

**BAZI ESANSİYEL YAĞLARLA ANTİFUNGAL
YENİLEBİLİR ZEİN FİLMİ GELİŞTİRİLMESİ
VE KASE MARGARİNE UYGULANMASI**

Çiğdem MECİTOĞLU GÜÇBİLMEZ

Doktora Tezi

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ömer ÖKSÜZ

II. Danışman: Prof. Dr. Muhammet ARICI

2014

T.C.

NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**BAZI ESANSİYEL YAĞLARLA ANTİFUNGAL YENİLEBİLİR ZEİN FİLMİ
GELİŞTİRİLMESİ VE KASE MARGARİNE UYGULANMASI**

Çiğdem MECİTOĞLU GÜÇBİLMEZ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Ömer ÖKSÜZ

II. DANIŞMAN: Prof. Dr. Muhammet ARICI

TEKİRDAĞ-2014

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Ömer ÖKSÜZ danışmanlığında, Çiğdem MECİTOĞLU GÜÇBİLMEZ tarafından hazırlanan “Bazı Esansiyel Yağlarla Antifungal Yenilebilir Zein Filmi Geliştirilmesi ve Kase Margarine Uygulanması” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Doktora tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Burhan ARSLAN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Ömer ÖKSÜZ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Murat TAŞAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Tuncay GÜMÜŞ

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Muhammet Zeki DURAK

İmza :

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI ESANSİYEL YAĞLARLA ANTİFUNGAL YENİLEBİLİR ZEİN FİLMİ GELİŞTİRİLMESİ VE KASE MARGARİNE UYGULANMASI

Çiğdem MECİTOĞLU GÜÇBİLMEZ

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ömer ÖKSÜZ

II. Danışman: Prof. Dr. Muhammet ARICI

Bu araştırmada, birtakım esansiyel yağların ilavesiyle elde edilen zein filmlerin bazı küf ve mayalar üzerine antifungal etkileri ile bu filmlerin margarin sanayiinde problem oluşturan *Aspergillus fumigatus*'un inhibisyonu için kullanım olanakları incelenmiştir. Bu amaçla bazı esansiyel yağların yenilebilir özellikteki zein film çözeltisi içerisine eklenerek, fonksiyonel film elde edilmesi gerçekleştirilmiş ve elde edilen bu filmin margarine uygulanarak, depolama süresince küf gelişimi ve oksidasyon oluşumuna etkileri incelenmiştir. Araştırmanın ilk aşamasında; farklı konsantrasyonda kekik (*Thymus vulgaris*), defne (*Laurus nobilis*) ve portakal (*Citrus sinensis*) esansiyel yağlarını tek başlarına ve kombinasyonlarını içeren zein filmlerin denemede kullanılan küf ve mayalar üzerine inhibitör etkileri, inhibisyon zon çapları ölçülmek suretiyle belirlenmiştir. Elde edilen verilerden; kekik esansiyel yağı ve kekik-defne esansiyel yağlarını birlikte içeren filmlerin, önceki çalışmalarda kullanılan margarinlerden izole edilmiş sıcaklığa dayanıklı *Aspergillus fumigatus*'a karşı çok etkili olduğu tespit edilmiştir. Defne esansiyel yağının radikal yakalama aktivitesinin, portakal esansiyel yağına göre daha fazla olduğunun belirlenmesiyle birlikte; raf ömrü çalışmalarında margarinin *Aspergillus fumigatus* ile kontaminasyonuna ve kekik ile defne esansiyel yağlarının zein film içerisinde birlikte kullanılmasına karar verilmiş ve *Aspergillus fumigatus*'a karşı film çözeltilerinin içerdiği minimum inhibisyon konsantrasyonları belirlenmiştir. Araştırmanın ikinci aşamasında ise; raf ömrü çalışması için pilot tesiste üretilen margarinler, beş farklı grup olarak hazırlanmış olup, depolama süresince *Aspergillus fumigatus*'un inhibisyon durumu ile diğer kimyasal özellikleri incelenmiştir. Depolama sonunda üç margarin grubunda duyu analizi gerçekleştirilmiştir. Araştırmanın üçüncü aşamasında; üretilen filmlerin mekanik özellikleri incelenmiştir. Gerilme direncini en çok kekik esansiyel yağı içeren film göstermiş olup, en fazla uzama yüzdesine sahip film ise potasyum sorbat içeren zein film olarak belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Antifungal aktivite, Radikal yakalama aktivitesi, Esansiyel yağlar, Margarin, Mekanik özellik, Zein film

2014, 130 sayfa

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

DEVELOPMENT OF ANTIFUNGAL EDIBLE ZEIN FILM WITH SOME ESSENTIAL OILS AND APPLICATION TO BOWL MARGARINE

Çiğdem MECİTOĞLU GÜÇBİLMEZ

Namık Kemal University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Ömer ÖKSÜZ

Co-Supervisor: Prof. Dr. Muhammet ARICI

In this research, antifungal effects of zein films, obtained by incorporation of some essential oils, over some mold and yeasts and possibility of using these films for the inhibition of *A. fumigatus* which constitutes problems at margarine industry was searched. For this purpose, obtaining functional film by incorporating some essential oils to edible zein film solutions was carried out and by applying this obtained film to margarine, the effect over mold growth and oxidation formation during storage was observed. At the first stage of investigation, inhibitory effects of zein films including thyme (*Thymus vulgaris*), laurel (*Laurus nobilis*) and orange (*Citrus sinensis*) essential oils alone or the combinations of these essential oils together at different concentrations were determined over mold and yeasts used in essay, by measuring inhibition zone diameter. From the obtained data, films containing thyme essential oil, thyme-laurel essential oils together were determined very effective against heat resistant *Aspergillus fumigatus* isolated from margarines used in previous studies. By determining the radical scavenging activity of laurel essential oil was higher than orange essential oil, for shelf life studies, contamination of margarine with *Aspergillus fumigatus* and use of thyme and laurel essential oils together in zein film were decided and minimum inhibition concentrations that zein film solutions contained were determined against *Aspergillus fumigatus*. At the second stage of investigation, margarines produced in pilot plant, were prepared as five different groups and investigated the case of *A. fumigatus* inhibition and other chemical properties during storage. At the end of storage, sensory analysis were performed in three groups of margarine. At the third stage of investigation, mechanical properties of produced films were searched. Film containing thyme essential oil showed highest tensile strength whereas film having most elongation percent value was determined as zein film including potassium sorbate.

Key words: Antifungal activity, Radical scavenging activity, Essential oils, Margarine, Mechanical properties, Zein film.

2014, 130 pages

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGE DİZİNİ.....	vi
ŞEKİL DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
TEŞEKKÜR.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Margarin Tanımı ve Özellikleri	4
2.2 Margarin Üretimi	4
2.3 Yemeklik Yağlarda Oksidasyon ve Mikrobiyal Bozulma.....	5
2.3.1 Oksidasyonun oluşumu.....	6
2.3.2 Mikrobiyal bozulmalar	7
2.4 Yenilebilir Filmlerin Tanımı, Tarihçesi ve Özellikleri	7
2.5 Yenilebilir Film Yapım Yöntemi.....	9
2.6 Yenilebilir Film Çeşitleri	10
2.6.1 Protein yenilebilir filmleri	10
2.6.1.1 Zein film	11
2.6.1.2 Peyniraltı suyu proteinleri filmi	12
2.6.1.3 Jelatin film	12
2.6.2 Polisakkarit yenilebilir filmler	13
2.6.2.1 Alginat filmler	14
2.6.2.2 Nişasta filmler.....	15
2.6.2.3 Kitosan yenilebilir film.....	15
2.6.3 Lipid yenilebilir filmler	17
2.6.3.1 Asetilenmiş monogliseritler	18
2.6.3.2 Mumlar	18
2.6.4 Kompozit filmler	18
2.7 Aktif Ambalajlama	18
2.7.1 Antimikrobiyal paketleme ve çeşitleri.....	19
2.7.1.1 Uçucu antimikrobiyal ajanları içeren kesecik ve pedlerin paketlerin içerisine eklenmesi	20
2.7.1.2 Uçucu ve uçucu olmayan antimikrobiyallerin direkt olarak polimerlere katılması.....	21
2.7.1.3 Polimerlerin yüzeylerinin üzerine antimikrobiyallerin kaplanması veya adsorbe edilmesi.....	22
2.7.1.4 Antimikrobiyallerin polimerlere iyonik veya kovalent bağlarla immobilizasyonu.....	22
2.7.1.5 Doğal olarak antimikrobiyal olan polimerlerin kullanılması.....	22
2.7.2 Antimikrobiyal paketleme sistemleri.....	23
2.7.2.1 Ambalaj/gıda sistemi	23
2.7.2.2 Ambalaj/tepe boşluğu/gıda sistemi.....	23
2.7.3 Antimikrobiyal ambalajlamanın etkisini belirlemeye yönelik metodlar	24
2.7.3.1 Minimum inhibisyon konsantrasyonu metodu	24
2.7.3.2 Agar plaka metodu.....	24
2.7.3.3 Sallanan erlen metodu.....	25
2.7.4 Gıda ambalajlarına katılan antioksidanlar	25
2.7.4.1 Sentetik antioksidanlar.....	27
2.7.4.2 Doğal antioksidanlar	28
2.8 Esansiyel Yağların Tanımı Tarihçesi ve Elde Edilme Yöntemleri.....	29

2.8.1 Kekik (<i>Thymus vulgaris</i>) esansiyel yağı.....	31
2.8.2 Defne (<i>Laurus nobilis</i>) esansiyel yağı	33
2.8.3 Portakal (<i>Citrus sinensis</i>) esansiyel yağı	34
2.9 Esansiyel Yağların Özellikleri ve Aktif Ambalaj Uygulamaları	36
2.9.1 Esansiyel yağların antimikrobiyal özellikleri ve aktif ambalaj uygulamaları	36
2.9.2 Esansiyel yağların antioksidan özellikleri ve aktif ambalaj uygulamaları	38
2.10 Çalışmada Kullanılan Küf ve Mayalar	39
3. MATERYAL ve METOD	41
3.1 Materyal	41
3.2 Metod	42
3.2.1 Esansiyel yağ ve potasyum sorbat içeren filmlerin antifungal aktivitelerinin belirlenmesi ..	42
3.2.1.1 Küf ve maya kültürlerin geliştirilmesi	42
3.2.1.2 Zein film hazırlanması	42
3.2.1.3 Kekik (<i>Thymus vulgaris</i>) esansiyel yağı içeren zein filmin antifungal aktivitesinin belirlenmesi	42
3.2.1.4 Defne (<i>Laurus nobilis</i>) esansiyel yağı içeren zein filmin antifungal aktivitesinin belirlenmesi	43
3.2.1.5 Portakal (<i>Citrus sinensis</i>) esansiyel yağı içeren zein filmin antifungal aktivitesinin belirlenmesi	43
3.2.1.6 Potasyum sorbat içeren zein filmin antifungal aktivitesinin belirlenmesi	43
3.2.1.7 Farklı esansiyel yağları birlikte içeren zein filmlerin antifungal aktivitesinin belirlenmesi	44
3.2.2 Esansiyel yağ ve potasyum sorbat içeren zein filmlerin mekanik özelliklerinin belirlenmesi	44
3.2.3 Esansiyel yağların DPPH radikali yakalama aktivitesi tayini.....	46
3.2.4 Esansiyel yağların toplam fenolik bileşik miktarının belirlenmesi.....	46
3.2.5 Margarinlere zein film uygulamaları ve raf ömrü çalışmaları	47
3.2.5.1 Zein filmlerin hazırlanması.....	47
3.2.5.2 Margarinlere zein film uygulaması	48
3.2.5.3 Margarinlere depolama süresince uygulanan analizler	49
3.2.5.3.1 Toplam bakterive maya-küf sayısının belirlenmesi	49
3.2.5.3.2 <i>Aspergillus fumigatus</i> sayısının belirlenmesi.....	49
3.2.5.3.3 Serbest yağ asitleri tayini	49
3.2.5.3.4 Peroksit sayısı tayini	50
3.2.5.3.5 Yağ asitleri kompozisyonu tayini	50
3.2.5.3.6 Demir, bakır, nikel analizi	51
3.2.5.3.7 Toplam fenolik madde tayini	51
3.2.5.3.8 Duyusal değerlendirme	51
3.2.6 İstatistiksel analiz	52
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	53
4.1 Kekik Esansiyel Yağı İçeren Zein Filmin Antifungal Aktivitesi	53
4.2 Defne Esansiyel Yağı İçeren Zein Filmin Antifungal Aktivitesi	56
4.3 Portakal Esansiyel Yağı İçeren Zein Filmin Antifungal Aktivitesi.....	57
4.4 Farklı Esansiyel Yağları Birlikte İçeren Zein Filmlerin Antifungal Aktivitelerinin belirlenmesi	57
4.5 Esansiyel Yağların Zon Oluşumunu Sağlayan Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları.....	60
4.6 Zein Filmlerin Kalınlığı	62
4.7 Esansiyel Yağ ve Potasyum Sorbat İçeren Zein Filmlerin Mekanik Özellikleri.....	64
4.8 Esansiyel Yağların DPPH Radikali Yakalama Aktivitesi	68
4.9 Esansiyel Yağların Toplam Fenolik Bileşik Miktarları.....	71

4.10 Margarinelere Depolama Süresince Uygulanan Analizler	72
4.10.1 Toplam bakteri ve maya-küf sayısı	72
4.10.2 Margarin üretiminde kullanılan zein fimlerin ağırlıkları.....	72
4.10.3 <i>Aspergillus fumigatus</i> sayısı	73
4.10.4 Serbest yağ asitleri	77
4.10.5 Peroksit sayısı tayini	81
4.10.6 Yağ asidi kompozisyonu tayini	88
4.10.7 Demir, bakır, nikel analizi	95
4.10.8 Toplam fenolik madde tayini.....	95
4.10.9 Duyusal değerlendirme.....	98
5. SONUÇ	101
6. KAYNAKLAR.....	106
EKLER	124
ÖZGEÇMİŞ	130

ÇİZELGE DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1 : Yenilebilir film/kaplamaların gıdalara değişik uygulamaları	10
Çizelge 2.2 : Gıda ambalajlamada kullanılan polimerlere direkt olarak eklenen doğal aktif bileşenler	20
Çizelge 2.3 : Antioksidan yenilebilir filmlerin uygulamaları	27
Çizelge 2.4 : Bazı esansiyel yağların elde edildikleri bitkiler, önemli bileşikleri ve uçucu yağ miktarları	30
Çizelge 2.5 : <i>T.vulgaris</i> 'ten elde edilen kekik yağının spesifik özellikleri	32
Çizelge 4.1 : Kekik esansiyel yağı içeren zein filmlerin küfler ve mayalar üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon alanları	54
Çizelge 4.2 : Farklı kombinasyonlarda esansiyel yağ içeren zein filmlerin küfler ve mayalar üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon alanları	59
Çizelge 4.3 : Kekik esansiyel yağı içeren zein filmlerin <i>A. fumigatus</i> üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon alanları	60
Çizelge 4.4 : Kekik ve defne esansiyel yağlarını içeren zein filmlerin <i>A. fumigatus</i> üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon alanları	61
Çizelge 4.5 : Potasyum sorbat içeren zein filmlerin <i>A. fumigatus</i> üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon alanları	61
Çizelge 4.6 : Zein filmlerin kalınlıkları	63
Çizelge 4.7 : Zein filmlerin gerilme dirençleri ve uzama yüzdeleri	64
Çizelge 4.8 : Zein filmlere uygulanan kesme kuvvetleri	67
Çizelge 4.9 : Esansiyel yağların IC ₅₀ değerleri	68
Çizelge 4.10 : Esansiyel yağların toplam fenolik madde değerleri	71
Çizelge 4.11 : Zein film ağırlıkları	73
Çizelge 4.12 : Farklı uygulamalar yapılmış margarin örneklerinde +4 °C'de depolama süresince <i>A. fumigatus</i> sayısındaki değişimler	74
Çizelge 4.13 : Depolama periyodu boyunca margarin gruplarının serbest asitlik değerlerine ait ortalamaları	78
Çizelge 4.14 : Depolama periyodu boyunca margarin gruplarının peroksit sayısına ait ortalamaları	82
Çizelge 4.15 : Margarinin 0. güne ve margarin gruplarının 90. güne ait yağ asidi kompozisyonu	89
Çizelge 4.16 : Margarin gruplarının 180. güne ait yağ asidi kompozisyonu	92
Çizelge 4.17 : Margarinde tespit edilen demir, bakır, nikel miktarı	95
Çizelge 4.18 : Depolama periyodunun 0, 90 ve 180. günlerinde margarin gruplarında ölçülen gallik asit eşdeğeri olarak toplam fenolik madde miktarlarına ait ortalama değerleri	96
Çizelge 4.19 : Depolama periyodunu 180. gününde margarin gruplarında yapılan duyusal değerlendirme sonuçları	99

ŞEKİL DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1 : Jelatin (a), mısır zeini (b) tanımlayıcı resimleri	13
Şekil 2.2 : Çok değerlikli iyonlar ile alginat jel ağ oluşumu	14
Şekil 2.3 : Muzzarelli (1996) tarafından resmedilen kitin (a) ve kitosanın (b) yapısı.....	16
Şekil 2.4 : Ambalaj/gıda sistemi.....	23
Şekil 2.5 : Ambalaj/tepe boşluğu/gıda sistemi	24
Şekil 2.6 : Antimikrobiyal plastik filmlerin <i>Aspergillus niger</i> üzerine etkisi	25
Şekil 2.7 : Karvakrol (a) ve timolün (b) yapısı.....	32
Şekil 2.8 : <i>Laurus nobilis</i> ağacı ve yaprakları	34
Şekil 3.1 : Tekstür analiz cihazı	45
Şekil 3.2 : Cam plakalara dökülmüş zein film örnekler	47
Şekil 3.3 : Potasyum sorbat içeren zein filmle kaplanmış kase margarin (a), zein filmle kaplanmış kase margarin (b), defne ve kekik esansiyel yağlarını içeren zein filmle kaplanmış kase margarin (c)	48
Şekil 4.1 : %1,6 (v/w) kekik ve %1,6 (v/w) defne esansiyel yağları içeren çözeltiden elde edilen zein filmin <i>A. fumigatus</i> üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon alanı.....	62
Şekil 4.2 : %3,5 (w/w) potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein filmin <i>A. fumigatus</i> üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon alanı	62
Şekil 4.3 : % 3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film (a), %1,6 kekik ve %1,6 defne esansiyel yağlarını içeren çözeltiden elde edilen zein film (b), zein film (c), %1,6 defne esansiyel yağı içeren çözeltiden elde edilen zein film (d), %1,6 kekik esansiyel yağı içeren çözeltiden elde edilen zein film (e), %1,6 portakal esansiyel yağı içeren çözeltiden elde edilen zein film (f)	63
Şekil 4.4 : Gerilme direnci ve uzama yüzdesi ölçümü esnasında hiçbir madde içermeyen zein film (a), %3,5 (w/w) potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film (b).....	65
Şekil 4.5 : Zein film üzerine kesme testi uygulaması.....	68
Şekil 4.6 : DPPH giderme aktivitesi gallik asit (a), kekik esansiyel yağı (b), defne esansiyel yağı (c), portakal esansiyel yağı (d)	70
Şekil 4.7 : Depolama süresince margarin gruplarında tespit edilen <i>A. fumigatus</i> sayısı (kob/7,5 cm ³).....	75
Şekil 4.8 : Depolama periyodu boyunca margarin gruplarının, 0-15. günde serbest asitlik değerlerine ait ortalamaları (% oleik asit) (a), 30-180. günler arasındaki serbest asitlik değerlerine ait ortalamaları (% oleik asit) (b), 0-180. günler arasındaki serbest asitlik değerlerine ait ortalamaları (% oleik asit) (c)	79
Şekil 4.9 : Depolama periyodu boyunca margarin gruplarının peroksit sayısına ait ortalamaları (meq O ₂ /kg margarin)	83

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
λ	Lamda
μg	Mikrogram
μl	Milrolitre
μm	Mikrometre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad derece
dk	Dakika
g	Gram
kg	Kilogram
mg	Miligram
kob	Koloni oluşturan birim
L	Litre
mL	Mililitre
m	Metre
cm	Santimetre
mm	Milimetre
MPa	Megapaskal
N	Normalite
N	Newton
ppm	Milyonda bir kısım
s	Saniye

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AFB ₁	Aflatoksin B ₁
BHA	Butillendirilmişhidroksianisol
BHT	Butillendirilmişhidroksitoluen
DPPH	2-2-difenil-2-pikrilhidrazil
EVOH	Etilen Vinil Alkol Kopolimer

GRAS	Genel olarak güvenli kabul edilen
HDPE	Yüksek yoğunluklu polietilen
LDPE	Düşük yoğunluklu polietilen
PET	Polietilen tereftalat
PG	Propilgallat
PP	Polipropilen
PVC	Polivinilklorit
PVOH	Polivinilalkol
TBHQ	Tersiyer bütil hidrokinon
U.S. FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
M	Kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış margarin
F	<i>Aspergillus fumigatus</i> dilüsyonu ile kontamine edilmiş fakat film uygulanmamış margarin
Z	<i>Aspergillus fumigatus</i> dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve hiçbir madde içermeyen çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin
KDZ	<i>Aspergillus fumigatus</i> dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %1,6 kekik, %1,6 defne esansiyel yağlarını birlikte içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin
PSZ	<i>Aspergillus fumigatus</i> dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin
MY	Kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış margarin yüzeyi
FY	<i>Aspergillus fumigatus</i> dilüsyonu ile kontamine edilmiş fakat film uygulanmamış margarin yüzeyi
ZY	<i>Aspergillus fumigatus</i> dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve hiçbir madde içermeyen çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin yüzeyi
KDZY	<i>Aspergillus fumigatus</i> dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %1,6 kekik, %1,6 defne esansiyel yağlarını birlikte içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin yüzeyi
PSZY	<i>Aspergillus fumigatus</i> dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin yüzeyi
MM	Kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış margarin merkezi

FM	<i>Aspergillus fumigatus</i> dilüsyonu ile kontamine edilmiş fakat film uygulanmamış margarin merkezi
ZM	<i>Aspergillus fumigatus</i> dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve hiçbir madde içermeyen çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin merkezi
KDZM	<i>Aspergillus fumigatus</i> dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %1,6 kekik, %1,6 defne esansiyel yağlarını birlikte içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin merkezi
PSZM	<i>Aspergillus fumigatus</i> dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin merkezi

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım süresince, bilgi ve tecrübesiyle bana daima yol gösteren, karşılaştığım sorunların çözümünde her zaman yardımcı olan, çalışmamın her aşamasında desteğini ve ilgisini esirgemeyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Ömer ÖKSÜZ'e, doktora eğitimime başladığım ilk günden beri destekleyici yaklaşımıyla beni daima cesaretlendiren, çalışmalarım esnasında ihtiyaç duyduğum her anımda yardımlarını esirgemeyen Yıldız Teknik Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölüm Başkanı çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Muhammet ARICI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yardım ve desteklerini her zaman hissettiğimiz değerli hocam ve bölüm başkanımız Prof. Dr. Mehmet DEMİRCİ'ye, yine çalışmalarım boyunca değerli görüş ve yardımlarını benden esirgemeyen kıymetli hocalarım Doç. Dr. Murat TAŞAN ve Doç. Dr. Ümit GEÇGEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın bir bölümünü Çorlu Meslek Yüksek Okulu, Gıda Teknolojisi Bölümü'nün laboratuvarında yapabilme fırsatı sunarak, deneysel aşamalarımı rahatlıkla gerçekleştirmemi sağlayan, yardımlarını hiçbir zaman unutamayacağım Çorlu Meslek Yüksek Okulu Müdürü çok değerli hocam Doç. Dr. Tuncay GÜMÜŞ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım esnasında, bilgi ve tecrübeleri yanında manevi desteklerini de benden esirgemeyen, değerli arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Serap DURAKLI VELİOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Murat VELİOĞLU, Gülnaz ÇELİK YURT ve Öğr. Gör. Nazan TOKATLI DEMİROK'a ve yardımlarından dolayı Çorlu Meslek Yüksek Okulu'nda görevli Öğr. Gör. Yusuf KESLER'e, Tekirdağ Bağcılık Araştırma İstasyonunda Gıda Mühendisi sayın Mehmet GÜLCÜ'ye, Namık Kemal Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Tezimin istatistiki değerlendirmelerindeki yardımları ve destekleri ile yanımda olan değerli hocalarım Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü'nde görevli Doç. Dr. Yusuf CUFADAR ve Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü'nde görevli Yrd. Doç. Dr. Mehmet HAMURCU'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Deneysel aşamalarımı gerçekleştirmede katkıları olan Unipro A.Ş.'nin Arge ve Kalite Departmanlarında çalışan, yardımlarını benden esirgemeyen değerli ekibine, Çorlu İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü'ndeki Gıda ve Yem Birimi'nde uzun süre birlikte çalıştığım, manevi desteklerini hep yanımda hissettiğim çok değerli ve unutulmaz arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

“Bazı Esansiyel Yağlarla Antifungal Yenilebilir Zein Filmi Geliştirilmesi ve Kase Margarine Uygulanması” isimli ve NKUBAP.00.24.DR.10.06 nolu proje ile tez çalışmasına destek sağlayan NKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca sonsuz destekleri, anlayışları, sevgileri ve yüreklendirmeleriyle hep yanımda olan canım annem Ayşe MECİTOĞLU, babam Celal MECİTOĞLU ve kızkardeşim Yeşim MECİTOĞLU YAĞCI'ya ve son olarak da huzur ve mutluluğu yanlarında bulduğum, sonsuz sabır ve sevgileriyle her zaman destekçilerim olan sevgili eşim Ahmet GÜÇBİLMEZ ve canım oğlum Demir GÜÇBİLMEZ'e sonsuz teşekkür ederim.

Temmuz 2014

Çiğdem MECİTOĞLU GÜÇBİLMEZ
Gıda Yüksek Mühendisi

1. GİRİŞ

Ambalaj; gıdayı fiziksel, kimyasal ve biyolojik tehlikelerden koruyarak, kimyasal katkı maddelerinin kullanımını azaltmaya yardımcı olan; depolama, taşıma ve son kullanım sırasında gıdaların kalitesini etkileyen en önemli faktörlerden biridir (Lindstrom ve ark. 1992).

Aktif ambalajlama ise; gıdanın kalitesini sürdürürken, güvenliğini ve duyuşal özelliklerini geliştirmek veya raf ömrünü uzatmak için ambalajın durumunu değiştiren bir paketleme çeşididir (Quintavalla ve Vicini 2002).

Antimikrobiyal ambalajlama aktif ambalajlamanın bir şeklidir (Appendini ve Hotchkiss 2002). Tüketicilerin minimum işlem görmüş ve koruyucu madde içermeyen gıdalara olan isteğinin artmasıyla, gıda ve ambalajlama endüstrilerinin de antimikrobiyal paketlemeye ilgisi artmıştır (López ve ark. 2007).

Antimikrobiyal ambalajlamada, materyal olarak plastik veya doğal materyaller kullanılmaktadır. Ancak plastik ambalaj materyalleri biyolojik olarak bozunuma uğramadığından çevresel problemler yaratmaktadır (Ayana ve Turhan 2009). Bu nedenle biyolojik olarak yok olabilen yenilebilir film ve kaplamalar gıda paketleme uygulamaları için güvenli gözükmetedir (Temiz ve Yeşilsu 2006).

Yenilebilir film ve kaplamalar, yapısal maddeleri baz alınarak protein, lipit, polisakkarit ve üçünün farklı kombinasyonları ile oluşan karma olmak üzere dört grupta sınıflandırılabilirler (Budak Bağdatlı ve Kayaardı 2010, Falguera ve ark. 2011, Varela ve Fiszman 2011). Yenilebilir film ve kaplamaların fonksiyonel özellikleri; gıda maddelerinin yapısal bütünlüğünün mekanik darbelere karşı korunması, oksijen, karbondioksit gibi gazların transferlerinin yavaşlatılması, içerisine lezzet, renk, tat maddelerinin eklenerek, gıdaların organoleptik özelliklerini artırması, antimikrobiyal ve antioksidan maddeler için taşıyıcı yüzey olarak kullanılması, heterojen gıdalarda farklı tabakalar arasına uygulanabilmesi, özellikle proteinden yapılan filmlerin gıdaların beslenme değerlerini desteklemesi olarak sayılabilir (Anonim 1997, Yılmaz ve ark. 2007).

Protein bazlı yenilebilir film ve kaplamalar, fonksiyonel özellikleri ve besinsel niteliklerinden dolayı artan bir ilgi görmektedirler (Ozdemir ve Floros 2008). Mısır endospermünde bulunan ve alkolde çözünen bir protein olan zeinden elde edilen filmler, ürün

üzerinde sert, parlak, dayanıklı ve mikroorganizmalar için koruyucu bir tabaka oluşturmaktadır (Temiz ve Yeşilsu 2006). Zein kaplamaları, fındık, şekerlemelerde kaplama olarak kullanılmaktadır (Lindstrom ve ark. 1992).

Antimikrobiyal film ve kaplamaların üretiminde kimyasal ve doğal antimikrobiyal maddeler kullanılmaktadır (Ayana ve Turhan 2009). Organik asitler, benomil, imazalil gibi fungusitler, lizozim gibi enzimler (Seydim ve Sarıkuş 2006), bakteriyosinler, antibiyotikler, alkoller, peptidler, bitkisel esansiyel yağlar, zeolit ve gümüş gibi maddeler filmlere katılarak antimikrobiyal özellikler kazandırmaktadırlar (Özdemir 2011a). Ancak tüketicilerin sentetik bileşiklerin tüketimi ile oluşabilen potansiyel sağlık riskleri hakkında daha bilinçli hale gelmesiyle, bu bileşiklerin etkinliklerine rağmen, doğal antimikrobiyal maddelere talep artmaktadır (Kechichian ve ark. 2010). Doğal katkıların kullanımına olan talep ile birlikte, USA FDA tarafından GRAS olarak kabul edilen esansiyel yağlar gibi doğal ekstraktlarla yapılan çalışmaların sayısında da son yıllarda belirgin bir artış gözlenmiştir (Persico ve ark. 2009).

Birçok baharat ve bitki esansiyel yağ fraksiyonlarından dolayı antimikrobiyal aktivite göstermektedirler (Moreira ve ark. 2005). Güçlü kokuya sahip olan esansiyel yağlar, uçucu bileşiklerin kompleks karışımı olup, bitkilerin tomurcuk, çiçek, yaprak, sap, dal, tohum, meyve, kök, kabuk gibi değişik organlarında sentezlenebilirler (Teixeira ve ark. 2013). Esansiyel yağların gıda katkı maddesi olarak kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalarda, gıdanın raf ömrünü uzattığı gözlemlendiğinden, esansiyel yağların gıdalarda kullanımının avantajı açıktır. Ancak sahip oldukları güçlü aromalarını gıdaya verebileceği düşünüldüğünde, kullanımlarında esansiyel yağ miktarı belirleyici faktör olmuştur (Teixeira ve ark. 2013). Nychas (1995), narenciye meyveleri, keklik otu, kekik, adaçayı, biberiye, karanfil, kişniş, sarımsak ve soğandan elde edilen esansiyel yağların birçok bakteri ve küfe karşı antimikrobiyal aktivitesi olduğunu bildirmiştir. Aromatik bitkilerin esansiyel yağlarında, monoterpenler, seskiterpenler, alkoller, aldehitler, fenoller, esterler, eter gibi bileşikler ve kükürtlü, azotlu maddeler bulunmaktadır (Farjam 2012). Mikroorganizmaların esansiyel yağlar tarafından inhibisyonu birçok değişik etki şekli içerir. Esansiyel yağların sahip olduğu fenolik bileşiklerin hücre membranındaki fosfolipid katmanını hassaslaştırdığı böylece geçirgenliği arttırarak hücre içi hayati öğelerin sızmasına neden olduğu veya bakterilerin enzim sistemini zayıflatarak bu antimikrobiyal etkiyi sağladıkları bildirilmektedir (Singh ve ark. 2002).

Gıda ambalaj filmleri içerdiği aktif maddenin gıdaya kontrollü salınımını uzun sürede sağlayarak, bu maddenin gıdaya direkt eklenmesi ile gıdanın tamamına hızlıca diffüze olmasıyla meydana gelebilecek nötralizasyonu (Pranoto 2005) ve oluşabilecek arzu edilmeyen fazla aromayı önler (Ramos ve ark. 2012). Bu şekilde antimikrobiyal ajanların gıda yüzeyine yavaşça salınması sağlanarak, uzun süre boyunca yüksek konsantrasyonda gıda yüzeyinde etkili olabilmesi amaçlanmaktadır.

Gıdanın işlenmesi ve depolanması sırasında bozulma sebeplerinden en önemlilerinden biri lipid peroksidasyonudur. Doymamış yağların oksidasyonu sırasında oluşan bileşikler, gıdaların doku yapısında, renginde, kokusunda ve tadında arzu edilmeyen değişimlere sebep olur (Emir Çoban ve Patır 2010). Oksidatif bozulma gıda ürünlerinin raf ömrünü sınırlandıran ve kalite kaybına neden olan önemli faktörlerden biridir (Emir Çoban ve Patır 2010). Oksidatif bozulmayı engelleyen aromatik bitkilerin antioksidan özelliğinin yapılarında bulunan hidroksil gruplarından kaynaklandığı bildirilmiştir. Esansiyel yağların antioksidan etkileri, izolasyon prosedürüne, ekstraksiyonda kullanılan solvent türüne ve bileşenlerinin konsantrasyonuna göre değişiklik göstermektedir (Turan ve ark. 2012). Esansiyel yağların koruyucu olarak kullanımı, gıdaları oksidasyondan korumak için uygulanan yeni bir yaklaşımdır (Deba ve ark. 2008). Önemli miktarda flavonoid ve fenolik bileşikler içermekte olan *Thymus* türü, güçlü antioksidan aktiviteye sahiptir (Nickavar ve Esbati 2012, Ruiz-Navajas ve ark. 2013). Ruiz-Navajas ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada, *Thymus moroderi* ve *Thymus piperella* esansiyel yağlarının kitosan film içerisine eklendiği ve mükemmel özellikte antioksidan etkili bir aktif ambalaj elde edildiği bildirilmiştir.

Yapılan bu araştırmanın amacı; denemede kullanılan bazı küf ve mayalar üzerine etkili antifungal etki gösterecek, kekik, defne ve portakal esansiyel yağlarından uygun karışımli içeren zein film üretmek, elde edilecek zein film ile daha önceki çalışmalarda margarinlerden izole edilmiş, ısıl işleme dayanıklı *A. fumigatus* ile kontamine edilmiş kase margarinlerde bu organizmayı inhibe etmektir. Bu bağlamda elde edilecek zein filmlerin teknolojik özellikleri ile margarine olan etkileri de incelenecektir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Margarin Tanımı ve Özellikleri

Margarin, su veya süt fazının, sürekli olan yağ fazı içerisinde dağılarak meydana gelen bir emülsiyondur. Margarinin yağ fazını oluşturacak karışım; likit, hidrojene likit ve hidrojene katı yağlardan oluşur. Her farklı ürün için belirli bir formülasyonda karışım hazırlanır. Bundan başka yağ fazı, yağda çözünen vitaminleri, renk maddeleri, esanslar ve emülsifiye edici maddeleri içerir. Su fazı ise fermente edilmiş süt, tat verici olarak saf ve temiz tuz, mikroorganizma gelişimini engellemek için koruyucu maddeler, antioksidanları ihtiva eder. Ayrıca margarine tereyağı rengini kazandırmak için β - karoten, stabilite ve aroma kazandırmak için laktik, sitrik, asetik, formik, propiyonik asit ve diasetil karışımı ilave edilir (Nas ve ark. 2001).

17.05.2008 tarihli resmi gazetede yayımlanarak yürürlüğe giren Türk Gıda Kodeksi Sürülebilir Yağlar/Margarin ve Yoğun Yağlar Tebliği (Tebliğ No:2008/21) ile TS 2812 sayılı Bitkisel Margarin adlı standart mecburi uygulamadan kaldırılmıştır. İlgili tebliğe göre, toplam yağ içeriğinin en fazla % 3'ü oranında süt yağı içerebilen sürülebilir yağ olan margarin, ağırlıkça en az %80, en fazla %90 oranında yağ içeriğine sahip ürünü, toplam yağ içeriğinin en az %10' u en fazla %80' i oranında süt yağı içeren sürülebilir yağ olan süt yağlı margarin ise ağırlıkça en az %80, en fazla %90 oranında yağ içeriğine sahip olan ürünü ifade etmektedir. Bu tebliğe göre yağ içeriği %90'dan fazla olan ürün ise yoğun yağ olarak adlandırılmaktadır (Anonim 2008).

2.2. Margarin Üretimi

Margarin üretimi; su ve yağ fazı hazırlama, emülsiyon hazırlama, soğutma ve kristalizasyon, dinlendirme ve ambalajlama olmak üzere dört bölümde ele alınabilir (Ünal 1995, Alpaslan ve Demir 2013).

1. Su ve Yağ Fazı hazırlanması: Margarinin yağ fazını oluşturacak karışımdaki yağların oranları, ürüne, her ürün için mevsim şartlarına, ürünün kullanım alanına, beslenme şartlarına göre hazırlanır (Nas 2001). Yine, üretilecek margarin çeşidine göre sulu faz olarak; su, süt tozundan hazırlanmış rekombine süt, yağsız süt, peynir altı suyu veya tozu kullanılmaktadır (Bilişli 2012).

2. Emülsiyon Hazırlama: Margarin üretimini gerçekleştirebilmek için, sulu faz ve yağlı faz hazırlanır. Yağlı fazın hazırlanmasında kullanılacak olan katı ve sıvı yağların özellikleri ve oranları; üretimi düşünülen margarinin konsistensini belirleyecek şekilde ayarlanır. Bu karışım üzerine vitaminler (A,D,E), β - karoten gibi boyar maddeler, laktik, sitrik, asetik, formik, propiyonik asit ve diasetil gibi aroma geliştiriciler ve mono ve diğliseritler, lesitin gibi emülsifiyarlar eklenerek tekrar karıştırılır ve yağlı faz hazırlanmış olur. Asıl olarak yağ alınmış taze süt veya yağsız süt tozundan yapılmış süttten oluşan sulu faza ise temiz sofrta tuzu, antioksidan ve koruyucular ilave edilip karıştırılır. Her iki faz da emülsiyonlaştırma tankına verilerek emülsiyon oluşturulur ve sonrasında muhafaza tankına alınır. Buradan katılaştırma ünitesine pompalanır (Nas 2001).
3. Soğutma ve Kristalizasyon: Kesikli yada sürekli olarak yapılan bu işlem, yağ/su emülsiyonunun hazırlanmasını mütakip uygulanmaktadır (Çiftçi 2006). Yüzey kazıyıcı ısı değıştiricilerin bulunduğu sürekli sistemlere, yüksek basınç pompası ile yağ ve su fazı sürekli olarak beslenmektedir. 20-50 bar arası bir basınç uygulanmakta ve iç yüzey kazıyıcı plastik bıçaklar ile kazınmaktadır. Soğutuculu olan bu sistemde yağ emülsiyonu hızla soğutularak kristal yapı oluşmaktadır (Gümüşkesen ve Yemişçioğlu 2004).
4. Dinlendirme ve Ambalajlama: Yüksek basınç ile dinlendirme tüpüne gönderilen margarin, belli bir süre dinlendirildikten sonra oradan çıkışta da ya plastik kaplara eritilip sıvı şekilde veya katı halde uygun kağıt ambalajlara sarılmak suretiyle paketlenir (Ünal 1995).

2.3. Yemeklik Yağlarda Oksidasyon ve Mikrobiyal Bozulma

Oksidasyon her çeşit yağ ve yağlı ürünlerde oluşabilen bir kimyasal bozulma olup, üründe istenmeyen çeşitli değışimlere neden olabilir. Ayrıca bazı margarin çeşitleri ve yağlı ürünlerdeki su aktivitesi mikroorganizma gelişmesine uygun olduğundan bu tip ürünler mikrobiyolojik olarak da bozulabilirler. Yağlar da oluşan mikrobiyolojik bozulma dışındaki bozulma çeşitlerini 4 gruba ayrılır (Nas ve ark. 2001). Bunlar;

1. Hidroliz: Yüksek sıcaklık, alkali, asit ve lipolitik enzimlerce katalize edilerek; trigliseritlerin suyun etkisi ile gliserol ve yağ asitleri arasındaki ester bağlarının kopması, serbest yağ asidi ve gliserol oluşması durumudur (Anonim 2006).
2. Ransidite: Doymamış yağ asitlerinin otooksidasyonu ile çeşitli uçucu bileşiklerin oluşumu olup sonucunda üründe istenmeyen bir flavor olan ransid flavor olur.

3. Dönüşüm (Reversion) : Daha çok çift bağ sayısı fazla olan yağ asitlerinde görülen bu durum, özellikle rafine ve hidrojenlendirilmiş yağlarda ısı ile, oksidasyondan önce balık, ot kokusu gibi değişiklikler oluşmasıdır (Anonim 2006).
4. Polimerizasyon: Doymamış yağ moleküllerinin iki karbon atomu arasındaki çapraz bağlanma olup, doymamış kısımların oksijenle birbirine bağlanması sonucu meydana gelir.

Bu değişimlerin sonucunda oksijen yağlar, hidroksi asitler, gliserol ve diğer alkoller, aldehitler, ketonlar, laktonlar oluşabilir. Antioksidan bileşikler hidroliz ve reversionda etkili değilken, ransidite ve polimerizasyonu engellemede veya azaltmada etkilidir (Nas ve ark. 2001).

2.3.1. Oksidasyonun oluşumu

Oksidasyon, yemeklik katı ve sıvı yağların kalitesini olumsuz yönde etkileyen bir kimyasal reaksiyonlar serisi olup, bu reaksiyonlar sonunda, gliserid molekülleri parçalanarak serbest yağ asitleri oluşup asiditeyi arttırabildiği gibi, doymamış yağ asitlerinin oksijenle yükseltgenmesiyle de, çeşitli aldehit, keton, hidroksiasit, alkol ve küçük moleküllü yağ asitleri gibi yemeklik yağlarda istenmeyen bileşikler meydana gelebilmektedir (Targan ve ark 2008). Hidrolitik ransidite, gliserid moleküllerini çeşitli şekillerde hidrolizi sonucu serbest yağ asidi içeriğinin artmasıyla meydana gelir. Oluşan serbest yağ asitleri, daha ileri derecedeki reaksiyonlarla yağın acıması ve tüketilemez duruma gelmesine sebep olur. Hidrolitik reaksiyonlar sonucu, metil ketonlar, laktonlar ve esterler oluşmaktadır. Oksidatif ransidite (otooksidasyon) ise, atmosfer oksijeninin yağ asidi molekülünün çift bağlarına etki etmesi sonucu oluşan acılaştırma. Yağların bileşimindeki doymamış moleküllerin oksijenle yükseltgenmesi ve bunun sonucunda da aldehit, keton, hidroksi asit ve alkollerin oluşumu aslında yağların genel bozulmasıdır. Bu tarzdaki bozulmaya peroksidasyon da denir (Nas ve ark. 2001). Otoksidasyon reaksiyonlarında yağın tat ve kokusunu kötü yönde etkileyen çok fazla ara ürün meydana gelir ki; buda yağın kalitesini bozarak ekonomik zararlara yol açmaktadır (Başoğlu 2012). Bu yükseltgenerek bozulmayı, ısı, ışık, nem ve bazı metaller katalize eder. Serbest yağ asitleri ve trigliseritler otooksidasyon veya lipoksijenaz enzimi ile okside olabilmektedirler. Otoksidasyonun gerçekleşmesinde, serbest radikal ve fotooksidasyon olmak üzere iki yol üzerinde durulmaktadır. Her ikisinde de hidroperoksitler meydana gelmektedir (Nas ve ark. 2001).

Otooksidasyon, atmosferik oksijenin katalizlediği tipik bir serbest radikal zincir reaksiyonudur (Nawar 1996). Porter (1985), oksidasyonun başlangıç, ilerleme ve sonuç aşamalarından oluşmakta olduğunu bildirmiştir. Oksidasyonun başlangıç aşamasında oluşan serbest radikale, ilerleme aşamasında oksijen eklenmesiyle peroksi radikali (ROO·) oluşmakta ve bu peroksi radikali diğer bir yağ asidi molekülünden ayrılan bir hidrojen atomu ile birleşerek tekrar hidroperoksitlere ve yeniden serbest radikallere dönüşmektedir. Oluşan radikallerin birbirleriyle reaksiyona girerek ester, eter, aldehit, keton ve alkol gibi stabil bozunma ürünlerine dönüşmesi ise sonuçlanma aşamasında gerçekleşmektedir (Koca ve Karadeniz 2003).

Daha uzun başlangıç fazı olan ürünlerin raf ömrü daha uzundur. Ticari olarak kullanılan veya doğal ürünlerde bulunan antioksidantlar, başlangıç periyodunu uzatır. Oksidasyonu tam olarak durduramaz. Fotooksidasyon mekanizması ile ışık ve ışığa hassas moleküllerin varlığında farklı hidroperoksitlerin oluştuğu bulunmuştur (Nas ve ark. 2001).

2.3.2. Mikrobiyal bozulmalar

Margarinlerde sıklıkla bozulmaya yol açan organizmalar küf ve mayalar, özellikle lipolitik mayalardır (Başoğlu 2012).

Katı yağların bozulmasına neden olan küfler arasında *Geotrichium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* ve *Monilia* cinsleri bulunmakta olup, bakteriler içinde ise *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Serratia*, *Achromobacter* ve *Proteus* cinsleri sayılabilmektedir. Margarinlerde yağın hidrolizine neden olan mayalar arasında *Candida lipolytica* önemlidir (Nas ve ark. 2001).

2.4. Yenilebilir Filmlerin Tanımı, Tarihçesi ve Özellikleri

Dünya nüfusu hızla artmakta ancak bunu karşılayacak yeterli gıda üretimi sağlanamamaktadır. Gıdaların korunması da üretimi kadar önemlidir (Temiz ve Yeşilsu 2006). Bu amaçla çeşitli ambalaj materyalleri kullanılabilen ancak bunlardan bir kısmı çevre kirliliğine neden olabilmektedir. Tüketicinin mikrobiyolojik bakımdan güvenli, pratik ve uzun raf ömürlü gıdaya artan talebi doğrultusunda, gıda endüstrisinde enzimatik ve bakteriyel bozulmanın geciktirilmesi ile gıda güvenliğinin sağlanması için farklı muhafaza ve ambalaj teknikleri kullanılmaktadır (Dursun ve Erkan 2009, Çağrı-Mehmetoğlu 2010). Bunlardan biri de yenilebilir film ve kaplamalardır.

Yenilebilir film ve kaplamalar, “gıdalarda kalite kayıplarını ve bozulma reaksiyonlarını önlemek, raf ömrünü uzatmak, duyuşal özellikleri korumak amacıyla gıda bileşenleri arasında ya da gıdanın yüzeyinde oluşmuş ince protein, polisakkarit ve lipit kökenli tabaka” olarak tanımlanmaktadır (Yılmaz ve ark. 2007). Yenilebilir kaplama, bir gıda üzerinde oluşmuş ince tabaka halindeki materyal olarak tanımlanırken, yenilebilir film ise gıda bileşenleri ya da gıda üzerine önceden hazırlanmış ince yenilebilir materyalin yerleştirilmesi olarak tanımlanmaktadır (Yılmaz ve ark. 2007, Falguera ve ark. 2011).

