

T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİTOSAN NANOKOMPOZİT FİLMLERİN ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİĞİNİN ARTTIRILMASI

Burcu KAYA

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

Not: Tez kapağı yüksek lisans tezlerinde "Turkuaz", doktora tezlerinde "Mavi" dir.

(Tez basımı aşamasında bu sayfa basılmayacaktır. Tez dış kapak örneğidir)

T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİTOSAN NANOKOMPOZİT FİLMLERİN ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİĞİNİN ARTTIRILMASI

Burcu KAYA

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: **05/08/2018**

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Nükhet Nilüfer ZORBA

ÇANAKKALE

Burcu KAYA tarafından Doç. Dr. Nükhet Nilüfer ZORBA yönetiminde hazırlanan ve **05/08/2019** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan "**Kitosan Nanokompozit Filmlerin Antimikrobiyal Etkinliğinin Arttırılması**" başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Doç. Dr. Nükhet Nilüfer ZORBA ……

Başkan

Prof. Dr. Cengiz CANER ……

Üye

Doç. Dr. Seda ERSUS BİLEK ……

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ
Müdür
Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:……

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası: FYL-2018-1373.

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Burcu KAYA

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen, hayalimin gerçekleşmesini sağlayan değerli danışman hocam Doç. Dr. Nükhet Nilüfer ZORBA'ya,

Bilgi birikimini ve deneyimlerini benimle paylaşan saygı değer hocam Prof. Dr. Cengiz CANER'e,

Maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen sevgili annem ve babam Songül ve Halis KAYA, kardeşlerim Semih, Serdar KAYA'ya,

Gıda mühendisi olacağımı ummadan girdiğim lisede, eğitim öğrenimim boyunca bana daima inanan hocalarım Penbe ORAN ve Canan KALIPÇIOĞLU'na,

Hiç tereddüt etmeden evinin kapısını benim için açan, bana daima motivasyon veren ve umudumu her kaybettiğimde hedeflerimi tekrar tekrar hatırlatan değerli hocam Seda ÖZDİKMENLİ TEPELİ'ye,

Lisans öğrenimim sırasında bana mikrobiyoloji çalışmanın önemini ve gerekliliklerini öğreten hocam Gülçin ÖZCAN ATEŞ'e,

Yüksek lisansım boyunca aynı ofisi paylaştığım değerli arkadaşlarım Melike Nur TOSUN, Gizem TAYLAN ve Mehmet BALKİ'ye,

Ayrıca tez projemizin gerçekleşmesinde maddi destekte bulunan Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Burcu KAYA

Çanakkale, Ağustos 2019

SİMGELER VE KISALTMALAR

µm	Mikrometre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
kob	Koloni Oluşturan Birim
log kob/mL	Logaritmik Koloni Oluşturan Birim
g	Gram
%	Yüzde Oranı
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhdrazyl
mL	Mililitre
mol	Mol Sayısı
N	Normalite
kDa	Kilodalton
GPa	Gigapascal
w/v	Ağırlık/Hacim
°C	Santigrat Derece
T	Geçirgenlik
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
HCl	Hidroklorik Asit
YI	Sarılık İndeksi
WI	Beyazlık İndeksi
TCD	Toplam Renk Farklılığı
Hue°	Renk
DA	Deasetilasyon Derecesi
MIC	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
ATCC	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu, Amerika Birleşik Devletleri
CCRC	Kültür Toplama ve Araştırma Merkezi, Gıda Endüstrisi Araştırma ve Geliştirme Enstitüsü, Tayvan
CECT	İspanyol Tipi Kültür Koleksiyonu, Valensiya Üniversitesi, İspanya

MTCC	Mikrobiyal Tip Kültür Toplama ve Gen Bankası, Mikrobiyal Teknoloji Enstitüsü, Hindistan
NBRC	Biyolojik Kaynak Merkezi, Ulusal Teknoloji ve Değerlendirme Enstitüsü, Japonya
NCTC	Ulusal Tip Kültürleri Koleksiyonu, İngiltere
NRRL	Northen Bölgesel Araştırma Merkezi, Tarımsal Araştırma Hizmeti Kültür Koleksiyonu, Amerika Birleşik Devletleri
TSA	Tryptone Soy Agar
TSB	Tryptone Soy Broth
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Potato Dextrose Broth
MHA	Mueller Hinton Agar

ÖZET

KİTOSAN NANOKOMPOZİT FİLMLERİN ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİĞİNİN ARTTIRILMASI

Burcu KAYA
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Doç. Dr. Nükhet Nilüfer ZORBA
05/08/2019, 161

Bu çalışmada Cloisite 30 B, boraks, etil pirüvat, bor nitrür ve limon esansiyel yağı iki farklı konsantrasyonda (%1 ve 3) kitosan polimerine eklenerek, kitosan bazlı nanokompozit filmler üretilmiştir. Filmlerin kalınlığı, nem içeriği, suda çözünürlüğü, görünür yoğunluğu, renk değerleri (L*, a*, b*, Hue°, TCD, WI, YI) belirlenmiştir. Distile su, aktif çamur, 2 N HCl, 2 N NaOH ve %1 NaCl çözeltileri içerisinde film örnekleri 2 ay boyunca muhafaza edilerek, filmlerin zamana karşı ağırlık kayıpları belirlenmiştir. DPPH yöntemi kullanılarak filmlerin antioksidan aktivitesi belirlenmiştir. Ayrıca filmlerin, *Staphyloccocus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* 0157:H7 EDL 937, *Bacillus cereus* NCTC 7464, *Aspergillus flavus* NRRL 21882, *Penicillium expansum* CECT 2280, *Penicillium citrinum* CECT 20822, *Penicillium digitatum* CECT 20795, *Alternaria arborescens, Saccharamyces cerevisiae* ATCC 9763 ve *Candida albicans* ATCC 10231 suşlarına karşı antimikrobiyal etkinliği, disk difüzyon, canlı hücre sayım ve spot ekim yöntemi olmak üzere 3 farklı yöntem ile belirlenmiştir.

Çalışmada hazırlanan filmlerin kalınlık değerlerinin 0,213-0,312 mm, nem içeriklerinin %12,74-24,98, suda çözünürlük değerlerinin ise %10,48-23,21 aralığında değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Filmler arasında biyolojik bozunurluğu en yüksek olan filmlerin %1'lik etil pirüvat, bor nitrür ve limon esansiyel yağı filmleri olduğu belirlenmiştir. 2 N HCl içerisindeki en yüksek kimyasal bozunurluk değerini %3 bor nitrür filmi gösterirken, 2 N NaOH içerisindeki en yüksek kimyasal biyobozunurluk değerini %3 limon esansiyel yağı filmi göstermiştir. 60 gün boyunca % 1 NaCl içerisinde muhafaza edilen kontrol, %1 Cloisite 30B, %1 boraks, %1 etil pirüvat, %1 bor nitrür ve %1 limon esansiyel yağı filmlerinin çözelti içerisinde tamamen kaybolduğu belirlenmiştir.

Filmlerin DPPH yöntemine göre belirlenen antioksidan aktivitesinin ise %16,74-35,69 aralığında değiştiği tespit edilmiştir. Ayrıca test edilen bakteriler için en yüksek antimikrobiyal etki %1 etil pirüvat ve limon esansiyel yağı filmlerinde belirlenirken, küfler için en yüksek antimikrobiyal etki %1 etil pirüvat ve bor nitrür filmlerinde belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Kitosan, Cloisite 30B, Boraks, Etil Pirüvat, Bor Nitrür, Limon Esansiyel Yağı

ABSTRACT

INCREASING THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CHITOSAN NANOCOMPOSITES FILMS

Burcu KAYA

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Food Science

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Nükhet Nilüfer ZORBA

05/08/2019, 161

In this study, Cloisite 30 B, borax, ethyl pyruvate, boron nitride and lemon essential oil were added to chitosan polymer in two different concentrations (1-3%) to produce chitosan based nanocomposite films. Film thickness, moisture content, water solubility, apparent density, color values (L *, a *, b *, Hue °, TCD, WI, YI) of the film samples were determined. The film samples were stored for 2 months in distilled water, activated sludge, 2 N HCl, 2 N NaOH and 1% NaCl solutions and the weight loss of the films over time were determined. Antioxidant activity values of the films were determined by DPPH method. In addition, antimicrobial efficacy of the films against *Staphyloccocus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* 0157:H7 EDL 937, *Bacillus cereus* NCTC 7464, *Aspergillus flavus* NRRL 21882, *Penicillium expansum* CECT 2280, *Penicillium citrinum* CECT 20822, *Penicillium digitatum* CECT 20795, *Alternaria arborescens*, *Saccharamyces cerevisiae* ATCC 9763 and *Candida albicans* ATCC 10231 strains, were also determined by disc diffusion, viable cell counting and spot culture methods.

In the study, it was found that the thickness values of the films vary between 0.213-0.312 mm, the moisture content of 12.74-24.98%, and the water solubility values vary between 10.48-23.21%. The films with the highest biodegradability were found to be 1% ethyl pyruvate, 1% boron nitride and 1% lemon essential oil films. The 3% boron nitride film showed the highest chemical degradability rate in 2 N HCl, while the 3% lemon essential oil film showed the highest chemical degradability rate in 2 N NaOH. The control chitosan, 1% Cloisite 30B, 1% borax, 1% ethyl pyruvate, 1% boron nitride and 1% lemon essential oil films, which were preserved in 1% NaCl for 60 days, were found to disappear

completely in solution. The antioxidant activity of the films according to DPPH method was found to vary between 16.74-35.69%. In addition, the highest antimicrobial effect was detected in 1% ethyl pyruvate and 1% lemon essential oil films for the tested bacteria, while the highest antimicrobial effect was found in 1% ethyl pyruvate and 1% boron nitride films for molds.

Keywords: Chitosan, Cloisite 30B, Borax, Ethyl Pyruvate, Boron Nitride, Lemon Essential Oil

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI iii
TEŞEKKÜR iv
SİMGELER VE KISALTMALAR v
ÖZET vii
ABSTRACT ix
ŞEKİLLER DİZİNİ xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ xxi
BÖLÜM 1 1
GİRİŞ 1
BÖLÜM 2 3
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 3
2.1. Biyopolimerler 3
2.2. Nanokompozitler 5
2.2.1. Polisakkarit Bazlı Nanokompozitler 5
2.2.2. Protein Bazlı Nanokompozitler 6
2.2.3. Nano-Dolgu Maddeleri 7
2.2.3.1. Organik Nano-Dolgu Maddeleri 9
2.2.3.2. İnorganik Nano-Dolgu Maddeleri 12
2.3. Antimikrobiyal Nanokompozit Filmler 13
2.3.1. Nanokompozit Filmlerde Kullanılan Antimikrobiyal Maddeler ve Etki Mekanizmaları 13
2.3.2. Antimikrobiyal Aktiviteye Etki Eden Faktörler 16
2.4. Kitosan Nanokompozit Filmler 17
2.4.1. Kitosan Nanokompozit Filmlerin Antimikrobiyal Etkisi Üzerine Yapılan Çalışmalar 20
2.5. Antimikrobiyal Etkinliği Arttırmak için Çalışmada Kullanılan Maddeler 23
2.5.1. Cloisite 30B 23
2.5.2. Boraks 24
2.5.3. Bor Nitrür 25
2.5.4. Etil Pirüvat 26
2.5.5. Limon Esansiyel Yağı 27
BÖLÜM 3 29

MATERYAL VE YÖNTEM 29
3.1. Materyal 29
3.2. Yöntem 29
3.2.1. Filmlerin Hazırlanması 29
3.2.2. Filmlerin Fiziksel Özelliklerinin Belirlenmesi 30
3.2.2.1. Film Kalınlığının Belirlenmesi 30
3.2.2.2. Nem İçeriği ve Suda Çözünürlük Değerlerinin Belirlenmesi 30
3.2.2.3. Film Görünür Yoğunluğunun Belirlenmesi 31
3.2.2.4. Renk Özelliklerinin Belirlenmesi 31
3.2.3. Film Biyobozunurluk Özelliklerinin Belirlenmesi 31
3.2.3.1. Biyolojik Biyobozunurluk 31
3.2.3.2. Kimyasal Biyobozunurluk 32
3.2.4. Antioksidan Aktivite Tayini 32
3.2.5. Filmlerin Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi 32
3.2.5.1. Filmlerin Antibakteriyel Etkisinin Belirlenmesi 32
3.2.5.1.1. Antibakteriyel Etkinin Disk Difüzyon Yöntemi ile Belirlenmesi 32
3.2.5.1.2. Antibakteriyel Etkinin Canlı Hücre Sayım Yöntemi ile Belirlenmesi 33
3.2.5.1.3. Antibakteriyel Etkinin Spot Ekim Yöntemi ile Belirlenmesi 33
3.2.5.2. Filmlerin Antifungal Etkisinin Belirlenmesi 34
3.2.5.2.1. Antifungal Etkinin Disk Difüzyon Yöntemi ile Belirlenmesi 34
3.2.5.2.2. Antifungal Etkinin Canlı Hücre Sayım Yöntemi ile Belirlenmesi 34
3.2.5.2.3. Antifungal Aktivitenin Spot Ekim Yöntemi ile Belirlenmesi 35
3.2.6. İstatistiksel Analiz 35
BÖLÜM 4 36
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 36
4.1. Filmlerin Fiziksel Özelliklerine Ait Bulgular 36
4.1.1. Film Kalınlık Değerleri 36
4.1.2. Filmlere Ait Nem İçeriği ve Suda Çözünürlük Değerleri 38
4.1.3. Filmlere Ait Görünür Yoğunluk Değerleri 42
4.1.4. Filmlere Ait Renk Değerleri 44
4.2. Filmlerin Biyobozunurluk ve Kimyasal Dayanıklılık Özelliklerine Ait Bulgular 50
4.2.1. Biyolojik Bozunurluk Değerleri 50
4.2.1.1. Distile Su İçerisindeki Biyobozunurluk Değerleri 50
4.2.1.2. Aktif Çamur İçerisindeki Biyobozunurluk Değerleri 53

4.2.2. Filmlerin Kimyasal Biyobozunurluk Değerleri 55
4.2.2.1. 2 N Hidroklorik Asit 55
4.2.2.2. 2 N Sodyum Hidroksit 58
4.2.2.3. %1 NaCl Çözeltisi 60
4.3. Filmlerin Antioksidan Aktivitesine Ait Bulgular 62
4.4. Filmlerin Antimikrobiyal Özelliklerine Ait Bulgular 64
4.4.1. Çözeltilerin Tespit Edilen Antibakteriyel ve Antifungal Aktivite Değerleri 64
4.4.2. Filmlerin Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması 66
4.4.2.1. Filmlerin Antibakteriyel Etkisinin Disk Difüzyon Yöntemi ile Belirlenmesi 66
4.4.2.2. Filmlerin Antifungal Etkisinin Disk Difüzyon Yöntemi ile Belirlenmesi 70
4.4.2.3. Filmlerin Antibakteriyel Etkisinin Canlı Hücre Sayım Testi ile Belirlenmesi 76
4.4.2.4. Filmlerin Antifungal Etkisinin Canlı Hücre Sayım Testi ile Belirlenmesi 95
4.4.2.5. Filmlerin Antibakteriyel Etkisinin Spot Ekim Yöntemi ile Belirlenmesi 112
4.4.2.6. Filmlerin Antifungal Etkisinin Spot Ekim Yöntemi ile Belirlenmesi 125
BÖLÜM 5 144
SONUÇ VE ÖNERİLER 144
KAYNAKLAR 147
EKLERİ I
EK 1. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri II
ÖZGEÇMİŞ IV

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Polimer/kil nanokompozitlerinde oluşabilecek muhtemel yapı tipleri (Valapa ve ark., 2017) 10
Şekil 2.2. Kitosan nanopartiküllerinin *S. aureus* üzerindeki antibakteriyel etkisinin önerilen bir mekanizması (Perinelli ve ark., 2018) 18
Şekil 2.3. Cloisite 30B organokilinin kimyasal yapısı (Sodeifian ve ark., 2012) 23
Şekil 2.4. Boraks'ın kimyasal yapısı (Anonim 1, 2018) 24
Şekil 2.5. Boron Nitrit'in kimyasal yapısı (Anonim 2, 2018) 25
Şekil 2.6. Etil pirüvat'ın kimyasal yapısı (Anonim 3, 2018) 26
Şekil 2.7. Limon esansiyel yağı uçucu bileşeni olan limonen ve γ-terpinenin kimyasal yapısı (Anonim 4, 2018) 27
Şekil 4.1. Üretilen filmlerin görüntüleri 36
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı .36
Şekil 4.2. Farklı formülasyona sahip kitosan nanokompozit filmlerin kalınlık değerleri ..37
Şekil 4.3. Filmlerin distile su içerisinde zamana bağlı ağırlık kayıpları 52
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı .52
Şekil 4.4. Filmlerin aktif çamur içerisinde zamana bağlı ağırlık kayıpları 54
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı .54
Şekil 4.5. Filmlerin hidroklorik asit içerisinde zamana bağlı ağırlık kayıpları 57
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı .57
Şekil 4.6. Filmlerin sodyum hidroksit içerisinde zamana bağlı ağırlık kayıpları 59
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı .59
Şekil 4.7. Filmlerin tuz çözeltisi içerisinde zamana bağlı ağırlık kayıpları 61
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı .61
Şekil 4.8. *E. coli* 'ye ait log kob/mL-absorbans değeri grafiği 76
Şekil 4.9. *Salmonella* Typhimurium 'a ait log kob/mL-absorbans değeri grafiği 76
Şekil 4.10. *Bacillus cereus* 'a ait log kob/mL-absorbans değeri grafiği 77
Şekil 4.11. *Stapylococcus aureus* 'a ait log kob/mL-absorbans değeri grafiği 77
Şekil 4.12. Kitosan kontrol filmi ve Cloisite 30B (%1-%3) filmlerinin *E. coli* 'ye karşı antimikrobiyal aktivitesi 78
*K: Kontrol *E. coli,* 1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B 78
Şekil 4.13. Kitosan kontrol filmi ve Boraks (%1-%3) filmlerinin *E. coli* 'ye karşı antimikrobiyal aktivitesi 78
*K: Kontrol *E. coli,* 1A: Kitosan, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks 78

Şekil 4.14. Kitosan kontrol filmi ve Etil pirüvat (%1-%3) filmlerinin *E. coli* 'ye karşı antimikrobiyal aktivitesi 79
*K: Kontrol *E. coli*, 1A: Kitosan, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat.... 79
Şekil 4.15. Kitosan kontrol filmi ve Bor nitrür (%1-%3) filmlerinin *E. coli* 'ye karşı antimikrobiyal aktivitesi 79
*K: Kontrol *E. coli*, 1A: Kitosan, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür 79
Şekil 4.16. Kitosan kontrol filmi ve Limon esansiyel yağı (%1-%3) filmlerinin *E. coli* 'ye karşı antimikrobiyal aktivitesi..... 80
*K: Kontrol *E.coli*, 1A: Kitosan, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı 80
Şekil 4.17. Kitosan kontrol filmi ve Cloisite 30B (%1-%3) filmlerinin *Salmonella* Typhimurium 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi 82
*K: Kontrol *S.* Typhimurium,1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B 82
Şekil 4.18. Kitosan kontrol filmi ve Boraks (%1-%3) filmlerinin *Salmonella* Typhimurium 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi 83
*K: Kontrol *S.* Typhimurium, 1A: Kitosan, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks . 83
Şekil 4.19. Kitosan kontrol filmi ve Etil pirüvat (%1-%3) filmlerinin *Salmonella* Typhimurium 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi 84
*K: Kontrol *S.* Typhimurium, 1A: Kitosan, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat 84
Şekil 4.20. Kitosan kontrol filmi ve Bor nitrür (%1-%3) filmlerinin *Salmonella* Typhimurium 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi 84
*K: *S.* Typhimurium, 1A: Kitosan, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür..... 84
Şekil 4.21. Kitosan kontrol filmi ve Limon esansiyel yağı (%1-%3) filmlerinin *Salmonella* Typhimurium 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi 85
*K: *S.* Typhimurium, 1A: Kitosan, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı 85
Şekil 4.22. Kitosan kontrol filmi ve Cloisite 30B (%1-%3) filmlerinin *Bacillus cereus* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi..... 87
*K: Kontrol *B. cereus*, 1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B 87
Şekil 4.23. Kitosan kontrol filmi ve Boraks (%1-%3) filmlerinin *Bacillus cereus* karşı antimikrobiyal aktivitesi 87
*K: Kontrol *B. cereus*, 1A: Kitosan, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks..... 87
Şekil 4.24. Kitosan kontrol filmi ve Etil pirüvat (%1-%3) filmlerinin *Bacillus cereus* 'akarşı antimikrobiyal aktivitesi 88
*K: Kontrol *B. cereus*, 1A: Kitosan, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat 88
Şekil 4.25. Kitosan kontrol filmi ve Bor nitrür (%1-%3) filmlerinin *Bacillus cereus* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi 89
*K: Kontrol *B. cereus*, 1A: Kitosan, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür.... 89
Şekil 4.26. Kitosan kontrol filmi ve Limon esansiyel yağı (%1-%3) filmlerinin *Bacillus cereus 'a* karşı antimikrobiyal aktivitesi..... 89
*K: Kontrol *B. cereus*, 1A: Kitosan, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı 89
Şekil 4.27. Kitosan kontrol filmi ve Cloisite 30B (%1-%3) filmlerinin *Stapylococcus aureus* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi..... 91
*K: Kontrol *S. aureus*, 1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B 91

Şekil 4.28. Kitosan kontrol filmi ve Boraks (%1-%3) filmlerinin *Stapylococcus aureus* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi.....91
*K: Kontrol *S. aureus*, 1A: Kitosan, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks.....91
Şekil 4.29. Kitosan kontrol filmi ve Etil pirüvat (%1-%3) filmlerinin *Stapylococcus aureus* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi 92
*K: Kontrol *S. aureus*, 1A: Kitosan, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat92
Şekil 4.30. Kitosan kontrol filmi ve Bor nitrür (%1-%3) filmlerinin *Stapylococcus aureus* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi 93
*K: Kontrol *S. aureus*, 1A: Kitosan, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür....93
Şekil 4.31. Kitosan kontrol filmi ve Limon esansiyel yağı (%1-%3) filmlerinin *Stapylococcus aureus* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi.....93
*K: Kontrol *S. aureus*, 1A: Kitosan, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı 93
Şekil 4.32. *Saccharomyces cerevisiae* 'ya ait log kob/mL-absorbans değeri grafiği 96
Şekil 4.33. *Candida albicans* 'a ait log kob/mL-absorbans değeri grafiği 96
Şekil 4.34. *Alternaria arborescens* 'e ait log kob/mL-absorbans değeri grafiği 97
Şekil 4.35. *Penicillium citrinum* 'a ait log kob/mL-absorbans değeri grafiği 97
Şekil 4.36. Kitosan kontrol filmi ve Cloisite 30B (%1-%3) filmlerinin *Saccharomyces cerevisiae* 'ya karşı antimikrobiyal aktivitesi 98
*K: Kontrol *S. cerevisiae*, 1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B.....98
Şekil 4.37. Kitosan kontrol filmi ve Boraks (%1-%3) filmlerinin *Saccharomyces cerevisiae* 'ya karşı antimikrobiyal aktivitesi 98
*K: Kontrol *S. cerevisiae*, 1A: Kitosan, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks 98
Şekil 4.38. Kitosan kontrol filmi ve Etil pirüvat (%1-%3) filmlerinin *Saccharomyces cerevisiae* 'ya karşı antimikrobiyal aktivitesi 99
*K: Kontrol *S. cerevisiae*, 1A: Kitosan, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat 99
Şekil 4.39. Kitosan kontrol filmi ve Bor nitrür (%1-%3) filmlerinin *Saccharomyces cerevisiae* 'ya karşı antimikrobiyal aktivitesi 100
*K: Kontrol *S. cerevisiae*, 1A: Kitosan, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür 100
Şekil 4.40. Kitosan kontrol filmi ve Limon esansiyel yağı (%1-%3) filmlerinin *Saccharomyces cerevisiae* 'ya karşı antimikrobiyal aktivitesi 100
*K: Kontrol *S. cerevisiae*, 1A: Kitosan, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı 100
Şekil 4.41. Kitosan kontrol filmi ve Cloisite 30B (%1-%3) filmlerinin *Candida albicans* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi.....102
*K: Kontrol *C. albicans*, 1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B.....102
Şekil 4.42. Kitosan kontrol filmi ve Boraks (%1-%3) filmlerinin *Candida albicans* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi 102
*K: Kontrol *C. albicans*, 1A: Kitosan, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks 102
Şekil 4.43. Kitosan kontrol filmi ve Etil pirüvat (%1-%3) filmlerinin *Candida albicans* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi.....103
*K: Kontrol *C. albicans*, 1A: Kitosan, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat 103

Şekil 4.44. Kitosan kontrol filmi ve Bor nitrür (%1-%3) filmlerinin *Candida albicans* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi.....104
*K: Kontrol *C. albicans*, 1A: Kitosan, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür 104
Şekil 4.45. Kitosan kontrol filmi ve Limon esansiyel yağı (%1-%3) filmlerinin *Candida albicans* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi.....104
*K: Kontrol *C. albicans*, 1A: Kitosan, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı 104
Şekil 4.46. Kitosan kontrol filmi ve Cloisite 30B (%1-%3) filmlerinin *Alternaria arborescens* 'e karşı antimikrobiyal aktivitesi.....106
*K: Kontrol *A. arborescens*, 1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B 106
Şekil 4.47. Kitosan kontrol filmi ve Boraks (%1-%3) filmlerinin *Alternaria arborescens* 'e karşı antimikrobiyal aktivitesi.....106
*K: Kontrol *A. arborescens*, 1A: Kitosan, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks..106
Şekil 4.48. Kitosan kontrol filmi ve Etil pirüvat (%1-%3) filmlerinin *Alternaria arborescens* 'e karşı antimikrobiyal aktivitesi.....107
* K: Kontrol *A. arborescens*, 1A: Kitosan, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat 107
Şekil 4.49. Kitosan kontrol filmi ve Bor nitrür (%1-%3) filmlerinin *Alternaria arborescens* 'e karşı antimikrobiyal aktivitesi 107
* K: Kontrol *A. arborescens*, 1A: Kitosan, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür.....107
Şekil 4.50. Kitosan kontrol filmi ve Kitosan+Limon esansiyel yağı (%1-%3) filmlerinin *Alternaria arborescens* 'e karşı antimikrobiyal aktivitesi 108
* K: Kontrol *A. arborescens*, 1A: Kitosan, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı 108
Şekil 4.51. Kitosan kontrol filmi ve Cloisite 30B (%1-%3) filmlerinin *Penicillium citrinum* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi 109
*K: Kontrol *P. citrinum*, 1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B.....109
Şekil 4.52. Kitosan kontrol filmi ve Boraks (%1-%3) filmlerinin *Penicillium citrinum* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi.....109
*K: Kontrol *P. citrinum*, 1A: Kitosan, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks.....109
Şekil 4.53. Kitosan kontrol filmi ve Etil pirüvat (%1-%3) filmlerinin *Penicillium citrinum* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi 110
*K: Kontrol *P. citrinum*, 1A: Kitosan, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat 110
Şekil 4.54. Kitosan kontrol filmi ve Kitosan+Bor nitrür (%1-%3) filmlerinin *Penicillium citrinum* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi.....110
*K: Kontrol *P. citrinum*, 1A: Kitosan, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür 110
Şekil 4.55. Kitosan kontrol filmi ve Limon esansiyel yağı (%1-%3) filmlerinin *Penicillium citrinum* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi.....111
*K: Kontrol *P. citrinum*, 1A: Kitosan, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı 111

Şekil 4.56. Kontrol *Salmonella* Typhimurium ve kontrol kitosan filmini içeren petrilerin görüntüsü....113
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 113
*K: Kontrol *S.* Typhimurium, 1A: Kitosan 113
Şekil 4.57. *Salmonella* Typhimurium için %1 Cloisite 30B ve %3 Cloisite 30B filmlerini içeren petrilerin görüntüsü 114
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 114
*2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B....114
Şekil 4.58. *Salmonella* Typhimurium için %1 Boraks ve %3 Boraks filmlerini içeren petrilerin görüntüsü....115
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 115
*3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks 115
Şekil 4.59. *Salmonella* Typhimurium için %1 Etil pirüvat ve %3 Etil pirüvat filmlerini içeren petrilerin görüntüsü 116
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 116
*4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat....116
Şekil 4.60. *Salmonella* Typhimurium için %1 Bor nitrür ve %3 Bor nitrür filmlerini içeren petrilerin görüntüsü....117
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 117
*5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür 117
Şekil 4.61. *Salmonella* Typhimurium için %1 Limon esansiyel yağı ve %3 Limon esansiyel yağı filmlerini içeren petrilerin görüntüsü 118
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 118
*6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı....118
Şekil 4.62. Kontrol *Stapylococcus aureus* ve kitosan filmini içeren petrilerin görüntüsü 119
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 119
*K: Kontrol *Stapylococcus aureus*, 1A: Kitosan....119
Şekil 4.63. *Stapylococcus aureus* için %1 Cloisite 30B ve %3 Cloisite 30B filmlerini içeren petrilerin görüntüsü 120
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 120
*2A: Cloisite 30B, 2B: Cloisite 30B....120
Şekil 4.64. *Stapylococcus aureus* için %1 Boraks ve %3 Boraks filmlerini içeren petrilerin görüntüsü....121
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 121
*3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks 121
Şekil 4.65. *Stapylococcus aureus* için %1 etil pirüvat ve %3 etil pirüvat filmlerini içeren petrilerin görüntüsü....122
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 122
*4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat....122

Şekil 4.66. *Stapylococcus aureus* için %1 Bor nitrür ve %3 Bor nitrür filmlerini içeren petrilerin görüntüsü 123
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 123
*5A: %1Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür 123
Şekil 4.67. *Stapylococcus aureus* için %1 Limon esansiyel yağı ve %3 Limon esansyel yağı filmlerini içeren petrilerin görüntüsü 124
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 124
*6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı 124
Şekil 4.68. Kontrol *Alternaria arborescens* ve kitosan filmini içeren petrilerin görüntüsü 126
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 126
*K: Kontrol *Alternaria arborescens,* 1A: Kitosan 126
Şekil 4.69. *Alternaria arborescens* için %1 Cloisite 30B ve %3 Cloisite 30B filmlerini içeren petrilerin görüntüsü 127
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 127
*2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B 127
Şekil 4.70. *Alternaria arborescens* için %1 Boraks ve %3 Boraks filmlerini içeren petrilerin görüntüsü 128
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 128
*3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks 128
Şekil 4.71. *Alternaria arborescens* için %1 Etil pirüvat ve %3 Etil pirüvat filmlerini içeren petrilerin görüntüsü 129
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 129
*4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat 129
Şekil 4.72. *Alternaria arborescens* için %1 Bor nitrür ve %3 Bor nitrür filmlerini içeren petrilerin görüntüsü 130
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 130
*5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür 130
Şekil 4.73. *Alternaria arborescens* için %1 Limon esansiyel yağı ve %3 Limon esansiyel yağı filmlerini içeren petrilerin görüntüsü 131
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 131
*6A: Limon esansiyel yağı, 6B: Limon esansiyel yağı 131
Şekil 4.74. Kontrol *Penicillium citrinum* ve kitosan filmini içeren petrilerin görüntüsü 132
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 132
*K: Kontrol *P. citrinum,* 1A: Kitosan 132
Şekil 4.75. *Penicillium citrinum* için %1 Cloisite 30B ve %3 Cloisite 30B filmlerini içeren petrilerin görüntüsü 133
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 133
*2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B 133

Şekil 4.76. *Penicillium citrinum* için %1 Boraks ve %3 Boraks filmlerini içeren petrilerin görüntüsü.....134
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 134
*3A: %1Boraks, 3B: %3 Boraks 134
Şekil 4.77. *Penicillium citrinum* için %1 Etil pirüvat ve %3 Etil pirüvat filmlerini içeren petrilerin görüntüsü.....135
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 135
*4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat.....135
Şekil 4.78. *Penicillium citrinum* için %1 Bor nitrür ve %3 Bor nitrür filmlerini içeren petrilerin görüntüsü.....136
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 136
*5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür 136
Şekil 4.79. *Penicillium citrinum* için %1 Limon esansiyel yağı ve %3 Limon esansiyel yağı filmlerini içeren petrilerin görüntüsü.....137
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 137
*6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı.....137
Şekil 4.80. Kontrol *Saccharomyces cerevisiae* ve kitosan filminin petri görüntüsü 138
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 138
*K: Kontrol *Saccharomyces cerevisiae*, 1A: Kitosan.....138
Şekil 4.81. *Saccharomyces cerevisiae* için %1 Cloisite 30B ve %3 Cloisite 30B filmlerinin petri görüntüsü 139
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 139
*2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B.....139
Şekil 4.82. *Saccharomyces cerevisiae* için %1 Boraks ve %3 Boraks filmlerinin petri görüntüsü.....140
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 140
*3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks 140
Şekil 4.83. *Saccharomyces cerevisiae* için %1 Etil pirüvat ve %3 Etil pirüvat filmlerinin petri görüntüsü 141
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 141
*4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat.....141
Şekil 4.84. *Saccharomyces cerevisiae* için %1 Bor nitrür ve %3 Bor nitrür filmlerinin petri görüntüsü.....142
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 142
*5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür 142
Şekil 4.85. *Saccharomyces cerevisiae* için %1 Limon esansiyel yağı ve %3 Limon esansiyel yağı filmlerinin petri görüntüsü.....143
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür. 143
*6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı.....143

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. Nanokompozit filmlerde kullanılan nano-dolgu maddeleri ve matriksler.....9
Çizelge 2.2. Antimikrobiyal kitosan bazlı nanokompozit filmler üzerine yapılan çalışmaların özeti 22
Çizelge 4.2. Kontrol kitosan filmi ve antimikrobiyal madde içeren kitosan bazlı filmlerin ortalama nem içerikleri ve standart sapma değerleri 39
*Aynı sütun üzerinde belirtilen farklı harfler istatistiksel açıdan ortalamalar arasındaki farklılığı ifade etmektedir (p<0,05). 39
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı .39
Çizelge 4.2. Kontrol kitosan filmi ve antimikrobiyal madde içeren kitosan bazlı filmlerin ortalama suda çözünürlükleri ve standart sapma değerleri 41
*Aynı sütun üzerinde belirtilen farklı harfler istatistiksel açıdan ortalamalar arasındaki farklılığı ifade etmektedir (p<0,05). 41
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon Esansiyel Yağı 41
Çizelge 4.3. Kontrol kitosan filmi ve antimikrobiyal madde içeren kitosan bazlı filmlerin ortalama görünür yoğunlukları ve standart sapma değerleri.....43
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı .43
Çizelge 4.4. Filmlerin ortalama renk değerleri ve standart sapması.....45
*Aynı sütun üzerinde belirtilen farklı harfler istatistiksel açıdan ortalamalar arasındaki farklılığı ifade etmektedir (p<0,05). 45
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı .45
Çizelge 4.5. Filmlerin Hue°, TCD, WI ve YI değerleri.....48
*Aynı sütun üzerinde belirtilen farklı harfler istatistiksel açıdan ortalamalar arasındaki farklılığı ifade etmektedir (p<0,05). 48
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı .48
Çizelge 4.6. Filmlerin antioksidan aktivite değerleri.....62
*Aynı sütun üzerinde belirtilen farklı harfler istatistiksel açıdan ortalamalar arasındaki farklılığı ifade etmektedir (p<0,05). 62
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı .62
Çizelge 4.7. Film içerisine eklenen etken maddelerin, film içindeki konsantrasyonuna göre hazırlanan çözeltilerinin antibakteriyel etkisi 64
*B1: %1 Boraks çözeltisi, B2: %3 Boraks çözeltisi, BN1:%1 Bor nitrür çözeltisi, BN2: %3 Bor nitrür çözeltisi, C30B1:%1 Cloisite 30B çözeltisi, C30B2: %3 Cloisite 30B çözeltisi, EPO: Etil pirüvat, EP1: %1 Etil pirüvat özeltisi, EP2: %3 Etil pirüvat çözeltisi, LEOO: Limon esansiyel yağı, LEO1: %1 Limon esansiyel yağı, LEO2: %3 Limon esansiyel yağı.....64

*Analizde kullanılan disklerin çapı 5 mm'dir. 64
Çizelge 4.8. Film içerisine eklenen etken maddelerin, film içindeki konsantrasyonuna göre hazırlanan çözeltilerinin küflere karşı antifungal etkisi.....65
*B1: %1 Boraks çözeltisi, B2: %3 Boraks çözeltisi, BN1:%1 Bor nitrür çözeltisi, BN2: %3 Bor nitrür çözeltisi, C30B1:%1 Cloisite 30B çözeltisi, C30B2: %3 Cloisite 30B çözeltisi, EPO: Etil pirüvat, EP1: %1 Etil pirüvat özeltisi, EP2: %3 Etil pirüvat çözeltisi, LEOO: Limon esansiyel yağı, LEO1: %1 Limon esansiyel yağı, LEO2: %3 Limon esansiyel yağı CX:Siklohekzemit. 65
*Analizde kullanılan disklerin çapı 5 mm'dir. 65
Çizelge 4.9. Film içerisine eklenen etken maddelerin, film içindeki konsantrasyonuna göre hazırlanan çözeltilerinin mayalara karşı antifungal etkisi 66
*B1: %1 Boraks çözeltisi, B2: %3 Boraks çözeltisi, BN1:%1 Bor nitrür çözeltisi, BN2: %3 Bor nitrür çözeltisi, C30B1:%1 Cloisite 30B çözeltisi, C30B2: %3 Cloisite 30B çözeltisi, EPO: Etil pirüvat, EP1: %1 Etil pirüvat özeltisi, EP2: %3 Etil pirüvat çözeltisi, LEOO: Limon esansiyel yağı, LEO1: %1 Limon esansiyel yağı, LEO2: %3 Limon esansiyel yağı.....66
*Analizde kullanılan disklerin çapı 5 mm'dir. 66
Çizelge 4.10. Filmlerin bakterilere karşı inhibisyon zon çapları.....67
* Film besiyeri interaksiyonu sonucu film besiyeri üzerinde çözünerek genişlemiştir. Bundan dolayı inhibisyon sadece filmin genişlediği alanda belirlenmiştir. 67
*Aynı sütun üzerinde belirtilen farklı harfler istatistiksel açıdan ortalamalar arasındaki farklılığı ifade etmektedir ($p<0,05$). 67
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı .67
*Analizde kullanılan filmlerin çapı 5 mm'dir. 67
Çizelge 4.11. Filmlerin *Alternaria arborences, Aspergillus flavus, Penicillium digitatum, Penicillium citrinum, Penicillium expansum* türlerine karşı antifungal etkisi..73
*Film besiyeri interaksiyonu sonucu film besiyeri üzerinde çözünerek genişlemiştir. Bundan dolayı inhibisyon sadece filmin genişlediği alanda belirlenmiştir. 73
*Aynı sütun üzerinde belirtilen farklı harfler istatistiksel açıdan ortalamalar arasındaki farklılığı ifade etmektedir ($p<0,05$). 73
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı .73
*Analizde kullanılan filmlerin çapı 5 mm'dir. 73
Çizelge 4.12. Filmlerin *S. cerevisiae* ve *C. albicans* 'a karşı antifungal etkisi 75
*Film besiyeri interaksiyonu sonucu film besiyeri üzerinde çözünerek genişlemiştir. Bundan dolayı inhibisyon sadece filmin genişlediği alanda belirlenmiştir. 75
*Aynı sütun üzerinde belirtilen farklı harfler istatistiksel açıdan ortalamalar arasındaki farklılığı ifade etmektedir ($p<0,05$). 75
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı .75
*Analizde kullanılan filmlerin çapı 5 mm'dir. 75

Ek Çizelge 1. TSB toz beiyeri içerik listesi II
Ek Çizelge 2. PDB toz besiyeri içerik listesi II
Ek Çizelge 3. MHA toz besiyeri içerik listesi III

BÖLÜM 1
GİRİŞ

Gıda sektöründe ürünler, tüketici beğenisine sunulana kadar her türlü kimyasal (oksidasyon, enzimatik aktivite, ransidite) ve mikrobiyolojik (patojenler, mikotoksinler) tehlikelerle karşı karşıya gelmektedir. Bu tehlikeler engellenmediği takdirde bozulmayı takiben besin ve kalite kaybı kaçınılmazdır. Ayrıca bu ürünlerin tüketilmesi sağlık açısından risk oluşturmaktadır. Günümüzde bu bozulma reaksiyonlarını tamamen önlemek veya geciktirerek gıda güvenliğini sağlamak amacıyla çeşitli ambalajlama ve muhafaza yöntemlerinden yaralanılmaktadır.

Ambalajın temel fonksiyonu korumak olsa da gelişen teknoloji ve değişen yaşam şartları ile tüketici beklentileri gün geçtikçe artmaktadır. Günümüzde bu beklentiler; daha uzun raf ömrü sağlayacak, albenisi yüksek, kullanabilirliği kolay, herhangi bir toksik madde içermeyecek tamamen doğa dostu ambalaj kavramını ortaya çıkarmıştır. Sürdürebilirlik ve çevre güvenliğini sağlamak için artan doğa dostu ambalaja yönelik talep, doğada kendiliğinden hızla bozunabilecek gıda ambalajlama materyali geliştirmeye yönelik çalışmaların hızla artmasına neden olmaktadır (Avella ve ark., 2005; Othman, 2014). Bu alandaki en önemli gelişmelerden biri de biyopolimerlerdir. Biyopolimerler, petrol türevi plastiklerin aksine ucuz ve yenilebilir olması, biyolojik materyallerden elde edilmesi, doğada kendiliğinden bozunabilmesi, ucuz ve yenilebilir olması ile dikkat çekmektedir (Rhim ve Ng, 2007). Ancak biyobozunur polimerlerin düşük mekanik özelliklere sahip olması kullanımını kısatlamaktadır. Bundan dolayı son zamanlarda biyopolimerlere nanometre boyutunda çeşitli materyaller eklenerek mekanik özellikleri geliştirilmiş nanokompozit filmler üretilmektedir.

Antimikrobiyal ambalajlama, aktif maddenin bir torba içerisinde ambalaja tutturulması, ambalaj atmosferine dağıtılması veya çeşitli film materyalleri üzerine yedirilmesi ile oluşan sistemlerdir (Prasad ve Kochhar, 2014). Etanol, karbon dioksit, gümüş iyonları, klor dioksit, antibiyotikler, organik asitler, esansiyel yağlar ve baharatlar gibi birçok antimikrobiyal özellikteki madde antimikrobiyal ambalajlama sistemlerinde bozulma ve patojen etkiye sahip mikroorganizma gelişimini engellemek amacıyla kullanılmaktadır (Prasad ve Kochhar, 2014;Bahrami ve ark., 2018).

Bu tez çalışmasında polisakkarit bazlı kitosan ile hazırlanan nanokompozit filmlerin antibakteriyel ve antifungal etkinliğinin çeşitli antimikrobiyal maddelerin ilavesi ile arttırılması amaçlanmıştır. Her bir antimikrobiyal madde film formülasyonuna iki farklı

konsantrasyonda eklenmiştir. Elde edilen nanokompozit filmlerin meyve sebze gibi taze olarak tüketiciye sunulan ürünlerde bozulma etmeni ve toksin üretme potansiyeli bulunan küfler üzerine antifungal etkisi, önemli patojen bakteriler üzerine antibakteriyel etkisi araştırılmıştır.

BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Biyopolimerler

Biyopolimerler biyolojik ve sentetik materyallerden elde edilen doğada kendiliğinden parçalanabilen biyolojik materyallerdir. Biyopolimerlerin bozunması mekanik, termal, kimyasal, biyolojik veya fotolitik etkiler ile gerçekleşebilmektedir (Lizarrage-Labarin ve ark., 2018). Bir polimerin bakteri, küf, mayalar tarafından enzimatik yolla aerobik ortamda parçalanması sonucu CO_2 ve H_2O, anerobik koşullarda parçalanması sonucu ise metan ve hidrokarbon gibi ürünler açığa çıkmaktadır (Avella ve ark., 2005; Othman, 2014). Güneş radyasyonu, rüzgar ve ortam sıcaklığı gibi doğal olarak değişen iklim şartlarına maruz kalan bir polimerin parçalanması sırasında ise oksidatif bir dizi reaksiyon meydana gelerek peroksit ve hidroperoksitler açığa çıkmaktadır (Lizarrage-Labarin ve ark., 2018).

Biyopolimerler, elde edildiği hammadde ve üretim şekline göre üç başlık altında toplanmaktadır;

- Biyokütleden doğrudan ekstrakte edilen biyopolimerler (nişasta ve türevleri, selüloz ve türevleri, kitin/kitosan, peyniraltı suyu proteini)
- Biyolojik olarak türetilmiş monomerlerin kimyasal sentezi yolu ile elde edilen biyopolimerler (polilaktik asit, polihidroksi karbonat, polivinil alkol, etilen vinil alkol)
- Doğal veya genetik olarak değiştirilmiş organizmalardan elde edilen biyopolimerler (bakteriyel selüloz, ksantan, pullulan) (Dursun ve ark., 2010; Fabra ve ark., 2014;Popović ve ark., 2018;Schmid ve Müller, 2019)

Nişasta, selüloz ve türevleri, kitosan, karragenan, pektin gibi polisakkaritler biyobozunur ambalaj malzemelerinin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Polimer filmler, polimer yapının parçalanarak polimer zincirinin jel haline dönüşmesi ve hidrojen bağı oluşturan hidrofilik çözücünün yapıdan buharlaştırılarak uzaklaştırılması ile oluşturulur (Rhim ve Ng, 2007). Polisakkarit polimerlerin çeşitli gaz ve aroma maddelerine karşı güçlü bariyer özelliği ve aktif bileşenleri taşıma yeteneğine sahip olması kullanımı için avantaj sağlamaktadır. Ancak polisakkarit moleküllerinin hidrofilik karakterde olması zayıf su buharı geçirgenliğine neden olmaktadır (Popović ve ark., 2018).

Soya proteini, peynir altı suyu proteini, kazein, kollajen, mısır zeini, jelatin ve buğday gluteni farklı kaynaklardan elde edilen proteinler biyobozunur filmlerin

hazırlanmasında kullanılmaktadır (Kumar ve ark., 2010). Isı uygulanması, pH 'nın değiştirilmesi veya çapraz bağlayıcı ajanların ortama eklenmesi ile polimerik yapıda açılmalar meydana gelmektedir (Schmid ve Müller, 2019). Ardından kısmen denatüre olan peptit zincirleri hidrofilik ve hidrojen bağları yoluyla bir araya gelerek protein matrisinin oluşumunu sağlamaktadır (Rhim ve Ng, 2007). Proteinler mükemmel gaz bariyeri özelliğine sahip olduğundan dolayı gıda ambalajlama sektöründe biyobozunur materyal olarak tercih edilmektedir. Ancak polisakkarit materyallere benzer şekilde hidrofilik yapıda olmaları zayıf su buharı geçirgenliğine neden olmaktadır (Popović ve ark., 2018). Lipitler ise polisakkarit ve proteinlerin aksine hidrofobik yapısından dolayı güçlü su bariyer özelliğine sahiptir. Balmumu, karnauba mumu, kandelilla balmumu, trigliserid, asitlendirilmiş monogliserid, yağ asitleri ve çeşitli bitkisel yağlardan (palm, mısır, vb.) elde edilen biyobozunur polimerler gıdanın nem kaybını önlemek ve parlaklığını arttırmak için avantaj sağlamaktadır (Rhim ve Ng, 2007;Popović ve ark., 2018). Ancak kısıtlı oksijen bariyer özelliği ve kaplama materyali olarak kulanılması sonucu yağda katılaşmanın gerçekleşmesi lipid bazlı polimerlerin dezavantajları arasında yer almaktadır (Rhim ve Ng, 2007).

Özetle biyopolimerlerin gıdanın nem kaybının önlenmesi, gaz geçirgenliğinin kontrollü bir şekilde sağlanması, mikrobiyal aktiviteyi kontrol altına almak, gıdanın yapısal bütünlüğünün korunması, antioksidan ve aroma maddelerinin gıdaya kontrollü salınımını sağlamak gibi birçok avantajı vardır (Fabra ve ark., 2014). Ancak biyopolimerlerin petrol türevi ambalaj materyallerine göre daha zayıf mekanik, termal ve bariyer özelliklerine sahip olmaları gıda ambalajlama için yeterli olmamasına neden olmaktadır (Othman, 2014). Bundan dolayı biyopolimerlere 100 nm ve daha küçük boyutlarda nano dolgu materyalleri eklenerek ısıya ve mekanik darbelere dayanıklı, hafif, yüksek gaz ve nem bariyerine, yüksek antimikrobiyal etkiye sahip nanokompozit filmler elde edilmektedir (Dursun ve ark., 2010;Othman, 2014). Nanokompozit filmler çoğunlukla aktif akıllı ambalaj (antimikrobiyal filmler) ve yenilebilir film/kaplama teknolojisi ile birlikte gıdalara uygulanarak gıda ambalajının fonksiyonunun artmasına olanak sağlamaktadır (Dursun ve ark., 2010).

2.2. Nanokompozitler

Nanokompozitler nanometre boyutlarında iki veya daha fazla dolgu materyallerini içeren çok fazlı yapılardır (De Azeredo, 2011;Valapa ve ark., 2017; Armentano ve ark., 2018). Polisakkarit, protein ve lipit bazlı olan nanokompozitler 1-100 nm aralığında nano-dolgu materyallerinin eklenmesi ile hazırlanmaktadır.

Nanokompozit malzemelerde nano boyuttaki dolgu maddelerinin geniş bir yüzey alanına sahip olması, dolgu ile matriks arasındaki etkileşime bağlı olarak film mekanik (sertlik, kararlılık ve ısıya karşı direnç) ve bariyer (Oksijen, CO_2 gibi gazlar ve UV ışınlarına karşı) özelliklerinin gelişmesini sağlamaktadır (De Azeredo, 2009;Kumar ve ark., 2010;Silvestre ve ark., 2011). Nano-dolgu maddelerinin türü, matriks içindeki yoğunluğu, en/boy oranları ve nanokompozit filmlerin hazırlanma koşulları gibi faktörler hazırlanan nanokompozitin performansını belirlemektedir (Othman, 2014;Popović ve ark., 2018).

2.2.1. Polisakkarit Bazlı Nanokompozitler

Nişasta 1,4-α-D glikopiranozil birimlerinin tekrarlanmasıyla amiloz ve amilopektinden oluşur. Amiloz α (1-4) glikozidik bağıyla birbirine bağlı ve doğrusaldır. Amilopektin ise amilozun aksine α (1-4) bağıyla bağlanmış bir iskeletten ve α (1-6) bağına sahip dallanmış yapıdan oluşur. Nişastanın amiloz ve amilopektinin miktarı elde edildiği bitki kaynağına göre farklılık göstermektedir (Avella ve ark., 2005). Örneğin mısır nişastası %70 amilopektin, %30 amiloz içermekte iken pirinç nişastasında amiloz %18-28, amilopektin %72-82 oranındadır (Ölçer ve Akın, 2008). Amiloz ve amilopektin oranı çeşitli özelliklere sahip polimerik malzemelerin karakterize edilmesinde önemlidir. Bunun nedenini literatürdeki bir kaynak amilozun doğrusal fraksiyonda olmasının güçlü ve kararlı film oluşumunu sağlarken, dallanmış yapıya sahip amilopektinin yan zincirlerinin zayıf mekanik özelliğe sahip olabileceği şeklinde açıklamaktadır (Popović ve ark., 2018). Ancak başka bir kaynakta zayıf performansın amiloz kristallerinin zamanla düzensiz büyümesi sonucu oluşan kırılgan yapıdan kaynaklanabileceği bildirilmektedir (De Azeredo, 2009).

Gıda ambalajlama sektöründe, nişasta esaslı malzemeler düşük maliyeti nedeni ile her ne kadar ilgi görse de nişasta moleküllerinin hidrofilik özellikte olması filmlerin zayıf nem bariyer özellikte olmasına neden olmaktadır. Nişasta bazlı polimerlerin zayıf nem bariyeri ve mekaniksel özelliklerini güçlendirmek nano boyuttaki maddelerin filmlere eklenmesi ile mümkün olmaktadır (Dursun ve, ark., 2010). Ali ve ark. (2018), nişasta bazlı filmlere selüloz ve nişasta kristalleri ekleyerek daha üstün mekanik özelliklere sahip filmlerin elde edilebileceğini bildirmiştir.

Selüloz bitki hücre duvarında yaygın olarak bulunan biyobozunur bir polimerdir. Selüloz bazlı filmleri oluşturabilmek için molekül yapısında bulunan hidroksi grupları asetat ve metil gibi fonksiyonel gruplar ile yer değiştirilmektedir (Popović ve ark., 2018). Elde edilen selüloz asetat, karboksimetil selüloz (CMC), hidroksipropil metilselüloz (HPMC) gibi farklı selüloz türevleri nanokompozit film çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Dursun ve ark, 2010;Othman, 2014). HPMC gibi selüloz türevleri geniş kullanım alanı, kolay işlenebilirliği ve mükemmel film oluşturma özelliğinden dolayı tercih edilse de hidrofilik özellikte olması oluşturulan malzemeye zayıf nem bariyeri özelliği kazandırmaktadır (Bahrawi ve ark., 2018).

Selülozun ardından doğada en yaygın bulunan biyopolimer kitosandır (Liz_arraga-Laborín ve ark., 2018). ‘2.3. Kitosan Nanokompozit Filmler’ başlığı altında kitosan hakkında ayrıntılı bilgi verilmiştir.

2.2.2. Protein Bazlı Nanokompozitler

Soya proteininin 7S (b-konglisinin) ve 11S (glisinin) fraksiyonları toplam proteinin yaklaşık %90 ’ını oluşturmaktadır. Molekül ağırlığı 140-170 kDa olan b-conglycinin 58, 57 ve 42 kDa molekül ağırlığına sahip üç alt birimden oluşmaktadır. Molekül ağırlığı 340-375 kDa olan glisin ise disülfit bağları ile birbirine bağlanan altı asidik (35kDa) ve altı temel (35 kDa) polipeptit zincirinden oluşmaktadır (Kumar ve ark., 2010). Yalnızca soya proteini ile yapılan biyopolimerlerin aşırı derecede kırılgan özelliğe sahip olması film içeriğine çeşitli katkıların eklenmesini gerektirmektedir. Echeverría ve ark. (2014), %5 ve %10 oranında iki farklı konsantrasyon da montmorillonit (MMT) içeren soya proteini nanokompozit filmlerini hazırlamıştır ve kilin artan konsantrasyonuna bağlı olarak film parlaklığının azaldığını bildirmiştir. Ayrıca MMT ’nin film içeriğine eklenmesinin filmin suya karşı olan dayanıklılığında önemli bir iyileşme sağladığını tespit etmiştir.

En az %90 oranında protein içeren soya proteini izolatı soya proteininin ticari yan ürünüdür (Kumar ve ark., 2010; Han ve ark., 2018). Soya protein izolatı filmleri mükemmel yağ ve oksijen bariyeri özelliğine sahip olsa da zayıf mekanik direnci ve yüksek su hassasiyeti gıda ambalajlama sektöründe kullanımını kısıtlamaktadır (Han ve ark., 2018). Kumar ve ark. (2010), soya proteini izolatı filmlerine MMT eklenmesinin film kopma mukavemeti, kopmada uzama yüzdesi, camsı geçiş sıcaklığı, depolama modülü ve termal stabilitesi açısından önemli bir gelişme gösterdiğini bildirmektedir. Ayrıca Han ve ark. (2018), nanoselüloz-meyan kökü (100-400 nm uzunluğunda ve 10-35 nm çapında) kalıntısı ile hazırladıkları soya proteini izolatı filmlerinin çekme mukavemetini arttırdığını, oksijen geçirgenliğini azalttığını ve sulu ortamda yüksek stabiliteye sahip filmler oluşturduğunu bildirmektedir.

Peynir altı suyu (PAS) proteinleri ß-laktoglobulin, α-laktalbumin, sığır serum albumin gibi birkaç immünoglobulin ve proteoz pepton gibi polipeptitleri içermektedir (Schmid ve Müller, 2019). PAS proteininin en saf hali peynir altı suyu proteini izolatıdır (Azevedo ve ark., 2015). PAS proteini izolatı yapısındaki yüksek polar aminoasitlere bağlı olarak hidrofiliktir. Bundan dolayı üretilen filmlerin su buharına karşı olan bariyer özelliği orta derece, mekanik özellikleri ise düşük derecede kuvvetlidir (Sukyai ve ark., 2018). Sothornvit ve ark. (2008), PAS proteini izolatı bazlı filmlerin su buharı bariyer özelliğinin geliştirilmesinin film içeriğine %5 oranında nano-kil eklenerek mümkün olabileceğini bildirmiştir. Azevedo ve ark. (2015), peynir altı suyu proteini izolatı filmlere %3 oranında artan konsantrasyon da MMT eklenmesinin bio-nanokompozit filmlerin termal stabilitesini, elastik modülünü, gerilme mukavemetini ve film uzamasını arttırdığını bildirmiştir. Ancak filmlere MMT kiline ek olarak sitrik asit eklenmesinin termal stabilite de azalmaya yol açtığını tespit etmiştir. Sukyai ve ark. (2018) ise, PAS proteini izolatı filmlerinin gerilme mukavemetinin film formülasyonuna selüloz kristallerinin eklenmesi ile de artabileceğini bildirmektedir.

2.2.3. Nano-Dolgu Maddeleri

Biyopolimerlerin fiziksel özelliklerini geliştirmek için polimer matriksine eklenen 100 nm veya daha küçük boyutlardaki malzemelerdir (Othman, 2014). Nano boyuttaki materyallerin artan ‘yüzey alanı/hacim’ oranı materyalin daha fazla moleküle etkileşimini sağlayarak materyal aktifliğini arttırmaktadır (Polat ve Fenercioğlu, 2014). Genel olarak polimerin mekanik ve bariyer özelliklerini geliştirmek için kullanılsa da çeşitli nano-dolgu malzemelerinin matriks içerisine yerleştirilmesi ambalaj materyaline antimikrobiyal ajan,

antioksidan, biyosensör ve oksijen tutucu gibi fonksiyonel özellik kazandırmaktadır (Dursun ve ark.,2010;Othman, 2014). Nano-dolgu malzemeleri nanoküre veya nanopartiküller (üç boyutlu yapı), nanokıllar veya nanotüpler (iki boyutlu yapı), nanotabaka veya nanoplakalar (bir nanoboyutlu yapı) olmak üzere üç farklı nanomerik gruba sınıflandırılmaktadır (De Azeredo, 2011; Othman, 2014). Bunun dışında elde edildiği kaynağa göre de nano-dolgu materyalleri organik ve inorganik yapıda olabilmektedir. Kil, silikat nanotabakaları, nişasta nanokristalleri, selüloz bazlı nanolifler ve kitin/kitosan bazlı nanopartiküller organik yapıda iken SiO_2 nanopartikülleri inorganik yapıdaki dolgu malzemeleri arasında sayılabilmektedir (Duncan, 2011). Farklı yapıdaki bu nano-dolgu malzemeleri çeşitli polimerlerin özelliklerinin iyileştirilmesinde kullanılmaktadır. Çizelge 2.1. ’de farklı tipteki dolgu maddeleri ve kullanılan matriksler gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Nanokompozit filmlerde kullanılan nano-dolgu maddeleri ve matriksler

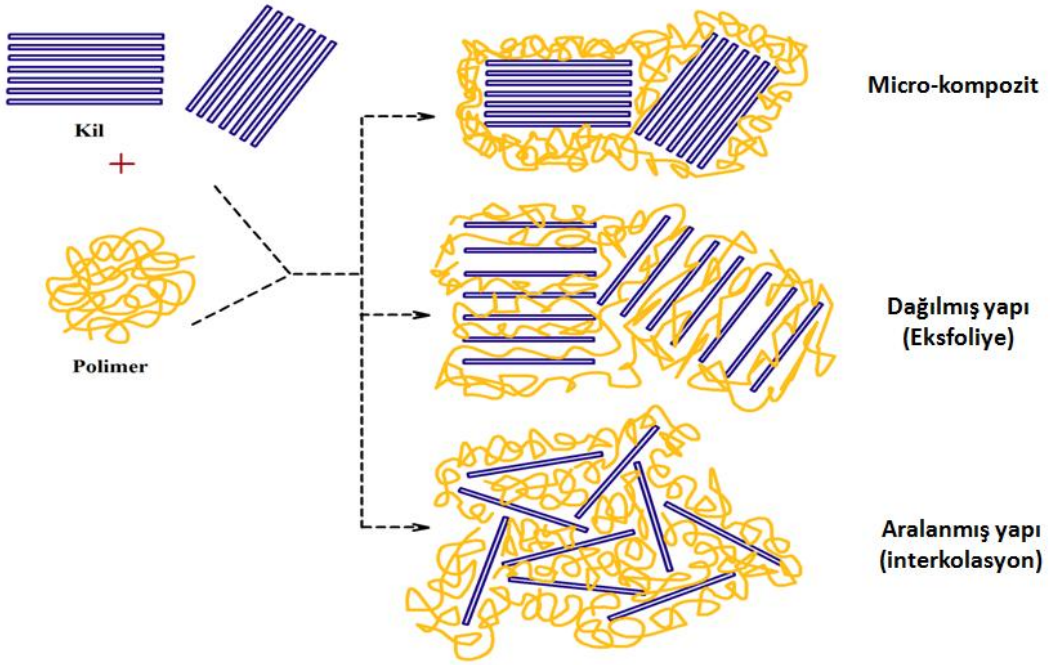
Sınıf	**Nano-Dolgu Malzemesinin Tipi**	**Örnek**	**Matriks**	**Referanslar**
Organik	Kil	Montmorillonit	Nişasta PAS proteini izolatı	Avella ve ark., 2005 Azevedo ve ark. 2015
		Cloisite 15A, 20A, 30B, Ca Cloisite 30B, 20A, Na	Kitosan PAS Proteini İzolatı	Rhim ve ark., 2006;Rahvalı, 2016 Sothornvit ve ark., 2008
		Halloysit Nanotüp	Kitosan Balmumu	Lee ve ark., 2018 Cavallaro ve ark., 2015
		Nişasta Nanokristalleri	Pullulan	Kristo ve Biliaderis, 2007
		Selüloz Kristalleri	PAS Protein İzolatı	Sukyai ve ark., 2018
	Antimikrobiyal Madde	Nisin Nisin	Kitosan Jelatin	Duran ve ark., 2016 Pranoto ve ar., 2015
İnorganik	Metal	Gümüş (Ag)	Kitosan	Bibi ve ark., 2018
		Sülfür NPs	Kitosan	Shangar ve Rhim, 2017
	Metal oksit	Çinko oksit NPs (ZnO)	Kitosan	Al-Naamani ve ark., 2017;Dananjaya ve ark., 2018
		MgO NPs	Kitosan	Silva ve ark., 2017
		TiO_2 NPs	Kitosan	Zhang ve ark., 2017
		Nano-Silisyum oksit (SiO_2)	Nişasta	Xiang ve ark., 2008

2.2.3.1. Organik Nano-Dolgu Maddeleri

Organik nano-dolgu materyalleri arasında kil (Montmorillonit, Cloisite), doğal polimerler (kitosan, nişasta, selüloz) ve nisin gibi bazı antimikrobiyal ajanlar sayılabilmektedir.

