal süspansiyon, 12 mm² polistiren küvet içerisine alınmış ve Zetasizer cihazında ölçüm gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar en az 10 tekrarın ortalaması olarak verilmiş ve hata payı en fazla %5 olarak öngörülmüştür.

2.2.2. Aktif maddelerin ve sürfaktanların karakterizasyonu

Kullanılan aktif maddelerin ve sürfaktanların iyonik veya noniyonik olma özelliklerinin tespiti amacıyla 175-225 m²/g yüzey alanına sahip silika (Sigma, Almanya) kullanılmıştır. Bu amaçla, bölüm 2.2.1.1'de anlatıldığı gibi hazırlanan koloidal silika süspansiyonuna farklı molar konsantrasyonlarda sürfaktan (Tween 80) ve/veya aktif maddeler (THY, EUG ve CRV) ilave edilerek oluşan yeni süspansiyonun

zetapotansiyeli (mV) ölçülmüştür [97] . Aktif madde ve sürfaktan konsantrasyonları Tablo 8'de görülmektedir.

Tablo 8. Aktif madde-sürfaktan-nanokil etkileşiminin tespiti için kullanılan aktif madde ve sürfaktan konsantrasyonları.

Aktif Madde	Konsantrasyon (M)	Sürfaktan	Konsantrasyon (M)
THY	10^{-4}		10^{-5}
EUG	10^{-3}		10^{-4}
CRV	5×10^{-3}	Tween 80	10^{-3}
	10^{-2}		10^{-2}
	5×10^{-2}		

THY: Timol; CRV: Karvakrol; EUG: Öjenol.

Tablo 8’de görülmekte olan aktif madde ve sürfaktan konsantrasyonları, ön denemeler sonucunda tespit edilmiştir. Maksimum konsantrasyonların belirlenmesinde sürfaktan içerisinde çözünebilen aktif madde miktarının üst sınırı dikkate alınmıştır.

Kullanılan biyoaktif maddeler ile nanokiller arasındaki iyon değişimi mevcudiyetinin tespiti amacıyla, silika kullanılarak yapılan işlem, silika yerine nanokiller kullanılarak da tekrar edilmiş ve nanokil-sürfaktan-aktif madde etkileşimleri belirlenmiştir.

2.2.3. Biyoaktif madde içeren aktif kil nanopartiküllerinin (AKNP) üretimi ve karakterizasyonu

2.2.3.1. AKNP üretimi

Biyoaktif maddelerin çözünürlükleri esas alınarak, uygun sürfaktanların yardımıyla biyoaktif madde yüklenmiş kil nanopartikülleri üretilmiştir. THY, EUG ve CRV yüklenmiş nanopartikül üretimi için sürfaktan olarak Tween 80 kullanılmıştır.

AKNP üretimi için, ilk olarak bir beher içerisinde sırasıyla ön denemelerle belirlenen miktarlarda aktif madde (3 mL) ve sürfaktan (3g) eklenerek oda sıcaklığında ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) 600 rpm'de 5dk karıştırılmış ve aktif madde sürfaktan içinde iyice dağıtılmıştır. Daha sonra karışımın üzerine 100 mL saf su ilave edilerek karıştırmaya devam edilmiş ve aktif maddelerin sürfaktan vasıtasıyla saf su içerisinde iyice disperse olması sağlanmıştır. Daha sonra karışım üzerine 3 g nanokil ilave edilmiş ve böylece karıştırma işlemi 3 saat boyunca sürdürülmüştür. Karıştırma boyunca MMT, hidrofilik yapısı nedeniyle su alıp şişerken sürfaktanların hem tabaka aralarını genişletmesi, hem de aktif maddelerin tabaka araları ve yüzeylerine taşınması amaçlanmıştır. Karıştırma işlemi

sonrasında elde edilen karışım, 5000 rpm'de 5 dk süre ile santrifüj edildikten sonra dibe çöken kek kısmı, oda sıcaklığında 2 gün süre bekletilerek kurutulmuş ve bilyeli değirmen (Fritsch™ Pulverisette 7 Premium Line, Almanya) ile öğütülerek boyutu 200 mesh altına indirgenmiştir.

2.2.3.2. AKNP'lerin antimikrobiyal aktivitelerinin tespiti

Biyoaktif madde yüklenmiş kil nanopartiküllerinin antimikrobiyal aktivitesi, sıvı besiyeri içerisinde 7 farklı bakteriye (Tablo 9) karşı zamana bağlı mikroorganizma canlılığı/ölümü test edilerek belirlenmiştir. THY, EUG ve CRV yüklenmiş nanokillerin bakterilerin tamamına etkisi belirlenmiştir.

AKNP'lerin antimikrobiyal etkisi, Appendini ve Hotchkiss [16] tarafından özetlenen yöntemle, 2 farklı inokülüm düzeyinde ($\sim 10^6$ ve $\sim 10^4$ kob/mL) taze mikrobiyal kültür içeren sıvı besiyeri içerisinde 24 saat boyunca takip edilmesi suretiyle belirlenmiştir. Öncelikle, Tablo 9'da görülen stok bakteriyel kültürler, tabloda belirtilen sıcaklık ve sürelerde peş peşe 2 kez aktifleştirilmiştir. Aktifleştirilen bakteriler 6 mL steril besiyeri içerisine $\sim 10^6$ kob/mL veya $\sim 10^4$ kob/mL düzeyinde inoküle edilmiş ve üzerine %5 (v:w) oranında AKNP ilave edilmiştir. Sıvı besiyeri 1 dk vortekste karıştırılarak kil partiküllerinin besiyeri içerisine iyice dağılması sağlanmıştır. Ardından mikroorganizma içeren sıvı besiyerinden belli periyotlarda (0, 6, 12 ve 24. saatler) örnekler alınmıştır [16]. Örneklerin Maximum Recovery Diluent (MRD, Merck, Almanya) çözeltisi ile seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Bu dilüsyonlardan uygun katı besiyerlerine yayma ekim yapılarak yine Tablo 9'da belirtilen şartlarda inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonucunda gelişen koloniler sayılmıştır. Koloni sayıları logaritmik değerlere çevrilmiş ve sonuçlar log kob/mL olarak ifade edilmiştir.

Tablo 9. Test edilen bakteriler.

Mikroorganizmalar	Kullanılan besiyeri	Aktifleştirme ve inkübasyon şartları
<u>Gram (+) bakteriler</u>		
<i>Bacillus cereus</i> FMC19	Nutrient Agar-Broth	37 °C'de 24 saat
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19118	Nutrient Agar-Broth	37 °C'de 24 saat
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Nutrient Agar-Broth	37 °C'de 24 saat
<i>Lactobacillus casei</i>	MRS Agar-Broth	37 °C'de 24 saat
<i>Lb. rhamnosus</i>	MRS Agar-Broth	37 °C'de 24 saat
<u>Gram (-) bakteriler</u>		
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 33150	Nutrient Agar-Broth	37 °C'de 24 saat
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar	Nurtient Agar-Broth	37 °C'de 24 saat
<i>Typhimurium</i> ATCC 14028		

MRS: De Man, Rogosa and Sharpe.

Antimikrobiyal aktiviteleri tespit edilen AKNP'lerden düşük etkili bulunanları elenmiş ve geriye kalanlar aktif nanokompozit film (ANF) üretiminde kullanılmıştır.

2.2.4. Biyoaktif madde içeren aktif nanokompozit film (ANF) üretimi ve karakterizasyonu

2.2.4.1. ANF üretimi

Bölüm 2.2.3.1'de izah edilen yöntemle hazırlanan AKNP'ler, LDPE içerisine %5 oranında karıştırılmış ve çift vidalı ekstrüderde (Gülner, Türkiye) ($L/D = 42$, $D = 16$ mm) 40, 175, 180, 175 ve 180°C'den oluşan bir sıcaklık profili kullanılarak aktif nanokompozit film (ANF) üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu sıcaklık profili, cihaz üzerinde yapılan optimizasyon çalışması sonucunda tespit edilmiştir. Kontrol ambalajı olarak aynı ekstrüzyon şartları altında, nanokil ilavesi yapılmamış saf LDPE filmler üretilmiştir.

2.2.4.2. ANF'lerin antimikrobiyal aktivitesinin tespiti

ANF'lerin antimikrobiyal aktiviteleri, tampon çözelti içerisindeki bakteriyel kültürlerle karşı test edilmiştir. Bu amaçla, Appendini ve Hotchkiss [16] tarafından izah edilen yöntem kullanılmıştır. Öncelikle; KH_2PO_4 (Merck, Almanya) ve Na_2HPO_4 (Merck, Almanya) ile pH 7.0'da tampon çözeltiler hazırlanmış, 100 mL'lik şişeler içerisine konulmuş ve sterilize edilmiştir. Steril tampon çözeltiler içerisine bölüm 2.2.3.2'de anlatıldığı gibi aktifleştirilen mikrobiyal kültürler $\sim 10^6$ kob/mL hedef inokülasyon düzeyi sağlanacak şekilde inoküle edilmiştir. Bir bisturi yardımıyla 25 cm² yüzey alanına sahip ambalaj filmler kesilmiş, küçük parçalara ayrılmış ve mikroorganizmaları içeren tampon çözeltiler içerisine konulmuştur. Kontrol örneğine aktif madde yüklenmiş

nanokil içermeyen saf LDPE film konulmuştur. Şişeler, orbital çalkalayıcıda Tablo 9’da belirtilen sıcaklıklarda 24 saat süreyle 200 rpm çalkalama hızında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun başlangıcında ve bitiminde şişelerden örnekler alınarak bölüm 2.2.3.2’de anlatıldığı gibi dilüsyonları hazırlanmış ve ekimleri yapılmıştır. Koloniler sayılarak sonuçlar logaritmik değerlere çevrilmiş ve log kob/mL olarak ifade edilmiştir.

ANF'lerin antimikrobiyal aktivitelerini karakterize etmek amacıyla aşağıdaki formül kullanılarak mikroorganizmaların gelişim inhibisyon düzeyleri (GİD) hesaplanmıştır [99]:

$$\%GID = \frac{P_k - P_o}{P_k} \times 100 \quad (2.1)$$

Formülde yer alan P_k ve P_o sırasıyla ölçüm anındaki kontrol ve örnek popülasyonunu (log kob/mL) ifade etmektedir.

2.2.4.3. ANF'lerin antiradikal aktivitelerinin tespiti

ANF'lerin antiradikal yakalama aktivitesi, Byun ve ark. [100] tarafından belirlenen yöntemle göre 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radikalini yakalama testleri yapılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 0.1 g film örneği küçük parçalar halinde kesilmiş ve üzerine 2 mL metanol ilave edilmiştir. Karışım, 3 dk vortekste (Elektromag, Türkiye) karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 3 saat bekletilmiştir. Daha sonra tekrar 3 dk vortekslenmiş ve 2300 rpm’de santrifüj cihazında (Hettich, Almanya) 10 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant, DPPH radikali yakalama testinde kullanılmıştır. Bu amaçla 500 µL metanol ekstraktı, 2 mL 0.06 mM metanol ile hazırlanmış DPPH çözeltisi ile karıştırılmış, karışım 1 dk vortekslenmiş ve karanlıkta 30 dk bekletilmiştir. Süre sonunda örneklerin absorbansı bir UV spektrofotometrede (Shimadzu UV–visible 1700, Tokyo, Japonya) 517 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Kontrol olarak 0.12 mM DPPH ile karıştırılmış metanol kullanılmıştır. Antiradikal aktivite, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$(\%) = \left(1 - \frac{Absorbans_{\text{örnek}}}{Absorbans_{\text{kontrol}}} \right) \times 100 \quad (2.2)$$

2.2.4.4. ANF'lerde kalan aktif madde miktarının belirlenmesi

THY, EUG ve CRV yüklenmiş killerin ilavesiyle elde edilen ANF'lerde depolama sürecinde kalan aktif maddelerin miktarı belirlenmesinde Suppakul ve ark. [101] tarafından açıklanan yöntem esas alınmıştır. Öncelikle ambalaj materyalinden aktif madde ekstraksiyon süresinin belirlenmesi üzerine ön denemeler yapılmıştır. Bu amaçla 2 g ambalaj örneği tartılarak üzerine 4 mL metanol ilave edilmiş, 24 saat süre ile soğuk ekstraksiyona tabi tutulmuş ve ekstraksiyonun farklı aşamalarında (0, 2, 5, 8, 12, 18 ve 24. saat) karışımdan örnekler alınarak alev iyonizasyon dedektörü (flame ionization detector, FID) ve kaynaşık kapilar kolon (DB-5, 30m × 0.25mm i.d., film kalınlığı 0.25mm; J&W Scientific, ABD) donanımlı gaz kromatografisi (GC) cihazına (Agilent 6890, ABD) enjekte edilmiştir. GC analiz koşulları Tablo 10'daki şekilde ayarlanmıştır:

Tablo 10. GC analiz koşulları.

Başlangıç kolon sıcaklığı	80°C
Isıtma oranı	180°C'ye kadar 5°C/dk
Bekleme	5 dk
Enjeksiyon sıcaklığı	250°C
Bölünme oranı	1:100
FID dedektör sıcaklığı	300°C
Taşıyıcı gaz	Hidrojen
Enjeksiyon miktarı	1.0 µL

Depolama sürecinde ambalaj filmde kalan aktif madde konsantrasyonunu belirlemek amacıyla oda (24±1°C) ve buzdolabı sıcaklığında (4±1°C) bekletilen ambalaj filmler, 40 gün boyunca 10'ar gün aralıklarla yukarıda izah edilen yöntem kullanılarak analize tabi tutulmuştur. ANF'lerdeki aktif madde konsantrasyonları, standart aktif madde çözeltilerinden oluşturulan bir standart eğri çizilerek belirlenmiştir.

Ayrıca, ekstrüder koşullarında aktif maddelerde meydana gelecek kayıpları belirlemek ve kaybın önlenmesi üzerinde nanokillerin etkisini belirlemek amacıyla nanokil içermeyen ancak ANF'lerle aynı oranlarda aktif madde ilave edilerek hazırlanan filmler depolama öncesi aynı şartlarda analiz edilmiştir. Bu filmlerde kalan aktif madde

miktarları, ANF'lerdekiyle karşılaştırılmıştır. Aktif madde tayini yapılan filmler Tablo 11'de görülmektedir.

Tablo 11. Aktif madde tayini yapılan filmler.

Ambalaj film	
1. CRV-MMT	Karvakrol yüklenmiş MMT ile hazırlanan LDPE film
2. CRV-HNT	Karvakrol yüklenmiş HNT ile hazırlanan LDPE film
3. CRV-K	Karvakrol ile üretilmiş nanokil içermeyen saf LDPE film
4. EUG-MMT	Öjenol yüklenmiş MMT ile hazırlanan LDPE film
5. EUG-K	Öjenol ile üretilmiş nanokil içermeyen saf LDPE film
6. THY-MMT	Timol yüklenmiş MMT ile hazırlanan LDPE film
7. THY-HNT	Timol yüklenmiş HNT ile hazırlanan LDPE film
8. THY-K	Timol ile üretilmiş nanokil içermeyen saf LDPE film

MMT: Montmorillonit; HNT: Halloysit

2.2.4.5. ANF'lerin mekanik özellikleri

ANF'lerin çekme dayanımı (TS, tensile strength) ve kopma anındaki uzama (EB, elongation at break) özellikleri, ASTM-D882 kodlu standart metoda [102] göre tekstür analiz cihazı (TA.XT Plus Stable Micro Systems, Surrey, UK) kullanılarak belirlenmiştir. Bu işlemde 5kg'lık yük hücresi kullanılmıştır. Ambalajlar dikdörtgen biçiminde (10 cm x 2 cm) kesilmiş ve çekme probuna uçlarından tutturulmuştur. Prob uçları arası başlangıç uzaklığı 50 mm olarak ayarlanmış ve film 4 mm/s hızda gerilmiştir. Ölçümler oda sıcaklığında (24 ± 1 °C) gerçekleştirilmiştir. TS (MPa) ve EB (%) değerleri, gerilme-şekil değiştirme eğrisinden elde edilmiştir. TS, filmin koptuğu andaki basıncını; EB filmin koptuğu andaki uzunluğunun başlangıçtaki uzunluğa oranını ifade etmektedir. Bu amaçla ortalama 5 film parçası test edilmiş ve ölçümlerin aritmetik ortalamaları alınmıştır.

2.2.4.6. ANF'lerin morfolojik (SEM) özellikleri

Üretilen ANF'lerin yüzey morfolojileri ve kil tabakalarının polimer matriksi içerisindeki dağılımı, EDX ve WDX 600i X-Ray spektrofotometre donanımlı bir taramalı elektron mikroskobu (SEM LEO 440 Stereoscan) kullanılarak analiz edilmiştir. ANF'lerin en az 10 adet fotoğrafı alınmıştır.

2.2.4.7. ANF'lerin renk ve opaklık özellikleri

Üretilen ambalaj filmlerinin renk özellikleri, Hunter kolorimetresi (Lovibond RT Series Reflectance Tintometer, UK) kullanılarak belirlenmiştir. Analizden önce siyah ve beyaz standartlarla cihazın kalibrasyonu yapılmıştır. Kalibrasyon sonrasında, film örneği, cihazın beyaz standardı üzerine konularak ölçümler yapılmış ve Hunter L^* , a^* ve b^* değerleri elde edilmiştir [103]. Ortalama 5 film örneği 3 farklı noktadan analize tabi tutulmuştur. Burada L^* değeri siyah-beyazlık (0-100), a^* değeri kırmızılık-yeşillik (+: kırmızı, -: yeşil) ve b^* değeri ise sarılık-mavilik (+: sarı, -: mavi) değerlerini ifade etmektedir. Toplam renk farklılığının hesaplanmasında ise

$$\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{0.5} \quad (2.3)$$

formülü kullanılmıştır. Burada; $\Delta L = L_{\text{standart}} - L_{\text{örnek}}$, $\Delta a = a_{\text{standart}} - a_{\text{örnek}}$, $\Delta b = b_{\text{standart}} - b_{\text{örnek}}$ olarak ifade edilmektedir Beyaz standart değerleri sırasıyla; $L = 94.98$, $a = -1.04$ ve $b = 0.55$ 'tir.

Filmlerin opaklık (saydamlık) özellikleri (%) ise yine reflektans ölçümleri ile belirlenmiştir ve bu amaçla Hunter kolorimetresi kullanılmıştır. Bu ölçümler yapılırken, örneklerin opaklığı ile siyah ve beyaz standartlar arasındaki ilişkiden yararlanılmıştır [104].

2.2.4.8. Film kalınlığı

Üretilen filmlerin kalınlıkları, dijital bir mikrometre (Fowler Digitrix Mark 2, Chicago, ABD) kullanılarak 0.01 mm hassasiyet ile ölçülmüştür.

2.2.4.9. Termogravimetrik (TGA) analiz

Bu analiz ile örneklerin belirli sıcaklık aralıklarında ağırlık kayıpları tespit edilmektedir. Bu işlemde, film örnekleri öncelikle denge sistemine yerleştirilmiş ve hava atmosferinde 20°C/dk ısıtma oranı ile 50°C'den 600°C'ye ısıtılmıştır. Örnekteki ağırlık kaybı, sıcaklığın bir fonksiyonu olarak ölçülmüştür [105].

2.2.4.10. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC)

Ambalaj filmlerin erime ve kristalizasyon sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla Perkin-Elmer (Model DSC-7, Perkin Elmer Instruments, ABD) DSC cihazı kullanılmıştır. 5-10 mg film örneği alınıp alüminyum kaplı DSC kabına yerleştirilmiş ve 10°C/dk ısıtma oranı ile azot atmosferinde -10°C'den 160°C'ye ısıtılmıştır. Sıcaklık ve zamana bağlı olarak örneğe verilen enerji tespit edilmiştir. Elde edilen değerlerden erime sıcaklığı (T_e) ve erime entalpisi (ΔH) belirlenmiştir. Kristalizasyon derecesi (χ) ise örneğin ΔH değeri ile %100 kristal polietilene ait olduğu varsayılan ΔH değeri olan 293 J/g değeri arasındaki orandan hesaplanmıştır [105].

2.2.4.11. Fourier transform infrared (FTIR) spectra analizi

Üretilen ambalaj filmlerin FTIR spektrumları, Perkin Elmer Spectrum 400 (Perkin Elmer Instruments, ABD) FTIR spektrofotometresi ile ölçülmüştür. Ölçüm 450-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir [106]. Ortalama 5 ölçüm gerçekleştirilmiştir.

2.2.5. Gıda denemeleri

ANF'lerin gıdaların raf ömürleri üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla yapısal olarak farklı gıda maddeleri seçilmiştir. Test edilen gıda maddeleri; kaşar peyniri, domates salçası, sucuk, parça et ve kıymadır. Gıdalarda yapılan testler 3 tekrürlü olarak yürütülmüş olup her bir parametre en az 3 paralelli olarak ölçülmüştür.

2.2.5.1. Kaşar peyniri

2.2.5.1.1. Kaşar peynirinin üretimi ve analize hazırlanması

Kaşar peyniri üretimi, Erciyes Üniversitesi Safiye Çıkrıkçıoğlu Meslek Yüksekokulu Gıda Pilot Uygulama Merkezinde Cankurt [107] tarafından önerilen yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Taze, tam yağlı (~%3.5) çiğ inek sütü kalite kontrolleri (antibiyotik, pH, SH, briks, yağ, soda ve peroksit) yapıldıktan sonra 65°C'de 30 dk pastörize edilmiş ve peynir teknesine alınarak mayalama sıcaklığına (30±1°C) soğutulmuştur. İçerisine önce %0.05 oranında suda çözünmüş CaCl_2 , ardından da rennin enzimi ilave edilmiştir. 1 saatlik pıhtılaşma süresinin ardından oluşan pıhtı kırılmış, 10 dk dinlendirildikten sonra telemenin toplanması için 40°C'ye ısıtılmıştır ve daha sonra suyu süzölmüş ve

baskıya alınmıştır. Baskılama sonrasında suyun iyice uzaklaşması için birkaç defa doğrama işlemi uygulanmıştır. Teleme, istenilen asitlik değerine ulaştığında suda 75°C'de 5 dk haşlanmıştır. Haşlanan peynir, 3 cm çaplı silindir şeklindeki kalıplar içerisine doldurularak 48 saat oda sıcaklığında bekletilmiş ve istenilen şekli aldıktan sonra kalıplardan çıkarılmıştır. Silindir şeklini almış peynir, dilimleme makinesi kullanılarak 8 mm kalınlığında (~20g ağırlığında) dilimlenmiştir. ANF'lerin kaşar peynirinin doğal yükü üzerindeki etkisinin test edileceği peynir dilimleri herhangi bir işlem yapılmadan kullanılırken, mikroorganizma bulaştırılacak peynir dilimlerinin her 2 tarafı, yüzey dezenfeksiyonu amacıyla 15 cm uzaklıktan 10 dk süre ile UV ışınına (254 nm) maruz bırakılmıştır. Dilimlenen kaşar peynirlerinde ANF'lerin etkisini test etmek amacıyla, kaşar peyniri dilimleri ANF'ler içerisine birbirine temas etmeyecek şekilde konulmuş ve vakum ambalajlanmıştır. Kontrol örnekleri saf LDPE ambalaj kullanılarak vakum paketlenmiştir.

2.2.5.1.2. Mikrobiyolojik analizler

Vakum ambalajlanan peynirler 30 gün boyunca 10°C'de depolanmış ve 10'ar gün arayla toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB), toplam koliform (TK), toplam laktik asit bakterisi (LAB), toplam maya-küf (MK) ve *Staphylococcus aureus* yükleri bakımından analize tabi tutulmuştur. Bu amaçla 20g peynir örneği, aseptik şartlarda stomacher poşeti içerisine konularak üzerine 180mL Maximum Recovery Diluent (MRD, Merck, Almanya) eklenerek 120s boyunca Stomacher cihazında (Stomacher, IUL, Barcelona, İspanya) homojenize edilmiştir. Daha sonra seri dilüsyonları hazırlanmış ve uygun dilüsyonlardan yayma ekim yapılmıştır [108].

- **TMAB sayımı:** Tahmin edilen mikroorganizma sayısına uygun dilüsyonlardan 0.1mL alınarak daha önceden steril edilerek petrilere dökülmüş ve katılaştırılmış Plate Count Agar (PCA, Merck, Almanya) üzerine yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Petriler 30°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda gelişen koloniler sayılmıştır.
- **TK sayımı:** Tahmin edilen mikroorganizma sayısına uygun dilüsyonlardan 0.1 mL alınarak daha önceden steril edilerek petrilere dökülmüş ve katılaşmış Violet Red Bile Agar (VRBA, Merck, Almanya) üzerine yayma yöntemi ile ekim

yapılmıştır. Petriler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda 1 mm 'den büyük pembe-kırmızı renkli koloniler sayılmıştır.

- **LAB sayımı:** Tahmin edilen mikroorganizma sayısına uygun dilüsyonlardan 0.1 mL alınarak daha önceden steril edilerek petrilere dökülmüş ve katılmış De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Agar (Merck, Almanya) üzerine yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Petriler 30°C'de 2-3 gün inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda gelişen koloniler sayılmıştır.
- **MK sayımı:** Tahmin edilen mikroorganizma sayısına uygun dilüsyonlardan 0.1 mL alınarak daha önceden steril edilerek petrilere dökülmüş ve katılmış Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) Agar (Merck, Almanya) üzerine yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Petriler 25°C'de 1-5 gün inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda gelişen koloniler sayılmıştır.
- ***S. aureus* sayımı:** Tahmin edilen mikroorganizma sayısına uygun dilüsyonlardan 0.1 mL alınarak daha önceden steril edilerek petrilere dökülmüş ve katılmış Baird Parker Agar (BPA, Merck, Almanya) üzerine yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Petriler 37°C'de 24-48 inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda yuvarlak, konveks, dar, parlak zonla çevrili, 2-3 mm çapındaki siyah-gri koloniler muhtemel *S. aureus* kolonileri olarak sayılmıştır.

Bu çalışmada ayrıca, üretilen kaşar peynirlerine *Aspergillus niger* ve *Listeria monocytogenes* ayrı ayrı kontamine edilerek ANF'lerin bu mikroorganizmaların peynirdeki gelişimlerine etkisi incelenmiştir.

Kaşar peynirine bulaştırılan *A. niger*'in peynirdeki canlılığı üzerine ANF'lerin etkisini belirlemek amacıyla Ture ve ark. [109] tarafından tarif edilen yöntem kullanılmıştır. Stok *A. niger* kültürü, öncelikle Malt Extract Agar (MEA, Merck, Almanya) üzerine ekilerek 3 gün boyunca 25°C'de aktifleştirilmiştir. Daha sonra spesifik küf kolonileri, steril Malt Extract Broth (MEB, Merck, Almanya) içerisine alınarak aynı sıcaklıkta 3-5 gün gelişimi sağlanmış ve sıvı besiyerinde gelişen kültür, denemelerde kullanılmıştır.

Aktifleştirilmiş *A. niger* kültürü, $\sim 10^3$ kob/mL hedef mikroorganizma sayısı içerecek şekilde steril MRD çözeltisi içerisine ilave edilerek inokülasyon sıvısı hazırlanmıştır. Peynir dilimleri, biyogüvenlik kabininde bu inokülasyon sıvısı içerisine daldırılarak 2 dk boyunca bekletilmiş ve küf inokülasyonu sağlanmıştır. Daha sonra her bir yüzey, 10

dk boyunca kurumaya bırakılmış ve kurutulan dilimler, 2 ANF (4.5 cm çapında) arasına konulmuş ve ardından bu şekilde steril petri kutusu içerisine yerleştirilmiştir. Petri içindeki peynir örnekleri, sürgü fermuarlı plastik poşet içerisine konularak 30 gün boyunca 10°C'de depolanmış ve 10 gün aralıklarla testlere tabi tutulmuştur.

Peynirdeki *A. niger* yükünün belirlenmesi amacıyla peynir örnekleri yukarıda anlatıldığı gibi seyreltilmiştir. Daha sonra uygun dilüsyonlardan alınarak DRBC Agar üzerine yayma ekim yapılmış ve ekimi yapılan petriler 25°C'de 1-5 gün bekletilerek gelişen spesifik küf kolonileri sayılmıştır. Sonuçlar, logaritmik değerlere çevrilerek kaydedilmiştir [108].

Kaşar dilimlerinde *L. monocytogenes* canlılığı üzerine ANF'lerle paketlemenin etkisini test etmek amacıyla, ilk olarak 2 kez peş peşe Nutrient Broth içerisinde (Merck, Almanya) 37°C'de 24 saat geliştirilerek aktifleştirilen bakteriyel kültür kullanılarak $\sim 10^5$ kob/mL düzeyinde bakteri içeren MRD çözeltisi hazırlanmıştır. Kaşar dilimleri, çözelti içerisine daldırılmış ve 2 dk boyunca bekletilerek bakteri ile kontamine edilmiştir. Daha sonra biyogüvenlik kabinde 10 dk bekletilerek peynirin kuruması ve bakterilerin peynir yüzeyine tutunması sağlanmıştır.

Kontamine edilmiş peynirler, ANF'ler kullanılarak vakum ambalajlanmış ve 10 °C'de 30 gün süreyle depolanmıştır. Kontrol örneklerinin ambalajlanmasında saf LDPE ambalaj kullanılmıştır. Paketlenen kaşar dilimlerinden 10'ar gün arayla örnekler alınarak analize tabi tutulmuştur. Bu amaçla yukarıda anlatıldığı gibi seyreltilen ve dilüsyonları hazırlanan peynir örnekleri, Oxford Listeria Selective Agar (Merck, Almanya) üzerine yayma ekim yöntemiyle ekilmiş ve 37°C'de 24 saatlik inkübasyon sonunda, gelişen koloniler sayılmıştır. Sonuçlar, logaritmik değerlere çevrilerek kaydedilmiştir [108].

2.2.5.1.3. Kaşar peynirinde pH değerinin belirlenmesi

Farklı ANF'lerle vakum ambalajlanmış ve 10°C'de 30 gün depolanmış kaşar peynirlerinin pH değişiminin ölçümü dijital pH metre kullanılarak gerçekleştirilmiştir [110].

2.2.5.2. Kıyma

2.2.5.2.1. Kıymanın analize hazırlanması

Ölüm sertliğini geçirmiş sığır karkasından alınan tek bir kasa (*Longissimus dorsi*) ait parça halindeki et, daha önceden steril edilmiş kıyma makinesinde (Tefal, Çin) kıyma haline getirilmiştir. Kıyma haline getirildikten sonra TBA (tiyobarbitürik asit) analizi, pH, doğal mikrobiyolojik yük ve *Escherichia coli* O157:H7 analizlerinde kullanılmak üzere 4 kısma ayrılmış ve ambalajlama denemelerinde kullanılmıştır.

2.2.5.2.2. Kıyma örneklerinin ANF'lerle paketlenmesi

Dört parçaya ayrılan kıyma örneğinin 3 kısmı, herhangi bir işleme tabi tutulmadan doğrudan 25 g'lık örnekler halinde 3x8cm boyutlarında düzgünce kesilmiş ve ANF'ler içerisine itina ile konularak paketlenmiştir. Kontrol örneği saf LDPE ambalaj içerisine konulmuştur. Paketlerin ağız kısımları, sızdırmayacak şekilde kapatılmıştır.

ANF'lerin kıymada *Escherichia coli* O157:H7 canlılığı üzerindeki etkisinin test edilmesi amacıyla 4 parti kıyma örneğinin 1 bölümü bu bakteri ile inoküle edilmiştir. Bu amaçla, peş peşe 2 kez Nutrient Broth (Merck, Almanya) içerisinde 37°C'de 24 saat süreyle aktiveleştirilen *E. coli* O157:H7 kültürü, kıyma ette $\sim 10^5$ kob/mL hedef popülasyon elde edilecek şekilde et üzerine serpmeye yöntemi ile inoküle edilmiştir. Kıyılmış et, inokulumun homojen şekilde dağılımının sağlanması amacıyla 5 dk süreyle elle iyice yoğrulmuştur. Et partisi, 25 g kısımlar halinde yukarıda izah edildiği gibi aseptik şartlarda ANF'lerle paketlenmiştir. Kontrol örneğinin ambalajlanmasında saf LDPE kullanılmıştır. Ambalajlanan kıymalar, 7 gün süreyle $5 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de depolanmış ve depolamanın 0, 1, 4 ve 7. günlerinde aşağıda sıralanmış analizlere tabi tutulmuştur.

2.2.5.2.3. Mikrobiyolojik analizler

Paketler içerisindeki 25 g kıyma örneği dikkatlice paket içerisinden çıkarılmış ve hemen Stomacher poşeti içerisine alınmıştır. Üzerine 225 mL MRD ilave edilerek Stomacher ile (Stomacher, IUL, Barselona, İspanya) homojenize edilmiş ve seri dilüsyonları hazırlanmıştır. *E. coli* O157:H7 ile kontamine edilmiş örneklerden hazırlanan dilüsyonlardan Sorbitol MacConkey (SMAC) Agar (Merck, Almanya) üzerine yayma yöntemine göre ekim yapılmıştır. Daha sonra 37°C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmış

ve gelişen renksiz koloniler sayılmıştır. Sonuçlar logaritmik değerlere çevrilerek log kob/g olarak ifade edilmiştir [108].

Doğal mikrobiyal yükteki değişimin belirlenmesi amacıyla yukarıda anlatıldığı gibi ambalajından çıkarılan ve tartılıp homojenize edilen kıyma örneğinin seri dilüsyonları hazırlanmış ve depolama sırasında TMAB, LAB, toplam *Enterobacteriaceae* yüklerindeki değişim test edilmiştir. TMAB ve LAB testleri bölüm 2.2.5.1.2'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Toplam *Enterobacteriaceae* sayısının tespiti amacıyla, hazırlanan dilüsyonlardan 0.1 mL alınarak daha önceden steril edilerek petrilere dökülmüş ve katılaşmış Violet Red Bile Dextrose Agar (VRBD, Merck, Almanya) üzerine yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. Petriler 37 °C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda 1-2 mm çapında kırmızımsı bir presipitat zonu ile çevrili kırmızı koloniler *Enterobacteriaceae* familyası üyeleri olarak sayılmıştır. Sonuçlar, log kob/g olarak kaydedilmiştir [108].

2.2.5.2.4. Tiyobarbitürik asit (TBA) değerinin belirlenmesi

Kıymada ANF'lerin lipit oksidasyonunun geciktirilmesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla Ulu [111] tarafından önerilen perklorik asit metodu kullanılmıştır. Bu amaçla, öncelikle 10 g kıyma örneği, 35 mL %4'lük soğuk perklorik asit ve 1 mL %7.2'lik (w:v etil alkol) bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) içerisinde 1 dk süreyle Ultra Turrax (IKA, T18 Basic, Almanya) kullanılarak homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler, 50 mL'lik mezürler içerisine Whatman no 4 filtre kâğıdı kullanılarak filtre edilmiş ve 5 mL saf su ile yıkanmıştır. Filtratın üzeri 50 mL'ye kadar %4'lük perklorik asit ile tamamlanmıştır. Elde edilen filtrattan deney tüpü içerisine 5 mL alınarak üzerine 5 mL 0.02 M taze TBA çözeltisi ilave edilmiştir. Tüpler, 40 dk süreyle 80±2 °C'ye ayarlanmış su banyosunda tutularak TBA-malondialdehit (MDA) kompleksinin oluşması sağlanmıştır. Bu sürenin ardından tüpler hızlı bir şekilde soğutulmuş ve karışımların 5 mL 0.02M TBA ve 5 mL saf sudan oluşan şahit numuneye karşı 532 nm dalgaboyundaki absorbanları ölçülmüştür.

2.2.5.2.5. pH değerinin belirlenmesi

Kıymanın pH değeri, mikrobiyolojik analiz için hazırlanan kıyma homojenizatına mikrobiyolojik analiz sonrasında dijital pHmetrenin probu daldırılarak tespit edilmiştir [112].

2.2.5.3. Fermente sucuk

2.2.5.3.1. Fermente sucuk üretimi, analize hazırlanması ve ANF'lerle paketlenmesi

Fermente sucuk üretimi, Gökalp ve ark. [113] tarafından belirlenen formülasyon ve yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Tek bir sığır karkasının kol ve but bölgesinden temin edilen taze kuşbaşı et ve böbrek yağı, üretim öncesinde -18°C 'de 1 gece muhafaza edilmiştir. Ertesi gün, kuşbaşı et derin dondurucudan çıkartılarak çözündürüldükten sonra, böbrek iç yağı ise doğrudan sucuk üretimine dâhil edilmiştir. Sucuk hamuru (ortalama 1 kg), şu reçeteye göre üretilmiştir: 800 g sığır eti, 200 g sığır iç yağı, 25 g tuz, 10 g sarımsak, 4 g şeker, 7 g kırmızı biber, 5 g karabiber, 9 g kimyon ve 2.5 g yenibahar. Öncelikle et ve yağ kıyma haline getirilmiş ve tartılarak yukarıdaki formülasyona uygun olarak iyice karıştırılmıştır. Ardından baharatlar (kırmızıbiber, karabiber, kimyon, yenibahar), sarımsak ve tuz aynı anda ilave edilerek iyice karıştırmaya devam edilmiştir. Şeker ise ılık su içerisinde eritildikten sonra ilave edilmiştir. Elde edilen sucuk hamuru, suni kılıflara doldurulmuştur. Dolumu yapılan sucuklar, iklimlendirme kabiniinde (Nüve, Türkiye) $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ ve %90 nispi nemde 3 gün, $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ve %85 nispi nemde 4 gün ve $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ ve %80 nispi nemde 5 gün olmak üzere toplam 12 gün süre ile fermente edilmiştir.

Fermentasyon sonrasında, sucuklar kılıflarından çıkartılmış ve keskin bir bıçak ile 4mm kalınlığında (2.0 ± 0.25 g) dilimlenmiştir. Dilimlenen sucuklar birbiri ile temas etmeyecek şekilde aktif nanokompozit ambalajlar içerisine vakum ambalajlanmıştır. Kontrol örneklerinin ambalajlanmasında saf LDPE ambalaj kullanılmıştır. Dilimlenmiş sucuklar ambalajlandıktan sonra 10°C 'de 30 gün boyunca depolanmıştır. Analizler fermentasyonun 0. ve 12. günü, depolamanın ise 0, 10, 20 ve 30. günlerinde gerçekleştirilmiştir.

2.2.5.3.2. Mikrobiyolojik analizler

Fermentasyon öncesi, sonrası ve ANF'ler içerisinde vakum depolama sırasında sucukta ortaya çıkan doğal mikrobiyal yük analiz edilmiştir. Bu amaçla, dilimlenmiş sucuklarda depolama sırasında oluşan TMAB, LAB, MK ve toplam *Enterobacteriaceae* yükleri bölüm 2.2.5.1.2 ve bölüm 2.2.5.2.3'de izah edildiği gibi test edilmiştir. Sonuçlar, log kob/g olarak ifade edilmiştir [108].

2.2.5.3.3. Sucukta TBA değerinin belirlenmesi

Bölüm 2.2.5.2.4'te anlatılan yöntemle gerçekleştirilmiştir.

2.2.5.3.4. Sucukta pH değerinin belirlenmesi

Bu amaçla alınan 10 g sucuk örneği üzerine 100 ml saf su ilave edilerek Ultra Turrax ile (IKA, T18 Basic, Almanya) iyice homojenize edilmiştir. Karışımın pH değeri, daha sonra pH metre (WTW, InoLab 720, Almanya) probunun daldırılmasıyla 20 ± 1 °C'de tespit edilmiştir [114].

2.2.5.4. Parça et

2.2.5.4.1. Parça etin analize hazırlanması ve ANF'lerle paketlenmesi

Parça etin analize hazırlanmasında Djenane ve ark. [115] tarafından bildirilen yöntem bazı modifikasyonlarla uygulanmıştır. Tek bir sığır karkasından elde edilen hayvansal kasa (*Longissimus dorsi*) ait parça halindeki et, öncelikle steril bir bıçak kullanılarak dış yağlarından arındırılmış, daha sonra 1 cm kalınlığında ve her biri yaklaşık 25 g ağırlığında ve düz bir yüzey elde edilecek şekilde dilimlere ayrılmıştır. Kesilen et parçaları, 2 partiye ayrılarak bir bölümünün yüzeyine *E. coli* O157:H7 kontamine edilerek, diğeri ise renk analizinde kullanılmak üzere parça etin geniş yüzeyi ile ambalaj arasında hava boşluğu kalmayacak şekilde doğrudan ANF'ler ile paketlenmiştir. Kontrol örneklerinin paketlenmesinde saf LDPE ambalaj kullanılmıştır. Paketlenen örnekler 5 ± 1 °C'de 7 gün süreyle depolanmış ve depolamanın 0, 1, 4, ve 7. günlerinde aşağıda anlatılan analizlere tabi tutulmuştur.

E. coli O157:H7 canlılığının test edileceği parça et örneklerinin analize hazırlanması amacıyla, Nutrient Broth içerisinde 2 kez peş peşe aktiveleştirilen *E. coli* O157:H7 kültürü, $\sim 10^6$ kob/mL hedef sayıya ulaşacak şekilde MRD çözeltisi içerisinde %1 (v:v)

oranında ilave edilmiştir. Hazırlanan parça etler, bakteri içeren sıvı içerisine yaklaşık 5 dk boyunca daldırılarak bakterilerin et yüzeyine bulaşması sağlanmıştır. Daha sonra bu etler, biyogüvenlik kabininde 30 dk boyunca bekletilerek yüzeyin kuruması ve kontamine edilen bakterilerin yüzeyde tutunması sağlanmıştır. Yüzeyi bakteri ile inoküle edilmiş etler, ANF'lerle yukarıda açıklandığı gibi sarılmış ve depolanmıştır. Kontrol örneklerinin paketlenmesi için saf LDPE ambalaj kullanılmıştır.

2.2.5.4.2. Mikrobiyolojik analizler

Paketler içerisindeki yaklaşık 25 g ağırlığındaki parça et, dikkatlice paket içerisinden çıkarılmış ve hemen Stomacher poşeti içerisine alınmıştır. Üzerine 225 mL MRD ilave edilerek Stomacher ile homojenize edilmiş ve seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Uygun dilüsyonlardan SMAC Agar üzerine yayma ekim yapılmıştır. 37°C'de 24 saatlik inkübasyon sonucunda gelişen renksiz koloniler sayılmıştır. Sonuçlar logaritmik değerlere çevrilerek log kob/g olarak ifade edilmiştir [108].

2.2.5.4.3. Parça ette yüzey renginin belirlenmesi

Parça etin yüzey renk kalitesi üzerine kullanılan ANF'ler ile depolamanın etkisini belirlemek amacıyla renk tayin cihazı ile örneklerin L^* , a^* ve b^* değerleri belirlenmiştir. Bu amaçla parça et yüzeyinin farklı bölgelerinin rengi en az 3 farklı bölgeden doğrudan ölçülerek sonuçlar kaydedilmiştir.

2.2.5.5. Salça

2.2.5.5.1. Salçanın analize hazırlanması ve ANF'lerle paketlenmesi

Çalışmada hammadde olarak, ev yapımı ve tuz dışında herhangi bir katkı maddesi içermeyen, 27° Briks ve 4.21 pH değerine sahip taze salça kullanılmıştır. Salça öncelikle 80°C'lik su banyosunda 10 dk bekletilerek pastörize edilmiş ve daha sonra denemelerde kullanılmıştır.

Pastörize edilmiş salçaya, bölüm 2.2.5.1.2'deki gibi aktifleştirilmiş *A. niger* kültürü, $\sim 10^3$ kob/g düzeyinde inoküle edilmiştir. Salçalar 12.5 ± 0.5 g tartılarak 5x8 cm boyutlarındaki ANF'ler içerisine konulmuş ve ambalajın ağız kısmı sızdırmayacak şekilde kapatılmıştır. Kontrol örneği olarak saf LDPE ambalajla paketlenen salçalar kullanılmıştır. Paketlenen salça örnekleri, $4 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 45 gün boyunca depolanmıştır.

Depolamanın 0, 15, 30 ve 45. günlerinde örnekler alınarak mikrobiyolojik analize tabi tutulmuştur.

2.2.5.5.2. Mikrobiyolojik analizler

Analiz günlerinde ambalajlı salça örnekleri, ambalajın ağız kısmı açıldıktan sonra doğrudan 90 mL MRD çözültisi içeren şişeler içerisine aseptik olarak 10 g ağırlığında tartılmıştır. Şişe kapakları kapatılarak 30 s boyunca elle çalkalanmış ve salçanın MRD içerisinde homojen olarak dağılması sağlanmıştır. Daha sonra karışımdan seri dilüsyonlar hazırlanmış ve bu dilüsyonlardan DRBC Agar üzerine yayma yöntemine göre ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriler, 25 °C'de 5 gün bekletilerek gelişen küf kolonileri sayılmıştır. Sonuçlar, logaritmik değerlere çevrilerek kaydedilmiştir [108].

2.2.6. İstatistiksel analiz ve değerlendirme

Bu çalışma 3 aşamadan ibaret olup birinci aşamada nanokillerin, ikinci aşamada aktif madde yüklenmiş nanokillerle üretilen aktif ambalajların karakterizasyonu yapılırken üçüncü aşamada ise aktif ambalajlar ile bazı gıdaların raf ömürlerini etkileyen birtakım parametreler üzerindeki etkinlikleri test edilmiştir. Çalışmanın ilk aşaması 2x2x5 (2 adet nanokil, 2 adet sürfaktan, 5 adet aktif madde) faktöriyel düzenlemede rastgele örnekleme ile 2 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. İkinci aşamada mikrobiyolojik analizler için 6x2 (6 ambalaj materyali, 2 süre), diğer denemeler için 6x1x1 (6 ambalaj materyali, tek ölçüm parametresi - antiradikal aktivite, renk, geçirgenlik -, 1 sıcaklık) faktöriyel düzenlemede 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Üçüncü aşama olan gıda denemeleri 6x4 (6 ambalaj materyali, 4 farklı süre) faktöriyel düzenlemede yine rastgele örnekleme ile 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Analizler sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SAS paket programı (SAS 8.2 versiyonu) kullanılmıştır. Değerlendirilen parametrelere tek ve iki faktör varyans analizleri uygulanarak depolama süresi ve ambalaj çeşidi gibi faktörlerin etkisi belirlenmiştir. Gruplar arası fark, $\alpha = 0.05$ manidarlık düzeyinde Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılarak tespit edilmiştir [116].

3. BÖLÜM

BULGULAR

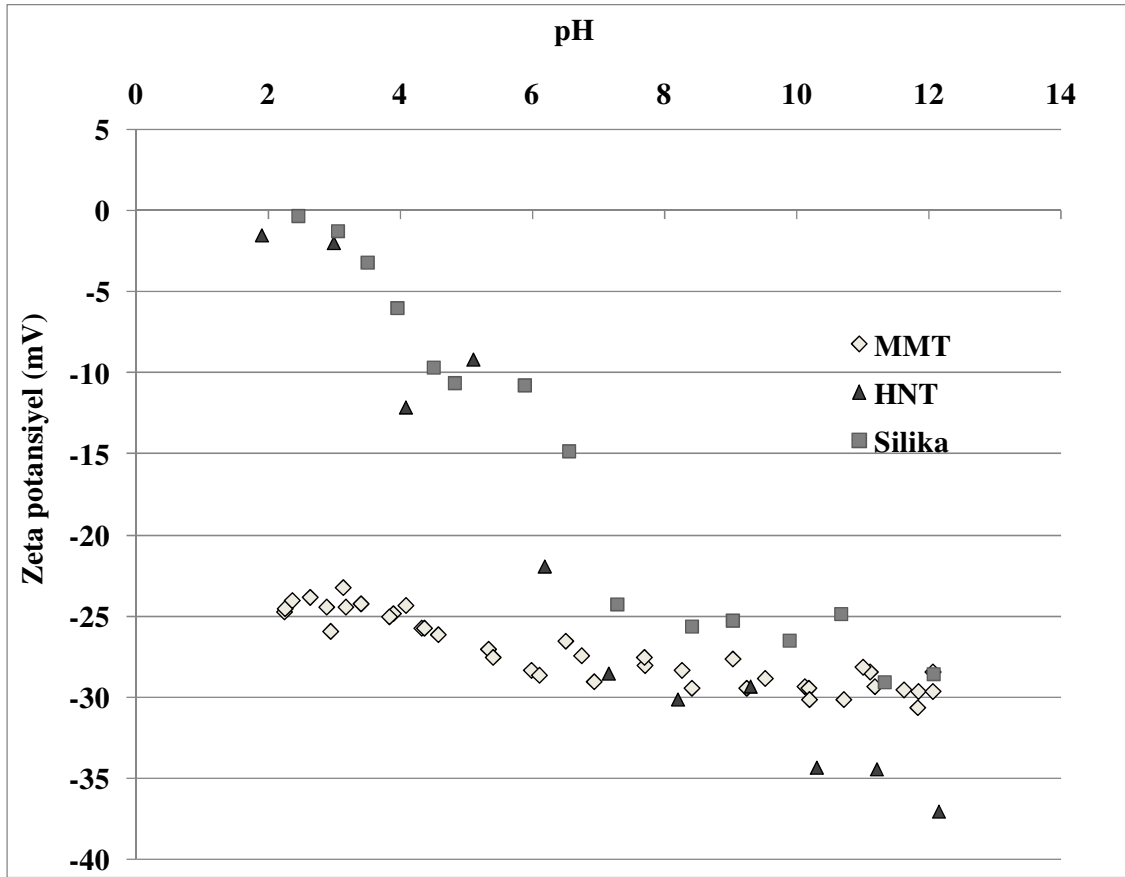
3.1. Nanokillerin karakterizasyonu

Bu araştırmada, ilk olarak ambalaj materyaline dolgu maddesi olarak kullanılacak olan nanokillerin [montmorillonit (MMT) ve halloysit (HNT)] karakterizasyonu yapılmış ve bu amaçla zetapotansiyelleri ve ortalama partikül boyutları test edilmiştir.

3.1.1. Nanokiller ve silikanın yüzey zetapotansiyelleri

Zetapotansiyel, koloidal sistemlerde koloid stabilitesinin bir göstergesidir. Bu araştırmada, nanokillerin su içerisinde koloidal süspansiyonları hazırlanmış ve zetasizer cihazı ile bu süspansiyonların zetapotansiyelleri ölçülmüştür. Böylece killerin yüzey iyonları hakkında bilgi sahibi olunmuştur. Zetapotansiyel değerinin sıfırdan uzaklaşması, kil süspansiyonlarının stabilitelerinin artması ve killerin daha yüksek yüzey iyon değişim potansiyeline sahip olmaları anlamına gelmektedir. Daha yüksek iyon değişim potansiyeli, katyonik özellikteki aktif maddeler ile nanokiller arasında daha iyi bir etkileşim olacağını ve aktif madde-nanokil arasındaki iyon değişimi sayesinde aktif özelliği yüksek bir modifiye kil elde etme olasılığının daha fazla olduğunu göstermektedir.

Bu araştırmada, nanokillerin farklı pH değerlerindeki yüzey zetapotansiyelleri ölçülmüştür. Karşılaştırma yapmak amacıyla, nanokillere ilaveten Silikada da aynı işlemler tekrar edilmiştir. Şekil 8'de, pH'nın bir fonksiyonu olarak MMT, HNT ve Silikanın zetapotansiyel değerleri verilmiştir.



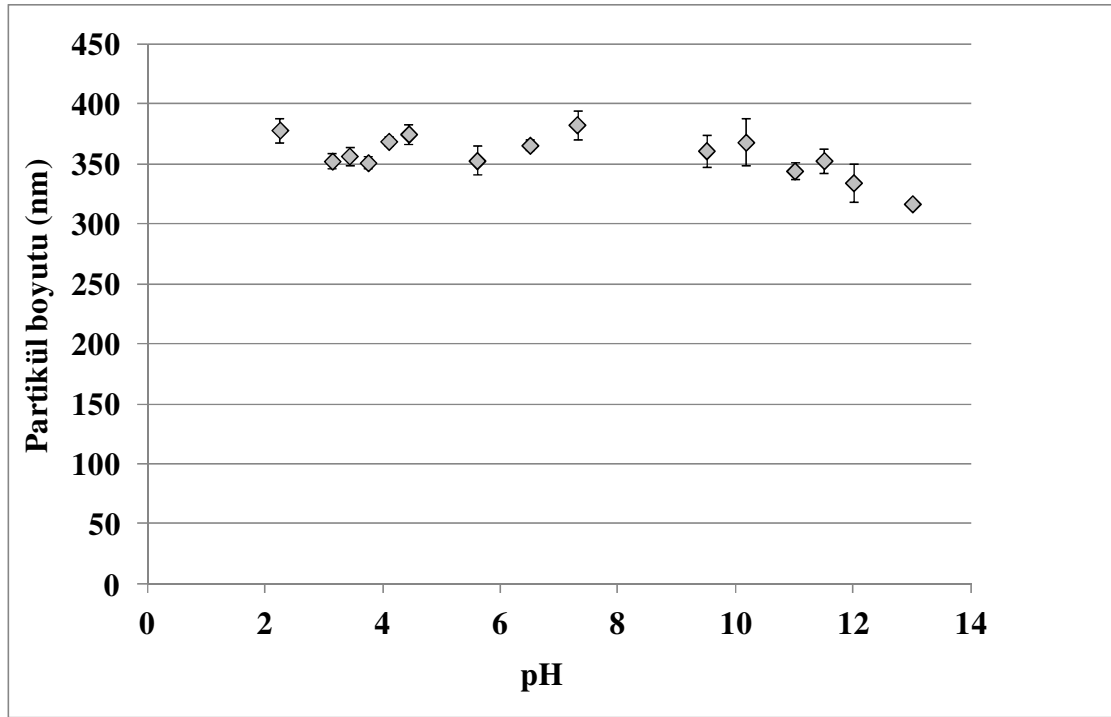
Şekil 8. HNT, MMT ve Silikanın zetapotansiyel değerlerinin pH'ya göre değişimi.

MMT: Montmorillonit; HNT: Halloysit.

Şekil 8'de görüldüğü gibi, HNT, MMT ve silikanın yüzey zetapotansiyelleri, tüm pH değerlerinde negatiftir. pH'ya bağlı olarak en az değişim, MMT'nin zetapotansiyelinde görülmektedir. HNT ve silikada ise pH'daki artışa bağlı olarak zetapotansiyel değerlerinin negatifliğinde artış yaşanmıştır. HNT'nin yüzey zetapotansiyeli -1.49 mV ile -37 mV arasında değişirken, silikaya ait değerlerin -0.30 ile -29.03 arasında olduğu tespit edilmiştir.

3.1.2. Nanokillerde partikül boyutu analizi

Montmorillonitin (MMT) pH'ya bağlı olarak zetapotansiyelindeki değişimin yanı sıra, partikül boyutunun da pH'ya göre dağılımı belirlenmiştir. HNT'nin tubüler yapıda olması ve belirgin bir boyya sahip olmaması nedeniyle partikül boyutu analizi yapılmamıştır. Literatürden bilindiği ve ürün spesifikasyonunda da belirtildiği üzere Silika ile hazırlanan monodispers dağılımların partikül boyutu 30-100 nm arasında değişmektedir. Şekil 9, MMT'nin partikül boyutlarını göstermektedir.



