

## ***Lactobacillus rhamnosus* GG VE *Bifidobacterium bifidum* BB-12 İÇEREN YENİLEBİLİR FİLMLEİN KARAKTERİZASYONU**

**Huriye GÖZDE CEYLAN<sup>\*1</sup>, Ahmet Ferit ATASOY<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Adiyaman Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Adiyaman, 02040, Türkiye

<sup>2</sup>Harran Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Şanlıurfa, 63010, Türkiye

Geliş Tarihi/Received Date: 14.02.2022 Kabul Tarihi/Accepted Date: 01.03.2022 DOI: 10.54365/adyumbd.1073615

### **ÖZET**

Bu çalışmada *Lactobacillus rhamnosus* GG ve *Bifidobacterium bifidum* BB-12 içeren sodyum kazeinat esaslı filmler bazı özellikler açısından karakterize edilmiştir. Bu amaçla, sodyum kazeinat esaslı %0 fruktooligosakkarit + %0 inülin, %0 fruktooligosakkarit + %1 inülin ve %1 fruktooligosakkarit + %0 inülin içeren film solüsyonlarına *Lactobacillus rhamnosus* GG ve *Bifidobacterium bifidum* BB-12 ilave edilerek altı adet film üretimi gerçekleştirilmiştir. Filmlerin bazı fizikokimyasal, bariyer ve renk özellikleri ile 4 °C’de depolama boyunca probiyotik organizma stabiliteleri araştırılmıştır. Fruktooligosakkarit ve inülin ilavesinin filmin kalınlığı, suda çözünürlüğü ve rengi üzerinde etkisi önemli bulunmuştur. Test edilen film formülasyonlarında kullanılan probiyotiklerin depolama stabilitelerinin yüksek olduğu belirlenmiş, ancak depolama stabilitesinin fruktooligosakkarit ve inülin ilavesi ile azaldığı tespit edilmiştir. *L. rhamnosus* GG ve *B. bifidum* BB-12 içeren filmlerin tahmini raf ömrü değerleri sırası ile 51-98 ve 68-82 gün aralığında hesaplanmıştır. Çalışma sonuçları, kullanılan film formülasyonlarının *B. bifidum* BB-12 ve *L. rhamnosus* GG için iyi birer taşıyıcı olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Yenilebilir film; *Lactobacillus rhamnosus* GG; *Bifidobacterium bifidum* BB-12; Prebiyotik; İnülin; Fruktooligosakkarit

## **CHARACTERIZATION OF EDIBLE FILMS CONTAINING *Lactobacillus rhamnosus* GG AND *Bifidobacterium bifidum* BB-12**

### **ABSTRACT**

In this study, sodium caseinate films containing *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 were characterized in terms of some properties. Six films were produced by adding *L. rhamnosus* GG and *B. bifidum* BB-12 to sodium caseinate film solutions containing 0% fructooligosaccharide + 0% inulin, 0% fructooligosaccharide + 1% inulin and 1% fructooligosaccharide + 0% inulin. Physicochemical, barrier, and color properties and the stability of probiotics during storage at 4 °C were investigated. The effect of fructooligosaccharide and inulin on the thickness, water solubility, and color of the film was significant. The storage stability of the probiotics was high, but it decreased with the addition of fructooligosaccharide and inulin. The estimated shelf life of films containing *L. rhamnosus* GG and *B. bifidum* BB-12 were between 51-98 and 68-82 days, respectively. The results showed that the tested film formulations were good carriers for *B. bifidum* BB-12 and *L. rhamnosus* GG.

**Keywords:** Edible film; *Lactobacillus rhamnosus* GG; *Bifidobacterium bifidum* BB-12; Prebiotic; Inulin; Fructooligosaccharide

### **1. Giriş**

Yenilebilir filmler ve kaplamalar nem, karbondioksit, oksijen, tat ve aroma transferini kontrol ederek gıda maddelerinin raf ömrünü ve kalitesini korumayı amaçlayan materyallerdir [1]. Yenilebilir ambalaj malzemeleri antioksidanlar, renklendiriciler, probiyotikler ve probiyotikler gibi fonksiyonel

\*1e-posta : hgyildiz@adiyaman.edu.tr ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7363-554X> (Sorumlu Yazar)

<sup>2</sup>e-posta : fatasoy@harran.edu.tr ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3390-1177>

bileşenlerin taşıyıcıları olarak kullanılmakta ve biyoaktif ambalaj malzemeleri olarak fonksiyonel gıdaların üretilmesine olanak sağlamaktadırlar [2].

Probiyotik terimi, yeterli sayıda alındığında konakçı üzerinde faydalı etkileri olan canlı mikroorganizmaları tanımlamak için kullanılmaktadır [3]. Gıdanın yapısı, pH, sıcaklık, üretim ve saklama koşulları ve gastrointestinal sistemdeki safra gibi faktörler son ürünlerdeki probiyotik canlılığını etkilemektedir. Bu nedenle, son üründe probiyotik organizma canlılığını artırmak için birçok yenilikçi yaklaşım ortaya çıkmaktadır. Yenilebilir ambalaj malzemeleri probiyotiklerin taşınmasında alternatif bir yöntem olarak kabul edilmekte ve yenilebilir ambalaj formülasyonlarında probiyotiklerin kullanıldığı yayınların sayısı son yıllarda giderek artış göstermektedir [4].

