

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

**PROBİYOTİK MİKROORGANİZMALAR İLE ZENGİNLEŞTİRİLEN  
SODYUM ALJİNAT FİLMLEİN KARAKTERİZASYONU VE  
ANTİMİKROBİYEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Öğrencinin Adı SOYADI : Şirin YILMAZ ÇOPUR**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih :**

**Enstitü Anabilim Dalı : Biyosüreç Mühendisliği**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Selin KALKAN**

**Aralık 2022  
GİRESUN**

T.C.  
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROBİYOTİK MİKROORGANİZMALAR İLE ZENGİNLEŞTİRİLEN  
SODYUM ALJİNAT FİLMLEİN KARAKTERİZASYONU VE  
ANTİMİKROBİYEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şirin YILMAZ ÇOPUR

Enstitü Anabilim Dalı : Biyosüreç Mühendisliği

Bu tez 26/12/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr.  
Emel ÜNAL TURHAN  
Jüri Başkanı

Prof. Dr.  
Mehmet Soner ENGİN  
Üye

Doç. Dr.  
Selin KALKAN  
Üye

Doç. Dr.  
Selahaddin Batuhan AKBEN  
Üye

Dr. Öğr. Üyesi  
Mustafa Remzi OTAĞ  
Üye

Prof. Dr.  
Bahadır KOZ  
Enstitü Müdürü

## **BEYAN**

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

Şirin YILMAZ ÇOPUR

26/12/2022

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin ve tez çalışmam sırasında fikirleri, bilgileri, öngörü ve deneyimleri ile verdiği motivasyon ile bu çalışmanın mümkün olmasını sağlayan çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Selin KALKAN' a teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında bilgi ve tecrübeleri ile bana sürekli destek olan, hiçbir yardımı esirgemeyen Sayın hocalarımdan öncelikle tezimde ikinci danışmanlık görevini yürüten Doç.Dr. Selahaddin Batuhan AKBEN ile Prof. Dr. Mehmet Soner ENGİN, Doç.Dr. Kadriye ÖZCAN ve Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Remzi OTAĞ'a teşekkür ederim.

Aktif olarak sahada çalışan bir anne olarak, ihtiyacım olan ekstra enerji ve moral desteği için önce oğullarım Çınar ve Can ÇOPUR'a, eşim Mustafa ÇOPUR'a teşekkür ederim.

Yaşamımın her anında beni destekleyen kardeşim Elif YILMAZ KOÇAK'a, annem Fatma YILMAZ'a, babam Cemil YILMAZ'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca destek ve yardımları ile süreci kolaylaştıran başta amirlerim olmak üzere çok değerli mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığına (Proje No FEN-BAP-A-250620-60) teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ .....	V
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	VII
TABLOLAR LİSTESİ .....	IX
ÖZET .....	X
SUMMARY .....	XI
BÖLÜM 1. GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	5
2.1. Yenilebilir Özellikte Gıda Ambalajları .....	5
2.2. Taşıyıcı Sistemler Olarak Yenilebilir Filmler ve Kaplamalar .....	8
2.3. Probiyotik Gıda Ambalajı Geliştirmek İçin Kullanılan Malzemeler .....	11
2.4. Probiyotik ve Simbiyotik Yenilebilir Paketleme (Teknolojiler, Üretim Yöntemleri ve Film Oluşturma Mekanizmaları).....	15
2.5. Yenilebilir Filmlerin ve Kaplamaların Bileşimsel Özelliklerinin Probiyotik Mikroorganizmaların Biyolojik Aktivitesi Üzerine Etkileri.....	21
2.6. Probiyotik Mikroorganizma İlavesinin Yenilebilir Filmlerin ve Kaplamaların Kalite, Mekaniksel ve Bariyer Özellikleri Üzerine Etkileri .....	25
2.7. Gıda Endüstrisinde Probiyotik ve Simbiyotik Yenilebilir Film Kaplama Uygulamaları .....	26
2.7.1. Taze ve Minimum Düzeyde İşlenmiş Meyve ve Sebzeler.....	26
2.7.2. Süt Ürünleri.....	27
2.7.3. Et Ürünleri .....	28
2.7.4. Orta ve Düşük Nemli Gıdalar .....	29
2.8. Yenilebilir Ambalajların İşlevselleştirilmesinde Gelecek Perspektifleri ....	30

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	32
3.1. Materyal .....	32
3.2. Probiyotik Mikroorganizma İçeren Sodyum Aljinat Filmlerin Hazırlanması	32
3.3. Aktif Film Örneklerinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi .....	35
3.3.1. Kalınlık Ölçümleri .....	35
3.3.2. Nem İçeriği ve Kuru Madde Yoğunluklarının Belirlenmesi .....	35
3.3.3. Temas Açısı Ölçümleri .....	35
3.3.4. Su Buharı Geçirgenliğinin Belirlenmesi .....	36
3.4. Aktif Film Örneklerinin Fiziksel ve Yapısal Özelliklerinin Belirlenmesi ..	36
3.4.1. Renk Ölçümleri, Optik ve UV Bariyer Özellikleri .....	36
3.4.2. Çekme Dayanımı, Uzama Katsayısı ve Elastik Modülün Belirlenmesi (TS, E, YM) .....	37
3.4.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İle Gözenek Yapılarının Belirlenmesi .....	37
3.4.4. Fourier Transform İnfrared (FTIR) Spektroskopi Analizi .....	37
3.4.5. Termogravimetrik Analiz (TGA) .....	38
3.5. Filmlerin Biyoaktif Özellikleri .....	38
3.5.1. Film Formülasyon Çözeltileri ve Filmlerdeki Probiyotik Mikroorganizma Sayılarının Belirlenmesi .....	38
3.5.2. Filmlerin Antimikrobiyel Özelliklerinin Belirlenmesi .....	39
3.5.3. Peynir Örneklerinin Aktif Filmler ile Kaplanması ve Mikrobiyel Raf Ömrü Analizleri .....	39
3.6. Veri Analizi Yöntemleri .....	40
3.6.1. Kutu Grafiği .....	40
3.6.2. Aglomeratif (Yığıcı) Hiyerarşik Kümeleme .....	41
3.6.3. Dendrogram .....	42
3.6.4. Silüet Değeri .....	43
3.7. İstatistiksel Analizler .....	43
BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	44
4.1. Filmlerin Fizikokimyasal Özellikleri .....	44
4.2. Filmlerin Fiziksel ve Yapısal Özellikleri .....	47

4.3. Filmlerin Biyoaktif Özellikleri .....	55
4.4. Mikrobiyel Raf Ömrü Veri Analiz Sonuçları .....	63
BÖLÜM 5. SONUÇ .....	68
KAYNAKLAR .....	71
ÖZGEÇMİŞ .....	83



## SİMGELER VE KISALTMALAR

$\Delta$ pH	: pH değişimleri
°C	: Santigrat derece
Aw	: Activity of water (su aktivitesi)
%	: Yüzde
ALG	: Aljinat
BHA	: Bütilhidroksianisol
BHT	: Bütil Hidroksi Toluen
CO <sub>2</sub>	: Karbondioksit
EAB	: Kopma uzaması
FAO	: Food and Agriculture Organization (Gıda ve Tarım Örgütü)
FOS	: Fruktooligosakkaritlerin
g	: Gram
G	: $\beta$ -L-guluronat
GRAS	: Generally recognizes as safe (Genellikle güvenli kabul edilen)
HPMC	: Hidroksipropilmetilselüloz
ISAPP	: Probiyotikler ve Prebiyotikler Uluslararası Bilimsel Derneği
KOB/g	: Koloni oluşturan birim/gram
kg	: Kilogram
LAB	: Laktik asit bakterileri
M	: 1-4- bağlanmış $\alpha$ -D-mannuronat (M)
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
$\mu$ L	: Mikrolitre
MRD	: Maximum Recovery Diluent
MRS	: De Man, Rogosa ve Sharpe Agar
O <sub>2</sub>	: Oksijen
PCA	: Plate Count Agar
PDA	: Patato Dekstroz Agar
psi	: Pounds per square
pKa	: Asit ayrışma sabiti
RA	: Referans alım
psi	: Pounds per square
PVOH	: Polivinilalkol
TBH	: ter-bütil hidrokinon
TMAB	: Toplam Mezofilik Aerofilik Bakteri

TS : Gerilme direnci  
w/v : ağırlık/hacim  
SA : Sodyum aljinat



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1. Probiyotik mikroorganizma ilave edilmiş sodyum aljinat film örnekleri .....	34
Şekil 3.2. Örnek bir kutu grafiği .....	41
Şekil 3.3. Örnek veri matrisi için hiyerarşik kümeleme ve dendrogram grafiği...	43
Şekil 4.1. Aktif film örneklerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri (SA-C: Probiyotik mikroorganizma içermeyen kontrol SA film örnekleri; SA-K: Kefir kültürü ilave edilen SA film örnekleri; SA-B: <i>B. lactis</i> kültürü ilave edilen SA film örnekleri; SA-L: <i>L. rhamnosus</i> kültürü ilave edilen SA film örnekleri) .....	52
Şekil 4.2. Aktif film örneklerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri (SA-KLB: Kefir, <i>B. lactis</i> ve <i>L. rhamnosus</i> kültürleri ilave edilen SA film örnekleri; SA-KB: Kefir ve <i>B. lactis</i> kültürleri ilave edilen SA film örnekleri; SA-KL: Kefir ve <i>L. rhamnosus</i> kültürleri ilave edilen SA film örnekleri; SA-BL: <i>B. lactis</i> ve <i>L. rhamnosus</i> kültürleri ilave edilen SA örnekleri).....	53
Şekil 4.3. Aktif SA filmlerin FT-IR spektrumu .....	54
Şekil 4.4. Aktif SA filmlerin Termo Gravimetrik Analiz (TGA) grafiği .....	55
Şekil 4.5. Probiyotik mikroorganizmaların aktif SA filmlerde canlılıkları (log KOB/g) .....	56
Şekil 4.6. Aktif SA filmler ile kaplanmış peynir örneklerinin depolama boyunca <i>Lactobacillus</i> spp. sayısı değişimleri (log KOB/g) .....	59
Şekil 4.7. Aktif SA filmler ile kaplanmış peynir örneklerinin depolama boyunca <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> B94 sayısı değişimleri (log KOB/g) .....	60
Şekil 4.8. Aktif SA filmler ile kaplanmış peynir örneklerinin depolama boyunca Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri sayısı değişimleri (log KOB/g) .....	61
Şekil 4.9. Aktif SA filmler ile kaplanmış peynir örneklerinin depolama boyunca psikrotrof mikroorganizma sayısı değişimleri (log KOB/g) .....	62

Şekil 4.10. Aktif SA filmler ile kaplanmış peynir örneklerinin depolama boyunca toplam maya-küf sayısı değişimleri (log KOB/g) .....	63
Şekil 4.11. Probiyotik mikroorganizmalarla zenginleştirilmiş SA filmlerin LAB sayısına göre sınıflandırılması .....	64
Şekil 4.12. Probiyotik mikroorganizmalarla zenginleştirilmiş SA filmlerin <i>B. lactis</i> sayısına göre sınıflandırılması .....	64
Şekil 4.13. Probiyotik mikroorganizmalarla zenginleştirilmiş SA filmlerin TMAB sayısına göre sınıflandırılması .....	65
Şekil 4.14. Probiyotik mikroorganizmalarla zenginleştirilmiş SA filmlerin psikrotrof bakteri sayısına göre sınıflandırılması .....	65
Şekil 4.15. Probiyotik mikroorganizmalarla zenginleştirilmiş SA filmlerin toplam maya-küf sayısına göre sınıflandırılması .....	66
Şekil 4.16. Depolama sürecinde ölçülen mikrobiyel değerlerin ortalama sınıflandırma başarısı .....	67

## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Aktif sodyum aljinat film formülasyonları .....	33
Tablo 4.1. Aktif filmlerin fizikokimyasal özellikleri .....	44
Tablo 4.2. Aktif filmlerin su buharı geçirgenlik değerleri (WVP; g mm/h m <sup>2</sup> kPa).....	47
Tablo 4.3. Aktif filmlerin renk değerleri .....	48
Tablo 4.4. Filmlerin ışık geçirgenliği (%) ve şeffaflık değeri (A600/mm) .....	49
Tablo 4.5. Film örneklerinin mekaniksel özellikleri .....	50
Tablo 4.6. Aktif film örneklerinin <i>in vitro</i> antimikrobiyel aktiviteleri.....	57

# PROBİYOTİK MİKROORGANİZMALAR İLE ZENGİNLEŞTİRİLEN SODYUM ALJİNAT FİLMLERİN KARAKTERİZASYONU VE ANTİMİKROBİYEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

## ÖZET

Bu çalışmada, *Bifidobacterium animalis* ssp *lactis* B94, *Lactobacillus rhamnosus* GG ve kefir mayası (*L. kefir*; *L. delburueckii* ssp. *bulgaricus*, *Str. thermophilus*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. berevis*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *Kluyveromyces* sp., *Saccharomyces* sp.) ve bu kültürlerin kombinasyonları ile zenginleştirilmiş sodyum aljinat (SA) bazlı filmlerin üretimi, karakterizasyonu ve dilimlenmiş işlenmiş peynirin kaplanması için kullanımları araştırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda, filmlerin fizikokimyasal, optik ve mekanik özellikleri probiyotik kültürlerin ilavesinden önemli ölçüde etkilenmiştir. Filmlerdeki probiyotik mikroorganizma sayısı filmlerin kurutulması sonrasında azalma göstermiştir. Filmlerdeki kurutma sonrası probiyotik mikroorganizmalarının canlılık değerleri % 81,79 – 90,57 arasında değişim göstermiştir. Probiyotik mikroorganizmalarla zenginleştirilmiş SA filmler en güçlü antimikrobiyel ekiyi *S. aureus*'a karşı göstermiş iken, en düşük antimikrobiyel etkiyi *E.coli*'ye karşı göstermiştir. Elde edilen sonuçlar SA filmlerin probiyotik mikroorganizmalar tarafından üretilen ve patojenler üzerinde antimikrobiyel etkisi olan maddelerin salınımına izin verme yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir. Farklı probiyotikler ile zenginleştirilmiş SA yenilebilir filmlerle kaplanmış beyaz peynir örneklerinde mikrobiyolojik değişiklikler buzdolabı koşullarında gerçekleştirilen 45 günlük depolama süresince değerlendirildiğinde, kontrol grup ile karşılaştırıldığında, tüm kaplanmış beyaz peynir örnekleri için probiyotik suşların depolama süresince önemli ölçüde artış gösterdiğini ortaya konmuştur. Aktif SA filmler ile kaplanmış peynir örneklerinde ise 45. gün sonunda laktik asit bakteri sayısı (LAB) 6,53 – 8,64 log KOB/g; *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* B94 sayısı 1,53 – 7,57 log KOB/g; TMAB sayısı 4,12- 6,58 log KOB/g; psikrotrof mikroorganizma sayısı 1,80- 2,87 log KOB/g ve toplam maya-küf sayıları ise 2,00 – 3,86 log KOB/g değerleri arasında değiştiği tespit edilmiştir. SA film türlerinin peynir örneklerinin 45 günlük depolama süresince mikrobiyel raf ömrü üzerindeki etkileri sınıflama yöntemlerine göre incelendiğinde, LAB, *B. lactis* ve toplam maya-küf için ölçülen mikrobiyel veriler 3 sınıfa ayrılırken, TMAB sayıları için 2 sınıfa ayrılmıştır. Psikrotrof bakteri sayımları için sınıf oluşmamıştır. Dolayısıyla, depolama süresi boyunca peynir örneklerinde tespit edilen psikrotrof grubu mikroorganizmalar için kullanılan film kaplama türlerinin kontrol gurubuna göre kıyasla herhangi bir etkisinin olmadığı, ancak LAB, *B. lactis*, toplam maya-küf ve TMAB için film kaplama türlerinin etkisi olduğu söylenebilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyoaktivite, fizikokimyasal özellikler, probiyotik mikroorganizma, sodyum aljinat, yenilebilir film

# CHARACTERIZATION AND DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF SODIUM ALGINATES FILMS ENRICHED WITH PROBIOTIC MICROORGANISMS

## SUMMARY

In this study, *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* B94, *Lactobacillus rhamnosus* GG and kefir yeast (*L. kefir*, *L. delburueckii ssp. bulgaricus*, *Str. thermophilus*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, *Lactococcus lactis ssp. berevis*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *Kluyveromyces sp.*, *Saccharomyces sp.*) and combinations of these cultures were investigated for the production, characterization and coating of sliced processed cheese. As a result of the analysis, the physicochemical, optical and mechanical properties of the films were significantly affected by the addition of probiotic cultures. The number of probiotic microorganisms in the films decreased after drying of the films. The viability values of probiotic microorganisms after drying in the films varied between 81.79 and 90.57%. SA films enriched with probiotic microorganisms showed the strongest antimicrobial effect against *S. aureus*, while the lowest antimicrobial effect against *E. coli*. These results show that SA films have the ability to allow the release of substances produced by probiotic microorganisms that have antimicrobial effects on pathogens. When the microbiological changes in white cheese samples coated with SA edible films enriched with different probiotics were evaluated during 45 days of storage under refrigerator conditions, it was revealed that the probiotic strains for all coated white cheese samples increased significantly during storage compared to the control group. In cheese samples coated with active SA films, it was determined that the number of the lactic acid bacteria count (LAB) was ranged 6.53 – 8.64 log CFU/g; *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* counts was ranged 1.53 – 7.57 log CFU/g; TMAB count was ranged 4.12-6.58 log cfu/g; psychrotrophic microorganisms counts varied between 1.80-2.87 log CFU/g and the total yeast-mold counts ranged between 2.00 and 3.86 log CFU/g at the end of the 45th day. When the effects of SA film types on the microbial shelf life of cheese samples during 45-day storage were examined according to the classification methods, the microbial data measured for LAB, *B. lactis* and total yeast-mold were divided into 3 classes, while for TMAB numbers they were divided into 2 classes. No class has been established for psychrotrophic bacteria counts. Therefore, it can be said that the film coating types used for the psychrotrophic group microorganisms detected in the cheese samples during the storage period do not have any effect compared to the control group, but the film coating types have an effect for LAB, *B. lactis*, total yeast-mold and TMAB.

**Keywords:** Bioactivity, Physicochemical properties, Probiotic microorganism, Sodium alginate, Edible film

## BÖLÜM 1. GİRİŞ

Probiyotik gıdalar sağlıklı beslenmenin ve geleneksel gıdalarımızın önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Son yıllarda artan önleyici tıp anlayışı ile birlikte popülarlığı ve bilinirliği artmıştır.

Yunancada “yaşam için” anlamına gelen “probiyotik” terimi, ilk önce diğer mikroorganizmaların gelişmesini engelleyen bir mikroorganizmanın ürettiği maddeleri tanımlamak için kullanılmıştır. Fuller, probiyotiğı “konakçı hayvanın bağırsak mikrobiyal dengesini olumlu yönde etkileyen yaşayan mikrobiyal yem takviyesi” olarak tanımlamıştır (Stanton ve ark, 2003). Bu tanım daha sonra geliştirmiş ve çeşitli tanımlamalar yapılmıştır.

Probiyotikler, insanların doğal mikroflorasına ait özellikleri geliştiren, tüketilmeleri sonucunda ağızda, tüm sindirim sisteminde, üst solunum yollarında, ürogenital kanallarda yararlı etkileri ile insanın sağlığında iyileşmeye neden olan tek veya karışık mikroorganizma kültürleridir. Probiyotikler Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından “yeterli miktarlarda verildiğinde, konağı sağlık faydası sağlayan yaşayan mikroorganizmalar” olarak tanımlanmaktadır (Lähteenmäki ve Ledeboer, 2007).

Probiyotik gıdalar ise; “insan vücudunda sindirildikleri zaman sindirim sisteminde büyük oranda canlı kalan ve bağırsak florasını olumlu yönde geliştiren canlı mikroorganizmaları içeren gıdalar” şeklinde tanımlanmaktadır (Demirci, 2009).

Probiyotik gıdalar ile ilgili mihenk taşı sayılabilecek ilk çalışma Rus bilimadamı Elie Metchnikoff tarafından yapılmıştır. 1907 yılında, Rus biliminsanı Elie Metchnikoff yoğurt, kefir ve ekşi süt gibi laktik asit bakterileri içeren gıdaların tüketimi ile sağlıklı ve uzun yaşamanın bağlantılı olduğunu ileri sürmüştür. Metchnikoff, ‘Yaşamın Uzatılması’ isimli kitabında, yüksek miktarda Bulgar tipi ekşi süt tüketen köylülerin

daha uzun yaşadığını bildirmiştir. Bu süt daha sonra *Lactobacillus bulgaricus* olarak adlandırılacak “Bulgar bacillus” adlı mikroorganizmayı içermektedir. Metchnikoff bunun sebebini gastrointestinal kanaldaki çürükçül bakterilerin, bu mikroorganizmalar tarafından elimine edilmesine bağlamıştır. Metchnikoff’un çalışması probiyotiklerin doğuşu olarak tanımlanmıştır. Ayrıca yirminci yüzyılın başlarında, Tissier, Metchnikoff’a paralel şekilde, Bifidobakterlerin, emzirilen bebeklerin bağırsak mikroflorasının baskın komponenti olması sebebiyle, bebeklerde enfeksiyonların önlenmesinde etkili olabileceğini öne sürmüştür (Stanton ve ark, 2003).

Japonya’da Bifidobakteriler ile ilgili araştırmalar 1950lerde başlamıştır. 1971 yılında, Morinaga Süt Endüstri Şirketi, *Bifidobacterium longum* ve *Streptococcus thermophilus* içeren fermente bir süt olan ilk Bifidus ürününü geliştirmiştir. 1970ler olmasına karşın, canlı bifidobakter içeren ürünlerin ticari anlamda elde edilmesini sağlayabilecek teknolojiler geliştirilmiş ve probiyotik tüketimi safi terapitik faydadan ziyade genel sağlık iyileştirmesiyle ilgili sebeplerle değişmiştir. Morinaga Süt Endüstri Şirketi 1977 yılında bifidus sütünü ve 1979 yılında bifidus yoğurdunu Japonya’da lanse etmiştir, Yakult firması ise bu sırada, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum* ve *Lactobacillus acidophilus* içeren MilMil adındaki sıvı yoğurdu 1978 yılında Japonya’da lanse etmiştir (Stanton ve ark, 2003).

*Streptococcus thermophilus* ve *Saccharomyces boulardii* bazı süt ürünlerinde kullanılsa da günümüzde sıklıkla kullanılan ticari bakteriler, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerine aittir (Espitia ve ark., 2016).

O günden bugüne probiyotikler ve probiyotik gıdalar ile ilgili çalışmalar artan bir ilgiyle devam etmektedir. Bu çalışmaların devam ettiği alanlardan biri de gıdanın ömrünü uzatmak üzere yenilebilir film kaplamaların probiyotikler ile zenginleştirilmesidir.

Değişen sosyo-ekonomik dengeler ile gıda endüstrisi ivmeli bir şekilde artmaktadır. Bu gelişme yanında artan çevresel atıklar gibi sorunları da getirmiştir. Gıda ambalajlamada kullanılan sentetik plastik ve diğer materyaller gibi doğal olmayan

ürünler ile bağlantılı çevresel problemler ve daha yüksek gıda kalitesi arayışı yenilikçi gıda paketlenme sistemlerinin geliştirilmesine sebep olmuştur (Pereira ve ark., 2019). Bu sistemlerden biri de aktif ambalajlamadır.

05.04.2018 tarih ve 30382 sayılı Resmi Gazetede yayımlanarak yürürlüğe giren Türk Gıda Kodeksi Gıda ile Temas Eden Madde ve Malzemelere Dair Yönetmelik'in (Anonim, 2022) dördüncü maddesi ikinci fıkrası (ğ) bendine göre "Gıda ile temas eden aktif madde ve malzeme: Bileşenlerini gıdaya ya da gıdanın bulunduğu ortama salacak ya da ambalajlı gıdadan veya gıdanın bulunduğu ortamdan maddeleri absorbe edecek şekilde tasarlanan, ambalajlı gıdanın raf ömrünü uzatması veya mevcut durumunu koruması ya da iyileştirmesi beklenen madde ve malzemeyi" tanımlamaktadır.

"Yenilebilir film" terimi; gıdaları kaplamak ya da gıdalar ve çevreleyen ortamlar arasında bariyer oluşturmak için, sentetik polimerlerin yerine kısmen veya tamamen ikame edilebilen, materyallerin yüzeyinin üstüne doğrudan uygulanan ince doğal polimer tabakası olarak tanımlanabilir (Emmambux ve Stading, 2007).

Filmler ve kaplamalar bazen aynı anlamda kullanılsa da aslında farklı konseptleri temsil etmektedir. Filmler genellikle bir örtü ya da sargı amacıyla kullanılan ince materyal tabakası olarak tanımlanırken, kaplamalar korunması amaçlanan ürünün yüzeyinde doğrudan oluşur (Gennadios, 2002).

Yenilebilir film ve kaplamaların üretiminde kullanılan birincil materyaller, polisakkaritler, proteinler ve lipidler veya bunların kombinasyonlarıdır. Her materyal kendi başına belli özellikte film yada kaplama oluştururken, nihai özelliklerini (bunlar, esneklik, bariyer ve optik özellikleridir) iyileştirmek üzere bu materyallerin kombinasyonlarının kullanımı ile plastikleştiriciler ve sürfektanların ilavesi yaklaşımı benimsenmektedir (Campos ve ark., 2011). Film yada kaplamanın bileşiminin optimizasyonu başarılı uygulamalar için kritiktir çünkü bunlar kullanım amacına ve uygulanacakları gıda ürününün özelliklerine göre formüle edilmelidir (Guimarães ve ark., 2018).

Yenilebilir film üretiminde kullanılan biyopolimerler arasında proteinler, belirgin ve nitelikli film oluşturması açısından büyük ilgi çekmektedir (Pereira ve ark., 2019). Protein filmlere ilave olarak aljinat (ALG) filmler de geniş çapta kullanılmaktadır. Bir aljinat filmi nem, gazlar ve aromalar için yarı geçirgen bir bariyer oluştururken, yapısal bütünlüğü ve taşıma özelliklerini korur ve gıda ürününden aromatik uçucu bileşenleri tutma kapasitesi vardır. Dahası esmerleşme önleyici ajanlar, renklendiriciler, tatlandırıcılar, besin öğeleri, baharatlar ve gıdanın yüzeyinde patojen gelişimi riskini azaltan antimikrobialer ve probiyotikler için taşıyıcı olarak değerlendirilebilir (Rhim, 2004).

Bu çalışmada, probiyotik bakteri suşu olarak, *Bifidobacterium animalis* ssp *lactis* B94, *Lactobacillus rhamnosus* GG ve kefir mayası (*L. kefir*; *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Str. thermophilus*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. berevis*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *Kluyveromyces* sp., *Saccharomyces* sp.) kullanılarak aktif sodyum aljinat filmlerin hazırlanması, hazırlanan aktif filmlerin karakterizasyonu ve biyoaktif özellikleri belirlenmesi ile beyaz peynirlerde kullanımlarının ürünün mikrobiyolojik raf ömrü üzerindeki etkilerinin veri analiz yöntemleri kullanılarak tespit edilmesi amaçlanmıştır.

## **BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI**

### **2.1. Yenilebilir Özellikte Gıda Ambalajları**

Yenilebilir kaplamalar, doğrudan gıda yüzeylerine, dış yüzeye veya katmanlar arasına uygulanan ve genellikle doğrudan korudukları gıdanın bir parçası olarak tüketilen malzemeleri içerir. Öte yandan, yenilebilir filmler genellikle ayrı olarak üretilir ve paketlenme için gıda yüzeyine uygulanır ve tüketilmeden önce gıdadan çıkarılabilir veya soyulabilir. Yenilebilir ambalaj, adından da anlaşılacağı gibi, yenilebilir ve sindirimi kolay olmalıdır. Biyolojik olarak parçalanabilir olmalarının yanı sıra insanlar için toksik olmamalıdır. Son ürünün işlevine bağlı olarak, hidrokoloidler/polisakkaritler, lipidler ve proteinler gibi çok çeşitli biyolojik olarak parçalanabilen bileşenler, çeşitli yenilebilir kaplamalar ve filmlerin üretim süreci için bitki kaynaklarından, hayvansal kaynaklardan ve mikroorganizmalardan ekstrakte edilir (Bomzon, 2022). Uygun yenilebilir ambalajlama bileşenlerinin seçimi, ambalajlanacak gıdanın özellikleri ile üretim yöntemi dahil olmak üzere kaplamanın üretildiği materyalin kompozisyonuna bağlıdır (Petkoska ve ark., 2021).

Tipik bir ambalajlama sistemi gibi yenilebilir kaplama sistemleri gazlar, nem ve aroma ile yağlar gibi diğer bileşenler için fiziksel bir bariyer oluşturmaktadır (Singh ve ark., 2019). Yenilebilir ambalajlama sistemleri başlıca, paketlenmiş ürünün kalite ve güvenliğinin devamı sağlamak veya yükseltmek ve raf ömrünü uzatmakla ilgilenmektedir. Diğer taraftan biyoaktif paketlenme sistemleri (kaplama/film), biyoaktif özellikler kaplama ya da kaplama materyalinin içerisinde taşınacak şekilde tasarlanmış, fonksiyonel gıdaların üretimine destek amaçlı yeni bir teknolojik konsepttir (Korhonen, 2022).

Biyolojik temelli ve biyoçözünür malzemeler kaynağına göre üç gruba ayrılabilir.

Bunlar:

- Doğrudan biyokütle/doğal kaynaklardan üretilen malzemeler (proteinler, polisakkaritler ve lipidler) (Pooja ve ark., 2019)
- Mikroorganizmalar tarafından üretilen malzemeler, genellikle polisakkaritlerin spesifik çeşitlerine aittir (Ramos ve ark., 2012a; Regubalan ve ark., 2018)
- Biyolojik temelli monomerlerden üretilen malzemeler (Ramos ve ark., 2012a, Regubalan ve ark., 2018)

Yenilebilir film kaplamalar biyolojik temelli ve biyoçözünür malzemelerin bir alt grubudur ve film oluşturma özellikleri ile geleneksel gıda ambalajlama sistemlerine alternatif olarak kapsamlı biçimde incelenmektedir (Petkoska ve ark., 2021).