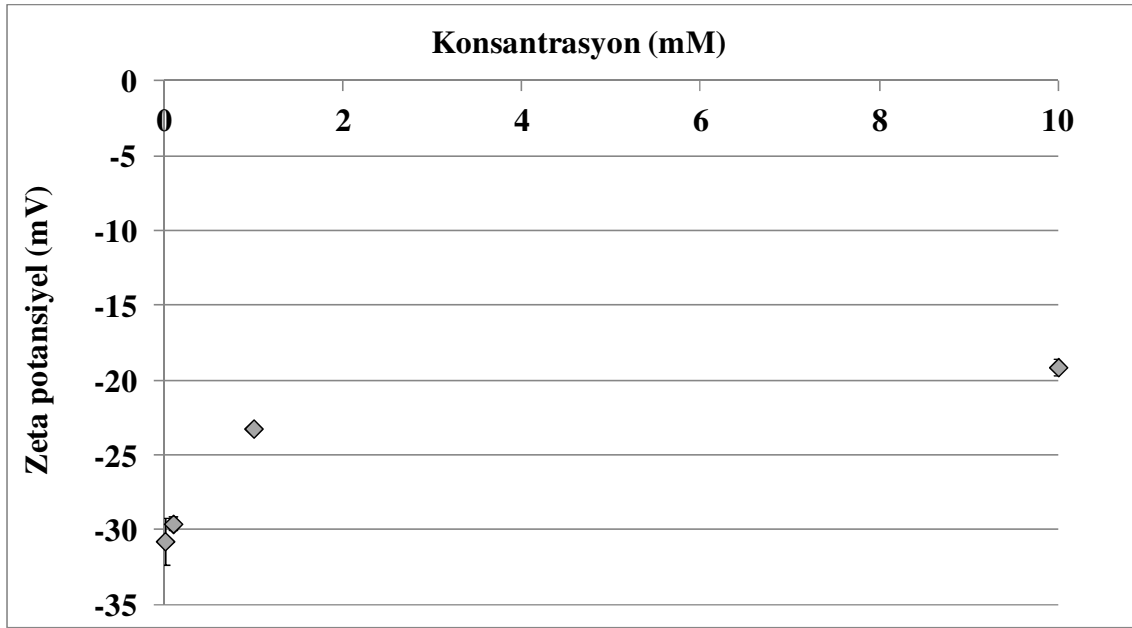
Şekil 9. Montmorillonitin (MMT) partikül boyutunun pH'ya bağlı olarak değişimi.

Şekil 9'da görüldüğü gibi, MMT'nin partikül boyutu, pH 2.25 ile 13.00 arasında 316.77 nm ile 378.25 nm arasında bir değişim göstermektedir. pH'ya bağlı olarak partikül boyutunda pratik olarak önemli bir değişim gözlenmemiş olmakla birlikte en düşük ve en yüksek partikül boyutları sırasıyla en yüksek ve en düşük pH değerlerinde tespit edilmiştir. Ayrıca, pH 1.62'de ise MMT'nin partikül boyutunun 2036 nm gibi oldukça yüksek bir seviyede olduğu belirlenmiştir. pH'nın aşırı düşüşü ile partikül boyutunda ortaya çıkan bu dramatik artışın asıl sebebinin, kil partiküllerinin aglomerasyonu olduğu düşünülmektedir.

3.2. Aktif maddelerin ve sürfaktanın karakterizasyonu

Bu araştırmada, ambalaj materyali üretiminde kullanılacak aktif maddeler, sürfaktan (Tween 80) ve nanokiller arasındaki etkileşimin ortaya konulması amacıyla aktif maddeler ve Tween 80'in nanokillerin zetapotansiyelleri üzerindeki etkileri belirlenmiştir (Şekil 10).

Tween 80'in farklı konsantrasyonlarına bağlı olarak MMT yüzey zetapotansiyelindeki değişim, Şekil 10'da görülmektedir.



Şekil 10. Farklı konsantrasyonlardaki Tween 80'in MMT'nin zetapotansiyeli üzerine etkisi.

Şekil 10'da görüldüğü gibi, Tween 80 konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak MMT zetapotansiyelinde sürekli bir artış olsa da, bu artışın 11mV gibi sınırlı bir düzeyde olması nedeniyle, Tween 80'in de DMSO gibi noniyonik bir yapıda olduğu ortaya çıkmıştır.

Tween 80'in MMT yüzeyindeki etkileşiminin tespitinden sonra, kil veya silika içeren süspansiyon ortamına Tween 80 konsantrasyonu sırasıyla 10mM olarak sabit tutularak farklı konsantrasyonlarda aktif maddeler ilave edilmiş ve ortamın pH ve zetapotansiyellerindeki değişim takip edilmiştir. Tablo 12, aktif maddelerin nanokiller ve silikanın zetapotansiyeli üzerindeki etkisi görülmektedir.

Tablo 12. Farklı konsantrasyonlarda aktif madde ilavesinin silika, MMT ve HNT'nin zetapotansiyeli üzerindeki etkisi.

Aktif madde	Konsantrasyon (mM)	<u>SİLİKA</u>		<u>MMT</u>		<u>HNT</u>	
		pH	Zeta potansiyel (mV)	pH	Zeta potansiyel (mV)	pH	Zeta potansiyel (mV)
-	0					5.60	
THY	0.1	5.31	-4.09±0.32 ^a	6.90	-26.77±0.90 ^d	5.11	-13.70±1.85 ^{bc}
	1	5.01	-3.40±0.94 ^a	5.06	-16.23±1.15 ^c	5.02	-19.03±1.07 ^d
	5	4.90	-2.81±1.69 ^a	4.90	-15.30±0.96 ^c	4.97	-10.83±1.18 ^b
	10	4.90	-4.47±0.72 ^a	5.19	-12.60±0.70 ^b	5.05	-6.08±0.63 ^a
	50	4.96	-4.56±0.53 ^a	5.20	-7.84±0.50 ^a	5.30	-16.07±0.64 ^{cd}
EUG	0.1	4.99	-5.51±0.51 ^{bc}	5.07	-18.33±0.97 ^c	5.09	-18.05±0.63 ^b
	1	4.84	-6.15±0.60 ^c	5.05	-16.90±0.69 ^b	4.99	-16.73±1.53 ^b
	5	4.91	-5.66±0.45 ^b	5.12	-18.93±0.86 ^c	5.01	-16.57±0.81 ^b
	10	4.89	-4.83±0.30 ^b	5.48	-18.30±0.72 ^c	4.90	-17.85±0.92 ^b
	50	4.80	-3.41±0.29 ^a	5.05	-11.90±0.20 ^a	4.88	-9.59±0.86 ^a
CRV	0.1	5.01	-5.04±0.45 ^a	5.30	-20.50±0.42 ^e	5.23	-21.43±0.91 ^e
	1	4.81	-4.96±0.63 ^a	5.00	-15.43±0.35 ^c	5.20	-18.10±0.66 ^d
	5	4.92	-4.59±0.74 ^a	5.20	-17.80±0.70 ^d	4.99	-11.37±1.20 ^c
	10	4.93	-4.52±0.65 ^a	5.15	-12.03±0.42 ^{ab}	4.99	-4.63±0.65 ^a
	50	4.91	-4.44±0.37 ^a	5.16	-11.07±0.06 ^a	4.91	-8.36±1.08 ^b

THY: Timol; EUG: Öjenol; CRV: Karvakrol; MMT: Montmorillonit; HNT: Halloysit;

a-d: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark (P<0.05) olduğunu göstermektedir.

Tablo 12'ye göz atıldığında, fenolik aktif maddelerin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak ortam pH'sında genellikle bir düşüş olduğu görülmektedir. THY ve CRV konsantrasyonundaki artışlar, silikanın zetapotansiyelinde istatistiksel olarak anlamlı (P>0.05) değişikliklere neden olmazken, THY, CRV ve EUG, MMT'nin zetapotansiyelinin negatifliğini azalttığı görülmektedir.

3.3. Aktif kil nanopartiküllerinin karakterizasyonu

3.3.1. Aktif kil nanopartiküllerinin antimikrobiyal aktivitesi

Aktif maddelerin nanokillere yüklenmesi ile aktif kil nanopartikülleri (AKNP) üretilmiş ve bunların sıvı besiyeri içerisinde 2 farklı inokülasyon seviyesindeki ($\sim 10^4$ kob/mL ve $\sim 10^6$ kob/mL) 7 farklı bakteriye karşı etkisi belirlenmiştir.

Tablo 13, 14, 15, 16, 17, 18 ve 19; AKNP'lerin sırasıyla *L. monocytogenes*, *Sal. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *B. cereus*, *Lb. casei* ve *Lb. rhamnosus*'a karşı *in vitro* antibakteriyel aktivitesini göstermektedir. Bu tablolarda yer alan düşük inokulum düzeyi, besiyerine inoküle edilen başlangıç mikroorganizma sayısının ~ 4.00 log kob/mL, yüksek inokulum düzeyi ise ~ 6.00 log kob/mL olduğunu ifade etmektedir.

Tablo 13. AKNP'lerin farklı inokulum seviyelerinde *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal etkisi.

AKNP	<i>L. monocytogenes</i> sayısı (log kob/mL)			
	Düşük İnokulum			
	Süre (saat)			
	0	6	12	24
KTR	4.70±0.11 ^{Da}	7.88±0.00 ^{Ca}	9.60±0.02 ^{Ba}	9.90±0.21 ^{Aa}
MMT	4.70±0.11 ^{Ca}	7.11±0.04 ^{Bb}	9.28±0.00 ^{Ab}	9.31±0.27 ^{Ab}
HNT	4.70±0.11 ^{Da}	7.15±0.06 ^{Cb}	9.11±0.08 ^{Bc}	9.41±0.20 ^{Ab}
CRV-MMT	4.70±0.11 ^{Aa}	<1 ^{Bf}	<1 ^{Bh}	<1 ^{Bf}
CRV-HNT	4.70±0.11 ^{Ca}	3.47±0.10 ^{De}	5.10±0.13 ^{Be}	6.09±0.15 ^{Accd}
EUG-MMT	4.70±0.11 ^{Ba}	3.89±0.10 ^{Cd}	4.42±0.04 ^{Bf}	5.47±0.39 ^{Ae}
EUG-HNT	4.70±0.11 ^{Ca}	4.91±0.12 ^{Cc}	5.26±0.12 ^{Bd}	6.26±0.20 ^{Ac}
THY-MMT	4.70±0.11 ^{Aa}	<1 ^{Bf}	<1 ^{Bh}	<1 ^{Bf}
THY-HNT	4.70±0.11 ^{Ba}	4.09±0.05 ^{Cd}	4.09±0.07 ^{Cg}	5.64±0.10 ^{Ade}
AKNP	Yüksek İnokulum			
	Süre (saat)			
	0	6	12	24
KTR	6.67±0.14 ^{Da}	8.51±0.14 ^{Ca}	9.47±0.15 ^{Ba}	10.42±0.14 ^{Aa}
MMT	6.67±0.14 ^{Da}	7.79±0.04 ^{Cb}	8.74±0.21 ^{Bb}	9.93±0.10 ^{Ab}
HNT	6.67±0.14 ^{Da}	7.97±0.03 ^{Cb}	8.75±0.24 ^{Bb}	9.08±0.15 ^{Ac}
CRV-MMT	6.67±0.14 ^{Aa}	<1 ^{Bh}	<1 ^{Bg}	<1 ^{Bh}
CRV-HNT	6.67±0.14 ^{Aa}	4.35±0.06 ^{Df}	5.45±0.09 ^{Ce}	6.22±0.11 ^{Be}
EUG-MMT	6.67±0.14 ^{Aa}	5.86±0.15 ^{Be}	6.10±0.20 ^{Bd}	4.83±0.03 ^{Cg}
EUG-HNT	6.67±0.14 ^{Da}	7.35±0.07 ^{Cc}	7.75±0.03 ^{Bc}	8.69±0.19 ^{Ad}
THY-MMT	6.67±0.14 ^{Aa}	2.94±0.28 ^{Bg}	2.85±0.17 ^{Bf}	<1 ^{Ch}
THY-HNT	6.67±0.14 ^{Aa}	6.58±0.13 ^{Ad}	5.51±0.19 ^{Be}	5.22±0.17 ^{Bf}

AKNP: Aktif kil nanopartikülü; KTR: Hiç aktif kil nanopartikülü içermeyen kontrol; MMT: Aktif madde yüklenmemiş montmorillonit kili; HNT: Aktif madde yüklenmemiş halloysit kili; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit;

a-h: Aynı sütündeki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir; A-D: Aynı satırdaki birbirinden farklı olan büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir.

Tablo 13'te görüldüğü gibi, kontrol ve uygulamaların başlangıç *L. monocytogenes* yükleri düşük ve yüksek inokülasyon düzeyleri için 4.70 log kob/mL ve 6.67 log kob/mL'dir. Tabloda 24 saatlik inkübasyon sırasında her iki inokülasyon düzeyinde de aktif madde içermeyen kontrol örneklerinde bakteri sayısında istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) artışlar meydana gelmiştir. CRV-MMT veya THY-MMT aktif madde + nanokil kombinasyonlarını içeren ortamlarda bakteri sayıları 24 saat sonunda sayılabilir düzeyin altında bulunmuştur. Diğer örneklerde ise bakteriyel eliminasyon sağlamamış olsalar bile kontrole karşı kıyaslandıklarında istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) seviyede bir bakteriyostatik etki gösterdikleri görülmektedir. EUG-HNT, aktif madde içeren killer içerisinde THY veya CRV yüklenmiş kil örneklerine göre *L. monocytogenes*'e karşı daha düşük antibakteriyel aktiviteye sahip olmuştur (Tablo 13).

Tablo 14. AKNP'lerin farklı inokulum seviyelerinde *Sal. Typhimurium*'a karşı antimikrobiyal etkisi.

AKNP	<i>Sal. Typhimurium</i> sayısı (log kob/mL)			
	Düşük İnokulum			
	Süre (saat)			
	0	6	12	24
<i>KTR</i>	3.93±0.14 ^{Ca}	7.56±0.06 ^{Ba}	10.30±0.00 ^{Aa}	10.44±0.02 ^{Aa}
<i>MMT</i>	3.93±0.14 ^{Da}	7.09±0.05 ^{Cb}	9.65±0.00 ^{Bb}	10.07±0.08 ^{Ab}
<i>HNT</i>	3.93±0.14 ^{Ca}	7.03±0.25 ^{Bb}	9.14±0.21 ^{Ach}	9.28±0.28 ^{Ac}
<i>CRV-MMT</i>	3.93±0.14 ^{Ca}	5.07±0.05 ^{Bc}	5.16±0.03 ^{Bg}	7.29±0.07 ^{Ae}
<i>CRV-HNT</i>	3.93±0.14 ^{Ba}	2.00±0.00 ^{Cf}	4.05±0.21 ^B	5.97±0.10 ^{Ag}
<i>EUG-MMT</i>	3.93±0.14 ^{Ca}	3.42±0.19 ^{De}	5.93±0.06 ^{Bf}	6.76±0.13 ^{Af}
<i>EUG-HNT</i>	3.93±0.14 ^{Da}	5.16±0.03 ^{Cc}	7.94±0.03 ^{Bd}	8.18±0.12 ^{Ad}
<i>THY-MMT</i>	3.93±0.14 ^{Da}	4.15±0.09 ^{Cd}	6.22±0.09 ^{Ae}	6.02±0.02 ^{Bg}
<i>THY-HNT</i>	3.93±0.14 ^{Aa}	<1 ^{Bg}	<1 ^{Bi}	<1 ^{Bh}
AKNP	Yüksek İnokulum			
	Süre (saat)			
	0	6	12	24
<i>KTR</i>	5.72±0.18 ^{Da}	8.98±0.06 ^{Ca}	11.39±0.09 ^{Ba}	12.17±0.12 ^{Aa}
<i>MMT</i>	5.72±0.18 ^{Da}	8.79±0.11 ^{Cb}	10.90±0.19 ^{Bb}	12.27±0.07 ^{Aa}
<i>HNT</i>	5.72±0.18 ^{Da}	8.74±0.00 ^{Cb}	9.66±0.26 ^{Bc}	10.98±0.04 ^{Ab}
<i>CRV-MMT</i>	5.72±0.18 ^{Ca}	4.84±0.05 ^{De}	6.65±0.09 ^{Be}	7.53±0.07 ^{Ad}
<i>CRV-HNT</i>	5.72±0.18 ^{Aa}	2.00±0.00 ^{Dg}	3.25±0.06 ^{Bh}	2.94±0.23 ^{Cg}
<i>EUG-MMT</i>	5.72±0.18 ^{Aa}	4.02±0.07 ^{Cf}	4.23±0.10 ^{Cg}	4.67±0.11 ^{Bf}
<i>EUG-HNT</i>	5.72±0.18 ^{Ba}	7.86±0.06 ^{Ac}	7.81±0.12 ^{Ad}	7.86±0.10 ^{Ac}
<i>THY-MMT</i>	5.72±0.18 ^{Ca}	5.78±0.06 ^{Cd}	6.33±0.10 ^{Be}	7.32±0.02 ^{Ad}
<i>THY-HNT</i>	5.72±0.18 ^{Ba}	4.11±0.14 ^{Cf}	5.95±0.14 ^{ABf}	6.02±0.08 ^{Ae}

AKNP: Aktif kil nanopartikülü; KTR: Hiç aktif kil nanopartikülü içermeyen kontrol; MMT: Aktif madde yüklenmemiş montmorillonit kili; HNT: Aktif madde yüklenmemiş halloysit kili; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit;

a-h: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir; A-D: Aynı satırdaki birbirinden farklı olan büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir.

Tablo 14'te sıvı besiyerlerinin başlangıç *Sal. Typhimurium* inokülasyon yüklerinin 3.93 ve 5.72 log oldukları görülmektedir. Kontrol örneğindeki bakteri sayıları her iki düzeyde de ortalama 6.7 logaritmik birimlik bir artış göstermiştir. Düşük inokülasyon düzeyinde, THY-HNT örneği, bakteri popülasyonunu tüm sayım noktalarında tespit edilebilir sınırların altına indirirken yüksek inokülasyon düzeyinde CRV-HNT ve EUG-MMT örneklerinde 24 saat sonunda bakteri sayılarında istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) azalmaların meydana geldiği belirlenmiştir. Kontrol örnekleri ile kıyaslandıklarında, aktif madde içeren tüm kil örnekleri, 24 saatte bakteri sayılarında istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) azalmalar sağlarken en düşük etkili olan örneğin ise EUG-HNT olduğu saptanmıştır (Tablo 14).

Tablo 15. AKNP'lerin farklı inokulum seviyelerinde *E. coli* O157:H7'ye karşı antimikrobiyal etkisi.

AKNP	<i>E. coli</i> O157:H7 sayısı (log kob/mL)			
	Düşük İnokulum			
	Süre (saat)			
	0	6	12	24
KTR	3.72±0.09 ^{Da}	5.62±0.08 ^{Cc}	7.45±0.06 ^{Ba}	8.43±0.17 ^{Aa}
MMT	3.72±0.09 ^{Da}	5.47±0.06 ^{Cc}	7.22±0.07 ^{Bb}	8.24±0.06 ^{Aab}
HNT	3.72±0.09 ^{Da}	5.91±0.04 ^{Cb}	7.32±0.05 ^{Bab}	8.10±0.05 ^{Ab}
CRV-MMT	3.72±0.09 ^{Aa}	2.70±0.00 ^{Cf}	3.39±0.21 ^{Bf}	3.85±0.00 ^{Ae}
CRV-HNT	3.72±0.09 ^{Ca}	4.67±0.06 ^{Bd}	4.83±0.13 ^{Bde}	5.70±0.01 ^{Ad}
EUG-MMT	3.72±0.09 ^{Ca}	3.91±0.07 ^{Bc}	4.43±0.02 ^{Ae}	4.05±0.19 ^{Be}
EUG-HNT	3.72±0.09 ^{Ca}	6.70±0.04 ^{Ba}	6.81±0.11 ^{Bc}	7.22±0.03 ^{Ac}
THY-MMT	3.72±0.09 ^{Ca}	4.79±0.08 ^{Bd}	5.03±0.26 ^{Bd}	5.80±0.06 ^{Ad}
THY-HNT	3.72±0.09 ^{Ca}	4.00±0.30 ^{Cc}	4.63±0.12 ^{Be}	5.89±0.15 ^{Ad}
AKNP	Yüksek İnokulum			
	Süre (saat)			
	0	6	12	24
KTR	5.92±0.09 ^{Da}	7.76±0.24 ^{Ca}	9.44±0.04 ^{Ba}	9.99±0.15 ^{Aa}
MMT	5.92±0.09 ^{Ca}	6.22±0.23 ^{Cc}	7.43±0.10 ^{Bd}	9.82±0.16 ^{Aa}
HNT	5.92±0.09 ^{Ca}	7.43±0.10 ^{Ba}	8.64±0.07 ^{Ab}	8.83±0.17 ^{Ab}
CRV-MMT	5.92±0.09 ^{Ca}	4.81±0.30 ^{De}	6.44±0.09 ^{Be}	7.49±0.17 ^{Ac}
CRV-HNT	5.92±0.09 ^{Aa}	5.27±0.06 ^{Cd}	5.69±0.15 ^{Bf}	5.98±0.07 ^{Ae}
EUG-MMT	5.92±0.09 ^{Aa}	5.44±0.05 ^{Bd}	4.90±0.11 ^{Cg}	3.72±0.14 ^{Dg}
EUG-HNT	5.92±0.09 ^{Da}	6.92±0.12 ^{Cb}	7.85±0.17 ^{Bc}	8.56±0.10 ^{Ab}
THY-MMT	5.92±0.09 ^{Ca}	6.29±0.08 ^{ABc}	6.17±0.17 ^{BCe}	6.46±0.12 ^{Ad}
THY-HNT	5.92±0.09 ^{Ba}	5.64±0.19 ^{Bd}	6.28±0.07 ^{Ae}	5.19±0.20 ^{Cf}

AKNP: Aktif kil nanopartikülü; KTR: Hiç aktif kil nanopartikülü içermeyen kontrol; MMT: Aktif madde yüklenmemiş montmorillonit kili; HNT: Aktif madde yüklenmemiş halloysit kili; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit;

a-h: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir; A-D: Aynı satırdaki birbirinden farklı olan büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir.

Tablo 15'de görüldüğü üzere, *E. coli* O157:H7 için başlangıç inokülasyon düzeyleri düşük ve yüksek inokulum için sırasıyla 3.72 log kob/mL ve 5.92 log kob/mL olmuştur. Düşük inokülasyon düzeyinde tüm örneklerde bakteri sayıları 24 saat sonunda önemli ($P<0.05$) düzeyde artış göstermiştir. Aktif madde içeren tüm örnekler, düşük ve yüksek inokülasyonda bakteri çoğalmasını yavaşlatmıştır. Düşük inokülasyon düzeyinde, kontrolle kıyaslandıklarında, CRV-MMT ve EUG-MMT örnekleri 24 saat inkübasyon sonunda sırasıyla sağlamış oldukları 4.58 log ve 4.38 log'luk azalmalar sayesinde en etkili AKNP'ler olarak öne çıkmışlardır. Yüksek inokülasyon düzeyi göz önüne alındığında, en etkili AKNP'nin yine EUG-MMT olduğu görülmektedir. EUG-MMT, inkübasyon sonunda başlangıç bakteri sayısını 2.20 log daha düşürmüş ve *E. coli* O157:H7 üzerinde diğer örneklerle kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek bir ($P<0.05$) antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

Tablo 16. AKNP'lerin farklı inokulum seviyelerinde *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal etkisi.

AKNP	<i>S. aureus</i> sayısı (log kob/mL)			
	Düşük İnokulum			
	Süre (saat)			
	0	6	12	24
<i>KTR</i>	4.25±0.07 ^{Da}	8.10±0.08 ^{Ca}	9.63±0.01 ^{Ba}	10.83±0.07 ^{Aa}
<i>MMT</i>	4.25±0.07 ^{Da}	6.83±0.07 ^{Cc}	7.84±0.07 ^{Bc}	9.69±0.14 ^{Ac}
<i>HNT</i>	4.25±0.07 ^{Da}	7.25±0.06 ^{Cb}	9.01±0.28 ^{Bb}	10.17±0.18 ^{Ab}
<i>CRV-MMT</i>	4.25±0.07 ^{Da}	4.68±0.15 ^{Cf}	6.35±0.09 ^{Be}	7.18±0.00 ^{Ae}
<i>CRV-HNT</i>	4.25±0.07 ^{Ca}	3.69±0.11 ^{Dg}	5.10±0.11 ^{Bf}	6.51±0.05 ^{Af}
<i>EUG-MMT</i>	4.25±0.07 ^{Aa}	2.70±0.00 ^{Dh}	3.35±0.23 ^{Cg}	6.12±0.12 ^{Agh}
<i>EUG-HNT</i>	4.25±0.07 ^{Da}	5.90±0.12 ^{Cd}	7.22±0.17 ^{Bd}	7.54±0.16 ^{Ad}
<i>THY-MMT</i>	4.25±0.07 ^{Da}	5.44±0.03 ^{Ce}	6.37±0.08 ^{Ae}	6.03±0.07 ^{Bh}
<i>THY-HNT</i>	4.25±0.07 ^{Aa}	2.85±0.21 ^{Ch}	3.17±0.17 ^{Bg}	4.37±0.09 ^{Ai}
AKNP	Yüksek İnokulum			
	Süre (saat)			
	0	6	12	24
<i>KTR</i>	6.70±0.15 ^{Da}	8.29±0.10 ^{Cc}	10.51±0.09 ^{Ba}	11.74±0.08 ^{Aa}
<i>MMT</i>	6.70±0.15 ^{Da}	9.60±0.03 ^{Ca}	10.52±0.07 ^{Ba}	11.27±0.04 ^{Ab}
<i>HNT</i>	6.70±0.15 ^{Da}	8.59±0.03 ^{Cb}	10.43±0.07 ^{Ba}	11.37±0.32 ^{Ab}
<i>CRV-MMT</i>	6.70±0.15 ^{Ca}	7.22±0.01 ^{Bd}	7.72±0.02 ^{Ac}	7.75±0.02 ^{Ad}
<i>CRV-HNT</i>	6.70±0.15 ^{Aa}	5.62±0.05 ^{Cf}	6.38±0.07 ^{Bd}	6.35±0.05 ^{Be}
<i>EUG-MMT</i>	6.70±0.15 ^{Ba}	5.58±0.16 ^{Cf}	7.65±0.05 ^{Ac}	7.76±0.03 ^{Ad}
<i>EUG-HNT</i>	6.70±0.15 ^{Ca}	6.88±0.10 ^{Ce}	8.07±0.03 ^{Bb}	8.69±0.13 ^{Ac}
<i>THY-MMT</i>	6.70±0.15 ^{Aa}	4.20±0.04 ^{Bh}	4.29±0.10 ^{Be}	5.25±0.07 ^{Cf}
<i>THY-HNT</i>	6.70±0.15 ^{Aa}	4.60±0.22 ^{Bg}	3.87±0.14 ^{Cf}	2.70±0.00 ^{Dg}

AKNP: Aktif kil nanopartikülü; KTR: Hiç aktif kil nanopartikülü içermeyen kontrol; MMT: Aktif madde yüklenmemiş montmorillonit kili; HNT: Aktif madde yüklenmemiş halloysit kili; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit;

a-h: Aynı sütündeki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir; A-D: Aynı satırdaki birbirinden farklı olan büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir.

Tablo 16'dan da görülebildiği gibi, *S. aureus* için başlangıç düşük ve yüksek inokülasyon düzeyleri sırasıyla 4.25 log kob/mL ve 6.70 log kob/mL'dir. Tabloda, kil içeren ve içermeyen kontrol örneklerinde 24 saatlik inkübasyon ile bakteri sayısında 5-6 log artışların olduğu görülmektedir. THY-HNT, *S. aureus*'a karşı her iki inokülasyon seviyesinde de en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi gösteren örnektir. EUG-HNT ise sağlamış olduğu bakteriyostatik etkiye rağmen yine de en zayıf antimikrobiyal aktivite gösteren AKNP grubu olarak saptanmıştır.

Tablo 17. AKNP'lerin farklı inokulum seviyelerinde *B. cereus*'a karşı antimikrobiyal etkisi.

AKNP	<i>B. cereus</i> sayısı (log10 kob/mL)			
	Düşük İnokulum			
	Süre (saat)			
	0	6	12	24
KTR	4.00±0.00 ^{Da}	6.70±0.08 ^{Ca}	7.11±0.04 ^{Ba}	8.58±0.17 ^{Aa}
MMT	4.00±0.00 ^{Da}	6.06±0.11 ^{Cc}	6.70±0.09 ^{Bb}	7.93±0.07 ^{Ab}
HNT	4.00±0.00 ^{Da}	6.29±0.21 ^{Cb}	6.89±0.06 ^{Bab}	7.95±0.08 ^{Ab}
CRV-MMT	4.00±0.00 ^{Aa}	<1 ^{Be}	<1 ^{Bc}	<1 ^{Be}
CRV-HNT	4.00±0.00 ^{Aa}	<1 ^{Ce}	3.74±0.08 ^{Bc}	3.97±0.03 ^{Ad}
EUG-MMT	4.00±0.00 ^{Aa}	<1 ^{Be}	<1 ^{Bc}	<1 ^{Be}
EUG-HNT	4.00±0.00 ^{Ba}	2.70±0.00 ^{De}	3.70±0.09 ^{Cc}	4.89±0.11 ^{Ac}
THY-MMT	4.00±0.00 ^{Aa}	<1 ^{Be}	<1 ^{Bc}	<1 ^{Be}
THY-HNT	4.00±0.00 ^{Aa}	<1 ^{De}	3.02±0.29 ^{Cd}	3.80±0.18 ^{ABd}
AKNP	Yüksek İnokulum			
	Süre (saat)			
	0	6	12	24
KTR	5.80±0.17 ^{Da}	6.44±0.13 ^{Ca}	7.00±0.00 ^{Ba}	8.78±0.05 ^{Aa}
MMT	5.80±0.17 ^{Da}	6.80±0.18 ^{Cab}	6.94±0.28 ^{Ba}	7.33±0.44 ^{Ab}
HNT	5.80±0.17 ^{Da}	6.84±0.05 ^{Ca}	7.22±0.17 ^{Ba}	7.67±0.10 ^{Ab}
CRV-MMT	5.80±0.17 ^{Aa}	3.87±0.13 ^{Cf}	5.03±0.10 ^{Bc}	5.95±0.06 ^{Ac}
CRV-HNT	5.80±0.17 ^{Aa}	5.74±0.24 ^{Ac}	4.70±0.22 ^{Bc}	4.81±0.05 ^{Bd}
EUG-MMT	5.80±0.17 ^{Aa}	4.79±0.10 ^{Be}	3.51±0.22 ^{Ce}	<1 ^{Dg}
EUG-HNT	5.80±0.17 ^{Ba}	5.24±0.07 ^{Cd}	5.96±0.04 ^{Bb}	6.24±0.07 ^{Ac}
THY-MMT	5.80±0.17 ^{Aa}	2.86±0.28 ^{Bg}	2.70±0.00 ^{Bf}	2.70±0.00 ^{Bf}
THY-HNT	5.80±0.17 ^{Aa}	3.52±0.10 ^{Cf}	3.95±0.03 ^{Bd}	4.00±0.30 ^{Be}

AKNP: Aktif kil nanopartikülü; KTR: Hiç aktif kil nanopartikülü içermeyen kontrol; MMT: Aktif madde yüklenmemiş montmorillonit kili; HNT: Aktif madde yüklenmemiş halloysit kili; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit;

a-h: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir; A-D: Aynı satırdaki birbirinden farklı olan büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir.

Tablo 17'de, örneklerin başlangıç *B. cereus* popülasyonlarının düşük ve yüksek inokülasyon seviyesinde sırasıyla 4.00 log kob/mL ve 5.80 log kob/mL olduğu görülmektedir. Kontrol örneklerinde 24 saat içinde istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) artışlar meydana gelmiş ve bu sayılar sırasıyla 8.58 ve 8.78 log'a yükselmiştir. Düşük inokülasyon seviyesinde CRV-MMT, EUG-MMT ve THY-MMT'nin bakterisidal etkisinin olduğu saptanırken tüm ölçüm noktalarında bakteri sayısı tespit edilebilir sınırların altında bulunmuştur. Denemede 6. saatte THY-HNT ve CRV-HNT içeren örneklerde bakteri tespit edilemezken 12 ve 24. saatlerde bakteri gelişiminin olduğu belirlenmiştir. Yüksek inokülasyon seviyesinde ise en yüksek antimikrobiyal etki yine EUG-MMT tarafından sergilenmiştir. EUG-MMT'yi THY-MMT takip etmiş olup EUG-HNT ve CRV-MMT hariç diğer AKNP'ler bakteri sayısını 24 saat sonunda başlangıç popülasyonunun bile daha altında tutmayı başarmıştır.

Tablo 18. AKNP'lerin farklı inokulum seviyelerinde *Lb. casei*'ye karşı antimikrobiyal etkisi.

AKNP	<i>Lb. casei</i> sayısı (log kob/mL)			
	Düşük İnokulum			
	Süre (saat)			
	0	6	12	24
KTR	4.56±0.03 ^{Da}	6.10±0.05 ^{Cb}	6.94±0.07 ^{Bb}	9.01±0.17 ^{Ab}
MMT	4.56±0.03 ^{Da}	6.34±0.08 ^{Ca}	7.79±0.08 ^{Ba}	10.40±0.00 ^{Aa}
HNT	4.56±0.03 ^{Da}	6.17±0.04 ^{Cab}	7.73±0.14 ^{Ba}	8.71±0.13 ^{Ac}
CRV-MMT	4.56±0.03 ^{Aa}	4.70±0.08 ^{Ad}	4.17±0.21 ^{Bd}	3.35±0.18 ^{Cf}
CRV-HNT	4.56±0.03 ^{Aa}	4.59±0.13 ^{Ade}	3.78±0.06 ^{Be}	<1 ^{Ch}
EUG-MMT	4.56±0.03 ^{Aa}	4.47±0.06 ^{Aef}	3.09±0.10 ^{Bg}	<1 ^{Ch}
EUG-HNT	4.56±0.03 ^{Da}	6.26±0.10 ^{Cab}	7.60±0.05 ^{Ba}	8.43±0.09 ^{Ad}
THY-MMT	4.56±0.03 ^{Ba}	5.80±0.17 ^{Ac}	5.59±0.17 ^{Ac}	4.09±0.08 ^{Ce}
THY-HNT	4.56±0.03 ^{Aa}	4.30±0.05 ^{Bf}	3.42±0.04 ^{Cf}	2.70±0.00 ^{Dg}
AKNP	Yüksek İnokulum			
	Süre (saat)			
	0	6	12	24
KTR	6.64±0.10 ^{Da}	8.18±0.07 ^{Cb}	9.07±0.30 ^{Bb}	10.71±0.17 ^{Ab}
MMT	6.64±0.10 ^{Da}	8.81±0.09 ^{Ca}	10.33±0.05 ^{Ba}	11.40±0.00 ^{Aa}
HNT	6.64±0.10 ^{Da}	7.85±0.09 ^{Cc}	8.99±0.08 ^{Bbc}	11.23±0.05 ^{Aa}
CRV-MMT	6.64±0.10 ^{Ba}	7.06±0.08 ^{Ae}	7.10±0.04 ^{Ad}	7.08±0.10 ^{Ad}
CRV-HNT	6.64±0.10 ^{Ba}	7.33±0.07 ^{Ad}	7.16±0.11 ^{Ad}	6.58±0.04 ^{Be}
EUG-MMT	6.64±0.10 ^{Aa}	6.34±0.03 ^{Bf}	5.89±0.07 ^{Cf}	5.67±0.12 ^{Df}
EUG-HNT	6.64±0.10 ^{Da}	7.82±0.15 ^{Cc}	8.68±0.13 ^{Ac}	8.28±0.03 ^{Bc}
THY-MMT	6.64±0.10 ^{Ba}	7.24±0.07 ^{Ade}	6.68±0.13 ^{Be}	4.71±0.09 ^{Cg}
THY-HNT	6.64±0.10 ^{Aa}	6.31±0.03 ^{Bf}	5.27±0.20 ^{Cg}	4.77±0.16 ^{Dg}

AKNP: Aktif kil nanopartikülü; KTR: Hiç aktif kil nanopartikülü içermeyen kontrol; MMT: Aktif madde yüklenmemiş montmorillonit kili; HNT: Aktif madde yüklenmemiş halloysit kili; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit;

a-h: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir; A-D: Aynı satırdaki birbirinden farklı olan büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir.

Tablo 18'den de anlaşılabildiği gibi, ortamların başlangıç *Lb. casei* sayıları düşük ve yüksek inokülasyon düzeyleri için ortalama 4.56 log kob/mL ve 6.64 log kob/mL'dir. Kil içeren ya da hiç kil içermeyen kontrol örneklerinde, bakteri sayılarında yaklaşık 4-5 log seviyelerinde artışlar meydana gelmiştir. Düşük inokülasyon seviyesinde EUG-HNT hariç diğer tüm AKNP'ler, bakteri sayısını başlangıç düzeyinin önemli derecede ($P<0.05$) altında tutmayı başarmıştır. CRV-HNT ve EUG-MMT 24 saatlik inkübasyon sonunda *Lb. casei* üzerinde bakterisidal etki göstermiştir. Yüksek inokülasyon düzeyinde ise yine tüm AKNP'lerin *Lb. casei* üzerinde antibakteriyel etkisinin olduğu görülürken en yüksek etkililerin bakteri sayısını başlangıç popülasyonunun altında tutan EUG-MMT, THY-MMT ve THY-HNT grubu örnekleri olduğu belirlenmiştir.

Tablo 19. AKNP'lerin farklı inokulum seviyelerinde *Lb. rhamnosus*'a karşı antimikrobiyal etkisi.

<i>Lb. rhamnosus</i> sayısı (log kob/mL)				
Düşük İnokulum				
AKNP	Süre (saat)			
	0	6	12	24
KTR	4.40±0.09 ^{Da}	8.12±0.14 ^{Ca}	9.54±0.10 ^{Ba}	10.11±0.09 ^{Aa}
MMT	4.40±0.09 ^{Da}	8.10±0.09 ^{Ca}	9.16±0.09 ^{Bb}	10.28±0.09 ^{Aa}
HNT	4.40±0.09 ^{Da}	7.87±0.14 ^{Ca}	9.37±0.07 ^{Bab}	10.20±0.02 ^{Aa}
CRV-MMT	4.40±0.09 ^{Ba}	5.42±0.22 ^{Ac}	3.85±0.14 ^{Ce}	3.00±0.00 ^{De}
CRV-HNT	4.40±0.09 ^{Ba}	4.93±0.08 ^{Ade}	4.32±0.04 ^{Bd}	3.63±0.11 ^{Cc}
EUG-MMT	4.40±0.09 ^{Ba}	5.22±0.05 ^{AcD}	4.39±0.07 ^{Bd}	3.10±0.32 ^{Cde}
EUG-HNT	4.40±0.09 ^{Ca}	7.14±0.08 ^{Bb}	8.78±0.08 ^{Ac}	8.76±0.04 ^{Ab}
THY-MMT	4.40±0.09 ^{Ba}	5.19±0.10 ^{AcD}	4.00±0.14 ^{Ce}	2.85±0.17 ^{De}
THY-HNT	4.40±0.09 ^{Ba}	4.91±0.14 ^{Ae}	4.49±0.05 ^{Bd}	3.40±0.16 ^{Ccd}
Yüksek İnokulum				
AKNP	Süre (saat)			
	0	6	12	24
KTR	6.19±0.07 ^{Da}	9.31±0.07 ^{Ca}	9.56±0.19 ^{Ba}	10.63±0.16 ^{Aa}
MMT	6.19±0.07 ^{Da}	9.17±0.02 ^{Ca}	9.68±0.49 ^{Ba}	10.32±0.03 ^{Ab}
HNT	6.19±0.07 ^{Da}	9.13±0.04 ^{Ca}	9.28±0.10 ^{Ba}	9.90±0.06 ^{Ac}
CRV-MMT	6.19±0.07 ^{Ba}	7.00±0.11 ^{Ad}	6.12±0.09 ^B	6.06±0.04 ^{Be}
CRV-HNT	6.19±0.07 ^{Ca}	7.73±0.10 ^{Ac}	6.86±0.05 ^{Bb}	6.05±0.06 ^{Ce}
EUG-MMT	6.19±0.07 ^{Ca}	7.06±0.08 ^{Ad}	6.37±0.04 ^B	4.90±0.04 ^{Dg}
EUG-HNT	6.19±0.07 ^{Ca}	8.85±0.04 ^{Bb}	9.32±0.31 ^{Aa}	9.34±0.09 ^{Ad}
THY-MMT	6.19±0.07 ^{Ca}	6.97±0.07 ^{Ad}	6.74±0.10 ^{Bbc}	6.04±0.12 ^{Ce}
THY-HNT	6.19±0.07 ^{Ca}	7.00±0.09 ^{Ad}	6.51±0.02 ^{Bbcd}	5.32±0.04 ^{Df}

AKNP: Aktif kil nanopartikülü; KTR: Hiç aktif kil nanopartikülü içermeyen kontrol; MMT: Aktif madde yüklenmemiş montmorillonit kili; HNT: Aktif madde yüklenmemiş halloysit kili; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit;

a-h: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir; A-D: Aynı satırdaki birbirinden farklı olan büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir.

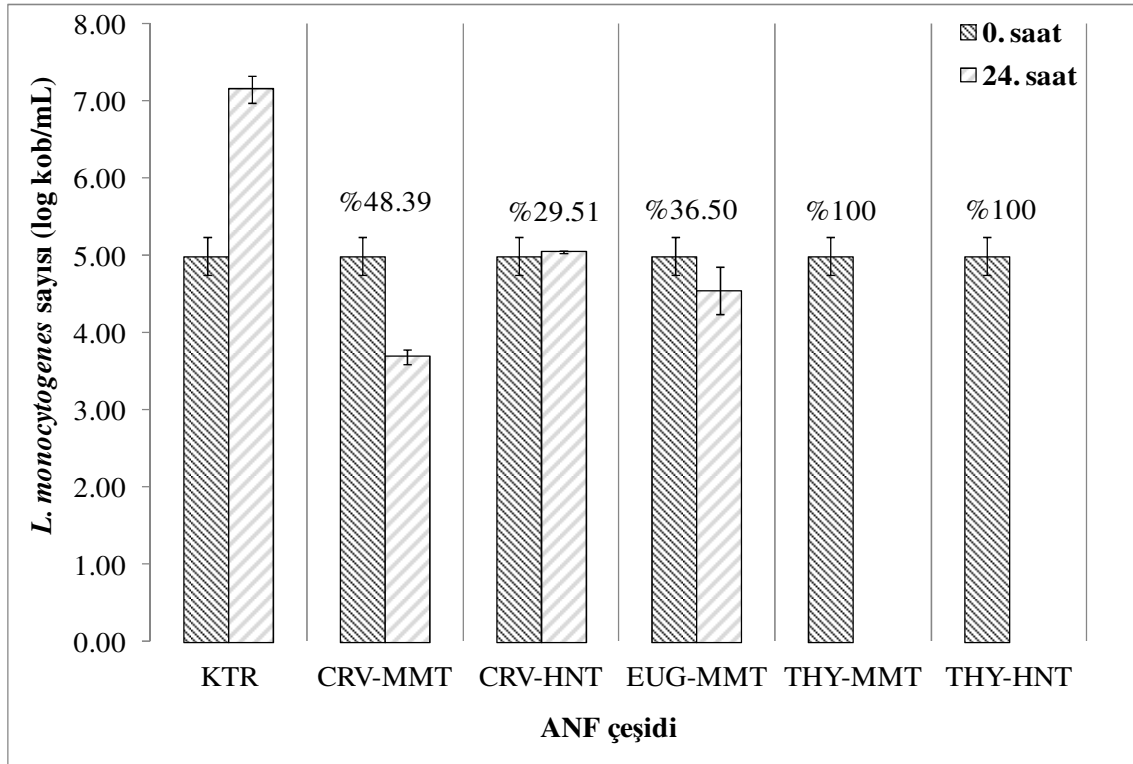
Tablo 19'dan da görülebildiği gibi, *Lb. rhamnosus* için düşük ve yüksek inokülasyon düzeyleri sırasıyla 4.40 log kob/mL ve 6.19 log kob/mL'dir. Kontrol örneklerinin yanı sıra EUG-HNT içeren örneklerdeki bakteri sayılarının her iki inokülasyon düzeyinde de istatistiksel olarak önemli derecelerde ($P<0.05$) artış gösterdiği belirlenmiştir. Düşük inokülasyon seviyesinde EUG-HNT hariç diğer tüm örnekler bakteri sayısını 4.00 log'un altında tutmuştur; ancak hiçbir örnek bakterisidal etki göstermemiştir. Yüksek inokülasyon düzeyinde de EUG-HNT hariç tüm örnekler bakteri gelişimini önemli derecede sınırlamıştır. EUG-MMT ve THY-HNT ise 24 saatte bakteri sayılarında sırasıyla 1.29 ve 0.87 log azalmalar sağlamıştır.

3.4. Aktif nanokompozit filmlerin karakterizasyonu

Bu araştırmada, üretilen AKNP'ler, LDPE ambalaj polimeri ile %5 oranında karıştırılarak çift vidalı ekstrüder yardımıyla aktif nanokompozit filmler (ANF) üretilmiştir. Üretilen ANF'lerin karakterizasyonlarının yapılması amacıyla antimikrobiyal ve radikal yakalama aktiviteleri, kalan aktif madde miktarları, mekanik ve morfolojik özellikleri, renk ve opaklık değerleri, film kalınlıkları ve gaz geçirgenlikleri test edilmiş, TGA (termogravimetrik analiz), DSC (Differential Scanning Calorimetry - Diferansiyel Taramalı Kalorimetre) ve FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy - Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) analizleri yapılmıştır.

3.4.1. ANF'lerin antimikrobiyal aktivitesi

Bölüm 3.2'de anlatıldığı gibi AKNP'lerin 7 farklı bakteriye karşı antimikrobiyal aktiviteleri tespit edilmiş, etkisi düşük bulunan partiküller elenerek geriye kalanlar ANF üretiminde kullanılmıştır. Buna göre şu ANF'ler üretilmiştir: karvakrol yüklenmiş nanokil içeren ANF'ler (CRV-MMT ve CRV-HNT); timol yüklenmiş ANF'ler (THY-MMT ve THY-HNT) ve öjenol yüklenmiş MMT içeren ANF'ler (EUG-MMT). İlk olarak, Şekil 11'de, elde edilen ANF'lerin tampon çözelti içerisinde 24 saat boyunca inkübe edilen *L. monocytogenes* üzerindeki antimikrobiyal etkisi verilmiştir.

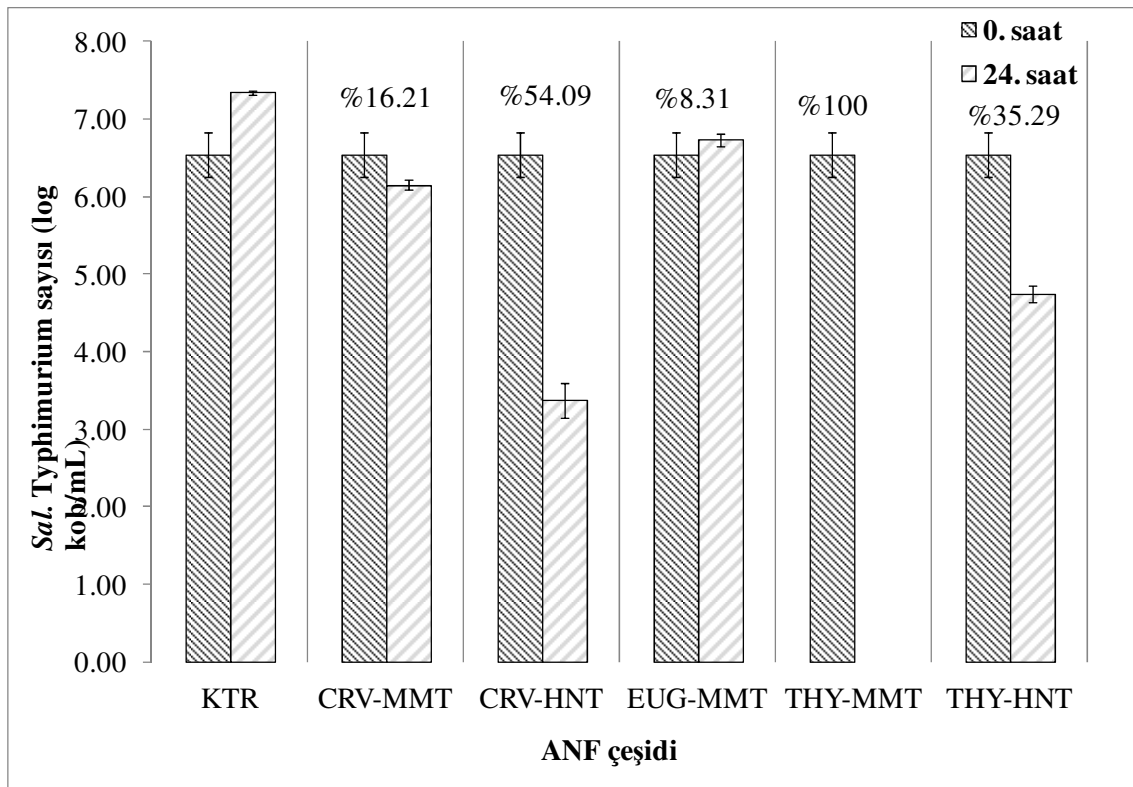


Şekil 11. Aktif nanokompozit filmlerin *Listeria monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal aktiviteleri.

KTR: Hiçbir aktif madde veya nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş haloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş haloysit; Çubukların üzerindeki sayılar, örneklerin sağladığı %gelişim inhibisyon düzeyini (GİD) ifade etmektedir.

Şekil 11'de görüldüğü gibi, THY yüklenmiş killere hazırlanan ANF'lerin net olarak *L. monocytogenes*'e karşı etkili oldukları ve 24 saat sonunda bakteri popülasyonunu sayılamayacak düzeylere indirdikleri ve %100 inhibisyon sağladıkları görülmektedir. Buna karşılık ambalaj içermeyen kontrol örneğinde istatistiksel olarak önemli derecede ($P < 0.05$) artış görülürken, CRV-HNT ve EUG-MMT içeren örneklerdeki değişimler önemsiz ($P > 0.05$) bulunmuş, ancak yine de kontrole göre sırasıyla %29.51 ve %36.50 inhibisyon sağladıkları belirlenmiştir (Şekil 11).

ANF'lerin *Sal. Typhimurium*'a karşı antimikrobiyal aktiviteleri, Şekil 12'de görülmektedir.

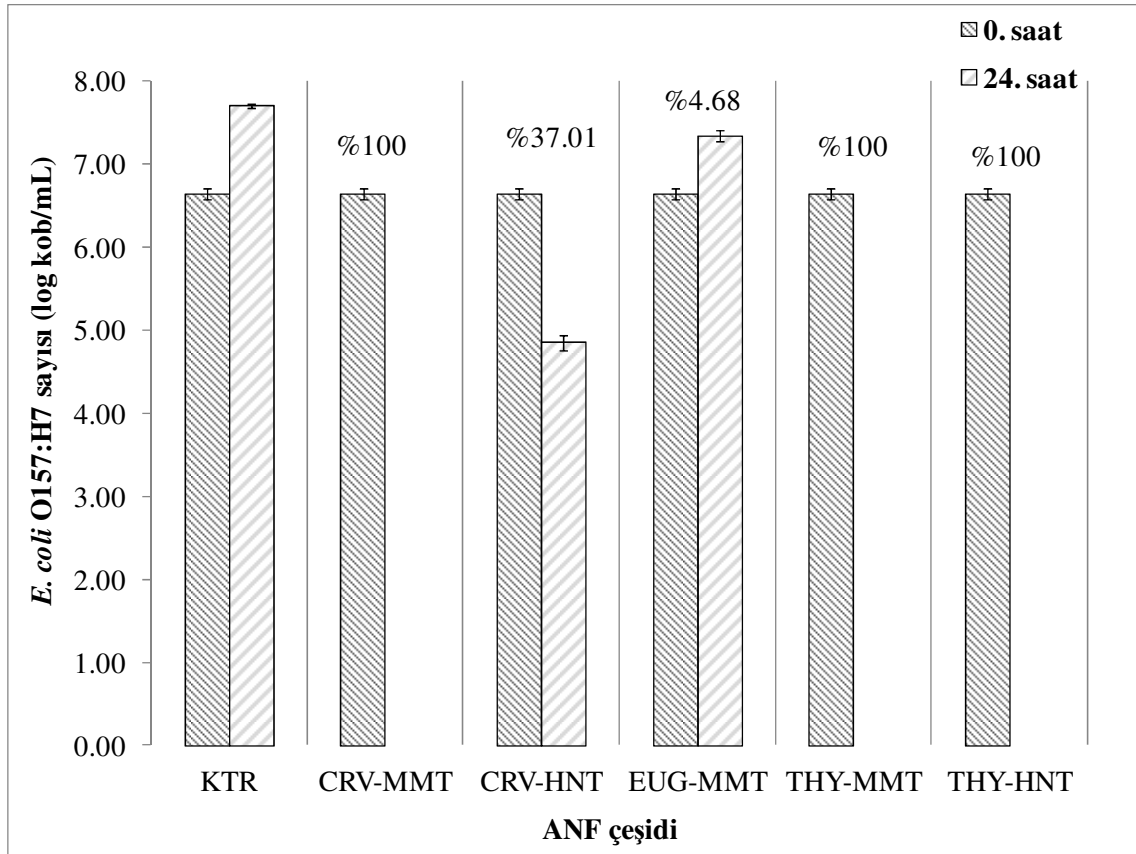


Şekil 12. Aktif nanokompozit filmlerin *Salmonella Typhimurium*'a karşı antimikrobiyal aktiviteleri.

KTR: Hiçbir aktif madde veya nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; Çubukların üzerindeki sayılar, örneklerin sağladığı %gelişim inhibisyon düzeyini (GİD) ifade etmektedir.

Şekil 12'de başlangıç *Sal. Typhimurium* inokülasyon yükünün 6.54 log kob/mL olduğu görülmektedir. Kontrol örneğindeki bakteri sayısı ise 24 saat sonunda 7.34 log kob/mL olarak tespit edilmiştir. ANF'ler içinde *Sal. Typhimurium*'a karşı en etkili olanı, bakteri sayısını tespit edilemeyen değerlere kadar indirgeyen (%100 GİD) THY-MMT ambalaj filmidir. Bunun dışında etkili diğer ANF'ler ise aynı saatteki kontrole göre *Sal. Typhimurium* sayısında sırasıyla 3.97 log (%54.09 GİD) ve 2.59 log (%35.29 GİD) azalma sağlayan CRV-HNT ve THY-HNT örnekleridir (Şekil 12).