Kil, SiO_2 ve AlO_6 gibi metal oksit ve alkali metalleri içeren organik yapılardır (Valapa ve ark., 2017). Nano boyuttaki kil polimerle karıştırıldığında faz-ayrışık (mikro-kompozit), dağılmış (eksfoliye) ve aralanmış (interkolasyon) yapıda üç tip kompozit elde edilir (Tekin, 2007). Şekil 2.1. de nanokil ve polimerler arasında oluşabilecek 3 farklı yapı

tipi gösterilmektedir. Mikro-kompozit yapıda, bütün kil partikülleri polimer matriksi içine dağılır fakat kil ve polimerler arasındaki zayıf etkileşim nedeni ile kil tabakalara ayrılmaz. Oluşan yapı nanokompozit yerine mikrokompozit olarak adlandırılır (Dursun ve ark., 2010;Silvestre ve ark., 2011; Valapa ve ark., 2017). Dağılmış yapıda polimerin küçük bir miktarı kilin tabakaları arasına girdiğinde oluşmaktadır. Bu yapıda iç tabaka boşlukları genişlemekte ve iyi düzenlenmiş çok tabakalı bir yapı oluşmaktadır (Dursun ve ark., 2010;Silvestre ve ark, 2011). Aralanmış yapı da ise kil tek tek tabakalar halinde yayılarak polimer matriksi içerisinde dağılım göstermektedir. Dağılmış yapıdaki nanokompozitler kil ve polimer arasındaki optimal etkileşimden dolayı en ideal yapısal özellikleri sergilemektedir (De Azeredo, 2009;Dursun ve ark., 2010;Valapa ve ark., 2017).



Şekil 2.1. Polimer/kil nanokompozitlerinde oluşabilecek muhtemel yapı tipleri (Valapa ve ark., 2017)

Polimerler tipik olarak hidrofobikken, killer hidrofiliktir. Bundan dolayı nanokillerin polimerlerle olan uyumluluğunu iyileştirmek için kimyasal olarak modifiye edilmektedir (Arora ve Padua, 2010). Montmorillonit (MMT) hidrate edilmiş alüminyum silikat tabakalı kildir ve elastik modül 178 GPa değerindedir (Dursun ve ark., 2010;De Azeredo, 2009). MMT'nin elastik modülünün yüksek değere sahip olması polimerlere uygulanan stresin önemli bir bölümünü taşıyarak polimer mekanik özelliklerinin iyileşmesini sağlamaktadır (Kumar ve ark., 2010).

MMT kil materyalinin kuarterner amonyum sürfaktanlar ile modifiye edilmesi sonucu Cloisite elde edilmektedir (Valapa ve ark., 2017). Cloisite nanometre ölçekte organik modifiye edici içeren 11 nm kalınlığa ve 70-150 nm genişliğe sahip tabakalı magnezyum, alüminyum silikat levhacıklardır. Yüzeyleri organik moleküllerle modifiye edilerek Cloisite 15A, Cloisite 30B gibi farklı yüzey alanı-boy oranına ve geliştirilmiş mekanik özelliklere sahip kil formları oluşturulmaktadır (Othman, 2014; Rahvalı, 2016).

Avella ve ark. (2005), kil nanopartiküllerini içeren nişasta bazlı kompozit filmleri test ettiklerinde; nişasta ve kil nanopartikülleri arasında iyi bir interaksiyon gerçekleştiğini buna bağlı olarak film mekanik özelliklerin geliştiğini bildirmiştir.

Halloysit nanotüp $Al_2Si_2O_5(OH)$ $4.nH_2O$, kaolin sınıfı kilin bir alt grubudur. Diğer kil minerallerinin aksine içinin boş olması aktif ajanların kapsüllenmesine neden olmaktadır. Toksik etkisinin olmaması, çevre dostu ve biyo-uyumluluğundan dolayı ABD İlaç İdaresi tarafından güvenli (GRAS) gıda ambalaj malzemesi olarak kabul edilmiştir (Lee ve ark., 2018). Lee ve ark. (2018), kitosan nanokompozit filmlerde halloysit nanotüplerin (HNT) ağırlıkça %20 oranında kullanıldığında film gerilme mukavemetini azalttığını buna bağlı olarak film matrisinde hasar ve çatlaklara yol açabileceğini bildirmiştir.

Selüloz uzun lifli yapıda hücrelere sahip oldukça güçlü bir polimerdir. Selülozun doğal olarak elde edilmesi, düşük maliyeti, kimyasal stabilitesi, süldürülebilir olması nedeniyle kompozitlerde kullanımı avantaj sağlamaktadır ve özellikle biyomateryaller arasında selüloz nanolifleri şeklinde öne çıkmaktadır (Dufresne, 2017;Amalraj ve ark., 2018). Liflerin orjinine bağlı olarak (2-20 nm) değişen nano boyutlu çapları ve mikrometre boyutlarında uzunlukları vardır. Yapılan çalışmalar selüloz liflerinin polimer matrisine dahil olmasının camsı geçiş sıcaklığının (Tg) üzerindeki sıcaklıklarda polimerlerin mukavemetini ve modülünü geliştirmek için etkili olduğunu bildirmektedir. Ayrıca polimerin uzamasını da katkıda bulunduğu bildirilmektedir (De Azeredo, 2009). Sukyai ve ark. (2018) ise, PAS proteini izolatı filmleri 200 nm uzunluğa ve 20-40 nm çapa sahip

selüloz kristallerini ağırlıkça %0-8 oranında ekleyerek hazırlamıştır. Artan selüloz kristali miktarına bağlı olarak mukavemetin arttığını ancak gerilmenin azaldığını bildirmektedir.

Nişasta kristal parçacıkları 6-8 nm kalınlığında ve küresel morfolojik yapıdadır (De Azeredo, 2009;Dursun ve ark., 2010). Kristo ve Biliaderis (2007), nişasta nanokristallerini pullulan filmlere eklediğinde artan dolgu materyali miktarı ile film su alımının azaldığını tespit etmiştir. Su buharı geçirgenliğinin ise ağırlıkça %20 nanokristal içeriğinde sabitken, nanokristal içeriği arttıkça azaldığını bildirmiştir. Ayrıca nanokristal miktarının artması ile camsı geçiş sıcaklığının da yüksek sıcaklığa çıktığını belirtmiştir.

2.2.3.2. İnorganik Nano-Dolgu Maddeleri

İnorganik nanopartiküller içerisinde gümüş (Ag), bakır (Cu), altın (Au) gibi metaller ile gümüş oksit (Ag_2O), titanyum dioksit (TiO_2), magnezyum oksit (MgO), çinko oksit (ZnO), silisyum dioksit (SiO_2) gibi çeşitli metal oksitler yer almaktadır (Silva ve ark., 2017).

Gümüş yüksek kimyasal kararlılıkta, bakterisit özelliği ve geniş antimikrobiyal aktiviteye sahip olması ile bilinen bir elementtir. Gümüş nanoparçacıklar ise geniş yüzey alanı ve yüksek orandaki yüzey atomları nedeni ile gümüş metaline kıyasla arttırılmış antibakteriyel aktiviteye sahiptir (Armentano ve ark., 2018; Shah ve ark.,2018; Bahrawi ve ark., 2018). Ayrıca yapılan çalışmalar gümüş nanopartiküllerinin polivinil alkol matrisinin camsı geçiş sıcaklığını ve matris stabilitesini arttırdığını göstermektedir (De Azeredo, 2009).

Elemental haldeki sülfür ise başta antibakteriyal özellikte olması nedeni ile nanokompozit malzemelerin çeşitli mekaniksel özelliklerini geliştirme de yaygın olarak çalışılmaktadır. Farklı tipte sülfür nanopartiküllerini içeren kitosan bazlı nanokompozitleri hazırlayan Shankar ve Rhim (2018), nanopartiküller ve kitosan molekülleri arasındaki etkileşim artışına bağlı olarak film gerilme direnci ve elastik modülünde bir artış olduğunu belirtmektedir.

Magnezyum oksit (MgO) nanopartikülleri antimikrobiyal aktivite, termal ve elektriksel yalıtım, biyo-uyuyumluluk, UV engelleyici özelliklerine sahip toksik olmayan bir metal oksittir (Silva ve ark., 2017). Ayrıca bu özelliklere ek olarak Silva ve ark. (2017), MgO nanopartiküllerinin kitosan filmlere ağırlıkça %5 oranında eklenmesinin çekme geriliminde %86, elastikiyet modülünde %38 artış sağlayarak nanokompozitin mekanik özelliklerini geliştirdiğini bildirmiştir.

Çinko oksit (ZnO) nanopartikülleri koku giderici özelliği, yüksek sıcaklıkta stabilitesi ve antimikrobiyal özellikte olması nedeniyle yaygın kullanılan bir diğer metal oksittir (Othman, 2014). Diğer metal oksitler ile karşılaştırıldığında ZnO düşük maliyeti, renksiz ve UV engelleyici özelliğiyle dikkat çekmektedir. Ayrıca ZnO nanoparçacıklarının biyouyumluluk, antimikrobiyal özelliği ve düşük toksisiteye sahip olması nanokompozit film çalışmalarında tercih sebebidir (Al-Naamani ve ark., 2017).

Polimerin mekanik ve termal özelliklerini geliştirdiği bilinen bir diğer dolgu maddesi Silisyum oksittir. Xiang ve ark. (2008), nişasta bazlı polimerlere nano-SiO_2 eklenmesinin gerilme mukavemeti, kopma uzaması ve geçirgenliği sırasıyla %79.4, %18 ve %15 arttırdığını; su emme oranını %70 azalttığını tespit etmiştir.

2.3. Antimikrobiyal Nanokompozit Filmler

Antimikrobiyal aktivite kazandırılmış nanokompozitler gıdalarda bozulma etmeni mikroorganizmaların gelişimini engellemekte ve gıda kaynaklı patojenleri yok ederek gıda zehirlenmeleri gibi çeşitli salgın ve hastalıkların azalmasını sağlamaktadır (Shankar ve Rhim, 2018).

2.3.1. Nanokompozit Filmlerde Kullanılan Antimikrobiyal Maddeler ve Etki Mekanizmaları

Nanokompozit film ve malzemeler de lizozim, peroksidaz gibi enzimler; çeşitli bitki esansiyel yağları; sorbik, benzoik, propiyonik asit gibi organik asit ve bunların tuzları antimikrobiyal ajan olarak kullanılmaktadır. Ayrıca film mekanik özelliklerini geliştirmede yardımcı olan montmorillonit (MMT), kitosan, gümüş (Ag), magnezyum (Mg), bakır (Cu), titanyum dioksit (TiO_2), magnezyum oksit (MgO), çinko oksit (ZnO) ve karbon nanotüpler gibi nano-dolgu materyalleri de antimikrobiyal özellik göstermektedir (Duncan, 2011;Othman, 2014;Polat ve Fenercioğlu, 2014;Prasad ve Kochhar, 2014).

Gümüş düşük uçuculuğu, sıcaklığa karşı yüksek kararlılıkta ve çok çeşitli mikroorganizmalara karşı güçlü toksisitesi ile bilinen antimikrobiyal ajandır (De Azeredo, 2009). Uzun yıllar yiyecek ve içecek depolama uygulamalarında antimikrobiyal ajan olarak kullanılmıştır. Ancak gümüşün antibakteriyel etkisi henüz net bir şekilde açıklanamasa da genel bir görüş aşağıdaki üç farklı mekanizmalardan en az biri ile gerçekleştiğini bildirmektedir:

a) Zar proteinleri ve diğer enzimlerin yüzeyleri üzerinde sülfhidril veya disülfür fonksiyonel gruplarına bağlanarak hayati hücresel süreçlerle etkileşime girme,
b) DNA replikasyonunun bozulması,
c) Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve bunların katalizi ile oksidatif stresin gerçekleşmesidir (Duncan, 2011).

Ancak hücre yapılarındaki farklılıktan dolayı bu mekanizmalardan hangisi daha sık gerçekleştiği bilinmemektedir. Gümüş metaline karşı gram negatif hücreler, gram pozitif hücrelere göre daha duyarlıdır. Gram pozitif hücre duvarı yapısı gümüş iyonlarının membran boyunca yavaş taşınmasına neden olurken gram negatif hücre duvarının daha ince olması bu süreyi hızlandırır (Duncan, 2011). Shah ve ark. 2018, gümüş nanopartiküllerinin antimikrobiyal etki mekanizmasını; pozitif yüklü gümüş iyonları ve hücre duvarındaki negatif yüklü fosfor, sülfür grupları arasındaki moleküler etkileşim sonucu bakteri hücre duvarının bozulması sonucu olabileceğini bildirmiştir. Bazı araştırmacılar ise bu durumu gümüş nanopartiküllerinin hücre zarı proteinlerine bağlandıktan sonra zarda çukurlar oluşturduklarını ve daha farklı morfolojik değişikliklere yol açarak geçirgenliğin artması sonucu yapısal hasara neden olabileceğini bildirmiştir (De Azeredo, 2009;Duncan, 2011; Singh ve ark., 2019).

Mikrobiyal hücrelerle etkileşim için daha geniş yüzey alanına sahip olan daha küçük gümüş nanopartikülleri, büyük gümüş parçacıklarına göre daha iyi bakterisid etkiye yol açmaktadır (De Azeredo, 2009). Gümüş nanopartiküllerinin *E. coli, Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Vibrio cholerae, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas oleovorans, Shigella flexneri, Bacillus anthracis, Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Proteus mirabilis, Salmonella enterica, Salmonella typhimurium, Micrococcus luteus, Listeria monocytogenes, Klebsiella pneumoniae* gibi bakteri türlerine ve *Candida albicans, Aspergillus niger, Trichophyton mentagrophytes* gibi mantar türlerine karşı antimikrobiyal etkinliği yapılan çalışmalar da tespit edilmiştir (Duncan, 2011).

Sülfür elementinin (kükürt) antimikrobiyal özelliği uzun yıllardır bilinmektedir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar 150 nm boyutlarındaki sülfür nanopartikülleri üzerinedir (Shankar ve Rhim, 2018). Sülfür nanopartiküllerinin antibakteriyel etkisi için 3 farklı mekanizma önerilmektedir. Bu mekanizmalar;

a) Negatif yüklü sülfür nanopartiküllerinin hücre yüzeyinde bulunan enzim ve proteinlerle etkileşmesi ve hücresel bileşenlerin sızıntısına neden olması (Shankar ve Rhim, 2018).
b) Sülfür nanoparçacıklarından sülfür iyonu oluşarak yüksek konsantrasyonda mikroorganizma hücrelerine katılması veya adsorpsiyonu ile hidrojen sülfür, pentatiyonik asit gibi çeşitli uçucu bileşiklerin açığa çıkması ve bu bileşenlerin mikrobiyal solunum ile ilgi enzimlere zarar vererek, lipit ve protein denatürasyonuna neden olması (Choudhury ve Goswami, 2012).
c) Sülfür nanoparçacıklarının DNA ile etkileşimi sonucu DNA yıkımı ve ardından hücre ölümüdür (Shankar ve Rhim, 2018).

TiO_2 foto katalitik özelliğe sahip antimikrobiyal metal oksittir. Işık etkisi ile mikroorganizma hücre duvarında bulunan fosfolipitlerin peroksidasyonuna neden olarak membran bütünlüğünün bozulmasına yol açmaktadır (De Azeredo, 2009;Duncan, 2011). TiO_2 antimikrobiyal etkinliğini yalnızca UV gibi fotokatalizör eşliğinde gösterebilmektedir (Polat ve Fenercioğlu, 2014). Örneğin yapılan çalışmalar TiO_2 nanopartiküllerinin *Salmonella choleraesuis* subsp., *Vibrio parahaemolyticus* ve *L. monocytogenes* suşlarına karşı antimikrobiyal etkinliğin karanlıkta değil ışık altında gerçekleştiğini desteklemektedir (Duncan, 2011).

Esansiyel yağlar aromatik bitki materyallerinden ekstrakte edilen yağlı aromatik sıvılardır. Doğal olarak farklı bitkilerin sekonder metaboliti olarak sentezlenir (Guerra ve ark., 2015). Esansiyel yağlar aldehit, keton ve esterler başta olmak üzere 100'den fazla bileşenden oluşmaktadır. Ancak içeriğindeki fenolikler ve terpenler esansiyel yağın antimikrobiyal etkisine önemli derecede katkı sağlamaktadır (Zivanovic ve ark., 2005). Esansiyel yağlar mikroorganizma hücresine; hücre zarına saldırmak, enzim sistemini ve bakteri genetik materyalini bozmak gibi mekanizmalar ile etki etmektedir (Popović ve ark., 2018).

2.3.2. Antimikrobiyal Aktiviteye Etki Eden Faktörler

Nanokompozit sistemlerde polimerik matriks/antimikrobiyal madde arasındaki etkileşim sistem aktivitesi açısından önemli bir parametredir. Her iki materyal arasındaki uyum antimikrobiyal madde salınımının kontrollü gerçekleşmesini sağlar (Shankar ve Rhim, 2018). Shankar ve Rhim (2018), kitosan/sülfür nanokompozitin elde edilmesi sırasında sülfür nanopartiküllerinin seçilen polimer matriksinde dağılımı ve nanopartikül boyutunun film antimikrobiyal aktivitesini etkilediğini bildirmektedir.

Farklı konsantrasyonlarda gümüş nanopartiküllerini içeren Kitre/Hidroksipropil metilselüloz/Balmumu nanokompozit filmleri hazırlayan Bahrawi ve ark. (2018), *B. cereus*, *S. aureus*, *S. pneumonia*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S.* Typhimurium, *Ps. aeruginos* ve *K. pneumoniae* suşlarına karşı filmlerin antimikrobial özelliklerini disk difüzyon yöntemi ile test etmiştir ve gümüş nanopartiküllerinin konsantrasyonuna bağlı olarak film antimikrobiyal etkinliğinin her mikroorganizma için arttığını bildirmektedir.

Ancak antimikrobiyal aktivitenin etkinliğini yalnızca film ve antimikrobiyal ajan arasındaki ilişkiye bağlamak yanlış olmaktadır. Çünkü her bir antimikrobiyal ajan spesifik bir mikroorganizmaya karşı karakteristik inhibitör etki mekanizması ve spesifik aktiviteye sahiptir (Dursun ve ark., 2010). Bu spesifik etkinin nedeni test edilen her mikroorganizmanın hücre yapısının farklı olmasından kaynaklanmaktadır (Shah ve ark., 2018). Örneğin Bahrawi ve ark., (2018) bakteriler için bu farklılığın hücre duvarındaki peptidoglukan tabakasından kaynaklandığını bildirmiştir. Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarı yapısındaki kompleks peptidoglukan tabakası yüzeyinde güçlü negatif yükler mevcuttur. Bu yükler nanopartiküllerinin sitoplazmik membrana istilasını zorlaştırmaktadır. Gram-negatif bakterilerde ise daha az ince peptidoglukan yapının olması, gram-negatif bakterilerin nanopartiküllere karşı daha duyarlı olmasına neden olmaktadır.

Nano-dolgu maddelerinin yüzey alanının geniş olması, daha fazla mikroorganizmanın yüzeye nüfuz etmesine sağlayarak antimikrobiyal etkinliğin artmasına neden olmaktadır (Othman, 2014). Örneğin gümüş nanopartikülleri ile yapılan bir çalışma; küçük boyutlardaki partiküllerin gümüş iyon salınımı için geniş bir yüzey alanı oluşturması sonucu daha yüksek protein bağlama kapasitesi ve partiküllerin bakteriyel membrandaki gözenekten kolay geçmesine yol açtığından dolayı nanoparçacık çapı azaldıkça toksisitenin arttığını bildirmektedir (Duncan, 2011).

2.4. Kitosan Nanokompozit Filmler

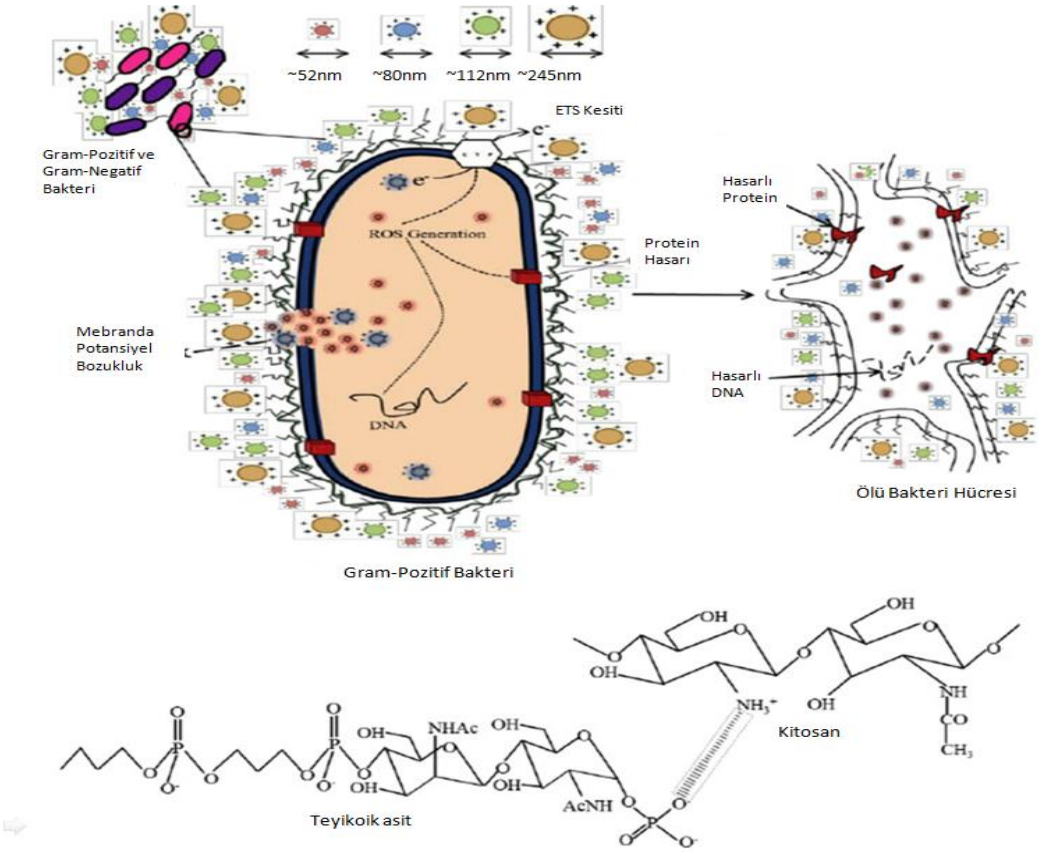
Kitosan, doğal olarak β-(1,4) bağlarına sahip lineer katyonik bir polisakkarit olan asetilglukozaminin kısmen deasetilasyonu ile elde edilen bir polimerdir (Dursun ve ark., 2010;Shah ve ark.,2018; Lizarraga-Laborín ve ark., 2018;Shankar ve Rhim, 2018). Yengeç, karides gibi çeşitli deniz kabuklularından, mantar hücre duvarlarından ve diğer biyolojik materyallerden ekstrakte edilen kitinin alkali deasetilasyonu ile elde edilmektedir (Nataraj ve ark., 2018;Shankar ve Rhim, 2018). Kitosanın deasetilasyon derecesi % 70-95 aralığındadır (Popović ve ark., 2018).

2001 yılında ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından güvenli (GRAS) olarak bildirilmiştir (Perinelli ve ark., 2018). Kitosan toksik olmadığından gıda, ilaç, kozmetik, biyomedikal ve tarım alanlarında farklı amaçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır (Al-Naamani ve ark., 2017; Perinelli ve ark., 2018;Singh ve ark., 2019). Kitosan gıda endüstrisinde özellikle et ve meyve ürünlerinin yüzey bozulmasını önlemek, su kaybının azalmasını sağlamak ve meyvelerin olgunlaşmasının geciktirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Shankar ve Rhim, 2018).

Yüksek molekül ağırlığı ve asidik sulu çözeltilerde çözünür olması nedeniyle kitosan iyi bir jel ve film oluşturma özelliğine sahiptir (Zivanovic ve ark., 2005). Kitosanın hidrofilik karakter de olması filmlerin zayıf nem bariyer özelliğine sahip olmasına neden olurken mükemmel film oluşturma kabiliyeti, oksijen bariyer özelliği, antimikrobiyal aktivitesi, güçlü fiziksel-mekaniksel özelliği ve diğer materyaller ile kolay uyumluluk sağlaması onu diğer polimerlerden öne çıkarmaktadır (Perdones ve ark., 2016;Zhang ve ark., 2017;Shankar ve Rhim, 2018;Lee ve ark., 2018).

Günümüzde birçok bakteri, küf ve mayaya karşı antimikrobiyal etkisi olduğu bilinen kitosanın, antimikrobiyal etkisi ilk defa Allen ve ark. tarafından 1979 yılında rapor edilmiştir (Singh ve ark., 2019).

Kitosanın antimikrobiyal etki mekanizması, molekülündeki katyonik amino gruplarının mikroorganizma yüzeyindeki anyonik gruplara bağlanması mikroorganizma metabolizmasının nötralizasyonuna ve ardından gelişiminin inhibisyonu şeklinde gerçekleşmektedir (Zivanovic ve ark., 2005;Dursun ve ark., 2010;Al-Naamani ve ark., 2017;Silva ve ark., 2017). Kitosan ve bakteri membranı arasındaki pozitif-negatif grup etkileşimi, bakteri hücre membranının hasarına neden olarak hücre sitoplazmasında yer alan iyon ve proteinlerin ekstrasellüler boşluğa geçmesine yol açmaktadır. Ardından oluşan ozmotik basınç ise hücre ölümüne neden olmaktadır (Perinelli ve ark., 2018). Anlatılan bu mekanizma Şekil 2. 2. üzerinde gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Kitosan nanopartiküllerinin *S. aureus* üzerindeki antibakteriyel etkisinin önerilen bir mekanizması (Perinelli ve ark., 2018)

Gram negatif bakterilerde ise antimikrobiyal etki kitosan yapısındaki glikozamin birimlerinin gram-negatif bakterilerin hücre yapısında bulunan Lipid A'daki fosfat gruplarına saldırması ve pozitif yüklü artık maddelerin oluşması şeklinde açıklanmaktadır (Saita ve ark., 2012).

Kitosanın antifungal etkisi ise bakterilere benzer şekilde gerçekleşir, kitosan direk mikroorganizma büyümesini engeleyici etkiye neden olur. Literatürde yapılan çalışmalar, kitosanın küf büyümesinden sorumlu olan ve enzim aktivitesine müdahale eden hifanın içinde yayılarak antifungal etkisini gösterdiğini bildirmiştir (Goy ve ark., 2009).

Nanosistemlere ise kitosan aktif bir bileşen için taşıyıcı veya tek başına antimikrobiyal özellikte olması nedeni ile antimikrobiyal özellik kazandırıcı bir nanopartikül olarak dahil edilebilmektedir (Perinelli ve ark., 2018).

Kitosan filmlerin antimikrobiyal ve fonksiyonel özellikleri; kitosan molekülünün asetilasyon derecesine, molekül ağırlığına, solüsyon veya film hazırlamada kullanılan asit türü ve konsantrasyonuna, sıcaklık ve nem gibi çevresel koşullara ve ortamda bulunan iyonlara bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Zivanavic ve ark., 2005;Nataraj ve ark.,

2018). Zivanavic ve ark., (2005) farklı asit türleri ile hazırladıkları filmlerde en yüksek gerilme mukavemetini asetik ve formik asit filmlerinde gözlemlerken laktik, propiyonik ve sitrik asit filmlerinin gerilme mukavemetinin daha az olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca film kalınlığı ve esnekliğinin, çözücü olarak kullanılan asit molekül ağırlığına bağlı olarak doğrusal bir şekilde arttığını bildirmektedir. Ayrıca kitosanın aktiviteleri belirli pH değerlerinde sınırlıdır. Kitosan pH 6.5 ve üzerinde katyonik yapısını kaybetmeye başlar ve ardından oluşan güçlü hidrojen bağları zayıf çözünürlüğe yol açmaktadır (Saita ve ark., 2012;Hu ve ark., 2016).

Literatürdeki tüm çalışmalar kitosan deasetilasyon derecesindeki artışın daha fazla antimikrobiyal aktivite sergilediğini bildirmektedir (Perinelli ve ark., 2018). Chien ve Chou (2006), turunçgil meyvelerinin hasat sonrası kalitesinin belirlenmesinde farklı molekül ağırlıklarına sahip iki kitosanın etkinliğini araştırmıştır. Sonuç olarak küf sporlarının inoküle edildiği kitosan ile kaplanmış meyvelerin 25 °C de 5 günlük depolanması sırasında kültür gelişimini %25,0-90,5 oranında inhibe ettiğini belirtmiştir. Kültür gelişiminin inhibisyonunda kitosan molekül ağırlığındaki farklılığın istatistiksel açıdan önemli olmadığını bildirmektedir. Ayrıca kitosan yoğunluğuna bağlı olarak meyve ağırlık kaybında azalma meydana geldiğini bildirmiştir. Ancak kitosan molekül ağırlıklığındaki farklılığın 42 gün boyunca depolanan meyve su içeriği, titrasyon asitliği ve askorbik asit oranında önemli bir fark yaratmadığını bildirmektedir. Ayrıca kitosanın nano boyutlardaki partiküllerinin yüksek pozitif yük yoğunluğunda olması negatif yüklü bakterilere karşı daha güçlü bağlanma sağlamaktadır (Perinelli ve ark., 2018). Penisilin, tetrasiklin, sefalasparin, vankomisin gibi antibiyotikler kitosan ile enkapsüllendiğinde ise bakterilerin büyümesine karşı engelleyici etkinlikliğin arttığını yapılan çalışmalar ortaya koymaktadır (Perinelli ve ark., 2018).

Kitosan filmlerine keklik otu esansiyel yağının eklenmesi su buharı geçirgenliğini, delinme ve gerilme mukavemetini azaltırken filmlerin esnekliğini arttırmaktadır (Zinavovic ve ark., 2005).

Birçok çalışma kitosanın *Candida, Aspergillus* ve *Fusarium* türlerine karşı antifungal aktivitesini bildirmektedir (Perinelli ve ark., 2018).

Araştırmacılar son zamanlarda kitosanın özellikle antimikrobiyal aktivitesi üzerinde durmakta ve nanosistemler ile kombinasyonu yaygın olarak çalışılmaktadır.

2.4.1. Kitosan Nanokompozit Filmlerin Antimikrobiyal Etkisi Üzerine Yapılan Çalışmalar

Kitosan/Gümüş nanopartikül filmlerini hazırlayan Shah ve ark. (2018), filmlerin *S. aureus* ve *P. aeruginosa* türlerine karşı antimikrobiyal etkinliğinin varlığını tespit etmiştir. Shankar ve Rhim (2018), farklı tipte sülfür nanopartiküllerini içeren kitosan bazlı nanokompozitlerin *L. monocytogenes* ve *E. coli* türlerine karşı antibakteriyel etkisini canlı hücre sayımı ile periyodik olarak test etmiştir. Sonuç olarak hazırlanan nanokompozit filmlerde her iki grup bakteri için belirgin antimikrobiyal etkinliğin varlığını tespit etmiştir. Ayrıca kitosan filmlerin yüzeyinde bulunan amino gruplar nedeni ile patojenik bakterilerin inhibisyonu için kitosanın tek başına yeterli olmadığını bildirmiştir.

Nataraj ve ark. (2018), çapraz bağlanmış kitosan nanokompozit filmlerin *E. coli* ve *B. cereus* suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesini incelediklerinde kontrol olarak kullandıkları antibiyotikte (ampisilin) inhibisyon zonunu *E. coli* için 36 mm, *B. cereus* için 24 mm olarak tespit etmiştir. Hazırladıkları çapraz bağlanmış filmlerdeki inhibisyon zonu ise *E. coli* için 23 mm, *B. cereus* için 26 mm ölçmüştür. Sonuç olarak çapraz bağlanmış kitosan filmlerde *B. cereus* suşuna karşı antimikrobiyal etkinliğinin daha fazla olduğunu bildirmiştir. Ayrıca yaptıkları çalışmada kitosanın gram pozitiflere olan antimikrobiyal aktivitesinin gram negatiflere olan antimikrobiyal etkisinden daha fazla olduğunu desteklemiştir.

Zhang ve ark. (2017), kitosan/titanyum dioksit nanokompozit filmin *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, and *A. niger* suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesini koloni sayım yöntemine göre belirlemiştir. Sonuç olarak 4 saatlik bir sürede her mikroorganizma için %90 bakterisidal oranın yakalandığını ve bu oranın *E. coli* suşunda daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 12 saatlik antimikrobiyal tedavisinin bakteri, küf ve mayaların tam inhibisyonu için yeterli olacağı bildirilmektedir.

Siriprom ve ark. (2018), istiridye kapuklarından hazırladıkları kitosan bazlı nanokompozit filmlerin antimikrobiyal özelliğini incelediğinde gram negatif bir bakteri olan *E. coli* suşuna karşı bir inhibisyonun var olduğunu bildirmiştir.

Kitosan/ZnO nanopartiküllerini içeren nanokompozit filmlerin ise bir alg türü olan *Navicula incerta* ve bir deniz bakterisi olan *Pseudoalteromonas nigrifaciens* suşlarına karşı antimikrobiyal etkinliği olduğu bildirilmiştir (Al-Naamani ve ark., 2017).

Kitosan bazlı filmleri Zivanovic ve ark. (2005), film formülasyonuna anason, fesleğen, kişniş ve keklik otu esansiyel yağlarını ekleyerek hazırlamıştır. Filmlerin antimikrobiyal etkinliğini disk difüzyon yöntemi kullanarak *Listeria monocytogenes* ve *E.*

coli O157:H7 patojenlerine karşı test etmiştir. Antimikrobiyal etkinlik şiddetinin yoğunluğunu sırasıyla keklik otu>kişniş>fesleğen>anason olarak bildirilmektedir. Ayrıca mikroorganizma inoküle edilen bologna örneklerini hazırlanan filmler ile kapladıklarında *L. monocytogenes* konsantrasyonunun saf kitosan filmlerde 2 log (kob/mL) azalma, keklik otu filmlerinde 3.6-4 log (kob/mL) azalma meydana getirdiğini bildirmiştir.

Birçok araştırmacı kitosanın *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum lindemuhianum*, ve *Aspergillus niger* gibi küf türlerine karşı da antifungal etkinliğini bildirmiştir (Chien ve Chou, 2006).

Guerra ve ark. (2015) kitosan bazlı filmleri Mentha piperita L. ve Mentha x villosa Huds esansiyel yağları ile hazırlamış ve *Aspergillus niger, Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Rhizopus stolonifer* gibi hasat sonrası hastalıklara yol açan patojen küflere karşı inhibitor etkisini araştırmıştır. İnhibitör oranının Mentha piperita L. esansiyel yağı ile hazırlanan filmlerde %90.2-97.5; Mentha x villosa Huds ile hazırlanan filmlerde ise %90.1-94.2 arasında olduğunu tespit etmiştir.

Se´bastien ve ark. (2006), kitosan/polilaktik asit filmlerin *Fusarium proliferatum*, *Fusarium moniliforme* ve *Aspergillus ochraceus* gibi mikotoksijenik küflere karşı antifungal etkisi olduğunu bildirmektedir.

Antimikrobiyal kitosan bazlı nanokompozit filmler üzerine yapılan çalışmaların ayrıntılı özeti Çizelge 2.2 ’de verilmektedir.

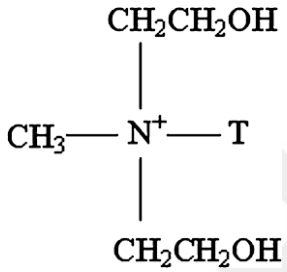
Çizelge 2.2. Antimikrobiyal kitosan bazlı nanokompozit filmler üzerine yapılan çalışmaların özeti

Kitosan Nanokompozit Film İçeriği	**Antimikrobiyal Test Yöntemi**	**Test Edilen Mikroorganizmalar**	**Referanslar**
Çapraz Bağlanmış Kitosan	Agar Disk Difüzyon	*Esherichia coli* *Bacillus cereus*	Nataraj ve ark., 2018
Kitosan+AgO Nanopartikülleri	Agar Disk Difüzyon	*E. coli* *Bacillus subtilis* *Pseudomonas aeruginosa* *S. aureus*	Perinelli ve ark., 2018
Kitosan+Ag Nanopartikülleri	Canlı Hücre Sayımı	*E. coli* *L. monocytogenes*	Shankar ve Rhim, 2018
Kitosan+TiO_2	Koloni Sayım Yöntemi	*Esherichia coli* *S. aureus* *Candida albicans* *Asperillus niger*	Zhang ve ark. 2017
Kitosan+Anason, Fesleğen, Kişniş, ve Keklik Otu Esansiyel Yağları	Disk Difüzyon Yöntemi	*Listeria monocytogenes* *Esherichia coli* O157:H7	Zivanovic ve ark., 2005
Kitosan+Mentha piperita L. veya Mentha × villosa Huds Esansiyel Yağları	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MIC)	*Aspergillus niger* *Botrytis cinerea* *Penicillium expansum* *Rhizopus stolonifer*	Guerra ve ark., 2015
Kitosan+Cloisite 30B, Nanogümüş, Na-MMT, Gümüş İyonu	Çalkalamalı Erlen Testi	*Staphylococcus aureus* *Listeria monocytogenes* *E. coli* O157:H7 *Salmonella* Typhimurium	Rhim ve ark., 2006
Kitosan+Bakır Nanopartikülleri	Disk Difüzyon Testi	*Staphylococcus aureus* *E. coli*	Tabesh ve ar., 2018

2.5. Antimikrobiyal Etkinliği Arttırmak için Çalışmada Kullanılan Maddeler

2.5.1. Cloisite 30B

Cloisite 30B kilin üçlü amonyum tuzu ile modifiye edilerek hazırlanan bir montmorillonittir (Rahvalı, 2016). Şekil 2.3.'de Cloisite 30B organokilinin kimyasal yapısı gösterilmektedir. Yapılan çalışmalar göz önüne alındığında Cloisite 30B çoğunlukla biyobozunur filmlerin renk, suda çözünürlük, su buharı geçirgenliği gibi fiziko-mekanik özelliklerinin gelişmesinde kullanılmaktadır (Salarbashi ve ark., 2018). Buna ek olarak kuarterner amonyum grupları nedeni ile Cloisite 30B kilinin tek başına antimikrobiyal özellik gösterdiği bilinmektedir (Sothornvit ve ark., 2010;Salarbashi ve ark., 2018).



Şekil 2.3. Cloisite 30B organokilinin kimyasal yapısı (Sodeifian ve ark., 2012)

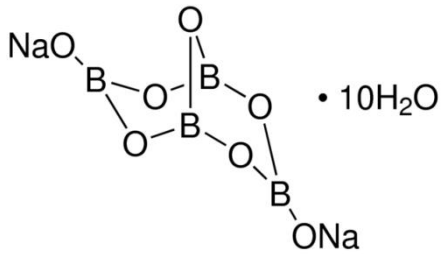
Cloisite 30B kilinin antimikrobiyal etki mekanizması ise şöyle açıklanmaktadır; montmorillonit yapısında bulunan pozitif yüklü amonyum gruplarının negatif yüklü bakteri hücresi ile olan etkileşimi bakteriyel hücre membranına zarar vermekte ve hücre içi materyalin dışarı sızması sonucu bakteri hücresi ölmektedir (Sothornvit ve ark., 2010; Rhim ve ark. 2011; Salarbashi ve ark., 2018).

Salarbashi ve ark. (2018), Soya fasulyesi/Cloisite 30B filmlerinin *Salmonella* Typhi PTCC-1609, *Staphylococcus epidermis* PTCC-1114 (ATCC-12228) ve *Listeria monocytogenes* PTCC-1165 suşlarına karşı antimikrobiyal etkisi olduğunu bildirirken, filmin *A. niger* suşuna karşı herhangi bir antifungal etkisi olmadığını tespit etmiştir. Ayrıca Rhim ve ark. (2006), Kitosan/Cloisite 30B filmlerinin *S. aureus* ATCC-14458 ve *L. monocytogenes* ATCC-19111 suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite sergilediğini, *Salmonella* Typhimurium ATCC-14028 ve *Escherichia coli* O157:H7 ATCC-11775 suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite sergilemediğini bildirmiştir.

Sothornvit ve ark. (2010), peynir altı suyu izolatı/Cloisite 30B filmlerinin *L. monocytogenes* ATCC-19111 suşuna karşı bakteriyostatik etkisi olduğunu, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC-11775 karşı bakteriyostatik etkinin olmadığını tespit etmiştir. Ayrıca Rhim ve ark. (2011), %5 Cloisite 30B içeren agar nanokompozit filmlerinin de *L. monocytogenes* ATCC-19111 suşuna karşı bakteriyostatik etki gösterdiğini bildirmiştir.

2.5.2. Boraks

Boraks beyaz ve toz halde bulunan; sodyum borat, sodyum tetraborat veya disodyum tetra borat olarakta bilinen bir borik asit tuzudur. Boraksın kimyasal yapısı Şekil 2.4.'de verilmiştir. Gıdalar ile temas eden plastik malzeme üretimi için kullanılabilecek malzemeler arasında listelenen boraksın migrasyon limiti 6 mg kg^{-1} olarak bildirilmektedir (Cozzolino ve ark., 2016). EFSA tarafından düzenlenen Gıda Katkı Maddeleri ve Besin Kaynakları adlı panelde boraksın gıda katkı maddesi olarak kullanılması durumunda günlük alım limitleri çocuklar için 0.56, gençler için 0.37, yetişkinler için 0.13, yaşlılar için 0.15 mg kg^{-1} vücut ağırlığı/gün olarak bildirilmiştir. Ayrıca panel kabul edilen dozun günlük düzenli bir şekilde alınarak aşılması ihtimalinin düşük olduğu sonucuna varmıştır (Cozzolino ve ark., 2016).



Şekil 2.4. Boraks'ın kimyasal yapısı (Anonim 1, 2018)

Cencetti ve ark. (2012), boraksın polisakkarit zincirleri ve polivinil alkol arasında çapraz bağlayıcı olarak hareket ederek malzemenin mekanik özelliklerinin artmasını sağladığını bildirmiştir. Boraksın polimerik kompozitin bir bileşeni olarak istenen özelliklere sahip olmasının nedeni polar –OH gruplarının güçlü etkileşimleri sonucu mekanik stabilitenin kolaylaşmasını sağlamasından ileri gelmektedir (Cozzolino ve ark., 2016).

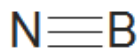
Thormidis ve Exadaktylou (2010), şeftalilerde görülen kahverengi meyve çürüklüğüne (*Monilinia laxa*) karşı boraksın etkinliğini çalışmıştır. Potato Dextrose Agar üzerinde 750 µg mL^{-1} boraksın *M. laxa* suşunun misel büyümesini engellediğini,

şeftalilerin hasat sonrası 3 mg mL^{-1} boraks çözeltisi ile muamele edilmesi sonucunda ise *M. laxa* suşunun gelişiminde önemli ölçüde azalma meydana geldiğini bildirmiştir.

Çiçek ve ark. (2018), su içinde poli(4-vinil fenilboronik asit) (PVPBA) ve poli [2-(dimetilamino)etil metakrilat] (PDMAEMA) homopolimerleri, kopolimerleri ve bunların metal, pentil, oktil kuartenize formlarını sentezleyerek antibakteriyel etkisini incelemiştir. Yüksek molekül ağırlıklı kopolimerlerin *E. coli* ATCC-25923 suşuna karşı, düşük molekül ağırlıklı kopolimerlerin ise *S. aureus* ATCC-25923 suşuna karşı antibakteriyel özellik gösterdiğini bildirmiştir.

2.5.3. Bor Nitrür

Bor nitrür doğal olarak oluşmaz ve altıgen, kübik, wurtzit, türbostratik gibi çeşitli kristal yapılarda sentezlenmektedir (Kıvanç ve ark., 2018). Hegzagonal yapıya sahip olan bor nitrür katmanlı ve grafene benzemektedir. (Kisku ve Swain, 2012;Jedrzejczak-Silicka ve ark., 2018). Bor nitürün kimyasal yapısı Şekil 2.5.'de verilmiştir. Yüksek oksidasyon direnci, kimyasal olarak inert, yüksek ısı iletkenliği, sınırlı yüzey aktivitesi, ıslanabilirlik, gibi özelliklerinden dolayı genellikle biyobozunur olmayan polimerlerin mekanik ve optik özelliklerini geliştirici olarak kullanılmaktadır. (Kisku ve Swain, 2012; Swain ve ark., 2013;Kıvanç ve ark., 2018).



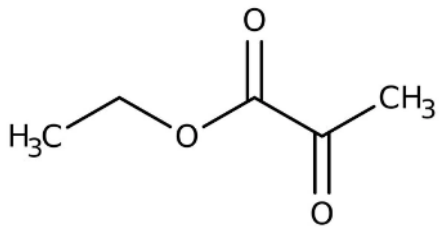
Şekil 2.5. Boron Nitrit'in kimyasal yapısı (Anonim 2, 2018)

Kıvanç ve ark. (2018), bor nitrür nanopartiküllerinin *S. mutans* 3.3, *S.mutans* ATCC-25175 ve *Candida* sp. M25 suşlarının biyofilm büyümesini inhibe ettiğini ve önceden oluşmuş olan biyofilm üzerinde yüksek bir antibiyofilm aktivitesi gösterdiğini bildirmiştir. Bununla birlikte bor nitrür nanopartiküllerinin *S. pasteuri* M3 ve *S. mutans* ATTC-25175 suşlarına karşı sadece yüksek konsantrasyonlarda (0,4 mg/mL) düşük bir antimikrobiyal etki gösterdiğini bildirmiştir.

Chen ve ark. (2009), bor nitrür nanotüplerinin insan embriyonik böbrek hücreleri olan HEK 293 hücrelerine etkisini incelediğinde, bor nitrürün hücre çoğalmasına herhangi bir etkisi olmadığını bildirmiştir.

2.5.4. Etil Pirüvat

Pirüvatın stabil bir lipofilik ester türevi olan etil piruvat, günümüzde terapötik bir ajan olarak bilinmektedir (Ulloa ve ark., 2002;Tonuk ve Durak., 2015). Etil pirüvatın kimyasal yapısı Şekil 2.6. üzerinde gösterilmektedir. Belirli koşullar altında uygulanan etil pirüvatın ABD Gıda ve İlaç İdaresi'nin GRAS sınıfında yer aldığı bilinmektedir (Tonuk ve Durak., 2015;Bozkurt ve ark., 2016). Ayrıca etil pirüvat buhar fazında gıda kaynaklı patojenlere karşı kullanılarak taze ve işlenmiş yüzeylerdeki mikrobiyal yükü azaltmak için uygulanan termal olmayan bir teknolojidir (Bozkurt ve ark., 2016). Yüksek uçucu özellik göstermesi mikroorganizmaların gizlenebileceği bölgelere kolayca ulaşıp girebilmesini sağlarak, mikroorganizma üzerinde üremesini azaltıcı veya önleyici etkiye neden olmaktadır (Bozkurt ve ark., 2016).



Şekil 2.6. Etil pirüvat'ın kimyasal yapısı (Anonim 3, 2018)

Tonuk ve Durak (2015), *S. aureus* ATCC-25923 ve *E. coli* O157:H7 ATCC-33150 ile muamele etmiş oldukları maydanozlara etil pirüvat uygulaması yapmıştır. Depolama süresi sonunda 1.000 µL etil pirüvat uygulamasının *S. aureus*'a karşı 2 log (kob/mL) azalmaya yol açtığı, *E. coli* O157:H7'yi ise tamamen inhibe ettiğini bildirmiştir. Etil pirüvat uygulamasının maydanoz çürümesini geciktirdiğini ancak etil pirüvatın maydanoz üzerinde sararmalara yol açtığını belirtmiştir.

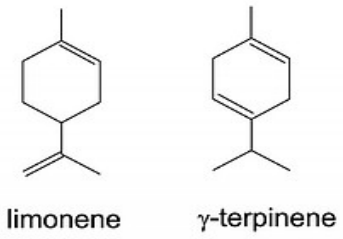
Bozkurt ve ark. (2016), 500 µL buharlaştırılmış etil pirüvat uygulamasının çilek ve kiraz gibi ürünlerdeki fungal bozulmayı geçiktirdiğini bildirmiştir. Ayrıca etil pirüvat uygulamasının bu grup ürünlerde tüketici tercihini etkileyen renk ve biyoaktivite özellikleriinin üzerinde herhangi bir olumsuz etkiye neden olmadan hasat sonrası kalitesini muhafaza etmesinde potansiyeli olduğunu belirtmiştir.

Uran ve Çetin (2018), etil pirüvatın, tavuk butu etinin raf ömrü üzerine etkisini belirlemek için yaptıkları çalışmada 42 mg/L etil pirüvat (EP) uygulamasının 4 gün, 105 mg/L ve 420 mg/L EP uygulamasının tavuk etinin raf ömrünü 4 günden fazla uzattığını bildirmiştir. Ayrıca yaptıkları mikrobiyolojik analizler sonucunda EP uygulamasının

ürünlerdeki toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı, *Enterobacteriaceae* sayısı ve küf maya sayısında azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir.

2.5.5. Limon Esansiyel Yağı

Limon esansiyel yağı, turunçgiller sınıfında yer alan limondan üretilmekte olup yapısında limonen ve γ-terpinenin gibi terpenler grubuna ait birçok uçucu bileşeni içermektedir (Perdone ve ark., 2016). Limonen ve γ-terpinenin kimyasal yapısı Şekil 2.7.'de verilmiştir. Limon esansiyel yağının temel bileşeni olan limonen FDA tarafından GRAS maddeler sınıfına alınmıştır (Perdone ve ark., 2016). Ayrıca çeşitli ürünlerde tat verici özelliği ile gıda katkı maddesi olarak kullanılmakta olan limonenin antifungal özellikte olduğu bilinmektedir (Perdone ve ark., 2016; Tüğen 2018).



Şekil 2.7. Limon esansiyel yağı uçucu bileşeni olan limonen ve γ-terpinenin kimyasal yapısı (Anonim 4, 2018)

Tunus limonu esansiyel yağının çeşitli özelliklerini belirleyen Hsouna ve ark., (2017) limon esansiyel yağının; *Aspergillus niger* CTM-10099, *Fusarium oxysporum* CTM-10402, *Fusarium culmorum* ISPAVE-21w, *Alternaria alternata* CTM-10230 ve gıdalardan izole edilen *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium graminearum* ISPAVE-271suşlarına karşı güçlü antifungal aktivite gösterdiğini belirtmiştir. Buna karşın Rancic ve ark. (2003) ise, limon esansiyel yağının ana bileşeni limonenin *Aspergillus niger* ATCC-6275, *A. ochraceus* ATCC-12066, *A. versicolor* ATCC-11730, *A. flavus* ATCC-9170, *A. terreus* ATCC-16792, *Alternaria alternata* ATCC-13963, *Penicillium ochrochloran* ATCC-9112, *P. funiculosum* ATCC-10509, *Cladosporium cladosporioides* ATCC-13276, *Tricoderma viride* IAM-5061, *Fusarium tricinctum* CBS-514478, *Phomopsis helianthi* ATCC-201540 suşlarına karşı orta düzeyde antifungal özellik sergilediğini bildirmiştir. Ayrıca limonenin *Escherichia coli* ATCC-35218, *Salmonella* Typhimurium ATCC-13311, *Salmonella* Enteritidis ATCC-13076, *Micrococcus luteus* ATCC-9341, *Staphylococcus aureus* ATCC-6538, *Staphylococcus*

epidermidis ATCC-12228 ve klinik *Candida albicans* izolatına karşı güçlü antimikrobiyal etkisi olduğunu Rancic ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada tespit etmiştir.

Esansiyel yağ içeriğinde bulunan terpenlerin antimikrobiyal etki mekanizması henüz açıklanmasada çeşitli çalışmalarda lipofilik bileşiklerin membran bozulmasını yol açtığı raporlanmıştır (Hsouna ve ark., 2017).

BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Filmlerin hazırlanmasında yaklaşık olarak %90 deasetilasyon derecesine ve $1.8x10^5$ g/mol molekül ağırlığına sahip kitosan (Dungeness Enviromental, ABD), asetik asit (Sigma-Aldrich, ABD), gliserol (Sigma-Aldrich, ABD), boraks (Acros Organics, ABD), etil pirüvat (Alfa aesar, ABD), limon esansiyel yağı (Naturoil, Türkiye), boron nitrür (Alfa aesar, ABD) ve Cloisite 30B kullanılmıştır.

Hazırlanan filmlerin antimikrobiyal etkisini belirlemek için laboratuarımızda bulunan *Staphyloccocus aureus* ATCC-25923, *Salmonella* Typhimurium ATCC-14028, *Escherichia coli* 0157:H7 EDL-937, *Bacillus cereus* NCTC-7464, *Saccharamyces cerevisiae* ATCC-9763 ve *Candida albicans* ATCC-10231 suşları kullanılmıştır. *Aspergillus flavus* NRRL-21882, *Penicillium expansum* CECT-2280, *Penicillium citrinum* CECT-20822, *Penicillium digitatum* CECT-20795, *Alternaria arborescens* kültürleri ise Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Burhan Şen'den temin edilmiştir. Bakteri kültürleri Tryptic Soy Broth (Oxoid, İngiltere), küf kültürleri Potato Dextrose Agar (Difco, Fransa) ve maya kültürleri Sabouraud Dextrose Broth (Biolife, İtalya) besiyerinde geliştirildikten sonra 4 ºC de stoğa alınmıştır. Ayrıca disk difüzyon yöntemine göre yapılan antimikrobiyal analizlerde besi ortamı olarak bakteriler için Mueller Hinton Agar (Merck, Almanya) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Filmlerin Hazırlanması

Filmler Duran ve ark. (2016) tarafından kullanılan yöntem esas alınarak % 1,5 lik (w/v) kitosan çözeltisinden hazırlanmıştır. Kitosan, asetik asit solüsyonunda çözündürülmüş plastikleştirici olarak gliserol kullanılmıştır. Cloisite 30B, boraks, etil pürivat, boron nitrür ve limon esansiyel yağları film formülasyonuna literatürdeki verilere göre %1 ve %3 oranında ilave edilerek, her bir maddeden iki farklı konsantrasyona sahip toplam da 10 adet film solüsyonu hazırlanmıştır (Rahvalı, 2011; Swain veark., 2013; Özcan ve Demirel Zorba, 2016) . Hazırlanan nanokompozit film solüsyonları petri kabına 125 mL hacimde döküldükten sonra kurutma işlemi biyogüvenlik kabininde yapılmıştır. Kuruyan filmler petri tabakasından ayrılarak analizler yapılmıştır.

3.2.2. Filmlerin Fiziksel Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.2.1. Film Kalınlığının Belirlenmesi

0.001 mm hassasiyete sahip elektronik dijital mikrometre (Dasqua, İtalya) ile filmlerin kalınlıkları belirlenmiştir.

3.2.2.2. Nem İçeriği ve Suda Çözünürlük Değerlerinin Belirlenmesi

Film nem içeriğinin belirlenmesi için 5 mm çapında kesilen filmler tartılmıştır ve 24 saat 105 ° C'de kurutularak tekrar tartılmıştır. Aşağıda verilen denkleme göre film nem içeriği % olarak hesaplanmıştır (de Elguea-Culebras ve ark., 2019).

$$\%\ Nem\ içeriği = \frac{\mathrm{Mo-M}}{\mathrm{Mo}} \qquad (3.1)$$

*Mo ve M sırasıyla kurutma öncesi ve sonrası ağırlıktır.

Her bir filmin suda çözünürlüğü 1 saat damıtılmış suya daldırıldıktan sonra çözünen film kuru maddesinin yüzdesi olarak belirlenmiştir. İlk kuru maddenin ağırlığını belirlemek için her film türünün rastgele seçilen 5 mm çapındaki film örneği, 24 saat boyunca 105 °C 'de etüvde kurutulmuştur. İlk ağırlığı belirlenen film örnekleri 30 mL damıtılmış su içeren 50 mL 'lik bir behere yerleştirildikten sonra beherlerin ağız kısmı parafilm ile kapatılmış bir şekilde 25 ºC de 1 saat boyunca muhafaza edilmiştir. Beherden çıkarılmış her bir film parçası damıtık su ile hafifçe durulanmış ve ardından etüvde kurutarak (105 °C, 24 saat) suda çözünmeyen kuru madde aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır (de Elguea-Culebras ve ark., 2019). Her film örneği için üçlü paralel çalışılmıştır.

$$\%\ \text{Çözünürlük} = \frac{\mathrm{So-S}}{\mathrm{So}} \qquad (3.2)$$

*So filmin başlangıçtaki ağırlığı, S filmin çözünmeyen kuru ağırlığıdır.

3.2.2.3. Film Görünür Yoğunluğunun Belirlenmesi

Filmin görünür yoğunluğu Lozano-Navarro ve ark. (2018) tarafından yapılan analiz baz alınarak yapılmıştır. Her film dairesel şekilde kesilerek tartılmıştır. Ardından çap ve kalınlık ölçülerek aşağıdaki formülden görünür yoğunluk hesaplanmıştır (3.3):

$$\rho = \frac{W}{\pi.\frac{D^2}{2}.H} \tag{3.3}$$

*D = Örnek Çapı, H = Örnek Kalınlığı, W = Örnek Ağırlığı

3.2.2.4. Renk Özelliklerinin Belirlenmesi

Minolta CR-400 kalorimetresi (Minolta, Japonya) kullanılarak renk değerleri (L, a, b) belirlenmiştir. Ayrıca filmlere ait Hue°, TCD, WI ve YI değerleri aşağıda verilen formüllere göre hesaplanmıştır (Zhao ve ark., 2018; Ortiz-Duarte ve ark., 2019).

$$\text{Hue°} = \tan^{-1}\frac{\text{b}^*}{\text{a}^*} \tag{3.4}$$

$$\Delta\text{E} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \tag{3.5}$$

$$\text{WI} = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2} \tag{3.6}$$

$$\text{YI} = 142{,}86\frac{\text{b}}{\text{L}} \tag{3.7}$$

3.2.3. Film Biyobozunurluk Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.3.1. Biyolojik Biyobozunurluk

5 mm çapında kesilen filmler 2 ay boyunca aktif çamur ve distile su içerisinde 2 ay boyunca muhafaza edilerek her 10 günde bir tartım yapılmış, ağırlık kaybı belirlenmiştir. (Swain ve ark., 2013).

3.2.3.2. Kimyasal Biyobozunurluk

Filmlerin kimyasal bozunumunun belirlenmesi için ilk tartımı alınan film örnekleri 2 ay boyunca 2 N Hidroklorik asit (2 HCl), 2 N Sodyum hidroksit (NaOH) ve %1'lik NaCl içerisinde bekletilerek 10 günde bir tartımları yapılmıştır ve ağırlık kayıpları belirlenmiştir (Swain ve ark., 2013).

3.2.4. Antioksidan Aktivite Tayini

Filmlerin antimikrobiyal özellikleri di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl) iminoazanium (DPPH) yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Ağırlığı yaklaşık olarak 10 mg olan filmlerin üzerine 6×10^{-5} M konsantrasyonda hazırlanan DPPH çözeltisinden 1.0 mL eklenmiştir. DPPH çözeltisinde karanlıkta 3 saat bekletilen her film örneği için UV spektrofotometrik absorbans 517 nm 'de ölçülmüştür. Ayrıca her film örneği için 2 tekrar yapılmıştır. İnhibisyon aktivitesi ise aşağıda verilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır (Akyuz ve ark., 2018).

$$\%\ İnhibisyon = \left(\frac{A_{Kontrol} - A_{örnek}}{A_{Kontrol}}\right) x\ 100 \qquad (3.8)$$

*$A_{kontrol}$ DPPH çözeltisinin absorbansı $A_{örnek}$ ise film+DPPH çözeltisinin absorbansını ifade etmektedir.

3.2.5. Filmlerin Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi

Her bir antimikrobiyal madde için %1 ve %3 konsantrasyonlar da çözelti hazırlanarak disk difüzyon yöntemi ile maddelerin antibakteriyel ve antifungal etkinliği belirlenmiştir.

