

Nisin İlave Edilmiş Peyniraltı Suyu Protein İzolatı Filmlerin Karakterizasyonu ve *Listeria innocua*' ya Karşı Antimikrobiyel Etkilerinin Belirlenmesi

¹Selin KALKAN*, ²Zerrin ERGİNKAYA

¹Giresun Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Giresun

²Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Adana

*Sorumlu yazar: selin.kalkan@giresun.edu.tr

Geliş Tarihi: 20.10.2015

Düzeltilme Geliş Tarihi: 24.03.2016

Kabul Tarihi: 25.03.2016

Özet

Bu çalışmada, çeşitli oranlarda nisin içeren (2500, 5000, 7500 ve 10.000 IU cm⁻² film) yenilebilir peyniraltı suyu protein izolatı (PASP) filmler hazırlanarak, *in vitro* koşullarda, *Listeria innocua*' ya karşı antimikrobiyel etkilerinin belirlenmesi ve hazırlanan antimikrobiyel filmlerin fiziksel ve mekaniksel özelliklerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Antimikrobiyel etkinin belirlenmesi için, hazırlanan nisin ilaveli PASP filmlerden, 1 cm çapında diskler kesilerek, agar difüzyon yöntemi ile oluşan zon çapları ölçülmüştür. Ayrıca filmlerin, ambalaj materyali olarak kullanım potansiyelini belirlemek amacıyla, kalınlık, ağırlık, kurumadde oranı, nem içeriği, su buharı geçirgenliği, gözenek yapıları, çekme dayanımı (TS), uzama katsayısı (E) ve youngmodülü (YM) ile renk özellikleri gibi karakteristik özellikleri belirlenmiştir. *Listeria innocua*'ya karşı en yüksek antimikrobiyel etki, 10.000 IU cm⁻² nisin içeren PASP filmler ile sağlanmıştır. Ayrıca, elde edilen filmlerin oldukça ince, yüksek % nem içeriğinde, homojen bir film yüzeyi ile kuvvetli çekme dayanımı ve yüksek uzama katsayısına sahip olan şeffaf filmler olduğu tespit edilmiştir ($P<0,01$). Sonuç olarak, hazırlanan tüm PASP filmlerin *Listeria innocua*'nın gelişimi üzerine antimikrobiyel etkisinin bulunduğu ve film karakterizasyonlarının ambalaj materyali olarak kullanıma uygun olduğu belirlenmiştir ($P<0,01$).

Anahtar kelimeler: Nisin, peyniraltı suyu protein izolatı, yenilebilir filmler, antimikrobiyel, karakterizasyon

Characterization of Whey Protein Isolate Films Containing Nisin and Determination of Their Antimicrobial Effect Against *Listeria innocua*

Abstract

In this study, we aim to determine of antimicrobial properties containing nisin in various proportions (2500, 5000, 7500 and 10,000 IU cm⁻² film) edible whey protein isolates (PASP) films against *Listeria innocua* by *in vitro* and also requested to be determined physical and mechanical properties of prepared antimicrobial films. For the determination of effective antimicrobial films 1 cm diameter discs cut from prepared nisin containing PASP films and zone diameters were measured by the agar diffusion method. Also the films in order to determine the potential for use as packaging material, thickness, weight, solids ratio, moisture content, water vapor permeability, porosity, tensile strength (TS), elongation (E), and Young's Modulus (YM) as with the color properties characteristic properties were determined. The highest antimicrobial activity against *Listeria innocua* was achieved by PASP films containing 10.000 IUcm⁻² nisin films. Also, the obtained films very thin, having a high moisture content rate, having strong tensile strength and high elongation with a homogeneous film surface were found to be transparent films ($P<0.01$). As a result, it was determined that all PASP films have an antimicrobial effect against *Listeria innocua* and characterization of the films is suitable for use as packaging material ($P<0.01$).

Key words: Nisin, whey protein isolate, edible films, antimicrobial, characterization

Giriş

Son yıllarda tüketici taleplerinde, minimum işlem görmüş gıdalara olan ilginin artmasına bağlı olarak, ambalaj sektöründe de yeni teknolojilerin araştırılmasına ve kullanılmasına başlanmıştır. Bu teknolojilerden en fazla öne çıkan ise aktif ambalajlama tekniğidir. Aktif ambalajlama, ambalaj materyaline çeşitli aktif bileşenlerin katılımı yoluyla gerçekleşmektedir. Bu aktif bileşenler, antimikrobiyel özellikte olup, sentetik polimer ve yenilebilir film gibi farklı yapılar içinde etkinleşmektedirler. Antimikrobiyel ambalajlama olarak da tanımlanan bu yöntemde, aktif antimikrobiyel maddeler, ambalajlamada kullanılan film içerisine doğrudan katılabileceği gibi, küçük paketler halinde ambalaj materyali içerisine de yerleştirilmektedir (Ayana, 2007). Bu amaçla, ambalaj materyali olarak, polietilen esaslı, selüloz içerikli pek çok farklı bileşenden yararlanılmaktadır. Biyolojik olarak yıkıma uğrayan, protein, polisakkarit ve lipit gibi doğal polimerlerden elde edilen yenilebilir film ve kaplamalar, aktif ambalajlama materyali olarak kullanılmaktadır. Antimikrobiyel film ve kaplamaların üretiminde ise, hem kimyasal, hem de doğal antimikrobiyel maddelerden yararlanılmaktadır (Ayana ve Turhan, 2010).

Bir süt proteini olan peyniraltı suyu proteinleri, süt proteinlerinin %20'sini teşkil eder. Kazeinlerin aksine, fosfor içermezler ve kalsiyuma duyarlı değildirler. Tamamı, disülfid bağları içerir ve yapıyı stabilize eder (Sarıküş, 2006). Peyniraltı suyu protein filmleri, içerdikleri polar kısımlar nedeniyle, mükemmel oksijen bariyeri özelliklerine sahiptirler. Bu nedenle, özellikle et ve balık gibi gıdaların muhafazasında, meyve ve sebzelerdeki oksidatif renk değişiminin önlenmesinde, önemli etkiye sahiptirler. Peyniraltı suyu proteinleri, düşük ve orta nispi nemlerde mükemmel aroma ve yağ bariyeri özelliklerine sahip olmalarının yanı sıra, ürüne yüksek oranda parlaklık da kazandırmaktadırlar (Yılmaz ve ark., 2007). Peyniraltı suyu proteinlerinden hazırlanan filmlerin, mükemmel oksijen bariyeri özellikleri olmasına karşın, su buharı geçirgenlik özelliği hidrofilik yapısı nedeniyle, yeterince dirençli değildir. Peyniraltı suyu proteinlerinde üretilen filmler de şeffaf, kokusuz ve yüksek esneme kabiliyetine sahiptir (Sarıküş, 2006).