İlk kullanılan kaplama 12 ve 13. yüzyıllarında Çin’de kullanılan, mumdan yapılarak turunçgiller üzerine uygulanan vaks adı verilen kaplamadır (Park 1999, Çağrı-Mehmetoğlu 2010). Bu kaplamalar depolama ve taşıma esnasında ürünlerdeki su kaybını azaltabilmek için kullanılmışlardır (Çağrı-Mehmetoğlu 2010). Değişik kaynaklarda da belirtildiği gibi; aynı amaçla 16. yüzyılda Avrupa’da etlerin yüzeyi yağlarla kaplanmış, yağlarla beraber jelatin kaplamaların kullanılmaya başlanması 19. yüzyılda gerçekleşmiştir. Yenilebilir film ve kaplamaların uygulamaları bununla da sınırlı kalmamış, sosis gibi et ürünlerinde hayvan bağırsağı yerine yenilebilir kollojen kılıflar kullanılmaya başlanmıştır (Gürel İnanlı ve Kuzgun 2012). Yenilebilir film ve kaplamaların, değişik kaynaklardan derlenen ticari uygulamaları; vaks, yağ, resin ve sukroz yağ asidi poliestерlerinden oluşan taze ürünler için kullanılan kaplamalar; sosisler için kullanılan kollajen kılıflar, şekerlemeler için çikolata kaplamalar, şellaktan yapılan şekerleme kaplamalar, fındık içleri, şekerleme ve ilaçlar için zein bazlı kaplamalar, yine ilaçlar için jelatin bazlı kaplamalar, gıda bileşenleri için selüloz eter bazlı suda çözünebilen kesecikler olarak verilmektedir (Gennadios ve ark. 1997).

Yenilebilir film ve kaplamalar asıl olarak gıda sisteminin mekanik özelliklerini oksijen, karbondioksit ve lipit geçişini kontrol altında tutmak suretiyle geliştirmekte, tat ve aroma maddelerinin kaybını azaltmakta ve antimikrobiyal maddeleri, antioksidanları, vitaminleri, pigmentleri ve esmerleşme reaksiyonlarını durduran iyonları ürünün içerisinde tutarak gıdanın raf ömrünü arttırmakta, kalitesini geliştirmektedirler (Temiz ve Yeşilsu 2006). Bu kaplamalar hem gıdanın duyuşal özelliklerini iyileştirmekte, hem de gıdanın yüzeyinin daha parlak ve pürüzsüz görünmesini sağlamaktadırlar (Çağrı-Mehmetoğlu 2010). Yenilebilir filmlerin sağlık açısından güvenilir olması, basit teknoloji gerektirmesi, üretim maliyetlerinin düşük olması, doğal ve biyolojik olarak geri dönüşümlü maddelerden yapıldıkları için çevreyi kirletici etkisinin olmaması en önemli avantajlarıdır (Şahin ve Akpınar Bayizit 2008, Gürel İnanlı ve Kuzgun 2012). Ayrıca, yenilebilir kaplama ve filmlerin fonksiyonel, mekaniksel, koruyucu, beslenme ya da duyuşal özelliklerini arttırmak için plastikleştiriciler, aromalar,

antimikrobiyal ve antioksidanlar maddeler film içeriğine eklenebilmektedir (Baysal ve ark. 2009). Filmin özelliklerini, eklenen maddelerin polar yada apolar olması, molekül ağırlıkları ve kimyasal yapıları etkilemektedir.

2.5. Yenilebilir Film Yapım Yöntemi

Yenilebilir filmler genellikle, filmi oluşturan yüksek molekül ağırlıklı polimer ve bir plastikleştirici olmak üzere en az iki önemli bileşenden oluşmaktadır (Choi ve ark. 2003). Film yapımında kullanılan birçok yöntem bulunmaktadır. Bunlar arasında basit koaservasyon, kompleks koaservasyon, ısıl jelleşme, çözücü uzaklaştırılarak ve eriyiğin katılaştırılması gibi işlemler sayılabilir (Guilbert ve ark. 1996, Anonim 1997, Çağrı-Mehmetoğlu 2010). İki zıt yüke sahip hidrokolloidlerin çözeltisi karıştırıldığında polimer kompleksi etkileşir ve çökelti oluşturur buna koaservasyon işlemi denir. Hidrokolloid filmlerin yapımında yaygın olarak kullanılan diğer bir yöntem çözücünün uzaklaştırılması işlemidir. Bu işlemde, moleküller arası etkileşim değişik fiziksel ve kimyasal muamele ile kararlı hale getirilir ve böylece sürekli bir yapı oluşturulur. Film çözeltisindeki makromoleküller etanol, asetik asit ya da su gibi çözücü ortamında dispers durumundadırlar. Plastikleştirici veya diğer katkı maddeleri, karışıma filmin özelliklerini iyileştirmek için eklenir. Bu film karışımı düz bir yüzeye ince bir tabaka şeklinde dökülür, kurumaya bırakılır ve yüzeyden soyularak çıkarılır (Çağrı-Mehmetoğlu 2010). Plastikleştiriciler, film oluşturan polimerle uyumlu olan, uçuculuğu az, küçük moleküllerdir (Choi ve ark. 2003). Plastikleştiriciler filme esneklik sağlarlar. Bunu, hidrojen bağlarıyla protein polimer zincirleri arasındaki mesafeyi artırarak gerçekleştirir. Plastikleştirici maddenin miktarı arttıkça ve molekül ağırlığı yükseldikçe filmin bariyer özelliği ve çekme gerilimi de düşer. Bu sebeple kullanılan plastikleştirici maddenin miktarı ve cinsi doğru seçilmelidir (Çağrı-Mehmetoğlu 2010). Gliserol, sorbitol, polyetilen glikol, mono-, di- veya oligosakkaritler, yağ asitleri, lipitler ve türevleri gibi plastikleştirici ajanlar filmin kırılabilirliğini yok edip, esnekliğini ve uzayabilirliğini geliştirirler (Flores ve ark. 2007).

Yenilebilir filmler gıdalara farklı yöntemlerle uygulanabilirler. Daldırma Yöntemi, Püskürtme Yöntemi, Dökme Yöntemi ve Boyama Yöntemi bunlar arasında sayılabilir (Polat 2007, Varela ve Fiszman 2011). Daldırma Yönteminde, gıda film çözeltisine daldırıp, fazlasının uzaklaştırılması ve sonrasında kaplamanın kurutulup katılaştırılması işlemi uygulanır. Püskürtme yöntemi ise, daldırma yöntemine göre daha ince, düzgün ve tek düze film oluşturulmasında tercih edilmektedir. Krochta ve ark. (1997)'de belirtildiği üzere, dökme yönteminde film yapımında kullanılacak olan materyal, düzgün bir yüzey üzerine istenilen

kalınlıkta dökülür, yayılım olduktan sonra kurutularak film oluşturulur (Polat 2007). Boyama yönteminde, gıda maddesinin üzerine fırça ile akışkan olan kaplama çözeltisi sürülerek, kaplama işlemi gerçekleştirilir. Farklı yenilebilir filmler ve bunların çeşitli gıdalara uygulanması Çizelge 2.1.'de verilmektedir.

Çizelge 2.1. Yenilebilir film/kaplamaların gıdalara değişik uygulamaları

Ürün	Materyal Örneği	Fonksiyonel Unsur	Etkisi	Referans
Elma	Alginat	Tarçın, karanfil, limonotu, cinnamaldehyde, eugenol, sitral	Antimikrobiyal	Raybaudi-Massilia ve ark. 2008
Armut	Metilselüloz	Askorbik asit	Antioksidan	Olivas ve ark. 2003
Kavun	Alginat	Kalsiyum klorür	Yapı arttırıcı	Oms-Oliu ve ark. 2008
Tavuk göğüs eti	Peyniraltı suyu proteini	Karanfil, keklik otu esansiyel yağları	Antimikrobiyal	Fernández-Pan ve ark. 2014
Köfte	Soya protein	Keklik otu, kekik esansiyel yağları	Antimikrobiyal	Karagöz Emiroğlu ve ark. 2010
Peynir	Peyniraltı suyu proteini	Laktik asit, kitoooligosakkarit	Antimikrobiyal	Ramos ve ark. 2012

2.6. Yenilebilir Film Çeşitleri

Yenilebilir film ve kaplamalar genellikle oluşturuldukları malzemelere göre ayrılabilirler. Yenilebilir film ve kaplamalar, yapısal maddeleri baz alınarak protein, lipit, polisakkarit ve üçünün farklı kombinasyonları ile oluşan karma olmak üzere sınıflandırılabilirler (Budak Bağdatlı ve Kayaardı 2010, Falguera ve ark. 2011, Varela ve Fiszman 2011).

2.6.1. Protein yenilebilir filmler

Proteinleri oluşturan aminoasitler; hidrofilik, hidrofobik, pozitif veya negatif olarak yüklenmiş farklı yan gruplara sahiptirler. Proteinlerden oluşmuş olan yenilebilir filmlerin çok uygun yapısal, mekanik, optik özellikleri olup, bu filmler yağ oksidasyonunu engellemede de iyi bir oksijen bariyeri sağlamaktadırlar (Cao ve Chang 2001, Ryu ve ark. 2002, Falguera ve

ark. 2011). Ancak bu filmlerin oldukça yüksek su buharı geçirgenliği bulunmaktadır. Proteinlerin tabiatında olan hidrofilik yapısının ve filmlerin esnekliğini sağlamak için kullanılan yine hidrofilik yapıdaki gliserol ve sorbitol gibi plastikleştiricilerin; su buharı geçirgenliğinde etkili olduğu sanılmaktadır.

Protein filmler, bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilen materyallerden oluşmaktadırlar. Mısır zeini, soya proteini, buğday gluteni, yer fıstığı proteini bitkisel kaynaklı olan filmlere; peyniraltı suyu proteini, kollajen, jelatin, kazein proteini de hayvansal kaynaklı olanlara örnek olabilir.

2.6.1.1. Zein film

Zein, yaklaşık 1-2 µm çapında, küçük yuvarlak parçacıklar şeklinde mısır endospermde bulunan ve alkolde çözünen bir proteindir (Lai ve Padua 1997, Kim ve ark. 2004, Temiz ve Yeşilsu 2006). Zein α , β ve γ fraksiyonlarını içerebilmekte olup, ticari olarak kullanılan zein genellikle molekül ağırlığı 21000 ve 25000 arasında olan α fraksiyonunu içermektedir (Lai ve Padua 1997). Zein özellikle glutamik asit (%21-26), lösin (%20), prolin (%10), alanin (%10) yönünden zengin olup, bazik ve asidik amino asitler yönünden eksiktir (Shukla ve Cheryan 2001). Mısır öğütme endüstrisinin yan ürünü olan ticari zeinin, film oluşturma özelliği üzerinde yıllardır durulmakta ve ticari olarak kullanılmaktadır. Zein proteinin sert, parlak, dayanıklı, hidrofobik, yağ geçirmez kaplamalar oluşturmaya ve mikrobiyal saldırılara karşı direnci, ticari olarak ilgilenilmesinde önemli etkenlerdendir (Shukla ve Cheryan 2001, Temiz ve Yeşilsu 2006). Zeinin gıdalarda kullanımını GRAS olarak kabul edilmektedir (Janes ve ark. 2002).

Zein film genellikle, zeinin alkol içerisindeki çözeltisinin inert ve düz bir yüzeye dökülmesi ve çözücünün uçmasıyla birlikte oluşan filmlerin yüzeyden çıkarılmasını içerir. Zeinden yapılan filmler kırılğan yapıda olup, bu şekliyle gıdalara uygulanması zordur. Filmlerin esnekliklerini sağlayabilmek için, gliserol gibi plastikleştirici eklenmektedir. Gliserolle plastikleştirilmiş filmler yüksek su aktivitesinde olup, plastikleştirilmemiş filmlerden beş kat daha fazla su sorbsiyon kapasitesine sahiptir (Temiz ve Yeşilsu 2006). Gliserolün hidrofilik özelliği, plastikleştirilmiş filmlerin su tutma kapasitelerinin yükselmesine sebep olmaktadır.

Zein, fındık, şekerleme ürünleri ve ilaç tabletlerinde yenilebilir kaplama olarak kullanılmaktadır (Lai ve Padua 1997, Anonim1997, Ryu ve ark. 2002).

2.6.1.2. Peyniraltı suyu proteinleri filmi

Peynir üretimi sırasında kazeinin çökmesi ve ayrılmasından sonra kalan kısma peyniraltı suyu denmektedir. Toplam süt proteinlerinin % 20'sini oluşturan peyniraltı suyu proteinleri 5 farklı fraksiyon içermekte olup, film oluşumu için en önemlisi birinci sırada laktoglobulin ikincisi ise laktalbumindir (Lin ve Krochta 2003, Yılmaz ve ark. 2007, Jooyandeh 2011). Peyniraltı suyu proteinleri dönüşümlü ambalajlama için oldukça iyi bir hammadedir. Çünkü yenilebilir kaynaktan gelmekte olup, peynir endüstrisinin bir yan ürünüdür ve bu sebeple elde edilmesi oldukça kolay ve esasen pahalı değildir (Ramos ve ark. 2012).

Yapılarını sağlamlaştıran kovalent disülfid bağları sebebiyle, suda çözünmediklerinden suda çözünmeyen yenilebilir filmlerin oluşturulmasında kullanılmaktadırlar (Yılmaz ve ark. 2007). Peyniraltı suyu protein filmleri, içerdikleri polar kısımlar nedeniyle çok iyi oksijen bariyeri özelliklerine sahip olmakla beraber, hidrofilik gruplarından dolayı nem bariyer özelliklerinin çok iyi olmadığı saptanmıştır (Yılmaz ve ark. 2007). Aroma bileşikleri ve yağa karşı ise mükemmel bariyer oluşturdukları bilinmektedir (Jooyandeh 2011). Peyniraltı suyu protein filmleri plastikleştiriciler eklenmeden çok kırılğan olup, film esnekliğini sağlayabilmek için gıdada kullanılabilir plastikleştiricilere ihtiyaç vardır (Ozdemir ve Floros 2008). Sorbitol ve gliserol içeren polioller, protein zincirler arasındaki intermoleküler güçleri azaltırlar böylece esnekliği arttırıp, kırılğanlığı azaltırlar. Peyniraltı suyu protein izolatları, filmlerinin mükemmel gaz bariyeri özelliklerinden dolayı, taze meyveleri kaplamada potansiyel biopolimerler olarak kullanılabilirler (Cisneros-Zevallos ve Krochta 2003). Peyniraltı suyu protein bazlı kaplamalar; kahvaltılık tahıllar, kuru üzüm, dondurulmuş bezelyeler ve peynir parçaları üzerinde ve yer fıstıklarında da oksijen bariyeri olarak uygulanmıştır (Gennadios ve ark. 1997).

2.6.1.3. Jelatin film

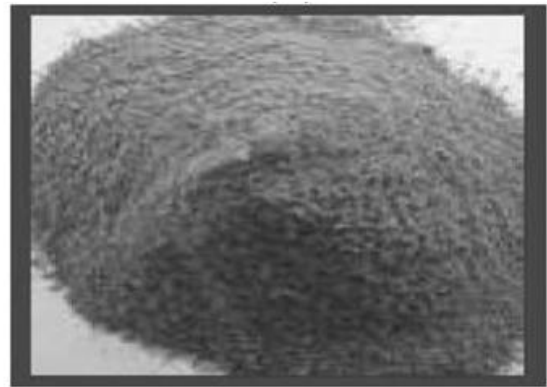
Çözünür jelatin, endüstriyel olarak kemik ve derilerdeki kollajenden elde edilmekte olup, gıda ürünlerinin elastikliğini, kıvamını ve stabilitesini geliştirmek için katkı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Dursun ve Erkan 2009). Glisin, prolin ve hidroksiprolin amino asitleri içeriği bakımından yüksek olan jelatin, ayrıca hidrofilik karakterde çift ve tek açılmış zincirlere sahiptir (Bourtoom 2008). Jelatin, iyi emülsiyon özelliği ve film oluşturma etkisi göstermesi, suda çözünabilirliğinin yüksek ve yenilebilir olması sebebiyle iyi bir kaplama materyalidir (Peker ve Aslan 2011).

Jelatinlerin film oluşturma özelliği direkt olarak molekül ağırlığı ile orantılı olup; yüksek molekül ağırlıklı olanlar en iyi kalitede olan filmi oluştururlar. Molekül ağırlığı dağılımı ise özellikle kollajenin çapraz bağlanma derecesi ve ekstraksiyon prosedürü ile ilişkilidir (Skurtys 2010). Jelatin filmler, % 20-30 jelatin, % 10-30 plastikleştiri (gliserin veya sorbitol) ve % 40-70 su ile oluşan jelin kurutulmasıyla oluşur (Bourtoom 2008, Wittaya 2012).

Jelatinler, gıda katkılarının ve ilaçların düşük nem ve yağ fazının enkapsülasyonu için kullanılırlar (Wittaya 2012). Jelatin filmler ayrıca, oksijen, nem ve yağ geçişini azaltmak için etlerde kaplama olarak kullanılırlar (Bourtoom 2008, Wittaya 2012). Jelatinler şeffaf ve güçlü filmler oluşturmakta, gıda ve ilaç imalatında mikroenkapsulasyon ve kapsül kaplamaları olarak da kullanılmaktadırlar (Wittaya 2012). Jelatine ait tanımlayıcı resim şekil 2.1'de verilmektedir.



a



b

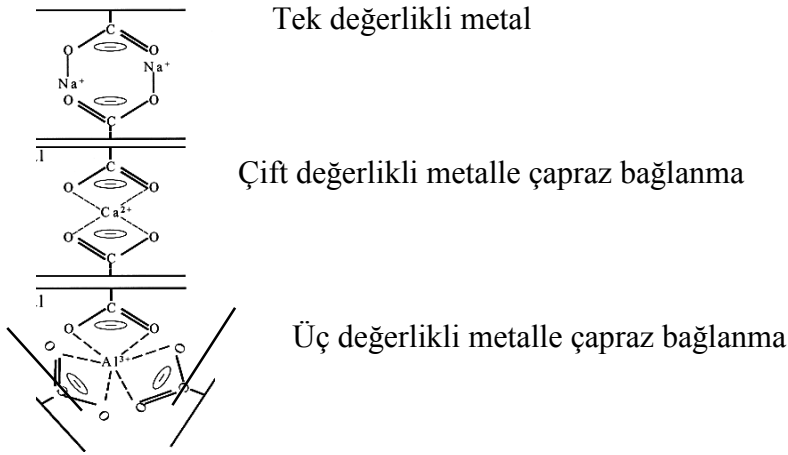
şekil 2.1. Jelatin (a), mısır zeini (b) tanımlayıcı resimleri (Bourtoom 2008)

2.6.2. Polisakkarit yenilebilir filmler

Polisakkarit filmler, nişasta, alginat, selülozeter, kitosan, karregenana veya pektinlerden yapılmakta olup, birçok filme sertlik, kırılma, kompaktlık, kalınlık kalitesi, viskozite, yapışkanlık, jel oluşturma kabiliyeti vermektedir. Bu filmler polimer zincirlerinden oluştuklarından mükemmel gaz geçirgenliği sergilemektedirler (Pashova ve Zhivkova 2010, Dhanapal ve ark. 2012). Ancak polisakkaritlerin hidrofilik yapılarından dolayı, zayıf su buharı bariyer özelliği bulunmaktadır (Bourtoom 2008, Pashova ve Zhivkova 2010).

2.6.2.1. Alginat filmler

Alginat, kahverengi deniz yosunundan ekstrakte edilen, β -D-mannuronic asit (M) ve α -L-guluronic asit (G) polimeri olan alginik asitin tuzudur (Olivas ve Barbosa-Ca'novas 2008). Polimer zincirinde, monomerler MG bloklarıyla birlikte GG ve MM blokları dönüşümlü olarak sıralanırlar (Zactiti ve Kieckbusch 2006). Alginik asit, oluşan herbir residü doğal olarak karboksil grup içeren ve fonksiyonel materyal olarak birçok kabiliyete sahip olan tek polisakkarittir. Alginatların en önemli ve yararlı özelliği kalsiyum iyonları gibi polivalent metal katyonlarla reaksiyona girerek, güçlü jeller ve çözünmez polimerler oluşturmasıdır (Rhim 2004, Norajit ve ark. 2010). Çok değerlikli iyonlarla alginat jel ağ oluşumu Şekil 2.2.'de gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Çok değerlikli iyonlarla alginat jel ağ oluşumu (Huang ve Moon 1999)

Polivalent katyonlarla çarpaz bağlanma, filmin; suya dayanıklılık, mekanik direnç, bariyer özellikleri, bağlılık ve sertlik gibi karakteristik özelliklerini geliştirmektedir (Zactiti ve Kieckbusch 2006). Hidrofilik polisakkarit tip polimerler arasında alginat membranı özel bir ilgiye sahiptir. Çünkü pervaporasyon dehidrasyonu için yapılan testlerde hidrofilik materyaller arasında en yüksek akış ve ayırma faktörüne sahip olma özelliği göstermiştir (Huang ve Moon 1999).

Kalsiyum alginat jeller, gıda proses endüstrisinde, et ürünleri, soğan halkaları, çilek kokteylleri gibi ürünlerde kullanılmaktadır (Rhim 2004).

2.6.2.2. Nişasta filmler

Amilopektin ve amilozdan oluşan nişastanın en büyük kaynağını, öncelikle mısır gibi hububatlar oluşturmaktadır. Genellikle kullanılan diğer kaynakları; buğday, patates, tapyoka ve pirinçtir (Dhanapal ve ark. 2012). Nişasta, bitkisel alemde en yaygın polisakkaritlerden biri olup, tek başına veya diğer sentetik polimer yada monomerlerle birlikte birçok uygulaması bulunmaktadır (Psomiadou ve ark. 1996). Amiloz nişastanın film oluşturma kapasitesinden sorumlu olan kısmıdır (García ve ark. 2000; Dhanapal ve ark. 2012). Yüksek amiloz nişasta filmleri, esnek, oksijen geçirmez, yağa dirençli, ısıyla kapanabilir ve suda çözünebilirler. Nişasta bazlı filmler, plastik filmlere benzer fiziksel karakteristikler sergilerler şöyle ki; toksik olmayıp, kokusuz, tatsız, renksizdirler, karbon dioksit karşı yarı geçirgen ve oksijen geçişine karşı dirençlidirler (Dhanapal ve ark. 2012).

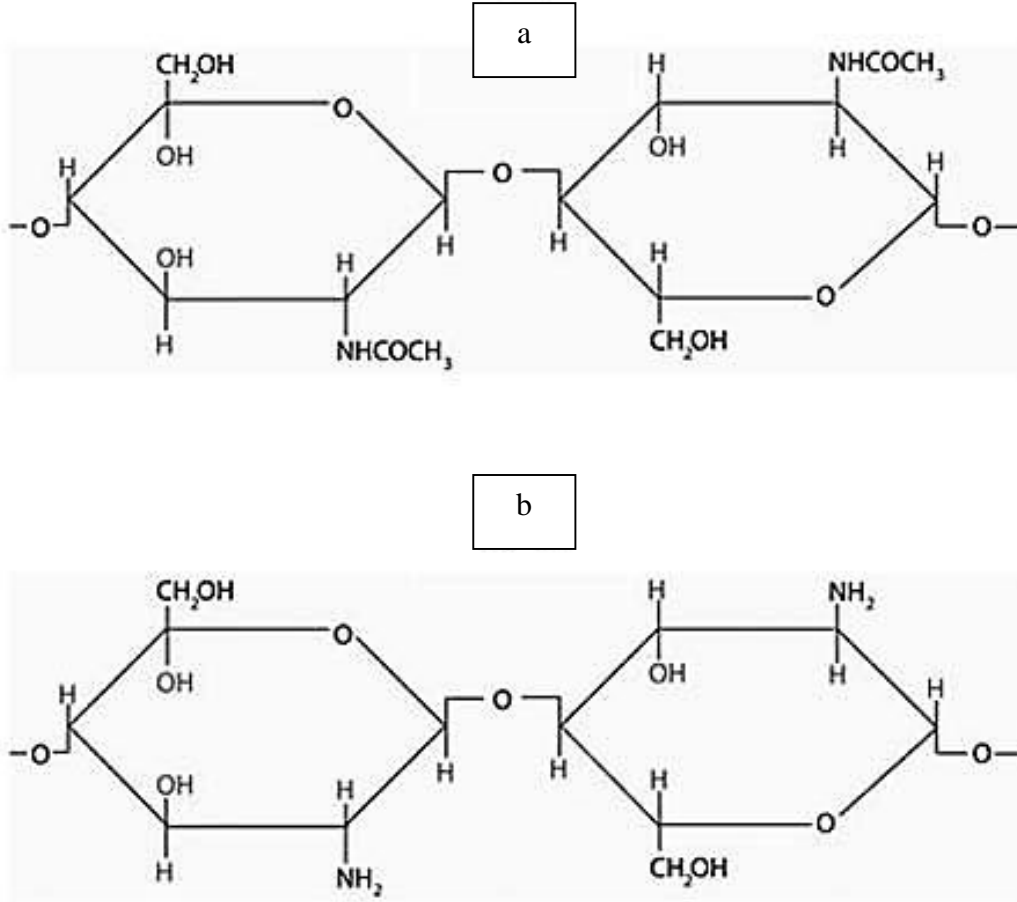
Nişasta yenilebilir filmlerin oluşumu, nişasta partiküllerinin bol suda ısıtılmak suretiyle jelatinizasyonunu içerir. Bu prosedür, granülden çözünebilir bileşenlerin (amiloz) süzülmesi olduğu kadar nişasta partiküllerinin şişmesi ve parçalanması ile sonuçlanır. Vizkos bir kitle elde edilir, sıcak macun kıvamındaki çözeltinin soğutulmasıyla viskoelastik jel oluşur. Gliserol, sorbitol veya polietilen glikol, mono-, di-, veya oligosakkaritler, yağ asitleri, lipitler, ve türevleri; film kırılma direncini artırmak ve filmin esnekliğini ve uzayabilirliğini geliştirmek için kullanılır (Flores ve ark. 2007).

Elma dilimlerinin ve kurutulmuş kaysıların nişasta hidrolizatları ile kaplanması, çok daha iyi aromayla sonuçlanır ki; bu da nişasta kaplamalarının potansiyel aroma bariyer özelliğini göstermektedir (Miller ve Krochta 1997).

2.6.2.3. Kitosan yenilebilir film

Kitin, doğada selülozdan sonra en çok rastlanan ikinci polisakkarittir (Dutta ve ark. 2009). Kabukluların dış kabuklarında, mantarların hücre duvarlarında ve diğer birçok biyolojik materyallerde bulunmaktadır (Bourtoom 2008). Kitinin deasetilasyonu ile elde edilen doğal kaynaklı bir biyopolimer olan kitosan gıda kaynaklı bakteri, küf ve mantarlara karşı antimikrobiyal aktivitesi ile gıdalar için potansiyel bir koruyucu katkı maddesidir. Kitin ve kitosanın yapısı Şekil 2.3.'de gösterilmektedir. Bu özelliğinin yanı sıra film oluşturabilme ve bariyer özelliklerinin olması kitosani antimikrobiyal özellikte yenilebilir film ve kaplamalar için ideal bir materyal haline getirmektedir (Torlak ve Nizamlioğlu 2009, Torlak ve Nizamlioğlu 2011, Gürel İnanlı ve Kuzgun 2012). Kitosanın Kore ve Japonya'da uzun

yıllardır gıda katkı maddesi olarak kullanımı yasaldır. ABD' de ise GRAS olarak onaylanmıştır (Torlak ve Nizamlioğlu 2009, Torlak ve Nizamlioğlu 2011).



Şekil 2.3. Muzzarelli (1996) tarafından resmedilen kitin (a) ve kitosanın (b) yapısı (Bourtoom 2008)

Kitosan antimikrobiyal aktivitesi ile gıda kaynaklı bakteri, küf ve mantarlara karşı potansiyel bir koruyucu katkı maddesidir. Kitosanın yapısında bulunan reaktif amino (NH_2)-grupları, kitosanın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin temelini oluşturmaktadır. Kitosanın polikationik özellikte olması, antimikrobiyal etkiye sahip olmasını sağlamaktadır. Bakteri, maya, küf ve patojenlere karşı etkili olabilmesi, negatif yüklü maddelere karşı etkili olmasından kaynaklanmaktadır. Yapılan araştırmalar kitosanın antioksidan aktivitesini ise esas olarak polimer zincirlerindeki aktif hidroksil ve amino gruplarına bağlı olarak gösterdiğini ortaya koymuştur (Gürel İnanlı ve Kuzgun 2012).

Kitosan filmler, dayanıklı, esnek ve çok zor yırtılabilen özellikte olup, bu mekanik özelliklerinin çoğu ile birçok orta güçteki ticari polimerlerle yarışabilir durumdadır (Shahidi ve ark. 1997).

Jiang ve Li (2001), Kittur ve ark. (2001), Li ve Yu (2001), Elibol (2008) tarafından Kitosanın film oluşturma özelliğinin, gıda maddelerinin patojenlere karşı korunmasında bu biyopolimere oldukça önemli bir özellik katmakta olduğunu belirtmekte olup bu kapsamda kitosanın meyvelerin saklanmasında potansiyel bir kaplama ajanı olduğu düşünülmektedir (Gürel İnanlı ve Kuzgun 2012).

Kitosan gıda teknolojisinde en yaygın olarak film şeklinde kullanılmakta olup, özellikle sebze ve meyvelerin kalitelerinin korunması ve depolama süresinin artırılmasında kitosanın kullanım potansiyeli ortaya konulmuştur. Gıdaların kitosan filmi ile kaplanması ambalaj içindeki kısmi oksijen basıncını azaltmakta, gıda ile çevresi arasındaki nem transferi ile sıcaklığı kontrol altında tutmakta; su kaybını azaltmakta, meyvelerde enzimatik kahverengileşmeyi geciktirmekte ve solunumu kontrol etmektedir. Bostan ve ark. (2007)'de kitosandan ayrıca, doğal aromanın artırılması, tekstürün ayarlanması, emülsifiye edici etkinin artırılması, rengin stabilizasyonu ve deasidifikasyon gibi konularda da yararlandığını bildirmektedir (Shadidi ve ark. 1999). Shadidi ve ark. (1999) makalelerinde; Cuero ve ark.'larının N-korboksimetilkitosanın *A. flavus* ve *A. parasiticus* üremesini yarıdan aza düşürürken, bu küflerce oluşturulan aflatoksin üretimini ise %90'dan fazla azalttığını gözlemlediğini bildirmişlerdir. Yine aynı makalede, Savage ve Savage'nin kitosan ile kaplanan elmaların 12 hafta boyunca elmalarda oluşan küf oluşumunda azalma olduğunu belirttikleri anlatılmıştır.

2.6.3. Lipid yenilebilir filmler

Gıdaların yağ ile kaplanması, meyvelerin mumlanması ve çikolata kaplamaları gibi şekerleme ürünleri için eskiden beri uygulanmaktadır (Anonim 1997). Koruyucu kaplama olarak kullanılan lipit bileşiklerin en önemli fonksiyonu, düşük polaritelerinden dolayı nem geçişini bloke etmeleridir. Tam ters olarak da, lipitler hidrofobik karakterlerinden dolayı daha kalın ve kırılabilir film oluştururlar (Bourtoom 2008). Asetilenmiş monogliseritler ve mumlar bu grup içerisinde yer almaktadır.

2.6.3.1. Asetilenmiş monogliseritler

Nem geçişine karşı asetilenmiş monogliseritler yenilebilir bariyerler oluşumunda tercih edilen bir bileşendir. Asetilenmiş monogliseritler, mumsu ve nem geçişine karşı oldukça sızdırmaz olan stabil α -formunda kristallere katılırlar (Lindstrom 1992). Asetilenmiş monogliseritlerin asetilasyon derecesi arttıkça bariyer özellikleri iyileşmektedir. Bu kaplamalar depolama süresince dehidrasyonu önlemek için parça etler ve kümes hayvanı etlerinde kullanılmaktadır (Anonim 1997).

2.6.3.2. Mumlar

Mumlar uzun zincirli alkoller ve onların yağ asidi esterlerinden oluşmaktadır. Daha çok taze meyve ve sebzelere uygulanmakta olup, en çok kullanılan yenilebilir kaplamalar arasında yer almaktadır. Mumlar nem kaybını engellemekte ve yüzey parlaklığını geliştirmektedir (Lindstrom 1992). Parafin mumlar, balmumu, carnauba ve candelilla gibi mumlar meyve ve sebzelerin kaplanmasında kullanılmaktadırlar (Anonim 1997).

2.6.4. Kompozit filmler

Polisakkarit, protein ve lipitlerin farklı kombinasyonları ile oluşturulan filmlere kompozit filmler denilmektedir. Bu tür filmler, filmlerin değişik özelliklerini bir araya getirdiğinden, elde edilen filmler de daha iyi fiziksel ve bariyer özelliklerine sahip olabilmektedir. Anker ve ark. 2002 yaptıkları çalışmada, peynir altı suyu izolatlarından oluşan filme lipit ekleyerek su buharı geçirgenliğini, sadece peynir altı suyu izolatlarından oluşan filmler göre 70 kat azaltmıştır.

2.7. Aktif Ambalajlama

Tarihin ilk çağlarından beri insanoğlu, gıdasını daha sonraki tüketimi için, korumak ve taşımak amacı ile ambalajı kullanmıştır. Böylece ambalaj kabı yeryüzünde ilk üretilen araç ve gereçlerin başında gelmektedir (Yiğit 2007). Ambalaj, ürünlerin niteliğinin korunumu için, muhafazası, taşınması ve son kullanımında rol oynayan en önemli faktörlerden biridir (Han 1999). Ayrıca gıda ambalajı, kimyasal ve fiziksel hasarlara karşı gıdanın korunmasını, ürün kullanım kolaylığını, tüketici için ürün bilgisini sağlamakta olup, oksijen, nem, kimyasal bileşikler ve gıdanın niteliğini bozan mikroorganizmalara karşı bariyer oluşturmaktadır (Lindstrom 1992). Gıdanın aroma, koku, nem kayıplarını önleyen ambalajlar, etiket bilgileri

sayesinde de tüketiciyi gıdanın içeriği, besleyici değeri, son kullanma tarihi, üretici firma adı, adresi hakkında bilgilendirir.

Tüketici istekleri ve endüstriyel üretim eğilimlerinin, uzun raf ömürlü, az koruyucu içeren, taze, lezzetli ve pratik gıda ürünlerine olması sebebiyle yeni gıda ambalajlama teknikleri gelişmektedir (Dainelli ve ark. 2008). Bir ambalajlama çeşidi olan aktif ambalajlama, paketleme şartlarını değiştirerek, gıdanın raf ömrünü uzatan, güvenilirliğini ve duyuşal özelliklerini arttıran bu arada da niteliğini koruyan bir paketleme türüdür (Quintavalla ve Vicini 2002). Genel olarak, aktif gıda ambalajlama, geleneksel paketleme sistemlerinde var olmayan birçok işlevi sağlamaktadır (Han 2001). Organik asitler ve tuzları, antioksidanlar, insektisit, fungusitler, bakteriyosinler, enzimler, alkoller, oksijen ve nem tutucular gibi ambalaj materyallerine eklenen aktif maddeler sayesinde antimikrobiyal aktivite, antioksidan aktivite, değişik aroma, gaz bileşiklerinin temizlenmesi veya yayılması gibi fonksiyonlar sağlanmaktadır. Fakat yenilebilir filmlerin ve kaplamaların kullanılması durumunda kullanılan aktif maddelerinde, gıdayla ve yenilebilir filmle tüketilebilecek özellik ve güvenilirlikte olması gerekmektedir. Enzimler, proteinler, doğal yağlar, karbonhidratlar, pigmentler, baharatlar doğal aktif ajanlara; potasyum sorbat, benzoik asit, sorbik asit asetik asit gibi organik asitler ise gıdayla kullanılabilen kimyasal ajanlara örnek verilebilir (Han 2001).

2.7.1. Antimikrobiyal paketleme ve çeşitleri

Antimikrobiyal paketleme, aktif paketlemenin bir şeklidir. Teknolojide olan gelişmelerle birlikte son yıllarda antimikrobiyal gıda ambalajları da önemli bir gelişim göstermiştir. Bu sebeple, antimikrobiyal ambalajların ticari olarak üretimleri artmış, gıdaların muhafazası ve raf ömürlerinin arttırılmasındaki kullanımı da yaygınlaşmıştır. Böylece tüketicilere daha güvenli ve daha sağlıklı gıdalar sunumu olası hale gelmiştir (Özdemir ve ark. 2011a). Aktif paketleme, istenen sonucu elde etmek için, ürün veya ambalaj materyali ve gıda sistemi arasındaki boşlukla etkileşime girer. Aynı şekilde, antimikrobiyal gıda paketleme, paketlenmiş gıdada veya paketleme materyalinin kendisinde bulunabilen mikroorganizmaların gelişimini azaltacak, geciktirecek veya inhibe edecek şekilde davranır (Appendini ve Hotchkiss 2002). Antimikrobiyal filmler etkinlikleri, antimikrobiyal maddenin gıda yüzeyine direkt temasıyla, gıda ambalajı içindeki tepe boşluğuna göç ederek veya film yüzeyine immobilize haldeyken gerçekleşebilir. Kimyasal ve fiziksel modifikasyonla film yüzeyine antimikrobiyal özellik kazandırılması da bir diğer uygulamadır (Özdemir ve ark. 2011b).

Antimikrobiyal ambalajlama materyalleri, raf ömrünü uzatmak ve gıda güvenilirliğini sağlamak için lag periyodu uzatmalı, mikroorganizmaların büyüme hızını düşürmelidir (Han 2000). Antimikrobiyal ambalajlar plastik ve esnek filmlerden üretilmekte olup, polisakkaritler, proteinler, lipid gibi yenilebilir doğal maddelerden de antimikrobiyal film üretimi olmaktadır.

Aktif antimikrobiyal paketlemede kullanımı deneysel çalışmalarla araştırılan doğal bileşimler Çizelge 2.2.'de verilmektedir.

Çizelge 2.2. Gıda ambalajlamada kullanılan polimerlere direkt olarak eklenen doğal aktif bileşimler

Aktif Bileşen	Polimer/Taşıyıcı	Substrat	Referans
Lizozim	PVOH, naylon, selüloz asetat	Kültür besiyeri	Appendini ve Hotchkiss 1997
Laktisin	Selüloz film, PE	Peynir, jambon	Scannell ve ark. 2000
Glukoz oksidaz	Alginat	Balık	Field ve ark. 1986
Greyfurt tohumları ekstraktı	LDPE	Marul, soyafasulyesi filizleri	Lee ve ark. 1998

2.7.1.1. Uçucu antimikrobiyal ajanları içeren kesecik ve pedlerin paketlerin içerisine eklenmesi

Antimikrobiyal paketlemenin en başarılı ticari uygulaması, ambalaj içerisine bağlanmış veya gevşekçe iliştilmiş keseciklerdir. Oksijen tutucular, nem tutucular, etanol buharı üreticileri olmak üzere çoğunlukla kullanılan üç şekli vardır (Appendini ve Hotchkiss 2002).

Oksijen tutucular: Gıdaların ambalajlarında bulunan yüksek seviyelerdeki oksijen miktarı mikrobiyal gelişmeyi hızlandırır (Coma 2008). Moleküler O₂ obligat aerobik, fakültatif anaerobik ve mikroaerofilik mikroorganizmaların gelişimini teşvik eder, kötü tat-koku ve renk oluşumuna sebep olur ve besinsel değer kaybına yol açar (Chen ve Brody 2013).

Oksijen tutucular antimikrobiyal olarak düşünülmesi de; oksijen miktarındaki azalma aerobların ve kısmen de küflerin gelişmesini engellemektedir (Appendini ve Hotchkiss 2002).

Nem tutucular: Ortam nemini istenilen düzeyde tutmak, kuruma ve aşırı nem çekmeyi önlemek için, su buharı geçirgenliği ayarlanabilen filmler, nem çekerler veya nemi kontrol altında tutan pedler kullanılmaktadır (Budak Bağdatlı ve Kayayardı 2010). Nem tutucular, a_w 'yi düşürerek dolaylı olarak mikrobiyal gelişmeyi etkilemektedir.

Oksijen ve nem tutucular, fırıncılık ürünleri, makarna ve et paketlemede, oksidasyon ve su yoğunlaşmasını engellemede kullanılır (Appendini ve Hotchkiss 2002).

Etanol Buharı Üreticileri: Taşıyıcı materyal içerisinde bulunan veya absorblanmış ve polimer paketleri içerisinde ekli etanolden oluşur. Etanol selektif bariyerden sızarak, paket içerisindeki boşluğa salınır. Üretilen etanolün miktarı göreceli olarak az olduğundan ve sadece düşük su aktiviteli ürünlerde etkili olduğundan ($a_w < 0.92$), uygulamalar en çok fırıncılık ürünleri ve kurutulmuş balık ürünlerinde oluşan küfleri geciktirmek için kullanılır. Bu uygulamanın dezavantajlarından biri etanolün karakteristik kötü kokusudur (Appendini ve Hotchkiss 2002).

2.7.1.2. Uçucu ve uçucu olmayan antimikrobiyallerin direkt polimerlere katılması

GRAS, GRAS olmayan ve doğal antimikrobiyaller, kağıt, termoplastik ve termosetlerin içerisine katılmış ve *Listeria monocytogenes*, patojenik *E.coli*'yi de kapsayan çeşitli mikroorganizmalar ve küfler de dahil bozulmaya yol açan organizmalar üzerinde denenmiştir (Appendini ve Hotchkiss 2002).

Antimikrobiyallerin ambalaj içerisine eklenmesinin mantığı, gıdalarda bozulma ve kontaminasyonu büyük oranda oluşturan yüzey gelişimini engellemektir (Appendini ve Hotchkiss 2002). Böylece gıdadaki spesifik mikroorganizmaların üreme hızını düşürerek canlı mikroorganizma sayısını azaltmakta, gıdanın raf ömrünü ve kalitesini arttırabilmektedir (Ayana ve Turhan 2010).

Antimikrobiyaller polimerler içerisine erimiş haldeyken veya solvent bileşikleri içerisine eklenebilir. Enzimler ve uçucu bileşikler gibi ısıya duyarlı antimikrobiyaller polimerlere eklenmesi için solvent bileşikleri çok daha uygun bir yöntemdir. Bu yöntemde polimerde antimikrobiyalde aynı solventte çözünebilir olmalıdır. Film ve kaplamaları oluşturan protein, karbonhidrat ve lipit çeşitliliğinin yaygın olmasından dolayı, biyopolimerler

bu yöntemle yapılan film oluşturma prosesi için iyi adaylardır. Eğer antimikrobiyaller uçucu değilse antimikrobiyal paketleme materyalleri gıdanın yüzeyi ile temas etmelidir ki böylece antimikrobiyal ajanlar yüzeye diffüze olabilirler. Bu sebepten yüzey karakteristikleri ve difüzyon kinetikleri çok önemli olmaktadır (Appendini ve Hotchkiss 2002).

Uçucu antimikrobiyallerin salınımını sağlayan paketleme materyalleri de geliştirilmektedir. Bunlar chlorine dioksit, sülfürdioksit, karbondioksit ve allilisotiosiyanat salınım sistemleridir (Appendini ve Hotchkiss 2002).

2.7.1.3. Polimerlerin yüzeylerinin üzerine antimikrobiyallerin kaplanması veya adsorbe edilmesi

Polimerlerin prosesleri sırasında kullanılan sıcaklıkları tolere edemeyen antimikrobiyaller genelde oluşumundan sonra materyalin üzerine kaplanır veya kalıp filmlere eklenir. Proteinler ampifilik yapılarından dolayı adsorbsiyon için yüksek kapasiteye sahiptirler (Appendini ve Hotchkiss 2002).

2.7.1.4. Antimikrobiyallerin polimerlere iyonik veya kovalent bağlarla immobilizasyonu

Bu tip immobilizasyon hem antimikrobiyal hem polimer üzerinde fonksiyonel grupların varlığına gereksinim duyar. Antimikrobiyallerin polimerler üzerine iyonik bağlanması, antimikrobiyalın gıdaya yavaş salınımına izin verir (Appendini ve Hotchkiss 2002).

2.7.1.5. Doğal olarak antimikrobiyal olan polimerlerin kullanılması

Kitosan, selülozdan sonra doğada en fazla bulunan ikinci yenilebilir polimer olan kitinin deasetile edilmesiyle elde edilen, glukozamin ve N-asetil glukozamin kopolimerini içeren, modifiye ve doğal bir karbonhidrat polimeridir (Karaton Kuzgun ve Gürel İnanlı 2012, Taştan ve Baysal 2013). Polikasyonik özelliğe sahip olan kitosanın, negatif yüklü maddelere karşı interaksiyon etkisi göstermesinden dolayı, bakteri, maya ve küflere karşı antimikrobiyal etki gösterdiği belirtilmektedir (Kurt ve Zorba 2005).

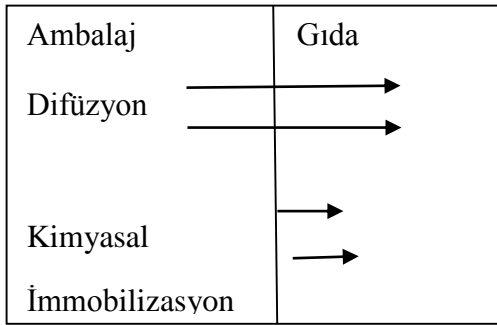
Kitosan, meyve sebze endüstrisinde bakteriyosidal ve fungisidal etki yaparak antimikrobiyal özellik göstermektedir (Taştan ve Baysal 2013).

2.7.2. Antimikrobiyal paketleme sistemleri

Gıda ambalajlama sistemlerinin çoğu, ambalaj/gıda sistemi veya ambalaj/tepe boşluğu/gıda olmak üzere ikiye ayrılabilir (Han 2000, Quintavalla ve Vicini 2002).

2.7.2.1. Ambalaj/gıda sistemi

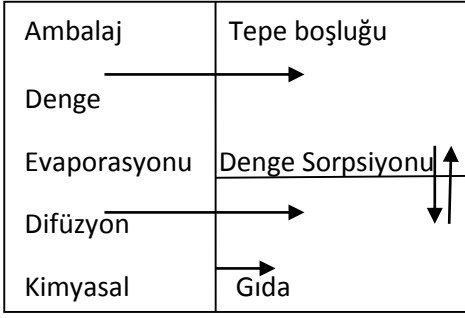
Ambalaj materyali ile temasta katı gıda ürünü, hava boşluğu bulunmayan düşük viskoziteli ya da sıvı gıda ambalaj/gıda sistemi olarak verilebilir. Paketlenmiş yenilmeye hazır et ürünleri, paketlenmiş peynir, hazır yemek ürünleri en iyi örneklerindendir (Han 2000, Quintavalla ve Vicini 2002). Ambalaj materyali ve gıda arasındaki difüzyon ve ara yüzeydeki bölme bu sistemde yer alan en önemli migrasyon olgusudur (Şekil 2.4.). Antimikrobiyal ajanlar ambalaj materyaline başta eklenmiş olabilir ve difüzyon ve bölünme sırasında gıdaya göç eder (Han 2000).



Şekil 2.4. Ambalaj/gıda sistemi (Quintavalla ve Vicini 2002)

2.7.2.2. Ambalaj/tepe boşluğu/gıda sistemi

Ambalaj/tepe boşluğu/gıda sistemi, esnek paketlerde, kaplarda ve karton kutularda paketlenen gıdalar olarak gösterilebilir. Buharlaştırma veya bir maddenin tepe boşluğu, ambalaj materyali ve/veya gıda arasındaki dengelenirilmiş dağılımı, o maddenin ara yüzey dağılımını değerlendirmek için en önemli migrasyon mekanizması parçası olarak düşünülmelidir (Şekil 2.5). Uçucu bir aktif madde bu sistemde kullanılabilir ve bu madde ambalaj ve gıda arasındaki tepe boşluğu ve hava boşluklarına göç edebilir (Han 2000, Quintavalla ve Vicini 2002).



Şekil 2.5. Ambalaj/tepe boşluğu/gıda sistemi (Quintavalla ve Vicini 2002)

2.7.3. Antimikrobiyal ambalajlamanın etkisini belirlemeye yönelik metodlar

Antimikrobiyal paketlemenin gıdalarda bulunan mikroorganizmalar üzerine etkisini değerlendirmek için minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) metodu, agar difüzyon metodu ve sallanan erlen metodu kullanılmaktadır (Appendini ve Hotchkiss 2002).