3.2.5.1. Filmlerin Antibakteriyel Etkisinin Belirlenmesi

3.2.5.1.1. Antibakteriyel Etkinin Disk Difüzyon Yöntemi ile Belirlenmesi

Bakteri kültürleri Tryptic Soy Broth besiyerinde 37 ºC de 2 saat inkübe edilerek 0.5 McFarland ($1x10^8$ kob/ml) bulanıklığına ayarlanmıştır. 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanan kültürler, Muller Hinton Agar (MHA) besiyeri ortamına 100 µl inoküle edilmiştir. Ardından 5 mm çapında kesilen film diskleri besiyeri üzerine yerleştirilerek 37 °C 'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşmuş olan inhibisyon zonları ölçülerek değerlendirilmiştir (Seydim ve Sarıkuş, 2006; Rhim ve ark., 2006).

3.2.5.1.2. Antibakteriyel Etkinin Canlı Hücre Sayım Yöntemi ile Belirlenmesi

Sothornvit ve ark. (2010) ve Shankar ve Rhim (2018), tarafından kullanılan yöntemler modifiye edilmiştir. Her bir mikroorganizma TSB besiyerinde 0.2-0.5-1.0-1.5 MacFarland konsantrasyona ayarlanmıştır. Konsantrasyonu ayarlanan besiyerleri mikroplak okuyucuda 620 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçümü yapılmıştır. Ardından her bir konsantrasyon için uygun seyreltme serileri oluşturularak TSA besiyerine ekim yapılarak 37 °C de 24 saat inkübasyon sonunda sayım yapılmıştır. Elde edilen sayım sonuçları verileri ve optik yoğunluk değerleri ile tüm mikroorganizmalar için canlı hücre sayısı-absorbans değeri eğrisi çizilmiştir. 0.5 MacFarland konsantrasyon kültür yoğunluğuna ayarlanan TSB içeren tüplere 5 mm çapında kesilen filmler eklenmiştir. Ardından tüpler 37 °C de inkübe edilerek 0., 2., 4., 6., 8. ve 24. saatlerde 620 nm de optik yoğunluğu ölçülmüştür. Film içeren test tüpünden 0., 2., 4., 6., 8. ve 24. saatlerde alınan absorbans değerinin, her bir kültür için belirlenen standart canlı hücre sayısı-absorbans değeri eğrisinden elde edilen denklemde yerine yazılması ile canlı hücre sayısı hesaplanmıştır. Ayrıca filmden gelen bulanıklığı bertaraf etmek için mikroorganizma içermeyen test tüplerinin absorbans değerlerinin ölçümü yapılmıştır.

3.2.5.1.3. Antibakteriyel Etkinin Spot Ekim Yöntemi ile Belirlenmesi

Butnaruve ark. (2016), yapmış olduğu yöntem modifiye edilmiştir. Her bir film 2x2 cm boyutunda kesilerek TSA üzerine yerleştirilmiştir. Ardından seçilen bir gram pozitif ve bir gram negatif bakteri spot ekim yapılarak 0,5 MacFarland konsantrasyonunda film üzerine mikroorganizma inoküle edilmiştir. İnkübasyon 37 °C de yapılmıştır ve 24-48-72 saat süre ile film üzerindeki gelişim fotoğraflanarak görsel olarak değerlendirilmiştir.

3.2.5.2. Filmlerin Antifungal Etkisinin Belirlenmesi

3.2.5.2.1. Antifungal Etkinin Disk Difüzyon Yöntemi ile Belirlenmesi

Küf kültürleri Potato Dekstroz Agar (PDA) da 25 °C de 14 gün inkübe edilerek %0.1 Tween 80 içeren %0.1 pepton içinde süspanse edilmiştir. Maya kültürleri ise Sabouraud Dextrose agar besiyerinde 30 ºC de 5 gün inkübe edilmiştir. Ardından küfler spektrofotometre kullanılarak 530 nm 'de % 68-82 T 'ye karşılık gelen 10^6 spor / mL 'lik bir konsantrasyona ayarlanmıştır (Pfaller ve Messel, 2000). Mayalar ise 2 MacFarland (10^6 kob/mL) konsantrasyona ayarlanarak bu süspansiyonlardan, PDA 'da 100 µL olacak şekilde besiyerine inoküle edilmiştir. 5 mm çapındaki film diskler besiyeri üzerine yerleştirilecek ve 25 ºC de 7 gün inkübe edilmiştir (Se´bastien ve ark., 2006; Ignatova ve ark., 2015). İnkübasyon sonunda oluşan inhibisyon zonları değerlendirilmiştir.

3.2.5.2.2. Antifungal Etkinin Canlı Hücre Sayım Yöntemi ile Belirlenmesi

Küf ve maya kültürleri için Sothornvit ve ark. (2010) ve Shankar ve Rhim (2018), tarafından kullanılan yöntemler modifiye edilmiştir. Bu yöntem seçilen 2 kültür ile gerçekleştirilmiştir. Her bir küf kültürü PDB, maya kültürü SDB besiyerinde 0.2-0.5-1.0-1.5 MacFarland konsantrasyona ayarlanmıştır. Konsantrasyonu ayarlanan besiyerleri mikroplak okuyucuda 620 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçümü yapılmıştır. Ardından her bir konsantrasyon için uygun seyreltme serileri oluşturularak PDA besiyerine ekim yapılarak küfler için 25 °C, mayalar için 30 °C de 3. gün inkübasyon sonunda sayım yapılmıştır. Elde edilen sayım sonuçları verileri ve absorbans değerleri ile tüm mikroorganizmalar için canlı hücre sayısı-absorbans değeri eğrisi çizilmiştir. 1 MacFarland kültür konsantrasyonuna ayarlanan PDB ve SDB içeren tüplere 5 mm çapında kesilen filmler eklenmiştir. Ardından küfler 25 °C, maya kültürleri ise 30 °C de inkübe edilerek 0., 3., 5. ve 7. günlerde 620 nm de optik yoğunluk ölçülmüştür. Film içeren test tüpünden 1., 3., 5. ve 7. günlerde alınan absorbans değerinin, her bir kültür için belirlenen standart canlı hücre sayısı-absorbans değeri eğrisinden elde edilen denklemde yerine yazılması ile canlı hücre sayısı hesaplanmıştır. Ayrıca filmden gelen bulanıklığı bertaraf etmek için mikroorganizma içermeyen test tüplerinin absorbans değerlerinin ölçümü yapılmıştır.

3.2.5.2.3. Antifungal Aktivitenin Spot Ekim Yöntemi ile Belirlenmesi

Butnaruve ark. (2016), yapmış olduğu yöntem modifiye edilmiştir. Her bir film 2x2 cm boyutunda kesilerek PDA üzerine yerleştirilmiştir. Ardından seçilen iki kültür 1 MacFarland konsantrasyonunda film üzerine mikroorganizma inoküle edilmiştir. İnkübasyon küfler için 25 °C, mayalar için 30 °C de yapılmıştır ve 0., 3., 5. ve 7. film üzerindeki gelişim fotoğraflanarak görsel olarak değerlendirilmiştir.

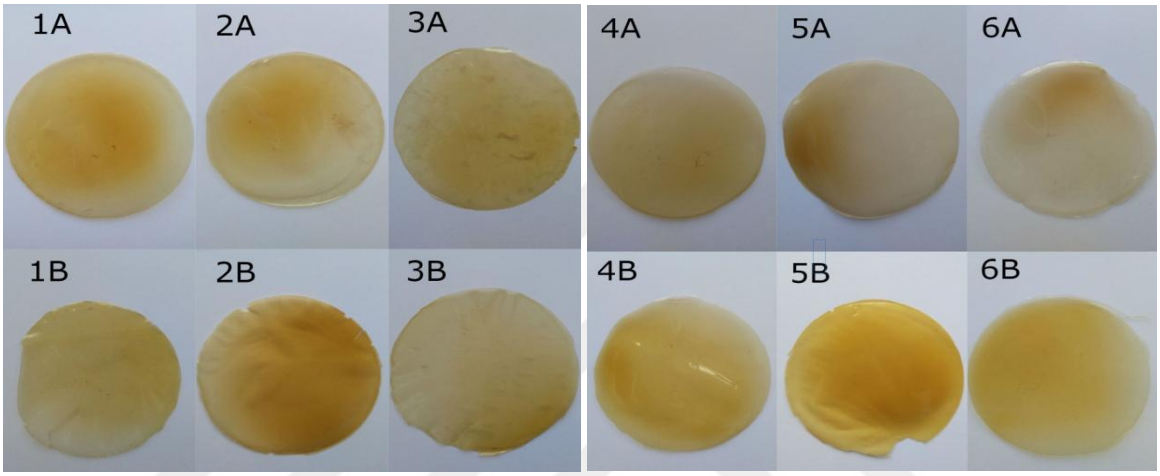
3.2.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 23.0 (SPSS Inc.,Chiago, IL, USA) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Filmler arasındaki farklılıklar ANOVA varyans analizi ile belirlenerek karşılaştırmalar Tukey ve Duncan testi ile yapılmıştır. $p<0.05$ istatistiksel açıdan önemli olarak kabul edilmiştir.

BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Filmlerin Fiziksel Özelliklerine Ait Bulgular

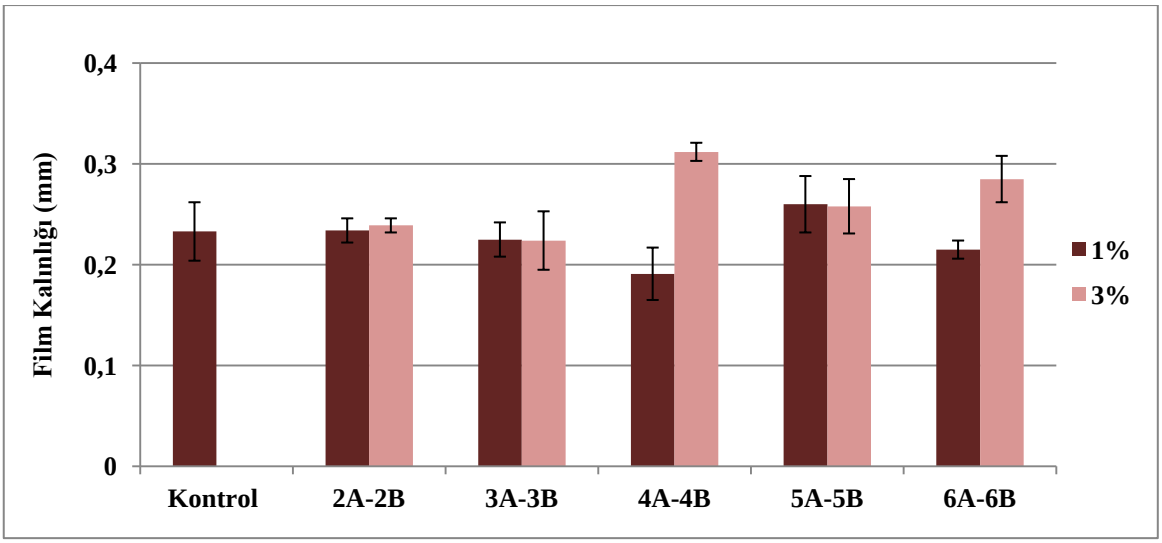
Filmlerin kalınlıkları, suda çözünürlük ve nem içerikleri, görünür yoğunluk değerleri, renk değerleri gibi bazı fiziksel özellikleri belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucu üretimi yapılan filmler Şekil 4.1.'deki görsellerde yer almaktadır.



Şekil 4.1. Üretilen filmlerin görüntüleri
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı

4.1.1. Film Kalınlık Değerleri

Farklı formülasyondaki film örneklerinin kalınlığı, filmin çeşitli noktalarından 4 farklı ölçüm alınarak belirlenmiştir. Şekil 4.2.'de film kalınlıkları verilmiştir.



Şekil 4.2. Farklı formülasyona sahip kitosan nanokompozit filmlerin kalınlık değerleri
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı

Şekil 4.2.'de belirtildiği üzere kontrol filmin kalınlığı 0,233±0,069 tespit edilirken; %1 Cloisite 30B içeren filmin kalınlığı 0,234±0,062 mm, % 3 Cloisite 30B içeren filmin kalınlığı 0,239±0,070 mm, %1 konsantrasyon da boraks içeren filmin kalınlığı 0,225±0,017 mm, % 3 boraks içeren filmin kalınlığı 0,224±0,069 mm, %1 etil pirüvat içeren filmin kalınlığı 0,191±0,059 mm, % 3 etilpirüvat filmin kalınlığı 0,312±0,063 mm, %1 bor nitrür filmin kalınlığı 0,260±0,138 mm, %3 bor nitrür filmin kalınlığı 0,258±0,027 mm, %1 limon esansiyel yağı içeren filmin kalınlığı 0,215±0,090 mm, %3 limon esansiyel yağ içeren filmin kalınlığı 0,285±0,009 mm olarak tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmada en düşük film kalınlık değeri %1 etil pirüvat, en yüksek film kalınlık değeri %3 etil pirüvat içeren filmlerde belirlenmiştir. Kontrol kitosan filminin kalınlık değeri ile karşılaştırıldığında filmlerin kalınlık değerlei arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$). Cloisite 30B, etil pirüvat ve limon esansiyel yağı filmlerinde artan konsantrasyona bağlı olarak film kalınlık değerinde artış gözlemlenmiştir. Ancak bu artışın istatistiksel açıdan Cloisite 30B, etil pirüvat ve limon esansiyel yağı içeren filmler için önemsiz olduğu tespit edilmiştir.

Rhim ve ark. (2006), %2 Cloisite 30B nanopartikülleri ile hazırladıkları filmlerin kalınlık değerini 63,3±2,3 µm (0,063±2,3), kontrol kitosan filminin kalınlık değerini ise 64,0±6,0 µm (0,064±6,0) olarak ölçmüştür. Yaptığımız çalışma ile karşılaştırıldığında Rhim ve ark. (2006), tarafından hazırlanan filmler elde ettiğimiz Cloisite 30B filmlerinden oldukça düşük kalınlık değerine sahiptir. Sothornvit ve ark. (2010), ise Cloisite 30B içeren

peynir altı suyu izolatı filmlerinin kalınlık değerini 0,17-0,21 mm aralığında tespit etmiştir ve yaptığımız çalışma ile kısmen paralellik göstermiştir.

Peng ve ark. (2014), kitosan filminin kalınlık değerini 0,077±0,007 mm, limon esansiyel yağı içeren kitosan filminin kalınlık değerini ise 0,097±0,003 mm tespit etmiştir.

Tüğen (2018), farklı konsantrasyonlarda limon yağı içeren jelatin kitosan filmleri hazırlamıştır. Hazırladığı kontrol jelatin kitosan filmi için kalınlık değerini 0,12±0,01 mm, %1 limon yağı içeren filmin kalınlık değerini ise 0,14±0,02 mm olarak belirlemiştir. Hazırlamış olduğumuz limon esansiyel yağı-kitosan filmlerinin kalınlık değerinin, Tüğen tarafından hazırlanan %1 limon yağı-jelatin kitosan filmlerinin kalınlık değerinden yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Literatür incelendiğinde boraks, etil pirüvat ve bor nitrür filmlerinin kalınlık değerine ait herhangi bir bulguya rastlanmamıştır. Ancak elde ettiğimiz Cloisite 30B ve limon esansiyel yağı film örneklerinin kalınlık değerlerinin yapılan çalışmalardaki film kalınlık değerine göre yüksek olduğu belirlenmiştir. Ön denemeler sırasında yaptığımız çalışmalar farklı boyutlardaki petri kabına dökülen film solüsyonundan, farklı film kalınlığına sahip filmler elde edildiğini göstermiştir. Bundan dolayı literatür ile karşılaştırıldığında çalışmamızdaki film örneklerinin kalınlık değerinin yüksek olmasının, kurutma kabı içerisine dökülen film solüsyonunun hacminin yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.1.2. Filmlere Ait Nem İçeriği ve Suda Çözünürlük Değerleri

Nem içeriği, film formülasyonu içerisinde yer alan maddelerin hidrofilik karakterlerinden dolayı tuttuğu suyu ifade etmektedir (Cozmuto ve ark., 2015). Nem içeriği, filmin gıda yüzeyine yapışmasını etkiler ve bu yüzden yüksek nem içeriğine sahip filmler yüksek su içeren gıdaları, düşük nem içeriğine sahip filmler ise yağlı gıdaları kaplamak için kullanılmaktadır (De Elguea-Culebras ve ark., 2019). Yaptığımız çalışmada film örneklerinin nem içerikleri Çizelge 4. 1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kontrol kitosan filmi ve antimikrobiyal madde içeren kitosan bazlı filmlerin ortalama nem içerikleri ve standart sapma değerleri

Örnek Kodu	Nem İçeriği (%)
1A	22,79±0,61[a]
2A	19,94±0,96[b]
2B	15,39±0,67[c]
3A	18,18±0,79[b]
3B	14,50±0,89[c]
4A	24,98±0,80[d]
4B	14,85±0,71[c]
5A	21,15±0,21[a]
5B	14,47±0,45[c]
6A	22,31±0,58[a]
6B	12,74±0,91[c]

*Aynı sütun üzerinde belirtilen farklı harfler istatistiksel açıdan ortalamalar arasındaki farklılığı ifade etmektedir ($p<0,05$).
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı

Yaptığımız çalışmada film örneklerinin nem değerlerinin %12,74-24,98 aralığında değiştiği tespit edilmiştir. En yüksek nem içeriği %1 etil pirüvat içeren, en düşük nem içeriği %3 limon esansiyel yağı içeren filmlerde saptanmıştır. Tüm filmlerin nem içeriğinin kontrol kitosan film ile karşılaştırıldığında nem içeriğinin kontrole göre düşük olduğu tespit edilmiştir. İstatistiksel açıdan ise film içerisindeki etken madde konsantrasyonunun nem içeriğinde anlamlı bir farklılığa yol açtığı tespit edilmiştir ($p>0.05$). Etken madde konsantrasyonundaki artışın nem içeriğinde azalmaya neden olduğu görülmüştür.

Literatürde Cloisite 30B, boraks, etil pirüvat ve bor nitrür içeren kitosan film örneklerine ait nem içeriği bulgularına rastlanmamıştır. Ancak Ahmed ve ark. (2016), kitosan filminin nem içeriğini yaklaşık %17, %3 borik asit içeren kitosan-jelatin filminin nem içeriğini ise yaklaşık %9 olarak tespit etmiştir. Ayrıca artan borik asit konsantrasyonunun filmin nem içeriğinde azalmaya yol açtığını bildirmiştir. Yaptığımız çalışma ile kıyaslandığında nem içeriğinin düşük olduğu görülmüştür. Filmlerin kurutma süresi ve kurutma ortamındaki farklılık elde ettiğimiz filmlerin nem içeriğinin daha yüksek olmasına neden olmuştur.

Peng ve Li (2014), kitosan filminin nem içeriğini %24±0,72 tespit ederken, limon esansiyel yağı içeren kitosan filminin nem içeriğini %22,25±1,65 tespit etmiştir. Peng ve Li (2014) tarafından yapılan çalışma, tespit ettiğimiz değerler ile benzerlik göstermektedir.

De Elguea-Culebras ve ark. (2019), kontrol kitosan filminin nem içeriğini

%27,25±1,6 olarak tespit ederken, farklı lavanta ekstraktları içeren kitosan film örneğinin nem içeriğini %20,15±1,0 olarak tespit etmiştir. Yaptığımız çalışma ile kıyaslandığında filmlerin benzer nem içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir.

Cozmuto ve ark. (2015), jelatin filminin nem içeriğini %9.90±0.16, %2 kenevir yağı içeren jelatin filmlerinin nem içeriğini %9.55±0.27, %2 adaçayı yağı içeren filmlerin nem içeriğini %7.29±0.14 tespit etmiştir.

Achachlouei ve Zahedi (2018), karboksimetül selüloz filmlerinin nem içeriğini %27,75±4,75, %1 Na-MMT içeren karboksimetil selüloz filminin nem içeriğini %31,67±2,12, %3 Na-MMT içeren karboksimetil selüloz filminin nem içeriğini ise 30,00±0,17 tespit etmiştir. Cyras ve ark. (2008), nişasta filmlerinin nem içeriğini %26, farklı oranlarda MMT içeren filmlerin (%2, %3, %5) nem içeriğini ise %21-24 aralığında değiştiğini tespit etmiştir. Achachlouei ve Zahedi (2018) ve Cyras ve ark. (2008), tarafından yapılan çalışmalardan anlaşılacağı üzere nanokompozit filmlerde tercih edilen polimer, film örneklerinin nem içeriğinde farklılığa yol açmıştır.

Suda çözünürlük, nem içeriğinde olduğu gibi film formülasyonu içerisinde yer alan maddelerin hidrofilik veya hidrofobik karakterine bağlıdır. Suda çözünürlük değeri kaplama materyalinin bütünlüğünü ve biyoaktif bileşenlerin gıdaya transferini etkilemektedir (Cozmuto ve ark., 2015). Bu yüzden yüksek suda çözünürlük değerine sahip biyopolimerler, yüksek nem içeriğine sahip gıdalar ve yüksek bağıl nemde depolanan gıdalar için uygun değildir (Achachlouei ve Zahedi, 2018). Yaptığımız çalışmadaki film örneklerine ait suda çözünürlük değerleri Çizelge 4.2.'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.2. Kontrol kitosan filmi ve antimikrobiyal madde içeren kitosan bazlı filmlerin ortalama suda çözünürlükleri ve standart sapma değerleri

Örnek Kodu	Suda Çözünürlük (%)
1A	23,21±0,00[a]
2A	20,68±2,25[a]
2B	16,15±0,90[b]
3A	16,23±5,10[b]
3B	14,11±1,81[b]
4A	21,25±0,35[a]
4B	18,38±0,74[b]
5A	18,4±1,28[b]
5B	14,6±1,28[c]
6A	17,45±4,73[b]
6B	10,48±1,38[d]

*Aynı sütun üzerinde belirtilen farklı harfler istatistiksel açıdan ortalamalar arasındaki farklılığı ifade etmektedir ($p<0,05$).
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon Esansiyel Yağı

Çizelge 4.2.'de belirtildiği üzere filmlerin suda çözünürlük değerlerinin %10,48-23,32 aralığında değiştiği görülmüştür. En yüksek suda çözünürlük %1 etil pirüvat içeren ve sonrasında kitosan filmde, en düşük suda çözünürlük %3 limon esansiyel yağı içeren filmde saptanmıştır. Tüm filmlerin suda çözünürlükleri kontrol kitosan film ile karşılaştırıldığında kontrole göre düşük olduğu tespit edilmiştir. Film formülasyonu içerisinde yer alan etken madde konsantrasyonundaki artış, filmin suda çözünürlüğünü azaltmaktadır. Kontrol filminin suda çözünürlüğü ile %1 Cloisite 30B ve %1 limon esansiyel yağı filmlerinin suda çözünürlüğü karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Ancak %3 Cloisite 30B, %3 etil pirüvat ve boraks, bor nitrür, lmon esansiyel yağının her iki konsantrasyondaki filmlerinin suda çözünürlüğü ile kontrol filminin çözünürlüğü arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Literatürde boraks, etil pirüvat ve bor nitrür içeren filmlere ait suda çözünürlük değeri bulgularına rastlanmamıştır. Ancak Rhim ve ark. (2006), kitosan kontrol filminin suda çözünürlüğünü %13,6±1,1, Cloisite 30B içeren kitosan nanokompozit filminin suda çözünürlüğünü %13,2±1,0 tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışma ile karşılaştırıldığında elde ettiğimiz kontrol kitosan filmi ve Cloisite 30B içeren kitosan bazlı filmin suda çözünürlükleri Rhim ve ark. tarafından yapılan çalışmaya göre oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Her iki çalışmada kullanılan hammadde farkı ve yaptığımız çalışmada

kuruma sırasında film içerisindeki nem miktarının daha yüksek kalması suda çözünürlük için etkili olduğu düşünülmektedir.

Tüğen (2018), kontrol jelatin-kitosan filminin suda çözünürlüğünü %96,34±0,70 tespit ederken, %1 limon esansiyel yağı içeren jelatin-kitosan filmlerinin çözünürlüğünü %86,77±0,17 olarak tespit etmiştir. Yaptığımız çalışma ile karşılaştırıldığında, Tüğen tarafından belirtilen değerlerin oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Bunun nedeninin Tüğen tarafından hazırlanan filmlerin oldukça düşük film kalınlık değerine sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Peng ve Li (2014), kitosan filminin suda çözünürlük değerini %59,28±1,55 tespit ederken, limon esansiyel yağı içeren filmin suda çözünürlük değerini %28,95±1,03 tespit etmiştir.

Yaptığımız çalışmadaki suda çözünürlük değerlerinin Peng ve Li (2014) ve Tüğen (2018) tarafından tespit edilen değerlerden düşük olmasının nedeninin, yaptığımız çalışmadaki film kalınlık değerinin yüksek olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

De Elguea-Culebras ve ark. (2019), tarafından yapılan başka bir çalışmada ise kitosan kontrol filminin suda çözünürlüğü %49,27±2,0 tespit edilirken, farklı lavanta ekstraktını içeren filmlerin suda çözünürlüğü %32,82±1,1 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca kitosan kontrol filminin kalınlık değerinin 0,08 mm olduğu belirtilmiştir. Yaptığımız çalışma ile kıyaslandığında kontrol filminin oldukça yüksek suda çözünürlük değerine sahip olması, filmlerin suda çözünürlük değerinin film kalınlık değerinden etkilendiği teorisini desteklemektedir.

4.1.3. Filmlere Ait Görünür Yoğunluk Değerleri

Film görünür yoğunluğu elde edilen malzemenin gözeneklik, filtrasyon kapasitesi hakkında fikir vermektedir ve görünür yoğunluğun azalması bu değerlerin yüksek olduğunun göstergesidir (Lozano-Novarro ve ark., 2018). Çalışmada elde edilen filmlerin görünür yoğunlukları Çizelge 4.4. üzerinde gösterilmektedir.

Çizelge 4.3. Kontrol kitosan filmi ve antimikrobiyal madde içeren kitosan bazlı filmlerin ortalama görünür yoğunlukları ve standart sapma değerleri

Örnek Kodu	Görünür Yoğunluk (g/cm^3)
1A	0,5088±0,0330
2A	0,5545±0,0387
2B	0,6106±0,0260
3A	0,6133±0,0548
3B	0,5868±0,0471
4A	0,5885±0,0220
4B	0,6448±0,0894
5A	0,6675±0,1386
5B	0,5615±0,0637
6A	0,6538±0,0299
6B	0,5404±0,0144

*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı

Çizelge 4.3.'de gösterildiği üzere filmlerin görünür yoğunluk değerlerinin 0,5088-0,6675 g/cm^3 aralığında değiştiği görülmüştür. Kontrol kitosan filmi ile karşılaştırıldığında tüm filmlerin görünür yoğunluğunun kontrole göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. En düşük görünür yoğunluk ise %3 limon esansiyel yağı içeren kitosan film olarak belirlenmiştir. Konsantrasyon arttıkça film görünür yoğunluğu azalmıştır. Ancak bu farklar yapılan istatistiksel analize göre anlamlı farklılığa yol açmamıştır ($p<0.05$).

Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde ise Cloisite 30B, boraks, etil pirüvat, bor nitrür ve limon esansiyel yağı içeren filmlerin görünür yoğunluk değerlerine ait herhangi bir veriye rastlanmamıştır. Ancak Lozano-Navarro ve ark. (2018), kızılcık, yaban mersini, nardan ekstrakte edilen antosiyanini; pancar ve pitayadan ekstrakte edilen betalainleri; üzümden izole edilen resveratrolü; kekikten izole edilen timol ve karvakrolu içeren kitosan-nişasta filmlerinin görünür yoğunluklarını belirlemiştir. Yaptıkları çalışmada filmlerin yoğunluk değerlerinin 0,0641-0,1087 g/cm^3 aralığında olduğunu tespit etmiştir ve yüksek görünür yoğunluk değerinin daha gelişmiş bariyer özellik göstereceğini bildirmiştir. Yaptığımız çalışma ile kıyaslandığında, Lozano-Navarro ve ark. tarafından elde edilen görünür yoğunluk değerlerinin, elde ettiğimiz filmlerin görünür yoğunluk değerlerinden düşük olduğu görülmüştür. Bundan dolayı hazırladığımız filmlerin gözeneklerinin daha az olması, Lozano-Navarro ve ark. tarafından elde edilen filmlere kıyasla daha fazla gelişmiş bariyer özelliği gösterebileceği anlaşılmaktadır.

Ahmed ve Ikram (2016), kitosan filminin görünür yoğunluğunu 0,675 g/cm^3 ve kitosan-jelatin filminin görünür yoğunluğunu 1,744 g/cm^3 tespit etmiştir. %3 borik asidi

çapraz bağlayıcı kullanarak hazırladıkları kitosan-jelatin filminin görünür yoğunluğunu ise 1,554 g/cm^3 tespit etmiştir. Yapılan çalışmada kitosan filminin görünür yoğunluk değeri, yaptığımız çalışmadaki kitosan filminin görünür yoğunluk değerinden yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ahmed ve ark. film örneklerini %2 (w/v) kitosan solüsyonundan hazırlarken, yaptığımız çalışmada film örnekleri %1,5 (w/v) kitosan solüsyonundan hazırlanmıştır. Formülasyon içeriğindeki kitosan miktarının görünür yoğunluğu etkilediği düşünülmektedir.

Achachlouei ve Zahedi (2018), karboksimetil selüloz filmlerinin yoğunluğunu 116,1±0,01 kg/m^3 tespit ederken, farklı oranlarda sodyum-MMT ve TiO_2 içeren karboksimetil selüloz filmlerinin yoğunluğunu 121,6-125,9 kg/m^3 olarak tespit etmiştir. Yaptığımız çalışma ile karşılaştırıldığında karboksimetil selüloz filmlerinin yoğunluk değerlerinin düşük olduğu görülmüştür. Bu sonucun nedenleri arasında film formülasyonları ve film kalınlık değerlerinin farklı olması sayılabilir.

Sonuç olarak Cloisite 30B, boraks, etil pirüvat, bor nitrür içeren filmlerin, kitosan kontrole ve yapılan çalışmaya göre düşük gözenekli yapıda olmasından dolayı daha fazla gelişmiş oksijen ve su buharı bariyer özelliği gösterebileceği belirlenmiştir. Ancak bunun oksijen ve su buharı geçirgenlik testleri ile desteklenmesi gerekmektedir.

4.1.4. Filmlere Ait Renk Değerleri

Renk ürün alırken, tüketici tercihini etkileyen önemli parametrelerden biridir. Bu nedenle gıda maddelerinin veya gıda kaplama materyallerinin renk kalitesinin nesnel olarak belirlenmesi için farklı renk değerleri kullanılmaktadır. Kaplama materyalinde ise renk değerlerinin belirlenmesi, uygulanacağı gıda maddesinin belirlenen karakteristik renk kalitesi değerlerini değiştirmemesi açısından önemlidir. Minolta CR 400 kolorimetresi ile yapılan ölçüm sonuçlarına göre L* değeri parlaklığı (0-100), –a* değeri yeşilliği (-60), +a değeri ise kırmızılığı (+60), -b* değeri maviliği (-60), +b sarılığı (+60) ifade etmektedir. Film örneklerine ait L*, a*, b* değerleri Çizelge 4.5.'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.4. Filmlerin ortalama renk değerleri ve standart sapması

KOD	L*	a*	b*
1A	79,22±1,64[a]	0,56±0,06[a]	26,19±0,90[a]
2A	84,88±0,21[b]	-0,73±0,08[b]	32,84±2,21[b]
2B	73,41±0,70[c]	2,94±0,41[c]	31,53±0,80[b]
3A	80,88±0,41[ade]	-1,21±0,18[b]	30,17±0,60[be]
3B	84,00±0,04[b]	-1,01±0,06[b]	20,80±0,69[c]
4A	81,42±0,43[d]	-0,03±0,01[ac]	23,08±0,53[c]
4B	81,32±0,00[ed]	-0,36±0,01[bce]	28,32±0,71[ae]
5A	85,44±0,41[b]	0,32±0,05[ac]	11,83±1,06[d]
5B	74,03±0,13[c]	3,33±0,37[cd]	33,75±0,69[b]
6A	84,10±0,72[b]	-0,08±0,05[c]	15,40±0,73[f]
6B	80,54±0,62[ad]	-0,88±0,39[b]	30,57±1,14[b]

*Aynı sütun üzerinde belirtilen farklı harfler istatistiksel açıdan ortalamalar arasındaki farklılığı ifade etmektedir ($p<0,05$).
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı

Çizelge 4.4. incelendiğinde L* (aydınlık) değeri kontrol filmi ile kaşılaştırıldığında tüm maddelerin % 1 konsantrasyon değeri için artış gözlemlenmiştir. %3 konsantrasyona sahip Cloisite 30B ve bor nitrür içeren kitosan filmlerinde ise L* değeri kontrole göre azalma göstermiştir. Bu artma ve azalmaların istatistiksel açıdan önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Madde konsantrasyonundaki değişiklik ise etil pirüvat filmlerinin her iki konsantrasyonunun L* değeri için bir farklılık göstermemiştir. Ancak Cloisite 30B, bor nitrür ve limon esansiyel yağı filmlerinin artan konsantrasyonuna bağlı olarak film L* değerinde istatistiksel anlamda önemli bir azalma olmuştur. Boraks filminde ise artan madde konsantrasyonuna bağlı olarak film L* değerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir artış meydana gelmiştir.

Filmlerin a* değeri incelendiğinde boraks, etil pirüvat, limon esansiyel yağı filmlerinin her iki konsantrasyonu ve Cloisite 30B filminin %1 konsantrasyonunu içeren filmlerde kontrole göre oldukça düşük istatistiksel açıdan önemli negatif a* değeri tespit edilmiştir ($p<0,05$). %3 Cloisite 30B ve %3 bor nitrür filmlerinde ise pozitif yönde kontrole göre artış meydana gelmiştir. Ayrıca etil pirüvat ve limon esansiyel yağı filmlerinde artan konsantrasyona bağlı olarak a* değerinin azaldığı görülmektedir.

İstatistiksel açıdan bu artış etil pirüvat filmleri için anlamsız olarak tespit edilsede limon esansiyel yağı filmleri için bu artış anlamlı farklılığa neden olmuştur ($p<0,05$). Cloisite 30B, boraks ve bor nitrür filmlerinde ise konsantrasyon artışına bağlı olarak a* değerinde artış meydana geldiği tespit edilmiştir. İstatistiksel açıdan bu artış boraks filmleri için önemsizken, Cloisite 30B ve bor nitrür filmleri için önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Filmlerin b* değerleri incelendiğinde ise kontrol ile karşılaştırıldığında Cloisite 30B filminin her iki konsantrasyonu, %1 boraks, %3 etil pirüvat, %3 bor nitrür, %3 limon esansiyel yağı içeren filmlerin b* değerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. %3 boraks, %1 etil pirüvat, %1 bor nitrür ve %1 limon esansiyel yağı filmlerinin b* değerinin ise kontrole göre düşük olduğu tespit edilmiştir. Tüm bu bulguların istatistiksel açıdan önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Ayrıca konsantrasyonun artması b* değerinin istatistiksel açıdan Cloisite 30B için önemsiz, boraks filmleri için ise b* değerinin önemli ölçüde azalmasına yol açarken; etil pirüvat, bor nitrür ve limon esansiyel yağı filmleri için b* değerinin istatistiksel açıdan önemli derecede artmasına yol açmıştır ($p<0,05$).

Literatürde boraks, etil pirüvat ve bor nitrür içeren filmlerin renk değerlerine ait bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak Rahvalı ve ark. (2016), kontrol kitosan filminin L*, a* ve b* değerlerini sırasıyla 95,447±0,165; -3,857±0,179; 15,921±0,506 olarak tespit ederken, %1 Cloisite 30B içeren kitosan filminin L*, a* ve b* değerlerini sırasıyla 94,729±0,394; 4,312±0,135; 18,913±0,618 olarak tespit etmiştir. Elde ettiğimiz kontrol kitosan filmi ve Cloisite 30B içeren kitosan filmlerin, Rahvalı tarafından yapılan çalışmaya göre L* değerlerinin düşük, a* ve b* değerlerinin ise yüksek olduğu görülmüştür. Rahvalı filmleri, etüvde 50 °C'de 12 saat gibi kısa 1 hafta kuruturken, yaptığımız çalışmada filmler oda sıcaklığında daha uzun sürede kurutulmuştur. Filmlerin kurutulması aşamasındaki farklılık, renk değerlerinin farklı görülmesine yol açmıştır.

Rhim ve ark. (2006), tarafından yapılan çalışmada kontrol kitosan filminin L*, a*,b* değerleri sırasıyla 85,8±0,0; -0,9±0,1; 2,7±0,3 olarak tespit edilirken Cloisite 30B için bu değerler sırasıyla 85,3±0,2;-1,7±0,1; 6,3±0,3 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızdaki film örneklerinin renk değerleri ile Rhim ve ark. tarafından elde edilen filmlerin renk değerleri karşılaştırıldığında film örneklerimizin her üç renk değerinin de düşük olduğu tespit edilmiştir. Renk değerleri arasındaki farklılığın nedeninin yaptığımız çalışmadaki filmlerin kalınlığının, Rhim ve ark. (2006), tarafından yapılan çalışmadaki filmlerin kalınlığından yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Film kalınlık değeri, film içerisindeki madde yoğunluğunun fazla olmasının sonucudur ve bundan dolayı yapılan çalışmaya göre

elde ettiğimiz filmlerin parlaklık değerinin düşük, sarılık değerinin ise oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Peng ve Li (2014), kitosan filminin L*, a*, b* değerini sırasıyla 89,02±0,30; -2,48±0,20; 10,13±0,54 tespit ederken, limon esansiyel yağı içeren kitosan filmlerin renk değerlerini sırasıyla 88,14±0,25; -0,43±0,64; 14,24±0,57 tespit etmiştir. Yaptığımız .çalışmada belirlenen renk değerleri ile benzerlik göstermiştir.

Tüğen (2018), kontrol kitosan-jelatin filminin L*, a*, b* değerini sırasıyla 15,67±0,14; -0,64±0,05; 3,16±0,01 tespit ederken, %1 limon yağı içeren kitosan-jelatin filminin renk değerlerini sırasıyla 27,54±0,17; -0,20±0,23; 6,51±0,04 tespit etmiştir. Sonuçlarımız ile karşılaştırıldığında her üç renk değerinin de elde ettiğimiz %1 limon esansiyel yağı içeren kitosan filmlerinin renk değerlerinden oldukça düşük olduğu görülmüştür. Tüğen (2018), tarafından yapılan çalışmada film formülasyonunda yer alan jelatinin filmlerin renk değerlerindeki düşüşe neden olabileceği düşünülmektedir.

İlk renk değerleri ile gerçek renk arasındaki mesafe vektörü modülünü veren toplam renk farklılıkları (TCD), ton açısı değeri (Hue°), açıklığı ve sarı-maviyi tek bir terimde birleştiren beyazlık indeksi (WI) ve sarılık indeksi (YI) değerleri Çizelge 4.5.'de verilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde Cloisite 30B, boraks, etil pirüvat, bor nitrür ve limon esansiyel yağı içeren kitosan filmlerine ait verilere rastlanmamıştır.

Hue° değeri 0 -saf kırmızı renk, 90 -saf sarı renk, 180 -saf yeşil renk, 270 saf mavi renk aralığında değişiklik göstermektedir (Duangmal veark., 2005;Tuyen ve ark., 2010). Yapılan çalışmadaki filmlerin Hue° değeri, kontrol filmin Hue° değeri ile karşılaştırıldığında, %1 bor nitrür filmi dışındaki tüm filmlerin Hue° değerinin kontrol ile arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Boraks, etil pirüvat ve limon esansiyel yağı filmlerinin konsantrasyon farklılığının istatistiksel açıdan önemli olmadığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Cloisite 30B ve bor nitrür filmlerinde konsantrasyonun artması Hue° değerinde istatistiksel açıdan önemli derecede azalmaya neden olmuştur ($p<0,05$). Verilere göre elde edilen tüm filmlerin, saf sarı ton açısı değerine daha yakın olduğu belirlenmiştir.

Adekunte ve ark. (2010), TCD değerlerini gözle görülebilecek düzeyde çok belirgin farklılıklar (TCD>3), belirgin farklılıklar (1,5<TCD<3) ve küçük farklılıklar (TCD<1,5) olarak sınıflandırmıştır. Yaptığımız çalışmadaki film örneklerinin TCD değerleri, TCD>3 tespit edilmiştir. Buna göre hazırlanan film örneklerinin renklerindeki farklılığın gözle görülebilir düzeyde çok belirgin bir şekilde algılanabileceğini göstermiştir. Ayrıca en yüksek TCD değeri %1 bor nitrür, en düşük TCD değeri ise %3 Cloisite 30B içeren

filmlerde saptanmıştır. %3 Cloisite 30B, %1 etil pirüvat ve %3 bor nitrür filmlerinin TCD değeri ile kitosan filminin TCD değeri karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan önemli azalma, %3 boraks ve %1 bor nitrür filminde ise önemli artış tespit edilmiştir ($p<0,05$). Boraks ve limon esansiyel yağı filmlerindeki konsantrasyon artışı TCD değerinde istatistiksel açıdan önemsiz bir artışa neden olmaktadır. Cloisite 30B ve bor nitrür filmlerinde artan konsantrasyon TCD değerinde önemli bir azalmaya neden olurken, etil pirüvat filmlerinde önemli bir artış neden olmuştur ($p<0,05$).

WI değeri, parlaklık ve sarı-mavilik değerlerini matematiksel anlamda tek bir terimde birleştiren ifadedir. Genel olarak gıda maddesinin kurutma işlemi sırasındaki rengin solmasının derecesini gösteren beyazlığı temsil etmektedir (Rathare ve Opara, 2013). Yaptığımız çalışmada en düşük WI değeri %3 Cloisite 30B, en yüksek WI değeri ise %1 bor nitrür filminde saptanmıştır. Ayrıca kontrol filminin WI değerinin %3 Cloisite 30B ve %3 bor nitrür içeren filmlerinin WI değeri ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı tespit edilirken, bunlar dışındaki tüm filmlerin WI değeri kontrol filmin değerinden anlamlı bir farklılığa yol açmıştır ($p<0,05$). Konsantrasyonun artması ise boraks filminin WI değerinde anlamlı bir artışa neden olurken; Cloisite 30B, etil pirüvat, bor nitrür ve limon esansiyel yağı filmlerinin WI değerinde anlamlı bir azalmaya neden olmuştur ($p<0,05$).

Çizelge 4.5. Filmlerin Hue°, TCD, WI ve YI değerleri

KOD	Hue°	TCD (ΔE)	WI	YI
1A	$88,48\pm0,27^{a}$	$37,81\pm0,26^{a}$	$58,36\pm0,45^{a}$	$64,83\pm0,96^{a}$
2A	$89,39\pm0,52^{b}$	$38,46\pm0,43^{ad}$	$68,78\pm0,27^{b}$	$44,82\pm0,60^{b}$
2B	$84,66\pm0,62^{c}$	$31,04\pm0,54^{c}$	$57,49\pm0,88^{a}$	$62,33\pm0,97^{c}$
3A	$87,34\pm0,80^{d}$	$38,41\pm0,13^{ad}$	$66,67\pm0,48^{b}$	$48,51\pm0,91^{d}$
3B	$87,47\pm0,42^{d}$	$39,05\pm0,63^{ad}$	$73,54\pm0,78^{d}$	$35,96\pm0,16^{e}$
4A	$89,77\pm0,20^{b}$	$36,24\pm0,36^{b}$	$70,74\pm0,82^{bd}$	$40,27\pm0,90^{f}$
4B	$89,09\pm0,29^{b}$	$37,49\pm0,45^{ac}$	$64,19\pm3,98^{bc}$	$50,93\pm0,29^{g}$
5A	$89,11\pm0,83^{a}$	$39,23\pm0,43^{acd}$	$76,88\pm0,45^{cd}$	$26,88\pm0,57^{h}$
5B	$84,28\pm0,51^{c}$	$32,58\pm0,47^{e}$	$57,54\pm0,36^{a}$	$64,52\pm0,82^{a}$
6A	$89,645\pm0,25^{b}$	$37,92\pm0,42^{ac}$	$79,04\pm0,38^{c}$	$23,33\pm0,77^{i}$
6B	$88,67\pm0,55^{bd}$	$38,59\pm0,19^{acd}$	$65,00\pm0,28^{b}$	$51,94\pm0,54^{g}$

*Aynı sütun üzerinde belirtilen farklı harfler istatistiksel açıdan ortalamalar arasındaki farklılığı ifade etmektedir ($p<0,05$).

*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı

Kirlenme, uygulanan işlemden dolayı yanma, ışık ve kimyasal maddeye maruz kalma gibi ürün bozulmasını tek bir değer ile ifade etmek için YI değeri kullanılmaktadır (Rathare ve Opara, 2013). Yapılan çalışmada en düşük YI değeri etil pirüvat filminde tespit edilirken, en yüksek YI değeri kontrol filminde tespit edilmiştir. Bu nedenle kontrol filminin çeşitli çevresel koşullara karşı daha hassas olduğu belirlenmiştir. Kontrol filmi ile karşılaştırıldığında ise %3 bor nitrür içeren film dışındaki tüm filmlerin YI değeri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Ayrıca konsantrasyonun artması boraks filminin YI değerinde anlamlı bir azalma; Cloisite 30B, etil pirüvat, bor nitrür ve limon esansiyel yağı filmlerinin YI değerinde anlamlı bir artış saptanmıştır ($p<0,05$).

Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde Cloisite 30B, boraks, etil pirüvat, bor nitrür ve limon esansiyel yağı içeren filmlerin TCD, Hue°, WI ve YI değerine rastanmamıştır. Ancak Zhao ve ark. (2018), manyok nişatasına, farklı oranlarda kitosan ve gallik asit ilave ederek hazırladığı biyoaktif filmlerin, TCD değerini yaklaşık 5-7; WI değerini 90-100; YI değerini 4-6 aralığında olduğunu tespit etmiştir. Yaptığımız çalışma ile karşılaştırıldığında renk değerlerinin oldukça düşük olduğu görülmektedir. Film formülasyonundaki madde farklılığının buna neden olabileceği tahmin edilmektedir.

Ortiz-Duarte ve ark. (2019), taze dilimlenmiş kavunları kitosan ve Ag nanopartikülleri içeren kitosan nanokompozit film ile kaplamıştır. TCD, Hue° ve WI değerini ilk gün kitosan ile kaplı kavunlarda sırasıyla 1,5±0,7;107,6±2,2; 70,2±1,1 tespit ederken, Ag nanopartiküllerini içeren kitosan ile kaplı kavunlarda sırasıyla 1,8±0,7; 104,6±1,3; 69,3±0,8 tespit etmiştir. Ayrıca her iki kaplama materyali için, depolama süresi arttıkça TCD değerinin arttığını, Hue° ve WI değerinin ise azaldığını bildirmiştir. Buna göre yaptığımız çalışmadaki filmlerin TCD değerinin yüksek, Hue° ve WI değerinin düşük olma nedeninin filmlerin kurutma aşamasının oldukça uzun sürmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Rhim ve ark. (2006), kontrol kitosan filminin ΔE (Toplam renk farklılığı) değerini 11,2±0,1 tespit ederken, Cloisite 30B içeren kitosan filminin ΔE değerini 12,4±0,3 olarak tespit etmiştir. Yaptığımız çalışma ile Rhim ve ark. tarafından yapılan çalışma karşılaştırıldığında, elde ettiğimiz kitosan-Cloisite 30B filmlerinin ΔE değerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Kurutma süre ve şartları, etken madde konsantrasyonu gibi faktörlerin bu farklılığa yol açtığı düşünülmektedir.

Luo ve ark. (2019), kekik yağı içeren jelatin filmlerinin ΔE değerini 0,18±0,13 WI değerini ise 92,92±0,19 tespit etmiştir. Ayrıca kekik yağı içeren jelatin filmlerine farklı

oranlarda chia müsilajı ilave edildiğinde ΔE değerinin 2,99-11,39 aralığında değiştiğini, WI değerinin ise 83,78-91,01 aralığında değiştiğini bildirmiştir.

Pranota ve ar. (2005), kitosan filminin ΔE değerini 9,28±0,76, %1 ve %2 sarımsak yağı içeren kitosan filmlerinin ΔE değerini sırasıyla 8.56±1.75, 8.42±1.33, %1 ve %2 potasyum sorbat içeren kitosan filmlerin ΔE değerini 13.72±2.38, 24.74±4.56, %1 ve %2 nisin içeren kitosan filmlerin ΔE değerini sırasıyla 13.40±1.67 olduğunu tespit etmiştir.

Özetle literatür de yapılan çalışmalar incelendiğinde film örneklerinin renk değerlerinin film formülasyonu, polimer madde miktarı, kalınlık değeri, kurutma şartları ve kurutma süresi gibi faktörlerden etkilendiği görülmüştür.

4.2. Filmlerin Biyobozunurluk ve Kimyasal Dayanıklılık Özelliklerine Ait Bulgular

4.2.1. Biyolojik Bozunurluk Değerleri

Filmlerin distile su ve aktif çamur içerisinde biyobozunurluk değerleri belirlenmiştir.

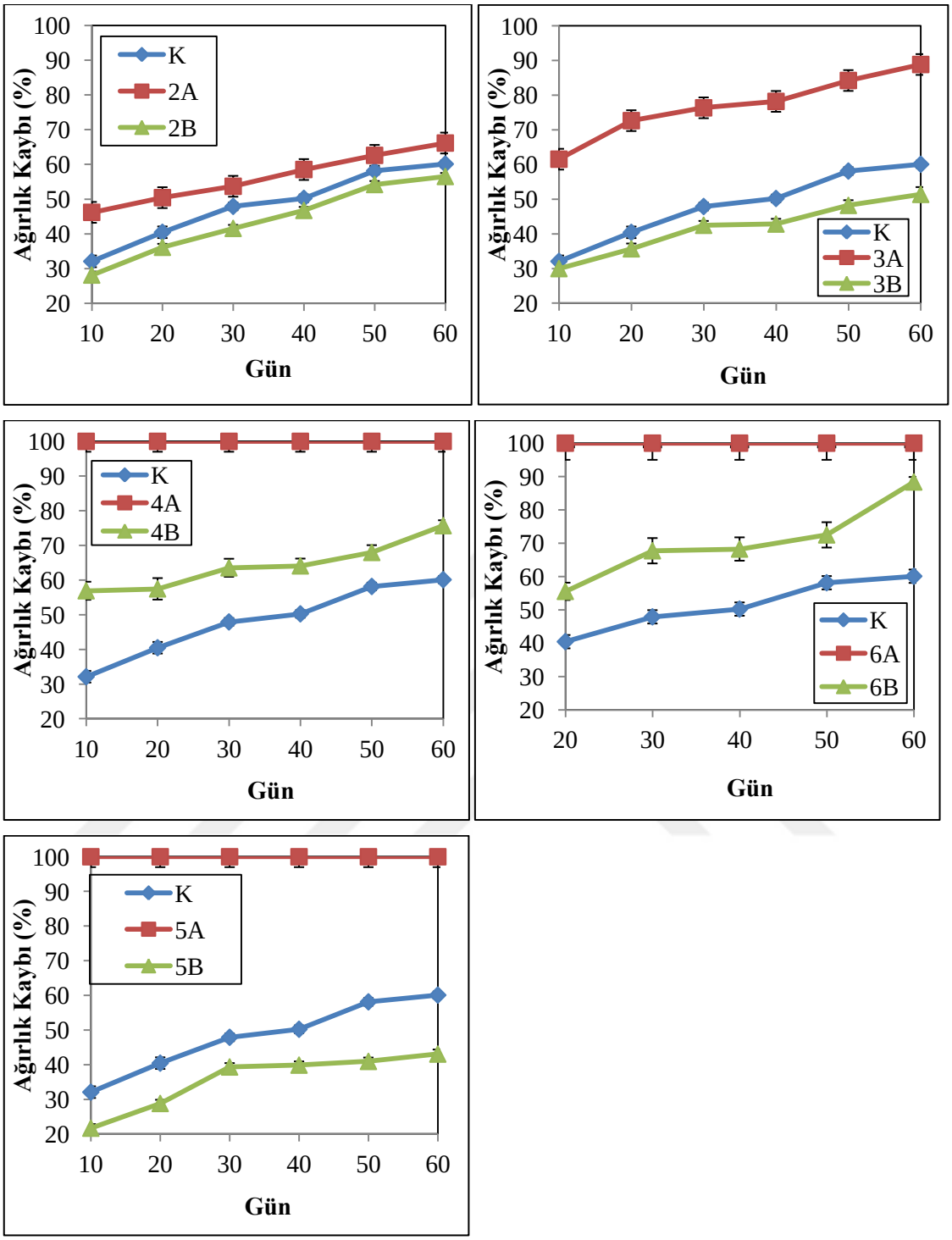
4.2.1.1. Distile Su İçerisindeki Biyobozunurluk Değerleri

2 ay süresince distile suda bekletilen filmlerin ağırlık kayıplarına ait bulgular Şekil 4.3.'de verilmiştir. Buna göre ilk 10 gün içerininde %1 etil pirüvat, %1 bor nitrür ve %1 limon esansiyel yağı içeren filmler distile su içerisinde tamamen erimiş ve kaybolmuştur. İlk 10 gündeki en düşük ağırlık kaybı ise %3 bor nitrür içeren filmde olmuştur. 60 gün sonunda %1 etil pirüvat, %1 bor nitrür ve %1 limon esansiyel yağı içeren filmlerin dışındaki filmlerin ağırlık kaybı ise; kontrol %60,09, %1 Cloisite 30B filminin %66,13, %3 Cloisite 30B filminin %56,51, %1 boraks filminin 88,88, %3 boraks filminin %51,41, %3 etil pirüvat filminin 75,68, %3 bor nitrür filminin %43,08 ve %3 limon esansiyel yağı filminin %88,36 olarak tespit edilmiştir.

Şekil 4.3. üzerinde 60 gün boyunca film biyobozunurlukları genel olarak incelendiğinde %1 konsantrasyonda etken madde içeren tüm filmlerin ve %3 konsantrasyona sahip etil pirüvat ve limon esansiyel yağı içeren filmlerin sudaki biyobozunurluğu kontrol kitosan filminin biyobozunurluğundan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ancak %3 konsantrasyona sahip Cloisite 30B, boraks ve bor nitrür, içeren filmin ağırlık kaybı kontrole göre daha düşük tespit edilmiştir. Ayrıca kitosan içerisine eklenen madde konsantrasyonu arttıkça filmin sudaki ağırlık kaybında azalma olduğu belirlenmiştir.

Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde Cloisite 30B, boraks, etil pirüvat, bor nitrür ve limon esansiyel yağı içeren filmlerin sudaki biyobozunurluk değerine ait bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak Cozmuto ve ark. (2015), jelatin film örneklerinin 24 saat boyunca su içerisinde muhafaza edilmesi sonucunda, jelatin filminin ağırlık kaybını %54,15, %2 kenevir yağı içeren jelatin filminin ağırlık kaybını %44,26, %2 adaçayı yağı içeren jelatin filminin ağırlık kaybını %34.45 tespit etmiştir. Ayrıca hızlı tüketime sunulacak sulu gıdalarda, daha çabuk çözünür özellikte olmasından dolayı kenevir yağı-jelatin filmlerinin tercih edilebileceğini bildirmiştir.

Yaptığımız çalışmaya göre, 10 günden daha az sürede hızlı tüketime sunulacak sulu gıdalar için, yüksek biyobozunurluklarından dolayı %1 etil pirüvat, %1 bor nitrür ve %1 limon esansiyel yağı içeren filmlerin uygun olacağı düşünülmektedir. Buna karşın daha uzun süre muhafaza edilmesi gereken gıdalar için, 60 gün sonunda daha az biyobozunurluk özelliği gösteren, %3 boraks ve %3 bor nitrür içeren kitosan filmlerinin uygun olabileceği düşünülmektedir.



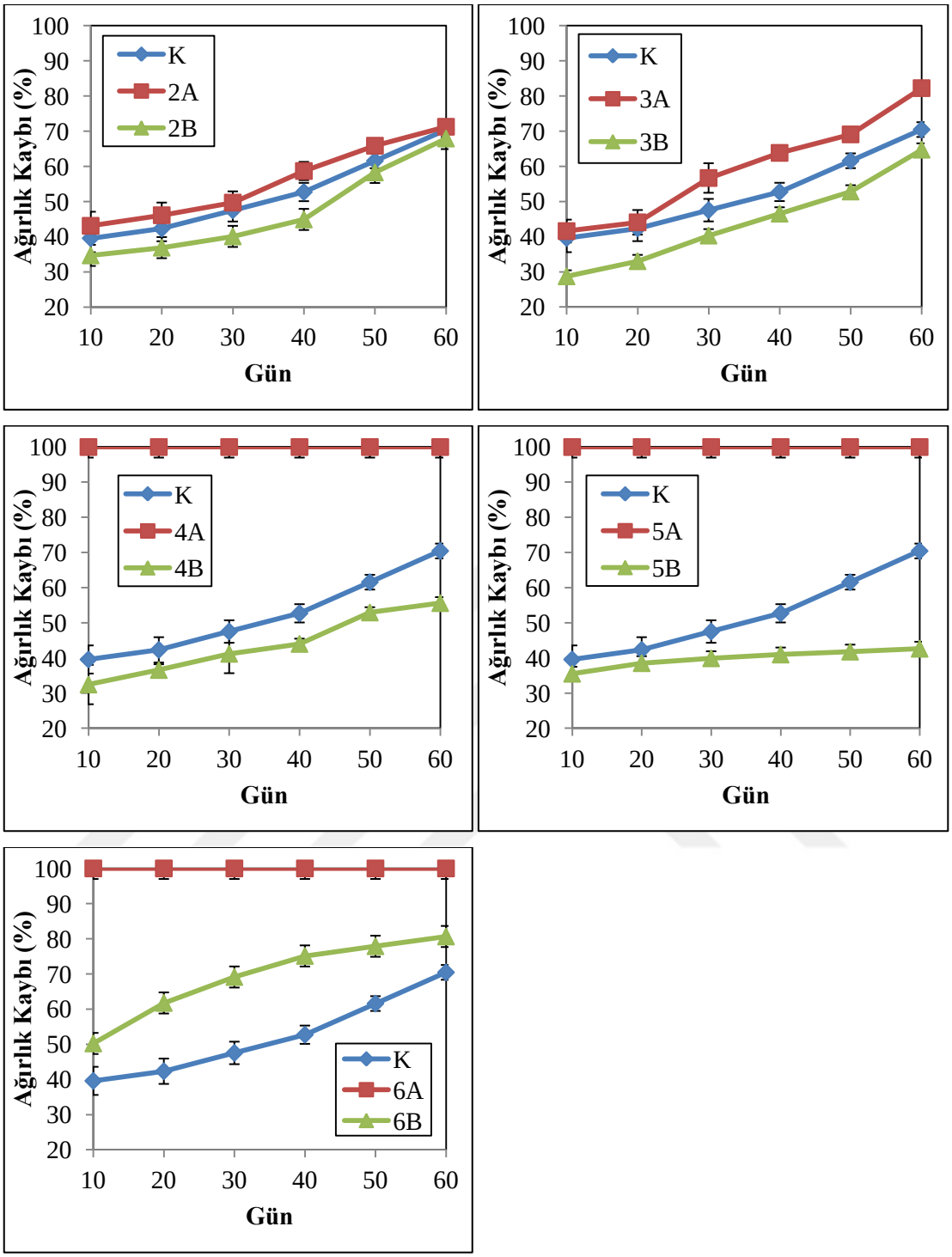
Şekil 4.3. Filmlerin distile su içerisinde zamana bağlı ağırlık kayıpları
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı

4.2.1.2. Aktif Çamur İçerisindeki Biyobozunurluk Değerleri

Aktif çamur, atık su arıtma sistemlerinde kullanılır ve su arıtma tesisleri tarafından üretilmektedir (Wang ve ark., 2018). Protein ve karbonhidrat gibi organik bileşenleri, kısa zincirli yağ asidi ve metan gibi biyoenerji kaynaklarını yüksek oranda içernektedir. Bundan dolayı aktif çamur fermantasyonu ile elde edilen yağ asitleri biyobozunur plastiklerin mikrobiyal üretimi için hammadde niteliğindedir (Chen ve ark., 2018). Ancak aktif çamur aynı zamanda *Proteobacteria, Actinobacteria, Nitrospirae* ve *Bacteroidetes* gibi türleri içeren heterojen bir mikroorganizma topluluğudur (Zhu ve ark., 2018). Aktif çamurun biyolojik çeşitliliğinin fazla olması çamurun arıtımınıda zorlaştırmaktadır. Öyle ki Zhu ve ark. (2018), aktif çamur içerisindeki bakteri topluluğunun, çinko içeren poliakrilat nanokompozitlere karşı dirençli olduğunu bildirmiştir. Yaptığımız çalışmada hazırlanan filmlerin, farklı biyoçeşitliliğe sahip ortama karşı direnci belirlenmiştir. 2 ay süresince aktif çamur içerisinde bekletilen filmlerin ağırlık kaybına ait bulgular Şekil 4.4. üzerinde verilmiştir.