Araştırmada üretilen ANF'lerin *E. coli* O157:H7'ye karşı sergilemiş oldukları antimikrobiyal aktiviteleri, Şekil 13'de görülmektedir.

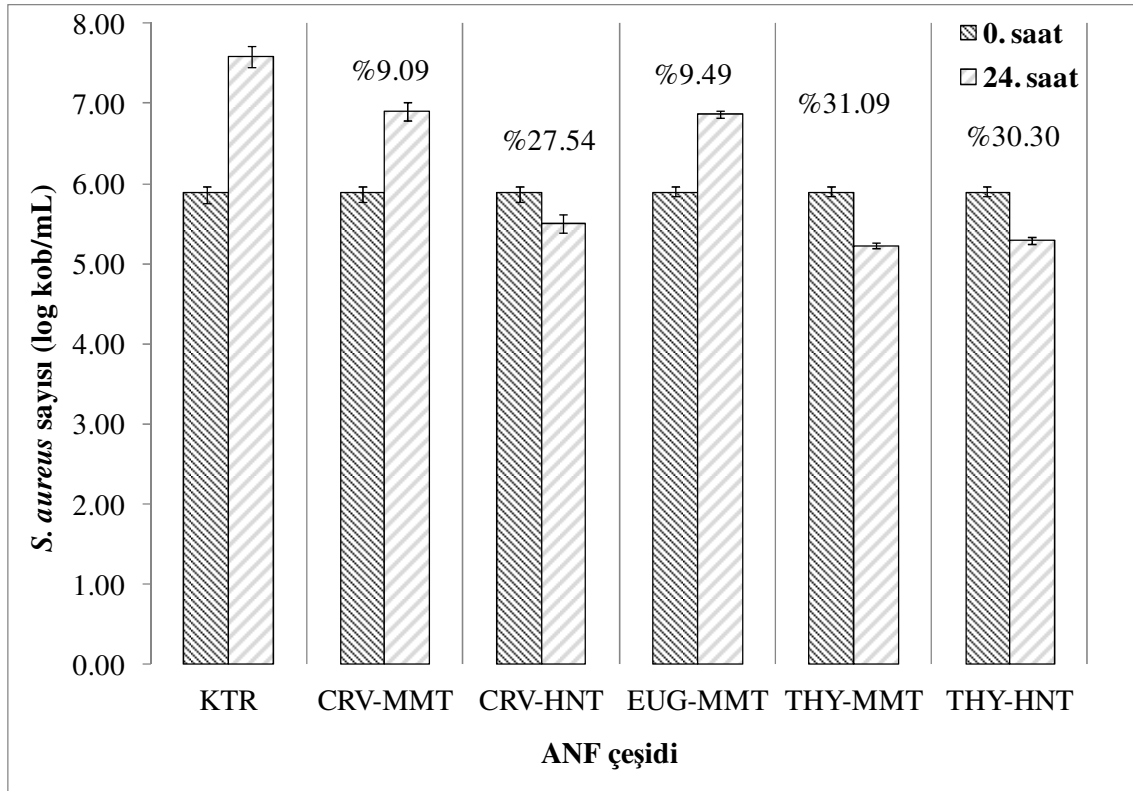


Şekil 13. Aktif nanokompozit filmlerin *Escherichia coli* O157:H7'ye karşı antimikrobiyal aktiviteleri.

KTR: Hiçbir aktif madde veya nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; Çubukların üzerindeki sayılar, örneklerin sağladığı %gelişim inhibisyon düzeyini (GİD) ifade etmektedir.

Şekil 13'ten de görülebildiği gibi, başlangıç *E. coli* O157:H7 yükü, 6.64 log kob/mL iken 24 saatlik inkübasyon sonrasında sayılamayacak düzeye indirgeyen ve %100'lik GİD sergileyen ANF örnekleri CRV-MMT, THY-MMT ve THY-HNT olmuştur. Kontrol örneğinin yanı sıra EUG-MMT filmi içeren örneğin bakteriyel yükünde istatistiksel olarak önemli düzeyde ($P < 0.05$) bir artış meydana gelmiş ve bu örnekte bakteri sayısı 7.34 log kob/mL'ye yükselmiştir.

Bu araştırmada kullanılan ANF'lerin *S. aureus*'a karşı sergilemiş oldukları antimikrobiyal aktiviteleri, Şekil 14'de verilmiştir.

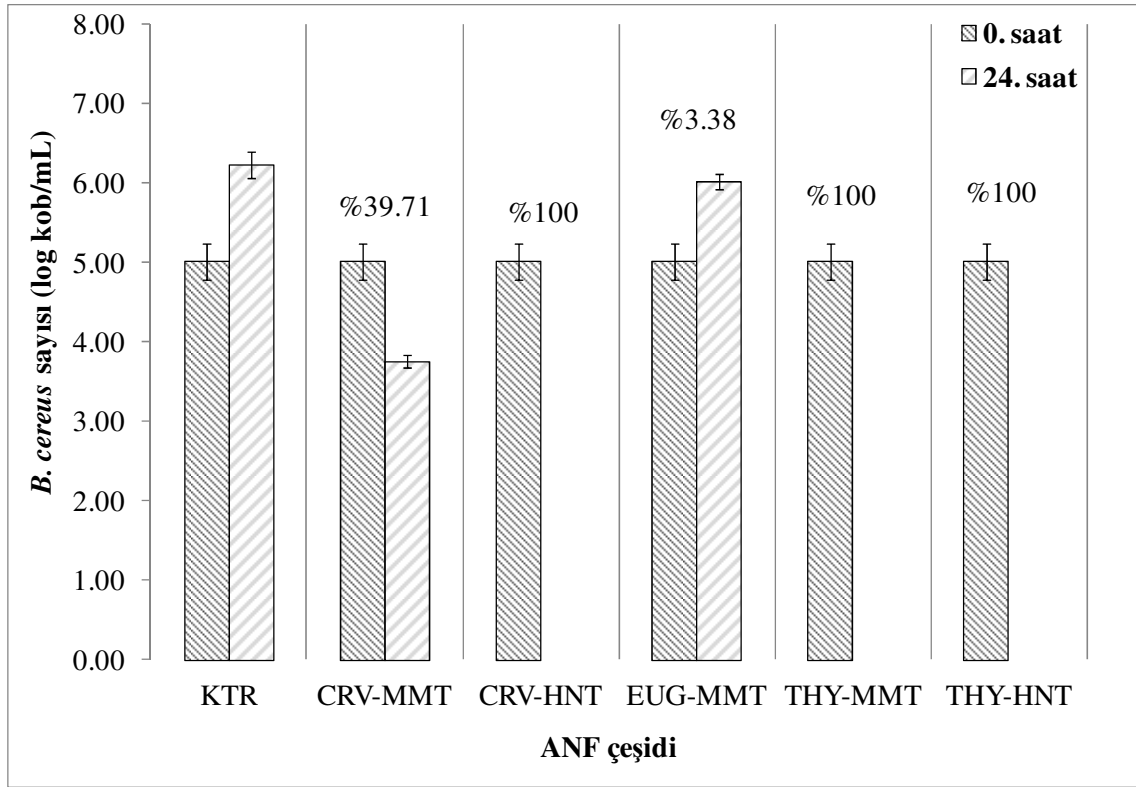


Şekil 14. Aktif nanokompozit filmlerin *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyal aktiviteleri.

KTR: Hiçbir aktif madde veya nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; Çubukların üzerindeki sayılar, örneklerin sağladığı %gelişim inhibisyon düzeyini (GİD) ifade etmektedir.

Şekil 14'te, ortama ilave edilen ilk *S. aureus* yükünün 5.89 log kob/ml olduğu ve kontrol grubu yanında EUG-MMT ve CRV-MMT örneklerinin de herhangi bir bakteriyel inhibisyona yol açmadıkları görülmektedir. *S. aureus* sayısında en büyük ($P < 0.05$) azalma, THY-HNT ve THY-MMT içeren örneklerde (sırasıyla %30.30 ve %31.09 GİD) ortaya çıkmış ve bu örneklerin inkübasyonu sonunda bakteri popülasyonunun sırasıyla 5.29 ve 5.23 log kob/mL'ye kadar düştüğü tespit edilmiştir.

Bu araştırmada üretilen ANF'lerin *B. cereus*'a karşı sergilemiş oldukları antimikrobiyal aktiviteleri ise Şekil 15'de verilmiştir.

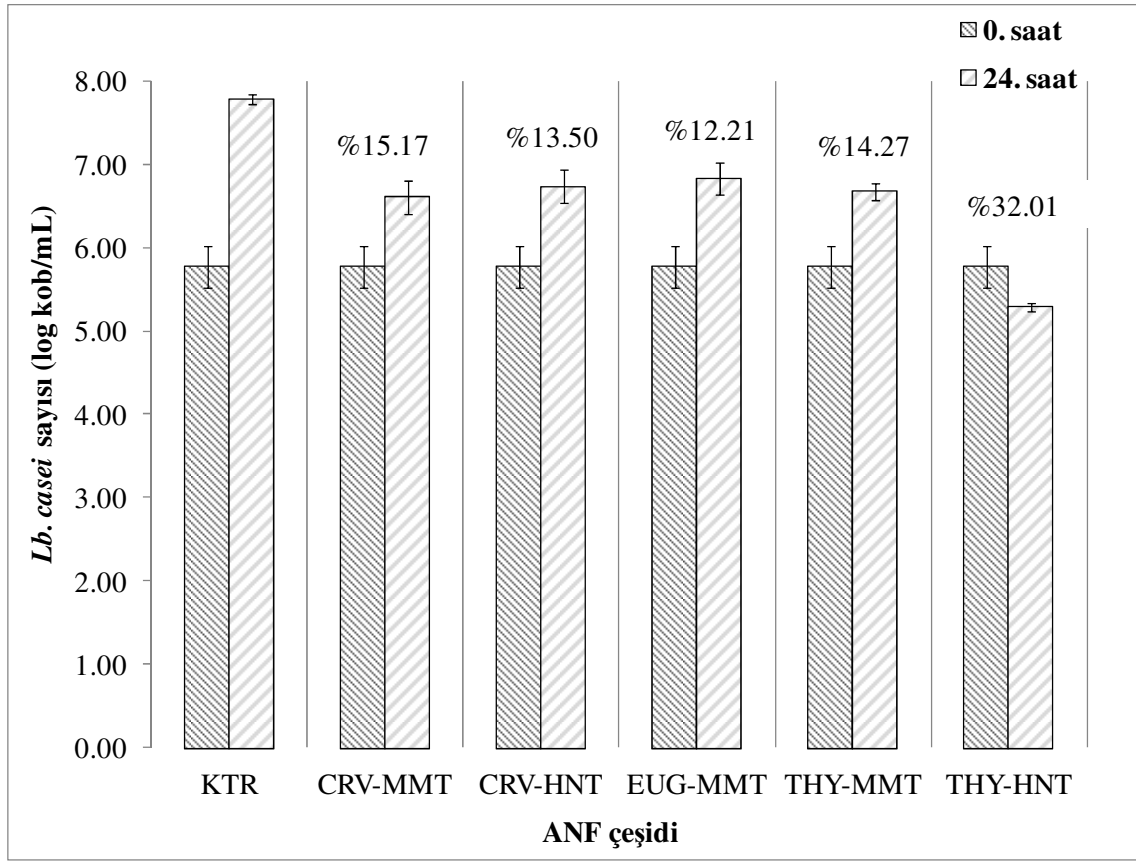


Şekil 15. Aktif nanokompozit filmlerin *Bacillus cereus*'a karşı antimikrobiyal aktiviteleri.

KTR: Hiçbir aktif madde veya nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş haloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş haloysit; Çubukların üzerindeki sayılar, örneklerin sağladığı %gelişim inhibisyon düzeyini (GİD) ifade etmektedir.

Şekil 15'den de görülebildiği gibi, EUG-MMT film örneğinin *B. cereus*'a karşı sergilediği inhibisyonun kontrole göre kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli ($P>0.05$) düzeyde olmadığı görülmektedir. Buna karşılık kontrol grubu ve EUG-MMT hariç diğer tüm örneklerde bakteri sayısında kayda değer ($P<0.05$) azalmalar meydana geldiği belirlenmiştir. Hatta THY-HNT, THY-MMT ve CRV-HNT örnekleri ise bakteri düzeyini sayım sınırlarının altına indirgemiş, %100 bakteriyel inhibisyon sağlamıştır.

Bu araştırmada, ANF'lerin gıda kaynaklı patojen bakterilerin yanı sıra bazı faydalı mikroorganizmalar üzerindeki etkileri de incelenmiştir. Örneğin, bu araştırmada üretilen ANF'lerin *Lb. casei*'ye karşı sergilemiş oldukları antibakteriyel etkileri Şekil 16'da verilmiştir.

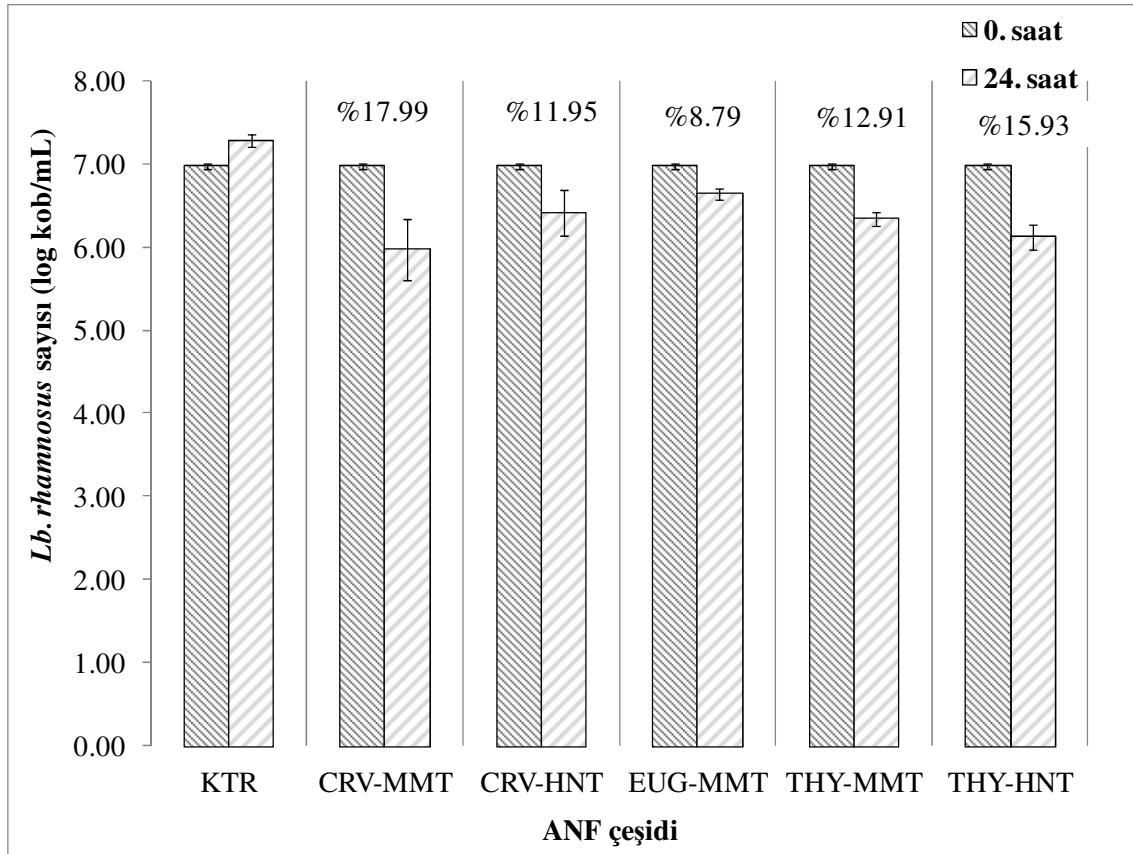


Şekil 16. Aktif nanokompozit filmlerin *Lactobacillus casei*'ye karşı antimikrobiyal aktiviteleri.

KTR: Hiçbir aktif madde veya nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; Çubukların üzerindeki sayılar, örneklerin sağladığı % gelişim inhibisyon düzeyini (GİD) ifade etmektedir.

Şekil 16'dan da görülebildiği gibi başlangıçta 5.77 log kob/mL olan *Lb. casei* sayısı, 24 saatlik inkübasyon sonrasında sadece THY-HNT örneğinde düşüş göstermiş ve kontrol grubuna göre %32.01'lik GİD düzeyi elde edilmiştir. İnkübasyon sonrasında diğer tüm ANF'ler kontrol grubuna göre belli düzeyde GİD'ler (%12.21 ile %15.17 arasında) sergilemiş olsalar da, 0. saate göre tüm örneklerde önemli derecede ($P < 0.05$) artışlar meydana gelmiştir. *Lb. casei* bakımından THY-HNT haricinde en yüksek bakteriyel bakteriyel inhibisyonu sağlayan ANF, kontrole göre bakteri yükünü 1.18 log azaltan CRV-MMT örneği olmuştur.

Yine bu araştırmada üretilen ANF'lerin *Lb. rhamnosus*'a karşı göstermiş oldukları antibakteriyel etkileri Şekil 17'de verilmektedir.



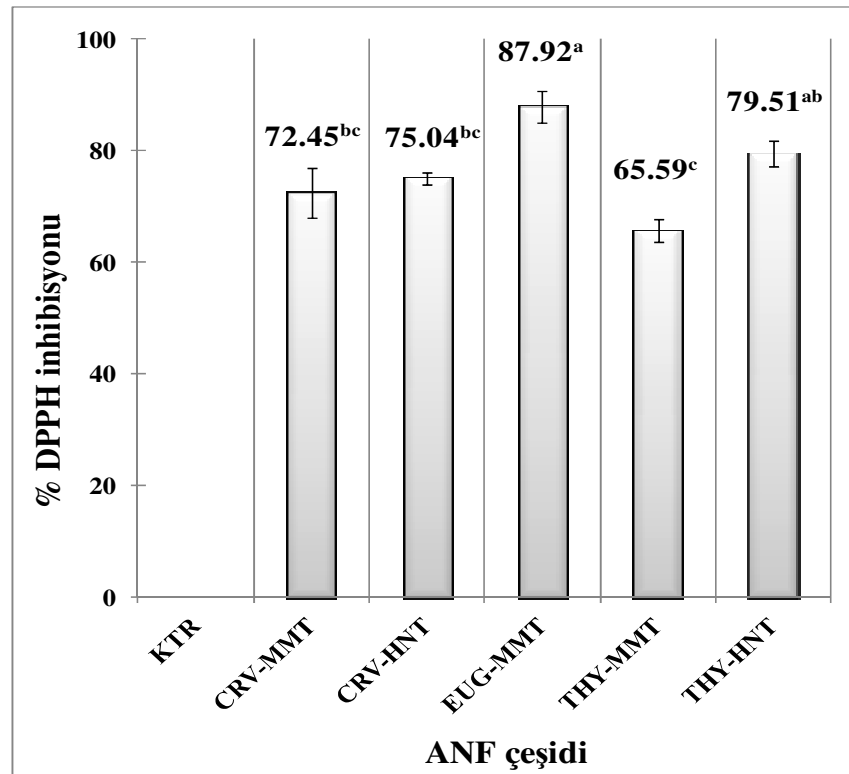
Şekil 17. Aktif nanokompozit filmlerin *Lactobacillus rhamnosus*'a karşı antimikrobiyal aktiviteleri.

KTR: Hiçbir aktif madde veya nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; Çubukların üzerindeki sayılar, örneklerin sağladığı %gelişim inhibisyon düzeyini (GİD) ifade etmektedir.

Bu araştırmada üretilen ANF'lerin *Lb. rhamnosus*'a karşı antibakteriyel aktiviteleri, Şekil 17'de görülmektedir. Başlangıç bakteri yükü 6.97 log kob/mL olmasına karşın inkübasyon sonrasında kontrol örneği hariç diğer tüm örneklerde *Lb. rhamnosus* sayısında önemli azalmalar ($P < 0.05$) ortaya çıkmış ve ANF'ler kontrole kıyasla bakteri sayısında %8.79 ile %17.99 arasında GİD ortaya koymuşlardır. Kontrol örneğinde bakteri sayısı 24 saatlik bir inkübasyonun sonunda 7.28 log kob/mL'ye yükselirken, diğer örneklerde bu sayı 5.97 log kob/mL ile 6.64 log kob/mL arasında değişiklik göstermiştir. *Lb. rhamnosus*'a karşı en etkili ANF örnekleri, kontrole göre bakteri yükünü sırasıyla 2.31 log ve 2.16 log azaltan CRV-MMT ve THY-HNT film örnekleri olmuştur.

3.4.2. ANF'lerin antiradikal aktivitesi

Bu araştırmada, gıdalarda oksidasyonun önlenmesi konusundaki etkinliği hakkında fikir sahibi olmak amacıyla ANF'lerin DPPH radikali test yöntemi ile antiradikal aktivitesi test edilmiştir. Şekil 18'de görüldüğü gibi, ANF'lerin DPPH radikali yakalama aktiviteleri %65.59 ile %87.92 arasında değişmiştir. İstatistiksel olarak en yüksek ($P<0.05$) antiradikal aktiviteyi EUG-MMT film örneği sergilemiştir. Hiçbir aktif madde içermeyen saf LDPE filmin (kontrol) ise DPPH radikalinde herhangi bir inhibisyon sağlamadığı belirlenmiştir (Şekil 18).



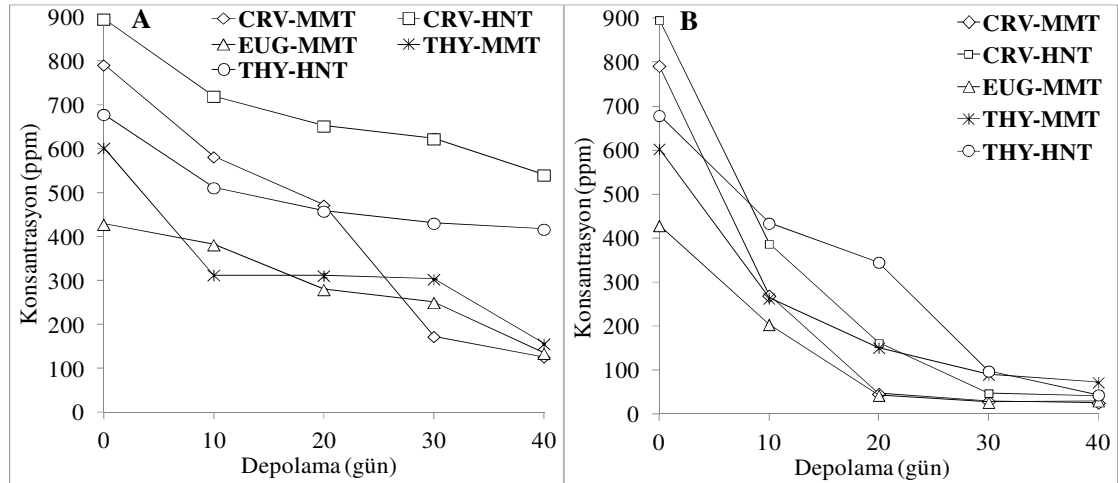
Şekil 18. Uçucu yağ bileşenleri ile üretilen ANF'lerin DPPH radikali yakalama aktiviteleri (%).

KTR: Herhangi bir aktif madde içermeyen kontrol ambalaj örneği; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş haloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş haloysit.

3.4.3. ANF'lerdeki aktif madde miktarının depolama süresince değişimi

Bitkisel ekstrakt ilave edilen nanokiller kullanılarak hazırlanmış ANF'lerde depolama sürecinde kalan aktif madde miktarını belirlemeden önce ambalaj materyalinden aktif maddenin ekstraksiyonunda izlenecek yöntemde sürenin belirlenmesi için ön denemeler

yapılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda 24 saat süreyle metanolle yapılacak soğuk ekstraksiyonun uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Ardından, buzdolabı ($4\pm1^\circ\text{C}$) ve oda sıcaklığında ($24\pm1^\circ\text{C}$) 40 gün bekletilen ambalajlarda kalan aktif madde miktarı tespit edilmiştir. Şekil 19'da test edilen ambalajlardaki kalan biyoaktif madde miktarları görülmektedir.



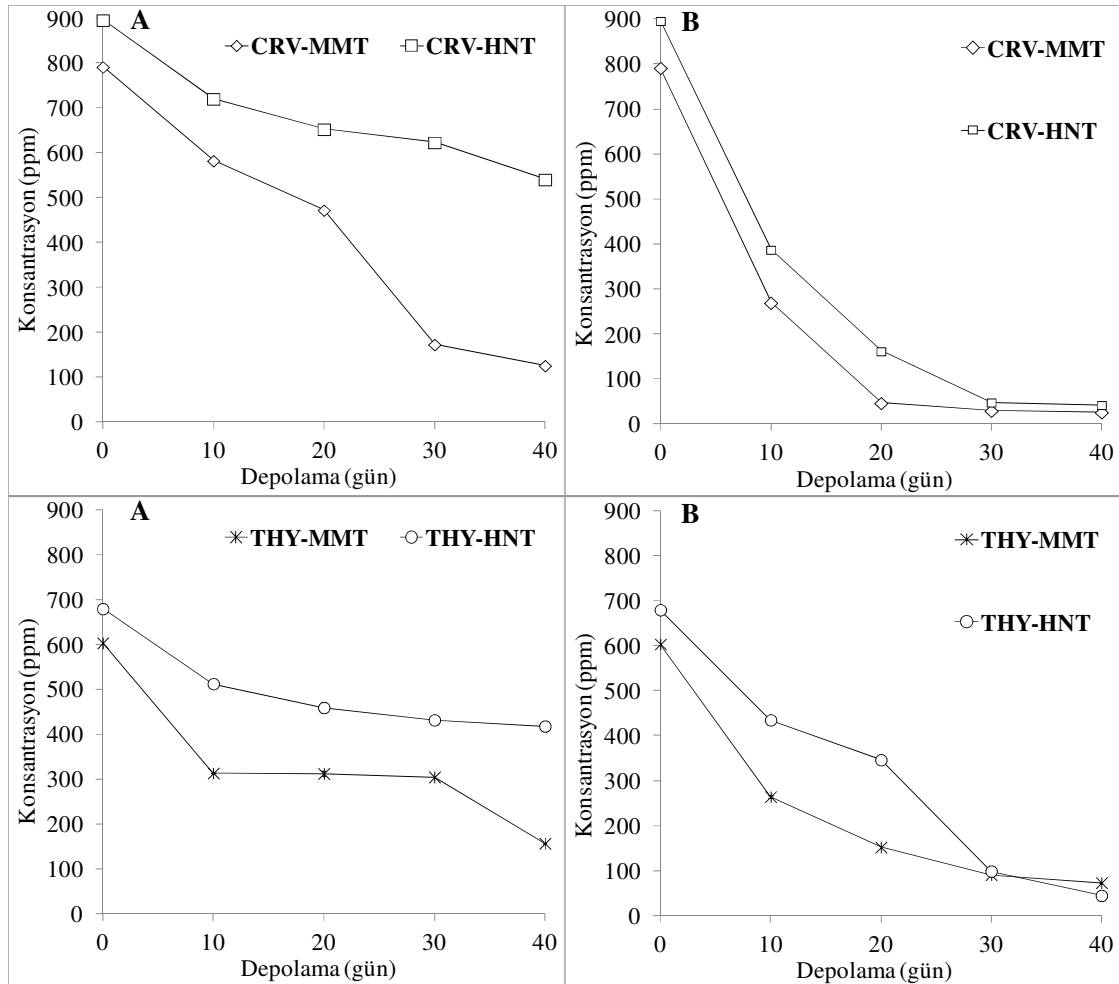
Şekil 19. 4°C'de (A) ve 24°C'de (B) muhafaza edilen ANF'ler kalan aktif madde miktarının zamana bağlı olarak değişimi (ppm)*.

CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit. * Şekilde verilmemiş olmakla birlikte, nanokil içermeyen, sadece %5 oranında CRV, EUG veya THY ilavesi ile üretilen ambalajların aktif madde miktarları, depolama öncesinde sırasıyla 20.55 ± 0.64 , 19.15 ± 0.92 ve 80.7 ± 0.00 ppm olarak belirlenmiştir.

Şekil 19'da, 4 °C'de ve 24 °C'e bekletilen ambalajlarda aktif madde miktarının nispi bir azalma eğiliminde olduğu görülmektedir. Bununla birlikte 24 °C'de bekletilen örneklerde ilk 10 günde daha hızlı bir düşüş gözlenirken 4 °C'de saklanan örneklerdeki aktif madde miktarının 40. güne kadar daha yavaş bir salım eğilimi gösterdiği ortaya çıkmıştır. CRV-HNT ve CRV-MMT, 0. günde sırasıyla sahip oldukları 896.22 ppm ve 791.93 ppm CRV konsantrasyonları ile en yüksek aktif madde konsantrasyonuna sahip ambalaj film örnekleridir. Araştırmada 40 gün süreyle 24°C'de muhafaza edilen ANF'lerin tümünde aktif madde konsantrasyonu 100 ppm'in altına düşmüştür. Bununla birlikte, 4°C'de muhafaza edilen ANF'ler içerisinde ise süre sonunda en yüksek aktif madde miktarları 541.07 ppm ve 417.66 pmm ile CRV-HNT ve THY-HNT filmlerinde tespit edilmiştir.

ANF'lerde kalan aktif madde miktarı üzerinde nanokillerin etkisinin ortaya konulması amacıyla yukarıdaki şekilden (Şekil 19), aynı aktif madde içeren ama aktif maddelerin

yüklenmiş oldukları nanokiller farklı olan ANF'lere ait yeni şekiller elde edilmiştir. ANF'lerde kalan aktif madde miktarı üzerine nanokilin etkisi, Şekil 20'de verilmiştir.



Şekil 20. 4°C'de (A) ve 24°C'de (B) muhafaza edilen ANF'lerdeki kalan aktif madde miktarı üzerinde nanokilin etkisi.

CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit.

Şekil 20'de görülebildiği gibi, ANF'lerde kalan aktif maddelerin miktarları üzerine sıcaklığın yanı sıra nanokil tipi de etki etmiştir. Aktif madde yüklenmiş HNT nanokili ile üretilen filmlerdeki aktif madde miktarı, depolama süresi boyunca MMT ile üretilen filmlere göre her iki sıcaklık derecesinde de daha yüksek bulunmuştur.

3.4.4. ANF'lerin mekanik özellikleri

Bu araştırmada, üretilen ambalajların mekanik özellikleri test edilmiş ve bu amaçla çekme dayanımı (tensile strength, TS) ve kopma anındaki uzama (elongation at break,

EB) parametreleri ölçülmüştür. ANF'lerin ölçülen mekanik özelliklerine ait sonuçlar Tablo 20'de verilmiştir.

Tablo 20. Aktif nanokompozit filmlerin bazı mekanik özellikleri.

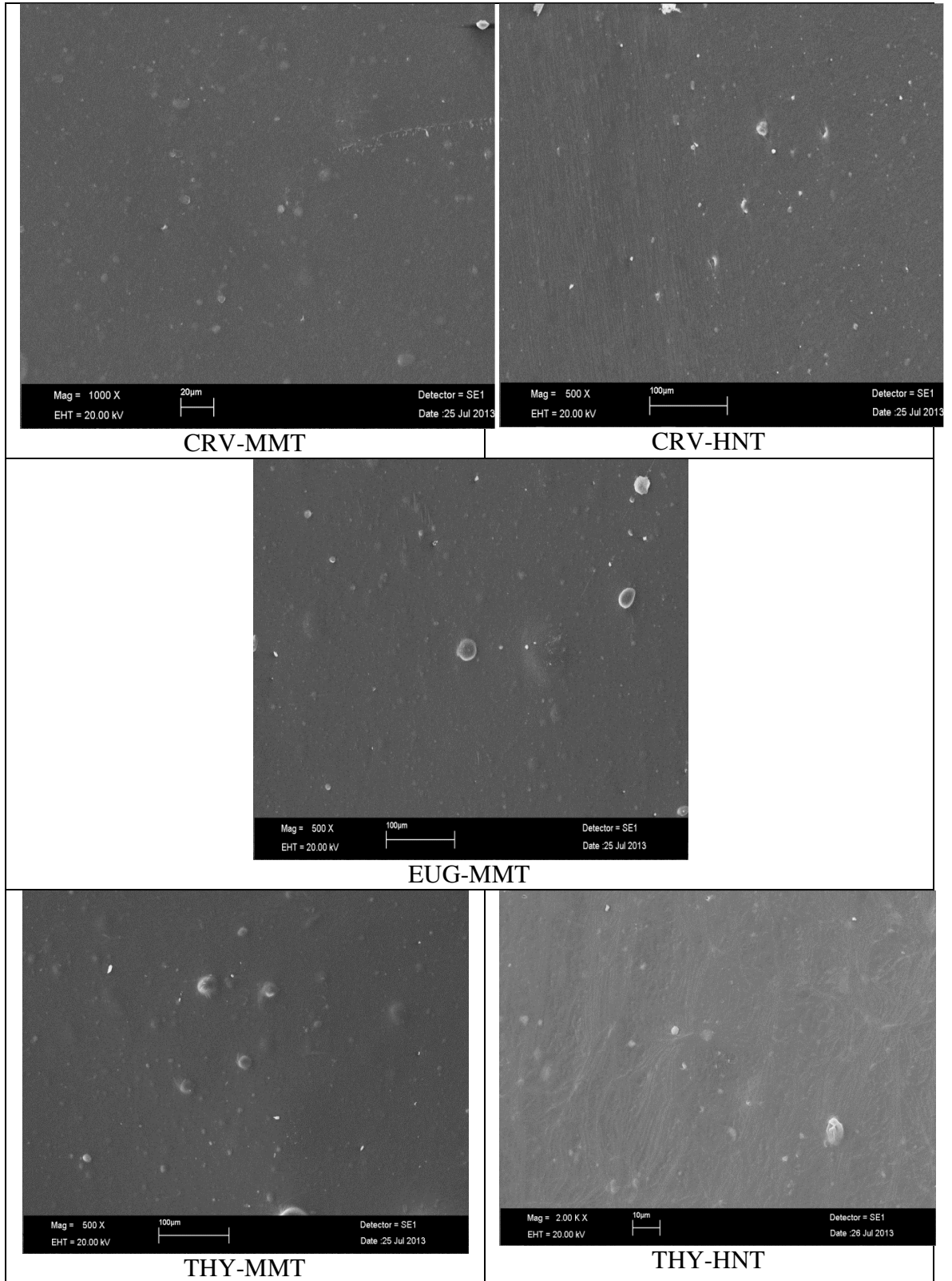
ANF çeşidi	Çekme dayanımı (MPa)	Kopma anındaki uzama (%)
KTR	4.69±0.29 ^c	334.48±16.42 ^c
CRV-MMT	7.90±0.42 ^a	485.67±43.26 ^a
CRV-HNT	4.73±0.28 ^c	461.78±11.21 ^a
EUG-MMT	7.31±0.23 ^b	481.81±25.99 ^a
THY-MMT	4.49±0.24 ^c	407.18±24.30 ^b
THY-HNT	4.89±0.29 ^c	384.89±8.81 ^b

KTR: Nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit.
a-e: Aynı sütundaki birbirinden farklı olan küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir.

Tablo 20'den de görülebildiği gibi, ambalajlara aktif kil nanopartiküllerinin (AKNP) ilavesi ile mekanik özelliklerinde istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) değişiklikler meydana gelmiştir. Saf LDPE ambalaj ile CRV-HNT, THY-MMT ve THY-HNT ambalajların TS değerleri arasındaki farklar istatistiksel olarak önemsiz ($P>0.05$) bulunmuştur. Buna karşılık, CRV-MMT ve EUG-MMT filmlerin TS değerlerinin, diğer örneklerle kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek ($P<0.05$) olduğu tespit edilmiştir. EB değerlerine göz atıldığında ise, AKNP ilavesinin ambalajın uzama özelliğini artırdığı saptanmıştır. İstatistiksel olarak en yüksek ($P<0.05$) EB değerleri CRV-MMT, CRV-HNT ve EUG-MMT filmlerinde tespit edilmiş ve bu ANF'ler arasında istatistiksel olarak önemli ($P>0.05$) bir fark bulunmamıştır.

3.4.5. ANF'lerin morfolojik özellikleri

Bu araştırmada üretilen ANF'lerin morfolojik özelliklerinin tespiti ve kil partiküllerinin polimer içerisinde dağılımının belirlenmesi amacıyla ANF'lerin SEM görüntüleri alınmış ve bunlar Şekil 21'de verilmiştir.



Şekil 21. Aktif nanokompozit filmlerin SEM (taramalı elektron mikroskobu) görüntüleri.

CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit.

Şekil 21'de görüldüğü gibi, %5 oranında nanokil ilavesi ile LDPE film yüzeylerinde etkili bir dağılımın yanı sıra bazı bölgelerde yer yer aglomeratların oluştuğu

görülmektedir. Görüntüler içerisinde ANF'lerin mikrogramları benzerlik göstermekle beraber CRV-MMT ve THY-HNT film örneklerinde daha etkili bir dağılımın sağlandığı anlaşılmaktadır. SEM görüntüleri, ambalajda AKNP'lerin dağılımı ile bilgi sahibi olmak amacıyla alındığı için, nanokil içermeyen saf LDPE ambalajın SEM görüntüsünün alınmasına gerek duyulmamıştır.

3.4.6. ANF'lerin renk ve opaklık değerleri

Bu araştırmada elde edilen ANF'lerin Hunter renk özellikleri, toplam renk farklılığı ve opaklık değerleri Tablo 21'de verilmiştir.

Tablo 21. ANF'lerin renk ve opaklık değerleri.

ANF	L^*	a^*	b^*	TRF (ΔE)	Opaklık (%)
KTR	93.92±0.06 ^a	-1.15±0.02 ^{cd}	0.34±0.02 ^d	1.09	4.01±0.29 ^a
CRV-MMT	93.08±0.18 ^{bc}	-1.16±0.02 ^d	1.23±0.10 ^c	2.02	4.44±0.21 ^a
CRV-HNT	92.80±0.47 ^{bc}	-1.09±0.03 ^{ab}	1.73±0.17 ^{ab}	2.47	4.51±0.28 ^a
EUG-MMT	93.18±0.25 ^b	-1.14±0.05 ^{bcd}	1.46±0.20 ^{bc}	2.02	4.41±0.40 ^a
THY-MMT	91.95±0.18 ^d	-1.10±0.02 ^{abc}	1.47±0.13 ^{bc}	3.17	4.21±0.11 ^a
THY-HNT	92.58±0.32 ^c	-1.08±0.03 ^a	1.76±0.20 ^a	2.69	4.65±0.05 ^a

KTR: Nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit.; TRF: Toplam renk farklılığı;

a-d: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir.

Tablo 21'de, saf LDPE ambalajın L^* değerinin nanokil içeren aktif ambalajlarınkine göre istatistiksel olarak daha yüksek ($P<0.05$) olduğu görülmektedir. En düşük L^* değeri ise THY-MMT'de tespit edilmiştir. LDPE film ile ANF'lerin a^* değerleri arasında belirgin bir farklılık saptanmamıştır. Buna karşılık LDPE filmin b^* değeri, ANF'lere göre önemli ($P<0.05$) düzeyde düşük bulunmuştur. Ambalaj örneklerinin ΔE değerleri 1.09 ile 3.17 arasında değişmekte olup en düşük ve en yüksek ΔE değerleri sırasıyla saf LDPE ve THY-MMT filmde belirlenmiştir. Filmlerin opaklık değerleri arasında ise istatistiksel olarak önemli bir fark ($P>0.05$) tespit edilmemiştir.

3.4.7. Film kalınlığı

Bu araştırmada, elde edilen ANF'ler üzerinde yapılan kalınlık testleri sonucunda bulunan değerler Tablo 22'de verilmiştir.

Tablo 22. ANF'lere ait kalınlık değerleri.

ANF	Film kalınlığı (μm)
KTR	20.00±0.00 ^b
CRV-MMT	37.50±3.54 ^{ab}
CRV-HNT	45.00±0.00 ^a
EUG-MMT	30.00±7.07 ^{ab}
THY-MMT	35.00±7.07 ^{ab}
THY-HNT	37.50±3.54 ^{ab}

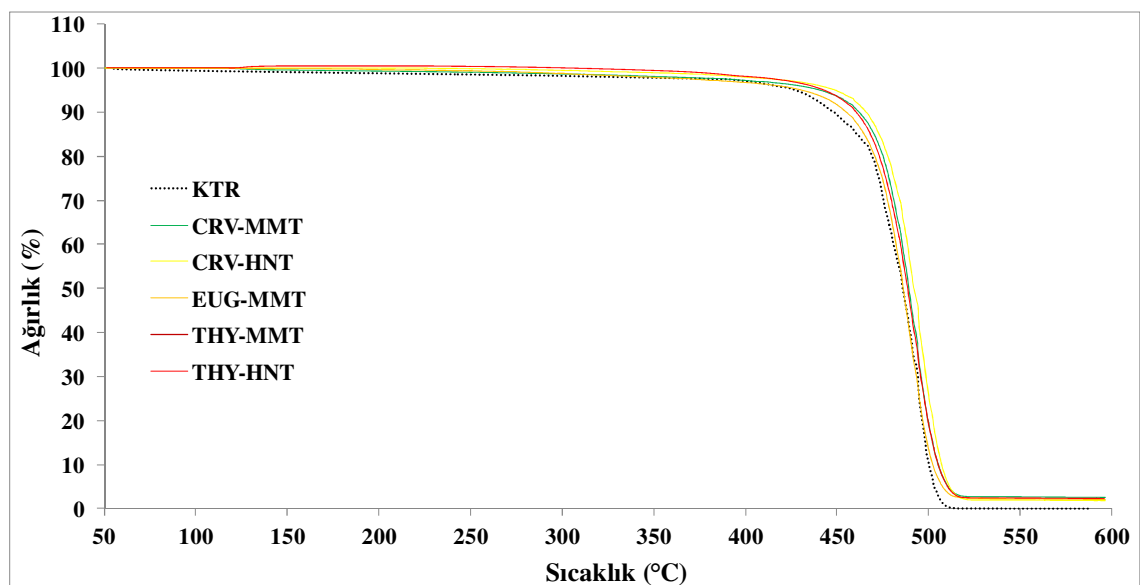
KTR: Nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorilonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit.

a-d: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir.

Tablo 22'de görüldüğü gibi, ambalaj materyallerinin kalınlık değerleri 20 μm ile 45 μm arasında değişmektedir. Saf LDPE filmin kalınlığı istatistiksel olarak diğer filmlerden daha düşük ($P<0.05$) bulunurken CRV-MMT, EUG-MMT, THY-MMT ve THY-HNT filmlerinin kalınlıkları arasında istatistiksel olarak önemli ($P>0.05$) bir fark bulunmamıştır.

3.4.8. Termogravimetrik analiz (TGA)

Bu araştırmada, elde edilen ANF'lerin yüksek sıcaklıklara bağlı olarak kütlelerinde meydana gelen değişim/kayıpların belirlenmesi amacıyla termogravimetrik analiz (TGA) yapılmıştır. ANF'lerin hava akımı ortamındaki TGA grafiği Şekil 22'de verilmiştir.



Şekil 22. Sıcaklığa bağlı olarak ANF'lerin ağırlıklarında meydana gelen kayıp.

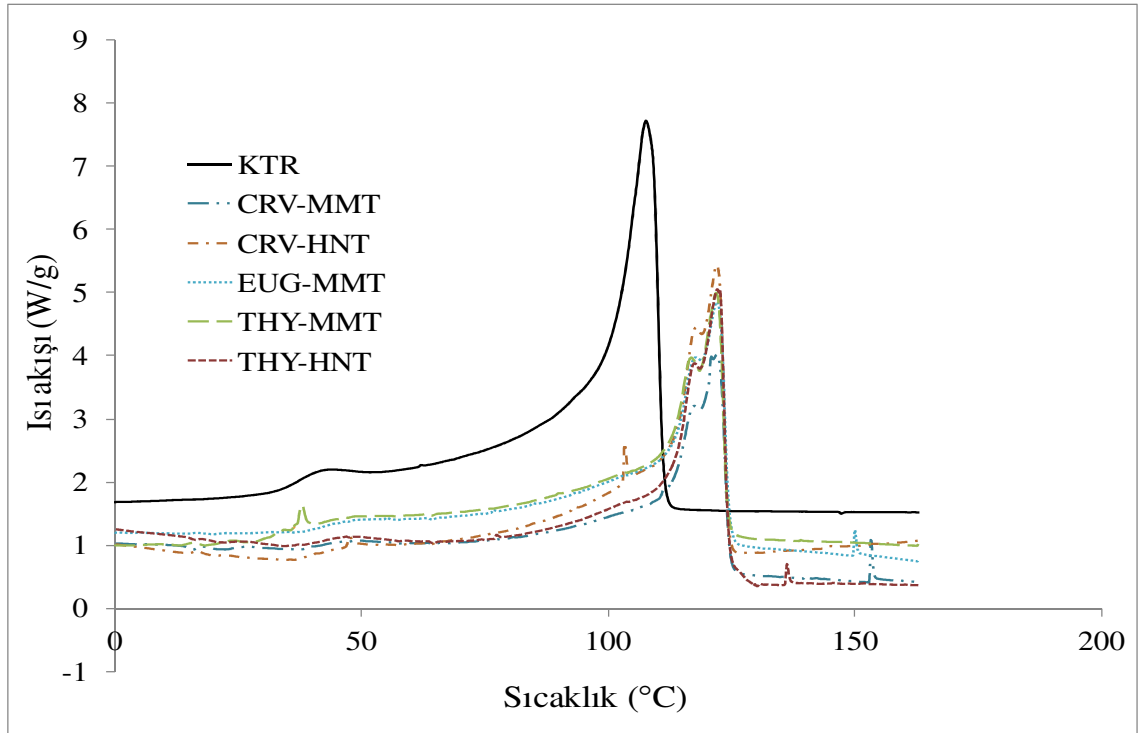
KTR: Nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorilonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit.

Aktif madde yüklenmiş nanokil katkı ANF'lerin ve saf LDPE ambalajın kütlelerinde 420°C'ye kadar benzer bir seyir meydana geldiği ve 420°C'ye geldikten sonra ANF'lerde bir termal degradasyon başladığı görülmektedir (Şekil 22). ANF'lere ait eğriler kıyaslandığında EUG-MMT'nin termal yıkımının diğerlerle kıyasla daha erken ve saf LDPE ile benzer olduğu, CRV-MMT'nin yıkımının ise daha sonra meydana geldiği görülmektedir. Bunun haricinde, sıcaklık karşısında ANF'lerin davranışları birbirine benzer bir davranış göstermektedir. Şekil 22'de, ANF'lerin T_{50} (örneğin %50 ağırlık kaybının gerçekleştiği sıcaklık değeri) değerlerine göz atıldığı zaman, en büyük ve en küçük T_{50} değerlerinin 491.45°C ve 481.64°C ile CRV-MMT ve THY-MMT'ye ait olduğu görülmektedir. EUG-MMT örneği ile saf LDPE ambalaja ait T_{50} değerleri ise birbirine yakın olup sırasıyla 485.84°C ve 485.70°C olarak tespit edilmiştir. ANF'lerde eğrinin ölçülen sıcaklık aralığında sıfıra düşmemesinin nedeni ise bünyelerinde bulunan nanokilin termal olarak yıkıma uğramamasıdır.

3.4.9. DSC analizi

Bu araştırmada üretilen ANF'lerin sıcaklık karşısındaki davranışlarının, erime ve kristalizasyon sıcaklıklarının belirlenmesi ve bu konuda AKNP ilavesinin LDPE ambalaj üzerindeki etkisinin test edilmesi amacıyla ANF'lerde DSC analizi yapılmıştır. Şekil 23'te, ANF'lere ait DSC termogramları verilmiştir.

Şekil 3.23'te yer alan termogramlara göz atıldığında, saf LDPE ambalajın erime sıcaklığının ANF'lere göre daha düşük olduğu görülmektedir. Ayrıca saf LDPE ambalajda 1 adet endotermik pik varken, ANF'lerde birbirine yakın sıcaklıklarda 2 endotermik pik ortaya çıkmıştır. ANF'lerde yapılan DSC analizine dair diğer özellikler ise Tablo 23'te verilmiştir.



Şekil 23. ANF'lerin DSC termogramları.

KTR: Nanokil içermeyen Saf LDPE ambalaj; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit.

Tablo 23. ANF'lerin termal özellikleri.

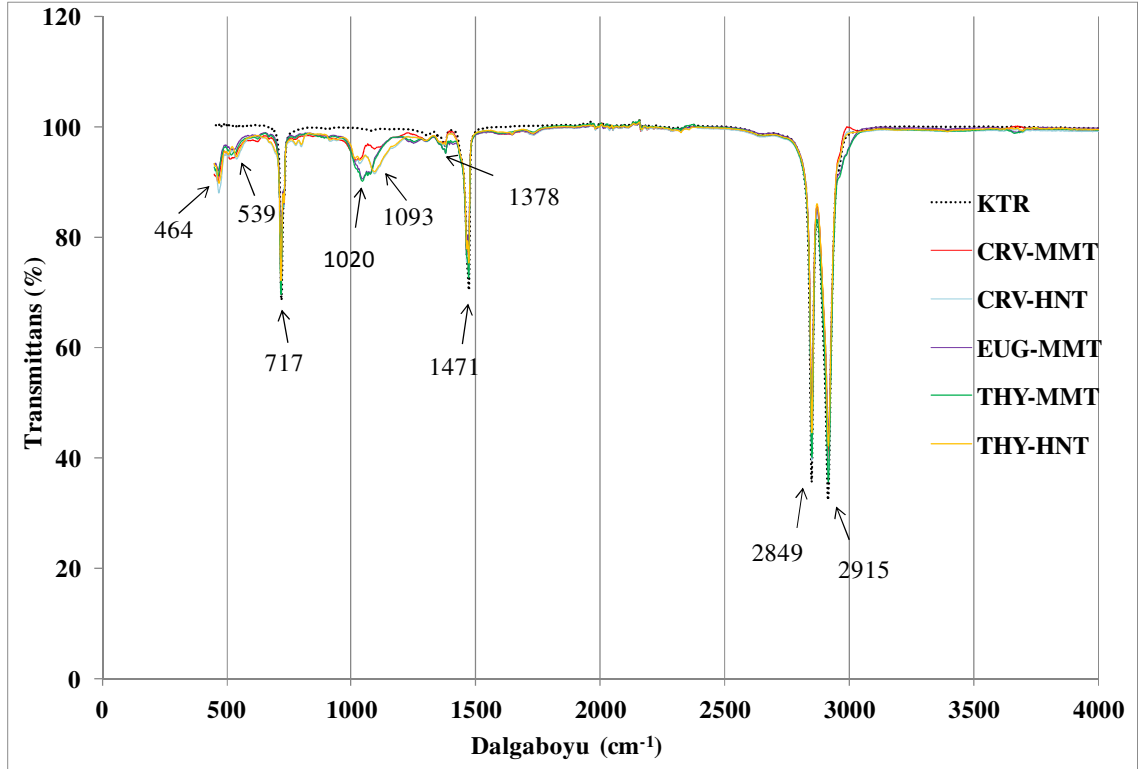
ANF	ΔH (J/g)	T_e (°C)	χ (%)
KTR	75.22	109.09	25.67
CRV-MMT	56.65	117.41	19.33
CRV-HNT	41.55	117.87	14.18
EUG-MMT	55.36	117.75	18.89
THY-MMT	68.35	116.92	23.33
THY-HNT	54.37	117.38	18.56

KTR: Nanokil içermeyen Saf LDPE ambalaj; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; ΔH : Toplam entalpi; T_e : Erime sıcaklığı; χ : Kristalizasyon derecesi.

Tablo 23'de görülebildiği gibi, kristalizasyon derecesi en düşük olan örnek %14.18 ile CRV-HNT iken THY-MMT'ninki %23.33 olarak saptanmıştır. Saf LDPE ambalajın kristalizasyon derecesi ise %25.67'dir. Aktif madde yüklenmiş nanokillerin polimer içerisine ilavesi, ambalajın erime sıcaklığını değiştirmiş ve erime sıcaklığını 109.09°C'den 116-117°C'ye yükseltmiştir.

3.4.10. FTIR analizi

Bu araştırmada üretilmiş olan ambalajlardaki moleküler bağların karakterize edilmesi amacıyla FTIR analizi yapılmıştır. Şekil 24'te LDPE ambalaj ve ANF'lerden elde edilen FTIR spektralleri görülmektedir.



Şekil 24. ANF'lere ait FTIR spektralleri.

KTR: Nanokil içermeyen Saf LDPE ambalaj; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit.

Şekil 24'ten de görülebildiği gibi, ANF'lerin 450-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığındaki FTIR absorpsiyon profilleri birbirlerine oldukça benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte, 450-550 cm^{-1} ve 1000-1100 cm^{-1} bandında saf LDPE ambalajda olmayan ama ANF'lerde olan çeşitli pikler de görülmektedir. Bu pikler, muhtemelen ANF'lerin bünyesinde bulunan nanokiller ve aktif maddelerden kaynaklanmaktadır. Örneğin, 464 cm^{-1} dalga boyu yakınında görülen pik, Si-O-Si bağlarının gerilme titreşiminden kaynaklanmakta, 1000-1100 cm^{-1} aralığı ise Si-O gerilme titreşimlerini ifade etmektedir. 1375-1475 cm^{-1} ve 2800-2900 cm^{-1} dalga boyu aralıklarındaki piklerin sebebi ise C-H bağlarından meydana gelen titreşimlerdir.

3.5. Gıda denemeleri

Bu araştırmada ilk olarak, çeşitli aktif maddeler yüklenmiş kil nanopartikülleri (AKNP) üretilmiş ve bunların karakterizasyonları yapılmıştır. İkinci aşamada, bu AKNP'lerin %5 oranında ilave edilmesi ile düşük molekül ağırlıklı polietilen (LDPE) bazlı aktif nanokompozit filmler (ANF) üretilmiş ve ANF'lerin karakterizasyonu amacıyla bir dizi testler yapılmıştır. Son aşamada ise bir önceki aşamada antimikrobiyal etkisi yüksek çıkan ANF'ler kullanılarak bu ANF'lerin çeşitli model gıdaların raf ömürleri ve mikrobiyolojik özellikleri üzerindeki etkileri test edilmiştir. Bu amaçla test edilen gıda maddeleri; kaşar peyniri, fermente sucuk, kıyma, parça et ve domates salçasıdır.