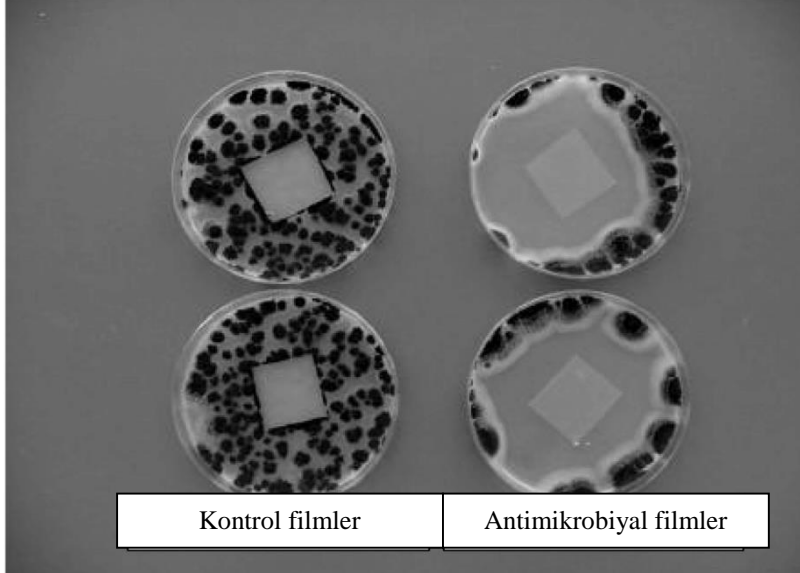
2.7.3.1. Minimum inhibisyon konsantrasyonu metodu

MIC, polimerin antimikrobiyal gücünü gösterir ve polimerin antimikrobiyal aktivitesini, sade antimikrobiyal maddenin kendisi ile kıyaslanmasına izin verir. Bu methoda gelişme besiyeri içeren tüplere hedef mikroorganizma ekimi yapılır ve değişik konsantrasyonlarda antimikrobiyal madde içeren polimerler eklenir. Tüpler daha önce belirlenen zaman periyodu süresince inkübe edilir ve bulanıklık gözle kontrol edilir. MIC, test edilen mikroorganizmanın tamamen inhibe olduğu polimer içerisindeki antimikrobiyalın minimum konsantrasyonudur. Sonuçlar, polimerin boyutlarını, kompozisyonunu ve örnekten örneğe değişen konu ile ilgili diğer özellikleri kapsar (Appendini ve Hotchkiss 2002).

2.7.3.2. Agar plaka metodu

Agar plaka metodunda, antimikrobiyal film, test mikroorganizmasını içeren katı agar besiyeri üzerine yerleştirilir. Agarlar üreme görülünceye kadar inkübe edilir. Filmlerin etrafındaki şeffaf zonlar, filmde antimikrobiyal difüzyonunun ve sonrasında da gelişme inhibisyonunun bir göstergesidir. Filmin sadece altında gelişmenin olmaması, inhibisyonun göstergesi olabilir fakat gerekli kontrollerin de yapılması gerekir çünkü bu oksijenin basit kısıtlanmasından da kaynaklanabilir. Agar difüzyon metodu, gıdalarda filmin kontamine yüzeylerle temas ettiğinde ve filmde gıdaya antimikrobiyal madde geçişinde ne olabileceğini gösterebilir. Filmlerin etrafındaki şeffaf zonların çaplarının ölçülmesiyle metod nicel hale

gelebilir (Appendini ve Hotchkiss 2002). Antimikrobiyal plastik filmlerin *Aspergillus niger* üzerine etkisi Şekil 2.6.'de verilmektedir.



Şekil 2.6. Antimikrobiyal plastik filmlerin *Aspergillus niger* üzerine etkisi (Appendini ve Hotchkiss 2002)

2.7.3.3. Sallanan erlen metodu

Sallanan erlen metodu, antimikrobiyal kinetiği hakkında daha detaylı bilgi sağlayabilir. Sıvı besiyeri (tampon, gelişme besiyeri veya gıdalar) hedef mikroorganizmalarla ekilir ve antimikrobiyal polimer eklenir. Erlenler hafif çalkalama ile inkübe edilir. MIC testten farklı olarak, zaman içerisinde örnekler alınır ve sayım yapılır. Bu test önemli bir gelişme olsa bile gelişme hızındaki düşüşü ölçebilir. Tampondaki deneyler polimerlerin mikrosidal özellikleri hakkında bilgi sağlarken, besiyerindeki deneyler mikrobiyal gelişme kinetiği ve polimerlerin antimikrobiyal davranış modu hakkında bilgi sağlar. Antimikrobiyal filmleri, sallanan erlen yöntemi test ederken, filmin yüzey alanının, besiyeri ya da ürünün hacmine oranı göz önünde tutulmalıdır (Appendini ve Hotchkiss 2002).

2.7.4. Gıda ambalajlarına katılan antioksidanlar

Hava oksijeninin etkisiyle yağ ve yağ içeren gıdalar oksidasyona uğramakta, hava oksijeni ile gıdanın bileşenleri arasında kendiliğinden meydana gelen bu olaya otooksidasyon

denilmektedir. Oksidasyonla bozulma sonucu, katı ve sıvı yağlar ile yağ içeren gıdalarda ransit tat ve aroma oluşumu, toksik oksidasyon ürünleri oluşumu, pigmentlerde renk açılması, üründe tat ve koku kaybı ve bozuklukları, tekstüründe değişimler, vitaminler (A, D ve E) ve esansiyel yağ asitlerinin (özellikle linoleik asit) bozulumundan dolayı besleyicilik değerinin azalması meydana gelmektedir (Çakmakçı ve Gökalp 1992).

U.S. FDA, antioksidanları, “oksidasyondan kaynaklanan bozulma, acılaşıma ve renk kaybını geciktiren koruyucular” olarak tanımlamaktadır (Specchio 1992). Antioksidantlar, gıda endüstrisinde, normal sıcaklıklarda atmosfer oksijeninin etkisini geciktirerek, gıdanın acılaşmasını ve bozulması belli bir müddet engelleyen en etkili maddelerdir (Çakmakçı ve Gökalp 1992).

Butillenmiş hidroksianisol (BHA) ve Butillenmiş hidroksitoluen (BHT), propil gallat (PG), Tersiyer bütül hidrokinon (TBHQ) gibi sentetik antioksidanlar genellikle işlem görmüş gıdalarda kullanıldığı halde bu antioksidanların yan etkileri olduğu bildirilmektedir (Yıldırım ve ark. 2000, Öztürk ve ark. 2004). Tüketicilerin de insan sağlığı üzerine ciddi etkileri bulunan sentetik koruyuculardan kaçarak, doğal olanlara yönelimleri gıda endüstrisini de doğal antioksidan kaynakları aramaya yöneltmiştir.

Antioksidanlar birinci veya uzun dönem ve ikinci veya işlem antioksidanları olarak sınıflandırılabilirler. Birinci olanlar, aktif radikal süpürücüleri, hidrojen donörleri veya zincir reaksiyon kırıcıları iken, ikinciler ise peroksit ayrıştırıcılarıdır (André ve ark. 2010).

Antimikrobiyal ajanların ambalaj materyallerine katılımı yanında, antioksidanların da eklenmesi popüler olmaya başlamıştır. Çünkü oksidasyon gıda kalitesini etkileyen en önemli problemlerdendir (Mecitoğlu Güçbilmez ve ark. 2007). Çizelge 2.3.’de antioksidan yenilebilir filmlerin gıdalara yapılan uygulamaları bulunmaktadır.

Çizelge 2.3. Antioksidan yenilebilir filmlerin uygulamaları

Film veya Kaplama	Antioksidan Bileşik	Uygulama	Analizler	Referans
Hidroksimetilselüloz,karboksi metilselüloz	α -tokoferol, BHA, BHT	Pekan cevizi	Hegzan duyusal analiz	Baldwin ve Wood 2006
Kalsiyum kaseinat ve peyniraltı suyu isolatı filmleri	Oregano ve/veya Pimento esansiyel yağları	Sığır eti kasları	TBA	Oussalah ve ark. 2004
Kitosanlı ve kitosansız jelatin bazlı filmler	Rosemary veya Oregano esansiyel yağları	Soğuk-füme sardalya	PV, TBA, Toplam fenolik, FRAP metodları	Gomez Estaca ve ark. 2007
Peyniraltı suyu konsantratu veya balmumu	Askorbik asit, sistein, 4-hegzil	Elma	Ağırlık kaybı, renk, duyusal değerlendirme	Perez-Gago ve ark. 2006
Metilselüloz-polietilen glikol (3g:1 ml) stearik asit	Askorbik asit, sitrik asit	Kayısı ve yeşil biberler	Su kaybı, vitamin C	Ayranci ve Tunc 2004

2.7.4.1. Sentetik Antioksidanlar

Gıdalarda en fazla uygulanan sentetik fenolik antioksidanlar, BHA, BHT, PG ve TBHQ' dir (Wanasundara ve Shahidi 2005). BHA ve BHT antioksidan aktif paketlemede en çok kullanılan iki sentetik antioksidan olmakla beraber, polimerlere eklenen PG ve TBHQ antioksidanlarının gıda ve gıda benzerlerine geçişi ile ilgili çalışma bulunmamaktadır (Jamshidian ve ark. 2012). Sentetik antioksidanlardan BHT ve BHA'un aktif paketleme uygulamalarına örnekler verilebilir; HDPE-LDPE, PP, PVC, PET' den sıvı ve yağ içeren gıda benzeri ürünlere BHA ve BHT geçişi (Dopico-Garcia ve ark. 2007), Asadero peynirlerine LDPE'den BHT geçişi (SotoCantu ve ark. 2008), HDPE, EVOH ve LDPE'den yapılmış çok katlı co-extruded filmlerden süt tozuna BHT geçişi (Granda-Restrepo ve ark. 2009) gibi.

Antioksidanların salınımı, difüzyon ve düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin ambalajdan gıda veya gıda benzeri ürünlere geçişini kapsayan denge prosesinin sonucunda oluşmaktadır (Jamshidian ve ark. 2012).

2.7.4.2. Doğal Antioksidanlar

Endüstriyel proste, gıdanın depolama esnasındaki stabilitesini sağlamak için genellikle sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Toksikolojistler ve diyetisyenler, gıda işlemede kullanılan BHA ve BHT gibi sentetik antioksidanların zararlarına uzun zamandan beri dikkat çekmektedirler (Karpińska ve ark. 2001). Ames (1983) ve Baardseth (1989), BHT ve BHA'nın canlılarda kansorejen etki gösterebileceğini bildirmişlerdir (Karpińska ve ark. 2001). Sherwin (1990) ve Wanasundara & Shahidi (1998)'nin bildirdiğine göre; tüketicinin gıda katkı maddelerinin güvenilirliği ile ilgili artan bilinciyle birlikte, BHA ve BHT'nin toksik olabileceği ile ilgili raporlar, tokoferol gibi doğal antioksidanların yüksek üretim maliyeti ve düşük verimi, doğal ve daha güvenilir alternatif gıda antioksidanlarına olan ihtiyacı doğurmuştur (Moure ve ark. 2001).

Meyve ve sebzenin çeşitli hastalıklara karşı koruyucu olmasının vitamin C, vitamin E, α -tokoferol, β -karoten ve polifenolik bileşikler gibi içerdiği çeşitli antioksidanlarla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Biyolojik antioksidanlar, özellikle E vitamini ilk çalışılanlardandır. Canlılarda beslenme ile ilgili antioksidanlar (α -tokoferol, β -karoten, askorbik asit) ve endojen enzimler (süperoksit dismutaz, glutation peroksidaz, katalaz) oksidasyondan kaynaklanan hasarlara karşı koruma sağlarlar (Moure ve ark. 2001).

Vitamin E, yağda çözünebilen, güçlü antioksidan aktiviteye sahip biyolojik bir antioksidandır. Fakat diğer sentetik antioksidanlara göre tokoferollerin dayanıksız olması, kullanımında güçlükler neden olmaktadır (Soycan Önenç ve Açıköz 2005).

Bilaloğlu ve Harmandar (1999) ve Harbone ve Williams (2000), doğal antioksidanların, başta flavonoidler olmak üzere sinamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller, organik asitler gibi bitkilerde ikincil metabolit olarak oluşan fenolik maddeler olduğunu bildirmişlerdir (Öztürk ve ark. 2004). Eski çağlardan beri yiyeceklerin tadını ve stabilitesini iyileştirmek için ilave edilen pek çok aromatik bitki ve baharatlar, zararsız doğal antioksidan maddelerdir (Öztürk ve ark. 2004). Baharatlar; flavonoidler ve fenolik asitler gibi fenolik bileşikler yönünden zengin olup, antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri de içeren geniş alanda biyolojik etki göstermektedirler (Coma 2008). Esansiyel yağların et ürünleri gibi

gıdalara direkt eklenmesi bakteri popülasyonunda hemen bir düşüş sağlarken, eklenen gıdanın duyuşal özelliklerini değiştirebilir. Bu sebeple esansiyel yağların, yenilebilir filmlere eklenmesi özellikle ilgi çekicidir (Coma 2008). Contini ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada, PET tepsi üzerine turunçgil meyvesi ekstraktı ve α -tokoferol püskürterek hazırladıkları aktif paketleri pişirilmiş hindi eti üzerine uygulamışlardır. Turunçgil meyve ekstraktı ile yaptıkları uygulamada oksidasyonda kayda değer bir düşüş görürken, α -tokoferol hiçbir antioksidan etki gösterememiştir.

Protein, peptit ve amino asitler de antioksidanlar olarak kullanılabilir. Örneğin kazein proteininin hem antioksidan hem de emülsifiye kapasitesi bulunmaktadır (Hu ve ark. 2003). Le Tien ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada, kazeinat ve peynir altı suyu kaplamalarının dilimlenmiş patates ve elmalarda oksidatif esmerleşmeyi başarıyla engellediğini bulmuşlardır.

2.8. Esansiyel Yağların Tanımı Tarihçesi ve Elde Edilme Yöntemleri

Esansiyel yağlar; bitkilerin yaprak, çiçek, kabuk, tohum ve köklerinden, su buharı distilasyonu veya ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen, kolayca kristalleşebilme özelliğinde olan, oda sıcaklığında genellikle sıvı formda bulunan, çoğunlukla renksiz veya açık sarı renkli bileşimlerdir (Şengezer ve Güngör 2008). En belirgin özellikleri kokuları ve oda sıcaklığında uçucu olmaları olan ve asıl olarak terpenlerden oluşan esansiyel yağlar, suda çözünmeyen fakat organik çözücülerde kolayca çözünebilen karışımlardır. Esansiyel yağların üretiminde kullanılan distilasyon metodu ilk önce doğuda (Mısır, Hindistan ve İran) 2000'den fazla yıldan önce kullanılmış olup, 9. Yüzyılda Araplar tarafından geliştirilmiştir (Burt 2004). Esansiyel yağlar 13. yüzyılda eczacılar tarafından yapılmaya başlanmış olup, farmakolojik etkileri ilaç kitaplarında anlatılmıştır ancak kullanımı Avrupa'da 16. Yüzyıla kadar yaygınlaşmamıştır. Esansiyel yağların buharlarının bakterisidal özelliklerinin ilk deneysel ölçümünün ise 1881 yılında De la Croix tarafından yapıldığı söylenmektedir (Burt 2004). Günümüzde, yaklaşık 3000 esansiyel yağ bilinmekte olup bunlardan 300 adedi eczacılık, tarım, gıda, temizlik, kosmetik, parfüm endüstrisinde ticari olarak önem arz etmektedir (Bakkali ve ark. 2008).

Bitkilerdeki uçucu yağ miktarına, cinsine ve bitki kısmına göre değişik şekillerde elde edilen esansiyel yağları elde etmede kullanılan yöntemler; Distilasyon Yöntemi, Mekanik Yöntem (Presleme), Anfloranj Yöntemi (Ekstraksiyon), Tüketme Yöntemi (Çözücü ile Ekstraksiyon) olmak üzere dört grupta toplanır (Şengezer ve Güngör 2008).

Grassman ve ark. 2003, Öztürk ve ark. 2002, İşcan ve ark. 2002, uçucu yağları içeren bitki familyaları olarak *Apiaceae* (Maydonozgiller), *Asteraceae* (Papatyagiller), *Brassicaceae* (Turpgiller), *Chenopodiaceae* (Sirkengiller), *Compositaceae* (Bileşikgiller), *Cupressaceae* (Servigiller), *İridaceae* (Süsengiller), *Lamiaceae* (Ballıbabagiller), *Lauraceae* (Defnegiller), *Myrtaceae* (Mersingiller), *Pineaceae* (Çamgiller), *Poaceae* (Buğdaygiller), *Rosaceae* (Gülgiller), *Rutaceae* (Sedefotugiller), *Zingiberaceae* (Zencefilgiller) belirtmişlerdir (Evren ve Tekgüler 2011).

Bazı esansiyel yağların elde edildiği bitkiler, önemli bileşenleri ve uçucu yağ miktarları Çizelge 2.4.'de verilmektedir.

Çizelge 2.4. Bazı esansiyel yağların elde edildikleri bitkiler, önemli bileşikleri ve uçucu yağ miktarları (Şengezer ve Güngör 2008)

Bitki Adı	Elde Edildiği Bitki	Önemli Bileşikleri	Uçucu Yağ Miktarı %
Adaçayı	<i>Salvia officinalis</i> L.	Camphor	6-15
		α -Pinene	4-5
		β -Pinene	2-10
		1,8-Cineole	6-14
		A-tujone	20-42
Bergamot	<i>Citrus bergamia</i> (meyveleri)	α -Pinene	8
		Limonene+ β -Phellandrene	39
		γ -Terpinene	9
		Linalool	11
		Linalyl acetate	28
Biberiye	<i>Rosmarinus officinalis</i>	α -Pinene	2 – 25
		Bomyl acetate	0 - 17
		Camphor	2 - 14
		1,8-Cineole	3 – 89

		Limonene	51
		Trans-Dihydrocarvone	10
Dere Otu	<i>Anethum sowa</i>	Carvone	20
		Dillapiole	37
Karanfil	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol	75 – 85
		Eugenyl acetate	8 – 15
Kekik	<i>Thymus vulgaris</i>	Thymol	10 – 64
		Carvacrol	2 – 11
		γ -Terpinene	2 – 31
		p -Cymene	10 – 56
Portakal	<i>Citrus sinensis</i> L. (meyve kabuğu)	Limonene	92

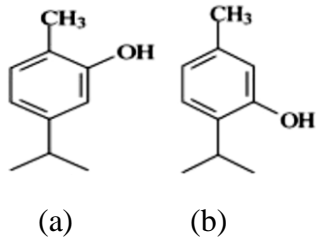
2.8.1. Kekik (*Thymus vulgaris*) esansiyel yağı

Lamiaceae familyasında yer almakta olan kekik (*Thymus vulgaris*) bitkisi, çimenlik tarla kıyılarında, orman kenarlarında, çayırlardaki karınca yuvalarının üstünde yer almaktan hoşlanır, güneş ve sıcak sevdiği için toprak sıcaklığının fazla olduğu kayalık ve dağlık bölgelerde çoğalır (Benli ve Yiđit 2005, Ertürk ve ark. 2010, Emir Çoban ve Patır 2010). Kendine has bir kokusu olan kekik özellikle timol ve karvakrol adlı aktif maddeleri içerir. Bu maddeler, kekiğe kendine özgü kokusunu veren, antimikrobiyal, antifungal (Ložienė ve ark. 2007) ve antioksidan özellik kazandıran fenolik bileşiklerdir (Ertürk ve ark. 2010, Emir Çoban ve Patır 2010). Karvakrol ve timolün yapısı Şekil 2.7.'de verilmiştir. Kekik yağında bulunan fenolik bileşikler, mikroorganizmaların hücre zarında bulunan fosfolipit tabakasını uyarırlar böylece mikroorganizmaların enzim sistemlerini bozarlar ya da hücre içi yaşamsal yapıların geçirgenliğini artırırlar (Lambert ve ark. 2001, Ertürk ve ark. 2010).

Thymus cinsi, en önemlilerinden biri olan *Thymus vulgaris* ile birlikte 215 tür içermektedir. *Thymus vulgaris* ekstraktlarının içerisinde, flavonoidler ve vitamin E gibi uçucu olmayan antioksidanlar da bulunmaktadır. Bu nedenle kekikden elde edilen esansiyel yağlar gıda endüstrisinde doğal koruyucular olarak kullanılabilirler (Ložienė ve ark. 2007).

Çizelge 2.5' de *T.vulgaris*'ten elde edilen kekik yağının spesifik özelliklerine ait bilgiler yer almaktadır.

Sacchetti ve ark (2005) yaptıkları çalışmada, 11 esansiyel yağın, fonksiyonel gıda bileşeni olmasıyla ilişkili özelliklerini değerlendirmişler, bu özellikler, referans bileşen olarak kullanılan *Thymus vulgaris* esansiyel yağı ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada referans olarak kullanılan *Thymus vulgaris* esansiyel yağı DPPH serbest radikalleri süpürme denemesinde % 75,6 ±0,53 inhibisyon gösterirken, β-karoten ağartma testinde de % 90,9±0,64 ile en yüksek antioksidan aktiviteyi göstermiştir.



Şekil 2.7. Karvakrol (a) ve timolün (b) yapısı (Emir Çoban ve Patır 2010)

Çizelge 2.5. *T.vulgaris*'ten elde edilen kekik yağının spesifik özellikleri (Emir Çoban ve Patır 2010).

Görünüş	Keskin kokulu, yeşil yada kırmızı renkli, sıvı
Özgül ağırlık (25 °C)	0,915-0,935
Kırılma indisi (20 °C)	1,495-1,505
Çözünübilirlik	% 80' lik etanolde, 1:2 oranında
Fenol içeriği	% 40'dan daha az
Ağır metal içeriği	≤ % 0,02

Yapılan bir diğer çalışmada; kekik, zater ve karanfil esansiyel yağlarının antifungal aktiviteleri besiyerinde ve domates salçasında ölçülmüştür. Sonuçlar göstermiştir ki; kekik,

zater ve karanfil esansiyel yağlarının *A. flavus*'a karşı in vitro olarak antifungal aktivitesi olduğu, kekik esansiyel yağının 350 ppm'de *A. flavus*'u tamamen inhibe ederek en çok etkiyi gösterdiği bulunmuştur. Domates salçasında bu etkinin biraz daha az olduğu görülmüştür (Omidbeygi ve ark. 2007).

Kekik ve nane uçucu yağlarının 21 bakteri ve 7 maya üzerindeki antimikrobiyal etkinliği disk difüzyon yöntemi kullanılarak test edilmiş, kekik uçucu yağının *Pseudomonas aeruginosa* dışındaki test edilen diğer mikroorganizmaların tamamına güçlü antimikrobiyal etki gösterdiği, test edilenler arasında *Candida* türlerinin en hassasları olduğu belirlenmiştir (Ertürk ve ark. 2010).

2.8.2. Defne (*Laurus nobilis*) esansiyel yağı

Laurus cinsi, Defnegiller (*Laureaceae*) familyasının 40 cinsinden biridir. Defne yapraklarının elde edildiği 5-10 m boyunda olan defne ağacı, daima yeşilliğini korumakta olup, sürgün verme kabiliyeti oldukça fazladır (Şekil 2.8). Defnenin yaprakları 5-10 cm uzunluğunda, 2-4 cm eninde ve eliptik yapıdadır ve serttir. Üst yüzleri parlak koyu yeşil, alt yüzleri ise mat ve daha açık yeşil renktedir (Şekil 2.8.).

Defne yapraklarının bileşiminde %1-4 oranında uçucu yağ, tanen ve acı maddeler bulunur. Uçucu yağın bileşiminde %35-50 oranında sineol bulunmakta olup (Karaoğul ve ark. 2012), ayrıca yapraklar seskuiterpenoid lakton ve isokuinolin alkoloit içermektedirler (Skerget ve ark. 2005). İçerdiği uçucu yağ miktarı yetişme yöresine göre değişir. Ülkemiz yıllık defne yaprağı üretimiyle dünya defne ticaretinin %97'sini karşılamakta olup, ihracat gelirlerimizde önemli bir yer tutmaktadır (Karaoğul ve ark. 2012).

Yvon ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada *Juniperus phoenicea*, *Thymus capitatus*, *Lauris nobilis*, *Melaleuca armillaris* ve *Eucalyptus gracilis*'den elde edilen altı adet esansiyel yağın antioksidan özelliklerini incelemiş, *Thymus capitatus*'dan sonra en fazla fenolik miktarına ve en güçlü antioksidan etkiye *Lauris nobilis* esansiyel yağının sahip olduğunu tespit etmişlerdir.



Şekil 2.8. *Laurus nobilis* ağacı ve yaprakları (Karaoğul ve ark. 2012)

2.8.3. Portakal (*Citrus sinensis*) esansiyel yağı

Citrus cinsi *Rutaceae* (Sedefotugiller) familyasında yaklaşık 16 tür içermektedir ve genellikle astropikal bölgelerde yetiştirilmektedir (Fisher ve Philips 2008). Portakal, mandalina, misket limonu, limon gibi birçok önemli meyveyi içinde bulunduran *Citrus* cinsi, dünyadaki en fazla meyve mahsulünü oluşturmakta olup bunun da %60'ını portakal meydana getirmektedir (Velázquez-Nuñez ve ark. 2013). *Citrus* esansiyel yağları dünyada en fazla üretimi olan (Tirado ve ark. 1995) ve en yaygın kullanılan esansiyel yağlardır (Bousbia ve ark. 2009). Bunlar %85-99 arası uçucu bileşikler, %1-15 arası uçucu olmayan bileşikler içerir. Uçucu bileşikleri monoterpen ve seskiterpen hidrokarbonları ve onların oksijenlenmiş türevleri olan aldehit (sital), keton, asit, alkoller ve esterleri oluşturmaktadır. Yağ asitleri *citrus* yağlarının önemsiz bir yüzdesini oluştururken (%0,2 v/v), türler arasındaki ayrımı yapmada kullanılan diğer bir grup bileşiklerdir. Flavonoidlerin altı sınıfı bulunmaktadır. Bunlar flavanon, flavonol, isoflavonoid, antosiyanin ve flavanlar olup, yağların uçucu olmayan kısmını oluştururlar (Fisher ve Philips 2008).

Citrus yağları GRAS olarak kabul edilmekte ve gıdalarda kullanılmakta olup, direkt yağ olarak ya da buhar formunda mayalar, küfler, gıdada bozulmaya yol açan bakteriler yanında, hem Gram-pozitiflere hem de Gram-negatiflere karşı da inhibisyon etkisi bulunmaktadır (Mexis ve ark. 2012, Fisher ve Philips 2008).

Piacentini 1949 yılında ilk kez *Citrus* yağlarının antimikrobiyel özelliklerinden bahsetmiş olup, sıvı formda fenol gibi dezenfektanlardan daha etkili olduğu bildirmiştir (Fisher ve Philips 2008). Subba ve ark. 1967'de, 2000 ppm konsantrasyonundaki portakal ve

limon yağlarının, nutrient agarda *Bacillus subtilis* sporlarının gelişmesini inhibe ettiğini ispatladıklarını belirtmişlerdir.

Limon, portakal, bergamut esansiyel yağlarının, disk difüzyon yöntemi kullanılarak *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157 ve *Campylobacter jejuni*'ye karşı antimikrobiyal etkilerine bakılmış; sonuçlar bergomat esansiyel yağı başta olmak üzere, citrus esansiyel yağlarının, gıda zehirlenmelerine en yaygın sebep olan bakterilerin gelişimini engellediği görülmüştür (Fisher ve Philips 2006).

Yapılan bir çalışmada ise *Citrus sinensis*, *Citrus aurantium*, *Citrus deliciosa*, *Citrus paradises* ve *Citrus limon* esansiyel yağlarının *Penicillium digitatum*'a karşı sırayla 2180,2, 1015,4, 713,3, 910,3, 1056,4 ppm dozlarda etkili olduğu değerlendirilmiştir (Caccioni 1998).

Singh ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada, 500 ppm konsantrasyonda, *C. maxima*, *C. sinensis* ve ikisinin kombinasyonunun *Aspergillus flavus* üzerine sırasıyla % 48,1, % 46,2 ve %44,0 inhibisyon etkisi gösterdiğini ve yine 500 ppm konsantrasyonda, *C. maxima*, *C. sinensis* ve ikisinin kombinasyonunun AFB₁ üretimini tamamen inhibe ettiğini bildirmektedirler. Ayrıca bu çalışmada, *C. maxima*, *C. sinensis* yağlarına ait IC₅₀ değerlerinin, 8,84 ve 9,45µl/ml olduğu belirlenmiş olup, bu değerlerin de esansiyel yağların yüksek antioksidan aktivitesine dikkat çektiği belirtilmektedir.

Yapılan bir diğer çalışmada ise, *A. niger*, *A. flavus*, *P. chrysogenum*, *P. verrucosum* üzerine, portakal, limon, mandalina ve greyfurt esansiyel yağlarının antifungal etkilerine bakılmıştır. Portakal esansiyel yağının *A. niger* üzerine en etkili olduğu bulunurken, *A. flavus* üzerine en iyi inhibisyon etkinin mandalina yağı tarafından sağlandığı belirlenmiştir. Greyfurt yağının ise *P. chrysogenum*, *P. verrucosum* üzerine daha etkili olduğu saptanmıştır (Viuda-Martos ve ark. 2008b).

Citrus sinensis esansiyel yağının *A. niger* üzerinde 3 µg/ml konsantrasyonda fungusidal olduğu tespit edilmiştir (Sharma ve Tripathi 2006). Viuda-Martos ve ark. 2008b, birçok yazarın citrus esansiyel yağlarının antifungal kapasitelerinin içeriklerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan D-limonen, linalool veya citral ile ilişkili olduğunu bildirdiklerini, bazı yazarların ise içeriğinde bulunan fenolik içeriğinden kaynaklandığını söylediklerini belirtmişlerdir.

Lucini ve ark. (2006), misel gelişimi inhibisyonunun esansiyel yağlarda bulunan monoterpenlerden kaynaklandığını, bu bileşenlerin hidroksil, alkoksil, alkoperoksil gibi reaktif oksijen türlerini arttırarak hücre membran yapısını değiştirdiklerini söylemektedirler.

2.9. Esansiyel Yağların Özellikleri ve Aktif Ambalaj Uygulamaları

2.9.1. Esansiyel yağların antimikrobiyal özellikleri ve aktif ambalaj uygulamaları

Gıda kaynaklı mikroorganizmalardan kaynaklanan sağlık tehlikelerini ve ekonomik kayıpları azaltmak için, doğal bileşiklerin antibakteriyel olarak kullanımı, patojen bakterilerin varlığını kontrol etmede ve işlem görmüş gıdanın raf ömrünün uzatılmasında dikkat çekici bir yol olarak gözükmektedir (Oussalah ve ark. 2007).

Organik asitler, lizozim gibi enzimler, benomil, imazalil gibi fungusitler, baharatlar gibi doğal antimikrobiyal bileşikler, gıda ambalajlarında gösterdikleri antimikrobiyal aktivitelerinden dolayı kullanımı önerilen bileşiklerdir. Bu bileşikler çoğunlukla antimikrobiyal ve bir kısmı da antioksidan özellikler taşırlar (Seydim ve Sarikus 2006).

Yalçın ve ark. (1997), baharatlarda bulunan eugenol, timol, humulon, lupulon, allil izotiyosiyanat gibi bileşiklerin antimikrobiyal etkiye sahip olması baharatların çoğunu gram pozitif bakteriler ve küflere karşı etkili hale getirmekte olduğunu, karışım halinde kullanılmalarının bu etkiyi daha da artırdığını bildirmektedirler (Coşkun 2006).

Bitkilerden elde edilen esansiyel yağlar ve ekstraktları son zamanlarda popülerite kazanmış ve bilimsel olarak da ilgilenilmeye başlanmıştır (Tepe ve ark. 2005). Sağlık ve ekonomik endişelerden dolayı araştırmacılar, fungusit ve bakterisit yerine kullanılabilen, böylece küf ve bakterileri tamamen veya kısmen inhibe edebilecek esansiyel yağları bulmaya yönelmişlerdir (Soliman ve Badeea 2006). Bitkilerden veya baharatlardan elde edilen esansiyel yağlar terpenoid ve organik asitler gibi biyolojik olarak aktif bileşiklerin zengin kaynaklarıdır ve bu esansiyel yağların birçoğunun antimikrobiyal özellikleri olduğu uzun zamandır bilinmektedir (Zinoviadou ve ark. 2011). Esansiyel yağlar GRAS olarak kabul edilmekle beraber (Burt 2004); organoleptik kriterleri (Oussalah 2007) ve gıdaların tadını değiştirebilecek güçlü aromaları (Rojas-Graü ve ark. 2009) gıdalarda kullanım miktarlarını sınırlayan en önemli etkendir.

Esansiyel yağlarda bulunan kimyasal bileşiklerin farklı gruplarının sayılarının fazlalığı düşünülecek olursa, antibakteriyel aktivitelerinin sadece tek bir spesifik mekanizmadan

kaynaklanmadığı anlaşılabilir. Esansiyel yağların ve bileşimlerinin en önemli karakteristik özellikleri hidrofobitesi olup, bu özellik onların bakteri hücre membran ve mitokondri lipitlerini parçalara ayırmasını sağlar. Böylece yapıyı bozarak geçirgenliği artırır (Viuda-Martos ve ark. 2008a, Sikkema ve ark. 1995). İyonlar ve diğer hücre bileşenleri sızar (Viuda-Martos ve ark. 2008a, Lambert ve ark. 2001). Denyer ve Hugo (1991), belli bir miktara kadar sızmanın yaşanabilirliğin kaybını tolere ettiğini, hücre bileşenleri kaybı, önemli molekül ve iyonların çıkışının arttıkça ölümün gerçekleştiğini bildirmişlerdir (Viuda-Martos ve ark. 2008a).

Aynı bitkiden elde edilen esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitelerinde çoğu kez büyük farklılıklar gözlemlenmektedir. Bu değişkenliğin sebepleri, coğrafik kaynaklar, hasat mevsimi, genotip, iklim, kurutma prosedürü ve bitkinin distilasyon yapılan kısmının farklı olmasından kaynaklanabilir (Oussalah 2007).

Oregano, savory ve thyme antimikrobiyal aktiviteleri 1950'lerden beri bildirilmekte olup, inhibisyon etkilerinin, en etkili bitkisel antibakteriyel ajanlar olarak bilinen timol ve karvakrol fenolik bileşiklerini (Seydim ve Sarikus 2006) yüksek konsantrasyonda içermesinden kaynaklandığı yayınlanmıştır (Oussalah 2007).

Nguefack ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada, *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* ve *Thymus vulgaris* esansiyel yağlarının ve aktif fraksiyonlarının, *A. ochraceus*, *P. expansum* ve *P. verrucosum*'un her birinin iki mikotoksijenik suşları üzerine gıdalarda yüksek koruyucu etkileri olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada potasyum sorbatın da antifungal aktivitesine bakılmış olup, her üç esansiyel yağın da potasyum sorbattan daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Yine Ćavar ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada, *Lamiaceae* (Ballıbabagiller) familyasına ait olan *Satureja* cinsinden esansiyel yağların *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* üzerine etkilerini belirlemek için kâğıt disk metodunu kullanmış ve esansiyel yağ örneklerinin bütün mikroorganizmaları inhibe ettiğini bulmuşlardır.

Türkiye'den elde edilen *Thymus revolutus* Celak esansiyel yağının etkisi 11 bakteri ve dört maya üzerine denenmiş olup, aralarında *E. coli*, *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes* gibi bakteri ve *C. albicans*, *C. tropicalis*, *S. cerevisiae* gibi mayalarında bulduğu gruplara antimikrobiyal ve antifungal etki gösterdiği tespit edilmiştir (Karaman ve ark. 2001).

Origanum vulgare L. esansiyel yağının da gıdada bozulmaya yol açan mayalar üzerine etkili olduğu Souza ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada gösterilmektedir.

Gıda ambalaj filmleri içerdiği aktif maddenin gıdaya kontrollü salınımını uzun sürede sağlayarak, bu maddenin gıdaya direkt eklenmesi ile gıdanın tamamına hızlıca diffüze olmasıyla meydana gelebilecek nötralizasyonu (Pranoto 2005) ve oluşabilecek istenmeyen fazla aromayı engeller (Ramos ve ark. 2012). Gıda yüzeyine yavaşça salınan antimikrobiyal ajanlar, uzun süre boyunca yüksek konsantrasyonda gıda yüzeyinde etkili olabilirler. Antimikrobiyal madde olarak gıda ambalaj materyallerinde bulunan esansiyel yağlarla ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

Kekik ve keklik otu esansiyel yağlarını içeren soya proteininden oluşan yenilebilir filmlerin *E.coli*, *E. coli* O157:H7, *S aureus*, *P. aeruginosa* ve *Lactobacillus plantarum* üzerine inhibisyon zonu testleri yapılan çalışmada (Karagöz Emiroğlu ve ark. 2010), ayrıca filmlerin sığır etinden yapılan köftelerin üzerine etkisi de incelenmiştir. İnhibisyon zonu testlerinde, *E.coli*, *E. coli* O157:H7, *S aureus* üzerinde daha etkili olduğu bulunurken, gıdada yapılan uygulamada ise sadece *Pseudomonas* spp. ve koliform bakterilerinde düşüş olduğu gözlemlenmiştir.

Rojas-Graü ve ark. (2007), alginat-elma püresi yenilebilir filmlere karvakrol, keklik otu esansiyel yağı, limon otu esansiyel yağı, sitral, tarçın esansiyel yağı, sinamaldehit eklemiştir. Karvakrol ve keklik otu esansiyel yağını içeren filmlerin *E. coli* O157:H7'ye karşı bariz bir şekilde daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirmiştir.

2.9.2. Esansiyel yağların antioksidan özellikleri ve aktif ambalaj uygulamaları

Proses ve depolama esnasında gıda ürünlerinin bozulma sebeplerinden en önemlilerinden biri lipid peroksidasyonudur. Peroksidasyon sonucu oluşan ürünler, diğer gıda bileşenlerini etkileyerek, tat ve aromayı değiştirir ve insan sağlığı üzerinde de istenmeyen etkiler oluşturur (Kumar ve ark. 2007).

Antioksidanlar ransit ürünleri ortadan kaldırmaz ya da oksidasyonu geri çevirmezler ancak gıdalara ilave edilerek oksidasyonun şekillenmesini geciktirir yada engellerler. Besinlerin muhafaza süresini uzatmak için endüstriyel işlemlerde asıl olarak sentetik antioksidanlar kullanıldığı halde tüketiciler genelde doğal antioksidanları sentetik olanlara tercih etmektedir (Emir Çoban ve Batır 2010).

Kendilerine özgü lezzet ve aromaları, antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri nedeniyle, bitki ve baharatlar gıda sektöründe alternatif olarak kullanılabilir doğal antioksidanlar olarak da giderek önem kazanmıştır. Bu bitkilerin yapılarında bulunan fenolik bileşiklerin antioksidan etkisi serbest radikalleri temizleme, metal iyonlarla bileşik oluşturma ve tekli oksijen oluşumunu engelleme gibi özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Emir Çoban ve Batır 2010). Birçok esansiyel yağ oksidasyona dayanıklı hatta antioksidan özellikler gösteren bileşenlere sahiptir (Pokorný 2001). Esansiyel yağların koruyucu olarak kullanımı, gıdaları oksidasyondan korumak için uygulanan yeni bir yaklaşımdır (Deba ve ark. 2008).

Thymus türü önemli miktarda flavonoid ve fenolik bileşikler içermekte olup, güçlü antioksidan aktiviteye sahiptir (Nickavar ve Esbati 2012, Ruiz-Navajas ve ark. 2013) yaptıkları çalışmada, *Thymus moroderi* ve *Thymus piperella* esansiyel yağlarını kitosan film içine eklediklerini ve mükemmel özellikte antioksidan etkili bir aktif ambalaj elde ettiklerini bildirmişlerdir.

2.10. Çalışmada Kullanılan Küf ve Mayalar

Aspergillus toprakta bulunan en yaygın küflerden olup, bütün dünya üzerinde dağılmıştır (Kang ve ark. 2013). Yayınlanan yaklaşık 250 türü tanımlanmış olup, yeni türler keşfedildikçe toplam sayısı artmaktadır (Geiser ve ark. 2007). Mikotoksin oluşturmalarından dolayı, *Aspergillus* türleri gıda ve gıda güvenliğinde çok önemli rol oynamaktadır (Klich 2007). *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus flavus* çok zararlı mikotoksin üretimleri ile bilinmektedirler. *Aspergillus fumigatus* spor oluşturan bir küf olup, konidyum diye adlandırılan bu sporlar 2-3 µm çapındadır. Konidyumların yüzeyleri son derece hidrofobik olup, bu özelliği havada uzun süre kalabilmesini sağlamaktadır (Rivera ve ark. 2006). *A. fumigatus*, taksonomik olarak iyi tanımlanmış türlerden olup, diğerlerinden makromorfolojik karakteristikleri ile ayrılırlar. *Aspergillus fumigatus* ve *Paecilomyces variotii* pastörizasyondan sonra gıda üzerinde bozulma yapabilen küflerdendir. Isıya dayanıklılık özellikleri başlıca askospor ve/veya kalın duvarlı klamidospore veya hiflerden kaynaklanmaktadır (Gumus ve ark. 2010).

Paecilomyces türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar az olup, genellikle yabancı bir vücutta, anatomik bozuklukta veya bağışıklık sistemi eksikliğinde görülmektedir (Wang ve ark. 2005). *Paecilomyces variotii* kosmopolitan, filamentous küf olup, toprakta çürümüş bitki ve gıdalarda bulunmaktadır. Yaygın saprofit bir küf olan *Paecilomyces variotii*, nadiren insanlarda enfeksiyona neden olur (Salle ve ark. 2005).

Aflatoksinler toksik ve kanserojen ikincil metabolitler olup, özellikle *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* olmak üzere birçok *Aspergillus* türleri tarafından üretilmektedir (Razzaghi-Abyaneh ve ark. 2008, Jayashree ve Subramanyam 2000). Bu küfler kozmopolit organizmalardır ve tahıl taneleri, yağlı tohumlar, pamuk tohumlarını da içeren geniş alandaki doğal substratları kontamine etmektedirler (Razzaghi-Abyaneh ve ark. 2008). *Aspergillus parasiticus* ve ürettiği aflatoksinler, depolama süresince gıdanın önemli kontaminantı olup, halk sağlığını da tehdit etmektedir (Ozcan 2003).

Gumus ve ark. 2010, yaptıkları çalışmada margarinden izole edilen ve ısıya dayanıklı küfler olan *Aspergillus fumigatus* ve *Paecilomyces variotti*'te karşı portakal, defne, mersin, kekik, adaçayı bitkilerine ait esansiyel yağların inhibisyon özellikleri incelenmiş; küf gelişimini engelleyici özelliklerinin çoktan aza doğru kekik>portakal>adaçayı>kekik>mersin olarak tespit etmişlerdir. Çalışmada, *Paecilomyces variotti*'nin, *Aspergillus fumigatus*'dan daha dayanıklı olduğu da belirtilmektedir.

Mayalar doğada geniş ölçüde dağılmışlardır. Şarap, peynir, sirke, içecekler, meyve suları, meyveler, salatalar, et gibi birçok gıdayı bozabilmekte, koku, renk, tat, ve yapıda değişikliklere yol açmaktadırlar (Souza ve ark. 2007). *Candida* da gıdaları bozabilen önemli mayalardandır (Souza ve ark. 2007). *C.sake*, *C. lambica*, *C. kefir*, *C. zeylanoides* *Candida* türleri içerisinde sayılabilir.

C. sake gıdalardan, balıktan, bira, şarap, sebze ve meyve suları gibi içeceklerden izole edilebilmektedir. Düşük su aktivitesine ve asidik ortamlara toleranslıdır. Dondurulmuş gıdalarda arzu edilmeyen görünüş ve aroma oluşturması sebebiyle tüketici tarafından kabul edilebilirliği yok etmektedir (Tyrer ve ark. 2004). *Candida* türleri içerisinde *Candida kefir*'in ise, kan akışı enfeksiyonları ile ilişkili olduğu düşüncesi artış göstermektedir (Gomez-Lopez ve ark. 2010).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Araştırma materyallerini kekik, defne ve portakal esansiyel yağlarının ilavesiyle üretilmiş yenilebilir zein filmler ile bu filmlerin etkinliğinin üzerinde denendiği margarinler oluşturmaktadır. Raf ömrü uygulaması için materyal olarak kullanılan margarinler, Çorlu'da Unipro A.Ş. yağ fabrikasının pilot tesisinde potasyum sorbat ve Vitamin A, D, E ilave edilmeyen kase margarin olarak üretilmiştir.

Esansiyel yağ olarak kullanılan kekik yağı *Thymus vulgaris*, defne yağı *Laurus nobilis* ve portakal yağı *Citrus sinensis* Talya Bitkisel Ürünler Tic. ve San. Ltd. Şti.'den temin edilmiştir.

Aspergillus parasiticus NRRL 465, *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces variotii*, Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü'nün kültür koleksiyonundan, *Candida kefir*, *Candida zeylanoides* 1, *Candida zeylanoides* 2, *Candida lambica* ve *Candida sake* Erciyes Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden temin edilmiştir.

Denemelerde ve analizlerde kullanılan Potato dextrose agar (PDA), Dichloran rose-bengal kloramfenikol agar (DRBC), asetik asit, nişasta, dietil eter, kloroform, sodyum hidroksit (NaOH), sodyum karbonat (Na₂CO₃), Folin-Ciocalteu, etanol (EtOH), metanol Merck KGaA (Almanya), Oxytetracycline Glucose Yeast Extract agar (OGYE-CM0545) ve Plate Count Agar (PCA-CM0325) Oxoid (İngiltere), zein, gliserin, gallik asit ve 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Sigma-Aldrich (Co ABD), potasyum iyodür (KI) Panreac (İspanya), potasyum sorbat Fluka, Sigma-Aldrich GmbH (Almanya) firmasından alınmıştır.

Bu çalışma, Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nün, Çorlu Meslek Yüksekokulu, Gıda Teknolojisi Programının ve Unipro A.Ş. yağ fabrikasının laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.2. Metod

3.2.1. Esansiyel yağ ve potasyum sorbat içeren filmlerin antifungal aktivitelerinin belirlenmesi

3.2.1.1. Küf ve maya kültürlerin geliştirilmesi

Küfler ve mayalar her kullanımdan önce yatık PDA besiyerinde 30°C'de 4 gün süresinde geliştirilmiştir. Yenilenen kültürler +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.1.2. Zein film hazırlanması

Esansiyel yağ (kekik, defne, portakal) ve potasyum sorbat içeren zein filmler, Padgett ve ark. (1998) tarafından açıklandığı gibi hazırlanmıştır. 1,4178 g mısır zeini 8,1 ml etanol (%97) içerisinde 25 dakika boyunca yavaşça karıştırılarak çözündürülmüştür. Daha sonra 0,39 ml gliserol ortama eklenmiş ve karışımın sıcaklığı kaynamaya başlayana kadar arttırılmıştır. Kaynama başlar başlamaz karıştırma işlemi durdurulmuş ve film solüsyonu 5 dk daha kaynatılmıştır. Hazırlanan zein film çözeltisi, oda sıcaklığına soğutulduktan sonra içerisine daha önce yapılan benzer çalışmalardan elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurularak belirlenen konsantrasyonlarda esansiyel yağlar veya potasyum sorbat eklenip, tekrar karıştırılmıştır. Karışımın 4,82 gramı daha önce etanolle silinmiş 9x9 ebadındaki cam plakaya yayılmıştır. Cam plakalar oda sıcaklığında 24 saat kurutulmuştur. Kuruduktan sonra film cam plakadan çıkarılmıştır. Filmin farklı noktalarından mikrometre ile yapılan 10 adet ölçüm sonucunda filmlerin ortalama kalınlığı belirlenmiştir. Antifungal aktivitelerinin belirlenmesi için, elde edilen filmlerden mantar delici aparat ile (1,1 cm çapında) aseptik koşullar altında diskler hazırlanmıştır. Elde edilen filmlerin antifungal etkisi Agar Difüzyon Metoduna göre test edilmiştir (Appendini ve Hotchkiss 2002).