Şekil 4.4.'de gösterildiği üzere ilk 10 gün içerisinde %1 etil pirüvat, %1 bor nitrür ve %1 limon esansiyel yağı içeren filmlerin aktif çamur içerisinde tamamen kaybolduğu belirlenmiştir. İlk 10 gün içerisindeki en düşük ağırlık kaybı ise % 3 boraks içeren filmde tespit edilmiştir. Filmlerin 60 gün sonundaki ağırlık kayıpları ise; kontrol %70,4, %1 Cloisite 30B filminin %71,25, %3 Cloisite 30B filminin %67,91, %1 boraks filminin 82,23, %3 boraks filminin 64,72, %3 etil pirüvat filminin 55,6, %3 bor nitrür filminin %42,62 ve %3 limon esansiyel yağı filminin ise %80,64 olarak tespit edilmiştir.

Filmlerin 60 gün boyunca aktif çamur içerisindeki ağırlık kayıpları kontrol filmi ile karşılaştırıldığında %1'lik Cloisite 30B, boraks, etil pirüvat, bor nitrür, limon esansiyel yağı ve %3 limon esansiyel yağı filmlerinin ağırlık kaybının yüksek; %3'lük Cloisite 30B, boraks, etil pirüvat ve bor nitrür filmlerinin ağırlık kaybının daha düşük olduğu belirlenmiştir. Ayrıca tüm filmler için etken madde miktarının artmasının filmin aktif çamur içerisindeki ağırlık kaybının azalmasına yol açtığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.4. Filmlerin aktif çamur içerisinde zamana bağlı ağırlık kayıpları
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı

Swain ve ark. (2013), %1, %2, %5, %8 ve %10 bor nitrür içeren selüloz nanokompozit filmlerini 180 gün boyunca aktif çamur içerisinde muhafaza ederek, 30 gün aralıklarla bu filmlerin ağırlık kayıplarını hesaplamıştır. 60 gün sonunda filmlerin ağırlık

kayıpları %9-15 aralığında değişirken, 180 gün sonunda ağırlık kaybının %15-20 arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca hazırladıkları filmlerin daha az biyolojik olarak parçalanabilme özelliği göstermelerinin, filmlerin termal direnç ve gaz geçirgenliği özelliklerini zayıflattığını bildirmiştir. Swain ve ark. (2013), tarafından yapılan çalışma ile elde ettiğimiz bor nitrür filmleri karşılaştırıldığında, elde ettiğimiz filmlerin aktif çamur içerisindeki biyobozunurluğunun daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeninin çalışmalarda farklı polimer matriksi kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca yaptığımız çalışmada filmlerin daha fazla biyolojik olarak parçalanması, filmlerin termal direnç ve gaz geçirgenliği özelliklerini daha çok iyileştirmiştir.

Dash ve ark. (2012), nanokil içeren sığır albumini biyonanokompozitlerinin 30 gün boyunca aktif çamur içerisinde muhafaza edildiğinde, %1 Cloisite 93A içeren kompozitin ağırlık kaybının yaklaşık %5, %2 Cloisite 93A içeren kompozitin ağırlık kaybının yaklaşık %4 olduğunu bildirmiştir. Nanokil çeşidi, polimer matriksi ve kullanılan aktif çamurun florasının filmlerin aktif çamur içerisindeki biyobozunurluklarını etkilediği düşünülmektedir.

Literatür incelendiğinde Cloisite 30B, boraks, etil pirüvat ve limon esansiyel yağı içeren filmlerin aktif çamur içerisindeki biyobozunurluk değerlerine ait bulgulara rastlanmamıştır.

4.2.2. Filmlerin Kimyasal Biyobozunurluk Değerleri

Filmlerin 2 N hidroklorik asit (HCl), 2N sodyum hidroksit (NaOH) ve %1 tuz çözeltisine karşı dayanıklılıkları belirlenmiştir.

4.2.2.1. 2 N Hidroklorik Asit

2 ay süresince 2 N HCl içerisinde bekletilen filmlerin ağırlık kayıplarına ait değerler Şekil 4.5. üzerinde verilmiştir. Buna göre filmlerin 2 N HCl içerisindeki ilk 10 günlük ağırlık kaybı kontrol filmi ile karşılaştırıldığında %1 ve %3 Cloisite 30B, %1 ve %3 boraks, %1 ve %3 limon esansiyel yağı içeren filmlerde düşük; %1 ve %3 etil pirüvat, %1 ve %3 bor nitrür içeren filmlerde ise daha yüksek olduğu belirlenmiştir. 10 gün sonunda en yüksek ağırlık kaybı %21,77 oranı ile %3 bor nitrür içeren filmde yaşanırken, en düşük ağırlık kaybı %1,36 oranı ile %1 limon esansiyel yağı içeren filmlerde tespit edilmiştir.

60 gün sonunda ise kontrol ile karşılaştırıldığında ağırlık kaybının %1 boraks, %1 bor nitrür ve %3 bor nitrür içeren filmlerde yüksek; %1 Cloisite, %3 Cloisite, %3 boraks, %1 ve %3 limon esansiyel yağı içeren filmlerde daha düşük olduğu belirlenmiştir. Ayrıca

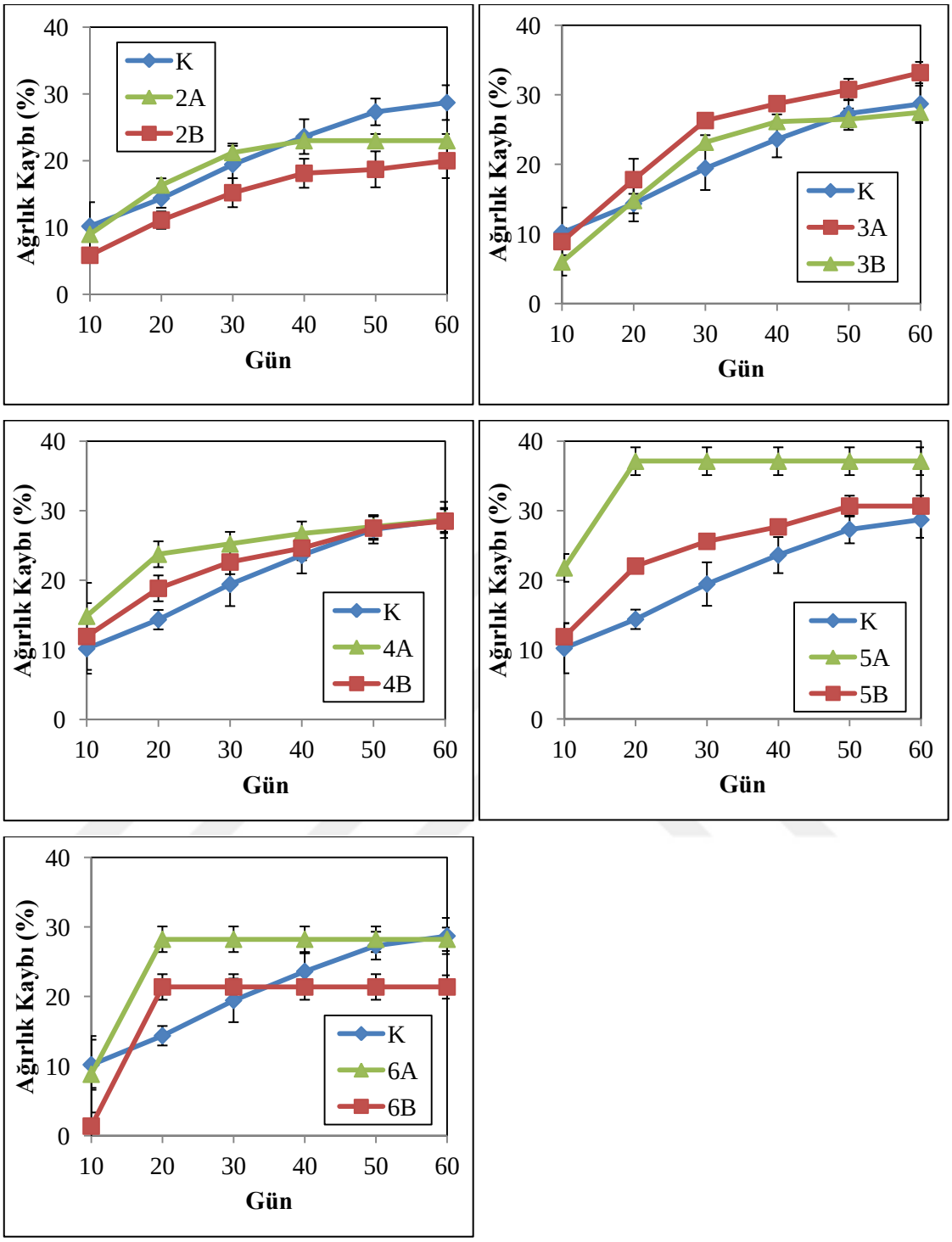
konsantrasyon arttıkça boraks içeren filmlerin ağırlık kaybında azalma belirlenirken, Cloisite 30B, etil pirüvat, bor nitrür ve limon esansiyel yağı filmlerinin ağırlık kaybında artış belirlenmiştir.

Swain ve ark. (2013), %1, %2, %5, %8 ve %10 oranında bor nitrür içeren selüloz filmleri 60 gün boyunca 2 N HCl içerisinde muhafaza ettiğinde 60 gün sonunda ağırlık kaybının %4,5-6,5 arasında değiştiğini tespit etmiştir. Yaptığımız çalışmada ise yapılan çalışmaya göre oldukça yüksek ağırlık kayıpları belirlenmiştir. Bu değerler %1 ve %3 bor nitrür içeren kitosan nanokompozit filmleri için sırasıyla %23 ve %20 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Swain ve ark. (2013) tarafından hazırlanan filmlerin asit ortama karşı daha fazla dayanıklı olduğunu göstermektedir. Bunun nedeninin çalışmalarda kullanılan polimer çeşidine bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Cozmuto ve ark. (2015), elde ettikleri jelatin filmleri ile asitli bir gıdanın kaplanması durumunda filmde meydana gelen değişimi belirlemek için filmleri asetik asit içerisinde 24 saat muhafaza etmiştir. %3 asetik asit içerisinde muhafaza edilen jelatin filminin ağırlık kaybını %38,65 %2 kenevir yağı içeren jelatin filminin ağırlık kaybını %50,12 %2 adaçayı yağı içeren jelatin filminin ağırlık kaybını %38,04 olarak tespit etmiştir.

Cozmuto ve ark. (2015), tarafından yapılan çalışmaya göre elde ettiğimiz filmlerin aside karşı dayanıklılarının oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeninin film formülasyonu ve çalışmada kullanılan asit türünün farklılığının yol açabileceği düşünülmektedir.

Literatürde Cloisite 30B, boraks, etil pirüvat ve limon esansiyel yağı filmlerinin asit içerisindeki biyobozunurluğu hakkında herhangi bir veriye rastlanmamıştır.



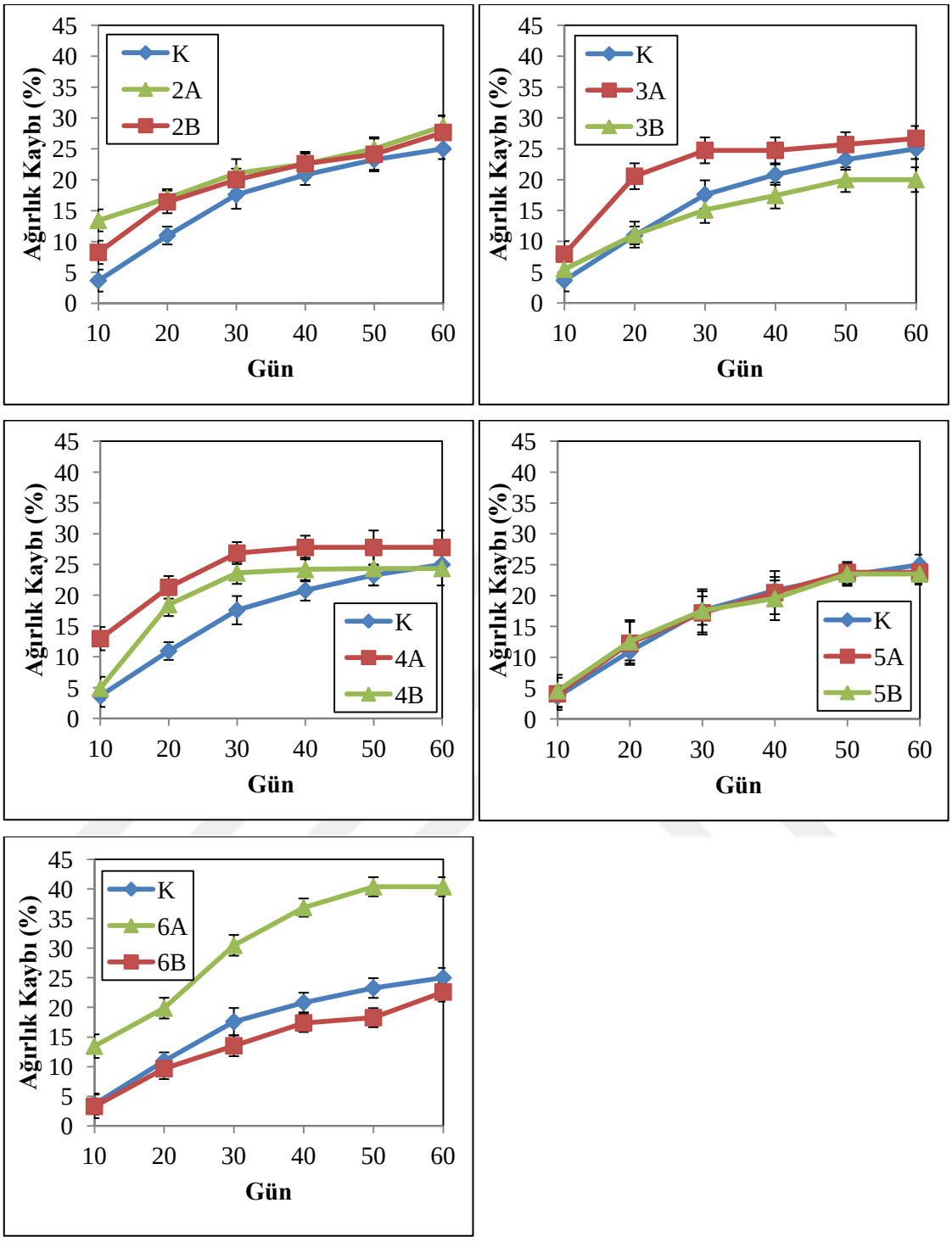
Şekil 4.5. Filmlerin hidroklorik asit içerisinde zamana bağlı ağırlık kayıpları
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı

4.2.2.2. 2 N Sodyum Hidroksit

2 ay süresince 2 N NaOH içerisinde bekletilen filmlerin ağırlık kayıplarına ait değerler Şekil 4.6. üzerinde verilmiştir. Buna göre 2 N sodyum hidroksit içerisinde muhafaza edilen filmlerin 10. gün sonunda en düşük ağırlık kaybı %1 limon esansiyel yağı içeren filmde, en yüksek ağırlık kaybı ise %3 limon esansiyel yağı içeren filmde olduğu tespit edilmiştir. 10. günün sonundaki filmlerin ağırlık kayıpları kontrol filmi ile karşılaştırıldığında ağırlık kayıplarının %1 Cloisite30B, %3 Cloisite 30B, %1 boraks, %1 etil pirüvat ve %3 limon esansiyel yağı içeren filmlerde yüksek; %3 boraks, %3 etil pirüvat, %1 bor nitrür, %3 bor nitrür ve %1 limon esansiyel yağı içeren filmlerde ise daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

60. gün sonunda ise en yüksek ağırlık kaybı %41,32 ile kontrol filmi iken, en düşük ağırlık kaybı oranı % 20 ile %3 boraks içeren filmlerde belirlenmiştir. Ayrıca tüm filmlerin ağırlık kaybı kitosan filmin ağırlık kaybından oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir. Filmlerdeki etken madde konsantrasyonundaki artış Cloisite 30B ve limon esansiyel yağı filmlerinin ağırlık kaybında artışa neden olurken boraks, etil pirüvat ve bor nitrür filmlerinin ağırlık kaybında azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir.

Swain ve ark. (2013), %1, %2, %5, %8 ve %10 oranında Cloisite 30B içeren selüloz filmleri 60 gün boyunca 2 N NaOH içerisinde muhafaza ettiklerinde filmlerin ağırlık kayıplarını %6,5-8 arasında tespit etmiştir. Yaptığımız çalışmada ise %1 ve %3 Cloisite 30B içeren filmlerin ağırlık kayıpları sırasıyla %28,66 ve %27,65 olarak tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışmada filmlerin biyobozunurluk özelliğinin yüksek olma nedeninin, her iki çalışmada kullanılan polimerlerin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



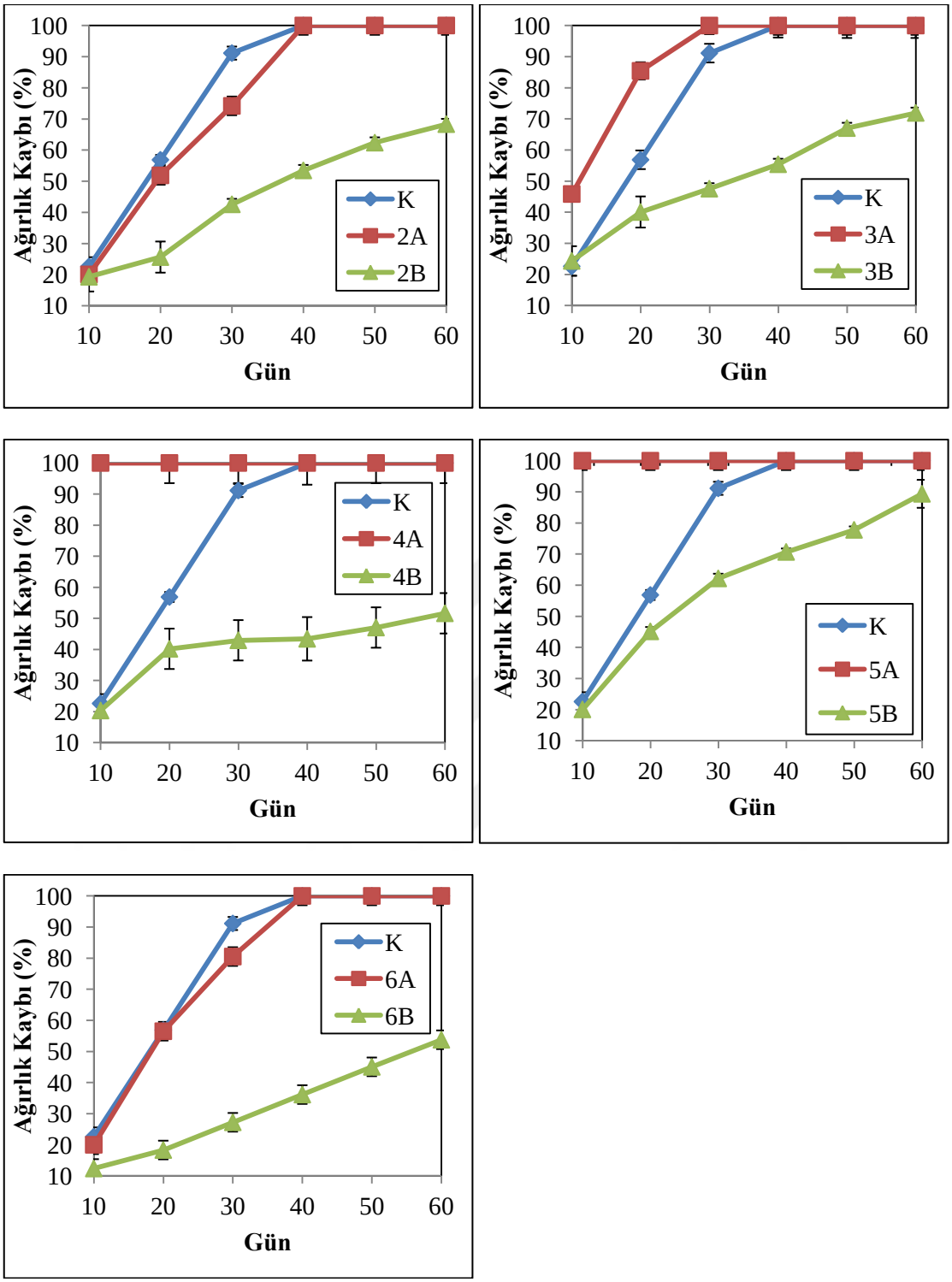
Şekil 4.6. Filmlerin sodyum hidroksit içerisinde zamana bağlı ağırlık kayıpları
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı

4.2.2.3. %1 NaCl Çözeltisi

2 ay süresince %1 NaCl içerisinde bekletilen filmlerin ağırlık kayıplarına ait değerler Şekil 4.6. üzerinde verilmiştir. Buna göre ilk 10 gün sonunda, %1 etil pirüvat ve %1 bor nitrür içeren filmlerin tamamen eriyip kaybolduğu belirlenmiştir. En düşük ağırlık kaybı ise %3 limon esansiyel yağ içeren filmlerde tespit edilmiştir. Kontrol filmi ile karşılaştırıldığında %1 boraks, %1 etil pirüvat ve %1 bor nitrür filmlerinde daha yüksek ağırlık kaybı oranı tespit edilirken; %1 Cloisite 30B, %3 Cloisite 30B, %3 boraks, %3 etil pirüvat, %3 bor nitrür, %1 limon esansiye yağı ve %3 limon esansiyel yağı filmlerinde daha düşük ağırlık kaybı oranı tespit edilmiştir.

60. gün sonunda ise kontrol, %1 Cloisite 30B, %1 boraks, %1 etil pirüvat, %1 bor nitrür ve %1 limon esansiyel yağı filmlerinde %100 ağırlık kaybı belirlenmiştir. Ayrıca diğer filmlerde ağırlık kaybı oranı %3 bor nitrür filminde %68,32, %3 boraks filminde %71,91, %3 etil pirüvat filminde %51,6, %3 bor nitrür filminde %89,36 ve %3 limon esansiyel yağı filminde %53,76 olarak tespit edilmiştir. Tüm filmler incelendiğinde filmin içerisindeki etken madde konsantrasyonundaki artışın, filmin ağırlık kaybında azalmaya yol açtığı belirlenmiştir. 60 gün boyunca daha az biyobozunurluk özelliği gösterdiği için tuzlu veya tuz ile muhafaza edilebilecek bir gıdanın, %3 etil pirüvat ve %3 limon esansiyel yağı içeren kitosan filmler ile kaplanmasının daha uygun olduğu belirlenmiştir.

Literatürde nanokompozit filmlerin tuz çözeltisi içerisindeki biyobozunurluk değerine ait herhangi bir bulguya rastlanmamıştır.



Şekil 4.7. Filmlerin tuz çözeltisi içerisinde zamana bağlı ağırlık kayıpları
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı

4.3. Filmlerin Antioksidan Aktivitesine Ait Bulgular

Antioksidan maddeler, lipit oksidasyonunu geciktirerek gıdanın muhafaza süresinin uzamasına yardımcı olmaktadır (Çoban ve Patır, 2010). Yöntem serbest bir radikal olan DPPH'ın giderilmesi ve antioksidan varlığında absorbans değerinde azalmaya neden olan renk meydana gelmesi temeline dayanmaktadır. DPPH analizinde, antioksidan maddeler DPPH radikalini sarı renkli bir bileşik olan difenilpirilhidrazine indirgemektedir (Siripatrawan ve Harte, 2010). Yaptığımız çalışmada DPPH yöntemi ile belirlenen antioksidan aktivite değerleri Çizelge 4.6.'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Filmlerin antioksidan aktivite değerleri

KOD	Antioksidan Aktivite (%İnhibisyon)
1A	$20,81\pm0,82^{a}$
2A	$22,54\pm0,31^{b}$
2B	$16,74\pm0,00^{c}$
3A	$39,35\pm0,52^{d}$
3B	$27,45\pm0,63^{e}$
4A	$35,69\pm0,39^{f}$
4B	$22,15\pm0,55^{ab}$
5A	$25,58\pm0,00^{g}$
5B	$19,39\pm0,39^{a}$
6A	$32,27\pm0,72^{h}$
6B	$19,88\pm0,49^{a}$

*Aynı sütun üzerinde belirtilen farklı harfler istatistiksel açıdan ortalamalar arasındaki farklılığı ifade etmektedir ($p<0,05$).
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı

Çizelge 4.7. üzerinde görüldüğü üzere en yüksek antioksidan aktivite %1 boraks içeren filmde tespit edilirken, en düşük antioksidan aktivite %3 Cloisite 30B filminde tespit edilmiştir. İstatistiksel analiz yapıldığında ise kontrol kitosan filminin antioksidan aktivitesi ile %1 etil pirüvat, bor nitrür ve limon esansiyel yağı içeren filmlerin antioksidan aktiviteleri arasında anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Ancak %1 Cloisite 30B, %3 Cloisite 30B, %1 boraks, %3 boraks, %1 etil pirüvat, %1 bor nitrür ve %1 limon esansiyel yağı içeren filmler ile kontrol filmin antioksidan aktivitesi arasında anlamlı

farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). Konsantrasyon artıkça tüm filmlerin antioksidan aktivitesinde önemli bir azalma olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Bunun nedeninin, düşük etken madde konsantrasyonuna sahip filmlerin yüksek çözünürlük göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tüğen (2018), yaptığı çalışmada %0,25, 0,5, 0,75 ve 1 limon yağı içeren jelatin-kitosan filmlerinin antioksidan aktivitesini DPPH yöntemine göre sırasıyla %13,12; %22,00; %50,60; %60,20 olarak belirlemiştir. Hsouno ve ark. (2017), %5 konsantrasyondaki citrus limon esansiyel yağının antioksidan aktivitesini yaklaşık %35 olarak tespit etmiştir. Literatür ile karşılaştırıldığında elde ettiğimiz %1 limon esansiyel yağı içeren filmin antioksidan aktivitesinin Hsouno ve ark. (2017), tarafından alınan sonuca göre yüksek, Tüğen tarafından yapılan çalışmaya göre oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeninin film formülasyonuna ilave edilen ham maddelerin niteliğinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

De Elguea-Culebras ve ark. (2019), DPPH yöntemine göre lavanta içeren kitosan filmlerin antioksidan aktivitesini 35,52±0,5 μg mL^{-1} tespit ederken, kontrol kitosan filminin herhangi bir aktivite göstermediğini belirtmiştir. Ancak yaptığımız çalışmada kitosan kontrol filminin antioksidan aktivitesinin varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca Yen ve ark. (2008), farklı kaynaklardan üretilen kitosanın antioksidan aktivitesinin DPPH yöntemine göre %11,67-16,30 arasında değiştiğini bildirmiştir. Kitosanın antioksidan özelliğinin ise kitosan molekülündeki NH_2 grubunun serbest radikali inhibe etme yeteneğinden geldiği bildirilmiştir (Sun ve ark., 2007).

Akyüz ve ark. (2018), kontrol kitosan filmin DPPH yöntemine göre antioksidan aktivitesini %31,72 belirlerken, farklı oranlarda kapsaisin içeren kitosan filmlerin antioksidan aktivitesinin %67,80-94,40 aralığında olduğunu belirlemiştir. Yaptığımız çalışmada ise kontrol kitosan kontrol filminin antioksidan aktivitesi %20,81 tespit edilmiştir. Bunun nedeni Akyüz ve ark. (2018), tarafından yapılan çalışmada kontrol kitosan filminin kalınlığının oldukça düşük olması ve buna bağlı olarak DPPH solüsyonundaki aktivitesini daha etkin gösterebilmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde Cloisite 30B, etil pirüvat, boraks ve bor nitrür içeren filmlerin antioksidan aktivite değerine ait herhangi bir veriye rastlanmamıştır. Ancak Bozkurt ve ark. (2016), çilek ve kiraza buhar şeklinde uygulanan etil pirüvatın, meyvelerin 3-6 gün boyunca depolanması sırasında, meyvelerin antioksidan özelliği üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığını tespit etmiştir.

4.4. Filmlerin Antimikrobiyal Özelliklerine Ait Bulgular

4.4.1. Çözeltilerin Tespit Edilen Antibakteriyel ve Antifungal Aktivite Değerleri

Herbir film formuasyonuna eklenen etken maddelerden %1 ve %3 konsantrasyona sahip çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin antibakteriyel ve antifungal aktivitesi disk difüzyon yöntemi ile tespit edilerek sonuçlar Çizelge 4.8, Çizelge 4.9. ve Çizelge 4.10. üzerinde yer verilmiştir.

Çizelge 4.7. Film içerisine eklenen etken maddelerin, film içindeki konsantrasyonuna göre hazırlanan çözeltilerinin antibakteriyel etkisi

	İnhibisyon Çapı (mm)			
Film Kodu	***E. coli* O157:H7 EDL 937**	***B. cereus* NCTC 7464**	***S.* Typhimurium ATCC 14028**	***S. aureus* ATCC 25923**
B1	<5	<5	<5	17,01±0,66
B2	<5	<5	<5	<5
BN1	<5	6,91±0,20	<5	10,70±0,94
BN2	<5	6,66±0,57	<5	<5
C30B1	<5	<5	<5	<5
C30B2	<5	<5	<5	<5
EPO	34,33±1,15	32,25±0,95	29,66±0,81	23,10±0,67
EP1	<5	<5	<5	<5
EP2	<5	<5	<5	<5
LEOO	15,50±1,51	16,75±0,95	11,16±0,98	12,83±1,22
LEO1	<5	<5	<5	<5
LEO2	<5	<5	<5	<5
Gentamisin	20,90±0,38	20,42±0,11	20,01±0,27	25,00±0,57

*B1: %1 Boraks çözeltisi, B2: %3 Boraks çözeltisi, BN1:%1 Bor nitrür çözeltisi, BN2: %3 Bor nitrür çözeltisi, C30B1:%1 Cloisite 30B çözeltisi, C30B2: %3 Cloisite 30B çözeltisi, EPO: Etil pirüvat, EP1: %1 Etil pirüvat özeltisi, EP2: %3 Etil pirüvat çözeltisi, LEOO: Limon esansiyel yağı, LEO1: %1 Limon esansiyel yağı, LEO2: %3 Limon esansiyel yağı
*Analizde kullanılan disklerin çapı 5 mm'dir.

Etil pirüvat ve limon esansiyel yağına karşı tüm mikroorganizmaların antimikrobiyal etkinliğinin varlığı mevcuttur. Ancak buna ek olarak %1 bor nitrür ve %3 bor nitrür çözeltilerinin *B. cereus*, %1 boraks ve yine %1 bor nitrür çözeltilerinin *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal etkinliğinin varlığı da tespit edilmiştir. Ayrıca etil pirüvat çözeltisinin test edilen 4 bakteri suşu için en yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.8. Film içerisine eklenen etken maddelerin, film içindeki konsantrasyonuna göre hazırlanan çözeltilerinin küflere karşı antifungal etkisi

Film Kodu	İnhibisyon Çapı (mm)									
	Alternaria arborescens		***Aspergillus flavus* NRRL 21882**		***Penicillium digitatum* CECT 20795**		***Penicillium citrinum* CECT 20822**		***Penicillium expansum* CECT 2280**	
	3.Gün	**7.Gün**	**3.Gün**	**7.Gün**	**3.Gün**	**7.Gün**	**3.Gün**	**7.Gün**	**3.Gün**	**7.Gün**
B1	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
B2	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
BN1	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
BN2	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
C30B1	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
C30B2	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
EPO	65,31 ±0,86	31,94 ±0,82	98,21 ±1,21	56,67 ±2,16	87,2± 2,26	40,19 ±1,43	96,83 ±0,60	71,20 ±0,33	87,05 ±1,42	66,43 ±0,52
EP1	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
EP2	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
LEOO	<5	<5	9,47± 0,19	6,81± 0,37	22,93 ±1,27	15,29 ±0,40	7,60± 0,10	6,72± 0,00	10,39 ±0,33	15,73 ±0,10
LEO1	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
LEO2	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
CX	5,00	5,00	6,44	6,28	22,49	21,53	5,00	5,00	5,00	5,00

*B1: %1 Boraks çözeltisi, B2: %3 Boraks çözeltisi, BN1:%1 Bor nitrür çözeltisi, BN2: %3 Bor nitrür çözeltisi, C30B1:%1 Cloisite 30B çözeltisi, C30B2: %3 Cloisite 30B çözeltisi, EPO: Etil pirüvat, EP1: %1 Etil pirüvat özeltisi, EP2: %3 Etil pirüvat çözeltisi, LEOO: Limon esansiyel yağı, LEO1: %1 Limon esansiyel yağı, LEO2: %3 Limon esansiyel yağı CX: Siklohekzemit.

*Analizde kullanılan disklerin çapı 5 mm'dir.

Boraks, bor nitrür, Cloisite 30B, etil pirüvat ve limon esansiyel yağı çözeltilerinin her iki konsantrasyonununda küflere karşı antifungal özellik göstermediği tespit edilmiştir. Buna karşın çalışmada analiz edilen tüm küflere karşı etil pirüvatın antifungal etkisi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca limon esansiyel yağınında *A. arborescens* dışındaki mikroorganizmalara karşı antifungal özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Bakteri suşlarında olduğu gibi 5 farklı küf için de en yüksek antifungal etkiye sahip olan madde etil pirüvat olarak belirlenmiştir. Üçüncü ve yedinci inkübasyon günlerinde ölçülen zon çaplarına göre inkübasyon süresine bağlı olarak maddelerin antimikrobiyal etki alanının daraldığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.9. Film içerisine eklenen etken maddelerin, film içindeki konsantrasyonuna göre hazırlanan çözeltilerinin mayalara karşı antifungal etkisi

Film Kodu	**İnhibisyon Çapı (mm)**	
	C. albicans **ATCC 10231**	***S. cerevisiae*** **ATCC 9763**
B1	<5	<5
B2	<5	<5
BN1	<5	<5
BN2	<5	<5
C30B1	<5	<5
C30B2	<5	<5
EPO	33,83±1,47	45,50±0,35
EP1	<5	<5
EP2	<5	<5
LEOO	17,16±0,40	16,75±1,06
LEO1	<5	<5
LEO2	<5	<5
CX	18,48±2,77	19,77±0,18

*B1: %1 Boraks çözeltisi, B2: %3 Boraks çözeltisi, BN1:%1 Bor nitrür çözeltisi, BN2: %3 Bor nitrür çözeltisi, C30B1:%1 Cloisite 30B çözeltisi, C30B2: %3 Cloisite 30B çözeltisi, EPO: Etil pirüvat, EP1: %1 Etil pirüvat özeltisi, EP2: %3 Etil pirüvat çözeltisi, LEOO: Limon esansiyel yağı, LEO1: %1 Limon esansiyel yağı, LEO2: %3 Limon esansiyel yağı
*Analizde kullanılan disklerin çapı 5 mm'dir.

Boraks, bor nitrür, Cloisite 30B, etil pirüvat ve limon esansiyel yağı çözeltilerinin her iki konsantrasyonuda mayalara karşı antifungal özellik göstermezken, etil pirüvat ve limon esansiyel yağı antifungal özellik göstermiştir. Çalışmada kullanılan bakteri ve küflerde olduğu gibi en yüksek antifungal etkiye sahip olan etken madde etil pirüvat olarak belirlenmiştir.

4.4.2. Filmlerin Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması

4.4.2.1. Filmlerin Antibakteriyel Etkisinin Disk Difüzyon Yöntemi ile Belirlenmesi

Disk şeklinde kesilen film örnekleri, belirli konsantrasyonda bakteri içeren TSA üzerine yerleştirildikten sonra inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan inhibisyon zonları ölçülmüştür. Ancak TSA ve film örneklerinin interaksiyonu sonucu film örneklerinde genişleme meydana geldiği için inhibisyon zonu film örneğinin altında kalmıştır. Her film örneği ve her bir bakteri için üç paralel çalışılmıştır ve sonuçlar Çizelge 4.11. üzerinde gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. Filmlerin bakterilere karşı inhibisyon zon çapları

Film Kodu	Inhibisyon Çapı (mm)			
	***E. coli* O157:H7 EDL 937**	***S.* Typhimurium ATCC 14028**	***B. cereus* NCTC 7464**	***S. aureus* ATCC 25923**
1A	6,55±0,17^{a}	7,51±0,06^{a}	6,56±0,47^{ac}	7,18±0,08^{a}
2A	7,20±0,12^{ab}	7,55±0,08^{a}	6,35±0,44^{a}	7,27±0,08^{a}
2B	7,00±0,40^{a}	6,59±0,12^{a}	7,15±0,07^{ac}	7,28±0,49^{a}
3A	7,50±0,61^{ab}	7,84±0,62^{a}	7,48±0,24^{c}	7,37±0,01^{ac}
3B	6,71±0,46^{a}	7,01±0,04^{a}	6,40±0,11^{ac}	6,81±0,14^{a}
4A	8,53±0,20^{b}	7,31±0,56^{a}	9,23±0,02^{b}	7,88±0,21^{c}
4B	6,86±0,14^{a}	7,75±0,15^{a}	6,65±0,25^{ac}	7,20±0,02^{ac}
5A	7,09±0,25^{a}	7,29±0,06^{a}	8,90±0,19^{b}	9,17±0,09^{b}
5B	6,52±0,05^{a}	6,73±0,10^{a}	7,05±0,04^{ac}	6,08±0,00^{d}
6A	11,60±1,24^{c}	10,60±1,60^{b}	9,96±0,93^{b}	12,57±0,13^{e}
6B	7,75±0,13^{ab}	8,16±0,08^{a}	8,21±0,06^{bc}	6,96±0,05^{ac}
Gentamisin	20,90±0,38^{d}	20,01±0,27^{c}	20,42±0,11^{d}	24,25±1,76^{f}

*Film besiyeri interaksiyonu sonucu film besiyeri üzerinde çözünerek genişlemiştir. Bundan dolayı inhibisyon sadece filmin genişlediği alanda belirlenmiştir.
*Aynı sütun üzerinde belirtilen farklı harfler istatistiksel açıdan ortalamalar arasındaki farklılığı ifade etmektedir ($p<0,05$).
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı
*Analizde kullanılan filmlerin çapı 5 mm'dir.

İstatistiksel açıdan %1 limon esansiyel yağı içeren filmin tüm bakterilere karşı önemli bir antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir ($p<0,05$). Kontrol film ile kaşılaştırıldığında film örneklerinin, %1 etken madde içeren filmlerin antibakteriyel etkinliğinin kontrol kitosan filmden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca etken madde çözeltilerinin, herhangi bir antibakteriyel özellik göstermemesine rağmen kitosan film formülasyonuna ilave edilmesi antibakteriyel aktivitenin artmasına yol açmıştır. Ancak %1 boraks ve %1 bor nitrür çözeltilerinde *S. aureus* 'a karşı görülen antibakteriyel etki, etken maddelerin film formülasyonuna eklenmesi ile azalmıştır.

Literatür incelendiğinde boraks, etil pirüvat ve bor nitrür içeren kitosan filmlerin antibakteriyel aktivitesi ile ilgili bulguya rastlanmamıştır. Ancak Saita ve ark. (2012), mikrokalorimetre kullanarak bakterilerin termogenez özelliğini inceleyerek, kitosan- borat kompleks partiküllerinin *E. coli* NBRC-3972 ve *S. aureus* NBRC-12732 suşlarına karşı antimikrobiyal etkisinin olduğunu bildirmiştir. Ancak borik asit içeriğinin düşük olduğu

partiküllerin en yüksek antimikrobiyal özellik gösterdiğini belirtmiştir. Yaptığımız çalışmada da düşük konsantrasyon da bor içeren filmlerin antibakteriyel etkinliğinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Rhim ve ark. (2006), yaptıkları çalışmada Cloisite 30B içeren kitosan bazlı nanokompozit filmlerin antimikrobiyal etkinliğinin disk difüzyon methodu kullanarak farklı bakteriler üzerinde belirlemiştir. Araştırma sonuçlarında nanokompozit filmin *E. coli* O157:H7 ATCC-11775 ve *S.* Typhimurium ATCC-14028 suşlarına karşı inhibisyon zonu oluşmadığını ancak *S. aureus* ATCC-14458 suşuna karşı ise 6-8 mm aralığında değişen bir inhibisyon zonu oluştuğunu tespit etmiştir. Yaptığımız çalışmadaki Cloisite 30B filmlerinin *S. aureus* 'a karşı olan antibakteriyel etkinliği Rhim ve ark. (2006), tarafından yapılan çalışma ile paralellik göstermektedir. Ancak Rhim ve ark. (2006), Cloisite 30B içeren kitosan filmlerin *E. coli* O157:H7 ve *S.* Typhimurium bakterilerine karşı herhangi bir antimikrobiyal etkisi olmadığını belirtirken, yaptığımız çalışma Cloisite 30B içeren kitosan filmlerin bu bakterilere karşı antibakteriyel etkisi olduğunu göstermiştir. Filmlerin *E. coli* O157:H7 ve *S.* Typhimurium 'a karşı olan etkisinin farklı olmasının sebebinin çalışmalarda kullanılan ham madde orjinlerinin ve film formülasyonu içerisinde yer alan etken madde konsantrasyonu ve denemede kullanılan suş farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Peng ve Li (2014), kitosan filminin *E. coli* CMCC-44102 suşuna karşı inhibisyon zonunu 2,84 mm belirlerken, *S. aureus* ATCC-6538 suşuna karşı inhibisyon zonunu 2,91 mm tespit etmiştir. Limon esansiyel yağı içeren kitosan filmlerin ise *E. coli* 'ye karşı inhibisyon zonunu 16,31 mm belirlerken, *S. aureus* 'a karşı inhibisyon zonunu 19,71 mm tespit etmiştir. Ayrıca limon esansiyel yağı-kitosan filmlerine kekik ve tarçın esansiyel yağı ilave edildiğinde *E. coli*'ye karşı inhibisyon zonunun 25,84-29,67 mm aralığında, *S. aureus* 'a karşı inhibisyon zonunun 55,12-71,25 mm aralığında değiştiğini bildirmiştir. Yaptığımız çalışmadaki inhbisyon değerlerinin düşük olmasının nedeninin, Peng ve Li (2014) tarafından yapılan çalışmada film solüsyonu içerisinde yer alan limon esansiyel yağı miktarının yüksek (Her 0,5 mL film solüsyonunda 1 mL esansiyel yağ) olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Pellissari ve ark. (2009), %1 kekik esansiyel yağı içeren nişasta-kitosan filmlerinin *E. coli* ATCC-25922, *S. aureus* FRI96 'e ve *B. cereus* ATCC-25923 suşlarına karşı inhibisyon zonlarını sırasıyla 23,73±1,91;30,81±1,30;33,88±1,44 mm tespit etmiştir. Yaptığımız çalışma ile karşılaştırıldığında limon esansiyel yağı içeren filmlerimizin antimikrobiyal etkinliğinin daha düşük olduğu belirlenmiştir. Buna göre filmin kurutma

süresi, formülasyonu içerisinde yer alan kitosanın miktarı ve kullanılan esansiyel yağ antimikrobiyal etkinliğin farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Akyüz ve ark. (2018), kitosan kontrol filminin *E. coli* ATCC-25922, *S.* Typhimurium SL-1344 ve *S. aureus* ATCC-25923 suşlarına karşı antimikrobiyal özellik göstermediğini bildirmiştir. Ancak farklı oranlarda kapsaisin içeren kitosan filmlerinin *E. coli* suşuna karşı inhibisyon zonunun 4,27-8,97 mm; *S.* Typhimurium 'a karşı inhibisyon zonunun 4,97-9,89 mm; *S. aureus* 'a karşı inhibisyon zonunun 4,82-8,75 mm aralığında olduğunu bildirmiştir. Akyüz ve ark. (2018), tarafından yapılan çalışmada, kontrol filmlerin antimikrobiyal özelliğinin olmamasının kullanılan toz kitosanın niteliğinin farklı olmasından veya filmlerin hazırlanma şeklinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Goy ve Assis (2014), 2 gL^{-1} ticari kitosan filminin *S. aureus* ATCC-25923 suşuna karşı olan inhibisyon zonunu yaklaşık 44 mm, 2 gL^{-1} N,N,N-trimetilkitosan (TMC) filminin ise filminin *S. aureus* ATCC-25923 suşuna karşı olan inhibisyon zonunu yaklaşık 33 mm tespit etmiştir. Ayrıca konsantrasyon artışına bağlı olarak antibakteriyel etkide bir azalma olduğunu bildirmiştir. Yaptığımız çalışmada kitosan filminin *S. aureus* 'a karşı olan inhibisyon zonunun daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeninin Goy ve Assis (2014), tarafından yapılan çalışmada film formülasyonuna plastikleştirici ilave etmemelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü ortama plastikleştirici ilave edilmesi film formülasyonundaki etken madde konsantrasyonunun azalmasına yol açmakta ve mikroorganizma üzerinde etkili olan aktif grupların kaybolmasına yol açmaktadır.

Youssef ve ark. (2015), kitosan filmlerini çözücü olarak asetik ve formik asit kullanarak hazırlamıştır. Asetik asit içeren kitosan filminin *S. aureus*, *E. coli*, *S.* Typhimurium ve *B. cereus* bakterilerine karşı inhibisyon zonunu sırasıyla 6 mm; 8 mm; 9 mm;7mm tespit etmiştir. Formik asit içeren kitosan filminin *S. aureus*, *E. coli*, *S.* Typhimurium ve *B. cereus* bakterilerine karşı inhibisyon zonunu ise sırasıyla 12 mm;11 mm; 14 mm; 16 mm olarak tespit etmiştir.

Hu ve ark. (2016), kuartenize kitosanın *E. coli* 'ye karşı 2,40 mm *S. aureus* 'a karşı ise 3,00 mm inhibisyon zonu oluşturduğunu bildirmiştir. Ayrıca kuartenize kitosan-karboksimetil selüloz filmlerin *E. coli* 'ye karşı 1,40-2,20 mm aralığında, *S. aureus* 'a karşı ise 1,60-2,60 mm aralığında değişen inhibisyon zonu oluştuğunu bildirmiştir. Hu ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışma ile karşılaştırıldığında, yaptığımız çalışmadaki kitosan filmin *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı olan antibakteriyel aktivitesi oldukça yüksektir. Bu çalışmalarda kullanılan kitosan türevinin farklı olmasının bir sonucu olarak düşünülmektedir.

Soni ve ark. (2018), kitosan-TEMPO (serbest radikal) filmlerinin *Salmonella enterica* (*S*. Enteritidis, *S*. Typhimurium ve *S*. Newport) kokteyl karışımı ve *Escherichia coli* O157:H7 (C7927, EDL933 ve 204 P) kokteyl karışımına karşı antibakteriyel etkisini belirlemiştir. Soni ve ark. (2018), TEMPO kontrol filminin herhangi bir antimikrobiyal özellik göstermediğini, kitosan-TEMPO filmlerinin ise her iki mikroorganizma kokteyl karışımı için tam inhibisyonun gösterdiğini bildirmiştir. Literatürde yer alan bu çalışma, yaptığımız çalışmada kontrol kitosan filminin *S*. Typhimurium ve *Escherichia coli* O157:H7 'ye karşı belirlediğimiz antimikrobiyal etkisinin varlığını desteklemiştir.

Yaptığımız çalışma literatürde Rhim ve ark. (2006), Saita ve ark. (2012), Youssef ve ark. (2015) ve Soni ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmalar ile paralellik göstermiştir. Ancak etken madde konsantrasyonunun artışına bağlı olarak, kitosan filmlerin antibakteriyel etkisinin azaldığı tespit edilmiştir. Bunun nedeninin %1 etken madde içeren filmin, %3 etken madde içeren filmden daha fazla çözünürlüğe sahip olması ve bundan dolayı çözünmeye bağlı olarak daha geniş bir antimikrobiyal etki alanı göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca Goy ve Assis (2014), belirttiği gibi film solüsyonunun konsantrasyonundaki artış, çözücünün ortamdan uzaklaşması sırasında polimer zincirindeki fonksiyonel gruplar arasında çapraz bağlanma, hidrojen ve kovalent bağların oluşumuna neden olmaktadır. Bu da fonksiyonel grup-ortam etkileşimlerine mekansal kısıtlamalar getirir. Sonuç olarak etken maddenin bakteri hücre duvarına bağlanması için ortamda daha az yüklü bölgeler kalır ve buna bağlı olarak antibakteriyel etkide azalma meydana gelir. Tüm mikroorganizmalar için en iyi antimikrobiyal etkinin ise %1 limon esansiyel filminde gerçekleştiği tespit edilmiştir. Ayrıca onu %1 etil pirüvat içeren film izlemiştir.

4.4.2.2. Filmlerin Antifungal Etkisinin Disk Difüzyon Yöntemi ile Belirlenmesi

Disk şeklinde kesilen film örnekleri, belirli konsantrasyon da, '3.1. Materyal' başlığı altında belirtilen küf ve maya kültürleri ile inoküle edilen PDA üzerine yerleştirildikten sonra inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin 3. ve 7. günü oluşan inhibisyon zonları ölçülmüştür. Ancak PDA ve film örneklerinin interaksiyonu sonucu film örneklerinde genişleme meydana geldiği için inhibisyon zonu film örneğinin altında kalmıştır. Ayrıca çalışmada etken madde konsantrasyonunun artışına bağlı olarak, kitosan filmlerin antifungal etkisinin azaldığı tespit edilmiştir. Bunun nedeninin %1 etken madde içeren filmin, %3 etken madde içeren filmden daha fazla çözünürlüğe sahip olması ve bundan dolayı çözünmeye bağlı olarak daha geniş bir antifungal etki alanı göstermesinden

kaynaklandığı düşünülmektedir. Her film örneği ve her bir mikroorganizma için iki paralel çalışılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.12. üzerinde gösterilmiştir.

İnkübasyonun üçüncü günü sonunda *A. arborescens* ve *A. flavus* 'a karşı en yüksek antifungal etkiyi %1 limon esansiyel yağı içeren film gösterirken, *Penicillium* türleri için en yüksek antifungal etkiyi %1 etil pirüvat içeren film göstermiştir. İnkübasyonun yedinci gününde ise %1 limon esansiyel yağı içeren filmin, *A. flavus* 'a karşı antifungal etkisi devam ederken, *A. arborescens* 'a için antifungal etkinliği tamamen yok olmuştur. *Penicillum* türleri için ise inkübasyonun yedinci gününde %1 etil pirüvat filmleri yüksek antifungal aktivitelerini sürdürmüştür. Ayrıca etken madde çözeltilerinin, herhangi bir antifungal özellik göstermemesine rağmen kitosan film formülasyonuna ilave edilmesi antifungal aktivitede artışına yol açmıştır.

Literatür incelendiğinde Cloisite 30B, boraks, etil pirüvat, bor nitrür ve limon esansiyel yağı filmlerinin antifungal etkinliği ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak Saita ve ark. (2012), mikrokalorimetre kullanarak bakterilerin termogenez özelliğini inceleyerek, kitosan-borat kompleks partiküllerinin *Aspergillus niger* NBRC-9455 ve *Fusarium solani* NBRC-5232 suşlarına karşı antimikrobiyal etkisinin olduğunu bildirmiştir. Ayrıca en iyi antimikrobiyal etkinin düşük borik asit içeriğinde tespit edildiğini bildirmiştir.

Zhang ve ark. (2009), kitosan filminin *A. flavus* 'a karşı inhibisyon zonunu 14,6±2,5 mm tespit ederken, kitosan solüsyonunun *A. flavus* 'a karşı inhibisyon zonunu 14,3±2,0 mm ve soya fasulyesi tripsin inhibitörü ekstraktı içeren kitosan filmin ise herhangi bir antifungal etkisi olmadığını belirlemiştir. Literatürdeki bu çalışmaya göre yaptığımız çalışmadaki kitosan filmin *A. flavus* 'a karşı belirlenen inhibisyon zonunun düşük olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeninin, film örneklerinin hazırlanmasında kullanılan kitosanın farklılığı ve çalışmalarda test edilen küf suşlarının farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Kaur ve ark. (2012), kitosan film solüsyonunun inkübasyonun üçüncü gününde *A. flavus* 'a karşı inhibisyon zonunu 10,66±0,76 mm belirlerken, *A. alternata* 'a karşı inhibisyon zonunu 10,0±1,73 mm belirlemiştir. Ayrıca kitosan-gümüş film solüsyonunun *A. flavus* 'a karşı inhibisyon zonunu 119,66±0,28 mm belirlerken, *A. alternata* 'ya karşı inhibisyon zonunu 16,33±0,29 mm belirlemiştir. Yaptığımız çalışma ile karşılaştırıldığında kitosanın *Alternaria* türüne karşı olan inhibisyon zonunun aynı olduğu belirlenirken, *A. flavus* 'a karşı olan inhibisyon zonunun yaptığımız çalışmada daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeninin Kaur ve ark. (2012)'nın film solüsyonunu kurutmadan direk solüsyon ile antifungal etkinliği test etmelerinden dolayı daha yüksek sonuç elde ettikleri düşünülmektedir.

Noshirvani ve ark. (2017), karboksimetil selüloz-kitosan filminin *Aspergillus niger* ATCC-5298 suşuna karşı 11,46±0,35 mm, farklı oranlarda tarçın esansiyel yağı içeren karboksimetil selüloz-kitosan filminin *Aspergillus niger* 'e karşı 16,44±0,36 mm ve 23,24±0,64 mm aralığında değişen, farklı oranlarda zencefil esansiyel yağı içeren karboksimetil selüloz-kitosan filminin ise, *Aspergillus niger* 'e karşı 14,31±0,54 mm ve 19,31±0,65 mm aralığında değişen inhibisyon zonunun varlığını belirlemiştir.

Younes ve ark. (2014), 72 saat sonunda %61 deasetilasyon derecesine (DA) sahip kitosanın *Alternaria solani* 'ye karşı 8,5 mm inhibisyon zonu oluşturduğunu, %56 DA'ya sahip kitosanın ise 8,0 mm inhibisyon zonu oluşturduğunu tespit etmiştir. Buna göre artan deasetilesyon derecesine göre *Alternaria* türü için oluşan inhibisyon zonununda arttığını bildirmiştir. Younes ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışma, yaptığımız çalışmayı desteklemektedir.

Çizelge 4.11. Filmlerin *Alternaria arborences, Aspergillus flavus, Penicillium digitatum, Penicillium citrinum, Penicillium expansum* türlerine karşı antifungal etkisi

Kod	İnhibisyon Çapı (mm)									
	A. arborescens		***A. flavus*** **NRRL 21882**		***P. digitatum*** **CECT 20795**		***P. citrinum*** **CECT 20822**		***P. expansum*** **CECT 2280**	
	3.Gün	**7.Gün**	**3.Gün**	**7.Gün**	**3.Gün**	**7.Gün**	**3.Gün**	**7.Gün**	**3.Gün**	**7.Gün**
1A	10,36±0,35^{a}	10,34±0,10^{a}	7,39±0,53^{a}	7,36±0,25^{a}	10,57±0,46^{a}	10,56±0,48^{a}	11,93±0,50^{a}	11,70±0,50^{a}	9,89±0,81^{a}	9,46±0,37^{a}
2A	8,60±0,56^{b}	7,80±0,47^{b}	7,30±0,12^{a}	7,20±0,18^{a}	9,92±1,01^{ac}	7,64±0,16^{b}	11,77±0,38^{a}	7,92±0,83^{b}	9,79±0,70^{a}	8,30±0,66^{ab}
2B	6,16±0,30^{c}	6,02±0,62^{c}	7,03±0,11^{a}	6,34±0,26^{ad}	6,41±0,48^{b}	6,14±0,05^{bc}	6,69±0,08^{b}	6,48±0,18^{b}	7,56±0,48^{b}	7,12±0,19^{b}
3A	9,50±0,45^{ab}	6,43±0,36^{c}	9,53±0,01^{b}	8,14±0,83^{ac}	12,33±0,02^{d}	12,27±0,29^{d}	10,95±0,83^{ac}	10,59±0,30^{a}	12,47±0,18^{c}	11,59±0,62^{ac}
3B	8,55±0,85^{b}	5,38±0,33^{cd}	7,40±0,12^{a}	7,28±0,16^{a}	11,22±0,26^{acd}	9,84±0,16^{ab}	10,18±0,11^{c}	10,18±0,11^{ad}	10,27±1,04^{a}	10,20±0,47^{ac}
4A	16,23±0,70^{d}	12,17±0,06^{e}	13,95±0,67^{c}	13,81±0,35^{b}	14,37±1,00^{d}	13,76±0,58^{ad}	14,21±0,04^{d}	14,09±0,38^{c}	15,52±1,10^{d}	14,99±1,08^{c}
4B	8,74±0,14^{b}	5,36±0,36^{cd}	7,44±0,9^{a}	6,97±0,41^{a}	8,54±0,26^{c}	8,26±0,23^{b}	11,05±0,21^{ac}	10,71±0,16^{a}	10,98±0,45^{ac}	10,09±0,31^{a}
5A	7,13±0,16^{cf}	<5	9,00±0,43^{b}	8,92±0,62^{ac}	13,92±0,47^{e}	13,35±0,08^{d}	15,06±0,45^{d}	14,62±0,49^{c}	14,96±0,39^{d}	14,54±0,53^{c}
5B	6,16±0,56^{c}	<5	6,86±0,24^{a}	6,20±0,72^{a}	6,56±0,04^{b}	6,48±0,12^{bc}	5,97±0,27^{b}	5,48±0,12^{b}	13,98±0,98^{cd}	8,43±0,19^{ab}
6A	25,24±0,14^{e}	<5	14,51±0,62^{c}	14,39±0,71^{b}	13,55,±0,03^{e}	11,40±1,42^{ad}	12,92±0,83^{ad}	12,47±1,24^{adc}	14,44±0,92^{cd}	13,98±0,98^{c}
6B	8,64±0,30^{b}	<5	7,24±0,84^{a}	7,08±0,67^{a}	8,86±0,31^{c}	8,32±0,76^{b}	12,23±0,13^{ac}	12,20±0,79^{ad}	12,58±0,16^{c}	8,34±0,86^{ab}
CX	5,49±0,15^{c}	<5	6,36±0,11^{a}	5,39±0,98^{d}	5,49±0,15^{b}	5,49±0,15^{c}	22,01±0,67^{e}	17,95±0,80^{b}	5,49±0,15^{e}	5,49±0,15^{b}

*Film besiyeri interaksiyonu sonucu film besiyeri üzerinde çözünerek genişlemiştir. Bundan dolayı inhibisyon sadece filmin genişlediği alanda belirlenmiştir.

*Aynı sütun üzerinde belirtilen farklı harfler istatistiksel açıdan ortalamalar arasındaki farklılığı ifade etmektedir ($p<0,05$).

*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı

*Analizde kullanılan filmlerin çapı 5 mm'dir.

Salarbashi ve ark. (2018), disk difüzyon yöntemine göre soya fasulyesi polisakkarit-Cloisite 30B filminin *A. niger* gelişimini engelleyemediğini belirlemiştir. Ancak yaptığımız çalışmada kitosan-Cloisite30B filmlerinin *Aspergillus* türüne ait antifungal etkinliği olduğu belirlenmiştir. Bu farklılığın nedeninin polimer matriksi ve kültür cinsinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Hsouna ve ark. (2017), limon esansiyel yağının *A. flavus* 'a karşı inhibisyon zonunu inkübasyonun üçüncü gününde 26,0±0,6 mm, *A. alternata* 'a karşı ise 17,0±0,6 mm tespit etmiştir. Yaptığımız çalışmada ise inkübasyonun üçüncü gününde %1 limon esansiyel yağı-kitosan filminin *A. arborescens* 'a karşı antifungal etkinliği Hsouna ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmaya göre yüksek olduğu, ancak limon esansiyel yağı-kitosan filminin *A. flavus* 'a karşı daha düşük antifungal etki gösterdiği belirlenmiştir. Buna göre limon esansiyel yağının orjininin farklı olması ve kitosan filmlere eklenmesinin, çalışmada kullanılan küf türü ve suşuna göre antifungal etkinin değiştiği belirlenmiştir.

Da Silva ve ark. (2013), alginat-kitosan (%65:35 oranında) filminin *Penicillium commune* ve *P. roqueforti* 'ye karşı herhangi bir antifungal etkisi olmadığını tespit ederken, film formülasyonuna %1 natamisin ilave edildiğinde *Penicillium commune* 'ye karşı 3,00±0,06 mm, *P. roqueforti'y*e karşı ise 2,90±0,11 mm inhibisyon zonu oluştuğunu bildirmiştir. Buna karşın yaptığımız çalışmada ise hazırladığımız kontrol kitosan film örneğinin *Penicillium* türlerine karşı antifungal etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Da Silva ve ark. (2013) tarafından hazırlanan film formülasyonundaki kitosan miktarının az olmasından dolayı alginat-kitosan film örneklerinde antifungal aktivitenin olmadığı düşünülmektedir.

Elde edilen filmlerin mayalara karşı antifungal etkisi Çizelge 4.13. üzerinde gösterilmektedir. İstatistiksel açıdan diğer filmler ile karşılaştırıldığında %1 limon esansiyel yağı içeren filmin *S. cerevisiae* 'a karşı önemli bir antifungal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Konsantrasyon artışının Cloisite 30B ve limon esansiyel yağı filmlerinin antibakteriyel etkinliğinde istatistiksel açıdan önemli bir azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bunun nedeni ise filmlerin %1 konsantrasyonlarının diğer konsantrasyona göre daha fazla çözünürlük özellik göstermesi ile açıklanabilmektedir. Ayrıca %1 limon esansiyel yağı içeren filmin *C. albicans* 'a karşıda istatistiksel açıdan önemli derecede antifungal aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Literatürde nanokompozit filmlerin *S. cerevisiae* ve *C. albicans* 'a karşı olan antifungal etkisinin, disk difüzyon yöntemi ile belirlenen bir bulgusuna rastlanmamıştır. Ancak Alburquenque ve ark. (2010), düşük molekül ağırlıklı kitosanın klinik *Candida*

türlerine karşı minimum inhibitör konsantrasyonunu (MIC) 4,8 mg/L tespit etmiştir ve kitosanın klinik *Candida* türlerinin %68,6'sını tamamen inhibe ettiğini bildirmiştir. Tayel ve ark. (2010), ise farklı kitosan tiplerinin *C. albicans* 'a karşı MIC değerini 1,25-2,0 mg/mL tespit etmiştir.