Prebiyotikler, gastrointestinal mikrobiyotada bir veya sınırlı sayıdaki bakterinin gelişmesini veya aktivitesini seçici olarak arttıran, konakçının sağlığı üzerinde fayda sağlayan sindirilemeyen bileşenler olarak tanımlanmaktadır [4]. Probiyotik mikroorganizmalarla birlikte prebiyotikler gibi fonksiyonel bileşenler de gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Nişasta [5], peynir altı suyu proteini [2, 6-7], aljinat [8-9], selüloz [10-11], jelatin [12] gibi farklı polimer esaslı probiyotik yenilebilir film ve kaplama formülasyonlarında prebiyotiklerin kullanıldığı pek çok çalışma mevcuttur. Bu prebiyotik ajanların yenilebilir filmlerde probiyotik organizmaların canlılığını arttırdığı bildirilmiştir [5, 10, 12]. Probiyotik filmlerin kabul edilebilirliğini probiyotik organizma stabilitesi ve film özelliklerinin kombinasyonu belirlemektedir. Bu nedenle, yenilebilir filmlerde probiyotiklerin prebiyotiklerle kombinasyonunu ilişkilendiren çalışmalar son yıllarda önemli bir çalışma alanını oluşturmaktadır. Bilgimiz dahilinde, sodyum kazeinat esaslı probiyotik filmlerde fruktooligosakkarit (FOS) ve inulin (IN) kullanılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada sodyum kazeinat esaslı %0 FOS + %0 IN, %0 FOS + %1 IN ve %1 FOS + %0 IN içeren film formülasyonlarına *B. bifidum* BB-12 ve *L. rhamnosus* GG ilave edilerek üretilen yenilebilir filmlerde bazı özellikler ve probiyotik organizmaların stabilitesi incelenmiştir.

## 2. Materyal ve Metod

### 2.1. Materyal

Sodyum kazeinat ve IN Kimbiotek A.Ş.'den (İstanbul), FOS Sinerji Gıda Kimya Tekstil San. ve Tic. A.Ş.'den (İstanbul) ve gliserol Sigma-Aldrich'ten (Stenheim, Almanya) tedarik edilmiştir. *Lactobacillus rhamnosus* GG ve *Bifidobacterium bifidum* BB-12 liyofilize kültürleri Chr. Hansen A/Ş'den (İstanbul) temin edilmiştir. Sodyum klorür, fosfat tamponlu tuzlu su (PBS), gliserol, L-sistein-HCl, de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) agar ve broth Merck'ten tedarik edilmiştir.

### 2.2. Metod

#### 2.2.1. Probiyotik kültürlerin hazırlanması, çoğaltılması ve ayrılması

0.1 g *L. rhamnosus* GG ve *B. Bifidum* BB-12 liyofilize kültürleri sırası ile 10 mL steril MRS ve %0.05 (a/h) oranında sistein içeren MRS broth'a aktarılarak 37 °C'de 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen taze kültürler 1000 mL steril MRS broth içine aşılansak anaerobik koşullarda 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 50 mL'lik hacimlerde steril tüplere aktarılan kültürler 3000 g ve 4 °C'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra 5 mL PBS ile yıkanmıştır. Bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır [13]. Her bir film çözeltisine toplam 150 mL besiyerden elde edilen pelletler aktarılmıştır.

#### 2.2.2. Film çözeltisinin hazırlanması ve film üretimi

Film çözeltileri %5 (a/h) sodyum kazeinat ve toplam katı madde miktarının %30'u oranında gliserol (a/a) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Polimer, gliserol ve prebiyotikler ile hazırlanan çözelti

manyetik karıştırıcıda sabit hızda 1 saat karıştırılmış ve ardından su banyosunda 90 °C'de 30 dakika ısıtılma işlemine tabi tutulmuştur. UV altında 40 °C'ye kadar soğutulan film çözeltisine probiyotik pelletler (9 log kob/mL) ilave edilmiştir. Pelletlerin tamamen çözünmesi için film çözeltisi 20 dakika manyetik karıştırıcıda homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sonunda aseptik koşullarda 8.5 mL film solüsyonu, 8.5 cm çaplı steril petrilere dökülerek oda sıcaklığında steril kabin içerisinde 16 saat kurumaya bırakılmıştır [14].

Çalışmada %0 FOS + %0 IN + *B. bifidum* BB-12, %0 FOS + %1 IN + *B. bifidum* BB-12, %1 FOS + %0 IN + *B. bifidum* BB-12, %0 FOS + %0 IN + *L. rhamnosus* GG, %0 FOS + %1 IN + *L. rhamnosus* GG, %1 FOS + %0 IN + *L. rhamnosus* GG içeren olmak üzere altı adet örnek grubu elde edilmiştir. Elde edilen filmler steril pens ile soyulmuş ve steril kilitli poşetler içinde muhafaza edilmiştir. Probiyotik organizma canlılığının tespit edileceği örnekler 4 °C'de 90 gün muhafaza edilmiş ve depolamanın 0., 7., 15., 45., 60. ve 90. günlerinde analizler gerçekleştirilmiştir. Fizikokimyasal analizler için örnekler %53 ± 2 bağıl nem ve 25 ± 2 °C sıcaklıkta 48 saat şartlandırma işleminin ardından analize tabi tutulmuştur. Tüm analizler 3 paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

### 2.2.3. Filmlerin fizikokimyasal, bariyer ve renk özellikleri

Filmlerin kalınlıkları 0.001 hassasiyet ile dijital bir mikrometre (Insize, 3108-25A, Germany) yardımıyla tespit edilmiştir. Bu amaçla rastgele seçilen 3 örnekte en az 6 noktadan ölçüm alınmış ve ortalama film kalınlığı hesaplanmıştır.

Suda çözünürlüğün tespiti için 105 °C'de 12 saat kurutulmuş sabit tartıma getirilen film örnekleri distile su içinde manyetik karıştırıcı ile 3 dakika karıştırılmıştır. Ardından film yeniden sabit tartıma ulaşmaya kadar 105 °C'de kurutulmuş ve son ağırlığı kaydedilmiştir. Kuru filmin çözünme öncesi ve sonrası ağırlık farkı suda çözünen madde olarak kuru filmin başlangıç ağırlığı üzerinden % olarak hesaplanmıştır [15].