Doğal bir antimikrobiyel madde olan nisin, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*'in bazı şuşları tarafından üretilen protein yapısında, antibakteriyel etkiye sahip bir bakteriyosindir. Nisinin, *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Mycobacterium* spp., *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* spp., *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *Listeria* spp. türleridahil olmak üzere oldukça geniş bir etki

spektrumu bulunmaktadır (Kurt ve Zorba, 2005). Gıda kaynaklı önemli bir çok Gram pozitif patojen bakterilere karşı etkili olan nisinin, selüloz, naylon, peyniraltı protein izolatu, hidroksipropil metil selüloz, zein vb. birçok çeşit filmlere dahil edildiği ve bu paketlenme sistemlerinin nisinin taşıyıcısı olarak kullanıldığı, bir çok çalışma yapılmıştır. Nisin içeren yenilebilir filmlerin, gıda yüzeyindeki istenmeyen mikroorganizmalar üzerine olan inhibisyon etkisi, nisinin gıda matriksine difüzyonuna bağlıdır (Kalkan ve ark., 2014).

Listeria innocua, *Listeria* cinsine ait 6 türden biridir. *Listeria monocytogenes* ile birlikte et yüzeylerinden en fazla izole edilen *Listeria* türüdür. Gıda kaynaklı tehlikeli bir patojen olan, *L. monocytogenes* ile çok benzerlik gösterir fakat *L. innocua* patojen olmayan bir bakteridir. Bir gıdadaki *L. innocua* varlığı muhtemel bir *L. monocytogenes* varlığını ifade edeceği için, *L. innocua* gıda mikrobiyolojisi açısından önemli bir yüzey kontaminantıdır (Blair ve ark., 1997). Bu çalışmada, çeşitli oranlarda nisin içeren (2500, 5000, 7500 ve 10.000 IU cm⁻² film) yenilebilir peyniraltı suyu protein izolatu (PASP) filmler hazırlanarak, *in vitro* koşullarda, *L. innocua*'ya karşı antimikrobiyel etkilerinin belirlenmesi ve hazırlanan antimikrobiyel filmlerin fiziksel ve mekaniksel özelliklerinin tespit edilerek ambalaj materyali olarak kullanım potansiyelinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Peyniraltı suyu protein izolatu (BIPRO Whey Protein Isolate) Davisco Foods International. Inc.-USA) Hardline Nutrition, Türkiye'den temin edilmiştir. Kullanılan antimikrobiyel özellikteki nisin, balmumu ve köpük önleyici madde (silicon antifoam) Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA)'dan temin edilmiştir. Plastikleştirici olarak, Merck (Darmstadt, Germany) marka gliserol kullanılmıştır.

Mikroorganizma ve Stok Kültür Hazırlanması

Araştırmada bakteri kültürü olarak, *L. innocua* (ATCC 33090) kullanılmıştır. Oxford *Listeria* Selektif Agar (Merck) besiyerinde gelişen kolonilerden öze yardımıyla alınarak, her bir koloni 10 mL'lik % 0.6 yeast ekstrakt ilaveli, Triptik Soy Broth besiyerine inoküle edilmiştir. Daha sonra bakteri kolonileri 35 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası gelişen bakteri kolonileri 5000 d d⁻¹'da 10 dakika santrifüj edilerek, üst faz dökülmüştür. 5 mL'lik eppendorf tüpleri içerisinde, % 40 oranında gliserol içeren Tryptic Soy Yeast Extract Broth (TSYB) besiyerlerinde kültürler, stok kültür olarak -18 °C'de muhafaza edilmişlerdir (Koçan, 2007; Tatlı, 2009).

Standart Nisin Solüsyonun Hazırlanması

Nisin, 0.1 g tartılarak 2 mL 0.01 M HCl solüsyonu (pH 2) içerisinde çözündürülerek, 0.2 µm gözenek çaplı Millipore filtreden (Nalgene, Rochester, New York, USA) geçirilmiş ve 4 °C'de saklanmıştır (Cao-Hoang ve ark., 2010).

Nisin İlave Edilmiş Peyniraltı Suyu Protein İzolatı (PASP) Filmlerin Hazırlanması

Peyniraltı suyu protein izolatı (% 5 w/v) ve gliserol (% 2 w/v), % 0.04 CaCl₂w/v içeren 100 mL distile su içerisinde çözündürülmüştür. Çözeltilinin pH'sı, 1 M NaOH kullanılarak 8'e ayarlanmış ve daha sonra, 90 °C'de 30 dakika süresince, karıştırılarak, ısıtılmıştır. Karıştırma sırasında 0.1 mL köpük önleyici madde ilavesi yapılmıştır. Isıtmanın son 5 dakikası süresince, yavaş bir şekilde bal mumu (% 0,4 w/v) ilavesi gerçekleştirilmiştir. Homojenizatör yardımıyla, solüsyonun 22.000 d d⁻¹'da 2 dakika süresince homojenizasyonu sağlanmıştır. Tülbent (cendere bezi) yardımıyla, solüsyonun süzülmesi işlemi gerçekleştirildikten sonra, 23±2 °C'ye kadar soğutulmuştur. Soğutulmuş solüsyon içerisine, nisin 2500, 5000, 7500 ve 10.000 IU cm⁻² oranlarında ilave edilmiştir. Hazırlanan film solüsyonları, 50'şer mL olarak, teflon tepsilere aktarılmış ve 25 °C'de 24 saat süreyle kurumaya bırakılmıştır (Çağrı ve ark., 2002; Sarıkuş, 2006; Cao-Hoang ve ark., 2010).

Nisin İçeren PASP Filmlerin Antimikrobiyel Etkilerinin Belirlenmesi

Farklı antimikrobiyel madde içeriği ile hazırlanan yenilebilir filmlerin antimikrobiyel etkisi, agar difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Stok kültürlerden, öze ile *L. innocua*'ya ait koloniler, % 0.6 yeast ekstrakt ilaveli, Triptik Soy Broth besiyerine inoküle edilmiştir. Duyarlılık testi için inokülüm miktarı, McFarland 0.5 standart değerine ulaşıncaya kadar, 35°C'de inkübasyona bırakılmışlardır. Yoğunluğu ayarlanmış kültürlerden (10⁶ KOB/mL), 0.1 mL alınarak steril swab yardımıyla Petrillerdeki steril Nutrient Agar (Merck) besiyerine ekimler yapılmıştır. Antimikrobiyel etkisini belirlemek için hazırlanmış filmlerden, 1 cm çaplı steril delgeç yardımıyla kesilen disk şeklindeki filmler, yüzey ekimi yapılmış ve agar plağı üzerine yerleştirilmişlerdir. Petril, 35 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda, film disklerin etrafında oluşan berrak zon çapı ölçülerek, değerlendirme yapılmıştır (Emiroğlu Karagöz ve ark., 2010).

Filmlerin Kalınlık ve Ağırlık Ölçümleri

Filmlerin kalınlık ölçümünde, 0.001 mm hassasiyetli dijital mikrometreden yararlanılmıştır. Ölçümler, 6 farklı bölgeden yapılmış ve ortalama

değer su buharı geçirgenliği ve diğer mekanik özelliklerin belirlenmesinde hesaplamalarda kullanılmıştır (Atares ve ark., 2010).