Yenilebilir filmler ve kaplamalar genellikle, gıda sınıfı bir ortam veya çözücüde (su, etanol, organik asit vb) film oluşturan bir polimerin çözünmesi, dispersiyonu ya da emülsifikasyonu ve film oluşturan solüsyonun gıdanın üzerine doğrudan uygulanması veya bir aracı vasıtasıyla uygulanıp solventin uçurulması ile oluşur. Diğer taraftan, vakslar, lipidler ve bunların türevleri gibi amorf yada kristal termoplastik malzemeler ile termoplastik hidrokolloidler (plastikleştirilmiş nişasta, proteinler vb) hala plastik özellikleri taşırken yüksek sıcaklıkta ekstrüzyon yada doğrudan uygulama ile oluşabilir (Guilbert ve ark., 1995). Plastikleştiriciler, çoğu zaman yenilebilir filmler ve kaplamalar için gerekli bileşenlerdir, özellikle de polisakkaritler ve proteinler için, çünkü bu filmlerdeki polimerik zincirler arasındaki yaygın etkileşim sebebiyle bu filmler katı ve rijittir. Polimer termoplastikliği artırmak için plastikleştiriciler (düşük molekül ağırlıklı ajanlar) polimerik film oluşturan malzemelere ilave edilir. Bunlar kendilerini polimerler arasına yerleştirebilir ve polimer-polimer bağlarını engelleyerek daha esnek ve işlenebilir olmalarını sağlarlar. Yaygın kullanılan plastikleştiriciler gliserin, propilen glikol, sorbitol, sükroz, polietilen glikol ve mısır şurubudur (Suhag ve ark., 2020).

Film oluşturan bir polimerin uygulandığı herhangi bir gıda kaplama işleminde iki çeşit kuvvet vardır. Bunlar, polimer molekülleri arasındaki kuvvet (kohezyon) ve film ile gıda yüzeyi arasındaki kuvvettir (adhezyon). Kohezyonun derecesi filmin direnç,

esneklik ve geçirgenlik gibi özelliklerini etkiler. Kuvvetli kohezyon esnekliği, gaz ve su buharı bariyer özelliklerini düşürür, gözenekliliği arttırır. Film kohezyonu uzun zincirli polimerler tarafından tercih edilmektedir. Endüstriyel sebeplerle genellikle gerekli olan aşırı solvent buharlaşması ya da soğuma oranı, polimer moleküllerinin yetersiz immobilizasyonu sebebiyle koheziv olmayan filmlerin üretimine neden olabilir. Hidrofilik dolguları korumak için hidrofobik malzemeler (yada tersi) kullanıldığında elde etmesi bazen zor olan uygun kaplama, sıcak uygulama yada bir bağdaştırıcı ajanı ile ürünün kaplanması veya film oluşturan çözeltiye ilavesi ile elde edilebilir (Guilbert ve ark., 1995). Ayrıca plastikleştiricilerin eklenmesi de film oluşturan malzemenin kohezyonunu düşürür (Suhag ve ark., 2020).

Yenilebilir film kaplamaların dayanıklı yapılarını oluşturmak için çeşitli biyolojik temelli polimerler araştırılmıştır. Hidrokolloidler, hem polisakkaritler hem de proteinler, yenilebilir malzemelerin üretiminde kullanılan en yaygın biyopolimer gruplarıdır. Bunlar bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi kaynaklardan elde edilir. Sellüloz türevleri, nişastalar, aljinatlar, pektinler, kitosan, pullulan, karregenalar yenilebilir film ve kaplamaların üretiminde kullanılan en popüler polisakkaritler iken, proteinler olarak en popülerleri soya proteini, buğday gluteni, mısır zeini, ayçiçeği proteinleri, jelatin, peynir altı suyu proteini, kazein ve keratindir. Bu malzemeler yapısal olarak hidrofiliktir. Bu sebeple, hidrokolloid matriksin içerisinde farklı yağlar katılarak su buharı bariyeri özellikleri geliştirilir. Bunlardan en yaygınları vakslar, trigliseridler, asetillenmiş monogliseridler, serbest yağ asitleri ve bitkisel yağlardır (Galus ve ark., 2020).

Geleneksel olarak yenilebilir film kaplama üretimi ıslak ve kuru prosesler olarak iki ana gruba ayrılır. Islak prosesler çözelti için solvante ihtiyaç duyar ve polimerin düz bir yüzey üzerine yayılımını içerir, bunu kontrollü şartlarda solventin uzaklaştırılması ve filmin oluşumu takip eder. Bu yüksek enerji gerektiren bir prosesdir, laboratuvar uygulamaları için uygun olup, endüstriyel çapta elverişli değildir. Yenilebilir film üretimi için kuru yöntemlerden; ekstrüzyon, enjeksiyon, şişirme, sıcak presleme işlemleri en yaygın kullanılanlardır (Mellinas ve ark., 2015). Tez çalışması kapsamında, laboratuvar çapında uygun olan ıslak proses kullanımı tercih edilmiştir.

## 2.2. Taşıyıcı Sistemler Olarak Yenilebilir Filmler ve Kaplamalar

Daha öncede değinildiği gibi tüm ambalajlama sistemlerinin ilk amacı gıdayı dış etkenlere karşı koruyarak raf ömrünü uzatmaktır. Yenilebilir filmler ve kaplamalar uygulandığı gıdayı korumak veya ona istenilen özellikleri katmak üzere taşıyıcı sistemler olarak kullanılmaktadır. Yenilebilir filmler ve kaplamalar; emülgatörler, aromalar ve renklendiriciler gibi çeşitli katkı maddeleri ile antioksidanlar, antimikrobiyaller, nutrasötikler, probiyotikler, prebiyotikler, besin maddeleri gibi çeşitli fonksiyonel bileşenlerin taşıyıcıları olarak görev yaparlar (Özdehan Ocak ve Demircan, 2020; Khodaei ve ark., 2020).

Besleyici değerlerine ek olarak, hastalıkların tedavisi ve kontrolünde de etkili olan gıda veya gıda bileşenleri fonksiyonel gıdalar olarak tanımlanmaktadır (Vural, 2004). Sağlıklı beslenmeye yönelik ilgi her geçen gün artmakta ve bu bağlamda fonksiyonel gıdaların üretimi ilgi odağı olmaktadır. Kaplamaya ilave edilen fonksiyonel özellikteki bileşenlerle bu özellik sağlanmaktadır.

Oksidatif prosesler gıdaların kalite kayıplarına yol açan mekanizmaların başında gelmektedir. Gıda formülasyonlarına antioksidanların ilavesi renk, koku, tat ve tüketici tarafından tercih edilme gibi özellikleri etkileyebilir. Antioksidanların polimer bir matrisle ilave edilerek oksidasyon proseslerinin engellenmesi yolu olan aktif ambalajlama yenilikçi bir yaklaşımdır (Aguirre-Joya ve ark., 2018).

Bitkisel ekstraktlar (yeşil çay, ginkgo yaprakları, zencefil, üzüm çekirdeği, kimyon, kekik gibi bitki ekstraktları), oleoresinler (karotenoidler, alkaloidler, steroidler, antosiyaninler gibi), esansiyel yağlar, C ve E vitamini gibi doğal kaynaklı bileşenler ile tereddütler devam etse de ter-bütıl hidrokinon (TBHQ), Bütılhidroksianisol (BHA), Bütıl Hidroksi Toluen (BHT) ve propil gallat gibi sentetik antioksidanların yenilebilir film ve kaplamalara ilavesi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (Sahraee ve ark., 2019).

Nutrasötikler, gıdaların ve diğer sindirilebilir formların doğal bileşenleri olarak bulunan, fizyolojik durumu geliştirerek hastalıkları önleme veya iyileştirmede insan

vücuduna katkı sağlayan kimyasallardır. Kalsiyum ve E vitamini, belli hastalıkların önlenmesinde rol oynayan önemli nutrasötiklerdir. Gıdaların sarılması veya kaplanması için yüksek oranda kalsiyum ve/veya E vitamini içeren yenilebilir film ve kaplamaların tasarlanması bu nutrasötiklerin günlük alım miktarının atmasına ve böylece diyetin bu besin öğelerince zenginleşmesine yardım edecektir (Mei ve Zhao, 2003). Yeni soyulmuş bebek havuçlar kalsiyum ve E vitamini içeren ksantan gum kaplama ile kaplandığında, Kalsiyum için Beslenme Referans Değeri 1000 mg/gün, E vitamini Beslenme Referans Değerinin 1 mg/gün olarak baz alındığında, bir porsiyon (85 gr) havucun kalsiyum Referans Alım (RA) değerinin % 6,6 , E vitamini RA değerinin % 70 olduğu yapılan çalışmada bulunmuştur (Mei ve ark., 2002).

Taşıyıcı sistem olarak yenilebilir filmler ve kaplamaların bir diğer uygulama alanı aroma artırmak üzere aroma vericilerin taşınmasıdır. Laohakunjit ve Kerdchoechuen (2007) yaptıkları çalışmada doğal pandan (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*) ekstraktı içeren pirinç nişastası ile kaplanmış aromatik olmayan pirinçten aromatik özellikte pirincin aromatik bileşenlerine benzer bir pirinç ürettildiğini göstermiştir. Aromatik pirinçler için indikatör tat bileşeni olan 2-acetyl-1-pyrroline (ACPY) ilavesinin etkili olduğu ayrıca n-hegzanal seviyelerini düşürerek depolama sırasında gelişebilecek potansiyel acılaşmayı azalttığı tespit edilmiştir.

Ticari olarak, özellikle Japon pullulan bazlı filmler, çeşitli renklerde, baharat ve çeşnilerle çeşitlendirilmiş olarak bulunmaktadır. Mükemmel oksijen bariyer özelliği ile pullulan filmler, aroma ve renkleri tutmak ve film içerisinde diğer aktif bileşenleri stabilize etmek için kullanılabilir (Martín-Belloso ve ark., 2009).

Antimikrobiyaller de yenilebilir film ve kaplamaların taşıyıcı özelliği ile kullanılabilir bir diğer aktif bileşen grubudur. Bu antimikrobiyal yenilebilir filmler ve kaplamalar, gıdanın yüzeyinde aktif bileşenlerin etkili konsantrasyonlarını koruyarak bozulmayı ve patojenik bakterileri inhibe edebilir (Gennadios ve ark., 1997). Yenilebilir film ve kaplamalara potansiyel olarak uygulanabilecek birkaç antimikrobiyal sınıfı vardır. Bunlar, organik asitler (asetik, benzoik, laktik, propiyonik, sorbik); yağ asidi esterleri (gliseril monolaurat); polipeptidler (lizozom, peroksidaz,

laktoferrin, nisin); bitkisel esansiyel yağlar (tarçın, kekik, limonotu); ve nitritler ile sülfidlerdir (Franssen ve Krochta, 2003). Bu kategoriler arasında bitkisel esansiyel yağlar kimyasal koruyuculara mükemmel bir alternatiftir ve gıdalarda kullanımı tüketicilerin az işlenmiş doğal gıda taleplerini de karşılamaktadır (Burt, 2004).

2013 yılında Sánchez-González ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, sodyum kazeinat, bezelye proteini, metilselüloz ve hidrosimetil selülozdan elde edilmiş film solüsyonuna *Lactobacillus plantarum* doğrudan ilave edilmiş, dökme yöntemi ile filmler elde edilmiş ve filmlerin özellikleri incelenmiştir. Sonuç olarak polisakkarit matrislerde protein filmlerde gözlemlenmeyen *Listeria innocua*'ya karşı belirgin bir antimikrobiyal aktivite gözlemlenmiştir.

Prebiyotikler bazı gıdalarda doğal olarak bulunan ya da mikroorganizmalar ve enzimler tarafından sentezlenebilen bileşenlerdir. Prebiyotik konsepti ilk olarak 1995 yılında ortaya atılmıştır ve “halihazırda bağırsakta bulunan bakterilerden bir ya da birkaçının gelişimini/aktivitesini seçici olarak teşvik ederek konağı faydalı biçimde etkileyen, sindirilemeyen gıda bileşeni” olarak tanımlanmıştır (Gibson ve Roberfroid, 1995). 2016 yılında Probiyotikler ve Prebiyotikler Uluslararası Bilimsel Derneği (ISAPP) tarafından prebiyotik tanım “konakçı mikroorganizmalar tarafından seçici olarak kullanılan, sağlık yararı sağlayan substrat” olarak güncellenmiştir (Gibson ve ark., 2017).

Geleneksel olarak prebiyotikler gıdaların sağlık üzerine etkilerini arttırmak ya da teknolojik ve duyuşal özelliklerini arttırmak için kullanılmaktadır. Ancak gıdaların bazı bileşenleri ile etkileşime girerek ya da üretim proseslerinde uygulanan yüksek sıcaklık, düşük pH gibi işlemlerde fonksiyonlarını yitirmektedir. Bu sebeple prebiyotik gıdaların üretimi için yenilebilir filmler ve kaplamalar potansiyel bir yöntemdir. Polidektroz, inulin, oligofruktoz, galakto-oligosakkaritler, bazı polioller ticari olarak filmler ve kaplamalar dahil bir çok matriste yıllardır kullanılmaktadır (Paulo ve ark. 2021).

Bakteriyosinler belli mikroorganizmaların metabolizmaları sonucu üretilen

antimikrobiyal özellikte peptidler veya ürünleridir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilmiş bakteriyosinlerin gıda endüstrisinde kullanımı ile gıdanın raf ömrü uzatılırken gıda güvenliği sağlanıp tüketicinin sağlığı korunmaktadır. Ambalajlama filmleri ve kaplamalara laktik asit bakterilerinden bakteriyosinlerin dahil edilmesi üzerine çalışmalar yapılmış ancak yalnızca depolamanın başında iyi antimikrobiyal etkiler gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun sebebi matristen bakteriyosinlerin zamanla tüketilmesidir. Buna çözüm olarak bazı çalışmalar laktik asit bakterilerinin filmlere doğrudan ilavesi yöntemi ile raf ömrü boyunca bakteriyosinlerin doğal olarak üretiminin sağlanması ve böylece antimikrobiyal aktivitenin artırılması yöntemini önermiştir (Pech-Canul ve ark. 2020).

### **2.3. Probiyotik Gıda Ambalajı Geliştirmek İçin Kullanılan Malzemeler**

Probiyotikler Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından “belli miktarlarda tüketildiğinde konağa sağlık faydası sağlayan mikroorganizmalar” olarak tanımlanmaktadır (FAO/WHO, 2006). Probiyotik tüketimi konağın gastrointestinal sistemindeki hedef mikroorganizmaların büyümesini olumlu yönde etkiler, zararlı bakteri ve mantarları engeller, konağın bağışıklık sistemi savunma tepkilerini destekler. Buna ek olarak huzursuz bağırsak sendromu, gastrointestinal disbiyoz ve diğer bağırsak kaynaklı hastalıkları önler (Gu ve ark. 2019). Bilinen probiyotiklerin çoğu Genellikle Güvenli Kabul Edilen (Generally Recognized As Safe, GRAS) listesindedir, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsleri ve *Saccharomyces boulardii*, *S. cerevisiae* CNCM I-3856 ve *Lipomyces starkeyi* VIT-MN03 gibi belli maya türleridir (Pech-Canul ve ark., 2020). Mikroorganizmaların konağın sağlığına nasıl faydalı olduğuna dair birkaç mekanizma öne sürülmektedir. Bunlardan bazıları: antimikrobiyal yada antifungal peptidlerin üretimi ile, patojenler dahil diğer mikroorganizmalar için bağırsak ortamını tercih edilmeyecek şekilde değiştirerek, besinler ve bağırsak epitel hücrelerine bağlanma için yarışarak olduğudur (Sanders ve ark., 2018).

Probiyotikler ile zenginleştirilmiş yenilebilir film ve kaplamaların üretimi ile gıda ürünü üzerinde patojen gelişimi engellenerek raf ömrü uzatılabileceği gibi aynı

zamanda sağlık üzerine olumlu etkileri olan fonksiyonel gıda üretimi de mümkündür. Bu amaçla farklı film ve kaplama malzemesi kullanarak pek çok çalışma yapılmıştır.

İlk çalışmalarda doğal olarak gelişen patojenlerin üremesini engellemek üzere selüloz ya da gomalak (hayvansal bir reçine) içerisinde *Candida spp.* kullanılmıştır. Maya hücreleri kaplama içerisinde canlı kalabilmiş ve çürümeyi yavaşlatmıştır (McGuire ve Baldwin, 1994; McGuire ve Hagenmaier, 1996; McGuire ve Dimitroglou, 1999).

Geliştirilen sistemler arasında, kitosan, gumlar, selüloz, pektinler ve denizyosunu ekstraktları gibi film malzemeleri en çok ilgiyi çekmiştir (Singh ve ark., 2019).

Yenilebilir kaplamalara probiyotik kültürlerin ilavesi ilk olarak Tapia ve ark. (2007) tarafından ortaya atılmıştır. Çalışmada aljinat filmler ve bifidobakteriler kullanılmıştır.

Nişasta, kitosan, selüloz ve galaktomannanlar gibi polisakkaritler yenilebilir film ve kaplamalar için potansiyel malzemeler olarak araştırılmıştır. Fakat polisakkarit bazlı film ve kaplamaların neme duyarlı olduğu ve düşük su buharı bariyer özelliği ve düşük mekanik özellikleri olduğu raporlanmıştır. Bu engeller endüstriyel uygulamalarını engellemektedir. Bu kısıtlamalar bu malzemelerin tek başlarına kullanımı yerine birbirleri veya pektin, yağ asitleri gibi diğer malzemeler ile kombinasyonlarının ya da metilselüloz veya karboksimetilselüloz gibi kimyasal modifikasyonlarının denenmesine yol açmıştır (Zhang ve ark., 2014).

Şimdiye kadar, selüloz türevleri önemli film oluşturan bileşikler olarak görünmektedir. Bunlar sadece biyobozunur, kokusuz ve tatsız olma özellikleri değil ayrıca düşük ve orta bağıl nemde yağlar, oksijen ve karbondioksit için iyi bariyer özellikleri göstermektedirler. Bu türevler içerisinde hidrosimetilselüloz ve metil selülozun güçlü film oluşturma ve mekanik dayanıklılık özellikleri vardır (Sánchez-González ve ark., 2013). Singh ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada sitrik asit ile çapraz bağlanmış sodyum karboksimetilselüloz ve hidrosimetilselüloza probiyotik (*Lactobacillus rhamnosus* GG) ilavesi yöntemi film oluşumu için kullanmış ve bu sistemin yeni yöntemler geliştirmede gelecek vaad ettiğini raporlamıştır.

Metilselüloz filmlerin formülasyonu ısıtma ve kurutma gibi işlemleri içermektedir ve ısıya duyarlı laktik asit bakterilerinin zarar görmesine ya da ölmesine sebep olmaktadır. Bunun önüne geçmek adına fruktooligosakkaritler gibi probiyotikleri koruyucu bir malzemenin ilavesi denenmiş ve hem koruyucu hem de prebiyotik özellik kazandırmaları incelemiştir. Filmin fizikokimyasal özelliklerinin ve yüklenmiş olan mikroorganizmaların stabilitesini olumlu yönde etkilediği tespit edilmiştir (Romano ve ark., 2014).

Soukoulis ve ark. (2014a) ilk kez, prebiyotik özellikleri ile bilinen dört oligomer karbonhidratı (inulin, polidektroz, glukoz oligosakkariteri ve buğday dekstrini) probiyotik yenilebilir filmlerde incelemiştir. *Lactobacillus rhamnosus* GG ilave edilen filmlerden polidektroz ve glukoz oligosakkaritin film oluşumu sırasında uygulanan kurutma sırasında probiyotik canlılığı desteklediği tespit edilmiştir.

Kefiran, kefir taneleri arasına yerleştirilen laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan doğal bir polisakkarittir. Kefiran, yeterli mekanik özellikleri ile şeffaf, esnek, homojen ve oldukça ince film oluşturma kapasitesine sahiptir (Piermaria ve ark., 2015).

Aljinat toksik olmaması, biyobozunurluğu, biyolojik olarak sürdürülebilirliği ve düşük maliyeti ile ilgi çekici bir film oluşturan malzeme olmuştur. Aljinatın fonksiyonel özellikleri olan kıvam arttırma, stabilize etme, askıya alma, film oluşturma, jel oluşturma, emülsiyon stabilize etme iyi bir şekilde araştırılmıştır. Aljinatın lineer yapısı gereği aljinat güçlü filmler ve katı formda yeteri kadar lifli yapı oluşturabilmektedir. Gıda sanayinde aljinat; et, sebzeler ve meyvelerin dehidrasyonunu kısıtlayıcı, içecek sanayinde kıvam arttırıcı, jel oluşturucu ve koloidal stabilize edici ajan olarak görev yapmaktadır (Tavassoli-Kafrani ve ark., 2016). Aljinatlar ayrıca ilaçların, proteinlerin, hücrelerin ve DNA'nın enkapsülasyonu için kullanılmaktadır (Ashikin ve ark., 2010).

Daha önceden değinildiği gibi film ve kaplama oluşturmada kullanılan bir diğer grup protein bazlı malzemelerdir. Proteinlerin hidrofilik yüzeylere bağlama kapasitesi

yükseltir ve özellikle düşük bağıl nemli ortamlarda O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> ve yağlar için iyi bir bariyer vazifesi görür. Ancak hidrofilik özelliği zayıf su bariyeri özelliği göstermesine sebep olur. Proteinlerin polipeptid zincirleri arasındaki kohezyonun attırılmasının bariyer özelliklerinin geliştirilmesinde faydalı olacağı düşünülmüştür. Bu amaçla yapılan çalışmalarda, proteinler arası bağları artırmak üzere kimyasal muamele (glutaraldehit, formaldehit, gliseraldehit), enzimlerle muamele (transglutaminaz) ya da fiziksel muamelenin (ısıtma, ışınlama) su buhar bariyeri özelliği ile mekanik özellikleri ve filmlerin proteolize direncini arttırdığı tespit edilmiştir (Lacroix ve Vu, 2014).

Le Tien ve ark. (2000) yaptığı çalışmada selüloz içerisinde çapraz bağlanmış peynir altı suyu proteininin, suda çözünmeyen, iyi mekanik özelliklere sahip, proteolitik enzimlere dirençli, su buharı geçirgenliği daha düşük bir film oluşturduğunu raporlamışlardır. Buna ek olarak film formülasyonlarına lipidlerin ilavesi nem bariyeri özelliğini geliştirebilir (McHugh, 1987). Fakat bunun için işlemlerin solvent ile muamelesi yada yüksek ısı istemesi, işlemlerin kompleks olması, oluşan ürünün daha sonra katmanlarına ayrılma ihtimali gibi sebeplerle uygulanabilirliği yüksek değildir. Ancak emülsifiye edici ajanların ya da sürfektanların ilavesi emülsiyon stabilitesini arttırabilir (Lacroix ve Vu, 2014).

Protein filmlere polisakkaritlerin ilavesi nem bariyeri, direnç ve mekanik özellikleri geliştirir. Bu bağlamda protein filmlere karboksimetilselüloz, aljinat ve pektin ilave edilerek çalışmalar yapılmıştır. Soukoulis ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada peynir altı suyu proteini isolatına aljinat, pektin, karregen/keçiyoynuzu gamı ve jelatini ilave ederek oluşturduğu probiyotik filmin özelliklerini karşılaştırmıştır. Karregen/keçiyoynuzu gamı içeren peynir altı suyu proteini filmlerin daha uzun stabilite sağladığı raporlanmıştır.

Yenilebilir film ve kaplama üretimi için kullanılan başlıca proteinler şunlardır (Lacroix ve Vu, 2014):

- Süt proteinleri;
  - Kazein

- Peynir altı suyu proteini
- Kollajen ve jelatin
- Plasma proteinleri
- Miyofibriler proteinler
- Yumurta akı
- Soya proteini
- Buğday gluteni
- Zein
- Protein bazlı nanobileşikler

Paketli olsun ya da olmasın gıdalardan nem kaybını önleme ihtiyacı lipidleri yenilebilir film kaplama malzemesi olarak iyi bir aday haline getirmektedir. Filmin fonksiyonerliğini arttırmak üzere lipidler genellikle polisakkaritler ya da proteinler ile birlikte kullanılarak kompozit filmler oluşturulmaktadır. Kompozit filmlerde lipid malzemelerin etkinliği kullanılan lipidin özelliklerine, başta kimyasal yapısı, hidrofobikliği, fiziksel yapısı (katı ya da sıvı oluşu) ve diğer bileşenlerle lipid arasındaki etkileşimlere bağlıdır (Perez-Gago ve Rhim, 2014).

Hidrofobik bu malzemeler arasında vakslar taze emtiaları korumak için geniş çapta kullanılmaktadır. Vaksların suda çözünmeyip bazı organik çözücülerde çözünebilir olmasına sebep olan yüksek higroskopikliği bunların neden su buharı transferi için en iyi bariyer olduğunu açıklamaktadır. Ticari olarak kullanılan başlıca vakslar; doğal kaynaklı balmumu, karnauba mumu, kandelila mumu ve sentetik üretilmiş parafin, oksitlenmiş polietilen ve mikrokristalindir (Perez-Gago ve Rhim, 2014).

Trigliseritler ya da yüksüz lipidler, yağ asitlerinin gliserolle esterleridir. Suda çözünmez ancak belli konsantrasyonların üzerinde misellere benzer kümeler oluştururlar (Perez-Gago ve Rhim, 2014).

#### **2.4. Probiyotik ve Simbiyotik Yenilebilir Paketleme (Teknolojiler, Üretim Yöntemleri ve Film Oluşturma Mekanizmaları)**

“Simbiyotik” terimi bir ürün hem probiyotik hem de prebiyotik içerdiğinde kullanılmaktadır. Schrezenmeir ve Vrese, (2001) kelime kökü sinerjizme dayandığı için bu terimin içeriğindeki probiyotiklerce tercih edilen prebiyotikleri içeren gıdalar için kullanılması gerektiğini öne sürmüşlerdir.

Gıdalara probiyotiklerin ve prebiyotiklerin katılması duysal özelliklerini negatif yönde etkileyerek, tüketici kabul edilebilirliğini azaltabilir. Filmlere yada kaplamalara probiyotiklerin ve prebiyotiklerin katılması ise genellikle nötr yada fark edilemez bir etkiye sebep olur (Corona-Hernandez ve ark, 2013).

Yenilebilir film kaplamaların probiyotiklerin ve prebiyotiklerin taşıyıcısı olarak kullanılmasının bir diğer teknolojik faydası canlı hücrelerin stabilitesi ve yeterli miktarda prebiyotik içermesi ile bağdaştırılmaktadır. Gıdanın içerisine doğrudan probiyotiklerin ve prebiyotikler ilave edildiğinde işleme sırasında oluşan çevresel şartlar sebebiyle son üründe probiyotiklerin canlılığı ya da prebiyotiklerin miktarı azalabilmektedir (Corona-Hernandez ve ark, 2013). Filmlere probiyotiklerin ve filmlerin kombinasyonu ile ilave işlemi simbiyotik bir birliktelik oluşturarak probiyotiklerin canlılığını artırmaktadır (Fernandes ve ark., 2020a).

2016 yılında Probiyotikler ve Prebiyotikler Uluslararası Bilimsel Derneği (ISAPP) tarafından prebiyotik tanımının “konakçı mikroorganizmalar tarafından seçici olarak kullanılan, sağlık yararı sağlayan substrat” olarak güncellenmesiyle prebiyotik olarak sınıflandırılacak maddeler artmıştır. ISAPP’ın 2016 yılında yayınladığı bildiriye göre sindirilemeyen oligosakkaritler fruktanlar ve galaktanlar, konjuge linolek asit, çoklu doymamış yağ asitleri, inulin, fenolik bileşikler, laktuloz, polidektroz prebiyotik olarak tanımlanabilecek bileşiklerdir (Gibson ve ark., 2017). Bu konsept yenilemesi prebiyotik ticari potansiyeline sebep olabilecektir (Fernandes ve ark, 2020b).

Bu bağlamda probiyotik ve simbiyotik yenilebilir paketleme sistemleri arasında mikroenkapsülasyon, kaplama ve filmler sayılabilir.

Mikroenkapsülasyon, sıvı yada katı bir malzemenin (çekirdek) her bir damla yada

tanenin, polimerik bir malzeme (kabuk) tarafından oluşturulmuş devamlı fazlı filmi ile sarılarak veya çevrilerek mikrokapsül olarak bilinen mikrometreden milimetreye kadar ölçülerde kapsüller oluşturması işlemidir (Vidhyalakshmi ve ark., 2009).

Probiyotik mikroorganizmaların enkapsülasyonu da yeni ve yüksek verimlilikli yöntemlerden biri olup halen geliştirilmeye devam etmektedir.

Mikrokapsüllerin birçok ilgi çekici avantajı vardır. Mikrokapsüller işlemlerden önce kararsız hassas materyalleri çevresinden korur, mikrokapsülasyon işlenebilirliği artırır, çözünürlüğü, disperse olabilmeyi, akışkanlığı geliştirir ve bunların sonucu olarak da oksidasyon ve dehidrasyon önlenerek raf ömrünü uzar. İşlem toksik maddelere karşı güvenli ve yeterlidir, mikroorganizmaları ve enzimleri immobilize eder (Benita, 2005).

Gıda işlemede kullanılmak üzere probiyotiklerin enkapsülasyonu için çeşitli yöntemler vardır. Bu yöntemler, spray kurutma, ekstrüzyon ve emülsiyondur.

Spray kurutma, aktif materyali bir polimer ya da eriyik tarafından oluşturulmuş koruyucu bir matris içerisinde enkapsülasyonu için kullanılır. Enkapsülasyon için pek çok yöntem geliştirilmiş olsa da gıda endüstrisinde düşük maliyet ve ulaşılabilir ekipmanlar sebebiyle en yaygın kullanılanıdır (Das ve ark., 2014).

Ekstrüzyon, hidrokolloidler ile probiyotik kapsüller oluşturmak için kullanılan en basit ve en yaygın yöntemdir. Bu teknik, hidrokolloid bir çözelti oluşturup içerisine probiyotik bileşenlerin ilave edilmesi ve hücresel çözeltinin meme başlıklı bir spreyden damlatılıp katılaştırıcı bir çözelti içerisinde serbest düşmeye bırakılmasını kapsar (King, 1995).

Ekstrüzyon ile prebiyotik potansiyelli gıda bileşenlerinin üretimi ve modifikasyonunun gıdalardaki çözünebilir lif içeriğini artırma gibi teknolojik avantajları bulunmaktadır (Hurtado-Romero ve ark., 2020).

Emülsiyon tekniği devamlı devamsız faz arasındaki etkileşim ilkesine dayanır. Aljinat, kitosan ve jelatin gibi birçok çeşit destek materyali probiyotiklerin enkapsülasyonu için kullanılmıştır. Bu tarz probiyotikler yoğurt, cheddar ve dondurmaya başarılı biçimde uygulanmıştır (Adhikari ve ark., 2002). Ancak ticari emülsiyon bazlı işlemler bazı kritik konularla uğraşmak zorundadır, bunlar organik çözeltilerin uzaklaştırılması, üretim tesisinden kaynaklı sınırlamalar, katılaştırma sırasında emülsiyon tanelerinin birleşmesi ve dengesizliği gibi konulardır. Bu zorluklar emülsiyon damlalarının verimli bir şekilde katılmış mikrokürelere dönüşmesine yol açmıştır. Bu tekniğin uygulamalarında halojenlenmiş ester organik çözücüler (metilkloroasetat ve etilkloroasetat gibi) dispersiyon çözeltileri olarak kullanılmıştır (Das ve ark., 2014).

Yenilebilir filmler probiyotiklerin enkapsülasyonu için kullanılacak bir diğer yöntemdir. Yenilebilir film oluşturmak için daha önce de bahsedildiği gibi kuru ve ıslak olmak üzere iki yöntem uygulanmaktadır.