Filmlerin su buharı geçirgenliği (SBG) için özel kaplar içerisine 105 °C'de kurutulmuş silika jel aktarılmış ve kabın ağzı film ile sızdırmayacak şekilde kaplanmıştır. Ardından, örnekler saf su içeren desikatör içinde 25 °C'lik etüve yerleştirilmiş ve deney kaplarının 1'er saat aralıklar ile 8 saat boyunca zamana karşı ağırlık değişimleri kaydedilmiştir. SBG değerleri ASTM E 96 [16] metodunda verilen formüle göre hesaplanmıştır.

Filmlerin oksijen geçirgenliği (OG) için peroksit sayısı (PS) analizi esas alınmıştır. 25 mL'lik erlen içerisine 10 mL ayçiçek yağı aktarılmış ve erlenin ağzı film örneği ile hava geçirmeyecek şekilde kapatılmıştır. Erlenler 60 °C'de karanlık bir ortamda 10 gün depolanmış ve depolama sonunda ayçiçek yağlarında titrimetrik yöntem ile tespit edilen peroksit sayısı oksijen geçirgenliğinin yorumlanmasında kullanılmıştır [17].

Filmlerde kolorimetre ile (Minolta CR-400, Japonya) CIE Lab renk ölçüm sistemi esas alınarak L\*, a\*, b\* değerleri tespit edilmiştir.

### 2.2.4. Filmde probiyotik organizma sayımı

*L. rhamnosus* GG ve *B. bifidum* BB-12 sayımı için sırasıyla 1 g film 99 mL steril peptonlu su ve sodyum klorür içerisine aktararak 37 °C'lik su banyosunda çözünmeye bırakılmıştır. Çözünme işleminin ardından seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. *L. rhamnosus* GG ve *B. bifidum* BB-12 içeren örneklerin uygun dilüsyonları sırası ile MRS ve %0.05 (a/h) sistein içeren MRS agara dökme plak yöntemi ile aktarılmıştır. Probiyotik bakteri sayımları 37 °C'de anaerobik koşullarda 72 saat inkübasyon sonucunda gerçekleştirilmiştir [13].

Probiyotik mikroorganizmaların canlılığında depolama sırasında meydana gelen değişime ilişkin kinetik modelleme Denklem 1'e göre yapılmıştır.

$$\log N_t = \log N_0 - k_T t \quad (1)$$

Burada  $\log N_0$ ; başlangıç probiyotik organizma sayısı (kob/g),  $\log N_t$ ; belirli bir depolama süresindeki probiyotik organizma sayısı (kob/g), t; depolama süresi (gün),  $k_T$ ; T °C sıcaklıkta inaktivasyon oran sabitini (kob/g gün<sup>-1</sup>) ifade etmektedir. Ayrıca,  $k_T$  değeri ile probiyotik canlı sayısının 6 log kob/g değerine düşmesi gereken süre göz önüne alınarak raf ömrü değeri hesaplanmıştır.

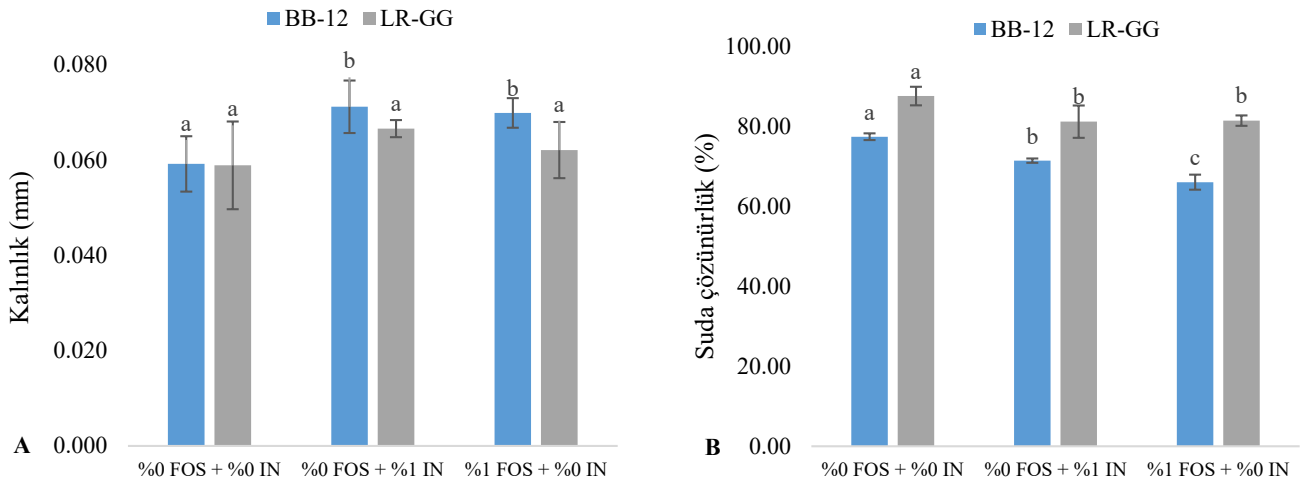
### 2.2.5. İstatistiksel analiz

Çalışmada elde edilen veriler SPSS yazılımı kullanılarak tek yönlü varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. Örnekler arasındaki farklılıklar %95 güven sınırında Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılarak belirlenmiştir.