Filmlerin Nem İçeriğinin Belirlenmesi

Her bir film örneği ±0.0001'e duyarlı hassas terazi kullanılarak, 0.2 g olarak tartılmış ve 105 °C'lik fırında 24 saat süresince kurumaya bırakılmıştır. Nem içeriği değerleri, kurutma sonrası her bir filmin ağırlık kaybının yüzdesi alınarak hesaplanmıştır (Gounga ve ark., 2007; Kowalczyk ve Baraniak, 2011).

Filmlerin Kuru Madde Yoğunluklarının Belirlenmesi

Film yoğunluklarının hesaplanmasında, doğrudan film ağırlıkları ve boyutlarından yararlanılmıştır. Hesaplama, aşağıda gösterilen formül (2.1) kullanılmıştır (Ramos ve ark., 2012).

$$\rho^s = m (A \gamma)^{-1} \quad (2.1)$$

ρ^s : Kuru madde yoğunluğu (g cm⁻³)

m: Kuru kütle ağırlığı (g)

A: Film yüzey alanı (cm²) γ : Film kalınlığı (cm)

Filmlerin Su Buharı Geçirgenliğinin Belirlenmesi

Filmlerin su buharı geçirgenliği, (SBG) ASTM E96-92 yöntemi kullanılarak, 25 °C'de gravimetrik olarak tespit edilmiştir. SBG ölçülmesinde, korozif olmayan özellikte Delrin (fleksiglass) kaplar kullanılmıştır. Kaplar, ASTM E96-92 standardında belirtilen ölçülerde yapılmıştır. Deney kaplarına, susuz kalsiyum klorür konulmuş ve filmler kap içine yerleştirilmiştir. Hazırlanan deney kapları, doymuş magnezyum nitrat çözeltisi (25 °C, % 53±2 bağıl nem, BN) içeren desikatöre konulmuştur. Desikatör, 25 °C tutulmuş ve deney kaplarının ağırlığındaki değişim zamana karşı ölçülmüştür. Ağırlık kaybı, 72 saat süresince, 4'er saatlik aralıklarla belirlenmiştir. Tartımlar, ± 0.0001 g duyarlılığa sahip terazi kullanılarak yapılmıştır. Ağırlık-zaman ilişkisinin doğrusal olduğu bilindiğinden, doğruların eğimleri bulunarak, aşağıdaki eşitlikte (2.2) yerine konulmuş ve filmlerin/kaplamaların su buharı geçirgenlikleri hesaplanmıştır. İç ve dış nispi rutubet farkından kaynaklanan basınç farkı ise, 1.750 KPa itici güce karşılık gelmektedir. Analizler, 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir (Ayana, 2007; De Moura ve ark., 2011; Ramos ve ark., 2012).

$$E_{\text{gim}} = PA \Delta p x^{-1} \quad (2.2)$$

P: Geçirgenlik (g mm m⁻²sa kPa)

Δp : Gazların kısmi basınç fark

x: Film kalınlığı (mm)

A: Yüzey alanı (m²)

Filmlerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İle Gözenek Yapılarının Belirlenmesi

Film materyallerinin film homojenliği, katman yapısı, yüzey yumuşaklığı ve gözenek yapısı analizleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile belirlenmiştir. SEM analizleri, Nova NanoSEM 200 cihazı ile 10 ile 15 kV arasında değişen voltajlarda gerçekleştirilmiştir (Garcia ve ark., 2009; Souza ve ark., 2010).

Filmlerin Çekme Dayanımı, Uzama Katsayısı ve Elastik Modülün Belirlenmesi (TS, E, YM)

Filmlerin mekanik özelliklerinin belirlenmesinde, ASTM D638 yöntemi esas alınmıştır. Filmlerden standartta belirtilen şekilde hazırlanmış, kalıp yardımıyla 80x25 mm boyutlarında kesilen örnekler, 25°C ve % 53±2 BN'de 48 saat bekletilmiştir. Örneklerin, çekme dayanımı ve % uzamaları TA-XT2 model mekanik test cihazı (Stable Micro Systems, Surrey, England) kullanılarak belirlenmiştir. Cihazın iki çenesi arasına yerleştirilen örnekler, 1 mm s⁻¹ çekme hızı ile test edilmişlerdir (Ayana, 2007; Atares ve ark., 2010).

Kopma anında örneğe uygulanan maksimum kuvvet ve kopma anındaki uzama miktarı, mekanik test cihazına bağlı bilgisayar programı (Texture Expert Exceed 2.3, Stable Micro System, Surrey, England) yardımıyla hesaplanmıştır. Kopma anında örneğe uygulanan kuvvetin, örneğin başlangıçtaki kesit alanına bölünmesiyle, gerilim (N mm⁻²), örneğin boyundaki değişimin başlangıçtaki boyuna oranlanmasıyla da uzama yüzdesi (2.3) hesaplanmıştır (Ayana, 2007; Kibar, 2010).

$$\% \text{uzama} = (L - L_0) L_0^{-1} 100^{-1} \quad (2.3)$$

L_0 : Filmlerin ilk uzunluğu

L : Filmlerin son uzunluğu

Filmlerin Renk Ölçümleri

Her bir film örneğinin, beyaz standart yüzey üzerinde, CR-410 kolorimetresi ile L^* (açıklık), a^* (kırmızı-yeşil) ve b^* (sarı-mavi) renk parametreleri ölçülmüştür. Filmlerin renk değişimleri (ΔE^*), aşağıda verilen eşitlikten (2.4) yararlanılarak hesaplanmıştır (Zinoviadou ve ark., 2009; Pires ve ark., 2011; Bahram ve ark., 2013).

$$\Delta E^* = [(L_o^* - L^*)^2 + (a_o^* - a^*)^2 + (b_o^* - b^*)^2]^{1/2} \quad (2.4)$$

Eşitlikte yer alan L_o, a_o ve b_o standart yüzeyin renk parametreleri iken, L, a ve b değerleri ise örneklerin renk parametreleridir.

İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler, "Windows SPSS 15.0 software" istatistik paket programı (SPSS Inc., Chiago, IL, USA) kullanılarak yapılmıştır. Tek

yönlü varyans analizi (ANOVA), denemeler arasında önem farklılıklarının karşılaştırılmasında, Duncan çoklu karşılaştırma testi, gruplar arasındaki farklılıkların karşılaştırılmasında kullanılmıştır ($P < 0,01$) (Royo ve ark., 2010).

Bulgular ve Tartışma

Nisin İçeren Peyniraltı Suyu Protein İzolatı Filmlerin *Listeria innocua* Üzerine Antimikrobiyel Etkisi

Yapılan denemeler sonucunda, 2500, 5000, 7500 ve 10.000 IU cm⁻² oranlarında nisin içeren peyniraltı suyu protein izolatu filmlerin tümünün, *L. innocua* üzerinde *in vitro* koşullarda inhibisyon etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Çizelge 1'de nisin içeren (2500, 5000, 7500 ve 10.000 IU cm⁻²) peyniraltı suyu protein izolatu filmlerin, *L. innocua*'ya karşı antimikrobiyel etkileri görülmektedir. Beklenildiği gibi, antimikrobiyel madde içermeyen kontrol filmlerin, *L. innocua*'ya karşı herhangi bir antimikrobiyel etkisi görülmemiştir.