3.5.1. Kaşar peyniri

Kaşar peyniri, beyaz peynir ile birlikte ülkemizde en fazla üretilen ve tüketilen peynir çeşididir. Ülkemizde kaşar peyniri, bütün ya da dilimlenmiş halde vakum ambalajlar içerisinde satılmaktadır. Bu araştırmada, kaşar peynirinde raf ömrünü kısıtlayan ve sağlık problemlerine yol açabilen en önemli etmenler olan doğal mikrobiyal yük, *L. monocytogenes* ve *A. niger* varlığı/gelişimi üzerine ANF'ler ile ambalajlamanın etkisi araştırılmıştır.

3.5.1.1. ANF'lerin doğal mikrobiyal yük üzerindeki etkisi

Bu araştırmada, öncelikle AKNP katkılı ANF'lerle vakum ambalajlamanın kaşar peynirinin doğal mikrobiyal yükü üzerindeki etkisi test edilmiştir. ANF'ler kullanılarak vakum ambalajlandıktan sonra 30 gün süreyle 4°C'de depolanan kaşar peynirlerinin TMAB yüklerindeki değişim, Tablo 24'te verilmiştir.

Tablo 24. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen kaşar peynirlerinin toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) yüklerinin depolama sırasındaki değişimi.

Süre (Gün)	TMAB yükü (log kob/g)					
	Kontrol	CRV-MMT	CRV-HNT	EUG-MMT	THY-MMT	THY-HNT
0	5.25±0.18 ^{ba}	5.25±0.18 ^{ca}	5.25±0.18 ^{ca}	5.25±0.18 ^{da}	5.25±0.18 ^{ca}	5.25±0.18 ^{ca}
10	7.54±0.23 ^{aA}	5.73±0.39 ^{bcC}	6.40±0.07 ^{bcC}	6.57±0.04 ^{cB}	7.00±0.14 ^{baB}	6.25±0.06 ^{bcC}
20	6.10±0.21 ^{bc}	6.35±0.26 ^{bcC}	7.39±0.24 ^{aA}	7.45±0.21 ^{ba}	7.18±0.04 ^{baB}	6.30±0.00 ^{bcC}
30	8.57±0.84 ^{aA}	7.81±0.73 ^{aAB}	7.83±0.48 ^{aAB}	8.45±0.31 ^{aA}	8.20±0.00 ^{aAB}	7.13±0.33 ^{aB}

Kontrol: Nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; TMAB: Toplam mezofilik aerobik bakteri; ±: standart sapma; a-c: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark (P<0.05) olduğunu göstermektedir; A-C: Aynı satırdaki birbirinden farklı büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark (P<0.05) olduğunu göstermektedir.

Tablo 24'den görülebildiği gibi peynirin başlangıç TMAB yükü 5.25 log kob/g'dır. Tüm örneklerin TMAB yükleri depolama sırasında önemli ($P<0.05$) düzeyde artış göstermiştir. Depolamanın ilk 10 gününde sadece CRV-MMT filmi TMAB gelişimini kontrol altında tutarken, diğer tüm örneklerde istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) artışlar meydana gelmiştir. İlginç olarak, kontrol grubu olarak değerlendirilen saf LDPE film ile ambalajlanan peynirlerin TMAB yükü 10. günden 20. güne kadar önemli düzeyde azalma göstermiş, diğer örneklerin yükleri ise istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) derecede artmış ya da sabit ($P>0.05$) kalmıştır. Çalışmada 30 günlük depolama sonucunda, kontrol örneği ile CRV-MMT, CRV-HNT, EUG-MMT ve THY-MMT ile ambalajlanan peynirlerin yükleri arasında istatistiksel olarak önemli ($P>0.05$) bir fark bulunmazken yalnızca THY-HNT ile ambalajlanan peynirlerde oluşan TMAB yükü istatistiksel olarak daha düşük ($P<0.05$) bulunmuştur.

Bu araştırmada, üretilen ANF'lerle ambalajlanan kaşar peynirlerinin depolanmaları ile LAB yüklerinde meydana gelen değişim Tablo 25'te verilmiştir.

Tablo 25. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen kaşar peynirlerinin laktik asit bakterisi (LAB) yüklerinin depolama sırasındaki değişimi.

Süre (Gün)	LAB yükü (log kob/g)					
	Kontrol	CRV-MMT	CRV-HNT	EUG-MMT	THY-MMT	THY-HNT
0	7.30±0.11 ^{cA}	7.30±0.11 ^{cA}	7.30±0.11 ^{cA}	7.30±0.11 ^{cA}	7.30±0.11 ^{dA}	7.30±0.11 ^{dA}
10	8.44±0.37 ^{bA}	8.15±0.25 ^{bA}	8.32±0.50 ^{bA}	8.38±0.30 ^{bA}	8.61±0.03 ^{cA}	8.18±0.18 ^{cA}
20	9.20±0.43 ^{bA}	8.13±0.77 ^{bB}	8.91±0.39 ^{aA}	9.11±0.12 ^{aA}	9.42±0.10 ^{bA}	9.13±0.10 ^{bA}
30	10.24±0.84 ^{aA}	9.11±0.89 ^{aBC}	8.95±0.15 ^{aC}	8.99±0.26 ^{aC}	10.03±0.15 ^{aAB}	8.81±0.28 ^{aC}

Kontrol: Nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; LAB: Laktik asit bakterisi; ±: standart sapma;

a-d: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir; A-C: Aynı satırdaki birbirinden farklı büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir.

Tablo 25'den de görülebildiği gibi, peynirlerde 0. gün LAB sayıları 7.30 log kob/g olarak tespit edilmiştir. Peynirlerin LAB yükleri, depolama sürecinde 2-3 log artış göstermiş ve bu artışlar istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) bulunmuştur. Depolamanın 20. gününe kadar CRV-HNT, EUG-MMT, THY-MMT ve THY-HNT ile ambalajlanan kaşar peynirlerinin LAB yükleri ile saf LDPE ile ambalajlanmış kontrol örneğinin LAB yükü arasında istatistiksel olarak önemli ($P>0.05$) bir fark ortaya çıkmamıştır. Yine 30 günlük depolamanın sonunda, kontrol örneğinin LAB yükü 10.24 log kob/g ile istatistiksel olarak ($P<0.05$) en yüksek değere ulaşmıştır. THY-HNT, CRV-HNT ve

EUG-MMT filmler, LAB artışını en çok ($P<0.05$) geciktiren ambalajlar olarak ön plana çıkmıştır.

Bu çalışmada kullanılan ANF'lerin depolama sürecinde kaşar peynirlerinin TK yüklerinde sağladıkları değişim, Tablo 26'da verilmiştir.

Tablo 26. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen kaşar peynirlerinin toplam koliform (TK) yüklerinin depolama sırasındaki değişimi.

Süre (Gün)	TK yükü (log kob/g)					
	Kontrol	CRV-MMT	CRV-HNT	EUG-MMT	THY-MMT	THY-HNT
0	2.14±0.16 ^{dA}	2.14±0.16 ^{bA}	2.14±0.16 ^{cA}	2.14±0.16 ^{aA}	2.14±0.16 ^{bA}	2.14±0.16 ^{cA}
10	2.78±0.10 ^{cA}	2.56±0.43 ^{abA}	2.24±0.00 ^{bcA}	2.85±0.04 ^{aA}	2.45±0.05 ^{bA}	2.59±0.03 ^{bA}
20	2.82±0.50 ^{bA}	2.85±0.17 ^{aAB}	2.73±0.38 ^{abAB}	2.70±0.36 ^{aAB}	2.51±0.04 ^{bB}	3.17±0.12 ^{aAB}
30	3.70±0.21 ^{aA}	2.89±0.25 ^{aB}	3.00±0.27 ^{aB}	3.08±0.15 ^{aB}	3.26±0.21 ^{aAB}	3.11±0.14 ^{aB}

Kontrol: Nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; TK: Toplam koliform; ±: standart sapma;

a-e: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir; A-D: Aynı satırdaki birbirinden farklı büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir.

Tablo 26'dan görülebildiği gibi, başlangıç TK yükü 2.14 log kob/g olan peynirlerin TK sayıları 30 günlük depolama sırasında istatistiksel olarak önemli düzeyde ($P<0.05$) artış göstermiştir. CRV-MMT, CRV-HNT, THY-HNT ve EUG-MMT'de depolama sonrasında gerçekleşen TK sayıları, diğer örneklerle göre istatistiksel olarak daha düşük ($P<0.05$) bulunmuştur. Saf LDPE ile ambalajlanmış kontrol örneğinin TK sayısı, 30 günlük depolama sonunda 3.70 log'a ulaşarak örnekler içerisindeki istatistiksel olarak en yüksek ($P<0.05$) değere ulaşmıştır.

Bu çalışmada üretilen farklı ANF'ler ile vakum paketlenerek depolanan kaşar peyniri örneklerinde oluşan MK yükleri, Tablo 27'de verilmiştir.

Tablo 27. Farklı ANF'lerle paketlenen kaşar peynirinin toplam maya-küf (MK) yükünün depolama sırasındaki değişimi.

Süre (Gün)	MK yükü (log kob/g)					
	Kontrol	CRV-MMT	CRV-HNT	EUG-MMT	THY-MMT	THY-HNT
0	2.27±0.15 ^{cA}	2.27±0.15 ^{cA}	2.27±0.15 ^{aA}	2.27±0.15 ^{bA}	2.27±0.15 ^{bA}	2.27±0.15 ^{bA}
10	3.30±0.22 ^{bA}	2.93±0.40 ^{abAB}	2.27±0.15 ^{aB}	2.29±0.21 ^{bB}	2.93±0.16 ^{aAB}	2.65±0.12 ^{baAB}
20	3.43±0.23 ^{baB}	3.48±0.35 ^{bA}	2.54±0.40 ^{aC}	3.04±0.18 ^{aABC}	2.95±0.06 ^{aBC}	2.73±0.26 ^{aC}
30	4.53±0.17 ^{aA}	2.88±0.36 ^{baBC}	2.33±0.37 ^{aA}	3.21±0.29 ^{aB}	3.03±0.04 ^{aB}	2.50±0.08 ^{baCD}

Kontrol: Nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; MK: Toplam maya-küf; ±: standart sapma;

a-c: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir; A-D: Aynı satırdaki birbirinden farklı büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir.

Tablo 27'den de görülebildiği gibi, kaşar peynirlerinin depolama öncesi MK sayısı 2.27 log kob/g olarak bulunmuştur. CRV-MMT ve CRV-HNT, depolamanın 20. gününden 30. gününe kadar kaşar peynirlerinin MK düzeylerini istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) derecede azaltmıştır. CRV-HNT hariç tüm örneklerin MK yüklerinde depolama sırasında önemli düzeyde ($P<0.05$) artış görülmüştür. CRV-HNT ise MK gelişimini sınırlandırmış ve bu örneğin MK yükünde istatistiksel olarak önemli ($P>0.05$) bir artış meydana gelmemiştir. Bu örnekte 30 günlük depolama sonucu MK yükü 2.33 log kob/g olarak tespit edilmiştir.

Kaşar peynirlerinin doğal *S. aureus* yükleri ve depolama sürecindeki değişimleri ve ANF'lerin *S. aureus* üzerindeki etkileri, Tablo 28'de verilmiştir.

Tablo 28. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen kaşar peynirlerinin *S. aureus* yükünün depolama sırasındaki değişimi.

Süre (Gün)	<i>S. aureus</i> sayısı (log kob/g)					
	Kontrol	CRV-MMT	CRV-HNT	EUG-MMT	THY-MMT	THY-HNT
0	<1.00 ^{Aa}	<1.00 ^{Aa}	<1.00 ^{Aa}	<1.00 ^{Aa}	<1.00 ^{Aa}	<1.00 ^{Aa}
10	<1.00 ^{Aa}	<1.00 ^{Aa}	<1.00 ^{Aa}	<1.00 ^{Aa}	<1.00 ^{Aa}	<1.00 ^{Aa}
20	<1.00 ^{Aa}	<1.00 ^{Aa}	<1.00 ^{Aa}	<1.00 ^{Aa}	<1.00 ^{Aa}	<1.00 ^{Aa}
30	<1.00 ^{Aa}	<1.00 ^{Aa}	<1.00 ^{Aa}	<1.00 ^{Aa}	<1.00 ^{Aa}	<1.00 ^{Aa}

Kontrol: Nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit;

a-b: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir; A-B: Aynı satırdaki birbirinden farklı büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir.

Tablo 28'den anlaşıldığı gibi, depolama başlangıcı ya da sonrasında herhangi bir örnekte *S. aureus* gelişimi gözlenmemiştir.

3.5.1.2. ANF'lerin *Aspergillus niger* yükü üzerindeki etkisi

Bu araştırmada, doğal mikrobiyal yükün yanında kaşar peynirinde çoğalarak ürünü tüketilemez hale getirebilen mikroorganizma gruplarından küfler, üzerinde ANF'lerin etkisi de araştırılmıştır. Bu amaçla, dilimlenmiş kaşar peynirlerine ~3.00 log kob/g düzeyinde *A. niger* kontamine edilmiş ve dilimlerin geniş yüzeyleri ANF'ler ile kapatılmıştır. Örnekler 30 gün süre ile depolanarak *A. niger* yükündeki değişim tespit edilmiştir. Tablo 29'da, kaşar peynirlerine kontamine edilen *A. niger* üzerinde farklı ANF'lerin 30 günlük depolama sırasındaki etkisi verilmiştir.

Tablo 29. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen kaşar peynirine inoküle edilen *Aspergillus niger* sayısının depolama sırasındaki değişimi.

Süre (Gün)	<i>A. niger</i> sayısı (log kob/g)					
	Kontrol	CRV-MMT	CRV-HNT	EUG-MMT	THY-MMT	THY-HNT
0	3.01±0.68 ^{ca}	3.01±0.68 ^{ba}	3.01±0.68 ^{ca}	3.01±0.68 ^{ca}	3.01±0.68 ^{ca}	3.01±0.68 ^{ca}
10	3.64±0.41 ^{bcAB}	3.37±0.55 ^{baBC}	3.10±0.17 ^{aBC}	2.50±0.58 ^{aC}	3.85±0.67 ^{ba}	3.33±0.48 ^{aABC}
20	4.53±0.43 ^{abA}	3.77±0.23 ^{baBC}	2.77±0.68 ^{aC}	3.00±0.00 ^{aBC}	4.00±0.00 ^{baB}	3.20±0.17 ^{aBC}
30	5.30±0.00 ^{aA}	5.15±0.21 ^{aA}	2.17±0.19 ^{bB}	2.69±0.09 ^{aB}	5.00±0.00 ^{aA}	3.00±0.24 ^{aB}

Kontrol: Nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; ±: standart sapma;

a-c: Aynı sütündeki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir; A-C: Aynı satırdaki birbirinden farklı büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir.

Tablo 29'dan da görülebildiği gibi, herbiri yaklaşık 20 g ağırlığında olan kaşar peyniri dilimlerine inoküle edilen *A. niger* sayısı 3.01 log kob/g olarak belirlenmiş, saf LDPE filmle sarılmış kontrol grubu örneğinin yanı sıra CRV-MMT ve THY-MMT ile sarılan örneklerinin *A. niger* yükleri üzerinde depolama sürecinde herhangi bir inhibisyon gerçekleşmemiş ve sürekli bir yükseliş görülmüş, fungal yükte ise ortalama 2 log düzeyinde bir artış meydana gelmiştir. Ancak EUG-MMT ve THY-HNT filmleri, ölçülebilir düzeyde bir fungistatik etki göstermiş, CRV-HNT filmleri ise *A. niger* sayısını 2.17 log kob/g'a kadar indirmiştir. CRV-HNT ile sarılan kaşar peyniri örneğinin fungal yükü, depolamanın ilk 20 gününde istatistiksel olarak bir değişim ($P>0.05$) göstermezken 20. gün sonrasında 30. güne kadar düşüş eğiliminde olmuştur (Tablo 29).

3.5.1.3. ANF'lerin *Listeria monocytogenes* yükü üzerindeki etkisi

Bu çalışmada, özellikle çiğ süt ve yumuşak peynir gibi çeşitli süt ürünlerinde bulunarak insanlarda hasalağa yol açan önemli gıda kaynaklı patojenlerden bir tanesi olan *L. monocytogenes* üzerine ANF'lerin etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, yüzeylerine ~5.00 log kob/g düzeyinde *L. monocytogenes* kontamine edilmiş kaşar dilimleri, ANF'ler ile vakum paketlenmiş ve depolama sürecindeki *L. monocytogenes* gelişimi takip edilmiştir. Tablo 30'da, kaşar peynirine kontamine edilmiş olan *L. monocytogenes* yüküne farklı ANF'ler ile vakum ambalajlamanın etkisi verilmiştir.

Tablo 30. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen kaşar peynirine inoküle edilen *Listeria monocytogenes* sayısının depolama sırasındaki değişimi.

Süre (Gün)	<i>L. monocytogenes</i> sayısı (log kob/g)					
	KONTROL	CRV-MMT	CRV-HNT	EUG-MMT	THY-MMT	THY-HNT
0	5.19±0.26 ^{aA}	5.19±0.26 ^{aA}	5.19±0.26 ^{aA}	5.19±0.26 ^{aA}	5.19±0.26 ^{aA}	5.19±0.26 ^{aA}
10	4.72±0.14 ^{bA}	4.22±0.22 ^{bcC}	4.36±0.25 ^{bABC}	4.31±0.26 ^{bBC}	4.68±0.09 ^{bAB}	4.10±0.35 ^{bcC}
20	4.30±0.42 ^{cA}	3.99±0.24 ^{cA}	3.85±0.17 ^{cA}	3.86±0.19 ^{cA}	3.91±0.21 ^{cA}	4.09±0.38 ^{bA}
30	4.72±0.39 ^{bA}	4.55±0.20 ^{bA}	3.62±0.16 ^{cC}	4.13±0.34 ^{bcABC}	3.88±0.08 ^{cBC}	4.36±0.44 ^{bAB}

Kontrol: Nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; ±: standart sapma;

a-c: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir; A-C: Aynı satırdaki birbirinden farklı büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir.

Tablo 30'dan da görülebildiği gibi, kaşar peynirlerinin depolama öncesi *L. monocytogenes* sayısı 5.29 log kob/g olup saf LDPE film ile ambalajlanan kontrol örneği dâhil tüm örneklerin *L. monocytogenes* sayıları, 30 günlük depolama sırasında önemli derecede ($P<0.05$) azalmıştır. CRV-HNT ve THY-MMT ile ambalajlanan örneklerde depolama sonrasında tespit edilen *L. monocytogenes* sayısı, saf LDPE filmle ambalajlanmış kontrol örneğine göre istatistiksel olarak daha düşük ($P<0.05$) bulunmuştur. Kontrol örneği ile CRV-MMT, EUG-MMT ve THY-HNT ile ambalajlanan örneklerin *L. monocytogenes* sayıları arasında depolama sonunda istatistiksel olarak herhangi bir fark ($P>0.05$) bulunmamıştır.

3.5.1.4. ANF'lerin kaşar peynirinin pH'sı üzerindeki etkisi

Kaşar peyniri gibi gıda maddelerinde mikrobiyal gelişim sonucu değişebilen ve raf ömürleri üzerinde etkili olan fizikokimyasal özelliklerden bir tanesi de pH derecesidir. Bu çalışmada üretilen farklı ANF'lerle ambalajlanmış kaşar peynirlerinin depolanmaları sırasında pH değerlerinde meydana gelen değişim Tablo 31'de verilmiştir.

Tablo 31. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen kaşar peynirinin pH değerinin depolama sırasındaki değişimi.

Süre (Gün)	pH değeri					
	Kontrol	CRV-MMT	CRV-HNT	EUG-MMT	THY-MMT	THY-HNT
0	5.52±0.07 ^{aA}	5.52±0.07 ^{aA}	5.52±0.07 ^{aA}	5.52±0.07 ^{aA}	5.52±0.07 ^{aA}	5.52±0.07 ^{aA}
10	5.24±0.02 ^{bC}	5.39±0.03 ^{bAB}	5.31±0.07 ^{bBC}	5.39±0.01 ^{bAB}	5.36±0.06 ^{bAB}	5.41±0.03 ^{abA}
20	5.27±0.04 ^{bB}	5.25±0.02 ^{cBC}	5.18±0.02 ^{bcBC}	5.25±0.01 ^{cBC}	5.15±0.05 ^{cC}	5.43±0.07 ^{aA}
30	5.28±0.03 ^{bAB}	5.18±0.03 ^{Cc}	5.17±0.05 ^{cC}	5.23±0.03 ^{cBC}	5.34±0.02 ^{bA}	5.29±0.01 ^{bAB}

KONTROL: Nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; ±: standart sapma;

a-e: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir; A-D: Aynı satırdaki birbirinden farklı büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir.

Tablo 31'den de görülebildiği gibi, depolama öncesinde peynirin başlangıç pH değeri 5.52 olarak tespit edilmiştir. Tüm örneklerin pH değerleri depolama sırasında istatistiksel olarak önemli derecede ($P<0.05$) bir düşüş göstermiş ve 5.17 ile 5.34 arasında değişmiştir. Depolama sonrasında istatistiksel olarak en yüksek ($P<0.05$) pH değerleri sırasıyla 5.28, 5.29 ve 5.34 ile LDPE, THY-HNT ve THY-MMT filmlerle sarılmış örneklerde meydana gelmiştir.

3.5.2. Kıyma

Bu çalışmada üretilen aktif madde yüklenmiş nanokil takviyeli ambalaj materyallerinin gerçek gıda maddeleri üzerindeki etkinliğinin belirlenmesi amacıyla seçilen gıdalardan bir tanesi de taze sığır etinden elde edilen kıymadır. Çalışma kapsamında ANF'lerin kıymanın doğal mikrobiyal yükü, TBA ve pH değeri ile kıymaya inoküle edilen *Escherichia coli* O157:H7'nin canlılığı üzerine etkisi araştırılmıştır.

3.5.2.1. ANF'lerin kıymanın doğal mikrobiyal yükü üzerindeki etkisi

Bu çalışmada üretilen farklı ANF'lerle paketlenmenin kıymanın TMAB yükü üzerindeki etkisi Tablo 32'de verilmiştir.

Tablo 32. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen kıymaların toplam mezofilik aerobik bakteri yükünün (TMAB) depolama sırasındaki değişimi.

Süre (Gün)	TMAB yükü (log kob/g)			
	Kontrol	CRV-MMT	EUG-MMT	THY-HNT
0	5.18±0.43 ^{dA}	5.18±0.43 ^{dA}	5.18±0.43 ^{dA}	5.18±0.43 ^{dA}
1	6.93±0.20 ^{cA}	6.59±0.58 ^{cA}	6.76±0.03 ^{cA}	6.82±0.10 ^{cA}
4	9.77±0.06 ^{bA}	9.69±0.03 ^{bA}	9.02±0.11 ^{bB}	9.14±0.02 ^{bB}
7	11.00±0.23 ^{aA}	10.96±0.27 ^{aA}	10.99±0.08 ^{aA}	10.79±0.05 ^{aA}

Kontrol: Nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; ; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; TMAB: toplam mezofilik aerobik bakteri; ±: standart sapma; a-d: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark (P<0.05) olduğunu göstermektedir; A-B: Aynı satırdaki birbirinden farklı büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark (P<0.05) olduğunu göstermektedir.

Tablo 32'den de görülebildiği gibi, başlangıçta 5.18 log kob/g olan TMAB yükü, 7 günlük depolama sırasında tüm örneklerde önemli düzeyde (yaklaşık 4-5 log, P<0.05) artış göstermiştir. Depolamanın 4. gününe kadar EUG-MMT ve THY-HNT filmlerle sarılmış kıyma örneklerinin TMAB yükleri, saf LDPE ile ambalajlanmış kontrol ile CRV-MMT ile sarılmış örneklerin yüklerinden istatistiksel olarak daha düşük (P<0.05) bulunmuştur. Depolama sonrasında ise saf LDPE film ve ANF'ler ile paketlenen örneklerin TMAB sayıları arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık (P<0.05) gözlenmemiştir (Tablo 32).

Kıymaların çalışmada kullanılan ANF'lerle ambalajlandıktan sonra depolanmaları sırasında LAB yüklerinde meydana gelen değişim, Tablo 33'te verilmiştir.

Tablo 33. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen kıymaların laktik asit bakterisi (LAB) sayısının depolama sırasındaki değişimi.

Süre (Gün)	LAB yükü (log kob/g)			
	Kontrol	CRV-MMT	EUG-MMT	THY-HNT
0	3.42±0.13 ^{dA}	3.42±0.13 ^{dA}	3.42±0.13 ^{dA}	3.42±0.13 ^{dA}
1	5.59±0.13 ^{cA}	5.25±0.04 ^{cB}	4.37±0.17 ^{cC}	5.20±0.09 ^{cB}
4	7.06±0.35 ^{bA}	6.80±0.10 ^{bA}	6.72±0.12 ^{bA}	6.90±0.19 ^{bA}
7	8.94±0.12 ^{aA}	8.22±0.06 ^{Ab}	8.08±0.14 ^{aB}	7.75±0.16 ^{aC}

KONTROL: Nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; ; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; LAB: Laktik asit bakterisi; ±: standart sapma; a-d: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark (P<0.05) olduğunu göstermektedir; A-B: Aynı satırdaki birbirinden farklı büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark (P<0.05) olduğunu göstermektedir.

Tablo 33'ten de görülebildiği gibi, kıyılmış etlerin LAB yükleri depolamanın başlangıcında 3.42 log kob/g olarak tespit edilmiştir. ANF'ler depolama sırasında kontrol örneğine kıyasla LAB gelişimini istatistiksel olarak önemli (P<0.05) derecede yavaşlatmıştır. Depolama sonrasında THY-HNT ile ambalajlanan kıyma örneğinde

oluşan LAB yükü, kontrol grubu olarak hazırlanan saf LDPE içerisindeki kıymaya kıyasla 1.19 log daha düşük bulunmuştur.

Bu araştırmada elde edilen ANF'lerle paketlenmiş kıymaların doğal *Enterobacteriaceae* yükleri ve bunların depolama sırasındaki değişimi, Tablo 34'te görülmektedir.

Tablo 34. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen kıymaların toplam *Enterobacteriaceae* yükünün depolama sırasındaki değişimi.

Süre (Gün)	<i>Enterobacteriaceae</i> sayısı (log kob/g)			
	Kontrol	CRV-MMT	EUG-MMT	THY-HNT
0	2.39±0.10 ^{dA}	2.39±0.10 ^{dA}	2.39±0.10 ^{dA}	2.39±0.10 ^{dA}
1	4.28±0.02 ^{cC}	4.52±0.09 ^{cAB}	4.40±0.09 ^{cBC}	4.64±0.01 ^{cA}
4	6.53±0.04 ^{bA}	6.46±0.06 ^{bA}	6.26±0.34 ^{bA}	6.16±0.06 ^{bA}
7	8.58±0.08 ^{aB}	8.54±0.09 ^{Ab}	8.86±0.03 ^{aA}	7.71±0.04 ^{aC}

Kontrol: Nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; ±: standart sapma;
a-d: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark (P<0.05) olduğunu göstermektedir; A-B: Aynı satırdaki birbirinden farklı büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark (P<0.05) olduğunu göstermektedir.

Tablo 34'ten de anlaşıldığı gibi, kıyılmış etin başlangıç *Enterobacteriaceae* yükü 2.39 olarak tespit edilmiştir. Örneklerin *Enterobacteriaceae* sayılarında 5 log'un üzerinde bir artış gerçekleşmiştir. Depolama sırasındaki istatistiksel olarak en büyük (P<0.05) artış 8.86 log kob/g son yük ile EUG-MMT'de gerçekleşmiş ve THY-HNT ise saf LDPE ambalaj ile paketlenmiş kontrol örneğine göre depolama sonrası toplam *Enterobacteriaceae* yükünü istatistiksel olarak önemli derecede (P<0.05) düşürmüştür (Tablo 34).

3.5.2.2. ANF'lerin kıymada *E. coli* O157:H7 üzerindeki etkisi

Kıyma örneklerine *E. coli* O157:H7 kontamine edilmiş ve ANF'lerin bu bakteri üzerindeki etkisi tespit edilmiştir. Tablo 35, farklı ANF'ler ile paketlenmiş kıymalarda depolama sürecinde *E. coli* O157:H7 yükünde meydana gelen değişimi göstermektedir.

Tablo 35. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen kıyılmış etlere inoküle edilen *E. coli* O157:H7 sayısının depolama sırasındaki değişimi.

Süre (Gün)	<i>E. coli</i> O157:H7 sayısı (log kob/g)			
	Kontrol	CRV-MMT	EUG-MMT	THY-HNT
0	4.90±0.08 ^{dA}	4.90±0.08 ^{dA}	4.90±0.08 ^{dA}	4.90±0.08 ^{dA}
1	6.56±0.13 ^{cA}	6.32±0.07 ^{cAB}	6.20±0.13 ^{cB}	6.24±0.10 ^{cB}
4	7.87±0.13 ^{bA}	7.50±0.19 ^{bBC}	7.25±0.15 ^{bC}	7.68±0.22 ^{bAB}
7	9.43±0.19 ^{aA}	9.12±0.19 ^{aAB}	8.98±0.11 ^{aB}	8.42±0.17 ^{Cc}

Kontrol: Nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; ±: standart sapma;

a-d: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark (P<0.05) olduğunu göstermektedir; A-B: Aynı satırdaki birbirinden farklı büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark (P<0.05) olduğunu göstermektedir.

Tablo 35'de görüldüğü gibi, başlangıçta 4.90 log kob/g olan *E. coli* O157:H7 yükü, tüm örneklerde depolama sürecinde istatistiksel olarak önemli düzeyde (P<0.05) artış göstermiştir. THY-HNT, depolama sonrasında *E. coli* O157:H7 yükünü diğer örneklerle göre önemli derecede (P<0.05) daha düşük sayılarda tutmuştur. Saf LDPE ile paketlenmiş kıyma (kontrol örneği) ve CRV-MMT ile ambalajlanmış kıyma örneklerinin *E. coli* O157:H7 sayıları arasında depolama sonrasında herhangi bir istatistiksel farklılık (P>0.05) bulunmamıştır (Tablo 35).

3.5.2.3. ANF'lerin kıymada TBA oluşumu üzerindeki etkisi

Çalışmada kullanılan ANF'ler ile paketlenmiş kıyma örneklerinde ANF'lerin lipid oksidasyonunun önlenmesi üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla kıymalarda depolama süresince TBA testi yapılmıştır. Farklı ANF'lerle paketlenen kıymaların TBA değerlerindeki değişim Tablo 36'da verilmiştir.

Tablo 36. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen kıyılmış etlerde TBA değerinin depolama sırasındaki değişimi.

Gün	TBA (mg MDA/kg)			
	Kontrol	CRV-MMT	EUG-MMT	THY-HNT
0	0.213±0.021 ^{cdA}	0.213±0.021 ^{dA}	0.213±0.021 ^{cA}	0.213±0.021 ^{dA}
1	0.266±0.032 ^{cAB}	0.275±0.012 ^{cAB}	0.325±0.032 ^{bA}	0.308±0.026 ^{cA}
4	0.435±0.070 ^{bA}	0.355±0.011 ^{bB}	0.345±0.037 ^{bB}	0.348±0.001 ^{bB}
7	1.807±0.507 ^{aA}	1.759±0.684 ^{aA}	0.622±0.090 ^{aB}	0.411±0.020 ^{aC}

Kontrol: Nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; TBA: Tiyoobar bitürik asit; MDA: Malondialdehit; ±: standart sapma;

a-d: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark (P<0.05) olduğunu göstermektedir; A-B: Aynı satırdaki birbirinden farklı büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark (P<0.05) olduğunu göstermektedir.

Tablo 36'da görüldüğü gibi, depolamanın başlangıcında kıyılmış etin TBA değeri 0.213 mg MDA/kg olarak tespit edilmiştir. Depolama sırasında tüm örneklerin TBA

değerlerinde istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) artışlar meydana gelmiştir. Depolamanın 4. gününe kadar CRV-MMT, EUG-MMT ve THY-HNT ile ambalajlanan kıymalarda elde edilen TBA değeri, saf LDPE film ile ambalajlanmış kıyma örneğine kıyasla istatistiksel olarak daha düşük ($P<0.05$) bulunmuş, ancak kontrol örneği ile CRV-MMT ile paketlenmiş örneğin TBA değeri 4. günden sonra çok hızlı bir yükseliş göstermiştir. Depolamanın 7. günü sonunda istatistiksel olarak en düşük ($P<0.05$) TBA değeri, THY-HNT ile ambalajlanan kıyılmış et örneğinde saptanmıştır (Tablo 36).

3.5.2.4. ANF'lerin kıymanın pH değeri üzerindeki etkisi

Kıymalarda ölçülebilecek kalite parametrelerinden bir tanesi de kıymaların pH değeridir. Bu çalışmada üretilen farklı ANF'lerle paketlenmiş kıyılmış etlerin pH değerlerindeki değişim Tablo 37'de verilmiştir.

Tablo 37. Farklı ANF'lerle paketlenen kıyılmış etlerde pH değerinin depolama sırasındaki değişimi.

Süre (Gün)	pH değeri			
	Kontrol	CRV-MMT	EUG-MMT	THY-HNT
0	6.15±0.03 ^{aA}	6.15±0.03 ^{aA}	6.15±0.03 ^{aA}	6.15±0.03 ^{aA}
1	6.08±0.02 ^{bA}	6.09±0.04 ^{aA}	6.07±0.01 ^{aA}	6.07±0.03 ^{bA}
4	6.07±0.02 ^{bA}	6.08±0.05 ^{aA}	5.96±0.04 ^{bB}	5.83±0.02 ^{cC}
7	6.07±0.02 ^{bA}	5.83±0.11 ^{bB}	5.64±0.06 ^{cC}	5.59±0.03 ^{dC}

Kontrol: Nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; ±: standart sapma;

a-d: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir; A-C: Aynı satırdaki birbirinden farklı olan büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir.

Yukarıdaki tabloda görüldüğü gibi, kıymanın paketlenme öncesi pH değeri 6.15 olarak tespit edilmiştir. Depolama sırasında tüm kıyma örneklerinin pH değerlerinde istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) derecede düşüş olduğu belirlenmiştir. Saf LDPE ile ambalajlanan kıyma örneğinin (kontrol) pH değeri, depolamanın 1. gününden itibaren sabit kalırken ($P>0.05$), depolama sonrasında istatistiksel olarak en düşük ($P<0.05$) pH değerleri 5.59 ve 5.64 ile sırasıyla THY-HNT ve EUG-MMT'de tespit edilmiştir (Tablo 37).

3.5.3. Sucuk

Sucuk, ülkemize özgü ve ülkemizde tüketilmekte olan en yaygın et ürünlerinden bir tanesidir. Sucuk ülkemizde yaygın olarak ticari olarak yarı fermente ısıtılmış işlem görmüş et

ürünü olarak üretilmektedir. Geleneksel sucuk üretimi ise hammaddelerden gelen doğal mikrofloranın rol oynadığı fermentasyon yoluyla gerçekleştirilmekte ve herhangi bir ısı işlem uygulanmamaktadır. Dolayısıyla hem kurutma işleminin uygulanmaması hem de doğal mikrofloranın hala canlı olması nedeniyle fermente sucuk, ısı işlem görmüş sucuğa göre daha kısa bir raf ömrüne sahiptir. Bu çalışmada, doğal kılıfı içerisinde 12 gün süreyle doğal fermentasyona tabi tutulan sucuk, fermentasyon sonrasında kılıflarından çıkarılarak dilimlenmiş ve araştırmada üretilen aktif nanokompozit filmler kullanılarak vakum paketlenmiştir. Paketlenen sucuklar 30 gün süre ile 10 °C'de depolanmış ve doğal mikrobiyal yükü ile pH ve TBA değerlerindeki değişim takip edilmiştir.

3.5.3.1. Sucuğun fermentasyonu ile doğal yükü, pH'sı ve TBA değerinde meydana gelen değişimler

Sucuk hamuru, formülasyona uygun olarak karıştırıldıktan sonra kılıflara doldurulmuş ve 12 gün süreyle doğal fermentasyona tabi tutulmuştur. Tablo 38'de, fermentasyon sırasında sucuğun doğal mikrobiyal yükü, TBA ve pH değerinde meydana gelen değişimleri gösterilmiştir.

Tablo 38. Sucukta fermentasyon öncesi ve sonrasında mikrobiyal yükü, TBA ve pH değerinde meydana gelen değişimler.

	Mikrobiyal yük (log kob/g)					TBA (mg MDA/kg)	pH
	TMAB	LAB	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>S. aureus</i>	MK		
Önce	6.34±0.07 ^b	6.89±0.02 ^b	4.62±0.19 ^b	<1.00 ^a	2.81±0.09 ^b	0.142±0.002 ^a	5.74±0.01 ^a
Sonra	10.22±0.08 ^a	9.89±0.14 ^a	<1.00 ^a	<1.00 ^a	6.59±0.22 ^a	0.133±0.009 ^b	4.97±0.08 ^b

TMAB: Toplam mezofilik aerobik bakteri; LAB: Laktik asit bakterileri; MK: Maya-küf; MDA: Malondialdehit; a-b: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark (P<0.05) olduğunu göstermektedir.

Tablo 38'den de görülebildiği gibi, sucuğun fermentasyonu ile TMAB, MK ve LAB yükü önemli (P<0.05) düzeyde artış göstermiş, *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerin toplam sayısı ise fermentasyon öncesinde 4.62 log kob/g iken fermentasyon sırasında bu bakteriler tamamen inhibisyona uğramıştır. *S. aureus* sucuk hamuru ve fermente olmuş sucukta tespit edilmemiştir. Sucuğun pH'sı fermentasyon ile 5.74'ten 4.97'ye gerilemiş, söz konusu değişim istatistiksel olarak önemli (P<0.05) bulunmuştur. TBA değeri ise fermentasyon öncesinde 0.142 iken fermentasyondan sonra 0.133 olarak saptanmıştır ve yine bu değişim istatistiksel olarak önemli (P<0.05) bulunmuştur.

3.5.3.2. ANF'lerin dilimlenmiş sucuğun doğal mikrobiyal yükü üzerindeki etkisi

Fermentasyonun ardından aseptik şartlarda kılıflarından çıkarılan sucuklar, dilimlendikten sonra yine aseptik şartlarda ANF'lerle vakum ambalajlanmış ve 10 °C'de 30 gün süreyle depolanmıştır. Depolama sürecinde sucuğun doğal mikrobiyal yükünde meydana gelen gelişmeler takip edilmiştir. Yapılan analizlerde, depolama boyunca hiçbir sucuk örneğinde *Enterobacteriaceae* ve *S. aureus* tespit edilememiştir (<1.00 log kob/g). Tablo 39'da ise, farklı ANF'lerle ambalajlanmış sucuklarda TMAB sayısının depolama ile değişimi verilmiştir.

Tablo 39. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen dilimlenmiş sucukların toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayısının depolama sırasındaki değişimi.

Süre (Gün)	TMAB yükü (log kob/g)					
	Kontrol	CRV-MMT	CRV-HNT	EUG-MMT	THY-MMT	THY-HNT
0	10.22±0.08 ^{bA}	10.22±0.08 ^{aA}	10.22±0.08 ^{aA}	10.22±0.08 ^{aA}	10.22±0.08 ^{aA}	10.22±0.08 ^{aA}
10	10.42±0.14 ^{bA}	9.96±0.11 ^{abBC}	10.14±0.12 ^{aB}	10.16±0.14 ^{aAB}	9.46±0.10 ^{bD}	9.78±0.12 ^{bC}
20	10.73±0.19 ^{aA}	9.85±0.21 ^{bcB}	9.90±0.06 ^{bB}	9.94±0.42 ^{aB}	9.05±0.12 ^{cC}	9.70±0.10 ^{bB}
30	10.78±0.06 ^{aA}	9.62±0.08 ^{cCD}	9.73±0.13 ^{cC}	10.16±0.11 ^{aB}	8.91±0.09 ^{cE}	9.47±0.05 ^{cD}

Kontrol: Nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; TMAB: Toplam mezofilik aerobik bakteri; ±: standart sapma;

a-c: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark (P<0.05) olduğunu göstermektedir; A-D: Aynı satırdaki birbirinden farklı büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark (P<0.05) olduğunu göstermektedir.

Yukarıdaki tabloya göre, başlangıçta 10.22 log kob/g olan TMAB sayısı, depolama sırasında LDPE ile ambalajlanmış kontrol örneğinde istatistiksel olarak önemli (P<0.05) düzeyde artış gösterirken, EUG-MMT ile ambalajlanmış sucukta önemli bir artış gözlenmemiştir (P>0.05). CRV-MMT, CRV-HNT, THY-MMT ve THY-HNT ile ambalajlanmış sucuklarda ise TMAB yükünde istatistiksel olarak önemli (P<0.05) azalmalar meydana gelmiştir. Depolama sonunda en düşük TMAB sayısı, 8.91 log kob/g ile THY-MMT örneğinde saptanmıştır (Tablo 39).

Bu araştırmada üretilen farklı ANF'lerle yapılan vakum ambalajlama işleminin dilimlenmiş sucukların LAB yüklerinde meydana getirdikleri değişim Tablo 40'ta verilmiştir.

Tablo 40. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen dilimlenmiş sucukların laktik asit bakterisi (LAB) sayısının depolama sırasındaki değişimi.

Süre (Gün)	LAB yükü (log kob/g)					
	Kontrol	CRV-MMT	CRV-HNT	EUG-MMT	THY-MMT	THY-HNT
0	9.89±0.14 ^{aA}	9.89±0.14 ^{aA}	9.89±0.14 ^{aA}	9.89±0.14 ^{aA}	9.89±0.14 ^{aA}	9.89±0.14 ^{aA}
10	9.94±0.08 ^{aA}	9.72±0.12 ^{aB}	9.08±0.10 ^{bD}	9.40±0.09 ^{bC}	8.86±0.12 ^{bD}	9.46±0.07 ^{bC}
20	10.11±0.36 ^{aA}	9.62±0.18 ^{aB}	8.75±0.23 ^{cC}	9.03±0.47 ^{bC}	8.73±0.20 ^{bC}	9.64±0.11 ^{bB}
30	10.11±0.10 ^{aA}	8.69±0.36 ^{bC}	8.77±0.13 ^{cC}	9.33±0.29 ^{bB}	8.90±0.22 ^{bC}	8.66±0.19 ^{cC}

Kontrol: Nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; LAB: Laktik asit bakterisi; ±: standart sapma;
a-c: Aynı sütündeki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark (P<0.05) olduğunu göstermektedir; A-D: Aynı satırdaki birbirinden farklı büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark (P<0.05) olduğunu göstermektedir.

Tablo 40'tan da görülebildiği gibi, depolama başlangıcında 9.89 log kob/g olarak tespit edilen LAB sayısı, LDPE ile ambalajlanmış sucukta (kontrol grubu) depolama sırasında istatistiksel olarak önemli (P>0.05) bir değişime uğramamıştır. Diğer tüm örneklerde ise LAB sayısında istatistiksel olarak önemli (P<0.05) azalmalar meydana gelmiştir. Depolama sonrası LAB sayıları göz önüne alındığında, ANF'ler kontrole kıyasla bakteri sayısını 0.78 log kob/g ve 1.45 log kob/g arasında değişen düzeylerde azaltmıştır.

Bu çalışmada elde edilen ANF'lerin dilimlenmiş sucukların MK yükleri üzerindeki etkisi, Tablo 41'de verilmiştir.

Tablo 41. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen dilimlenmiş sucukların toplam maya-küf (MK) sayısının depolama sırasındaki değişimi.

Süre (Gün)	MK yükü (log kob/g)					
	Kontrol	CRV-MMT	CRV-HNT	EUG-MMT	THY-MMT	THY-HNT
0	6.59±0.22 ^{cA}	6.59±0.22 ^{aA}	6.59±0.22 ^{aA}	6.59±0.22 ^{aA}	6.59±0.22 ^{aA}	6.59±0.22 ^{aA}
10	6.83±0.09 ^{bcA}	6.52±0.09 ^{abB}	6.55±0.09 ^{aAB}	6.64±0.18 ^{aAB}	6.51±0.13 ^{abB}	6.20±0.15 ^{abC}
20	7.13±0.28 ^{abA}	6.39±0.18 ^{abB}	6.61±0.38 ^{aAB}	6.61±0.15 ^{aAB}	6.50±0.11 ^{abAB}	6.11±0.54 ^{abB}
30	7.34±0.12 ^{aA}	6.20±0.09 ^{bD}	6.53±0.11 ^{aB}	6.45±0.11 ^{aBC}	6.24±0.05 ^{bCD}	5.85±0.14 ^{bE}

Kontrol: Nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; MK: Maya-küf; ±: standart sapma;
a-c: Aynı sütündeki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark (P<0.05) olduğunu göstermektedir; A-D: Aynı satırdaki birbirinden farklı büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark (P<0.05) olduğunu göstermektedir.

Yukarıdaki tablodan da (Tablo 41) anlaşıldığı gibi, depolama öncesinde sucukların MK yükü, 6.59 log kob/g olarak tespit edilmiştir. Kontrol örneğinin MK yükü depolama sırasında istatistiksel olarak önemli (P<0.05) derecede artarken, CRV-MMT, THY-MMT ve THY-HNT ile ambalajlanan sucuklarda istatistiksel olarak önemli (P<0.05)

azalmalar meydana gelmiştir. CRV-HNT ve EUG-MMT ise dilimlenmiş sucukların MK yükünde istatistiksel olarak herhangi bir azalma ya da artışa yol açmamıştır ($P>0.05$).

3.5.3.3. ANF'lerin dilimlenmiş sucukta TBA oluşumu üzerindeki etkisi

Sucuk gibi et ürünlerinde, kaliteyi sınırlandıran en önemli etmenlerden bir tanesi de lipid oksidasyonudur. Bu çalışmada, ANF'lerin sucukta lipid oksidasyonunu önleme konusundaki etkilerini belirlemek amacıyla TBA oluşumu test edilmiştir. Tablo 42'de, sucukların TBA değerleri üzerine farklı aktif ambalaj materyallerinin depolama sürecindeki etkisi verilmiştir.

Tablo 42. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen dilimlenmiş sucukların TBA değerinin depolama sırasındaki değişimi.

Süre (Gün)	TBA (mg MDA/kg)					
	Kontrol	CRV-MMT	CRV-HNT	EUG-MMT	THY-MMT	THY-HNT
0	0.133±0.009 ^{cA}	0.133±0.009 ^{bA}	0.133±0.009 ^{dA}	0.133±0.009 ^{cA}	0.133±0.009 ^{bA}	0.133±0.009 ^{bA}
10	0.142±0.003 ^{bcB}	0.133±0.001 ^{bc}	0.149±0.005 ^{cA}	0.133±0.002 ^{cC}	0.137±0.003 ^{bBC}	0.131±0.001 ^{bc}
20	0.155±0.004 ^{bB}	0.132±0.001 ^{bc}	0.172±0.005 ^{bA}	0.172±0.007 ^{bA}	0.144±0.006 ^{bBC}	0.144±0.009 ^{bBC}
30	0.233±0.010 ^{aA}	0.217±0.011 ^{aA}	0.227±0.009 ^{aA}	0.231±0.003 ^{aA}	0.215±0.005 ^{aA}	0.217±0.011 ^{aA}

Kontrol: Nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; TBA: Tiyobarbitürik asit; MDA: Malondialdehit; $\pm$: standart sapma; a-c: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir; A-D: Aynı satırdaki birbirinden farklı büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir.

Tablo 42'de görüldüğü gibi, fermente sucuğun TBA değeri depolamanın başlangıcında 0.133 mg MDA/kg olarak tespit edilmiştir. Saf LDPE ile paketlenmiş kontrol grubu dâhil tüm örneklerde TBA düzeyinin depolama sırasında istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) düzeyde artış gösterdiği saptanmıştır. CRV-MMT, THY-MMT ve THY-HNT, sucukların TBA seviyelerinin depolamanın 20. gününe kadar istatistiksel olarak önemli düzeyde ($P>0.05$) değişimine izin vermezken, CRV-HNT ile ambalajlanmış sucuk örneğinin TBA değeri sürekli artış göstermiştir.

3.5.3.4. ANF'lerin dilimlenmiş sucuğun pH değeri üzerindeki etkisi

Bu araştırmada, dilimlenmiş ve paketlenmiş sucukların depolama sürecinde takip edilen fizikokimyasal parametrelerinden bir tanesi de pH değerleridir. ANF'lerle ambalajlanmış sucukların pH değerlerinin depolama sürecindeki değişimi, Tablo 43'de verilmiştir.

Tablo 43. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen dilimlenmiş sucukların pH değerinin depolama sırasındaki değişimi.

Süre (Gün)	pH değeri					
	Kontrol	CRV-MMT	CRV-HNT	EUG-MMT	THY-MMT	THY-HNT
0	4.97±0.08 ^{aA}	4.97±0.08 ^{bA}	4.97±0.08 ^{aA}	4.97±0.08 ^{aA}	4.97±0.08 ^{aA}	4.97±0.08 ^{aA}
10	4.97±0.02 ^{aBC}	5.05±0.01 ^{aA}	4.90±0.03 ^{abD}	5.00±0.03 ^{aAB}	4.92±0.02 ^{abCD}	4.89±0.01 ^{abD}
20	4.94±0.01 ^{aB}	5.01±0.01 ^{abA}	4.87±0.02 ^{bC}	4.95±0.00 ^{abB}	4.86±0.01 ^{bC}	4.85±0.02 ^{bC}
30	4.95±0.04 ^{aA}	4.87±0.02 ^{cB}	4.89±0.01 ^{abAB}	4.86±0.01 ^{bB}	4.87±0.04 ^{bB}	4.90±0.01 ^{abAB}

Kontrol: Nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; $\pm$: standart sapma;

a-c: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir; A-D: Aynı satırdaki birbirinden farklı büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir.

Yukarıdaki tablodan da görülebildiği gibi, depolamanın başlangıcında sucuğun pH değeri 4.97 iken, 30 günlük depolama sonrasında ambalajlanmış örneklerin pH değerlerinin 4.86 ile 4.95 arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir. Depolama sonrasında saf LDPE ile paketlenmiş olan kontrol örneği, örnekler arasında istatistiksel olarak en yüksek ($P<0.05$) pH değerine sahip olmuş, diğer örneklerin pH değerleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı ($P>0.05$) bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo 43).

3.5.4. Domates salçası

Domates salçası gibi domatesten elde edilen ürünler, Akdeniz ülkelerinde yoğun olarak tüketilen önemli antioksidan kaynaklarıdır. Domates salçası ambalajı bozulmamış halde iken uzun süre muhafaza edilebilse de açıldıktan sonra yüzey kısmından küflenmeye başlamakta ve sonunda tüketilemez hale gelmektedir. Bu araştırmada, antifungal etkilerinin olduğu bilinen aktif maddeler ile üretilen ANF'ler, domates salçasında küf gelişiminin durdurulması/engellenmesi açısından test edilmiştir.

3.5.4.1. ANF'lerin salçada *A. niger* üzerindeki etkisi

Bu araştırmada, ANF'lerin salçalarda küf gelişimi üzerine etkisini ortaya koymak amacıyla taze domates salçasına ~ 4.00 log kob/g düzeyinde kontamine edilen *Aspergillus niger*'in 45 günlük depolama süresince gelişimi/inhibisyonu gözlemlenmiştir (Tablo 44).

Tablo 44. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen domates salçasının *Aspergillus niger* yükünün depolama sırasındaki değişimi.

Süre (Gün)	<i>A. niger</i> sayısı (log kob/g)					
	Kontrol	CRV-MMT	CRV-HNT	EUG-MMT	THY-MMT	THY-HNT
0	4.30±0.00 ^{bA}	4.30±0.00 ^{abA}	4.30±0.00 ^{aA}	4.30±0.00 ^{aA}	4.30±0.00 ^{aA}	4.30±0.00 ^{abA}
15	4.60±0.09 ^{abA}	4.15±0.17 ^{bAB}	4.23±0.38 ^{aAB}	4.34±0.08 ^{aAB}	4.06±0.13 ^{aB}	4.38±0.29 ^{abAB}
30	4.85±0.38 ^{aA}	4.10±0.21 ^{bA}	4.00±0.00 ^{aA}	4.50±0.58 ^{aA}	4.50±0.71 ^{aA}	4.00±0.00 ^{bA}
45	4.94±0.14 ^{aA}	4.69±0.23 ^{aA}	4.58±0.25 ^{aA}	4.88±0.10 ^{aA}	4.71±0.16 ^{aA}	4.56±0.22 ^{aA}

Kontrol: Nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; $\pm$: standart sapma;

a-c: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir; A-D: Aynı satırdaki birbirinden farklı büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir.

Tablo 44'ten de anlaşıldığı gibi, salçalara 4.30 log kob/g düzeyinde *A. niger* kontamine edilmiş, 45 günlük depolama sonrasındaki değişimleri göz önünde bulundurulduğunda, sadece LDPE ile ambalajlanmış kontrol grubu salça örneğindeki artış istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) bulunmuştur. THY-HNT ambalajı, *A. niger* yükünü 30. güne kadar başlangıca göre istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) düzeyde aşağıda tutmuştur, 30 günde ise küf sayısı tekrar istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) düzeyde yüksek bulunmuştur.

3.5.5. Parça et

Parça halindeki taze etler, kısa bir raf ömrüne sahip olan ve parlak kırmızı renginin hızla kaybolması sonrasında tüketiciler tarafından kabul edilebilirliği ortadan kalkan gıda maddeleridir. Taze etlerdeki diğer bir problem ise hayvanın kesilmesi, karkasın ayrılması ve parçalanması gibi çeşitli aşamalarda ete bulaşan patojen mikroorganizmalardan kaynaklanabilecek hastalıklardır. Çalışmanın bu bölümünde, ince dilimler halinde kesilmiş olan kırmızı et, geniş yüzeyi tamamen ANF'lerle kapatılacak şekilde ambalajlanmış ve etin 7 gün boyunca 4°C'de depolanması sırasında ete bulaştırılan *E. coli* O157:H7'nin canlılığı ve etin yüzey renginin değişimi takip edilmiştir.

3.5.5.1. ANF'lerin parça ette *Escherichia coli* O157:H7 üzerindeki etkisi

Parça ette *E. coli* O157:H7'in gelişimi üzerine çalışmada üretilen ambalajlamanın etkisi Tablo 45'te verilmiştir.

Tablo 45. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen parça etin *Escherichia coli* O157:H7 yükünün depolama sırasındaki değişimi.

Süre (Gün)	<i>E. coli</i> O157:H7 (log kob/g)					
	Kontrol	CRV-MMT	CRV-HNT	EUG-MMT	THY-MMT	THY-HNT
0	6.07±0.23 ^{cA}	6.07±0.23 ^{bA}	6.07±0.23 ^{cA}	6.07±0.23 ^{bA}	6.07±0.23 ^{aA}	6.07±0.23 ^{aA}
1	6.86±0.27 ^{bA}	6.26±0.11 ^{bBC}	6.70±0.27 ^{bA}	6.59±0.26 ^{aAB}	6.10±0.16 ^{aCD}	5.76±0.26 ^{abD}
4	8.55±0.22 ^{aA}	7.09±0.21 ^{aB}	7.08±0.21 ^{aB}	6.65±0.30 ^{aC}	5.85±0.24 ^{aD}	5.59±0.27 ^{bD}
7	8.29±0.29 ^{aA}	6.84±0.30 ^{aB}	6.71±0.24 ^{bB}	6.57±0.18 ^{aB}	5.15±0.16 ^{bD}	5.55±0.30 ^{bC}

Kontrol: Nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; ±: standart sapma;
a-c: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark (P<0.05) olduğunu göstermektedir; A-D: Aynı satırdaki birbirinden farklı büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark (P<0.05) olduğunu göstermektedir.