## 3. Sonuç ve Tartışma

### 3.1. Filmlerin fizikokimyasal, bariyer ve renk özellikleri

Şekil 1'de film örneklerinin kalınlık (a) ve suda çözünürlük değerleri (b) verilmiştir. Kalınlık filmlerin optik, mekanik ve bariyer özelliklerini etkileyen en önemli parametrelerden biri olup film hazırlama yöntemi ve kuruma koşullarına göre değişiklik göstermektedir [15]. Film formülasyonunda FOS ve IN kullanımı film kalınlığında artışa neden olmuştur. *L. rhamnosus* GG filmlerin kalınlık değerlerinde meydana gelen artış istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ). Ancak, %1 FOS ve %1 IN içeren *B. bifidum* BB-12 filmlerinin kalınlık değerleri prebiyotik içermeyen filmden önemli ölçüde düşük bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Film kalınlık değerlerinde prebiyotik ilavesi ile meydana gelen artış sabit hacimdeki kuru madde artışı ve buna bağlı olarak film matrisinin değişmesine atfedilmektedir [18]. Soukoulis ve ark. [12] *L. rhamnosus* GG içeren filmlerde prebiyotik kullanımının film kalınlığı üzerinde etkisinin önemli olmadığını bildirmiştir. Bir başka çalışmada [18], *L. plantarum* içeren karboksimetilselüloz esaslı filmlerde IN kullanımının film kalınlığını önemli ölçüde etkilediği rapor edilmiştir.

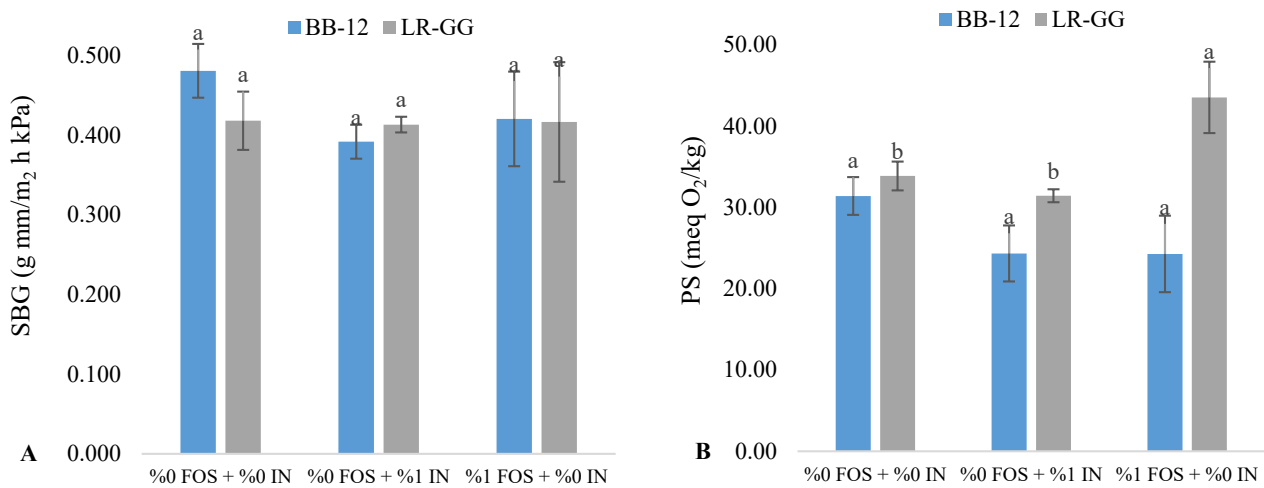


Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olacak şekilde verilmiştir. FOS: fruktooligosakkarit, IN: inülin. Farklı küçük harfler aynı örnek grubunda istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ( $p < 0.05$ ) ifade etmektedir.

**Şekil 1.** *B. bifidum* BB-12 ve *L. rhamnosus* GG içeren filmlerin kalınlık (A) ve suda çözünürlük değerleri (B)

Suda çözünürlük (SÇ) yenilebilir filmlerin gıda ve ilaç endüstrilerinde kullanımını belirleyen önemli özelliklerden biridir. SÇ filmlerin kimyasal yapısına bağlıdır ve filmin sudaki kararlılığını göstermektedir [19]. *B. bifidum* BB-12 ve *L. rhamnosus* GG içeren filmlerin SÇ değerlerinin FOS ve IN bulunması halinde, prebiyotik içermeyen örneklerle kıyasla önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ). Öte yandan, farklı polimer esaslı filmlerde FOS ve IN ilavesinin filmlerin SÇ değerlerini önemli düzeyde etkilemediği rapor edilmiştir [6-7]. Örneklerimizde kalınlık değerlerinde meydana gelen artış göz önüne alındığında, suda çözünürlükteki azalmanın film kalınlığındaki artış ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Film örneklerinin su buharı geçirgenliği (SBG) ve oksijen geçirgenliğinin yorumlanması için kullanılan peroksit sayısı (PS) değerleri Şekil 2’de verilmiştir. *L. rhamnosus* GG içeren filmlerin SBG değerlerinin prebiyotik ilavesi ile azaldığı tespit edilmiştir. Ancak, bu azalma istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Benzer şekilde, *B. bifidum* BB-12 içeren filmlerin SBG değerleri üzerinde formülasyona ilave edilen prebiyotik ajanların etkisinin önemli olmadığı belirlenmiştir ( $p>0.05$ ). Bizim bulgularımızın aksine, film formülasyonunda prebiyotik ajanların kullanıldığı bazı araştırmalarda [20-21] prebiyotik ilavesi ile SBG değerlerinin azaldığı belirtilmiştir.



Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. FOS: fruktooligosakkarit, IN: inülin. Farklı küçük harfler aynı örnek grubunda istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ( $p<0.05$ ) ifade etmektedir.

### Şekil 2. *B. bifidum* BB-12 ve *L. rhamnosus* GG içeren filmlerin SBG (A) ve PS (B) değerleri

Araştırma bulgularımız dikkate alındığında, film örneklerinin su buharı geçirgenliğinin yüksek olduğu görülmektedir. Bu durumun nedenleri arasında kullanılan sodyum kazeinatın kazein fraksiyonları oranları ve prebiyotiklerin higroskopik yapısı düşünülebilir. Hidrofilik özellikleri nedeniyle süt proteinleri esaslı yenilebilir filmlerin zayıf nem bariyeri özelliklerine sahip olduğu bildirilmektedir [21-22]. Bununla birlikte, prebiyotiklerin higroskopik yapısı sebebiyle filmin su moleküllerine olan ilgisinin artmasının polimerik matris boyunca su buharı difüzyonunu arttırdığı rapor edilmiştir [5].