3.2.1.3. Kekik (*Thymus vulgaris*) esansiyel yağı içeren zein filmin antifungal aktivitesinin belirlenmesi

Yatık PDA besiyerinde geliştirilen küf ve mayalardan, Mc Farland 0.5 standardına göre ayarlanmış ve yaklaşık 10^6 kob/ml konsantrasyonunu içeren dilüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlardan DRBC besiyerlerine 0,1 ml örnek eklenip, drigalski spatülü yardımıyla yayılarak ekimler gerçekleştirilmiştir. %3, 3,5, 4, 5, 6 (v/w) konsantrasyonlarda kekik esansiyel yağı içeren çözeltilerden elde edilen filmlerden hazırlanan, içerdiği ortalama esansiyel yağ miktarı $1,8 \times 10^{-3}$ - $2,7 \times 10^{-3}$ ml arasında değişen diskler, küf ve maya (*Aspergillus*

parasiticus NRRL 465, *Aspergillus fumigatus* ve *Paecilomyces variotii*, *Candida kefir*, *Candida zeylanoides* 1, *Candida zeylanoides* 2, *Candida lambica*, *Candida sake*) ekimi gerçekleştirilmiş besiyeri üzerine 3'er adet yerleştirilerek 25 °C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında %1, 1,5, 1,6, 1,7, 1,85, 2, 2,5 (v/w) konsantrasyonlarda kekik esansiyel yağı içeren çözeltilerden elde edilen filmlerden, içerdiği ortalama esansiyel yağ miktarı $0,5 \times 10^{-3}$ - $1,6 \times 10^{-3}$ ml arasında değişen diskler yalnızca *Aspergillus fumigatus* üzerinde denenmiştir. İnkübasyon sonunda zein film diskleri etrafında zon oluşumuna bakılmış ve zonların çapları ölçülmüştür.

3.2.1.4. Defne (*Laurus nobilis*) esansiyel yağı içeren zein filmin antifungal aktivitesinin belirlenmesi

Defne esansiyel yağını % 3, 4, 5, 7, 8 (v/w) konsantrasyonlarında içeren çözeltilerden elde edilen filmlerden hazırlanan, içerdiği ortalama esansiyel yağ miktarı $1,8 \times 10^{-3}$ - $4,8 \times 10^{-3}$ ml arasında değişen diskler, küf ve maya (*Aspergillus parasiticus* NRRL 465, *Aspergillus fumigatus* ve *Paecilomyces variotii*, *Candida kefir*, *Candida zeylanoides* 1, *Candida zeylanoides* 2, *Candida lambica*, *Candida sake*) ekimi gerçekleştirilmiş besiyeri üzerine 3'er adet yerleştirilmiş ve 25 °C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda zein film diskleri etrafındaki zon oluşumuna bakılmıştır.

3.2.1.5. Portakal (*Citrus sinensis*) esansiyel yağı içeren zein filmin antifungal aktivitesinin belirlenmesi

Portakal esansiyel yağını % 3, 4, 5, 6, 8 (v/w) konsantrasyonlarında içeren çözeltilerden elde edilen filmlerden hazırlanan, içerdiği ortalama esansiyel yağ miktarı $1,6 \times 10^{-3}$ - $3,9 \times 10^{-3}$ ml arasında değişen diskler, küf ve maya (*Aspergillus parasiticus* NRRL 465, *Aspergillus fumigatus* ve *Paecilomyces variotii*, *Candida kefir*, *Candida zeylanoides* 1, *Candida zeylanoides* 2, *Candida lambica*, *Candida sake*) ekimi gerçekleştirilmiş besiyeri üzerine 3'er adet yerleştirilmiş ve 25 °C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda zein film diskleri etrafında zon oluşumuna bakılmıştır.

3.2.1.6. Potasyum sorbat içeren zein filmin antifungal aktivitesinin belirlenmesi

Potasyum sorbatı % 1,6, 2,5, 3,5 (w/w) konsantrasyonlarında içeren çözeltilerden elde edilen filmlerden hazırlanan, içerdiği ortalama potasyum sorbat miktarı $0,9 \times 10^{-3}$ - $2,3 \times 10^{-3}$ gr arasında değişen disklerin antifungal etkisi, yalnızca *Aspergillus fumigatus* üzerinde

denenmiştir. İnkübasyon sonunda zein film diskleri etrafında zon oluşumuna bakılmış ve zonların çapları ölçülmüştür.

3.2.1.7. Farklı esansiyel yağları birlikte içeren zein filmlerin antifungal aktivitesinin belirlenmesi

Zein film içerisine ilave edilen konsantrasyonlarda, küf ve mayalara etkili olan esansiyel yağın kekik olarak belirlenmesi üzerine; kekik ile defne ve/veya portakal esansiyel yağlarının belirtilen konsantrasyonlarda kombinasyonlarıyla elde edilen filmlerin küfler ve mayalar üzerine antifungal etkisine bakılmıştır. %3 (v/w) kekik ve %3 (v/w) konsantrasyonunda defne, %3 (v/w) kekik ve %4 (v/w) konsantrasyonunda defne esansiyel yağlarını birlikte içeren çözeltilerden elde edilen filmlerden hazırlanan, içerdiği ortalama esansiyel yağ miktarı sırasıyla $2,5 \times 10^{-3}$ - $3,4 \times 10^{-3}$ ml olan diskler, %3 (v/w) kekik ve %3 (v/w) portakal esansiyel yağlarını birlikte içeren çözeltiden elde edilen filmden hazırlanan, içerdiği ortalama esansiyel yağ miktarı $3,6 \times 10^{-3}$ ml olan diskler, %3 (v/w) kekik ve %1,5 (v/w) defne ve %1,5 (v/w) portakal esansiyel yağlarını birlikte içeren çözeltiden elde edilen filmden hazırlanan, içerdiği ortalama esansiyel yağ miktarı $3,9 \times 10^{-3}$ ml olan diskler küf ve maya (*Aspergillus parasiticus* NRRL 465, *Aspergillus fumigatus* ve *Paecilomyces variotii*, *Candida kefyr*, *Candida zeylanoides* 1, *Candida zeylanoides* 2, *Candida lambica*, *Candida sake*) ekimi gerçekleştirilmiş besiyeri üzerine 3'er adet yerleştirilmiş ve 25 °C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda zein film diskleri etrafında zon oluşumuna bakılmıştır.

Daha sonra %1,5, %1,6, %1,65 (v/w) konsantrasyonlarında kekik ve defne esansiyel yağlarını birlikte içeren çözeltilerden elde edilen filmlerden hazırlanan, içerdiği ortalama esansiyel yağ miktarları $1,7 \times 10^{-3}$ - $1,9 \times 10^{-3}$ ml arasında olan disklerin antifungal etkisi, yalnızca *Aspergillus fumigatus* üzerinde denenmiştir. İnkübasyon sonunda zein film diskleri etrafında zon oluşumuna bakılmış ve zonların çapları ölçülmüştür.

3.2.2. Esansiyel yağ ve potasyum sorbat içeren zein filmlerin mekanik özelliklerinin belirlenmesi

Kekik, defne, portakal, kekik ve defne, potasyum sorbat içeren ve içeriğine hiçbir madde eklenmemiş sade zein filmler, Şekil 3.1.'de gösterilen 50 N yük hücresi donanımlı T.A.HD Plus model (Stable Micro Systems, İngiltere) tekstür analiz cihazı kullanılarak germe ve kesme testleri 23°C sıcaklık ve %65 nisbi nem şartlarında uygulanmıştır. Germe testi uygulaması için filmler, $2,5 \times 10$ cm boyutundaki şeritler halinde kesilmiş, çapraz kafa hızı 25

mm/dak olarak ayarlanmıştır. Ölçüm şartları ASTM D-882 standardı baz alınarak biraz değişiklik yapılmak suretiyle uygulanmıştır (ASTM 2001).

Farklı kompozisyonlardaki her bir film için dört adet germe testi uygulanmış ve elde edilen sonuçlar kullanılarak gerilme direnci (GD) ve uzama yüzdesi (U(%)) hesaplanmıştır.

$$GD = F_{maks}/A \quad (3.1)$$

Fmaks=Filmin kopmasını sağlamak için uygulanan maksimum yük (N)

A=Filmin enine kesit alanı (filmin kalınlığı x eni)

$$U (\%) = (L/L_0) \times 100 \quad (3.2)$$

L= Filmin kopma anındaki uzunluk farkı

L₀= Filmin orijinal uzunluğu veya başlangıç ayarlama uzunluğu

Formüllere göre yapılan hesaplamalar sonucu ortalama değerler alınmıştır.

Kesme testinde ise her bir ölçüm için 4 film kullanılmış ve bunların ortalaması alınmıştır. Kesme testi uygulaması için ise başlatma gücü 10 g force, test öncesi hızı 0,5 mm/s, test hızı ise 1 mm/s, test sonrası hız 10,0 mm/s ve basınç uzaklığı ise 0,3 mm olarak ayarlanmıştır. Kesme kurvelerinde, kesmenin olduğu pikteki maksimum güç, sonuçların verilmesinde kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Tekstür analiz cihazı

3.2.3. Esansiyel yağların DPPH radikali yakalama aktivitesi tayini

Esansiyel yağların bir hidrojen atomu veya elektron verebilme yeteneği ve DPPH radikalini süpürmesi, Blois (1958)'de belirtilen metodun modifiye edilerek kullanılmasıyla belirlenmiştir. Bu metod, metanolde hazırlanan mor renkli DPPH çözeltisinin renginin açılması esasına dayanır. Serbest radikal yakalama aktivitesinin göstergesi, reaksiyon karışımının absorbanasının düşmesidir.

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan esansiyel yağların (0,752-848,1 g/L) ve standart çözeltinin (1,25-6,25 mg/L) 1 mL'si, DPPH'nin metanolde hazırlanan 0,1 mM, 4 mL çözeltisine ilave edildi. Karışım sağlandıktan sonra oda koşullarında karanlıkta 30 dakika bekletildi ve 517 nm'de absorbanları okundu. Kontrolün absorbanı ise, örnek ve standart madde yerine 1 mL metanol kullanılarak aynı şartlarda ölçülerek belirlendi.

% DPPH radikali yakalama aktivitesi aşağıda verilen formül ile hesaplandı.

$$\text{DPPH Radikali Yakalama Aktivitesi(\%)} = \frac{\text{Kontrolün Absorbansı} - \text{Örnek Absorbansı}}{\text{Kontrolün Absorbansı}} \times 100 \text{(3.3)}$$

IC50 değeri ise, DPPH'in % 50'sinin inhibisyonunu sağlayan esansiyel yağ ve standart madde konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. Esansiyel yağ konsantrasyonlarına karşı inhibisyon yüzdelерinin grafiğe geçirilmesi ile IC50 değeri kekik, defne ve portakal esansiyel yağları ve gallik asit standardı için ayrı ayrı hesaplanmıştır.

3.2.4. Esansiyel yağların toplam fenolik bileşik miktarının belirlenmesi

Kekik, defne ve portakal esansiyel yağlarında bulunan fenolik bileşik miktarının belirlenmesi için Özkan ve ark. (2007) tarafından belirtilen 'Toplam Fenolik Bileşikler Tayini' metodu uygulanmıştır. Bu metod, fenolik bileşiklerin bazik ortamda Folin-Ciocalteu ayırıcını indirgeyip, kendilerinin oksitlenmiş forma dönüştüğü bir redoks reaksiyonuna dayanmakta olup, ayraç burada oksitleyici bileşik olarak rol almaktadır. Reaksiyon sonucunda, indirgenmiş ayırıcın oluşturduğu mavi renk fotometrik olarak ölçülmekte, böylece analizi yapılan örnekteki fenolik bileşiklerin toplam miktarı hesaplanabilmektedir.

75 ml saf su içeren 100 ml'lik balon jöjeler içerisine, saf su ile 1/10 oranında seyreltilmesi yapılan kekik esansiyel yağından 10 µl, defne ve portakal esansiyel yağlarından seyreltilme yapılmadan sırasıyla 50 ve 20 µl ilave edilip, üzerine 5 ml Folin-Ciocalteu ayırıcısı eklendikten sonra balon jöje iyice çalkalanmıştır. 3 dakika beklemeden sonra, üzerine 10 ml

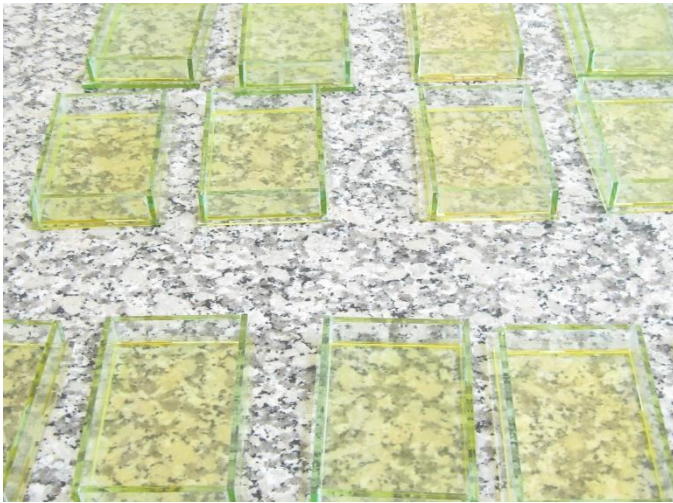
doymuş Na₂CO₃ eklenmiş ve saf su ile çizgisine kadar tamamlanmıştır. Bir saat bekleme sonunda spektrofometrede 720 nm dalga boyunda, aynı şekilde hazırlanmış şahite karşı okuma yapılmıştır. Deney sonucunda kekik, defne ve portakal esansiyel yağlarına ait okunan aborbans değerlerinin gallik asit cinsinden eşdeğeri olan fenolik bileşik miktarı gallik asitten hazırlanan standart eğri yardımıyla bulunmuştur.

3.2.5. Margarinlere zein film uygulamaları ve raf ömrü çalışmaları

3.2.5.1. Zein filmlerin hazırlanması

Margarin uygulamaları için; %1,6 kekik ve %1,6 defne esansiyel yağlarını birlikte içeren çözeltiden elde edilen zein film, %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film, hiçbir madde içermeyen zein film olmak üzere 3 çeşit film üretimi gerçekleştirilmiştir.

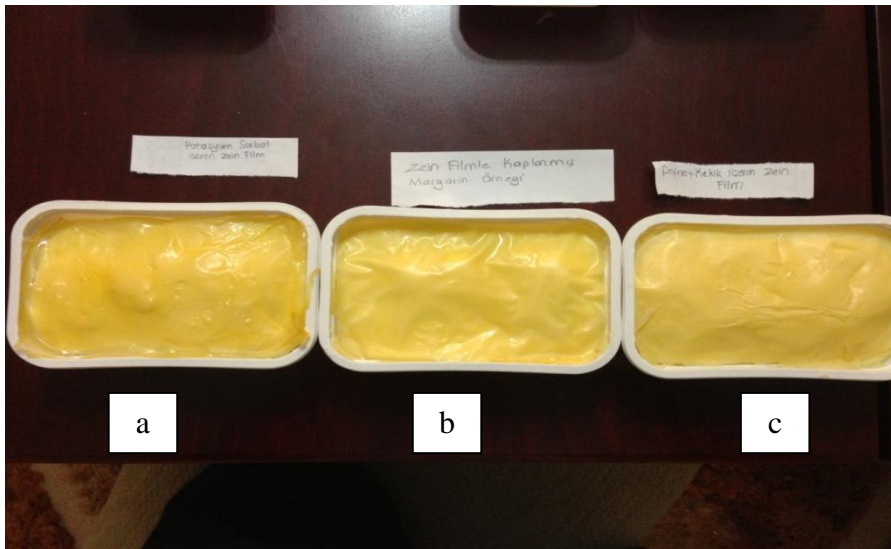
Hazırlanan zein film çözeltisi, oda sıcaklığına soğutulduktan sonra içerisine %1,6 (v/w) kekik ve %1,6 (v/w) defne yağı eklenerek tekrar 10 dk karıştırılmış, %3,5 (w/w) potasyum sorbat eklenerek 30 dakika karıştırılmıştır. Karışımların 5,13 gramı daha önce etanolle silinmiş 11,5x7,5 ebatındaki cam plakaya yayılmıştır. Hiçbir madde içermeyen zein film solusyonu da aynı şekilde cam plakalar üzerine dökülmüştür (Şekil 3.2.). Cam plakalar oda sıcaklığında 24 saat kurutulmuştur. Kuruduktan sonra film cam plakadan çıkarılmış, ağırlık ölçümü yapılmış ve margarinlere uygulanmak üzere 2 gün süreyle buzdolabına kaldırılmıştır.



Şekil 3.2. Cam plakalara dökülmüş zein film örnekleri

3.2.5.2. Margarinlere zein film uygulaması

Raf ömrü uygulaması için üretilen potasyum sorbat ve vitamin A,D,E ilave edilmeyen kase margarinler 5 farklı bölüme ayrılmıştır. 4 bölümde kase margarin örneklerinin açıkta olan üst yüzeyi Mc Farland 0.5'e göre ayarlanmış 10^6 kob/ml konsantrasyonundaki *Aspergillus fumigatus* dilüsyonunun 0,136 ml'si ile kontamine edilmiştir. İnokule edilen hacim, margarinlerin yüzeyine drigalski spatülü yardımı ile yayılmıştır. Bu yüzey üzerine %1,6 (v/w) kekik ve %1,6 (v/w) defne esansiyel yağını birlikte içeren çözeltiden elde edilen zein film (KDZ), %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film (PSZ), hiçbir madde içermeyen çözeltiden elde edilen zein film (Z) uygulanmış (Şekil 3.3.) ve ayrıca sadece kontaminasyon yapılmış fakat film uygulanmamış (F) kase margarin örnekleri de hazırlanmıştır. 5. bölüm margarinler ise kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış (M) grup olup, diğer gruplarla uygulama birliği olması açısından üzerindeki folyo açılıp, tekrar kapatıldıktan sonra, üretildiği şekliyle raf ömrü çalışmasına katılmıştır. Margarinler buzdolabında +4 °C'de depolanmıştır.



Şekil 3.3. Potasyum sorbat içeren zein filmle kaplanmış kase margarin (a), zein filmle kaplanmış kase margarin (b), defne ve kekik esansiyel yağlarını içeren zein filmle kaplanmış kase margarin (c)

3.2.5.3. Margarinlere depolama süresince uygulanan analizler

Üretilen kase margarinlerde 0. günde toplam küf, maya ve toplam bakteri'ye bakılmış ve kimyasal analiz olarak da peroksit sayısı tayini, serbest yağ asitliği, toplam fenolik madde tayini, demir-nikel-bakır analizi, yağ asidi kompozisyonu analizi yapılmıştır. Margarine uygulanan bu analizlerden bir kısmı ve *Aspergillus fumigatus* sayısının belirlenmesi depolama süresince belirli dönemlerde devam etmiştir. Tüm analizler iki tekerrürlü ve her bir tekerrür de iki paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Depolama sonunda kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış margarin grubu, hiçbir madde içermeyen çözeltiden elde edilen zein film ve %1,6 (v/w) kekik ve %1,6 (v/w) defne esansiyel yağını birlikte içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanan margarin gruplarında duyu analizi yapılmıştır.

3.2.5.3.1. Toplam aerobik mezofilik bakteri ve maya-küf sayısının belirlenmesi

Üretilen kase margarinlerde 0. günde küf, maya ve toplam aerobik mezofilik bakteri'ye (TAMB) bakılmıştır. TAMB sayımı, dökme plak yöntemi kullanılarak, Plate Count Agar (PCA) besiyeri ile TS 7703 EN ISO 4833 standardına göre gerçekleştirilmiştir. Petriler $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 24-48 saat inkübe edilmiş ve gelişen koloniler sayılmıştır (Anonim 2004).

Küf-Maya sayımı Oxytetracycline Glucose Yeast Extract agar (OGYE) besiyeri ile dökme plak yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Petrileri $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 3-5 gün inkübe edilmiş ve gelişen koloniler sayılmıştır (Roberts and Greenwood 2003).

3.2.5.3.2. *Aspergillus fumigatus* sayısının belirlenmesi

10 g ağırlığında yaklaşık 5x3x0,5 cm boyutunda margarin örneğinde bulunan *Aspergillus fumigatus* sayısını belirlemek için, 10^{-1} dilüsyondan, petri kutusunda hazırlanan steril DRBC besiyerine ekim yapılmıştır. 25°C 'de 3 günlük inkübasyon sonunda koloni sayımı yapılmıştır. Aynı işlemler margarinin merkezinden aynı şekilde alınan örnek içinde tekrar edilmiştir.

3.2.5.3.3. Serbest yağ asitleri tayini

Anonymous 1990'da bahsedilen serbest yağ asitliği tayini yöntemi temel alınır, modifiye edilerek uygulanmıştır. Bir erlen içerisinde margarinin yüzeyinden yaklaşık 5 g ağırlığında örnek alınarak tartılmış, su banyosu içerisinde erimesi sağlanmış ve 30-40 ml etil alkol-dietileter [1/1 (v/v)] karışımı eklenerek çözündürülmesi sağlanmıştır. Çözündürülen yağ fenolftalein indikatörlüğünde 0,1 N NaOH ile titre edilmiştir.

Aynı işlemler margarinin merkezinden aynı şekilde alınan örnek içinde tekrar edilmiştir.

$$\text{Serbest Yağ Asitleri} = \frac{\text{Harcanan } 0,1 \text{ N NaOH (ml)} \times 2,8}{\text{Margarin Ağırlığı (g)}} \quad (3.4)$$

3.2.5.3.4. Peroksit sayısı tayini

Anonymous 1989 (AOCS Official Method Cd8-53)'da bahsedilen peroksit sayısı tayini yöntemi temel alınıp, modifiye edilerek uygulanmıştır. Bu metod, potasyum iyodürün yağdaki peroksit oksijeni ile okside olarak iyodun serbest hale geçmesi ve bu serbest haldeki iyodun da tiyosülfat ile titre edilerek miktarının bulunması ilkesine dayanmaktadır.

Bir erlen içerisine margarinin yüzeyinden yaklaşık 2 g ağırlığında örnek alınarak tartılmış, erlenin ağzı kapatılmış ve su banyosu içerisinde erimesi sağlanmıştır. Örnek üzerine 10 ml kloroform ve 15 ml asetik asit eklenerek çözündürülmüş ve 1 ml doymuş potasyum iyodür çözeltisi de eklenerek 5 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Bu süre sonunda 75 ml saf su, 1 ml nişasta çözeltisi ilave edilmiş ve 0,01 N sodyum tiyosülfata karşı titre edilmiştir.

Aynı işlemler margarinin merkezinden aynı şekilde alınan örnek içinde tekrar edilmiştir.

$$\text{Peroksit Değeri} = \frac{\text{Harcanan } 0,01 \text{ N sodyum tiyosülfat (ml)} \times 10}{\text{Tartılan yağ miktarı (g)}} \quad (3.5)$$

3.2.5.3.5. Yağ Asitleri Kompozisyonu Tayini

Bu metod ile gaz-likit kromatografisinde, yağ asitleri metil esterleri yüksek polarize edilmiş kapiler kolondan geçirilip, cinsine ve miktarına göre ayrıştırılarak tayin edilmektedir. İncelenen margarin örnekleri David ve ark. (2005)'de belirtilen metod baz alınarak, küçük değişiklikler yapılmak suretiyle analize tabi tutulmuştur. 250 mg margarin örnekleri ağzı kapaklı santrifüj tüpüne alınır. Üzerine 0.5 ml Metanolik KOH (2N) ve 4.5 ml n-Heptan eklenir. Santrifüj kapağı kapatılıp, vortex karıştırıcıda 1 dakika çalkalanır ve sonrasında reaksiyonun tamamlanması için 1 dakika beklenir. 2000 devirde, 5 dakika santrifüj sonrasında üst fazdan 1 ml alınarak, ikinci bir santrifüj tüpüne aktarılır. İkinci santrifüj tüpüne 4.5 ml n-Heptan ilave edilir. Kapağı kapatılıp çalkalanır ve santrifüj tüpündeki örnek şırınga ile filtrelenip vialde aktarılır. Örnek haznesi ünitesi ile numune vialinden GC'ye 1 µL injekte edilir. Yağ asitleri kompozisyonu analizi için gaz kromatografisi cihazı (Hewlett Packard, model 6890) kullanılmıştır. GC kolonu olarak, HP 88 kapiler kolon (60 m x 0,25 mm ID, 0,2 µm HP 88) ve dedektör olarak da, alev iyonlaştırıcı dedektör kullanıldı. İnjesiyon hacmi 0,5

µl ve injeksiyon sıcaklığı 250 °C olarak ayarlanmıştır. Dedektör H₂ akış hızı 40 ml/dk, kuru hava akış hızı 450 ml/dk değerinde olup, toplam analiz süresi 50 dakika olarak kaydedilmiştir. Herbir margarin için hem yüzey, hem de merkezden örnek alınarak analizleri ayrı ayrı yapılmıştır.

3.2.5.3.6. Demir, bakır, nikel analizi

Raf ömrü çalışmalarında kullanılacak olan margarinlerin üretimden hemen sonra, 0. günde demir, bakır, nikel analizi Perkin Elmer, AAS 700 model atomik absorpsiyon spektrofotometre cihazı ile TS ISO 8294:1997/T1 standardına göre yapılmıştır (Anonim 2005).

25 g margarin bir kaba alınarak 60 °C'deki etüve konulmuştur. Cihazda demir analizi için 302,1 nm, bakır analizi için 324,8 nm, nikel analizi için ise 232 nm dalga boyları ayarlanmıştır. Yanma sıcaklıkları ise yine demir, bakır ve nikel için sırasıyla; 2600, 2300, 2500 °C'lere ayarlanmıştır. Her bir analiz için yine aynı sırayla 10, 20, 20 µl örnek cihaza verilmiş ve ölçüm yapılmıştır.

3.2.5.3.7. Toplam fenolik madde tayini

Margarinler de toplam fenolik madde tayini yüzey ve merkezinde olmak üzere depolama sürecinin başında 90. günde ve 180. günde olmak üzere 3 kez yapılmıştır. Fenolik bileşik miktarının belirlenmesi için Özkan ve ark. (2007)'de belirtilen 'Toplam Fenolik Bileşikler Tayini' metodu uygulanmıştır. Örnekler etüvde bekletilerek erimesi sağlanmıştır.

75 ml saf su içeren 100 ml'lik balon jöjeler içerisine, eriyen örnekten 100 µl eklenip, üzerine 5 ml Folin-Ciocalteu ayracı eklendikten sonra balon jöje iyice çalkalanmıştır. Eklenen örnek miktarı bulanıklık yaratmasından dolayı 1/10 oranında azaltılarak kullanılmıştır. Sonuçların hesaplamasında bu oran göz önünde bulundurulmuştur. 3 dakika beklemeden sonra, üzerine 10 ml doymuş Na₂CO₃ eklenip saf su ile çizgisine kadar tamamlanmıştır. Bir saat bekleme sonunda spektrofometrede 720 nm dalga boyunda, aynı şekilde hazırlanmış şahite karşı okuma yapılmıştır.

3.2.5.3.8. Duyusal değerlendirme

Depolamanın son günü, % 1,6 kekik ve % 1,6 defne esansiyel yağlarını birlikte içeren çözeltiden elde edilen zein film ve hiçbir madde içermeyen çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarinler ile kontamine edilmemiş, üretildiği şekliyle raf ömrü çalışmasına

katılmış margarin örneğinde, aydınlatılması ve havalandırılması uygun bir odada 10 kişilik bir panelist grubu ile duyuşsal analiz yapılmıştır.

Örnekler panelistlere içeriği hakkında bilgilendirilmeden sunulmuş, değerlendirme esnasında her bir örnek arasında ağızda kalan tadı gidermek için su kullanılmıştır.

Margarin örneklerinin görünüş, yapı, tat, koku bakımından değerlendirilmesinde Meilgaard ve ark. (1999)'da belirtilen yöntem modifiye edilerek kullanılmış olup, örneklerin duyuşsal değerlendirilmesinde 9'lu hedonik skala (1: Çok kötü, 2-3: Kötü, 4-5: Orta, 6-7: İyi, 8-9: Çok iyi) uygulanmıştır. Duyusal değerlendirmede kullanılan formda Bitkisel Margarin Standardı (TS 2812) ve Türk Gıda Kodeksi Sürülebilir Yağlar/Margarin ve Yoğun Yağlar Tebliği'nde (Tebliğ No:2008/21) belirtilen, margarinin sahip olması gereken duyuşsal özellikler göz önünde bulundurulmuştur (Ek 1).

3.2.6. İstatistiksel Analiz

Uygulamaların incelenen parametrelere etkilerinin önemli olup olmadığını tespit etmek için, verilere varyans analizi (ANOVA) uygulanmış olup, uygulamalar arası farklılıklar, % 5 güven aralığında ($P<0,05$) belirlenmeye çalışılmıştır. Ortalamaların karşılaştırılmasında ise Duncan's Çoklu Karşılaştırma Testi MSTAT-C istatistik paket programı kullanılmıştır (Anonim 1988).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Kekik Esansiyel Yağı İçeren Zein Filmin Antifungal Aktivitesi

Çalışmamızda kullanılan esansiyel yağlardan birisi olan kekik zein film çözeltisi içerisine %3, %3,5, %4, %5 ve %6 (v/w) olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda eklenmiştir. Belirtilen konsantrasyonlarda kekik esansiyel yağı içeren çözeltilerden elde edilen filmlerden hazırlanan disklerin, küf ve mayalara karşı antifungal etkisini belirlemek için, agar difüzyon yöntemi uygulandıktan sonra film etrafında oluşan şeffaf zonların alanları hesaplanmış ve Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Film çözeltisine eklenen kekik esansiyel yağının konsantrasyonu arttıkça film çözeltisinin daha akışkan olduğu gözlenmiştir. Cam plaka üzerine dökülen film çözeltisinin 24 saat sonunda kurumasiyla oluşan filmin yapısının, kekik konsantrasyonunun artmasıyla esnekliğinin arttığı görülmüştür.

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, yalnızca %3 kekik esansiyel yağı içeren çözeltilerden elde edilen filmin *Aspergillus parasiticus* NRRL 465 ve *Paecilomyces variotii*'yi tamamen inhibe edemediğini, diğer konsantrasyonlardaki çözeltilerden elde edilen tüm filmlerin çalışmada kullanılan her üç küf de tamamen inhibe ettiği (hiç üreme yok) belirlenmiştir. Ayrıca yine %3 oranında kekik esansiyel yağını içeren çözeltilerden elde edilen filmlerin, *C. lambica* dışındaki mayalarda yapılan uygulamalarında diskler etrafında zon oluşumu gözlenmemiştir.

Film çözeltisi içerisindeki kekik esansiyel yağı konsantrasyonunu %3,5'a çıkarılmasıyla birlikte, filmde elde edilen disklerin her üç küf de tamamen inhibe ettiği görülmüş, tüm mayalar üzerinde yapılan uygulamada ise diskler etrafında şeffaf zon oluşumu tespit edilmiştir.

Film çözeltisi içerisindeki kekik esansiyel yağ konsantrasyonlarının %4, %5, %6 gibi değerlere çıktıkça, küflerin tamamen inhibisyonu devam etmiş, mayalarda ise elde edilen inhibisyon zon alanlarında artış gözlenmiştir. Ancak zon alanları değerlerinin bazen ufak sapmalar gösterdiği tespit edilmiştir. Buna filmlerin ve dolayısıyla filmlerden elde edilen disklerin kalınlıklarındaki farklılıkların sebep olabileceği düşünülmektedir. Çünkü kalınlıkları ve ağırlıkları farklı olan disklerin içerisinde yer alan esansiyel yağ miktarları da farklı olmaktadır (Çizelge 4.1.). Filmlerden elde edilen disklerdeki kekik esansiyel yağı ortalamaları

Çizelge 4.1. Kekik esansiyel yağı içeren zein filmlerin küfler ve mayalar üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon alanları*

Zein Film Çözeltisi İçerisindeki Kekik Esansiyel Yağı Konsantrasyonu (%v/w)	Disklerin İçerdiği Ortalama Esansiyel Yağ Miktarı (ml*1000)	<i>Aspergillus fumigatus</i> Zon alanı (cm ²)	<i>Paecilomyces variotii</i> Zon alanı (cm ²)	<i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 465 Zon alanı (cm ²)	<i>Candida kefyri</i> Zon alanı (cm ²)	<i>Candida zeylanoides 1</i> Zon alanı (cm ²)	<i>Candida zeylanoides 2</i> Zon alanı (cm ²)	<i>Candida lambica</i> Zon alanı (cm ²)	<i>Candida sake</i> Zon alanı (cm ²)
3	1,8	Tamamı İnhibe ¹	0,95±0,42	1,26±0,26	Zon oluşumu yok	Zon oluşumu yok	Zon oluşumu yok	0,77±0,24	Zon oluşumu yok
3,5	2,1	Tamamı İnhibe	Tamamı İnhibe	Tamamı İnhibe	1,40±0,11	2,27±0,15	1,69±0,47	Tamamı İnhibe	2,08±8,08
4	2,0	Tamamı İnhibe	Tamamı İnhibe	Tamamı İnhibe	0,44±0,13	0,50±0,05	1,20±0,36	3,52±0,81	1,64±0,45
5	2,7	Tamamı İnhibe	Tamamı İnhibe	Tamamı İnhibe	2,38±0,03	1,26±0,39	2,74±0,11	Tamamı İnhibe	Tamamı İnhibe
6	2,3	Tamamı İnhibe	Tamamı İnhibe	Tamamı İnhibe	2,22±0,30	1,18±0,26	2,51±0,52	Tamamı İnhibe	2,36±0

*: Ortalama ± standart sapma (n=3)

¹: Besiyerinde üreme tespit edilmedi.

dikkate alındığında, %3,5 (v/w) kekik esansiyel yağı içeren çözeltiden yapılan filmde elde edilen disklerin; %4 konsantrasyona sahip olandan daha fazla miktarda kekik esansiyel yağı içerdiği görülmektedir. Bu durum, %3,5 (v/w) konsantrasyona sahip çözeltiden elde edilen filmin ve disklerin daha kalın ve ağırlığının da daha yüksek olduğunun bir göstergesidir. Oluşan inhibisyon zon alanlarına filmin içerdiği esansiyel yağ miktarı etkili olurken, film kalınlığı da film içerisindeki aktif maddenin salınımını etkileyebilmektedir.

Çizelgeden de anlaşılacağı üzere, kekik esansiyel yağı içeren filmlere karşı en duyarlı küf *A. fumigatus*, maya ise *C. lambica*'dır.

Nguefack ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada, *Thymus vulgaris* esansiyel yağının, *A. ochraceus*, *P. expansum* ve *P. verrucosum*'a ait ikişer mikotoksijenik suş üzerinde etkili olduğunu bildirmektedir.

Gıda yüzeyindeki mikrobiyal gelişimler gıda bozulmalarının en önemli sebebidir. Fakat farklı makalelerde belirtildiği gibi; antibakteriyel maddelerin direkt gıda yüzeyine uygulanmasının yararları sınırlıdır. Çünkü, bu aktif maddeler gıdayla temasta nötralize veya gıdanın tamamına hızlıca difüze olabilmektedir (Pranoto ve ark. 2005).

Günümüzde esansiyel yağların filmlere eklenmesiyle oluşturulan antimikrobiyal özellikteki filmler hakkında çalışmalar yapılmaktadır.

Rodriguez ve ark. (2007), güçlendirilmiş tarçın esansiyel yağını içeren kağıt ambalajları, *C. albicans* ve *A. flavus* üzerinde 71 günlük test periyodunda denemiş ve inhibisyon aktivitesini kaybetmediğini görmüşlerdir.

Timol içeren zein filmlerin *Bacillus cereus*, *Candida lusitaniae* ve *Pseudomonas spp.* karşı antimikrobiyel etkinlikleri ölçüldüğünde, özellikle 20% ve 35% timol içerenlerin test boyunca mikrobiyal gelişimi inhibe ettiği; 5%, 10% içerenlerinse büyüme döngüsünü yavaşlattığı bildirilmiştir (Del nobile ve ark. 2008).

Disk difüzyon tekniği kullanılarak *Thymus vulgaris* ve *Thymus daenensis*'in antimikrobiyal aktivitelerinin *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* ve *Aspergillus niger*'e karşı denendiği çalışmada, her iki esansiyel yağın etkili olduğu görülmüştür (Behbahani ve ark. 2013).

Yaptığımız çalışmada, kekik esansiyel yağını yenilebilir bir film olan zein içerisine eklediğimizde, elde edilen filmlerin test edilen küflere, test edilen mayalardan daha fazla etki ettiği, en hassas organizmanın *A. fumigatus* olduğu belirlenmiştir.

4.2. Defne Esansiyel Yağı İçeren Zein Filmin Antifungal Aktivitesi

Çalışmamızda kullanılan esansiyel yağlardan bir diğeri olan defne, zein film çözeltisi içerisine %3, %4, %5, %7 ve %8 (v/w) olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda ilave edilmiştir. Bu konsantrasyonlara ait çözeltilerden elde edilen filmlerden hazırlanan disklerin içerdikleri ortalama esansiyel yağ miktarları aynı sıralamayla $1,8 \times 10^{-3}$ ml, $2,4 \times 10^{-3}$ ml, $3,3 \times 10^{-3}$ ml, $4,5 \times 10^{-3}$ ml ve $4,8 \times 10^{-3}$ ml olarak belirlenmiştir. Ancak film çözeltisi içerisine eklenen konsantrasyonlarda *Aspergillus parasiticus* NRRL 465, *Aspergillus fumigatus* ve *Paecilomyces variotii*, *Candida kefyr*, *Candida zeylanoides* 1, *Candida zeylanoides* 2, *Candida lambica*, *Candida sake*'e karşı antifungal etki tespit edilememiştir.

Film çözeltisi içerisine eklenen defne esansiyel yağının konsantrasyonu arttıkça film çözeltisinin de daha bulanık ve kekik esansiyel yağını içeren filmlere göre biraz daha viskoz yapıda olduğu gözlenmiştir. Cam plaka üzerine dökülen film çözeltisinin 24 saat sonunda kurumasıyla oluşan filmin kırılabilirliğinin, defne esansiyel yağının konsantrasyonunun artmasıyla biraz daha arttığı görülmüştür.

Laurus nobilis esansiyel yağının antifungal aktivitesi ile ilgili yeterli yayına rastlanamamıştır. Ertürk (2006), *Lauris nobilis*'in etanolik ekstraktlarının MIC metodu ile *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *E.coli*, *P aeruginosa*, *C. albicans* ve *A.niger* üzerine antibakteriyel ve antifungal aktivitelerine bakmış, MIC değerlerini tüm test edilenlere karşı 5 mg/ml olarak belirlemiştir. *A.niger* ve *C. albicans* üzerine steril kağıt disklerde uygulanan disk difüzyon metodunda ise 22-25 mm/15 µl zon çapı oluşturduğu bildirilmiştir.

Bir antimikrobiyal paketleme sistemi geliştirilirken, antimikrobiyal madde ile substrat seçimi çok önemlidir. Antimikrobiyal ajan paketleme materyaline eklendiği zaman, materyalin doğası gereği sahip olduğu fiziko-mekanik özelliklerini etkileyebilir. Polimere katkı ekleneceği zaman, bu eklenecek maddenin polaritesi, molekül ağırlığı gözönünde bulundurulmalıdır. Eklenen maddenin molekül ağırlığı, iyonik yükü, çözünürlüğü, polimerden difüzyon hızını değiştirebilir (Suppakul ve ark. 2003).

Ertürk (2006)'da defne esansiyel yağı steril kağıt disklerle *A.niger* ve *C. albicans*'a karşı uygulandığında antifungal etki göstermiştir. Yaptığımız çalışmada yine defne esansiyel yağı içeren zein filmin kullanılan küf ve mayalara karşı etki göstermeyişinin sebebi, defne esansiyel yağının film materyaline gösterdiği afinitesi, böylece difüzyonun engellenmesi olarak düşünülmektedir.

4.3. Portakal Esansiyel Yağı İçeren Zein Filmin Antifungal Aktivitesi

Denemelerimizde kullanılan esansiyel yağlardan biri olan portakalın zein film içerisinde %3, %4, %5, %6, ve %8 (v/w) olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda üretimi yapılmıştır. Bu konsantrasyonlara ait çözeltilerden elde edilen filmlerden hazırlanan disklerin içerdikleri ortalama esansiyel yağ miktarları aynı sıralamayla $1,6 \times 10^{-3}$ ml, $1,7 \times 10^{-3}$ ml, $2,6 \times 10^{-3}$ ml, $3,8 \times 10^{-3}$ ml ve $3,9 \times 10^{-3}$ ml olarak belirlenmiştir. Ancak film içerisine eklenen konsantrasyonlarda *Aspergillus parasiticus* NRRL 465, *Aspergillus fumigatus* ve *Paecilomyces variotii*, *Candida kefyr*, *Candida zeylanoides* 1, *Candida zeylanoides* 2, *Candida lambica*, *Candida sake*'e karşı antifungal etki tespit edilememiştir.

Film çözeltisi berrak ve kekik esansiyel yağı içeren filmlere göre daha akışkan yapıdadır. Cam plaka üzerine dökülen film çözeltisinin 24 saat sonunda kurumasiyla oluşan filmin portakal esansiyel yağı konsantrasyonunun artmasıyla kırılgenliğinin biraz daha arttığı görülmüştür.

Citrus sinensis L. esansiyel yağının agar dilüsyon metodu ile *A. niger*, *A. flavus*, *Penicillium chrysogenum* ve *Penicillium verrucosum* üzerine etkilerine bakılmış ve hepsine karşı antifungal aktivite gösterdiği ancak *A.niger* üzerinde en etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Viuda-Martos ve ark 2008b).

4.4. Farklı Esansiyel Yağları Birlikte İçeren Zein Filmlerin Antifungal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Zein film çözeltisi içerisine ilave edilen konsantrasyonlarda küf ve mayalara etkili olan esansiyel yağın kekik olarak belirlenmesi üzerine; kekik ile diğer iki esansiyel yağ Çizelge 4.2.'de belirtilen konsantrasyonlarda beraber eklenerek, belirtilen küf ve mayalar üzerine antifungal etkisine bakılmıştır. Film çözeltisi içerisinde %3 konsantrasyondaki kekiğin diğer esansiyel yağlar ile birlikte kombine edildiğinde küf ve mayalar üzerindeki antimikrobiyal etkisinin arttığı tespit edilmiştir.

%3 kekik esansiyel yağı içeren çözültiden elde edilen zein film sadece *A. fumigatus*'u tamamen inhibe etmişken, %3 kekik ve %3 defne esansiyel yağını birlikte içeren ve %3 kekik ve %3 portakal esansiyel yağını birlikte içeren çözültiden elde edilen zein film *A. parasiticus* NRLL 465'i de tamamen inhibe etmiştir. *P. variotti* üzerinde oluşan inhibisyon zon alanını da arttırmıştır.

%3 kekik esansiyel yağı içeren çözültiden elde edilen zein film sadece *C. lambica*'ya etki ederken, %3 kekik ve %3 defne esansiyel yağını birlikte içeren ve %3 kekik ve %3 portakal esansiyel yağını birlikte içeren çözültiden elde edilen zein film diğer mayalar üzerine de etki göstermeye başlamıştır.

Her üç esansiyel yağı da içeren çözültiden elde edilen zein film, *A. parasiticus* NRLL 465'e olan antifungal etkisini %3 kekik esansiyel yağını içeren çözültiden elde edilen filme göre arttırırken, tamamen inhibisyon sağlayamamıştır. *P. variotti* üzerine olan antifungal etkisini ise oldukça fazla arttırmıştır. *C.kefyr* haricindeki mayalara da antifungal aktivite göstermiştir.

Al-Bayati (2008) yaptığı çalışmada, *Thymus vulgaris* ve *Pimpinella anisum* esansiyel yağlarının gram pozitif ve gram negatif patojenik bakteriler üzerine MIC metodu ile ayrı ayrı ve birlikte etkilerine bakmış ve iki esansiyel yağın kombinasyonunun çoğu patojene daha güçlü etki gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Bir diğer çalışmada, *C. citratus*, *O. gratissimum* ve *T. vulgaris* fraksiyonları arasında yapılan 23 karışımın, *P. expansum*'un mikotoksin oluşturan iki suşu üzerine denemeler yapılmıştır. 4 karışımın sinerjik etki, 1 karışımın additif etki, 18 tanesinin de antogonistik etki gösterdiği bulunmuştur (Nguefack 2012).