Çizelge 1 incelendiğinde, nisin ilaveli peyniraltı suyu protein izolatu filmlerin, içerdiği nisin konsantrasyonlarına bağlı olarak, *L. innocua*'ya karşı antimikrobiyel etkide artış olduğu görülmektedir. Bu sonuç, istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0,01$). *L. innocua*'ya karşı en düşük antimikrobiyel etki, 2500 IU cm⁻² nisin içeren peyniraltı suyu protein izolatu filmlerde görülürken, en yüksek antimikrobiyel etki, 10.000 IU cm⁻² nisin içeren peyniraltı suyu protein izolatu filmler ile sağlanmıştır.

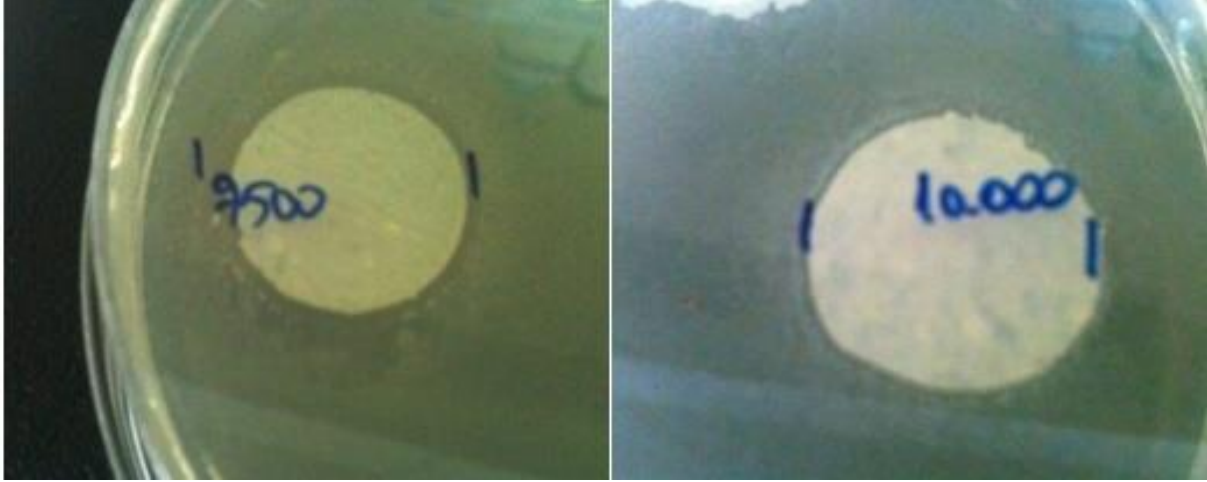
Çizelge 1'de de görüldüğü gibi, hazırlanan tüm nisin içeren peyniraltı suyu izolatu filmler, *L. innocua*'ya karşı antimikrobiyel etki göstermiştir. Bilindiği üzere nisin, Gram pozitif bakterilere karşı güçlü bir antimikrobiyal özellik sergilemektedir (Dawson ve ark., 2005; Campos ve ark., 2011). *L. innocua*, Gram pozitif bir apatojen olarak, nisin içeren peyniraltı suyu protein izolatu filmlerden etkilen bakteri kültürü olmuştur. Araştırma sonuçlarına benzer olarak, Ko ve ark. (2001) ile Reyes-Garcia ve ark. (2004), nisin içeren peyniraltı suyu protein filmler ile yaptıkları çalışmalarda, *L. monocytogenes* inaktivasyonunda başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Chi-Zhang ve ark. ise (2004), nisin ile kombine edilmiş paketleme materyallerinin, *L. monocytogenes* gelişmesini önlemede önemli bir yöntem olabileceğini belirtmişlerdir.

Nisin iki önemli etki mekanizmasına sahip olup, birincisi, membranlarda porlar oluşturarak hücre içindeki organellerin ve diğer maddelerin dışarı akmasını sağlamak, ikincisi ise, membranlarda Lipid II molekülünün, peptidoglikan zincirine birleşmesini önleyerek hücre duvarı sentezini durdurmaktır (Hampikyan ve Çolak, 2007). Nisin içeren yenilebilir filmlerin antimikrobiyel etkisi,

mikroorganizmanın gelişme oranı ile antimikrobiyal maddenin besiyerine difüzyon oranına bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Mikroorganizmanın gelişme oranı ile, antimikrobiyal maddenin besiyerine difüzyon oranı, agar kompozisyonundan, filmin kimyasal yapısı ile film içerisindeki çapraz

bağların oranından etkilenmektedir (Kalkan ve ark., 2014).

Şekil 1'de 7500 ve 10.000 IU cm⁻² nisin içeren peyniraltı suyu protein izolatu filmlerin, *Listeria innocua*'ya karşı antimikrobiyal etkileri görülmektedir.



Şekil 1. Nisin içeren (7500 ve 10.000 IU cm⁻²) peyniraltı suyu protein izolatu filmlerin *Listeria innocua*'ya karşı antimikrobiyal etkileri

Çizelge 1. Nisin içeren peyniraltı suyu protein izolatu filmlerin *L. innocua*'ya karşı antimikrobiyal etkileri

Nisin (IU cm ⁻²)	Zon çapları (mm)*	
	<i>Listeria innocua</i>	Film altında üreme*
K	0 ^A	+
2500	20.33±0.57 ^B	-
5000	21.66±0.57 ^{BC}	-
7500	22.66±0.57 ^C	-
10.000	26.66±0.57 ^D	-

*(+) Film altında üreme pozitif; (-) Film altında üreme negatif; A- D: aynı sütunda farklı harfleri taşıyan zon çapı ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0, 01$).

Nisin İçeren Peyniraltı Suyu Protein İzolatu Filmlerin Karakterizasyon

Yenilebilir filmlerin veya kaplamaların, gıda yüzeyine ya da ambalaj malzemesi olarak kullanıma uygunluğunu, o filmin veya kaplamanın mekanik, fiziksel ve duyuşal özellikleri belirler (Mehmetoğlu, 2010). Bu kapsamda gerçekleştirilen filmlerin kalınlık, ağırlık, nem içeriği, su buharı geçirgenliği, gözenek yapısı, çekme dayanımı, uzama katsayısı, elastik modülü ve renk ölçümleri *L. innocua*'ya karşı en fazla antimikrobiyal etkinin tespit edildiği 10.000 IU cm⁻² nisin içeren peyniraltı suyu protein izolatu filmler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Nisin içeren antimikrobiyal peyniraltı suyu protein izolatu filmlerin fiziksel ve mekanik özellikleri Çizelge 2'de gösterilmiştir.