%0 FOS + %0 IN, %0 FOS + %1 IN, %1 FOS + %0 IN içeren *B. bifidum* BB-12 filmlerin PS değerleri sırası ile 31.40, 24.33 ve 24.27 meq O<sub>2</sub>/kg olarak belirlenmiştir. *L. rhamnosus* GG ve %0 FOS + %0 IN, %0 FOS + %1 IN, %1 FOS + %0 IN formülasyonları ile hazırlanan filmlerin PS değerleri ise sırası ile 33.87, 31.43 ve 43.53 meq O<sub>2</sub>/kg olarak tespit edilmiştir. Filmlerin PS değerleri, tüm örneklerin oksijen bariyer özelliği gösterdiğini ve yağ oksidasyonunu azalttığını ortaya koymaktadır. Örneklerin PS değerleri üzerinde *B. bifidum* BB-12 filmlerde FOS ve IN etkisi önemli bulunmazken ( $p>0.05$ ), *L. rhamnosus* GG filmlerde %1 FOS ilavesinin etkisi önemli bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

Film bileşenlerinin polimer yapısı, film kalınlığı, plastikleştirici türü, yapısal konformasyonu ve uyumluluğu gibi özelliklerin filmlerin optik özelliklerini değiştirdiği bilinmektedir [19]. *B. bifidum* BB-12 ve *L. rhamnosus* GG filmlerin  $L^*$ ,  $a^*$  ve  $b^*$  değerleri Çizelge 1’de verilmiştir. Her iki örnek grubunda tespit edilen yüksek  $L^*$  değerleri, filmlerin şeffaf ve berrak özelliklere sahip olduğunu göstermektedir [6-7]. Yenilebilir filmlerin hazırlanmasında sıklıkla tercih edilen sodyum kazeinatın şeffaf film eldesine imkân sağladığı bilinmektedir [23]. Ayrıca,  $a^*$  ve  $b^*$  değerlerinin sıfıra yakın olması güçlü renk tonlarının olmadığını göstermektedir [5].

Formülasyona FOS ve IN ilavesinin film parlaklığında önemli bir değişime neden olmadığı saptanmıştır ( $p>0.05$ ). Benzer şekilde, Orozco-Parra ve ark. [5] tarafından *L. casei* içeren nişasta esaslı filmlerde IN ilavesinin film parlaklığını etkilemediği ifade edilmiştir. Bir başka çalışmada [7], peynir altı suyu protein izolatu ve aljinat esaslı probiyotik filmlerde IN ve FOS ilavesinin film parlaklığı üzerinde önemli bir değişime neden olmadığı bildirilmiştir.

**Çizelge 1.** *B. bifidum* BB-12 ve *L. rhamnosus* GG filmlerin  $L^*$ ,  $a^*$  ve  $b^*$  değerleri

Film	$L^*$	$a^*$	$b^*$
<b><i>B. bifidum</i> BB-12 filmler</b>			
%0 FOS + %0 IN	88.96±0.40 <sup>a</sup>	0.24±0.03 <sup>b</sup>	0.64±0.28 <sup>a</sup>
%0 FOS + %1 IN	89.01±0.41 <sup>a</sup>	0.25±0.02 <sup>b</sup>	1.02±0.02 <sup>a</sup>
%1 FOS + %0 IN	89.12±0.51 <sup>a</sup>	0.45±0.08 <sup>a</sup>	0.55±0.36 <sup>a</sup>
<b><i>L. rhamnosus</i> GG filmler</b>			
%0 FOS + %0 IN	91.82±0.14 <sup>a</sup>	0.94±0.05 <sup>a</sup>	-0.24±0.07 <sup>ab</sup>
%0 FOS + %1 IN	91.75±0.40 <sup>a</sup>	0.62±0.03 <sup>c</sup>	-0.11±0.07 <sup>a</sup>
%1 FOS + %0 IN	91.71±0.09 <sup>a</sup>	0.85±0.02 <sup>b</sup>	-0.53±0.24 <sup>b</sup>

<sup>a-c</sup>Satırlar arasındaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ( $p<0.05$ ) ifade etmektedir. Değerler ortalama ± standart sapma olacak şekilde verilmiştir. FOS: fruktooligosakkarit, IN: inülin.

*B. bifidum* BB-12 filmlerin  $b^*$  değerleri arasında önemli fark tespit edilmezken ( $p>0.05$ ), *L. rhamnosus* GG filmlerin  $b^*$  değerleri arasındaki fark önemli ( $p<0.05$ ) bulunmuştur. Ayrıca, her iki örnek grubunda, filmlerin  $a^*$  değerleri üzerinde film formülasyonunun istatistiksel olarak önemli bir değişime ( $p<0.05$ ) neden olduğu tespit edilmiştir. %1 FOS + %0 IN içeren *B. bifidum* BB-12 filmde  $a^*$  değeri diğer filmlere kıyasla yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). *L. rhamnosus* GG filmlerde ise prebiyotik kullanımı ile  $a^*$  değerinin azaldığı tespit edilmiştir.

Film kalınlığının optik özellikler üzerinde etkili olduğu bilinmektedir [24]. Bu nedenle, %1 FOS + %0 IN içeren *B. bifidum* BB-12 filmlerin  $a^*$  değerinde meydana gelen artış %1 FOS içeren film kalınlığının artışı ile ilişkilendirilebilir. *L. rhamnosus* GG içeren filmlerde  $a^*$  değerinde görülen azalmanın ise prebiyotik tipi ve formülasyonda yer alan bileşenlerin uyumluluğu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Orozco-Parra ve ark. [5] tarafından farklı konsantrasyonlarda IN içeren probiyotik filmlerin  $a^*$  ve  $b^*$  değerleri üzerinde IN ilavesinin etkili bulunmadığı rapor edilmiştir.