Tablo 45'den de görülebildiği gibi, etteki başlangıç bakteri sayısı 6.07 log kob/g olarak tespit edilmiştir. LDPE ile ambalajlanan kontrol örneğinde 7 gün içerisinde bakteri sayısında 2.22 log artış gözlenirken, CRV-MMT, CRV-HNT ve EUG-MMT ile paketlenmiş etlerde de istatistiksel olarak önemli (P<0.05) artışlar meydana gelmiştir. THY-MMT ve THY-HNT ise depolama sırasında *E. coli* O157:H7 sayısında istatistiksel olarak önemli (P<0.05) derecede azalma sağlamıştır. Depolamanın 7. gününde ANF'lerle sarılan ambalajlar ile kontrol ambalajı bakteri sayıları karşılaştırıldığında, tüm ANF'lerin bakteriyel inhibisyon konusunda etkili olduğu, en etkili ambalaj materyalinin ise THY-MMT olduğu anlaşılmaktadır.

3.5.5.2. ANF'lerin parça etin yüzey rengi üzerindeki etkisi

Bu araştırmada, taze etin önemli kalite parametrelerinden birisi olarak değerlendirilen renk özellikleri üzerine ANF'ler ile paketlemenin etkisi test edilmiştir. ANF'ler ile ambalajlanan etlerin Hunter renk özelliklerinin depolama sırasındaki değişimi Tablo 46'da verilmiştir.

Tablo 46. Farklı aktif nanokompozit filmlerle paketlenen parça etin renginin depolama sırasındaki değişimi.

ANF	Depolama (gün)			
	0	1	4	7
	Renk Değerleri			
	L^*			
Kontrol	37.80±0.73 ^{aA}	37.81±0.78 ^{aA}	37.58±0.34 ^{cAB}	36.67±0.81 ^{bcB}
CRV-MMT	37.80±0.73 ^{aA}	38.31±0.87 ^{aA}	38.90±0.62 ^{bA}	36.37±0.80 ^{cB}
CRV-HNT	37.80±0.73 ^{aA}	38.56±0.65 ^{aA}	38.45±0.94 ^{bcA}	38.82±0.80 ^{aA}
EUG-MMT	37.80±0.73 ^{aA}	36.29±0.87 ^{bb}	37.64±0.64 ^{cA}	36.94±0.62 ^{bcAB}
THY-MMT	37.80±0.73 ^{aA}	38.82±0.37 ^{aAB}	37.84±0.69 ^{bcAB}	37.24±0.88 ^{bcB}
THY-HNT	37.80±0.73 ^{aC}	39.02±0.86 ^{aB}	41.11±0.91 ^{aA}	37.83±0.58 ^{abBC}
	a^*			
Kontrol	18.06±0.69 ^{aB}	22.66±0.72 ^{abcA}	13.64±0.87 ^{cC}	13.61±0.62 ^{aC}
CRV-MMT	18.06±0.69 ^{aC}	24.74±0.95 ^{aA}	20.91±0.84 ^{aB}	14.65±1.21 ^{aD}
CRV-HNT	18.06±0.69 ^{aA}	20.44±0.32 ^{cB}	12.44±0.32 ^{cC}	13.45±0.85 ^{aC}
EUG-MMT	18.06±0.69 ^{aC}	22.88±1.21 ^{abA}	21.02±1.10 ^{aB}	10.95±0.55 ^{bd}
THY-MMT	18.06±0.69 ^{aB}	20.69±1.69 ^{bcA}	18.72±0.61 ^{bAB}	14.01±0.83 ^{aC}
THY-HNT	18.06±0.69 ^{aC}	23.66±1.46 ^{aA}	20.04±0.40 ^{abB}	11.30±0.72 ^{bd}
	b^*			
Kontrol	3.53±0.82 ^{aC}	7.40±0.53 ^{abcA}	6.01±0.39 ^{aB}	3.33±0.54 ^{bc}
CRV-MMT	3.53±0.82 ^{aC}	7.59±0.44 ^{abcA}	6.39±0.24 ^{aB}	3.42±0.40 ^{bc}
CRV-HNT	3.53±0.82 ^{aC}	6.56±0.28 ^{cA}	6.32±0.49 ^{aA}	5.16±0.74 ^{aB}
EUG-MMT	3.53±0.82 ^{aC}	7.08±0.75 ^{bcA}	6.86±0.49 ^{aA}	5.21±0.61 ^{aB}
THY-MMT	3.53±0.82 ^{aD}	8.31±0.60 ^{aA}	6.59±0.40 ^{aB}	5.04±0.68 ^{aC}
THY-HNT	3.53±0.82 ^{aD}	8.24±0.88 ^{abA}	6.83±0.54 ^{aB}	4.70±0.60 ^{aC}

Kontrol: Nanokil içermeyen saf LDPE film; CRV-MMT: Karvakrol yüklenmiş montmorillonit; CRV-HNT: Karvakrol yüklenmiş halloysit; EUG-MMT: Öjenol yüklenmiş montmorillonit; THY-MMT: Timol yüklenmiş montmorillonit; THY-HNT: Timol yüklenmiş halloysit; ±: standart sapma;

a-c: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir; A-D: Aynı satırdaki birbirinden farklı büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir.

Tablo 46'dan da görülebildiği gibi, depolama öncesinde parça etin L^* , a^* ve b^* değerleri sırasıyla 37.80, 18.06 ve 3.53 olarak bulunmuştur. Depolama sırasında farklı ambalajlarla paketlenmiş etin L^* değerinde belirgin bir değişim gözlenmemiş olup 36.37 ile 38.82 arasında değişen değerler ortaya çıkmıştır. a^* değeri, etin depolanması sırasında örnekler arasında önemli farklılıklar sergilemiştir. CRV-MMT, EUG-MMT ve THY-HNT ile ambalajlanan parça etler, depolamanın 1. ve 4. gününde diğer örneklerle kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek ($P<0.05$) a^* değerlerine sahip olmuştur. Saf LDPE film ile ambalajlanan kontrol grubu örneği ise, depolamanın 1. gününde hala yüksek bir a^* değerine sahipken, depolamanın 4. ve 7. günlerinde, 1. güne nazaran istatistiksel olarak daha düşük ($P<0.05$) a^* değeri ortaya çıkmıştır. Depolamanın son gününde, tüm örneklerin a^* değerleri, başlangıca göre istatistiksel olarak daha düşük ($P<0.05$) bulunmuş olup bu değerler 10.95 ile 14.65 arasında değişiklik göstermiştir. Tüm örnekler için b^* değerlerinde, depolamanın 1. gününde istatistiksel olarak önemli

($P < 0.05$) artışlar meydana gelmiştir. Bu değerler 4. güne kadar devam etmiş olup 4. gün tüm örneklerle ait b^* değerleri birbirleri ile istatistiksel olarak farksız ($P > 0.05$) bulunmuştur. Depolama sonunda, 4. güne kıyasla yine tüm örneklerin b^* değerlerinde istatistiksel olarak önemli ($P < 0.05$) azalmalar meydana gelmiştir.

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmanın ilk aşamasında, seçilen aktif maddeler [öjenol (EUG), timol (THY), karvakrol (CRV)] ile nanokiller [montmorillonit (MMT) ve halloysit (HNT)] karakterize edilmiş ve bu maddeler kullanılarak uygun sürfaktan (Tween 80) eşliğinde aktif kil nanopartikülleri (AKNP) üretilmiştir. Daha sonra, AKNP'lerin 7 farklı bakteriye karşı antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiştir. İkinci aşamada antimikrobiyal aktivitesi yüksek bulunan AKNP'ler kullanılarak aktif nanokompozit filmler (ANF) üretilmiş ve bunların bir dizi karakterizasyonları yapılmıştır. Üçüncü aşamada ise ANF'lerle bazı gıdalar paketlenmiş, bu gıdaların depolama sürecinde bazı kalite parametreleri takip edilmiştir. Böylece doğal aktif maddeler içeren, doğrudan gıda ambalajlamada kullanılabilecek ve klasik ambalajlara kıyasla gıdaların raf ömürlerini uzatacak bir ambalaj materyali elde edilmesi amaçlanmıştır.

4.1. Nanokillerin karakterizasyonu

Daha önceki bölümlerde de ifade edildiği gibi zetapotansiyel değerleri, koloidal sistemlerde koloid stabilitesinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada da, öncelikle nanokillerin farklı pH değerlerindeki yüzey zetapotansiyelleri belirlenmiştir. Yapılan araştırmalar, doğal haldeyken üst üste binmiş tabakalar halinde bulunan killerin tabaka yüzeylerinin yüksek bir negatif yükle yüklü olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada, hem MMT hem de HNT'nin yüzey zetapotansiyeli negatif bulunurken ve pH yükseldikçe daha da düşerken HNT'deki bu yöndeki değişimin daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 8). Literatürde, artan pH değeri ile koloidal partiküllerin negatif yüklerinde de bir artış olduğu ve böylece yüzey potansiyellerinin arttığı ifade edilmektedir [117-119]. Yüksek bir yüzey potansiyeli, koloidal partiküller arasında daha güçlü bir itme ve daha düşük bir agregasyon kinetiğini ifade etmektedir [117].

Rice ve Bergkvist [120], yaptıkları bir araştırmada, MMT'nin doğal bir çeşidi olan Cloisite Na⁺ kilinin farklı pH tamponlarındaki zetapotansiyellerini ölçmüşlerdir. HCl ile hazırlanan ve 1.75 pH değerine sahip bir ortamda güvenilir sonuçlar elde edilememekle birlikte, beklendiği gibi pH'ya bağlı olarak zetapotansiyel değerinin negatifliğinde önemli bir artış tespit edilmiştir. pH 4.5'te zetapotansiyel -18.5 mV olarak bulunurken, pH 9'a çıktığında bu değer -39.1 mV'ye gerilemiştir. Lee ve ark. [121] partikül boyutu 45 µm altında olan ve 92 mequiv/100g kasyon değişim kapasitesine sahip MMT'nin 3-12 pH arasındaki zetapotansiyelini ölçmüş ve -40 mV ile -50 mV arasında değerler kaydetmişlerdir. Verma ve ark. [122] tarafından yapılan başka bir çalışmada, bazı tabakalı (Cloisite Na⁺, bentone MA, ME-100, Nanomer PGV ve Delite LVF) ve tubüler (Halloysite ve Halloysite MP1) haldeki nanokillerin yüzey zetapotansiyelleri analiz edilmiş ve sonuçta zetapotansiyel değerlerinin -32.1 mV ile -52.3 mV arasında değiştiği saptanmıştır. Olivier ve ark. [123], farklı sürelerde sonikasyon uygulamalarının MMT zetapotansiyeli üzerindeki etkisini araştırmış ve 4 saatlik sonikasyon sonunda bile zetapotansiyelin -30 mV'nin altında olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Bu araştırmada, 60 dk sonrasında zetapotansiyelde meydana gelen artış ise tabakalar arasındaki pozitif yüklü Na⁺ iyonlarının süspansiyon içerisine dağılmalarına bağlanmıştır.

Nanokillerin zetapotansiyel değerleri üzerine yapılan bu çalışmada bulunan sonuçlar (Şekil 8) ile daha önceki araştırma sonuçları karşılaştırıldığında, sonuçların büyük benzerlikler gösterdiği görülmektedir. Killerin yüzeylerinin negatif yüklü olması ve pH değişimine bağlı olarak bu yapısını muhafaza etmesi, nanokillerin sulu koloidal ortamlarda iyi bir süspansiyon stabilitesine ve yavaş aglomerasyona sahip olduklarını göstermektedir.

Bu araştırmada, MMT'nin farklı pH değerlerine bağlı olarak ortalama partikül boyutları belirlenmiş, pH'nın partikül boyutu üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı ve MMT'nin partikül boyutunun 300 nm ile 400 nm arasında değiştiği ortaya konulmuştur. Bu sonuçlar da zetapotansiyel ölçümlerine benzer şekilde MMT'nin pH stabilitesini göstermektedir. Çok düşük pH'da (1.52) elde edilen yüksek boyut ise, pH'daki aşırı düşüşün kil partiküllerinde önemli bir aglomerasyona yol açığının bir göstergesidir.

Killerin partikül boyutunu belirlemek amacıyla birçok farklı araştırmacı tarafından çalışmalar yapılmış, bu çalışmalarda birbirinden farklı yöntemler kullanılmıştır. Partikül

boyutu ölçüm metotları arasında dinamik ışık saçılımı, lazer ışık kırılımı, elektron mikroskopisi, elektroforez, kromatografi, elüsyon gibi farklı uygulamalar yer almaktadır. Işık saçılımı; ortalama patikül boyutu, boyut dağılımı ve polidisperslik indeksi değerlerinin belirlenmesinde kullanılan hızlı bir yöntem olup dünyada yaygın rutin yöntemler arasındaki yerini almıştır [124]. Bu araştırmada da nanokillerde partikül boyutu ölçümü için dinamik ışık saçılımı yöntemi kullanılmıştır

Nanokillerden MMT, tabakalı yapıya sahip olup her bir tabaka kalınlığı yaklaşık 1 nm'dir. Bununla birlikte birkaç mikrondan yüzlerce mikrona kadar değişen tabaka genişliğine sahiptir [125].

MMT gibi silika kökenli killerin partikül boyutu ve boyut dağılımı, birçok araştırmacı tarafından analiz edilmiştir. Verma ve ark. [122] killerin partikül boyutlarını SEM ve TEM tekniklerini kullanarak analiz etmiş ve tabakalı yapıdaki Bentone MA'nın ortalama partikül boyutunun 91-312 nm, tübüler yapıdaki HNT'nin ise 453-1112 nm olduğunu rapor etmişlerdir. Lin ve ark. [126] sonikasyon işleminin MMT'nin ortalama partikül boyutu üzerindeki etkisini incelemiştir. Sonikasyon işlemi görmemiş MMT tabakaları ortalama 518 nm boyutta iken 3 dk'lık sonikasyonla %50'nin üzerinde küçülme gerçekleşmiş ve partikül boyutu 235 nm'ye düşmüştür. Bu çalışmada, 10 dk'ya kadar artan sonikasyon süresi ise partikül boyutunda herhangi bir ek azalmaya neden olmamıştır. Lee ve ark. [121] da MMT'nin 3 ve 12 arasında değişen farklı pH değerlerindeki ortalama partikül boyutunu analiz etmişlerdir. Sonuçta pH 5 ve 12 değerleri arasında stabil bir partikül boyutu elde edilmiş, pH 4'ün altına düştüğünde ise hızlı aglomerasyon gözlenmiştir.

Literatürde yer alan sonuçlar ile bu çalışmada elde edilen bulgular karşılaştırıldığında, sonuçların birbirleriyle uyumlu olduğu ve MMT'nin pH'ya bağlı olarak partikül boyutunda meydana gelen değişimlerin benzer bir seyir izlediği görülmektedir.

4.2. Aktif madde ve sürfaktanların karakterizasyonu

MMT ve diğer tabakalı killer, doğal yapıları itibarıyla hidrofiliktir. Bu durum, onların çoğu hidrofobik polimerler ile etkili bir şekilde karıştırılması ve etkileşim yeteneğini oldukça zayıflatmaktadır. Ayrıca tabaka yığınları, elektrostatik kuvvetlerden dolayı birbirleriyle oldukça sıkı bir etkileşim halindedirler [127-129]. Tüm bu sebeplerden

dolayı, eğer tabakalı killer kullanılarak nanokompozit üretilecekse, killerin bazı işlemlere tabi tutulması gerekmektedir. İşlem görmemiş bir kil, polimer matriksi ile iyi bir etkileşime giremez ve elde edilecek kompozit de ancak mikrokompozit olur. Kil yüzeyini modifiye etmenin kolay ve etkili bir yolu, geleneksel iyon değişim metodudur. Tabakalar arasındaki iyonların organik katyonlarla yer değiştirmesi ile killer, birçok polimer matriksine uyumlu hale getirilebilmektedir. Bu işlem aynı zamanda tabakalar arasını genişlemesini (intercalation) ya da tabakaların tamamen birbirinden ayrılmasını (exfoliation) sağlamaktadır [130]. Organik sürfaktanlar iyon değiştirme amacıyla endüstride yaygın olarak kullanılmakta ve bu yöntemle elde edilen kil de organokil olarak isimlendirilmektedir.

Bu araştırmada, MMT'nin modifikasyonu amacıyla sürfaktan olarak Tween 80 kullanılmıştır. Tween 80, Amerikan İlaç ve Gıda İdaresi (FDA) tarafından gıda ve ilaç formülasyonlarında kullanılmasına izin verilen bir sürfaktandır. Bu madde; besin takviyelerinde, lezzet verici ajanlarda, kremşantilerde ve şorteninglerde yaygın olarak kullanılmaktadır [131]. Bu sürfaktanların killerin yüzey zetapotansiyellerinde meydana getirecekleri değişiklik ölçülerek iyon değiştirme kapasiteleri tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlarda, sürfaktan konsantrasyonundaki artışa paralel olarak MMT'nin yüzey iyon yükünün negatifliğine bir azalma olsa da bu değişikliklerin kayda değer olmadıkları saptanmıştır. Buna göre, sürfaktanların nanokil ile çok düşük bir iyon değişimine girdikleri ya da aralarında hiçbir iyon değişiminin gerçekleşmediği, buna karşın fiziksel bir etkileşimin olabileceği düşünülmektedir.

Killerin sürfaktanla muamelesi ile modifikasyonu sonucunda killerin yüzey zetapotansiyellerinin değişmesinin yanı sıra tabaka aralığının da genişlemesi söz konusu olmaktadır. Ayrıca farklı araştırmacılar tarafından temas açısı ve konsistens limiti gibi özellikleri de test edilmiştir. Örneğin Akbulut ve ark. [132] noniyonik, anyonik, katyonik ve zwitteriyon olduğu bilinen 7 farklı sürfaktanın smektit, kaolinit ve illitten oluşan kilin temas açısı ve konsistens limiti (sıvı ve plastik limiti) özelliklerinde meydana getirdiği değişiklikleri araştırmışlardır. Neticede, çalışılan sürfaktanlar, kilin konsistens limiti üzerinde önemli değişimler meydana getirmiştir. Noniyonik, zwitteriyon ve anyonik sürfaktanlar kilin temas açısını düşürürken katyonik sürfaktanlar artırmıştır. Katyonik sürfaktanların temas açısını artırması, daha hidrofobik bir yüzey elde edildiğini göstermiştir. Marras ve ark. [133] hektadesil amonyum katyonu ilavesi

ile MMT'nin bazal boşluğu ve zetapotansiyelinde meydana gelen değişimi araştırmışlardır. Sonuçta sürfaktan konsantrasyonu arttıkça kilin bazal boşluğu genişlemiş, zetapotansiyel ise oluşan hidrofobik bağlar sayesinde pozitifçe çevrilmiştir.

Bu araştırmada, CRV, THY ve EUG'nin karakterize edilmesi ve nanokiller ile etkileşimlerinin belirlenmesi amacıyla farklı konsantrasyonlarda aktif madde içeren ortamlardaki killerin zetapotansiyeli ölçülmüştür. Sonuç olarak, fenolik aktif maddeler (CRV, THY ve EUG), MMT ve HNT'nin zetapotansiyelinde konsantrasyona bağlı olarak sınırlı bir değişime neden olmuştur. Bu durum, iyon değiştirme afinitesi yüksek olan killerle iyon değişimine girmeyen ya da kısmi iyon değişimi gerçekleştiren bu maddelerin noniyonik yapıda ya da düşük katyonik karakterli olduklarını göstermektedir.

Koloidal bir solüsyonda elektrostatik bir yapının oluşabilmesi için genellikle -30 mV altında ya da 30 mV üstünde bir zetapotansiyel değerinin olması arzu edilmekte ve bu durumda dispersiyonun stabil olduğu düşünülmektedir [134]. Bu çalışmada kullanılan aktif maddeler ve sürfaktanlar göz önünde bulundurulduğunda, aktif maddeler/sürfaktanlar ile nanokillerin stabil bir koloidal ortam oluşturmadıkları görülmektedir.

Nanokillerle iyon değişimi gerçekleştirerek onların yüzey yüklerinde modifikasyona yol açan aktif maddeler arasında en çok bilinenleri gümüş (Ag) ve çinko (Zn) gibi metal iyonlarıdır. Antimikrobiyal özellikleri bilinen bu maddelerle killerin etkileşimi sonucu killerin yüzey zetapotansiyelinin değiştiğine dair çok sayıda çalışma mevcuttur [135-138]. Örneğin, Gashti ve Almasian [139], silika/kaolinit süspansiyonuna 0.4 N AgNO_3 ilavesi ile elde edilen koloidal süspansiyonun zetapotansiyeli üzerinde UV radyasyonun etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak, AgNO_3 ilavesinin koloidal ortamın zetapotansiyelini düşürdüğünü ve UV radyasyon süresi uzadıkça düşüşün daha da fazla olduğunu ifade etmiştir. Benzer bir sonuç, Na-MMT'den elde edilmiş nanoölçekli kil tabakası ile Ag nanopartiküllerini içeren süspansiyonda da tespit edilmiştir [140].

4.3. Aktif kil nanopartiküllerinin antimikrobiyal aktivitesi

Bugün dünyada antimikrobiyal ajanların *in vitro* antimikrobiyal aktivitelerinin test edilmesinde kâğıt disk agar difüzyon, delik agar difüzyon, agar ve tüp dilüsyon yöntemi gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır [141]. Bu çalışmada, modifiye edilmiş tüp dilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Mikroorganizma kültürünü içeren tüplerdeki sıvı besiyeri içerisine %5 konsantrasyonda (ambalaj polimeri ile karıştırılan AKNP konsantrasyonu) AKNP ilave edildikten sonra mikroorganizmaların 24 saat boyunca canlılıkları takip edilmiştir. Bu amaçla tüplerden belli aralıklarla örnekler alınarak mikroorganizmanın zamana bağlı olarak canlılığı belirlenmiştir.

Antimikrobiyal maddelerin mikroorganizmalar üzerindeki etkisinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden bir tanesi zaman-ölüm eğrisi veren yöntemdir [141]. Bu yöntemde sıvı besiyerine aktif madde ilavesinden sonra belli aralıklarla besiyerinde canlı kalan mikroorganizma sayısı kültürel sayım yöntemleri ya da optik yoğunluğun ölçülmesi ile belirlenir. Hücre duvarlarının yapısı veya hücre içi materyallerdeki kaybın SEM ile değerlendirilmesi de bu amaçla kullanılabilir [12]. Bu yöntem, diğerlerine göre daha fazla iş yükü gerektirmesine rağmen bu yöntemle elde edilen sonuçların doğruluğu/kesinliği daha yüksektir [142].

Bu araştırmada, farklı antimikrobiyal maddelerin yüklenmiş olduğu kil nanopartiküllerinin çeşitli bakteri ve mayalara karşı sergiledikleri antimikrobiyal aktiviteleri incelendiğinde, tüm AKNP'lerin bakteriler üzerinde etkili oldukları, ancak bu etkilerin de yine değişken olduğu görülmektedir (Tablo 13-19). AKNP'lere karşı en hassas bakteri *B. cereus* olmuştur. *B. cereus*, düşük inokülasyon seviyesinde 3 farklı AKNP (CRV-MMT, EUG-MMT ve THY-MMT) muamelesi sonucunda da tespit edilebilir düzeyin altına inerken, yüksek inokülasyon seviyesinde sadece EUG-MMT, *B. cereus*'u tamamen elimine etmeyi başarmıştır. EUG-HNT'nin antimikrobiyal etkisi, diğer AKNP'lere göre nispeten zayıf kalmıştır (Tablo 17). Aktif madde yüklenmemiş killer tek başlarına hiçbir mikroorganizmaya karşı önemli görülebilecek bir etkiye sahip olmamışlardır.

Bu araştırmada, antimikrobiyal etki gösteren AKNP'ler, uçucu yağ bileşenleri, CRV, EUG ve THY ile yüklenmiş olan nanokillerle üretilenlerdir. CRV, EUG ve THY, fenol

halkası içeren fonksiyonel biyoaktif maddelerdir ve bunlar kekik ve karanfil gibi bitkilerin uçucu yağlarının ana bileşenleri arasındadır. THY, CRV ve EUG'nin antimikrobiyal özellikleri literatürde geniş olarak yer almaktadır. Bu maddeler, konsantrasyonlarına bağlı olarak hem bakterisidal hem de bakteriyostatik etki gösterebilirler. Yapılan bir çalışmada, 21 farklı uçucu yağ bileşeni, gıdalarda bozulma, insan ve hayvanlarda enfeksiyon ve gıda zehirlenmeleri gibi problemlere yol açtıkları bilinen 25 farklı bakteri üzerinde test edilmiş ve EUG, THY ve CRV, bu maddeler içerisinde en yüksek etkililer arasında yer almıştır. Ayrıca EUG, THY ve CRV, Gram (+) ve Gram (-) çok sayıda bakteriye karşı etkili bulunmuştur [143].

THY, kimyasal yapısı itibarıyla CRV'ye çok benzemekle birlikte fenol halkasındaki hidroksil grubunun pozisyonundaki farklılıktan dolayı CRV'den ayrılmaktadır CRV ve THY'nin antimikrobiyal etkisinin, mikroorganizmaların hücre zarının geçirgenliğini artırmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir [144]. CRV ve THY ayrıca Gram (-) bakterilerin dış membranının yapısal bütünlüğünü ortadan kaldırmakta, lipopolisakkaritlerin serbest kalmasına ve sitoplazma zarının ATP geçirgenliğinin artmasına neden olmaktadır [145]. Bu çalışmada, AKNP'lere karşı en duyarlı bakteri olduğu belirlenen *B. cereus* üzerine CRV'nin etkisini ortaya koymak amacıyla yapılan çalışmalarda, CRV'nin hücre zarı ile interaksyona girerek fosfolipit tabakasını erittiği ve zar geçirgenliğini artırdığı ifade edilmiştir [146]. CRV, hücre zarında bulunan fosfolipitlerdeki yağ asidi zincirlerini birbirinden uzaklaştırarak kanal oluşturmakta ve iyonların sitoplazmadan hücre dışına çıkmasına neden olmaktadır [147].

Karanfil bitkisi uçucu yağının ana bileşeni olan EUG'nin suda çözünürlüğü THY ve CRV'ye göre daha yüksek olmasına rağmen daha düşük bir antimikrobiyal aktiviteye sahiptir [148]. EUG'nin sublethal konsantrasyonlarının *B. cereus*'un hücre duvarına zarar vererek hücre içi materyallerinin sızmasına yol açtığı bildirilmiştir [149]. EUG, glukoz kaynağı yokluğunda ortamda bulunduğunda *L. monocytogenes*'in hücre içi ATP düzeyinin artmasına engel olmakta ve sonuçta hücre içi ATP'nin tükenmesine neden olmaktadır [150].

Aktif ambalajlamada kullanabilmek amacıyla hazırlanan nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivitelerine dair literatürde çok sayıda çalışma mevcut olup, bunların önemli bir kısmını metal nanopartikülleri üzerinde yapılan çalışmalar oluşturmaktadır.

Örneğin Rajamanickam ve ark. [151], *Streptomyces* spp. tarafından üretilen ekstrasellüler çinko nanopartiküllerinin *S. aureus*, *E. coli* ve *Salmonella* spp. üzerindeki antibakteriyel etkisini test etmiştir. 24 ve 48 saatlik fermentasyon sonucunda elde edilen nanopartiküllerden elde edilen sonuçlarda, nanopartiküllerin *S. aureus*'a karşı daha etkili olduğunu bulmuşlardır. $[Ag(NH_3)_2]^+$ kompleksinin glukoz, galaktoz, laktoz ve maltoz ile indirgenmesiyle elde edilen gümüş nanopartiküllerinin (AgNP), 10 farklı bakteri suşu üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, disakkaritlerle (laktoz ve maltoz) üretilen AgNP'lerin monosakkaritlerle (glukoz ve galaktoz) üretilenlere kıyasla daha yüksek bir antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiştir [152]. Bu sonucun disakkarit AgNP'lerinin daha düşük olan partikül boyutları ile ilişkili olduğu ve Ag'nin düşük konsantrasyonlarda ($1.69 \mu g/mL$) bile etkili olabildiği belirtilmiştir. ZnO nanopartikül süspansiyonlarının *E. coli* üzerindeki antibakteriyel aktivitesi üzerine partikül boyutu, konsantrasyon ve dispertant çeşidinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise antibakteriyel etkinin konsantrasyondaki artış ve partikül boyutundaki düşüğe bağlı olarak arttığı sonucuna ulaşılmıştır [153]. Çalışmada, kullanılan 2 farklı sürfaktanın (polietilen glikol ve polivinil pirolidon) antibakteriyel etki üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı, ancak süspansiyon stabilitesini etkilediği vurgulanmıştır. Yoksan ve Chirachanchai [154] tarafından yapılan çalışmada, kitosan içerisinde %0.5 (w/v) oranında süspanse edilen AgNP, *E. coli* ve *S. aureus* üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Kvitek ve ark. [155], farklı sürfaktanların [Tween 80 ve sodyum dodesil sülfat (SDS)], AgNP'nin stabilizasyonu ve 10 farklı bakteriyel suşa karşı antibakteriyel aktivitesi üzerindeki etkisini araştırmıştır. Sonuçta, modifiye edilmiş AgNP'lerin özellikle de SDS ile modifiye edilmiş olanın antibakteriyel etkisinin daha yüksek olduğu ve minimum inhibisyon konsantrasyonunun $1 \mu g/mL$ 'ye kadar düştüğü rapor edilmiştir.

4.4. ANF'lerin karakterizasyonu

4.4.1. ANF'lerin antimikrobiyal özellikleri

Bu araştırmada, 7 farklı bakteriye karşı test edilerek antimikrobiyal aktiviteleri belirlenen aktif kil nanopartikülleri (AKNP) kullanılarak üretilen aktif nanokompozit filmlerin (ANF) bazı özelliklerinin karakterizasyonu yapılmıştır. Araştırma planında yer alan EUG yüklenmiş halloysit kili, test edilen bakterilerin tamamına karşı düşük aktivite gösterdiği için ANF üretiminde kullanılmamıştır.

Üretilen ANF'lerin killer için daha önceden test edilen 7 bakteriye karşı antibakteriyel aktiviteleri belirlenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, en etkili ANF'lerin THY-MMT ve THY-HNT olduğu görülmektedir. Bu araştırmada THY-MMT ve THY-HNT, tampon çözeltide 24 saatlik inkübasyon sonunda *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Sal. Typhimurium* ve *B. cereus*'u sayılabilir düzeyin altına indirmeyi başarmıştır. Bu 2 ANF'nin ardından en etkili olan örnek CRV-HNT ambalaj filmidir. Bu örnek sadece 2 bakteriyi (*Sal. Typhimurium* ve *B. cereus*) ortamdan tamamen elimine etmiştir. Diğerleri ise değişken düzeylerde etkili olmuştur. *S. aureus*, ANF'lere karşı en dirençli bakteri olarak ortaya çıkarken, bunu laktik asit bakterileri takip etmiştir (Şekil 11-17).

Ambalaj materyallerinin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılan en yaygın testlerden birisi agar difüzyon yöntemidir. Bu yöntemde belli bir çapta kesilerek, aktifleştirilmiş mikrobiyal kültürle inoküle edilmiş katı agar üzerine konulan film parçasının etrafında belli bir inkübasyon sürecinden sonra oluşan şeffaf zon ölçülerek değerlendirme yapılır. İş yükü az olmasına rağmen bu yöntemin en önemli dezavantajı, sonuçlarının genellikle çok etkili-etkili-az etkili-etkisiz gibi kalitatif olmasıdır [156]. Bu çalışmada, ANF'lerin antibakteriyel etkilerini test etmek amacıyla öncelikle agar difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Agar difüzyon yönteminde arzu edilen sonuçların alınamaması nedeniyle bu yöntemden vazgeçilmiş ve sıvı ortamda antibakteriyel test uygulaması yapılmıştır. Burada sıvı ortam olarak herhangi bir uygun besiyeri ortamı ya da pH'sı ayarlanmış tampon çözelti kullanılabilmektedir. Bu yöntemde dikkate alınan hususlar, film kesitinin yüzey alanı ve sıvının hacmidir. Burada yüzey alanı/hacim oranının yüksek olması, daha fazla antimikrobiyal etkinlik anlamına gelmektedir. Bununla birlikte, bu testte gerçek gıda koşulları göz önünde bulundurulmalıdır [16].

Aktif ambalaj materyallerinin sıvı ortam içerisindeki antimikrobiyal etkileri çeşitli araştırmacılar tarafından da çalışılmıştır. Örneğin Zivanovic ve ark. [157] tarafından yapılan bir çalışmada, pH'sı 7.08'e ayarlanmış ve 10^6 kob/mL düzeyinde *E. coli* içeren fosfat tamponuna (9 mL) daha önceden farklı kitosan/polietilen oksit oranlarıyla hazırlanmış film parçaları (50 mm çapında) ilave edilmiş ve 6 saat sonraki bakteri sayıları tespit edilmiştir. Sonuçta bakteriyel azalmanın artan kitosan konsantrasyonu ile orantılı olduğu ve %100 kitosandan oluşan filmde kontrole göre 3.43 log düzeyinde bir

azalmanın sağlandığı tespit edilmiştir. Fajardo ve ark. [158], %10 oranında lizozim ilave edilmiş gliadin bazlı filmlerin pH 6.2'ye ayarlanmış tampon çözeltideki *Listeria innocua* popülasyonunu 23 °C'de 32 saatte önemli düzeyde azalttığını rapor etmiştir.

Uçucu yağlar ve bileşenleri gibi fitokimyasalların nanokillerle interaksyonu arzu edilmiş ve elde edilen aktif nanopartiküllerin polimer içerisine karıştırılmasıyla elde edilen filmlerin mekanik, geçirgenlik özellikleri yanında bazı çalışmalarda antimikrobiyal aktiviteleri de test edilmiştir. Bu çalışmalardan birisinde Persico ve ark. [10], %10 oranında CRV içeren ve %5 organomodifiye edilmiş nanokil (Nanomer I.28, Nanocor) takviyeli LDPE filmlerin agar difüzyon yöntemi ile *Brochothrix thermosphacta*, *L. innocua*, *Pseudomonas fragi* ve *Carnobacterium* sp.'ye karşı antibakteriyel aktivitesini test etmiştir. Aktif filmler; *B. thermosphacta*, *L. innocua* ve *Carnobacterium*'a karşı etkili bulunurken filmlerin *P. fragi* üzerindeki antimikrobiyal etkileri düşük kalmıştır. Lim ve ark. [50], 2 farklı nanokil (Cloisite Na⁺ ve 30B) ve farklı konsantrasyonlarda (%0.8, %1 ve %2) THY veya üzüm çekirdeği ekstraktı içeren *Gelidium corneum* bazlı filmlerin *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 üzerindeki antibakteriyel etkisini test etmiştir. Sonuçta, aktif madde konsantrasyonuna bağlı olarak antimikrobiyal etkide de bir artış gözlenirken, üzüm çekirdeği ekstraktı, her 2 nanokil varlığında da *L. monocytogenes*'e karşı en yüksek aktiviteyi göstermiştir.

Literatürde ambalaj filmlerin antimikrobiyal aktivitelerinin tespiti üzerine yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, çalışmaların çoğunluğunun agar difüzyon yöntemine, bir kısmının ise sıvı ortam içerisindeki etkinliklerinin test edilmesine dayandığı görülmektedir. Bu çalışma ile geçmişte yapılan çalışmaların sonuçları kıyaslandığında, ambalaj filmlerin antimikrobiyal aktivitelerinin kullanılan aktif maddelerin çeşidine ve miktarına, test yöntemine, başlangıç mikroorganizma sayısına ve mikroorganizmanın türüne bağlı olarak farklılık gösterdiği anlaşılmaktadır.

4.4.2. ANF'lerin antiradikal aktivitesi

Oksidasyon, gıdaların raf ömürlerini sınırlandıran en önemli etmenlerden bir tanesidir. Tat, lezzet ve renkteki kayıp ve bozulmaların yanı sıra oksidasyon ile gıdaların besinsel değerlerinde de azalmalar meydana gelmektedir [100]. Gıdalarda oksidasyonun önlenmesi ya da geciktirilmesi amacıyla, ambalaj materyallerine BHA, BHT, yeşil çay ekstraktı, biberiye ekstraktı ve α -tokoferol gibi çeşitli doğal ve sentetik antioksidanlar

ilave edilerek çok çeşitli araştırmalar yapılmıştır [159, 160]. Yapılan çalışmalar incelendiğinde, yapay antioksidanların sağlık üzerindeki olası risklerini ortadan kaldırmak için doğal antioksidanların gittikçe daha fazla kullanılmaya başlandığı görülmektedir. Doğal antioksidanlar içinde de fenolik maddeler daha fazla ön planda yer almaktadır.

Bu araştırmanın amaçlarından bir tanesi de ambalaja antioksidan özellik kazandırılmasıdır. Çalışmada kullanılan uçucu yağ bileşenleri (THY, CRV ve EUG), antioksidan özellikleri bilinen fitokimyasallardır ve daha önce de birçok araştırmaya konu olmuşlardır.

Antioksidan aktivitenin tespitinde birbirinden farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler; reaksiyon mekanizmaları, reaksiyon şartları, oksidan ve hedef madde çeşitleri gibi yönleri ile birbirlerinden ayrılmaktadır. Radikal yakalama testleri, kullanılan yöntemlerden bir tanesi olup bunlardan en yaygın olanı DPPH radikalinde renk değişiminin ölçülmesine dayanan testtir. DPPH radikali, pembe renkte bir görünüme sahip olmakla birlikte antoksidan/indirgen madde varlığında soluk sarı bir renge indirgenir. Oluşan karışımın absorbans değeri ölçülerek antioksidanların DPPH radikalini indirgeme yetenekleri üzerinde bilgi sahibi olunur. Bu yöntemin avantajı, hızlı ve basit olması ve gerçekleştirilmesinde cihaz olarak sadece UV-vis spektrofotometreye ihtiyaç duymasıdır [161].

Bu araştırmada üretilen ANF'lerin DPPH radikali yakalama aktivitelerine göz atıldığında, tüm ANF'lerin %65'in üzerinde bir aktiviteye sahip oldukları görülmektedir (Şekil 18). DPPH yakalama aktiviteleri bakımından en iyi sonuç veren örnekler ise %87.92 ile EUG-MMT ve %79.52 ile THY-HNT olarak ortaya çıkmıştır.

Siripatrawan ve Harte [159] tarafından yapılan çalışmada, %2, %5, %10 ve %20 oranlarında yeşil çay ekstraktı içeren kitosan bazlı filmler üretilmiş ve bu filmlerin DPPH yakalama aktiviteleri test edilmiştir. Ambalaj materyallerinin antiradikal aktiviteleri, içerdikleri yeşil çay ekstraktı miktarına bağlı olarak artış göstermiş ve %20 oranında ekstrakt içeren filmin DPPH yakalama aktivitesi %50'nin üzerinde bulunmuştur. Byun ve ark. [100], saf polilaktik asit filmin DPPH yakalama aktivitesini %0.14 bulurken BHT ve polietilen glikol ilavesiyle filmin aktivitesinin %14.2'ye kadar

yükseldiğini rapor etmiştir. Aynı filme BHT ve polietilen glikolün yanı sıra α - tokoferol de ilave edilince antiradikal aktivite %90.43'e yükselmiştir.

Gimenez ve ark. [162], jelatin-yumurta akı solüsyonuna sepiolit (1.2 g/100 mL) ve karanfil uçucu yağı (3 mL/100 mL) ilave ederek aktif film üretmiş ve demir iyonu indirgeme (FRAP) ve ABTS [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)] radikali yakalama aktivitesi yöntemleri ile 16 saat boyunca filmin antioksidan kapasitesini test etmiştir. Sonuç olarak araştırmacılar, zamana bağlı olarak FRAP ve ABTS yakalama değerlerinin arttığını gözlemlemiş ve bunu zamanla daha fazla aktif maddenin (karanfil uçucu yağı) salınmasına bağlamışlardır. Ayrıca, sepiolit içeren filmin antioksidan aktivitesinin sepiolit içermeyene göre zamanla daha hızlı arttığı sonucuna ulaşılmıştır.

Literatürde yer alan çalışmalarda üretilmiş antioksidan özellik taşıyan ambalaj materyalleri ile bu çalışmada üretilen ANF'lerin sahip oldukları antiradikal aktivitelerinin karşılaştırmasını yapmak gerekirse, sonuçların birbiri ile uyumlu olduğu görülebilir. Ambalajın antioksidan aktivitesi, genellikle bileşiminde bulunan aktif maddenin konsantrasyonu ile orantılı olup aktif madde ve polimerin çeşidi, ambalaj üretim yöntemi ve testte kullanılan ekstraksiyon koşulları gibi faktörlerden etkilenebilir.

4.4.3. ANF'lerde kalan aktif madde miktarı

Film üretimi sırasında polimerin ekstrüderde eritilip akıcı bir hale getirilebilmesi için oldukça yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyulmaktadır. Uçucu yağ ve bileşenleri, sıcaklık karşısında oldukça hassas materyaller oldukları için yüksek sıcaklıklarda hızlı bir şekilde degradasyona uğrarlar. Bu çalışmada, ekstrüderde uygulanan ısıl muamelenin ambalaj materyalinde kalan aktif madde miktarı üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, ekstrüder sonrasında nanokil yüklenmiş ve yüklenmemiş, ancak aynı miktarda aktif madde içeren filmlerde kalan aktif madde miktarları belirlenmiştir. Sonuç olarak, hem nanokillerin ekstrüderde termal degradasyona karşı aktif maddeleri korudukları ve nanokil içeren aktif filmlerde, nanokil içermeyenlere oranla çok daha fazla aktif madde kaldığı bulunmuştur (Şekil 19). Benzer bir çalışmada Persico ve ark. [10] da %5 oranında nanokil (MMT) ilavesinin LDPE ambalaja ilave edilen CRV'nin ekstrüder koşullarında termal kaybını azalttığı ve filminden salım veya ayrılma süresini uzattığı sonucuna varmıştır. Bu, bu çalışmada elde edilen sonuçları destekler nitelikte bir tespittir.

Araştırma sonuçlarına göre ANF'lerde zamana ve sıcaklığa bağlı olarak aktif madde miktarlarındaki değişimler değerlendirildiğinde, sıcaklığın aktif madde konsantrasyonu üzerinde oldukça etkili olduğu görülmektedir. 4°C'de bekletilen ambalaj materyallerindeki aktif madde miktarı, 24°C'de bekletilenlere göre oldukça yüksek bulunmuş ve daha uzun süreli bir salım gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 19). Zamana bağlı olarak bütün ANF'lerde aktif madde miktarları azalım göstermiş, ancak bu azalma 4°C'de daha yavaş gerçekleşmiştir. Elde edilen sonuçlar, ANF'lerin buzdolabında muhafaza edilecek gıdaların raf ömrünün uzatılabilmesi için daha etkili olacağı anlamına gelmektedir. Ambalajlar içerisinde ise zamana bağlı olarak en uzun süreli salım ve en fazla kalan aktif madde miktarları, depolamanın 40. günü sonunda 541.07 ppm ve 417.66 ppm ile sırasıyla CRV-HNT ve THY-HNT'de belirlenmiştir. MMT ve HNT'nin aktif madde salımı üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında ise HNT takviyeli ambalaj materyallerinde her zaman daha fazla aktif madde kaldığı saptanmıştır (Şekil 20). Bu durum, HNT'nin MMT'ye göre aktif maddelerin salımını daha etkili şekilde geciktirdiğini göstermektedir.

Aktif ambalajlarda antimikrobiyal/antioksidan aktivite, ya ambalaj materyali içerisine emdirilen ya da immobilize edilen aktif maddelerin direkt gıda ile teması veya paket yapısından ambalajın içerisindeki tepe boşluğuna kontrollü salımı sayesinde gerçekleşir [163]. Kontrollü salım, aktif maddelerin ambalaj materyalini kontrollü bir oranda terk etmesi ve böylece gıdaların güvenlik ve raf ömrünü daha da uzatması şeklinde tanımlanabilir. MMT gibi tabakalı ve HNT gibi tüp şeklindeki nanokillerin, polimer içerisine ilave edildiklerinde aktif maddelerin salımını yavaşlattıkları ve böylece aktivitenin uzun süre devamlılığını sağladıkları bildirilmiştir. Tabakalı killer, yüksek tabaka uzunlukları sayesinde aktif maddenin daha dolambaçlı yollardan geçmesine yol açarak ambalajı daha uzun sürede terk etmesini temin ederler [59]. HNT'nin dış yüzeyinin kimyasal özellikleri tabakalı yapıdaki killere benzemekle birlikte HNT tüp şeklinde bir yapıya sahip olması nedeniyle iç kısmına kontrollü salımı istenen enzim, ilaç, antimikrobiyal, alev önleyici/geciktirici gibi maddeler yüklenebilir [164]. İç çapının 10-15 nm'den 30-40 nm'ye çıkarılması ile HNT'nin yükleme kapasitesi %40-50 oranında artırılabilir. Aynı zamanda böylece polimer zincirlerinin daha etkili şekilde tüpe tutunması sağlanabilir [165].

4.4.4. ANF'lerin mekanik özellikleri

Bu araştırmada, %5 oranında aktif madde yüklenmiş kil nanopartikülleri (AKNP) ile dolgulu LDPE filmler üretilmiş ve AKNP'lerin LDPE'nin mekanik özellikleri üzerindeki etkisi test edilmiştir. Testler sonucunda, aktif madde yüklenmiş HNT nanopartiküllerinin ambalajın çekme dayanımı (tensile strength, TS) özelliklerini geliştirmede ancak CRV-MMT ve EUG-MMT nanopartikülleri ilave edilmiş film örneklerinin daha yüksek TS değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Kopma anındaki uzama (elongation at break, EB) değerlerine göz atıldığında ise bütün AKNP'lerin ambalajın EB değerlerini geliştirdiği anlaşılmaktadır (Tablo 20). Nanokillere yüklenmiş aktif maddelerin de TS ve EB değerleri üzerinde etkili oldukları görülmektedir. Özellikle timol (THY) içeren ANF'lerin mekanik parametreleri, diğer örneklerden elde edilenlere göre daha düşük bulunmuştur.

Gıda ambalajlama uygulamalarında en fazla kullanılan materyallerden bir tanesi, düşük molekül ağırlıklı polietilendir (low density polyethylene, LDPE). LDPE'nin mekanik özelliklerinin iyileştirilmesi, onun ilaç ve elektronik endüstrisi gibi farklı alanlarında kullanımına imkân sağlamaktadır. LDPE'nin mekanik özelliklerini iyileştirmenin bir yolu da içerisine düşük miktarlarda organokil ilavesidir [166]. LDPE ve diğer polimerlere nanokil ilavesi ile mekanik özelliklerinin geliştirilmesi üzerine çok sayıda araştırma mevcuttur. Dafdar ve ark. [56], %2, %3 ve %4 oranlarında nanokil (Cloisite® 15A) ve uyumlaştırıcı olarak etilen vinil asetat (EVA) kopolimeri içeren LDPE bazlı ambalaj materyallerinin mekanik özelliklerini test etmiştir. Sonuçlarda, LDPE içerisine EVA ilavesinin filmin elastikiyet katsayısını düşürdüğü, buna karşılık nanokil ilavesinin ise iyileştirdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, EVA ile nanokil arasında ambalajın mekanik özelliklerinin gelişmesi bakımından sinerjistik etki olduğu rapor edilmiştir. Hotta ve Paul [167] tarafından yapılan çalışmada, LDPE içerisine dolgu maddesi olarak ilave edilen MMT'den türevlendirilmiş 2 farklı organokilin (2 alkil uçlu ve 1 alkil uçlu organokil) LDPE'nin mekanik özellikleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Sonuçta LDPE'nin içerisine farklı konsantrasyonlarda katıldıklarında 2 alkil ucuna sahip organokilin diğerine göre polimerin mekanik özelliklerini daha fazla iyileştirdiği belirlenmiştir. Diğer bir çalışmada [168]; jelâtin, gümüş nanopartikülleri (AgNP) ve organokil (Cloisite 30B) kullanılarak ambalaj film üretilmiş ve filmlerin özellikleri karakterize edilmiştir. AgNP ve organokil, ayrı ayrı bir arada kullanıldıkları zaman

filmin mekanik özelliklerini değiştirmiş, kil/jelâtin ve kil/jelâtin/AgNP filmlerin TS değeri jelâtin filme göre yüksek, EB değeri ise daha düşük bulunmuştur. Müller ve ark. [169], nişasta bazlı filmlerin mekanik özellikleri üzerine kil ilavesinin etkisini araştırmışlar ve nanokilin önceden gliserolle karıştırılsın ya da karıştırılmasın ambalajın TS değerini iyileştirdiğini rapor etmişlerdir. Nanokilin önceden gliserolle karıştırılarak ilave edilmesi ise kilin film içerisinde daha iyi dispersiyonunu ve daha gelişmiş mekanik özellikler kazanmasını sağlamıştır. Nişasta bazlı filmlerin mekanik özellikleri üzerine farklı konsantrasyonlardaki (%1-3-5-7) MMT'nin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, konsantrasyon artışına bağlı olarak filmin TS değerinin arttığı rapor edilmiştir [170]. Lewitus ve ark. [171] tarafından yapılan çalışmanın sonucunda, %5 oranında organomodifiye MMT ilavesi ile polilaktik asit (PLA) filmin gerilme katsayısının %30, uzamasının da %40 oranında arttığı belirlenmiştir. Sothornvit ve ark. [172] da peyniraltı suyu bazlı filmlere ilave ettikleri nanokiller (Cloisite Na⁺, Cloisite 20A ve Cloisite 30B) sayesinde ambalaj filmin mekanik özelliklerinde olumlu sonuçlar elde etmişlerdir.

Nanokillerin ambalaj materyallerinin mekanik özelliklerini genel olarak iyileştirdikleri rapor edilmiş olsa da bazı çalışmalarda tam tersi sonuçlar da elde edilmiştir. Örneğin Rhim ve ark. [173] PLA bazlı filmler içerisine ilave edilen nanokillerin (Cloisite Na⁺, Cloisite 30B, Cloisite 20A) saf PLA filmin TS değerini nanokil tipine bağlı olarak %10-20 arasında azalttığını belirlemiş ve bunu organokillerin polimer matriksi içerisinde iyi dağılmamalarından kaynaklandığını ifade etmişlerdir.

Bu araştırmada elde edilen filmlerde yapılan mekanik testlerin sonuçları ile literatürde yer alan çalışmalar kıyaslandığında sonuçların benzerlik gösterdiği görülmektedir. Yapılmış çalışmaların büyük bölümünde olduğu gibi bu çalışmada da ambalaj içerisine ilave edilen nanokil, ambalajın TS ve EB gibi mekanik karakteristiklerini iyileştirmiştir.

4.4.5. ANF'lerin morfolojik özellikleri

Bu çalışmada, aktif madde yüklenmiş nanokiller LDPE ile %5 oranında karıştırılarak çift vidalı ekstrüderde aktif nanokompozit filmler (ANF) üretilmiştir. Nanokil ve aktif madde yüklenmiş ANF'lerin mikroyapılarını incelemek amacıyla SEM mikrofotografı alınmıştır. Nanokiller LDPE içerisinde genel olarak homojen bir

dağılım göstermiştir. En düzgün dağılım CRV-MMT ve THY-HNT örneklerinde görülmüştür (Şekil 21).

SEM vasıtasıyla alınan mikrograflar, killerin polimer içine dispersiyonu hakkında bilgi verir. Ancak SEM hassasiyetindeki mikroskoplar, kil tabakalarının ara mesafesi hakkında fikir verecek yeterli çözünürlükte fotoğraflar vermezler [174]. Kil galerileri arasındaki mesafe (exfoliation/intercalation) hakkında fikir edinebilmek için daha yüksek çözünürlükte ve nanoölçekte TEM fotoğraflarının alınması gerekmektedir. Bununla birlikte TEM için örnek hazırlama işlemi oldukça kompleks ve zaman alıcıdır ve örneğin hazırlanmasının ardından istenilen görüntülerin alınıp alınamayacağı da kesin olarak bilinmemektedir [175].

Bu araştırmada elde edilen SEM fotoğrafları değerlendirildiğinde, killerin büyük ölçüde disperse olduğu, ancak bazı bölgelerde kil agglomeratlarının meydana geldiği görülmektedir (Şekil 21). Nanokillerin polimer içerisine dağılmalarını etkileyen faktörler üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Örneğin, Da Silva ve ark. [176] ekstrüzyon sırasında vida profili, vida hızı, besleme oranı gibi parametrelerin değiştirilmesi ile MMT'nin yüksek yoğunluklu polietilen (HDPE) içindeki dispersiyonunun önemli ölçüde etkilendiğini rapor etmiştir. Dennis ve ark. [177], 2 farklı organokilin (Cloisite 15B ve 30B) poliamid içerisindeki dispersiyonunu tek ve çift vidalı ekstrüderlerde farklı vida konfigürasyonlarında araştırmıştır. Çift vidalı ekstrüder, tek vidalıya göre çok daha iyi bir karıştırma sağlamıştır. Tüm ekstrüder ve vida konfigürasyonları için 30B, 15A'dan daha kolay delaminasyona (tabaka genişlemesi) uğramış ve disperse olmuştur. Düşük, orta ve yüksek kesme yoğunlukları karşılaştırıldığında ise en iyi delaminasyon ve dispersiyon, orta kesme şiddetinde gerçekleşmiştir. Wang [178], nişasta/MMT nanokompozit üretiminde artan kesme hızı ile kil tabakalarının daha iyi disperse olduğunu, ekstrüzyon sıcaklık ve vida hızı profilinin de delaminasyon ve dispersiyonu etkilediğini ifade etmiştir. Picard ve ark. [179] tarafından yapılan çalışmada ise %0 ile %18 arasında değişen MMT takviyeleri ile üretilen poliamid 6/MMT nanokompozit membranlarının morfolojik yapısı incelenmiştir. Sonuç olarak, %6 ve %10'luk kil konsantrasyonlarında mikron boyutunda agglomeratların olduğu belirlenmiştir. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise orta boyutlu taktoid ve agglomeratlar ortaya çıkmış, bu ise yüksek kil konsantrasyonlarında tabakalar arası boşluğun genişlemediği şeklinde yorumlanmıştır.