Bizim çalışmamızda elde edilen verilerden ise, yapılan kombinasyonların antifungal etkileri arttırdığı görülmüş olup, küfler üzerine yapılacak denemelerde özellikle ikili kombinasyonların uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.2. Farklı kombinasyonlarda esansiyel yağ içeren zein filmlerin küfler ve mayalar üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon alanları*

Zein Film Çözeltisi İçerisindeki Esansiyel Yağ Konsantrasyonları (% v/w)			Disklerin İçerdiği Ortalama Esansiyel Yağ Miktarı (ml*1000)	<i>Aspergillus fumigatus</i> Zon alanı (cm ²)	<i>Paecilomyces variotii</i> Zon alanı (cm ²)	<i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 465 Zon alanı (cm ²)	<i>Candida kefyr</i> Zon alanı (cm ²)	<i>Candida zeylanoides 1</i> Zon alanı (cm ²)	<i>Candida zeylanoides 2</i> Zon alanı (cm ²)	<i>Candida lambica</i> Zon alanı (cm ²)	<i>Candida sake</i> Zon alanı (cm ²)
Kekik	Defne	Portakal									
3	3	-	2,5	Tamamı İnhibe ¹	1,00- tt-tt	Tamamı İnhibe	0,20-tt- zy	Disk kenarları üreme azalması	Disk kenarları üreme azalması	3,43±2,04	0,41±0,21-zy
3	4	-	3,4	Tamamı İnhibe	3,47±0,02	Tamamı İnhibe	tt-zy-zy	tt- zy- zy	Disk kenarları üreme azalması	2,85±0,09	0,30±0,04- zy
3	-	3	3,6	Tamamı İnhibe	2,56±0,02	Tamamı İnhibe	Zon oluşumu yok	0,19±0-zy	tt-zy-zy	3,31±0,39	0,52±0,12
3	1,5	1,5	3,9	Tamamı İnhibe	5,78±0,47	1,54±0,61	Zon oluşumu yok	0,49±0,07	0,07±0,01	2,91±0,37	2,54±0,29- ti

*: Ortalama ± standart sapma (n=3)

¹: Besiyerinde üreme tespit edilmedi.

ti: Paralelin birinde tam inhibisyon gözlemlendi

tt: Paralelin birinde tek taraflı zon oluşumu gözlemlendi

zy: Paralelin birinde zon oluşmadı

4.5. Esansiyel Yağların Zon Oluşumunu Sağlayan Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları

Elde edilen verilerden; kekik esansiyel yağı ve kekik-defne esansiyel yağlarını birlikte içeren filmlerin *Aspergillus fumigatus*'a karşı çok etkili olduğu anlaşılmıştır. Kekik esansiyel yağının, margarinlerde duyusal olarak defne esansiyel yağı ile portakal esansiyel yağından daha uyumlu olacağı da düşünüldüğünden ve antioksidan etkisinin de portakala göre daha fazla olduğu anlaşıldığından; kekik ile defne esansiyel yağlarının yenilebilir film içerisinde birlikte kullanılmasına karar verilmiştir. Böylece sadece kekik, kekik ve defne, potasyum sorbat içeren filmlerde *Aspergillus fumigatus*'a karşı, disk difüzyon yöntemiyle, zon oluşumunu sağlayan film çözeltisi içerisindeki minimum konsantrasyonları belirlemek için çalışmalara devam edilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3., Çizelge 4.4. ve Çizelge 4.5.'de verilmiştir. Buna göre, sadece kekik esansiyel yağı içeren film için %1,7 (v/w); kekik ve defne esansiyel yağlarını birlikte içeren filmler için %1,6 (v/w); potasyum sorbat içeren zein film içinse % 3,5 (w/w), film çözeltisi içerisindeki inhibisyonu sağlayan minimum konsantrasyon olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. Kekik esansiyel yağı içeren zein filmlerin *A. fumigatus* üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon alanları*

Zein Film Çözeltisi İçerisindeki Kekik Esansiyel Yağı Konsantrasyonu (% v/w)	Disklerin İçerdiği Ortalama Esansiyel Yağ Miktarı (ml*1000)	<i>Aspergillus fumigatus</i> Zon alanı (cm²)
1,00	0,5	Zon oluşumu yok
1,50	0,8	Zon oluşumu yok
1,60	1	Zon oluşumu yok
1,70	0,9	0,65±0,26
1,85	0,9	0,66±0,14
2,00	1,2	5,23±0,60
2,50	1,6	7,18±1,02

*: Ortalama ± standart sapma (n=3)

Çizelge 4.4. Kekik ve defne esansiyel yağlarını içeren zein filmlerin *A. fumigatus* üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon alanları*

Zein Film Çözeltisi İçerisindeki Esansiyel Yağ Konsantrasyonları (v/w)		Disklerin İçerdiği Ortalama Esansiyel Yağ Miktarı (ml*1000)	<i>Aspergillus fumigatus</i> Zon alanı (cm ²)
Kekik	Defne		
1,50	1,50	1,7	Zon oluşumu yok
1,60	1,60	1,9	0,94±0,06
1,65	1,65	1,8	0,97±0,00

*: Ortalama ± standart sapma (n=3)

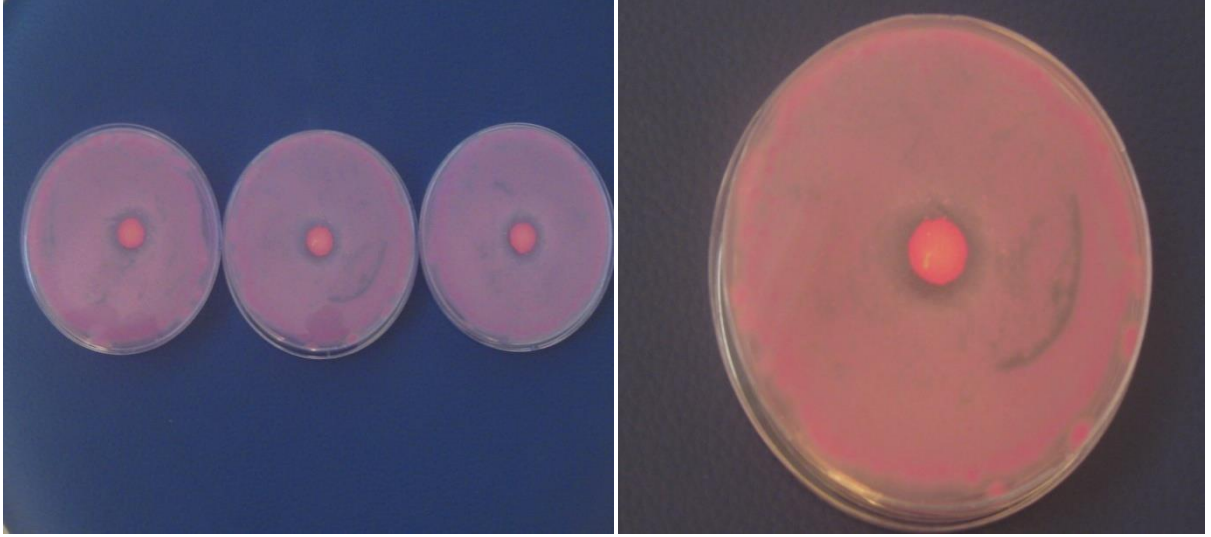
Çizelge 4.5. Potasyum sorbat içeren zein filmlerin *A. fumigatus* üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon alanları*

Zein Film Çözeltisi İçerisindeki Potasyum Sorbat Konsantrasyonu (% w/w)	Disklerin İçerdiği Ortalama Potasyum Sorbat Miktarı (gr*1000)	<i>Aspergillus fumigatus</i> Zon alanı (cm ²)
1,60	0,9	Zon oluşumu yok
2,50	1,8	Zon oluşumu yok
3,50	2,3	0,65±0,26

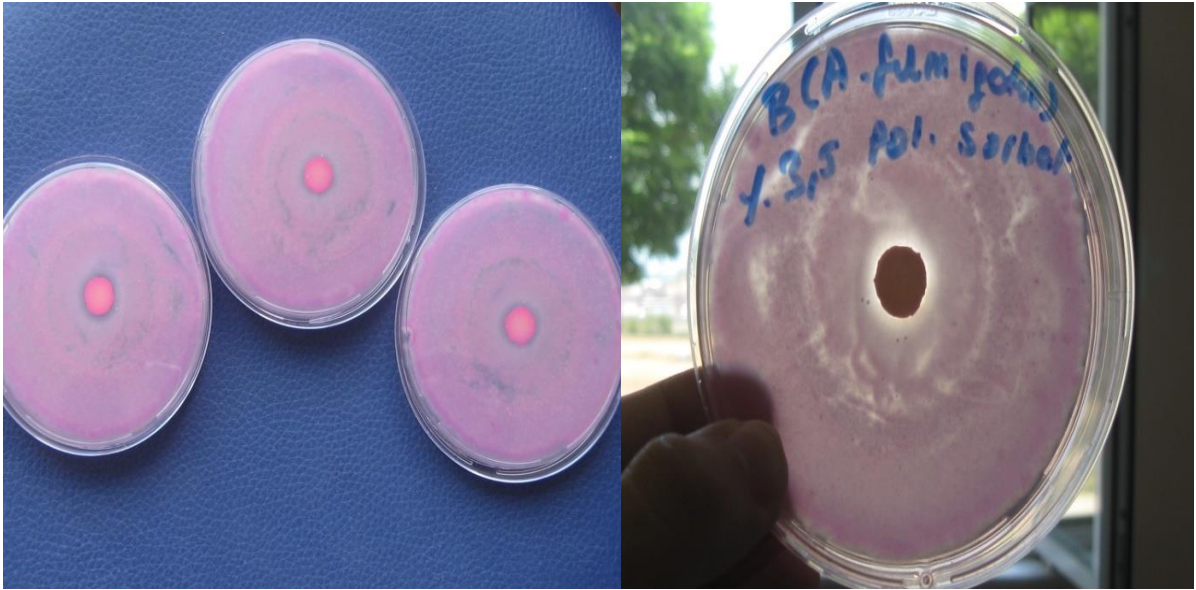
*: Ortalama ± standart sapma (n=3)

Elde edilen sonuçlardan görüldüğü gibi; sadece %1,6 kekik esansiyel yağı içeren çözeltiden elde edilen filmlerde *A. fumigatus* üzerine herhangi bir antifungal etki tespit edilemezken, %1,6 kekik ve %1,6 defne esansiyel yağlarını birlikte içeren çözeltiden elde edilen filmlerde inhibisyon zonu gözlemlenmiştir (Şekil 4.1).

Film çözeltisi içerisinde %3,5 (w/w) konsantrasyona kadar *A. fumigatus* üzerine herhangi bir antifungal aktivite gösteremeyen potasyum sorbat içeren filmlerin, *A. fumigatus* üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon alanı Şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. %1,6 (v/w) kekik ve %1,6 (v/w) defne esansiyel yağları içeren çözeltiden elde edilen zein filmin *A. fumigatus* üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon alanı



Şekil 4.2. %3,5 (w/w) potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein filmin *A. fumigatus* üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon alanı

4.6. Zein Filmlerin Kalınlığı

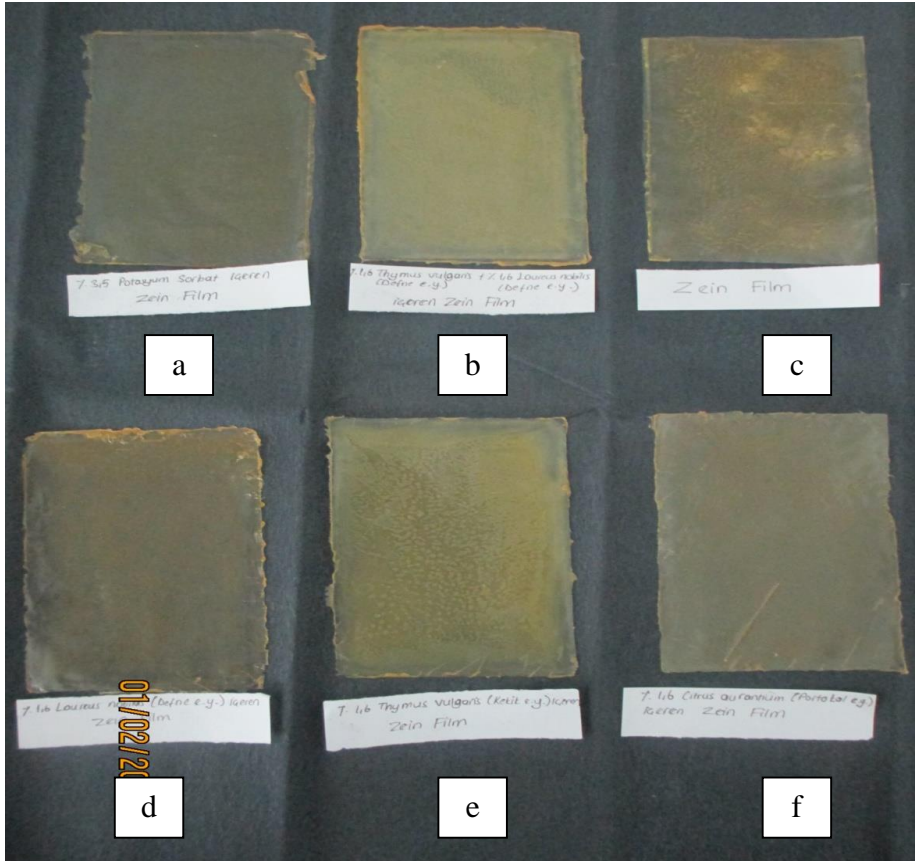
Zon oluşumunu sağlayan minimum konsantrasyonların belirlenmesinin ardından bu özellikteki filmlerin kalınlık ölçümleri film üzerindeki on farklı noktada mikrometre yardımıyla yapılmış, ortalamaları Çizelge 4.6.'da, görüntüleri ise Şekil 4.3.'te verilmiştir.

Çizelge 4.6. Zein filmlerin kalınlıkları*

Zein Film Çözeltisi İçerisindeki Esansiyel Yağ (% v/w) ve Potasyum sorbat (w/w) Konsantrasyonları				Film Kalınlığı (mm)
Kekik	Defne	Portakal	Potasyum sorbat	
-	-	-	-	0,139±0,008 ^a
1,6	-	-	-	0,100±0,003 ^b
-	1,6	-	-	0,132±0,020 ^a
-	-	1,6	-	0,104±0,003 ^b
1,6	1,6	-	-	0,131±0,008 ^a
-	-	-	3,5	0,112±0,003 ^b

*: Ortalama ± standart hata (n=10)

^{a, b} : Aynı sütun içinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0,05).



Şekil 4.3. % 3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film (a), %1,6 kekik ve %1,6 defne esansiyel yağlarını içeren çözeltiden elde edilen zein film (b), zein film (c), %1,6 defne esansiyel yağı içeren çözeltiden elde edilen zein film (d), %1,6 kekik esansiyel yağı içeren çözeltiden elde edilen zein film (e), %1,6 portakal esansiyel yağı içeren çözeltiden elde edilen zein film (f)

Hazırlanan yenilebilir filmlerin kalınlıkları 0,100-0,139 mm arasında tespit edilmiştir. İçeriğinde hiçbir madde bulunmayan zein filmin kalınlığının en fazla olduğu, kalınlık miktarlarının sırasıyla zein film> defne esansiyel yağ içeren> defne ve kekik esansiyel yağ içeren> potasyum sorbat içeren> portakal esansiyel yağ içeren> kekik esansiyel yağ içeren zein film olduğu görülmüştür. İçeriğinde hiçbir madde bulunmayan zein film, defne esansiyel yağ içeren, defne ve kekik esansiyel yağ içeren zein filmlere ait kalınlıklar kendi içlerinde benzerlik gösterirken, diğerlerine göre önemli seviyede daha kalın bulunmuştur (P<0,05). Sonuçlara ait varyans analiz tablosu Ek 2’de verilmiştir.

4.7. Esansiyel yağ ve potasyum sorbat içeren zein filmlerin mekanik özellikleri

Elde edilen verilerden, %1,6 (v/w) konsantrasyonda kekik ve defne esansiyel yağlarını içeren çözeltiden elde edilen zein filmin, disk difüzyon yöntemiyle *A. fumigatus*’a karşı inhibisyon zonu oluşturan en düşük konsantrasyon olduğu belirlenmiş ve bu özellikteki filmlerin margarinlere uygulanmasına karar verilmiştir. Dolayısıyla film çözeltisindeki esansiyel yağ konsantrasyonu olarak %1,6 baz alınarak hazırlanan tüm filmlerin gerilme direnci ve uzama yüzdesi özelliklerine bakılmıştır. Potasyum sorbat içeren zein filmin mekanik özelliklerini belirlemek için ise *A. fumigatus*’a karşı inhibisyon gösterdiği minimum konsantrasyon olan %3,5 kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7.’de, sonuçlara ait varyans analiz tablosu ise Ek 3’de verilmiştir. Hiçbir madde içermeyen zein film ile potasyum sorbat içeren zein filmin uzayabilirlikleri arasındaki fark Şekil 4.4’de görülmektedir.

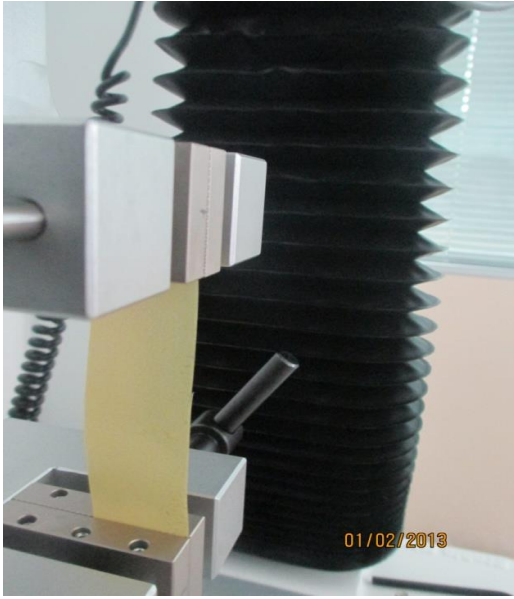
Çizelge 4.7. Zein filmlerin gerilme dirençleri ve uzama yüzdeleri*

Zein Film Çözeltisi İçerisindeki Esansiyel Yağ (% v/w) ve Potasyum sorbat (w/w) Konsantrasyonları				Gerilme Direnci (Mpa)	Uzama Yüzdesi (%)
Kekik	Defne	Portakal	Potasyum sorbat		
-	-	-	-	3,57±0,83 ^c	0,53±0,08 ^b
1,6	-	-	-	7,79±0,68 ^a	1,50±0,22 ^b
-	1,6	-	-	3,50±0,24 ^b	0,89±0,05 ^b
-	-	1,6	-	3,66±0,24 ^b	0,80±0,10 ^b
1,6	1,6	-	-	2,91±0,33 ^b	1,50±0,30 ^b
-	-	-	3,5	0,96±0,08 ^c	164±11 ^a

*: Ortalama ± standart hata

^{a-c}: Aynı sütun içinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

Elde edilen sonuçlardan görüldüğü üzere; %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltilerden elde edilen film 0,96 MPa ile en düşük gerilme direncini gösterirken, %164 ile de en fazla uzamayı sağlamıştır. Gerilme direnci değeri 7,79 MPa ile kekik esansiyel yağını içeren film için önemli ölçüde yüksek bulunurken ($P<0,05$), onu sırasıyla portakal esansiyel yağını içeren, hiçbir madde içermeyen, defne esansiyel yağını içeren, defne ve kekik esansiyel yağlarını birlikte içeren filmler takip etmiştir. En yüksek uzama yüzdesi olan, %164 ile uzama yüzdesi değeri diğerlerine göre önemli derecede yüksek tespit edilen potasyum sorbat içeren film olup ($P<0,05$); daha sonra % 1,50 ile kekik, kekik ve defne esansiyel yağlarını birlikte içeren, % 0,89 ile defne esansiyel yağını içeren, % 0,80 ile portakal esansiyel yağını içeren filmler olmuştur. En düşük uzayabilirlik, % 0,53 uzama yüzdesine sahip olan, hiçbir madde içermeyen zein film olmuştur.



(a)



(b)

Şekil 4.4. Gerilme direnci ve uzama yüzdesi ölçümü esnasında hiçbir madde içermeyen zein film (a), %3,5 (w/w) potasyum sorbat içeren çözeltilerden elde edilen zein film (b)

Sade zein filmin 3,57 MPa olarak ölçülen gerilme direnci, Herald ve ark. (1996)'ca verilen 3,9 ile benzerlik göstermektedir. Sonuçlardan da anlaşılacağı üzere, potasyum sorbat, zein filmin esnekliğini sağlamada çok büyük bir katkı sağlamıştır. Bunun yanında kullandığımız esansiyel yağların tümü filmin esnekliğini sade zein filme göre bir miktar

arttırmış olup, en büyük etkiyi kekik esansiyel yağı göstermiştir. Ancak potasyum sorbat içeren zein filmin uzama yüzdesi değerlendirmeye alındığında, diğer beş çeşit zein filmin uzama yüzdeleri bakımından birbirleri arasındaki fark önemsiz bulunmuştur ($P>0,05$). Kekik esansiyel yağının da film içerisindeki konsantrasyonunun artmasıyla esnekliği artıracakı düşünülmektedir. Zaten bu durum antifungal özelliklerini belirlemek için % 6 konsantrasyona çıktığımızda da oldukça açık bir şekilde gözlemlenmiştir.

Kekik yağının antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerinin yanında, zein filmin esnek olmayan yapısını iyileştirmesi, gıda uygulamaları açısından çok önemli bir katkıdır.

Yayınlanan çalışmalar, protein filmlere lipit eklenmesiyle filmlerin mekanik özelliklerinde oluşan etkinin farklı farklı olduğunu göstermiştir (Pires ve ark. 2011). Gontard ve ark. (1994), filmlere lipit eklenmesinin filmin mekanik özelliklerine etkisinin, lipitin özelliğine ve protein matriksi ile etkileşme kapasitesine bağlı olduğunu belirtmişlerdir (Pires ve ark. 2011). Öyle ki, birçok çalışma buğday gluteninden, sodyum kazeinattan, suda çözünebilir balık proteinlerinden ve jelatinden elde edilen filmlerde lipit konsantrasyonu arttıkça gerilme direncinin düştüğünü gösterirken, kazein filmlere değişik lipitlerin eklendiği, soya proteini izolatları filmine tarçın esansiyel yağının katıldığı gibi diğer bir kısım çalışmalarda da lipit konsantrasyonu arttıkça gerilme kuvvetinin arttığı belirtilmiştir (Pires ve ark. 2011).

Pires ve ark. (2013), barlam balığı protein filmlerine kekik, citronella (güney asya otu), tarhun otu ve kişniş esansiyel yağlarını ekleyerek mekanik özelliklerini araştırmıştır. Çalışma sonunda, kontrol filmin gerilme direnci 6,16 MPa olarak bulunurken, citronella esansiyel yağı içeren film 7,06 MPa ile en yüksek gerilme direncini, kekik esansiyel yağı içeren film ise 4,33 MPa gerilme direnci göstermiştir. Aynı çalışmada; kontrol örneğinin uzama yüzdesi % 147,9 iken kekik esansiyel yağı içeren filmin ise %111,2 olarak tespit edilmiştir.

%0-1,5 arasında 4 farklı konsantrasyonda oregano esansiyel yağı içeren alginat filmlerin ise konsantrasyonu arttıkça, gerilme dirençlerinin azaldığı, uzama yüzdesinin ise %2,2'den 3,7'ye kadar arttığı belirtilmiştir (Benvides ve ark. 2012).

Sayanjali ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada, karboksi metil selüloz filmlere %1-4 (w/v) aralığında sorbat eklemişler, kontrol filmlere kıyasla gerilme direncinin azaldığını,

uzama yüzdesinin ise 6,61'den 28,82'ye kadar arttığını görmüşlerdir. Gerilme direncindeki azalış ile uzama yüzdesinde artış olması bizim örneğimizle paralellik göstermektedir.

Esansiyel yağların fenolik bileşiklerce zengin olması ve ayrıca doğal fenolik bileşiklerin gıdanın oksidatif ve mikrobiyal durumunu iyi anlamda geliştirmesi bunların gıda ambalajlamada kullanılmasını teşvik etmektedir (Aguirre ve ark. 2013). Damodaran (1996) belirttiği gibi, fenolik bileşiklerin moleküler ağırlığı ve yapısı büyük değişkenlik göstermekte ve proteinlerin peptid karbonil gruplarıyla H bağı yapabilecek farklı sayıda hidroksil grupları içermektedir (Aguirre ve ark. 2013). Bu durum, farklı esansiyel yağların, yine farklı protein yapıdaki yenilebilir filmler içerisine eklendiğinde, filmlerin değişik mekanik özellikler sergilemesini açıklamaktadır.

Germe testi ile aynı konsantrasyonda esansiyel yağ ve potasyum sorbat içeren zein filmlere yapılan kesme testinde uygulanan kuvvet değerleri Çizelge 4.8.'de, sonuçlara ilişkin varyans analiz tablosu Ek 4'de verilmiştir. Kesme testi uygulaması görüntüsü ise Şekil 4.5.'de verilmektedir.

Çizelge 4.8. Zein filmlere uygulanan kesme kuvvetleri*

Zein Film Çözeltisi İçerisindeki Esansiyel Yağ (% v/w) ve Potasyum sorbat (w/w) Konsantrasyonları				Kesme Kuvveti (N)
Kekik	Defne	Portakal	Potasyum sorbit	
-	-	-	-	281±10 ^b
1,6	-	-	-	348±17 ^a
-	1,6	-	-	344±11 ^a
-	-	1,6	-	298±27 ^{ab}
1,6	1,6	-	-	291±9 ^b
-	-	-	3,5	313±12 ^{ab}

*: Ortalama ± standart hata

^{a- ab}: Aynı sütun içinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

Gerilme direnci en yüksek olan kekik esansiyel yağı içeren zein filmlere uygulanan kesme kuvveti de en yüksek olarak tespit edilmiştir. Ancak diğer germe testiyle eş içerikli

filmlerin, gerilme direnci ile filmlere uygulanan kesme kuvvetinin paralellik gösterdiği söylenemez. Hiçbir madde içermeyen zein filmlere uygulanan kesme kuvvetinin, kekik veya defne esansiyel yağını içeren zein filmlerle karşılaştırıldığında önemli seviyede düşük olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$). Filmlerin kesilebilmesi için uygulanan kuvvetin büyüklüğünün, filmin kalınlığı, filmin içerdiği maddelerden farklılaşan yapısı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.5. Zein film üzerine kesme testi uygulaması

4.8. Esansiyel yağların DPPH radikali yakalama aktivitesi

Yaptığımız çalışmada, kekik, defne ve portakal esansiyel yağlarının, DPPH radikali yakalama aktivitelerine bakılmış ve antioksidan aktivitesi varlığını bildiğimiz gallik asit de standart olarak kullanılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.6.'da görülmekte olup, her biri için hesaplanan IC_{50} değerleri ise Çizelge 4.9.'da verilmektedir.

Çizelge 4.9. Esansiyel yağların IC_{50} değerleri

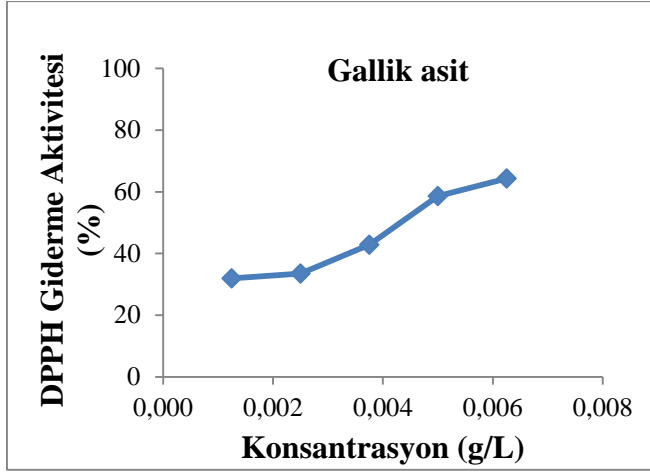
	Esansiyel Yağlar			
	Kekik	Defne	Portakal	Gallik asit
$IC_{50}(g/L)$	3,90	54,27	709,61	0,004

Elde edilen veriler göstermektedir ki, DPPH radikallerinin % 50'sini inhibe etmek için gereken gallik asit ve esansiyel yağ konsantrasyonları büyükten küçüğe şöyle sıralanmaktadır; portakal> defne> kekik> gallik asit. Bu da bize denemelerini yaptığımız esansiyel yağlar içerisinde en yüksek radikal giderme aktivitesine kekiğin, en düşük aktiviteye ise portakalın sahip olduğunu göstermektedir.

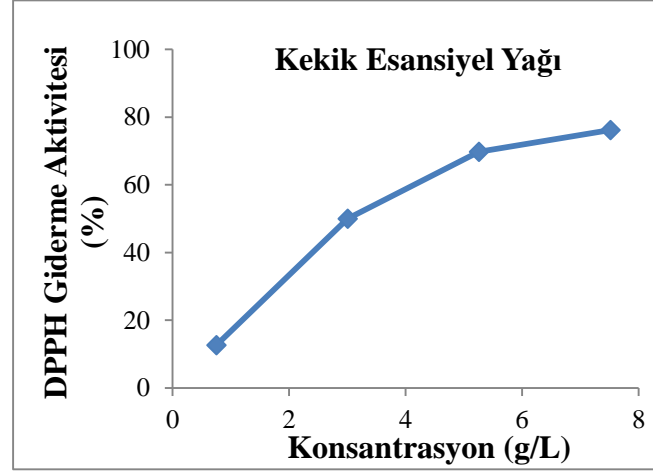
Kodal (2008), yaptığı çalışmada bahçe kekiğine (*Thymus vulgaris* L.) ait IC₅₀ değerini, 7,62 g/L olarak bulurken; Sokmen ve ark. (2004), *Thymus spathulifolius* esansiyel yağına ait IC₅₀ değerini, 243,2±7,20 µg/ml olarak tespit etmişlerdir. *Thymus vulgaris* esansiyel yağının kullanıldığı çalışmamızda bu esansiyel yağa ait IC₅₀ değeri 3,90 g/L olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler değerlendirildiğinde; radikal giderme aktivitesinin *Thymus spathulifolius* esansiyel yağının en yüksek olduğu, *Thymus vulgaris*'in radikal giderme aktivitesinin ise *Thymus vulgaris* L.'den yaklaşık 2 kat fazla olduğu anlaşılmaktadır. 215 tür içeren *Thymus* cinsinin (Ložienė ve ark. 2007), bu türlerinin antioksidan özelliklerinin de birbirinden farklı olabileceği, elde edilen verilerden anlaşılmaktadır. Aynı bitkiden elde edilen yağların antimikrobiyal aktivitelerinde bile genellikle büyük farklılıklar olmaktadır. Bu değişkenlik bitkilerin elde edildiği coğrafik kaynakların, hasat mevsiminin, genotipinin, iklimin, kurutma prosedürünün ve bitkinin distilasyon yapılan kısmının farklılıklarından kaynaklanabilmektedir (Oussalah 2007). Bu durum göz önüne alındığında antioksidan aktivitelerinde de farklılıklar olabileceği sonucuna varılmaktadır.

Defne (*Laurus nobilis*) ve portakal (*Citrus sinensis*) esansiyel yağlarının antioksidan aktiviteleriyle ilgili sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmış olup, Yvon ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada *Lauris nobilis* esansiyel yağının IC₅₀ değerini 236,3±2,9 mg/L olarak vermişlerdir. Bu sonuca göre araştırmada kullandığımız defne esansiyel yağının antioksidan aktivitesi daha düşüktür. Ayrıca Singh ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada, *C. maxima*, *C. sinensis* yağlarına ait IC₅₀ değerlerinin, 8,84 ve 9,45 µl/ml olduğu bildirmişlerdir.

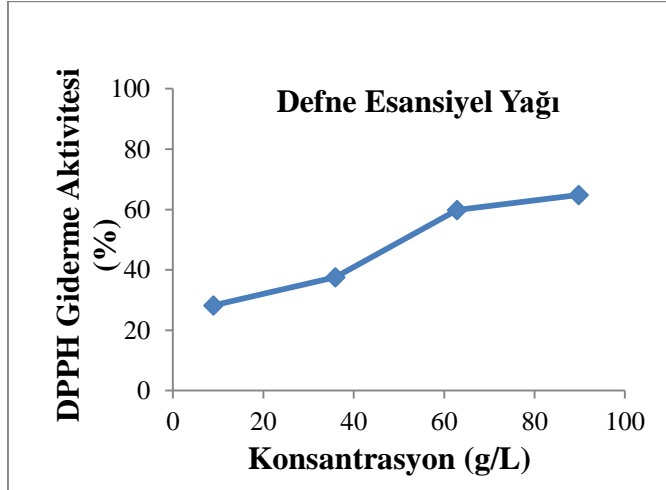
Esansiyel yağların lipid peroksidasyonunda önemli bir rol oynayan serbest radikaller üzerine etkilerinin belirlendiği deneylerimizin sonucu olarak, kekik esansiyel yağıyla birlikte defne esansiyel yağının da yenilebilir filmlerde antioksidan amaçlı kullanmaya uygun olduğu tespit edilmiştir.



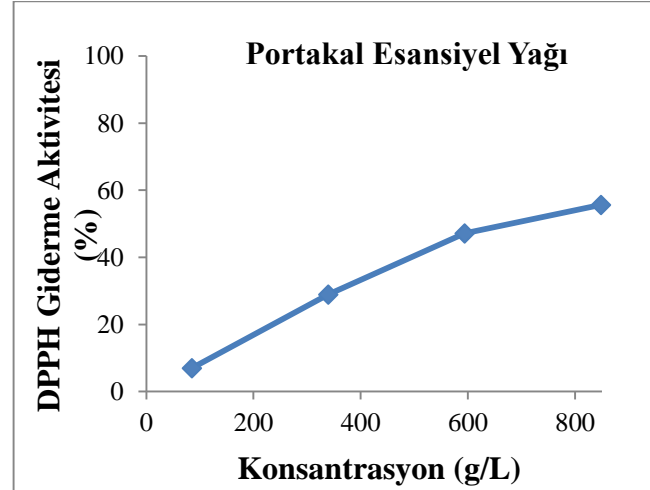
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 4.6. DPPH giderme aktivitesi gallik asit (a), kekik esansiyel yağı (b), defne esansiyel yağı (c), portakal esansiyel yağı (d)

4.9. Esansiyel Yağların Toplam Fenolik Bileşik Miktarları

Yaptığımız çalışmada, kekik, defne ve portakal esansiyel yağlarının, fenolik bileşik miktarları gallik asit eşdeğeri olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.10'da, sonuçlara ilişkin varyans analiz tablosu ise Ek 5'de verilmektedir.

Çizelge 4.10. Esansiyel yağların toplam fenolik madde değerleri*

Esansiyel Yağ	Toplam Fenolik Madde (mg/L)
Kekik	273833±8209 ^a
Portakal	3308±78 ^b
Defne	3157±33 ^b

*: Ortalama ± standart hata (n=4)

^{a, b}: Aynı sütun içinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

Buna göre fenolik bileşik miktarı gallik asit eşdeğeri olarak; kekik esansiyel yağı için 273833±8209 mg/L, portakal esansiyel yağı için 3308±78 mg/L, defne esansiyel yağı için 3157±33 mg/L olarak hesap edilmiştir. Portakal ve defne esansiyel yağının toplam fenolik madde miktarı arasında istatistiki olarak önemli bir fark bulunmazken, kekik esansiyel yağının toplam fenolik miktarı diğerlerine göre önemli seviyede yüksek bulunmuştur (P<0,05).

Portakal esansiyel yağına ait IC₅₀ değeri, defne esansiyel yağından 13 kat fazla olduğu halde fenolik bileşik miktarı daha fazla çıkmıştır.

Sun ve ark. (2002)'ye ait bir çalışmada, toplam 11 meyvede yapılan deneyde, sahip olunan antioksidan özelliklerle, toplam fenolik bileşiklerin direkt ilişkisi bulunduğu tespit edilmiştir. Ancak Mohammadian ve ark. (2011)'nin yaptığı bir diğer çalışmada; toplam fenolik içeriğinin radikal giderme aktivitesi ile ilişkili olmadığı, ancak antioksidan aktivitenin flavonoid içeriği ile bir bağlantısı olduğu bildirilmiştir. Fenolik bileşiklerin oranlarındaki farklılıklar antioksidan aktivitede de farklılığa sebep olabilirler. Bu yüzden toplam fenolik içeriği yüksek olsa bile toplam antioksidan aktivitesinin düşük olabilmektedir (Li et al. 2006, Mohammadian et al. 2011).

Nitekim, Wojdyło ve ark. (2007), antioksidan aktiviteye sahip fenoliklerin özellikle fenolik asitler ve flavonoidler olarak bulunduğunu belirtmektedirler. Yaptıkları çalışmada, flavon ve flavonoller gibi flavonoid ve fenolik asitleri HPLC metodu ile belirlemiş ve en yüksek konsantrasyondaki fenolik asitleri, 100 g kuru ağırlıkları (dw) bazında ve gallik asit eşdeğerinde *T. vulgare* (1700 mg/100 g dw), *M. officinalis* (969 mg/100 g dw), *L. officinale* (630 mg/100 g dw) ve *Thymus vulgaris* (607 mg/100 g dw) yapraklarının ekstraktlarında bulmuşlardır. *T.longicaulis*'in metanolle elde edilen ekstraktlarında tespit edilen toplam fenolik madde miktarı gallik asit eşdeğeri olarak (GA) ise $126,51 \pm 1,99$ µg GA/ mg ekstrakt olarak belirtilmiştir (Sarıkurkcu ve ark. 2010)

Skerget ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada defne yaprağının metanolle elde edilen ekstraktlarına ait toplam fenolik madde miktarını 99,7 g GA/kg olarak tespit etmiştir. Yine defne yapraklarının asetonla elde edilen ekstraktlarında yapılan toplam fenolik madde ölçümünde sonuç, $20,94 \pm 0,97$ mg GA/g dw olarak hesaplanmıştır (Ouchikh ve ark. 2011).

Literatürde, kekik, defne ve portakal esansiyel yağlarına ait toplam fenolik madde sonuçlarıyla ilgili çalışmaya rastlanmadığından, ancak ekstraktlarına ait bilgiler verilebilmiş fakat çalışmamızda elde edilen verilerin karşılaştırılması yapılamamıştır. Anagnostopoulou ve ark. (2006)'a ait bir diğer çalışmada ise, portakal kabuğunun çeşitli ekstraktlarının ve fraksiyonlarının fenolik bileşiklerine ve DPPH radikali giderme aktivitesine bakılmış, toplam fenolik bileşik miktarı ile radikal giderme aktivitesi arasında düşük bir ilişki gözlemlenmiştir.

4.10. Margarinelere Depolama Süresince Uygulanan Analizler

4.10.1. Toplam bakteri ve maya-küf sayısı

Margarinlere üretimden hemen sonra inokulasyondan önce yapılan mikrobiyolojik analizlerde, toplam aerobik mezofilik bakteri, küf ve maya içerikleri incelenmiştir. Yapılan tüm ekim ve inkübasyon sonuçlarında, herhangi bir koloni gelişimi olmamıştır. Sonuç olarak, üretimde mikrobiyal kontaminasyon bulunmamaktadır.

4.10.2. Margarin üretiminde kullanılan zein filmlerin ağırlıkları

Margarinlerde depolama süreci için hazırlanan filmlerin ağırlıkları ölçülmüş ve ortalaması alınarak Çizelge 4.11'de verilmiştir. Sonuçlara ilişkin varyans analiz tablosu ise Ek 6'da verilmektedir. Uygulamalarda kullanılacak olan potasyum sorbat içeren zein filmlere ait ortalama ağırlık $0,97$ g olarak tespit edilmiş olup, kekik ve defne esansiyel yağlarını birlikte

içeren ve hiçbir madde içermeyen zen filmlerin ortalama ağırlıklarına göre istatistiki olarak önemli seviyede yüksek bulunmuştur ($P<0,05$).

Çizelge 4.11. Zein film ağırlıkları *

Zein Film Çözeltili İçerisindeki Esansiyel Yağ (% v/w) ve Potasyum sorbat (w/w) Konsantrasyonları				Film Ağırlığı (g)
Kekik	Defne	Portakal	Potasyum sorbat	
-	-	-	-	0,85±0,02 ^b
1,6	1,6	-	-	0,86±0,02 ^b
-	-	-	3,5	0,97±0,01 ^a

*: Ortalama ± standart hata

^{a, b}: Aynı sütun içinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($P<0,05$).

4.10.3. *Aspergillus fumigatus* sayısı

Hazırlanan bütün margarin örnekleri, +4 °C'de depolanmış olup, 180 gün boyunca belirli aralıklarla mikrobiyolojik analiz yapılmıştır. Bu analizler, margarinin hem merkezinden, hem de yüzeyinden alınan örneklerde 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. *Aspergillus fumigatus* ile kontamine edilmiş margarinlerin yüzey analizlerinde oluşan koloniler sayılarak, değerler 7,5 cm³'lük kısım dikkate alınarak kob/7,5 cm³ birimi ile Çizelge 4.12.'de verilmiştir. Şekil 4.7.'den anlaşıldığı gibi tüm margarin örneklerinin merkezlerinde herhangi bir gelişmeye rastlanmamıştır.

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, *Aspergillus fumigatus* ile kontamine edilmemiş margarinlerin örnekleri yüzeyi olan MY'de, depolama boyunca yapılan mikrobiyolojik analizlerde herhangi bir gelişmeye rastlanmadığı görülmektedir.

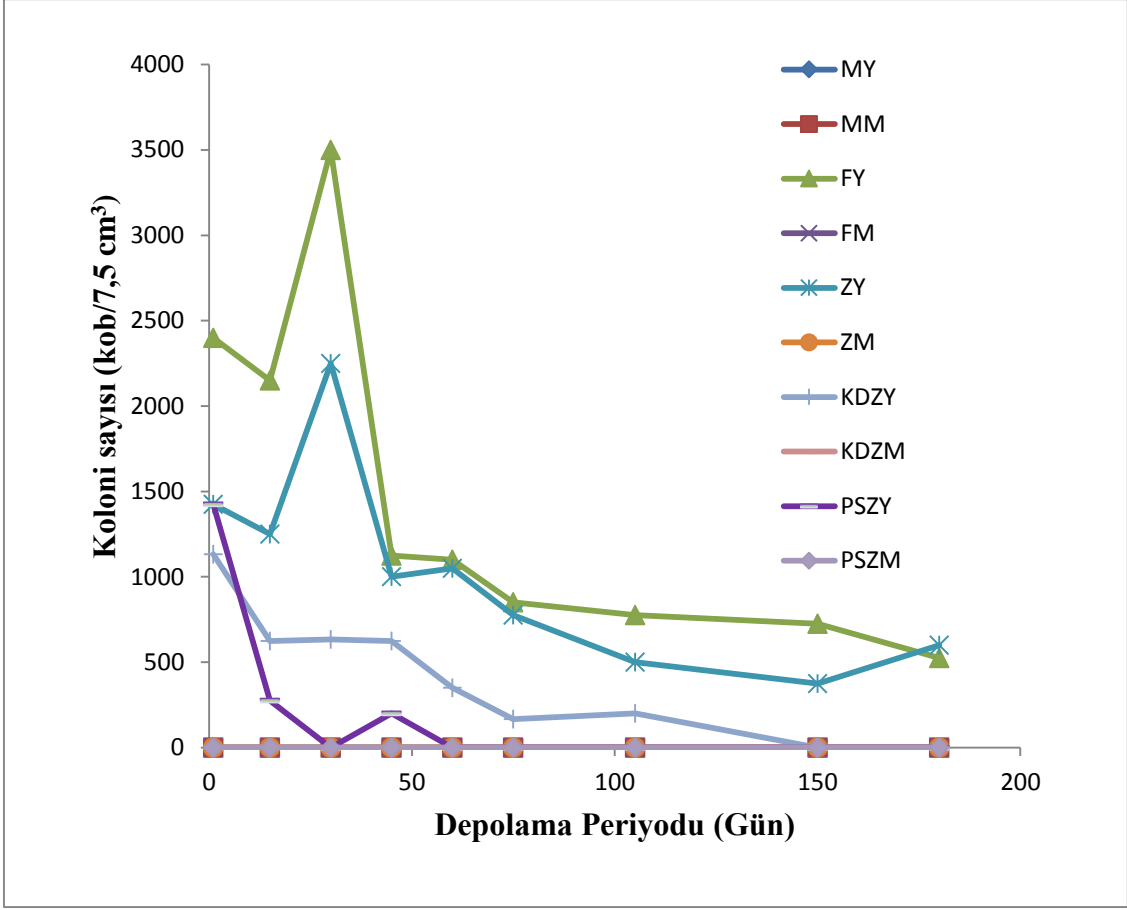
Yapılan çalışmada, sadece kontaminasyon yapılmış fakat film uygulanmamış kase margarin örneklerinin yüzeyi olan FY değerleri, 1. gün analizinde en yüksek değeri göstermiş, depolama süresince değerlerde genel olarak artış olmamakla birlikte zaman içinde bir miktar düşüş de gözlenmiştir. Bunun nedeni ortamda bulunan oksijen zaman içerisinde küfler tarafından kullanıldığından, başta hızlı olan gelişimin, ortamda oksijenin azalmasıyla beraber düşüş göstermesi olabilir.

Çizelge 4.12. Farklı uygulamalar yapılmış margarin örneklerinde +4 °C’de depolama süresince *A. fumigatus* sayısındaki değişimler*

Örnek	Depolama Periyodu (gün)								
	1	15	30	45	60	75	105	150	180
MY	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi
MM	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi
FY	2400±627*	2150±404	3500±794	1125±472	1100±497	850±212	775±377	725±71	525±171
FM	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi
ZY	1425±150	1250±191	2250±1526	1000±648	1050±208	775±562	500±163	375±250	600±115
ZM	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi
KDZY	1133±551	625±50	633±513	625±206	350±300	167±58	200±82	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi
KDZM	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi
PSZY	1425±126	275±263	Koloni gözlenmedi	200±100	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi
PSZM	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi	Koloni gözlenmedi

*:Ortalama ± standart sapma (2 tekrür, n=2)

MY: Kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış margarin yüzeyi FY: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş fakat film uygulanmamış margarin yüzeyi ZY: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve hiçbir madde içermeyen çözültiden elde edilen zein film uygulanmış margarin yüzeyi KDZY: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %1,6 kekik , %1,6 defne esansiyel yağlarını birlikte içeren çözültiden elde edilen zein film uygulanmış margarin yüzeyi PSZY: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %3,5 potasyum sorbat içeren çözültiden elde edilen zein film uygulanmış margarin yüzeyi MM: Kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış margarin merkezi FM: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş fakat film uygulanmamış margarin merkezi ZM: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve hiçbir madde içermeyen çözültiden elde edilen zein film uygulanmış margarin merkezi KDZM: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %1,6 kekik , %1,6 defne esansiyel yağlarını birlikte içeren çözültiden elde edilen zein film uygulanmış margarin merkezi PSZM: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %3,5 potasyum sorbat içeren çözültiden elde edilen zein film uygulanmış margarin merkezi



Şekil 4.7. Depolama süresince margarin gruplarında tespit edilen *A. fumigatus* sayısı (kob/7,5 cm³)

Aspergillus fumigatus dilüsyonu ile kontamine edilmiş, hiçbir madde içermeyen zein film uygulanan margarin örneklerinin yüzeyi olan ZY grubunda tespit edilen *A. fumigatus* sayısı, kontamine edilmiş fakat film uygulanmamış margarin yüzeyi örneklerine göre ilk 45 günde, diğer günlere göre daha iyi bir düşüş göstermiş olup, daha sonraki günlerde yapılan ölçüm sonuçları dalgalanma göstermekle beraber; yinede ZY grubunda tespit edilen *A. fumigatus* sayısı kontamine edilmiş fakat film uygulanmamış margarin yüzeyi grubuna göre düşük bulunmuştur.

Aspergillus fumigatus dilüsyonu ile kontamine edilmiş, % 1,6 kekik ve % 1,6 defne esansiyel yağlarını birlikte içeren çözültiden elde edilen zein film uygulamasının yapıldığı margarin örneklerinin yüzeyinde yapılan sayım sonucunda; kontamine edilmiş fakat film uygulanmamış margarin yüzeyi örneklerine göre daha ilk günde 1267 kob/7,5 cm³ birim

azaldığı görülmüştür. Daha sonraki günlerde de önemli bir azalış gösterdiği, hatta 150. günden itibaren üremenin gerçekleşmediği tespit edilmiştir.

Aspergillus fumigatus dilüsyonu ile kontamine edilmiş, % 3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanan margarin örneklerinin ise; ilk günde kontamine edilmiş fakat film uygulanmamış margarin yüzeyi örneklerinden 975 kob/7,5 cm³ daha düşük bir değere sahip olduğu görülmüştür. Çizelge 4.12'ye bakıldığında depolamanın 60. gününden itibaren yapılan mikrobiyolojik analizler sonucunda da gelişim gözlenmediği anlaşılmaktadır.

Günümüzde; antimikrobiyal özellik gösteren yenilebilir filmlerle ilgili çalışmalar artmaktadır (Ponce ve ark. 2008). Bu filmler; gıdaları bozucu veya patojen mikroorganizmaların lag fazını uzatarak ve/veya gelişme hızını düşürerek bu mikroorganizmaların çoğalmasını engeller ve böylece gıdaların güvenliğini sağlayarak raf ömrünü uzatabilirler (Quintavalla ve Vicini 2002). Üstelik filmlerin içerisinde yer alan antimikrobiyaller, gıdanın yüzeyine kademe kademe salınabildiği için, istenen raf ömrüne ulaşabilmek için antimikrobiyal maddelerin gıdanın yüzeyine direkt uygulamasına kıyasla, daha az miktarlarda antimikrobiyal ajana gereksinim duyulmaktadır (Min ve Krochta 2005). Gıdaya direkt katılmasındansa, paketlenme materyaline uygulanmasının diğer bir yararı da artan bir antimikrobiyal etkinlik göstermesidir (Marcos ve ark. 2013). Zein film içerisinden margarine esansiyel yağın yada potasyum sorbatın geçişi ile ilgili olarak deneysel çalışmalar yapılmadığından, bu maddelerin margarine ne kadarının geçtiği ile ilgili kesin bir sonuca varılamamaktadır. Ancak bu aktif maddelerin filmde hepsinin salındığını varsayarsak, *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilerek %1,6 (v/w) kekik ve %1,6 (v/w) defne esansiyel yağı birlikte içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulaması yapılan margarin grubunun içerisinde toplam %0,06 (v/w) oranında kekik ve defne esansiyel yağı, *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilerek %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulaması yapılan margarin grubunun içerisinde %0,07 (w/w) oranında potasyum sorbat olduğu sonucuna varılmaktadır. Margarinde “koruyucu madde olarak sorbik asit veya sorbik asitin Na, K veya Ca tuzu her biri veya karışım halinde toplam olarak 1 kg margarinde en çok 1000 mg bulunabilir” denilmektedir (Başoğlu 2012). Buda potasyum sorbat için oran olarak %0,1'e denk gelmektedir. Yapılan çalışmamızda potasyum sorbatın filmde margarine hepsinin geçtiği varsayılsa dahi, bu oranın altında kalmaktadır.