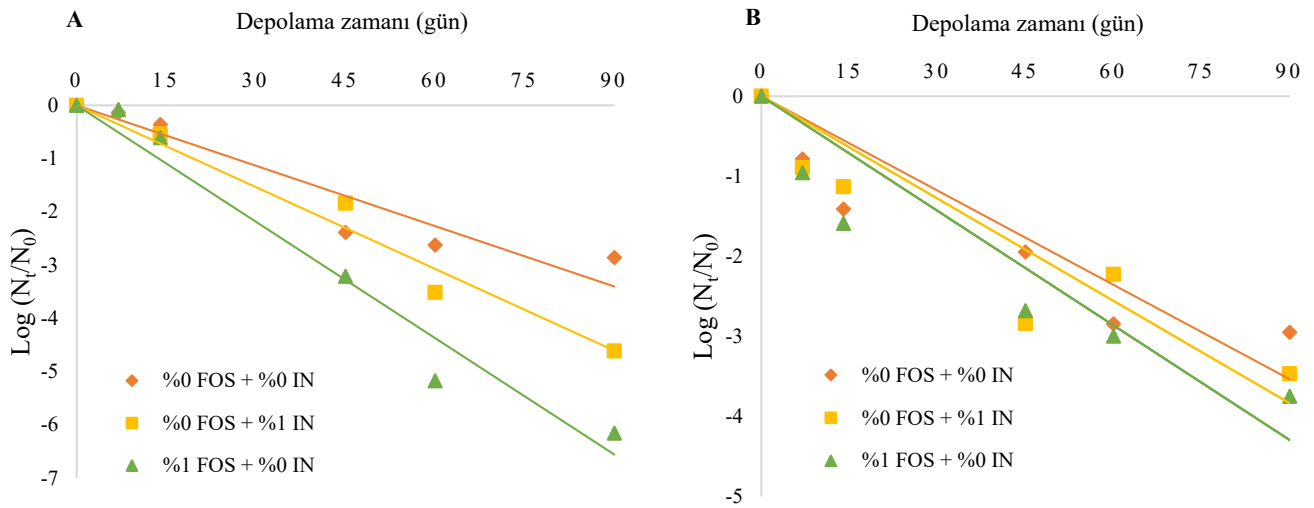
### 3.2. Filmlerde depolama boyunca probiyotik organizma canlılığı

Depolama periyodu boyunca *B. bifidum* BB-12 ve *L. rhamnosus* GG’ye ait inaktivasyon eğrileri Şekil 3’te gösterilmiştir. Ayrıca, probiyotiklerin inaktivasyon oranları ve filmlerin raf ömrü değerleri Çizelge 2’de verilmiştir. Film solüsyonunun kurutulması sonrası film örneklerinde probiyotik organizma sayıları 9 ile 10 log kob/g aralığında tespit edilmiştir (Veriler gösterilmedi). *B. bifidum* BB-12 ve *L. rhamnosus* GG’nin inaktivasyon oranı üzerinde film formülasyonuna prebiyotik ilavesi önemli ( $p<0.05$ ) bulunmuştur. Beklenenin aksine, %1 FOS ilavesi *B. bifidum* BB-12 ve *L. rhamnosus* GG’nin inaktivasyon hızında prebiyotik içermeyen örneğe kıyasla önemli ( $p<0.05$ ) bir artışa neden olmuştur.

%1 IN ilavesi *B. bifidum* BB-12 inaktivasyon hızının artmasına neden olmuş ( $p<0.05$ ), ancak *L. rhamnosus* GG'nin inaktivasyon hızında önemli bir farka yol açmamıştır ( $p>0.05$ ).

Prebiyotik ajanların yenilebilir probiyotik filmlerde depolama stabilitesini arttırdığı pek çok çalışmada [5, 7, 12] bildirilmiştir. Ancak, bakteriyel selüloz ve kaju gamı esaslı yenilebilir film formülasyonunda probiyotik ve FOS etkisinin incelendiği çalışmada, test edilen sıcaklıklarda FOS ilavesinin depolama stabilitesini önemli ölçüde arttırmadığı ifade edilmiştir [10]. Aynı çalışmada, FOS'un depolama üzerinde belirgin etkisinin olmaması, probiyotiğin FOS içermeyen filmdeki stabilitesinin depolama sırasında oldukça yüksek olması sebebiyle FOS etkisinin tespit edilemeyecek kadar küçük olması ile açıklanmıştır. Benzer şekilde, çalışmamızda test edilen film formülasyonlarında probiyotik organizmaların depolama stabilitesi oldukça yüksek bulunmuştur.

Aynı zamanda, çalışmamızda FOS ve IN ilavesinin probiyotiklerin depolama stabilitesi üzerinde beklenen etkiyi göstermemesi film yoğunluğu ile açıklanabilir. Film kalınlığının artması daha yüksek yoğunlukta film elde edilmesine sebep olmaktadır. Film yoğunluğunda meydana gelen artış sebebiyle filmin tartılması aşamasında prebiyotik içeren filmlerin daha küçük yüzey alanına sahip parçaları, prebiyotik içermeyen örnek ile aynı ağırlığa karşılık gelmektedir. Bu durumun prebiyotik içeren film örneklerinin birim yüzey alanında daha az sayıda mikroorganizma bulunmasına sebep olabileceği düşünülmektedir.