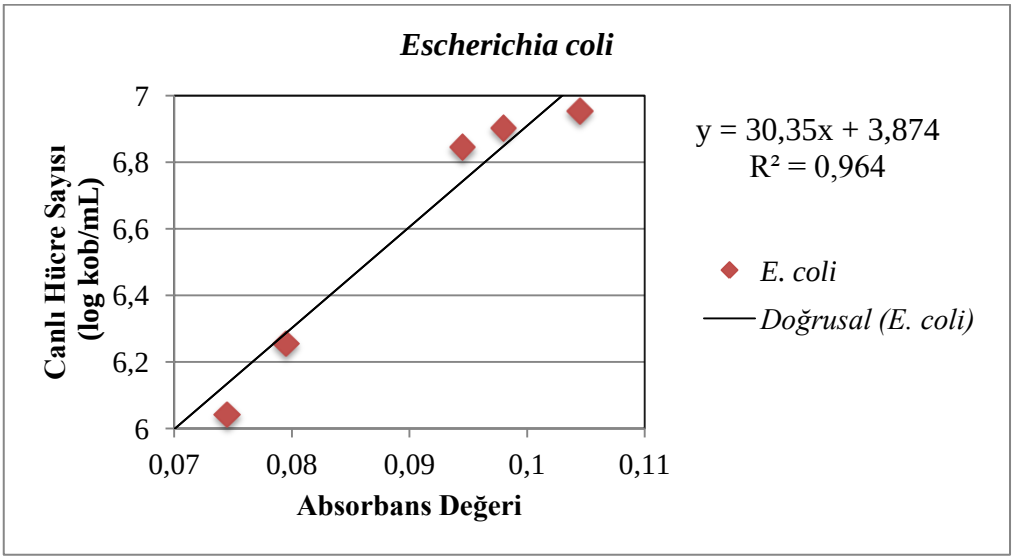
Çizelge 4.12. Filmlerin *S. cerevisiae* ve *C. albicans* 'a karşı antifungal etkisi

Film Kodu	İnhibisyon Çapı (mm)	
	S. cerevisiae **ATCC 9763**	***C. albicans*** **ATCC 10231**
1A	8,20±0,28^{a}	6,91±0,00^{a}
2A	9,72±0,02^{b}	10,54±0,38^{b}
2B	8,19±0,45^{a}	7,46±0,41^{ced}
3A	<5	9,24±0,48^{d}
3B	<5	10,17±0,70^{bd}
4A	<5	11,62±0,62^{ab}
4B	12,26±0,01^{c}	9,56±0,64^{bd}
5A	16,49±0,17^{d}	6,65±0,21^{e}
5B	9,75±0,16^{b}	8,36±0,01^{d}
6A	25,59±0,04^{e}	16,8±0,36^{f}
6B	10,01±0,05^{b}	9,40±0,02^{bd}
Siklohekzamit	18,36±0,29^{f}	<5

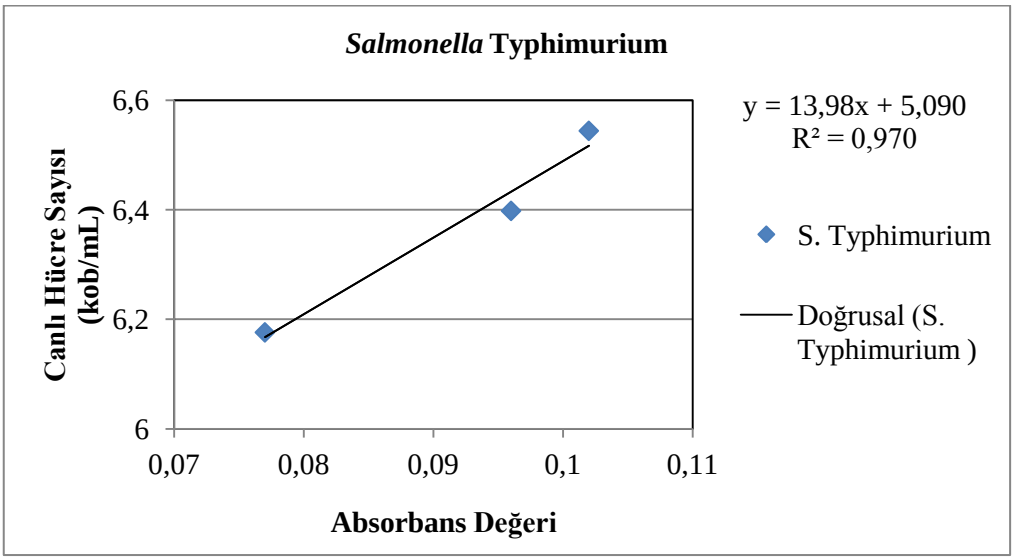
*Film besiyeri interaksiyonu sonucu film besiyeri üzerinde çözünerek genişlemiştir. Bundan dolayı inhibisyon sadece filmin genişlediği alanda belirlenmiştir.
*Aynı sütun üzerinde belirtilen farklı harfler istatistiksel açıdan ortalamalar arasındaki farklılığı ifade etmektedir ($p<0,05$).
*1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı
*Analizde kullanılan filmlerin çapı 5 mm'dir.

4.4.2.3. Filmlerin Antibakteriyel Etkisinin Canlı Hücre Sayım Testi ile Belirlenmesi

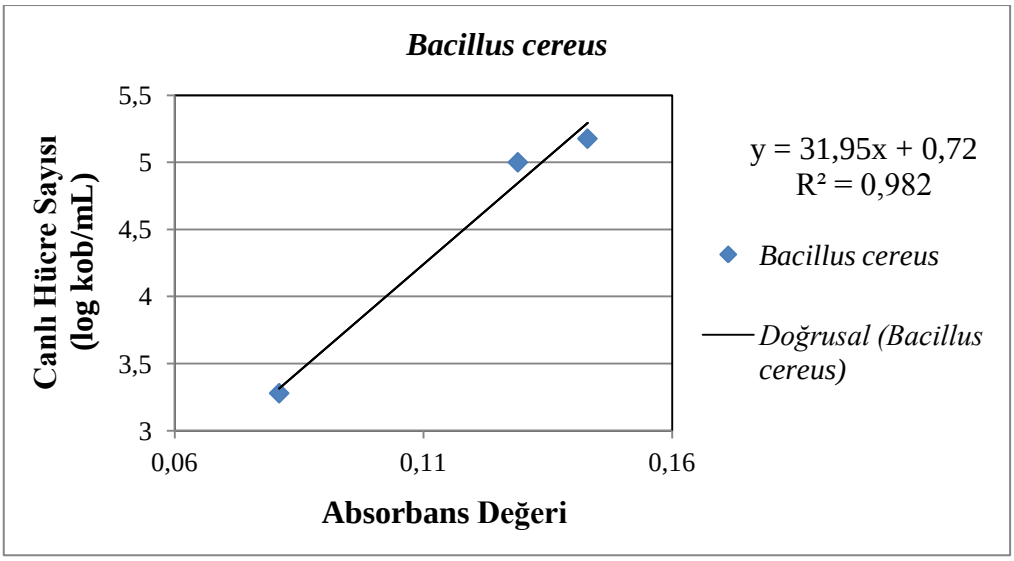
TSB besiyerinde 37 °C de 24 saat inkübe edilen mikroorganizmalar için çeşitli konsantrasyon da hazırlanan hücre süspansiyonlarının spektrofotometrik ölçümü ve yine aynı konsantrasyonlarda canlı hücre sayımı yapılarak log kob/mL-absorbans değerine ait eğri çizilmiştir. Grafikler Şekil 4.8., Şekil 4.9., Şekil 4.10. ve Şekil 4.11. üzerinde gösterilmektedir.



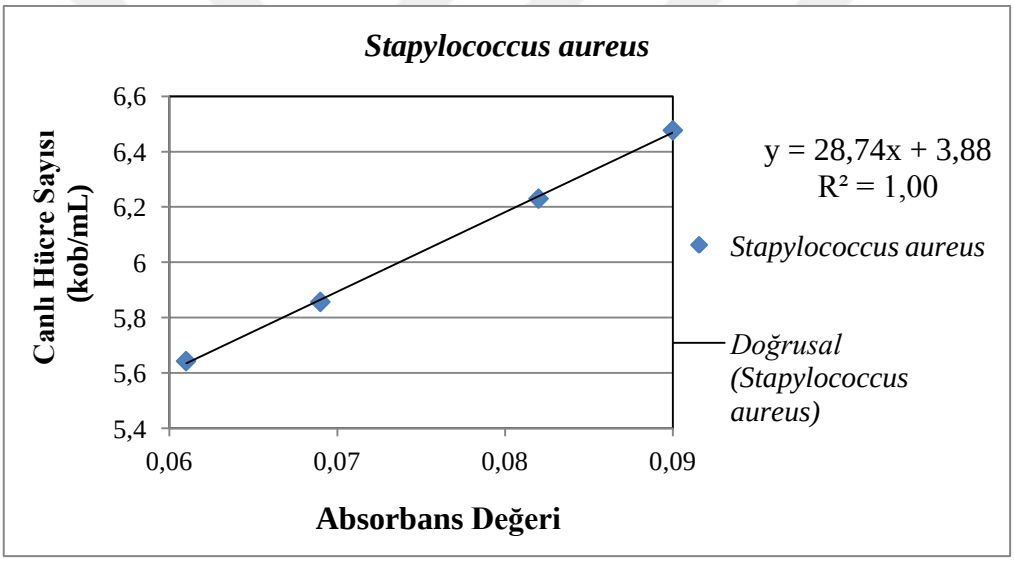
Şekil 4.8. *E. coli* 'ye ait log kob/mL-absorbans değeri grafiği



Şekil 4.9. *Salmonella* Typhimurium 'a ait log kob/mL-absorbans değeri grafiği

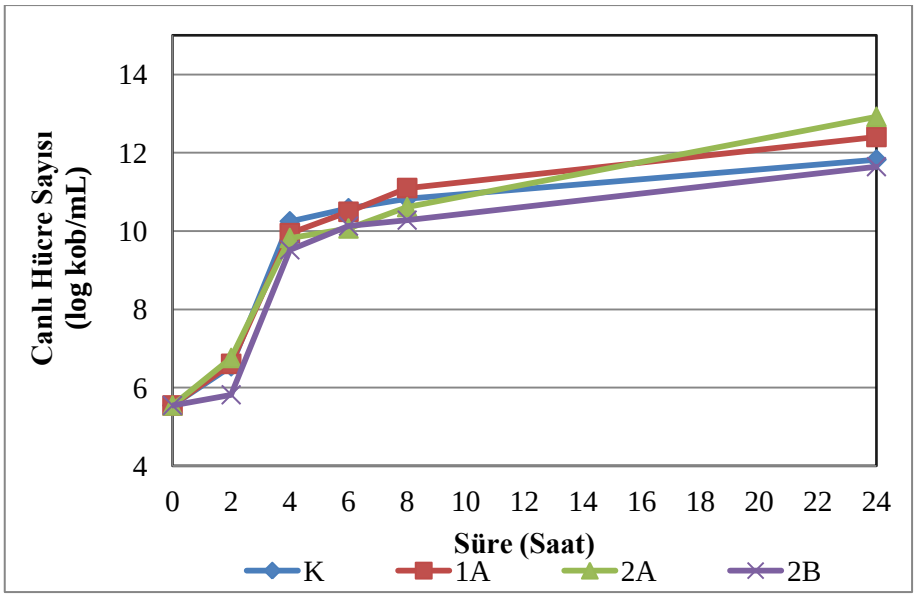


Şekil 4.10. *Bacillus cereus* 'a ait log kob/mL-absorbans değeri grafiği

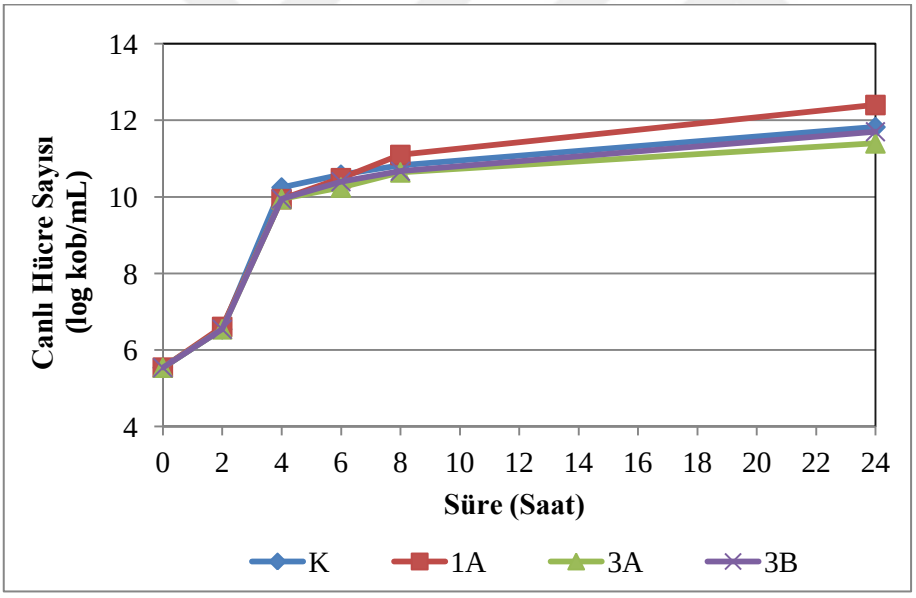


Şekil 4.11. *Stapylococcus aureus* 'a ait log kob/mL-absorbans değeri grafiği

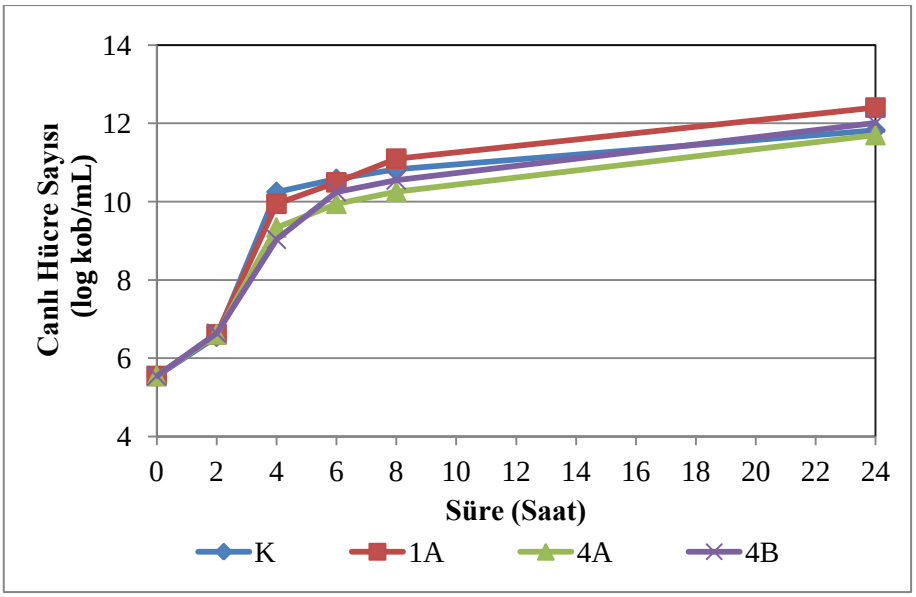
Literatürde çeşitli araştırmacılar sonuçlarını petri üzerinde canlı hücre sayımı yaparak yorumlarken, yaptığımız çalışmada absorbans değerinden canlı hücre sayımına geçildiği için filmlerin antimikrobiyal etkinliğinde literatürdeki bazı kaynaklara göre farklılık gözlenmiştir. Ayrıca literatür incelendiğinde boraks, bor nitrür, etil pirüvat ve limon esansiyel yağı içeren filmlerin canlı hücre sayım yöntemi ile antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi konusunda bir bulguya rastlanmamıştır. Filmlerin *E. coli* 'ye karşı canlı hücre sayımı yöntemi ile belirlenen antibakteriyel aktivitesi Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16. üzerinde gösterilmektedir.



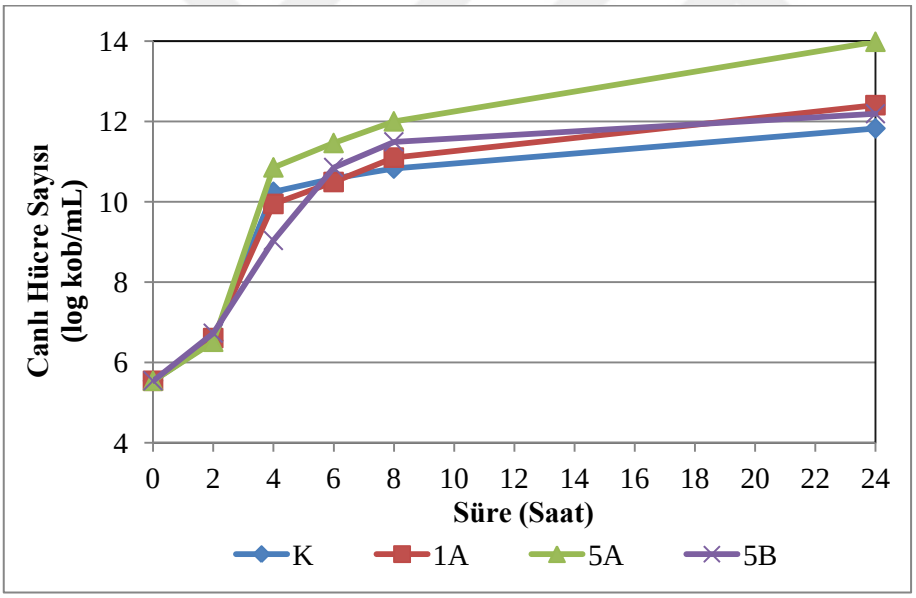
Şekil 4.12. Kitosan kontrol filmi ve Cloisite 30B (%1-%3) filmlerinin *E. coli* 'ye karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *E. coli*, 1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B



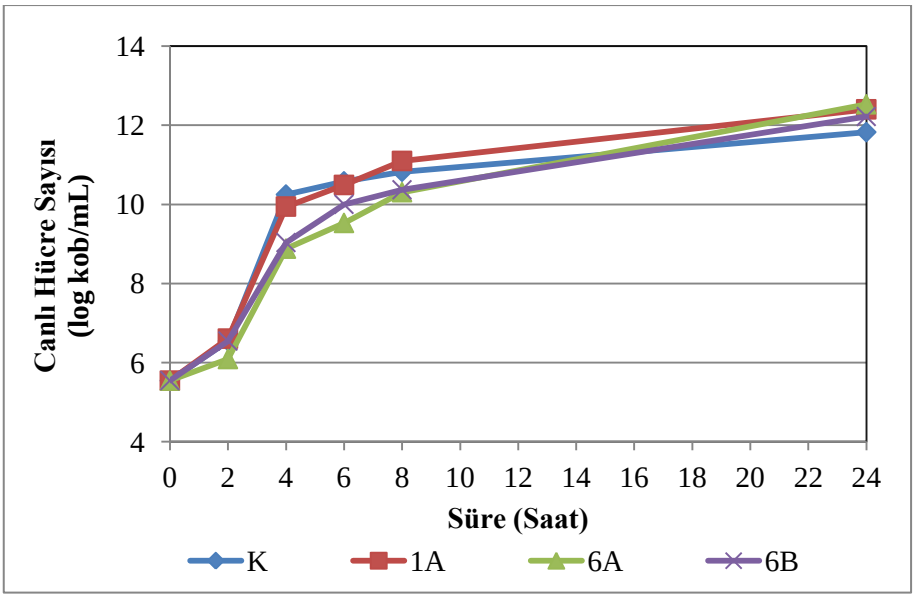
Şekil 4.13. Kitosan kontrol filmi ve Boraks (%1-%3) filmlerinin *E. coli* 'ye karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *E. coli*, 1A: Kitosan, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks



Şekil 4.14. Kitosan kontrol filmi ve Etil pirüvat (%1-%3) filmlerinin *E. coli* 'ye karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *E. coli*, 1A: Kitosan, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat



Şekil 4.15. Kitosan kontrol filmi ve Bor nitrür (%1-%3) filmlerinin *E. coli* 'ye karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *E. coli*, 1A: Kitosan, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür



Şekil 4.16. Kitosan kontrol filmi ve Limon esansiyel yağı (%1-%3) filmlerinin *E. coli* 'ye karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *E.coli*, 1A: Kitosan, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı

Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16.'de verilen grafikler incelendiğinde; control kitosan filmi içeren besiyeri ile sadece *E. coli* kültürünü içeren besiyerinde aynı düzeyde gelişim olduğu gözlenirken, %3 Cloisite 30B, %1 boraks, %3 boraks ve %1 etil pirüvat içeren film örneklerini içeren besiyerinde *E. coli* gelişiminin kontrol filmi içeren besiyerine göre daha az olduğu gözlenmiştir. Ayrıca *E. coli* gelişiminde 1 log (kob/mL) azalmaya neden olduğu için, %1 boraks içeren filmlerin *E. coli* 'ye karşı en yüksek antibakteriyel özellik gösterdiği belirlenmiştir.

Benhabiles ve ark. (2012), %0,1 kitosan ve %0,1 kitinin sıvı formunda besiyerine eklenmesi ile 4 saatlik inkübasyon sonunda *E. coli* ATCC-25922 gelişiminde optik yoğunluk değerini (OD) 0,122 azalttığı bildirmiştir. Yaptığımız çalışmada ise 4 saat sonunda kontrol suşunun optik yoğunluk değeri 0,210 iken, kontrol kitosan filmi ile bu değer 0,204'ye düşmüştür. Buna göre yaptığımız çalışmadaki kontrol kitosan filmin antibakteriyel etkisinin düşük olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeninin yaptığımız çalışmada kitosanın film formunda analiz edilmesinden dolayı, mikroorganizma üzerindeki etkisinin düştüğü düşünülmektedir.

Younes ve ark. (2014), 24 saat sonunda %61 deasetilasyon derecesine (DA) sahip kitosanın *E. coli* ATCC-25922 suşunun gelişiminde 24 saat sonunda 4,6 log azalmaya, %2 DA kitosanın ise 5,9 log azalmaya neden olduğu tespit etmiştir. Ayrıca kitosanın deasetilasyon derecesinin artmasının *E. coli* 'ye karşı olan antimikrobiyal etkisinin

azalmasına yol açtığını bildirmiştir. Buna göre yaptığımız çalışmada kullanılan kitosanın deasetilasyon derecesinin Younes ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmadakinden daha yüksek olması, kullandığımız kitosanın mikroorganizma gelişimi üzerinde daha az etkili olmasının nedenini açıklamaktadır.

Tsai ve ark. (2004), kitosan solüsyonunun (%4,5 w/v), canlı hücre sayım yöntemine göre *E. coli* CCRC 10674 suşunu tamamen inhibe ettiğini, kitosanın enzimatik yolla hidrolize edilmesi ile elde edilen kitooligosakkarit karışımının ise *E. coli* gelişiminde 0,85 log azalmaya neden olduğunu tespit etmiştir. Buna göre elde edilen sonuçlar ile yaptığımız çalışma arasında fark olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeninin çalışmalarda kullanılan kitosanın hammadde kaynağının farklı olması, Tsai ve ark. (2004) tarafından hazırlanan solüsyon içerisindeki kitosan miktarının yüksek olması ve kitosan solüsyonuna kurutma işleminin uygulanmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

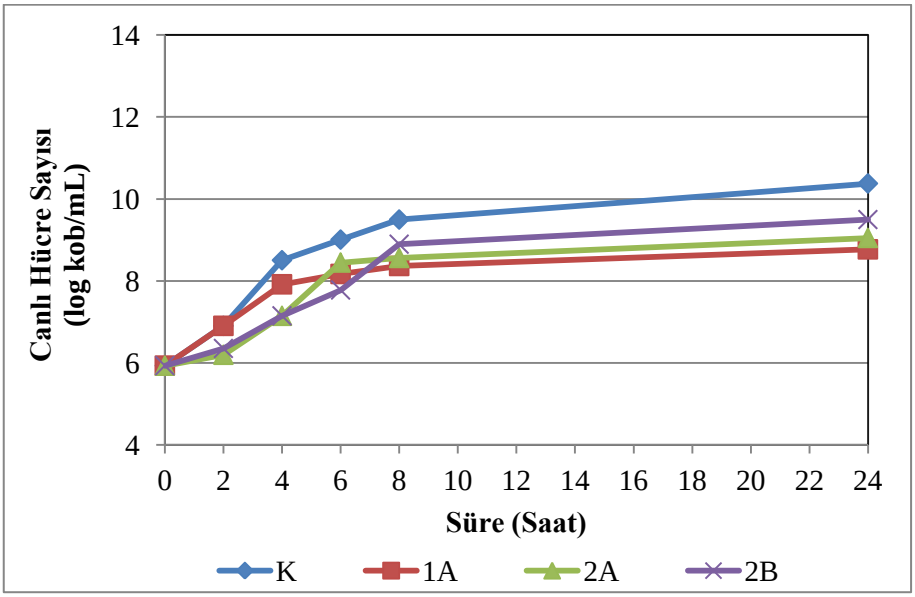
Rhim ve ark. (2010), canlı hücre sayım yöntemine gore kitosan ve Cloisite 30B içeren kitosan filmlerinin *E. coli* O157:H7 ATCC-11775 suşunun gelişiminde sırasıyla yaklaşık 3 log ve 3,5 log azalmaya neden olduğunu bildirmiştir. Yaptığımız çalışmada ise kontrol kitosan ve Cloisite 30B içeren kitosan filmlerinin antimikrobiyal etkisinin, Rhim ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmaya göre düşük olduğu belirlenmiştir. Bu farklılığın nedeninin Rhim ve ark. (2010) tarafından hazırlanan filmlerin %2 kitosan içermesi, petri üzerinde canlı hücre sayımı yapmalarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca Rhim ve ark. (2011), tarafından canlı hücre sayım yöntemi ile yapılan başka bir çalışmada, Cloisite 30B-agar filmlerinin *E. coli* O157:H7 ATCC-11775 suşuna karşı herhangi bir etki göstermediğini bildirmiştir.

Sothornvit ve ark. (2010), farklı oranda Cloisite 30B içeren peynir altı suyu proteini izolatlarından hazırladıkları filmlerin, *E. coli* O157:H7 ATCC-11775 suşuna karşı antimikrobiyal etkinliklerini canlı hücre sayım yöntemine göre belirlemiştir. Araştırmacılar, filmlerin ilave edildiği besiyerlerindeki canlı hücre sayısında ilk 6 saat boyunca artış gözlemlendiğini, 6 saat sonrasında ise canlı hücre sayısının sabit kaldığını bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada ise sadece *E. coli* O157:H7 içeren besiyerinde gelişim ile %3 Cloisite 30B içeren film eklenen beiyerindeki *E. coli* O157:H7 gelişimi karşılaştırıldığında %3 Cloisite 30B içeren film eklenen besiyerindeki canlı hücre sayısının 8 saatten sonra azaldığı belirlenmiştir. Bu açıdan, Sothornvit ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışma elde edilen sonuçlar ile yaptığımız çalışma sonuçları benzerlik göstermektedir.

Quintero ve ark. (2014), sellüloz asetat bütirat kontrol nanokompoziti ve %5 Cloisite 30B-trietil citrate-selüloz astetat bütirat nanokompozitlerinin koloni sayım yöntemine göre *E. coli* 0157:H7'ye karşı herhangi bir antimikrobiyal etkisinin olmadığını belirlemiştir. Bu nedenle, yaptığımız çalışmada ise %3 Cloisite 30B-kitosan filmlerinin *E. coli* 0157:H7 üzerindeki antimikrobiyal etki göstermesinin, polimer seçiminin farklı olmasından kaynaklandığını düşünülmektedir.

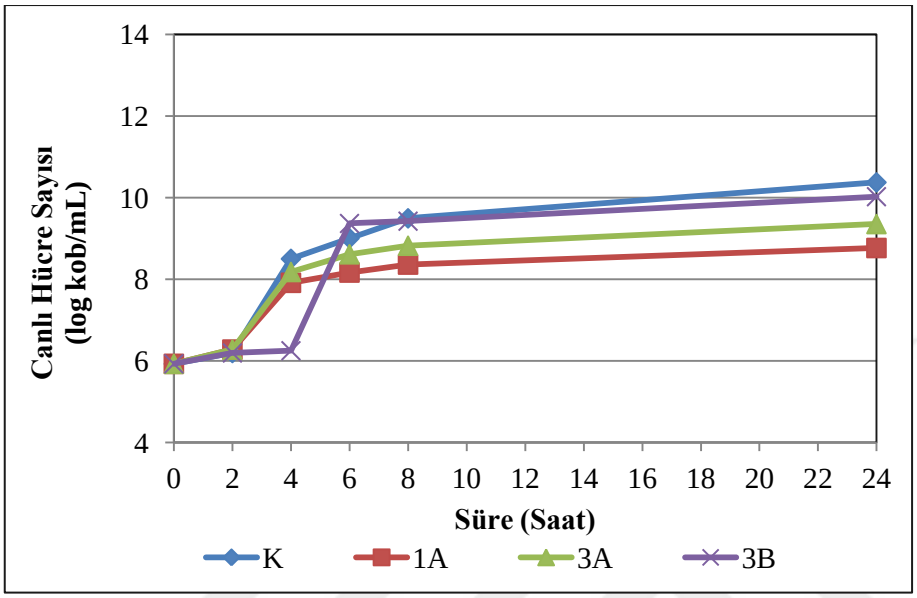
Shankar ve ark. (2018), kitosan ve kitosan-sülfür nanokompozitlerinin antimikrobiyal etkinliğini canlı hücre sayım yöntemi ile belirlemiştir. Kontrol kitosan nanokompozit filmlerin *E. coli* O157:H7 ATCC-43895 suşunun koloni sayısını inkübasyon sonunda yaklaşık 3,5 log (kob/mL) azalttığını bildirmişlerdir. Ayrıca sülfür içeren kitosan filmlerin, mikroorganizma gelişimini 6-12 saat içerisinde tamamen inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Shankar ve ark. (2018) tarafından hazırlanan kitosan film formülasyonundaki kitosanın oranının yüksek olmasının (4g/150mL) filmlerin antibakteriyel etkisinin daha yüksek olmasına neden olduğu düşünülmektedir.

Filmlerin *Salmonella* Typhimurium'a karşı canlı hücre sayım yöntemi ile belirlenen antibakteriyel aktivitesi Şekil 4.17., Şekil 4.18., Şekil 4.19., Şekil 4.20. ve Şekil 4.21. üzerinde gösterilmektedir.



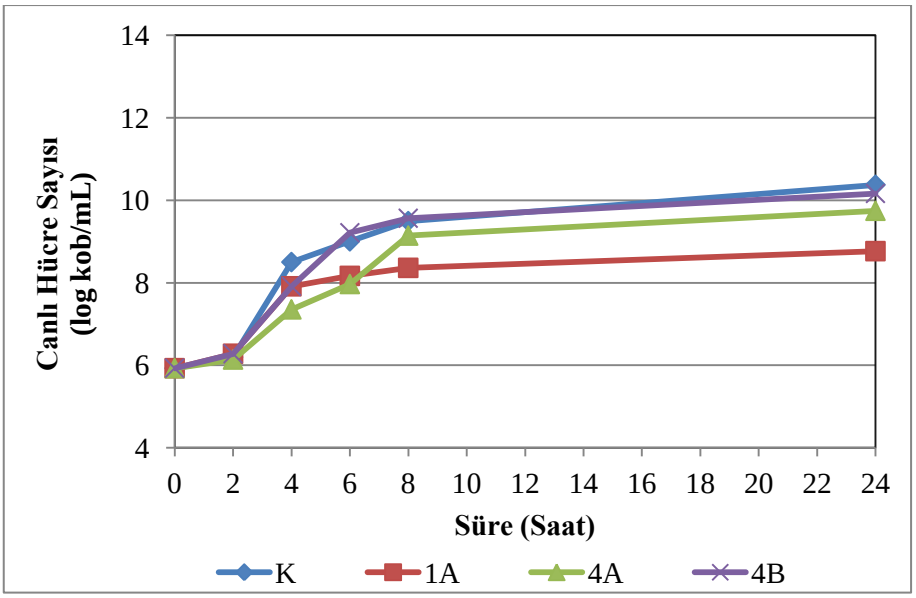
Şekil 4.17. Kitosan kontrol filmi ve Cloisite 30B (%1-%3) filmlerinin *Salmonella* Typhimurium 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *S.* Typhimurium,1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B

Şekil 4.17. incelendiğinde inkübasyonun 24. saatinde *Salmonella* Typhimurium gelişiminde kontrol (kitosan) filmi yaklaşık 1,5 log (kob/mL) azalmaya neden olurken, Cloisite 30B içeren kitosan filmlerin her iki konsantrasyonunun da yaklaşık 1 log (kob/mL) azalmaya yol açtığı belirlenmiştir.



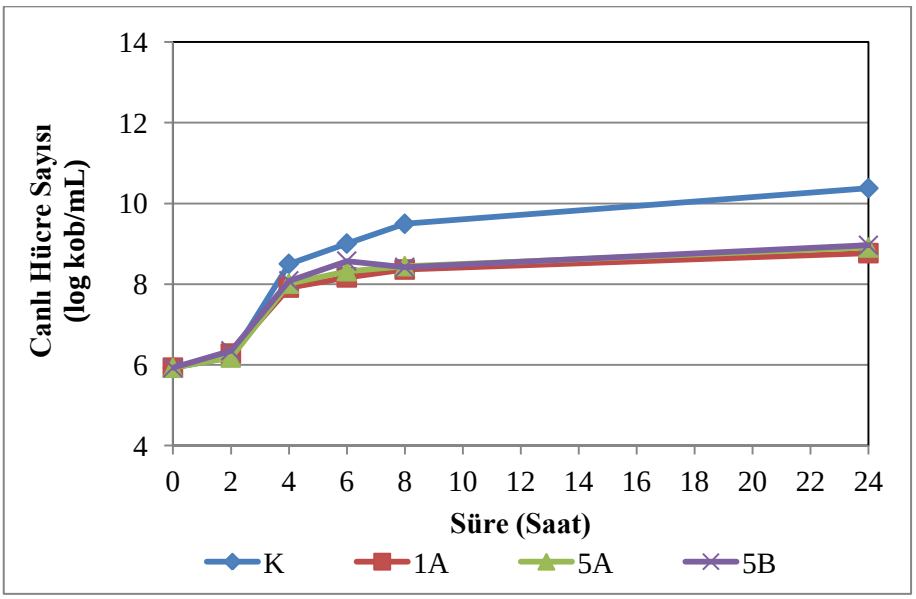
Şekil 4.18. Kitosan kontrol filmi ve Boraks (%1-%3) filmlerinin *Salmonella* Typhimurium 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *S.* Typhimurium, 1A: Kitosan, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks

Şekil 4.18. incelendiğinde inkübasyonun 24. saatinde kontrol filminin *Salmonella* Typhimurium gelişiminde yaklaşık 1,5 log (kob/mL) azalmaya neden olduğu, %1 boraks filminin 1 log ve %3 boraks filminin ise 0,2 log (kob/mL) azalmaya neden olduğu belirlenmiştir.



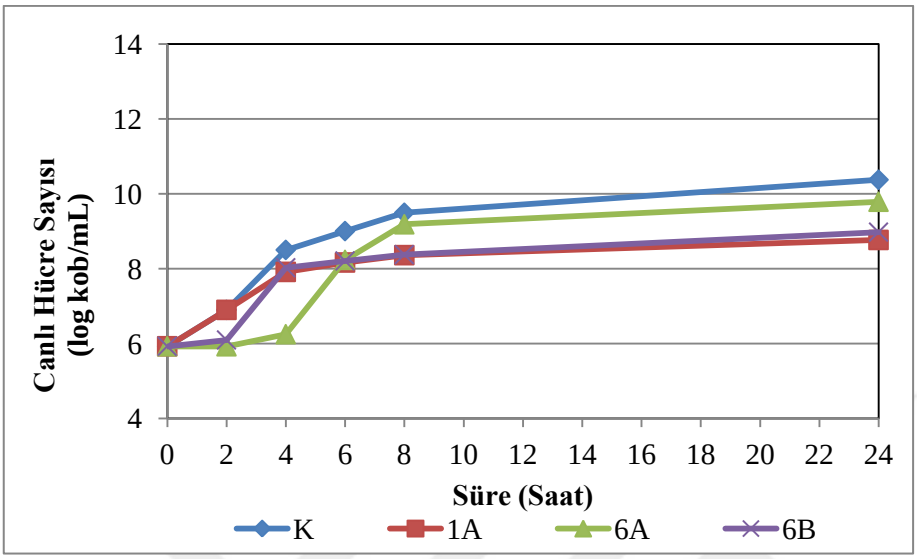
Şekil 4.19. Kitosan kontrol filmi ve Etil pirüvat (%1-%3) filmlerinin *Salmonella* Typhimurium 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *S.* Typhimurium, 1A: Kitosan, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat

Şekil 4.19. incelendiğinde inkübasyonun 24. saatinde %1 etil pirüvat filminin *Salmonella* Typhimurium gelişiminde 0,5 log (kob/mL) azalmaya yol açtığı, %3 etil pirüvat filminin ise mikroorganizma gelişiminde azalmaya yol açmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.20. Kitosan kontrol filmi ve Bor nitrür (%1-%3) filmlerinin *Salmonella* Typhimurium 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: *S.* Typhimurium, 1A: Kitosan, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür

Şekil 4.20. incelendiğinde inkübasyonun 24. saatinde %1 ve %3 bor nitrür içeren filmlerinin *Salmonella* Typhimurium gelişiminde yaklaşık 1,5 log (kob/mL) azalmaya yol açtığı belirlenmiştir.



Şekil 4.21. Kitosan kontrol filmi ve Limon esansiyel yağı (%1-%3) filmlerinin *Salmonella* Typhimurium 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: *S.* Typhimurium, 1A: Kitosan, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı

Şekil 4.21. incelendiğinde inkübasyonun 24. saatinde %1 limon esansiyel yağı içeren kitosan filminin *Salmonella* Typhimurium gelişiminde yaklaşık 0,5 log (kob/mL) azalmaya yol açtığı, %3 limon esansiyel yağı içeren filminin ise yaklaşık 1,5 log (kob/mL) azalmaya yol açtığı belirlenmiştir.

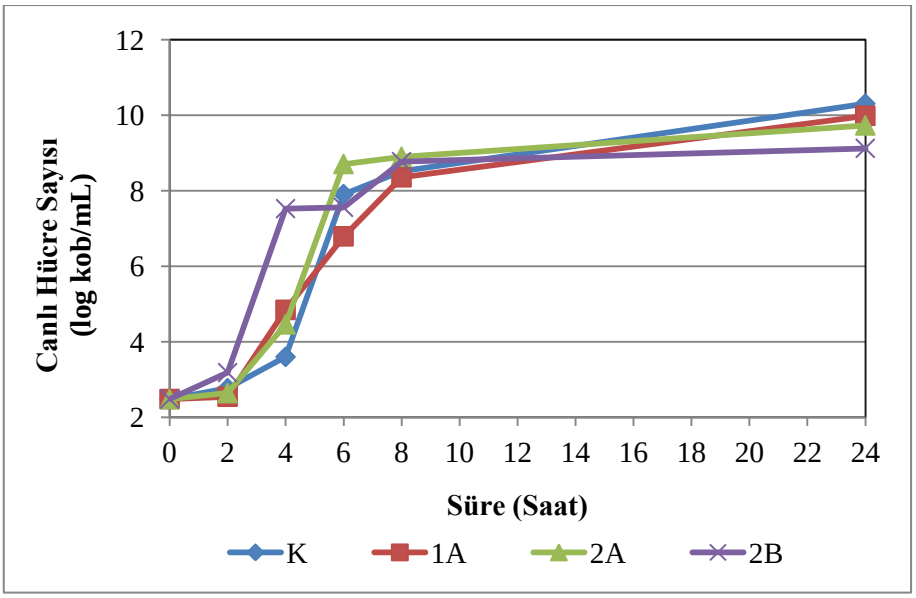
Benhabiles ve ark. (2012), %0,1 kitosan ve %0,1 kitinin *Salmonella* Typhimurium gelişimi üzerine herhangi bir etkisi olmadığını (OD değerleri kontrol suş ile aynı) bildirmiştir. Yaptığımız çalışmada ise film içermeyen sadece mikroorganizmayı içeren besiyerindeki OD değeri 0,315 iken, kitosan filmi içeren besiyerinde bu değer 0,22'ye düşmüştür. Benhabiles ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada kitosanın test edilen miktarının, yaptığımız çalışmaya göre düşük olmasından dolayı *Salmonella* Typhimurium'a karşı herhangi bir antimikrobiyal özellik belirlenmemesine neden olmuştur.

Younes ve ark. (2014), 24 saat sonunda %61 DA kitosanın *Salmonella* Typhimurium gelişiminde 24 saat sonunda 2,8 log azalmaya, %2 DA kitosanın ise 4,7 log azalmaya neden olduğu tespit etmiştir. Ayrıca kitosanın deasetilasyon derecesinin artmasının, *Salmonella* Typhimurium 'a karşı olan antimikrobiyal etkisinin azalmasına yol açtığını

bildirmiştir. Buna göre yaptığımız çalışmada kullanılan kitosanın deasetilasyon derecesinin Younes ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmadakinden daha yüksek olması, kullandığımız kitosanın mikroorganizma gelişimi üzerinde daha az etkili olmasına neden olabileceği ile açıklanmaktadır.

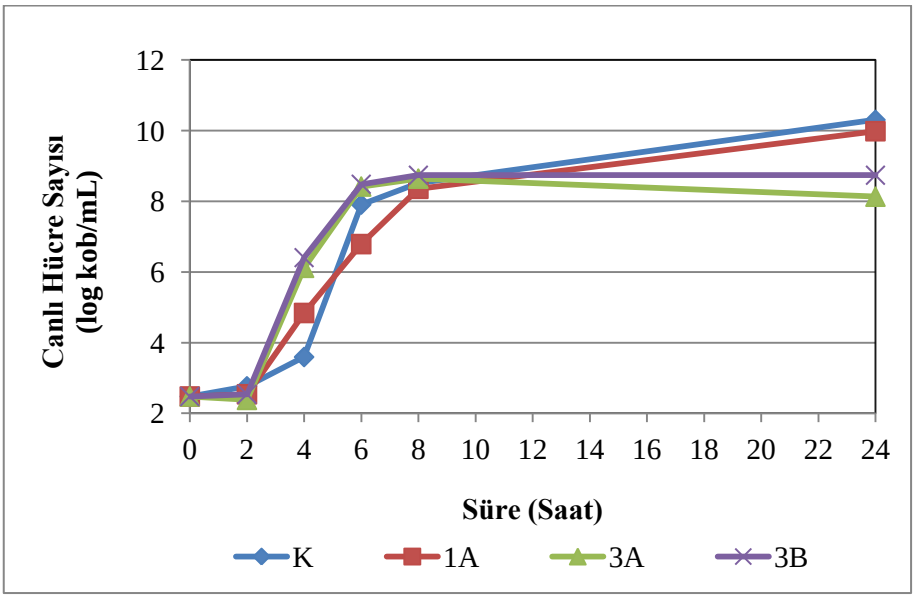
Rhim ve ark. (2006), Cloisite 30B içeren kitosan nanokompozit filmlerin antimikrobiyal etkinliğini canlı hücre sayım yöntemi ile test ettiklerinde, kontrol kitosan ve Cloisite 30B içeren kitosan filmlerin 8 saatlik inkübasyon sonunda *Salmonella* Typhimurium ATCC-14028 gelişiminde yaklaşık 3 log (kob/mL) azalmaya yol açtığını bildirmiştir. Yaptığımız çalışmada kullanılan filmlerin ise bu mikroorganizmanın gelişiminde kısmen daha az antibakteriyel etkisi olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeni Rhim ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada film formülasyonu içerisinde yer alan kitosan miktarının (%2 w/v) daha fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca Rhim ve ark. (2006)'nın çalışmada koloni sayım tekniği kullanmış olmalarının bizim çalışmamızda OD değerinden canlı hücre sayısına geçiş yapılıyor olmasının (zarar görmüş hücrelerin besiyerinde koloni oluşturamaması ancak metabolik olarak aktif olmaları ve OD de etkili olmaları dolayısıyla) da etkisi olduğu düşünülmektedir.

Filmlerin, *Bacillus cereus*'a karşı canlı hücre sayım yöntemi ile belirlenen antibakteriyel aktivitesi Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25 ve Şekil 4.26 üzerinde gösterilmektedir.



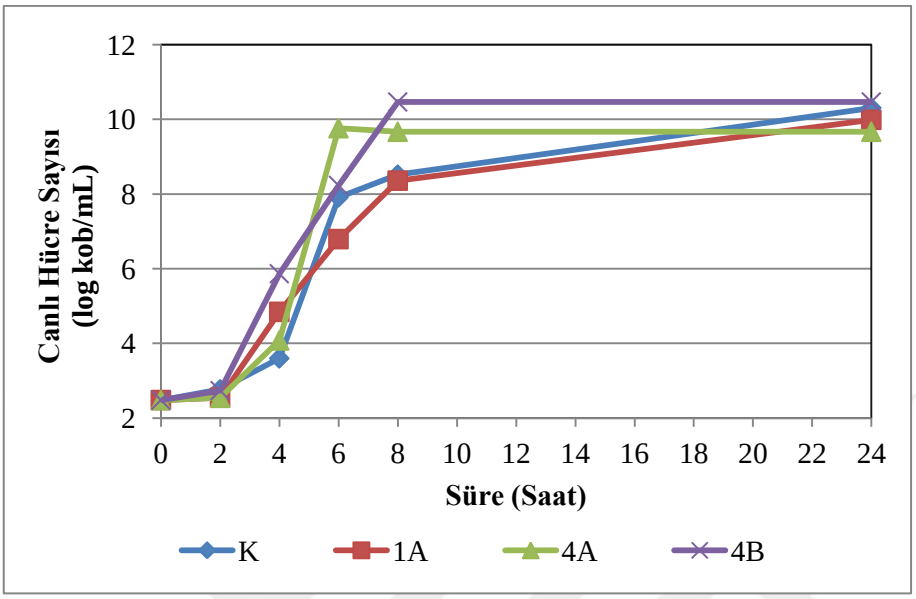
Şekil 4.22. Kitosan kontrol filmi ve Cloisite 30B (%1-%3) filmlerinin *Bacillus cereus* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *B. cereus*, 1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B

Şekil 4.22. incelendiğinde inkübasyonun 24. saatinde kontrol filminin *Bacillus cereus* gelişiminde yaklaşık 0,3 log (kob/mL) azalmaya neden olduğu gözlenirken, %1 Cloisite 30B içeren kitosan filminin 0,5 log (kob/mL), %3 Cloisite 30B içeren kitosan filmi 1,2 log (kob/mL) azalmaya yol açtığı belirlenmiştir.



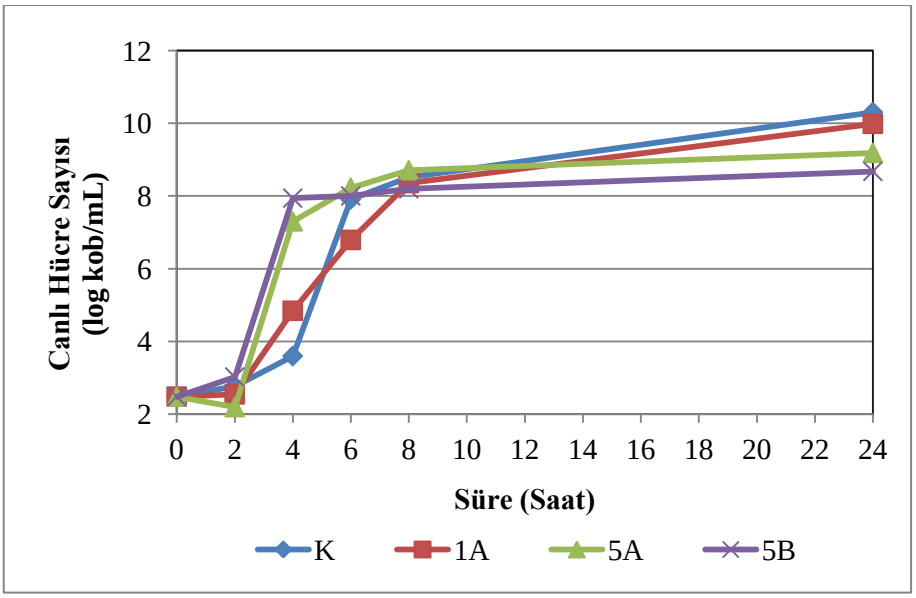
Şekil 4.23. Kitosan kontrol filmi ve Boraks (%1-%3) filmlerinin *Bacillus cereus* karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *B. cereus*, 1A: Kitosan, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks

Şekil 4.23. incelendiğinde inkübasyonun 24. saatinde %1 boraks içeren kitosan filminin *Bacillus cereus* gelişiminde 2,2 log (kob/mL) , %3 boraks içeren kitosan filmi 1,6 log (kob/mL) azalmaya yol açtığı belirlenmiştir.



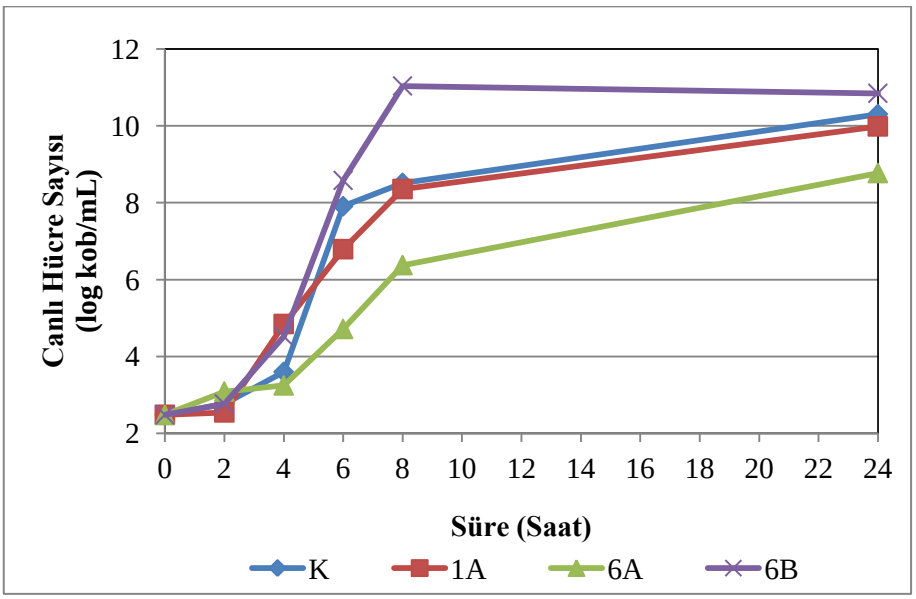
Şekil 4.24. Kitosan kontrol filmi ve Etil pirüvat (%1-%3) filmlerinin *Bacillus cereus* 'akarşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *B. cereus*, 1A: Kitosan, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat

Şekil 4.24. incelendiğinde inkübasyonun 24. saatinde %1 etil pirüvat içeren kitosan filminin *Bacillus cereus* gelişiminde bir azalmaya neden olmazken, %3 etil pirüvat içeren kitosan filminin 0,6 log (kob/mL) azalmaya neden olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.25. Kitosan kontrol filmi ve Bor nitrür (%1-%3) filmlerinin *Bacillus cereus* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *B. cereus*, 1A: Kitosan, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür

Şekil 4.25. incelendiğinde inkübasyonun 24. saatinde %1 bor nitrür içeren kitosan filminin *Bacillus cereus* gelişiminde 1,1 log (kob/mL), %3 bor nitrür içeren kitosan filminin ise 1,6 log (kob/mL) azalmaya yol açtığı belirlenmiştir.



Şekil 4.26. Kitosan kontrol filmi ve Limon esansiyel yağı (%1-%3) filmlerinin *Bacillus cereus 'a* karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *B. cereus*, 1A: Kitosan, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı

Şekil 4.26. incelendiğinde inkübasyonun 24. saatinde %1 limon esansiyel yağı içeren kitosan filmin *Bacillus cereu*s gelişiminde 1,5 log (kob/mL) azalmaya neden olduğu, %3 limon esansiyel yağı içeren kitosan filmin ise mikroorganizma gelişiminde herhangi bir etkiye neden olmadığı belirlenmiştir.

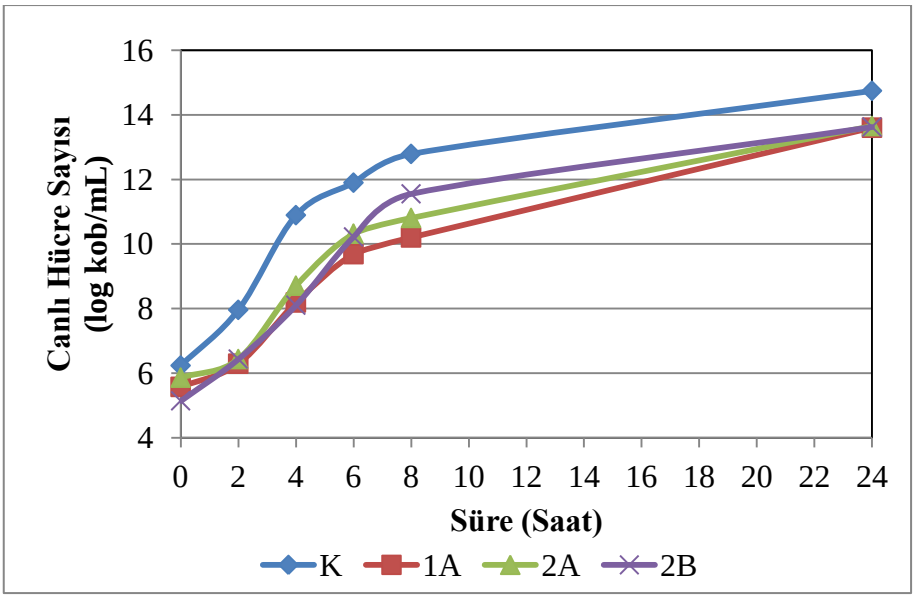
Tsai ve ark. (2004), selülazın hidrolizi ile elde edilen kitosan solüsyonunun (%4,5 w/v), canlı hücre sayım yöntemine göre *Bacillus cereus* CCRC 10603 suşunu tamamen inhibe ettiğini, kitosanın enzimatik yolla hidrolize edilmesi ile elde edilen kitooligosakkarit karışımının ise *B. cereus* gelişiminde 0,1 log azalmaya neden olduğunu tespit etmiştir. Buna göre elde ettiğimiz kitosan filmlerin antimikrobiyal etkinliği, kitosanoligosakkaritin antimikrobiyal etkinliği ile benzerlik göstermektedir.

Younes ve ark. (2014), 24 saat sonunda %61 DA kitosanın *Bacillus cereus* ATCC-11778 suşunun gelişiminde 24 saat sonunda 3,6 log azalmaya, %2 DA kitosanın ise 5,6 log azalmaya neden olduğu tespit etmiştir. Ayrıca kitosanın deasetilasyon derecesinin artmasının, *Bacillus cereus* suşuna karşı olan antimikrobiyal etkisinin azalmasına yol açtığını bildirmiştir. Buna göre yaptığımız çalışmada kullanılan kitosanın deasetilasyon derecesinin Younes ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmadakinden daha yüksek olması, kullandığımız kitosanın mikroorganizma gelişimi üzerinde daha az etkili olmasının nedenini açıklamaktadır.

Benhabiles ve ark. (2012), %0,1 kitosanın *Bacillus cereus* gelişiminde optik yoğunluk değerini (OD) 0,218 azalttığı, %0,1 kitinin ise OD değerini 0,077 azalttığını bildirmiştir. Yaptığımız çalışmada ise 24 saat sonunda kontrol suşunun optik yoğunluk değeri 0,463 iken, kontrol kitosan filmi ile bu değer 0,207'ye düşmüştür. Bundan dolayı yapılan her iki çalışmada birbirini desteklemektedir.

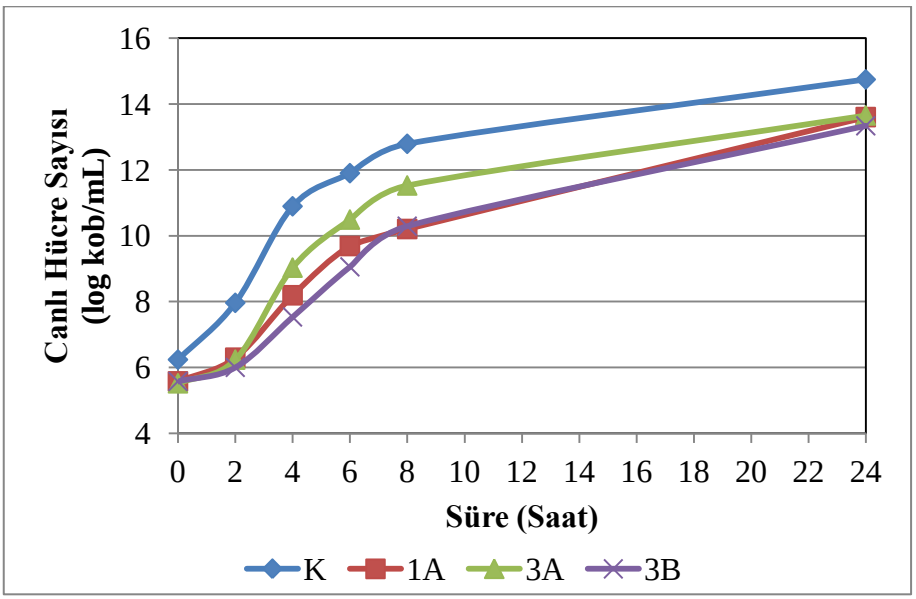
Kanatt ve ark. (2012), %1 kitosan ve %5 polivinil alkol içeren filmlerin canlı hücre sayım yöntemine göre *Bacillus cereus* MTCC-470 suşunun gelişimini yaklaşık 2 log (kob/mL) azalttığını bildirmiştir. Yaptığımız çalışmada ise mikroorganizma gelişiminde daha düşük bir azalma olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeninin çalışmalarda kullanılan polimer katkılarının farklı olması ve Kanatt ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada petri üzerinde canlı hücre sayımı yapmış olamalarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Filmlerin *Stapylococcus aureus* 'a karşı canlı hücre sayım yöntemi ile belirlenen antibakteriyel aktivitesi Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29, Şekil 4.30 ve Şekil 4.31 üzerinde gösterilmektedir.



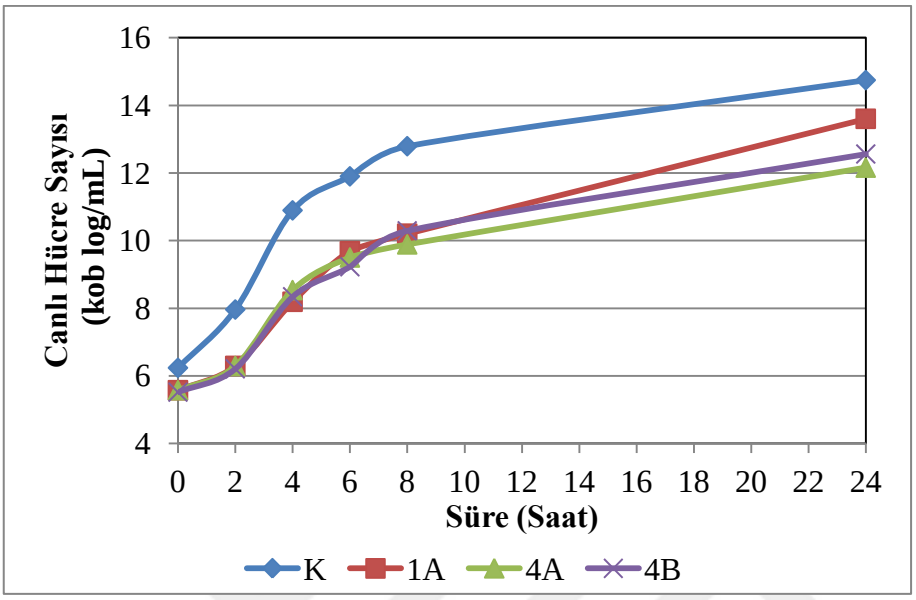
Şekil 4.27. Kitosan kontrol filmi ve Cloisite 30B (%1-%3) filmlerinin *Stapylococcus aureus* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *S. aureus*, 1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B

Şekil 4.27. incelendiğinde inkübasyonun 24. saatinde kontrol filmi, %1 ve %3 Cloisite 30B içeren kitosan filmlerinin *Stapylococcus aureus* gelişiminde yaklaşık 1,1 log (kob/mL) azalmaya yol açtığı belirlenmiştir.