Bizim çalışmamızda da özellikle kekik ve defne esansiyel yağlarını birlikte içeren zein filmin margarine uygulanmasında; zaman içerisinde antifungal etkinin arttığı tespit edilmiştir.

Antimikrobiyal olarak potasyum sorbat içeren zein filmin margarin uygulamalarında, antifungal etki çok daha hızlı gerçekleşmiş, depolamanın daha 30. gününde gelişime rastlanmamıştır. Bu da bize potasyum sorbatın, kekik ve defne esansiyel yağlarına göre zein filmde daha hızlı difüze olduğunun bir göstergesidir. Film solüsyonuna eklenen maddelerin polar veya apolar olması, molekül ağırlıkları ve kimyasal yapıları filmin özelliklerini etkileme derecesini belirlemektedir (Çağrı-Mehmetoğlu 2010). Antimikrobiyallerin film diskinde difüzyonu, difüze olan molekülün boyut, şekil, kimyasal yapısına ve polaritesine bağlı olduğu gibi, moleküler çapraz bağlanma derecesine de bağlıdır. Difüze olan molekülün düz, dallı, halkalı gibi şekillerde olması da difüzyon hızını etkileyebilir. Çağrı ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada, peynir altı suyu proteini izolatu zincirlerine sorbik asitin, benzen halkasına sahip olan p-aminobenzoik asitten daha kolay nüfuz ettiğini belirtmişlerdir. Ayrıca sorbik asit ve p-aminobenzoik asit gibi katkıların filmdeki paketleme zincirini zayıflatarak daha gevşek bir yapı oluşturduğunu bunun da su hareketliliğini arttırdığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda kullanılan ve sorbik asitin potasyum tuzu olan, potasyum sorbatın da zein film yapısında daha gevşek bir yapı oluşturarak hızlı bir şekilde difüze olduğu, depolamanın daha 15. gününde koloni sayısının 275 ± 263 kob/7,5 cm³ düşmesinden ve 60. günden itibaren ise gelişim gözlenmemesinden anlaşılmaktadır.

4.10.4. Serbest yağ asitleri tayini

Depolama süresince margarin gruplarına ait serbest asitlik değerleri (% oleik asit) %0,04-0,71 arasında değişmektedir (Çizelge 4.13., Şekil 4.8.). Sonuçlara ilişkin varyans analiz tablosu Ek 7'de verilmiştir. Ana muamele etkisi olarak uygulamaların 0. günden 180. güne kadar olan depolama periyodu süresince serbest yağ asitliği değerine etkisi 0 ve 30. günlerde istatistiki olarak önemli olmazken, diğer günlerdeki etkisi istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P < 0,05$). Depolamanın 45, 60, 135. günlerinde, *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilerek, %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulamasının yapıldığı margarinlerde tespit edilen serbest yağ asitliği değeri diğer uygulamalardan önemli seviyede yüksek bulunurken ($P < 0,05$), 105. ve 120. günlerinde, *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilerek, %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin grubu ve kontamine edilmemiş, film uygulanmamış margarin gruplarında belirlenen serbest yağ asitliği değerleri, kontaminasyon yapılmış fakat film uygulanmamış, hiçbir madde içermeyen çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış, %1,6 (v/w) kekik ve %1,6 (v/w) defne esansiyel yağını birlikte içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulaması yapılmış margarin gruplarına göre istatistiki olarak önemli

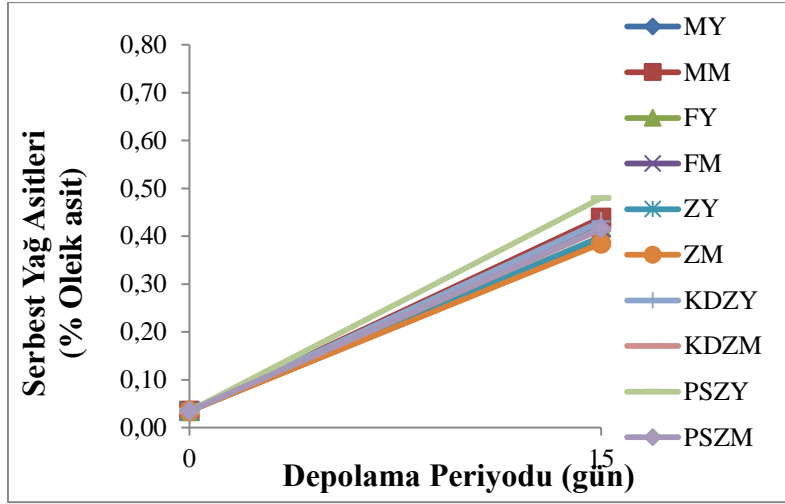
Çizelge 4.13. Depolama periyodu boyunca margarin gruplarının serbest asitlik değerlerine ait ortalamaları (% oleik asit)

	Depolama Periyodu (gün)											
	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	180
Uygulama												
M	0,04±0,00	0,41±0,01	0,53±0,02	0,49±0,02 ^b	0,52±0,01 ^{bc}	0,61±0,02	0,52±0,01	0,62±0,01 ^a	0,61±0,01 ^a	0,59±0,01 ^{ab}	0,58±0,01	0,61±0,01
F	0,04±0,00	0,42±0,00	0,48±0,01	0,54±0,02 ^{ab}	0,56±0,01 ^{ab}	0,57±0,01	0,54±0,01	0,55±0,01 ^b	0,56±0,01 ^b	0,54±0,01 ^{cd}	0,56±0,01	0,58±0,01
Z	0,04±0,00	0,39±0,01	0,52±0,02	0,51±0,02 ^b	0,56±0,01 ^{ab}	0,53±0,00	0,56±0,03	0,55±0,01 ^b	0,57±0,02 ^b	0,57±0,02 ^{bc}	0,56±0,01	0,61±0,01
KDZ	0,04±0,00	0,42±0,01	0,47±0,01	0,50±0,01 ^b	0,51±0,01 ^c	0,57±0,01	0,58±0,03	0,54±0,01 ^b	0,57±0,01 ^b	0,53±0,02 ^d	0,54±0,02	0,59±0,01
PSZ	0,04±0,00	0,45±0,01	0,53±0,02	0,58±0,00 ^a	0,60±0,03 ^a	0,65±0,02	0,63±0,01	0,64±0,00 ^a	0,62±0,00 ^a	0,62±0,01 ^a	0,63±0,00	0,64±0,01
Bölge												
Y	0,04±0,00	0,42±0,00	0,52±0,01 ^a	0,52±0,02	0,55±0,01	0,61±0,01	0,59±0,01	0,60±0,01 ^a	0,61±0,00 ^a	0,59±0,01 ^a	0,59±0,00	0,63±0,01
M	0,04±0,00	0,41±0,01	0,49±0,01 ^b	0,53±0,01	0,55±0,01	0,56±0,01	0,54±0,01	0,56±0,01 ^b	0,56±0,01 ^b	0,55±0,01 ^b	0,56±0,00	0,58±0,01
Uygulama*Bölge												
MY	0,04±0,00	0,39±0,00 ^{de}	0,54±0,02	0,45±0,03	0,50±0,01	0,63±0,02 ^b	0,51±0,01 ^{cd}	0,65±0,00	0,62±0,01	0,59±0,02	0,59±0,01 ^{bc}	0,62±0,02 ^b
MM	0,04±0,00	0,44±0,01 ^b	0,52±0,04	0,52±0,01	0,55±0,02	0,58±0,01 ^{bcde}	0,54±0,01 ^{bc}	0,58±0,00	0,59±0,01	0,58±0,01	0,57±0,00 ^{cd}	0,60±0,00 ^{bc}
FY	0,04±0,00	0,42±0,01 ^{bcd}	0,49±0,01	0,57±0,03	0,58±0,01	0,59±0,02 ^{bcd}	0,56±0,01 ^b	0,56±0,02	0,57±0,01	0,56±0,00	0,56±0,01 ^d	0,60±0,01 ^{bc}
FM	0,04±0,00	0,42±0,01 ^{bcd}	0,48±0,02	0,52±0,00	0,54±0,02	0,55±0,01 ^{cde}	0,53±0,00 ^{bcd}	0,53±0,02	0,54±0,01	0,52±0,01	0,55±0,00 ^d	0,56±0,00 ^c
ZY	0,04±0,00	0,40±0,01 ^{cde}	0,56±0,01	0,50±0,00	0,57±0,02	0,53±0,01 ^e	0,64±0,01 ^a	0,58±0,00	0,61±0,00	0,59±0,03	0,57±0,01 ^{cd}	0,62±0,02 ^b
ZM	0,04±0,00	0,38±0,02 ^e	0,47±0,03	0,52±0,05	0,56±0,01	0,53±0,00 ^e	0,49±0,01 ^d	0,53±0,01	0,54±0,02	0,54±0,01	0,56±0,01 ^{cd}	0,60±0,00 ^{bc}
KDZY	0,04±0,00	0,43±0,01 ^{bc}	0,47±0,00	0,51±0,03	0,53±0,01	0,60±0,01 ^{bc}	0,64±0,01 ^a	0,54±0,01	0,59±0,02	0,57±0,01	0,58±0,00 ^{cd}	0,62±0,02 ^b
KDZM	0,04±0,00	0,41±0,01 ^{bcd}	0,46±0,02	0,49±0,01	0,50±0,02	0,54±0,01 ^{de}	0,51±0,01 ^{cd}	0,54±0,01	0,54±0,00	0,49±0,02	0,50±0,02 ^e	0,57±0,01 ^c
PSZY	0,04±0,00	0,48±0,01 ^a	0,56±0,03	0,55±0,01	0,61±0,04	0,71±0,03 ^a	0,61±0,02 ^a	0,68±0,01	0,64±0,01	0,63±0,01	0,66±0,01 ^a	0,71±0,01 ^a
PSZM	0,04±0,00	0,42±0,01 ^{bcd}	0,50±0,03	0,61±0,01	0,60±0,04	0,58±0,03 ^{bcd}	0,64±0,02 ^a	0,59±0,01	0,60±0,01	0,62±0,01	0,61±0,01 ^b	0,56±0,01 ^c

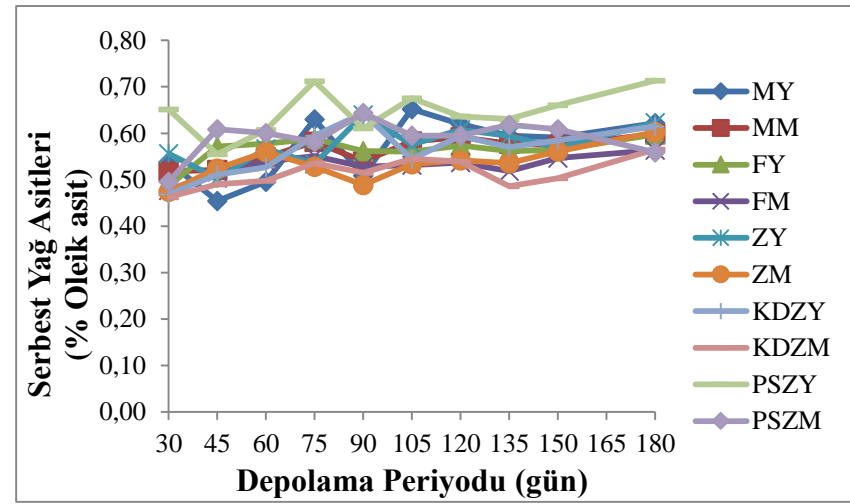
*: Ortalama ± standart hata (2 tekerrür, n=2)

^{a-e}: Aynı sütun içinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

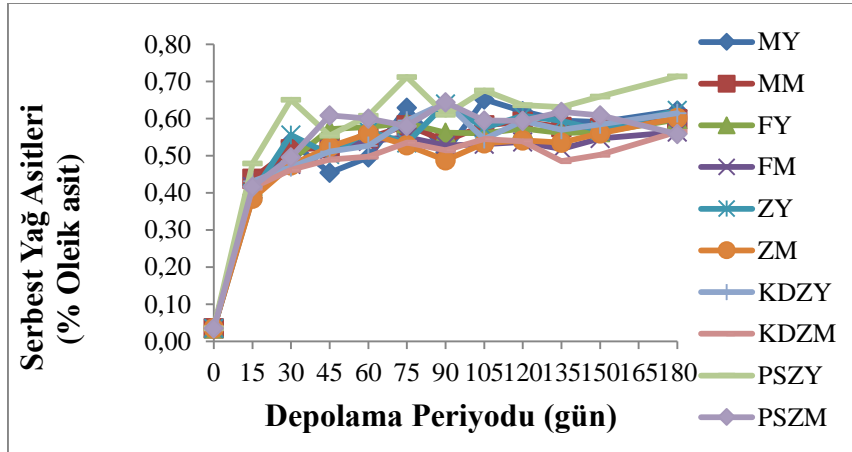
M: Kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış margarin F: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş fakat film uygulanmamış margarin Z: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve hiçbir madde içermeyen çözeltilerden elde edilen zein film uygulanmış margarin KDZ: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %1,6 kekik , %1,6 defne esansiyel yağlarını birlikte içeren çözeltilerden elde edilen zein film uygulanmış margarin PSZ: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltilerden elde edilen zein film uygulanmış margarin Y: Yüzey M: Merkez



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.8. Depolama periyodu boyunca margarin gruplarının, 0-15. günde serbest asitlik değerlerine ait ortalamaları (% oleik asit) (a), 30-180. günler arasındaki serbest asitlik değerlerine ait ortalamaları (% oleik asit) (b), 0-180. günler arasındaki serbest asitlik değerlerine ait ortalamaları (% oleik asit) (c).

derecede yüksek belirlenmiştir ($P<0,05$). Bununla birlikte, depolamanın 105 ve 120. günlerinde, *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilerek, %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış ve kontamine edilmemiş, film uygulanmamış margarin grupları ile kontaminasyon yapılmış fakat film uygulanmamış, hiçbir madde içermeyen çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış, %1,6 (v/w) kekik ve %1,6 (v/w) defne esansiyel yağını birlikte içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin gruplarının kendi aralarındaki farklılıklar önemsiz olmuştur ($P>0,05$).

Depolamanın 0, 45, 60. günleri hariç diğer günlerinde uygulamalar ile birlikte yüzey ve merkezin de istatistiki olarak önemi belirlenmiş ($P<0,05$) ve bu durum 15, 75, 90, 150, 180. günlerde serbest yağ asitliği değeri bakımından istatistiki olarak önemli farklılıklar olarak ortaya çıkmıştır ($P<0,05$). Bu günlerde serbest yağ asitliği değeri bakımından en yüksek değer 0,71 değeri ile *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin yüzeyi olarak adlandırılan PSZY interaksiyonunda görülürken, en düşük değer ise 0,38 değeri ile 15. günde, kontamine edilmiş ve hiçbir madde içermeyen çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin merkezi interaksiyon grubunda tespit edilmiştir.

Başlangıç periyodu ve son periyot değerlendirildiğinde, bütün gruplar içerisindeki en büyük artış PSZY örneklerinde gözlemlenmektedir. Örneklerin merkez ve yüzeyleri arasında bir değerlendirme yapılacak olursa; sapsular olmakla beraber kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış margarin grubu örnekleri dışındakilerde merkeze ait serbest yağ asitliği değerleri genel olarak biraz daha düşük çıkmıştır. Bütün margarin gruplarında serbest yağ asitliği değerlerindeki en büyük artış ilk 15 günün sonunda olmuştur. Depolama periyodunun geri kalan döneminde margarin gruplarında meydana gelen artışlar daha az düzeydedir. Üretimden çıkan margarinlerin, raf ömrü uygulaması için, öncelikle kapakları açılmış ve 4 grup *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiştir. Bu grupların üçüne film uygulamaları yapılmıştır. Geri kalan bir grup üretildiği şekliyle depolama sürecine katıldıysa da; şartların aynı olması amacıyla margarinlerin kapakları ve üzerlerinde bulunan folyo açılıp kapatılmıştır. Dolayısıyla 5 grup margarin de raf ömrü sürecine girmeden önce havayla temas etmekte durumunda kalmış ve oksidasyon oluşmaya başlamıştır. Oksidasyon bir kimyasal reaksiyonlar serisi olup, bu reaksiyonlar sonunda gliserit molekülleri parçalanarak serbest yağ asitleri oluşup, asiditeyi arttırabilir (Nas ve ark. 2001). İlk 15 gündeki hızlı artışın margarinin depolama sürecine girmeden önceki havayla temasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Depolama sürecinden önce, havayla temas sonrası 3 grup margarin örneklerinin yüzeyi farklı

içeriğe sahip zein filmle tamamen kaplandığı için depolama sürecinin geri kalan kısmında serbest yağ asitliği değerindeki artış azalmıştır. Sadece *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilen ancak herhangi bir film uygulaması olmayan FY grubunda tespit edilen serbest yağ asitlik değerinin daha yüksek olması beklenirken, sonuçlar diğer gruplarla benzerlik göstermiştir. Mikroorganizmalar solunum için oksijen isteyenler, az oksijen isteyenler, oksijen istemeyenler ile oksijenli ve oksijensiz ortamda gelişenler olarak 4 gruba ayrılırlar. Küfler, bakterilerin büyük bir bölümü oksijene gerek duyarlar ve oksijen olmadan gelişemezler. (Anonim 2014b). FY grubu margarinlerde *Aspergillus fumigatus*'un mevcut oksijeni kullandığı bu sebeple serbest yağ asitlik değerlerinde oluşabilecek artışı önlediği düşünülmektedir.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, kekik ve defne esansiyel yağlarını birlikte içeren zein film uygulaması yapılmış margarinlerin depolama sürecinin çoğunluğunda biraz daha düşük serbest asitlik değerine sahip olduğu görülse de, depolama sürecine genel olarak bakıldığında, içerisinde kekik ve defne esansiyel yağlarını birlikte bulunduran zein filmin, serbest yağ asitlerinin oluşumunu engellemede, hiçbir madde içermeyen zein filminden çok daha etkili olduğu sonucuna ulaşılammamaktadır.

Türk Standartları Enstitüsü, “Bitkisel Margarin Standardı” (TS 2812)'ye göre kahvaltılık margarininin % oleik asit cinsinden asitlik derecesi en fazla 1,5 olmalıdır (Başoğlu 2012). Grupların asitlik derecesi ölçümlerinin sonuçları altı aylık periyotta bu değeri aşmamıştır.

4.10.5. Peroksit sayısı tayini

Depolama süresince yapılan peroksit sayısı analizlerine ait değerler Çizelge 4.14.'de ve Şekil 4.9.'da verilmiş olup, değerlerin 0-20,57 meq O₂/kg yağ arasında değiştiği görülmektedir. Sonuçlara ilişkin varyans analiz tablosu Ek 8'de verilmiştir. Ana muamele etkisi olarak uygulamaların 0. günden 180. güne kadar olan depolama periyodu süresince uygulamaların peroksit sayısına etkisi 0, 45, 75, 105, 135 ve 180. günlerde istatistiki olarak önemli olmazken, 15, 30, 60, 90, 120 ve 150. günlerdeki etkisi istatistiki olarak önemli bulunmuştur (P<0,05). Depolama periyodunun 15. günündeki kontamine edilmemiş, film uygulanmamış ve kontaminasyon yapılmış fakat film uygulanmamış kase margarin uygulamalarının peroksit sayısı değeri, *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilerek, hiçbir madde içermeyen çözültiden elde edilen zein film, %1,6 (v/w) kekik ve

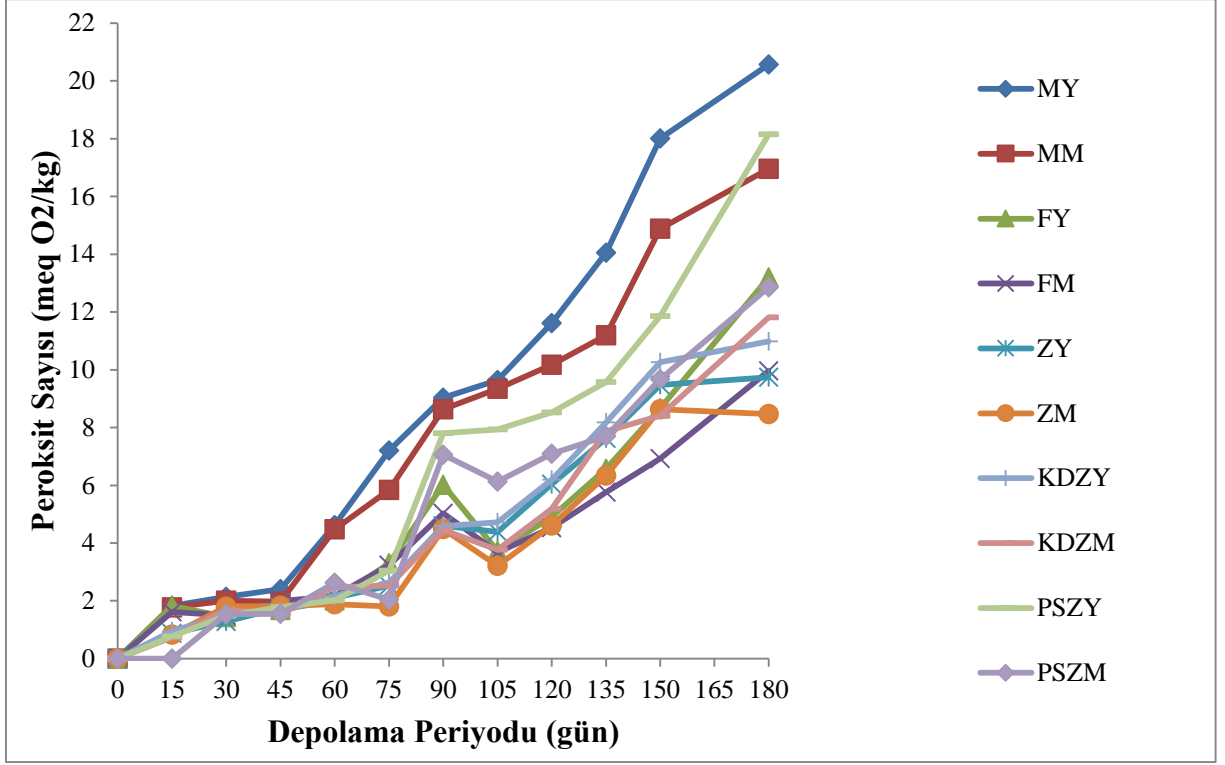
Çizelge 4.14. Depolama periyodu boyunca margarin gruplarının peroksit sayısına ait ortalamaları* (meq O₂/kg margarin)

Uygulama	Depolama Periyodu (gün)											
	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	180
M	0,00±0,00	1,80±0,10 ^a	2,07±0,15 ^a	2,19±0,18	4,55±0,16 ^a	6,52±0,32	8,83±0,26 ^a	9,49±0,31	10,89±0,39 ^a	12,62±0,62	16,45±0,62 ^a	18,76±0,72
F	0,00±0,00	1,72±0,11 ^a	1,47±0,09 ^b	1,84±0,18	2,09±0,08 ^b	3,27±0,05	5,53±0,23 ^c	3,7±0,10	4,73±0,14 ^d	6,16±0,17	7,79±0,37 ^d	11,58±0,67
Z	0,00±0,00	0,85±0,32 ^b	1,54±0,15 ^b	1,80±0,09	2,00±0,16 ^b	2,17±0,19	4,55±0,13 ^d	3,8±0,24	5,33±0,30 ^c	6,98±0,29	9,05±0,31 ^c	9,10±0,30
KDZ	0,00±0,00	0,85±0,33 ^b	1,60±0,14 ^b	1,60±0,07	2,32±0,10 ^b	2,58±0,06	4,52±0,11 ^d	4,24±0,22	5,69±0,26 ^c	8,03±0,09	9,34±0,58 ^c	11,4±0,48
PSZ	0,00±0,00	0,39±0,25 ^b	1,51±0,13 ^b	1,67±0,17	2,32±0,13 ^b	2,54±0,19	7,43±0,34 ^b	7,04±0,35	7,81±0,30 ^b	8,64±0,37	10,76±0,53 ^b	15,51±1,01
Bölge												
Y	0,00±0,00	1,25±0,20	1,57±0,11	1,86±0,10	2,58±0,24	3,74±0,40	6,41±0,43 ^a	6,08±0,54	7,46±0,55 ^a	9,2±0,61	11,65±0,78 ^a	14,53±0,97
M	0,00±0,00	0,99±0,19	1,70±0,08	1,78±0,10	2,72±0,22	3,09±0,34	5,93±0,39 ^b	5,23±0,54	6,32±0,51 ^b	7,77±0,45	9,71±0,67 ^b	12,01±0,68
Uygulama*Bölge												
MY	0,00±0,00	1,83±0,17	2,13±0,22	2,40±0,14	4,62±0,20	7,20±0,20 ^a	9,03±0,40	9,64±0,46 ^a	11,61±0,24	14,06±0,44 ^a	18,01±0,11	20,57±0,21 ^a
MM	0,00±0,00	1,77±0,13	2,00±0,23	1,97±0,32	4,47±0,26	5,84±0,34 ^b	8,63±0,36	9,34±0,48 ^a	10,17±0,56	11,19±0,48 ^b	14,89±0,40	16,95±0,42 ^b
FY	0,00±0,00	1,82±0,22	1,44±0,17	1,69±0,23	2,02±0,10	3,30±0,09 ^c	6,01±0,26	3,72±0,19 ^{ef}	4,91±0,18	6,57±0,16 ^e	8,66±0,15	13,19±0,47 ^c
FM	0,00±0,00	1,62±0,04	1,49±0,11	1,99±0,28	2,16±0,13	3,23±0,05 ^c	5,04±0,17	3,68±0,13 ^{ef}	4,54±0,17	5,76±0,03 ^f	6,93±0,32	9,96±0,36 ^f
ZY	0,00±0,00	0,88±0,51	1,29±0,20	1,76±0,14	2,11±0,31	2,53±0,08 ^{ef}	4,60±0,22	4,39±0,13 ^{de}	6,04±0,17	7,63±0,15 ^d	9,48±0,23	9,74±0,13 ^f
ZM	0,00±0,00	0,83±0,48	1,79±0,16	1,83±0,12	1,88±0,13	1,81±0,27 ^e	4,49±0,17	3,22±0,16 ^f	4,61±0,22	6,33±0,28 ^{ef}	8,63±0,54	8,47±0,36 ^e
KDZY	0,00±0,00	0,95±0,56	1,52±0,13	1,64±0,06	2,17±0,05	2,64±0,09 ^{de}	4,59±0,19	4,72±0,19 ^d	6,19±0,30	8,18±0,06 ^d	10,26±0,45	10,68±0,86 ^{ef}
KDZM	0,00±0,00	0,74±0,43	1,68±0,27	1,55±0,14	2,47±0,18	2,53±0,08 ^{ef}	4,45±0,14	3,77±0,21 ^{ef}	5,19±0,22	7,87±0,15 ^d	8,42±0,9	11,81±0,49 ^{de}
PSZY	0,00±0,00	0,78±0,45	1,48±0,29	1,78±0,26	2,01±0,10	3,05±0,07 ^{cd}	7,80±1,63	7,94±0,08 ^b	8,53±0,14	9,58±0,17 ^c	11,85±0,42	18,15±0,22 ^b
PSZM	0,00±0,00	0,00±0,00	1,54±0,04	1,56±0,25	2,63±0,10	2,04±0,04 ^{fg}	7,06±0,24	6,13±0,11 ^c	7,09±0,23	7,70±0,16 ^d	9,67±0,56	12,86±0,22 ^{cd}

*: Ortalama ± standart hata (2 tekerrür, n=2)

^{a-g}: Aynı sütun içinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

M: Kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış margarin F: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş fakat film uygulanmamış margarin Z: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve hiçbir madde içermeyen çözeltilerden elde edilen zein film uygulanmış margarin KDZ: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %1,6 kekik , %1,6 defne esansiyel yağlarını birlikte içeren çözeltilerden elde edilen zein film uygulanmış margarin PSZ: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltilerden elde edilen zein film uygulanmış margarin Y: Yüzey M: Merkez



Şekil 4.9. Depolama periyodu boyunca margarin gruplarının peroksit sayısına ait ortalamaları (meq O₂/kg margarin)

%1,6 (v/w) defne esansiyel yağını birlikte içeren çözeltiden elde edilen zein film ve %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin gruplarından önemli seviyede yüksek bulunmuştur ($P < 0,05$). Bununla birlikte, kontamine edilmemiş, film uygulanmamış ve kontaminasyon yapılarak film uygulanmamış margarin grubu uygulamaları ile *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilerek, hiçbir madde içermeyen çözeltiden elde edilen zein film, %1,6 (v/w) kekik ve %1,6 (v/w) defne esansiyel yağını birlikte içeren çözeltiden elde edilen zein film ve %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin gruplarının kendi aralarındaki farklılıklar önemsiz olmuştur ($P > 0,05$).

Depolamanın 30. ve 60. gününde, kontamine edilmemiş, film uygulanmamış margarin uygulamasının peroksit sayısı değeri diğer 4 uygulamaya göre önemli seviyede yüksek tespit edilirken ($P < 0,05$), 90. günden itibaren 180. güne kadar tespit edilen peroksit sayıları incelendiğinde, *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilen margarinlere yapılan %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulaması ile kontaminasyon yapılmış fakat film uygulanmamış, hiçbir madde içermeyen çözeltiden elde edilen zein film

uygulanmış, % 1,6 (v/w) kekik ve % 1,6 (v/w) defne esansiyel yağını birlikte içeren çözeltilerden elde edilen zein film uygulanmış margarin grupları arasında da önemli seviyede fark olduğu görülmektedir ($P<0,05$). *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilerek, % 1,6 (v/w) kekik ve % 1,6 (v/w) defne esansiyel yağını birlikte içeren çözeltilerden elde edilen zein film ve hiçbir madde içermeyen çözeltilerden elde edilen zein film uygulanmış margarin grupları ise genel olarak benzerlik göstermiştir. Depolamanın 75. günü itibari ile uygulamalar ile birlikte yüzey ve merkezin de istatistiki olarak önemi belirlenmiş ($P<0,05$) ve bu durum 75. 105. 135. ve 180. günlerde peroksit sayıları bakımından interaksiyon grupları arasındaki istatistiki olarak önemli farklılıklar şeklinde ortaya çıkmıştır ($P<0,05$). Bu günlerde peroksit sayısı bakımından en yüksek değer kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış margarin yüzeyi interaksiyonunda görülürken en düşük peroksit sayısı değeri ise kontamine edilmiş ve hiçbir madde içermeyen çözeltilerden elde edilen zein film uygulanmış margarin merkezi interaksiyon grubunda görülmüştür.

Başlangıç periyodu ve son periyot değerlendirildiğinde, bütün gruplar içerisinde peroksit sayısındaki en büyük artış kontamine edilmemiş margarinlerde tespit edilmiştir.

Depolama periyodu sonunda peroksit sayısı değerleri kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış margarin grubu yüzeyi için $20,57\pm 0,43$ meq O_2/kg yağ, kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış margarin grubu merkezi için ise $16,5\pm 0,84$ meq O_2/kg yağ olarak bulunmuştur.

Sonuçlardan da görüleceği üzere tüm film uygulaması yapılmış margarinler, kontamine edilmemiş margarinlerden daha düşük peroksit değerlerine sahiptir. Ancak kekik ve defne esansiyel yağlarını içeren filmlerin uygulandığı margarin örnekleri ile sade zein filmin uygulandığı margarin örneklerindeki peroksit değerleri benzerlik gösterirken, potasyum sorbat içeren filmlerin uygulandığı margarin değerlerine ait peroksit değerleri biraz daha yüksek bulunmuştur. Protein ve peptitlerin antioksidan aktiviteleri ile hidrofobisiteleri arasında yakın bir ilişki olduğu da bildirilmektedir. Örneğin, hidrofobik protein olan zeinin, antioksidan aktivitesinin doymamış lipitlere bağlanma özelliğine dayandırıldığından bahsedilmektedir (Arcan ve Yemenicioğlu 2007). Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda kullanılan zeinden yapılmış olan yenilebilir filmin zaten bir antioksidan özelliği mevcuttur. Ayrıca zein filmin, margarinin üzerine tamamen kapatılmasıyla, örneklerin havayla temasını kesmesi, böylece oksidasyon derecesini azaltması da mümkündür. Ancak potasyum sorbat içeren zein filmlerin uygulandığı margarin değerlerine ait peroksit değerlerinin biraz daha

yüksek olması, potasyum sorbatın bu filmlerin geçirgenliğini bir miktar arttırdığının bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Film solüsyonuna eklenen maddelerin polar veya apolar olması, molekül ağırlıkları ve kimyasal yapıları filmin özelliklerini etkileme derecesini belirlemektedir (Çağrı-Mehmetoğlu 2010). Filme elastikiyet özelliği kazandırmak için eklenen plastikleştirici maddelerin filmin geçirgenliğini olumsuz yönde etkilediği bildirilmekte, kullanılan plastikleştirici maddenin miktarının artması ve molekül ağırlığının yükselmesiyle birlikte filmin bariyer özelliğinin ve çekme geriliminin düştüğünden bahsedilmektedir (Çağrı-Mehmetoğlu2010).

Filme antimikrobiyal özellik kazandırmak amacıyla koyulan potasyum sorbat ise adeta bir plastikleştirici gibi davranmış ve %164 uzama yüzdesiyle filmin elastikiyetini kayda değer bir şekilde arttırmıştır. Bu durum filmin oksijen geçirgenliğini olumsuz etkilemiş ve hiçbir madde içermeyen zein filmlerin margarine uygulanmaları sonucu elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında, peroksit sayısında artışa yol açmıştır. Cagri ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada, peynir altı suyu protein bazlı film içerisindeki sorbik asit konsantrasyonunun %0'dan %1,5'a arttırıldığında, uzama yüzdesinin %6,37'den %74,28'e arttığını, gerilme direncinin ise azaldığını görmüşlerdir. Sorbik asidin düz zincir şeklindeki yapısının peynir altı suyu protein bazlı film zincirlerine sızarak, protein zincirleri arasında hareketlilik sağladığını böylece daha esnek yapıda ve daha düşük düzeyde gerilme direncine sahip filmler oluşturduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca sorbik asit gibi katkıların filmdeki paketleme zincirini zayıflatarak, daha gevşek bir yapı oluşturduğunu böylece su geçiş hareketini arttırdığını bildirmişlerdir. Sayanjali ve ark. (2011) ise karboksi metil selüloz filmlere eklenen potasyum sorbatın, filmin polimer yapı bağlarında azalmaya sebep olduğunu belirterek, film çözeltisi içerisindeki potasyum sorbat içeriğinin %3'e (w/v) çıkmasıyla uzamanın %6,61'den %28,82'ye arttığını tespit etmişlerdir.

Elde edilen sonuçlardan görüldüğü üzere; sadece kontaminasyon yapılmış fakat film uygulanmamış kase margarin örneklerinin peroksit değerlerinde de depolama süresince kontamine edilmemiş margarinlere göre düşüş gözlenmiştir. Depolama sonunda kontamine edilmiş fakat film uygulanmamış margarin yüzeyi grubunun peroksit sayısı değeri 13,19 meq O₂/kg olarak tespit edilirken, kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış margarin grubu yüzeyi örneklerinin peroksit değeri 20,57 meq O₂/kg olarak bulunmuştur. Küfler gibi bazı mikroorganizmalar büyümek için oksijene gerek duyarlar (Günerhan 2007). Küflenmeyi engelleyebilmek için gıda maddelerinin hava ile temas etmeyecek şekilde ambalajlanmaları gerektiğinden bahsedilmektedir (Anonim 2014a). Kontaminasyon yapılmış fakat film

uygulanmamış margarin gruplarında depolama sürecine girmeden önce, *Aspergillus fumigatus* ile kontamine edilmek için, kapakları ve kapak altında bulunan folyo açılmak suretiyle hava ile temas edilmiş ve daha sonra kapakları kapatılmıştır. Bu gruba ait peroksit sayısı değerlerinin düşük olması, ortamda kalan oksijeninin küfler tarafından kullanıldığının ve böylece oksijenin elimine olduğunun bir göstergesi olabilir.

Örneklerin merkez ve yüzeyleri arasında bir değerlendirme yapılacak olursa; serbest asitlik değerlerinde olduğu gibi, bazı sapmalar dışında merkeze ait peroksit sayısı değerleri genel olarak daha düşük çıkmıştır. Daha önce de belirtildiği üzere üretimden çıkan margarinlerin, raf ömrü uygulaması için, öncelikle kapakları açılmıştır. Dolayısıyla 5 grup margarinde raf ömrü sürecine girmeden önce havayla temas etmek durumunda kalmıştır. Yağ ve yağ içeren gıdalar hava oksijeninin etkisiyle oksidasyona uğramaktadırlar (Çakmakçı ve Gökalp 1992). Sonuç olarak oksijenle temas sonucunda margarinin yüzeyinde meydana gelen peroksit yapısındaki ürünlerin miktarı merkeze göre fazla olmuş, peroksit sayısı değerleri de merkeze göre yüksek tespit edilmiştir.

Türk Standartları Enstitüsü, “Bitkisel Margarin Standardı” (TS 2812)’ye göre kahvaltılık margarininin peroksit miktarı, miliekivalant peroksit/1000 g numune, en çok 5 olarak verilmektedir (Başoğlu 2012).

Kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış margarin yüzeyi, kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış margarin merkezi interaksiyon grupları 5 değerini 75. günde aşarken, *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş fakat film uygulanmamış margarin yüzeyi, kontamine edilmiş fakat film uygulanmamış margarin merkezi, kontamine edilmiş ve %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin yüzeyi, kontamine edilmiş ve %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin merkezi interaksiyon grupları 90. günde bu değeri geçmiştir. *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve hiçbir madde içermeyen çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin yüzeyi, kontamine edilmiş ve %1,6 kekik, %1,6 defne esansiyel yağlarını birlikte içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin yüzeyi, kontamine edilmiş ve %1,6 kekik, %1,6 defne esansiyel yağlarını birlikte içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin merkezi interaksiyon grubu margarinler 120. günde, kontamine edilmiş ve hiçbir madde içermeyen çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin merkezi interaksiyon grubu ise 135. günde 5 değerinin üzerine çıkmıştır. 5 farklı uygulamaya sahip margarinlerin de depolama sürecine girmeden önce hava

ile temas ettiği göz önüne alınırsa kontamine edilmemiş, film uygulanmamış ve kontamine edilerek filmle kaplanmamış gruba uygulamalarda gıdanın yüzeyini tamamen kaplayan bir film bulunmadığından margarin yüzeyinin oksijenle teması yüzeyde oluşan peroksit ürünlerinin süresini kısaltmıştır. *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilerek, zein filmle yada kekik ve defne esansiyel yağlarını birlikte içeren zein filmle kaplanmış örneklerin, kontamine edilmemiş ve filmle kaplanmamış örneklere ve kontamine edilerek filmle kaplanmamış örneklere göre 1,5 ay daha fazla süre peroksit sayısı limitini geçmediği hatta margarinin raf ömrü olan 4 ayı tamamladığı görülmüştür. Yağ oksidasyonu başlangıç fazı ve üstel faz olmak üzere iki belirgin faz halinde devam eder. Normalde düşük hızda olan başlangıç fazı geçildiğinde oksidasyon üstel olarak artmaktadır. Bu sebeple yağ üstel fazda hızla bozulmaktadır. Başlangıç fazı yağın raf ömrünün veya oksidatif stabilitesinin ana göstergesidir. Daha uzun başlangıç fazlı yağ ürünleri daha uzun raf ömrüne de sahiptir. Antioksidanlar ise başlangıç periyodunu uzatır ama oluşan oksidasyonu tam olarak durduramaz (Nas ve ark. 2001). Daha öncede bahsedildiği üzere; zaten antioksidan yapıda olan zein filmin bu özelliğiyle birlikte, örneklerin havayla temasını kestiği böylece oksidasyon derecesini azalttığı düşünüldüğünde; zein film ve kekik ve defne esansiyel yağlarını birlikte içeren zein filmlerle kaplanmış olan örneklerde, margarinde oluşan başlangıç fazı süresinin uzadığı direkt olarak fark edilmiştir. Potasyum sorbat içeren filmlerde ise potasyum sorbatın filmin yapısını değiştirerek, oksijen geçirgenliğini olumsuz etkilemesinden dolayı peroksit sayısında artış olduğu düşünülmektedir

Protein ve peptidlerin hidrofobisiteleri ve antioksidan aktiviteleri arasında yakın bir ilişki olduğu bildirilmektedir. Örneğin hidrofobik bir protein olan zeinin antioksidan aktivitesi doymamış lipitlere bağlanma ve gizleme kabiliyetine dayandırılmaktadır (Arcan ve Yemenicioğlu 2007). Bu bağlamda zein filmlerin de kendilerine özgü antioksidan aktivitesine sahip olabilecekleri düşünülmektedir. Sonuçlar da bu düşünceleri destekleyici yöndedir.

% 1,6 kekik (v/w) ve % 1,6 defne (v/w) esansiyel yağlarını içeren çözeltilerden elde edilen zein film, margarinde bulunan *A. fumigatus* inhibisyonunu sağlamada çok başarılı olurken; oksidasyonu engellemede daha da iyi sonuçların eldesinde zein filmin elde edildiği çözelti içerisindeki yüzdesini bir miktar arttırmanın uygun olabileceği düşüncesine ulaşılmıştır.

Nitekim; Koldal (2008) yaptığı çalışmada; % 5 oranında *Thymus vulgaris* L. esansiyel yağını içeren film çözeltisinden elde edilen soya proteini izolatları filmini uyguladığı

kıymalarda 12 günlük süreçte; peroksit sayısı değerlerinde dalgalanmalar olduğu görülmüştür. 10. günde kontrol grubuna göre *Thymus vulgaris* L. esansiyel yağını içeren filmlerde 2,46 değerinde düşüş gözlenirken, 12. günde 0,11'lik bir azalma tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, film içerisindeki kekik ve defne esansiyel yağı oranı düşük tutulmasına rağmen, *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilerek, %1,6 (v/w) kekik ve %1,6 (v/w) defne esansiyel yağını birlikte içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin grubunun depolama periyodu süresince peroksit sayısı değerleri, kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış uygulama grubununkiyle karşılaştırıldığında aradaki farkın önemli seviyede düşük olduğu görülmektedir ($P<0,05$).

4.10.6. Yağ asidi kompozisyonu tayini

Denemelerde kullanılan margarinin başlangıçtaki yağ asidi bileşimi olan 0. gün değerleri ve farklı uygulamalara tabi tutulan margarin örneklerinin depolama periyodunun 90. gününe ait % yağ asidi kompozisyonları, Çizelge 4.15.'de verilmiştir. Ayrıca depolama periyodu sonu olan 180. gün yağ asidi kompozisyona ait değerler ise Çizelge 4.16.'da verilmektedir. Sonuçlara ilişkin varyans analiz tablosu Ek 9 ve Ek 10'da verilmiştir.

Ana muamele etkisi olarak uygulamaların yağ asidi kompozisyonuna etkileri incelendiğinde, depolamanın 90. gününde, C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C18:2 CIS, C18:3 CIS, C22:0, Diğerleri, SAFA, MUFA, PUFA, Omega 3, Omega 6, MUFA+PUFA yağ asitlerinde uygulamalar arası farklılıkların önemli olduğu belirlenirken ($P<0,05$), C12:0, C14:0, C16:0, C18:1 CIS, C18:2 CIS, SAFA, MUFA, PUFA, Omega 6, MUFA+PUFA yağ asitlerinde ise bölgeler arası farklılıklar önemli bulunmuştur. Depolamanın 90. gününde yağ asitleri kompozisyonu bakımından interaksiyon grupları arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemli olmamıştır ($P>0,05$). Depolamanın 180. gününe gelindiğinde uygulamalar arasında, C14:0, C16:0, C18:1 CIS, C18:2 CIS, Omega 6 yağ asitlerinde istatistiki olarak farklılıklar tespit edilmiş olup, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C18:1 CIS, C18:2 CIS, C 22, Diğerleri, SAFA, PUFA, Omega 6 yağ asitlerinde bölgeler arası farklılıklar görülmüştür. Deneysel çalışmalarımızda daha öncede belirtildiği gibi, 5 farklı margarin uygulamasının, her birinin yüzey ve merkezinden olmak üzere örnekler alınmış ve bunların deney sonuçları Uygulama*Bölge interaksiyonu adı altında verilmiştir. Bu interaksiyonların hiçbirinde yağ asitleri grupları arasında istatistiki olarak farklılıklar önemli olmamıştır ($P>0,05$).