Genel olarak, polimerik materyallerin mekanik özellikleri, dış kuvvetlerin etkisiyle ortaya çıkan, uzama, akma, kopma gibi deformasyonlarla tanımlanır. Bu malzemelerin en önemli özellikleri ise, deformasyonların sıcaklık ve zamana bağımlı

olarak ortaya çıkmasıdır (Ayana, 2007). Protein ve karbonhidratlar gibi hidrokarbonlardan yapılan filmlerin esneklik katsayıları, elastikiyet özellikleri yok denecek kadar düşüktür. Bu filmler, kırılma özelliğindedir. Bunun nedeni, protein ve polisakarit zincirleri arasındaki güçlü bağların moleküler hareketini kısıtlamasıdır. Bu bağları daha zayıf ve harekete izin veren bir bağ olan hidrojen bağına çevirmek için, film çözeltisine, plastikleştirici etki yapan gliserol, sorbitol, mannitol, sakkaroz gibi maddeler eklenir. Plastikleştiriciler, hidrojen bağlarıyla protein polimer zincirleri arasındaki mesafeyi artırarak, esneklik sağlarlar (Mehmetoğlu, 2010). Polimer filmlerin, mekanik özelliklerinin belirlenmesinde, yaygın olarak, gerilim direnci ve uzama miktarları ölçülür. Gerilim direnci, uygulanan dış kuvvete karşı malzemenin gösterdiği tepki, uzama ise, dış kuvvetlerin etkisiyle malzemenin geometrik durumundaki değişim olarak ifade edilir (Ayana, 2007; Skurtys ve ark., 2010). Filmin fiziksel özelliğini ise, filmin oksijen, karbondioksit ve su

buharı geçirgenliği belirler (Mehmetoğlu, 2010). Yenilebilir filmlerin önemli işlevlerinden biri, gaz veya daha da sık olarak su buharı için bariyer olarak kullanılabilirlerdir. Su buharı geçirgenliği, yenilebilir filmlerin en önemli ve en çok çalışılan bariyer özelliğidir. Gıdalardaki nem seviyeleri, tazeliği korumak, mikrobiyolojik gelişimi kontrol altında tutmak ve ağız dolgunluğu ve görünüm sağlamak için önemlidir (Sarıkuş, 2006). Filmler bileşen özelliklerine göre ve yapıma tekniğine göre, farklı bariyer özelliğine sahiptirler. Protein ve karbonhidrat gibi polar polimerler, düşük gaz geçirgenliği ve yüksek su buharı geçirgenliği değerleri gösterirler (Mehmetoğlu, 2010). Hidrofilik maddelerden oluşan yenilebilir filmlerin, su buharı geçirgenliği yüksektir. Hidrofilik filmlerde, düşük su aktivitelerinde suyun çözünürlük katsayısı ve nem difüzyonu düşüktür, dolayısıyla filmlerin geçirgenlikleri minimum düzeydedir. Filmlerin su aktivitesinin artması, filmlerin nem içeriğinin, dolayısıyla su buharı geçirgenliğinin artmasına neden olur. Yüksek su aktivitelerinde, matriksin su ile şişmesi, su moleküllerinin difüzyonunu artırır. Dolayısıyla, hidrofilik filmlerin su buharı geçirgenlikleri yüksektir. Bu nedenle, bu tip filmler düşük ve orta nemli gıdalarda kısa dönemli uygulamalar için uygundur (Ayana, 2007).

Bu bulgular ışığında Çizelge 2'deki değerler incelendiğinde, 10.000 IU cm⁻² nisin içeren peyniraltı suyu protein izolatu filmlerin oldukça düşük kalınlık değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Sivarooban ve ark (2008), tarafından yapılan bir çalışmada 10.000 IU nisin, EDTA ve üzüm çekirdeği ekstraktları ile zenginleştirilen soya protein izolatu filmlerin kalınlıklarının 0.609±2,93 - 0.25±5,55 mm arasında

olduğu tespit edilmiştir. Ko ve ark. (2001), tarafından yapılan bir başka çalışmada, nisin ilave edilmiş peyniraltı suyu protein izolatu filmlerin kalınlıklarının ortalama 0.244±8.5 mm olduğu bildirilmiştir.

Nisin içeren peyniraltı suyu protein izolatu filmlerin ağırlık değerleri incelendiğinde ise (Çizelge 2), ağırlık değerlerinin 3.686±0.352 g olduğu görülmektedir ($P<0.01$). Konu ile ilgili yapılan benzer çalışmalar incelendiğinde, filmlerin ağırlık değerlerinin ölçüm parametreleri arasında yer almadığı görülmektedir. Candoğan (2009), tarafından yapılan bir çalışmada ise, sadece antimikrobiyel aktivite testinde kullanılan film disklerin ağırlık değerleri ölçülmüş ve bu değerlerin 0.056±0.001 - 0.134±0.005 mg değerleri arasında değiştiği belirtilmiştir.

Çizelge 2'de görüldüğü gibi, 10.000 IU cm⁻² nisin ile zenginleştirilmiş filmlerin % 9.06±0.881 oranla, yüksek % nem içeriğine sahip olduğu görülmektedir ($P<0.01$). Protein polimerlerinden elde edilen filmler hidrofilik karakterdedirler ve filmlerin bu karakteristikleri artan nem oranı ile paralel olarak artış gösterir. Dolayısıyla, % nem içeriği yüksek olan filmlerin su buharı geçirgenliklerinin de yüksek olması beklenmektedir (Mehmetoğlu, 2010). Araştırma sonuçlarına benzer olarak, Martins ve ark. (2012) tarafından karregen ve keçiyoynuzu zamkı kullanılarak elde edilen filmlerin % nem içeriklerinin 13.69 - 26.77 değerleri arasında olduğu belirtilmiştir. Rubilar ve ark. (2013), tarafından yapılan farklı bir çalışmada ise kitosan filmlerin nem içeriklerinin 8.87 - 14.87 değerleri arasında olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 2. Nisin içeren (10.000 IU cm⁻²) peyniraltı suyu protein izolatu filmlerin karakteristik özellikleri