İlk yöntem olan ıslak yada solvent döküm yönteminde, yenilebilir malzeme dispersiyonu uygun bir baz üzerine yayılır ve kurumaya bırakılır. Çözeltinin kuruması sırasında solventin buharlaşması sonucu polimer zincirleri film oluşturmak üzere kendilerini yeniden hizalayana kadar polimerin çözünürlüğü azalır. Bu aşamanın filmin kalınlığı ve yapısal özellikleri üzerine yüksek etkisinden dolayı kurutma hızını ve çevresel faktörünü kontrol etmek çok önemlidir. İnfrared kurutma, kurutma hızını arttırdığı için avantajlıdır (Tavassoli-Kafrani ve ark., 2016).

Filmin yırtılmadan ve buruşmadan kaldırılması çok önemlidir bu da baz malzemenin cinsine bağlıdır. Filmin bir uçtan kolay sıyrılabilmesi için %5 ila %8 arasında optimum nem içeriği sağlanmalıdır (Tharanathan, 2003).

İkinci yöntem kuru yöntemdir ve düşük nemde bazı polisakkaritlerin ve proteinlerin termoplastik özelliklerine dayanarak kompresyonla kalıplama ve ekstrüzyon işlemleri uygulanır.

Solvent döküm yöntemi birçok araştırmacı tarafından aljinat filmlerin

oluşturulmasında kullanılmıştır. Aljinatların güçlü jel veya düşük çözünürlüklü polimer oluşturmasına sebep olan en yararlı ve benzersiz özelliği, çok değerlikli metal kationlar ile, özellikle kalsiyum iyonları ile, reaksiyona girebilme yeteneğidir (Zactiti ve Kieckbusch, 2006). Aljinat, çok sayıda 1-4- bağlanmış  $\alpha$ -D-mannuronat (M) ve  $\beta$ -L-guluronat (G) monomerik birimlerinden oluşan, doğrusal yapıda, anyonik, suda çözünebilen bir polisakkarittir (Tavassoli-Kafrani ve ark., 2016). Aljinatın polimer zinciri, zincirde değişik oran ve dağılımda bulunan 3 tip bölge ya da bloktan oluşur. G blokları sadece L-guluronik asitten oluşan birimleri içerir ve daha kuvvetli jel gücüne sebep olur, M blokları tamamen D-mannuronik asitten oluşur ve MG blokları değişen sayıda L-guluronik asit ve D-mannuronik asitten oluşur ve aljinatların asitte çözünürlüğünü bu belirler (McHugh, 1987). Zincirdeki M/G oranı ve M ve G bloklarının dağılımı aljinatın fiziksel özelliklerini etkilemektedir. M/G oranı  $<1$  olduğunda yüksek oranda guluronik asiti temsil eder ve daha güçlü bağlar oluşturma kapasitesi vardır. M/G oranı  $>1$  ise daha düşük guluronik asitin varlığını gösterir ve daha yumuşak elastik yapılara sebep olabilir (Blanco-Pascual ve ark., 2014). Aljinat çözeltileri, pH değerinin guluronik asidin  $pK_a$  değerinin altına düşürerek yada başta kalsiyum olmak üzere, magnezyum, manganez, alüminyum, demir gibi iki değerli iyonları varlığında jel oluşturur (Tavassoli-Kafrani ve ark., 2016).

Moayednia ve ark. (2010), %2 (w/v) sodyum aljinat çözeltisi kullanarak *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium lactis*'i kalsiyum aljinat filmlerinde immobilize edilerek çilekleri kaplamıştır. *Lactobacillus acidophilus*'un canlılığının *Bifidobacterium lactis*'e göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Akman ve ark. (2021) yaptıkları çalışmada sodyum aljinat filmlere *Lactobacillus plantarum* ilave ederek film özelliklerini ve üretimini incelemiş ve sonuç olarak sodyum aljinat filmlerin taze kesilmiş meyveler, sebzeler ve et ürünlerinin raf ömürlerinin uzatmak için biyoaktif gıda ambalajlama uygulamalarında mükemmel özellikler gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Döküm yöntemi ile film üretimi aynı zamanda probiyotik ve prebiyotik içeren simbiyotik filmlerin üretimde de kullanılmıştır.

Pereira ve ark. (2019) prebiyotik olarak inulin ve fruktooligosakkaritleri seçerek *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 ilavesi ile peynir altı suyu proteini ve aljinat filmler elde etmiştir. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12'nin 23°C'de 60 günlük depolamada probiyotik olarak görev yapabileceği 10<sup>6</sup> KOB/g eşik değerde kaldığını göstermişlerdir.

Solvent döküm yöntemin alternatif versiyonları Arzate-Vázquez ve ark. (2012) tarafından aljinat/kitosan, Galus ve Lenart (2013) tarafından aljinat/pektin, Sirviö ve ark. (2014) tarafından aljinat/selüloz filmlerin yapımında kullanılmıştır.

Yenilebilir kaplamalar ise püskürtme, daldırma ve yayma yöntemleri ile elde edilebilmektedir.

Püskürtme yöntemi, yüksek basınçta (60-80 psi) kolayca püskürtülebilecek düşük viskoziteli kaplama çözeltileri için kullanılabilir (Tharanathan, 2003). Bir püskürtme sistemi bir dizi meme sayesinde damlacıklar oluşturarak yüzey alanını artırır ve bunların gıdanın yüzeyine dağılmasını sağlar. Bu tekniğin en büyük avantajı eşit dağılımlı kaplama oluşturması, kalınlığın kontrol edilebilmesi ve çoklu katman uygulamalarına izin vermesidir (Andrade ve ark., 2013). Ayrıca spreyleme yöntemi kaplama materyaline kontaminasyonu engelleyebilir, kaplama malzemesinin sıcaklık kontrolünü sağlayabilir ve kesintisiz üretim için otomasyonu sağlayabilir (Paulo ve ark., 2013).

Kaplama üretim yöntemlerinden sadece daldırma yöntemi kullanılarak kalın kaplamalar elde edilebilir. Bu metotta kaplama formülasyonun sıvı ortamına ürünün doğrudan daldırılması ve çıkarılıp kurumaya bırakılmasıyla ürün üzerinde ince bir tabaka oluşturulur (Paulo ve ark., 2013).

Daldırma yöntemi ile κ-karregenan kullanarak papaya meyvesinin (Hamzah ve ark., 2013) ve sodyum aljinat kullanarak havuçların (Mastromatteo ve ark., 2012) kaplandığı çalışmalar vardır.

Yayma yada fırçalama metodunda, fırça yada spatula gibi malzemeler kullanılarak kaplama gıdanın üzerine doğrudan yada paketleme malzemesinin üzerine uygulanır (Tahir ve ark., 2019). Kaplamayı yaymak üzere kullanılan ekipmanın gıdalar ile sürekli temasını gerektirdiği için kontaminasyon riski vardır.

## **2.5. Yenilebilir Filmlerin ve Kaplamaların Bileşimsel Özelliklerinin Probiyotik Mikroorganizmaların Biyolojik Aktivitesi Üzerine Etkileri**

Probiyotik mikroorganizmalar yaşayan canlılar olmaları sebebiyle çevresel faktörlerden etkilenmektedirler. Bu sebeple yenilebilir film ve kaplamaların bileşimleri uygulamada büyük önem kazanmaktadır.

Probiyotik tanımına daha önceki kısımlarda yer verilmiştir. Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak tanımlanabilmesi için FAO ve WHO tarafından oluşturulan Konsültasyon şu kriterleri sağlaması gerektiğini deklare etmiştir. Gıdalarda kullanım için probiyotik mikroorganizmalar sindirim sistemini sadece canlı geçmekle kalmayıp aynı zamanda bağırsakta çoğalmalıdır. Bu mide özsuyuna dirençli olmaları ve bağırsaktaki şartlarda safra içerisinde çoğalabilmelerini gerektirir ya da mideyi geçerken safra ile temasında canlı kalmasına yardımcı olacak bir gıda vasıtasıyla tüketilmelidirler. Bunlar Gram pozitif bakteriler olup başlıca iki sınıfa aittir Laktobasilluslar ve Bifidobakteriler (Holzapfel ve ark., 1998).

Probiyotik mikroorganizmaların biyokatifliği üzerine film ya da kaplama malzemelerinin etkisi üzerine çalışmalardan biri olan Kanmani ve Lim (2013) çalışmasında saf pullulan, saf nişasta (patates, tapyoka ve mısır) ve mutelif oranlarda pullulan+nişasta bazlı filmlere *Lactobacillus plantarum* GG ATCC 53103, *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 ve *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 ilavesi yapılmış ve filmlerin özellikleri ile 25°C ve 4°C'deki depolamalarda probiyotiklerin canlılıkları izlenmiştir. Çalışmanın sonucunda oda sıcaklığında en yüksek canlılığın saf pullulan filmlerde olduğu, saf nişasta filmler hariç diğer tüm filmlerde hücre canlılığının 20 güne kadar korunduğu, 10 gün sonunda en yüksek canlılığın saf pullulan filmlerde olduğu, bunda sonra hızla düştüğü, nişasta ilavesinin hücre

canlılığını düşürdüğü rapor edilmiştir. Buna karşılık 4°C’de 20 güne kadar probiyotik hücrelerin daha stabil olduğu; saf pullulan ve eşit miktarda pullulan ve patates nişastası içeren filmlerin %80’nin üzerinde bağıl hücre canlılığı gösterdiği; patates nişastasının nişastalar arasında en yüksek canlılığı gösterdiği; 30 günlük soğukta muhafazadan sonra bile saf pullulan ve eşit pullulan/nişasta karışımının %80’nin üzerinde hücre canlılığı gösterdiği raporlanmıştır.

Bir diğer çalışmada Romano ve ark. (2014), metilselüloz filmlere *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 ve *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 yüklemiş ve fizikokimyasal özellikleri ile, fruktooligosakkaritlerin (FOS) ilavesinin probiyotik canlılığı üzerine etkileri incelenmiştir. Probiyotikleri yükleme sırasında osmatik basıncın etkisi açısından FOS’lar olmasa da her iki türde de herhangi bir canlılık kaybı yaşanmadığı, ancak kurutma fırınında FOS’lar ilave edilmediğinde *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 canlılığında belirgin bir düşüş yaşandığı, %3’e kadar FOS ilavesinin canlılığı olumlu etkilediği %5’e kadar olan daha yüksek konsantrasyonlarda daha yüksek bir etkinin olmadığı, *L. plantarum* CIDCA 83114’ün kurutmaya karşı direnç gösterdiği ve %5’e kadar FOS ilavesinin canlılığı değiştirmedeğini raporlamışlardır.

Pullulan ve fruktooligosakkaritlerin prebiyotikler olarak kabul gördüğü düşünüldüğünde probiyotiklerin seçici olarak kullandığı prebiyotik varlığının canlılığa destek olması sonucu şaşırtıcı değildir.

Biopolimerlerin türlerinin probiyotiklerin canlılığına etkileri üzerine yapılan araştırmada; Sánchez-González ve ark. (2013) sodyum kazeinat, bezelye proteini, metilselüloz ve hidroksipropilmetilselüloz (HPMC) biyopolimerlerini test etmiştir. Filmlere *Lactobacillus plantarum* inoküle edilmiş, 25°C ve 37°C’de kurutma işlemlerinden sonra filmler ile kaplanmış soğuk zincir ürünlerinin (peynir ve et ürünleri gibi) saklama koşulları olan 5°C ısı ve %75 bağıl nemde 30 gün süre ile bekletilmiştir. Hem kurutma işlem sıcaklıklarının hem de depolama sırasında probiyotik canlılığı ölçülmüştür. Sonuç olarak kurutma işlem sıcaklığının doğrudan bir etkisi gözlemlenmemiş, ancak her iki sıcaklıkta da HPCM filmlerinde yaşam oranını

daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Depolama boyunca ve sonunda yapılan testlerde sodyum kazeinat filminin %90 canlılık ile en yüksek canlılığı sağladığı, arkasından bezelye proteinin, daha sonra metilselüloz ve en son hidroksipropilmetilselüloz geldiği ve 30 gün sonunda HPCM’de hiç canlı probiyotik kalmadığı tespit edilmiştir.

Soukoulis ve ark. (2014b) yaptıkları bir çalışmada *Lactobacillus rhamnosus* GG’nin canlılığı üzerine sodyum aljinat ve peynir altı suyu proteininin etkilerinin incelemek üzere ön pişirme uygulanmış ekmekleri probiyotik filmlerle kaplamışlardır. Pişirme işleminden 2 saat sonra başlamak üzere 7 günlük depolama süreci gözlemlenmiştir. Çalışma sonucunda kurutma işleminde bakteriler üzerine sadece film kompozisyonunun etkili olduğu tespit edilmiş, sodyum aljinatlı filmlerde daha düşük canlılık olduğunu tespit etmişlerdir.

Soukoulis ve ark. (2016) yaptıkları ikinci bir çalışmada yine *Lactobacillus rhamnosus* GG suşunu kullanmışlardır. Fakat bu sefer film hammaddesi olarak pirinç ve mısır nişastasını baz alarak içerisine jelatin, sodyum kazeinat yada soya proteini izolatu ilave ederek oluşturulan filmlerde, canlılığın tüm filmlerde kurutma sırasında protein içeren filmlerde canlılık düşüşünün daha az olduğunu raporlamışlardır. 4 °C depolama sırasında da nişasta içeren filmler stabiliteyi desteklemiştir. Oda sıcaklığında depolamada belirgin farklar gözlemlenmemiştir. Protein filmler karşılaştırıldığında sodyum kazeinatın daha yüksek canlılığı desteklediği bunu jelatin ve soya proteini izolatının takip ettiği raporlanmıştır.

Soukoulis ve ark. (2017) yaptığı üçüncü çalışmada *Lactobacillus rhamnosus* GG canlılığına biyopolimerlerin etkisini ölçmek üzere bu kez, probiyotik ilave edilmiş düşük ve yüksek viskoziteli sodyum aljinat, düşük esterleşmiş amidli pektin, kappa-karegenan/keçiboynuzu gamı, ve jelatin filmleri peynir altı suyu proteini varlığında ve yokluğunda test etmişlerdir. Kurutma sırasında polisakkarit filmlerde protein içeren filmlere oranla daha yüksek hücre ölümü olduğu bildirilmiştir. Peynir altı suyu proteinin ilavesi ise canlılığı arttırmıştır. Depolama sırasındaki gözlemlerde protein ilavesinin canlılık üstüne belirgin etkisi olduğu gözlemlenmiştir. 25°C ve 4°C’de depolamada bakterinin stabilitesinin şu sırayla olduğu raporlanmıştır; kappa-

karregen/keçiboynuzu gamı > yüksel viskoziteli sodyum aljinat > jelatin > düşük viskoziteli sodyum aljinat = düşük esterleşmiş amidli pektin.

Ebrahimi ve ark. (2017) çalışmasında *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* ve *Bifidobacterium bifidum* türlerini karboksimetilselüloz filmler immobilize etmiş ve 42 günlük 25°C ve 4°C’de canlılıkları ölçülmüştür. Kurutma işleminde hiç bir türde belirgin bir fark gözlemlenmemiş, oda sıcaklığında 14 günlük depolama sonrasında 10<sup>9</sup> KOB/g olan başlangıç probiyotik sayısının düştüğü, en belirgin düşüşün *L. rhamnosus* sayısında olduğu belirlenmiştir. 4°C depolamada *L. acidophilus* ve *L. rhamnosus*’un en yüksek canlılığı gösterdiği ve probiyotik etki için bulunması gereken 10<sup>6</sup> KOB/g değerinin üzerinde olduğu raporlanmıştır. En yüksek canlılığın da *L. acidophilus*’da olduğu rapor edilmiştir. En düşük canlılık ise *Bifidobacterium bifidum*’da tespit edilmiştir.

Settier-Ramírez ve ark. (2019) bu kez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*’in sade polivinilalkol (PVOH), ya da PVOH’a jelatin, kazein hidrolizatı ve maya ekstraktı ilavesiyle oluşturulan filmlerde bakteri canlılığını ölçmüşlerdir. Protein veya protein hidrolizatı varlığında daha yüksek canlılık olduğu raporlanmıştır.

Ürün uygulamalı denemelerde ise *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361 inulin ve oligosakkarit ile zenginleştirilmiş sodyum aljinat filmleri ile taze yabancınları kaplanmıştır. Prebiyotik ilaveli filmlerde başlangıç işlemlerinde canlılık açısından belirgin bir fark gözlemlenmemiştir. Depolamanın sonuna doğru prebiyotik ilaveli filmlerde daha yüksek probiyotik canlılığı gözlemlenmiştir (Bambace ve ark., 2019).

Bir başka çalışmada Khodaei ve Hamidi-Efsani (2019), taze çilekleri değişik oranlarda *Lactobacillus plantarum* ilave edilmiş karboksimetilselüloz ile kaplamışlardır. Raf ömrü boyunca probiyotiklerin canlılıklarını devam ettirdiği, inoküle edilen probiyotik sayısı attıkça canlılığın daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Karboksimetilselülözün çileklere *Lactobacillus plantarum* ilavesi için uygun bir kaplama malzemesi olduğu değerlendirilmiştir.

Yukarıda açıklanan çalışmalar ışığında film bileşimlerine prebiyotik ilavesinin tüm probiyotik çeşitlerinde canlılık açısından olumlu etkileri olduğu, aynı şekilde aynı grup filmler düşünüldüğünde protein ilavesinin de olumlu etkiler gösterdiği, ürün grup ve saklama koşullarına göre film biyopolimer bileşenlerinin değerlendirmeye açık etkileri olduğu sonucuna varılabilir.

## **2.6. Probiyotik Mikroorganizma İlavesinin Yenilebilir Filmlerin ve Kaplamaların Kalite, Mekaniksel ve Bariyer Özellikleri Üzerine Etkileri**

Probiyotik filmlerin kompozit yapılar olduğu düşünüldüğünde hem canlı matrisin hem de taşıyıcı matrisin birbirleri üzerine etkileri kaçınılmazdır. Yukarıda bahsi geçen çalışmalarda probiyotik canlılıkları araştırılmışken aşağıda irdelen çalışmalarda ise taşıyıcı filmin özellikleri üzerine probiyotiklerin etkileri değerlendirilmiştir.

Bir önceki bölümde değinilen Kanmani ve Lim (2013) çalışmasında saf pullulan, saf nişasta (patates, tapyoka ve mısır) ve mutelif oranlarda pullulan+nişasta bazlı filmlere *Lactobacillus plantarum* GG ATCC 53103, *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 ve *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 ilavesi yapılmış ve filmlerin özellikleri ile 25°C ve 4°C'deki depolamalarda probiyotik canlılığının incelediği belirtilmiştir. Çalışmanın probiyotiklerin filmler üzerine etkileri değerlendirildiğinde 25°C'de probiyotiklerin tüm filmlerde viskoziteyi ve pH'yı düşürdüğü tespit edilmiştir. Burada pH düşüşünün viskozite düşüşünü doğrudan etkilediğinin düşünüldüğü değerlendirilmiştir. Probiyotik ilavesi filmin opaklığını arttırmış, kalınlıklar ise farklılıklar göstermiştir. Suda çözünürlük üzerine bakterilerin herhangi bir etkisi tespit edilmemiştir. Pullulan filmlere probiyotik ilavesinin su buharı geçirgenliğini belirgin biçimde düşürdüğü, nişasta içeren filmlerde ise bu azalışın düşük olduğu belirlenmiştir. Polimer filmlerin mekanik özellikleri çekme mukavemeti (Tensile Strength, TS) ve Kopma Uzaması (Elongation at Break, EAB) ile ölçülmüştür. TS filmi uzatırken uygulanan en yüksek kuvveti, EAB ise kopma noktasına kadar geçen sürede filmin uzunluğundaki artmayı temsil eder. Saf pullulan filmlerin en yüksek çekme mukavemeti olduğu, bunlara probiyotik ilavesinin çekme mukavemetinde belirgin bir azalmaya sebep olduğu ve bunun da Giamalas ve ark. (2010) sodyum kazeinat filmler

bakteri ilavesinin mekanik özellikleri etkilemediğine dair sonuçlarıyla tezat oluşturduğu raporlanmıştır. Nişasta içeren pullulan filmler probiyotik hücre varlığından görece daha az etkilenmiş oluğu belirtilmiştir. Bunun nişasta varlığında hücrelerle daha interaktif olması sebebiyle olabileceği ve bakteri hücrelerinin stabilitesini destekleyebileceği öne sürülmüştür. Pullulan/tapyoka (25:75) ve pullulan/mısır (25:75) karışım filmlerin daha yüksek gerilim direnci gösterdiği raporlanmıştır. Nişasta içeren filmlere oranla saf pullulan filmlerinin probiyotik ilavesi olsun ya da olmasın daha yüksek kopma uzaması değeri gösterdiği, bunun da nişastanın filmlerin esnekliğini azalttığını gösterdiği belirtilmiştir.

Shahrampour ve ark. (2020) yaptığı çalışmada film çözeltilisine bakteri (*Lactobacillus plantarum* KMC 45) ilavesinin film kalınlığını arttırdığı, filmlerin su aktivitesininin probiyotikler ile değişmediği, probiyotik hücre sayısı arttıkça bakteriler ve polimerlerin interreaksiyonu sonucu filmlerdeki hidrofilik maddelerin ve dolayısıyla nem içeriğinin azaldığı, kimyasal bileşimler değişmediği için filmlerin çözünürlüklerinin probiyotikler ile değişmediğini, bakteri hücreleri ile film oluşturma ajanı arasındaki hidrojen bağları sebebi ile hücreler arası boşlukların azalarak bariyer özelliklerinin iyileştiğini, mekanik özelliklerinde yine iyileştiğini raporlamıştır.

## **2.7. Gıda Endüstrisinde Probiyotik ve Simbiyotik Yenilebilir Film Kaplama Uygulamaları**

### **2.7.1. Taze ve Minimum Düzeyde İşlenmiş Meyve ve Sebzeler**

Yenilebilir film ve kaplamaların en yaygın kullanıldığı alanların başında taze ve minimum işlenmiş meyveler gelmektedir. Bunun bir sebebi uygulamanın kolaylığı ve uzun süre depolamada bu tarz kaplamalarla taze meyve ve sebzede vitamin mineral gibi besin değerlerinin korunmasıdır. Pektin ve pektin türevleri endüstride elma, kayısı, avokado, üzüksü meyveler, guava, kestane, kavun, şeftali, ceviz, papaya, domates ve havuçların paketlenmesinde kullanılmaya başlamıştır (Valdés ve ark., 2015).

Yenilebilir kaplamalara probiyotik kültürlerin ilavesi ilk olarak Tapia ve ark. (2007)

tarafından ortaya atılmıştır. Çalışmada bifidobakteriler ilave edilmiş, %0,6'dan %2'ye kadar gliserol, %1 N-asetilsistein ve/veya %1 askorbik asit içeren aljinat (%2) ya da gellan (%5) yenilebilir filmleri formüle edilmiş ve taze kesilmiş elma ve papaya silindirlerinin kaplanması için kullanılmıştır. 10 günlük soğukta depolama sırasında  $10^6$  KOB/g'dan daha fazla *B. lactis* Bb-12 değerinin sağlandığı tespit edilmiştir.

Moayednia ve ark. (2010) %2 (w/v) sodyum aljinat çözeltisi kullanarak *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium lactis* kalsiyum aljinat filmlerinde immobilize edilerek çilekler kaplanmıştır. *Lactobacillus acidophilus* 'un canlılığının daha yüksek olduğunu tespit etmiştir.

Bambace ve ark. (2019) yılında probiyotik olarak *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361, prebiyotik olarak inülin ve oligofruktoz ilave ettiği simbiyotik aljinat filmlerle taze yabanmersinlerinin başarılı bir biçimde kaplamıştır.

### 2.7.2. Süt Ürünleri

Süt ve süt ürünleri günlük beslenmenin vazgeçilmez bir parçasıdır. Peynirler süt ürünlerinin pek çok çeşidini içeren geniş bir grubudur. Peynirin raf ömrü yüzeyinde gelişen mantar ve bakteriler sebebiyle limitlidir ve bu kalite kayıplarına yol açabilir. Peynirlerin yüzeyine uygulanabilecek antimikrobiyal kaplamalar üretim ve depolama sırasında oluşabilecek olumsuz değişikliklerin önüne geçecek bir yöntem olabilir (Galus ve Kadzińska, 2015).

Ramos ve ark. (2012) peynirler yaptıkları bir çalışmada peynir altı suyu proteini izolatu, gliserol, guar gam, ayçiçek yağı ve Tween 20'yi baz matris olarak kullanmış ve antimikrobiyal bileşenler olarak çeşitli oranlarda natamisin + laktik asit, natimisin + kitooligosakkarit, natamisin, laktik asit ve kitooligosakkarit ilave ederek filmler oluşturmuşlardır. 60 gün boyunca depolamada filmlerin peynir kalitesi üzerine etkileri incelenmiş ve ticari kapamalar ile karşılaştırma yapmışlardır. Patojen gelişimini engellemede yenilebilir filmlerin daha başarılı olduğu ve duyuşal özellikleri belirgin şekilde etkilemediği raporlanmıştır.

### 2.7.3. Et Ürünleri

Hayvanların bağırsağından yapılan doğal kollajen kılıflar yenilebilir protein kaplama malzemelerinin en eskilerinden birini oluşturmaktadır. Yenilebilir kollajen filmler ile yapılan çalışmalar nem kaybını önleme, lipid oksidasyonunu en aza indirme, renk kaybını önleme ve kaslı gıdaların damlamasını azaltmada potansiyellerini göstermiştir (Pandhi ve ark., 2019).

Probiyotik yenilebilir film kaplamaların ise hala araştırılmaya ihtiyacı vardır. Bununla ilgili bir çalışmada dilimlenmiş jambon dilimleri kaplamak üzere sodyum aljinat filmler 3 çeşit probiyotik bakteri için taşıyıcı film olarak kullanılmıştır. Jambon dilimlerinin bazılarına Yüksek Basınç İşlemi (HPP) uygulanmış, bazılarına uygulanmamış ve örnekler 4, 8 ve 12 °C'de 66 güne kadar vakum depolama sonunda incelenmiştir. Yüksek basınç işlemi uygulanmamış örneklerde tüm sıcaklıklarda probiyotik sayısı  $10^6$  KOB/g'in üzerinde bulunmuştur. İşlem uygulanmamış örneklerde benzer sonuçlar göstermiş ancak daha pH bu örneklerde daha yüksek ölçülmüştür. HPP uygulamamış probiyotik örnekler daha asidik bir tat ve koku göstermiştir. HPP uygulanmış ürünlerde ise bu parametreler ümit vaat etmektedir. HPP işleminden bağımsız olarak yenilebilir filmlerle ürünlere probiyotiklerin taşınabilmiş olması sebebiyle sonuçlar umut vaat etmektedir (Pavli ve ark., 2018).

Taze et ile yapılan farklı bir çalışmada sodyum kazeinat filmlere *Lactobacillus casei* doğrudan film solüsyonuna ilave edilerek ya da önceden oluşturulmuş film yüzeylerine püskürtme yöntemi ile ilave edilmiştir. Sonuç olarak, populasyon yoğunluğu  $10^6$  KOB/cm<sup>2</sup> olan filmler elde edilmiştir. 30 günlük soğukta ve oda sıcaklığında depolamada sorbitol ilavesinin %90'nın üzerinde bir canlılık artışına sebep olduğu tespit edilmiştir. *Listeria monocytogenes* inoküle edilmiş filmler ve taze et üzerine uygulanmasıyla, nemli yüzey ve gıda ile temas sebebiyle filmlerde immobilize *L. casei* hızlıca çoğalmış ve patojenin gelişimini inhibe etmeyi başarmıştır (Giamalas ve ark., 2010).

Yenilebilir jelatin film ve kaplamalara *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium*

*bifidum* ilavesi ile balıkların kaplandığı bir çalışmada jelatinin bazı gıdalarda laktik asit bakterileri ilavesi için uygun bir matris olduğu tespit edilmiştir (López de Lacey ve ark., 2012).

Bir başka çalışmada 15 günlük depolama süresinde, agar içerisine yeşil çay ekstarktı ve *Lactobacillus paracasei* L26 ve *Bifidobacterium lactis* B94 probiyotik türleri ilavesi ile elde edilmiş filmin barlam balığı filetoları üzerine etkisi incelenmiştir. Sonuç olarak yeşil çay ve probiyotikli agar filmlerin raf ömrünü en az bir hafta uzattığını ve balıktaki faydalı laktik asit bakterilerini artırdığını tespit etmişlerdir (López de Lacey ve ark., 2014).

#### **2.7.4. Orta ve Düşük Nemli Gıdalar**

Orta ve düşük nemi gıdalarda probiyotik film uygulamaları gıdanın yapısı gereği ortamda yeteri kadar su bulunmaması sebebiyle ve bu ürünlere uygulanan sıcaklık uygulamaları sebebiyle zorluklar içermektedir.

Daha önceden de bahsedilmiş olan Pereira ve ark.'nın (2019) inulin ve fruktooligosakkaritleri ilavesiye *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 içeren peynir altı suyu proteini ve aljinat filmlerle yaptıkları çalışmada tahıl çubukları kaplanmıştır. Bu çalışmada, hem depolama sırasında hem de *in vitro* gastrointestinal sindirimde, protein filmlerinin ilave probiyotik seviyesini aljinat fimlere göre daha iyi koruduğu gösterilmiştir. Depolama sırasında ürünlerin nem içeriği, renk ve tekstür gibi fizikokimyasal özellikleri değişmemiştir. Duyusal analizlerde kaplamalı barlar kaplamasız olanlar kadar kabul görmüştür. Dahası tüketiciler peynir altı suyu proteini kaplı barların koku ve tat özelliklerinin aljinat kaplılara göre daha çok beğenmişlerdir.

Ekmeklerle yapılan bir diğer çalışmada ekmek örnekleri *Lactobacillus acidophilus* ile zenginleştirilmiş nişasta filmlere karboksimetilselülöz, pektin, inülin, agar, karboksimetil selüloz ilave ederek elde edilen simbiyotik fimler ile kaplanmıştır (Zoghi ve ark., 2020). 24 saatlik raf ömründe ürünün mekanik direncinde azalma olduğu, su aktivitesi ve nem değerlerinde, tat ve tekstürde değişim olmadığı,

probiyotik seviyelerinde belirgin bir azalma olmadığı raporlanmıştır.