**Şekil 3.** Depolama boyunca film örneklerinde *B. bifidum* BB-12 (A) ve *L. rhamnosus* GG'nin (B) inaktivasyon eğrileri

*B. bifidum* BB-12 filmlerinde raf ömrü değerleri %0 FOS + %0 IN, %0 FOS + %1 IN ve %1 FOS + %0 IN içeren film örnekleri için sırası ile 98, 70 ve 51 gün olarak hesaplanmıştır. *L. rhamnosus* GG içeren %0 FOS + %0 IN, %0 FOS + %1 IN ve %1 FOS + %0 IN film örneklerinin raf ömrü değerleri ise sırası ile 82, 73 ve 68 gün bulunmuştur. %1 FOS veya IN ilavesinin film örneklerinin raf ömrü süresinde önemli bir farka ( $p<0.05$ ) yol açtığı saptanmıştır. Soukoulis ve ark. [12] tarafından 4 °C'de depolanan jelatin esaslı *L. rhamnosus* GG içeren filmlerin raf ömrü değerleri sırasıyla 63 ile 100 gün arasında bulunmuştur. Phovisay ve ark. [25] 4 °C'de depolanan jelatin esaslı *L. casei* içeren filmlerin raf ömrü değerlerinin 67 ile 130 gün arasında olduğunu bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada [5], *L. casei* içeren tapyoka nişastası esaslı filmlerde 10 °C'de depolama boyunca %0 ve %0.5 IN içeren örneklerin inaktivasyon oranları sırası ile 0.181 ve 0.164 kob/g gün<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 2.** Depolama boyunca probiyotiklerin inaktivasyon oranları ve filmlerin tahmini raf ömrü değerleri

Film	İnaktivasyon Oranı (R <sup>2</sup> ) (kob/g gün <sup>-1</sup> )	Tahmini Raf Ömrü (gün)
<b><i>B. bifidum</i> BB-12</b>		
%0 FOS + %0 IN	0.086±0.001 <sup>c</sup> (0.892)	98±0.57 <sup>a</sup>
%0 FOS +%1 IN	0.120±0.003 <sup>b</sup> (0.958)	70±0.62 <sup>b</sup>
%1 FOS + %0 IN	0.167±0.003 <sup>a</sup> (0.967)	51±0.73 <sup>c</sup>
<b><i>L. rhamnosus</i> GG</b>		
%0 FOS + %0 IN	0.091±0.005 <sup>b</sup> (0.750)	82±1.03 <sup>a</sup>
%0 FOS +%1 IN	0.099±0.004 <sup>b</sup> (0.789)	73±1.51 <sup>b</sup>
%1 FOS + %0 IN	0.111±0.003 <sup>a</sup> (0.807)	68±1.11 <sup>c</sup>

<sup>a-c</sup>Satırlar arasındaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı (p<0.05) ifade etmektedir. Tahmini raf ömrü, probiyotik canlı bakteri sayısının 6 log kob/g değerine düşmesi için gereken süreyi ifade etmektedir.

Film örneklerinde test edilen probiyotiklerin depolama stabiliteilerinin yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum, kullanılan formülasyonların *B. bifidum* BB-12 ve *L. rhamnosus* GG için iyi birer taşıyıcı olduğunu göstermektedir. Protein esaslı sodyum kazeinat kullanımının probiyotiklerin depolama stabilitesi üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. Sodyum kazeinat esaslı filmlerde bakteri canlılığı için gerekli besin elementlerinin varlığının hücre stabilitesi üzerinde etkili olduğu söylenebilir. Bazı polisakkarit esaslı filmlere kıyasla protein esaslı filmlerde bakteri canlılığının daha yüksek olduğu bildirilmiştir [26-27]. Ayrıca, *B. bifidum* BB-12'nin *L. rhamnosus* GG'a kıyasla daha uzun süre canlı kaldığı görülmektedir. Bu durumun, polimer olarak kullanılan sodyum kazeinat içeriğinde bulunan aminoasitlerin bifidojenik faktör etkileri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [28].

#### 4. Sonuçlar

Bu çalışmada, *B. bifidum* BB-12 ve *L. rhamnosus* GG içeren sodyum kazeinat esaslı yenilebilir filmlerin hazırlanmasında %1 oranında FOS ve IN kullanılmıştır. Elde edilen filmler bazı fizikokimyasal, bariyer ve renk özellikleri açısından incelenmiştir. Ayrıca, 4 °C'de depolama sırasında probiyotik canlılığı araştırılmıştır. Test edilen filmlerin kalınlık, suda çözünürlük ve renk özellikleri farklı bulunmuştur. Ancak, filmlerin genel olarak benzer bariyer özelliklerine sahip olduğu tespit edilmiştir. *B. bifidum* BB-12 ve *L. rhamnosus* GG filmlerin tahmini raf ömrü değerleri sırası ile 51-98 ve 68-82 gün aralığında hesaplanmıştır. Beklenenin aksine, FOS ve IN probiyotiklerin depolama stabilitesi üzerinde koruyucu bir etki göstermemiştir.

FOS ve IN ilavesi *B. bifidum* BB-12 ve *L. rhamnosus* GG içeren sodyum kazeinat esaslı filmlerde depolama stabilitesi açısından istenilen etkiyi göstermemesine rağmen test edilen filmlerin raf ömrü değerleri oldukça yüksek bulunmuştur. Bu nedenle, mevcut çalışmada kullanılan yenilebilir film formülasyonlarının probiyotik içeren yenilebilir ambalaj teknolojisinde alternatif olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir. Ayrıca, yenilebilir filmlerde probiyotiklerin depolama stabilitesi üzerinde probiyotiklerin etkilerinin daha iyi incelenebilmesi için film yoğunluklarının tespit edilmesi veya canlı hücre sayısının kuru madde içeriği üzerinden hesaplanması gerektiği düşünülmektedir.

#### Teşekkür

Bu çalışma; Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi birimi tarafından HÜBAK 19021 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

#### Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları herhangi bir kurum, kuruluş, kişi ile kişisel ve finansal çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedirler.