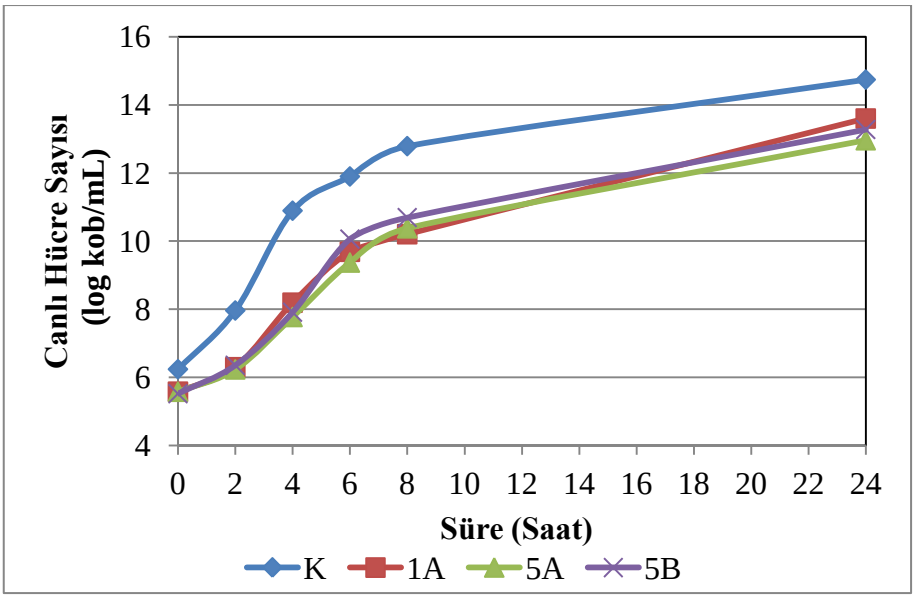
Şekil 4.28. Kitosan kontrol filmi ve Boraks (%1-%3) filmlerinin *Stapylococcus aureus* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *S. aureus*, 1A: Kitosan, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks

Şekil 4.28. incelendiğinde inkübasyonun 24. Saatinde %1 boraks içeren kitosan filminin *Stapylococcus aureus* gelişiminde 1,1 log (kob/mL) , %3 boraks içeren kitosan filminin 1,4 log (kob/mL) azalmaya yol açtığı belirlenmiştir.



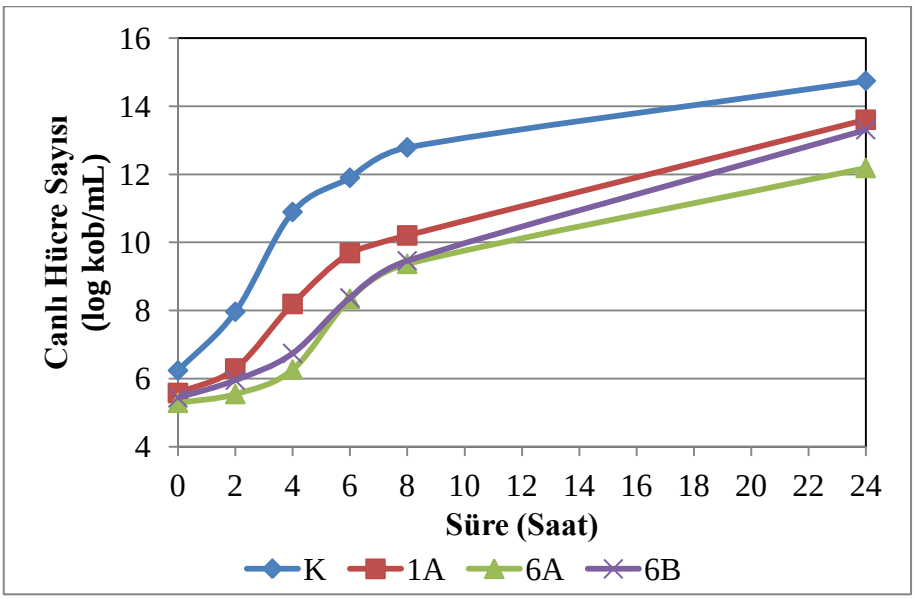
Şekil 4.29. Kitosan kontrol filmi ve Etil pirüvat (%1-%3) filmlerinin *Stapylococcus aureus* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *S. aureus*, 1A: Kitosan, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat

Şekil 4.29. incelendiğinde inkübasyonun 24. saatinde %1 etil pirüvat içeren kitosan filminin *Stapylococcus aureus* gelişiminde 2,5 log (kob/mL), %3 etil pirüvat içeren kitosan filminin 2,2 log (kob/mL) azalmaya yol açtığı belirlenmiştir.



Şekil 4.30. Kitosan kontrol filmi ve Bor nitrür (%1-%3) filmlerinin *Stapylococcus aureus* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *S. aureus*, 1A: Kitosan, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür

Şekil 4.30. incelendiğinde inkübasyonun 24. saatinde %1 bor nitrür içeren kitosan filminin *Stapylococcus aureus* gelişiminde 1,8 log (kob/mL), %3 bor nitrür içeren kitosan filminin 1,5 log (kob/mL) azalmaya yol açtığı belirlenmiştir.



Şekil 4.31. Kitosan kontrol filmi ve Limon esansiyel yağı (%1-%3) filmlerinin *Stapylococcus aureus* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *S. aureus*, 1A: Kitosan, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı

Şekil 4.28. incelendiğinde inkübasyonun 24. saatinde %1 limon esansiyel yağı içeren kitosan filminin *Stapylococcus aureus* gelişiminde 2,5 log (kob/mL), %3 limon esansiyel yağı içeren kitosan filminin 1,4 log (kob/mL) azalmaya yol açtığı belirlenmiştir.

Tsai ve ark. (2004), selülazın hidrolizi ile elde edilen kitosan solüsyonunun (%4,5 w/v), canlı hücre sayım yöntemine göre *S. aureus* CCRC-12652 suşunu tamamen inhibe ettiğini, kitosanın enzimatik yolla hidrolize edilmesi ile elde edilen kitooligosakkarit karışımının ise *S. aureus* gelişiminde 4,22 log azalmaya neden olduğunu tespit etmiştir. Buna göre elde edilen sonuçlar ile yaptığımız çalışma karşılaştırıldığında kitosan kontrol filminin, kitosan solüsyonundan daha düşük antimikrobiyal özellik gösterdiği belirlenmiştir. Bunun nedeninin çalışmalarda kullanılan kitosanın hammadde kaynağının farklı olması ve Tsai ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmada petri üzerinde canlı hücre sayımı yapılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Younes ve ark. (2014), 24 saat sonunda %61 DA derecesine sahip kitosanın *Stapylococcus aureus* ATCC-25923 suşunun gelişiminde 24 saat sonunda 3,0 log azalmaya, %2 DA kitosanın ise 5,2 log azalmaya neden olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca kitosanın deasetilasyon derecesinin artmasının, *Stapylococcus aureus* 'a karşı olan antimikrobiyal etkisinin azalmasına yol açtığını bildirmiştir. Buna göre yaptığımız çalışmada kullanılan kitosanın deasetilasyon derecesinin Younes ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmadakinden daha yüksek olması, kullandığımız kitosanın mikroorganizma gelişimi üzerinde daha az etkili olmasına neden olduğu düşünülmektedir.

Benhabiles ve ark. (2012), %0,1 kitin ve %0,1 kitosanın 4 saatlik inkübasyon sonunda *Stapylococcus aureus* ATCC-25923 gelişiminde optik yoğunluk değerini (OD) 0,15 azalttığını bildirmiştir. Yaptığımız çalışmada ise 4 saatlik inkübasyon sonunda optik yoğunluk değeri 0,236 iken, kontrol kitosan filmi ile bu değer 0,118 OD değerine düşmüştür. Buna göre literatürdeki bu çalışma, yaptığımız çalışmayı desteklemektedir.

Rhim ve ark. (2006), canlı hücre sayım yöntemine göre kitosan ve Cloisite 30B içeren kitosan filmlerinin inkübasyonun ikinci saatinde, *Stapylococcus aureus* ATCC-14458 suşunun gelişiminde sırasıyla yaklaşık 0,5 log ve 2 log azalmaya neden olduğunu bildirmiştir. Rhim ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada, yaptığımız çalışma ile farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bunun nedeni çalışmalarda kullanılan kitosanın niteliğinin farklılığı ve test edilen suşun farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Quintero ve ark. (2014), sellüloz asetat bütirat nanokompoziti ve %5 Cloisite 30B-trietil citrate-selüloz astetat bütirat nanokompozitlerinin koloni sayım yöntemine göre *S. aureus* 'a karşı herhangi bir antimikrobiyal etkisinin olmadığını belirlemiştir. Yaptığımız

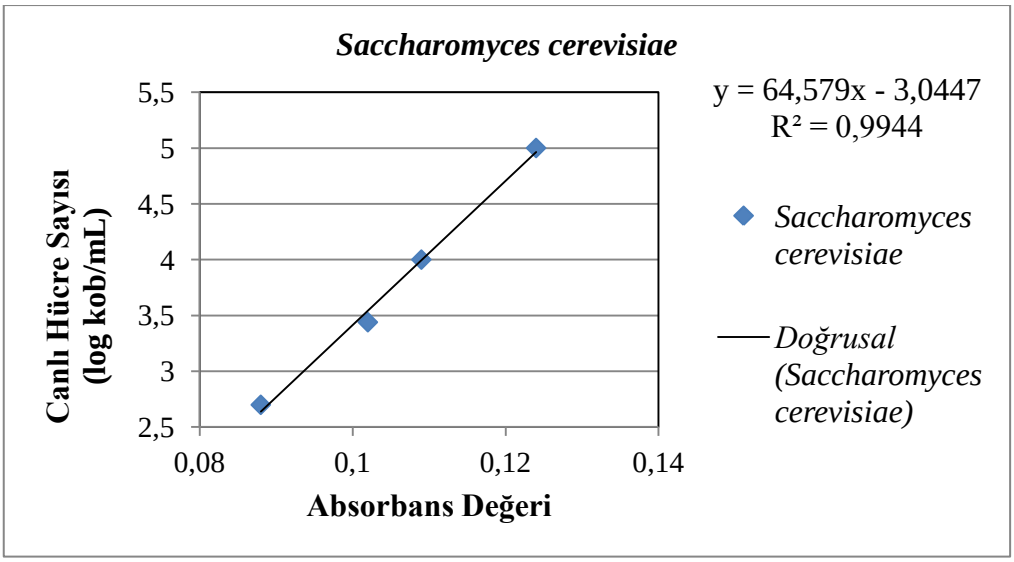
çalışmada ise %3 Cloisite 30B içeren filmlerin antibakteriyel etkisinin varlığı belirlenmiştir. Buna göre polimer seçiminin, antibakteriyel aktiviteyi etkilediği düşünülmektedir.

Kanatt ve ark. (2012), %1 kitosan ve %5 polivinil alkol içeren filmlerin canlı hücre sayım yöntemine göre *Stapylococcus aureus* ATCC-6538P gelişimini yaklaşık 2 log azalttığını bildirmiştir. Yaptığımız çalışmada ise daha düşük antibakteriyel etki olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeninin çalışmalarda kullanılan polimer katkılarının farklı olması ve Kanatt ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada petri üzerinde canlı hücre sayımı yapmış olamalarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

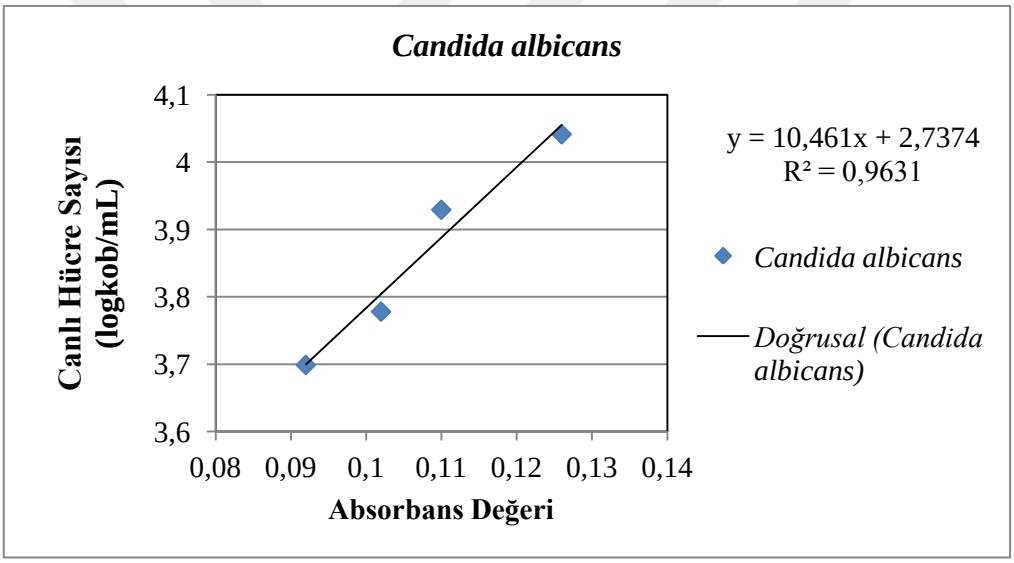
Cencetti ve ark. (2012), tarafından yapılan bir çalışmada canlı hücre sayım yöntemine göre boraks içeren polivinil alkol malzemenin *Staphylococcus aureus* ATCC-6538P ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853 suşlarına karşı herhangi bir antimikrobiyal özellik göstermediği bildirilmiştir. Yaptığımız çalışmada ise boraks içeren filmlerin *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel etkisi olduğu belirlenmiştir. Çalışmalarda elde edilen sonuçların farklılığının test edilen suş ve polimer matriksi farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4.4.2.4. Filmlerin Antifungal Etkisinin Canlı Hücre Sayım Testi ile Belirlenmesi

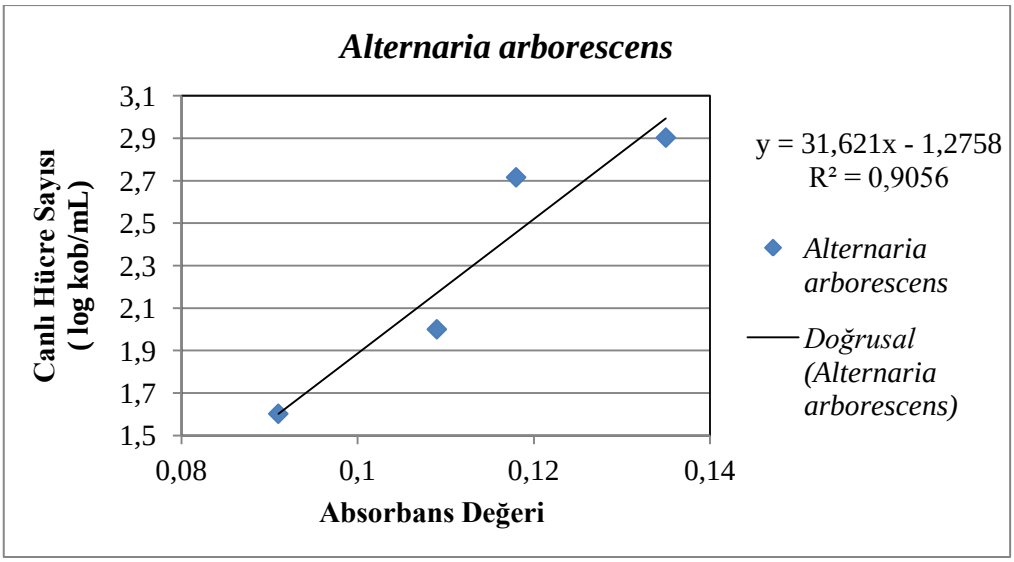
Küf kültürleri için PDB besiyerinde 25 °C'de 7 gün, maya kültürleri için SDB besiyerinde 30 °C de 2 gün inkübe edilen mikroorganizmalar için çeşitli konsantrasyon da hazırlanan hücre süspansiyonları spektrofotometrik ölçümü ve yine aynı konsantrasyonlarda canlı hücre sayımı yapılarak log kob/mL-absorbans değeri standart eğrisi çizilmiştir. Grafikler Şekil 4.32., Şekil 4.33., Şekil 4.34. ve Şekil 4.35. üzerinde gösterilmiştir.



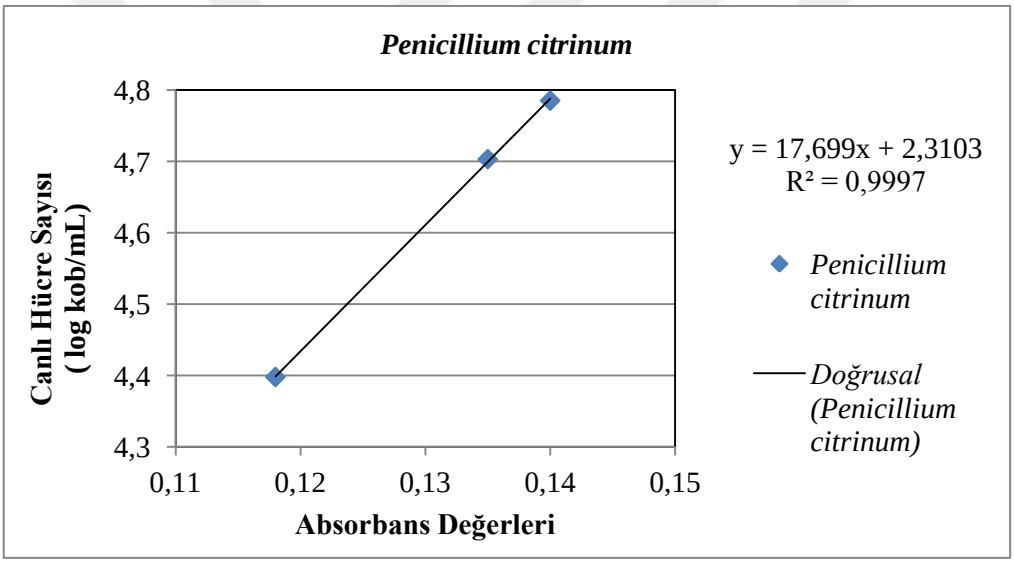
Şekil 4.32. *Saccharomyces cerevisiae* 'ya ait log kob/mL-absorbans değeri grafiği



Şekil 4.33. *Candida albicans* 'a ait log kob/mL-absorbans değeri grafiği

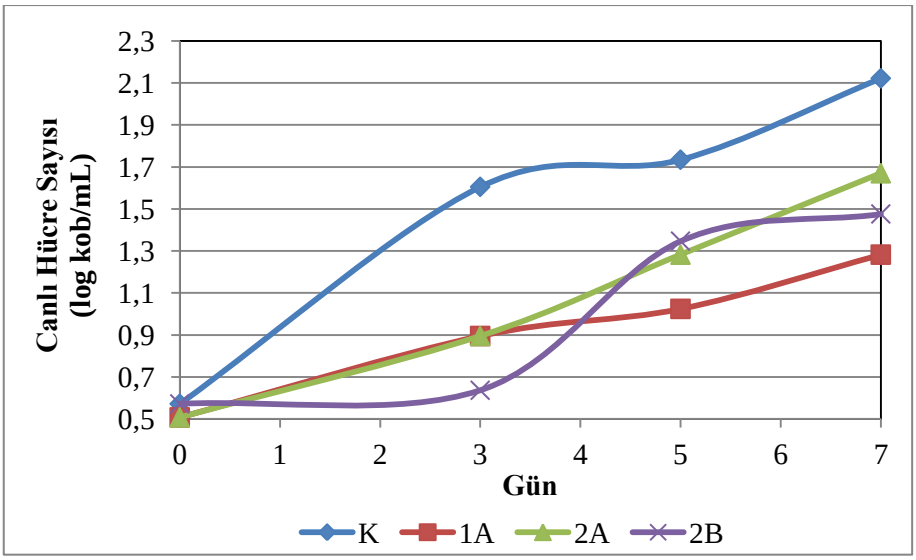


Şekil 4.34. *Alternaria arborescens* 'e ait log kob/mL-absorbans değeri grafiği



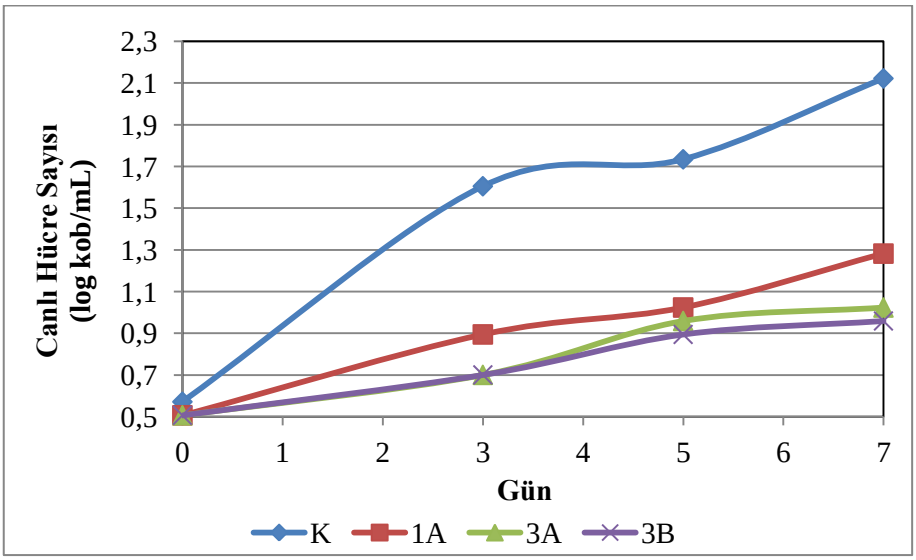
Şekil 4.35. *Penicillium citrinum* 'a ait log kob/mL-absorbans değeri grafiği

Literatürde çeşitli araştırmacılar sonuçlarını petri üzerinde canlı hücre sayımı yaparak yorumlarken, yaptığımız çalışmada absorbans değerinden canlı hücre sayımına geçildiği için filmlerin antimikrobiyal etkinliğinde literatürdeki diğer kaynaklara göre farklılık gözlenmiştir. Ayrıca literatür incelendiğinde Cloisite 30B, boraks, etil pirüvat, bor nitrür ve limon esansiyel yağı içeren filmlerin canlı hücre sayım yöntemi ile belirlenen antifungal aktivitesine ait bir bulguya rastlanmamıştır. Filmlerin *Saccharomyces cerevisiae*'ya karşı canlı hücre sayım yöntemi ile belirlenen antifungal aktivitesi Şekil 4.36, Şekil 4.37, Şekil 4.38, Şekil 4.39. ve Şekil 4.40. üzerinde gösterilmektedir.



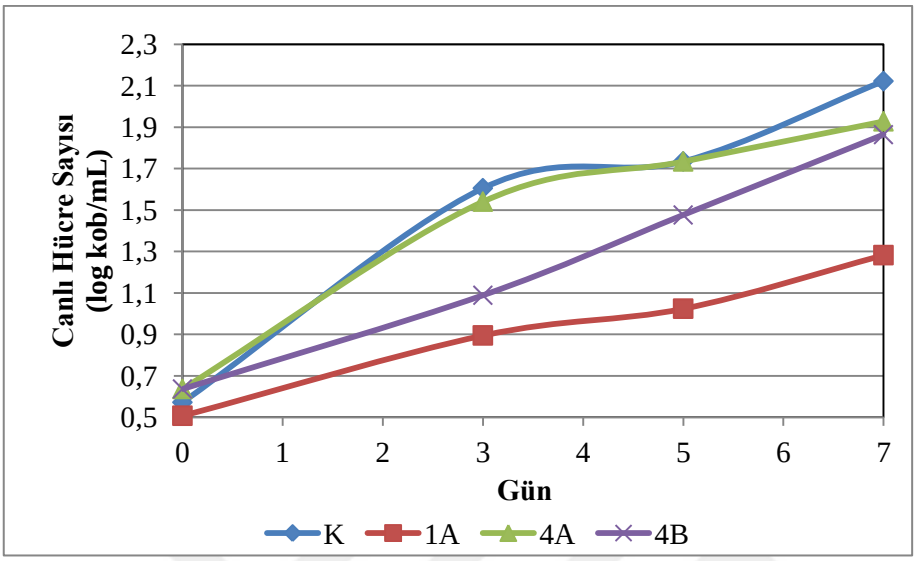
Şekil 4.36. Kitosan kontrol filmi ve Cloisite 30B (%1-%3) filmlerinin *Saccharomyces cerevisiae* 'ya karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *S. cerevisiae*, 1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B

Şekil 4.36. incelendiğinde inkübasyonun üçüncü gününde kontrol film ve %1 Cloisite 30B filminin *Saccharomyces cerevisiae* gelişiminde yaklaşık 0,8 log (kob/mL) azalmaya neden olurken, %3 Cloisite 30B içeren kitosan film yaklaşık 1 log (kob/mL) azalmaya neden olmuştur. İnkübasyonun yedinci gününde ise kontrol filmi 0,8 log, %1 Cloisite 30B filmi 0,5 log, %3 Cloisite 30B filmi ise 0,6 log (kob/mL) azalmaya neden olmuştur.



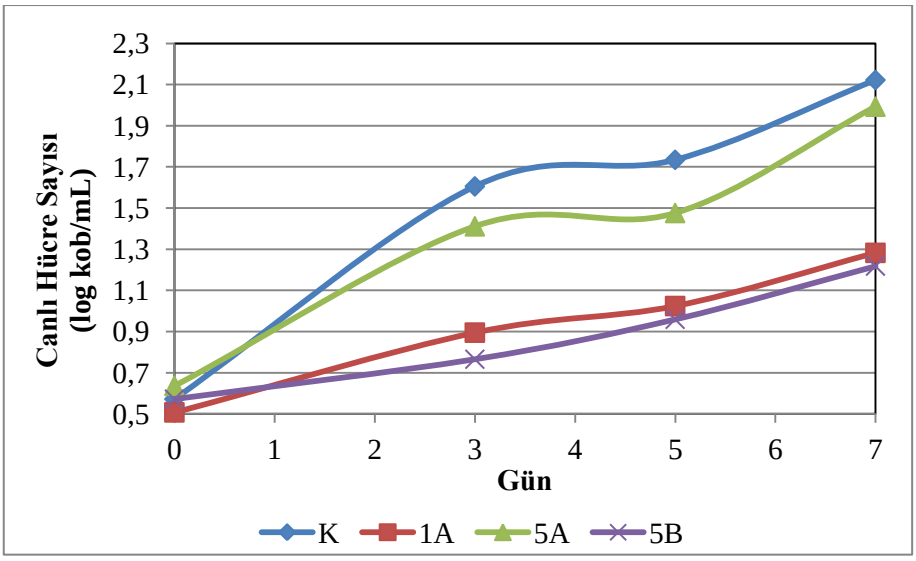
Şekil 4.37. Kitosan kontrol filmi ve Boraks (%1-%3) filmlerinin *Saccharomyces cerevisiae* 'ya karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *S. cerevisiae*, 1A: Kitosan, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks

Şekil 4.37. incelendiğinde inkübasyonun yedinci gününde %1 boraks içeren filmin *Saccharomyces cerevisiae* gelişiminde yaklaşık 1,1 log (kob/mL), %3 boraks içeren film yaklaşık 1,2 log (kob/mL) azalmaya neden olduğu belirlenmiştir.



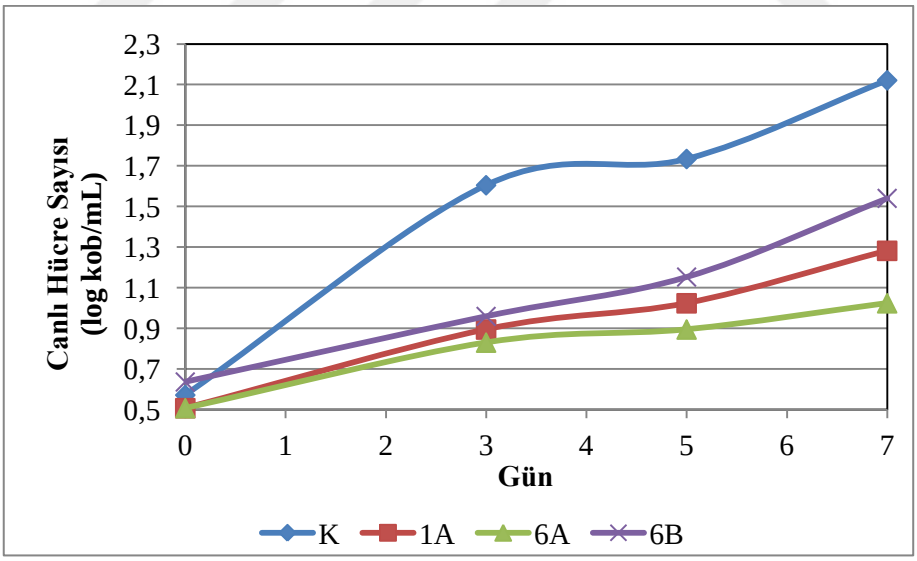
Şekil 4.38. Kitosan kontrol filmi ve Etil pirüvat (%1-%3) filmlerinin *Saccharomyces cerevisiae* 'ya karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *S. cerevisiae*, 1A: Kitosan, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat

Şekil 4.38. incelendiğinde inkübasyonun yedinci günü %1 etil pirüvat filminin *Saccharomyces cerevisiae* gelişiminde herhangi bir azaltıcı etkisi olmadığı gözlemlenirken, %3 etil pirüvat içeren filmin mikroorganizma gelişimini yaklaşık 0,3 log (kob/mL) azalttığı belirlenmiştir.



Şekil 4.39. Kitosan kontrol filmi ve Bor nitrür (%1-%3) filmlerinin *Saccharomyces cerevisiae* 'ya karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *S. cerevisiae*, 1A: Kitosan, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür

Şekil 4.39. incelendiğinde inkübasyonun yedinci gününde %1 bor nitrür filminin *Saccharomyces cerevisiae* gelişimini yaklaşık 0,1 log (kob/mL), %3 bor nitrür filmi ise yaklaşık 0,9 log (kob/mL) azalttığı belirlenmiştir.



Şekil 4.40. Kitosan kontrol filmi ve Limon esansiyel yağı (%1-%3) filmlerinin *Saccharomyces cerevisiae* 'ya karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *S. cerevisiae*, 1A: Kitosan, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı

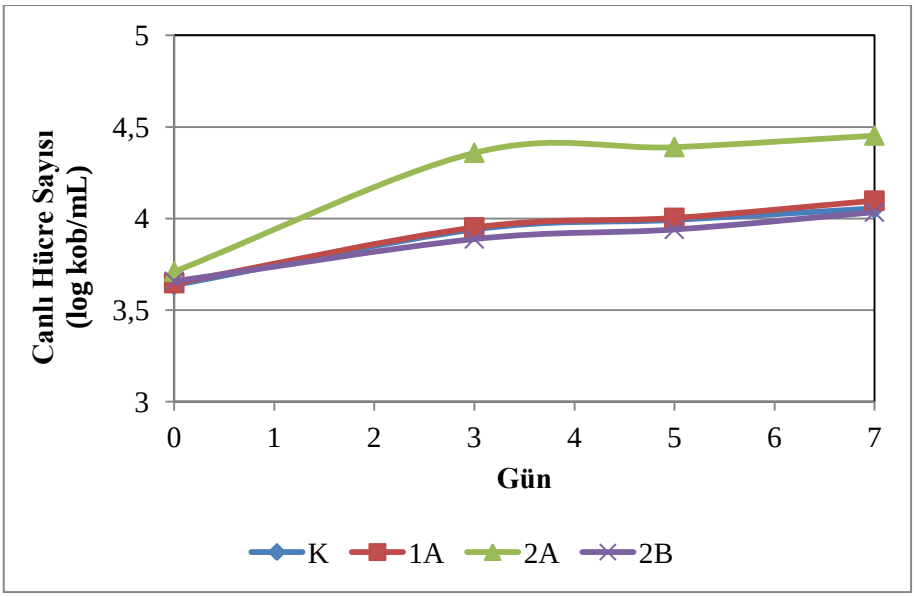
Şekil 4.40. incelendiğinde inkübasyonun yedinci gününde %1 limon esansiyel yağı içeren kitosan filmi *Saccharomyces cerevisiae* gelişimini yaklaşık 1,1 log (kob/mL), %3 limon esansiyel yağı içeren filmin ise yaklaşık 0,6 log (kob/mL) azalttığı belirlenmiştir.

Tsai ve ark. (2004), selülazın hidrolizi ile elde edilen kitosan solüsyonunun (%4,5 w/v), *Saccharomyces cerevisiae* CCRC-21671 ve 21687 suşlarını canlı hücre sayım yöntemine göre tamamen inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Kitosanın enzimatik yolla hidrolize edilmesi ile elde edilen kitooligosakkarit karışımının ise CCRC-21671 suşunun gelişimini engellemediği ancak CCRC-21687 suşunun gelişimini 0,5 log azalttığını tespit etmişlerdir. Buna göre yaptığımız çalışmada elde edilen sonuçlar ile olan farklılığın, çalışmalarda kullanılan kitosanın hammadde kaynağının farklı olması, Tsai ve ark. (2004) tarafından hazırlanan solüsyon içerisindeki kitosan miktarının yüksek olması ve antimikrobiyal analizin solüsyon üzerinden yapılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Quintero v ark. (2014), %5 Cloisite 30B içeren trimetil sitrat-selüloz asetat bütirat nanokompozitlerinin *S. cerevisiae* T73-CECT suşunun gelişiminde 1 log (kob/mL) azalmaya neden olduğunu belirlemiştir. Buna göre Quintero ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışma, yaptığımız çalışma ile benzerlik göstermektedir.

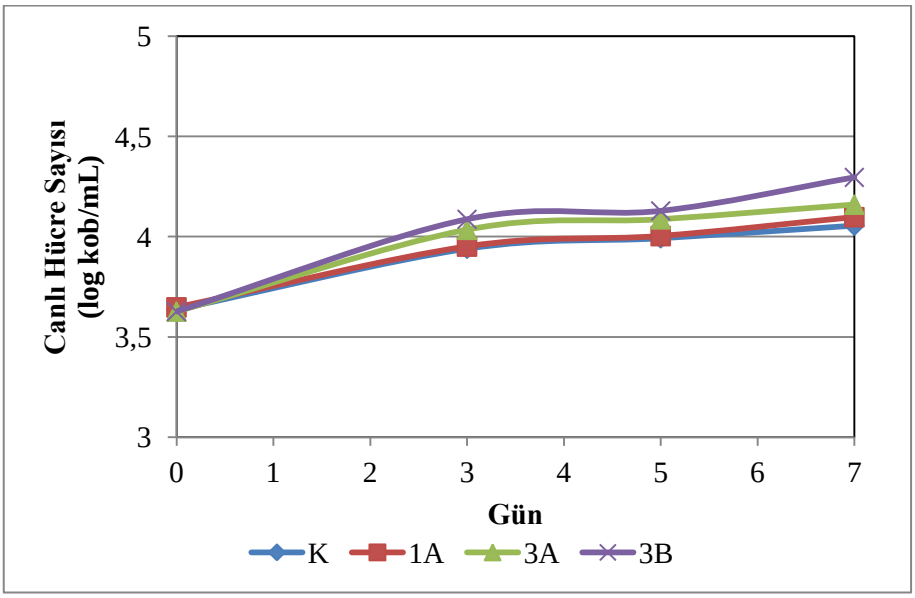
Roller ve Covill (1999), 0,1 g/L kitosan glutamatın elma sularına ilave edilmesinin *S. cerevisiae* gelişimini 10 gün içerisinde tamamen inhibe ettiğini, 0,4 g/L kitosan glutamatın ise *S. cerevisiae* gelişimini 3 gün geciktirdiğini bildirmiştir.

Filmlerin *Candida albicans*'a karşı canlı hücre sayım yöntemi ile belirlenen antifungal aktivitesi Şekil 4.41, Şekil 4.42, Şekil 4.43, Şekil 4.44 ve Şekil 4.45 üzerinde gösterilmektedir.



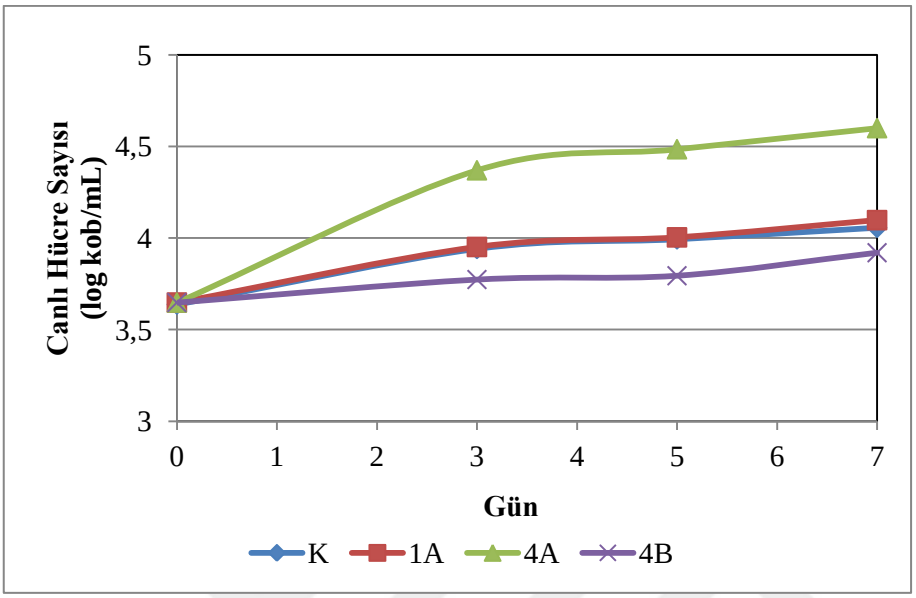
Şekil 4.41. Kitosan kontrol filmi ve Cloisite 30B (%1-%3) filmlerinin *Candida albicans* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *C. albicans*, 1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B

Şekil 4.41. incelendiğinde inkübasyonun yedinci günü *Candida albicans* gelişiminin kontrol mikroorganizma, kontrol kitosan film ve %3 etil pirüvat içeren film ile aynı düzeyde olduğu belirlenmiştir. %1 etil pirüvat içeren filmin ise mikroorganizma gelişimini teşvik ettiği gözlenmiştir.



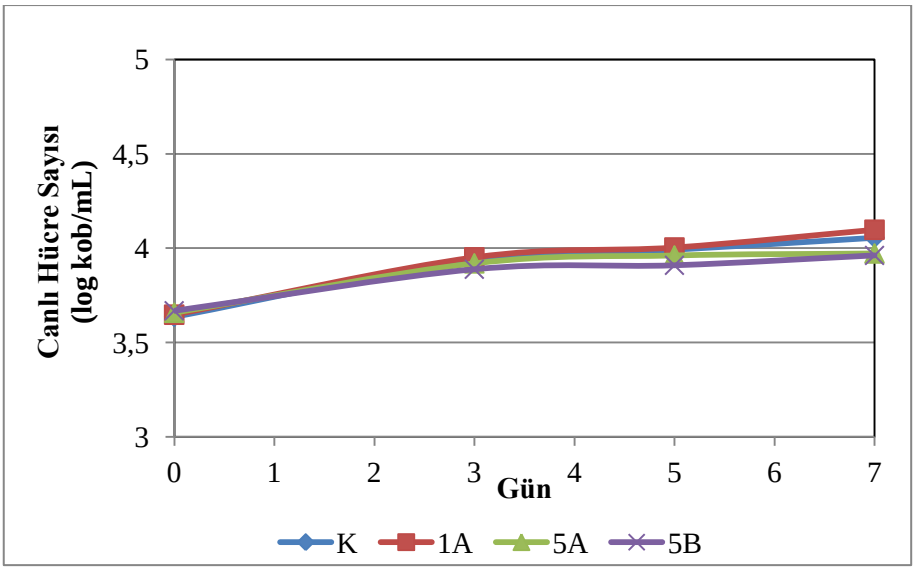
Şekil 4.42. Kitosan kontrol filmi ve Boraks (%1-%3) filmlerinin *Candida albicans* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *C. albicans*, 1A: Kitosan, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks

Şekil 4.42. incelendiğinde inkübasyonun yedinci günü %1 boraks içeren filmin *Candida albicans* gelişimini yaklaşık 0,1 log (kob/mL), %3 boraks içeren filmin ise yaklaşık 0,2 log (kob/mL) azalttığı belirlenmştir.



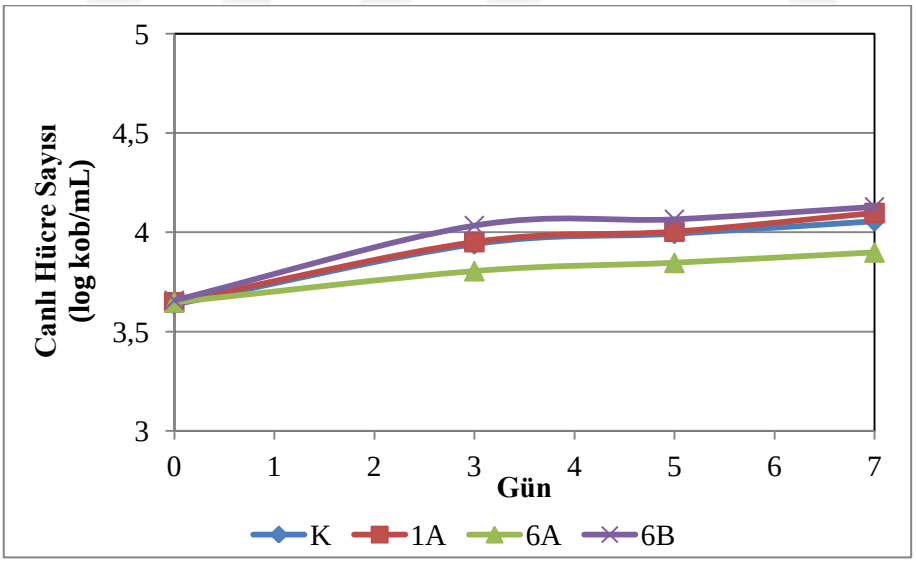
Şekil 4.43. Kitosan kontrol filmi ve Etil pirüvat (%1-%3) filmlerinin *Candida albicans* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *C. albicans*, 1A: Kitosan, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat

Şekil 4.43. incelendiğinde inkübasyonun yedinci gününde %1 etil pirüvat filminin *Candida albicans* gelişimini yaklaşık 0,5 log (kob/mL), %3 etil pirüvat filminin ise yaklaşık 0,1 log (kob/mL) azalttığı belirlenmiştir.



Şekil 4.44. Kitosan kontrol filmi ve Bor nitrür (%1-%3) filmlerinin *Candida albicans* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *C. albicans*, 1A: Kitosan, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür

Şekil 4.44. incelendiğinde inkübasyonun yedinci günü %1 bor nitrür ve %3 bor nitrür içeren kitosan filmlerinin *Candida albicans* gelişimini yaklaşık 0,1 log (kob/mL) azalttığı belirlenmiştir.



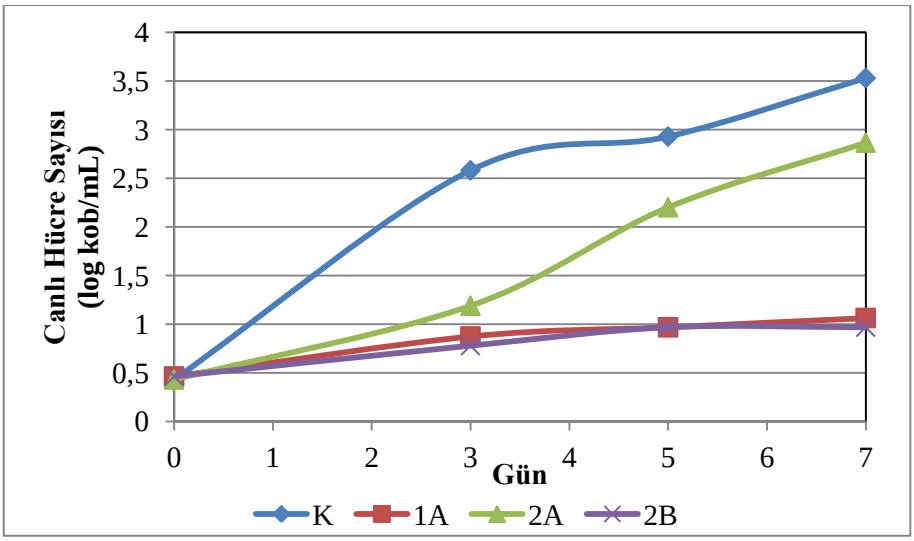
Şekil 4.45. Kitosan kontrol filmi ve Limon esansiyel yağı (%1-%3) filmlerinin *Candida albicans* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *C. albicans*, 1A: Kitosan, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı

Şekil 4.45. incelendiğinde inkübasyonun yedinci günü *Candida albicans* gelişiminde %3 limon esansiyel yağı içeren filmin kontrol mikroorganizmaya göre herhangi bir azalmaya neden olmadığı, %1 limon esansiyel yağı içeren filmin mikroorganizma gelişiminde yaklaşık 0,1 log (kob/mL) azalmaya neden olduğu belirlenmiştir.

Tsai ve ark. (2004), selülazın hidrolizi ile elde edilen kitosan solüsyonunun (%4,5 w/v), canlı hücre sayım yöntemine göre *C. albicans* CCRC-20513 suşunun gelişimini 2,48 log azalttığını, kitosanın enzimatik yolla hidrolize edilmesi ile elde edilen kitooligosakkarit karışımının ise *C. albicans* CCRC-20513 suşunun gelişimini engelleyemediğini tespit etmiştir. Buna göre yaptığımız çalışmada kitosan filmlerin düşük antifungal özellik gösterme nedeninin çalışmalarda kullanılan kitosanın hammadde kaynağının farklı olması, Tsai ve ark. (2004) tarafından hazırlanan solüsyon içerisindeki kitosan miktarının yüksek olması ve antimikrobiyal analizin solüsyon üzerinden yapılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

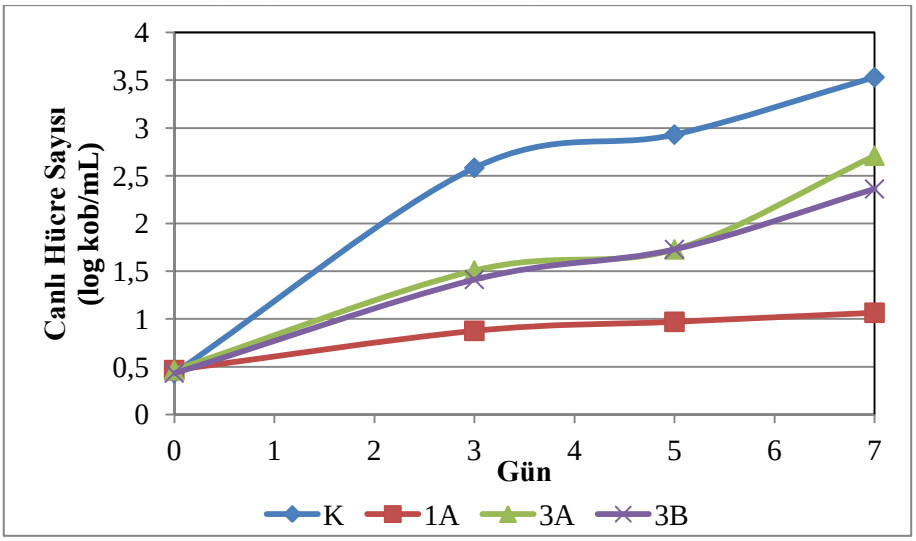
Peña ve ark. (2013), canlı hücre sayım methoduna göre kitosanın, *C. albican*s ATCC-10231 suşuna karşı inhibisyonunun 666 µg/mL (%60 w/v) konsantrasyonda başladığını bildirmiştir. Yaptığımız çalışmada ise film formülasyonu %1,5 kitosan içerdiğinden dolayı *C. albicans*'a karşı herhangi bir inhibisyon tespit edilmemiştir. Bundan dolayı Peña ve ark. (2013), tarafından yapılan çalışma ile karşılaştırıldığında, yaptığımız çalışmada film formülasyonu içerisindeki kitosan miktarının inhibisyon için yetersiz olduğu belirlenmiştir.

Filmlerin *Alternaria arborescens* 'e karşı canlı hücre sayım yöntemi ile belirlenen antifungal aktivitesi Şekil 4.46, Şekil 4.47, Şekil 4.48, Şekil 4.49 ve Şekil 4.50 üzerinde gösterilmektedir.



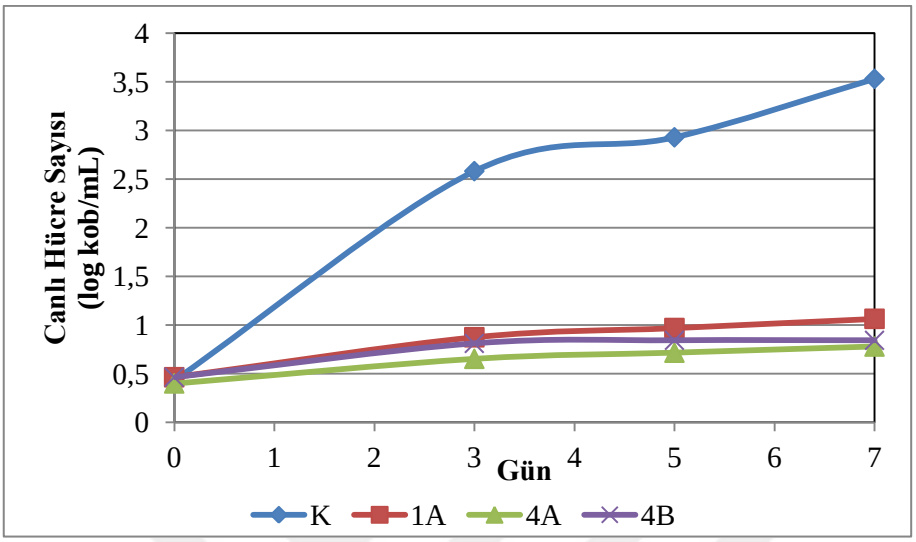
Şekil 4.46. Kitosan kontrol filmi ve Cloisite 30B (%1-%3) filmlerinin *Alternaria arborescens* 'e karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *A. arborescens*, 1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B

Şekil 4.46. incelendiğinde inkübasyonun yedinci gününde kontrol kitosan filmi ve %3 Cloisite30B içeren filmlerin *Alternaria arborescens* gelişiminde yaklaşık 2,5 log (kob/mL) azalmaya neden olurken, %1 Cloisite 30B içeren kitosan filmin 0,7 log (kob/mL) azalmaya neden olduğu belirlenmiştir.



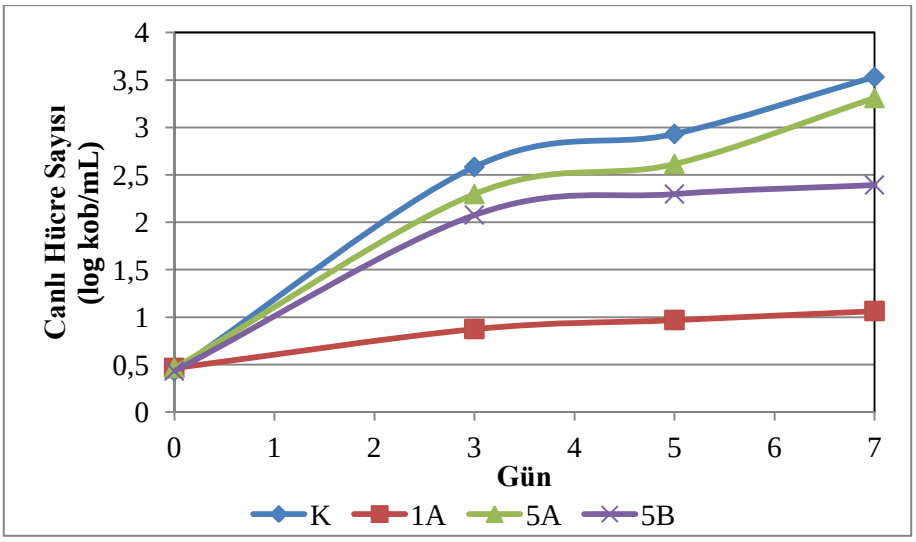
Şekil 4.47. Kitosan kontrol filmi ve Boraks (%1-%3) filmlerinin *Alternaria arborescens* 'e karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *A. arborescens*, 1A: Kitosan, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks

Şekil 4.47. incelendiğinde inkübasyonun yedinci gününde %1 boraks içeren filmin *Alternaria arborescens* gelişiminde 0,8 log (kob/mL), %3 boraks içeren filmin ise 1,2 log (kob/mL) azalmaya neden olduğu belirlenmiştir.



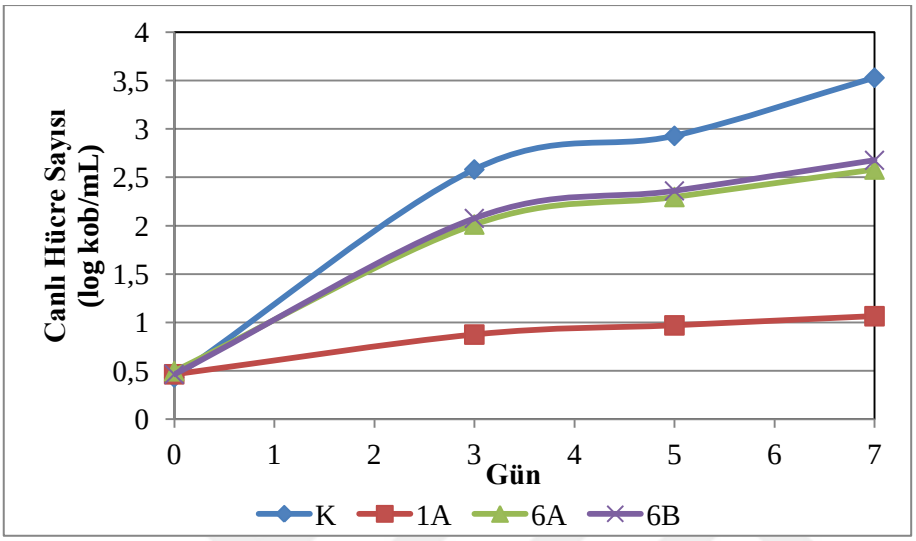
Şekil 4.48. Kitosan kontrol filmi ve Etil pirüvat (%1-%3) filmlerinin *Alternaria arborescens* 'e karşı antimikrobiyal aktivitesi
* K: Kontrol *A. arborescens*, 1A: Kitosan, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat

Şekil 4.48. incelendiğinde inkübasyonun yedinci gününde %1 etil pirüvat ve %3 etil pirüvat içeren filmlerin *Alternaria arborescens* gelişiminde yaklaşık 2,8 log (kob/mL) azalmaya neden olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.49. Kitosan kontrol filmi ve Bor nitrür (%1-%3) filmlerinin *Alternaria arborescens* 'e karşı antimikrobiyal aktivitesi
* K: Kontrol *A. arborescens*, 1A: Kitosan, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür

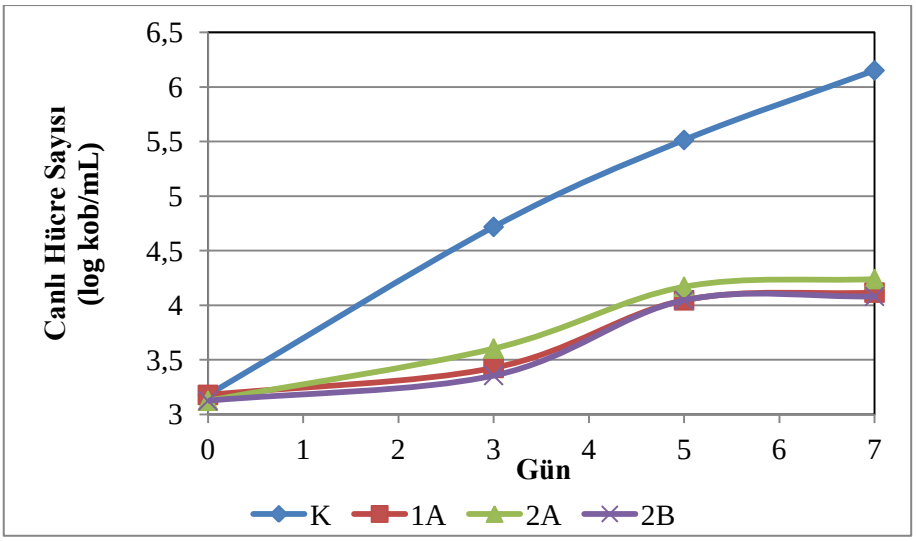
Şekil 4.49. incelendiğinde inkübasyonun yedinci gününde %1 bor nitrür içeren kitosan filminin sonunda *Alternaria arborescens* gelişiminde yaklaşık 0,2 log, %3 bor nitrür içeren kitosan filminin ise yaklaşık 1,14 log (kob/mL) azalmaya neden olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.50. Kitosan kontrol filmi ve Kitosan+Limon esansiyel yağı (%1-%3) filmlerinin *Alternaria arborescens* 'e karşı antimikrobiyal aktivitesi
* K: Kontrol *A. arborescens*, 1A: Kitosan, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı

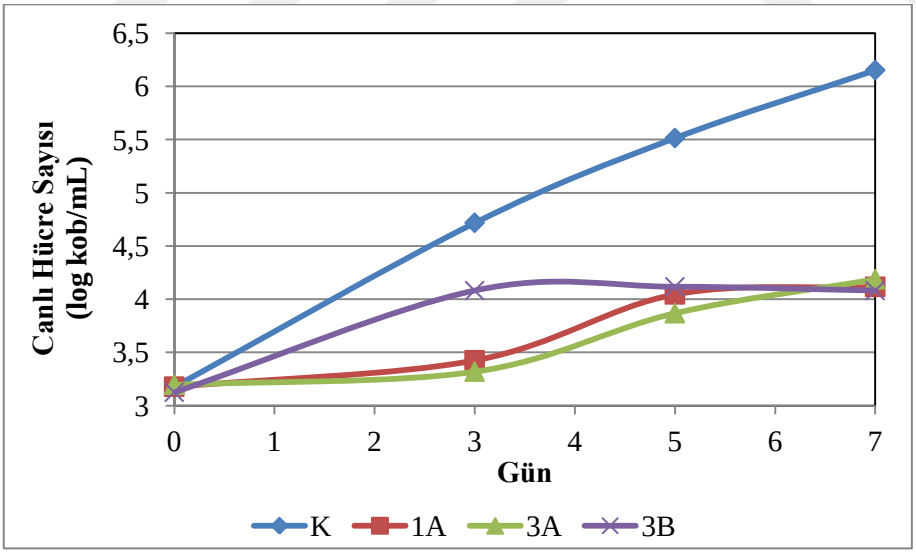
Şekil 4.50. incelendiğinde inkübasyonun yedinci gününde %1 limon esansiyel yağı içeren filmin *Alternaria arborescens* gelişiminde 1,0 log (kob/mL) azalmaya, %3 limon esansiyel filminin ise yaklaşık 0,8 log (kob/mL) azalmaya yol açtığı belirlenmiştir.

Filmlerin *Penicillium citrinum* 'a karşı canlı hücre sayım yöntemi ile belirlenen antifungal aktivitesi Şekil 4.51, Şekil 4.52, Şekil 4.53, Şekil 4.54 ve Şekil 4.55 üzerinde gösterilmektedir.



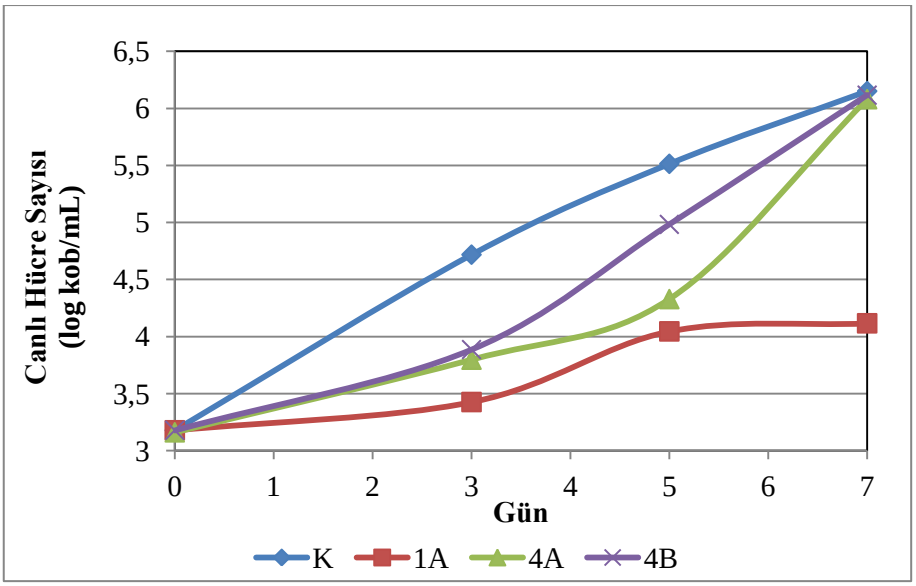
Şekil 4.51. Kitosan kontrol filmi ve Cloisite 30B (%1-%3) filmlerinin *Penicillium citrinum* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *P. citrinum*, 1A: Kitosan, 2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B

Şekil 4.51. incelendiğinde inkübasyonun yedinci gününde, kontrol kitosan, %1 ve %3 Cloisite 30B içeren filmlerin *Penicillium citrinum* gelişiminde yaklaşık 2 log (kob/mL) azalmaya yol açtığı belirlenmiştir.