Soukoulis ve ark. (2014b) tava ekmeği ile yaptığı çalışmada, ekmekler sadece sodyum aljinat veya peynir altı suyu proteini veya bunların mutelif oranlarda karışımlarıyla hazırlanmış film solüsyonlarına *Lactobacillus rhamnosus* GG ilave edilmiş filmlerle kaplanarak probiyotik ekmekler hazırlanmıştır. Bu ekmeklere iki çeşit film uygulamasıyla denemeler yapılmıştır. İlk uygulamada pişmiş ekmeklerin üzerine 1 gr kadar probiyotik solüsyon fırça yardımı ile sürülmüş ve 60°C’de 10 dakika hava sirkülasyonu kurutucuda kurutulmuştur. İkinci uygulamada pişirme fırınında 180°C’de 2 dakika sıcaklık ile film oluşturulmuştur. Kontrol ve probiyotik ekmeklerin görsellerinde bir fark gözlemlenmemiştir. Aljinat-peynir altı suyu proteini kombinasyonu filmlerde daha kalın film oluştuğu, peynir altı suyu proteini varlığında kurutma aşamasında ve depolamada *L. rhamnosus* GG canlılığının daha yüksek olduğu, simule edilmiş bağırsakta ise sodyum aljinat içeren filmlerin *L. rhamnosus* GG canlılığını daha çok desteklediği, yapılan hesaplamalar ile 30-40 g’lık ekmek dilimlerin Dünya Sağlık Örgütü’nün tavsiye ettiği probiyotik tüketim miktarını karşıladığı tespit edilmiştir.

## 2.8. Yenilebilir Ambalajların İşlevselleştirilmesinde Gelecek Perspektifleri

Yenilebilir filmler gelecek için ümit vaad eden uygulamalardır. Ancak incelenen araştırmalardan da görüldüğü üzere birçoğu henüz laboratuvar ölçeğinde üretime konudur.

Probiyotik film kaplamalar ise hala gelişmekte olan bu alanın hala araştırılması gereken bölümüdür. Plastikleştiricilerin ilavesi çalışmaları ile filmlerin esnekliği, bariyer kuvveti nasıl ki artırılıp yeni araştırmalara öncülük ettiyse, probiyotik ilavesi ile bariyer özellikleri geliştirilmiş filmlerin ürünlerin raf ömürlerini artırıp patojenlere karşı korunurken, tüketiciye fayda sağlamasıyla multifonksiyonel yenilikçi ürünlerin tasarımı mümkün olacaktır.

Gıda kaynaklarının gittikçe tükendiği düşünüldüğünde elimizdeki kaynakların israf

edilmeden kullanılmasının önemi her geçen gün artmaktadır. Bunun yanında tüketicilerin artan sağlıklı gıda talebi probiyotik film kaplamaların gelecekte popülerliğinin daha da artacağını işaret etmektedir.



## **BÖLÜM 3. MATERYAL ve YÖNTEM**

### **3.1. Materyal**

Çalışmada probiyotik bakteri suşu olarak, Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonunda yer alan *Bifidobacterium animalis ssp lactis* B94 ve *Lactobacillus rhamnosus* GG kullanılmıştır. Ayrıca kefir mayası da (*L. kefir*, *L. delburueckii ssp. bulgaricus*, *Str. thermophilus*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. berevis*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *Kluyveromyces sp.*, *Saccharomyces sp.*) probiyotik karışık kültür olarak kullanılmıştır. Kefir mayası Doğadan Bizim Gıda'dan (İstanbul, Türkiye) temin edilmiştir.

Test mikroorganizmaları Gram pozitif (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) ve Gram negatif bakteri (*Escherichia coli* Type 1, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028) suşları Giresun Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Kültürlerin 0,5 McFarland skalası esas alınarak mililitresinde  $1,5 \times 10^6$  KOB/mL hücre olacak şekilde bakteri stok solüsyonları hazırlanmıştır.

Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik sınıftadır ve Merck Chemical Co. (Darmstadt, Almanya) ve Sigma-Aldrich Co.'dan (St. Louis, MO, ABD) satın alınmıştır.

### **3.2. Probiyotik Mikroorganizma İçeren Sodyum Aljinat Filmlerin Hazırlanması**

Probiyotik mikroorganizma içeren sodyum aljinat filmlerin hazırlanmasında Sánchez-González ve ark. (2013) tarafından kullanılan yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Filmlerin üretiminde 2 gr toz halde sodyum aljinat (SA; Sigma Aldrich) 100 mL saf su

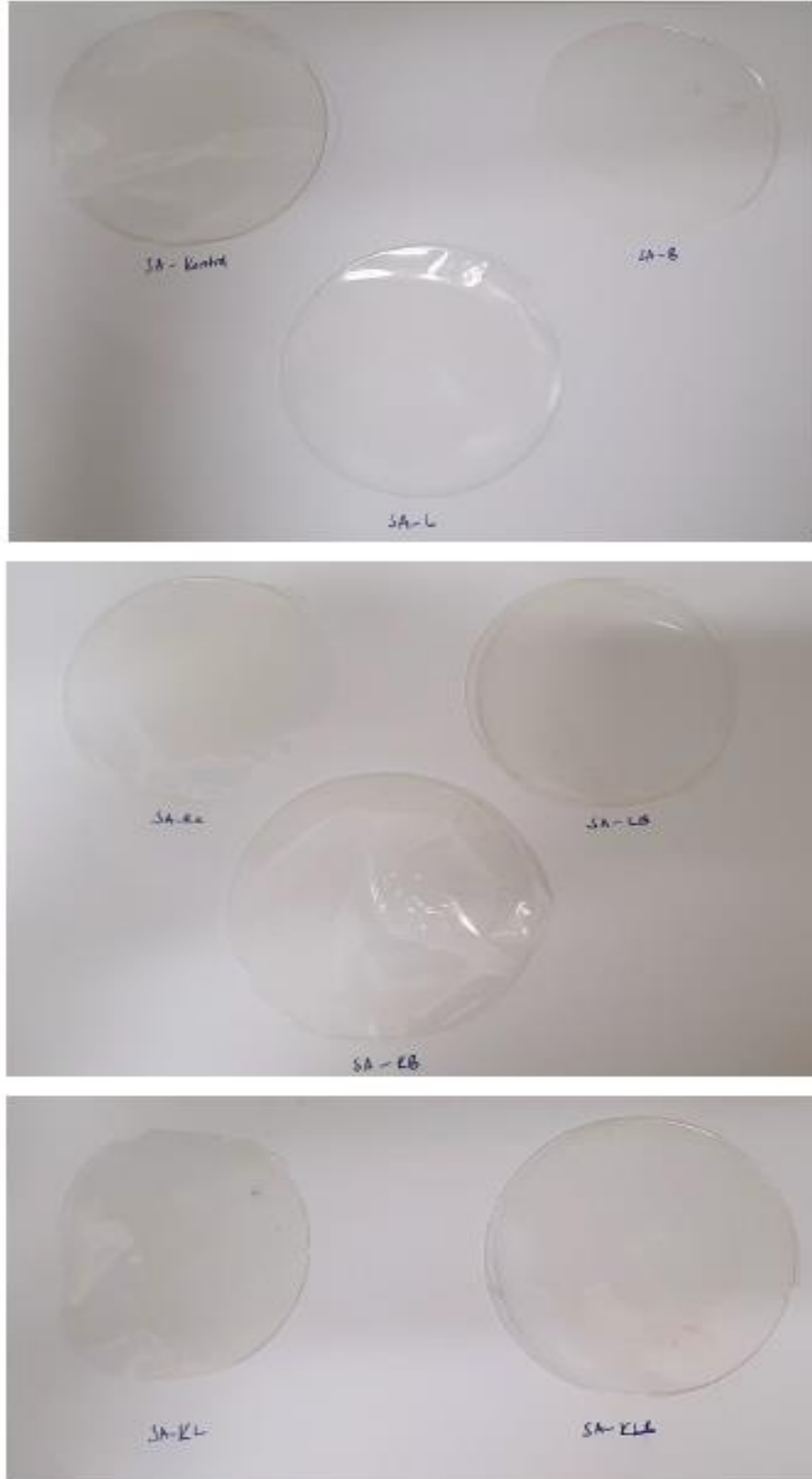
içerisine ilave edilerek, ısıtıcılı manyetik karıştırıcı yardımıyla 45 °C'de 30 dakika boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra plastikleştirici olarak gliserol (%20, v/v; Merck, Almanya) ilavesi ile birlikte 45 °C'de 15 dakika boyunca ısıtılmaya devam edilmiştir. Film formülasyonlarına ilave edilecek olan probiyotik mikroorganizmaları içeren 1 g ticari preparasyon 10 mL MRS Broth (Merck, Almanya) aktarılarak mikrobiyal kültür 37°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda gelişen kültür ortamından 100 µL'lik bir kısım tekrar 10 mL MRS Broth (Merck, Almanya) içerisine ilave edilmiş ve kültürler tekrar 37°C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gelişen kültürler, 6000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek toplanmış ve iki kez steril fosfat tamponu (pH: 6,88; Merck, Almanya) ile yıkanmıştır. Probiyotik mikroorganizmalar kuru filmde 8 log KOB/cm<sup>2</sup>'lik bir nihai konsantrasyon elde etmek amacıyla hazırlanan film formülasyonuna 1 mL olarak ilave edilmiştir. İlave sonrası aktif film çözeltileri 5 dakika boyunca manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırılmaya devam edilmiştir. Karıştırma sonrası, aktif film çözeltileri 12,5 mL olarak steril cam petri kaplarına (9,5 cm çapında) ilave edilerek, petri kapları 37 °C'de 12 saat boyunca kurutmaya tabi tutulmuş ve filmlerin eldesi gerçekleştirilmiştir. Filmler, sonraki analizler için 48 saat boyunca 25 °C ve %50±4 RH'de bir desikatör içerisinde saklanmıştır. Aktif sodyum aljinat (SA) filmlerin hazırlanmasında kullanılan formülasyonlar ve filmlerin isimlendirilmeleri Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Aktif sodyum aljinat film formülasyonları

Örnek Kodu*	Probiyotik kefir		
	kültürü (kob/g film)	<i>B. lactis</i> (kob/g film)	<i>L. rhamnosus</i> (kob/g film)
Kontrol film (SA-C)	-	-	-
SA-K	10 <sup>8</sup>	-	-
SA-B	-	10 <sup>8</sup>	-
SA-L	-	-	10 <sup>8</sup>
SA-KBL	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>
SA-KB	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	-
SA-KL	10 <sup>8</sup>	-	10 <sup>8</sup>
SA-BL	-	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>

\*SA-C: Probiyotik mikroorganizma içermeyen kontrol sodyum aljinat film örnekleri; SA-K: Kefir kültürü ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-B: *B. lactis* kültürü ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-L: *L. rhamnosus* kültürü ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-KLB: Kefir, *B. lactis* ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-KB: Kefir ve *B. lactis* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-KL: Kefir ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-BL: *B. lactis* ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri

Üretimi yapılan aktif sodyum aljinat filmler Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Probiyotik mikroorganizma ilave edilmiş sodyum aljinat film örnekleri

### 3.3. Aktif Film Örneklerinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

#### 3.3.1. Kalınlık Ölçümleri

Filmlerin kalınlığını belirlemek için, her bir filmin altı farklı rastgele noktasından 0,001 mm'lik hassas bir mikrometre ölçüm yapılmış ve ardından ortalamaları hesaplanmıştır. Ortalama film kalınlıkları, filmlerin su buharı geçirgenliği (WVP) ve çekme mukavemetini belirlemek için kullanılmıştır (Zamahay, 2022).

#### 3.3.2. Nem İçeriği ve Kuru Madde Yoğunluklarının Belirlenmesi

Filmlerin nem içeriğinin belirlenmesinde Bakry ve ark. (2017) yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu yöntemde göre, kesilen film örneklerinin 2 x 2 cm'lik parçaları tartılmış ve sabit bir ağırlığa ulaşana kadar 105 °C'de kurutulmuştur. Daha sonra filmin nem içeriği, ilk ve son ağırlık farkına göre belirlenmiştir (Denklem 3.1);

$$SA (\%) = \left[ \frac{m_1 - m_2}{m_1} \right] \times 100 \quad (3.1)$$

Denklemde SA film numunelerinin % nem içeriğini, m1 film örneklerinin ilk ağırlıklarını, m2 ise film örneklerinin kurutma sonrası son ağırlıklarını ifade etmektedir.

Film yoğunluklarının hesaplanmasında, doğrudan film ağırlıkları ve boyutlarından yararlanılmaktadır. Hesaplamada, aşağıda gösterilen denklem (3.2) kullanılmıştır (Ramos ve ark, 2012b).

$$\rho_s = m / (A \times \gamma) \quad (3.2)$$

$\rho_s$ : Kuru madde yoğunluğu (g.cm<sup>-3</sup>)      m: Kuru kütle ağırlığı (g)

A: Film yüzey alanı (cm<sup>2</sup>)       $\gamma$ : Film kalınlığı (cm)

#### 3.3.3. Temas Açısı Ölçümleri

Filmlerin yüzey ıslanabilirlik değerlerinin (hidrofiliklik/hidrofobiklik) özelliklerinin belirlenmesi amacıyla temas açısı ölçümleri yapılmıştır. Bu amaçla goniometer (Dataphysics OCA 15EC) kullanılarak, film yüzeyine bir damla sıvı bırakılarak sapsız damla tekniği ile test edilmiştir. 1 µL ultra saf sudan bir damla, bir mikro şırınga ile filmin yüzeyine dikkatlice yerleştirilmiş ve her film üzerinde 25 °C'de üç ölçüm yapılmıştır.

### 3.3.4. Su Buharı Geçirgenliğinin Belirlenmesi

Kontrol ve probiyotik mikroorganizmalarla zenginleştirilen sodyum aljinat filmlerin su buharı geçirgenlik değerleri (WVP), ASTM (2000; E 96-00) tarafından belirtilen standart yöntemle göre belirlenmiştir. Bu amaçla film örnekleri Delrin kaplarına yerleştirilmiş ve daha sonra kaplar 24 saat boyunca 25 °C'de distile su içeren desikatörde saklanmıştır. Tüplerin ağırlıkları 0, 4, 8, 12, 16, 20 ve 24. saatlerde belirlenmiş ve WVP değeri denklem (3.3) kullanılarak hesaplanmıştır;

$$WVP = \frac{w}{t} \times \frac{x}{\Delta P \times A} \quad (3.3)$$

Burada  $x$ ,  $\Delta P$  ve  $A$  sırasıyla ortalama film kalınlığı ( $\mu\text{m}$ ), 25 °C'de bağıl basınç farkı (kPa) ve film alanıdır.  $w/t$  ise sistem tarafından sabit durumda absorbe edilen suyun lineer regresyon kullanılarak belirlenmesiyle hesaplanmıştır.

## 3.4. Aktif Film Örneklerinin Fiziksel ve Yapısal Özelliklerinin Belirlenmesi

### 3.4.1. Renk Ölçümleri, Optik ve UV Bariyer Özellikleri

Her bir film örneğinin, beyaz standart yüzey üzerinde, Hunterlab kolorimetresi ile  $L^*$  (açıklık),  $a^*$  (kırmızı-yeşil) ve  $b^*$  (sarı-mavi) renk parametreleri ölçülmüştür. Filmlerin renk değişimleri ( $\Delta E^*$ ) ise, aşağıda verilen denklemden (3.4) yararlanılarak hesaplanmıştır. Her ölçüm 3 kez tekrarlanmış ve her tekrar için üç film numunesi kullanılmıştır (Zamahay, 2022).

$$\Delta E^* = [(L_o^* - L^*)^2 + (a_o^* - a^*)^2 + (b_o^* - b^*)^2]^{1/2} \quad (3.4)$$

Filmlerin optik ve UV bariyer özelliklerinin değerlendirilmesi için filmler dikdörtgenler halinde kesilmiş ve bir kuvars spektrofotometre hücresinin iç tarafına yerleştirilmiştir. Absorbans spektrumu (200-800 nm), Hach Lange GmbH spektrofotometre (Almanya) kullanılarak her numune için kaydedilmiştir. Filmlerin opaklığı (AU nm), Lopez ve Garcia (2012)'ya göre belirlenmiş, ışık geçirgenliği için standart test yöntemi (ASTM D1003-00) kullanılmıştır. Filmlerin şeffaflığı ise, 600 nm'de (A600) absorbans ile film kalınlığı arasındaki oran olarak hesaplanmış ve A600/mm olarak ifade edilmiştir.

#### **3.4.2. Çekme Dayanımı, Uzama Katsayısı ve Elastik Modülün Belirlenmesi (TS, E, YM)**

Filmlerin gerilme mukavemeti ve kopma uzaması (80x25 mm), 6 film örneğinin ölçüm ortalamaları alınarak, ASTM-D638'e göre TA-TX2 (Texture Expert Exceed 2.3, Stable Micro System, Survey, İngiltere) kullanılarak belirlenmiştir. Her film şeridi, pnömatik kollara (25 psi) yerleştirilmiş ve 1 mm/sn ile 100 mm kollar arasındaki bir başlangıç mesafesinde gerilmiştir (Kalkan ve ark., 2020).

#### **3.4.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İle Gözenek Yapılarının Belirlenmesi**

Yenilebilir aktif film örneklerinin morfolojisini gözlemek için taramalı elektron mikroskobu (Nova NanoSEM 200) kullanılmıştır. Tüm numuneler, numune başına en az altı mikrograf alınarak 10 kV'luk bir voltaj kullanılarak fotoğraflanmıştır (Zamahay, 2022). Daha sonra her numunenin tipik yüzey morfolojisini göstermek için temsili görüntüler seçilmiştir.

#### **3.4.4. Fourier Transform İnfrared (FTIR) Spektroskopi Analizi**

Filmlerin FTIR spektrumları, Jasco 6600 spektrometresi kullanılarak elde edilmiştir. Tarama 4000 cm<sup>-1</sup> aralığında ve 4 cm<sup>-1</sup> çözünürlüğünde gerçekleştirilmiştir. Her spektrum için 10 tarama yapılmış ve elde edilen spektrumlar, fonksiyonel grupların polimer-gliserol ve aktif bileşik arasındaki olası etkileşimlerini belirlemek için kullanılmıştır (Maizura ve ark., 2007).

#### **3.4.5. Termogravimetrik Analiz (TGA)**

Filmlerin termal özellikleri, Seteram Instrumentation Labsys Evo (Caluire, France) kullanılarak belirlenmiştir. Film örnekleri 10 mg tartılarak, alüminyum kaplarda hava geçirmez bir şekilde kaplanmış ve termo-oksidatif reaksiyonları önlemek için bir argon atmosferi altında 0 ile 790 °C arasında 10 °C dk<sup>-1</sup>'de ısıtılmıştır.

### **3.5. Filmlerin Biyoaktif Özellikleri**

#### **3.5.1. Film Formülasyon Çözeltileri ve Filmlerdeki Probiyotik Mikroorganizma Sayılarının Belirlenmesi**

Film formülasyon çözeltileri ve filmlerdeki probiyotiklerin sayımı, Ceylan ve Atasoy (2022) tarafından önerilen yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Bu yönteme göre, 1 mL film solüsyonu, steril 9 mL pepton su içinde aktarılmış ve ardından seyreltme serileri hazırlanmıştır. 1 gram film örneği, hidrasyona izin vermek için 37°C'de 99 mL MRD Broth (Merck, Almanya) içinde çözüldürülmüş ve daha sonra seri seyreltme serileri hazırlanmıştır. Uygun seyreltmelerin L-sistein-HCl ile desteklenmiş MRS Agar (Merck, Almanya) besiyerine ekimleri yapılarak, ekimi tamamlanan petri kutuları anaerobik koşullar altında 37°C'de 72 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Ayrıca, probiyotiklerin dehidrasyon sonrası filmlerde canlılığı belirlenmiş ve canlılık, aşağıdaki denklem (3.5) kullanılarak filmlerin kurutma işleminden sonra hesaplanmıştır.

$$\text{Canlılık (\%)} = N/No \times 100 \quad (3.5)$$

Denklem 3.5’de yer alan N ve N<sub>0</sub>, sırasıyla filmdeki kurutma işleminden sonra probiyotik organizmaların sayısı ve film formülasyon çözeltisindeki probiyotik organizmaların sayısıdır. Film formülasyon çözeltisi ve filmdeki toplam probiyotik sayısı, sırasıyla gravimetrik olarak hesaplanan film çözeltisi yoğunluğuna ve film kuru madde içeriğine dayalı olarak log KOB/g kuru madde olarak verilmiştir (Soukoulis ve ark., 2014b).

### 3.5.2. Filmlerin Antimikrobiyel Özelliklerinin Belirlenmesi

Hazırlanan aktif filmlerin seçilen patojen bakterilere (Gram pozitif (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) ve Gram negatif bakteri (*Escherichia coli* Type 1, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028)) karşı *in vitro* antimikrobiyal aktivitesi “Disk Difüzyon” yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Analiz için farklı bileşimlerde hazırlanan aktif filmlerden 6 mm çapında kesilen diskler kullanılmıştır. İlk olarak taze kültürden öze ile alınan mikroorganizmalar sıvı besi ortamında 10<sup>6</sup> KOB/mL mikroorganizma yoğunluğuna oluşana kadar inkübe edilmiş ve daha sonra MUELLER-HINTON Agar katı besi yüzeyine ekimi yapılmıştır. Son olarak aktif filmlerden kesilen diskler ekim yapılan petrilere yerleştirilerek petri kutuları 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda disklerin etrafında oluşan inhibisyon zon çapları (mm) olarak ölçülmüştür. Her analiz 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

### 3.5.3. Peynir Örneklerinin Aktif Filmler ile Kaplanması ve Mikrobiyel Raf Ömrü Analizleri

Taze blok tipi işlenmiş beyaz peynir örnekleri Trabzon ilinde (Türkiye) yerel bir fabrikadan temin edilmiştir. Beyaz peynir numuneleri 7x7x0,5 cm'lik parçalara dilimlenmiştir. Her dilim peynir, kontaminasyonu önlemek için steril kabin içerisinde hazırlanmış aktif filmler ile kaplanmıştır. Hazırlanan tüm örnekler esnek, düşük yoğunluklu polietilen film ile ambalajlanarak, ısıl kaplama makinesi ile kapatılmıştır. Örnekler, literatür ile uyumlu olarak buzdolabı sıcaklığında 45 gün süre ile depolanmış ve bu süre içerisinde 0, 15, 30 ve 45. günlerde analizleri yapılarak, aktif filmlerin

mikrobiyel raf ömrü üzerindeki etkileri belirlenmiştir (Ceylan ve Atasoy, 2022).

Aktif filmler ile kaplanmış beyaz peynir örneklerinin depolama boyunca mikrobiyolojik raf ömrünü belirlemek amacıyla, 10 gram peynir örneği steril 90 mL MRD besiyeri (Merck, Almanya) içerisinde 1 dakika boyunca stomacher kullanılarak homojenize edilmiştir. Ondalık seyreltmeler ile 9 mL'lik steril seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Peynir örneklerinin *Lactobacillus spp.* sayısının belirlenmesi için MRS Agar (Merck, Almanya) besiyeri kullanılarak ve ekim yapılan petri kutuları 37 °C'de 72 saat anaerobik olarak inkübe edilmiştir. Aktif film örnekleri ile kaplanmış peynir örneklerinin *Bifidobacterium lactis* içeriğinin belirlenmesi için %3 lityum klorür ve %2 sodyum propiyonat ile desteklenmiş MRS Agar (Merck, Almanya) besiyeri kullanılmış ve ekimleri tamamlanan petri kutuları 37 °C'de 48 saat anaerobik olarak inkübe edilmiştir. Örneklerin Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri sayımı PCA (Plate Count Agar; Merck, Almanya) besiyeri kullanılarak 30 °C'de 24 saat, psikrotrofik bakteri sayıları ise 5 °C'de 7 gün süreyle gerçekleştirilen inkübasyon sonucunda elde edilmiştir. Örneklerin Maya-Küf sayımları için PDA (Patato Dekstroz Agar; Merck, Almanya) besiyeri kullanılmış ve ekimi tamamlanan petri kutuları 25 °C'de 4 gün inkübe edilmiştir. Tüm mikrobiyolojik sayım sonuçları log KOB/g olarak hesaplanmıştır.

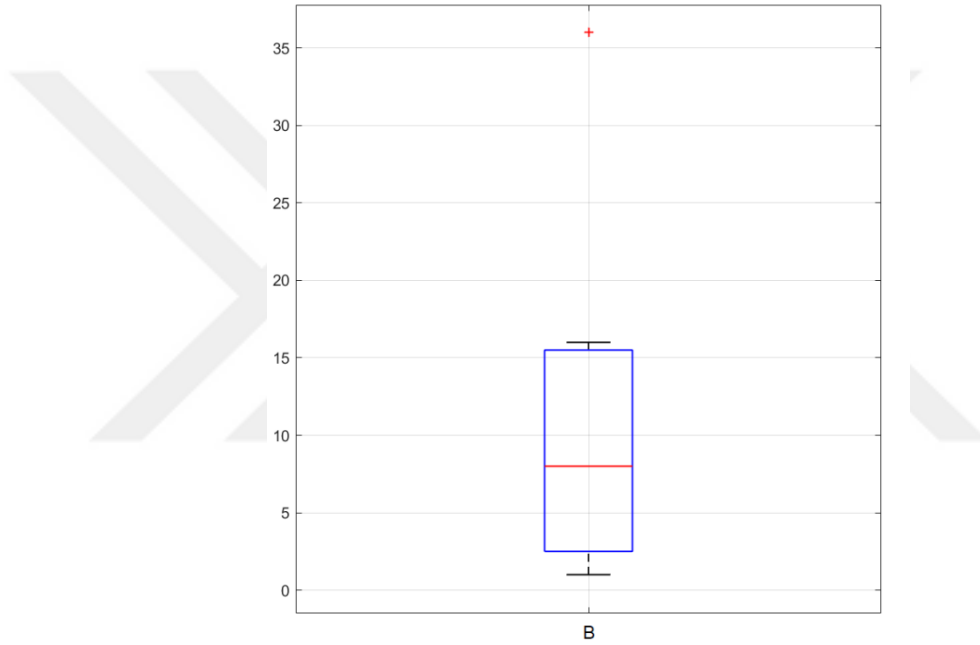
### **3.6. Veri Analizi Yöntemleri**

Çalışmada üretimi yapılan SA film türlerinin peynir örneklerinin mikrobiyel raf ömrü üzerine etkinliği, şekillerde öncelikle kutu grafiği (box-plot) ile gösterilmiş, sonra kaç sınıfa ayrıldığı aglomeratif (yığıcı) hiyerarşik kümeleme yöntemi ile belirlenerek sınıflar dendrogram grafiği (taksonomik ilişki ağacı) ile gösterilmiştir. Son olarak bu sınıfların ayrışma dereceleri silüet grafikleri ile açıklanmıştır.

#### **3.6.1. Kutu Grafiği**

Verileri görsel şekilde özetlemek için kullanılan bir istatistiksel betimleme grafiğidir. Veri dizisinin olasılık dağılımının tepeden göstermek için kullanılır. Grafikte veri

dizisinin ilk ve üçüncü çeyreği ile sınırlanmış bir kutu bulunur. Ortanca (medyan) değeri ise kutunun içinde çizgi şeklinde gösterilir. Kutunun dışındaki “T” şeklinde çizgiler de veri dizisinin %95 güven aralığındaki sınırları içindeki minimum ve maksimum sınırlarını gösterir. Bununla beraber, aykırı değerler (%95 güven aralığındaki sınırları) dışındaki değerler “+” işareti ile gösterilir. Şekil 3.2’de  $B=\{1, 2, 4, 8, 14, 16, 36\}$  veri dizisi için çizdirilmiş örnek bir kutu grafiği gösterilmiştir. Bu veri dizisinin ortancası 8; ilk çeyrekliği 2,5; üçüncü çeyrekliği 15,5; %95 güven aralığındaki sınırları içindeki minimum ve maksimum değeri ise 1 ve 16’dır.



Şekil 3.2. Örnek bir kutu grafiği

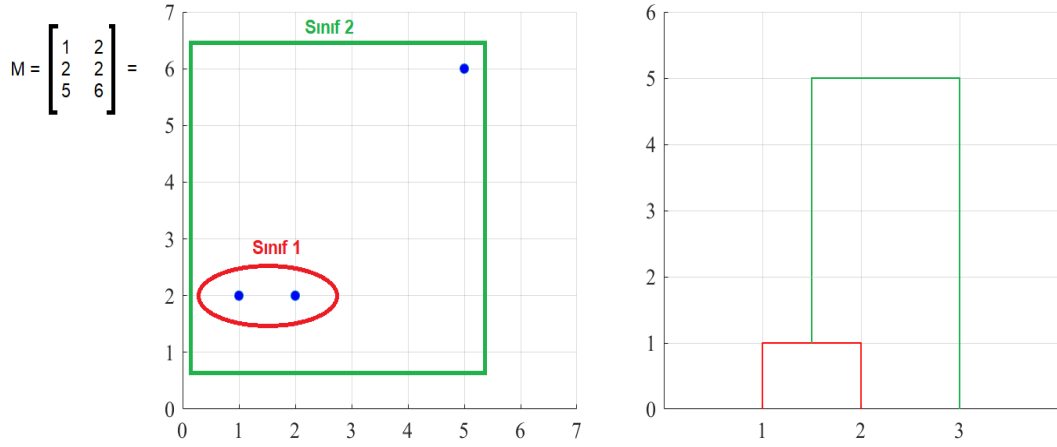
### 3.6.2. Aglomeratif (Yığıcı) Hiyerarşik Kümeleme

Bir veri matrisindeki örneklem değerlerini (veri dizilerini) aralarındaki uzaklıklara göre birleştirip gruplamayı amaçlar. Diğer bir ifadeyle, sırasıyla birbirine uzayda en yakın iki veri dizisini birleştirip tek bir veri dizisi (sınıf) olarak kabul eder ve tek bir sınıf kalıncaya kadar bu birleştirme (yığma) işlemini sürdürür. Yakınlık ölçüsü olarak ortancalar arası yakınlık, en benzer değerler arası yakınlık, ortalamalar arası yakınlık gibi farklı kriterler bu yöntemde amaca göre kullanılabilir. Bu çalışmada SA film türlerinin her biri bir veri dizisi olup bu veri dizilerinin her birindeki değerler birbirine

çok yakın olduğu için sınıflandırıcı yakınlık kriteri olarak en benzer değerler arası yakınlık (veri dizileri arası minimum uzaklık) kullanılmıştır. Sınıflandırma esnasında iki veri dizisi arası uzaklığın belirli bir kriteri (eşik değerini) aşması durumunda sınıflandırma sonlandırılabilir. Böylece veri matrisinde kaç sınıf olacağı belirlenebilir. Bu çalışmada, sınıflandırma için kullanılan uzaklık değerlerinin  $1,0365 \times$  standart sapması (tek taraflı %85 güven aralığı) %85 üzeri sınıflandırma performansını ortalama olarak sağlayabilmek için sonlandırma kriteri olarak seçilmiştir. Yani, sınıflandırma esnasında kullanılan uzaklıkların standart sapması  $\times 1,0365$  değeri belirlenmiş ve iki veri dizisini birleştirmek için kullanılan uzaklık bu değerden küçük ise sınıflandırma sonlandırılmıştır. Böylece sınıflandırılma ortalama başarısı %85 üzeri olan veri dizileri bir sınıfa dahil edilmiştir.