**Kaynaklar**

- [1] Sothornvit R, Krochta JM. Plasticizers in edible films and coatings. In: Innovations in Food Packaging Academic Press; 2005.
- [2] Pereira JO, Soares J, Sousa S, Madureira AR, Gomes A, Pintado M. Edible films as carrier for lactic acid bacteria. *LWT* 2016;73:543–550.
- [3] FAO/WHO. Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. In: Food and Nutrition Paper; 2006.
- [4] Espitia PJP, Batista RA, Azeredo HMC, Otoni, CG. Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings. *Food Research International* 2016;90:42–52.
- [5] Orozco-Parra J, Mejía CM, Villa CC. Development of a bioactive synbiotic edible film based on cassava starch, inulin, and *Lactobacillus casei*. *Food Hydrocolloids*; 2020:104,105754.
- [6] La Storia A, Di Giuseppe FA, Volpe S, Oliviero V, Villani F, Torrieri E. Physical properties and antimicrobial activity of bioactive film based on whey protein and *Lactobacillus curvatus* 54M16 producer of bacteriocins. *Food Hydrocolloids*;2020:108.
- [7] Pereira JO, Soares J, Costa E, Silva S, Gomes A, Pintado M. Characterization of edible films based on alginate or whey protein incorporated with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and prebiotics. *Coatings* 2019;9(8).
- [8] Bambace MF, Alvarez MV, del Rosario Moreira M. Novel functional blueberries: Fructo-oligosaccharides and probiotic lactobacilli incorporated into alginate edible coatings. *Food Research International* 2019;122:653–660.
- [9] Rodrigues FJ, Cedran MF, Garcia S. Influence of linseed mucilage incorporated into an alginate-base edible coating containing probiotic bacteria on shelf-life of fresh-cut yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Food and Bioprocess Technology* 2018;11(8):1605–1614.
- [10] Oliveira-Alcântara AV, Abreu AAS, Gonçalves C, Fuciños P, Cerqueira MA, Gama FMP, Pastrana LM, Rodrigues S, Azeredo HMC. Bacterial cellulose/cashew gum films as probiotic carriers. *LWT* 2020;130.
- [11] Romano N, Tavera-Quiroz MJ, Bertola N, Mobili P, Pinotti A, Gómez-Zavaglia A. Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. *Food Research International* 2014;64:560–566.
- [12] Soukoulis C, Behboudi-Jobbehdar S, Yonekura L, Parmenter C, Fisk ID. Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in prebiotic edible films. *Food Chemistry* 2014;159:302–308.
- [13] Ebrahimi B, Mohammadi R, Rouhi M, Mortazavian AM, Shojae-Aliabadi S, Koushki MR. Survival of probiotic bacteria in carboxymethyl cellulose-based edible film and assessment of quality parameters. *LWT* 2018;87:54–60.
- [14] Soukoulis C, Behboudi-Jobbehdar S, Macnaughtan W, Parmenter C, Fisk ID. Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG incorporated in edible films: Impact of anionic biopolymers and whey protein concentrate. *Food hydrocolloids* 2017;70:345-355.
- [15] Kanmani P, Lim ST. Development and characterization of novel probiotic-residing pullulan/starch edible films. *Food Chemistry* 2013;141(2):1041–1049.
- [16] ASTM. Standard test methods for water vapor transmission of materials. American Society for Testing and Materials, E 96/E 96M; 1995.
- [17] Kurt A, Kahyaoglu T. Characterization of a new biodegradable edible film made from salep glucomannan. *Carbohydrate Polymers* 2014;104(1):50–58.
- [18] Zabihollahi N, Alizadeh A, Almasi H, Hanifian S, Hamishekar H. Development and characterization of carboxymethyl cellulose based probiotic nanocomposite film containing cellulose nanofiber and inulin for chicken fillet shelf life extension. *International Journal of Biological Macromolecules* 2020;160:409–417.
- [19] Shahrapour D, Khomeiri M, Razavi SMA, Kashiri M. Development and characterization of alginate/pectin edible films containing *Lactobacillus plantarum* KMC 45. *LWT* 2020;118: 108758.
- [20] Bersaneti GT, Mantovan J, Magri A, Mali S, Celligoi MAPC. Edible films based on cassava starch and fructooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis natto* CCT 7712. *Carbohydrate Polymers* 2016;151:1132–1138.

- [21] Fernandes LM, Guimarães JT, Silva R, Rocha RS, Coutinho NM, Balthazar CF, Calvalcanti RN, Piler CW, Pimentel TC, Neto RPC, Tavares MIB, Esmerino EA, Freitas MQ, Silva MC, Cruz AG. Whey protein films added with galactooligosaccharide and xylooligosaccharide. *Food Hydrocolloids* 2020;104:105755.
- [22] McHugh TH, Krochta JM. Milk protein based edible film and coating. *Food Technology* 1994;48(1):97–103.
- [23] Caprioli I, O’Sullivan M, Monahan FJ. Use of sodium caseinate/glycerol edible films to reduce lipid oxidation in sliced turkey meat. *European Food Research and Technology* 2009;228(3):433–440.
- [24] Piermaria J, Diosma G, Aquino C, Garrote G, Abraham A. Edible kefir films as vehicle for probiotic microorganisms. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2015;32:193–199.
- [25] Phovisay S, Siriwoharn T, Surawang S. (2018). Effect of drying process and storage temperature on probiotic *Lactobacillus casei* in edible films containing prebiotics. *Food and Applied Bioscience Journal* 2018;6(Special):105-116.
- [26] Sánchez-González L, Saavedra JIQ, Chiralt A. (2013). Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing *Lactobacillus plantarum*. *Food Hydrocolloids* 2013;33(1):92–98.
- [27] Sánchez-González L, Saavedra JIQ, Chiralt A. (2014). Antilisterial and physical properties of biopolymer films containing lactic acid bacteria. *Food Control* 2014;35(1):200–206.
- [28] Modler HW. (1994). Bifidogenic factors—sources, metabolism and applications. *International Dairy Journal* 1994;4(5):383–407.