Yapılan çalışmalarla bu çalışmada elde edilen SEM mikrografları ile elde edilen sonuçları karşılaştırmak gerekirse, polimer içerisinde homojen bir dispersiyon elde etmek için %5'lik MMT konsantrasyonunun büyük ölçüde yeterli olduğu, ancak belli noktalarda oluşan agglomeratların polimerin arzu edilen özellikleri kazanmasında olumsuz etki yapabileceği düşünülmektedir. Bu yüzden %5'in üzerindeki nanokil takviyeleri, kilin polimer içerisinde etkili bir dispersiyonu üzerinde olumsuz etki yapacaktır. Literatürde yer alan farklı kil konsantrasyonları ile üretilen ambalajlarda kilin polimer içerisindeki dispersiyonunu değerlendiren çalışmalar bu yorumu desteklemektedir [19, 173, 180, 181]. Belirtilen noktada, literatür ile bu çalışmada elde edilen bulgular birbiriyle uyumludur. Ayrıca, ekstrüzyon aşamasında kullanılan sıcaklık profili ve besleme oranı gibi parametrelerin de dispersiyon üzerinde etkili olabileceği ifade edilebilir.

4.4.5. ANF'lerin renk-opaklık değerleri

Bu araştırmada, ANF'lerde elde edilen renk değerlerine göz atıldığında, nanokil ilavesi ile ANF'lerin L^* , a^* ve b^* değerlerinin etkilendiği görülmektedir. Ambalajın beyazlık-siyahlık özelliğini gösteren L^* değeri, en yüksek saf LDPE'de belirlenmiştir (Tablo 21). Bu, nanokil ilavesinin ambalaj rengini koyulaştırdığını göstermektedir. Benzer durumu ANF'lerin opaklık değerleri de teyit etmektedir. LDPE'ye ilave edilen nanokiller, ambalajın a^* değerini çok fazla değiştirmemiş, b^* değerini ise yükseltmiştir. Renk farklılığı, en düşük saf LDPE'de, en yüksek THY-H'da belirlenmiştir (Tablo 21).

Nanokil ilavesi ile aktif nanokompozit filmlerde L^* ve a^* değerlerinin düşmesi, literatürde de rastlanan sonuçlardır. Sothornvit ve ark. [172], Cloisite Na⁺, Cloisite 20A, veya Cloisite 30B ilavesi ile peyniraltı suyu proteini izolatından üretilen filmlerin kontrole göre daha düşük L^* ve a^* ile daha yüksek b^* and ΔE değerlerine sahip olduğunu rapor etmiştir. Bu türden bir sonucun elde edilmesi, nanokilin yüksek hidrofobikliğine ve polimer içerisinde iyi bir dispersiyon gösterdiğine dayandırılmaktadır [182]. Rhim ve ark. [49] da nanokil ilave edilmiş agar filmlerde benzer sonuçlar elde etmiştir. Farahnaky ve ark. [55], farklı konsantrasyonlarda (%0-18) Cloisite 20A ilavesinin jelatin bazlı filmlerin renk özellikleri üzerindeki etkisini araştırmıştır. Sonuç olarak, film içerisindeki kil konsantrasyonu artışına paralel olarak L^* ve a^* değerlerinin düştüğü, b^* and ΔE değerlerinin ise artış gösterdiği bulunmuştur.

4.4.6. Film kalınlığı

Bu araştırmada, elde edilen aktif nanokompozit filmlerin (ANF) kalınlıkları, en az 5 farklı noktalarından ölçölmüş ve kalınlıkları 20-45 µm arasında bulunmuştur, filmlerin ortalama kalınlığı ise 34.17 µm'dir (Tablo 22). Bu kalınlık değeri, daha önceki çalışmalarda LDPE filmler üzerinde yapılmış olan çalışmalarla uyumludur. Örneğın, Golebiewski ve ark. [183], ekstüderde üretmiş olduğı LDPE/MMT filmlerin ortalama kalınlığını 22 µm bulmuştur. Shah ve ark. [184] tarafından üretilen LDPE filmlerin kalınlıkları 1-3 mil (1 mil = 25.4 µm = 0.001 inç) olarak saptanmıştır. Zan ve ark. [185] ise ürettikleri LDPE/TiO₂ filmlerin ortalama kalınlığını 30 µm olarak rapor etmişlerdir. Diğer bir çalışmada üretilen LDPE/MMT filmlerin yaklaşık 50-60 µm kalınlığında olduğı rapor edilmiştir [186].

4.4.7. Termogravimetrik analiz (TGA)

TGA, polimerin termal degradasyonu ile ilgili bilgi vermesinin yanında onun herhangi bir uygulama alanındaki kullanılabilirliği ve uygunluğı konusunda da fikir vermektedir. Polimerin termal stabilitesi ve dekompozisyonun şekli, büyük ölçüde kimyasal yapısındaki zincir bölümleri ve tekrar eden birimlere bağıdır. Dekompozisyon şekli polimerlerde genellikle tamamen aynıdır [187]. Polimerlerin termal degradasyonunda, sıcaklık artışı sırasında öncelikle düşük enerjili kimyasal bağlar yıkılır. Termal olarak daha stabil olan bağlar ise daha fazla enerjiye sahip olan bağlardır [101].

Polimerlerin termal degradasyon kinetikleri bilinirse, onların termal davranışlarında iyileştirme yapılması da mümkün olmaktadır [188]. Nanokillerin, polimer içerisine ilave edildikleri zaman onların termal stabilitelerini artırdıkları bilinmektedir. [189]. Bununla birlikte, nanokillerin bu etkisi, tabaka aralıklarının genişlemesi ile de yakından ilişkilidir. Morawiec ve ark. [105], organik modifiye edilmiş MMT ve LDPE ile hazırlanan ayrılmış tabakalı nanokompozitlerin saf LDPE'ye ve modifiye olmamış kil ile hazırlanan filmlere göre daha iyi termal stabiliteye sahip olduğı sonucuna varmıştır.

Bu araştırmada üretilen ANF'lerin TGA termogramlarına göz atıldığında, örneklere ait kurvelerin büyük ölçüde üst üste bindikleri görölmektedir (Şekil 22). Bu ambalajların ekstrüzyon aşamasında maruz kaldıkları maksimum sıcaklık değeri 180 °C'dir. Örneklerin bu sıcaklık veya civarındaki termal davranışlarına bakıldığında, ağırlık

kaybının ihmal edilebilecek düzeylerde olduğu anlaşılmaktadır. Bu durum, uçucu olan aktif maddelerin ekstrüzyon sırasında termal degradasyona karşı stabil olduklarını göstermektedir. TGA termogramlarından çıkarılan diğer bir sonuç ise EUG-MMT örneğinin diğerlerine göre nispeten daha düşük sıcaklıklarda ağırlık kaybına uğramaya başlamasıdır. Bunun sebebi, EUG'nin diğer aktif maddelere göre çok daha düşük stabiliteye sahip olabileceği ihtimalidir. ANF'lerde kalan aktif madde miktarları hatırlandığında (Şekil 19), EUG-MMT'nin diğer aktif madde ilave edilmiş ambalajlara göre daha düşük konsantrasyonda aktif madde içerdiği ve bu, ambalaj örneğinin ekstrüzyon aşamasında daha fazla aktif madde kaybına uğradığı anlamına gelmektedir. Dolayısıyla, bu çalışmada üretilen ANF'lerde yapılan kalan aktif madde testleri ile TGA sonuçları, birbirleri ile uyumluluk arz etmektedir.

4.4.10. DSC analizi

DSC analizleri ile malzemelerin camsı geçiş, kristalizasyon ve erime sıcaklıkları gibi termal özellikleri belirlenebilmektedir. Bu çalışmada elde edilen DSC termogramlarına göz atıldığında, ANF'lerin 2 tane erime geçişi gösterdikleri görülmektedir. Bu durum, ambalaj hammaddesi olarak kullanılan LDPE'nin polimer karışımı olduğu anlamına gelmektedir. Bu iki madde; erime noktası 117°C civarında olan LDPE ile 122°C civarında olan lineer düşük molekül ağırlıklı polietilendir (LLDPE) [190, 191]. Film üretiminde kullanılan LLDPE, yaygın olarak LDPE ile birleştirilmektedir [192].

Bu araştırmada üretilen ANF'lerin erime sıcaklıklarına (T_e) göz atıldığında, hepsinin 117 °C'de erimeye başladığı görülmektedir (Tablo 23). MMT, HNT ya da aktif madde ilaveleri, ANF'lerin erime sıcaklıkları üzerinde herhangi bir değişime neden olmamıştır. Pedroso ve ark. [190], DSC termogramından saf LDPE'nin erime sıcaklığının 114°C civarında olduğunu rapor etmiştir. Dadbin ve ark. [193], MMT içeriğinin LDPE ambalaj filmler üzerindeki etkisini araştırmıştır. Bu çalışmada, saf LDPE'nin erime sıcaklığı 115.914 °C olarak bulunmuştur. Ayrıca MMT miktarındaki artışa paralel olarak erime sıcaklığının da arttığı belirlenmiştir. Baldev ve ark. [194], saf LDPE'nin erime sıcaklığını 104 °C olarak ifade ederken, nişasta ilavesinin LDPE ile nişasta arasında iyi bir karışım gerçekleşmemesinden dolayı erime sıcaklığını değiştirmedığı sonucuna varmıştır.

Kristalizasyon derecesi, bir polimerin amorf (şekilsiz) bölgesine karşılık kristal bölgenin düzeyinin bir göstergesidir. Bu çalışmada, ANF'lerde yapılan DSC analizinde elde edilen kristalizasyon dereceleri değerlendirildiğinde, örneklerin kristalizasyon derecelerinin birbirlerinden farklı olduğu ve ya aktif maddelerin, ya da nanokillerin mevcudiyetinden etkilendiği görülmektedir. En yüksek kristalizasyon dereceleri ise MMT ilave edilmiş filmlerde tespit edilmiştir. HNT yüklenmiş ANF'lerin kristalizasyon dereceleri MMT yüklenmiş ANF'lere göre daha düşük bulunmuştur. Ayrıca örneklerin kristalizasyon dereceleri ile erime entalpileri arasında doğrusal orantı tespit edilmiştir. Kristalizasyon derecesi yüksek olan ANF'lerin erime entalpileri de yüksek çıkmıştır. Arunvisut ve ark. [186], organomodifiye MMT ve uyumlaştırıcı (maleik anhidrit) içeriğinin LDPE bazlı ambalajların termal davranışları üzerindeki etkisini araştırmıştır. Sonuçta, artan MMT ve uyumlaştırıcı içeriğinin LDPE'nin erime entalpisini düşürdüğü bulunmuştur. Morawiec ve ark. [105] da benzer bir sonuç elde etmiştir.

4.4.11. FTIR analizi

Fourier Dönüşüm Kızılötesi (Fourier Transform Infra Red: FTIR) spektroskopisi, incelenmek istenen materyallerin fonksiyonel gruplarının titreşimlerinden kaynaklanan yapısal, kompozisyonel ve fonksiyonel özellikleri hakkında bilgi elde etmeye yarayan bir tekniktir. Bu spektroskopik teknikte; boyama, işaretleme gibi uzun örnek hazırlama işlemlerine ihtiyaç duyulmadan hızlı, hassas ve etkin olarak sonuç elde edilebilmektedir. FTIR spektroskopisi ile elde edilen parmakizi benzeri bilgiler sayesinde moleküllerin fonksiyonel grupları tespit edilebilmekte ve dolayısıyla farklı yapıların varlığı ayırt edilebilmektedir [195].

FTIR spektroskopisinde, örnek materyaldeki kimyasal bağların titreşim, eğilme, bükülme, sallanma gibi hareketleri için gerekli olan enerji kızılötesi ışınların elektromanyetik enerjisinden absorplanır. Bu absorpsiyonlar sonucu elde edilen kızılötesi spektrumları, molekül içindeki fonksiyonel grupları gösterir. Örnek materyalde yer alan kimyasal bağlar; C-H, C-C gibi aynı miktarda aynı şekilde enerji absorplanmaz. Piklerin bulunduğu yere, yapılarına ve şekillerine göre inceleme yapılarak materyaldeki bağlar tayin edilir. Miktar tayini ise pik boyu ve pik alanı ölçülerek ve standartlar ile karşılaştırılarak yapılabilir [196].

Bu araştırmada, üretilen ambalajlarda FTIR spektra analizi yapılarak ambalajların kimyasal karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır. FTIR analizleri sonucunda, kontrol örneği olan saf LDPE ambalaj ile nanokil dolgulu aktif nanokompozit filmlerde (ANF) ortak olan pikler ile ANF'lere ait olan pikler elde edilmiştir. LDPE'den elde edilen spektrum, daha önceki raporlarla benzerlik göstermektedir [185, 197]. Ortak olan pikler ($1375-1475\text{ cm}^{-1}$ ve $2800-2900\text{ cm}^{-1}$ dalgaboylarında elde edilenler) ambalaj hammaddesi olan LDPE'nin yapısındaki kimyasal bağlardan (C-H bağları) kaynaklanmaktadır (Şekil 24). Yaklaşık $2800-2900\text{ cm}^{-1}$ bandındaki pikler, CH_2 yapılarını ifade etmektedir ve bu piklerin büyük olması, bu kimyasal bağların ekstrüzyon aşamasında degradasyona (oksidasyona) uğramadığını göstermektedir [198]. Daha küçük olan $1000-1100\text{ cm}^{-1}$ bandındaki pikler, Si-O bağlarının absorpladığı enerjiden kaynaklanmaktadır ve nanokillerin varlığına işaret etmektedir. Örneğin, $450-550\text{ cm}^{-1}$ dalgaboylarında elde edilen pikler ise yine nanokil kaynaklıdır (Şekil 24) ve Si-O-Si ile Si-O-Al bağlarının gerilme titreşiminden ileri gelmektedir [199].

Bu araştırmada, FTIR analizi sonucunda, üretilen ambalaj materyallerinin moleküler karakterizasyonu yapılmış ve ambalaj materyallerinde yer alan, LDPE, nanokiller, sürfaktan ve aktif maddelerin yapısında bulunan moleküler bağlar, kızılötesi ışınların enerjisini absorplayarak miktarlarına bağlı olarak pik oluşturmuşlardır. Araştırmada elde edilen FTIR spektrumları ile geğmişte yapılan araştırma sonuçları kıyaslandığında, ambalaj içerisindeki fonksiyonel yapıların enerji absorplamalarıyla ortaya çıkan piklerin dalgaboylarının büyük ölçüde benzerlik gösterdiği görölmektedir. Pik alanlarında meydana gelebilen farklılıklar ise kimyasal grupların miktarsal olarak farklı olmalarından kaynaklanmaktadır.

4.5. Gıda denemeleri

4.5.1. Kaşar peyniri

4.5.1.1. ANF'lerle ambalajlamanın kaşar peynirinin doğal mikrobiyal yükü üzerindeki etkisi

Kaşar peyniri, ölkemizde en fazla tüketilen peynir türlerinden birisidir ve Balkan ölkelerinde Kaşkaval ismiyle bilinmektedir [200]. Yarı sert bir peynir olan kaşar peynirinin üretiminde çiğ ya da pastörize süt kullanılmaktadır [201]. Ölkemizde üretilen

kaşar peynirlerinin önemli bir kısmı taze olarak tüketilirken geriye kalan kısmı ise olgunlaştırıldıktan sonra eski kaşar şeklinde tüketime sunulmaktadır.

Peynirlerde mikrobiyolojik kaynaklı bozulmalar daha çok lipolitik ve proteolitik aktivite sonucu gerçekleşmektedir. Özellikle bu tip bozulmalar, çiğ süttten yapılan peynirlerde çok daha sık rastlanmaktadır. Lipolitik aktivitede, lipaz enziminin etkisiyle trigliseritlerin parçalanması sonucu peynirde ransidite oluşurken proteolitik aktivite sonucunda proteinler parçalanmakta ve istenmeyen tat ve aromalı bileşikler ortaya çıkmaktadır [202]. Peynirlerde bozulmaya yol açan önemli mikroorganizma grupları arasında aerobik psikrotrofik ve mezofilik Gram (-) bakteriler, mayalar, küfler, heterofermentatif LAB'ler ve spor oluşturan bakteriler yer almaktadır. Taze kaşar gibi olgunlaştırılmamış ve yumuşak peynirler, sahip oldukları yüksek pH değerleri ve su aktiviteleri ile düşük tuz oranlarından dolayı çok daha hızlı bozulurlar [203].

Bu araştırmada, kontrollü şartlarda üretilen dilimlenmiş taze kaşar peynirleri, biyoaktif madde yüklenmiş nanokiller ile üretilmiş ANF'lerle vakum paketlenen kaşar peynirlerinin TMAB, MK, TK ve LAB yükü 30 gün boyunca takip edilmiştir (Tablo 24-27). Depolamanın başlangıcında kaşar peynirlerinde önemli düzeyde mikrobiyal yükün olduğu belirlenmiştir. Bu durum, süttün pastörizasyonundan sonra ilave edilen starter kültürlerin mevcudiyetinin yanı sıra daha sonraki üretim aşamalarında çevreden ya da ekipmanlardan kontaminasyon olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda daha sonra uygulanan haşlama işleminin de mikrobiyal inaktivasyonu yeterince sağlamadığı görülmektedir. Konu ile ilgili daha önce yapılmış olan çalışmalarda da benzer sonuçlar bulunmuştur [204]. Depolama sırasında peynirlerin doğal mikrobiyal yüklerinde artışlar gözlenirken, genel itibariyle bu çalışmada üretilen ANF'lerin mikrobiyal gelişimi durdurucu/yavaşlatıcı bir etki yaptıkları ortaya çıkmıştır. Kaşar peynirlerinin mikrobiyal yükleri üzerinde en çok etkili olan ambalaj materyallerinin sıralanması gerekirse: TMAB için THY-HNT; LAB için EUG-MMT, CRV-HNT ve THY-HNT; MK için ise CRV-HNT ve THY-HNT'dir. Buna ek olarak TK için tüm ANF'ler benzer inhibisyonlar sağlamış, *S. aureus* ise kaşar peynirlerinin hiçbirisinde tespit edilmemiştir (Tablo 28).

Literatürde, piyasada satılmakta olan kaşar peynirlerinin mikrobiyolojik yükleri hakkında yapılmış çok çeşitli araştırmalar mevcuttur. Örneğin Öksüztepe ve ark. [205], Elazığ'da tüketime sunulan 50 adet taze kaşar peynirinin mikrobiyolojik kalitesini

araştırmıştır. Sonuçta; örneklerde ortalama olarak TMAB sayısı 7.02 log kob/g, TK 1.72 log kob/g, *Staphylococcus-Micrococcus* 2.14 log kob/g, *Lactobacillus-Leuconostoc-Pediococcus* 7.02 log kob/g, *Lactococcus* 6.81 log kob/g ve MK ise 1.76 log kob/g seviyelerinde tespit edilmiştir. İncelenen 50 adet taze kaşar peyniri örneğinin 4 (%8) tanesinin *E. coli* ile kontamine olduğu belirlenmiş; ancak hiçbir örnekte *S. aureus* saptanamamıştır. Gülmez ve ark. [206] tarafından Kars'ta satılmakta olan kaşar peynirleri üzerinde yapılan araştırmada, incelenen peynirlerde *S. aureus*'a rastlanılmadığı; ancak örneklerin %6'sının TSE standartlarının üzerinde MK sayısı içerdiği, %2'sinin ise standartlarda izin verilmemesine rağmen *E. coli* ile kontamine olduğu belirlenmiştir. Erkan ve Aksu [207], modifiye atmosferde paketlenen (MAP) kaşar peynirinin mikrobiyolojik kalitesi üzerine etkisini araştırmış ve sonuçta MAP uygulamasının TMAB yükünde herhangi bir değişime neden olmadığı, *Staphylococcus-Micrococcus* yükünde ise depolama süresince sürekli bir azalma sağlandığı belirlenmiştir.

4.5.1.2. ANF'lerin kaşar peynirine kontamine edilen *Aspergillus niger* küf'ünün gelişimi üzerindeki etkisi

Küfler, peynirlerin yüzeylerinde gelişerek raf ömrünü kısaltan ve ürün kayıplarına neden olan mikroorganizmalardan birisidir. Peynirlerde küf gelişimi sonucu söz konusu diğer bir risk noktası ise küflerin oluşturdukları mikotoksinlerdir [208]. *A. niger*'in üretiminde rol oynadığı bazı ürünler, food-grade (gıda saflığında, tüketiminde sakınca bulunmayan) olarak bilinmektedir. Örneğin *A. niger* kaynaklı sitrik asit, FDA tarafından GRAS kategorisine alınan bir üründür [209]. *A. niger* ayrıca pektinaz, amiloglukozidaz ve proteaz gibi birçok enzimin de endüstriyel üretiminde kullanılmaktadır. *A. niger*'in mikotoksin ürettiğine dair çeşitli raporlar bulunsun da aflatoksinenik bir küf olduğuna dair herhangi bir bulgu söz konusu değildir [210]. Bununla birlikte yarı sert, yarı yumuşak, tuzlanmış veya tuzlanmamış çeşitli peynirlerden *A. niger*'i de içeren *Aspergillus* türleri izole edilmiş ve bunların peynirde bozulmalara ve ürün kayıplarına yol açtıkları bildirilmiştir [211-214].

Bu araştırmada, dilimlenmiş kaşar peynirlerinin yüzeyine kontamine edilen *A. niger*'in inhibisyonu üzerine aktif kil nanopartikülleri (AKNP) kullanılarak üretilen ANF'lerin etkisi araştırılmıştır. CRV-HNT ve EUG-MMT ile üretilen filmler, depolama sırasında fungisidal etki göstererek küf sporu sayısında nispi bir azalma sağlarken, THY-HNT

filmleri fungistatik etki yapmıştır. AKNP içermeyen kontrol grubu LDPE filmlerin yanı sıra CRV-MMT ve THY-MMT filmleri kullanılarak yüzeyleri kapatılan peynir dilimlerinde ise küf sayısının arttığı gözlemlenmiştir (Tablo 29).

Kaşar peyniri ve benzer yapısal özelliklere sahip Cheddar gibi peynirlerde küf gelişiminin önlenmesi amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu araştırmalarda, antifungal ajan olarak yoğun şekilde natamisin kullanıldığı görülmektedir. Örneğin Var ve ark. [202], natamisin uygulanmış ve plastik ambalaj materyalleri (PVC ve Sperdex-Ref. 99017) ile vakum paketlenmiş kaşar peynirlerinde 5 aylık olgunlaştırma sürecinde herhangi bir küf gelişimi gözlenmemiştir. Yine Ture ve ark. [109], natamisin içeren metil selüloz (MC) ve buğday gluteni (WG) bazlı ambalaj materyallerinin kaşar peynirlerinde *A. niger* ve *P. roquefortii* üzerindeki antifungal etkisini araştırmıştır. Sonuçta, 5-20 mg/10 g natamisin içeren MC ambalajların *A. niger* sporu sayısını 2 log civarında azalttığı, 2 mg/10g WG ambalajların ise tamamen elimine ettiği bildirilmiştir. *P. roquefortii* sayısında ise natamisin içeren ambalaj materyallerinden kaynaklanan herhangi bir inhibisyon gözlenmemiştir. Yildirim ve ark. [215], natamisin içeren kazeinle kaplamanın kaşar peynirinde *P. roquefortii* üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını rapor etmiştir. Sarıkuş [216], natamisin katkılı peyniraltı suyu proteini izolatu filmlerle kaplanan kaşar peynirinde *Penicillium* spp. yükünün 15 günlük depolama sonunda kontrole göre 1.78 log daha düşük olduğunu rapor etmiştir. Gorgonzola peynirinin yüzeyinde *P. roquefortii* gelişiminin engellenmesi amacıyla geliştirilen farklı konsantrasyonlarda natamisin katkılı selüloz filmlerden %2 ve %4 natamisin içerenlerin fungus gelişimi için arzu edilen sonuçları verdiği ve peynire izin verilen limitlerin altında bir natamisin geçişinin olduğu belirlenmiştir.

4.5.1.3. ANF'lerin kaşar peynirinde *L. monocytogenes* gelişimi üzerindeki etkisi

L. monocytogenes, Gram (+), fakültatif anaerob bir bakteri olup geniş bir pH aralığında gelişebilmekte ve 72 °C'nin altındaki pastörizasyon sıcaklıklarında canlı kalabilmektedir [217]. Şimdiye kadar özellikle çiğ süttten yapılmış olanlar olmak üzere çeşitli peynirlerde *L. monocytogenes* kontaminasyonu ya da *L. monocytogenes* kontamine olmuş peynirlerin tüketiminden kaynaklanan çok sayıda listeriosis vakası rapor edilmiştir. İsveç'te satışa sunulan 333 ithal yumuşak ve yarı yumuşak peynirde *L. monocytogenes* varlığı üzerine yapılan bir araştırmada, çiğ süttten yapılan peynirlerin

%42'si ve pastörize süttten yapılanların %2'si olmak üzere toplam 20 peynirde *L. monocytogenes* varlığı tespit edilmiştir [218]. Beckers ve ark. [219], analiz ettikleri 69 peynirin 7'sinde 10^3 ile 10^6 kob/g arasında değişen sayılarda *L. monocytogenes* bulunduğunu rapor etmişlerdir. Makino ve ark. [220] tarafından yapılan araştırmada, Japonya'da satılmakta olan 15 perakende peynirden *L. monocytogenes* 1/2b izole edildiği ve bu peynirlerin tüketilmesi sonucu 86 kişinin listeriosis enfeksiyonuna yakalandığı bildirilmiştir. Bu kişilerden 38'inde klinik gastroenterisit belirtileri ortaya çıkmıştır.

Taze kaşar peynirinin tüketiminden kaynaklanan herhangi bir listeriosis vakası rapor edilmiş olmamasına rağmen, taze kaşar peyniri sahip olduğu pH, su aktivitesi ve besin bileşimi gibi şartlar göz önüne alındığında *L. monocytogenes* gelişimi için oldukça uygun bir süt ürünü olarak değerlendirilebilir. Çetinkaya ve Soyutemiz [204], süte farklı düzeylerde *L. monocytogenes* inoküle ederek kaşar peyniri üretim aşamalarında bakterinin canlılığını gözlemlemiş ve yüksek düzeyde (6 log civarı) bakteri içeren süttten yapılan peynirlerde *L. monocytogenes*'in elimine edilebilmesi için peynir üretim ve olgunlaştırma işlemlerinin yetersiz kaldığını bildirmiştir. Cagri-Mehmetoglu ve ark. [221] tarafından yapılan araştırmada ise kaşar üretimi yapan 2 farklı üretim tesisi *Listeria* varlığı bakımından incelenmiştir. Sonuçta, tesislerin sırasıyla 3 ve 4 ayrı bölümünde *L. monocytogenes* varlığı tespit edilmiş ve bunun yetersiz hijyenden kaynaklanabileceği ve çapraz kontaminasyona sebebiyet verebileceği ifade edilmiştir.

Bu araştırmada vakum ambalajlanan tüm peynirlerin *L. monocytogenes* yükünün depolama sırasında azalmaya uğradığı görülmektedir. Bunun yanı sıra CRV-HNT ve THY-MMT ambalaj örneklerinin bakteriyel gelişimin sınırlandırılmasında etkili sonuçlar verdiği anlaşılmaktadır (Tablo 30).

4.5.1.4. ANF'lerin kaşar peynirinin pH değeri üzerindeki etkisi

Bu araştırmada, aktif madde yüklenmiş nanokillerle üretilen ANF'ler kullanılarak vakum paketlenmiş dilim halindeki kaşar peynirlerinin pH değerlerinin depolama sırasında önemli derecede bir düşüş gösterdiği tespit edilmiştir. LDPE'den üretilen kontrol grubu film ve THY-MMT ile üretilmiş filmlerle ambalajlanmış peynirlerin pH'sının 10. güne kadar düştüğü tespit edilirken, 10. günden sonra çok az da olsa bir artış gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 31). Bunun sebebi, depolamanın ilk aşamasında

bakteriyel faaliyet sonucu ortaya çıkan organik asitlerden kaynaklanan asitlik artışından dolayı pH'nın düşmesi olabilir. Bununla birlikte, 10. günden sonra meydana gelen artış ise özellikle proteolitik mikroorganizmaların faaliyetlerinden dolayı bazik karakterli bileşikler meydana getirmelerinden kaynaklanmış olabilir. Diğer tüm örneklerde pH'da görülen sürekli düşüş, depolama sırasında asit üretiminin proteolitik aktiviteden daha baskın gerçekleştiğinin de bir göstergesidir.

Bugüne kadar çeşitli araştırmacılar, kaşar peynirlerinin üretim ve olgunlaştırma süreçlerindeki pH değişimleri üzerine çalışmalar yapmıştır. Örneğin Andiç ve ark. [201], vakum ambalajlanmış ya da vakum olmayacak şekilde plastik ambalajla sarılmış kaşar peynirlerinin 180 günlük depolama sürecindeki pH değişimini belirlemiştir. Araştırma sonucunda, başlangıçta 5.24 ve 5.25 olarak tespit edilen pH'nın her iki peynir örneğinde de depolama sırasında artış gösterdiği rapor edilmiştir. Yine Cetinkaya ve Soyutemiz [204], kaşar peyniri üretiminde pıhtının asitlendirilmesi aşamasında pH'nın 5.03-5.07'ye kadar gerilediğini, 18 °C'de 10 gün olgunlaştırma sırasında ise 5.30-5.43'e yükseldiğini bildirmişlerdir. Öksüztepe ve ark. [205] ise Elazığ'da tüketime sunulan kaşarların pH değerlerinin 5.01 ile 5.92 arasında değiştiğini rapor etmişlerdir.

4.5.2. Kıyma

4.5.2.1. ANF'lerin kıymanın doğal mikrobiyal yükü üzerindeki etkisi

Kıyma vb. taze et ürünleri, uzun süre beklememek kaydı ile markette buzdolabı sıcaklığında satışa sunulurlar. Bununla birlikte bu ürünlerde satış sırasında mikrobiyal gelişim ve lipid oksidasyonundan kaynaklanan arzu edilmeyen değişimler söz konusu olabilmektedir [222]. Bu değişimler, ürünü duyuusal olarak tüketilemez hale getirmesinin yanında, sağlık açısından da riskli durumlara sebebiyet verebilmektedir. Kıymada bu tür problemlerin önlenmesi veya geciktirilmesi maksadıyla vakum ambalajlama, modifiye atmosferde ambalajlama, aktif ambalajlama, radyasyon, kimyasal koruyucuların kullanımı gibi çeşitli uygulamalara başvurulmuştur [222-227]. Elbette her bir yöntemin avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır.

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından 2009 yılında yürürlüğe konulan Türk Gıda Kodeksi (TGK) Mikrobiyolojik Kriterler Tebliğine [228] göre, kıymada bulunması gereken maksimum TMAB sayısı 5×10^5 - 5×10^6 kob/g düzeyinde olmalı ve

aynı zamanda 25 g örnekte *Salmonella*, *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 bulunmamalıdır.

Bu araştırmada, kıymanın başlangıç TMAB yükü, TGK Mikrobiyolojik Kriterler Tebliğinde belirtilen sınırlar içerisinde bulunmuştur. Bununla birlikte, etin 7 gün boyunca perakende satış koşullarına uygun şekilde depolanması ile önemli derecede artış göstermiş ve belirlenen limitlerin çok üzerine çıkmıştır. Kıymaların ANF'ler ile ambalajlanması, kontrole göre TMAB yükü üzerinde herhangi bir azalmaya sebep olmamıştır (Tablo 32). Toplam *Enterobacteriaceae* ve LAB sayıları dikkate alındığında ise THY-HNT ambalajının kıymada kontrole ve diğer ANF'lere kıyasla daha iyi bir mikrobiyolojik kalite sağladığı tespit edilmiştir (Tablo 33 ve 34).

Başkaya ve ark. [229], İstanbul'da satışa sunulan hazır kıymaların mikrobiyolojik kalitesini araştırmış ve bu kıymaların ortalama 6.43 log kob/g düzeyinde TMAB içerdiklerini belirlemişlerdir. Direkel ve ark.'nın [230] Mersin ili Yenişehir ilçesinde satılan kıymalar üzerinde yaptıkları araştırmada, TMAB, TK ve *E. coli* sayıları sırasıyla 4.67 log kob/g, 2.78 log kob/g ve 3.45 log kob/g düzeyinde bulunmuştur. Güven ve ark. [231], Kars ilinde satışa sunulan hazır kıymaların TMAB, *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* ve *Clostridium perfringens* bakımından sırasıyla %27.5, %27.5, %46.25, %1.25 ve %27.5'inin yönetmeliklerde belirlenen koşulları sağlamadığını tespit etmiştir.

Vakum ve modifiye atmosferle ambalajlama ile kıymanın mikrobiyolojik kalitesindeki değişimin araştırıldığı bir çalışmada [232], %70 O₂ + %30 CO₂ atmosfer kombinasyonunun MK ve koliform yükünün düşük tutulması için uygun sonuçlar verdiği, vakum ambalajlama ile de MK, *Pseudomonas* ve psikrofil bakteri gelişiminin sınırlandırılabilceği belirlenmiştir.

Kenawi ve ark. [233]; sodyum laktat, sodyum klorür ve bunların karışımının vakum ambalajlanmış bufalo etki kıymasının raf ömrü üzerindeki etkisini araştırmıştır. Sonuçta, sodyum laktatın, sodyum klorür olsun ya da olmasın kıymada TMAB, psikrofilik bakteri ve LAB çoğalmasını geciktirdiği ve kıymanın raf ömrünü 21-24 gün uzattığı bildirilmiştir.

Diğer bir çalışmada [112], farklı miktarlarda (%0.05, %0.5 ve %1) oregano uçucu yağı ilave edilmiş kıymalar 3 farklı yöntemle (normal atmosfer, %40 CO₂/ %30 N₂/ %30 O₂

modifiye atmosfer kombinasyonu ve %100 CO₂) depolanmış ve kıymaların mikrobiyolojik özellikleri takip edilmiştir. Artan oregano konsantrasyonu, modifiye atmosfer uygulamalarında mikrobiyal yükün kontrol altına alınmasında etkili iken, normal atmosferde depolamada etkili olmamıştır. %100 CO₂'de depolama, TMAB yükünü karışık modifiye atmosfere göre daha fazla baskılamıştır.

Seydim ve ark. [234], kıyılmış devekuşu etini yüksek O₂, yüksek N₂, vakum ambalajda ve normal atmosfer ortamında olmak üzere 4 farklı yöntemle depolamış ve örneklerin TMAB, TK ve LAB gelişimini takip etmiştir. Farklı depolama uygulamaları mikrobiyal gelişim üzerinde benzer etki göstermiştir. TMAB sayısı, depolamanın 3. gününden itibaren 10⁶ kob/g'ın üzerine çıkmıştır.

Kıymanın mikrobiyolojik kalitesinin devam ettirilmesinde uçucu yağların (oregano, tarçın ve hardal uçucu yağları), modifiye atmosferde paketlenmenin ve radyasyon uygulamasının kombine etkisi, Turgis ve ark. [235] tarafından araştırılmıştır. Hardal uçucu yağı, TMAB yükünün kontrol edilmesinde ve patojenlerin (*E. coli*, *Salmonella* ve *Pseudomonas*) eliminasyonunda etkili olmuştur. Radyasyon uygulaması da TMAB ve patojen bakterileri tamamen inhibe etmiştir. Sonuç olarak kıymanın raf ömrünün 28 güne kadar uzatılması için en iyi uygulamanın uçucu yağ + radyasyon + modifiye atmosfer olduğu ifade edilmiştir.

Lisozim (700 µg/cm²) ve Na₂ EDTA (300 µg/cm²) içeren zein filmlerin sığır etinden üretilmiş köftelerin doğal mikrobiyal yükünün değişimi üzerine etkisinin belirlenmesi üzerine yapılan bir çalışmada, aktif filmlerin hiçbir ambalaj içermeyen kontrol örneklerine kıyasla TMAB ve TK popülasyonunu 5. güne kadar önemli düzeyde kontrol altında tuttuğu belirlenmiştir [236].

Ha ve ark. [237], tarafından yapılan çalışmada, ekstrüzyon ya da kaplama yoluyla %0.5 veya %1 oranlarında üzüm çekirdeği ekstraktı (GSE) içeren LDPE ambalajlar üretilmiş ve 3°C'de 18 gün depolama süresince kıymanın mikrobiyolojik kalitesi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Ekstrüzyonla üretilen filmler, kıymada TMAB ve TK yükünü baskılamış ve çoğalmayı geciktirmiştir. GSE kaplanmış LDPE ambalajlar, kıymada hem TMAB hem de TK sayısı üzerinde daha etkili bir antibakteriyel etki göstermiştir. %0.5 ile %1'lik GSE konsantrasyonları arasında ise herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir.

Yine %5 oranında oregano uçucu yağı, kekik uçucu yağı veya bunların karışımını içeren yenilebilir soya bazlı filmlerle vakum depolamanın kıymanın doğal mikrobiyal yükü üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmanın sonucunda, 4°C'de 12 günlük depolama süresince uçucu yağ içermeyen kontrol örneği ile ambalajlanmış kıyma örneği dâhil hiçbir örneğin TMAB yükünde anlamlı bir artış gözlenmezken LAB popülasyonu üzerinde aktif ambalajlar herhangi bir inhibisyon etkisi göstermemiştir. Kıymaların TK ve toplam *Pseudomonas* yükleri, söz konusu aktif ambalajlar sayesinde depolama sırasında azalma göstermiştir [88],.

Kim ve ark. [238] tarafından yapılmış olan çalışmada, nisin ve lacticin kaplanmış LDPE ambalajların kıymanın doğal mikrobiyal yükü üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla sıkı bir şekilde paketlenen etler 3°C ve 10°C'de sırasıyla 25 ve 15 gün depolanmıştır. TMAB sayısındaki artış, her iki sıcaklıkta da antimikrobiyal ambalajlarla etkin şekilde baskılanmıştır; ambalajların koliformlar üzerindeki etkisi ise 10°C'de daha fazla bulunmuştur. Nisin ve lacticin arasında kıymada sergilenen antimikrobiyal aktiite bakımından herhangi bir fark gözlenmemiştir.

Ambalajlama uygulamalarının kıymanın doğal yükü üzerindeki etkisine yönelik literatürde yer alan çalışmalara genel anlamda göz atıldığında, aktif ambalajlama teknolojilerinden ziyade modifiye atmosfer ve vakum ambalajlamanın daha fazla test edildiği görülmektedir. Aktif nanokompozit ambalajlarla kıymanın ambalajlanması üzerine ise herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

4.5.2.2. ANF'lerin kıymada *E. coli* O157:H7 canlılığı üzerindeki etkisi

E. coli O157:H7, şiddetli karın ağrısı ile birlikte seyreden kanlı diareye sebep olması şeklinde karakterize edilen klinik vakalara yol açan tehlikeli bir patojendir. Yetersiz pişirilmiş ya da çiğ et ürünlerinin tüketimi sonucu *E. coli* O157:H7'nin enfeksiyon vakalarına yol açtığı bilinmektedir [239]. Kıymalarda *E. coli* O157:H7'nin dekontaminasyonu amacıyla ışınlama, paketleme modifikasyonları, bakteriyofaj kullanımı, bakteriyosin kullanımı, asit spreyi uygulaması, aktif klor uygulaması gibi yöntemlerin etkinliği farklı araştırmacılar tarafından test edilmiştir [224, 239-243].

Nadarajah ve ark. [244] tarafından yapılan çalışmada, kıymadan yapılmış köfte örnekleri alil izotiyosiyanat emdirilmiş diskle birlikte plastik (EVOH/Nylon/PE) poşetler içerisine yerleştirilmiş ve köftelere kontamine edilen *E. coli* O157:H7'nin canlılığı soğutma ve dondurma sıcaklıklarındaki depolamalar süresince takip edilmiştir. Bu çalışmada, antimikrobiyal madde direkt olarak köfte içerisine uygulanmamış, ambalajın tepe boşluğuna geçerek antimikrobiyal etki göstermesi amaçlanmıştır.

Yapılan diğer bir çalışmada, ekstrüzyon ya da kaplama yoluyla %0.5 veya %1 oranlarında üzüm çekirdeği ekstraktı (GSE) içeren çok tabakalı polietilen ambalajlar üretilmiştir. Ekstrüzyonla üretilmiş %1 GSE içeren ambalaj, kıymaya inoküle edilmiş bakteriler içerisinde sadece *Micrococcus flavus* ATCC 10240 üzerinde etkili olurken, %1 oranında GSE ile kaplanmış olan ambalaj ise *E. coli* IFO 3301, *S. aureus* IFO 3060 ve *B. subtilis* IFO 12113 üzerinde antimikrobiyal etki göstermiştir. %0.5'lik GSE uygulanmış ambalajların etkisi ise yetersiz kalmıştır [237].

Nissen ve ark. [245], 3 farklı ticari ambalajlama tekniği (%60 CO₂ - %40 N₂ - 0.4%CO; 70%O₂ - 30%CO₂; plastik poşet) kullanarak paketlenen kıymalara kontamine edilen *Yersinia enterocolitica*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella* üzerine ambalajların etkisini araştırmıştır. *E. coli* O157:H7 gelişimi, modifiye atmosfer ambalajları içerisinde 10°C'de depolanan kıymalarda tamamen durdurulmuştur.

Kıymada *E. coli* O157:H7 ve diğer patojenlerin inaktive edilmesi üzerine çalışmaları özetlemek gerekirse, çalışmaların önemli bir kısmı modifiye atmosfer ve ışınlama uygulamalarından ibaret olup bazı çalışmalar ise aktif ambalajlar ile yapılan testleri kapsamaktadır. Aktif ambalajlama çalışmalarında, uçucu özellikteki antimikrobiyallerin ambalaj içerisine kıymaya temas etmeyecek şekilde yerleştirilmeleri ile bu maddelerin gaz fazında sergiledikleri antimikrobiyal aktivite önemli yer tutmaktadır. Bununla birlikte, ışınlama ve modifiye atmosfer uygulamaları ile kıymada patojenlerin etkin şekilde inhibe edilebildiği görülmektedir. Işınlama belli dozları aşılmadığı müddetçe güvenilir bir uygulama olarak kabul edilmesine rağmen, ışınlanan gıdalarda çeşitli kimyasal değişimlerin olduğu, lipid, protein ve vitaminlerin ise besinsel açıdan olumsuz etkilendiği yaşandığı belirlenmiştir [246-248]. Ayrıca taze etin düşük dozlarla ışınlandığında bile çürük yumurta, balık, kızarmış mısır, yanık, kükürt, metalik, alkol veya asetik asit gibi özellikler ile karakterize edilen tat ve koku bozukluklarına

uğrayabildiği bildirilmiştir [249]. Modifiye atmosfer uygulaması her ne kadar et ürünlerinin raf ömrünü %50-400 oranında uzatabilse de yüksek maliyeti, mevcut sıcaklığın devamlılığı ve her ürüne uygun gaz kombinasyonu standardizasyonu gibi dezavantajlara sahiptir. Ayrıca özel eğitim ve ekipmana da ihtiyaç duymaktadır [250].

4.5.2.3. ANF'lerin kıymada TBA oluşumu üzerindeki etkisi

Mikrobiyolojik bozulmanın yanında, taze etlerin raf ömrü ve kalitesini olumsuz etkileyen diğer bir faktör de lipid oksidasyonudur. Kas lipidlerinin doymamışlık derecesi ve bunların lipid oksidasyonuna duyarlılığı, etler arasında farklılık gösterir ve bu durum hayvanın diyeti ile yakından ilgilidir [251]. Lipid oksidasyonunu geciktirmenin yollarından bir tanesi, O₂'yi ortamdan uzaklaştırmaktır, bu açıdan da vakum ambalajlama çok önemlidir. Yine tabakalı yapıya sahip nanokillerin polimer içerisine ilave edildikleri zaman ambalajın O₂ geçirgenliğini de düşürdükleri bilinmektedir [252]. Ayrıca, EUG, THY ve CRV gibi fenolik bileşiklerin ve bu maddeleri içeren bitkisel ekstraktların antioksidan özellikleri de kanıtlanmıştır [253]. Tüm bu etkenler bir araya getirildiğinde, bu çalışmada üretilen aktif ambalajların, taze et ürünleri gibi gıdalarda lipid oksidasyonun engelleme yönünden avantajlı özelliklere sahip olabileceği ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmanın kıymada lipid oksidasyonunun önlenmesi açısından ANF'lerin etkilerini araştırdığımız bölümünde, THY-H ve EUG-MMT'nin 7 günlük depolama süresince oksidasyonu etkin biçimde yavaşlattığı belirlenmiş ve bu sonuçların, ANF'lerin avantajlı yönlerini teyit ettiği görülmüştür (Tablo 36).

Taze etlerde aktif ambalaj uygulamaları ile lipid oksidasyonunun önlenmesine yönelik literatürde çeşitli araştırmaların yapıldığı görülmektedir. Örneğin, Ouattara ve ark. [227], ışınlamadan sonra uygulanan askorbik asit uygulanmış ve soya proteini bazlı yenilebilir filmlerle kaplanmış taze kıymada lipid oksidasyonunun geciktirildiği sonucuna ulaşmışlardır.

Ünal ve ark. [236], lizozim (700 µg/cm²) ve Na₂ EDTA (300 µg/cm²) içeren zein filmlerin sığır etinden yapılmış köftelerde lipid oksidasyonunu 7 günlük depolama süresince etkili olarak azalttığını ve bu iki maddenin kombine olarak kullanıldığında daha etkili olduğunu rapor etmişlerdir.

Kuzu etinin 13 günlük soğukta depolanması süresince TBA oluşumu üzerine %4 oranında oregano ve biberiye ekstraktı ilave edilmiş polietilen ve poliamid filmlerin etkisi, Camo ve ark. [254] tarafından araştırılmıştır. Bu çalışmada etler, %70 oranında O₂ içeren modifiye atmosfer ortamında aktif ambalajlarla paketlenmiştir. Kontrol olarak üzerine biberiye ekstraktı püskürtülmüş ve püskürtülmemiş etler örnek olarak alınmış ve aynı şartlarda depolanmıştır. Araştırma sonucunda, etlerde oksidasyonun geciktirilmesinde etin üzerine püskürtülmüş biberiye ekstraktı en etkili örnek gurubu olarak belirlenirken, aktif ambalajlar da kontrole göre oldukça etkili muamele çeşidi olmuştur.

Diğer bir çalışmada [255], paketlenmede kullanılan polipropilen filmlerdeki oregano konsantrasyonuna (%0.5-4) bağlı olarak parça ette lipid oksidasyonunun önlenmesi araştırılmıştır. Araştırmanın sonucuna göre, etin raf ömrünü 14 günden 23 güne çıkarmak için ambalaj bünyesinde en az %1 oregano olması gerektiği, %4'lük oregano konsantrasyonunun ise etlerde duyusal olarak kabul edilemez bir kokuya neden olduğu ifade edilmiştir. Sonuç olarak, ette toplam kalite yönünden ambalaj içerisindeki en uygun oregano konsantrasyonunun, %1-2 arasında olduğu bildirilmiştir.

Literatürde taze etlerde lipid peroksidasyonunun önlenmesi amacıyla aktif ambalajlama denemelerinin yanı sıra modifiye atmosferde paketlenme uygulamaları da test edilmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmaların bir tanesinde, kıymalar farklı modifiye atmosfer kombinasyonlarında [1- %30 O₂ + %70 CO₂ (MAP1), 2- %50 O₂ + %50 CO₂ (MAP2), 3- %70 O₂ + %30 CO₂ (MAP3), 4- %50 O₂ + %30 CO₂ + %20 N₂ (MAP4), 5- %30 O₂ + %30 CO₂ + %40 N₂ (MAP5)] depolanarak oksidasyonun önlenmesi amaçlanmıştır [256]. Bu çalışmada 14 günlük depolama sonrasında yüksek (%50) O₂ konsantrasyonuna sahip MAP4 kombinasyonunun en etkili muamele olduğu sonucuna varılmıştır. Lund ve ark. [257] tarafından yapılan çalışmada ise yukarıdaki çalışmanın tam aksine yüksek O₂ konsantrasyonuna sahip modifiye atmosfer ortamının kıymada hem lipid hem protein oksidasyonunu hızlandırdığı rapor edilmiştir. Aynı çalışmada %100 N₂ ortamının lipid oksidasyonunu daha düşük düzeyde tuttuğu, ayrıca ete ilave edilen biberiye ekstraktının daha iyi bir oksidasyon stabilitesi sağladığı belirtilmiştir. O'Grady ve ark. [258] da bu çalışmaya paralel olarak artan O₂ konsantrasyonunun kıymada TBA oluşumunu hızlandırdığını rapor etmiştir.

Literatürde yapılan çalışmaların sonuçları incelendiğinde, aktif ambalajların da modifiye atmosferin de etlerde lipid oksidasyonunu önlemede etkili olduğu görülmektedir. Vakum ambalajlama ise her ne kadar lipid oksidasyonunu önlese de etin O₂ ile teması tamamen kesildiği için vakum ambalajlanan etlerde tüketiciyi cezbetmeyen bir renk oluşmaktadır. Ekstrüzyon yolu ile aktif maddelerin polimer içerisine dağıtılması ile elde edilen aktif ambalajlarda aktivitenin gerçekleşmesi, gıda ile ambalaj arasında direkt temas olmasına bağlıdır [259]. Bu çalışmada üretilen ANF'ler göz önüne alındığında ise durum biraz farklıdır. Çünkü CRV, EUG ve THY, ambalaj içerisine ekstrüzyon yolu ile dağıtılmış olmasına rağmen bu maddeler uçucu özelliğe sahip oldukları için ambalajı terk ettikleri anda uçucu özellikleri sayesinde gıdanın ambalajla direkt temas etmeyen kısımlarına da ulaşabilirler. Böylece etkisini gıdanın ulaştığı her bölgesinde gerçekleştirebilirler. Elde ettiğimiz sonuçlar da CRV ile üretilenler hariç ANF'lerin kıymanın TBA seviyesini düşürmesi konusunda ümit verici özellikler taşıdığını göstermektedir (Tablo 36).

4.5.3. Fermente sucuk

4.5.3.1. Fermentasyon sırasında meydana gelen değişimler

Kuru fermente sucuk, ülkemize özgü geleneksel bir et ürünüdür. Büyük ve küçük işletmelerde üretilen sucuklar, üretim yöntemi bakımından farklılık arz etmektedir. Büyük işletmelerde sucuklar, starter kültür ilavesini takiben kısa süreli bir fermentasyon işleminden sonra kurutma işlemine tabi tutularak üretilirken, küçük işletmelerde şans inokülasyonuna dayanan doğal fermentasyon gerçekleştirilmektedir [260, 261]. Bu çalışmada, hazırlanan sucuk hamuru kılıflara doldurulduktan sonra doğal mikroflorası ile 12 gün süreyle fermentasyona bırakılmıştır. Fermentasyon sırasında, sucuğun mikrobiyolojik yükünde bir dizi değişimler meydana gelmiştir. TMAB, LAB ve MK sayısında artış meydana gelirken, *Enterobacteriaceae* cinsi bakteri üyeleri tamamen inhibe olmuştur. Fermentasyon işlemi, sucuğun pH ve TBA değerlerinde de düşüşe neden olmuştur. Sucuğun pH'sındaki düşüş, mikrobiyal faaliyet sonucunda özellikle LAB'nin gelişimi sonucu üretmiş olduğu laktik asitten kaynaklanmaktadır (Tablo 38).

Fermentasyon işleminin sucuğun fiziksel, kimyasal, mikrobiyolojik ve duyuşal özellikleri üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla bir dizi araştırma yapılmıştır. Erken

ve Bozkurt [262], ticari katkı maddelerinin fermentasyon ve depolama sırasında sucuğun kalite özelliklerine etkisini araştırmıştır. TMAB sayısı, 15 günlük fermentasyonun ilk 10 gününde artış gösterirken 10. günden sonra düşmeye başlamıştır. MK popülasyonu, tüm örneklerde fermentasyonun ilk 5 gününde artmış, daha sonra düşüş göstermiştir. LAB sayısında ise fermentasyon ile sürekli artış meydana gelmiştir.

Aksu ve Kaya [263], formülasyonuna farklı konsantrasyonlarda (%1-5) *Urtica dioica* bitkisi katılan sucukların 14 gün süreyle fermentasyonu sırasında değişen mikrobiyal yükünü incelemiştir. Sonuçta, bitkiyi içermeyen kontrol sucuklarının fermentasyonu ile TMAB yükünün başlangıçta yükselip sonra düşmeye başlayarak 8.02 log kob/g'a ulaştığını bulmuştur. LAB ve MK gelişiminde de benzer bir seyir ortaya çıkmış ve fermentasyon sonrasında sucukların LAB ve MK sayıları sırası ile 7.92 log kob/g ve 3.25 log kob/g olarak tespit edilmiştir. *Enterobacteriaceae* üyeleri ise bu çalışmada olduğu gibi fermentasyon ile tamamen inhibe olmuştur.

Diğer bir çalışmada, ticari starter kültürlerin ve katkı maddelerinin sucuğun çeşitli özellikleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla 2 farklı starter kültü ile katkı maddeleri (sodyum nitrit, sodyum nitrat, α -tokoferol, askorbik asit, potasyum sorbat, potasyum pirofosfat ve dipotasyum hidrojenfosfat) kullanılarak farklı kombinasyonlarda sucuklar üretilmiştir. Yaklaşık 15 günlük fermentasyonun sonrasında sucukların TMAB ve MK yükleri, sırasıyla 8.00-8.36 ve 2.42-3.26 arasında bulunmuştur. Sucukların pH değerleri, fermentasyonun ilk 3 gününde 5.98'den keskin bir şekilde 4.53 civarına gerilemiş, ilerleyen süreçte ise fazla bir değişime uğramamıştır. Örneklere ait TBA değerleri, fermentasyon ile tüm örneklerde 2-3 kat artmıştır [264].

Soyer ve ark. [265], farklı sıcaklık (20-22 °C ve 24-26 °C) ve yağ konsantrasyonlarının (%10, %20, %30) sucuğun kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerine etkisini araştırmıştır. Yüksek ve düşük sıcaklıkta fermente edilen sucukların başlangıçta sırasıyla 5.5 log kob/g ve 6.2 log kob/g olan TMAB sayıları, fermentasyonun ilk 2 gününde hızlı bir şekilde artmış, daha sonra yatay bir seyir izlemiştir. Aynı sıcaklıklarda başlangıçta 3.5 log kob/g ve 4.3 log kob/g olarak belirlenen LAB sayısı da TMAB'ye benzer bir değişim göstermiştir. Sucuğun yağ oranı, TMAB ve LAB sayılarının değişimi üzerinde etkili bulunurken pH ise özellikle fermentasyon sıcaklığından

etkilenmiş ve yüksek sıcaklıkta fermente edilen sucuklarda daha hızlı bir pH düşüşü gerçekleşmiştir.