### 3.6.3. Dendrogram

Hiyerarşik kümeleme esnasında sınıfları oluşturan uzaklıkları ve sonlandırma kriterine göre oluşan sınıfları görsel olarak sunmak için kullanılan bir grafikdir. Bu grafikte dikey ekseninde sınıflar arası uzaklık değerleri, yatay ekseninde ise sınıflar gösterilir. Şekil 3.3’de örnek veri matrisi için hiyerarşik kümeleme ve dendrogram grafiği gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi,  $\{1, 2\}$  ve  $\{2, 2\}$  veri dizileri arasındaki uzaklık “1” dir ve bu uzaklık matristeki veri dizileri arasındaki en düşük uzaklıktır. Bu yüzden önce bu iki dizi bir sınıfa dahil edilmiştir ve dendrogram grafiğinde kırmızı sınıf oluşturulmuştur. Kırmızı sınıfın elemanları arası uzaklığın “1” olduğu ise dendrogram grafiğinde dikey ekseninde gösterilmiştir. Daha sonra bu yeni sınıf ile  $\{5, 6\}$  dizisi birleştirilmiş ve yeşil sınıf oluşturulmuştur. Yeni sınıf ile  $\{5, 6\}$  dizisi arasındaki uzaklık  $\sqrt{(3^2 + 4^2)} = 5$  olduğundan, bu “5” değeri dendrogram grafiğinin dikey ekseninde gösterilmiştir (3 numaralı sınıf ile kırmızı sınıf arası uzaklık dikey ekseninde 5’tir).



Şekil 3.3. Örnek veri matrisi için hiyerarşik kümeleme ve dendrogram grafiği

### 3.6.4. Silüet Değeri

Bir veri dizisinin dahil edildiği sınıfa uygunluğunu bulmak için silüet değeri hesaplanır (Denklem 3.6). Bu hesap, bir veri dizisi elemanları ile aynı kümedeki diğer veri dizilerinin elemanları arasındaki mesafe “a”; bir veri dizisi elemanları ile en yakın veri dizisindeki elemanlar arasındaki mesafe “b” olmak üzere, aşağıdaki gibi hesaplanır. Örneğin, yukarıdaki şekilde kırmızı sınıfın elemanlarının birbirine uzaklığının sonradan yeşil sınıfı oluşturmak için eklenen elemana uzaklığına oranları kırmızı sınıfın silüet değerlerini verir. Bu değerlerin ortalaması da kırmızı sınıfın ortalama silüet değeridir. Çalışmada her bir mikrobiyal değer için yapılan sınıflandırmada belirlenen sınıf sayısı için ortalama silüet değerleri belirlenmiştir.

$$S = \frac{b-a}{\max(b-a)} \quad (3.6)$$

### 3.7. İstatistiksel Analizler

Tüm analizlerden elde edilen veriler, IBM SPSS Statistic 19,0 yazılımı (IBM Corporation, Somers, NY, ABD) kullanılarak varyans analizi ile analiz edilmiştir. Ortalama değerleri karşılaştırmak için Duncan'ın çoklu aralık testi ( $p \leq 0,05$ ) kullanılmıştır.

## BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Filmlerin Fizikokimyasal Özellikleri

Probiyotik mikroorganizmalarla zenginleştirilmiş sodyum aljinat (SA) filmlerin fizikokimyasal özelliklerinden olan kalınlık, nem, yoğunluk ve temas açısı değerleri Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Aktif filmlerin fizikokimyasal özellikleri

Parametre	Film örnekleri*							
	SA-C	SA-K	SA-L	SA-B	SA-LB	SA-KL	SA-KB	SA-KLB
Kalınlık (µm)	50,00±0,00 <sup>a</sup>	70,00±0,02 <sup>b</sup>	70,00±0,02 <sup>b</sup>	70,00±0,01 <sup>b</sup>	70,00±0,02 <sup>b</sup>	68,00±0,01 <sup>b</sup>	72,00±0,01 <sup>b</sup>	100,00±0,02 <sup>c</sup>
Nem (%)	20,28±3,69 <sup>a</sup>	20,70±1,22 <sup>a</sup>	21,03±1,04 <sup>a</sup>	23,42±1,43 <sup>b</sup>	22,73±0,97 <sup>b</sup>	21,62±0,34 <sup>a</sup>	21,44±2,77 <sup>a</sup>	28,81±0,61 <sup>c</sup>
Yoğunluk (g.cm <sup>-3</sup> )	1,17±0,35 <sup>a</sup>	1,75±0,10 <sup>c</sup>	1,59±0,43 <sup>b</sup>	1,40±0,31 <sup>b</sup>	2,03±0,17 <sup>d</sup>	1,61±0,09 <sup>c</sup>	1,91±0,32 <sup>d</sup>	1,67±0,07 <sup>c</sup>
Temas açısı (θ°)	41,10±1,36 <sup>a</sup>	48,35±0,87 <sup>b</sup>	49,17±0,09 <sup>b</sup>	54,10±3,25 <sup>c</sup>	47,35±0,07 <sup>b</sup>	41,72±3,08 <sup>a</sup>	51,63±3,20 <sup>bc</sup>	56,28±3,22 <sup>c</sup>

\*Ortalama ve std. hata; a-c: Aynı satırdaki farklı üst simgeler  $p \leq 0,05$  seviyesinde önemli bir fark olduğunu gösterir. SA-C: Probiyotik mikroorganizma içermeyen kontrol sodyum aljinat film örnekleri; SA-K: Kefir kültürü ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-B: *B. lactis* kültürü ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-L: *L. rhamnosus* kültürü ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-KLB: Kefir, *B. lactis* ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-KB: Kefir ve *B. lactis* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-KL: Kefir ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-LB: *B. lactis* ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri

Yenilebilir bir ambalajın etkinliği, kullanılan malzeme özellikleri ve uygulama yöntemi ile belirlenmektedir (Zhong ve ark., 2014). Bu özelliklerden biri olan film kalınlığı, ürünlerin görünümüne ve tadına katkıda bulunan gaz ve nem iletim oranında önemli bir faktördür (Embuscado ve Huber, 2009). Bunlara ek olarak probiyotik yüklü filmlerin kalınlığı da bakterilerin korunması açısından önemlidir (Ceylan ve Atasoy, 2022). Kalantarmahdavi ve ark. (2021), yenilebilir filmlerin kalınlık değerlerinin 300 µm’den az olması gerektiğini bildirmişlerdir. Çalışma kapsamında üretilen aktif film örneklerinin kalınlık değerleri bu sınırın oldukça altında bulunmuştur. Tablo 4.1’de de görüldüğü gibi, üretilen En düşük film kalınlığına kontrol SA film örnekleri sahip iken, en yüksek film kalınlık değerleri ise kefir, *B. lactis* ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen SA film örneklerinde olduğu görülmektedir ( $p \leq 0,05$ ). Çalışmamıza benzer

olarak, Martins ve ark. (2010), nisin ( $50 \text{ IU. g}^{-1}$ ) eklenmesinin galaktomannan bazlı filmlerde kalınlık artışına neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu durum, film oluşturan çözeltideki nisin molekülleri için arzu edilen hidrofobik etkileşimler nedeniyle film matrisinde daha büyük kümelerin oluşumu ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmamızda kullanılan probiyotik laktik asit bakterilerinin benzer bir oluşum sergilendikleri düşünülmektedir. Ayrıca, kalınlıktaki artış, probiyotiklerin eklenmesiyle film formülasyon çözeltisinin sabit hacmindeki kuru maddedeki artıştan kaynaklanabilir (Nagar ve ark., 2020). Benzer şekilde, önceki çalışmalarda probiyotik içeren film formülasyonlarına probiyotiklerin eklenmesinin film kalınlığında artışa neden olduğu bildirilmiştir (Phovisay ve ark., 2018; Zabihollahi ve ark., 2020; Ceylan ve Atasoy, 2022).

Yenilebilir filmlerin ağızda erimesini ölçmek için önemli bir parametre olan nem içeriği, aynı zamanda uzun süreli depolama sırasında probiyotiklerin canlılığını da etkiler (Pereira ve ark., 2019). Tablo 4.1’de de görüldüğü üzere, çalışmamızda üretilen probiyotik içeren aktif film örneklerinin nem oranları  $\% 20,28 \pm 3,69 - 28,81 \pm 0,61$  değerleri arasında değişiklik göstermiştir ( $p \leq 0,05$ ). Çalışmamıza benzer olarak, Ceylan ve Atasoy (2022) tarafından yapılan çalışmada, probiyotik içeren sodyum kazeinat aktif filmlerin nem oranı  $\% 15,13 - 23,29$  arasında değişiklik gösterdiği bildirilmiştir. Film matrisinden su buharı kütle transferi, nem dağılımının itici gücüdür. Yenilebilir filmlerin denge nem seviyeleri, kullanılan polimerlerin konsantrasyonundan, ilave edilen plastikleştiricilerin miktar ve türünden etkilenmektedir (Abedinia ve ark., 2021). Nem oranındaki artış, probiyotiklerin bireysel su tutma kapasitelerinden ve bunların plastikleştirici ile etkileşimlerinden kaynaklanabilir (Phovisay ve ark., 2018). Ayrıca, muhtemelen prebiyotiklerin dahil edilmesiyle film kalınlığında meydana gelen artış, filmde nemin uzaklaştırılmasını kısmen sınırlamaktadır (Jansson ve Thuvander, 2004).

Aktif filmlerin kalınlığı ve yoğunluğu, üretimde kullanılan biyopolimer tipi ve kullanılan katkılar ile konsantrasyonları ile ilgilidir (Karimi ve ark., 2020). Tablo 4.1’de de görüldüğü üzere, çalışmamızda üretilen aktif filmlerin yoğunluk değerleri  $1,17 \pm 0,35 - 1,91 \pm 0,32 \text{ g.cm}^{-3}$  arasında değişiklik göstermiştir ( $p \leq 0,05$ ). Filmlere

probiyotik ilavesi, film numunelerinde yoğunluk değerinin artmasına neden olmuştur.

Temas açısı (TA;  $\theta^\circ$ ), su damlasının temas yüzeyinin noktasındaki teğet çizgisi ile film yüzeyinin taban çizgisi arasındaki açı olarak tanımlanmakta ve genellikle filmin suya karşı direncini ölçmek için kullanılmaktadır. Yenilebilir filmlerin suya dayanıklılığı, kaplanmış gıdanın saklama sırasında suyla temas ettiğinde korunması için önemli bir özelliktir. Film yüzeyinin hidrofiliğini ( $\theta < 65^\circ$ ) veya hidrofobikliğini ( $\theta > 65^\circ$ ) belirlemek için su temas açısı ölçümü kullanılır. Bu parametre, filmin nem transferine karşı direncini tahmin etmek için kullanılabilir (Phan ve ark., 2005). Tablo 4.1'de de gösterildiği gibi, üretilen aktif filmlerin temas açısı değerleri  $41,10 \pm 1,36 - 56,28 \pm 3,22^\circ$  arasında değişim göstermiştir. En küçük temas açısı değeri kontrol grup film örnekleri sahip iken, en yüksek temas açısı değerine ise kefir, *B. lactis* ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örneklerinin sahip olduğu tespit edilmiştir ( $p \leq 0,05$ ). Görüldüğü üzere, filmlere probiyotik mikroorganizma ilavesi farklı mikroorganizma türüne değişmekle beraber, filmlerin hidrofobik özelliğinin artmasına neden olmuştur. Bu durum, bakteriyel yüzey polisakkaritlerinin film hidrofiliğini azaltması ile ilişkilendirilebilir (Oliveira-Alcântara ve ark., 2020). Çalışmamıza benzer olarak, Guimarães ve ark. (2020) tarafından yapılan antifungal özelliklere sahip bir laktik asit bakterisi olan *Lactobacillus buchneri* UTAD104'in peynir altı suyu proteini bazlı filmlere ve kaplamalara dahil edilmesi ile ilgili bir çalışmada da temas açısı değerleri  $20,8 \pm 10,35 - 51,1 \pm 4,78^\circ$  arasında tespit edilmiştir.

Su buharı geçirgenliği (WVP), filmlerin bütünlüğü, hidrofobik oran, kristal ve amorf oran ve kalınlık gibi faktörlerden etkilenebilen yenilebilir filmlerin en önemli özelliklerinden biridir (Kanmani ve Lim, 2013). Ayrıca filmlerin WVP'si gıdadan çevre ile kütle aktarımını önlemek için önemlidir (Ebrahimi ve ark., 2018). Kontrol filmler ile probiyotik mikroorganizma ilave edilmiş film örneklerinin WVP değerleri Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Aktif filmlerin su buharı geçirgenlik değerleri (WVP; g mm/h m<sup>2</sup> kPa)

Film örnekleri	Su buharı geçirgenlik değerleri
SA-C	1,45±0,00 <sup>a</sup>
SA-K	1,56±0,00 <sup>a</sup>
SA-L	1,50±0,00 <sup>a</sup>
SA-B	1,50±0,00 <sup>a</sup>
SA-LB	1,46±0,00 <sup>a</sup>
SA-KL	1,58±0,00 <sup>a</sup>
SA-KB	1,46±0,00 <sup>a</sup>
SA-KLB	2,11±0,00 <sup>b</sup>

\*Ortalama ve std. hata; a-c: Aynı sütundaki farklı üst simgeler  $p \leq 0,05$  seviyesinde önemli bir fark olduğunu gösterir. SA-C: Probiyotik mikroorganizma içermeyen kontrol sodyum aljinat film örnekleri; SA-K: Kefir kültürü ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-B: *B. lactis* kültürü ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-L: *L. rhamnosus* kültürü ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-KLB: Kefir, *B. lactis* ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-KB: Kefir ve *B. lactis* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-KL: Kefir ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-BL: *B. lactis* ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri

Film örneklerinin WVP değerleri 1,45 – 2,11 g mm/h m<sup>2</sup> kPa arasında değişmektedir. Tablo 4.2’de de görüldüğü üzere probiyotik mikroorganizma ilavesi ile film örneklerinin WVP değerleri artış göstermiştir. Film örneklerinin WVP değerleri arasındaki en önemli istatistiksel farklılık SA-C filmleri ile SA-KLB filmleri arasında olduğu tespit edilmiştir ( $p \leq 0,05$ ). Mikroorganizma ilavesi ile film yüzeyinde oluşan olası gözenek ve delikler filmleri kohezyonunu bozarak nem emilimini arttırmış olduğu düşünülmektedir. Çalışmamıza benzer olarak, Akman ve ark. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada mikroenkapsüle ve edilmeyen *Lactobacillus plantarum* içeren sodyum aljinat filmlerin WVP değerleri 1,384 – 1,560 g mm/h m<sup>2</sup> kPa arasında bulunmuştur. Ebrahimi ve ark., (2018) tarafından yapılan farklı bir çalışmada da karboksimetil selüloz filmlere probiyotik mikroorganizma (*Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* ve *Bifidobacterium bifidum*) ilavesi ile WVP değerlerinin benzer şekilde artış gösterdiği, kontrol film örneklerinin WVP değeri 2,73 g mm/h m<sup>2</sup> kPa iken probiyotik film örneklerinin WVP değerlerinin 4,40 – 4,51 g mm/h m<sup>2</sup> kPa arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen WVP değerleri Ebrahimi ve ark., (2018) tarafından elde edilen sonuçlara kıyasla daha düşüktür. Bu durumun, kullanılan biyopolimer türleri ve film hazırlama yöntemleri arasındaki farklılıklar nedeniyle gerçekleştiği düşünülmektedir.

#### 4.2.Filmlerin Fiziksel ve Yapısal Özellikleri

Gıda matrisinin görünümünün, hem satın alma hem de tüketim sırasında tüketicileri

cezbetmesi nedeniyle aktif ambalaj filmlerinin optik özellikleri önemlidir (Olle Resa ve ark., 2014). Polimer özellikleri, film kalınlığı, plastikleştirici tipi ve film bileşenlerinin yapısal konformasyon ve uyumluluğu dahil olmak üzere çeşitli parametreler filmin optik özelliklerini değiştirebilmektedir (Shahrampour ve ark., 2020). Tablo 4.3’de aktif film örneklerinin renk ölçüm değerleri verilmiştir. Tablo 4.3’de de görüldüğü üzere, aktif film örneklerinin  $L^*$  değerleri  $89,83 \pm 0,44$  -  $91,73 \pm 0,51$  arasında;  $a^*$  değerleri  $3,39 \pm 0,20$  -  $4,35 \pm 0,14$  arasında;  $b^*$  değerleri  $12,42 \pm 0,92$  -  $17,28 \pm 0,77$  arasında;  $\Delta E^*$  değerleri  $19,93 \pm 0,79$  -  $23,99 \pm 0,62$  arasında değişim göstermiştir ( $p \leq 0,05$ ). Çalışma sonuçlarına benzer sonuçlar Ma ve ark. (2019a,b) tarafından rapor edilmiştir. Renk değerleri arasındaki farklılık, öncelikle film yapımında kullanılan probiyotik mikroorganizmalara atfedilebilir. Bununla birlikte, probiyotik mikroorganizmalar tarafından indüklenen filmlerin görünümündeki bu değişiklikler, pratik açıdan oldukça küçüktür (Soukoulis ve ark., 2014a; Ebrahimi ve ark., 2018; Ma ve ark., 2019a; Ma ve ark., 2019b).

Tablo 4.3. Aktif filmlerin renk değerleri

Renk özellikleri	Film örnekleri*							
	SA-C	SA-K	SA-L	SA-B	SA-LB	SA-KL	SA-KB	SA-KLB
$L^*$	$90,18 \pm 0,24^a$	$90,25 \pm 0,10^a$	$90,83 \pm 0,06^a$	$90,69 \pm 0,07^a$	$90,59 \pm 0,37^a$	$90,41 \pm 0,17^a$	$91,73 \pm 0,51^a$	$89,83 \pm 0,44^a$
$a^*$	$3,45 \pm 0,32^a$	$3,39 \pm 0,20^a$	$3,99 \pm 0,06^a$	$3,87 \pm 0,08^a$	$3,74 \pm 0,39^a$	$3,53 \pm 0,11^a$	$4,35 \pm 0,14^{ab}$	$3,66 \pm 0,06^a$
$b^*$	$13,03 \pm 1,41^a$	$12,42 \pm 0,92^a$	$15,59 \pm 0,26^b$	$15,09 \pm 0,47^b$	$14,23 \pm 1,82^{ab}$	$13,57 \pm 0,53^a$	$17,28 \pm 0,77^c$	$13,61 \pm 0,23^a$
$\Delta E^*$	$20,45 \pm 1,20^a$	$19,93 \pm 0,79^a$	$22,58 \pm 0,23^{ab}$	$22,15 \pm 0,40^{sb}$	$21,44 \pm 1,56^{ab}$	$20,84 \pm 0,44^a$	$23,99 \pm 0,62^b$	$21,10 \pm 0,28^a$

\*Ortalama ve std. hata; a-c: Aynı satırdaki farklı üst simgeler  $p \leq 0,05$  seviyesinde önemli bir fark olduğunu gösterir. SA-C: Probiyotik mikroorganizma içermeyen kontrol sodyum aljinat film örnekleri; SA-K: Kefir kültürü ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-B: *B. lactis* kültürü ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-L: *L. rhamnosus* kültürü ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-KLB: Kefir, *B. lactis* ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-KB: Kefir ve *B. lactis* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-KL: Kefir ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-BL: *B. lactis* ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri

Biyobozunur filmlerin UV ışığı absorplaması önemli olup bu ışığa oksidatif parçalanmayı katalizleyebilir özelliklerle yağlı gıdaların raf ömürlerini olumsuz yönde etkileyebilir (López ve García, 2012). Tablo 4.4’de aktif film örneklerinin ve bir sentetik filmin (LDPE; düşük yoğunluklu polietilen) 200-800 nm arasındaki dalga boyunda ışık geçirgenlikleri ve şeffaflık değerleri verilmiştir. 200 nm’de sentetik film çok az bir geçirgenlik değerine sahip iken SA-filmler UV-C ışınmasını geçirmemişlerdir. 280 nm dalga boyundaki geçirgenlikler sentetik filme göre anlamlı bir şekilde farklıdır. 350 nm de ise anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ( $p \leq 0,05$ ). SA filmlerin UV-C ve UV-B bariyer özelliği sentetik filme göre biraz daha iyi

gözükmektedir. Ölçümler sonunda elde edilen bu bulgular, SA- filmlerin UV ışık tarafından gerçekleşen fotooksidasyonu bir seviyeye kadar önleyebileceğini göstermektedir. Benzer şekilde, 350 – 800 nm arasında elde edilen değerlerde de anlamlı farklılık tespit edilmemiştir ( $p \leq 0,05$ ). SA-KLB, SA-KB ve SA-B filmler sentetik film ile birlikte yakın şeffaflık değeri gösterirken, diğer SA filmler anlamlı bir şekilde farklı olarak düşük şeffaflık değerleri göstermişlerdir ( $p \leq 0,05$ ). Bu bulgular SA filmlerin şeffaf ambalaj veya kaplama malzemesi olarak kullanılabilceğini göstermektedir. Filmlere ilave edilen probiyotik mikroorganizmalar gibi küçük boyutlu bileşenlerin suda daha iyi çözünür olduğu ve dolayısıyla ışık geçirgenlik özelliklerini arttırdığı bilinmektedir (Tang ve ark., 2015).

Tablo 4.4. Filmlerin ışık geçirgenliği (%) ve şeffaflık değeri (A600/mm)

Film örnekleri	Farklı dalga boylarında (nm) ışık geçirgenlik değerleri (%)								Şeffaflık değeri
	200	280	350	400	500	600	700	800	
LDPE	5,7 <sup>b</sup>	76,4 <sup>c</sup>	82,0 <sup>b</sup>	83,9 <sup>b</sup>	86,2 <sup>b</sup>	87,5 <sup>b</sup>	88,2 <sup>b</sup>	89,0 <sup>b</sup>	2,07 <sup>c</sup>
SA-C	0 <sup>a</sup>	46,1 <sup>b</sup>	71,9 <sup>ab</sup>	79,8 <sup>ab</sup>	85,0 <sup>b</sup>	86,6 <sup>b</sup>	87,9 <sup>b</sup>	88,4 <sup>b</sup>	0,88 <sup>a</sup>
SA-KLB	0 <sup>a</sup>	29,3 <sup>a</sup>	64,9 <sup>a</sup>	75,6 <sup>a</sup>	82,7 <sup>b</sup>	84,8 <sup>b</sup>	86,2 <sup>b</sup>	87,0 <sup>b</sup>	1,53 <sup>b</sup>
SA-KB	0 <sup>a</sup>	38,8 <sup>ab</sup>	66,1 <sup>a</sup>	73,1 <sup>a</sup>	78,9 <sup>a</sup>	80,9 <sup>a</sup>	81,8 <sup>a</sup>	83,3 <sup>a</sup>	3,06 <sup>d</sup>
SA-KL	0 <sup>a</sup>	46,5 <sup>b</sup>	74,2 <sup>b</sup>	82,0 <sup>b</sup>	86,4 <sup>b</sup>	87,7 <sup>b</sup>	88,4 <sup>b</sup>	88,8 <sup>b</sup>	0,62 <sup>a</sup>
SA-K	0,1 <sup>a</sup>	54,0 <sup>b</sup>	75,3 <sup>b</sup>	81,7 <sup>b</sup>	85,6 <sup>b</sup>	87,0 <sup>b</sup>	87,7 <sup>b</sup>	87,5 <sup>b</sup>	0,61 <sup>a</sup>
SA-B	0,1 <sup>a</sup>	58,2 <sup>b</sup>	76,1 <sup>b</sup>	80,9 <sup>b</sup>	84,2 <sup>b</sup>	85,6 <sup>b</sup>	86,1 <sup>b</sup>	87,1 <sup>b</sup>	1,97 <sup>b</sup>
SA-L	0 <sup>a</sup>	32,3 <sup>a</sup>	64,4 <sup>a</sup>	75,4 <sup>a</sup>	81,8 <sup>b</sup>	83,4 <sup>b</sup>	84,1 <sup>b</sup>	84,8 <sup>b</sup>	0,81 <sup>a</sup>
SA-LB	0 <sup>a</sup>	35,7 <sup>ab</sup>	68,8 <sup>a</sup>	79,1 <sup>ab</sup>	85,0 <sup>b</sup>	86,6 <sup>b</sup>	87,3 <sup>b</sup>	87,7 <sup>b</sup>	0,63 <sup>a</sup>

\*Ortalama ve std. hata; a-d: Aynı sütündeki farklı üst simgeler  $p \leq 0,05$  seviyesinde önemli bir fark olduğunu gösterir. SA-C: Probiyotik mikroorganizma içermeyen kontrol sodyum aljinat film örnekleri; SA-K: Kefir kültürü ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-B: *B. lactis* kültürü ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-L: *L. rhamnosus* kültürü ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-KLB: Kefir, *B. lactis* ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-KB: Kefir ve *B. lactis* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-KL: Kefir ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-BL: *B. lactis* ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri

Yenilebilir filmler, gıda işleme, paketlenme ve depolama sırasında stres faktörlerine direnmek için yeterli mekanik dayanıma ve uzayabilirliğe sahip olmalıdır (Akman ve ark., 2021). Bu filmlerin mekanik özellikleri, film matrisinin polimer zincirlerinin dağılımı ve yoğunluğu ile yakından ilişkilidir (Kalantarmahdavi ve ark., 2021) ve polimer ağının yapısal bileşenleri arasındaki etkileşimden etkilenmektedir (Nisar ve ark., 2022). Çalışma kapsamında üretimi yapılan aktif film örneklerine ait çekme mukavemeti (TS; MPa) ve kopma uzaması (E; %) değerleri Tablo 4.5’de gösterilmiştir.

Tablo 4.5’de de görüldüğü üzere, aktif film örneklerinin TS değerleri  $0,42\pm0,06 - 1,49\pm0,20$  MPa, E değerleri ise  $\% 20,45\pm3,60 - 28,62\pm4,40$  arasında değişim göstermiştir. Kontrol film örneklerine kıyasla en küçük TS ve %E değerlerine sahip örneklerin *B. lactis* kültürü ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri olduğu tespit edilmiştir. En yüksek TS ve %E değerlerine sahip örnekler ise *B. lactis* ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleridir. Tablo 4.5’de de görüldüğü üzere film örneklerinin TS ve %E değerleri ilave edilen probiyotik mikroorganizma türü ve kombinasyonuna göre değişkenlik göstermiştir ( $p\leq0,05$ ). İlave edilen probiyotik mikroorganizma ile artış gösteren TS ve %E değerleri, probiyotiklerin filmlerde plastikleştirici olarak rol oynadığını göstermektedir (Tang ve ark., 2015). Genel olarak, probiyotik aljinat filmler, yüksek TS ve düşük WVP’si nedeniyle gıda endüstrisinde önerilebilen filmler arasındadır (Shahrapour ve ark., 2020). Çalışma sonuçlarında elde edilen bulguların literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir (Da Silva ve ark., 2009; Wang ve ark., 2010; Tang ve ark., 2015; Fernandes ve ark., 2020; Ceylan ve Atasoy, 2022).