Çizelge 4.15. Margarinin 0. güne ve margarin gruplarının 90. güne ait yağ asidi kompozisyonu (%)

	Depolama Periyodu (Gün)	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1 CIS
		0	0,26±0,03	3,35±0,06	1,55±0,02	18,68±0,08	0,16±0,00	5,09±0,03
Margarin Uygulama								
M	90	0,25±0,01 ^a	3,33±0,01 ^a	1,54±0,01 ^{ab}	18,33±0,10 ^b	0,16±0,00	4,92±0,02 ^{bc}	31,92±0,04
F	90	0,23±0,00 ^{bc}	3,29±0,02 ^{ab}	1,53±0,01 ^b	18,39±0,11 ^b	0,14±0,02	5,06±0,09 ^{ab}	32,06±0,06
Z	90	0,25±0,01 ^{ab}	3,33±0,02 ^a	1,55±0,01 ^a	18,46±0,08 ^{ab}	0,16±0,00	4,90±0,02 ^c	31,84±0,05
KDZ	90	0,23±0,00 ^{bc}	3,34±0,01 ^a	1,55±0,01 ^a	18,46±0,09 ^{ab}	0,16±0,00	4,96±0,03 ^{bc}	31,96±0,06
PSZ	90	0,23±0,00 ^{bc}	3,25±0,03 ^b	1,52±0,01 ^b	18,70±0,12 ^a	0,15±0,00	5,17±0,04 ^a	31,93±0,11
Bölge								
Y	90	0,24±0,00	3,28±0,01 ^b	1,52±0,01 ^b	18,30±0,07 ^b	0,15±0,01	4,98±0,05	32,04±0,04 ^b
M	90	0,24±0,00	3,34±0,01 ^a	1,56±0,01 ^a	18,63±0,04 ^a	0,15±0,00	5,02±0,03	31,84±0,03 ^a
Uygulama*Bölge								
MY	90	0,26±0,01	3,30±0,01	1,52±0,01	18,10±0,09	0,17±0,00	4,88±0,03	32,00±0,03
MM	90	0,25±0,01	3,36±0,01	1,55±0,01	18,56±0,07	0,16±0,01	4,95±0,02	31,85±0,04
FY	90	0,23±0,00	3,27±0,01	1,51±0,01	18,32±0,24	0,12±0,04	5,10±0,19	32,17±0,08
FM	90	0,24±0,00	3,32±0,03	1,55±0,01	18,46±0,04	0,16±0,01	5,02±0,03	31,94±0,02
ZY	90	0,24±0,00	3,29±0,01	1,53±0,00	18,28±0,08	0,16±0,00	4,88±0,04	31,93±0,04
ZM	90	0,25±0,01	3,37±0,02	1,57±0,00	18,63±0,03	0,16±0,00	4,91±0,02	31,74±0,06
KDZY	90	0,23±0,00	3,32±0,02	1,54±0,01	18,25±0,08	0,16±0,01	4,91±0,03	32,09±0,05
KDZM	90	0,24±0,00	3,36±0,02	1,57±0,01	18,67±0,08	0,16±0,01	5,02±0,02	31,84±0,05
PSZY	90	0,22±0,01	3,23±0,06	1,50±0,02	18,55±0,19	0,15±0,00	5,13±0,07	32,02±0,17
PSZM	90	0,23±0,01	3,28±0,04	1,54±0,02	18,85±0,11	0,15±0,00	5,20±0,05	31,84±0,14

*: Ortalama ± standart hata (2 tekerrür, n=2)

^{a-c}: Aynı sütun içinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

¹: Doymuş yağ asitleri ²: Tekli doymamış yağ asitleri ³: Çoklu doymamış yağ asitleri

M: Kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış margarin F: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş fakat film uygulanmamış margarin Z: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve hiçbir madde içermeyen çözeltilerden elde edilen zein film uygulanmış margarin KDZ: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %1,6 kekik , %1,6 defne esansiyel yağlarını birlikte içeren çözeltilerden elde edilen zein film uygulanmış margarin PSZ: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltilerden elde edilen zein film uygulanmış margarin Y: Yüzey M: Merkez

Çizelge 4.15. Margarinin 0. güne ve margarin gruplarının 90. güne ait yağ asidi kompozisyonu (%) (Devamı)

	Depolama Periyodu (Gün)	Depolama Periyodu (Gün)							TOPLAM
		C18:2 CIS	C18:3 CIS	C20:0	C20:1	C22:0	Diğerleri		
Margarin Uygulama	0	36,40±0,08	1,77±0,08	0,33±0,11	0,30±0,10	0,21±0,12	0,00±0,00	99,76±0,01	
M	90	36,61±0,06 ^a	1,75±0,04 ^a	0,42±0,01	0,34±0,05	0,33±0,05 ^a	0,07±0,02 ^a	100±0,00	
F	90	36,62±0,06 ^a	1,65±0,01 ^b	0,36±0,05	0,34±0,05	0,32±0,05 ^a	0,02±0,01 ^b	100±0,00	
Z	90	36,59±0,07 ^a	1,69±0,01 ^{ab}	0,41±0,00	0,38±0,00	0,37±0,00 ^a	0,08±0,02 ^a	100±0,00	
KDZ	90	36,46±0,06 ^b	1,66±0,01 ^b	0,42±0,00	0,39±0,00	0,37±0,01 ^a	0,05±0,02 ^{ab}	100±0,00	
PSZ	90	36,52±0,08 ^{ab}	1,64±0,01 ^b	0,34±0,02	0,37±0,01	0,18±0,07 ^b	0,02±0,01 ^b	100±0,00	
Bölge									
Y	90	36,71±0,02 ^a	1,68±0,01	0,37±0,02	0,36±0,02	0,31±0,03	0,05±0,01	100±0,00	
M	90	36,41±0,03 ^b	1,68±0,02	0,40±0,01	0,36±0,02	0,31±0,03	0,04±0,01	100±0,00	
Uygulama*Bölge									
MY	90	36,75±0,05	1,73±0,02	0,41±0,00	0,39±0,00	0,38±0,01	0,12±0,01	100±0,00	
MM	90	36,48±0,04	1,78±0,09	0,42±0,01	0,28±0,09	0,27±0,09	0,03±0,03	100±0,00	
FY	90	36,75±0,05	1,65±0,01	0,31±0,10	0,29±0,10	0,27±0,09	0,01±0,01	100±0,00	
FM	90	36,49±0,07	1,66±0,01	0,41±0,00	0,39±0,00	0,37±0,00	0,02±0,02	100±0,00	
ZY	90	36,74±0,06	1,70±0,01	0,41±0,00	0,38±0,00	0,37±0,01	0,08±0,03	100±0,00	
ZM	90	36,43±0,03	1,69±0,01	0,41±0,00	0,38±0,00	0,38±0,00	0,08±0,03	100±0,00	
KDZY	90	36,61±0,03	1,68±0,02	0,42±0,00	0,39±0,00	0,37±0,01	0,06±0,04	100±0,00	
KDZM	90	36,31±0,06	1,64±0,00	0,42±0,00	0,38±0,00	0,37±0,01	0,05±0,04	100±0,00	
PSZY	90	36,71±0,06	1,65±0,01	0,32±0,03	0,36±0,01	0,18±0,10	0,00±0,00	100±0,00	
PSZM	90	36,34±0,05	1,64±0,01	0,35±0,03	0,37±0,01	0,18±0,10	0,03±0,02	100±0,00	

*: Ortalama ± standart hata (2 tekerrür, n=2) ^{a-c}: Aynı sütun içinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

¹: Doymuş yağ asitleri ²: Tekli doymamış yağ asitleri ³: Çoklu doymamış yağ asitleri

M: Kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış margarin F: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş fakat film uygulanmamış margarin Z: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve hiçbir madde içermeyen çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin KDZ: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %1,6 kekik, %1,6 defne esansiyel yağlarını birlikte içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin PSZ: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin Y: Yüzey M: Merkez

Cizelge 4.15. Margarinin 0. güne ve margarin gruplarının 90. güne ait yağ asidi kompozisyonu (%) (Devamı)

	Depolama Periyodu (Gün)	Yağ Asitleri					
		SAFA ¹	MUFA ²	PUFA ³	Omega 3	Omega 6	MUFA+PUFA
Margarin Uygulama	0	29,70±0,12	32,13±0,11	38,17±0,14	1,77±0,08	36,40±0,08	38,63±0,05
M	90	28,32±0,49 ^b	33,31±0,45 ^a	38,37±0,06 ^a	1,75±0,04 ^a	36,61±0,06 ^a	39,69±0,46 ^a
F	90	29,20±0,13 ^a	32,53±0,09 ^b	38,27±0,06 ^{ab}	1,65±0,01 ^b	36,62±0,06 ^a	38,75±0,09 ^b
Z	90	29,26±0,12 ^a	32,45±0,05 ^b	38,28±0,07 ^{ab}	1,69±0,01 ^{ab}	36,59±0,07 ^a	38,82±0,07 ^b
KDZ	90	29,36±0,14 ^a	32,52±0,07 ^b	38,12±0,07 ^c	1,66±0,10 ^b	36,46±0,06 ^b	38,66±0,07 ^b
PSZ	90	29,39±0,16 ^a	32,45±0,11 ^b	38,17±0,08 ^{bc}	1,64±0,01 ^b	36,52±0,08 ^{ab}	38,68±0,08 ^b
Bölge							
Y	90	28,78±0,19 ^b	32,83±0,17 ^a	38,39±0,03 ^a	1,68±0,01	36,71±0,02 ^a	39,13±0,18 ^a
M	90	29,43±0,12 ^a	32,48±0,11 ^b	38,09±0,03 ^b	1,68±0,02	36,41±0,03 ^b	38,70±0,11 ^b
Uygulama*Bölge							
MY	90	27,70±0,73	33,82±0,67	38,48±0,06	1,73±0,02	36,75±0,05	40,19±0,73
MM	90	28,94±0,57	32,80±0,58	38,26±0,06	1,78±0,09	36,48±0,04	39,18±0,52
FY	90	29,02±0,24	32,58±0,19	38,40±0,06	1,65±0,01	36,75±0,05	38,81±0,18
FM	90	29,37±0,08	32,49±0,01	38,14±0,07	1,66±0,01	36,49±0,07	38,69±0,06
ZY	90	29,01±0,13	32,55±0,07	38,44±0,06	1,70±0,01	36,74±0,06	38,98±0,06
ZM	90	29,52±0,07	32,36±0,04	38,12±0,03	1,69±0,01	36,43±0,03	38,66±0,03
KDZY	90	29,05±0,10	32,66±0,07	38,29±0,03	1,68±0,02	36,61±0,03	38,83±0,04
KDZM	90	29,68±0,12	32,38±0,06	37,95±0,06	1,64±0,00	36,31±0,06	38,49±0,06
PSZY	90	29,12±0,21	32,53±0,17	38,35±0,06	1,65±0,01	36,71±0,06	38,87±0,07
PSZM	90	29,65±0,16	32,36±0,14	37,98±0,05	1,64±0,01	36,34±0,05	38,50±0,05

*: Ortalama ± standart hata (2 tekerrür, n=2)

^{a-c}: Aynı sütun içinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

¹: Doymuş yağ asitleri ²: Tekli doymamış yağ asitleri ³: Çoklu doymamış yağ asitleri

M: Kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış margarin F: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş fakat film uygulanmamış margarin Z: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve hiçbir madde içermeyen çözültiden elde edilen zein film uygulanmış margarin KDZ: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %1,6 kekik, %1,6 defne esansiyel yağlarını birlikte içeren çözültiden elde edilen zein film uygulanmış margarin PSZ: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %3,5 potasyum sorbat içeren çözültiden elde edilen zein film uygulanmış margarin Y: Yüzey M: Merkez

Çizelge 4.16. Margarin gruplarının 180. güne ait yağ asidi kompozisyonu (%)

Uygulama	Depolama Periyodu (180. Gün)						
	Yağ Asitleri						
	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1 CIS
M	0,24±0,00	3,30±0,02	1,52±0,01 ^{ab}	17,93±0,1 ^{abc}	0,16±0,00	4,81±0,03	32,31±0,06 ^{ab}
F	0,24±0,00	3,29±0,03	1,50±0,02 ^{ab}	17,84±0,17 ^{bc}	0,16±0,00	4,78±0,03	32,27±0,1 ^{abc}
Z	0,23±0,00	3,30±0,02	1,53±0,01 ^a	18,16±0,11 ^a	0,16±0,00	4,87±0,05	32,16±0,06 ^{bc}
KDZ	0,24±0,01	3,32±0,02	1,53±0,01 ^a	18,07±0,10 ^{ab}	0,16±0,00	4,80±0,02	32,15±0,05 ^c
PSZ	0,24±0,00	3,29±0,03	1,50±0,01 ^b	17,71±0,13 ^c	0,16±0,00	4,75±0,03	32,35±0,08 ^a
Bölge							
Y	0,24±0,00	3,26±0,01 ^b	1,49±0,00 ^b	17,68±0,07 ^b	0,16±0,00	4,76±0,02 ^b	32,39±0,04 ^a
M	0,24±0,00	3,35±0,01 ^a	1,54±0,00 ^a	18,20±0,04 ^a	0,16±0,00	4,84±0,01 ^a	32,10±0,02 ^b
Uygulama*Bölge							
MY	0,24±0,00	3,32±0,03	1,50±0,01	17,70±0,11	0,16±0,01	4,79±0,05	32,44±0,08
MM	0,24±0,01	3,34±0,02	1,54±0,00	18,17±0,04	0,16±0,01	4,83±0,02	32,18±0,02
FY	0,23±0,01	3,23±0,05	1,46±0,03	17,48±0,20	0,16±0,01	4,71±0,03	32,46±0,13
FM	0,24±0,01	3,35±0,01	1,54±0,00	18,20±0,07	0,16±0,01	4,85±0,03	32,07±0,03
ZY	0,23±0,00	3,28±0,02	1,50±0,01	17,96±0,15	0,16±0,01	4,84±0,09	32,29±0,08
ZM	0,24±0,00	3,33±0,02	1,55±0,00	18,36±0,06	0,16±0,01	4,91±0,05	32,02±0,02
KDZY	0,24±0,00	3,29±0,03	1,51±0,01	17,86±0,11	0,16±0,01	4,78±0,04	32,25±0,06
KDZM	0,25±0,01	3,36±0,02	1,55±0,00	18,29±0,04	0,17±0,01	4,82±0,02	32,05±0,02
PSZY	0,24±0,01	3,24±0,02	1,47±0,01	17,42±0,12	0,16±0,00	4,67±0,02	32,50±0,10
PSZM	0,24±0,00	3,35±0,03	1,53±0,01	18,00±0,09	0,16±0,01	4,82±0,03	32,20±0,06

*: Ortalama ± standart hata (2 tekerrür, n=2)

^{a-c}: Aynı sütun içinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

¹: Doymuş yağ asitleri ²: Tekli doymamış yağ asitleri ³: Çoklu doymamış yağ asitleri

M: Kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış margarin F: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş fakat film uygulanmamış margarin Z: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve hiçbir madde içermeyen çözültiden elde edilen zein film uygulanmış margarin KDZ: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %1,6 kekik, %1,6 defne esansiyel yağlarını birlikte içeren çözültiden elde edilen zein film uygulanmış margarin PSZ: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %3,5 potasyum sorbat içeren çözültiden elde edilen zein film uygulanmış margarin Y: Yüzey M: Merkez

Çizelge 4.16. Margarin gruplarının 180. güne ait yağ asidi kompozisyonu (%) (Devamı)

Uygulama	Depolama Periyodu (180. Gün)						
	Yağ Asitleri						TOPLAM
	C18:2 CIS	C18:3 CIS	C20:0	C20:1	C22:0	Diğerleri	
M	36,88±0,09 ^{bc}	1,81±0,06	0,41±0,00	0,24±0,07	0,36±0,01	0,03±0,01	100±0,00
F	37,05±0,16 ^{ab}	1,83±0,07	0,40±0,00	0,28±0,06	0,32±0,05	0,04±0,01	100±0,00
Z	36,79±0,10 ^c	1,85±0,07	0,40±0,01	0,24±0,07	0,28±0,06	0,04±0,01	100±0,00
KDZ	36,80±0,10 ^c	1,77±0,06	0,41±0,00	0,39±0,00	0,37±0,00	0,08±0,02	100±0,00
PSZ	37,09±0,12 ^a	1,70±0,01	0,41±0,00	0,39±0,00	0,37±0,00	0,05±0,01	100±0,00
Bölge							
Y	37,17±0,06 ^a	1,82±0,04	0,40±0,00	0,29±0,04	0,31±0,03 ^b	0,03±0,01 ^b	100±0,00
M	36,67±0,03 ^b	1,76±0,04	0,41±0,00	0,29±0,04	0,37±0,00 ^a	0,07±0,01 ^a	100±0,00
Uygulama*Bölge							
MY	37,08±0,09	1,78±0,09	0,40±0,00	0,29±0,10	0,36±0,01	0,02±0,02	100±0,00
MM	36,68±0,02	1,85±0,10	0,41±0,00	0,20±0,11	0,36±0,01	0,06±0,02	100±0,00
FY	37,41±0,17	1,88±0,12	0,40±0,00	0,28±0,09	0,27±0,09	0,03±0,02	100±0,00
FM	36,69±0,06	1,78±0,09	0,41±0,00	0,29±0,10	0,37±0,00	0,05±0,02	100±0,00
ZY	37,00±0,11	1,87±0,09	0,38±0,02	0,28±0,09	0,19±0,11	0,02±0,02	100±0,00
ZM	36,58±0,05	1,83±0,11	0,41±0,00	0,19±0,11	0,37±0,00	0,06±0,00	100±0,00
KDZY	37,02±0,12	1,88±0,11	0,40±0,00	0,19±0,11	0,37±0,01	0,06±0,03	100±0,00
KDZM	36,59±0,04	1,67±0,01	0,41±0,00	0,39±0,00	0,38±0,00	0,10±0,02	100±0,00
PSZY	37,37±0,09	1,72±0,02	0,41±0,00	0,39±0,00	0,38±0,01	0,04±0,02	100±0,00
PSZM	36,81±0,07	1,68±0,01	0,41±0,00	0,38±0,00	0,37±0,00	0,06±0,01	100±0,00

*: Ortalama ± standart hata (2 tekerrür, n=2)

^{a-bc}: Aynı sütun içinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

¹: Doymuş yağ asitleri ²: Tekli doymamış yağ asitleri ³: Çoklu doymamış yağ asitleri

M: Kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış margarin F: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş fakat film uygulanmamış margarin Z: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve hiçbir madde içermeyen çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin KDZ: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %1,6 kekik, %1,6 defne esansiyel yağlarını birlikte içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin PSZ: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin Y: Yüzey M: Merkez

Çizelge 4.16. Margarin gruplarının 180. güne ait yağ asidi kompozisyonu (%) (Devamı)

	Depolama Periyodu (180. Gün)					
	Yağ Asitleri					
	SAFA ¹	MUFA ²	PUFA ³	Omega 3	Omega 6	MUFA+PUFA
Uygulama						
M	28,18±0,39	33,13±0,39	38,69±0,44	1,81±0,10	36,88±0,06 ^{bc}	39,50±0,09
F	28,40±0,28	32,72±0,28	38,88±0,11	1,83±0,21	37,05±0,07 ^{ab}	39,32±0,16
Z	28,80±0,17	32,56±0,17	38,64±0,10	1,85±0,10	36,79±0,07 ^c	39,04±0,1
KDZ	28,41±0,34	33,01±0,34	38,57±0,36	1,77±0,16	36,80±0,06 ^c	39,39±0,1
PSZ	28,29±0,20	32,92±0,20	38,78±0,08	1,70±0,12	37,09±0,01 ^a	39,33±0,12
Bölge						
Y	28,15±0,22 ^b	32,85±0,22	39,00±0,23 ^a	1,82±0,04	37,17±0,06 ^a	39,45±0,04
M	28,68±0,00 ^a	32,89±0,00	38,43±0,00 ^b	1,68±0,00	36,67±0,03 ^b	39,19±0,01
Uygulama*Bölge						
MY	28,26±0,16	32,89±0,14	38,85±0,14	1,78±0,09	37,08±0,09	39,30±0,09
MM	28,09±0,83	33,38±0,91	38,53±0,10	1,85±0,10	36,68±0,02	39,70±0,81
FY	27,81±0,37	32,90±0,13	39,29±0,28	1,88±0,12	37,41±0,17	39,73±0,24
FM	28,99±0,10	32,54±0,13	38,47±0,10	1,78±0,09	36,69±0,06	38,92±0,05
ZY	28,40±0,13	32,73±0,11	38,87±0,06	1,87±0,09	37,00±0,11	39,31±0,08
ZM	29,20±0,08	32,39±0,11	38,41±0,09	1,83±0,11	36,58±0,05	38,77±0,07
KDZY	28,45±0,14	32,65±0,08	38,90±0,21	1,88±0,11	37,02±0,12	39,27±0,12
KDZM	28,37±0,73	33,38±0,71	38,25±0,04	1,67±0,01	36,59±0,04	39,52±0,23
PSZY	27,83±0,16	33,08±0,08	39,09±0,08	1,72±0,02	37,37±0,09	39,64±0,08
PSZM	28,76±0,12	32,76±0,06	38,48±0,06	1,68±0,01	36,81±0,07	39,02±0,06

*: Ortalama ± standart hata (2 tekerrür, n=2)

^{a-bc}: Aynı sütun içinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

¹: Doymuş yağ asitleri ²: Tekli doymamış yağ asitleri ³: Çoklu doymamış yağ asitleri

M: Kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış margarin F: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş fakat film uygulanmamış margarin Z: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve hiçbir madde içermeyen çözültiden elde edilen zein film uygulanmış margarin KDZ: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %1,6 kekik, %1,6 defne esansiyel yağlarını birlikte içeren çözültiden elde edilen zein film uygulanmış margarin PSZ: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %3,5 potasyum sorbat içeren çözültiden elde edilen zein film uygulanmış margarin Y: Yüzey M: Merkez

4.10.7. Demir, bakır, nikel analizi

Margarinlerde üretim sonrası demir, bakır ve nikel analizi yapılmış olup sadece demire $0,18\pm 0,05$ ppm düzeyinde rastlanmıştır (Çizelge 4.17).

Yağlara kontamine olabilen nikel, demir ve özellikle de bakır güçlü prooksidantlardır. Yağın bakırla kontaminasyonu düşük bir ihtimal olmakla beraber, kontamine olduğu zaman ise hızla okside olur. Demirin yağa, işleme ekipmanları veya borulardan bulaşma ihtimali bulunmakta iken; nikel ise katalist olan nikelin hidrojenasyondan sonra tamamen uzaklaştırılmaması sonucu yağda kalabilir (Nas ve ark. 2001).

Çizelge 4.17. Margarinde tespit edilen demir, bakır, nikel miktarı*

Margarindeki Miktarları (ppm)		
Demir	Bakır	Nikel
0,18±0,05	-	-

*: Ortalama ± standart sapma

1 kg margarinde en çok 1,5 mg demir (Fe) bulunabileceği Başoğlu (2012)'de belirtilmiştir. Denemelerde kullanılan margarinde tespit edilen değer bu limitin altında bulunmaktadır.

4.10.8. Toplam fenolik madde tayini

Margarin grupları uygulamalarında 0, 90 ve 180. günlerde toplam fenolik madde ölçümü gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.18.). Sonuçlara ilişkin varyans analiz tablosu Ek 11'de verilmiştir. Depolamanın 90. gününde kontamine edilmemiş, film uygulanmamış margarin ve kontamine edilerek film uygulanmış margarin gruplarının toplam fenolik madde miktarında düşüşler gözlenmiştir. *A. fumigatus* ile kontamine edilerek, hiçbir madde içermeyen çözeltiden elde edilen zein film, %1,6 (v/w) kekik ve %1,6 (v/w) defne esansiyel yağını birlikte içeren çözeltiden elde edilen zein film, %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulamalarının yapıldığı margarinerin kendi aralarındaki farklılıklar ile kontamine edilmemiş, film uygulanmamış margarin grubu ve kontamine edilerek film uygulanmamış margarin gruplarının kendi aralarındaki farklılıklar önemsiz bulunurken

($P>0,05$), *A. fumigatus* ile kontamine edilerek, hiçbir madde içermeyen çözeltilerden elde edilen zein film, %1,6 (v/w) kekik ve %1,6 (v/w) defne esansiyel yağını birlikte içeren çözeltilerden elde edilen zein film, %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltilerden elde edilen zein film uygulamalarının yapıldığı margarinlerde tespit edilen toplam fenolik madde miktarı diğer iki uygulamaya göre önemli seviyede yüksek tespit edilmiştir ($P<0,05$). Depolama periyodunun bu döneminde margarinlerin bölgeler ve interaksiyon grupları arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur ($P>0,05$). Elde edilen sonuçlardan; fenolik madde miktarındaki en büyük artışın yüzey olarak *A. fumigatus* ile kontamine edilerek, %1,6 (v/w) kekik ve %1,6 (v/w) defne esansiyel yağını birlikte içeren çözeltilerden elde edilen zein film uygulanmış margarin grubunda olduğu, bunu sırasıyla *A. fumigatus* ile kontamine edilerek, %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltilerden elde edilen zein film, hiçbir madde içermeyen çözeltilerden elde edilen zein film uygulanmış margarin gruplarının takip ettiği görülmüştür.

Çizelge 4.18. Depolama periyodunun 0, 90 ve 180. günlerinde margarin gruplarında ölçülen gallik asit eşdeğeri olarak toplam fenolik madde miktarlarına ait ortalama değerleri* (mg/L)

Uygulama	Bölge	Uygulama*Bölge	Depolama Periyodu (gün)		
			0	90	180
M			35±1,89	32,50±2,50 ^b	13,63±1,65
F			35±1,89	33,80±1,83 ^b	31,13±2,09
Z			35±1,89	211,30±27,28 ^a	26,00±2,36
KDZ			35±1,89	251,30±21,91 ^a	63,63±11,8
PSZ			35±1,89	258,80±10,6 ^a	164,50±39,54
	Y		35±1,15	164,50±27,41	44,55±7,08
	M		35±1,15	150,50±23,56	75,00±22,26
		MY	35±2,89	30,00±4,08	12,50±2,60 ^e
		MM	35±2,89	35,00±2,89	14,75±2,25 ^{de}
		FY	35±2,89	32,50±2,50	29,00±2,31 ^{de}
		FM	35±2,89	35,00±2,89	33,25±3,48 ^{de}
		ZY	35±2,89	240,00±49,16	31,00±2,00 ^{de}
		ZM	35±2,89	182,50±22,5	21,00±2,31 ^{de}
		KDZY	35±2,89	270,00±35,36	87,75±7,17 ^b
		KDZM	35±2,89	232,50±27,50	39,50±14,5 ^{cd}
		PSZY	35±2,89	250,00±14,72	62,50±17,45 ^c
		PSZM	35±2,89	267,50±16,01	266,50±7,58 ^a

*: Ortalama ± standart hata (2 tekrür, n=2)

^{a-e}: Aynı sütun içinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($P<0,05$).

M: Kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış margarin F: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş fakat film uygulanmamış margarin Z: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve hiçbir madde içermeyen çözeltilerden elde edilen zein film uygulanmış margarin KDZ: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %1,6 kekik, %1,6 defne esansiyel yağlarını birlikte içeren çözeltilerden elde edilen zein film uygulanmış margarin PSZ: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltilerden elde edilen zein film uygulanmış margarin Y: Yüzey M: Merkez

Merkezde en büyük artış, *A. fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilerek, %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin grubunda tespit edilmiş olup, bunu sırayla *A. fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilerek, %1,6 (v/w) kekik ve %1,6 (v/w) defne esansiyel yağını birlikte içeren çözeltiden elde edilen zein film, hiçbir madde içermeyen çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin grupları izlemektedir. *A. fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilerek, hiçbir madde içermeyen çözeltiden elde edilen zein film ve %1,6 (v/w) kekik ve %1,6 (v/w) defne esansiyel yağını birlikte içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulamaları yapılmış margarinlerde ise yüzeyde ölçülen toplam fenolik madde miktarının merkezden daha fazla olduğu belirlenmiştir. Mısırın fenolik madde içeriğine sahip olduğu, Oğuz (2008) ve Diken (2009) yaptıkları çalışmada belirtilmiştir. Buradan bir mısır proteini olan zeinden elde edilen filmin de fenolik madde içerdiği sonucuna varılabilmektedir. Bu içeriğinde filmde margarin yüzeyine ve merkezine geçtiği, Çizelge 4.18'de belirtilen başlangıç ve 90. gün ölçümlerinde hiçbir madde içermeyen çözeltiden elde edilen zein film, %1,6 (v/w) kekik ve %1,6 (v/w) defne esansiyel yağını birlikte içeren çözeltiden elde edilen zein film ve %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulamalarının yapıldığı *A. fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş margarin gruplarının hem merkez hem de yüzeyinde belirlenen artıştan anlaşılmaktadır. Fenolik madde içeriği bakımından KDZY>ZY ve KDZM>ZM olduğu sonuçlardan anlaşılmaktadır. Buradan kekik ve defne esansiyel yağlarının içerdiği fenolik maddelerin margarin yüzey ve merkezinde meydana gelen artışa sebep olduğu düşünülmektedir. %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulama grubunda ise yüzey ve merkezde bulunan fenolik maddelerin hiçbir madde içermeyen çözeltiden elde edilen zein film uygulama grubundan fazla olduğu tespit edilmiştir. Sorbik asitin filmdeki paketleme zincirini zayıflatarak filmde daha gevşek bir yapı oluşturduğu bilinmektedir (Çağrı ve ark. 2001). Çalışmamızda zein filmin elastikiyetini kayda değer şekilde arttıran potasyum sorbatın, aynı etkiyi zein filmin yapısında da oluşturduğu bu sebeple yapısı değişen zein filmde margarine geçen fenolik madde miktarının daha yüksek seviyeye ulaşmış olabileceği düşünülmektedir. Film yapısında değişiklik yapan potasyum sorbatın aynı zamanda oksijen geçişini de arttırdığından yüzeydeki fenolik bileşikler parçalanmış olabileceği bu yüzden de yüzeydeki fenolik bileşiklerin miktarının merkezden düşük olduğu sonucuna varılmaktadır. Morelló ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada, yağların depolama boyunca toplam fenolik madde içeriğindeki düşüşün daha kompleks formda oluşan bozulma ve oksidasyon aktivitelerinin sonucu olduğunu belirtmişlerdir. Depolamanın 90. gününde, kontamine edilmemiş, film

uygulanmamış ve kontamine edilerek film uygulanmamış uygulama gruplarının yüzeyinde çok az miktarda düşüş gözlenirken, merkezlerinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir.

Depolamanın 180. günü itibari ile uygulamalar ile birlikte, bölgeler arası fark ve dolayısıyla interaksiyon grupları arasındaki farklılıklar da istatistiki olarak önemli tespit edilmiştir ($P<0,05$). Toplam fenolik madde bakımından en yüksek değer 266,50 mg/L ile *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin merkezi olarak adlandırılan PSZM interaksiyon grubunda görülürken, en düşük toplam fenolik madde miktarına sahip interaksiyon grubu 12,50 mg/L ile kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış margarin grubu yüzeyi olarak belirlenmiştir.

Depolama süreci sonunda; PSZM interaksiyon grubu hariç tüm gruplarda fenolik madde içeriğinde oldukça belirgin düşüşler gözlenmiştir. Del Caro ve ark. (2006), Bosana cv ekstra ham zeytinyağlarında depolama süresince fenolik madde içeriklerini ölçmüş. 16 aylık depolama sonrasında toplam fenoliklerin %40'ında aşağısında bir düşüşe uğradığı görülmüştür. Bu düşüşün literatürde belirtildiği üzere, bu bileşiklerin bozulma prosesinden ve oksidatif aktivitesinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Gómez-Alonso ve ark. (2007) ham zeytinyağlarının toplam fenolik bileşik içeriğinin depolama süresi boyunca azaldığını tespit etmişler buradan da uygun şartlarda bile fenolik bileşiklerin çok kararlı olmadıklarını bildirmişlerdir. Depolama sonunda fenolik madde içeriğinde, margarin gruplarında gözlenen azalma diğer çalışmalarla uyum içerisindedir. %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulamasında, potasyum sorbatın zein filmin yapısında gerçekleştirdiği düşünülen sebeplerden dolayı, depolama süreci boyunca filmde margarine fenolik madde geçişinin devam ettiği, bu sebeple merkezde düşüş gözlenmediği ancak yine film yapısında meydana gelen değişimin margarin yüzeyine oksijen geçişini artırmasından ötürü yüzeydeki fenolik madde miktarında azalma olduğu sonucuna varılmıştır.

4.10.9. Duyusal değerlendirme

Zein film ve kekik, defne esansiyel yağlarını birlikte içeren zein film uygulamalarının margarinin duyu özellikleri üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla depolamanın 180. gününde panelistler tarafından grupların görünüş, yapı, tat, koku gibi özellikleri değerlendirilmiş ve duyu değerlendirme sonuçları Çizelge 4.19'de verilmiştir. Sonuçlara ilişkin varyans analiz tablosu Ek 12'de verilmiştir. Yapılan duyu değerlendirmede, yapı, tat

ve koku bakımından panelistlerin fikirleri benzer olmakla beraber, görünüş bakımından biraz farklılık bulunmaktadır.

Çizelge 4.19. Depolama periyodunun 180. gününde margarin gruplarında yapılan duyuşal değerlendirme sonuçları*

Uygulama	Görünüş	Yapı	Tat	Koku
M	8,40±0,40 ^a	5,80±0,33 ^b	8,80±0,13 ^a	8,80±0,13 ^a
Z	2,50±0,40 ^b	8,40±0,40 ^a	1,10±0,10 ^b	1,80±0,39 ^b
KDZ	2,50±0,40 ^b	8,40±0,40 ^a	8,70±0,15 ^a	8,60±0,22 ^a

*: Ortalama ± standart hata (n=10)

^{a, b}: Aynı sütun içinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

M: Kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış margarin Z: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve hiçbir madde içermeyen çözültiden elde edilen zein film uygulanmış margarin KDZ: *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %1,6 kekik, %1,6 defne esansiyel yağlarını birlikte içeren çözültiden elde edilen zein film uygulanmış margarin

9-8: Çok iyi 7-6: İyi 5-4: Orta 3-2: Kötü 1: Çok kötü

Görünüş bakımından hiçbir madde içermeyen çözültiden elde edilen zein film ve %1,6 (v/w) kekik ve %1,6 (v/w) defne esansiyel yağını birlikte içeren çözültiden elde edilen zein film uygulama gruplarında filmin renginden de kaynaklanabileceği düşünölen koyu sarı renk oluşumu gözlenmiştir. Panelistlerden büyük bir kısmı bu görünüőün standardın dışında olduğunu ve tüketici de olumsuz etki yaratacağını düşünmektedir. Kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış uygulama grubunun aldığı puan diğerlerine göre istatistiki olarak önemli seviyede yüksek bulunmuştur (P<0,05).

Film uygulaması yapılan margarinlerin, yapısının daha iyi olduğu bildirilmektedir. Hiçbir madde içermeyen çözültiden elde edilen zein film ve %1,6 (v/w) kekik ve %1,6 (v/w) defne esansiyel yağını birlikte içeren çözültiden elde edilen zein film uygulama gruplarının yapı yönünden 8,40 puan alarak, kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış uygulama grubunu 5,80 puanla geride bırakmıştır (P<0,05). Filmin, margarinin yüzeyine temas ederek tamamen kaplanmasıyla, hava ile temasla oluşabilecek kurumunun önlenmesinin yapının stabil kalmasını sağlamış olabileceği düşünölmektedir. Yenilebilir film ve kaplamaların oksijen, karbondioksit ve lipit transferini kontrol altında tutarak, gıda sisteminin mekanik özelliklerini geliştirdiği belirtilmektedir (Temiz ve Yeşilsu 2006).

Mısır zeininin, hiçbir madde içermeyen çözeltiden elde edilen zein film uygulama grubunda oluşturduğu tat ve koku beğenilmemiştir. 1,10 ve 1,80 puan olarak bu ürünün kabul edilemeyeceği sonucuna varılmıştır. Kontamine edilmemiş, film uygulanmamış grup ve %1,6 (v/w) kekik ve %1,6 (v/w) defne esansiyel yağını birlikte içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulama grupları ile arasında panelistler tarafından verilen puan bakımından istatistiki olarak önemli seviyede fark bulunmuştur ($P<0,05$).

Ancak kekik ve defne içeren zein film uygulamasının, margarinlere hoş bir aroma kattığı, bu margarinlerin kahvaltılık olarak bir alternatif oluşturabileceği ve kekiğin kullanıldığı yemeklerde de rahatlıkla kullanılabilceği sonucuna varılmıştır. Tat ve koku yönünden 8,70 ve 8,60 puanları olarak neredeyse tam puana yaklaşmış ve panelistler tarafından kabul görmüştür.

5. SONUÇ

Bu araştırmada, öncelikle kekik, defne, portakal esansiyel yağları zein film içerisine farklı konsantrasyonlarda eklenmiş *Aspergillus parasiticus* NRRL 465, *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces variotii*, *Candida kefir*, *Candida zeylanoides* 1, *Candida zeylanoides* 2, *Candida lambica*, *Candida sake* üzerine antifungal özelliklerine bakılmıştır.

Kekik zein film içerisine, %3, %3,5, %4, %5 ve %6 (v/w) olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda eklenmiştir. Zein filmlerin 5 konsantrasyonda da *Aspergillus fumigatus*'u tamamen inhibe ettiği ancak *Aspergillus parasiticus* NRRL 465 ve *Paecilomyces variotii*'nin tamamen inhibisyonunu %3'ten sonraki konsantrasyonlarda sağlayabildiği görülmüştür. Çalışmada kekik esansiyel yağı içeren zein filmlerden; %3 konsantrasyona sahip olan film sadece *C. lambica* etrafında şeffaf zon oluştururken; zein filmin elde edildiği çözelti içerisindeki esansiyel yağ konsantrasyonun %3,5 çıkmasıyla birlikte, bütün mayalara karşı etkisinin olduğu belirlenmiştir. Konsantrasyonların artışıyla beraber şeffaf zonların çaplarında da artış olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen verilerden anlaşılmıştır ki; kekik esansiyel yağı içeren zein filmlerin inhibisyon etkisinin en güçlü olduğu mikroorganizma çalışmada kullanılan küfler içerisinde *A. fumigatus*, mayalar içerisinden de *C. lambica*'ya karşıdır.

%3-%8 (v/w) aralığında defne esansiyel yağı veya portakal esansiyel yağı içeren çözeltiden elde edilen zein filmlerin aynı küf ve mayalar üzerine inhibisyon etkisine bakılmış, bu filmlerin belirtilen konsantrasyonlarda antifungal etki göstermediği anlaşılmıştır.

Bu bulgular üzerine %3 konsantrasyonundaki kekik diğer esansiyel yağlarla kombine edilerek zein film içerisinde kullanılmıştır. Yapılan farklı konsantrasyonlardaki ikişerli ve ya üçerli kombinasyonları içeren zein filmlerin antifungal etkilerinin arttığı tespit edilmiştir. Esansiyel yağların antioksidan etkilerine bakımından güçlüden zayıfa doğru kekik, defne ve portakal esansiyel yağları olarak sıralandığı tespit edilmiştir. Kekik esansiyel yağının, margarinlerde duyuşal olarak defne esansiyel yağı ile daha uyumlu olacağı göz önünde bulundurulduğunda kekik ile defne esansiyel yağlarının yenilebilir film içerisinde birlikte kullanılmasına karar verilmiştir. Elde edilen film antifungal özellik bakımından *Aspergillus fumigatus*'a karşı en etkili olduğundan; kekik ve defne, potasyum sorbat içeren filmlerde *Aspergillus fumigatus*'a karşı, disk difüzyon yöntemiyle, zon oluşumunu sağlayan filmin elde edildiği çözelti içerisindeki minimum konsantrasyonlar hesaplanmış ve sırasıyla %1,6 (v/w), % 3,5 (w/w) olarak tespit edilmiştir.

Raf ömrü uygulaması için özel üretilen ve 5 bölüme ayrılmış olan kase margarin örneklerinin üst yüzeyi *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş dört bölümünün üçüne %1,6 kekik ve %1,6 defne esansiyel yağını birlikte içeren çözeltiden elde edilen zein film, %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film, hiçbir madde içermeyen zein film uygulanmış, bir bölümü ise kontamine haliyle raf ömrü çalışmasına katılmıştır. 5. bölüm margarinler ise üretildiği şekliyle +4 °C'de depolanmıştır. Üretim sonrası margarinde yapılan mikrobiyolojik analiz sonucunda bakteri, maya ve küf oluşumu tespit edilmemiştir.

Yine başlangıçta bir kereye mahsus olmak üzere demir, bakır, nikel analizi yapılmış olup; sadece demire 0,18±0,05 ppm düzeyinde rastlanmıştır.

+4 °C'de 180 günlük depolama süresinde belirli periyotlarda *Aspergillus fumigatus* sayısı belirlenmiştir. Kontamine edilmiş ve hiçbir madde içermeyen çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin yüzeyi grubunda tespit edilen koloni sayısı, kontamine edilmiş fakat film uygulanmamış margarin yüzeyi grubuna göre ilk 45 günde, daha hızlı bir düşüş göstermiş olup, daha sonraki günlerde yapılan ölçüm sonuçları dalgalanma göstermekle beraber; yinede kontamine edilmiş ve hiçbir madde içermeyen çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin yüzeyi grubunda tespit edilen *A. fumigatus* sayısı, kontamine edilmiş fakat film uygulanmamış margarin yüzeyi grubuna göre düşük bulunmuştur. *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş ve %1,6 kekik, %1,6 defne esansiyel yağlarını birlikte içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin yüzeyinde gözlenen koloniler kontamine edilmiş fakat film uygulanmamış margarin yüzeyi gruplarına göre daha ilk günde kayda değer bir azalış göstermiş, depolama periyodu boyunca tespit edilen koloni sayıları daha da azalarak 150. günde sıfıra ulaşmıştır. *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilerek, % 3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanan margarinler olan PSZY gruplarında ise depolamanın 15. gününde dahi koloni oluşumunda çok hızlı bir düşüş olmuş, 60. günden itibaren ise koloni tespit edilmemiştir.

Depolama süresince, oksidasyondaki değişimleri belirlemek amacıyla serbest yağ asitliği ve peroksit sayısı değerlerine de bakılmıştır. Serbest yağ asitliği bakımından değerlendirildiğinde, başlangıç periyodu ve son periyot göz önüne alınca en büyük artış kontamine edilmiş ve %3,5 potasyum sorbat içeren çözeltiden elde edilen zein film uygulanmış margarin yüzeyi grubunda gözlenmiştir. Depolama sürecinin çoğunluğunda, *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilerek, kekik ve defne esansiyel yağlarını

birlikte içeren zein film uygulaması yapılmış margarinlerin bir miktar daha düşük serbest asitlik değerine sahip olduğu istatistiki olarak da görülmüştür. Genel olarak depolama sürecine bakıldığında, içerisinde %1,6 (v/w) kekik ve %1,6 (v/w) defne esansiyel yağlarını birlikte bulduran çözeltilerden elde edilen zein filmin, hiçbir madde içermeyen zein filme göre, *Aspergillus fumigatus* dilüsyonu ile kontamine edilmiş margarinlerde serbest yağ asitlerinin oluşumunu bariz bir şekilde engellediği tespit edilememiştir. Depolama boyunca 5 grup örneğin peroksit sayılarındaki değişimler değerlendirildiğinde ise; film uygulaması yapılmış bütün margarinlerin, kontamine edilmemiş ve film uygulanmamış margarin grupları merkez ve yüzeyinden daha düşük peroksit sayılarına sahip olduğu, ancak hiçbir madde içermeyen zein filmle ve kekik ve defne esansiyel yağlarını içeren zein filmle kaplanan örneklerin peroksit sayısı değerleri benzerlik gösterirken; potasyum sorbat içeren zein filmle kaplananların daha yüksek peroksit sayısına sahip olduğu görülmüştür. Sonuçlar değerlendirildiğinde; zein filmin ve kekik, defne esansiyel yağlarını birlikte içeren zein filmin oksidasyonu engellemedeki etkisi açık olarak görülmekle birlikte; serbest radikalleri yakalama aktivitesi özelliğini belirlediğimiz kekik ve defne esansiyel yağlarının, zein film içerisinde %1,6'şar (v/w) oranında bulunduğu zaman margarinlerde tespit edilen peroksit sayısı değerlerine bu özelliklerinin yansımadağı anlaşılmaktadır.

Zein filmin, disk difüzyon yöntemiyle *A. fumigatus*'a karşı inhibisyon zonu oluşturduğu, film çözeltisi içerisindeki minimum konsantrasyonun % 1,6 (v/w) kekik ve % 1,6 (v/w) defne olarak belirlenmesi üzerine; film çözeltisi içerisindeki esansiyel yağ konsantrasyonu olarak %1,6 baz alınarak hazırlanan tüm filmlerin gerilme direnci, uzama yüzdesi özelliklerine bakılmıştır. Potasyum sorbat içeren zein filmin özelliklerine belirlemek için ise *A. fumigatus*'a karşı inhibisyon gösterdiği, film çözeltisi içerisindeki minimum konsantrasyon olan %3,5 kullanılmıştır.

%3,5 potasyum sorbat içeren çözeltilerden elde edilen zein film, 0,96 MPa ile en düşük gerilme direncini gösterirken, %164 uzama yüzdesi değeri diğerlerine göre önemli seviyede yüksek değere ($P < 0,05$) sahip olmuştur. Öyle ki; ikinci sırada % 1,50 uzama yüzdesi ile kekik esansiyel yağını içeren zein film gelmektedir. Gerilme direncini 7,79 MPa ile en çok kekik esansiyel yağını içeren film göstermiş olup, onu sırasıyla portakal esansiyel yağını içeren, hiçbir madde içermeyen, defne esansiyel yağını içeren, defne ve kekik esansiyel yağlarını birlikte içeren filmler takip etmiştir. Potasyum sorbatın, zein filmin esnekliğini sağlamadaki büyük katkısı belirlenirken; kullanılan esansiyel yağların tümü filmin esnekliğini sade zein filme göre bir miktar arttırmış, kekik esansiyel yağı en büyük etkiyi göstermiştir. Bu durum

ayrıca kekik esansiyel yağının antifungal özelliğini belirlemek üzere film çözeltisi içerisindeki konsantrasyonu %6 (v/w)'ya çıkarıldığında daha fazla esneklik artışı olmasının gözlemlenmesiyle de anlaşılmıştır. Kekik yağının kırılmalı olan zein filmin yapısını esnek hale getirebilmesi, antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerinin yanında, gıda uygulamaları açısından çok önemli bir katkıdır.

Yapılan duyu analizi sonucunda tat, koku puanları açısından kekik ve defne içeren zein film uygulamasının, margarinlere hoş bir aroma kattığı, bu margarinlerin kekik kullanılarak yapılan yemeklerde rahatlıkla kullanılabilmesi, kahvaltılık olarak da iyi bir alternatif olabileceği sonucuna varılmıştır. Ancak filmin renginden kaynaklanabileceği düşünülen margarin yüzeyinde oluşan koyu sarı renk, panelistlerin bir kısmı tarafından standart dışı olarak ifade edilmiş ve tüketicide olumsuz etki yaratacağı düşüncesine varılmıştır.

Gıdalarda kullanılan kimyasal koruyucular ve plastik ambalaj materyalleri, tüketici de gerek sağlık yönünden gerekse çevresel açıdan kaygılar oluşturmaktadır. Bu sebeple özellikle doğal antimikrobiyal maddeler olmak üzere bunun yanında doğal antioksidanların da yenilebilir filmlerde kullanılmasıyla oluşturulan ambalaj sistemlerinin kullanımına olan ilgi artmaktadır.

Bitki türleri açısından zengin olan ülkemizin, ayrıca önemli miktarda kekik ihracatına sahip olması (Bayram 2003), kekik başta olmak üzere antimikrobiyal ve antioksidan özelliklere sahip diğer esansiyel yağların da yenilebilir filmlerde kullanımına yönelik çalışmaların önemini göstermektedir.

Tüm bu bilgiler göz önüne alınarak, çalışmadan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; zein film içerisinde önemli ölçüde antifungal aktivite göstermekte olan kekik esansiyel yağının, defne ve/veya portakal esansiyel yağlarıyla birlikte film içerisinde kullanıldığı zaman, elde edilen filmin antifungal aktivitesinde artış olduğu tespit edilmiştir. Kekik ve defne esansiyel yağlarının zein ile birlikte formüle edilmesiyle oluşturulan yenilebilir filmlerin margarine uygulanması sonucunda, 6 aylık depolama sürecinde görülen antifungal etkinin artışı, antimikrobiyalın gıdaya kademe kademe salınabildiğinin bir göstergesi olmuştur. Marcos ve ark. (2013), antimikrobiyalın gıdaya direkt katılmasındansa, paketlenme materyaline uygulanmasının en büyük yararının artan bir antimikrobiyal etkinlik göstermesi olduğunu belirtmişlerdir.

Oldukça iyi antioksidan aktiviteleri olduğu belirlenen kekik ve defne esansiyel yağları kullanılarak elde edilen aynı zein filmlerin depolama boyunca antioksidan etkilerine de bakılmıştır. Film kullanılmayan margarin gruplarına göre daha düşük peroksit sayısı değerlerine sahip olduğu belirlenmiş fakat esansiyel yağ olarak tek başlarına sahip oldukları antioksidan aktiviteyi film içerisinde aynı düzeyde gösteremedikleri anlaşılmıştır. % 1,6 (v/w) kekik ve % 1,6 (v/w) defne esansiyel yağlarını içeren çözeltiden elde edilen zein filmlerin antioksidan etkilerinin arttırılabilmesi için içerdikleri esansiyel yağ konsantrasyonlarının biraz daha yükseltilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Esansiyel yağların gıdalarda kullanımını kısıtlayan en önemli etkenlerden birisi yoğun aroması olduğundan, kullanılan esansiyel yağın, gıdanın özelliklerine uygun olarak dikkatle seçilmesi ve gıdaya direkt ilave edilmektense aynı miktarın filme eklenerek gıdaya uygulanması, esansiyel yağın arzu edilmeyen yoğun organoleptik özelliklerini azaltmada önem arz etmektedir. Bizim çalışmamızda da margarinde kullanımı tat ve aroma bakımından uygun olabilecek kekik ve defne esansiyel yağları tercih edilmiş ve yapılan zein film uygulaması ile rahatsızlık verebilecek bir duyuasal etkinin önüne geçilmiştir. Yapılan duyuasal testlerde de, söz konusu uygulama tat ve koku açısından olumlu puanlar almıştır.