Türk tipi fermente sucukların kalite parametrelerinin fermentasyon sırasındaki değişiminin araştırıldığı bir çalışmada, 9 gün boyunca fermente edilen sucukların pH'sı ilk 4 günde 5.88'den 4.90'a düşmüş, ardından fermentasyon sonuna kadar küçük bir artışla 5.05'e yükselmiştir. TBA değeri ise 0.260 mg MDA/kg'dan 0.520 mg MDA/kg'a çıkmıştır. TMAB ve LAB popülasyonu, ilk 2-4 günde artarken, fermentasyonun ilerleyen günlerince azalmaya başlamıştır. Toplam *Enterobacteriaceae* sayısı ise fermentasyon ile sürekli düşüş göstermiştir [266].

Sucuğun pH ve TBA değeri ile mikrobiyolojik özellikleri üzerine fermentasyonun etkisi üzerine yapılan çalışmaları özetlemek gerekirse, sucukların pH değerlerinin fermentasyon sırasında üretilen laktik asit dolayısıyla bütün çalışmalarda benzer şekilde düştüğü ve bu araştırmada da paralel sonuçların elde edildiği görülmektedir. TBA değerleri bazı çalışmalarda artış gösterirken, bu çalışmada ve diğerlerinde düşmüştür. Mikrobiyolojik parametrelerde ise bütün çalışmalarda birbirine benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada, sucuğun LAB ve TMAB sayısının literatürdeki çalışmalarda elde edilen sonuçlara kıyasla daha fazla artış gösterdiği belirlenmiştir. *Enterobacteriaceae* sayısı ise diğer çalışmalardaki gibi düşmüş ve tamamen inhibe olmuştur. Bu çalışmada elde edilenlerle literatürde yer alan sonuçlar arasındaki farklılıklara neden olabilecek birçok etken sayılabilir. Bu etkenler arasında; sucuk formülasyonu, kullanılan koruyucular, etin kalitesi, fermentasyon şartları, başlangıç mikrobiyal yükü ve sucuğun doğal mikroflorasında yer alan organizmaların farklı olması sayılabilir.

4.5.3.2. ANF'lerin dilimlenmiş sucuğun doğal mikrobiyal yükü üzerindeki etkisi

Türk tipi geleneksel fermente sucuk, fermentasyon sonrasında herhangi bir ısıl işleme maruz bırakılmadığı için depolanması sırasında hâlâ belli bir mikroorganizma yüküne sahiptir. Ancak, düşük sıcaklık, su aktivitesi ve besin maddelerinin azalması, pH'nın düşmesi gibi etkenler, depolama sırasında mikrobiyal gelişimi sınırlayabilmekte, belki de sayının azalmasına sebep olabilmektedir. Bu araştırmada elde edilen değerlere göre; fermente edildikten sonra dilimlenerek ANF'lerle vakum ambalajlanan sucuklardan saf LDPE film ile ambalajlanan kontrol örneklerinin TMAB, LAB ve MK sayıları

depolama sırasında küçük miktarlarda (1 log'un altında) artış göstermiş, aktif madde yüklenmiş nanokillerle üretilen ANF'ler ise doğal mikrofloranın belli ölçüde baskılanmasını sağlamıştır. Depolama sonrasında ANF'lerle sarılmış sucuk örneklerinin TMAB, LAB ve MK popülasyonları sırasıyla 8.91-10.16 log kob/g, 8.66-9.33 log kob/g ve 5.85-6.53 log kob/g arasında değişiklik göstermiştir. ANF'ler içerisinde doğal mikrobiyal yük üzerinde en etkili olanların ise THY-HNT ve THY-MMT filmleri olduğu görülmektedir (Tablo 39-41).

Bu araştırmada, fermente sucukların dilimlenerek vakum ambalajlar içerisinde soğukta muhafaza edilmesinin temel amacı, markette yer alan fermente sucuk satış koşullarının simüle edilmesidir. Literatürde, piyasada satılmakta olan ya da deneysel olarak üretilen fermente ve ısıtılmış sucukların mikrobiyolojik özelliklerinin belirlenmesi üzerine çok sayıda araştırma mevcuttur. Öztürk [267], piyasadaki toplamış olduğu fermente sucuk örneklerinin TMAB, LAB ve MK sayılarının sırasıyla 6.00-10.00 log kob/g, 3.00-9.00 log kob/g ve 2.00-7.00 log kob/g arasında değiştiğini tespit etmiştir. Diğer bir çalışmada Erkmen ve Bozkurt [260], Gaziantep'ten toplanan 50 adet fabrika ve kasap sucuk örneğinin TMAB, LAB ve MK sayılarını sırası ile 5.56-8.39 log kob/g, 4.70-6.48 log kob/g 3.15-4.68 log kob/g olarak belirlemiştir. Çon ve Gökalg [268] tarafından yapılan araştırmada, Türkiye'nin çeşitli illerinden toplanan 51 adet sucuk örneğinin TMAB, LAB ve *Enterobacteriaceae* sayılarının sırasıyla 8.72, 8.66 ve 3.59 log kob/g düzeylerinde olduğu ortaya konulmuştur.

Diğer bir çalışmada, Kahramanmaraş piyasasında satılan sucukların TMAB, MK ve toplam koliform sayılarının sırasıyla ortalama 7.51 log kob/g, 5.85 log kob/g ve 244 EMS/g olduğu saptanmıştır [269]. Kök ve ark. [270], Aydın'da satışa sunulan fermente sucukların TMAB ve MK sayılarının sırasıyla ortalama 4.20 log kob/g ve 3.00 log kob/g olarak belirlemiştir. Yapılan benzer bir çalışmada ise Elazığ'da satılan sucukların TMAB, MK ve LAB sayılarının ortalamaları sırasıyla 8.75 log kob/g, 3.08 log kob/g ve 8.56 log kob/g olarak tespit edilmiştir [271].

Günümüzde ülkemiz sucuk piyasasının önemli bir kısmını ısıtılmış sucuklar oluşturmaktadır. Bu sucuklar market raflarında doğal kılıfları ile satılmakta, ısıtılmış görmeleri dolayısıyla düşük bir mikrobiyal yüke sahip oldukları için oda sıcaklığında satılmalarında herhangi bir mahsur bulunmamaktadır. Bununla birlikte, geleneksel

fermente sucuklar, yüksek mikroorganizma yüküne sahiptirler. Bu sucukların satış sırasında oda sıcaklığında tutulmaları, fermentasyonun devam etmesiyle sucuğun tat ve aromasında istenmeyen değişikliklere yol açabilmektedir. Geleneksel fermente sucukların kalite kaybına uğramamaları için satış esnasında fermentasyonlarının engellenmesi gerekmektedir. Bu açıdan yapılması en basit uygulamalardan 2 tanesi, ürünü buzdolabı şartlarında satışa sunmak ve hava ile temasını kesmektir. Bu araştırmada üretilen ANF'ler, fermente sucukların depolanmasında hem doğal antimikrobiyallerle takviye edilmiş olmaları, hem düşük O₂ geçirgenliğine sahip olmaları, hem de vakum ambalajlamaya uygunlukları gibi avantajlara sahiptirler. Literatürde, fermente sucuklarda depolama esnasında kalitenin muhafaza edilmesinde ambalajlama uygulamalarının öneminin ortaya konulması üzerine kurulmuş herhangi bir araştırmaya rastlanmamış olup bu çalışma, bu noktada ilk olma özelliği taşımaktadır.

4.5.3.3. ANF'lerin dilimlenmiş sucuğun TBA değeri üzerindeki etkisi

Lipid oksidasyonu, diğer et ürünlerinde olduğu gibi sucuğun da raf ömrü ve kalitesini olumsuz etkileyebilecek bir faktördür. Bu araştırmada üretilen sucukların lipid oksidasyon düzeyini değerlendirmek amacıyla TBA testi yapılmıştır. Testler sonucunda, dilimlendikten sonra ANF'lerle vakum ambalajlanmış sucukların depolama esnasında TBA değerlerinin yaklaşık 2 katına çıktığı görülmektedir (Tablo 42). TBA değerlerindeki artış, sucukta oksidasyonun depolama esnasında kısmen de olsa devam ettiğini göstermektedir. Bu araştırmanın sonuçlarına göre, kontrol grubu olan saf LDPE ambalaj ile ANF'ler arasında sucuğun lipid oksidasyonunun önlenmesi açısından herhangi bir farklılık gözlenmemiştir.

Piyasada satılmakta olan sucukların TBA değerleri üzerine çok sayıda araştırma yapılmıştır. Erkmen ve Bozkurt [260], Gaziantep ilinde fabrikalarda ve kasaplarda üretilmiş olan sucuklarda TBA değerlerinin sırasıyla 0.51-2.11 ve 0.65-3.34 arasında olduğunu belirlemiştir. Diğer bir çalışmada, ısıtma işlemi uygulanarak ya da geleneksel yöntemle üretilmiş olan sucukların 90 günlük depolanması sırasında TBA değerinde artış olduğu ve ısıtma işlem uygulamasının sucukta lipid oksidasyonunu teşvik ettiği rapor edilmiştir [272]. Gök [273] tarafından yapılan çalışmada; biberiye, biberiye ekstraktı ve α - tokoferol ilavesinin fermente sucuklarda lipid oksidasyonu üzerindeki etkisi araştırılmış ve depolamanın ilk 60 gününde örneklerin TBA değerlerinin arttığı, 60.

günden sonra ise düşmeye başladığı sonucuna varılmıştır. Kontrol örneğinde en yüksek TBA değerleri görülmüş, katkı maddelerinin TBA oluşumunu inhibe ettiği belirlenmiştir. Kara ve ark. [274] tarafından yapılan çalışmada, farklı oranlarda manda eti ile üretilen fermente sucukların 90 günlük vakum ya da vakumsuz depolanmaları ile TBA değerlerinin değişimi araştırılmıştır. Sonuçta, depolama süresince tüm örneklerin TBA değerlerinin arttığı, ancak vakum uygulanan örneklerde TBA değerlerinin daha düşük çıktığı saptanmıştır. Bozkurt ve Erkmek [275], nitrit/nitrat ilave edilerek fermente edilen sucukların 45 günlük depolanması sırasında TBA değerlerinde belirgin bir artışın olmadığını ve nitrat/nitritin sucukta TBA oluşumu üzerinde herhangi bir etkisinin bulunmadığını rapor etmiştir. Bozkurt ve Erkmek [264] tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise ticari katkıların sucukta TBA oluşumu üzerindeki etkileri test edilmiştir. Sonuçta, katkı maddesi ilave edilmeden üretilen sucuklarda depolama sırasında daha yüksek TBA değerleri oluşurken, α -tokoferol, askorbik asit ve fosfatların nitrit ve nitrate göre TBA oluşumunun önlenmesi hususunda daha etkili oldukları sonucuna varılmıştır.

Literatürde ticari/deneysel sucukların depolanmaları esnasında sergilemiş oldukları TBA değer ve değişimleri ile bu çalışmada üretilen sucuklardan elde edilen sonuçlar kıyaslandığında, benzer sonuçların elde edildiği görülmektedir. Kimi araştırmacılar, TBA değerinin depolama sürecine bağlı olarak önce yükselip sonra düştüğünü bildirirken, bazıları da sürekli artış gösterdiği sonucuna ulaşmıştır. Bu çalışmada, farklı ANF'lerle vakum ambalajlanmış sucukların TBA değerlerinin özellikle depolamanın ilk 20 günü fazla artmadığı görülürken, 20. günden sonra tüm örneklerin TBA değerlerinde artışlar meydana gelmiştir. Literatürde, aktif ambalajlarla ambalajlanmış sucuklarda oluşan TBA değerlerinin belirlenmesi üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmadığından, bu çalışmanın sonuçlarıyla bu tür bir kıyaslamaya burada yer verilememiştir.

4.5.3.4. ANF'lerin dilimlenmiş sucuğun pH değeri üzerindeki etkisi

Bu çalışmada, fermente edilerek üretilmiş sucukların ANF'lerle ambalajlandıktan sonra depolanmaları sırasında pH değerlerinde meydana gelen değişimler takip edilmiştir. ANF'ler, sucuğun pH'sı üzerinde belirgin bir etkide bulunmazken örneklerin pH değerlerinin çok fazla değişmediği, bununla birlikte pH'da önemsiz de olsa küçük düşüşlerin meydana geldiği belirlenmiştir (Tablo 3.32). Türk Gıda Kodeksi Et Ürünleri

Tebliğine [276] göre, fermente edilerek üretilen geleneksel Türk sucuğunun pH değeri en fazla 5.40 civarında olmalıdır. Buna göre, bu araştırmada üretilen sucukların pH değerleri, TSE standartlarına uygun olup depolama sırasında da sucuklar standartlara uygun değerlerini muhafaza etmiştir.

Literatürde, sucukların pH değerlerine dair çok sayıda çalışma mevcuttur. Örneğin Kaya ve Aksu [277], probiyotik kültürler ilave edilerek fermente edilen ve fermentasyondan sonra dilimlenen sucukların pH değeri üzerinde depolama süresi (90 gün) ve sıcaklığı (4°C ve 10°C), starter kültürler ile ambalajlama tekniğinin (modifiye atmosfer ve vakum) etkisini araştırmıştır. pH değerinin starter kültürler (*Staphylococcus xylosus* + *Pediococcus pentosaceus* (starter kültür); starter kültür + *Bifidobacterium lactis*; starter kültür + *Lb. acidophilus*) ile depolama süresinden etkilendiği, ancak depolama sıcaklığı ve paketlenme tipinin pH üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir. Bozkurt ve Erkmen [264] tarafından yapılan çalışmada, starter kültür ve ticari katkı maddeleri ilave edilerek üretilen sucukların 45 günlük depolama sürecinde pH değerleri artış gösterirken starter kültür ile üretilenlerin pH değerleri 5.20'nin üzerine çıkmıştır. Bozkurt ve Erkmen [262] tarafından yapılan diğer bir çalışmada, nitrat/nitrit, potasyum pirofosfat, dipotasyum hidrojen fosfat, askorbik asit veya potasyum sorbat katılarak üretilen sucukların pH değerleri 45 günlük depolama sürecinde bir miktar artış göstermiş, ancak elde edilen değerler, kodekste yer alan değerlere uygun bulunmuştur. Farklı laktik starter kültürlerin sucukta *L. monocytogenes*'in canlılığı üzerindeki etkisinin araştırıldığı diğer bir çalışmada, sucukların depolama sonundaki pH değerlerinin 4.94 ile 5.09 arasında değiştiği belirlenmiştir [278]. Başka bir araştırmada, kontrollü ve kontrolsüz şartlarda fermente edilerek üretilen sucuklardan elde edilen pH değerlerinin olgunlaştırma sonrasında sırasıyla 5.00-5.23 ve 5.03-5.20 arasında değiştiği belirlenmiş ve bu değerlerin depolama sırasında bir miktar artış gösterdiği rapor edilmiştir [279].

Bu araştırmada, vakum ambalajlandıktan sonra depolanan sucuklarda elde edilen pH değerleri, literatürde yer alan sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte, literatürde depolama sırasında sucukların pH değerlerinde çoğunlukla küçük düzeylerde artış olduğu ifade edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise herhangi bir artış gözlenmemiş, pH'daki değişimler önemsiz bulunmuştur. Bunun sebebi, ANF'lerin ya da vakumdan dolayı ortamda O₂ bulunmamasının proteolitik aktivite sonucu pH artışına yol açabilecek mikroorganizmaların faaliyetlerini engellemiş olması gösterilebilir. Ayrıca

sucuğun bileşimi, kullanılan katkı maddeleri, mikrobiyolojik kalitesi gibi faktörler de pH üzerinde etkili olabilir.

4.5.4. Domates salçası

4.5.4.1. Aktif nanokompozit filmlerin domates salçasına kontamine edilen *Aspergillus niger* canlılığı üzerindeki etkisi

Domates salçası, üretiminde uygulanan yüksek sıcaklıktaki pastörizasyon işlemi sayesinde bozulmaya yol açan ve patojen bakteriler ile maya ve küflerden arındırılır. Ayrıca enzimler de bu sıcaklık uygulaması ile inaktif hale getirilmiş olur.

Konserve gıdalarda kaliteyi ve sağlığı olumsuz etkileyen en önemli faktör, spor oluşturan bakterilerin pastörizasyon esnasında canlı kalarak üründe bozulmalara ve gıda kaynaklı hastalıklara neden olmalarıdır. *Bacillus coagulans*, hafif asidik koşullarda gelişebilen termotolerant bir sporlu bakteridir. Bu bakteri, gaz oluşturmada laktik asit üretme yeteneğine sahip olup konserve gıdalarda düz ekşime denilen bozulmaya sebebiyet vermektedir [280]. *B. coagulans*, pH 4 gibi düşük değerlerde de gelişebilmekte, özellikle 4.1-5.0 pH değerine sahip domates salçası gibi konserveleer açısından risk oluşturmaktadır. Yine ısıya dayanıklı *Clostridium butyricum*, *C. beijerinckii* ve *C. pasteurianum* sporları, pastörizasyon sonrasında 3.9-4.5 arası düşük pH değerlerine sahip konserve gıdalarda vejetatif hale geçerek çoğalarak gaz oluşturmada ve üründe bombaj ile bütirik koku ile karakterize edilen bozulmalara yol açmaktadır [281]. Mayaların vejetatif hücreleri ve sporları genellikle pastörizasyon işlemi ile yok edilebilirler. Bu mikroorganizmaların konserveleerde bozulmaya yol açmaları ancak yetersiz pastörizasyon ve yetersiz vakum uygulamasından kaynaklanabilir. Küfler de aerobik özellikte olduklarından vakum uygulanmış konserveleerde gelişme şansı bulamazlar. Ancak bazı ısıya dirençli askosporlar ve vejetatif sclerotiaların pastörizasyonda canlı kaldıkları ve azalan O₂ şartlarında da (mikroaerofilik) gelişebildikleri bildirilmiştir. Bunlar arasında *Byssoschlamys fulva*, *Byssoschlamys nivea*, *Neosartorya fischeri* ve *Talaromyces flavus* ısıya dirençli olup bunların meyve ve meyve konservelelerinde bozulmalara yol açtıkları ortaya konulmuştur. Bununla birlikte ısıya dirençli küflerin domates salçasında sorun yarattıklarına dair herhangi bir rapor mevcut değildir [282].

Küflerin domates salçası açısından rol oynadıkları asıl problem, salçaların kapakları açıldıktan sonra buzdolabında muhafazaları esnasında yüzeyde gelişerek ürünü kullanılamaz hale getirmeleridir. Domates salçası yarı işlenmiş bir ürün olarak kabul edildiği ve gıda maddelerinin bileşiminde bir katkı maddesi olarak kullanıldığı için bu tür bir bozulma sonucu salçanın kullanımı imkânsız hale gelmektedir. Bu durumlarda, salçanın yüzeyindeki küf gelişimi görülen kısım alınarak atılmakta ve bu da ekonomik kayıplara sebebiyet vermektedir.

Uçucu yağlar ve bileşenlerinin küf gelişimini önlediklerine dair literatürde çok sayıda çalışma mevcuttur [283-288]. Domates salçalarında küf gelişiminin engellenmesi amacıyla uçucu yağların rolünün belirlenmesine yönelik bazı çalışmalar yapılmış ve bunlarda olumlu sonuçlar elde edilmiştir [289, 290]. Bu çalışmalarda uçucu yağlar doğrudan salça içerisine ilave edilmiştir. Bu araştırmada, salça bünyesine uçucu yağ ilavesinden ziyade nanoteknolojinin getirdiği yeniliklerden faydalanılarak ambalaj içerisine ilave edilen uçucu yağların salçada küf gelişiminin önlenmesine yönelik etkisi araştırılmıştır. Sonuçta, üretilen ANF'lerin salçaya bulaştırılan *A. niger* gelişimi üzerinde herhangi bir antifungal etkiye yol açmadıkları görülmüştür. Depolamanın 30. gününe kadar CRV-MMT, CRV-HNT ve THY-HNT kısmi bir antifungal etki gösterse de depolama süresinin uzaması ile bu etki ortadan kaybolmuştur (Tablo 44).

4.5.5. Parça et

4.5.5.1. Aktif nanokompozit filmlerin parça et yüzeyine kontamine edilen *Escherichia coli* O157:H7 canlılığı üzerindeki etkisi

Parça et, 4°C'de depolandığı zaman sadece birkaç günlük gibi kısa bir raf ömrüne sahiptir [91]. *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* ve LAB gibi bakteriler ette bozulmanın başlıca etmenleri olup et ve et ürünleri ayrıca *L. monocytogenes*, *Sal. Typhimurium*, *Sal. Enteritidis*, *E. coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* gibi gıda kaynaklı hastalıklara sebep olan bakterilerle de kontamine olabilirler [291]. Et ürünlerinde bu risklerin önlenmesi amacıyla çeşitli önlemlerin alınması gerekmektedir. Vakum ya da modifiye atmosferde ambalajlama ile soğukta muhafaza edilen etlerde raf ömrünün uzatıldığına dair bulgular rapor edilmiş olmasına rağmen, bu ortamlarda mikroaerofilik psikrotrofik bakterilerin gelişimi/canlılığı söz konusu olabilir [292, 293]. Bu problemlerin önlenmesi amacıyla gerçekleştirilen uygulamalardan bir tanesi aktif ambalajlamadır. Eğer ette

mikrobiyal gelişim yüzeyde ise, et yüzeyindeki mikroorganizma gelişiminin yavaşlatılması ya da durdurulması açısından aktif ambalajlama önemli kazanımlar sağlayabilir [291, 294].

Bu araştırmada, parça et aktif uçucu yağ bileşenleri içeren LDPE filmler ile direkt yüzey teması sağlayacak şekilde ambalajlanmış ve aktif ambalajların parça et yüzeyine kontamine edilmiş olan *E. coli* O157:H7'nin canlılığı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Yedi günlük 4 °C'de depolama sürecinde saf LDPE filmde mikrobiyal gelişim gözlenirken, kullanılan bütün ANF'ler bakteri gelişimini baskılayarak başlangıç düzeyinin altında tutmuştur (Tablo 45). Bu durum, ANF'lerin temas halinde iken yüzeyde yer alan bakteriler üzerinde üst düzey antimikrobiyal etki gösterebileceğini ortaya koymuştur. Ayrıca ANF'lerde bulunan aktif maddelerin yanı sıra ANF'lerin et yüzeyi ile hava temasını minimuma indirmesi sayesinde de fakültatif anaerob olan bakterinin gelişimi baskılanmış olabilir.

Literatürde parça ette mikroorganizmaların ambalajlama uygulamaları ile kontrol altına alınmasına yönelik çeşitli çalışmalar mevcuttur. Örneğin, Oussalah ve ark. [91] tarafından yapılan çalışmada, %1 oranında oregano, yenibahar ya da bunların karışımını içeren süt proteini bazlı filmlerin parça et yüzeyinde bulunan *E. coli* O157:H7 ve *Pseudomonas* spp. gelişimini 7 günlük depolama süresince engellediği ve oregano içeren filmin daha yüksek antibakteriyel etki gösterdiği bildirilmiştir. Siragusa ve Dickson [295], %1.7 oranında laktik asit içeren kalsiyum aljinat jellerinin et yüzeyinde immobilize edilmesi sayesinde et yüzeyine kontamine edilen *L. monocytogenes* popülasyonunun, kontrole kıyasla 7 gün sonunda 1.3 log daha düşük olduğunu belirlemiştir. Diğer bir çalışmada [296], %1 oranında oregano, tarçın veya zahter uçucu yağı içeren aljinat bazlı yenilebilir filmlerin, %2 ya da %20 oranında CaCl₂ içeren solüsyona daldırıldıktan sonra parça et yüzeyine kontamine edilmiş *E. coli* O157:H7 ve *Sal. Typhimurium* üzerindeki etkinliği test edilmiştir. Sonuçta, CaCl₂ solüsyonuna daldırılmış olsun ya da olmasın oregano ve tarçın içeren filmlerin *Sal. Typhimurium* üzerinde, oregano içeren filmlerin ise *E. coli* O157:H7 daha etkili oldukları tespit edilmiştir. Ming ve ark. [297] tarafından yapılan çalışmada, ticari plastik ambalajların iç yüzeyine nisin ve pediosin uygulanmış ve bu ambalajlar *L. monocytogenes* kontamine edilmiş etlerin vakum ambalajlamasında kullanılmıştır. Sonuçta, 2 haftalık 4 °C'de depolama ile *L. monocytogenes* tamamen inhibe edilmiştir. Cutter [298] tarafından

yapılan çalışmada, triklosan içeren plastik filmlerin rigor öncesi etlere kontamine edilmiş çeşitli patojenler (*E. coli* O157:H7, *Sal. Typhimurium* ve *Brochothrix thermosphacta*) üzerindeki antibakteriyel etkisi araştırılmıştır. Depolamanın ilk gününde kontrole kıyasla bakterilerde kısmi bir inhibisyon gerçekleşse de 14 günlük depolama sonunda kontrol ile triklosan içeren ambalajların etkisi arasında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Millette ve ark. [299], *S. aureus* kontamine edilmiş sığır eti dilimlerini 500 veya 1000 IU/mL nisin içeren aljinat filmlerle kaplamış ve 7 günlük depolama sonucunda etlerin bakteri sayılarında sırasıyla 0.91 ve 1.86 log kob/cm² azalma olduğunu bildirmiştir. Diğer bir çalışmada, farklı oranlarda (%0.5, %1, %1.5) oregano uçucu yağı içeren peyniraltı suyu bazlı filmler ile sarılan etlerin TMAB, LAB ve toplam *Pseudomonas* spp. sayıları 12 günlük soğukta depolama boyunca test edilmiştir. Sonuçta, %1.5 yağ içeren aktif filmlerin parça etlerin TMAB ve *Pseudomonas* spp. popülasyonlarında azalma sağladığı, LAB'yi ise tamamen inhibe ettiği belirlenmiştir [300]. Ercolini ve ark. [301] tarafından nisin ile aktive edilmiş iç katmanı LDPE olan plastik ambalajın parça etin doğal mikroflorası (TMAB, LAB, *Enterobacteriaceae*, *Brochothrix thermosphacta* ve *Carnobacterium*) üzerindeki antimikrobiyal etkisi üzerine yaptıkları çalışmada, LAB, *B. thermosphacta* ve *Carnobacterium* sayılarında önemli azalmalar sağlanmış ve 11 gün süreyle bu bakterilerin gelişimi inhibe edilmiştir. *Enterobacteriaceae* sayısında ise 22-32 gün boyunca 1-3 log azalma kaydedilmiştir.

Parça etin ve karkasların mikrobiyolojik kalitelerinin muhafaza edilmesi ya da yükseltilmesi amacıyla ambalajlama uygulamalarının etkisi bugüne kadar yapılan çalışmaları özetlemek gerekirse, çeşitli yenilebilir ve plastik materyaller kullanılarak üretilen aktif ambalajların parça etlerden hem doğal mikrofloranın hem de çeşitli bozucu ve patojen mikroorganizmaların dekontaminasyonunda olumlu sonuçlar verdiği görülmektedir. Bu çalışmada olduğu gibi *E. coli* O157:H7 üzerine yapılan çalışmaların bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile kıyaslaması yapıldığında ise bu çalışmada kullanılan ANF'lerin literatürde kullanılan ambalajlama yöntemlerine kıyasla daha iyi antimikrobiyal etki sağladığı görülmektedir. Bu ANF'lerin hemen hepsi, 7 günlük depolama süresi içerisinde kontrol grubu olan saf LDPE ambalaja kıyasla *E. coli* O157:H7 sayısında 3 log civarında azalmalar sağlamıştır (Tablo 45). Literatürde parça

etlerin ambalajlanmasına yönelik herhangi bir nanokompozit ambalaj uygulamasına yönelik bir çalışmaya rastlanmadığı için, bu yönde bir karşılaştırma yapılmamıştır.

4.5.5.2. ANF'lerin parça etin yüzey rengi üzerindeki etkisi

Market raflarında parça halinde satılan taze etlerde, mikrobiyolojik kalitenin yüksek tutulmasının öneminin yanı sıra görsel kalitenin de yüksek olması istenir. Çünkü tüketici eti satın alırken kararını, etteki diğer faktörlerden çok etin rengine bakarak vermektedir. Marketteki etin yüzey rengi, onun kalitesi ve sıhhatinin göstergesidir [302].

Etin renginden sorumlu olan birincil protein myoglobindir. Etin satışı esnasında, myoglobin havada bulunan O_2 ile birleşerek oksimiyoglobine dönüşmekte, bu da ete arzu edilen parlak kiraz kırmızısı bir renk kazandırmaktadır. Ancak bu reaksiyon oldukça kısa sürelidir. İleri oksidasyon neticesinde oksimiyoglobinde bulunan Fe^{+2} atomunun Fe^{+3} 'e dönüşmesiyle metmyoglobin oluşmakta ve etin rengi tekrar kahverengileşmektedir [113].

Daha önce yapılmış bilimsel çalışmalar, belli düzeyde O_2 içeren modifiye atmosfer ile yapılan depolama işlemlerinin etin arzu edilen yüzey renginin muhafazasında daha iyi sonuçlar verdiğini göstermektedir. Bununla birlikte, vakum ambalajlama ise mikrobiyolojik kalitenin daha uzun süre devam ettirilmesi açısından istenilen sonuçları verirken O_2 yokluğundan dolayı vakum ambalajlanan etlerde renk kaybı meydana gelmektedir. Öte yandan kıyma ve parça et gibi taze ürünlerde modifiye atmosferde depolama, perakendeciler için pahalı bir uygulama olarak görülmektedir [303]. Bu yüzden vakum ve modifiye atmosfer uygulamalarının bu dezavantajlarını bertaraf edecek uygun ambalajlama teknikleri üzerine araştırmalar yapılmasına ihtiyaç vardır.

Bu araştırmada, ANF'lerin etin doğal rengi üzerindeki etkisini test etmek amacıyla depolama süresince L^* , a^* ve b^* değerleri ölçülmüştür. Ambalajlanan parça etlerin yüzey L^* değerleri depolama sırasında 36-39 arasında kalmış, a^* değerlerinde depolamanın 1. günü artış, sonraki günlerde olarak düşüş meydana gelmiş, b^* değerleri ise depolamanın 4. gününe kadar yükselirken 7. günü tekrar düşmüştür. Bu 3 parametreden etin duyusal kalitesini değerlendirmede kullanılması gereken değerler a^* değerleridir. a^* değeri, kırmızılığın göstergesi olup a^* değerinin yüksek olması, etin

daha arzu edilir şekilde kırmızı renge sahip olduğunu ifade eder. Farklı ambalajlarla ambalajlanan parça etlerin depolama süresince güne ve ambalaj tipine bağlı olarak birbirinden farklı kırmızılık değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Bu araştırmada depolamanın 1. gününde, tüm örneklerin kırmızılık değeri artarken, 4. gün kontrol ve CRV-HNT hariç diğer ANF'ler ile sarılan örneklerin a^* değerleri fazla düşmemiştir. ANF'lerin parça et rengi üzerindeki etkilerini özetlemek gerekirse, özellikle depolamanın 4. gününe kadar CRV-MMT, EUG-MMT, THY-MMT ve THY-HNT'nin etlerin renk kalitesini muhafaza etmesine yardımcı olduğu görülmektedir (Tablo 46). ANF'leri etin yüzey rengi üzerindeki etkisi şöyle izah edilebilir: Etlerin depolanmasının başlangıcında ambalajın içerisinde kalan bir kısım O_2 ile myoglobinin interaksyonu sonucu oluşan oksimiyoglobin nedeniyle tüm et örnekleri ilk gün parlak kırmızı bir renge sahip olmuştur. Depolamanın devamında, ortamda yeterli O_2 olmaması ve ANF'lerden serbest kalan aktif maddelerin antioksidan özelliği göstermesi sayesinde oksimiyoglobin daha ileri derecede okside olmayarak metmyoglobin oluşumu geciktirilmiştir.

4.6. Bu araştırmada elde edilen önemli sonuçlar

Bu araştırma, temel olarak 3 aşamadan oluşmaktadır. Birinci aşamada, ambalaj üretiminde kullanılacak nanokiller, aktif maddeler ve sürfaktanlar karakterize edilmiştir. Nanokillerin karakterize edilmesi amacıyla önce bunların zetapotansiyelleri ve partikül boyut dağılımları belirlenmiştir. Aktif maddeler ve sürfaktanların nanokillerle etkileşimlerinin belirlenmesi amacıyla da nanokil/sürfaktan/aktif madde süspansiyonları hazırlanarak süspansiyonların zetapotansiyelleri belirlenmiştir. Daha sonra aktif maddeler nanokiller üzerine sürfaktanlar kullanılarak yüklenmiş ve elde edilen aktif kil nanopartiküllerinin (AKNP) 7 bakteri (*E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *Sal. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*) ve üzerindeki *in vitro* antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiştir.

Çalışmanın 2. aşamasında; AKNP'lerden antimikrobiyal aktivitesi düşük olanlar elenmiş, yüksek olanlar tespit edilerek ambalaj materyali üretiminde kullanılmıştır. Bu amaçla çift vidalı ekstrüder kullanılarak aktif ambalajlar (ANF) üretilmiş, bu aktif ambalajların karakterizasyonu amacıyla bir dizi test yapılmıştır. Bu testler; yukarıda sayılan bakteriler üzerinde antibakteriyel aktivite, DPPH radikaline karşı antioksidan

aktivite, gaz geçirgenliği, aktif madde miktarı tayini, TGA, DSC, SEM, film kalınlığı ve FTIR'dır.

Çalışmanın 3. aşaması ise farklı gıda denemelerinden oluşmaktadır. Karakterize edilen ANF'ler; kaşar peyniri, kıyma, parça et, dilimlenmiş sucuk ve salçanın ambalajlanmasında kullanılmış ve bu gıdaların depolama süresi boyunca çeşitli mikrobiyolojik ve fizikokimyasal kalite parametreleri test edilmiştir.

Bu araştırmanın tamamlanması ile kayda değer bazı bilimsel sonuçlar elde edilmiştir. Bunlar şu şekilde sıralanabilir:

- 1) Araştırmada kullanılan nanokillerin (MMT ve HNT) yüzey zetapotansiyelleri negatiftir ve pH'ya bağlı olarak değişmektedir. pH'da meydana gelen artış, yüzey negatifliğini de artırmaktadır.
- 2) MMT'nin ortalama partikül boyutu farklı pH'larda 316 nm ile 377 nm arasında değişiklik göstermektedir. Yüzey zetapotansiyelinde olduğu gibi partikül boyutu da pH'ya bağımlı olup pH yükseldikçe genel manada partikül boyutu küçülmektedir.
- 3) Killerin farklı konsantrasyonlarda aktif madde (CRV, THY ve EUG) ve sürfaktan (Tween 80) içeren dispersiyonlarında zetapotansiyellerinde meydana gelen değişiklikler istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Bu sonuç, aktif madde ve Tween 80'in noniyonik özellikte olduğunu göstermektedir.
- 4) Nanokiller ile sürfaktan/aktif maddeler arasında herhangi bir kimyasal etkileşim gerçekteşmemiştir. Buna karşılık, etkileşimin fiziksel olduğu öngörölmüştür.
- 5) Genel olarak *B. cereus*'un vejetatif formlarının AKNP'lere karşı en hassas bakteriler olduğu belirlenmiştir. CRV-MMT'nin *L. monocytogenes*'i; THY-HNT'nin *Sal. Typhimurium*'u; CRV-MMT, EUG-MMT ve THY-MMT'nin *B. cereus*'u, CRV-HNT ve EUG-MMT'nin ise *Lb. casei*'yi düşük ya da yüksek inokölasyon seviyelerinde 24 saatlik muamele sonucunda tamamen inhibe ettikleri belirlenmiştir.
- 6) EUG yüklenmiş HNT kilinin antimikrobiyal özelliği çok düşük bulunmuştur. Bu yüzden ANF üretiminde kullanılmamıştır.
- 7) Test edilen mikroorganizmalara karşı en yüksek antimikrobiyal aktivite gösteren ANF'ler şöyle sıralanmaktadır: (i) *L. monocytogenes*'e karşı THY-MMT ve

- THY-HNT; (ii) *Sal. Typhimurium*'a karşı THY-MMT; (iii) *E. coli* O157:H7'ye karşı THY-MMT, THY-HNT ve CRV-MMT; (iv) *S. aureus*'a karşı THY-MMT ve THY-HNT; (v) *B. cereus*'a karşı CRV-HNT, THY-MMT ve THY-HNT; (vi) *Lb. casei*'ye karşı THY-HNT; (vii) ve *Lb. rhamnosus*'a karşı ise CRV-MMT'dir.
- 8) ANF'lerin DPPH radikalini indirgeme aktivitelerinde şu sıralama oluşmuştur: EUG-MMT > THY-HNT > CRV-HNT > CRV-MMT > THY-MMT.
- 9) Aktif maddeler, 4 °C'de 24 °C'ye göre daha yavaş bir şekilde ambalajı terk etmiştir. Diğer bir deyişle, buzdolabı sıcaklığında ambalajda kalan aktif madde miktarı daha fazladır.
- 10) Ekstrüzyon ile ambalaj üretim işleminde, araştırmada kullanılan her 2 kil de CRV üzerinde daha yüksek koruyucu etki göstermiştir. CRV-MMT ve CRV-HNT, başlangıçta en yüksek aktif madde konsantrasyonuna sahip ANF'ler olmuştur.
- 11) HNT kilinin, aktif maddenin kontrollü salımında daha etkili olduğu belirlenmiştir.
- 12) SEM mikrografları sonucunda, nanokillerin polimer içerisinde etkili şekilde dağıldıkları, ancak yer yer kil aglomeratlarının oluştuğu görülmüştür.
- 13) ANF'lerin renk ve opaklık değerleri arasında kayda değer bir farklılık gözlenmemiştir.
- 14) TGA analizi sonucunda, EUG-MMT'nin termal yıkımının diğerlerinden daha erken, CRV-MMT'nin ise daha geç meydana geldiği ortaya çıkmıştır.
- 15) Yapılan mekanik testler, aktif madde ve nanokillerin LDPE'nin mekanik özelliklerini etkilediğini ve MMT'nin HNT kiline göre ambalajın TS ve EB değerlerinde daha fazla iyileşme sağladığını göstermiştir.
- 16) DSC analizi sonucunda, AKNP ilavesinin LDPE'nin erime noktasını yükselttiği belirlenmiştir.
- 17) Bu araştırmanın orijinal yollarından bir tanesi, üretilen ANF'lerin çeşitli gıdaların kalite ve mikrobiyolojik özellikleri üzerindeki etkisinin belirlenmesidir. Literatürde klasik aktif ambalajların gıdalarda kullanımı üzerine çok sayıda araştırmaya rastlansa da nanokompozit ambalajlarla ilgili gıda denemelerinin sayısı oldukça sınırlıdır. Sonuçta araştırma bu alandaki ilk çalışmalardan birisi olma özelliği taşımaktadır.

- 18) ANF'ler kaşar peynirinin vakum depolanmasında kullanıldığında, peynirin doğal mikrobiyal yükündeki artışı baskılamış, kaşara kontamine edilmiş *A. niger* küfü ile ve *L. monocytogenes* bakterisinin gelişimini ise inhibe etmişlerdir.
- 19) ANF'lerden THY-HNT, kıymanın ambalajlanmasında kullanıldığında, kıymada doğal LAB ve *Enterobacteriaceae* ile kıymaya kontamine edilen *E. coli* O157:H7'nin gelişimini baskımlarken EUG-MMT ve THY-HNT ise kıymada TBA oluşumunu geciktirmiştir.
- 20) Sucuğun doğal kılıflar içerisinde 12 gün süresince fermentasyonu ile TMAB, LAB ve MK yükünde artış olurken, *Enterobacteriaceae* üyeleri tamamen inhibe olmuştur. TBA ve pH değerinde ise azalma meydana gelmiştir.
- 21) Fermente edildikten sonra dilimlenmiş sucukların ANF'lerle ambalajlanması sayesinde depolama sırasında doğal mikrobiyal yükleri gelişimi inhibe edilmiş ve TMAB, LAB ile MK sayılarında düşüşler meydana gelmiştir.
- 22) Dilimlenmiş sucuğun ANF'lerle ambalajlanması, depolama sırasında artan TBA değeri üzerinde herhangi bir azalmaya sebebiyet vermemiştir.
- 23) ANF'ler, domates salçasında *A. niger* gelişimi üzerinde kontrole kıyasla herhangi bir ilave inhibisyon sağlamamıştır.
- 24) ANF'ler, parça etin sarılmasında kullandıkları zaman, parça etin yüzeyine kontamine edilmiş *E. coli* O157:H7 gelişimini kontrol altında tutmayı başarmıştır. THY-MMT ve THY-HNT, bu konuda en etkili ANF'ler olarak ön plana çıkmış ve yine depolama sonunda *E. coli* O157:H7 yükünü başlangıç inokülasyon sayısının altına düşürmüştür.
- 25) ANF'ler, parça etin yüzey renginin kontrole göre daha uzun süre arzu edilen kiraz kırmızısı renkte tutulmasını sağlamıştır. Ancak, depolamanın 7. gününde, tüm örnekler, kırmızı renklerini kaybetmişlerdir.

4.7. Bu araştırma sonucunda sunulabilecek bazı öneriler

Bu çalışmada elde edilen bulgular ışığında aşağıdaki öneriler sunulabilir:

- 1) Bu çalışmada, nanokiller karakterize edilmiş ve çeşitli aktif madde ve sürfaktanlarla etkileşimleri test edilmiştir. Çalışmada sürfaktanların noniyonik özellikte olanları denenmiş, bundan sonra da iyonik özellikte ancak toksik etkisi olmayan sürfaktanların nanokiller ile etkileşimleri test edilebilir.

- 2) Araştırmada kullanılan aktif maddelerden başka diğer fenolik maddeler ve bazı uçucu yağların da nanokiller ve farklı sürfaktanlar ile etkileşimleri test edilebilir.
- 3) Bu araştırmada kullanılan modifiye edilmemiş killerin yerine piyasada satılan organokillerin kullanılan aktif maddeler ve sürfaktanlarla etkileşimleri araştırılabilir.
- 4) Nanokillerin tabaka aralarının Tween 80 gibi GRAS nitelikteki sürfaktanlarla genişlemesi veya tamamen ayrılması için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.
- 5) Aktif maddeler ve nanokiller ile elde edilen aktif ambalajların TEM görüntüleri alınarak daha ayrıntılı karakterizasyonları yapılabilir.
- 6) Ekstrüzyon koşulları optimize edilerek aktif maddelerin ekstrüzyon aşamasında uğrayacağı kayıpların azaltılması yönünde çalışmalar yapılabilir.
- 7) Polietilen dışında nişasta, kitosan gibi biyobozunur ambalajlar başta olmak üzere diğer ambalaj materyalleri ile de araştırmalar yapılabilir.
- 8) Sürfaktanlarla muamele edilerek üretilen organik modifiye nanokillerin toksik etkileri üzerinde araştırma yapılabilir.
- 9) Ambalaj materyalinden gıdalara aktif maddelerin ve nanokillerin migrasyonu ve bunların sağlık üzerindeki etkileri test edilebilir.
- 10) Deneylerle belirlenen aktif maddelerin ambalajdan kontrollü salımı veya daha uzun süre aktivitesini koruyabilmesi için araştırmalar yapılabilir.
- 11) Aktif nanokompozit ambalajların daha farklı bakteri, küf ve maya kültürleri üzerindeki etkileri belirlenebilir.
- 12) Üretilen aktif ambalajların, araştırmada kullanılanların dışında diğer bazı gıdaların kalite özellikleri üzerindeki etkisi de araştırılabilir.
- 13) Gıda denemelerinde atmosfer şartları, sıcaklık, süre gibi faktörler kontrol altında tutularak, bunların fiziksel, kimyasal, mikrobiyolojik, biyokimyasal ve duyuşsal kalite parametreleri ile birlikte gıdalarda raf ömrü testleri de yapılabilir. Bu amaçla yanıt yüzey metodu, Arrhenius eşitliği, Gompertz eşitliği gibi çeşitli matematiksel model ve modelleme tekniklerinden faydalanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Duncan, T. V., 2011. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, **363** (1): 1-24.
2. Boccuni, F., Rondinone, B., Petyx, C., Iavicoli, S., 2008. Potential occupational exposure to manufactured nanoparticles in Italy. **Journal of Cleaner Production**, **16** (8-9): 949-956.
3. Azeredo, H. M. C. d., 2009. Nanocomposites for food packaging applications. **Food Research International**, **42** (9): 1240-1253.
4. Du, M. L., Guo, B. C., Jia, D. M., 2006. Thermal stability and flame retardant effects of halloysite nanotubes on poly(propylene). **European Polymer Journal**, **42** (6): 1362-1369.
5. Sozer, N., Kokini, J. L., 2009. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, **27** (2): 82-89.
6. Chaudhry, Q., Castle, L., 2011. Food applications of nanotechnologies: An overview of opportunities and challenges for developing countries. **Trends in Food Science & Technology**, **22** (11): 595-603.
7. Roco, M. C., Bainbridge, W. S., 2005. Societal implications of nanoscience and nanotechnology: Maximizing human benefit. **Journal of Nanoparticle Research**, **7** (1): 1-13.
8. Neethirajan, S., Jayas, D., 2011. Nanotechnology for the food and bioprocessing industries. **Food and Bioprocess Technology**, **4** (1): 39-47.
9. Carmen Moraru, Q. H., Paul Takhistov, Hulya Dogan, Jozef Kokini, "Food Nanotechnology: Current Developments and Future Prospects," in *Global Issues in Food Science and Technology*, Gustavo Barbosa-Canovas, A. M., David Lineback, Walter Spiess, Ken Buckle, Paul Colonna, Ed., 1 ed USA: Elsevier, 2009, pp. 370-399.
10. Persico, P., Ambrogi, V., Carfagna, C., Cerruti, P., Ferrocino, I., Mauriello, G., 2009. Nanocomposite polymer films containing carvacrol for antimicrobial active packaging. **Polymer Engineering and Science**, **49** (7): 1447-1455.
11. Sagdic, O., Kuscü, A., Özcan, M., Özcelik, S., 2002. Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. **Food Microbiology**, **19** (5): 473-480.
12. Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, **94** (3): 223-253.
13. Wendakoon, C. N., Sakaguchi, M., 1995. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. **Journal of Food Protection**, **58** (3): 280-283.
14. Ogata, M., Hoshi, M., Urano, S., Endo, T., 2000. Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, **48** (10): 1467-1469.
15. Yanishlieva, N. V., Marinova, E. M., Gordon, M. H., Raneva, V. G., 1999. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. **Food Chemistry**, **64** (1): 59-66.
16. Appendini, P., Hotchkiss, J. H., 2002. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, **3** (2): 113-126.
17. Han, J. H., 2000. Antimicrobial food packaging. **Food Technology**, **54** (3): 56-65.

18. Quintavalla, S., Vicini, L., 2002. Antimicrobial food packaging in meat industry. **Meat Science**, **62** (3): 373-380.
19. Alexandre, M., Dubois, P., 2000. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. **Materials Science & Engineering R-Reports**, **28** (1-2): 1-63.
20. Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo, L. H. C. M., Tara Habig McHugh, "Nanocomposites in Food Packaging – A Review," in *Advances in Diverse Industrial Applications of Nanocomposites*, Reddy, B., Ed., ed USA: InTech, 2011.
21. Martin, R. T., Bailey, S. W., Eberl, D. D., Fanning, D. S., Guggenheim, S., Kodama, H., Pevear, D. R., Srodon, J., Wicks, F. J., 1991. Report of the clay-minerals-society nomenclature committee - revised classification of clay materials. **Clays and Clay Minerals**, **39** (3): 333-335.
22. Uddin, F., 2008. Clays, nanoclays, and montmorillonite minerals. **Metallurgical and Materials Transactions a-Physical Metallurgy and Materials Science**, **39A** (12): 2804-2814.
23. Tan, W., Zhang, Y., Szeto, Y.-s., Liao, L., 2008. A novel method to prepare chitosan/montmorillonite nanocomposites in the presence of hydroxy-aluminum oligomeric cations. **Composites Science and Technology**, **68** (14): 2917-2921.
24. Ray, S., Quek, S. Y., Easteal, A., Chen, X. D., 2006. The Potential use of polymer-clay nanocomposites in food packaging. **International Journal of Food Engineering**, **2** (4): 1-11.
25. de Paiva, L. B., Morales, A. R., Valenzuela Díaz, F. R., 2008. Organoclays: Properties, preparation and applications. **Applied Clay Science**, **42** (1–2): 8-24.
26. Liu, X., Wu, Q., 2001. PP/clay nanocomposites prepared by grafting-melt intercalation. **Polymer**, **42** (25): 10013-10019.
27. Kwolek, T., Hodorowicz, M., Stadnicka, K., Czapkiewicz, J., 2003. Adsorption isotherms of homologous alkyl dimethylbenzylammonium bromides on sodium montmorillonite. **Journal of Colloid and Interface Science**, **264** (1): 14-19.
28. Tang, Y., Hu, Y., Song, L., Zong, R., Gui, Z., Chen, Z., Fan, W., 2003. Preparation and thermal stability of polypropylene/montmorillonite nanocomposites. **Polymer Degradation and Stability**, **82** (1): 127-131.
29. Yılmaz, N., Yapar, S., 2004. Adsorption properties of tetradecyl- and hexadecyl trimethylammonium bentonites. **Applied Clay Science**, **27** (3–4): 223-228.
30. Shen, Y. H., 2001. Preparations of organobentonite using nonionic surfactants. **Chemosphere**, **44** (5): 989-995.
31. Lvov, Y. M., Shchukin, D. G., Moñhwald, H., Price, R. R., 2008. Halloysite clay nanotubes for controlled release of protective agents. **ACS Nano**, **2** (5): 814-820.
32. Ravindra Kamble, M. G., Sheetal Gaikawad, Bijoy Kumar Panda, 2012. Halloysite Nanotubes and Applications: A Review. **Journal of Advanced Scientific Research**, **3** (2): 25-29.
33. Churchman, G. J., Theng, B. K. G., 1984. Interactions of halloysites with amides - mineralogical factors affecting complex-formation. **Clay Minerals**, **19** (2): 161-175.
34. Costanzo, P. M., Giese, R. F., 1986. Ordered halloysite - dimethylsulfoxide intercalate. **Clays and Clay Minerals**, **34** (1): 105-107.

35. Frost, R. L., Van Der Gaast, S., Zbik, M., Klopogge, J. T., Paroz, G. N., 2002. Birdwood kaolinite: a highly ordered kaolinite that is difficult to intercalate - an XRD, SEM and Raman spectroscopic study. **Applied Clay Science**, **20** (4-5): 177-187.
36. Luca, V., Thomson, S., 2000. Intercalation and polymerisation of aniline within a tubular aluminosilicate. **Journal of Materials Chemistry**, **10** (9): 2121-2126.
37. Horvath, E., Kristof, J., Frost, R. L., Redey, A., Vagvolgyi, V., Cseh, T., 2003. Hydrazine-hydrate intercalated halloysite under controlled-rate thermal analysis conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, **71** (3): 707-714.
38. Joussein, E., Petit, S., Delvaux, B., 2007. Behavior of halloysite clay under formamide treatment. **Applied Clay Science**, **35** (1-2): 17-24.
39. Mellouk, S., Cherifi, S., Sassi, M., Marouf-Khelifa, K., Bengueddach, A., Schott, J., Khelifa, A., 2009. Intercalation of halloysite from Djebel Debagh (Algeria) and adsorption of copper ions. **Applied Clay Science**, **44** (3-4): 230-236.
40. Patel, H. A., Somani, R. S., Bajaj, H. C., Jasra, R. V., 2006. Nanoclays for polymer nanocomposites, paints, inks, greases and cosmetics formulations, drug delivery vehicle and waste water treatment. **Bulletin of Materials Science**, **29** (2): 133-145.
41. Gao, F., 2004. Clay/polymer composites: the story. **Materials Today**, **7** (11): 50-55.
42. Klopogge, J. T., 2004. Handbook of Layered Materials: edited by Scott M. Auerbach, Kathleen A. Carrado and Prabir K. Dutta. Marcel Dekker Inc, New York, Basel, 2004, 646 pp. [ISBN 0-8247-5349-6]. Price \$195. **Clays and Clay Minerals**, **52** (6): 795-797.
43. Hussain, F., Hojjati, M., Okamoto, M., Gorga, R. E., 2006. Review article: Polymer-matrix nanocomposites, processing, manufacturing, and application: An overview. **Journal of Composite Materials**, **40** (17): 1511-1575.
44. Shen, Z. Q., Simon, G. P., Cheng, Y. B., 2002. Comparison of solution intercalation and melt intercalation of polymer-clay nanocomposites. **Polymer**, **43** (15): 4251-4260.
45. Rhim, J. W., Ng, P. K. W., 2007. Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, **47** (4): 411-433.
46. J. N. Hay, S. J. S., 2000. A review of nanocomposites.
47. Silvestre, C., Duraccio, D., Cimmino, S., 2011. Food packaging based on polymer nanomaterials. **Progress in Polymer Science**, **36** (12): 1766-1782.
48. Nielsen, L. E., 1967. Models for the permeability of filled polymer systems. **Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry**, **1** (5): 929-942.
49. Rhim, J. W., 2011. Effect of clay contents on mechanical and water vapor barrier properties of agar-based nanocomposite films. **Carbohydrate Polymers**, **86** (2): 691-699.
50. Lim, G. O., Jang, S. A., Bin Song, K., 2010. Physical and antimicrobial properties of *Gelidium corneum*/nano-clay composite film containing grapefruit seed extract or thymol. **Journal of Food Engineering**, **98** (4): 415-420.
51. Lotti, C., Isaac, C. S., Branciforti, M. C., Alves, R. M. V., Liberman, S., Bretas, R. E. S., 2008. Rheological, mechanical and transport properties of blown films of high density polyethylene nanocomposites. **European Polymer Journal**, **44** (5): 1346-1357.