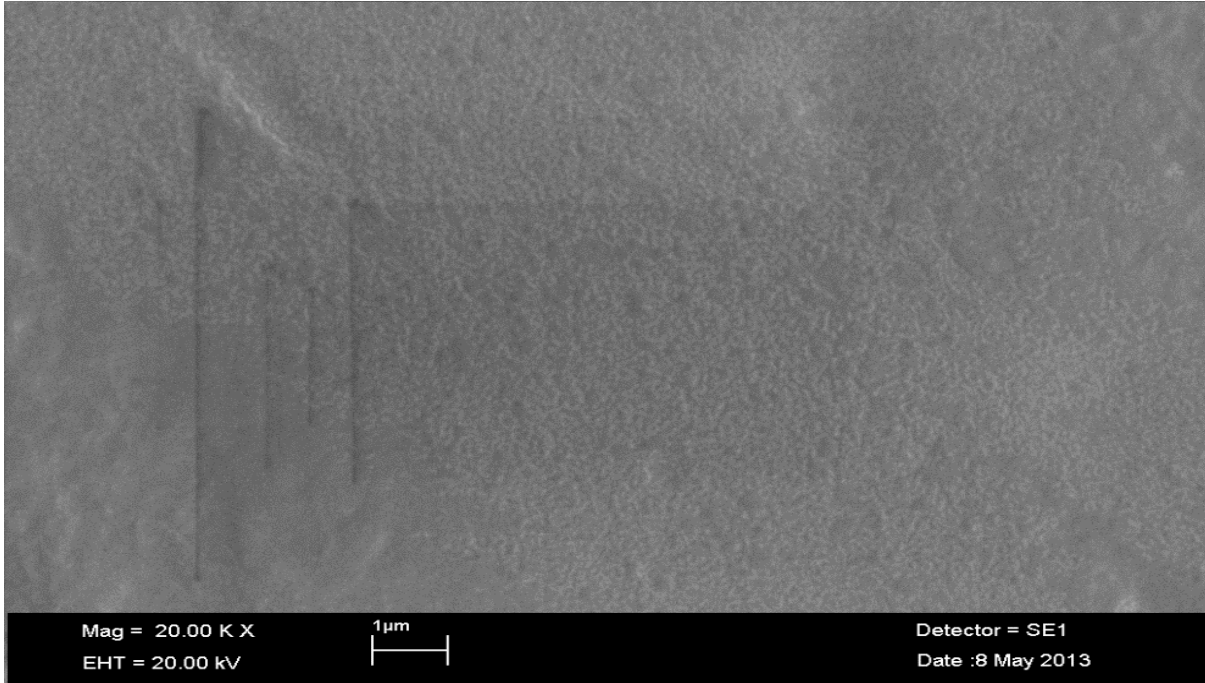
Film karakteristik özellikleri	Kontrol-PASP filmler	Nisin- PASP filmler (10.000 IU cm ⁻²)*
Kalınlık (mm)	0.333±0.029	0.167±0.024
Ağırlık (g)	5.093±0.003	3.686±0.352
Nem İçeriği (%)	7.93±1.105	9.06±0.881
Kurumadde Yoğunluğu (g cm ⁻³)	0.98±0.129	0.56±0.049
Su Buharı Geçirgenliği (g mm m ⁻² sa ⁻¹ kPa ⁻¹)	2.614±0.016	6.857±0.045
Çekme Dayanımı (TS; KPa)	0.823±0.114	0.955±0.182
Young Modülü (YM, KPa)	13.757±3.038	3.531±0.662
Uzama Katsayısı (% E)	38.438±0.556	48.302±0.311
Renk Özellikleri	L; 91.57±0.305 a; -1.59±0.037 b; 8.06±0.186 ΔE; 8.70±0.345	L; 92.10±0.290 a; -1.65±0.022 b; 8.94±0.271 ΔE; 9.02±0.371

*Ortalama ve standart hata

Antimikrobiyel özellikteki peyniraltı suyu protein izolatu filmlerin kuru madde yoğunluk değerlerinin ise $0.56 \pm 0.049 \text{ g cm}^{-3}$ olduğu Çizelge 2'de gösterilmiştir. Araştırma sonuçlarına benzer olarak, Wang ve ark. (2013), çay fenolikleri ile zenginleştirilen kitosan filmlerle yaptıkları bir çalışmada film yoğunluklarının, $1.102 \pm 0.078 - 1.231 \pm 0.120$ değerleri arasında olduğunu tespit etmişlerdir.

Filmlerin su buharı geçirgenliğinin değerlendirilmesinde, dikkate alınması gereken faktörler, polimerin yapısı ile antimikrobiyel maddenin polimer ile etkileşimidir. Çalışılan filmler, yapılarındaki hidroksil grupları nedeniyle hidrofil özelliktedir. Nisin içeren peyniraltı suyu protein izolatu filmlerin su buharı geçirgenlik değeri ise 6.857 ± 0.045 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 2). En düşük su buharı geçirgenlik değerine, herhangi bir

antimikrobiyel madde içermeyen kontrol filmler sahiptir. Su buharının, polimer süresince aktarımı suyun, önce yapıda çözünmesi ve daha sonra difüzyonu ile olmaktadır. Bu nedenle, polimer zincirleri arasındaki kuvvetli etkileşim, suyun difüzyonunu zorlaştırmakta ve su buharı geçirgenlik değerleri düşmektedir (Kalkan, 2014). Sonuçlar değerlendirildiğinde, beklenildiği gibi % nem içeriği yüksek olan filmlerin, su buharı geçirgenlik değerleri de yüksektir. Protein ve karbonhidrat gibi polar polimerler, düşük gaz geçirgenliği ve yüksek su buharı geçirgenliği değerleri gösterirler. Araştırma sonuçlarına benzer olarak, Mehmetoğlu (2010) tarafından yapılan bir derlemede, peyniraltı suyu protein izolatu filmlerin su buharı geçirgenliklerinin, $3.720 - 4.121 \text{ g mm}^{-2}\text{sa kPa}$ değerleri arasında olduğu belirtilmiştir.



Şekil 2. Kontrol-PASP filmlerin SEM mikrografisi

Çizelge 2'de gösterilen çalışma sonuçlarına göre nisin içeren peyniraltı suyu protein izolatu filmlerin uzama katsayısı (% E) 48.302 ± 0.311 , youngmodülü (YM, kPa) 3.531 ± 0.662 , çekme dayanımı (TS, kPa) ise 0.955 ± 0.182 olarak tespit edilmiştir. Molekül ağırlığının artmasıyla, polimer zincirlerinin griftliği ve moleküller arası çekim kuvvetleri artmaktadır. Bunun sonucu olarak, Young Modülü artmakta, malzeme sertleşmektedir. Molekül ağırlığının artmasıyla, kopma gerilimi ve kopmada uzama da, aynı şekilde önce artmakta, daha sonra fazla değişmemektedir (Kibar, 2010). Sonuç olarak, molekül ağırlığının artmasıyla, malzeme daha sert ve dayanıklı olmaktadır. Araştırmamız sonuçlarına benzer olarak, Ko ve ark.