Bu çalışma, antimikrobiyal ve antioksidan özellikteki esansiyel yağlar kullanılarak elde edilen yenilebilir filmlerin, gıdaların raf ömrü süresince mikrobiyal ve oksidatif bozulmalarını önlemede önemli bir alternatif ambalaj materyali olabileceğini ortaya koymuştur. Bu sayede hem tüketicide kaygı yaratan kimyasal katkı maddelerinin kullanımı azalmış olacak hem de çevrenin korunmasına fayda sağlanacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Aguirre A, Borneo R, León AE (2013). Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. *Food Bioscience*, 1: 2–9.
- Al-Bayati FA (2008). Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 403-406.
- Alpaslan M, Demir N (2013). Yemeklik yağlar ve Margarınler. International 2nd Halal and Healthy Food Congress, 337-343, Konya.
- Anagnostopoulou MA, Kefalas P, Vassilios P, Papageorgiou VP, Assimopoulou AN, Boskou D (2006). Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chemistry*, 94: 19–25.
- André C, Castanheira I, Cruz JM, Paseiro P, Sanches-Silva A (2010). Analytical strategies to evaluate antioxidants in food: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21: 229–246.
- Anonim (1988). User's Guide to MSTAT-C. A software program for the design, management and analysis of agronomic research experiments. Michigan State University, ABD.
- Anonim (1991). Bitkisel margarin standardı. TS 2812, 1-23.
- Anonim (1997). Yenilebilir film ve kaplamalar. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 4: 4-9.
- Anonim (2004). Mikrobiyoloji - Gıda ve hayvan yemleri - Mikroorganizmaların sayımı için yatay yöntem - 30°C'ta koloni sayım tekniği. TS 7703 EN ISO 4833. <https://intweb.tse.org.tr/Standard/Standard/Standard.aspx?081118051115108051104119110104055047105102120088111043113104073083101120089082100078069117115121> (erişim tarihi, 15.08.2012).
- Anonim (2005). Hayvansal ve bitkisel katı ve sıvı yağlar - Bakır, demir ve nikel tayini - Grafit fırınlı atomik absorpsiyon metodu. TS ISO 8294:1997/T1 (Numara tadili, TS EN ISO 8294).<https://intweb.tse.org.tr/Standard/Standard/Standard.aspx?053107106111065067115113049116090107100056052055108081090071086075069085047110067109075073081116103090081086073108065117084119102110052077048071067089122109100043067112116087076086109074083100> (erişim tarihi, 15.08.2012).
- Anonim (2006). Mesleki eğitim ve öğretim sisteminin güçlendirilmesi projesi. <http://hbogm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/kursprogramlari/gida/moduller/lipitler.pdf> (erişim tarih, 27.08.2014).
- Anonim (2008). Türk Gıda Kodeksi Sürülebilir Yağlar/Margarın ve Yoğun Yağlar Tebliği (Tebliğ No:2008/21).

- Anonim (2014a). Mesleki eğitim ve öğretim sisteminin güçlendirilmesi projesi. http://hbogm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/kursprogramlari/gida/moduller/genel_mikrobiyoloji.pdf (erişim tarihi, 24.06.2014).
- Anonim (2014b). Genel Mikrobiyolojinin ABC'si. <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAAF6AA849816B2EF20FF3F96B01BD67B> (erişim tarihi, 24.06.2014).
- Anonymous (1989). Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, Fourth Edition, Method: Cd8-53.
- Anonymous (1990). Official Methods of Analysis of Association of Official Chemists, 15th Edition, AOAC Inc., Arlington, VA.
- Appendini P, Hotchkiss JH (1997). Immobilization of lysozyme on food contact polymers as potential antimicrobial films. *Packaging Technology and Science*, 10: 271-279.
- Appendini P, Hotchkiss JH (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(2): 113-126.
- Arcan I, Yemenicioğlu A (2007). Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans. *Food Chemistry*, 103: 301-312.
- ASTM (2001). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Standard D882. In ASTM, annual book of ASTM, 1622 D8, Philadelphia.
- Ayana B, Turhan KN (2010). Gıda ambalajlamasında antimikrobiyel madde içeren yenilebilir filmler/kaplamalar ve uygulamaları. *Gıda* 35(2): 151-158.
- Ayrancı E, Tunc S (2004). The effect of edible coatings on water and vitamin C loss of apricots (*Armeniaca vulgaris* Lam.) and green peppers (*Capsicum annuum* L.). *Food Chemistry*, 87: 339-342.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils-a review. *Food Chem Toxicol.*, 46: 446-75.
- Baldwin EA, Wood B (2006). Use of edible coating to preserve pecans at room temperature. *Hort Science*, 41(1): 188-192.
- Başoğlu F (2012). Yemeklik yağ teknolojisi. Dora, 345s, Bursa.
- Bayram E (2003). Kekik yetiştiriciliği. Ege Üniversitesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi.
- Baysal T, Ersus S, Apaydın E (2009). Yenilebilir mısır zeini filmi kaplamanın orta nemli domates kalitesi üzerine etkisi. *Gıda*, 34: 359-366.

- Behbahani MH, Younes Ghasemi Y, Khoshnoud MJ, Faridi P, Moradli G, Najafabady NM (2013). Volatile oil composition and antimicrobial activity of two *Thymus* species. *Pharmacognosy Journal*, 5: 77-79.
- Benavides S, Villalobos-Carvajal R, Reyes JE (2012). Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *Journal of Food Engineering*, 110: 232–239.
- Benli M, Yiğit N (2005). Ülkemizde yaygın kullanımı olan kekik (*Thymus vulgaris*) bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi. *Orlab On-line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3(8): 1-8.
- Bilişli A (2012). Gıda Teknolojisi. Sidas Medya Ltd. Şti., 235, İzmir.
- Blanco Tirado C, Stashenko EE, Combariza MY, Martinez JR (1995). Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 697: 501-513.
- Blois MS 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1200.
- Bostan K, Aldemir T, Aydın A (2007). Kitosan ve antimikrobiyal aktivitesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 37: 118-127.
- Bourtoom T (2008). Edible films and coating characteristic and properties. *International Food Research Journal*, 15(3): 237-248.
- Bousbia N, Vian MA, Ferhat MA, Meklati BY, Chemat F (2009). A new process for extraction of essential oil from Citrus peels: Microwave hydrodiffusion and gravity. *Journal of Food Engineering*, 90: 409–413.
- Budak Bağdatlı A, Kayaardı S (2010). Et ve et ürünlerinde kullanılan paketleme yöntemleri. *Akademik Gıda*, 8(2): 24-30.
- Burt S (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
- Caccioni DRL, Guizzardi M, Biondi DM, Renda A, Ruberto G (1998). Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology*, 43: 73–79.
- Cagri A, Ustunol Z, Ryser ET (2001). Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acids. *Journal of Food Science*, 66: 865–870.
- Cao YM, Chang KC (2001). Edible films prepared from water extract of soybeans. *Journal of Food Science*, 67(4): 1449-1454.

- Ćavar S, Maksimović M, Šolić ME, Jerković-Mujkić A, Bešta R (2008). Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. *Food Chemistry*, 111: 648–653.
- Cervato G, Carabelli M, Gervasio S, Cittera A, Cazzola R, Cestaro B (2000). Antioxidant properties of oregano (*Origanum Vulgare*) leaf extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 24: 453-465.
- Chen J, Brody AL (2013). Use of active packaging structures to control the microbial quality of a ready-to-eat meat product. *Food Control*, 30: 306–310.
- Choi S-G, Kim KM, Hanna MA, Welle CL, Kerr WL (2003). Molecular dynamics of soy-protein isolate films plasticized by water and glycerol. *Journal of Food Science*, 68(8): 2516–2522.
- Cisneros-Zevallos L, Kochta JM (2003). Whey protein coatings for fresh fruits and relative humidity effects. *Journal of Food Science*, 68(1): 176-181.
- Coma V (2008). Bioactive packaging Technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, 78: 90-103.
- Contini C, Katsikogianni MG, O'Neill FT, O'Sullivan M, Dowling DP, Monahan FJ (2011). Development of active packaging containing natural antioxidants. *Procedia Food Science*, 1: 224–228.
- Coşkun F (2006). Gıdalarda bulunan doğal koruyucular. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2: 27-33.
- Çağrı-Mehmetoğlu A (2010). Yenilebilir filmlerin ve kaplamaların özelliklerini etkileyen faktörler. *Akademik Gıda*, 8(5): 37-43.
- Çakmakçı S, Gökalp HY (1992). Gıdalarda kısaca oksidasyon; antioksidantlar ve gıda sanayiinde kullanımları. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 23(2): 174-192.
- Çiftçi Y (2006). Bitkisel ve hayvansal katı ve sıvı yağlar. *Nadir Kitap*, 629s.
- Dainelli D, Gontard N, Spyropoulos D, Zondervan-van den Beuken E, Tobback P (2008). Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends in Food Science & Technology*, 19: 103-112.
- David F, Sandra P, Vicker AK (2005). Column selection for the analysis fatty acids methyl esters. *Agilent Technologies, Inc.*, 1-12, USA.
- Deba F, Xuan TD, Yasuda M, Tawata S (2008). Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Biden pilosa* Linn. var. *Radiata*. *Food Control*, 19: 346-352.

- Decker EA (1998). Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of foods to maximize oxidative stability. *Trends in Food Science & Technology*, 9: 241-248.
- Del Caro A, Vacca V, Poiana M, Fenu P, Piga A (2006). Influence of technology, storage and exposure on components of extra virgin olive oil (*Bosana cv*) from whole and destoned fruits. *Food Chemistry*, 98: 311–316.
- Del Nobile MA, Conte A, Incoronato AL, Panza O (2008). Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. *Journal of Food Engineering*, 89: 57–63.
- Dhanapal A, Sasikala P, Rajamani L, Kavitha V, Yazhini G, Banu MS (2012). Edible films from polysaccharides. *Food Science and Quality Management*, 3: 2224-6088.
- Diken ME (2009). Bazı şifalı bitkilerin antioksidan içerikleri. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Dopico-García MS, López-Vilariño JM, González-Rodríguez MV (2007). Antioxidant content of and migration from commercial polyethylene, polypropylene, and polyvinyl chloride packages. *J. Agric. Food Chem.*, 55(8): 3225–3231.
- Dursun S, Erkan N (2009). Yenilebilir protein filmler ve su ürünlerinde kullanımı. *Journal of Fisheries Science.com*, 3(4): 352-373.
- Dutta PK, Tripathi S, Mehrotra GK, Dutta J (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114: 1173–1182.
- Emir Çoban Ö, Patır B (2010). Antioksidan etkili bazı bitki ve baharatların gıdalarda kullanımı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5(2): 7-19.
- Ertürk Ö (2006). Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. *Section Cellular and Molecular Biology*, 61(3): 275-278.
- Ertürk R, Çelik C, Kaygusuz R, Aydın H (2010). Ticari olarak satılan kekik ve nane uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri. *Cumhuriyet Tıp Derg*, 32: 281-286.
- Evren M, Tekgüler B (2011). Uçucu yağların antimikrobiyel özellikleri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 9(3): 28-40.
- Falguera V, Quintero JP, Jimenez A, Munoz JA, Ibarz A (2011). Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, 22: 292-303.
- Farjam MH (2012). Comparative study of the antimicrobial activity of essential oil and two different extract from *Salvia urmiensis* Bunge. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1680-1682.

- Fernández-Pan I, Carrión-Granda X, Maté JI (2014). Antimicrobial efficiency of edible coatings on the preservation of chicken breast fillets. *Food Control*, 36: 69-75.
- Field CE, Pivarnick LF, Barnett SM, Rand A (1986). Utilization of glucose oxidase for extending the shelf-life of fish. *Journal of Food Science*, 51: 66-70.
- Fisher K, Phillips CA (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 1232–1240.
- Fisher K, Phillips C (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?. *Trends in Food Science & Technology*, 19: 156-164.
- Flores S, Famá L, Rojas AM, Goyanes S, Gerschenson L (2007). Physical properties of tapioca-starch edible films: Influence of film making and potassium sorbate. *Food Research International*, 40(2): 257–265.
- García MA, Martino MN, Zaritzky NE (2000). Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coatings. *Journal of Food Science*, 65: 941-944.
- Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J, Samson RA (2007). The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 59: 1–10.
- Gennadios A, Hanna MA, Kurth LB (1997). Application of edible coating on meats, poultry and seafoods: A Review. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 30: 337-350.
- Gómez-Alonso S, Mancebo-Campos V, Salvador MD, Fregapane G (2007). Evolution of major and minor components and oxidation indices of virgin olive oil during 21 months storage at room temperature. *Food Chemistry*, 100: 36–42.
- Gomez-Estaca J, Montero P, Gimenez B, Gomez-Guillen MC (2007). Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*, 105: 511-520.
- Gomez-Lopez A, Pan D, Cuesta I, Alastruey-Izquierdo A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M (2010). Molecular identification and susceptibility profile in vitro of the emerging pathogen *Candida kefyr*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 66: 116–119.
- Granda-Restrepo D, Peralta E, Troncoso-Rojas R, Soto-Valdez H (2009). Release of antioxidants from co-extruded active packaging developed for whole milk powder. *International Dairy Journal*, 19: 481–488.
- Gumus T, Demirci AŞ, Sagdic O, Arici M (2010). Inhibition of heat resistant molds: *Aspergillus fumigatus* and *Paecilomyces variotii* by some plant essential oils. *Food Science and Biotechnology*, 19: 1241-1244.

- Guilbert S, Gontard N, Gorris LGM (1996). Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 29: 10-17.
- Günerhan H (2007). Gıdaların donma sürelerinin hesabı. VIII. Ulusal Tesisat Mühendisliği Kongresi, 975-988, İzmir.
- Gürel Inanlı A, Karaton Kuzgun N (2012). Uçucu yağlarla zenginleştirilmiş kitosan filmlerin antimikrobiyal aktivitesi. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 7: 28-35.
- Han JH (1999). Food packaging general and active food packaging technologies. Canada, <http://www.dcn.davis.ca.us/~han/CyberFoodsci/volume1999.html>. (28.10.2003).
- Han JH (2000). Antimicrobial food packaging. *Food Technology*, 54(3): 56-65.
- Han JH (2001). Edible and biodegradable films/coatings carrying bioactive agents. Canada, <http://www.dcn.davis.ca.us/~han/CyberFoodsci/volume2001.html>. (28.10.2003).
- Haugaard VK, Udsen A-M, Mortensen G, Høegh L, Petersen K, Monahan F (2001). Potential food applications of biobased materials. An EU-Concerted action project. *Starch – Stärke*, 53(5): 189–200.
- Herald TJ, Hachmeister KA, Huang S, Bowers JR (1996). Corn zein packaging material for cooked turkey, *Journal of Food Science*, 61(2): 415-418.
- Hu M, McClements DJ, Decker EA (2003). Lipid oxidation in corn oil-in-water emulsions stabilized by casein, whey protein isolate, and soy protein isolate. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (6): 1696–1700.
- Huang RYM, Pal R, Moon GY (1999). Characteristic of sodium alginate membranes for the prevaporation dehydration of ethanol-water and isopropanol-water mixtures. *Journal of Membrane Science*, 160: 101-113.
- Jamshidian M, Tehrani EA., Desobry S (2012). Release of synthetic phenolic antioxidants from extruded poly lactic acid (PLA) film. *Food Control*, 28: 445-455.
- Janes ME, Kooshesh S, Johnson MG (2002). Control of *Listeria monocytogenes* on the surface of refrigerated, ready-to-eat chicken coated with edible zein film coatings containing nisin and/or calcium propionate. *Journal of Food Science*, 67(7): 2754-2757.
- Jayashree T, Subramanyam C (2000). Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free Radical Biology and Medicine*, 29: 981–985.
- Jooyandeh H (2011). Whey protein films and coatings: A Review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10(3): 296-301.

- Kang D, Son GH, Park HM, Kim J, Choi JN, Kim HY, Lee S, Hong S-B, Lee CH (2013). Culture condition-dependent metabolite profiling of *Aspergillus fumigatus* with antifungal activity. *Fungal Biology*, 117: 211–219.
- Karagöz Emiroğlu Z, Polat Yemiş G, Kodal Coşkun B, Candoğan K (2010). Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science*, 86: 283-288.
- Karaman S, Digrak M, Ravid U, Ilcim A (2001). Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 76: 183–186.
- Karaoğul E, Ertaş M, Altuntaş E, Alma MH (2012). Karadeniz ve Akdeniz Bölgesinde yetişen defne (*Laurus nobilis*)’nin kimyasal içeriği. *KSÜ Mühendislik Bil. Der., Özel Sayı*, 74-77.
- Karaton Kuzgun N, Gürel İnanlı A (2012). Kitosan üretimi ve özellikleri ile kitosanın kullanım alanları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6(2): 16-21.
- Karpińska M, J Borowski J, Danowska-Oziewicz M (2001). The use of natural antioxidants in ready-to-serve food. *Food Chemistry*, 72: 5–9.
- Kechichian V, Ditchfield C, Veiga-Santos P, Tadini CC (2010). Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch. *Food Science and Technology*, 43(7): 1088-1094.
- Kim S, Sessa DJ, Lawton JW (2004). Characterization of zein modified with a mild cross-linking agent. *Industrial Crops and Products*, 20(3): 291-300.
- Klich MA (2007). *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, 8: 713-722.
- Koca N, Karadeniz F (2003). Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 16: 32-37.
- Kodal B (2008). Antioksidan özellikteki yenilebilir filmlerin sığır kıymasının oksidatif stabilitesine etkileri. *Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara*.
- Krochta KM, Johnston De-Mulder C (1997). Edible and biodegradable polymer films: Challenges and oppotunities. *Food Technology*. 51(2): 60-74.
- Kulisic T, Radonic A, Katalinic V, Milos M (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 85: 633-640.
- Kumar R, Mishra AK, Dubey NK, Tripathi YB (2007). Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity. *International Journal of Food Microbiology*, 1115: 159–164.

- Kurt Ş, Zorba Ö (2005). Kitin, kitosan ve türevlerinin gıdalarda kullanım olanakları. *Gıda*, 30(6): 371-378.
- Lai HM, Padua GW (1997). Properties and microstructure of plasticized zein films. *Cereal Chemists*, 74(6) : 771-775.
- Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas G-JE (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 453-462.
- Lazarus CR, West RL, Oblinger JL, Palmer AZ (1976). Evaluation of a calcium alginate coating and a protective plastic wrapping for the control of lamb carcass shrinkage. *J. Food Sci.*, 4: 639-641.
- Le Tien C, Vachon C, Mateescu M-A, Lacroix M (2001). Milk protein coatings prevent oxidative browning of apples and potatoes. *Journal of Food Science*, 66: 512–516.
- Lee DS, Hwang YI, Cho SH (1998). Developing antimicrobial packaging film for curled lettuce and soybean sprouts. *Food Science and Biotechnology*, 7: 117-121.
- Li BB, Smith B, Hossain MM (2006). Extraction of phenolics from citrus peels II. Enzyme-assisted extraction method. *Separation and Purification Technology*, 48: 189–196.
- Lin SY, Krochta JM (2003). Plasticizer effect on grease barrier and color properties of whey-protein coating on paperboard. *Journal of Food Science*, 68(1): 229-233
- Lindstrom TR, Morimoto K, Cante CJ (1992). Edible Films and Coatings. *Encyclopedia of Food Science and Technology*, H.Y. Hui. John Wiley & Sons, Inc. Vol 2, New York, 659-663.
- Liu S, Sun J, Yu L, Zhang C, Bi J, Zhu F, Qu M, Yang Q (2012). Antioxidant activity and phenolic compounds of *Holotrichia parallela* Motschulsky extracts. *Food Chemistry*, 134: 1885–1891.
- López P, Sánchez C, Batlle R, Nerín C. Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents. *J Agric Food Chem.*, 55(21): 8814-24.
- Ložienė K, Venskutonis PR, Šipailienė A, Labokas J (2007). Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chemistry*, 103: 546–559.
- Lucini EI, Zunino MP, Lo'pez ML, Zygadlo JA (2006). Effect of monoterpenes on lipid composition and sclerotial development of *Sclerotium cepivorum* Berk. *J. Phytopathology*, 154: 441–446.
- Manso S, Cacho-Nerin F, Becerril R, Nerin C (2013). Combined analytical and microbiological tools to study the effect on *Aspergillus flavus* of cinnamon essential oil contained in food packaging. *Food Control*, 30: 370-378.

- Marcos B, Aymerich T, Garriga M, Arnau J (2013). Active packaging containing nisin and high pressure processing as post-processing listericidal treatments for convenience fermented sausages. *Food Control*, 30: 325–330.
- Mecitoğlu Güçbilmez Ç, Yemenicioğlu A, Arslanoğlu A (2007). Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein films incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA. *Food Research International*, 40: 80–91.
- Meilgaard M, Civille GV, Carr BT (1999). *Sensory evaluation techniques* (3rd ed.). New York: CRC Press.
- Mexis SF, Chouliara E, Kontominas MG (2012). Shelf life extension of ground chicken meat using an oxygen absorber and a citrus extract. *Food Science and Technology*, 49: 21-27.
- Miller KS, Krochta JM (1997). Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 8: 228-237.
- Min S, Krochta JM (2005). Inhibition of *Penicillium commune* by edible whey protein films incorporating lactoferrin, lactoferrin hydrolysate, and lactoperoxidase systems. *Food Microbiology and Safety*, 70: 87-94.
- Mohammadian MA, Mobrami Z, Sajedi RH (2011). Bioactive compounds and antioxidant capacities in the flavedo tissue of two citrus cultivars under low temperature. *Braz. J. Plant Physiol.*, 23(3): 203-208.
- Moreira MR, Ponce AG, del Valle CE, Roura SI (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Swiss Society of Food Science and Technology*, 38: 565-570.
- Morelló JR, Motilva MJ, Tovar M-J, Romero M-P (2004). Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chemistry*, 85: 357–364.
- Moure A, Cruz JM, Franco D, Domínguez JM, Sineiro J, Domínguez H, Núñez MJ, Parajó JC (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72: 145–171.
- Nas S, Gökalp HY, Ünsal M (2001). *Bitkisel yağ teknolojisi*. Mühendislik Fakültesi Matbaası, 329s, Denizli.
- Nawar WW (1996). *Lipids*. *Food Chemistry*, Ed: O.R. Fennema, Marcel Dekker, New York, 225-319.
- Nguefack J, LekagneDongmo JB, Dakole CD, Leth V, Vismer HF, Torp J, Guemdjom EFN, Mbeffo M, Tamgue O, Fotio D, Amvam Zollo PH, Nkengfack AE (2009). Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 131: 151-156.

- Nguefack J, Tamgue O, Lekagne Dongmo JB, Dakole CD, Leth V, Vismer HF, Amvam Zollo PH, Nkengfack AE (2012). Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. *Food Control*, 23: 377-383.
- Nickavar B, Esbati N (2012). Evaluation of the antioxidant capacity and phenolic content of three *Thymus* species. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 5: 119-125.
- Norajit K, Kim KM, Ryu GH (2010). Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *Journal of Food Engineering*, 98: 377–384.
- Nychas GJE (1995). Natural antimicrobials from plants. *New Methods of Food Preservation*, GW Gould, Blackie: Academic Profesional, London, 58-89.
- Oğuz A (2008). Bazı çerez gıdaların antioksidan kapasiteleri. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Olivas GI, Barbosa-Canóvas GV (2008). Alginate-calcium films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity. *Food Science and Technology*, 41: 359-356.
- Omidbeygi M, Barzegar M, Hamidi Z, Naghdibadi H (2007). Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*, 18: 1518–1523.
- Olivas GI, Rodriguez JJ, Barbosa-Ca'novas GV (2003). Edible coatings composed of methylcellulose, stearic acid, and additives to preserve quality of pear wedges. *Journal of Food Processing and Preservation*, 27: 299-320.
- Oms-Oliu G, Soliva-Fortuny R, Martí'n-Belloso O (2008). Using polysaccharide-based edible coatings to enhance quality and antioxidant properties of fresh-cut melon. *LWT Food Science and Technology*, 41: 1862-1870.
- Ouchikh O, Chahed T, Ksouri R, Taarit MB, Faleh H, Abdelly C, Kchouk ME, Marzouk B (2011). The effects of extraction method on the measured tocopherol level and antioxidant activity of *L. nobilis* vegetative organs. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24:103–110.
- Oussalah M, Caillet S, Salmieri S, Saucier L, Lacroix M (2004). Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52: 5598-5605.
- Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18: 414-420.

- Ozcan M (2003). Effect of essential oils of some plants used as thyme on the growth of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 strain. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 6: 55-59.
- Ozdemir M, Floros JD (2008). Optimization of edible whey protein films containing preservatives for mechanical and optical properties. *Journal of Food Engineering*, 84: 116-123.
- Özdemir M, Kasapoğlu M, Kaymaz S, Eskikapuzus C, Bozyayla D (2011a). Antimikrobiyal gıda ambalaj uygulamaları – 1. *Dünya Gıda*, <http://www.dunyagida.com.tr/haber.php?nid=2428>. (18.06.2014).
- Özdemir M, Kasapoğlu M, Kaymaz S, Eskikapuzus C, Bozyayla D (2011b). Antimikrobiyal gıda ambalaj uygulamaları – 2. *Dünya Gıda*, <http://www.dunyagida.com.tr/haber.php?nid=2465>. (18.06.2014).
- Özkan M, Kırca A, Cemeroğlu B (2007). Gıdalara Uygulanan Bazı Özel Analiz Yöntemleri. *Gıda Analizleri, Bekir Cemeroğlu. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No:34, Ankara.*
- Öztürk N, Tunalier Z, Koşar M, Başer KHC (2004). *Petroselinum crispum*, *Anethum graveolens* ve *Eruca sativa*'nın antioksidan etki ve fenolik bileşikleri yönünden incelenmesi. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, 376-384, Eskişehir.
- Padgett T, Han IY, Dawson PL (1998). Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. *Journal of Food Protection*, 61(10): 1330-1335.
- Park HJ (1999). Development of advanced edible coatings for fruits. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 254-260.
- Pashova S, Zhivkova V (2010). Edible films and coatings used for prolonging the term of storage of foods. *Forum Ware International 2010/1*, 20-28, Austria.
- Peker H, Arslan S (2011). Mikroenkapsülasyon ve süt teknolojisinde kullanım alanları. *Akademik Gıda Dergisi*, 9(6): 70-80.
- Perez-Gago MB, Serra M, del Rio MA (2006). Color change of fresh-cut apples coated with whey protein concentrate-based edible coatings. *Postharvest Biology and Technology* 39: 84-92.
- Persico P, Ambrogi V, Carfagna C, Cerruti P, Ferrocino I, Mauriello G (2009). Nanocomposite polymer films containing carvacrol for antimicrobial active packaging. *Polymer Engineering and Science*, 1447-1455.
- Petersen K, Nielsen PV, Bertelsen G, Lawther M, Olsen MB, Nilsson NH, Mortensen G (1999). Potential of biobased materials for food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 52-68.

- Pires C, Ramos C, Teixeira G, Batista I, Mendes R, Nunes L, Marques A (2011). Characterization of biodegradable films prepared with hake proteins and thyme oil. *Journal of Food Engineering*, 105: 422–428.
- Pires C, Ramos C, Teixeira G, Batista I, Nunes L, Marques A (2013). Hake proteins edible films incorporated with essential oils: Physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties. *Food Hydrocolloids*, 30: 224-231.
- Pokorný J (2001). Natural Antioxidants. *Antioxidants in Food: Practical Applications*, Ed: J. Pokorný, N Yanishlieva, M. Gordon. Woodhead Publishing Limited, Cambridge England, 147-249.
- Ponce GA, Roura SI, Valle CE, Moreira MR (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extract: In vitro and in vivo studies. *Postharvest Biology and Technology*, 49: 294-300.
- Pranoto Y, Salokhe VM, Rakshit SK (2005). Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food Research International*, 38: 267-272.
- Psomiadou E, Arvanitoyannis I, Yamamoto N (1996). Edible films made from natural resources; microcrystalline cellulose (MCC), methylcellulose (MC) and corn starch and polyols-Part 2. *Carbohydrate Polymers*, 31: 193- 204.
- Quintavalla S, Vicini L (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, 62: 373–380.
- Ramos M, Jiménez A, Peltzer M, Garrigós MC (2012). Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. *Journal of Food Engineering*, 109: 513-519.
- Raybaudi-Massilia RM, Rojas-Grau MA, Mosqueda-Melgar J, Martín-Belloso O. (2008). Comparative study on essential oils incorporated into an alginate-based edible coating to assure the safety and quality of fresh-cut Fuji apples. *Journal of Food Protection*, 71: 1150-1161.
- Razzaghi-Abyaneh M, Shams-Ghahfarokhi M, Yoshinari T, Rezaee M-B, Jaimand K, Nagasawa H, Sakuda S (2008). Inhibitory effects of *Satureja hortensis* L. essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 123: 228-233.
- Rhim JW (2004). Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 37: 323-330.
- Rivera A, Hohl T, Pamer EG (2006). Immune responses to *Aspergillus fumigatus* infections. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 12: 47-49.
- Roberts D, Greenwood M (2003). *Practical Food Microbiology*. Third edition, Blackwell publishing Ltd., 294s, USA.

- Rodríguez A, Batlle R, Nerín C (2007). The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging. Part II. *Progress in Organic Coatings*, 60: 33-38.
- Rojas-Graü MA, Avena-Bustillos RJ, Olsen C, Friedman M, Henika PR, Martín-Belloso O, Pan Z, Mchugh TH (2007). Effects of plant essential oils compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films. *Journal of Food Engineering*, 81: 634-641.
- Rojas-Graü MA, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O (2009). Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20: 438-447.
- Ruiz-Navajas Y, Viuda-Martos M, Sendra E, Perez-Alvarez JA, Fernández-López J (2013). *In vitro* antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. *Food Control*, 30: 386-392.
- Ryu SY, Rhim JW, Roh HJ, Kim SS (2002). Preparation and physical properties of zein-coated high-amylose corn starch film. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 35: 680-686.
- Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, Bruni R (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91: 621-632.
- Salle V, Lecuyer E, Chouaki T, Lescure FX, Smail A, Vaidie A, Dayen C, Schmit JL, Ducroix JP, Douadi Y (2005). *Paecilomyces variotii* fungemia in a patient with multiple myeloma: case report and literature review. *Journal of Infection*, 51: 93-95.
- Sarikurkcu C, Ozer MS, Eskici M, Tepe B, Can Ş, Mete E, Essential oil composition and antioxidant activity of *Thymus longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis* var. *longicaulis*. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 1801-1805.
- Sayanjali S, Ghanbarzadeh B, Ghiassifar S (2011). Evaluation of antimicrobial and physical properties of edible film based on carboxymethyl cellulose containing potassium sorbate on some mycotoxigenic *Aspergillus* species in fresh pistachios. *Food Science and Technology*, 44: 1133-1138.
- Scannell AGM, Hill C, Ross RP, Marx S, Hartmeier W, Arendt EK (2000). Development of bioactive food packaging materials using immobilised bacteriocins Lacticin 3147 and Nisapilins. *International Journal of Food Microbiology*, 60: 241-249.
- Seydim AC, Sarikus G (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, 39(5): 639-644.
- Shahidi F, Arachchi JKV, Jeon YJ (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 37-51.

- Sharma N, Tripathi A (2006). Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22: 587-593.
- Sharma N, Tripathi A (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research*, 163: 337-344.
- Shukla R, Cheryan M (2001). Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products*, 13: 171-192.
- Sikkema J, de Bontt JAM, Poolmann B (1995). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membran. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(11): 8022-8028.
- Singh N, Singh RK, Bhunia AK, Stroshine RL (2002). Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157:H7 on Lettuce and Baby Carrots. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 35: 720–729.
- Singh P, Shukla R, Prakash B, Kumar A, Singh S, Mishra PK, Dubey NK (2010). Chemical profile, antifungal, antiaflatoxicogenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 1734–1740.
- Skerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hras AH, Aimonic M, Knez Z (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant material and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89: 191-198.
- Skurtys O, Acevedo C, Pedreschi F, Enronoe J, Osorio F, Aguilera JM (2010). Food hydrocolloid edible films and coatings. *Food Science and Technology*, 66s, United States.
- Sokmen A, Gulluce M, Akpulat HA, Daferera D, Tepe B, Polissiou M, Sokmen M, Sahin F (2004). The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*, 15: 627–634.
- Soliman KM, Badeaa RI (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*, 40: 1669–1675.
- Soto-Cantú CD, Graciano-Verdugo AZ, Peralta E, Islas-Rubio AR, González-Córdova A, González-León A, Soto-Valdez H (2008). Release of butylated hydroxytoluene from an active film packaging to asadero cheese and its effect on oxidation and odor stability. *Journal of Dairy Science*, 91: 11–19.
- Souza EL, Stamford TLM, Lima EO, Trajano VN (2007). Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control*, 18: 409–413.
- Soycan Önenç S, Açıkgöz Z (2005). Aromatik bitkilerin hayvansal ürünlerde antioksidan etkileri. *Hayvansal Üretim*, 46(1): 50-55.

- Specchio JJ (1992). Antioxidants. Encyclopedia of Food Science and Technology, H.Y. Hui. John Wiley & Sons, Inc., New York, 73-79.
- Suppakul P, Miltz J, Sonneveld K, Bigger SW (2003). Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. Journal of Food Science, 68: 408-420.
- Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. J Agric Food Chem., 50(25): 7449-7454.
- Şahin OI, Akpınar Bayizit A (2008). Nanokompozit filmlerin gıda sanayi uygulamaları. Türkiye 10. Gıda Kongresi, 145-148, Erzurum.
- Şengezer E, Güngör T (2008). Esansiyel yağların hayvanlar üzerindeki etkileri (Derleme). Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg., 48(2): 101-110.
- Targan Ş, Arısoy K, Abalı Y, Kaya E (2008). Ayçiçek yağının raf ömrünün uzatılmasında sitrik asit ve fosforik asidin antioksidan etkisi. BAÜ FBE Dergisi, 10(1): 67-75.
- Taştan Ö, Baysal T (2013). Meyve sebze işleme endüstrisinde kitosan kullanımı. Gıda, 38 (3): 175-182.
- Teixeira B, Marques A, Ramos C, Neng NR, Nogueira JMF, Saraiva JA, Nunes ML (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. Industrial Crops and Products 43: 587– 595.
- Temiz H, Yeşilsu AF (2006). Bitkisel protein kaynaklı yenilebilir film ve kaplamalar. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 2: 41-50.
- Tepe B, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (*Lamiaceae*). Food Chemistry, 90: 333–340.
- Torlak E, Nizamoğlu M (2009). Doğal antimikrobiyal maddeler ile hazırlanan yenilebilir filmlerin *Listeria monocytogenes* üzerine etkileri. Vet. Bil. Derg. 25: 15-21.
- Torlak E, Nizamoğlu M (2011). Uçucu yağ içeren yenilebilir kitosan filmlerinin *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* O157:H7 üzerine etkinlikleri. Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 17: 125-129.
- Turan F, Güragaç R, Sayın S (2012). Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Esansiyel Yağlar. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 5(1): 35-40.
- Tyrer H, Ainsworth P, İbanoğlu Ş, Bozkurt H (2004). Modelling the growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Candida sake* in ready-to-eat meals. Journal of Food Engineering, 65: 137–143.
- Ünal S (1995). Sıvı yağların sertleştirilmesi ve margarin üretimi. Gıda Teknolojisi. Mehmet Kesim, Eskişehir, 123-126.

- Varela P, Fiszman SM (2011). Hydrocolloids in fried foods. A review. *Food Hydrocolloids*, 25: 1801-1812.
- Velázquez-Nuñez MJ, Avila-Sosa R, Palou E, López-Malo A (2013). Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. *Food Control*, 31: 1–4.
- Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez J (2008a). Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. *International Journal of Food Science and Technology*, 43: 526-531.
- Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez J (2008b). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, 19: 1130–1138.
- Wanasundara PKJPD, Shahidi F (2005). *Antioxidants: Science, Technology, and Applications*. Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Fereidoon Shahidi, John Wiley and Sons, Inc., New Jersey, 431-489.
- Wang S-M, Shieh C-C, Liu C-C (2005). Successful treatment of *Paecilomyces variotii* splenic abscesses: a rare complication in a previously unrecognized chronic granulomatous disease child. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 53: 149-152.
- Wittaya T (2012). Protein-based edible films: Characteristics and improvement of properties. *Structure and Function of Food Engineering*, Ayman Amer Eissa. Agricultural and Biological Sciences, Chapter 3.
- Wojdyło A, Oszmian´ski J, Czemerys R (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105: 940–949.
- Yıldırım A, Mavi A, Oktay M, Kara AA, Algur ÖF, Bilaloğlu V (2000). Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of Tilia (*Tilia argentea Desf Ex DC*), Sage (*Salvia Triloba* L.) and Black Tea (*Camellia sinensis*) extracts. *J Agric Food Chemistry*, 48: 5030-5034.
- Yılmaz L, Akpınar Bayizit A, Özcan Yılsay T (2007). Süt proteinlerinin yenilebilir film ve kaplamalarda kullanılması. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 1: 59-64.
- Yiğit V (1997). Gıda ve ambalaj. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 4: 15-18.
- Yvon Y, Raelison GE, Randriantsoa A, Romdhane M, Chabir N, Mkaddem GM, Bouajila J (2012). Relation between chemical composition or antioxidant activity and antihypertensive activity for six essential oils. *Journal of Food Science*, 77(8): 184-190.

- Zactiti EM, Kieckbusch TG (2006). Potassium sorbate permeability in biodegradable alginate films: Effect of the antimicrobial agent concentration and crosslinking degree. *Journal of Food Engineering*, 77: 462–467.
- Zinoviadou KG, Koutsoumanis KP, Biliaderis CG (2011). Biopolymer-based films as carriers of antimicrobial agents. *Procedia Food Science*, 1: 190-196.
- Zivanovic S, Chi S, Draughon AF (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of Food Science*, 70: 45-51.

EKLER

Ek 1. Margarin için duyuşal değerlendirme formu

Panelist Adı:

Tarih:

Örnek No	Değerlendirme Kriteri			
	Görünüş	Yapı	Tat	Koku
1				
2				
3				

9-8: Çok iyi 7-6: İyi 5-4: Orta 3-2: Kötü 1: Çok kötü

Görünüş: Beyaz veya sarımsı renkte

Yapı: Homojen

Tat-Koku: Kendine has tat ve kokuda

Ek 2. Zein film kalınlıklarına ait varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynağı	S.D	F Değeri
		Film Kalınlığı
Uygulama	5	7,81**
Hata	54	0,000346
Toplam	59	

* : %5 seviyesinde önemli

** : %1 seviyesinde önemli

S.D: Serbestlik derecesi

Ek 3. Zein filmlerin gerilme dirençleri ve uzama yüzdelerine ait varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynağı	S.D	F Değeri	
		Gerilme Direnci	Uzama Yüzdesi
Uygulama	5	21,67**	226,94**
Hata	18	0,921	77,9
Toplam	23		

* : %5 seviyesinde önemli

** : %1 seviyesinde önemli

S.D: Serbestlik derecesi

Ek 4. Zein filmlere uygulanan kesme kuvvetlerine ait varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynağı	S.D	F Değeri
		Kesme Kuvveti
Uygulama	5	3,23*
Hata	18	977
Toplam	23	

* : %5 seviyesinde önemli

** : %1 seviyesinde önemli

S.D: Serbestlik derecesi

Ek 5. Esansiyel yağların toplam fenolik madde değerlerine ait varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynağı	S.D	F Değeri
		Toplam Fenolik Madde
Uygulama	2	1086,49**
Hata	9	89861267
Toplam	11	

* : %5 seviyesinde önemli

** : %1 seviyesinde önemli

S.D: Serbestlik derecesi

Ek 6. Zein fim ağırlıklarına ait varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynağı	S.D	F Değeri
		Film Ağırlığı
Uygulama	2	14,91**
Hata	105	0,0104
Toplam	107	

* : %5 seviyesinde önemli

** : %1 seviyesinde önemli

S.D: Serbestlik derecesi

Ek 7. Depolama periyodu boyunca margarin gruplarının serbest asitlik değerlerine ait varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynağı	S.D	F Değerleri											
		0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	180
Uygulama	4	0	7,03**	2,4	3,44*	6,31**	15,14**	18,61**	15,83**	16,19**	13,69**	29,64**	5,82**
Bölge	1	0	1,79	4,94*	0,52	0,21	31,21**	37,77**	20,76**	63,47**	21,51**	35,7**	49,62**
Uygulama x Bölge	4	0	7,29**	0,87	1,55	1,46	4,2**	22,98**	2,23	1,4	2,02	5,65**	9,82**
Hata	30	0,0000333	0,000462	0,002691	0,003325	0,00171	0,001021	0,000657	0,000947	0,000329	0,000869	0,000341	0,000643
Toplam	39												

* : %5 seviyesinde önemli

** : %1 seviyesinde önemli

S.D: Serbestlik derecesi

Ek 8. Depolama periyodu boyunca margarin gruplarının peroksit sayısı değerlerine ait varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynağı	S.D	F Değerleri											
		0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	180
Uygulama	4	-	5,85**	3,12*	2,34	75,43**	239,29**	74,22**	204,19**	174,29**	199,17**	107,32**	163,82**
Bölge	1	-	1,32	1,08	0,32	1,56	40,21**	5,73*	28,91**	44,15**	81,56**	44,15**	88,04**
Uygulama x Bölge	4	-	0,35	0,7	0,89	1,92	5,89**	0,74	3,92*	1,48	7,8**	1,57	15,47**
Hata	30	-	0,5146	0,1546	0,177	0,1205	0,106	0,39	0,253	0,292	0,251	0,859	0,718
Toplam	39												

* : %5 seviyesinde önemli

** : %1 seviyesinde önemli

S.D: Serbestlik derecesi

Ek 9. Margarin gruplarının 90. güne ait yağ asitleri değerlerine ilişkin varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynağı	S.D	F Değerleri								
		C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1 CIS	C18:2 CIS	C18:3 CIS
Uygulama	4	5,8**	3,62*	3,76*	2,82*	1,16	5,12**	1,78	3,58*	4,65**
Bölge	1	0,32	10,86**	26,92**	20,58**	0,24	0,73	14,51**	89,25**	0,00
Uygulama x Bölge	4	0,41	0,13	0,16	0,56	1,08	0,56	0,11	0,34	0,51
Hata	30	0,0001975	0,002836	0,000455	0,0555	0,0006717	0,01975	0,02799	0,01005	0,003513
Toplam	39									

* : %5 seviyesinde önemli

** : %1 seviyesinde önemli

S.D: Serbestlik derecesi

Ek 9. Margarin gruplarının 90. güne ait yağ asitleri değerlerine ilişkin varyans analiz tablosu (Devamı)

Varyasyon Kaynağı	S.D	F Değerleri										
		C20:0	C20:1	C22:0	Diğerleri	Toplam	SAFA ¹	MUFA ²	PUFA ³	Omega 3	Omega 6	MUFA+PUFA
Uygulama	4	2,32	0,6	3,3*	3,52*	0,97	3,87*	3,07*	6,03**	4,65**	3,58	4,39**
Bölge	1	1,83	0,01	0	0,81	0,10	10,39**	3,51	69,82**	0,00	89,25**	5,44*
Uygulama x Bölge	4	0,76	1,4	0,71	2,29	0,58	0,57	0,81	0,60	0,51	0,34	0,66
Hata	30	0,004907	0,007378	0,01516	0,001934	0,0000258	0,4104	0,3551	0,01293	0,003513	0,01005	0,3415
Toplam	39											

* : %5 seviyesinde önemli ** : %1 seviyesinde önemli S.D: Serbestlik derecesi

¹: Doymuş yağ asitleri ²: Tekli doymamış yağ asitleri ³: Çoklu doymamış yağ asitleri

Ek 10. Margarin gruplarının 180. güne ait yağ asitleri değerlerine ilişkin varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynağı	S.D	F Değerleri								
		C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1 CIS	C18:2 CIS	C18:3 CIS
Uygulama	4	1,01	0,45	2,95*	5,28**	0,41	2,54	3,27*	1,77**	1,03
Bölge	1	3,87	25,19**	57,80**	54,60**	0,19	10,85**	40,65**	76,44**	1,39
Uygulama x Bölge	4	0,22	0,58	0,94	0,72	0,41	0,82	0,5	1,12	0,77
Hata	30	0,0001267	0,002768	0,0005233	0,04933	0,0001158	0,00714	0,02019	0,03336	0,02892
Toplam	39									

* : %5 seviyesinde önemli

** : %1 seviyesinde önemli

S.D: Serbestlik derecesi

Ek 10. Margarin gruplarının 180. güne ait yağ asitleri değerlerine ilişkin varyans analiz tablosu (Devamı)

Varyasyon Kaynağı	S.D	F Değerleri										
		C20:0	C20:1	C22:0	Diğerleri	Toplam	SAFA ¹	MUFA ²	PUFA ³	Omega 3	Omega 6	MUFA+PUFA
Uygulama	4	0,59	0,96	1,63	2,09	0,34	0,76	0,74	1,63	0,03	4,77**	0,45
Bölge	1	1,75	0	4,47*	8,93**	0,77	4,82*	0,03	44,30**	1,39	76,44**	1,37
Uygulama x Bölge	4	0,79	0,93	1,5	0,18	0,34	1,3	0,99	0,99	0,77	1,12	1,16
Hata	30	0,00028	0,02953	0,008196	0,001295	0,0000292	0,5866	0,5683	0,05953	0,02892	0,03336	0,5156
Toplam	39											

* : %5 seviyesinde önemli ** : %1 seviyesinde önemli S.D: Serbestlik derecesi

¹: Doymuş yağ asitleri ²: Tekli doymamış yağ asitleri ³: Çoklu doymamış yağ asitleri

Ek 11. Depolama periyodunun 0, 90 ve 180. günlerinde margarin gruplarında ölçülen galik asit eşdeğeri olarak toplam fenolik madde miktarlarına ait varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynağı	S.D	F Değerleri		
		0	90	180
Uygulama	4	0	48,58**	113,84**
Bölge	1	0	0,9	35,01**
Uygulama x Bölge	4	0	0,93	74,45**
Hata	30	33,33	2177	265
Toplam	39			

* : %5 seviyesinde önemli

** : %1 seviyesinde önemli

S.D: Serbestlik derecesi

Ek 12. Depolama periyodunun 180. gününde margarin gruplarında yapılan duyuşsal analiz sonuçlarına ait varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynağı	S.D	F Değerleri			
		Görünüş	Yapı	Tat	Koku
Uygulama	2	72,19*	15,84*	1145,15*	218,76*
Hata	27	1,61	1,42	1,17	0,726
Toplam	29				

* : %5 seviyesinde önemli

**:%1 seviyesinde önemli

S.D: Serbestlik derecesi

ÖZGEÇMİŞ

21.06.1979 tarihinde Antalya'nın Akseki İlçesi'nde doğdu. İlkokulu Antalya'da Atatürk İlkokulu'nda, ortaokul ve lise öğrenimini Antalya Anadolu Lisesi'nde tamamladı. Lisans eğitimini Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde 2001 yılında tamamlayarak mezun oldu. Aralık 2001 tarihinde Antalya Ekmek Fabrikasında çalışmaya başladı. 2002-2005 yılları arasında İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyoteknoloji bölümünde aynı zamanda bir TÜBİTAK projesi olan tezini tamamlayarak yüksek lisans eğitimini gerçekleştirdi. Aynı zamanda 31.12.2002 tarihinde araştırma görevlisi kadrosuna atandı ve görevine 01.09.2005 tarihine kadar devam etti. 03.10.2005 tarihinde Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Lüleburgaz İlçe Müdürlüğü'nde gıda mühendisi olarak göreve başladı. 15.11.2007-15.02.2013 tarihleri arasında Çorlu İlçe Müdürlüğünde görevine devam etti. 2006 yılında Namık Kemal Üniversitesi'nde Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda doktora programına başladı. Halen Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Sarayönü İlçe Müdürlüğünde Kontrol Görevlisi olarak görevine devam etmektedir.