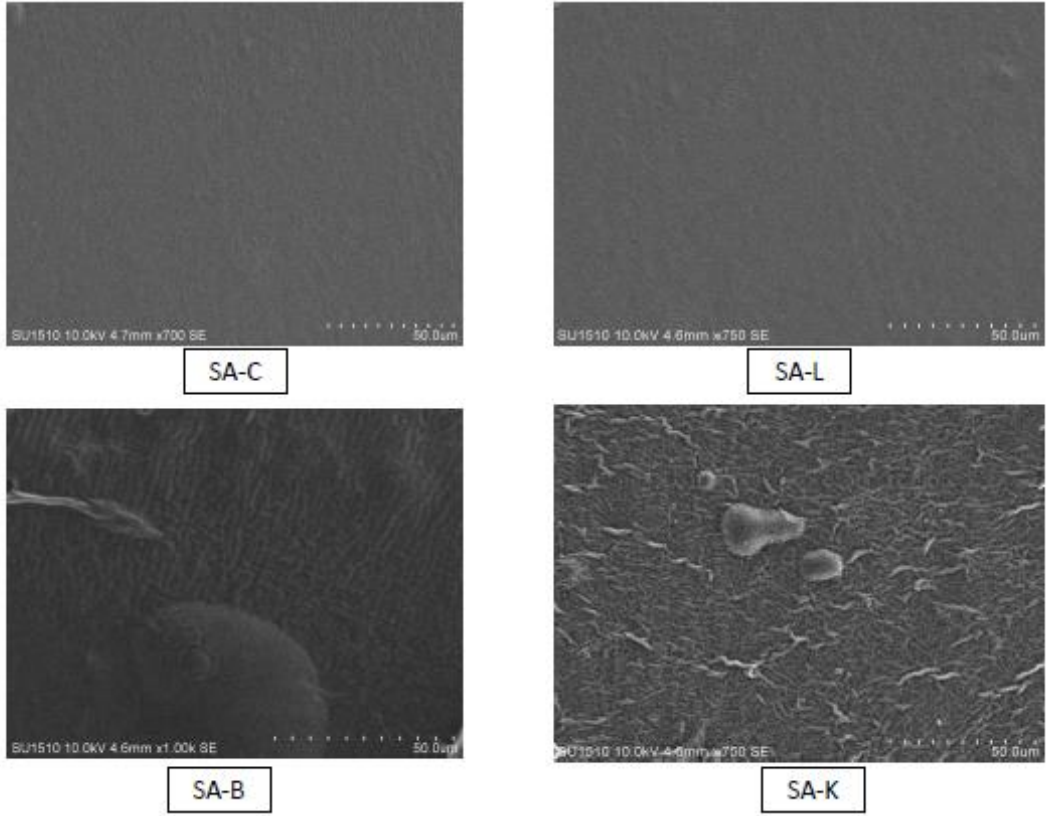
Tablo 4.5. Film örneklerinin mekaniksel özellikleri

Film Örnekleri*	Mekaniksel Özellikler	
	TS (MPa)	Kopma Uzunluğu (E ; %)
SA-C	$0,83\pm0,25^{ab}$	$22,11\pm6,84^b$
SA-K	$1,02\pm0,35^b$	$26,60\pm2,47^c$
SA-L	$0,66\pm0,34^a$	$22,40\pm7,78^b$
SA-B	$0,42\pm0,06^a$	$20,45\pm3,60^a$
SA-LB	$1,49\pm0,20^c$	$28,62\pm4,40^c$
SA-KL	$0,68\pm0,24^a$	$22,56\pm6,37^b$
SA-KB	$1,17\pm0,36^b$	$27,25\pm5,60^c$
SA-KLB	$0,85\pm0,21^{ab}$	$20,29\pm4,83^a$

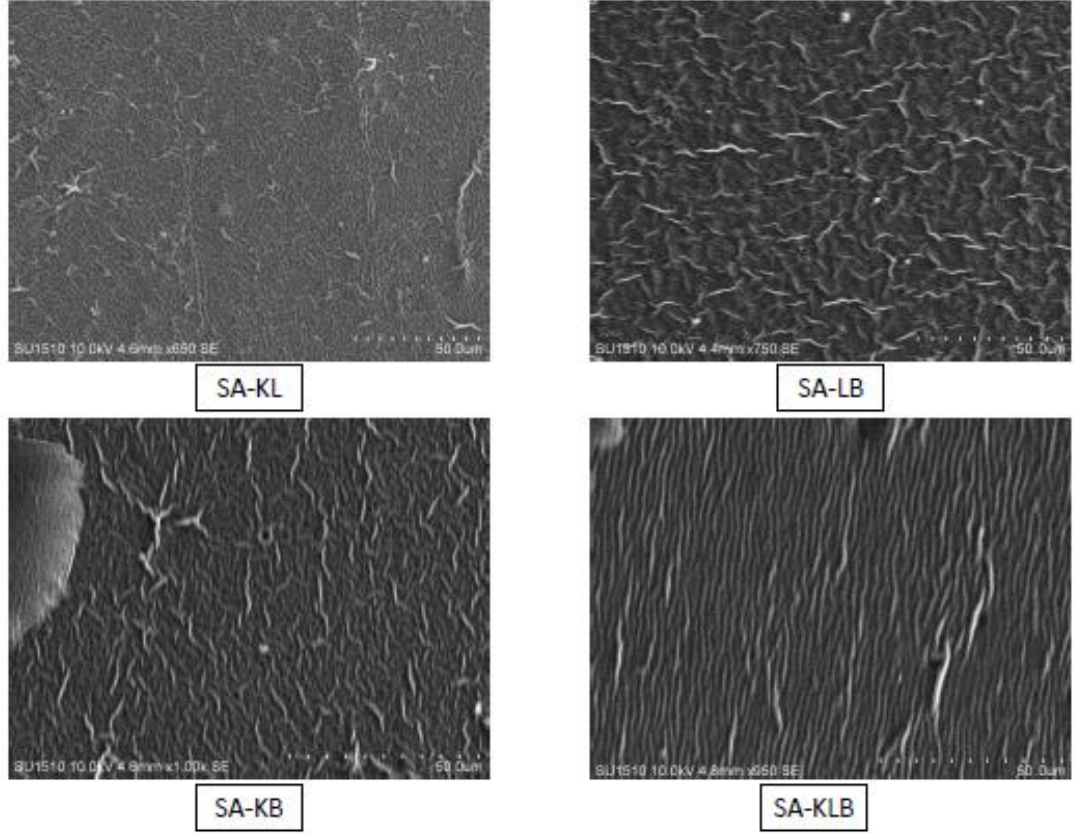
\*Ortalama ve std. hata; a-c: Aynı sütundaki farklı üst simgeler  $p\leq0,05$  seviyesinde önemli bir fark olduğunu gösterir. SA-C: Probiyotik mikroorganizma içermeyen kontrol sodyum aljinat film örnekleri; SA-K: Kefir kültürü ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-B: *B. lactis* kültürü ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-L: *L. rhamnosus* kültürü ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-KLB: Kefir, *B. lactis* ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-KB: Kefir ve *B. lactis* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-KL: Kefir ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-BL: *B. lactis* ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri

Taramalı elektron mikroskopu (SEM), probiyotik mikroorganizma ilavesinin SA filmlerin morfolojik yapısı üzerindeki etkilerine ilişkin yorum yapmak amacıyla kullanılmıştır. Elde edilen SEM görüntüleri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de de görüldüğü üzere filmlere ilave edilen probiyotik mikroorganizma tür ve kombinasyonuna göre, kontrol film örneklerine kıyasla farklı

film yüzey görüntüleri alınmıştır. Şekiller incelendiğinde, yalnızca *L. rhamnosus* kültürü ilave edilen sodyum aljinat film örneklerinin çatlak ve gözenek içermeyen pürüzsüz bir yüzey gösterirken, filmlere *B. lactis* kültürünün ilavesi filmin yüzey morfolojisinde gözenek oluşumu meydana gelmesine neden olmuştur. Çalışmamıza benzer olarak Orozco-Parra ve ark. (2020), inulin ve *L. casei* içeren tapyoka nişastasız bazlı filmlerin, çatlak ve gözenek içermeyen homojen bir film matrisine sahip olduğunu bildirmiştir. *B. lactis* kültürü ilave edilen film örneklerinde görülen gözenek ve pürüzlülük, bu filmlerin en düşük TS ve %E değerlerine sahip olması ile ilişkili olarak, mekanik özelliklerinde de değişime neden olmuştur. Benzer şekilde film formülasyonlarında kefir kültürünün kullanımı da film yapısında pürüzsüzlüğün azalmasına, gözenek oluşumuna neden olmuştur. Kefir ile beraber *L. rhamnosus* kültürü ilave edilen sodyum aljinat film örneklerinin film morfolojilerinin ise daha pürüzsüz bir yapı gösterdiği, mikroorganizmaların film yüzeyinde homojen olarak dağıldığı gözlemlenmiştir. Bu durumun *L. rhamnosus* kültürü ilave ile, sodyum aljinat ile *L. rhamnosus* kültürü arasında iyi bir moleküler arası etkileşimden kaynaklandığı düşünülmektedir (Zabihollahi ve ark., 2020). Benzer şekilde Soukoulis ve ark. (2014a) probiyotik jelatin bazlı filmlere prebiyotik bileşikler olarak polidekstroz ve inülinin eklenmesinin, kompakt bir film yapısının oluşmasına neden olduğunu ve bunun da bakteri hücrelerinin yayılım alanlarının arttırdığını bildirmiştir. Tam aksi olarak kefir ile beraber *B. lactis* kültürü ilave edilen film örneklerinin morfolojik yapısında, yalnızca *B. lactis* kültürü ilave edilen film örneklerine benzer olarak gözenek oluşumlarının meydana geldiği tespit edilmiştir. Benzer bulgular Ebrahimi ve ark. (2018) tarafından *B. animalis subsp. lactis* BB-12 hücreleri ile zenginleştirilen karboksimetilselüloz filmlerde de tespit edilmiştir.



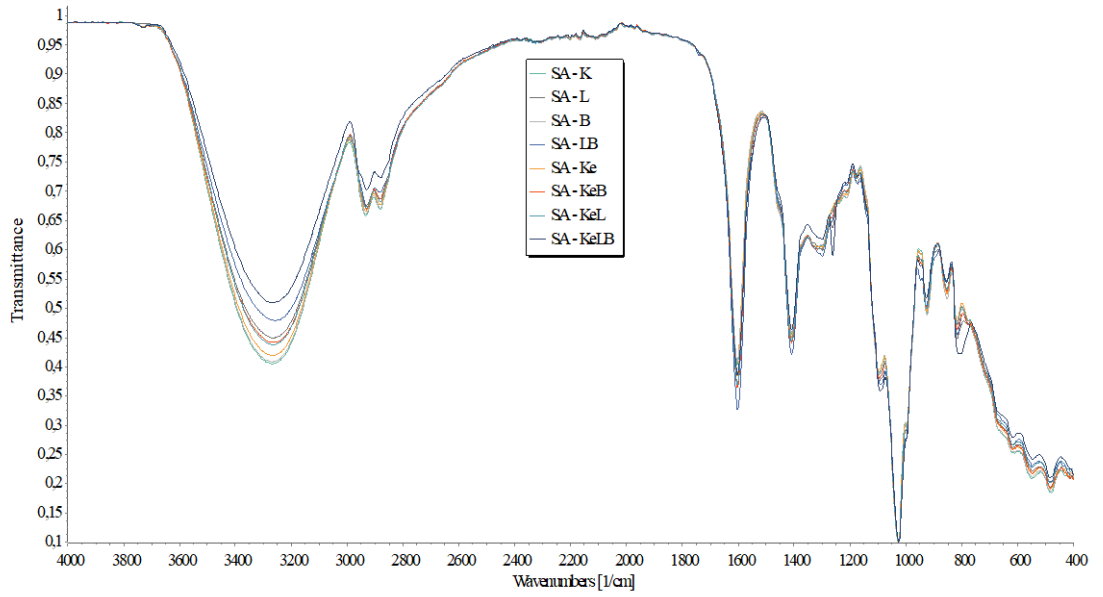
Şekil 4.1. Aktif film örneklerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri (SA-C: Probiyotik mikroorganizma içermeyen kontrol SA film örnekleri; SA-K: Kefir kültürü ilave edilen SA film örnekleri; SA-B: *B. lactis* kültürü ilave edilen SA film örnekleri; SA-L: *L. rhamnosus* kültürü ilave edilen SA film örnekleri)



Şekil 4.2. Aktif film örneklerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri (SA-KLB: Kefir, *B. lactis* ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen SA film örnekleri; SA-KB: Kefir ve *B. lactis* kültürleri ilave edilen SA film örnekleri; SA-KL: Kefir ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen SA film örnekleri; SA-BL: *B. lactis* ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen SA film örnekleri)

FT-IR ölçümleri, SA filmlere probiyotik mikroorganizmaların katılımının moleküller arası kuvvetler üzerindeki etkisini tahmin etmek için kullanılmıştır. Şekil 4.3'de, probiyotikli ve probiyotiksiz SA filmlerinin FTIR spektrumlarını gösterilmiştir. Şekil 4.3'de de görüldüğü üzere, tüm film örneklerinde görülen  $3300\text{ cm}^{-1}$  civarında meydana gelen absorpsiyon piki molekül içi ve moleküller arası hidroksil gruplarının gerilme titreşimleridir. Sodyum aljinat ve gliserol yapısında bulunan hidroksil grupları bu bölgede güçlü omuz yapabilir.  $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  arası gözlenen zayıf omuz alifatik  $\text{-CH}$  gerilme titreşimlerine aittir. Sodyum aljinat ve gliserol kaynaklı olabileceği gibi mikroorganizmalarla yapılan çalışmalarda bu bölge yağ asitleri absorpsiyonu da gözlenmektedir.  $1600$  ve  $1400\text{ cm}^{-1}$  gözlenen pik, asimetrik gerilme yapan sodyum aljinatın yapısındaki karboksilat tuzlarından kaynaklı olabilir. Mikroorganizmalar için  $1600\text{ cm}^{-1}$  bölgesi amid bölgesi iken  $1400\text{ cm}^{-1}$  bölgesi karma bölge olarak adlandırılan, proteinlerin karboksilik grupları, serbest aminoasitler, polisakkaritler,

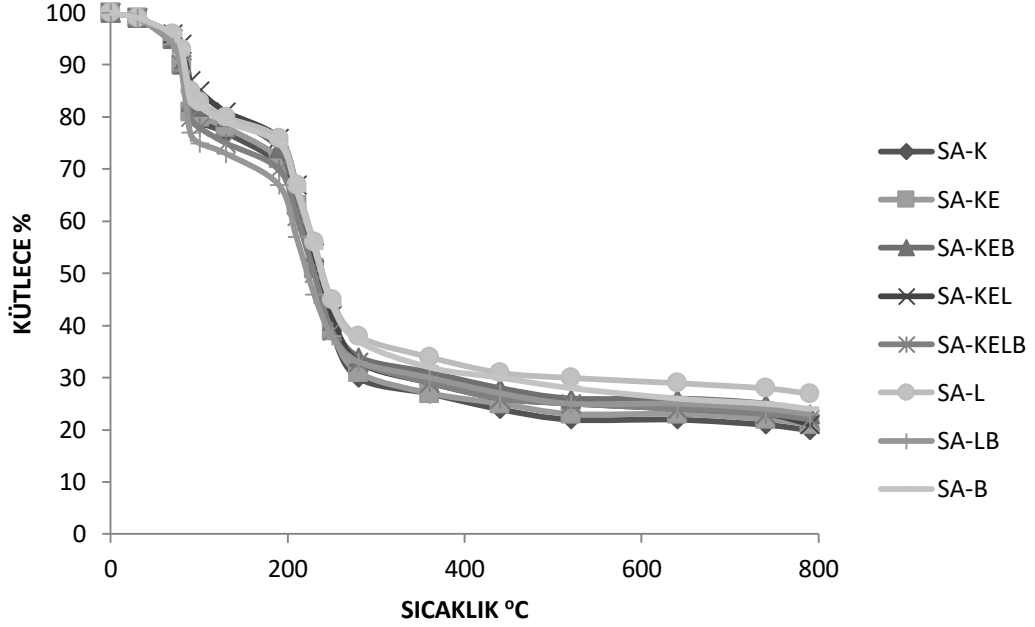
yağ asitleri ve fosfat taşıyan bileşenlerin pik yaptığı bölgedir.  $1300\text{ cm}^{-1}$  civarında gözlenen zayıf omuz sodyum aljinat ve gliseol kaynaklı C-O gerilme titreşimlerinden kaynaklı olabileceği gibi,  $1200\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$  den gözlenen zayıf omuz mikroorganizmalardan kaynaklı RNA/DNA ve fosfolipit kaynaklı olabilir.  $1100\text{ cm}^{-1}$  civarı gözlenen güçlü pikin ise C-C ve C-O gerilme titreşimlerinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda bu bölge mikroorganizmalar için polisakkarit bölge olup hücre duvarında bulunan karbohidratların parmak izi benzeri absorpsiyon bantlarında gözlenebilir. (Kılıç ve Karahan, 2010; Engin ve ark., 2022).



Şekil 4.3. Aktif SA filmlerin FT-IR spektrumu

Hazırlanan aktif film örneklerinin termal bozunma sıcaklıklarını ve polimerlerin termal kararlılığını bulmak amacı ile TGA eğrileri incelenmiş ve Şekil 4.4’de gösterilmiştir. Şekil 4.4’de de görüldüğü üzere, üretilen aktif filmlerin termal ayrışması iki ana aşamada gerçekleşmiştir. Başlangıç aşamasındaki kütle azalması, bileşimden suyun buharlaşması ile ifade edilebilirken,  $100^{\circ}\text{C}$  civarında başlayan kütle kaybı, yenilebilir film yapısında bulunan sudan kaynaklanmaktadır (Roy ve Rhim, 2020). İkinci aşamada yaklaşık  $200^{\circ}\text{C}$  civarında başlayan kütle kaybı gliserol yapısının bozulmasıyla ilgili olabileceği gibi büyük kütle kaybının gerçekleştiği  $200^{\circ}\text{C}$ ’den sonra, aynı zamanda aljinatın parçalanmaya başladığı sıcaklıktır (Beghetto, 2020; Huntrakul ve Harnkarnsujarit, 2020). Bu bölgede kütle kaybının yaklaşık %50’ si

kaybedilmiştir. Literatür verilerine göre de (Popovic ve ark., 2021; Zehir, 2017; Üçok, 2020) film yapısında bulunan probiyotik mikroorganizmaların organik kütle kayıpları üstte verilen TGA eğrisi ile uyumludur.

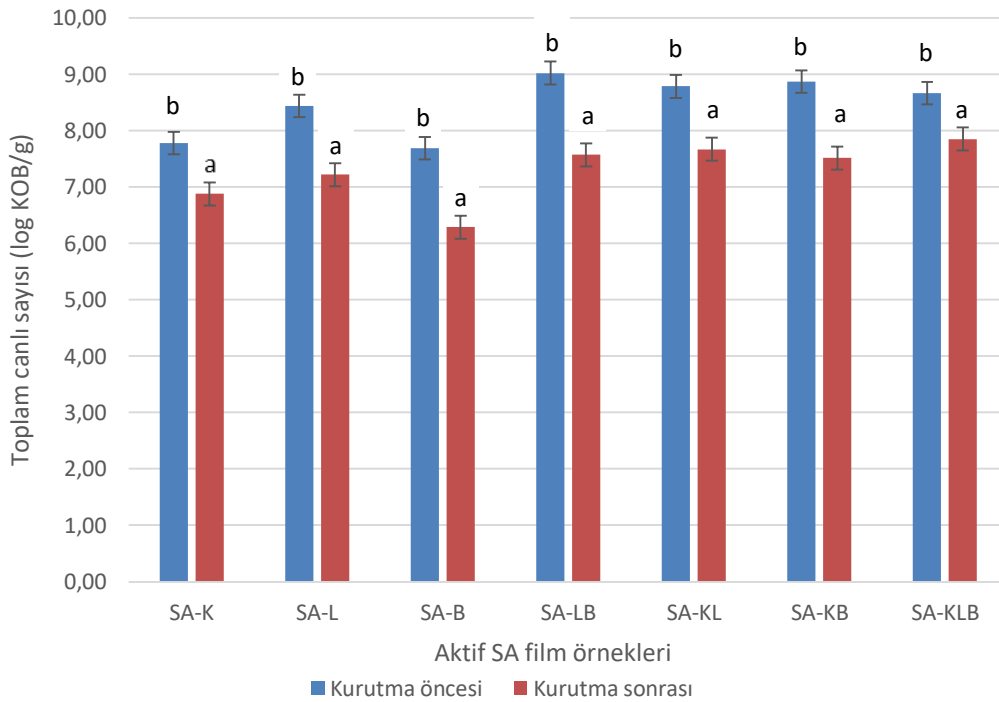


Şekil 4.4. Aktif SA filmlerin Termo Gravimetrik Analiz (TGA) grafiği

### 4.3. Filmlerin Biyoaktif Özellikleri

Yenilebilir filmlerde probiyotiklerin hayatta kalmasındaki en önemli adımlar film dökümü ve kurutma işlemidir. Film üretiminde probiyotiğin yüksek kuruma stabilitesi, probiyotik filmlerin değerlendirilmesinde önemli bir kriter olarak kabul edilmektedir (Kalantarmahdavi ve ark., 2021). Probiyotik içeren filmlerin hazırlanması, film oluşturan çözeltinin ozmotik etkisi ve kurutmanın dehidrasyon etkisi olmak üzere probiyotik bakteriler için iki zararlı adım içermektedir (Romano ve ark., 2014). Film yapısını oluşturan çözeltinin kuruma koşulları göz önüne alındığında, konvektif kurutulma sırasında, probiyotiklerin hücresel yapılarında meydana değişikliklerden dolayı (ozmotik stres kaynaklı sitoplazmik membran hasarının sorunu; membran yırtılması ve sitoplazmik materyalin sızması) canlılıkta önemli kayıplar olabileceği iyi bilinmektedir (Fu ve Chen, 2011). Bu nedenle pek çok araştırmacı tarafından

probiyotiklerin, pektin, selülozikler veya aljinatlar gibi polisakkaritler bazlı filmlerde hem kurutma işlemi hem de saklama süresi boyunca bakteri hücrelerinin canlılığını tespit edilmiştir (Cook ve ark., 2012; Bustos ve Bórquez, 2013; Yonekura ve ark., 2013; Soukoulis ve ark., 2014a; Ceylan ve Atasoy, 2022). Şekil 4.5’de çalışmamız kapsamında üretilen aktif SA filmlerin kurutma işlemi öncesi ve sonrası toplam canlı sayısı (log KOB/g) verilmiştir.



Şekil 4.5. Probiyotik mikroorganizmaların aktif SA filmlerde canlılıkları (log KOB/g)

Şekil 4.5’de de görüldüğü üzere, filmlerdeki probiyotik canlı sayısı kurutma sonrasında azalma göstermiştir ( $p \leq 0,05$ ). Filmlerdeki kurutma sonrası probiyotik mikroorganizmalarının canlılık değerleri % 81,79 – 90,57 arasında değişmektedir. Çalışmamız sonucunda elde edilen canlılık değerleri literatüre kıyasla biraz daha düşük bulunmuştur. Örneğin; Ceylan ve Atasoy (2022) tarafından yapılan çalışmada *B. animalis subsp. lactis* BB-12’in canlılık değerleri kurutma sonrası %86,73 ile %93,38 arasında bulunmuştur. Çalışmada meydana gelen farklılığın, film formülasyonlarında kullanılan inulin (IN) ve fruktooligosakkarit (FOS) kaynaklı olduğu düşünülmektedir. IN, FOS ve IN\*FOS kombinasyonunun kullanımı, kurutmadan sonra bakteriyel

stabilite üzerindeki etkileşimi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0.001$ ). Birkaç araştırmacı, probiyotik ve prebiyotik kombinasyonlarının sinerjik bir etkiye sahip olduğunu ve prebiyotiklerin yenilebilir filmlerde probiyotiklerin canlılığını sürdürmede etkili olduğunu bildirmiştir (Pereira ve ark., 2019; Orozco-Parra ve ark., 2020). Benzer şekilde, çeşitli prebiyotik yenilebilir filmlerin *L. casei*'nin hayatta kalma oranı üzerindeki etkisi değerlendirildiği farklı bir çalışmada, en yüksek canlılık değeri IN içeren numunede belirlenmiştir (Phovisay ve ark., 2018). Prebiyotiklerin yapısında bulunan fruktanların, dehidrasyon sırasında membran fosfolipidlerinin (hidrojen bağları) polar baş grupları ile etkileşerek probiyotiklerin korunmasında rol oynadığı bilinmektedir (Schwab ve ark., 2007). Çalışmamızda film formülasyonun hazırlanmasında herhangi bir prebiyotik kullanılmamasına rağmen, elde edilen sonuçlar, film üretimi sırasında kurutma aşamasının probiyotik mikroorganizma canlılığı üzerinde akut toksik etkisinin olmadığını göstermektedir.

Hazırlanan aktif filmlerin seçilen patojen bakterilere (Gram pozitif (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) ve Gram negatif bakteri (*Escherichia coli* Type 1, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028)) karşı *in vitro* antimikrobiyal aktivitesi “Disk Difüzyon” yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda elde edilen inhibisyon zon çapları (mm) Tablo 4.6’da gösterilmiştir.

Tablo 4.6. Aktif film örneklerinin *in vitro* antimikrobiyel aktiviteleri

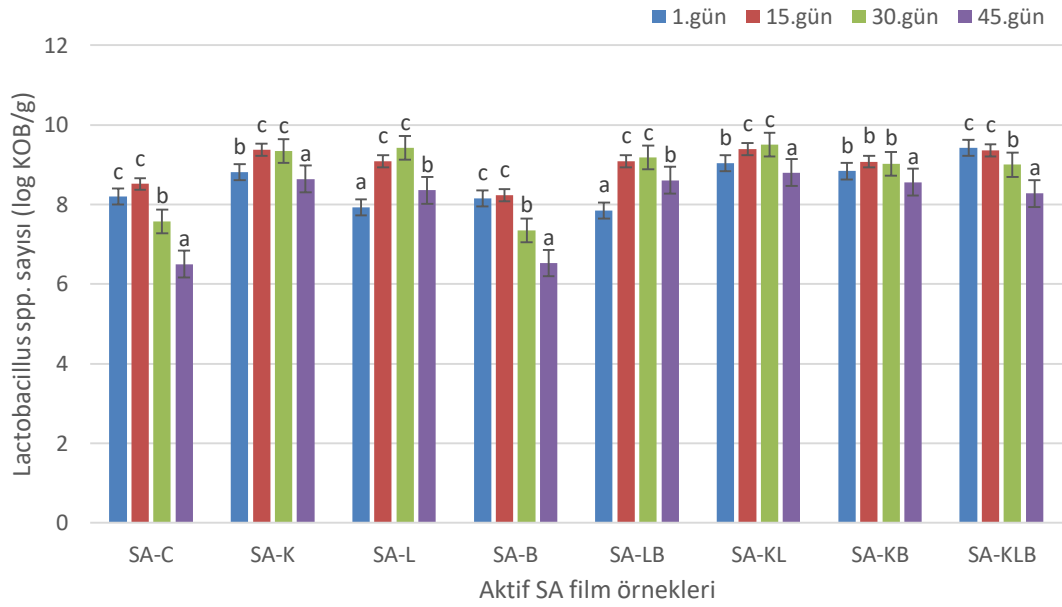
Patojen mikroorganizma	Aktif film örnekleri*						
	SA-K	SA-L	SA-B	SA-LB	SA-KL	SA-KB	SA-KLB
	Antimikrobiyel Zon Çapı (mm)*						
<i>E. coli</i>	16,50±2,12 <sup>ab</sup>	15,50±0,71 <sup>a</sup>	16,50±0,71 <sup>ab</sup>	17,50±0,71 <sup>c</sup>	16,50±2,12 <sup>ab</sup>	18,00±1,41 <sup>d</sup>	19,00±1,41 <sup>d</sup>
<i>S. aureus</i>	23,00±1,41 <sup>ab</sup>	21,50±0,71 <sup>a</sup>	21,50±4,95 <sup>a</sup>	22,00±4,24 <sup>a</sup>	23,50±2,12 <sup>b</sup>	24,25±1,06 <sup>bc</sup>	24,75±1,77 <sup>c</sup>
<i>L. monocytogenes</i>	20,50±0,71 <sup>b</sup>	17,50±0,71 <sup>a</sup>	16,50±2,12 <sup>a</sup>	20,50±2,12 <sup>b</sup>	21,50±2,12 <sup>b</sup>	20,50±4,95 <sup>b</sup>	21,00±1,41 <sup>b</sup>
<i>S. Typhimurium</i>	20,00±1,41 <sup>b</sup>	15,50±0,71 <sup>a</sup>	16,50±0,71 <sup>a</sup>	20,00±2,83 <sup>b</sup>	21,00±1,41 <sup>b</sup>	20,00±1,41 <sup>b</sup>	21,50±0,71 <sup>b</sup>

\*Ortalama ve std. hata; a-d: Aynı satırdaki farklı üst simgeler  $p\leq 0,05$  seviyesinde önemli bir fark olduğunu gösterir. SA-C: Probiyotik mikroorganizma içermeyen kontrol sodyum aljinat film örnekleri; SA-K: Kefir kültürü ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-B: *B. lactis* kültürü ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-L: *L. rhamnosus* kültürü ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-KLB: Kefir, *B. lactis* ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-KB: Kefir ve *B. lactis* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-KL: Kefir ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri; SA-BL: *B. lactis* ve *L. rhamnosus* kültürleri ilave edilen sodyum aljinat film örnekleri

Tablo 4.6’da da görüldüğü üzere, probiyotik mikroorganizmalarla zenginleştirilmiş SA filmler en güçlü antimikrobiyel ekiyi *S. aureus*’a karşı göstermiş iken, en düşük

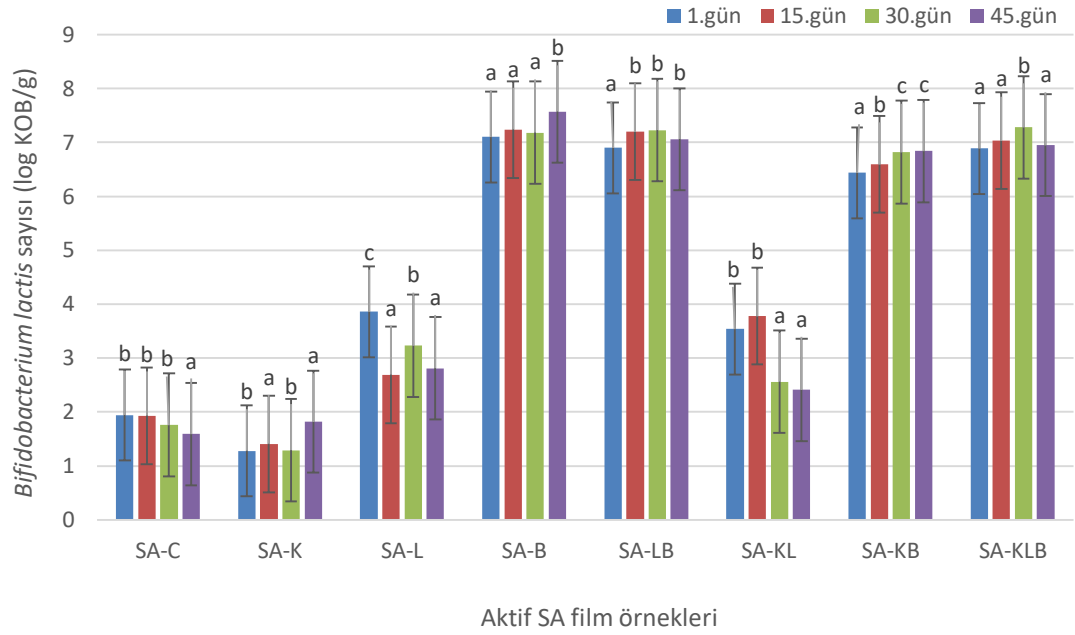
antimikrobiyel etkiyi *E.coli*'ye karşı göstermiştir. Elde edilen sonuçlar SA filmlerin probiyotik mikroorganizmalar tarafından üretilen ve patojenler üzerinde antimikrobiyel etkisi olan maddelerin salınımına izin verme yeteneğine atfedilir (El-Sayed ve El-Sayed, 2020). SA yenilebilir filmler içerdikleri probiyotiklerin canlılığını korumak için stabilize edici birer matriks görevi görmüşlerdir (El-Sayed ve ark., 2021). Çalışma sonuçlarımız *Bifidobacterium* sp., *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* ve diğer *Lactobacillus* sp. türlerini içeren probiyotik film çalışmaları ile de uyumluluk göstermiştir (Marin ve ark., 2019; Dianina ve ark., 2019). El-Sayed ve ark. (2021) yapılan çalışmada *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus casei* ile zenginleştirilen sodyum aljinat, kitosan ve karboksimetil selüloz filmlerin tüm test mikroorganizmalarına karşı (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus flavus*) 17- 25 mm'lik zon çapları ile inhibisyon etkisi tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bilindiği üzere probiyotik mikroorganizmalar ürettikleri sekonder metabolitlerle (organik asitler ve bakteriyosin olarak adlandırılan antimikrobiyel peptidler vb.) çevre ortamını değiştirerek, patojen mikroorganizmalar için elverişsiz hale getirirler (Chichlowski ve ark., 2007; Denkova ve ark., 2017). Çalışma sonucunda elde edilen bulgular, gıdaların raf ömrünü uzatmak, gıda yüzeylerinde patojen üreme riskini sınırlamak ve ayrıca sağlık yararları olan fonksiyonel bir ürün sunmak için değerli olabilir.

Farklı probiyotikler ile zenginleştirilmiş SA yenilebilir filmlerle kaplanmış beyaz peynir örneklerinde mikrobiyolojik değişiklikler buzdolabı koşullarında gerçekleştirilen 45 günlük depolama süresince değerlendirilmiş ve Şekil 4.6 – Şekil 4.10 arasında gösterilmiştir. Şekillerde gösterilen sonuçlarımız, kontrol grup ile karşılaştırıldığında, tüm kaplanmış beyaz peynir örnekleri için probiyotik suşların depolama süresince önemli ölçüde artış gösterdiğini ortaya koymuştur.