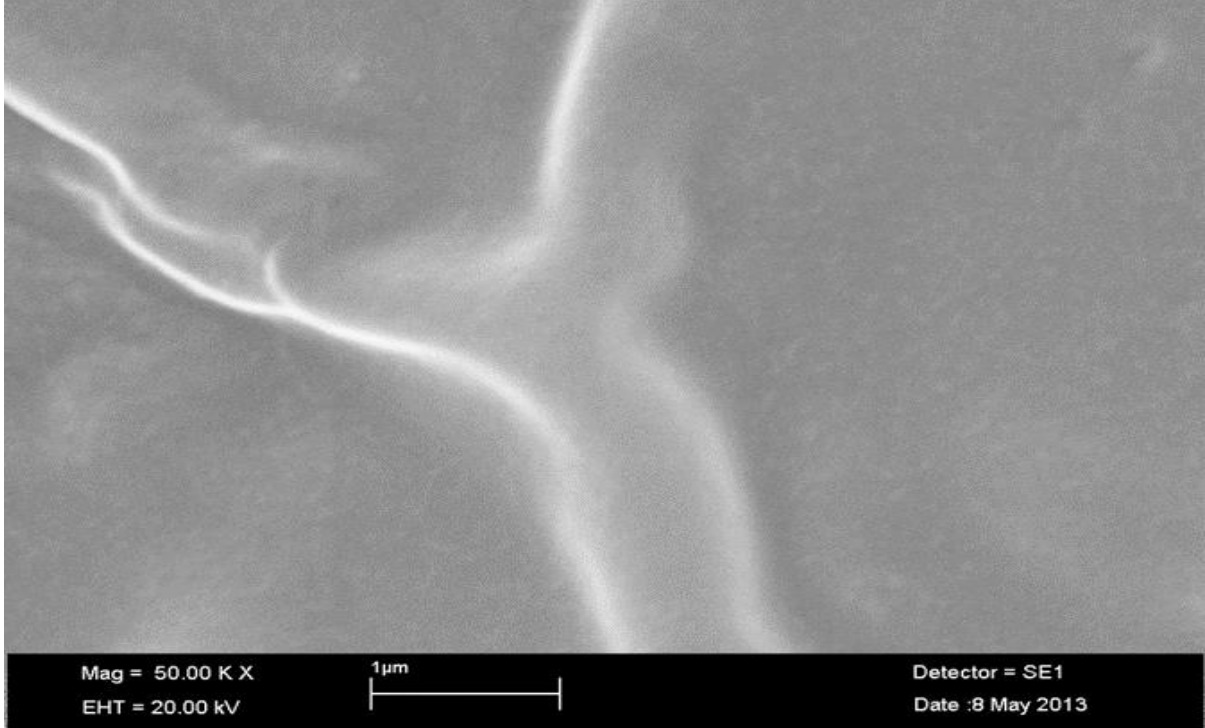
(2001), tarafından yapılan bir çalışmada, nisin ilave edilmiş peyniraltı suyu protein izolatu filmlerin, çekme dayanımları ortalaması $3.50 \pm 0.34 \text{ MPa}$, soya proteini izolatu filmlerin çekme dayanımları ise, $10.43 \pm 2.53 \text{ MPa}$ olarak bulunmuştur. Sivarooban ve ark. (2008), tarafından yapılan farklı bir çalışmada ise, 10.000 IU nisin ilave edilerek hazırlanmış soya protein izolatu filmlerin, çekme dayanımı değerleri $4.72 \pm 0.40 - 9.78 \pm 0.12 \text{ MPa}$ olarak tespit edilmiştir.

Filmlerin renk özellikleri ($L, a, b, \Delta E$) genel olarak değerlendirildiğinde (Çizelge 2), kontrol filmlere kıyasla nisin ilavesinin filmlerin renk özellikleri üzerinde önemli bir değişime neden olmadığı görülmektedir ($P < 0.01$). Bu durum, filmlerin içerisine nisin ilavesinin, damlacık migrasyonu veya filmlerin kuruması süresince

nisinin yüzeyde topaklaşma oluşturması gibi yüzey düzensizliğine yol açan etmenlerle film yüzey pürüzsüzlüğünün artmasına yol açmaması ile açıklanabilir. Yapılan araştırmalarla da ortaya konulduğu üzere, yüzeyde pürüzlülüğe neden olan öğelerin, yüzeye gönderilen ışığın farklı açılarla yansımalarına, dolayısıyla daha opak ve bulanık görünmesine neden olması mümkündür (Du ve ark., 2009; Sanchez-Gonzalez ve ark., 2009; Kibar, 2010; Kalkan, 2014).

Nisin içeren ($10.000 \text{ IU cm}^{-2}$) ve herhangi bir antimikrobiyel madde içermeyen kontrol peyniraltı suyu protein izolatu polimerlerinden elde edilen yenilebilir film örneklerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile belirlenen yüzey yapıları, Şekil 2 ve Şekil 3'te gösterilmiştir. Taramalı elektron mikroskobu görüntüleri (SEM), filmlerin yüzey homojenitesi hakkında bilgi vermektedir. Homojen bir film yüzeyi, yapısal bütünlüğün göstergesi olarak kabul edilmektedir ve böyle filmlerin mekanik

özelliklerinin de iyi olması beklenmektedir (Mali ve ark., 2005). Ayrıca, su buharı geçirgenliği değerlerini, yüzey mikrograflarından elde edilen sonuçlarla ilişkilendirmek mümkün olmaktadır. Heterojen yüzey oluşumuyla kendini gösteren yapısal bütünlükteki kayıp, gözenekli bir yapı oluşumuna ve dolayısıyla daha yüksek su buharı geçirgenliği değerleri değerlerine yol açmaktadır (Kalkan, 2014). Şekil 1 ve Şekil 2'deki yüzey mikrografları incelendiğinde ise, herhangi bir antimikrobiyel madde içermeyen kontrol PASP filmlerle $10.000 \text{ IU cm}^{-2}$ nisin içeren PASP filmlerin homojen bir yüzey yapısına sahip olduğunu söylemek mümkündür. Kontrol filmlerin hiç birinde iğne deliği ya da hava kabarcığına rastlanmamıştır. Nisin ilavesi filmlerdeki antimikrobiyel madde varlığı yüzey pürüzsüzlüğünü bir miktar arttırmışsa da, film homojenliği bozulmamıştır.



Şekil 3. $10.000 \text{ IU cm}^{-2}$ nisin içeren PASP filmlerin SEM mikrografisi

Sonuç ve Öneriler

Sonuç olarak, nisin içeren peyniraltı suyu protein izolatu filmler *L. innocua* üzerinde güçlü bir antimikrobiyel etkiye sahiptir. Bu filmlerin, yüksek nem ve su buharı değerlerine, düşük kuru madde yoğunluğu ile kuvvetli çekme dayanımına sahip olduğu tespit edilmiştir. Nisin ilavesi ile filmlerin yapısal bütünlüğünü korumuştur ama nisin içeren antimikrobiyel filmlerin ambalaj materyali olarak etkin kullanımı için diğer fiziksel ve mekanik özelliklerinin de geliştirilmesi gereklidir.

Kaynaklar

- Atares, L., De Jesus, C., Talens, P., Chiralt, A., 2010. Characterization of SPI-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*, 99: 384-391.
- Ayana, B., 2007. Antimikrobiyel yenilebilir filmlerin üretimi ve özelliklerinin belirlenmesi. Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 60 s.