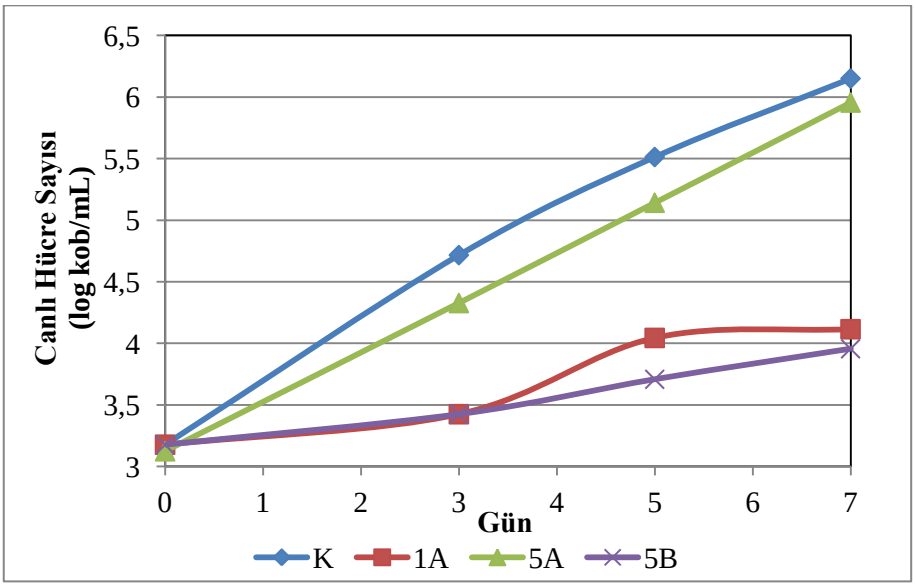
Şekil 4.52. Kitosan kontrol filmi ve Boraks (%1-%3) filmlerinin *Penicillium citrinum* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *P. citrinum*, 1A: Kitosan, 3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks

Şekil 4.52. incelendiğinde inkübasyonun yedinci gününde, %1 ve %3 boraks içeren filmlerin *Penicillium citrinum* gelişiminde yaklaşık 2 log (kob/mL) azalmaya yol açtığı belirlenmiştir.



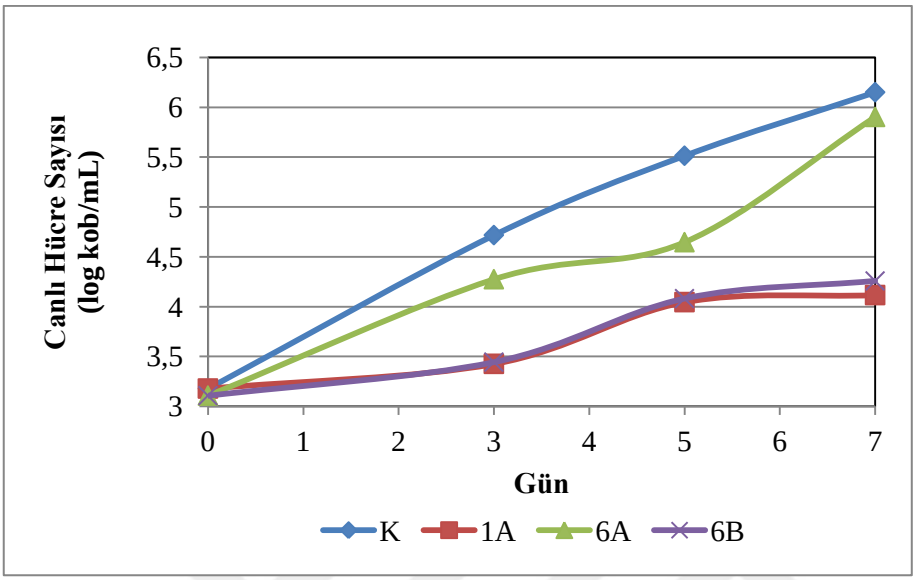
Şekil 4.53. Kitosan kontrol filmi ve Etil pirüvat (%1-%3) filmlerinin *Penicillium citrinum* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *P. citrinum*, 1A: Kitosan, 4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat

Şekil 4.53. incelendiğinde inkübasyonun yedinci gününde, %1 ve %3 etil pirüvat içeren filmlerin *Penicillium citrinum* gelişiminde herhangi bir azalmaya yol açmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.54. Kitosan kontrol filmi ve Kitosan+Bor nitrür (%1-%3) filmlerinin *Penicillium citrinum* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *P. citrinum*, 1A: Kitosan, 5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür

Şekil 4.54. incelendiğinde inkübasyonun yedinci günü %1 bor nitrür içeren film *Penicillium citrinum* gelişiminde yaklaşık 0,2 log (kob/mL), %3 bor nitrür içeren film ise yaklaşık 2,2 log (kob/mL) azalmaya yol açtığı belirlenmiştir.



Şekil 4.55. Kitosan kontrol filmi ve Limon esansiyel yağı (%1-%3) filmlerinin *Penicillium citrinum* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi
*K: Kontrol *P. citrinum*, 1A: Kitosan, 6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı

Şekil 4.55. incelendiğinde inkübasyonun yedinci günü %1 limon esansiyel yağı içeren kitosan filminin *Penicillium citrinum* gelişiminde 0,2 log, %3 limon esansiyel yağı içeren kitosan filmin ise yaklaşık 2 log (kob/mL) azalmaya neden olduğu belirlenmiştir.

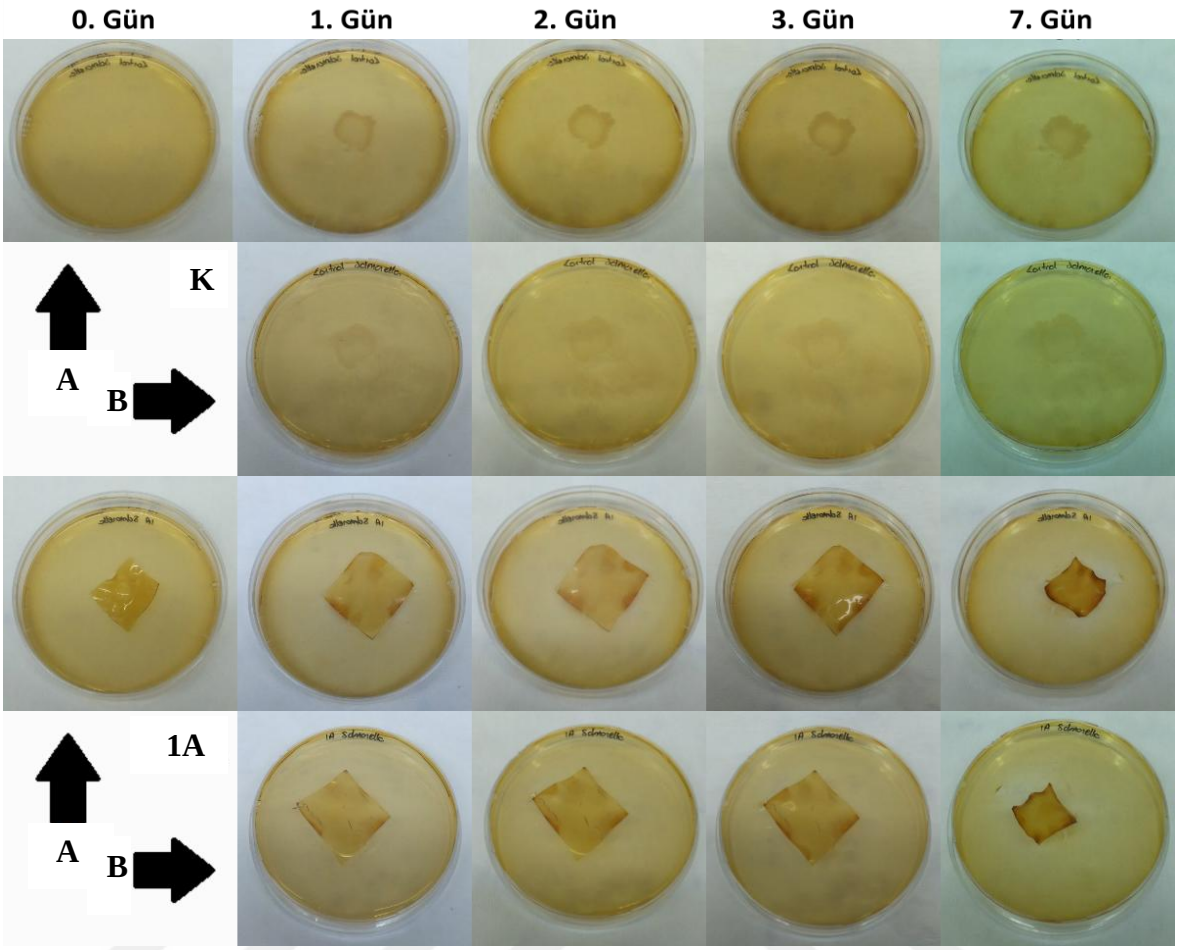
Sánchez-González ve ark. (2010), kitosan filminin inkübasyonun yedinci gününde *Penicillium italicum* gelişimine harhangi bir etkisi olmadığını, %1 bergamot esansiyel yağı içeren kitosan filmin mikroorganizma gelişimini 2 log (kob/mL), %3 bergamot esansiyel yağı içeren kitosan filmin mikroorganizma gelişimini 3 log (kob/mL) azalttığını bildirmiştir. Yaptığımız çalışma ile karşılaştırıldığında hazırladığımız kitosan filmin antibakteriyel etkisi olduğu belirlenmiştir. Buna göre bu farklılığın Sánchez-González ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada kullanılan kitosanın deasetilasyon derecesi (%82,7) ve test mikroorganizmasının türünün farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Hossain ve ark. (2019), kekik esansiyel yağı emülsiyonları ile hazırlanan selüloz nanokristali-kitosan filmlerinin canlı hücre sayım yöntemine göre antifungal aktivitesini belirlemiştir. Kekik esansiyel yağı emülsiyonları ile hazırlanan selüloz nanokristali-kitosan

filmlerinin *P. chrysogenum* ATCC-10106 suşunun gelişimini kontrol kitosan filme göre 2,3 log (kob/mL) azalttığını bildirmiştir. Buna göre Hossain ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışma, yaptığımız çalışmayı desteklemektedir.

4.4.2.5. Filmlerin Antibakteriyel Etkisinin Spot Ekim Yöntemi ile Belirlenmesi

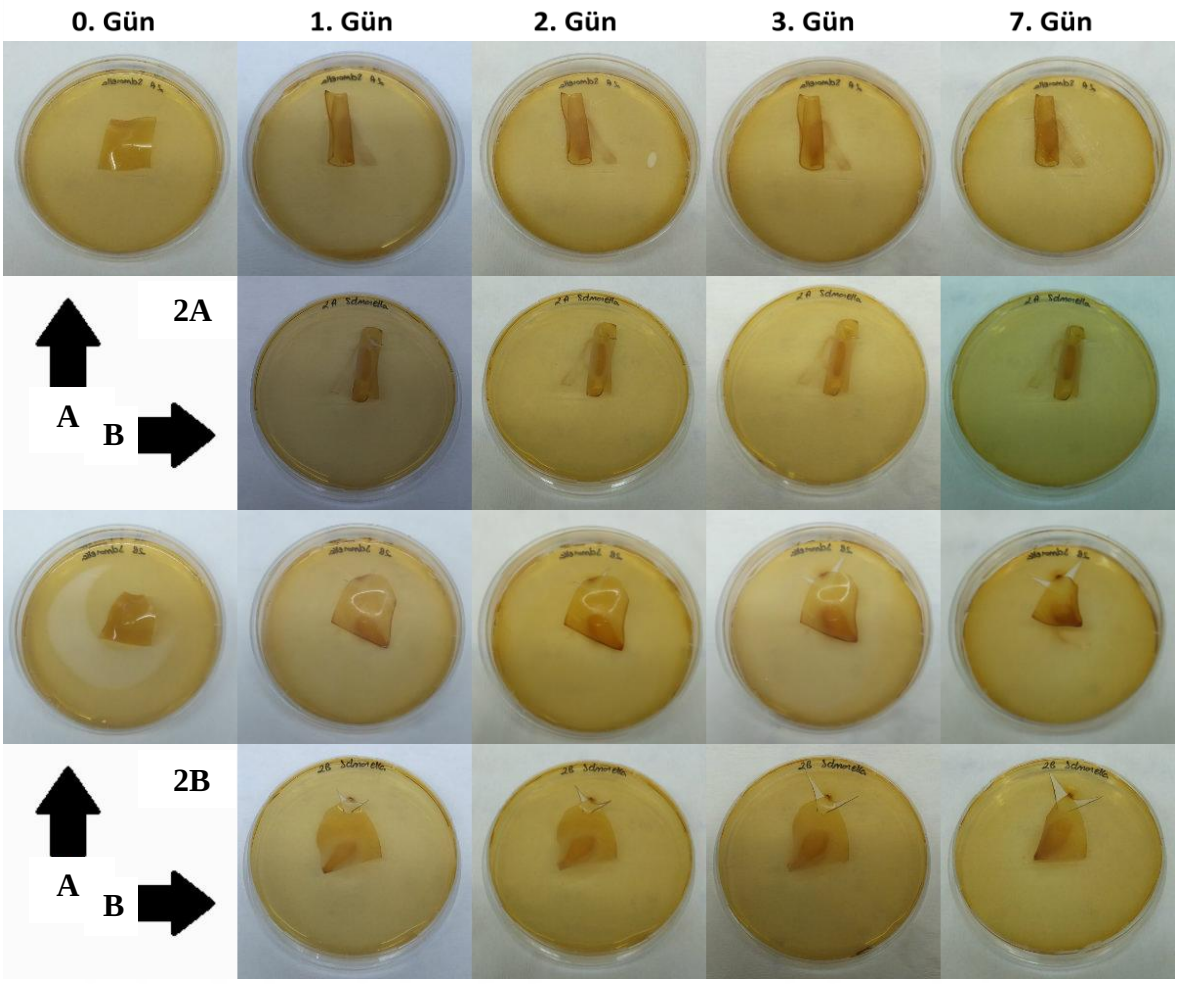
Besiyeri üzerine yerleştirilen kare şeklindeki film örneklerine, mikroorganizma inoküle edildikten sonra 1., 2., 3. ve 7. gün inkübasyon süresi sonunda petrilerin görüntüleri kaydedilmiştir. Ancak besiyeri ve filmlerin interaksiyonu sonucu, filmlerin inkübasyon süresi sırasında şekillerinde değişim olmuştur. Literatür incelendiğinde boraks, etil pirüvat, bor nitrür ve limon esansiyel yağı nanokompozit filmlerinin spot ekim yöntemi ile belirlenen antibakteriyel etkisine ait bir bulguya rastlanmamıştır. Filmlerin *Salmonella* Typhimurium 'a karşı spot ekim yöntemi ile belirlenen antibakteriyel etkisi Şekil 4.56., Şekil 4.57., Şekil 4.58., Şekil 4.59., Şekil 4.60. ve Şekil 4.61. üzerinde verilen görsellerde gösterilmektedir.



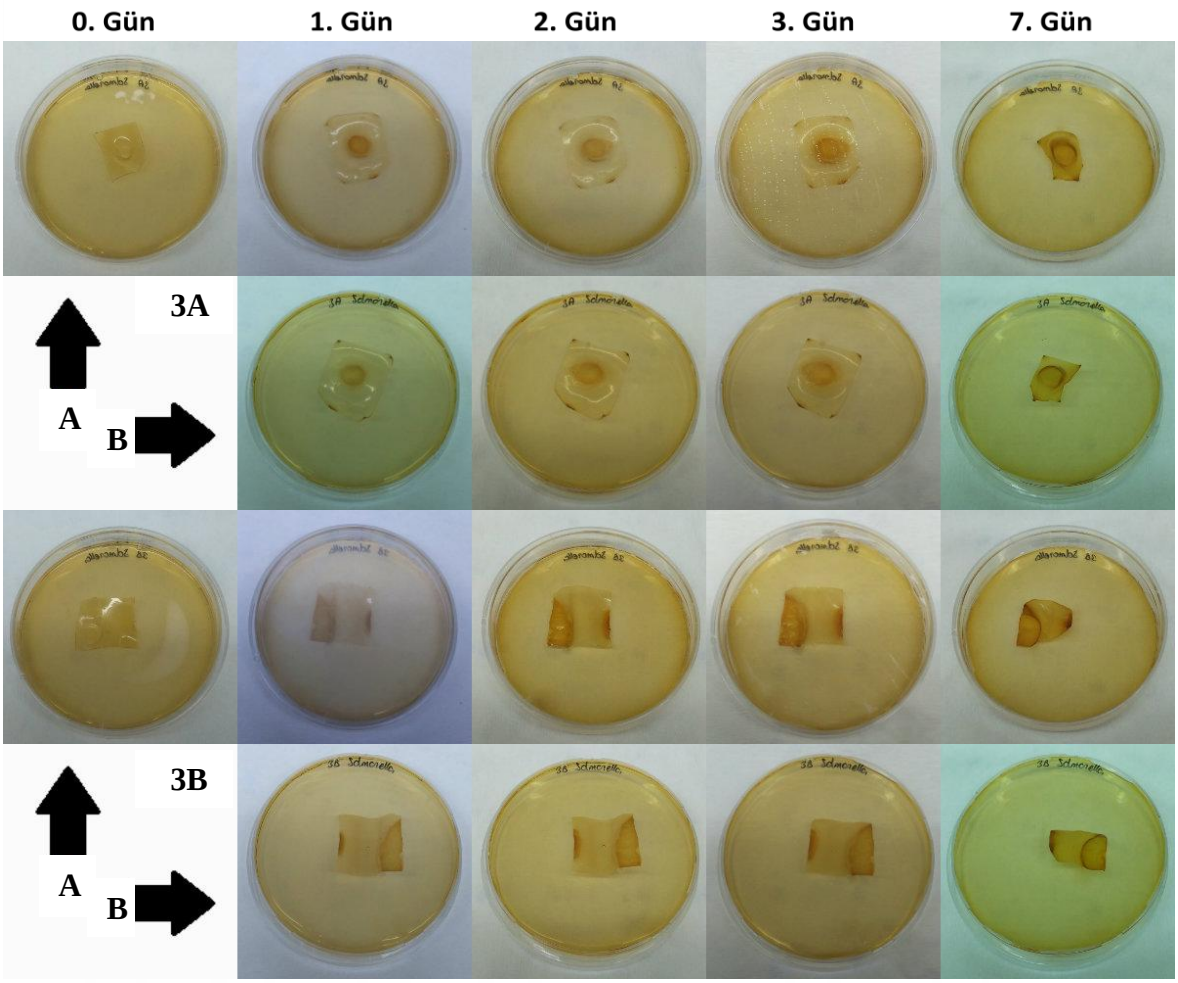
Şekil 4.56. Kontrol *Salmonella* Typhimurium ve kontrol kitosan filmini içeren petrilerin görüntüsü

*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.

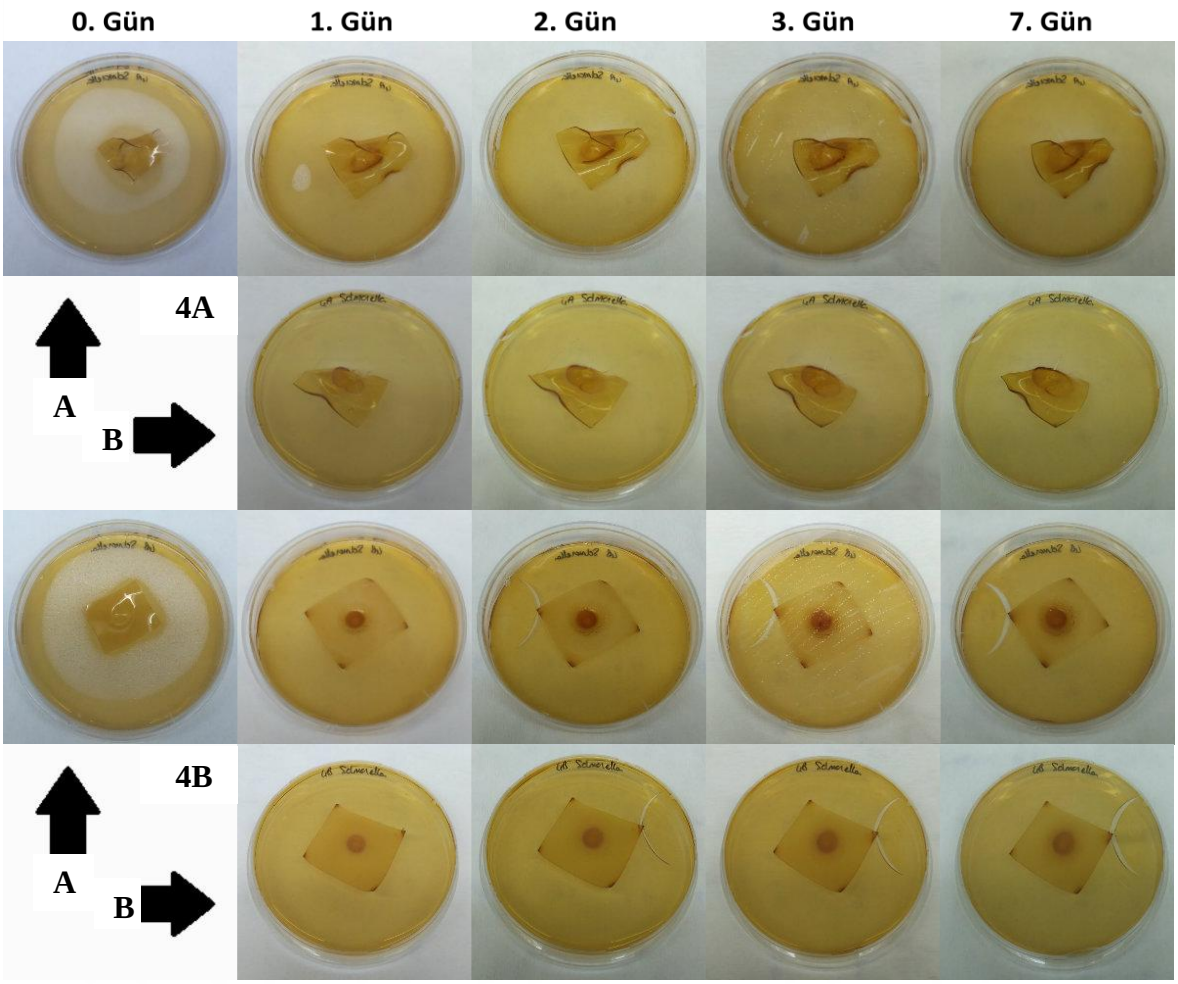
*K: Kontrol *S.* Typhimurium, 1A: Kitosan



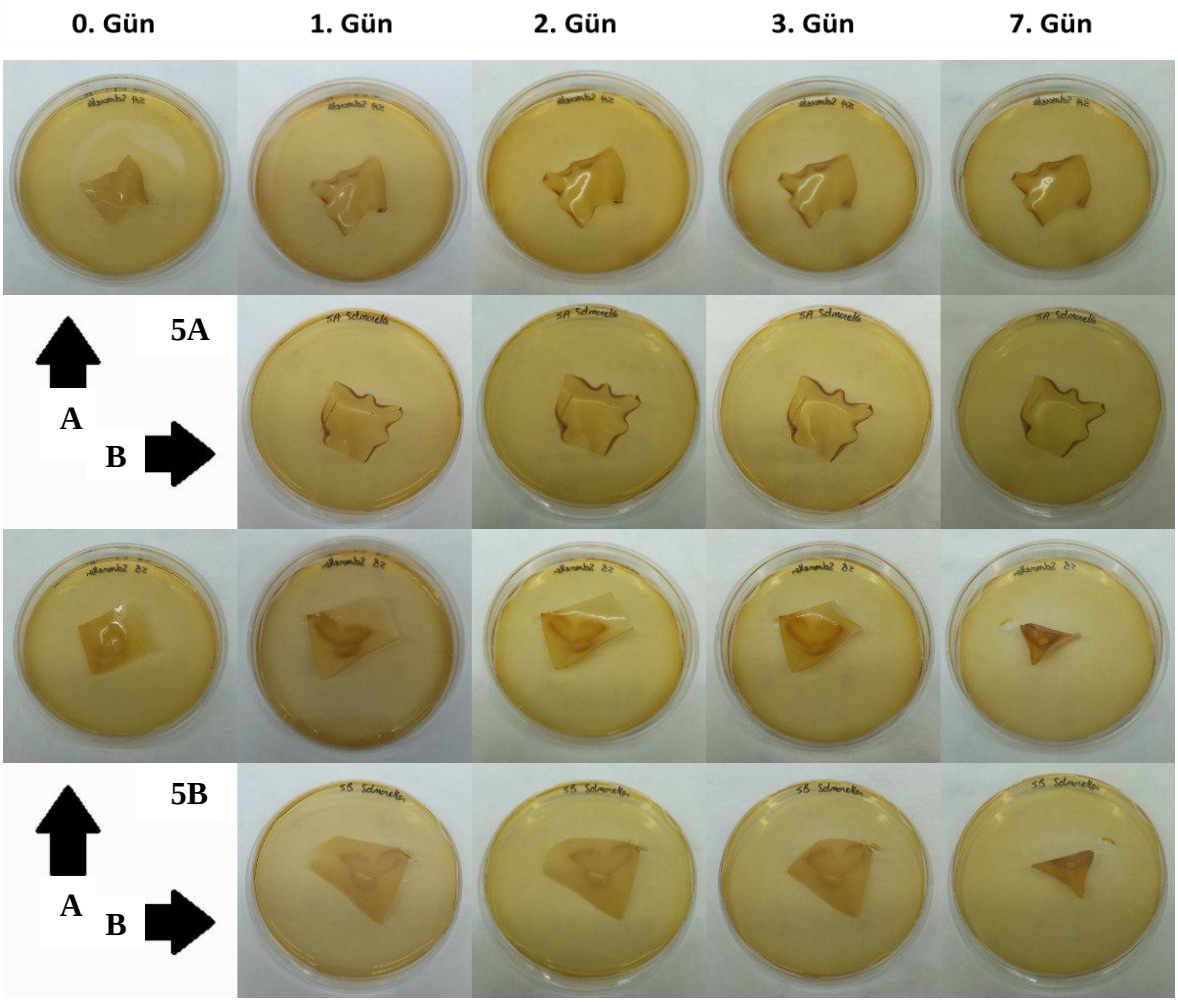
Şekil 4.57. *Salmonella* Typhimurium için %1 Cloisite 30B ve %3 Cloisite 30B filmlerini içeren petrilerin görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B



Şekil 4.58. *Salmonella* Typhimurium için %1 Boraks ve %3 Boraks filmlerini içeren petrilerin görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks



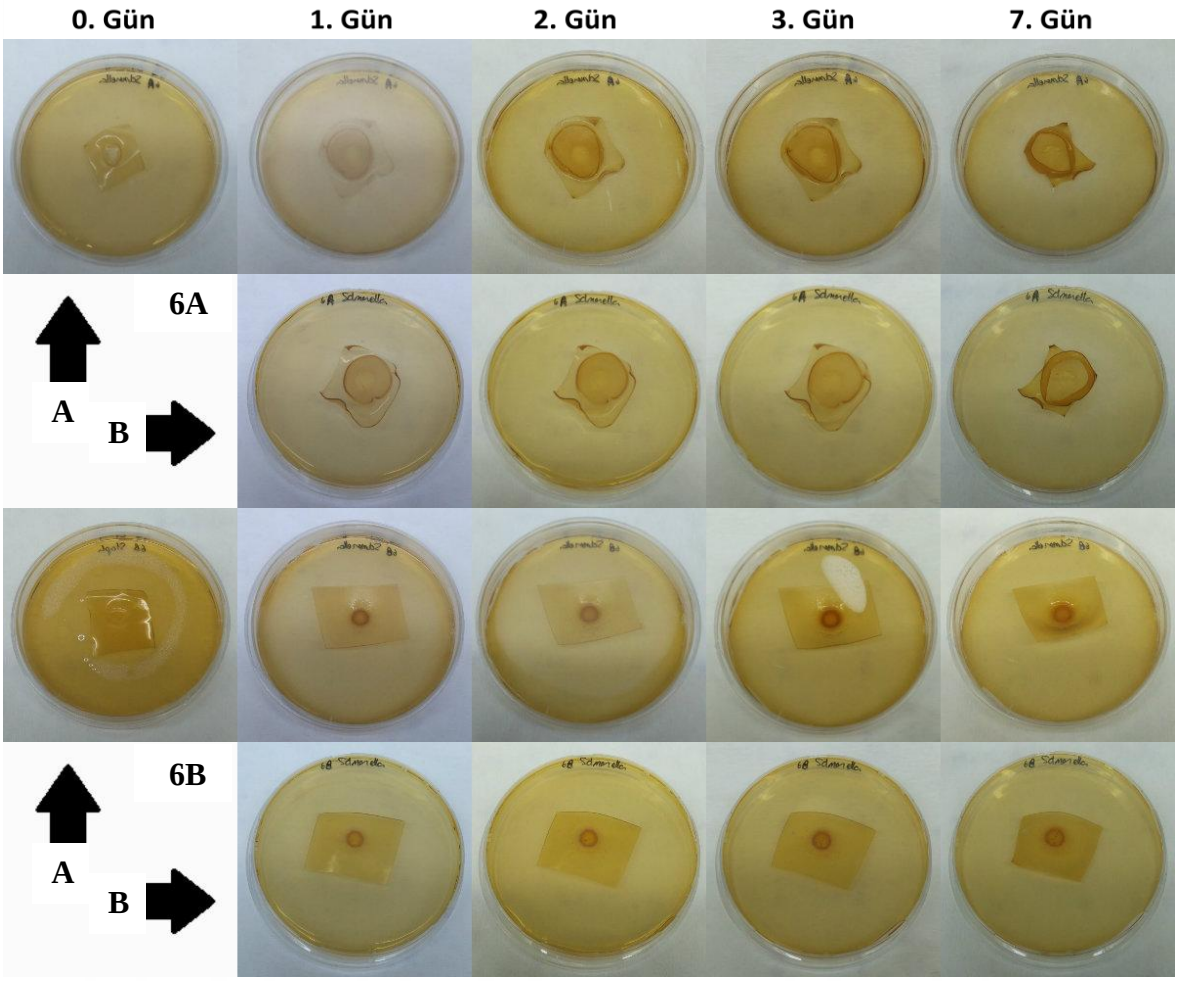
Şekil 4.59. *Salmonella* Typhimurium için %1 Etil pirüvat ve %3 Etil pirüvat filmlerini içeren petrilerin görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat



Şekil 4.60. *Salmonella* Typhimurium için %1 Bor nitrür ve %3 Bor nitrür filmlerini içeren petrilerin görüntüsü

*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.

*5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür

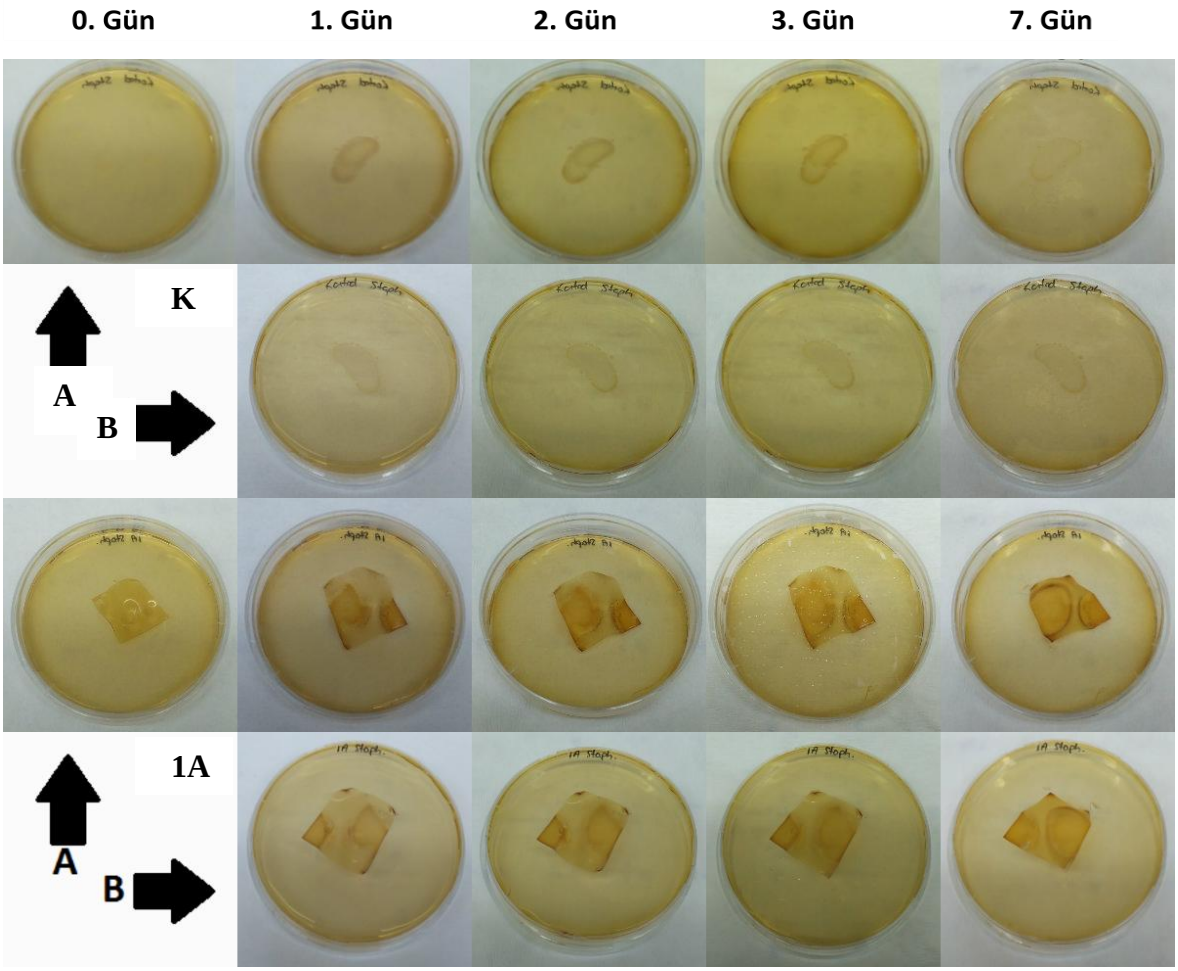


Şekil 4.61. *Salmonella* Typhimurium için %1 Limon esansiyel yağı ve %3 Limon esansiyel yağı filmlerini içeren petrilerin görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı

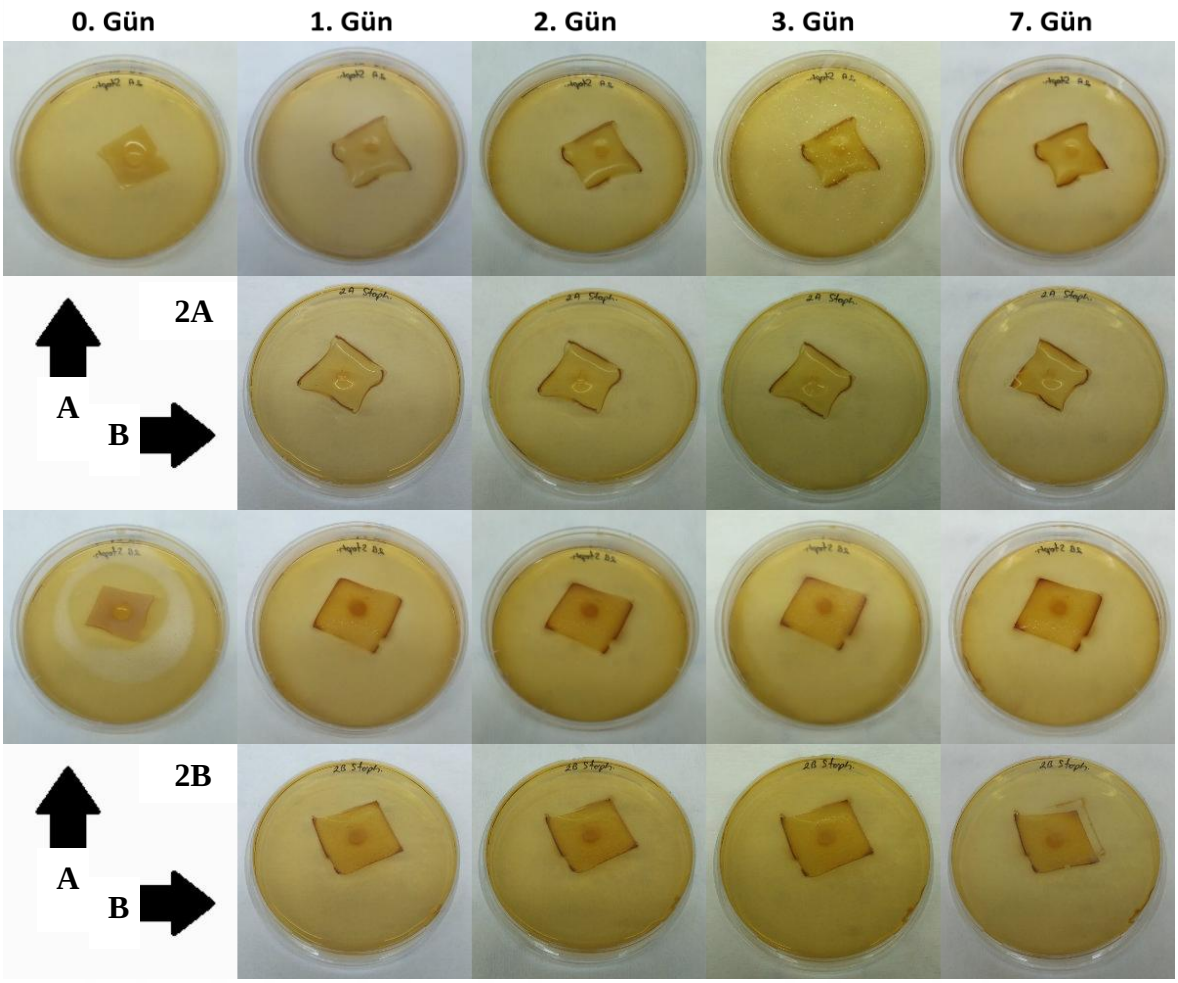
Salmonella Typhimurium besiyerine inokule edildikten sonra ilk 24 saat içerisinde gelişim olmuştur. Ancak besiyerine konulan filmlerin üzerine inokulasyon yapılan denemelerde tüm filmlerde 7 günlük inkübasyon sırasında film yüzeyinde herhangi bir gelişim olmamıştır. Bu nedenle spot ekim yöntemine göre tüm filmlerin *Salmonella* Typhimurium 'a karşı antibakteriyel etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Butnaru ve ark. (2016), polivinil alkol (PVA) nanokompozitinin yüzeyine inokule edilen *Salmonella* Typhimurium ATCC-14028 suşunun 48 saat inkübasyonu boyunca gelişiminin %25, %1 kitosan içeren PVA yüzeyindeki gelişiminin ise %54 oranında inhibe olduğunu, farklı oranda Cloisite 30B içeren PVA-kitosan nanokompozit örneklerinin yüzeyinde ise *Salmonella* Typhimurium 'un %92-95 oranında inhibe olduğunu tespit etmişlerdir. Buna göre Cloisite 30B filmleri için yapılan çalışma, yaptığımız çalışma ile benzerlik göstermiştir.

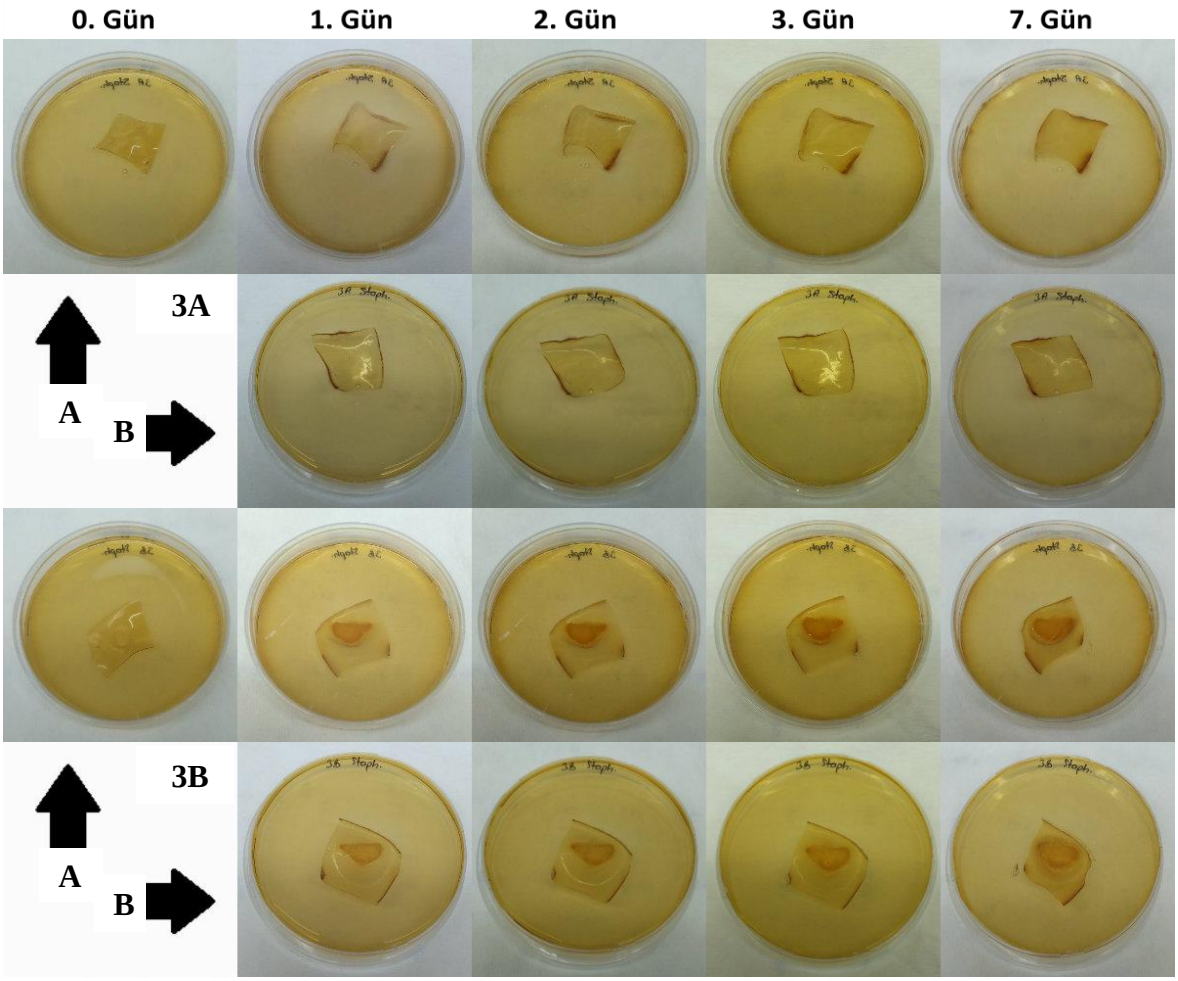
Filmlerin *Stapylococcus aureus* 'a karşı spot ekim yöntemi ile belirlenen antibakteriyel etkisi Şekil 4.62. Şekil 4.63. Şekil 4.64. Şekil 4.65. Şekil 4.66. ve Şekil 4.67. üzerinde verilen görsellerde gösterilmektedir.



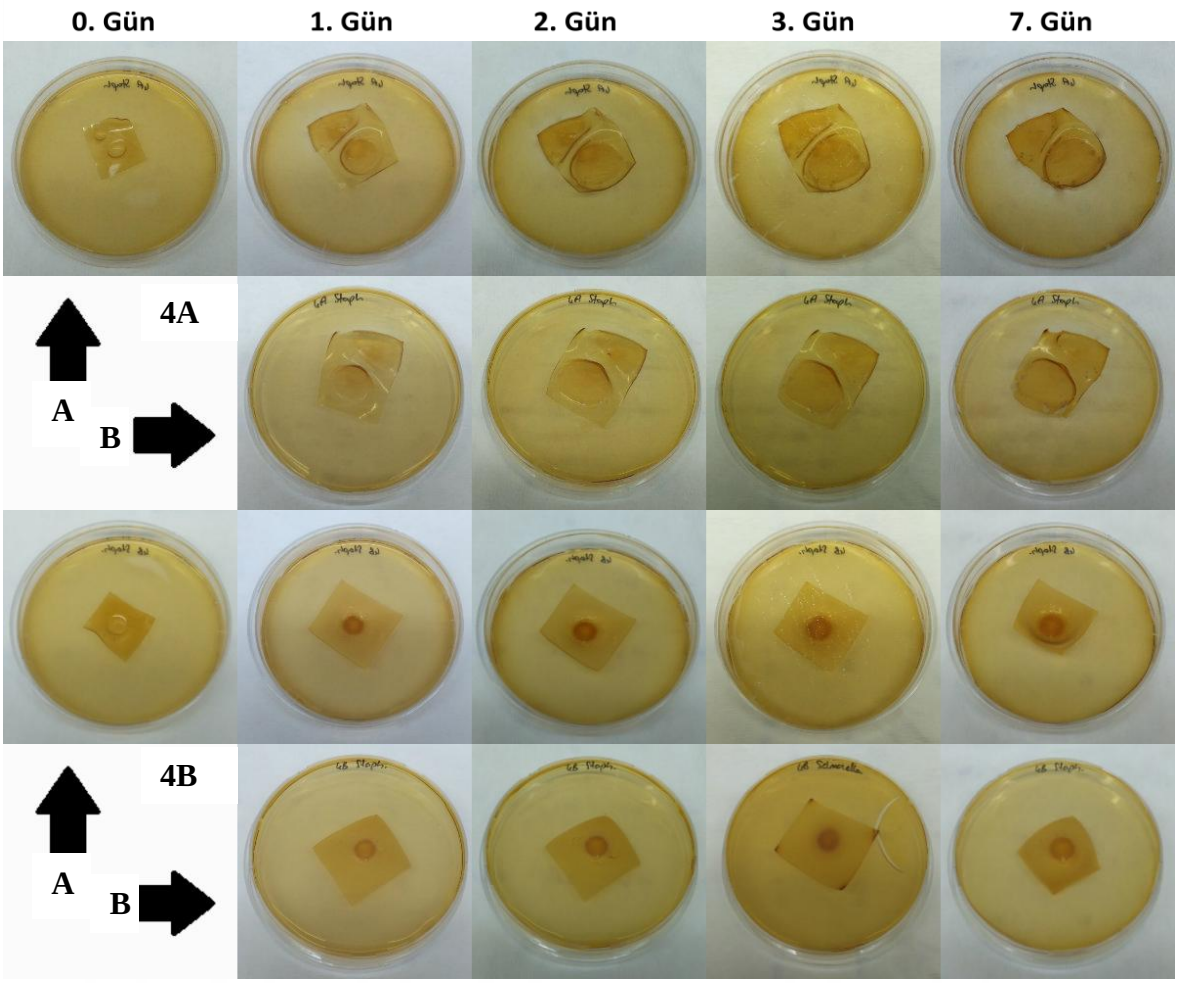
Şekil 4.62. Kontrol *Stapylococcus aureus* ve kitosan filmini içeren petrilerin görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*K: Kontrol *Stapylococcus aureus*, 1A: Kitosan



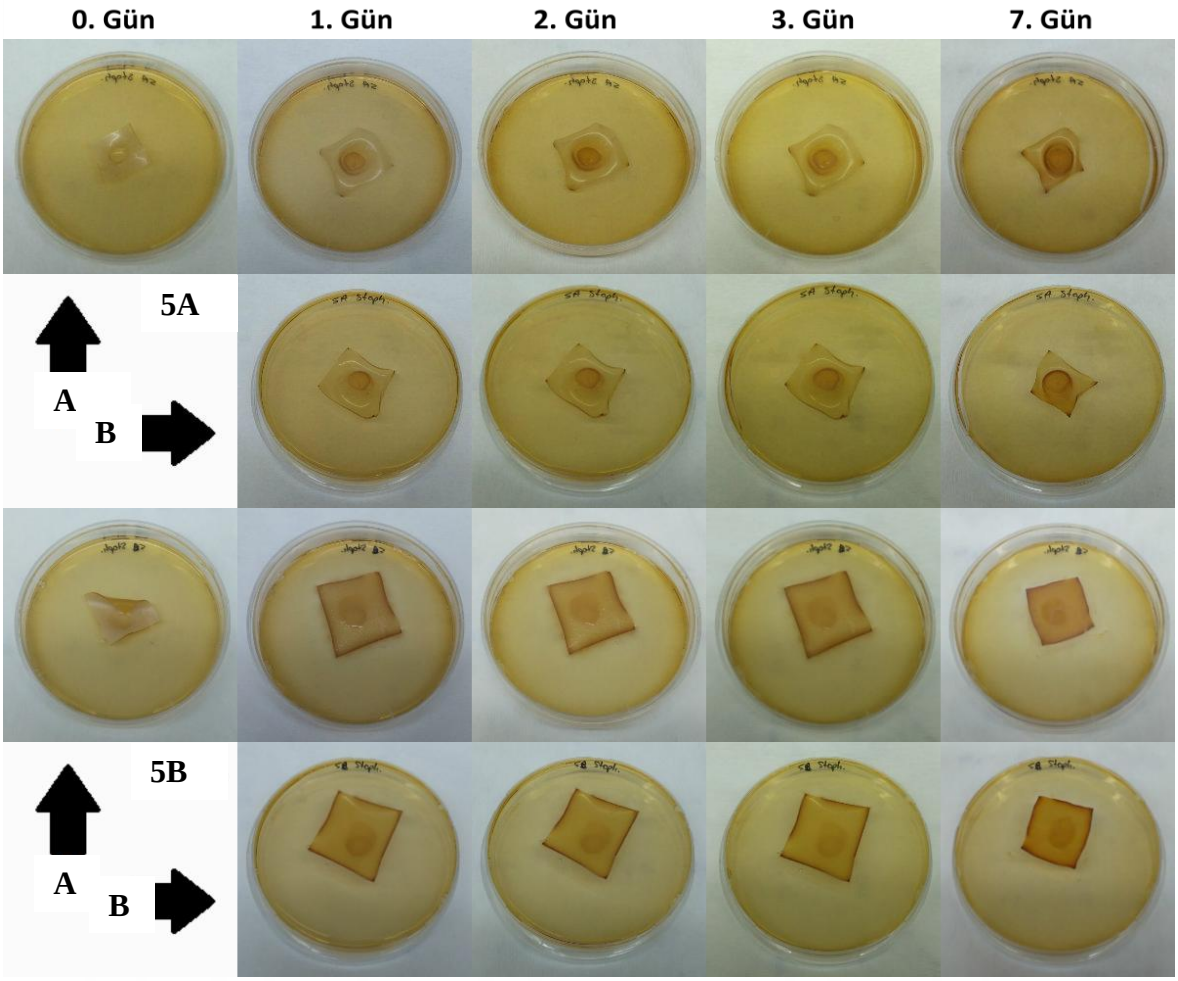
Şekil 4.63. *Stapylococcus aureus* için %1 Cloisite 30B ve %3 Cloisite 30B filmlerini içeren petrilerin görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*2A: Cloisite 30B, 2B: Cloisite 30B



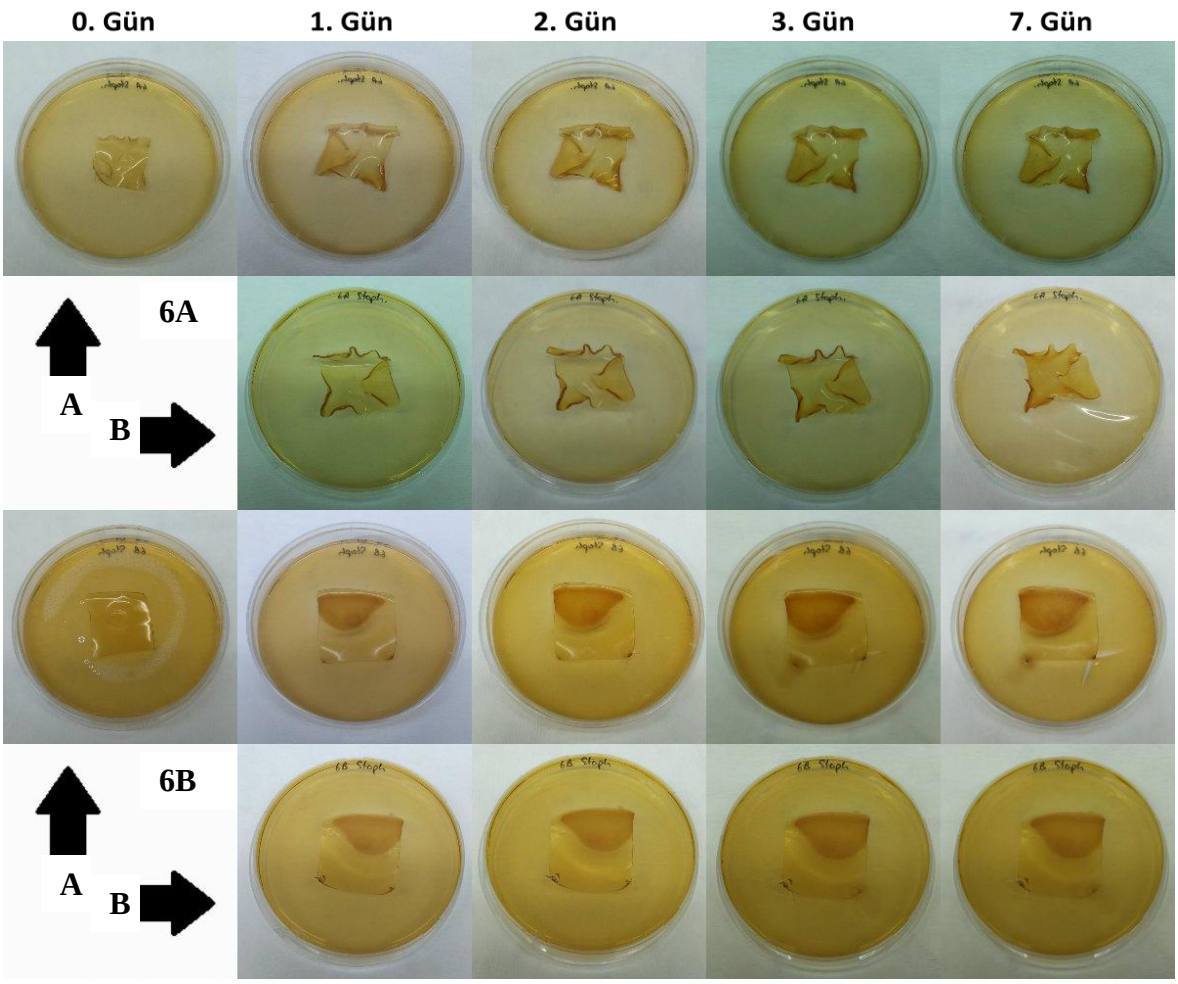
Şekil 4.64. *Stapylococcus aureus* için %1 Boraks ve %3 Boraks filmlerini içeren petrilerin görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks



Şekil 4.65. *Stapylococcus aureus* için %1 etil pirüvat ve %3 etil pirüvat filmlerini içeren petrilerin görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat



Şekil 4.66. *Stapylococcus aureus* için %1 Bor nitrür ve %3 Bor nitrür filmlerini içeren petrilerin görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*5A: %1Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür



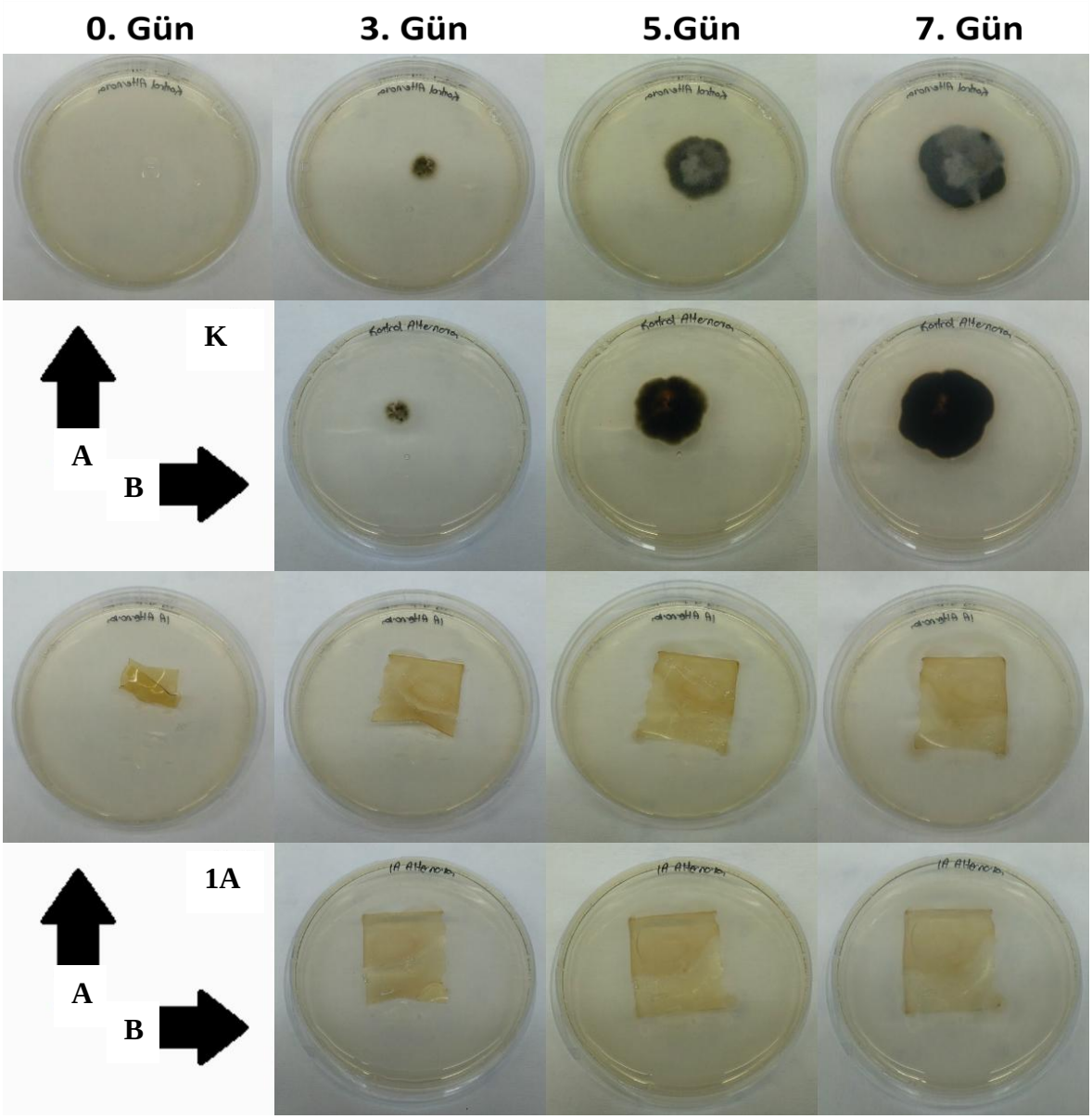
Şekil 4.67. *Stapylococcus aureus* için %1 Limon esansiyel yağı ve %3 Limon esansyel yağı filmlerini içeren petrilerin görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı

Kontrol için ekim yapılan *S.aureus* 24 saat içerisinde petri yüzeyinde gelişim göstermiştir. Ancak petri üzerine yerleştirilen filmlerde 7 günlük inkübasyon süresi boyunca her hangi bir gelişim gözlenmemiştir. Bundan dolayı spot ekim yöntemine göre *Stapylococcus aureus*'a karşı tüm filmlerin antibakteriyel özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir.

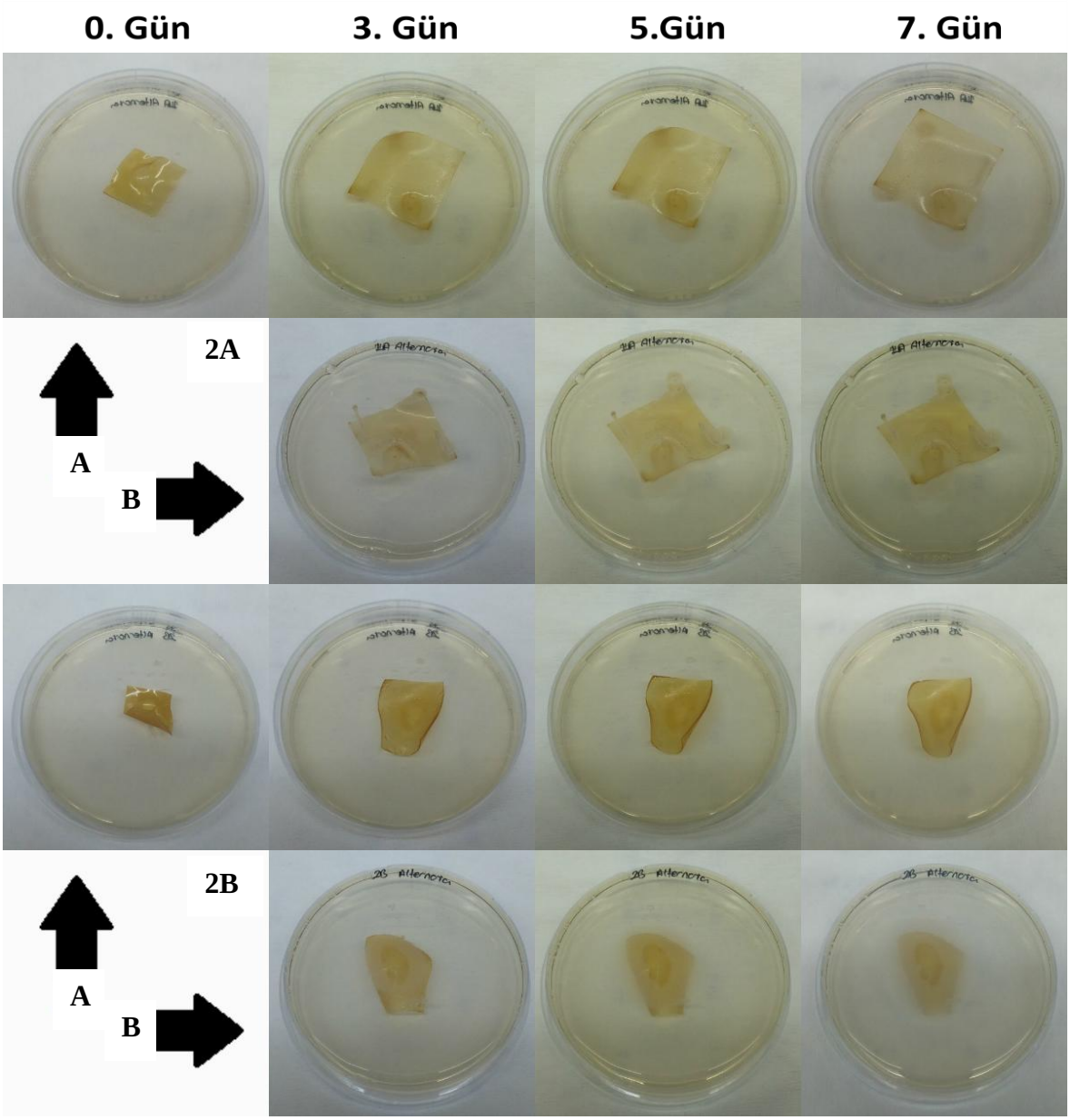
Zheng ve Zu (2003), *S. aureus*'un, molekül ağırlığı 48,5-305 kDa aralığında değişen %1'lik kitosan yüzeyinde 20 saatlik inkübasyon boyunca gelişmediğini bildirmiştir. Buna göre Zheng ve Zu (2003) tarafından alınan sonuç, yaptığımız çalışma ile benzerlik göstermektedir.