52. Abdollahi, M., Rezaei, M., Farzi, G., 2012. A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. **Journal of Food Engineering**, **111** (2): 343-350.
53. Hong, S.-I., Rhim, J.-W., 2012. Preparation and properties of melt-intercalated linear low density polyethylene/clay nanocomposite films prepared by blow extrusion. **LWT - Food Science and Technology**, **48** (1): 43-51.
54. Ozcalik, O., Tihminlioglu, F., 2013. Barrier properties of corn zein nanocomposite coated polypropylene films for food packaging applications. **Journal of Food Engineering**, **114** (4): 505-513.
55. Farahnaky, A., Dadfar, S. M. M., Shahbazi, M. Physical and mechanical properties of gelatin-clay nanocomposite. **Journal of Food Engineering**, (0)
56. Ali Dadfar, S. M., Alemzadeh, I., Reza Dadfar, S. M., Vosoughi, M., 2011. Studies on the oxygen barrier and mechanical properties of low density polyethylene/organoclay nanocomposite films in the presence of ethylene vinyl acetate copolymer as a new type of compatibilizer. **Materials & Design**, **32** (4): 1806-1813.
57. Choudalakis, G., Gotsis, A. D., 2009. Permeability of polymer/clay nanocomposites: A review. **European Polymer Journal**, **45** (4): 967-984.
58. Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., Bigger, S. W., 2003. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. **Journal of Food Science**, **68** (2): 408-420.
59. Sanchez-Garcia, M. D., Ocio, M. J., Gimenez, E., Lagaron, J. M., 2008. Novel polycaprolactone nanocomposites containing thymol of interest in antimicrobial film and coating applications. **Journal of Plastic Film and Sheeting**, **24** (3-4): 239-251.
60. Li, B., Kennedy, J. F., Peng, J. L., Yie, X., Xie, B. J., 2006. Preparation and performance evaluation of glucomannan-chitosan-nisin ternary antimicrobial blend film. **Carbohydrate Polymers**, **65** (4): 488-494.
61. Tunc, S., Duman, O., 2011. Preparation of active antimicrobial methyl cellulose/carvacrol/montmorillonite nanocomposite films and investigation of carvacrol release. **Lwt-Food Science and Technology**, **44** (2): 465-472.
62. Cha, D. S., Cooksey, K., Chinnan, M. S., Park, H. J., 2003. Release of nisin from various heat-pressed and cast films. **Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology**, **36** (2): 209-213.
63. Cagri, A., Ustunol, Z., Ryser, E. T., 2004. Antimicrobial edible films and coatings. **Journal of Food Protection**, **67** (4): 833-848.
64. Sondi, I., Salopek-Sondi, B., 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, **275** (1): 177-182.
65. Li, Q., Mahendra, S., Lyon, D. Y., Brunet, L., Liga, M. V., Li, D., Alvarez, P. J. J., 2008. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. **Water Research**, **42** (18): 4591-4602.
66. Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., Yacaman, M. J., 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, **16** (10): 2346.
67. Wei, D. W., Sun, W. Y., Qian, W. P., Ye, Y. Z., Ma, X. Y., 2009. The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. **Carbohydrate Research**, **344** (17): 2375-2382.

68. Bryaskova, R., Pencheva, D., Kyulavska, M., Bozukova, D., Debuigne, A., Detrembleur, C., 2010. Antibacterial activity of poly(vinyl alcohol)-b-poly(acrylonitrile) based micelles loaded with silver nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, **344** (2): 424-428.
69. Pinto, R. J. B., Almeida, A., Fernandes, S. C. M., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., Neto, C. P., Trindade, T., 2013. Antifungal activity of transparent nanocomposite thin films of pullulan and silver against *Aspergillus niger*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, **103** (0): 143-148.
70. de Moura, M. R., Mattoso, L. H. C., Zucolotto, V., 2012. Development of cellulose-based bactericidal nanocomposites containing silver nanoparticles and their use as active food packaging. **Journal of Food Engineering**, **109** (3): 520-524.
71. Zapata, P. A., Tamayo, L., Paez, M., Cerda, E., Azocar, I., Rabagliati, F. M., 2011. Nanocomposites based on polyethylene and nanosilver particles produced by metallocenic "in situ" polymerization: synthesis, characterization, and antimicrobial behavior. **European Polymer Journal**, **47** (8): 1541-1549.
72. Hu, Q., Fang, Y., Yang, Y., Ma, N., Zhao, L., 2011. Effect of nanocomposite-based packaging on postharvest quality of ethylene-treated kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) during cold storage. **Food Research International**, **44** (6): 1589-1596.
73. Emamifar, A., Kadivar, M., Shahedi, M., Soleimani-Zad, S., 2010. Evaluation of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on shelf life of fresh orange juice. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, **11** (4): 742-748.
74. Li, H., Li, F., Wang, L., Sheng, J., Xin, Z., Zhao, L., Xiao, H., Zheng, Y., Hu, Q., 2009. Effect of nano-packing on preservation quality of Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill. var. *inermis* (Bunge) Rehd). **Food Chemistry**, **114** (2): 547-552.
75. Wang, K., Jin, P., Shang, H., Li, H., Xu, F., Hu, Q., Zheng, Y., 2010. A combination of hot air treatment and nano-packing reduces fruit decay and maintains quality in postharvest Chinese bayberries. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **90** (14): 2427-2432.
76. Kalemba, D., Kunicka, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, **10** (10): 813-829.
77. Seydim, A. C., Sarikus, G., 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Research International**, **39** (5): 639-644.
78. Maizura, M., Fazilah, A., Norziah, M. H., Karim, A. A., 2007. Antibacterial activity and mechanical properties of partially hydrolyzed sago starch–alginate edible film containing lemongrass oil. **Journal of Food Science**, **72** (6): C324-C330.
79. 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** (8): 859-865.
80. Mascheroni, E., Chalier, P., Gontard, N., Gastaldi, E., 2010. Designing of a wheat gluten/montmorillonite based system as carvacrol carrier: Rheological and structural properties. **Food Hydrocolloids**, **24** (4): 406-413.

81. Del Nobile, M. A., Conte, A., Incoronato, A. L., Panza, O., 2008. Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. **Journal of Food Engineering**, **89** (1): 57-63.
82. Pilati, F., Degli Esposti, M., Bondi, M., Iseppi, R., Toselli, M., 2013. Designing of antibacterial plastics: thymol release from photocured thymol-doped acrylic resins. **Journal of Materials Science**, **48** (12): 4378-4386.
83. Manso, S., Cacho-Nerin, F., Becerril, R., Nerín, C., 2013. Combined analytical and microbiological tools to study the effect on *Aspergillus flavus* of cinnamon essential oil contained in food packaging. **Food Control**, **30** (2): 370-378.
84. Becerril, R., Gómez-Lus, R., Goñi, P., López, P., Nerín, C., 2007. 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*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, **388** (5-6): 1003-1011.
85. Guarda, A., Rubilar, J. F., Miltz, J., Galotto, M. J., 2011. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **International Journal of Food Microbiology**, **146** (2): 144-150.
86. Ben Arfa, A., Preziosi-Belloy, L., Chalier, P., Gontard, N., 2007. Antimicrobial paper based on a soy protein isolate or modified starch coating including carvacrol and cinnamaldehyde. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **55** (6): 2155-2162.
87. Ramos, M., Jimenez, A., Peltzer, M., Garrigos, M. C., 2012. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. **Journal of Food Engineering**, **109** (3): 513-519.
88. Emiroğlu, Z. K., Yemiş, G. P., Coşkun, B. K., Candoğan, K., 2010. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. **Meat Science**, **86** (2): 283-288.
89. Rodríguez, A., Batlle, R., Nerín, C., 2007. The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging. Part II. **Progress in Organic Coatings**, **60** (1): 33-38.
90. Rodriguez-Lafuente, A., Nerin, C., Batlle, R., 2010. Active paraffin-based paper packaging for extending the shelf life of cherry tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **58** (11): 6780-6786.
91. Oussalah, M., Caillet, S., Salmiéri, S., Saucier, L., Lacroix, M., 2004. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **52** (18): 5598-5605.
92. Muriel-Galet, V., Cerisuelo, J. P., López-Carballo, G., Aucejo, S., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P., 2013. Evaluation of EVOH-coated PP films with oregano essential oil and citral to improve the shelf-life of packaged salad. **Food Control**, **30** (1): 137-143.
93. Rojas-Graü, M. A., Raybaudi-Massilia, R. M., Soliva-Fortuny, R. C., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., Martín-Belloso, O., 2007. Apple puree-alginate edible coating as carrier of antimicrobial agents to prolong shelf-life of fresh-cut apples. **Postharvest Biology and Technology**, **45** (2): 254-264.
94. Raybaudi-Massilia, R. M., Rojas, G., Mar, a, A., Mosqueda-Melgar, J., Mart, n-Belloso, O., 2008. Comparative study on essential oils incorporated into an alginate-based edible coating to assure the safety and quality of fresh-cut fuji apples. **Journal of Food Protection**, **71**(6): 1150-1161.

95. Cerisuelo, J. P., Alonso, J., Aucejo, S., Gavara, R., Hernandez-Munoz, P., 2012. Modifications induced by the addition of a nanoclay in the functional and active properties of an EVOH film containing carvacrol for food packaging. **Journal of Membrane Science**, **423**: 247-256.
96. Sanchez-Garcia, M. D., Ocio, M. J., Gimenez, E., Lagaron, J. M., 2008. Novel Polycaprolactone nanocomposites containing thymol of interest in antimicrobial film and coating applications. **Journal of Plastic Film & Sheeting**, **24** (3-4): 239-251.
97. Calabi-Floody, M., Bendall, J. S., Jara, A. A., Welland, M. E., Theng, B. K. G., Rumpel, C., Mora, M. d. l. L., 2011. Nanoclays from an Andisol: Extraction, properties and carbon stabilization. **Geoderma**, **161** (3-4): 159-167.
98. Tong, Z., Deng, Y., 2006. Synthesis of water-based polystyrene-nanoclay composite suspension via miniemulsion polymerization. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, **45** (8): 2641-2645.
99. Tornuk, F., Cankurt, H., Ozturk, I., Sagdic, O., Bayram, O., Yetim, H., 2011. Efficacy of various plant hydrosols as natural food sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium on fresh cut carrots and apples. **International Journal of Food Microbiology**, **148** (1): 30-35.
100. Byun, Y., Kim, Y. T., Whiteside, S., 2010. Characterization of an antioxidant polylactic acid (PLA) film prepared with α -tocopherol, BHT and polyethylene glycol using film cast extruder. **Journal of Food Engineering**, **100** (2): 239-244.
101. Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., Bigger, S. W., 2006. Characterization of antimicrobial films containing basil extracts. **Packaging Technology and Science**, **19** (5): 259-268.
102. "ASTM D882-2010 Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting," ed. West Conshohocken, PA: ASTM International, 2010.
103. Rhim, J.-W., Hong, S.-I., Park, H.-M., Ng, P. K. W., 2006. Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **54** (16): 5814-5822.
104. Casariego, A., Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Teixeira, J. A., Cruz, L., Díaz, R., Vicente, A. A., 2009. Chitosan/clay films' properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles' concentrations. **Food Hydrocolloids**, **23** (7): 1895-1902.
105. Morawiec, J., Pawlak, A., Slouf, M., Galeski, A., Piorkowska, E., Krasnikowa, N., 2005. Preparation and properties of compatibilized LDPE/organo-modified montmorillonite nanocomposites. **European Polymer Journal**, **41** (5): 1115-1122.
106. Siripatrawan, U., Harte, B. R., 2010. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, **24**(8): 770-775.
107. Cankurt, H., "Kaşar peyniri üretimi, özel görüşme," 2013.
108. Erkmen, O., 2011. Basic Methods for the Microbiological Analysis of Foods. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
109. Ture, H., Eroglu, E., Ozen, B., Soyer, F., 2011. Effect of biopolymers containing natamycin against *Aspergillus niger* and *Penicillium roquefortii* on fresh kashar cheese. **International Journal of Food Science & Technology**, **46** (1): 154-160.

110. Kosikowski, F. V., Mistry, V. V., 1997. Cheese and fermented milk foods. Volume 2: procedures and analysis. FV Kosikowski LLC, Westport.
111. Ulu, H., 2004. Evaluation of three 2-thiobarbituric acid methods for the measurement of lipid oxidation in various meats and meat products. **Meat Science**, **67** (4): 683-687.
112. Skandamis, P. N., Nychas, G. J. E., 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. **Journal of Applied Microbiology**, **91** (6): 1011-1022.
113. Gökalp, H. Y., Kaya, M. Zorba, Ö., 2004. Et Ürünleri İşleme Mühendisliği. Atatürk Üniv. Yayın No:786, Ziraat Fak. Yayın No: 320, Erzurum.
114. Gökalp, H. Y., Kaya, M., Tülek, Y., Zorba, Ö., 2001. Et Ürünlerinde Kalite Kontrolü ve Laboratuar Uygulama Kılavuzu. Atatürk Üniversitesi Yayınları No: 751, Erzurum.
115. Djenane, D., Sánchez-Escalante, A., Beltrán, J. A., Roncalés, P., 2003. The shelf-life of beef steaks treated with dl-lactic acid and antioxidants and stored under modified atmospheres. **Food Microbiology**, **20** (1): 1-7.
116. SAS, "SAS/STAT User's Guide (Version 8.2). Cary, NC: SAS Institute Inc.," ed, 2000.
117. García-García, S., Wold, S., Jonsson, M., 2009. Effects of temperature on the stability of colloidal montmorillonite particles at different pH and ionic strength. **Applied Clay Science**, **43** (1): 21-26.
118. Tombácz, E., Ábrahám, I., Gilde, M., Szántó, F., 1990. The pH-dependent colloidal stability of aqueous montmorillonite suspensions. **Colloids and Surfaces**, **49** (0): 71-80.
119. Avena, M. J., De Pauli, C. P., 1998. Proton adsorption and electrokinetics of an Argentinean montmorillonite. **Journal of Colloid and Interface Science**, **202** (1): 195-204.
120. Rice, Z., Bergkvist, M., 2009. Adsorption characteristics of a cationic porphyrin on nanoclay at various pH. **Journal of Colloid and Interface Science**, **335** (2): 189-195.
121. Lee, C.-W., Hwang, T., Nam, G.-Y., Hong, J.-P., Lee, D.-A., Oh, J.-S., Kwak, S. B., Lee, S.-H., Lee, W.-S., Yang, K.-M., Park, J.-M., Lee, Y.-S., Chung, K.-H., Lee, Y., Choi, H. R., Nam, J.-D., 2011. A novel synthetic route to natural rubber/montmorillonite nanocomposites using colloid stabilization–destabilization method. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, **42** (11): 1826-1832.
122. Verma, N. K., Moore, E., Blau, W., Volkov, Y., Babu, P. R., 2012. Cytotoxicity evaluation of nanoclays in human epithelial cell line A549 using high content screening and real-time impedance analysis. **Journal of Nanoparticle Research**, **14** (9)
123. Olivier, M. G., Fedel, M., Sciamanna, V., Vandermiers, C., Motte, C., Poelman, M., Deflorian, F., 2011. Study of the effect of nanoclay incorporation on the rheological properties and corrosion protection by a silane layer. **Progress in Organic Coatings**, **72** (1–2): 15-20.
124. Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., Delie, F., 2008. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, **69** (1): 1-9.

125. Voorn, D. J., Ming, W., van Herk, A. M., 2006. Polymer–clay nanocomposite latex particles by inverse pickering emulsion polymerization stabilized with hydrophobic montmorillonite platelets. **Macromolecules**, **39** (6): 2137-2143.
126. Lin, Z., Rennekar, S., Hindman, D., 2008. Nanocomposite-based lignocellulosic fibers 1. Thermal stability of modified fibers with clay-polyelectrolyte multilayers. **Cellulose**, **15** (2): 333-346.
127. Jordan, J. W., 1949. Organophilic bentonites. I. Swelling in organic liquids. **The Journal of Physical and Colloid Chemistry**, **53** (2): 294-306.
128. 1964. An introduction to clay colloid chemistry. By H van Olphen. Interscience Publishers, Div. of John Wiley & Sons, 605 Third Ave., New York 16, N. Y, 1963. xvi + 301 pp. 15.5 × 23 cm. Price \$10. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, **53** (2): 230-230.
129. Giannelis, E. P., 1996. polymer layered silicate nanocomposites. **Advanced Materials**, **8** (1): 29-35.
130. Pankil Singla, R. M., Siddh Nath Upadhyay, 2012. Clay modification by the use of organic cations. **Green and Sustainable Chemistry**, **2**: 21-25.
131. Wang, P., Jia, L., Sanders, B. G., Kline, K., 2007. Liposomal or nanoparticle alpha-TEA reduced 66cl-4 murine mammary cancer burden and metastasis. **Drug Delivery**, **14** (8): 497-505.
132. Akbulut, S., Kurt, Z.N., Arasan, S., 2013. Surfactant modified clays' consistency limits and contact angles. **Earth Sciences Research Journal**, **16**(2): 13-19.
133. Tsimpliaraki, A., Zuburtikudis, I., Marras, S. I., Panayiotou, C., 2011. Optimizing the nanofibrous morphology of electrospun poly[(butylene succinate)- co-(butylene adipate)]/clay nanocomposites and revealing the effect of the fibre nano-dimension on the attained material properties. **Polymer International**, **60**(5): 859-871.
134. Bihari, P., Vippola, M., Schultes, S., Praetner, M., Khandoga, A. G., Reichel, C. A., Coester, C., Tuomi, T., Rehberg, M., Krombach, F., 2008. Optimized dispersion of nanoparticles for biological *in vitro* and *in vivo* studies. **Particle and Fibre Toxicology**, **5**
135. Incoronato, A. L., Buonocore, G. G., Conte, A., Lavorgna, M., Nobile, M. A. D., 2010. Active systems based on silver-montmorillonite nanoparticles embedded into bio-based polymer matrices for packaging applications. **Journal of Food Protection**, **73** (12): 2256-2262.
136. Espitia, P., Soares, N. d., Coimbra, J. d., Andrade, N., Cruz, R., Medeiros, E., 2012. Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. **Food and Bioprocess Technology**, **5** (5): 1447-1464.
137. Ōya, A., Banse, T., Ohashi, F., Ōtani, S., 1991. An antimicrobial and antifungal agent derived from montmorillonite. **Applied Clay Science**, **6** (2): 135-142.
138. Llorens, A., Lloret, E., Picouet, P. A., Trbojevich, R., Fernandez, A., 2012. Metallic-based micro and nanocomposites in food contact materials and active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, **24** (1): 19-29.
139. Gashti, M. P., Almasian, A., 2012. Synthesizing tertiary silver/silica/kaolinite nanocomposite using photo-reduction method: Characterization of morphology and electromagnetic properties. **Composites Part B: Engineering**, **43** (8): 3374-3383.
140. Chiao, S. H., Lin, S. H., Shen, C. I., Liao, J. W., Bau, I. J., Wei, J. C., Tseng, L. P., Hsu, S. H., Lai, P. S., Lin, S. Z., Lin, J. J., Su, H. L., 2012. Efficacy and safety

- of nanohybrids comprising silver nanoparticles and silicate clay for controlling Salmonella infection. **Int J Nanomedicine**, **7**: 2421-32.
141. Temiz, A., 2008. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatiboğlu Yayınevi, Ankara.
 142. MacGowan, A. P., Wootton, M., Hedges, A. J., Bowker, K. E., Holt, H. A., Reeves, D. S., 1996. A new time-kill method of assessing the relative efficacy of antimicrobial agents alone and in combination developed using a representative β -lactam, aminoglycoside and fluoroquinolone. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **38**: 193-203.
 143. Dorman, H. J. D., Deans, S. G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, **88** (2): 308-316.
 144. Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., Nychas, G. J. E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, **91** (3): 453-462.
 145. Helander, I. M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M., von Wright, A., 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **46** (9): 3590-3595.
 146. Ultee, A., Kets, E. P. W., Alberda, M., Hoekstra, F. A., Smid, E. J., 2000. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. **Archives of Microbiology**, **174** (4): 233-238.
 147. Ultee, Gorris, Smid, 1998. Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Journal of Applied Microbiology**, **85** (2): 211-218.
 148. Gallucci, M. N., Oliva, M., Casero, C., Dambolena, J., Luna, A., Zygodlo, J., Demo, M., 2009. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. **Flavour and Fragrance Journal**, **24** (6): 348-354.
 149. Thoroski J, Blank G, C, B., 1989. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**, **52** (6): 397-403.
 150. Gill, A. O., Holley, R. A., 2004. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. **Applied and Environmental Microbiology**, **70** (10): 5750-5755.
 151. Rajamanickam, U., Mysamy, P., Viswanathan, S., Muthusamy, P., "Biosynthesis of zinc nanoparticles using actinomycetes for antibacterial food packaging," *International Conference on Nutrition and Food Sciences*, Singapore, 2012, pp. 195-199.
 152. Panáček, A., Kvítek, L., Pucek, R., Kolář, M., Vecňáková, R., Pizúrová, N., Sharma, V. K., Nevěčná, T. j., Zbořil, R., 2006. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. **The Journal of Physical Chemistry B**, **110** (33): 16248-16253.
 153. Zhang, L., Jiang, Y., Ding, Y., Povey, M., York, D., 2007. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). **Journal of Nanoparticle Research**, **9** (3): 479-489.

154. Yoksan, R., Chirachanchai, S., 2009. Silver nanoparticles dispersing in chitosan solution: Preparation by γ -ray irradiation and their antimicrobial activities. **Materials Chemistry and Physics**, **115** (1): 296-302.
155. Kvitek, L., Panacek, A., Soukupova, J., Kolar, M., Vecerova, R., Prucek, R., Holecova, M., Zboril, R., 2008. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). **The Journal of Physical Chemistry C**, **112** (15): 5825-5834.
156. Suppakul, P., "Alternative Technique for the Quantitative Determination of Antimicrobial Activity of Antimicrobial Packaging Film Containing Lipophilic Materials " in *Food Packaging: Procedures, Management and Trends*, Kontominas, M. G., Ed., ed ABD: Nova Science Publishers, 2012, pp. 93-116.
157. Zivanovic, S., Li, J. J., Davidson, P. M., Kit, K., 2007. Physical, mechanical, and antibacterial properties of chitosan/PEO blend films. **Biomacromolecules**, **8** (5): 1505-1510.
158. Fajardo, P., Balaguer, M. P., Vieites, J. M., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P., 2010. Active packaging based on chemically modified gliadins as sustained release systems of natural antimicrobial compounds, pp. 209. *International Conference on Food Innovation, 25-29 October 2010, Valencia, Spain*.
159. Siripatrawan, U., Harte, B. R., 2010. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, **24** (8): 770-775.
160. Moore, M. E., Han, I. Y., Acton, J. C., Ogale, A. A., Barmore, C. R., Dawson, P. L., 2003. Effects of Antioxidants in Polyethylene Film on Fresh Beef Color. **Journal of Food Science**, **68** (1): 99-104.
161. Karadag, A., Ozcelik, B., Saner, S., 2009. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, **2** (1): 41-60.
162. Giménez, B., Gómez-Guillén, M. C., López-Caballero, M. E., Gómez-Estaca, J., Montero, P., 2012. Role of sepiolite in the release of active compounds from gelatin-egg white films. **Food Hydrocolloids**, **27** (2): 475-486.
163. Sanchez-Garcia, M. D., Lopez-Rubio, A., Lagaron, J. M., 2010. Natural micro and nanobiocomposites with enhanced barrier properties and novel functionalities for food biopackaging applications. **Trends in Food Science & Technology**, **21** (11): 528-536.
164. Abdullayev, E., Lvov, Y., 2013. Halloysite clay nanotubes as a ceramic "skeleton" for functional biopolymer composites with sustained drug release. **Journal of Materials Chemistry B**, **1** (23): 2894-2903.
165. Abdullayev, E., Joshi, A., Wei, W., Zhao, Y., Lvov, Y., 2012. Enlargement of halloysite clay nanotube lumen by selective etching of aluminum oxide. **ACS Nano**, **6** (8): 7216-7226.
166. Zhong, Y., Janes, D., Zheng, Y., Hetzer, M., De Kee, D., 2007. Mechanical and oxygen barrier properties of organoclay-polyethylene nanocomposite films. **Polymer Engineering & Science**, **47** (7): 1101-1107.
167. Hotta, S., Paul, D. R., 2004. Nanocomposites formed from linear low density polyethylene and organoclays. **Polymer**, **45** (22): 7639-7654.
168. Kanmani, P., Rhim, J.-W., 2014. Physical, mechanical and antimicrobial properties of gelatin based active nanocomposite films containing AgNPs and nanoclay. **Food Hydrocolloids**, **35** (0): 644-652.

169. Müller, C. M. O., Laurindo, J. B., Yamashita, F., 2011. Effect of nanoclay incorporation method on mechanical and water vapor barrier properties of starch-based films. **Industrial Crops and Products**, **33** (3): 605-610.
170. Almasi, H., Ghanbarzadeh, B., Entezami, A. A., 2010. Physicochemical properties of starch–CMC–nanoclay biodegradable films. **International Journal of Biological Macromolecules**, **46** (1): 1-5.
171. Lewitus, D., McCarthy, S., Ophir, A., Kenig, S., 2006. The Effect of nanoclays on the properties of PLLA-modified polymers part 1: Mechanical and thermal properties. **Journal of Polymers and the Environment**, **14** (2): 171-177.
172. Sothornvit, R., Rhim, J.-W., Hong, S.-I., 2009. Effect of nano-clay type on the physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/clay composite films. **Journal of Food Engineering**, **91** (3): 468-473.
173. Rhim, J.-W., Hong, S.-I., Ha, C.-S., 2009. Tensile, water vapor barrier and antimicrobial properties of PLA/nanoclay composite films. **LWT - Food Science and Technology**, **42** (2): 612-617.
174. Synder, R., 2007. Characterization of nanoclay nanocomposites. **Composites & Polycon**, **1**: 1-7.
175. Bensadoun, F., Kchit, N., Billotte, C., Trochu, F., Ruiz, E., 2011. A Comparative study of dispersion techniques for nanocomposite made with nanoclays and an unsaturated polyester resin. **Journal of Nanomaterials**, Article ID 406087, 1-12.
176. Silva, C. d., Canto, L., Visconti, L., 2010. Effect of extrusion processing variables on the polyethylene/clay nanocomposites rheological properties **Chemistry and Chemical Technology**, **4** (1): 61-68.
177. Dennis, H. R., Hunter, D. L., Chang, D., Kim, S., White, J. L., Cho, J. W., Paul, D. R., 2001. Effect of melt processing conditions on the extent of exfoliation in organoclay-based nanocomposites. **Polymer**, **42** (23): 9513-9522.
178. Wang, X., 2008. Use of extrusion for synthesis of starch-clay nanocomposites for biodegradable packaging films. Kansas State University, USA, Food Science Institute, College of Agriculture, PhD, Kansas.
179. Picard, E., Vermogen, A., Gérard, J. F., Espuche, E., 2007. Barrier properties of nylon 6-montmorillonite nanocomposite membranes prepared by melt blending: Influence of the clay content and dispersion state: Consequences on modelling. **Journal of Membrane Science**, **292** (1–2): 133-144.
180. Sinha Ray, S., Bousmina, M., 2005. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world. **Progress in Materials Science**, **50** (8): 962-1079.
181. Brody, A., 2003. Nanocomposite technology in food packaging. **Food Technol.**, **61** (10): 80-83.
182. Park, H.-M., Li, X., Jin, C.-Z., Park, C.-Y., Cho, W.-J., Ha, C.-S., 2002. Preparation and properties of biodegradable thermoplastic starch/clay hybrids. **Macromolecular Materials and Engineering**, **287** (8): 553-558.
183. Golebiewski, J., Rozanski, A., Dzwonkowski, J., Galeski, A., 2008. Low density polyethylene–montmorillonite nanocomposites for film blowing. **European Polymer Journal**, **44** (2): 270-286.
184. Shah, R. K., Krishnaswamy, R. K., Takahashi, S., Paul, D. R., 2006. Blown films of nanocomposites prepared from low density polyethylene and a sodium ionomer of poly(ethylene-co-methacrylic acid). **Polymer**, **47** (17): 6187-6201.

185. Zan, L., Fa, W., Wang, S., 2006. Novel photodegradable low-density polyethylene–TiO₂ nanocomposite film. **Environmental Science & Technology**, **40** (5): 1681-1685.
186. Arunvisut, S., Phummanee, S., Somwangthanaroj, A., 2007. Effect of clay on mechanical and gas barrier properties of blown film LDPE/clay nanocomposites. **Journal of Applied Polymer Science**, **106** (4): 2210-2217.
187. Jana, R. N., Nando, G. B., 2003. Thermogravimetric analysis of blends of low-density polyethylene and poly(dimethyl siloxane) rubber: The effects of compatibilizers. **Journal of Applied Polymer Science**, **90** (3): 635-642.
188. Kayacan, İ., Doğan, Ö. M., 2008. Pyrolysis of low and high density polyethylene. Part I: Non-isothermal pyrolysis kinetics. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, **30** (5): 385-391.
189. Pereira de Abreu, D. A., Paseiro Losada, P., Angulo, I., Cruz, J. M., 2007. Development of new polyolefin films with nanoclays for application in food packaging. **European Polymer Journal**, **43** (6): 2229-2243.
190. Pedroso, A. G., Rosa, D. S., 2005. Mechanical, thermal and morphological characterization of recycled LDPE/corn starch blends. **Carbohydrate Polymers**, **59** (1): 1-9.
191. Dintcheva, N. T., Jilov, N., La Mantia, F. P., 1997. Recycling of plastics from packaging. **Polymer Degradation and Stability**, **57** (2): 191-203.
192. Tzankova Dintcheva, N., La Mantia, F. P., Acierno, D., Di Maio, L., Camino, G., Trotta, F., Luda, M. P., Paci, M., 2001. Characterization and reprocessing of greenhouse films. **Polymer Degradation and Stability**, **72** (1): 141-146.
193. Dadbin, S., Noferesti, M., Frounchi, M., 2008. Oxygen barrier LDPE/LLDPE/Organoclay nano-composite films for food packaging. **Macromolecular Symposia**, **274** (1): 22-27.
194. Raj, B., K. U. S., Siddaramaiah, 2004. Low density polyethylene/starch blend films for food packaging applications. **Advances in Polymer Technology**, **23** (1): 32-45.
195. Anonim. 2013. Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ile Hastalık Nedenli Oluşan Moleküler Değişimlerin Belirlenmesi. http://www.acikders.org.tr/pluginfile.php/1108/mod_resource/content/0/ko nu11.pdf, Erişim tarihi: Kasım 2013.
196. Sırımoğlu, N., Talay, A., Öziş, A., İşler, R. 2013. Plastik ambalaj malzemeleri için uygulanan kalite kontrol testleri. <http://www.petkim.com.tr/Userfiles/File/uretim/kalitekontrol-teknikservis/Plastik.pdf>, Erişim tarihi: Kasım 2013.
197. Morlat-Therias, S., Fanton, E., Gardette, J.-L., Dintcheva, N. T., La Mantia, F. P., Malatesta, V., 2008. Photochemical stabilization of linear low-density polyethylene/clay nanocomposites: Towards durable nanocomposites. **Polymer Degradation and Stability**, **93** (10): 1776-1780.
198. García, N., Hoyos, M., Guzmán, J., Tiemblo, P., 2009. Comparing the effect of nanofillers as thermal stabilizers in low density polyethylene. **Polymer Degradation and Stability**, **94** (1): 39-48.
199. Durmuş, A., Woo, M., Kaşgöz, A., Macosko, C. W., Tsapatsis, M., 2007. Intercalated linear low density polyethylene (LLDPE)/clay nanocomposites prepared with oxidized polyethylene as a new type compatibilizer: Structural, mechanical and barrier properties. **European Polymer Journal**, **43** (9): 3737-3749.

200. Hayaloglu, A. A., Guven, M., Fox, P. F., 2002. Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White cheese 'Beyaz Peynir'. **International Dairy Journal**, **12** (8): 635-648.
201. Andiç, S., Tunçtürk, Y., Genççelep, H., 2011. The effect of different packaging methods on the formation of biogenic amines and organic acids in Kasha cheese. **Journal of Dairy Science**, **94** (4): 1668-1678.
202. Var, I., Erginkaya, Z., Güven, M., Kabak, B., 2006. Effects of antifungal agent and packaging material on microflora of Kasha cheese during storage period. **Food Control**, **17** (2): 132-136.
203. Ledenbach, L., Marshall, R., "Microbiological Spoilage of Dairy Products," in *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*, Sperber, W. H., Doyle, M. P., Eds., ed: Springer New York, 2010, pp. 41-67.
204. Çetinkaya, F., Soyutemiz, G. E., 2006. Microbiological and chemical changes throughout the manufacture and ripening of kasha: a traditional Turkish cheese. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, **30**: 397-404.
205. Öksüztepe, G., Patır, B., Dikici, A., İlhak, O. İ., 2009. Elazığ'da tüketime sunulan vakum paketli taze kaşar peynirlerinin mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesi. **Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi**, **23** (2): 89-94.
206. Gülmez, M., Oral, N., Güven, A., Baz, E., Sezer, Ç., Duman, B., 2004. Kars'ta tüketime sunulan kaşar peynirlerinin bazı mikrobiyolojik ve kimyasal özellikleri. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, **10** (2): 183-188.
207. Erkan, M. E., Aksu, H., 2006. Modifiye atmosfer paketleme tekniğinin dilimlenmiş taze kaşar peynirinin mikrobiyolojik ve duyu özellikleri üzerine etkisi. **İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, **32** (1): 57-68.
208. Filtenborg, O., Frisvad, J. C., Thrane, U., 1996. Moulds in food spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, **33** (1): 85-102.
209. Blumenthal, C. Z., 2004. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, **39** (2): 214-228.
210. Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J., van Dijck, P., 2002. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **59** (4-5): 426-435.
211. Özçakmak, S., Dervişoğlu, M., 2011. Peynirlere kontamine olan küflerin bazı esansiyel yağlar ile inhibisyonu. **Gıda**, **36** (3): 187-194.
212. Nasser, L. A., 2001. Fungal contamination of white cheese at the stage of consumption in Saudi Arabia, Pakistan. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, **4** (6): 733-735.
213. Hassanin, N. I., 1993. Detection of mycotoxigenic fungi and bacteria in processed cheese in Egypt. **International Biodeterioration & Biodegradation**, **31** (1): 15-23.
214. Lund, F., Filtenborg, O., Frisvad, J. C., 1995. Associated mycoflora of cheese. **Food Microbiology**, **12** (0): 173-180.
215. Yıldırım, M., Gulec, F., Bayram, M., Yıldırım, Z., 2006. Properties of kasha cheese coated with casein as a carrier of natamycin. **Italian Journal of Food Science**, **18** (2): 127-138.
216. Sarıkuş, G., 2006. Farklı antimikrobiyal maddeler içeren yenilebilir film üretimi ve kaşar peynirinin muhafazasında mikrobiyal inaktivasyona etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Isparta.

217. Yavuz, M., Korukluoğlu, M., 2010. *Listeria monocytogenes*'in gıdalardaki önemi ve insan sağlığı üzerine etkileri **Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, **24** (1): 1-10.
218. Loncarevic, S., Danielsson-Tham, M.-L., Tham, W., 1995. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft and semi-soft cheeses in retail outlets in Sweden. **International Journal of Food Microbiology**, **26** (2): 245-250.
219. Beckers, H. J., Soentoro, P. S. S., Delgou-van Asch, E. H. M., 1987. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses and raw milk and its resistance to heat. **International Journal of Food Microbiology**, **4** (3): 249-256.
220. Makino, S. I., Kawamoto, K., Takeshi, K., Okada, Y., Yamasaki, M., Yamamoto, S., Igimi, S., 2005. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. **International Journal of Food Microbiology**, **104** (2): 189-196.
221. Cagri-Mehmetoglu, A., Yaldirak, G., Bodur, T., Simsek, M., Bozkir, H., Eren, N. M., 2011. Incidence of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in two kasar cheese processing environments. **Food Control**, **22** (5): 762-766.
222. Sallam, K. I., Samejima, K., 2004. Microbiological and chemical quality of ground beef treated with sodium lactate and sodium chloride during refrigerated storage. **LWT - Food Science and Technology**, **37** (8): 865-871.
223. Gill, C. O., Badoni, M., 2002. Microbiological and organoleptic qualities of vacuum-packaged ground beef prepared from pasteurized manufacturing beef. **International Journal of Food Microbiology**, **74** (1-2): 111-118.
224. Clavero, M. R., Monk, J. D., Beuchat, L. R., Doyle, M. P., Brackett, R. E., 1994. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, salmonellae, and *Campylobacter jejuni* in raw ground beef by gamma irradiation. **Applied and Environmental Microbiology**, **60** (6): 2069-2075.
225. Maca, J. V., Miller, R. K., Acuff, G. R., 1997. Microbiological, sensory and chemical characteristics of vacuum-packaged ground beef patties treated with salts of organic acids. **Journal of Food Science**, **62** (3): 591-596.
226. Pohlman, F. W., Stivarius, M. R., McElyea, K. S., Johnson, Z. B., Johnson, M. G., 2002. The effects of ozone, chlorine dioxide, cetylpyridinium chloride and trisodium phosphate as multiple antimicrobial interventions on microbiological, instrumental color, and sensory color and odor characteristics of ground beef. **Meat Science**, **61** (3): 307-313.
227. Ouattara, B., Giroux, M., Yefsah, R., Smoragiewicz, W., Saucier, L., Borsa, J., Lacroix, M., 2002. Microbiological and biochemical characteristics of ground beef as affected by gamma irradiation, food additives and edible coating film. **Radiation Physics and Chemistry**, **63** (3-6): 299-304.
228. **Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği, Türk Gıda Kodeksi**, Gıda, T. v. H. 27456, 2009.
229. Başkaya, R., Karaca, T., Çakmak, Ö., Yıldız, A., Yörük, M., "İstanbul'da satışa sunulan hazır kıymaların ve köftelerin histolojik, mikrobiyolojik ve serolojik kalitesi," *Türkiye 9. Gıda Kongresi*, Bolu, 2006, pp. 647-648.
230. Direkel, Ş., Yıldız, Ç., Aydın, F. E., Emekdaş, G., 2010. Mersin ili Yenişehir ilçesinde satışa sunulan çiğ kıymaların mikrobiyolojik kalitesinin değerlendirilmesi. **Mersin Üniversitesi Sağlık Üniversitesi Dergisi**, **3** (2): 8-14.

231. Güven, A., Gülmez, M., Kamber, U., 1997. Kars ilinde tüketime sunulan kıymalarda bazı patojen mikroorganizmaların araştırılması ve kıymaların mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, **3** (1): 57-65.
232. Değirmencioğlu, N., Esmer, Ö. K., İrkin, R., Değirmencioğlu, A., 2008. Modifiye atmosferde ambalajlamanın kıymanın kimyasal ve mikrobiyolojik kalite özellikleri üzerine etkisi, pp. 571-572. *Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs 2008, Erzurum*.
233. Kenawi, M. A., Salam, R. R. A., Kenawi, M. N., 2009. Effect of antimicrobial agents on some chemical and microbiological characteristics of vacuum - packaged ground buffalo meat stored under refrigerated condition **Biotechnology in Animal Husbandry**, **25**: 231-239.
234. Seydim, A. C., Acton, J. C., Hall, M. A., Dawson, P. L., 2006. Effects of packaging atmospheres on shelf-life quality of ground ostrich meat. **Meat Science**, **73** (3): 503-510.
235. Turgis, M., Han, J., Borsa, J., Lacroix, M., 2008. Combined effect of natural essential oils, modified atmosphere packaging, and gamma radiation on the microbial growth on ground beef. **Journal of Food Protection**, **71** (6): 1237-1243.
236. Ünal, İ. U., Korel, F., Yemenicioğlu, A., 2011. Active packaging of ground beef patties by edible zein films incorporated with partially purified lysozyme and Na₂EDTA. **International Journal of Food Science & Technology**, **46** (6): 1289-1295.
237. Ha, J.-U., Kim, Y.-M., Lee, D.-S., 2001. Multilayered antimicrobial polyethylene films applied to the packaging of ground beef. **Packaging Technology and Science**, **14** (2): 55-62.
238. Kim, Y.-M., Paik, H.-D., Lee, D.-S., 2002. Shelf-life characteristics of fresh oysters and ground beef as affected by bacteriocin-coated plastic packaging film. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **82** (9): 998-1002.
239. Thayer, D. W., Boyd, G., 1993. Elimination of *Escherichia coli* O157:H7 in meats by gamma irradiation. **Applied and Environmental Microbiology**, **59** (4): 1030-1034.
240. Brackett, R. E., Hao, Y. Y., Doyle, M. P., 1994. Ineffectiveness of hot acid sprays to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 on beef. **Journal of Food Protection**, **57** (3): 198-203.
241. Abuladze, T., Li, M., Menetrez, M. Y., Dean, T., Senecal, A., Sulakvelidze, A., 2008. Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, **74** (20): 6230-6238.
242. El-Ziney, M. G., van den Tempel, T., Debevere, J., Jakobsen, M., 1999. Application of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* for meat decontamination and preservation. **Journal of Food Protection**, **62** (3): 257-261.
243. Farrell, B. L., Ronner, A. B., Lee Wong, A. C., 1998. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef to meat grinders and survival after sanitation with chlorine and peroxyacetic acid. **Journal of Food Protection**, **61** (7): 817-822.
244. Nadarajah, D., Han, J. H., Holley, R. A., 2005. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in packaged ground beef by allyl isothiocyanate. **International Journal of Food Microbiology**, **99** (3): 269-279.

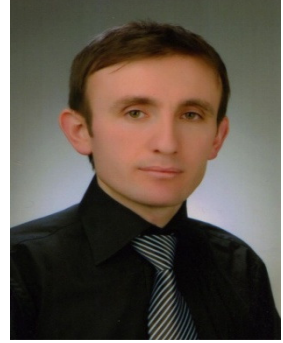
245. Nissen, H., Alvseike, O., Bredholt, S., Holck, A., Nesbakken, T., 2000. Comparison between the growth of *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in ground beef packed by three commercially used packaging techniques. **International Journal of Food Microbiology**, **59** (3): 211-220.
246. Fox, J. B., Lakritz, L., Hampson, J., Richardson, F., Ward, K., Thayer, D. W., 1995. Gamma irradiation effects on thiamin and riboflavin in beef, lamb, pork, and turkey. **Journal of Food Science**, **60** (3): 596-598.
247. Kilcast, D., 1994. Effect of irradiation on vitamins. **Food Chemistry**, **49** (2): 157-164.
248. Giroux, M., Lacroix, M., 1998. Nutritional adequacy of irradiated meat—a review. **Food Research International**, **31** (4): 257-264.
249. Brewer, M. S., 2009. Irradiation effects on meat flavor: A review. **Meat Science**, **81** (1): 1-14.
250. Narasimha Rao, D., Sachindra, N. M., 2002. Modified atmosphere and vacuum packaging of meat and poultry products. **Food Reviews International**, **18** (4): 263-293.
251. Tang, S., Kerry, J. P., Sheehan, D., Buckley, D. J., Morrissey, P. A., 2001. Antioxidative effect of added tea catechins on susceptibility of cooked red meat, poultry and fish patties to lipid oxidation. **Food Research International**, **34** (8): 651-657.
252. Sorrentino, A., Gorrasi, G., Vittoria, V., 2007. Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. **Trends in Food Science & Technology**, **18** (2): 84-95.
253. Ahn, J., Grün, I. U., Mustapha, A., 2007. Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. **Food Microbiology**, **24** (1): 7-14.
254. Camo, J., Beltrán, J. A., Roncalés, P., 2008. Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging. **Meat Science**, **80** (4): 1086-1091.
255. Camo, J., Lorés, A., Djenane, D., Beltrán, J. A., Roncalés, P., 2011. Display life of beef packaged with an antioxidant active film as a function of the concentration of oregano extract. **Meat Science**, **88** (1): 174-178.
256. Esmer, O. K., Irkin, R., Degirmencioglu, N., Degirmencioglu, A., 2011. The effects of modified atmosphere gas composition on microbiological criteria, color and oxidation values of minced beef meat. **Meat Science**, **88** (2): 221-226.
257. Lund, M. N., Hviid, M. S., Skibsted, L. H., 2007. The combined effect of antioxidants and modified atmosphere packaging on protein and lipid oxidation in beef patties during chill storage. **Meat Science**, **76** (2): 226-233.
258. O'Grady, M. N., Monahan, F. J., Burke, R. M., Allen, P., 2000. The effect of oxygen level and exogenous α -tocopherol on the oxidative stability of minced beef in modified atmosphere packs. **Meat Science**, **55** (1): 39-45.
259. McMillin, K. W., 2008. Where is MAP going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. **Meat Science**, **80** (1): 43-65.
260. Erkmen, O., Bozkurt, H., 2004. Quality characteristics of retailed sucuk (Turkish dry-fermented sausage). **Food Technology and Biotechnology**, **42** (1): 63-69.
261. Bozkurt, H., 2006. Utilization of natural antioxidants: Green tea extract and *Thymbra spicata* oil in Turkish dry-fermented sausage. **Meat Science**, **73** (3): 442-450.

262. Bozkurt, H., Erkmen, O., 2007. Effects of some commercial additives on the quality of sucuk (Turkish dry-fermented sausage). **Food Chemistry**, **101** (4): 1465-1473.
263. Aksu, M. İ., Kaya, M., 2004. Effect of usage *Urtica dioica* L. on microbiological properties of sucuk, a Turkish dry-fermented sausage. **Food Control**, **15** (8): 591-595.
264. Bozkurt, H., Erkmen, O., 2002. Effects of starter cultures and additives on the quality of Turkish style sausage (sucuk). **Meat Science**, **61** (2): 149-156.
265. Soyer, A., Ertaş, A. H., Üzümcüoğlu, Ü., 2005. Effect of processing conditions on the quality of naturally fermented Turkish sausages (sucuks). **Meat Science**, **69** (1): 135-141.
266. Ercoşkun, H., Özkal, S. G., 2011. Kinetics of traditional Turkish sausage quality aspects during fermentation. **Food Control**, **22** (2): 165-172.
267. Öztürk, İ., 2013. Geleneksel fermente sucuklardan izole edilen mayaların tanımlanması, teknolojik ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi ve sucuk üretimine uygun izolatların seçilmesi. Erciyes Üniversitesi, Gıda Mühendisliği ABD, Doktora tezi, Kayseri.
268. Çon, A. H., Gökalp, H. Y., 1998. Türkiye pazarındaki sucukların bazı kimyasal ve mikrobiyolojik nitelikleri. **Gıda** **23** (5): 347-355.
269. Erdoğan, Ö., Ergün, Ö., 2005. Kahramanmaraş piyasasında tüketime sunulan sucukların bazı fiziksel, kimyasal, duyuşal ve mikrobiyolojik özellikleri. **İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi**, **31** (1): 55-65.
270. Kök, F., Özbey, G., Muz, A., 2007. Aydın ilinde satışa sunulan fermente sucukların mikrobiyolojik kalitelerinin incelenmesi. **Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi**, **21** (6): 249 - 252.
271. Öksüztepe, G., Güran, H. Ş., İncili, G. K., Gül, S. B., 2011. Elazığ'da tüketime sunulan fermente sucukların mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesi. **Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veterinerlik Dergisi**, **25** (3): 107 - 114.
272. Dalmış, Ü., Soyer, A., "Sucukta lipolitik ve oksidatif değişmelere üretim yönteminin ve starter kültürün etkisi," *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, Erzurum, 2008, p. 857.
273. Gök, V., 2006. Antioksidan kullanımının fermente sucukların bazı kalite özellikleri üzerine etkileri. Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği ABD, Doktora tezi, Ankara.
274. Kara, R., Akkaya, L., Gök, V., Gürler, Z., Müdüroğlu, R., 2012. Farklı oranlarda manda eti kullanılarak üretilen sucukların olgunlaşma ve depolama aşamalarındaki bazı kalite özelliklerinin araştırılması. **Kocatepe Veteriner Dergisi**, **5** (1): 13-19.
275. Bozkurt, H., Erkmen, O., 2004. Effect of nitrate/nitrite on the quality of sausage (sucuk) during ripening and storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **84** (3): 279-286.
276. **Türk Gıda Kodeksi, Et Ürünleri Tebliği**, Gıda, T. v. H. B. 23960, 2000.
277. Kaya, M., Aksu, M. İ., 2005. Effect of modified atmosphere and vacuum packaging on some quality characteristics of sliced 'sucuk' produced using probiotics culture. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **85** (13): 2281-2288.
278. Kaya, M., Gökalp, H. Y., 2004. The behavior of *Listeria monocytogenes* in sucuks produced with different lactic starter cultures. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, **28**: 1113-1120.

279. Erkmen, O., 2008. Modeling the effects of sucuk production technique on *Listeria monocytogenes*, aerobic bacteria and lactic acid bacteria during ripening and storage. **Food and Bioproducts Processing**, **86** (3): 220-226.
280. Lucas, R., Grande, M. J., Abriouel, H., Maqueda, M., Ben Omar, N., Valdivia, E., Martínez-Cañamero, M., Gálvez, A., 2006. Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. **Food and Chemical Toxicology**, **44** (10): 1774-1781.
281. Brown, K. L., 2000. Control of bacterial spores. **British Medical Bulletin**, **56** (1): 158-171.
282. Kotzekidou, P., 1997. Heat resistance of *Byssochlamys nivea*, *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. **Journal of Food Science**, **62** (2): 410-412.
283. Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Chinou, I. B., Mitakou, S., Gikas, E., Tsarbopoulos, A., 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of five taxa of sideritis from Greece. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **49** (2): 811-815.
284. Thompson, D. P., 1989. Fungitoxic activity of essential oil components on food storage fungi. **Mycologia**, **81**: 151-153.
285. Mishra, A. K., Dubey, N. K., 1994. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. **Applied and Environmental Microbiology**, **60** (4): 1101-1105.
286. Rasooli, I., Abyaneh, M. R., 2004. Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, **15** (6): 479-483.
287. Guynot, M. E., Marín, S., Setú, L., Sanchis, V., Ramos, A. J., 2005. Screening for antifungal activity of some essential oils against common spoilage fungi of bakery products. **Food Science and Technology International**, **11** (1): 25-32.
288. Moleyar, V., Narasimham, P., 1986. Antifungal activity of some essential oil components. **Food Microbiology**, **3** (4): 331-336.
289. Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z., Naghdibadi, H., 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. **Food Control**, **18** (12): 1518-1523.
290. Kalantari, F., Barzegar, M., Hamidi-Esfahani, Z., 2012. Control of *Aspergillus flavus* growth in tomato paste by *Cinnamomum zeylanicum* and *Origanum vulgare* L. essential oils. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, **66**: 64-68.
291. Coma, V., 2008. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. **Meat Science**, **78** (1-2): 90-103.
292. de Fernando, G. D. G., Nychas, G. J. E., Peck, M. W., Ordóñez, J. A., 1995. Growth/survival of psychrotrophic pathogens on meat packaged under modified atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**, **28** (2): 221-231.
293. Skandamis, P. N., Nychas, G.-J. E., 2002. Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. **International Journal of Food Microbiology**, **79** (1-2): 35-45.
294. Ouattara, B., Simard, R. E., Holley, R. A., Piette, G. J. P., Bégin, A., 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, **37** (2-3): 155-162.

295. Siragusa, G. R., Dickson, J. S., 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on beef tissue by application of organic acids immobilized in a calcium alginate gel. **Journal of Food Science**, **57** (2): 293-296.
296. Oussalah, M., Caillet, S., StéphaneSalmiéri, Saucier, L., Lacroix, M., 2006. Antimicrobial effects of alginate-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. **Journal of Food Protection**, **69** (10): 2364-2369.
297. Ming, X., Weber, G. H., Ayres, J. W., Sandine, W. E., 1997. Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. **Journal of Food Science**, **62** (2): 413-415.
298. Cutter, C. N., 1999. Effectiveness of triclosan-incorporated plastic against bacteria on beef surfaces. **Journal of Food Protection**, **62** (5): 474-479.
299. Millette, M., Le Tien, C., Smoragiewicz, W., Lacroix, M., 2007. Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads. **Food Control**, **18** (7): 878-884.
300. Zinoviadou, K. G., Koutsoumanis, K. P., Biliaderis, C. G., 2009. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. **Meat Science**, **82** (3): 338-345.
301. Ercolini, D., Ferrocino, I., La Stora, A., Mauriello, G., Gigli, S., Masi, P., Villani, F., 2010. Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging. **Food Microbiology**, **27** (1): 137-143.
302. Mancini, R. A., Hunt, M. C., 2005. Current research in meat color. **Meat Science**, **71** (1): 100-121.
303. Church, N., 1994. Developments in modified-atmosphere packaging and related technologies. **Trends in Food Science & Technology**, **5** (11): 345-352.

ÖZGEÇMİŞ



KİŞİSEL BİLGİLER

Adı-Soyadı: Fatih TÖRNÜK

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 31/12/1982, Sivas

Medeni Durumu: Evli

Tel: +90 212 383 45 82

E-mail: ftornuk@yildiz.edu.tr

Yazışma Adresi: Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya-Metalürji Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Davutpaşa Kampüsü, 34210, Esenler, İstanbul

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü	2009
Lisans	Erciyes Üniversitesi Gıda Müh. Bölümü	2006

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2013-	Yıldız Teknik Üniv. Kimya-Metalürji Fak. Gıda Müh. Böl.	Uzman
2009-2013	Erciyes Üniv. Safiye Çıkrıkçıoğlu Meslek Yüksekokulu	Öğretim Görevlisi
2007-2009	Cumhuriyet Üniversitesi Suşehri Timur Karabal Meslek Yüksekokulu	Öğretim Görevlisi

YABANCI DİL

Yıl	Sınav	Puan
2012	ÜDS	83,75
2012	KPDS	86,25

YAYINLAR

SCI, SSCI, AHCI İndekslerine Giren Dergilerde Yayınlanan Makaleler

- A1. **Tornuk**, F., Ozturk, I., Sagdic, O., Yetim, H. **2011**. Determination and improvement of microbial safety of wheat sprouts with chemical sanitizers. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8, 503-508.
- A2. **Tornuk**, F., Cankurt, H., Ozturk, I., Sagdic, O., Bayram, O., Yetim, H., **2011**. Efficacy of various plant hydrosols as natural food sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium on fresh cut carrots and apples. *International Journal of Food Microbiology*, 148, 30-35.
- A3. Sagdic, O., Ozturk, I., Cankurt, H., **Tornuk**, F. **2012**. Interaction between some phenolic compounds and probiotic bacterium in functional ice cream production. *Food and Bioprocess Technology*, 5(8), 2964-2971.
- A4. Ozturk, I., **Tornuk**, F., Sagdic, O., Kisi, O. **2012**. Application of non-linear models to predict inhibition effects of various plant hydrosols on *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh-cut apples. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(7), 607-616.
- A5. Sagdic, O., Ozturk, I., **Tornuk**, F. **2013**. Inactivation of non-toxigenic and toxigenic *Escherichia coli* O157:H7 inoculated on minimally processed tomatoes and cucumbers: Utilization of hydrosols of *Lamiaceae* spices as natural food sanitizers. *Food Control*, 30(1), 7-14.
- A6. **Tornuk**, F., Karaman, S., Ozturk, I., Toker, O.S., Tastemur, B., Sagdic, O., Dogan, M., Kayacier, A. **2013**. Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. *Industrial Crops and Products*, 46, 124-131.
- A7. Ozturk, I., Karaman, S., **Tornuk**, F., Sagdic, O. **2013**. Physicochemical and rheological characteristics of alcohol free probiotic boza produced using *Lactobacillus casei* Shirota: Estimation of apparent viscosity of boza using non-linear modeling techniques. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37, 475-487.
- A8. **Tornuk**, F., Ozturk, I., Sagdic, O., Yilmaz, A., Erkmen, O. **2014**. Application of predictive inactivation models to evaluate survival of *Staphylococcus aureus* in fresh-cut apples treated with different plant hydrosols. *International Journal of Food Properties*, 17(3), 587-598.
- A9. Ozturk, I., Sagdic, O., **Tornuk**, F., Yetim, H. **2014**. Effect of wheat sprout powder incorporation on lipid oxidation and physicochemical properties of beef patties. *International Journal of Food Science & Technology*, In press, DOI: 10.1111/ijfs.12407.