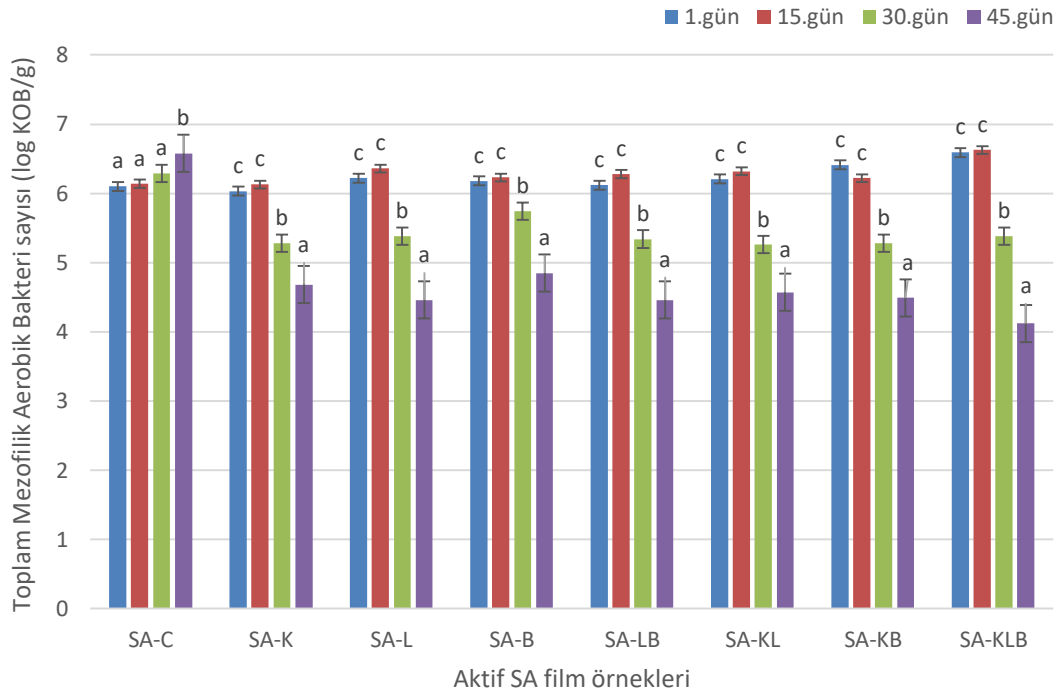
Şekil 4.6. Aktif SA filmler ile kaplanmış peynir örneklerinin depolama boyunca *Lactobacillus* spp. sayısı değişimleri (log KOB/g)

Şekil 4.6’da da görüldüğü üzere, depolama süresinin sonunda *Lactobacillus* spp. sayıları kontrol film örnekleri ile kaplanmış peynir örneklerinde 8,20’den 6,50 log KOB/g olarak azalış göstermiştir. Aktif SA filmler ile kaplanmış peynir örneklerinde ise 45. gün sonunda laktik asit bakteri sayısı 6,53 – 8,64 log KOB/g değerleri arasında değişim göstermiştir ( $p \leq 0,05$ ).



Şekil 4.7. Aktif SA filmler ile kaplanmış peynir örneklerinin depolama boyunca *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* B94 sayısı değişimleri (log KOB/g)

Şekil 4.7’de de görüldüğü üzere, depolama boyunca en düşük *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* B94 sayısı kontrol film örnekleri (SA-C) ile SA-K, SA-L ve SA-KL film örneklerinde elde edilmiştir. Depolama boyunca en yüksek *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* B94 sayısı ise depolamanın 45. gününde SA-B aktif filmler ile kaplanmış peynir örneklerinde 7,57 log KOB/g olarak tespit edilmiştir. Kaplanmış peynir örneklerindeki hem *Lactobacillus spp.* hem de *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* B94 sayılarındaki depolama boyunca görülen artış, istatistiksel olarak önemli olup ( $p \leq 0,05$ ), bu durum film kaplamaların probiyotik mikroorganizmaları koruyucu etkisine bağlanmaktadır. Probiyotik mikroorganizmaların kontrol SA film örnekleri ile kaplanmış peynir örneklerinde meydana gelen azalıştan ise peynir örneklerinde depolama boyunca meydana gelen fizyokimyasal değişimler ile asitlik gelişimin etkisi olduğu düşünülmektedir (El-Sayed ve ark., 2021).

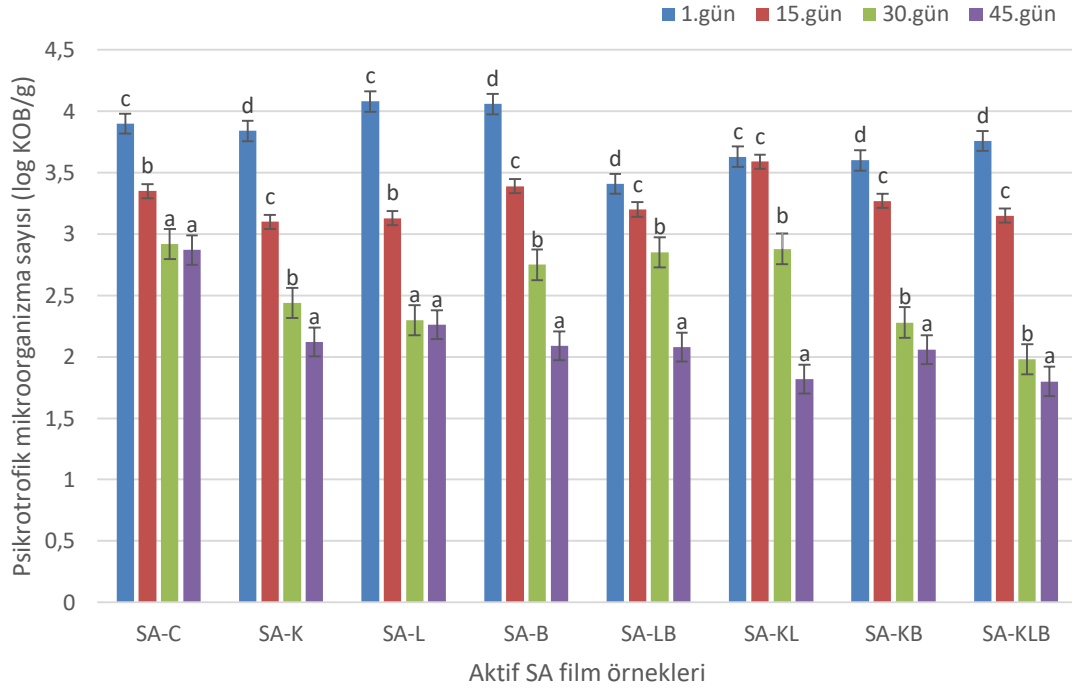


Şekil 4.8. Aktif SA filmler ile kaplanmış peynir örneklerinin depolama boyunca Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri sayısı değişimleri (log KOB/g)

Şekil 4.8’de aktif SA filmler ile kaplanmış peynir örneklerinin depolama boyunca meydana gelen Toplam Mezofilik Aerobik bakteri (TMAB) sayısı gösterilmiştir. Şekilde 4.8’de de görüldüğü üzere kontrol filmler kaplanmış peynir örneklerinin aksine diğer tüm aktif filmler ile kaplanmış peynir örneklerinin depolama sonunda TMAB sayısı azalış göstermiştir ( $p \leq 0,05$ ). Kontrol filmlerle kaplanmış peynir örneklerinin depolamanın 45. gününde TMAB sayısı 6,58 log KOB/g olarak tespit edilmişken, en düşük TMAB sayısı 4,12 log KOB/g olarak depolamanın 45. gününde SA-KLB filmler ile kaplanmış peynir örneklerinde tespit edilmiştir.

Aktif SA film kaplamalarının depolama boyunca peynir örneklerinde gerçekleştirdiği psikrotrof mikroorganizma sayı değişimleri Şekil 4.9’da gösterilmiştir. Şekil 4.9’da da görüldüğü üzere tüm kaplanmış peynir örneklerinde psikrotrof mikroorganizma sayısında depolamanın son gününde bir azalma olduğu görülmektedir. Psikrotrof mikroorganizma sayısında meydana gelen bu değişim, kontrol filmler ile aktif filmler kıyaslandığında, aktif film ile kaplanmış peynir örneklerinde gerçekleşen azalmanın daha fazla ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir ( $p \leq 0,05$ ). Kontrol filmlerle kaplanmış peynir örneklerinin depolamanın 45. gününde psikrotrof mikroorganizma

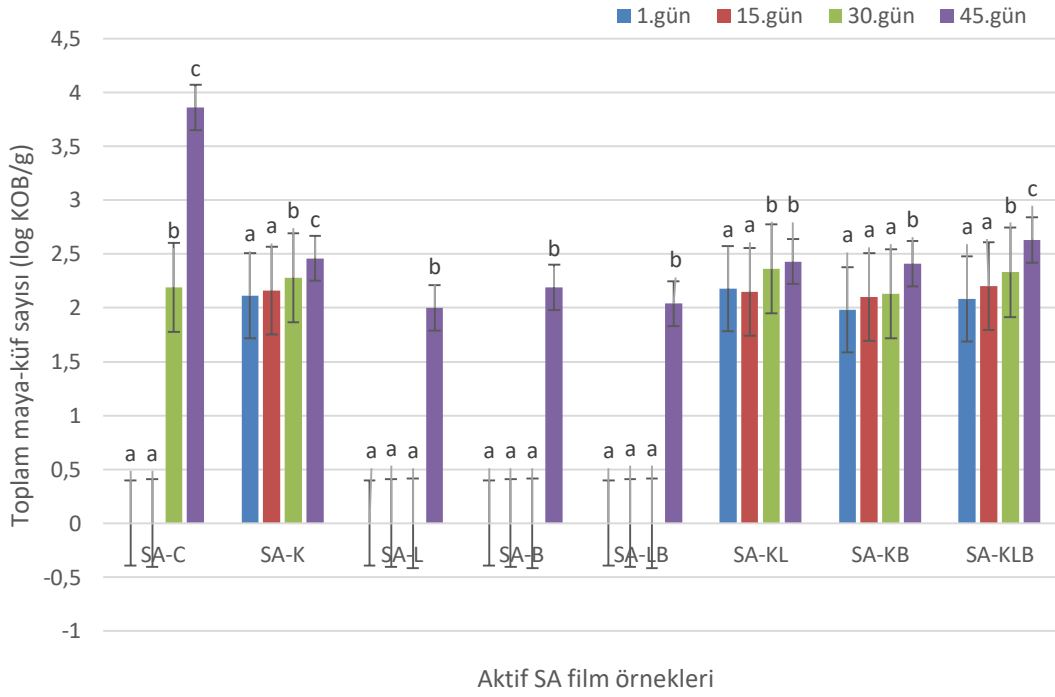
sayısı 2,87 log KOB/g olarak tespit edilmişken, en düşük psikrotrof mikroorganizma sayısı 1,80 log KOB/g olarak depolamanın 45. gününde SA-KLB filmler ile kaplanmış peynir örneklerinde tespit edilmiştir.



Şekil 4.9. Aktif SA filmler ile kaplanmış peynir örneklerinin depolama boyunca psikrotrof mikroorganizma sayısı değişimleri (log KOB/g)

Aktif SA filmler ile kaplanmış peynir örneklerinin 45 günlük depolama sonucunda meydana gelen toplam maya-küf sayılarındaki değişim Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Şekil 4.10'da da görüldüğü üzere en yüksek maya-küf sayısı depolamanın 45. gününde kontrol filmler ile kaplanmış peynir örneklerinde 3,86 log KOB/g olarak tespit edilmiştir. En düşük maya-küf sayısı ise depolamanın 1, 15 ve 30. günlerinde SA-L, SA-B ve SA-LB kaplamalar ile elde edilmiştir. Kontrol filmler ve aktif film kaplamaların peynir örneklerinin maya-küf sayısındaki etkisi istatistiksel olarak önemlidir ( $p \leq 0,05$ ). SA-K, SA-KL, SA-KB ve SA-KLB filmler ile elde edilen maya-küf sayısındaki değişim ise 1,98 – 2,63 log KOB/g olarak tespit edilmiştir. Bu filmler ile yapılan kaplamalarda tespit edilen maya-küf sayısı üzerinde, filmlerde kullanılan kefir kültüründe mevcut olan *Kluyveromyces sp.*, *Saccharomyces sp.* türlerinin etkin olduğu düşünülmektedir.

Elde edilen bu mikrobiyolojik veriler ışığında, yenilebilir filmlerin probiyotikler gibi faydalı mikroorganizmaların gıdaya taşınması için kullanılabilir umut verici bir yöntem olduğu düşünülmektedir (Corona-Hernandez ve ark., 2013; Soukoulis ve ark., 2017; El-Sayed ve ark., 2020; El-Sayed ve ark., 2021).

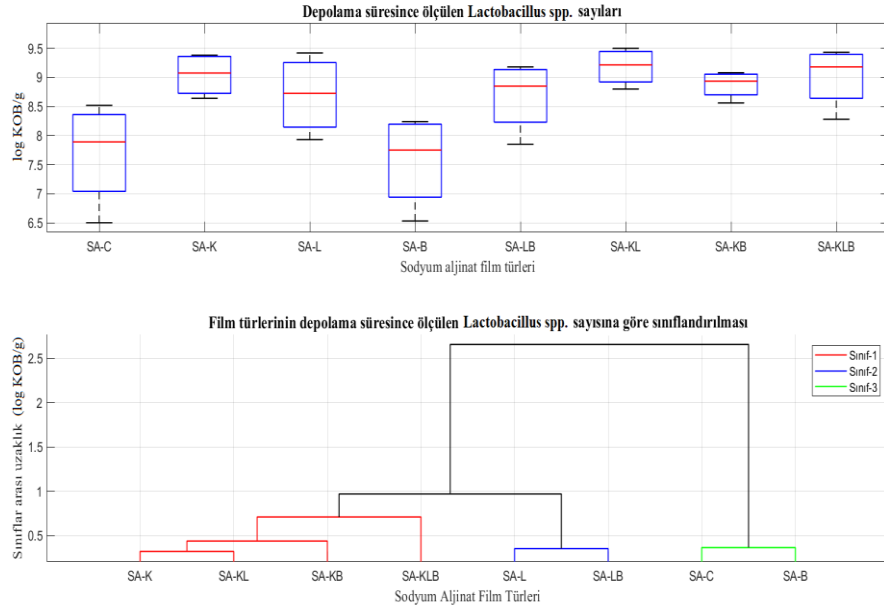


Şekil 4.10. Aktif SA filmler ile kaplanmış peynir örneklerinin depolama boyunca toplam maya-küf sayısı değişimleri (log KOB/g)

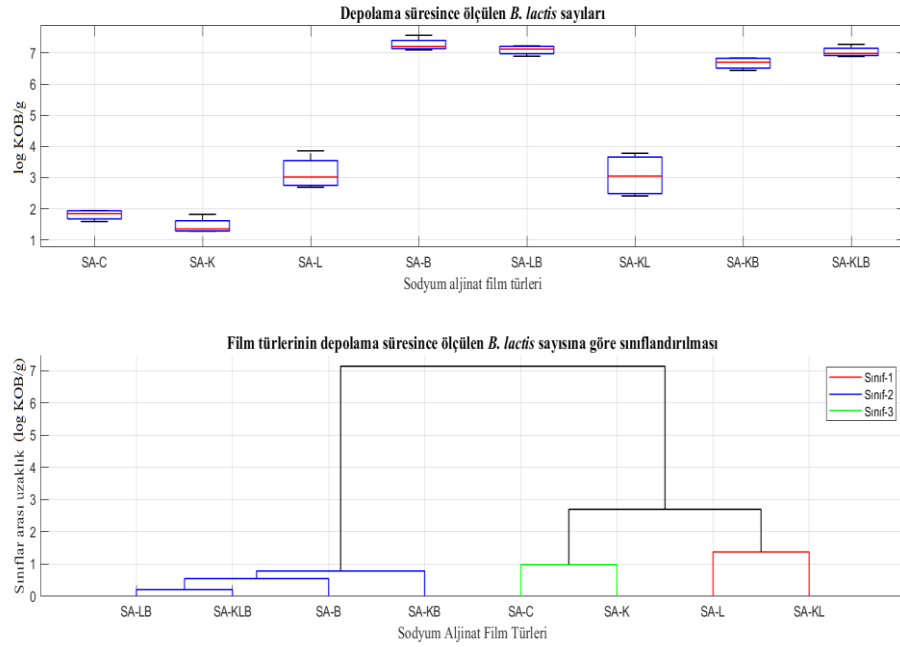
#### 4.4. Mikrobiyel Raf Ömrü Veri Analiz Sonuçları

SA film türlerinin peynir örneklerinin 45 günlük depolama süresince mikrobiyel raf ömrü üzerindeki etkileri, Şekil 4.11 - Şekil 4.15 arasında kutu grafiği (box-plot) ile gösterilmiş, kaç sınıfa ayrıldığı aglomeratif (yığıcı) hiyerarşik kümeleme yöntemi ile belirlenip oluşan sınıflar dendrogram grafiği (taksonomik ilişki ağacı) ile gösterilmiştir. Şekil 4.11 - Şekil 4.15'de de görüldüğü üzere, toplam laktik asit bakteri sayısı (LAB), *B. lactis* ve toplam maya-küf değerleri için ölçülen log KOB/g birimli mikrobiyel veriler 3 sınıfa ayrılırken, TMAB sayısı için 2 sınıfa ayrılmıştır. Beyaz peynir örneklerindeki Psikrotof bakteri sayımları için sınıf oluşmamıştır. Dolayısıyla, psikrotof bakteri sayıları için film kaplama türlerinin kontrol gurubuna göre kıyasla

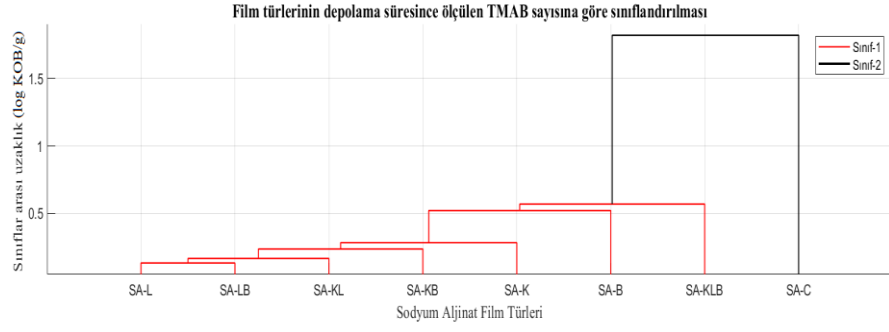
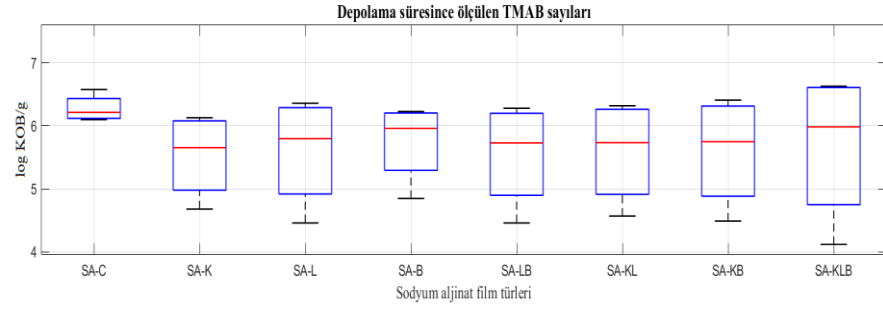
herhangi bir etkisi olmadığı, ancak LAB, *B. lactis*, toplam maya-küf ve TMAB sayıları için film kaplama türlerinin etkisi olduğu söylenebilmektedir.



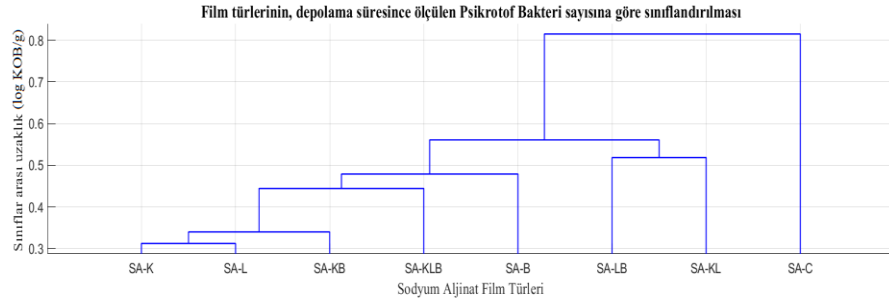
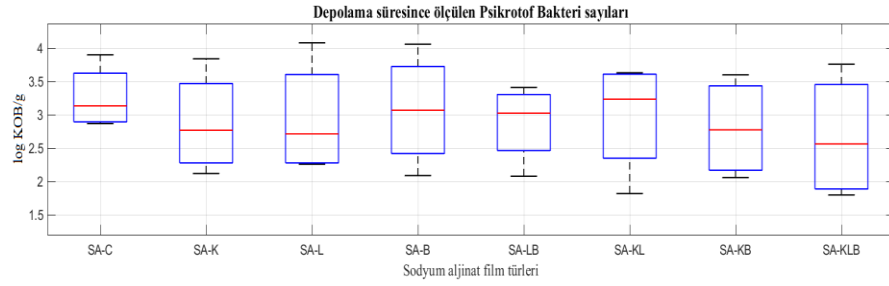
Şekil 4.11. Probiyotik mikroorganizmalarla zenginleştirilmiş SA filmlerin LAB sayısına göre sınıflandırılması



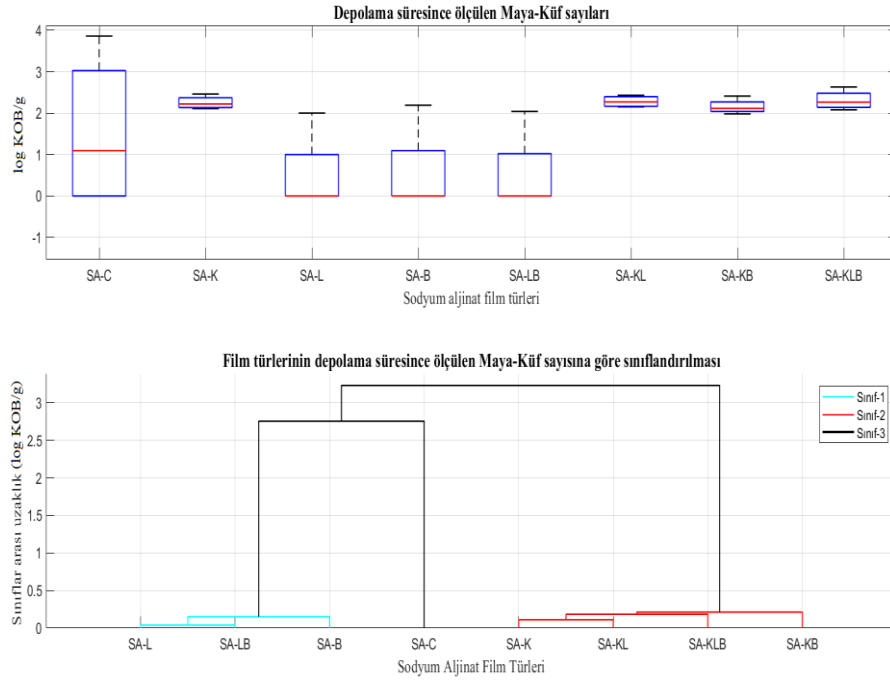
Şekil 4.12. Probiyotik mikroorganizmalarla zenginleştirilmiş SA filmlerin *B. lactis* sayısına göre sınıflandırılması



Şekil 4.13. Probiyotik mikroorganizmalarla zenginleştirilmiş SA filmlerin TMAB sayısına göre sınıflandırılması

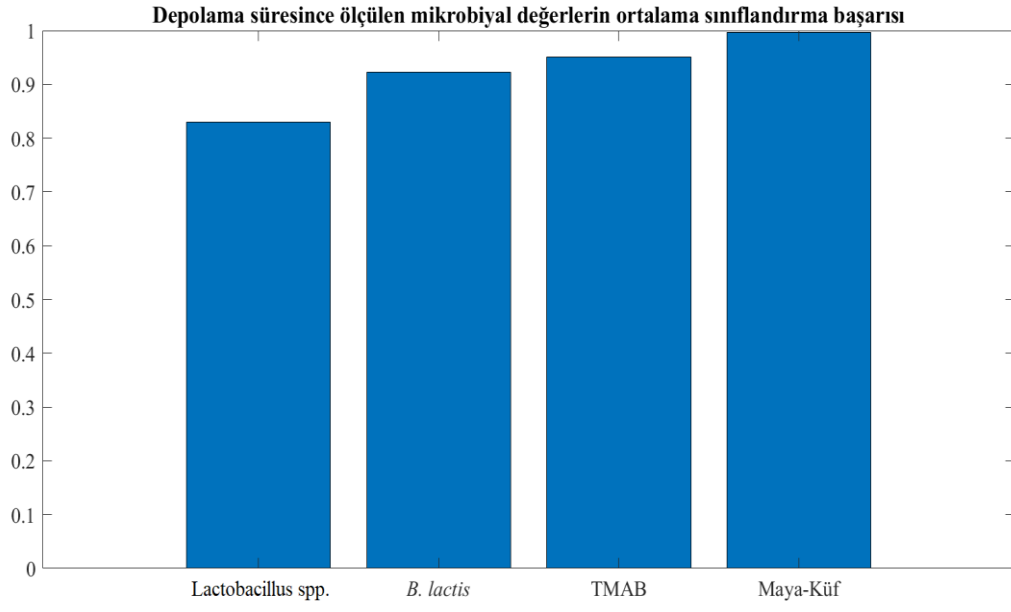


Şekil 4.14. Probiyotik mikroorganizmalarla zenginleştirilmiş SA filmlerin psikrotrof bakteri sayısına göre sınıflandırılması



Şekil 4.15. Probiyotik mikroorganizmalarla zenginleştirilmiş SA filmlerin toplam maya-küf sayısına göre sınıflandırılması

Elde edilen bulguların doğruluğunu değerlendirmek için ise sınıflandırmaların ortalama performansları Şekil 4.16’da verilmiştir. Şekil 4.16’daki silüet değerlerinden görüldüğü gibi sınıflandırmaların ortalama performansları %85 üzeridir. Sonuç olarak, sınıflandırmalar yeterince kalitelidir ve ayrışmalar tesadüfi değildir.



Şekil 4.16. Depolama sürecinde ölçülen mikrobiyel değerlerin ortalama sınıflandırma başarısı

## BÖLÜM 5. SONUÇ

Bu çalışmada, *Bifidobacterium animalis* ssp *lactis* B94, *Lactobacillus rhamnosus* GG ve kefir mayası (*L. kefir*, *L. delburueckii* ssp. *bulgaricus*, *Str. thermophilus*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. berevis*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *Kluyveromyces* sp., *Saccharomyces* sp.) ve bu kültürlerin kombinasyonları ile zenginleştirilmiş sodyum aljinat (SA) bazlı filmlerin üretimi, karakterizasyonu ve dilimlenmiş işlenmiş peynirin kaplanması için kullanımlarının araştırılması amaçlanmıştır.

Üretilen aktif SA film örneklerinin fizikokimyasal özellikleri incelendiğinde, probiyotik mikroorganizma ilavesinin filmlerin kalınlık değerlerinde artışa neden olduğu görülmektedir. Benzer şekilde film örneklerinin nem oranlarında ve yoğunluk değerlerinde de artış tespit edilmiştir. Filmlere probiyotik mikroorganizma ilavesi farklı mikroorganizma türüne göre değişmekle beraber, filmlerin hidrofobik özelliğinin artmasına neden olmuştur. Bu durum, bakteriyel yüzey polisakaritlerinin film hidrofilikliğini azaltması ile ilişkilendirilmiştir. Probiyotik mikroorganizma ilavesi ile film örneklerinin WVP değerleri artış göstermiş, mikroorganizma ilavesi ile film yüzeyinde oluşan olası gözenek ve delikler filmlerin kohezyonunu bozarak nem emilimini arttırmış olduğu düşünülmüştür. Bununla birlikte, probiyotik mikroorganizmalar tarafından indüklenen filmlerin görünümündeki renk değişiklikleri, istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Ayrıca, filmlerin UV geçirgenlik ve şeffaflık değerleri, SA filmlerin şeffaf ambalaj veya kaplama malzemesi olarak kullanılabilmesini göstermektedir.

Filmlerin mekaniksel özellikleri incelendiğinde, film örneklerinin TS ve %E değerleri ilave edilen probiyotik mikroorganizma türü ve kombinasyonuna göre değişkenlik

gösterdiği görülmektedir. İlave edilen probiyotik mikroorganizma ile artış gösteren TS ve %E değerleri, probiyotiklerin filmlerde plastikleştirici olarak rol oynadığını göstermektedir. Genel olarak, probiyotik aljinat filmler, yüksek TS ve düşük WVP'si nedeniyle gıda endüstrisinde önerilebilen filmler arasında yer almaktadır.

Filmlerin gözenek yapıları incelendiğinde, yalnızca *L. rhamnosus* kültürü ilave edilen sodyum aljinat film örneklerinin çatlak ve gözenek içermeyen pürüzsüz bir yüzey gösterirken, filmlere *B. lactis* kültürünün ilavesi filmin yüzey morfolojisinde gözenek oluşumu meydana gelmesine neden olduğu tespit edilmiştir. *B. lactis* kültürü ilave edilen film örneklerinde görülen gözenek ve pürüzlülük, bu filmlerin en düşük TS ve %E değerlerine sahip olması ile ilişkili olarak, mekanik özelliklerinde de değişime neden olmuştur. Benzer şekilde film formülasyonlarında kefir kültürünün kullanımı da film yapısında pürüzsüzlüğün azalmasına, gözenek oluşumuna neden olmuştur. Kefir ile beraber *L. rhamnosus* kültürü ilave edilen sodyum aljinat film örneklerinin film morfolojilerinin ise daha pürüzsüz bir yapı gösterdiği, mikroorganizmaların film yüzeyinde homojen olarak dağıldığı gözlemlenmiştir. Bu durumun *L. rhamnosus* kültürü ilave ile, sodyum aljinat ile *L. rhamnosus* kültürü arasında iyi bir moleküler arası etkileşimden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Filmlerdeki probiyotik mikroorganizma sayısı filmlerin kurutulması sonrasında azalma göstermiştir. Filmlerdeki kurutma sonrası probiyotik mikroorganizmalarının canlılık değerleri % 81,79 – 90,57 arasında değişim göstermiştir. Probiyotik mikroorganizmalarla zenginleştirilmiş SA filmler en güçlü antimikrobiyel ekiyi *S. aureus*'a karşı göstermiş iken, en düşük antimikrobiyel etkiyi *E.coli*'ye karşı göstermiştir. Elde edilen sonuçlar SA filmlerin probiyotik mikroorganizmalar tarafından üretilen ve patojenler üzerinde antimikrobiyel etkisi olan maddelerin salınımına izin verme yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir.

Farklı probiyotikler ile zenginleştirilmiş SA yenilebilir filmlerle kaplanmış beyaz peynir örneklerinde mikrobiyolojik değişiklikler buzdolabı koşullarında (+4°C'de, karanlık koşullarda) gerçekleştirilen 45 günlük depolama süresince değerlendirildiğinde, kontrol grup ile karşılaştırıldığında, tüm kaplanmış beyaz peynir

örnekleri için probiyotik suşların depolama süresince önemli ölçüde artış gösterdiğini ortaya konmuştur. Aktif SA filmler ile kaplanmış peynir örneklerinde ise 45. gün sonunda laktik asit bakterisi (LAB) sayısı 6,53 – 8,64 log KOB/g; *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* B94 sayısı 1,53 – 7,57 log KOB/g; TMAB sayısı 4,12- 6,58 log KOB/g; psikrotrof mikroorganizma sayısı 1,80- 2,87 log KOB/g ve toplam maya-küf sayıları ise 2,00 – 3,86 log KOB/g değerleri arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Aktif SA film türlerinin peynir örneklerinin 45 günlük depolama süresince mikrobiyel raf ömrü üzerindeki etkileri sınıflama yöntemlerine göre incelendiğinde, LAB, *B. lactis* ve toplam maya-küf için ölçülen mikrobiyel veriler 3 sınıfa ayrılırken, TMAB sayıları için 2 sınıfa ayrılmıştır. Psikrotrof bakteri sayımları için sınıf oluşmamıştır. Dolayısıyla, depolama süresi boyunca peynir örneklerinde tespit edilen psikrotrof grubu mikroorganizmalar için kullanılan film kaplama türlerinin kontrol gurubuna göre kıyasla herhangi bir etkisinin olmadığı, ancak LAB, *B. lactis*, toplam maya-küf ve TMAB için film kaplama türlerinin etkisi olduğu söylenebilmektedir.