- Ayana, B., Turhan, N., 2010. Gıda ambalajlamasında antimikrobiyel madde içeren yenilebilir filmler/kaplamalar ve uygulamaları. *Gıda*, 2: 151-158.
- Bahram, S., Rezaei, M., Soltani, M., Kamali, A., Ojagh, S.M., Abdollahi, M., 2013. Whey protein concentrate edible film activated with cinnamon essential oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 1- 8.
- Blair, I., Duffy, G., McDowell, D., Sheridan, J., 1997. Development of a surface adhesion immunofluorescent technique for the rapid isolation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat. *Journal of Applied Microbiology*. 82: 225-232.
- Campos, C.A., Gerschenson, L.N., Flores, S.K., 2011. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food Bioprocess Technol*, 4: 849-875.
- Candoğan, K., 2009. Antimikrobiyel ve antioksidan özellikteki yenilebilir filmlerin taze etlerin raf ömrüne etkisi. A.Ü. Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) Kesin Raporu. 92 s.
- Cao-Hoang, L., Chaine, A., Gregoire, L., Wache, Y., 2010. Potential of nisin-incorporated sodium caseinate films to control *Listeria* in artificially contaminated cheese. *Food Microbiology*, 27:940-944.
- Chi-Zhang, Y., Yam, K.L., Chikindas, M.L., 2004. Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released into a broth system. *Int. J. of Food Microbiology*, 90: 15– 22.
- Çağrı, A., Ustunol, Z., Ryser, E.T., 2002. Inhibition of three pathogens on bologna and summer sausage using antimicrobial edible films. *J. of Food Science*, 67(6): 2317-2324.
- Dawson, P.L., Harmon, L., Sotthibandhu, A., Han, I.Y., 2005. Antimicrobial activity of nisin-adsorbed silica and corn starch powders. *Food Microbiology*, 22: 93–99.
- De Moura, M.R., Avena-Bustillos, R.J., Mchugh, T.H., Wood, D.F., Otoni, G.C., Mattoso, L.H.C., 2011. Miniaturization of cellulose fibers and effect of addition on the mechanical and barrier properties of hydroxypropyl methylcellulose films. *J. of Food Engineering*, 104: 154-160.
- Du, W.X., Olsen, C.W., Avena-Bustillos, R.J., Mchugh, T.H., Levin, C.E., Mandrell, R., Friedman, M., 2009. Antibacterial effects of allspice, garlic and oregano essential oils in tomato films determined by overlay and vapor-phase methods. *J. Food Science*, 74(7): 390-397.
- Emiroğlu Karagöz, Z., Yemiş Polat, G., Çoşkun Kodal, 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.
- Garcia, M.A., Pinotti, A., Martino, M.N., Zaritzky, N.E., 2009. Characterization of starch and composite edible films and coatings. *Alınmıştır: Edible Films and Coatings for Food Applications*. (ed) Embuscado, M. E. and Huber, K. C. Springer Dordrecht Heidelberg London New York, 169-211.
- Gounga, M.E., Xu, S.Y., Wang, Z., 2007. Whey protein isolate-based films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. *J. of Food Engineering*, 83: 521-530.
- Hampikyan, H., Çolak, H., 2007. Nisin ve gıdalardaki antimikrobiyel etkisi. *Tsk Koruyucu Hekimlik Bülteni*, 6(2): 142-147.
- Kalkan, S., Ünal, E., Erginkaya, Z. 2014. Nisin ilave edilmiş metil selüloz filmlerin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi. *Gıda ve Yem Bilimi - Teknolojisi Dergisi*. 14: 1-7.
- Kalkan, S., 2014. Farklı antimikrobiyel maddeler içeren yenilebilir film kaplamaların macar salamında kullanım olanakları ve *Listeria innocua* inaktivasyonu üzerine etkileri. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi, 165 s.
- Kibar, E.A.A., 2010. Biyobozunur metil selüloz-mısır nişastası ve karboksimetil selüloz- mısır nişastası esaslı filmlerin üretimi ile geçirgenlik, mekaniksel ve yapısal özelliklerinin belirlenmesi. H.Ü. Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Doktora Tezi, 160 s.
- Ko, S., Janes, M.E., Hettiarachchy, N.S., Johnson, M.G., 2001. Physical and chemical properties of edible films containing nisin and their action against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Sci*, 66: 1006–1011.
- Koçan, D., 2007. *Listeria monocytogenes*'in belirlenmesinde minimum inhibisyon konsantrasyonu. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 177 s.
- Kowalczyk, D., Baraniak, B., 2011. Effects of plasticizers, pH and heating of film-forming solution on the properties of pea protein isolate films. *J. of Food Engineering*, 105: 295-305.
- Kurt, Ş., Zorba, Ö., 2005. Bakteriyosinler ve gıdalarda kullanım olanakları. *YYÜ Vet Fak Derg*, 16 (1): 77-83.
- Mali S., Grossmann M.E., Garcia M.A., Martino M.N., Zaritzky N.E., 2005. Mechanical and thermal

- properties of yam starch films. *Food Hydrocolloids*, 19(1): 157–164.
- Martins, J.T., Cerqueira, M.A., Bourbona, A.I., Pinheiroa, A.C., Souza, B.W.S., Vicente, A.A., 2012. Synergistic effects between κ -carrageenan and locust bean gum on physicochemical properties of edible films made thereof. *Food Hydrocolloids*, 29(2):280–289.
- Mehmetoğlu, A.Ç., 2010. Yenilebilir filmlerin ve kaplamaların özelliklerini etkileyen faktörler. *Akademik Gıda*, 8(5): 37-43.
- 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. *J. of Food Engineering*, 105: 422-428.
- Ramos, O.L, Silva, S.I., Soares, J.C., Fernandes, J.C., Poças, M.F., Pintado, M.E., Malcata, F.X., 2012. Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. *Food Research International*, 45: 351-361.
- Reyes-Garcia, A., Ortiz-Garcia, D., Pérez-Pérez, C., Garcia-Almendárez, B., Regalado-González, C., 2004. Biodegradable, edible film based on whey protein concentrate, added with bacteriocin to increase shelf life of packaged foods. International Congress in Food Science and Biotechnology in Developing Countries. Durango, June 20-23, Mexico.
- Royo, M., Fernandez-Pan, I., Mate, J.I., 2010. Antimicrobial effectiveness of oregano and sage essential oils incorporated in to whey protein films or cellulose-based filter paper. *J.Sci.FoodAgric*, 90: 1513-1519.
- Rubilar, J.F., Cruz, R.M.S., Silva, H.D., Vicente, A.A., Khmelinskii I., Vieira, M.C., 2013. Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. *J. Food Eng*, 115, 466–474.
- Sanchez-Gonzalez, L, Vargas, M, Gonzalez-Martinez, C, Chiralt, A, Chafer, M., 2009. Characterization of edible films based on hydroxypropyl methylcellulose and tea tree essential oil. *Food Hydrocolloids*, 23: 2102-2109.
- Sarıkuş, G., 2006. Farklı antimikrobiyel maddeler içeren yenilebilir film üretimi ve kaşar peynirinin muhafazasında mikrobiyel inaktivasyona etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. 69 s.
- Sivarrooban, T., Hettiarachchy, N.S., Johnson, M.G., 2008. Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Research International*, 41: 781-785.
- Skurtys, O., Acevedo, C., Pedreschi, F., Osorio, F., Agulera, J.M., 2010. *Food Hydrocolloid Edible Films And Coatings*. Nova Science Publishers Inc., Hauppauge, New York, 66p.
- Souza, B.W.S., Corqueira, M.A., Martins, J.T., Casariego, A., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., 2010. Influence of electric fields on the structure of chitosan edible coatings. *Food Hydrocolloids*, 24: 330-335.
- Tatlı, D., 2009. Geleneksel süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 69s.
- Wang, L., Dong, Y., Men, H., Tong, J., Zhou, J., 2013. Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. *Food Hydrocolloids*, 32: 35-41.
- Yılmaz, L., Beyazit, A. A., Yılsay, Ö.T., 2007. Süt proteinlerinin yenilebilir film ve kaplamalarda kullanılması. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 1: 59-64.
- Zinoviadou, K.G., Koutsoumains, K.P., Biliaderis, C.G., 2009. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. *Meat Science*, 82: 338-345.