Sonuç olarak, tez çalışması kapsamında elde edilen veriler ışığında, yenilebilir filmlerin probiyotikler gibi faydalı mikroorganizmaların gıdaya taşınması için kullanılabilir umut verici bir yöntem olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, elde edilen çalışma bulguları, ilerki çalışmalarda probiyotik mikroorganizmalar ile zenginleştirilen SA bazlı film örneklerinin farklı ürün uygulamaları ile ürün raf ömrü kalite analizleri hakkında yapılacak çalışmalara ışık tutulabilecektir.

## KAYNAKLAR

- Abedinia, A., Alimohammadi, F., Teymori, F., Razgardani, N., Saeidi Asl, M. R., Ariffin, F., Roslan, J. 2021. Characterization and cell viability of probiotic/prebiotics film based on duck feet gelatin: A novel poultry gelatin as a suitable matrix for probiotics. *Foods*, 10(8): 1761.
- Aguirre-Joya, J.A., Leon-Zapata, M.A.D., Alvarez-Perez, O.B., Torres-León, C., Nieto-Oropeza, D., Ventura-Sobrevila, J.M., Aguilar, M.A., Ruelas-Chacón, X., Rojas, R., Ramos-Aguiñaga, M.E., Aguilar C.N. 2018. İçinde: *Food Packaging and Preservation, Handbook of Food Bioengineering*. Elsevier Academic Press, UK, 1-61.
- Akkoç, N., Şanlıbaba, P., Akçelik, M. 2009. Bakteriyosinler: alternatif gıda koruyucuları. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 25(1-2): 59-70.
- Akman, P. K., Bozkurt, F., Dogan, K., Tornuk, F., Tamturk, F. 2021. Fabrication and characterization of probiotic *Lactobacillus plantarum* loaded sodium alginate edible films. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(1): 84-92.
- Andrade, R., Skurtys, O., Osorio, F. 2013. Drop impact behavior on food using spray coating: Fundamentals and applications. *Food Research International*, 54(1): 397-405.
- Anonim, Türk Gıda Kodeksi Gıda ile Temas Eden Madde ve Malzemelere Dair Yönetmelik. [www.mevzuat.gov.tr](http://www.mevzuat.gov.tr), Erişim Tarihi: 04.09.2022.
- Arzate-Vázquez, I., Chanona-Pérez, J.J., Calderón-Domínguez, G., Terres-Rojas, E., Garibay-Febles, V., Martínez-Rivas, A., Gutiérrez-López. 2012. Microstructural characterization of chitosan and alginates films by microscopy techniques and texture image analysis. *Carbohydrate Polymers*, 87: 289-299.
- Ashikin, W.H.N.S., Wong, T.W., Law, C.L. 2010. Plasticity of hot air-dried mannuronate- and guluronate-rich aljinate films. *Carbohydrate Polymers*, 81(1): 104-113.
- Bakry, N.F., Isa, M.I.N., Sarbon, N.M. 2017. Effect of sorbitol at different concentrations on the functional properties of gelatin/carboxymethyl cellulose (CMC)/chitosan composite films. *International Food Research Journal*, 24(4): 1753.
- Bambace, M.F., Alvarez M.V., Moreira M.D.R. 2019. Novel functional blueberries:

- fructo-oligosaccharides and probiotic lactobacilli incorporated into alginate edible coatings. *Food Research International*, 122: 653-660.
- Beghetto, V., Gatto, V., Conca, S., Bardella, N., Buranello, C., Gasparetto, G., Sole, R. 2020. Development of 4-(4, 6-dimethoxy-1, 3, 5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholinium chloride cross-linked carboxymethyl cellulose films. *Carbohydrate Polymers*, 249: 116810.
- Benita, S. 2005. *Microencapsulation Methods and Industrial Applications*. 2. Baskı, CRC Press, Boca Raton, 781.
- Blanco-Pascual, N., Montero, M.P., Gómez-Guillén, M.C. 2014. Antioxidant film development from unrefined extracts of brown seaweeds *Laminaria digitata* and *Ascophyllum nodosum*. *Food Hydrocolloids*, 37: 100-110.
- Burt, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
- Bustos, P., Bórquez, R. 2013. Influence of osmotic stress and encapsulating materials on the stability of autochthonous *Lactobacillus plantarum* after spray drying. *Drying Technology*, 31(1): 57-66.
- Bomzon, P. S. 2022. Sources, Origin and Characterization of Edible Packaging. In *Edible Food Packaging*. Springer, Singapore. 22-37.
- Campos, C.A., Gerschenson, L.N., Flores, S.K. 2011. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food Bioprocess Technology*, 4: 849-875.
- Ceylan, H. G., Atasoy, A. F. 2022. Optimization and characterization of prebiotic concentration of edible films containing *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12® and its application to block type processed cheese. *International Dairy Journal*, 134: 105443.
- Chichlowski, M., Croom, J., McBride, B., Havenstein, G., Koci, M. 2007. Metabolic and physiological impact of probiotics or directfedmicrobials on poultry: A brief review of current knowledge. *International Journal of Poultry Science*, 6(10): 694-704.
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., Khutoryanskiy, V. V. 2012. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162(1): 56-67.
- Corona-Hernandez, R.I., Alvarez-Parrilla, E., Lizardi-Mendoza, J., Islas-Rubio, A.R., de la Rosa, L.A., Wall-Medrano, A. 2013. Structural stability and viability of microencapsulated probiotic bacteria: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(6): 614-628.
- Da Silva, M. A., Bierhalz, A. C. K., Kieckbusch, T. G. 2009. Alginate and pectin

- composite films crosslinked with Ca<sup>2+</sup> ions: Effect of the plasticizer concentration. *Carbohydrate Polymers*, 77(4): 736–742.
- Das, A., Ray, S., Raychaudhuri, U., Chakraborty, R. 2014. Microencapsulation of probiotic bacteria and its potential application in food technology. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*. 7(1): 47-53.
- Demirci, M. 2009. Beslenme. Rebel Yayıncılık, 1. Baskı, Tekirdağ, 60-62.
- Denkova, R., Goranov, B., Teneva, D., Denkova, Z., Kostov, G. 2017. Antimicrobial activity of probiotic microorganisms: Mechanisms of interaction and methods of examination. İçinde: Mendez-Vilas A (ed) *Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs*, 1. Baskı, Wiley, Hoboken, 201–212.
- Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Research International*, 43: 2402-2408.
- Dianina, I.B., Jrb, A.G.O., Pimentelc, T.C., Hernandesa, N.F., Costaa, G.N. 2019. Edible films formulated with whey protein isolate and *L. casei* probiotic culture: Characterization and application in tomatoes and grapes. *Chemical Engineering Transactions*, 75: 469–474.
- Ebrahimi, B., Mohammadi, R., Rouhi, M., Mortazavian, A. M., Shojaee-Aliabadi, S., & Koushki, M. R. (2018). Survival of probiotic bacteria in carboxymethyl cellulose-based edible film and assessment of quality parameters. *LWT- Food Science Technology*, 87: 54-60.
- El-Sayed, H. S., El-Sayed, S. M., Mabrouk, A. M., Nawwar, G. A., Youssef, A. M. 2021. Development of eco-friendly probiotic edible coatings based on chitosan, aljinate and carboxymethyl cellulose for improving the shelf life of UF soft cheese. *Journal of Polymers and the Environment*, 29(6): 1941-1953.
- El-Sayed, S. M., El-Sayed, H.S. 2020. Production of UF-soft cheese using probiotic bacteria and *Aloe vera* pulp as a good source of nutrients. *Annals of Agricultural Sciences*, 65:13–20.
- El-Sayed, S.M., El-Sayed, H.S., Ibrahim, O.A., Youssef, A.M. 2020. Rational design of chitosan/guar gum/zinc oxide biocomposites based on *Roselle calyx* extract for Ras cheese coating. *Carbohydrate Polymers*, 239: 116234.
- Embuscado, M.E., Huber, K.C. 2009. Edible films and coatings for food applications. 1. Baskı, Springer, New York, NY, USA, 240–420.
- Emmambux, M.N., Stading, M. 2007. In situ tensile deformation of zein films with plasticizers and filler materials. *Food Hydrocolloids*, 21(8): 1245-1255.
- Engin, M. S., Zamahay, F., Kalkan, S., Otağ, M. R. 2022. Physical, mechanical, and

- bioactive properties of edible film based on sodium alginate enriched with *Lythrum salicaria* L. extract. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(6): e16620.
- Espitia, P. J.P, Batista, R.A., Azeredo, H.M.C., Otoni, C.G. 2016. Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings. *Food Research International*, 90: 42-52.
- FAO. 2006. Probiotics in food health and nutritional properties and guidelines for evaluation. *Food and Nutrition Paper*, 85: 50.
- Fernandes, M.F., Guimarães, J.T., Pimentel, T.C., Esmerino, E.A., Freitas M.Q., Carvalho, C.W.P. 2020a. Edible whey protein films and coatings added with prebiotic ingredients. *İçinde: Agri-Food Industry Strategies for Healthy Diets and Sustainability*. 1. Baskı, Elsevier Academic Press, UK. 177-193.
- Fernandes, L. M., Guimarães, J. T., Silva, R., Rocha, R. S., Coutinho, N. M., Balthazar, C. F., Cruz, A. G. 2020b. Whey protein films added with galactooligosaccharide and xylooligosaccharide. *Food Hydrocolloids*, 104: 105755.
- Franssen, L.R., Krochta, J.M. 2003. Natural antimicrobials for the minimal processing of foods. *İçinde: Edible Coatings Containing Natural Antimicrobials for Processed Foods*. 1. Baskı, Woodhead Publishing Ltd, UK, 250-262.
- Fu, N., Chen, X. D. 2011. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International*, 44(5): 1127-1149.
- Galus, S., Kadzińska, J. 2015. Food applications of emulsion-based edible films and coatings. *Trends in Food Science and Technology*, 45(2): 273-283.
- Galus, S., Lenart, A. 2013. Development and characterization of composite edible films based on sodium alginate and pectin. *Journal of Food Engineering*, 115: 459-465.
- Gennadios, A., Hanna, M.A., Kurth, L.B. 1997. Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: A review. *LWT-Food Science and Technology*, 30(4): 337-350.
- Gialamas, H., Zinoviadou, K. G., Biliaderis, C. G., Koutsoumanis, K. P. 2010. Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Research International*, 43(10): 2402-2408.
- Gibson, G., Hutkins, R., Sanders, M.E., Prescott, S.L., Reimer, R., Salminen, S.J., Scott, K., Stanton, C, Swanson, K.S., Cani, P.D., Verbeke, K., Reid, G. 2017. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAAP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14: 491-502.

- Gibson, G., Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6): 1401-1412.
- Gu, Y., Zhou, G., Qin, X., Huang, S., Wang, B., Cao, H. 2019. The potential role of gut mycobiome in irritable bowel syndrome. *Frontiers in Microbiology*. 10: 1894.
- Guimarães, A., Abrunhosa, L., Pastrana, L.M., Cerqueira, M.A. 2018. Edible films and coatings as carriers of living microorganisms: A new strategy towards biopreservation and healthier foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(3): 594-614.
- Guimarães, A., Ramos, Ó., Cerqueira, M., Venâncio, A., Abrunhosa, L. 2020. Active whey protein edible films and coatings incorporating *Lactobacillus buchneri* for *Penicillium nordicum* control in cheese. *Food and Bioprocess Technology*, 13(6): 1074-1086.
- Hamzah, H.M., Osman, A., Tan, C.P., Ghazali, F.M. 2013. Carrageenan as an alternative coating for papaya (*Carica papaya* L. cv. Eksotika). *Postharvest Biology and Technology*, 75: 142-146.
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Veld, J.H.J.H. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41: 85-101.
- Huntrakul, K., Harnkarnsujarit, N. 2020. Effects of plasticizers on water sorption and aging stability of whey protein/carboxy methyl cellulose films. *Journal of Food Engineering*, 272: 109809.
- Hurtado-Romero, A., Toro-Barbosa, M., Garcia-Amezquita, L.E., García-Cayuela, T. 2020. Innovative technologies for the production of food ingredients with prebiotic potential: Modifications, applications, and validation methods. *Trends in Food Science and Technology*, 104: 117-131.
- Jansson, A., Thuvander, F. 2004. Influence of thickness on the mechanical properties for starch films. *Carbohydrate Polymers*, 56: 499-503.
- Kalantarmahdavi, M., Khanzadi, S., Salari, A. 2021. Edible films incorporating with *Lactobacillus plantarum* based on sourdough, wheat flour, and gelatin: Films characterization and cell viability during storage and simulated gastrointestinal condition. *Starch-Stärke*, 73(9-10): 2000268.
- Kalkan, S., Otağ, M. R., Engin, M. S. 2020. Physicochemical and bioactive properties of edible methylcellulose films containing *Rheum ribes* L. extract. *Food Chemistry*, 307: 125524.
- Kanmani, P., Lim, S. T. 2013. Development and characterization of novel probiotic-

- residing pullulan/starch edible films. *Food Chemistry*, 141(2): 1041-1049.
- Karimi, M., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., Shahabi-Ghahfarrokhi, I., Chamani, J. 2020. Development of active antimicrobial poly (l-glutamic) acid-poly (l-lysine) packaging material to protect probiotic bacterium. *Polymer Testing*, 83: 106338.
- Khodaei, D., Hamidi-Efsani, Z. 2019. Influence of bioactive edible coatings loaded with *Lactobacillus plantarum* on physicochemical properties of fresh strawberries. *Postharvest Biology and Technology*. 156: 110944.
- Khodaei, D., Hamidi-Efsani, Z., Lacroix, M. 2020. Gelatin and low methoxyl pectin films containing probiotics: film characterization and cell viability. *Food Bioscience*, 36: 100660.
- Kılıç, G. B., Karahan, A. G. 2010. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ve laktik asit bakterilerinin tanısında kullanılması. *Gıda/The Journal of Food*, 35(6): 445-452.
- King, A.H. 1995. Encapsulation of food ingredients. İçinde: *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*, ACS Symposium Series, ACS Publications, 26-39.
- Korhonen, H. 2002. Technology options for new nutrition concepts. *International Journal of Dairy Technology*, 55(2): 79-88.
- Lacroix, M., Vu, K.D. 2014. Edible coating and film materials: Proteins. İçinde: *Innovations in Food Packaging*. 2. Baskı, Academic Press, Plano, Texas, USA, 277-304.
- Lahteenmaki, L., Ledebøer, A. 2007. Probiotics-the consumer perspective. *Food Science and Technology Bulletin, Functional Foods*, 4(5): 43-49.
- Laohakunjit, N, Kerdchoechuen, O. 2007. Aroma enrichment and change during storage of non-aromatic milled rice coated with extracted natural flavor. *Food Chemistry*, 101: 339-344.
- Le Tien, C., Letendre, M., Ispas-Szabo, P., Mateescu, M.A., Delmas-Patterson, G., Yu., H.L. Lacroix, M. 2000. Development of biodegradable films from whey proteins by cross-linking and entrapment in cellulose. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48: 5566-5575.
- López de Lacey, A.M., López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M.C., Montero, P. 2012. Functionality of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* incorporated to edible coatings and films. *Innovation Food Science and Emerging Technologies*, 16: 277-282.
- López de Lacey, A.M., López-Caballero, Montero, P. 2014. Agar film containing green tea extract and probiotic bacteria for extending fish shelf-life. *LWT-Food*

Science and Technology, 55: 559-564.

- 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.
- Marin A, Plotto A, Atares L, Chiralt A. 2019. Lactic acid bacteria incorporated into edible coatings to control fungal growth and maintain postharvest quality of grapes. *HortScience* 54(2): 337–343.
- Martín-Belloso, O., Rojas-Graü, A., Soliva-Fortuny, R. 2009. Delivery of flavor and active ingredients using edible films and coatings. *İçinde: Edible Films and Coatings for Food Applications*. 1. Baskı, Springer, New York, NY, USA, 295-313.
- Martins, J.T., Cerqueira, M.A., Souza, B.W.S., Carmo Avides, M.D.O., Vicente, A.A. 2010. Shelf life extension of ricotta cheese using coatings of galactomannans from nonconventional sources incorporating nisin against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 58: 1884–1891.
- Mastromatteo, M., Conte, A., Nobile, M.A. 2012. Packaging strategies to prolong the shelf life of fresh carrots (*Daucus carota* L.). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 13: 215-220.
- McGuire, R. G., Baldwin, E.A. 1994. Composition of cellulose coatings affect populations of yeasts in the liquid formulation and on coated grapefruits. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 107: 293-297.
- McGuire, R.G., Dimitroglou, D.A. 1999. Evaluation of shellac and sucrose ester fruit coating formulations that support biological control of post-harvest grapefruit decay. *Biocontrol Science and Technology*, 9: 53-65.
- McGuire, R.G., Hagenmaier, R.D. 1996. Shellac coatings for grapefruits that favor biological control of *Penicillium digitatum* by *Candida oleophila*. *Biological Control*, 7(1): 100-106.
- McHugh, D.J. 1987. Production, properties and uses of alginates. *Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds*. FAO. Fisheries Technical Paper, 288: 58-115.
- Mei, Y., Zhao, Y. 2003. Barrier and mechanical properties of milk protein-based edible films containing nutraceuticals. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51: 1914-1918.
- Mei, Y., Zhao, Y., Furr, H.C. 2002. Using edible coating to enhance nutritional and sensory qualities of baby carrots. *Journal of Food Science*, 67(5): 1964-1968.
- Moayednia, N., Ehsani, M.R., Emamdjomeh, Z., Asadi, M.M., Mizani, M., Mazaheri,

- A.F. 2010. Effect of refrigeration on viability of immobilized probiotic bacteria in alginate coat of strawberry. *World Applied Sciences Journal*, 10(4): 472-476.
- Nagar, M., Sharanagat, V. S., Kumar, Y., Singh, L. 2020. Development and characterization of elephant foot yam starch–hydrocolloids based edible packaging film: Physical, optical, thermal and barrier properties. *Journal of Food Science and Technology*, 57(4): 1331-1341.
- Nisar, T., Alim, A., Iqbal, T., Iqbal, M., Tehseen, S., Zi-Chao, W. 2022. Functionality of different probiotic strains embedded in citrus pectin based edible films. *International Journal of Food Science and Technology*, 57: 1005-1015.
- Odila Pereira, J., Soares, J., Costa, E., Silva, S., Gomes, A., Pintado, M. 2019. Characterization of edible films based on alginate or whey protein incorporated with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and prebiotics. *Coatings*, 9(8): 493.
- Oliveira-Alcântara, A. V., Abreu, A. A. S., Gonçalves, C., Fuciños, P., Cerqueira, M. A., Gama, F. M., Azeredo, H. M. 2020. Bacterial cellulose/cashew gum films as probiotic carriers. *LWT- Food Science Technology*, 130: 109699.
- Orozco-Parra, J., Mejía, C. M., Villa, C. C. 2020. Development of a bioactive synbiotic edible film based on cassava starch, inulin, and *Lactobacillus casei*. *Food Hydrocolloids*: 104, 105754.
- Özdekan Ocak, Ö., Demircan, B. 2020. Lezzet bileşenleri ve biyoaktif maddelerin yenilebilir film ve kaplamalar ile gıda sisemlerinde taşınması ve işlevsellik etkileri. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilim Dergisi*, 26(7): 1245-1256.
- Pandhi, S., Kumari, A., Alam, T. 2019. Probiotic edible films and coatings: concerns, applications and future prospects. *Journal of Packaging Technology and Research*, 3(3): 261-268.
- Paulo, A.F.S., Baú T. R., Ida, E.I.; Shirai, M.A. 2021. Edible coatings and films with incorporation of prebiotics-a review. *Food Research International*, 148: 1100629.
- Pavli, F., Argyr, A.A., Nychas, G.J.E., Tassou, C., Chaorianopoulos, N. 2018. Use of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for monitoring the shelf life of ham slices packed with probiotic supplemented edible films after treatment with High Pressure Processing. *Food Research International*, 106: 1061-1068.
- Pech-Canul, A. D. L. C., Ortega, D., García-Triana, A., González-Silva, N., Solis-Oviedo, R. L. 2020. A brief review of edible coating materials for the microencapsulation of probiotics. *Coatings*, 10(3): 197.
- Pereira, J. O., Soares, J., Costa, E., Silva, S., Gomes, A., Pintado, M. 2019. Characterization of edible films based on algininate or whey protein incorporated

- with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and prebiotics. *Coatings*, 9(8): 493.
- Pereira, J. O., Soares, J., Monteiro, M.J.P., Amaro, A., Gomes, A., Pintado, M. 2019. Cereal bars functionalized through *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and inulin incorporated in edible coatings of whey protein isolate or alginate. *Food Function*, 10: 6892-6902.
- Pereira, J.O., Soares, J., Sousa, S., Madureira, A.R., Gomes, A., Pintado, M. 2016. Edible films as carrier for lactic acid bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 73: 543-550.
- Perez-Gago, M.B., Rhim, J.W. 2014. Edible coating and film materials: lipid bilayers and lipid emulsions. *Çinde: Innovations in Food Packaging*. 2. Baskı, Academic Press, Plano, Texas, USA, 325-350.
- Petkoska, A. T., Daniloski, D., D'Cunha, N. M., Naumovski, N., Broach, A. T. 2021. Edible packaging: Sustainable solutions and novel trends in food packaging. *Food Research International*, 140: 109981.
- Phan, T. D., Debeaufort, F., Luu, D., Voilley, A. 2005. Functional properties of edible agar-based and starch-based films for food quality preservation. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53(4): 973–981.
- Phovisay, S., Siriwoharn, T., Surawang, S. 2018. Effect of drying process and storage temperature on probiotic *Lactobacillus casei* in edible films containing prebiotics. *Food and Applied Bioscience Journal*, 6(Special): 105-116.
- Piermaria, J., Diosma, G., Aquino, C., Garrote, G., Abraham, A. 2015. Edible kefiran films as vehicle for probiotic microorganisms. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 32: 193-199.
- Popović, M., Stojanović, M., Veličković, Z., Kovačević, A., Miljković, R., Mirković, N., Marinković, A. 2021. Characterization of potential probiotic strain, *L. reuteri* B2, and its microencapsulation using alginate-based biopolymers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183: 423-434.
- Ramos O.L, Silva S.I., Soares J.C., Fernandes J.C., Poças M.F., Pintado M.E., Malcata, F.X. 2012a. Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. *Food Research International*, 45(1): 351-361.
- Ramos, O.L., Pereira, J.O., Silva, S.I., Fernandes, J.C., Franco, M.I., Lopes-da-Silva, J.A. 2012b. Evaluation of antimicrobial edible coatings from a whey protein isolate base to improve the shelf life of cheese. *Journal of Dairy Science*, 95(11): 6282-6292.
- Resa, C. P. O., Jagus, R. J., Gerschenson, L. N. 2014. Effect of natamycin, nisin and

- glycerol on the physicochemical properties, roughness and hydrophobicity of tapioca starch edible films. *Materials Science and Engineering: C*, 40: 281-287.
- Rhim, J.W. 2004. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *LWT-Food Science and Technology*, 37: 323-330.
- Romano, N., Tavera-Quiroz, M. J., Bertola, N., Mobili, P., Pinotti, A., Gómez-Zavaglia, A. 2014. Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64: 560-566.
- Roy, S., Rhim, J. W. 2020. Carboxymethyl cellulose-based antioxidant and antimicrobial active packaging film incorporated with curcumin and zinc oxide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 148: 666-676.
- Sahraee, S., Milani, J.M., Regenstein, J.M., Kafil, H.S. 2019. Protection of foods against oxidative deterioration using edible films and coatings: a review. *Food Bioscience*, 32: 100451.
- Sánchez-González, L., Saavedra, J.I.Q., Chiralt, A. 2013. Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing *Lactobacillus plantarum*. *Food Hydrocolloids*, 33(1): 92-98.
- Sanders, M.E., Benson, A., Lebeer, S., Merenstein, D.J., Klaenhammer, T.R. 2018. Shared mechanisms among probiotic taxa: implications for genera probiotic claims. *Current Opinion in Biotechnology*. 49: 207-216.
- Schrezenmeir, J., Vrese, M. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 361-364.
- Schwab, C., Vogel, R., Gänzle, M. G. 2007. Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1. 106 during freeze-drying. *Cryobiology*, 55(2): 108-114.
- Settler-Ramírez, L., López-Carballo, G., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P. 2019. Antilisterial properties of PVOH-based films embedded with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Food Hydrocolloids*, 87: 214-220.
- Shahrampour, D., Khomeiri, M., Razavi, S. M. A., Kashiri, M. 2020. Development and characterization of alginate/pectin edible films containing *Lactobacillus plantarum* KMC 45. *LWT- Food Science Technology*, 118: 108758.
- Singh, P., Magalhães, S., Alves, L., Antunes, F., Miguel, M., Lindman, B., Medronho, B. 2019. Cellulose-based edible films for probiotic entrapment. *Food Hydrocolloids*, 88: 68-74.
- Sirviö, J.A., Kolehmainen, A., Liimatainen, H., Niinimäki, J., Hormi, O.E.O. 2014. Biocomposite cellulose-alginate films: Promising packaging materials. *Food*

Chemistry, 151: 343-351.

- Soukoulis, C., Behboudi-Jobbehdar, S., Macnaughtan, W., Parmenter, C., Fisk, I.D. 2017. Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG incorporated in edible films: impact of anionic biopolymers and whey protein concentrate. Food Hydrocolloids, 70: 345-355.
- Soukoulis, C., Behboudi-Jobbehdar, S., Yonekura, L., Parmenter, C., Fisk, I.D. 2014a. Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in prebiotic edible films. Food Chemistry, 159: 302-308.
- Soukoulis, C., Singh, P., Macnaughtan, W., Parmenter, C., Fisk, I.D. 2016. Compositional and physicochemical factors governing the viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG embedded in starch-protein based edible films. Food Hydrocolloids, 52: 876-887.
- Soukoulis, C., Yonekura, L., Gan, H. H., Behboudi-Jobbehdar, S., Parmenter, C., Fisk, I. 2014b. Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread. Food Hydrocolloids, 39: 231-242.
- Stanton, C., Desmond, C., Fitzgerald, G., Ross, R.P. 2003. Probiotic health benefits-reality or myth. Australian Journal of Dairy Technology, 58(2): 107.
- Tahir, H.E., Xiaobo, Z., Mahunu, G.K., Arslan, M., Abdalhai, M., Zhihua, L. 2019. Recent Developments in gum edible coating applications for fruits and a vegetables preservation: a review. Carbohydrate Polymers, 224: 115141.
- Tang, Y., Xie, F., Zhang, D., Zhu, M., Liu, L., Liu, P., Gu, C. 2015. Physical properties and prebiotic activity of maize starch-based functional films. Starch-Stärke, 67(1-2): 124-131.
- Tapia, M.S., O., Rojas-Graü, Rodríguez, F.J., Ramírez, J., Carmona, A., Martín-Belloso, O. 2007. Alginate-and gellan-based edible films for probiotic coatings on fresh-cut fruits. Journal of Food Science, 72(4): 190-196.
- Tavassoli-Kafrani, E., Shekarchizadeh, H., Masoudpour-Behabadi, M. 2016. Develoepment of edible films and coatings from alginates and carregenans. Carbohydrate Polymers, 137: 360-374.
- Tharanathan, R.N., 2003. Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future. Trends in Food Science and Technology, 14: 71-78.
- Üçok, G. 2020. Ekşi hamurlardan izole edilen *Lactobacillus plantarum* türünün dondurarak kurutulmasında farklı sütçülük yan ürünlerinin kriyoprotektif rollerinin belirlenmesi. Necmettin Erbakan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği ABD, Doktora Tezi.
- Valdés, A., Burgos, N., Jiménez, A., Garrigós, M.C. 2015. Natural pectin

- polysaccharides as edible coatings. *Coatings*, 5(4): 865-886.
- Vidhyalakshmi, R., Bhakvaraj, R., Subhasree, R.S. 2009. Encapsulation the future of probiotics- a review. *Advances in Biological Research*, 3(3-4): 96-103.
- Vural, A. 2004. Fonksiyonel gıdalar ve sağlık üzerine etkileri. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi*, 6: 51-58.
- Wang, L., Auty, M. A., Kerry, J. P. 2010. Physical assessment of composite biodegradable films manufactured using whey protein isolate, gelatin and sodium alginate. *Journal of Food Engineering*, 96(2): 199-207.
- Yonekura, L., Sun, H., Soukoulis, C., Fisk, I. 2014. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after in vitro digestion. *Journal of Functional Foods*, 6: 205-214.
- Zabihollahi, N., Alizadeh, A., Almasi, H., Hanifian, S., Hamishekar, H. 2020. Development and characterization of carboxymethyl cellulose based probiotic nanocomposite film containing cellulose nanofiber and inulin for chicken fillet shelf life extension. *International Journal of Biological Macromolecules*, 160: 409-417.
- Zactiti, E.M., Kieckbusch, T.G. 2006. Potassium sorbate permeability in biodegradable alginate films: Effect of antimicrobial agent concentration and crosslinking degree. *Journal of Food Engineering*. 77(3): 462-467.
- Zehir, D. 2017. Tarhanadan izole edilen bazı laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakaritlerin karakterizasyonu. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği ABD, Yüksek Lisans Tezi.
- Zhang, Y., Rempel, C., Mclare, D. 2014. Edible coating and film materials: Carbohydrates. İçinde: *Innovations in Food Packaging*. 2. Baskı, Academic Press, Plano, Texas, USA,305-323.
- Zhong, Y., Cavender, G., Zhao, Y. 2014. Investigation of different coating application methods on the performance of edible coatings on Mozzarella cheese. *LWT - Food Science Technology*, 56: 1-8.
- Zoghi, A., Khosravi-Darani, K., Mohammadi, R. 2020. Application of edible films containing probiotics in food products. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 15(4): 307-320.

## ÖZGEÇMİŞ

Şirin YILMAZ ÇOPUR, 2003 yılında Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği bölümünden mezun olarak Gıda Mühendisi ünvanını almıştır. 2005 yılında o günkü adıyla Tarım ve Köyişleri Bakanlığında Gıda Kontrol Görevlisi olarak göreve başlamıştır. 2010 yılında Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Mühendislik Anabilim Dalı Gıda Mühendisliğinde başlayıp ara verdiği yüksek lisans eğitimine 2019 yılı itibariyle Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyosüreç Mühendisliği Anabilim Dalı'nda devam etmektedir. Halen Çekmeköy İlçe Tarım Müdürlüğünde Gıda Kontrol Görevlisi olarak çalışmaya devam etmektedir.