4.4.2.6. Filmlerin Antifungal Etkisinin Spot Ekim Yöntemi ile Belirlenmesi

Besiyeri üzerine yerleştirilen kare şeklindeki film örneklerine, küf ve maya kültürleri inoküle edildikten sonra 3., 5. ve 7. gün inkübasyon süresi sonunda petrilerin görüntüleri kaydedilmiştir. Ancak besiyeri ve filmlerin interaksiyonu sonucu, filmlerin inkübasyon süresi sırasında şekillerinde değişim olmuştur. Literatür incelendiğinde nanokompozit filmlerin spot ekim yöntemi ile belirlenen antifungal etkisine ait bir bulguya rastlanmamıştır. Filmlerin *Alternaria arborescens* 'a karşı spot ekim yöntemi ile belirlenen antibakteriyel etkisi Şekil 4.68. Şekil 4.69. Şekil 4.70. Şekil 4.71. Şekil 4.72. ve Şekil 4.73. üzerinde verilen görsellerde gösterilmektedir.



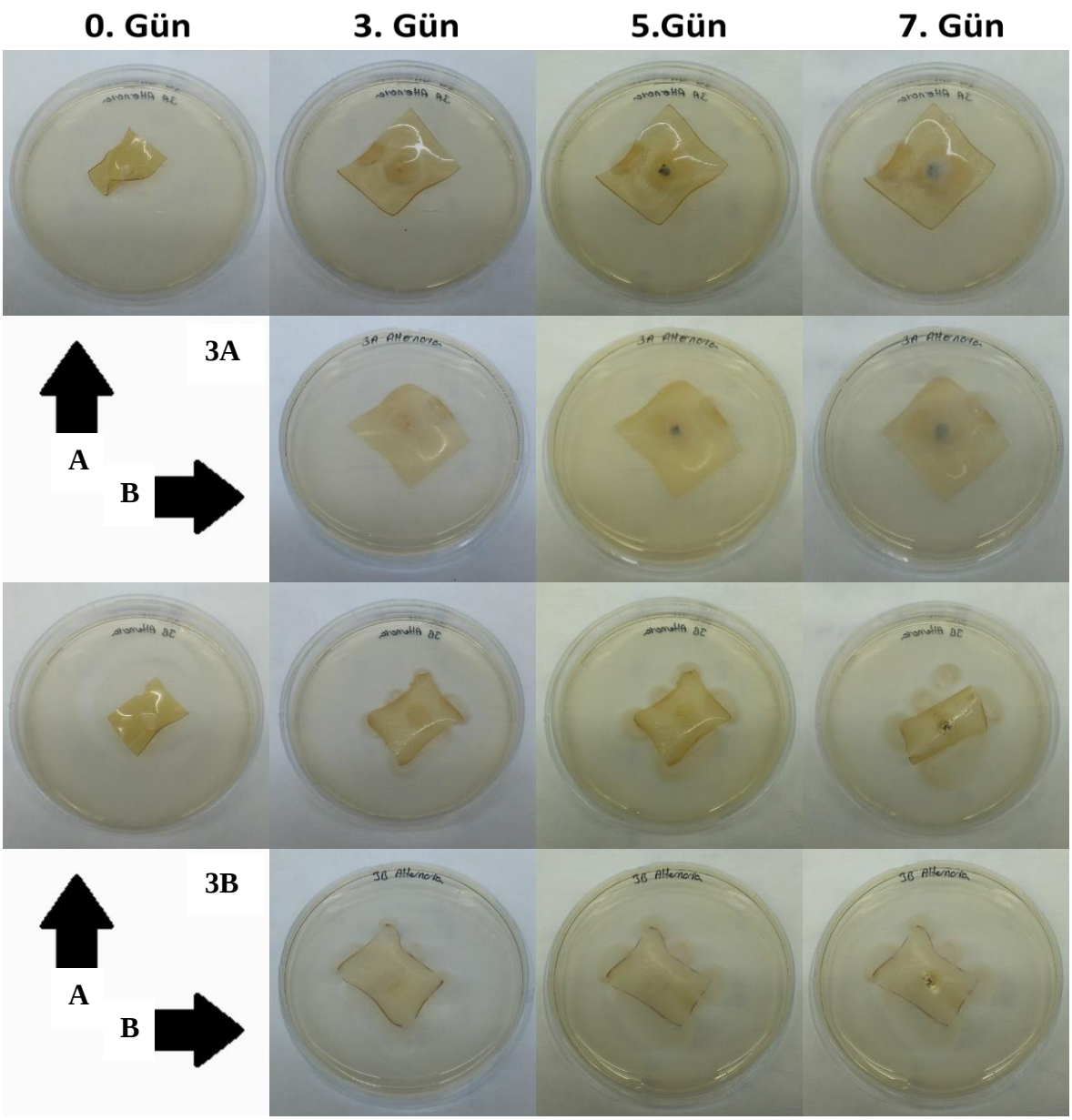
Şekil 4.68. Kontrol *Alternaria arborescens* ve kitosan filmini içeren petrilerin görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*K: Kontrol *Alternaria arborescens*, 1A: Kitosan



Şekil 4.69. *Alternaria arborescens* için %1 Cloisite 30B ve %3 Cloisite 30B filmlerini içeren petrilerin görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B

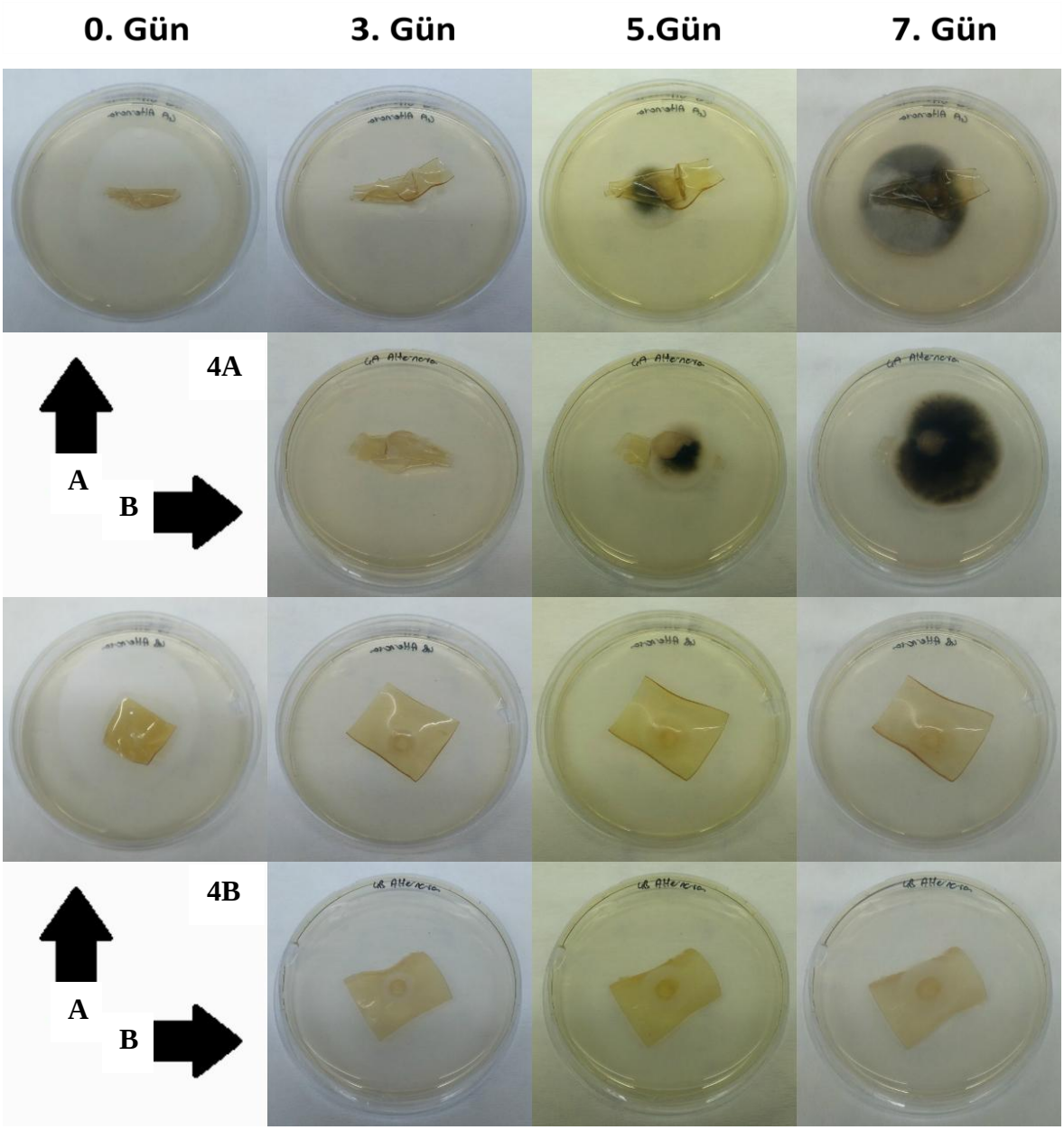
Kontrol *Alternaria arborescens* içeren petride inkübasyonun 3. gününde mikroorganizma gelişimi olduğu gözlenirken, Şekil 4.49 incelendiğinde %1 ve %3 Cloisite 30B içeren film örneklerinin yüzeyinde mikroorganizma gelişimi gözlenmemiştir.

Ziani ve ark. (2009), %1 (w/v) kitosan solüsyonunun *A. alternata* CECT-20560 suşuna karşı radyal inhibisyonunu %97 tespit ederken, kitosan filmi yüzeyindeki radyal inhibisyonu %57 tespit etmiştir. Yaptığımız çalışmada ise inkübasyonun 7 günü boyunca herhangi bir gelişim olmamıştır. Buna göre Ziani ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışma yaptığımız çalışmayı desteklemektedir.



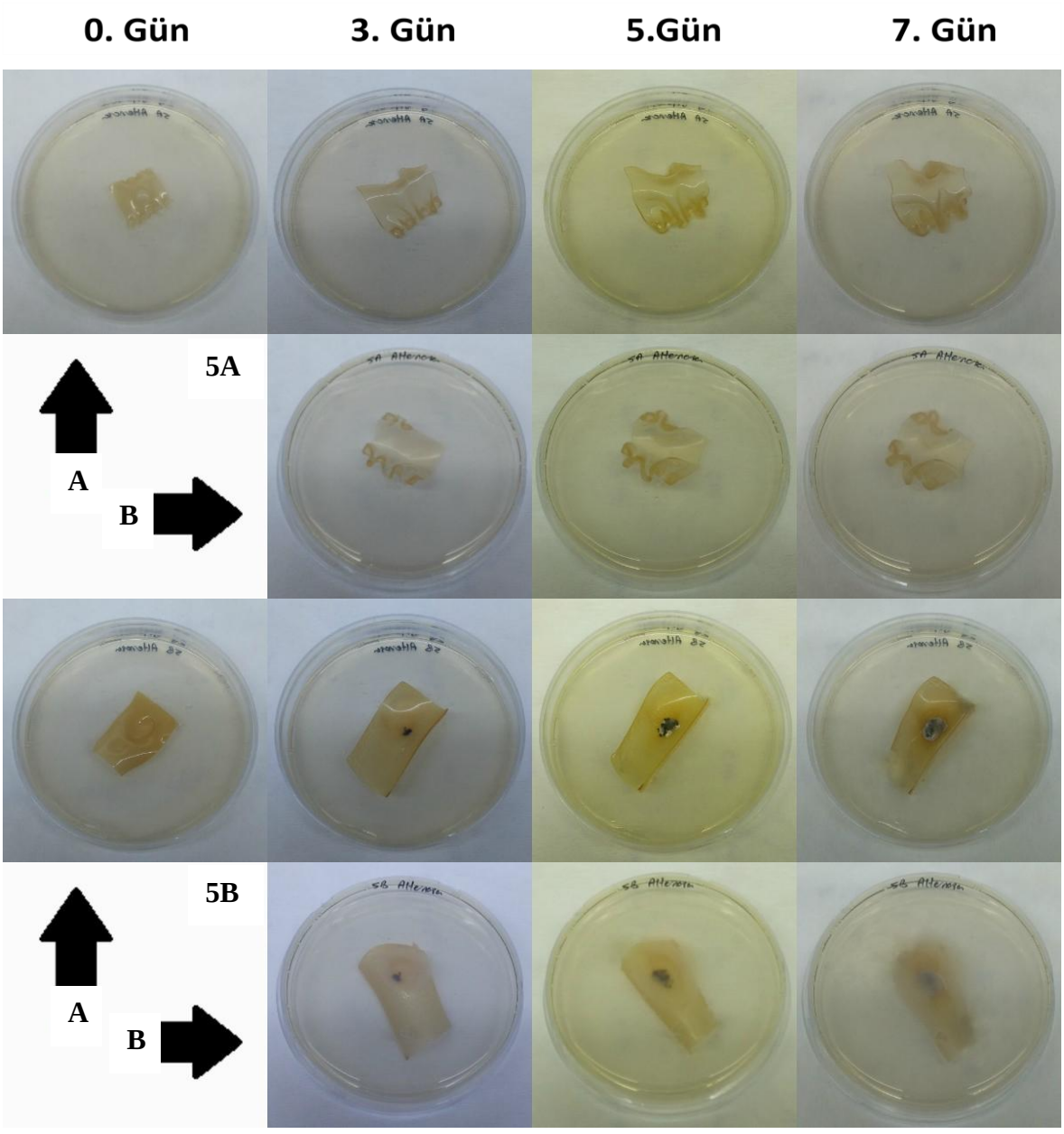
Şekil 4.70. *Alternaria arborescens* için %1 Boraks ve %3 Boraks filmlerini içeren petrilerin görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks

Şekil 4.70. incelendiğinde %1 boraks içeren film örneğinde mikroorganizma gelişiminin inkübasyonun 5. gününde, %3 boraks içeren filmi örneğinde ise mikroorganizma gelişiminin inkübasyonun 7. gününde başladığı belirlenmiştir. Buna göre boraks filmlerinde konsantrasyon artışının film yüzeyinde gelişebilecek mikroorganizma gelişimini daha uzun süre geciktirebilme potansiyeli olduğu tespit edilmiştir.



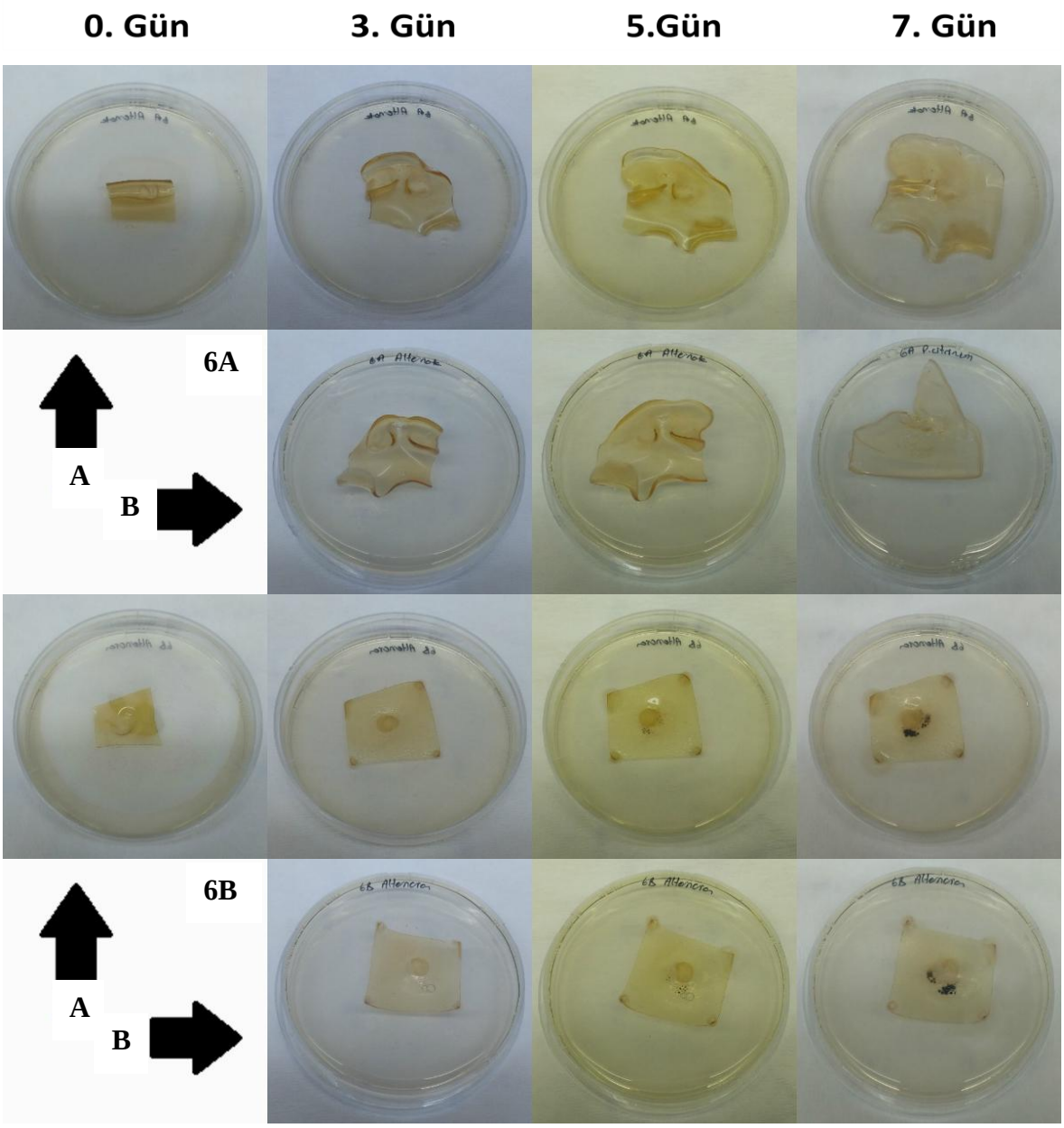
Şekil 4.71. *Alternaria arborescens* için %1 Etil pirüvat ve %3 Etil pirüvat filmlerini içeren petrilerin görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat

Şekil 4.71. incelendiğinde %1 etil pirüvat içeren film örneğinde inkübasyonun 5. günü mikroorganizma gelişimi olduğu gözlemlenirken, %3 etil pirüvat içeren film örneklerinde ise inkübasyonun 7 günü boyunca mikroorganizma gelişimine rastlanmamıştır. %1 etil pirüvat filminin inkübasyon süresi boyunca çözünmesi, antifungal etkinliğinde azalmaya neden olduğu için inkübasyonun beşinci gününde mikroorganizma gelişimine neden olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.72. *Alternaria arborescens* için %1 Bor nitrür ve %3 Bor nitrür filmlerini içeren petrilerin görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür

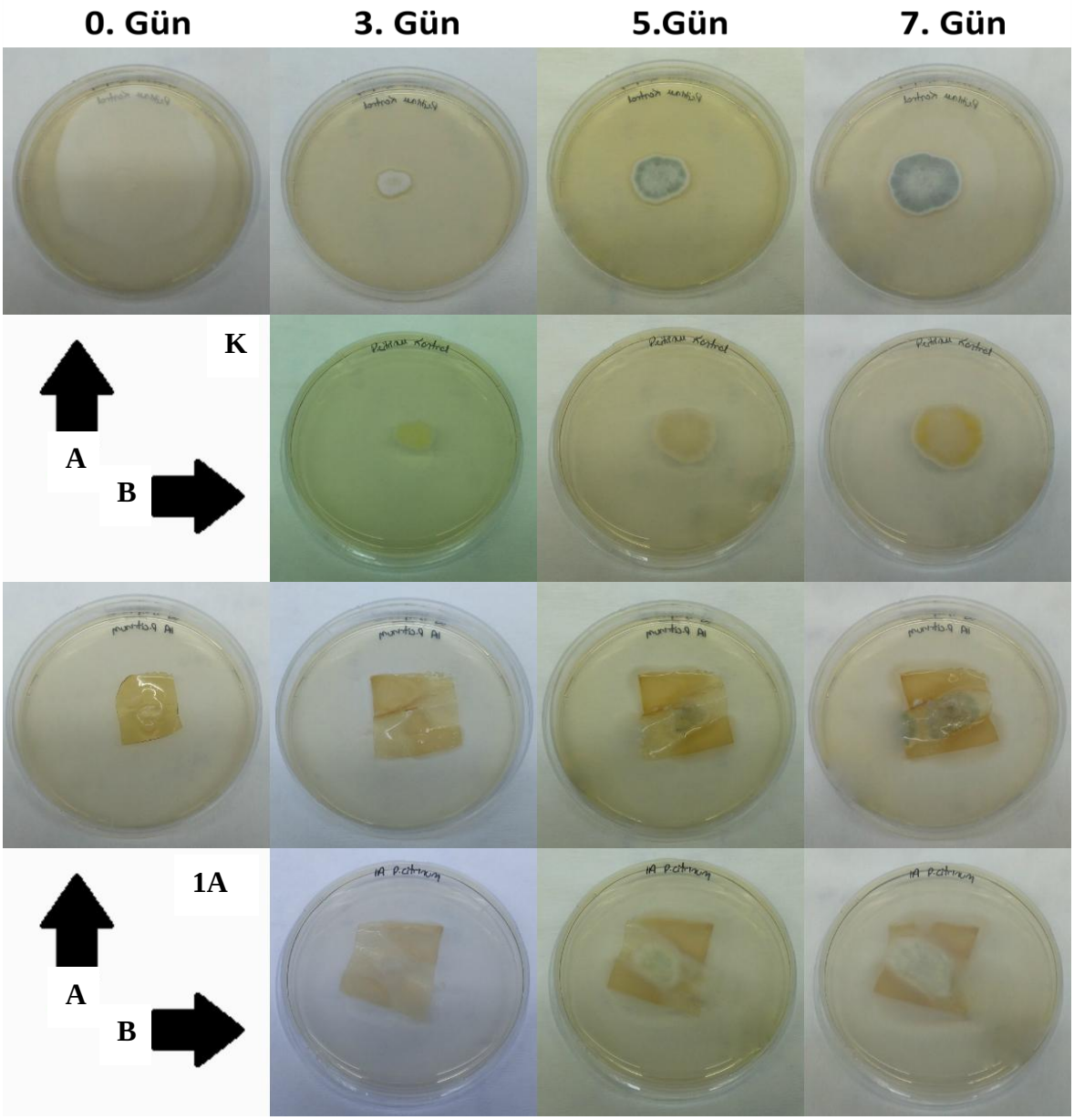
Şekil 4.72. incelendiğinde %1 bor nitrür içeren film örneğinde herhangi bir gelişim gözlemlenmezken, %3 bor nitrür içeren filmde inkübasyonun 7. gününde mikroorganizma gelişiminin olduğu tespit edilmiştir. Ancak kontrol mikroorganizma ile karşılaştırıldığında, *Alternaria arborescens* 'in %3 bor nitrür filmi yüzeyindeki gelişim çapı daha küçüktür.



Şekil 4.73. *Alternaria arborescens* için %1 Limon esansiyel yağı ve %3 Limon esansiyel yağı filmlerini içeren petrilerin görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*6A: Limon esansiyel yağı, 6B: Limon esansiyel yağı

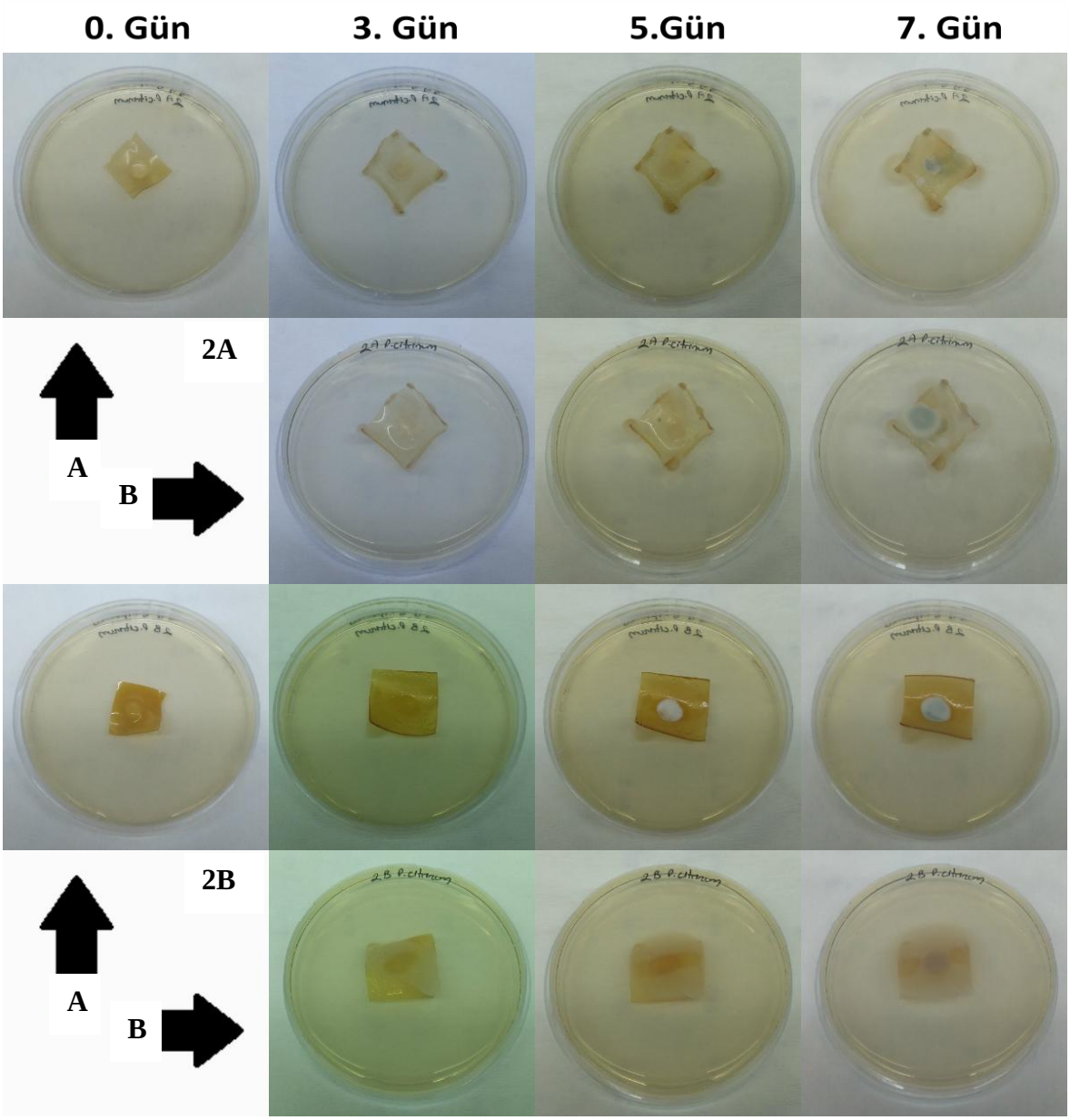
Şekil 4.73. incelendiğinde inkübasyonun 7 günü boyunca %1 limon esansiyel yağı içeren film örneğinde *Alternaria arborescens* 'in gelişmediği, buna karşın inkübasyonun 7. gününde %3 limon esansiyel yağı içeren film örneğinin yüzeyinde gelişmeye başladığı belirlenmiştir.

Filmlerin *Penicillium citrinum* 'a karşı spot ekim yöntemi ile belirlenen antibakteriyel etkisi Şekil 4.74. Şekil 4.75. Şekil 4.76. Şekil 4.77. Şekil 4.78. ve Şekil 4.79. üzerinde verilen görsellerde gösterilmektedir.



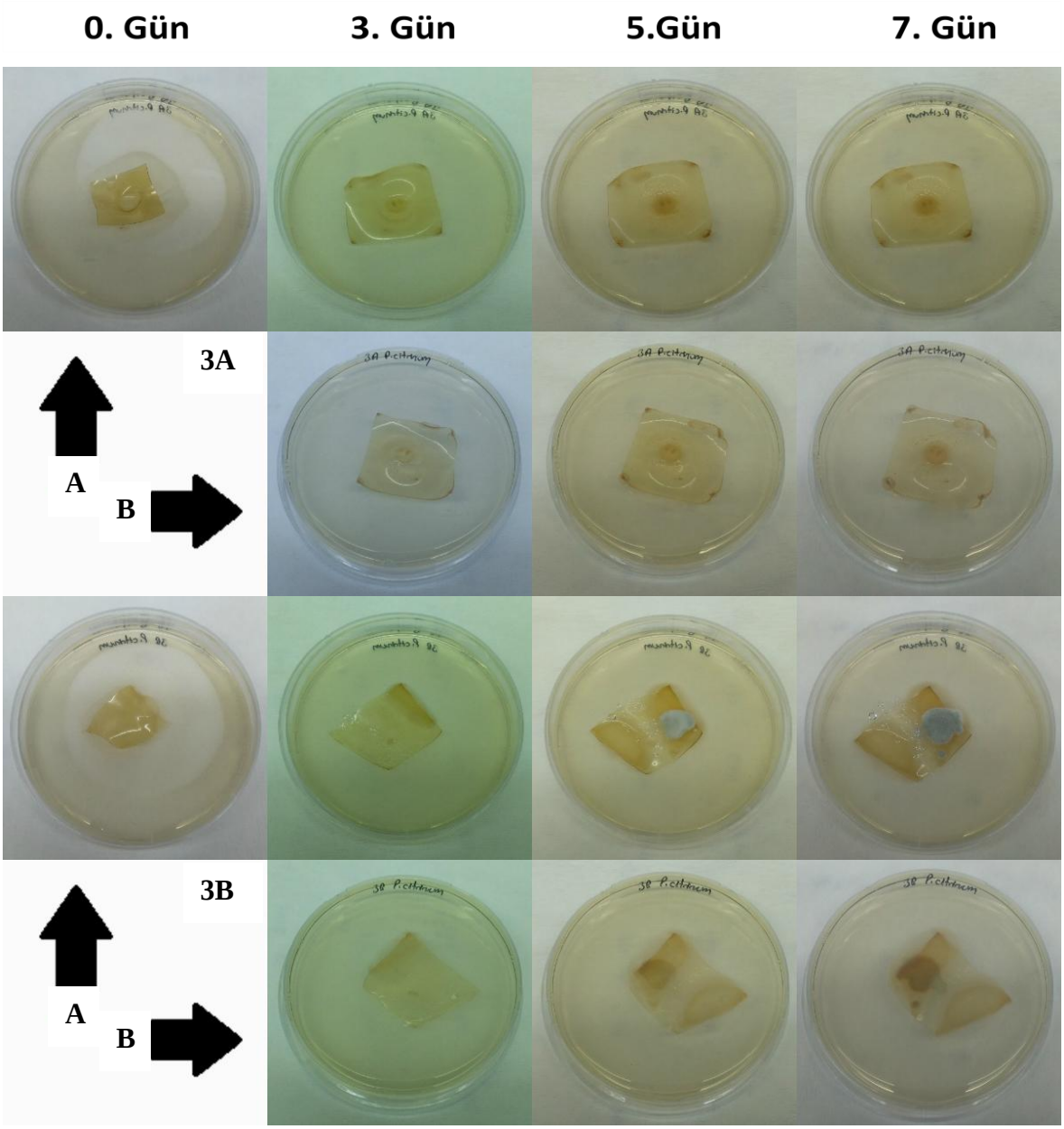
Şekil 4.74. Kontrol *Penicillium citrinum* ve kitosan filmini içeren petrilerin görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*K: Kontrol *P. citrinum*, 1A: Kitosan

Şekil 4.74 incelendiğinde *Penicillum citrinum* 'un kontrol kitosan filmini içeren petride inkübasyonun 5. gününde gelişmeye başladığı belirlenmiştir.



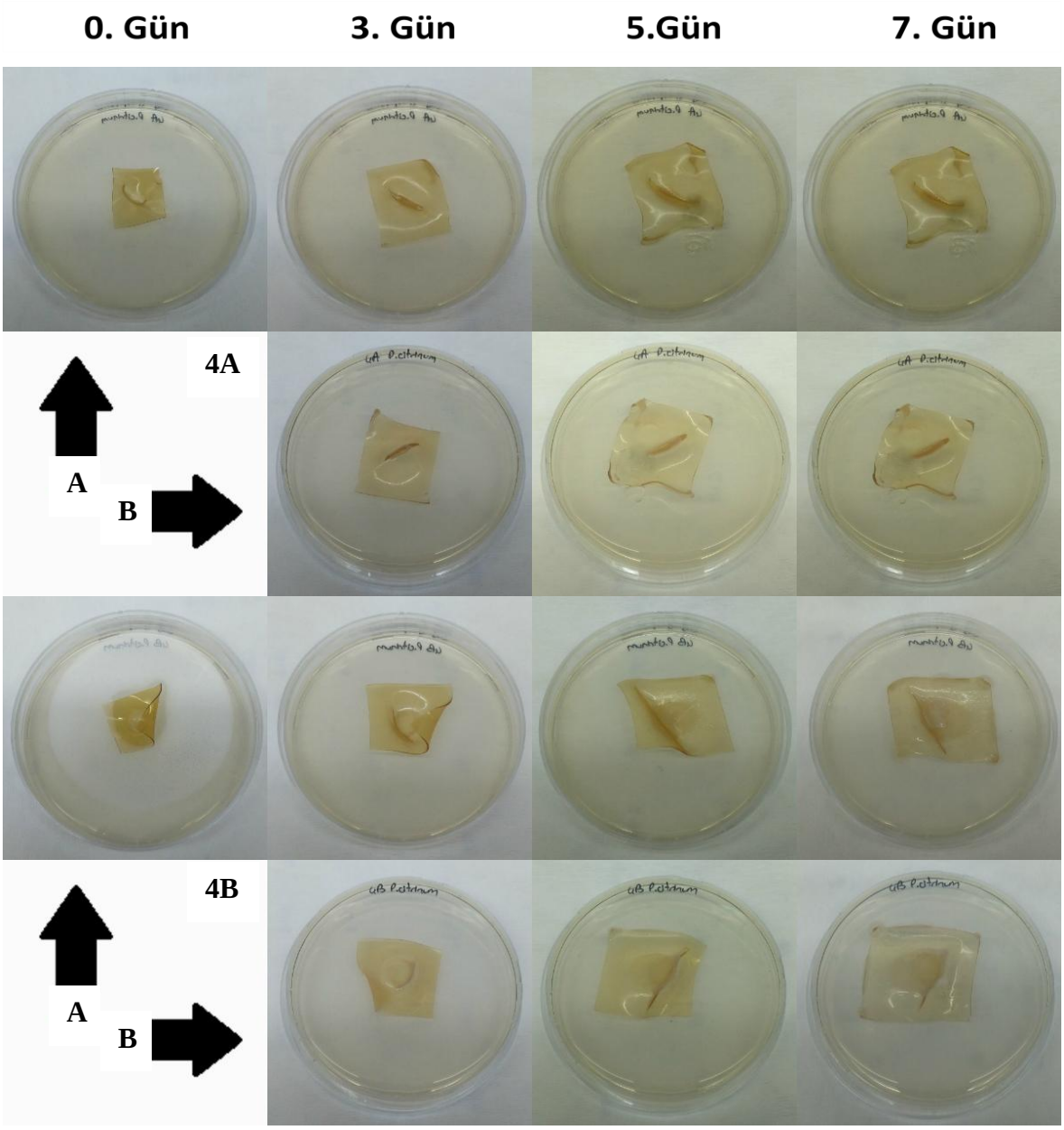
Şekil 4.75. *Penicillium citrinum* için %1 Cloisite 30B ve %3 Cloisite 30B filmlerini içeren petrilerin görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B

Şekil 4.75 incelendiğinde inkübasyonun 7. gününde %1 Cloisite 30B içeren filmde, 5. gününde ise %3 Cloisite 30B içeren filmin yüzeyinde mikroorganizma gelişimi olmuştur.



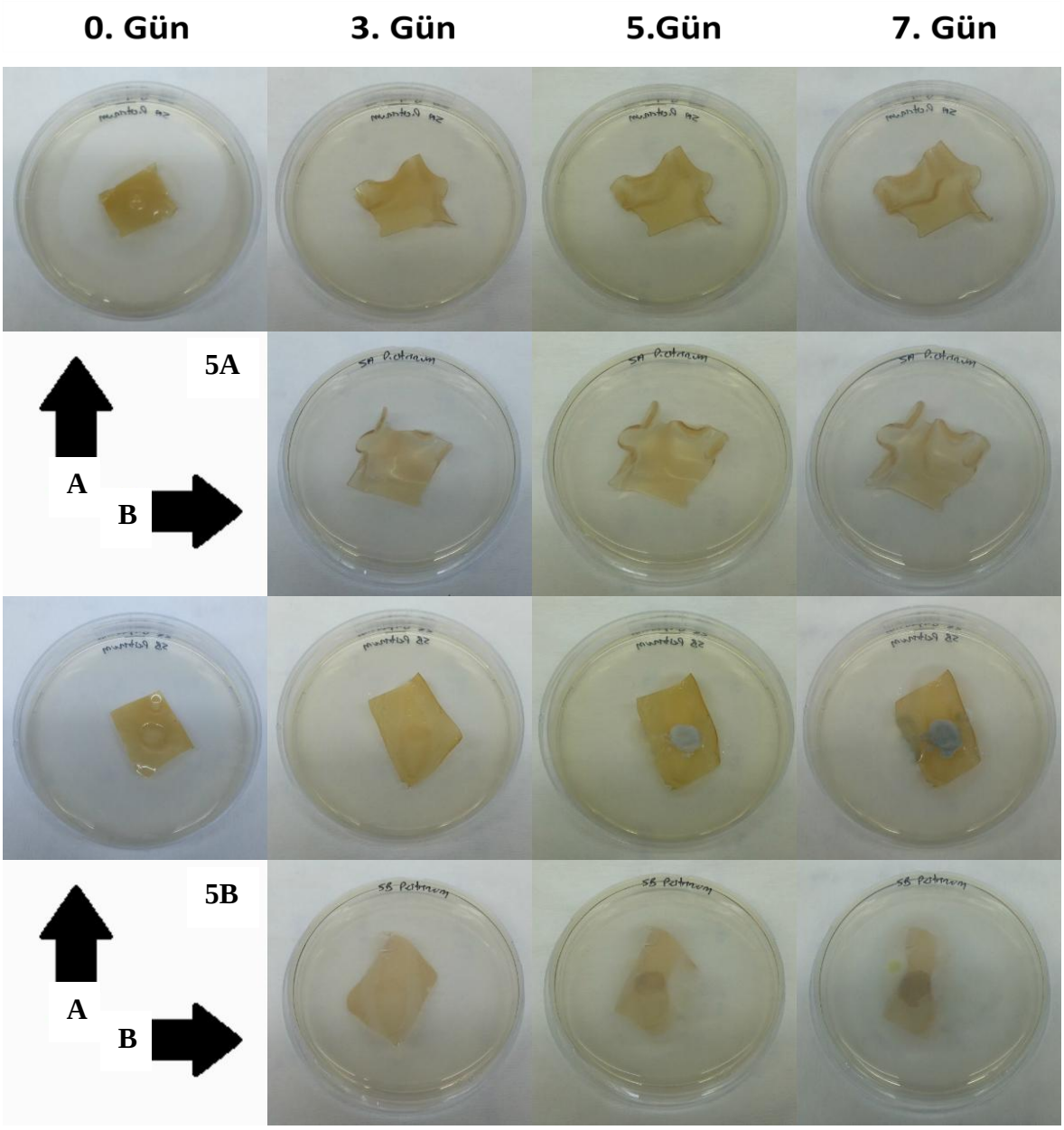
Şekil 4.76. *Penicillium citrinum* için %1 Boraks ve %3 Boraks filmlerini içeren petrilerin görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*3A: %1Boraks, 3B: %3 Boraks

Şekil 4.76. incelendiğinde %1 boraks içeren filmde 7 günlük inkübasyon boyunca mikroorganizma gelişimi gözlemlenmezken, %3 boraks filminde inkübasyonun 5. günün de mikroorganizma gelişimi olduğu belirlenmiştir.



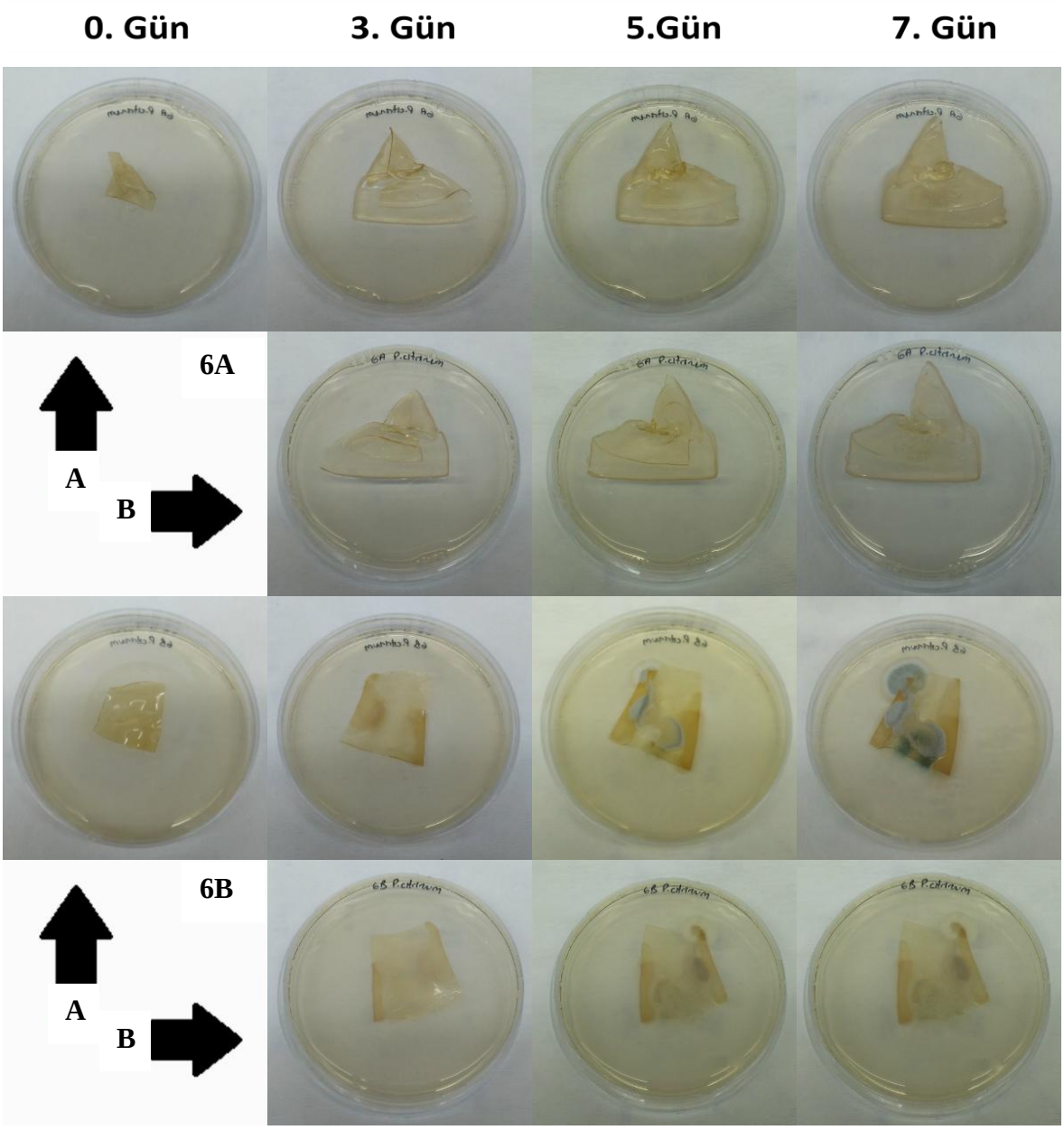
Şekil 4.77. *Penicillium citrinum* için %1 Etil pirüvat ve %3 Etil pirüvat filmlerini içeren petrilerin görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat

Şekil 4.77. incelendiğinde inkübasyonun 7 günü boyunca %1 ve %3 etil pirüvat içeren filmlerde mikroorganizma gelişimi gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.78. *Penicillium citrinum* için %1 Bor nitrür ve %3 Bor nitrür filmlerini içeren petrilerin görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür

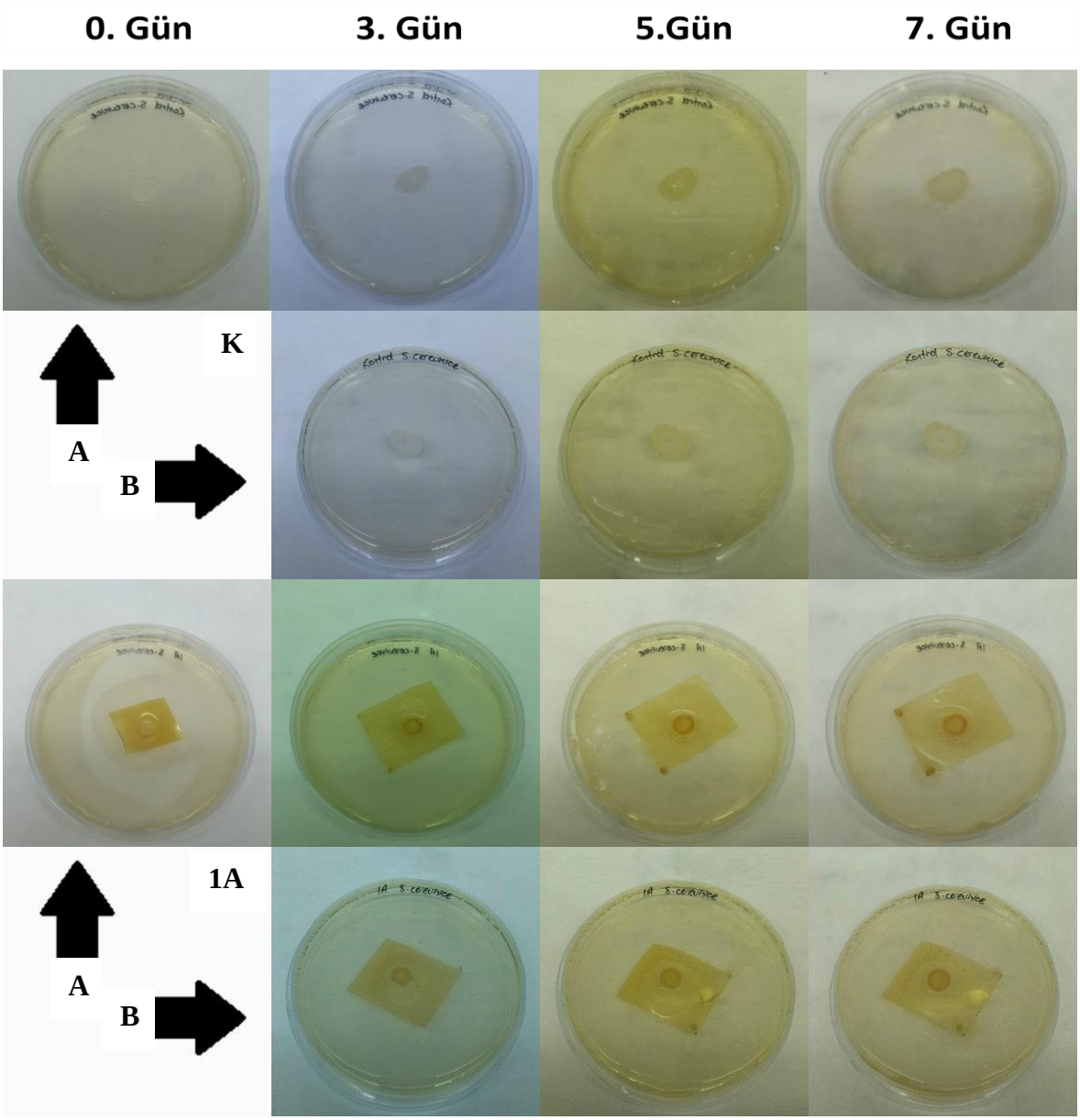
Şekil 4.78. incelendiğinde inkübasyonun 7 günü boyunca %1 bor nitrür içeren film örneğinde mikroorganizma gelişimi gözlemlenmezken, %3 bor nitrür içeren film örneğinin yüzeyinde inkübasyonun 5. gününde mikroorganizma gelişiminin olduğu gözlemlenmiştir.



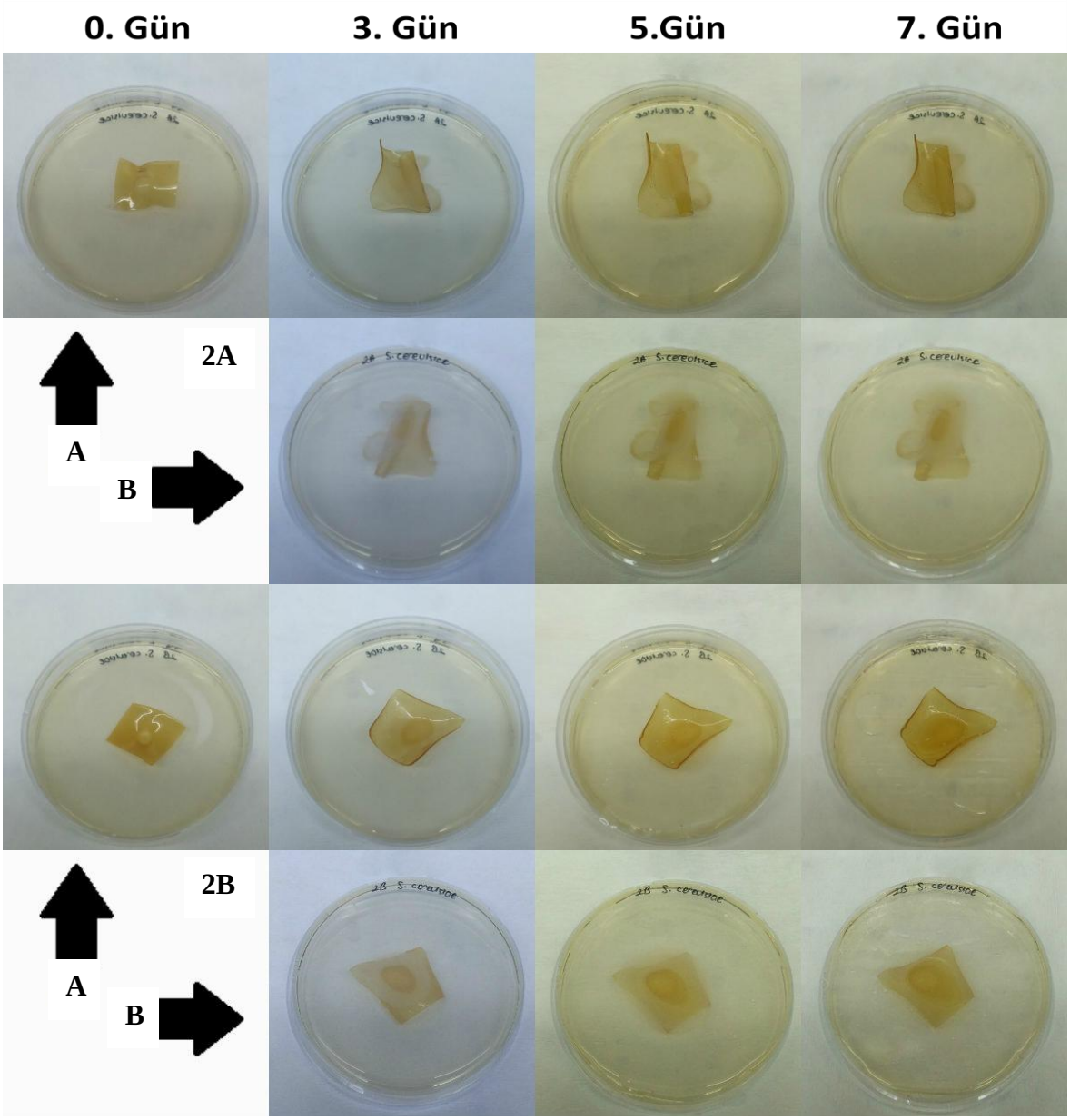
Şekil 4.79. *Penicillium citrinum* için %1 Limon esansiyel yağı ve %3 Limon esansiyel yağı filmlerini içeren petrilerin görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı

Şekil 4.79. incelendiğinde inkübasyonun 7 günü boyunca %1 limon esansiyel yağı içeren film örneğinde mikroorganizma gelişimi gözlemlenmezken, %3 limon esansiyel yağı içeren film örneğinin yüzeyinde inkübasyonun 5. gününde mikroorganizma gelişiminin olduğu gözlemlenmiştir.

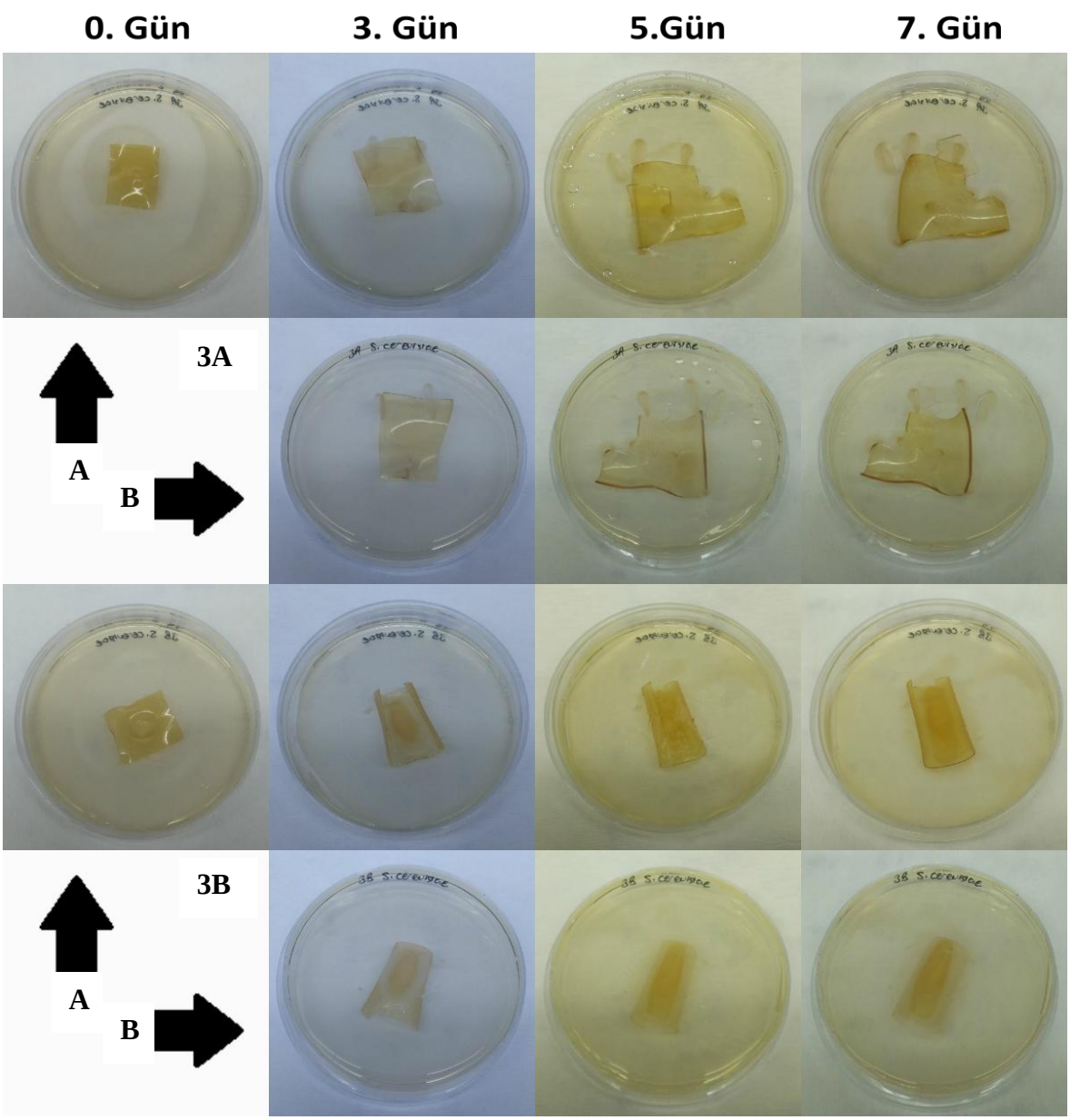
Filmlerin *Saccharomyces cerevisiae* 'a karşı spot ekim yöntemi ile belirlenen antibakteriyel etkisi Şekil 4.80. Şekil 4.81. Şekil 4.82. Şekil 4.83. Şekil 4.84. ve Şekil 4.85. üzerinde verilen görsellerde gösterilmektedir.



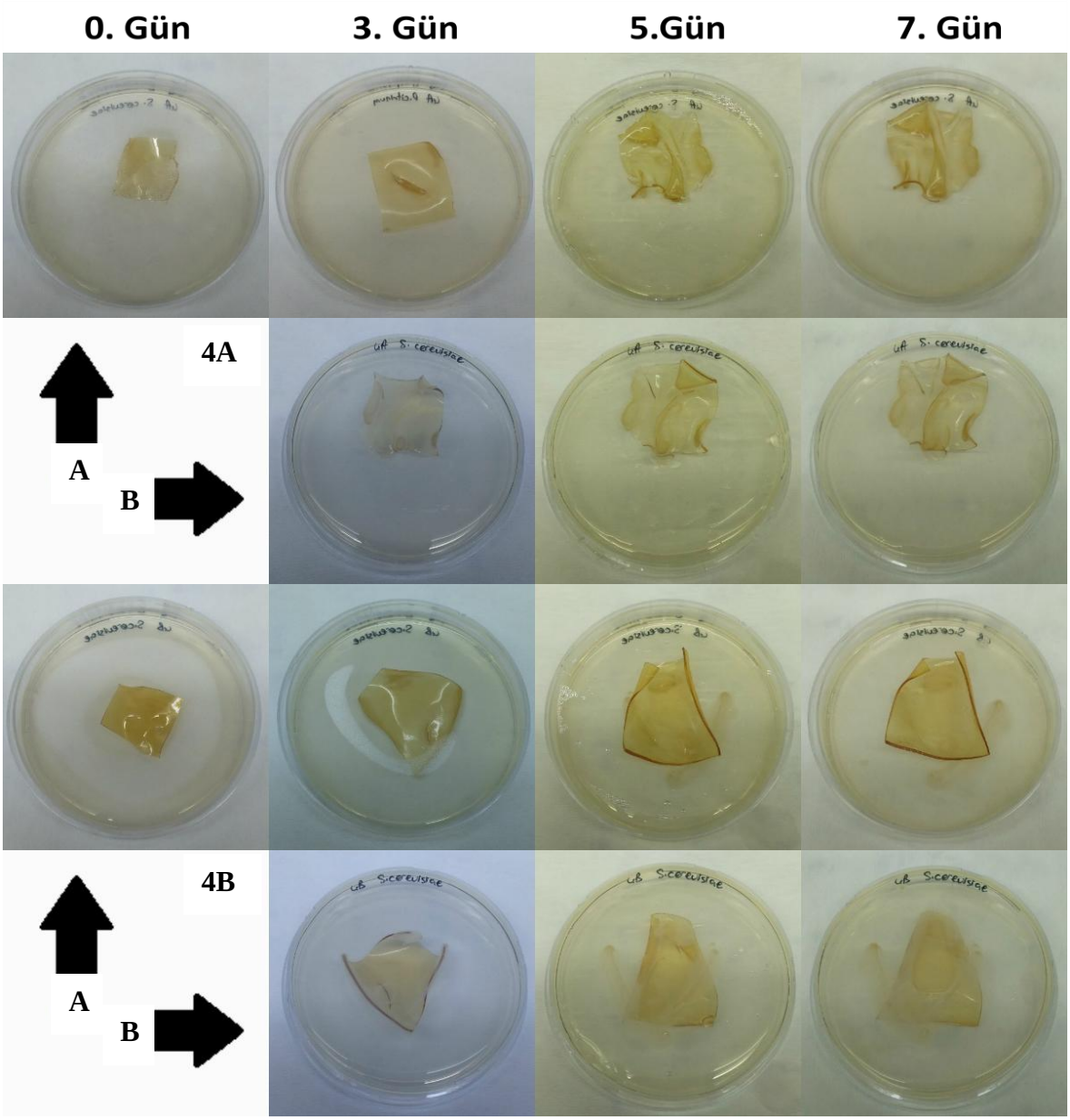
Şekil 4.80. Kontrol *Saccharomyces cerevisiae* ve kitosan filminin petri görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*K: Kontrol *Saccharomyces cerevisiae*, 1A: Kitosan



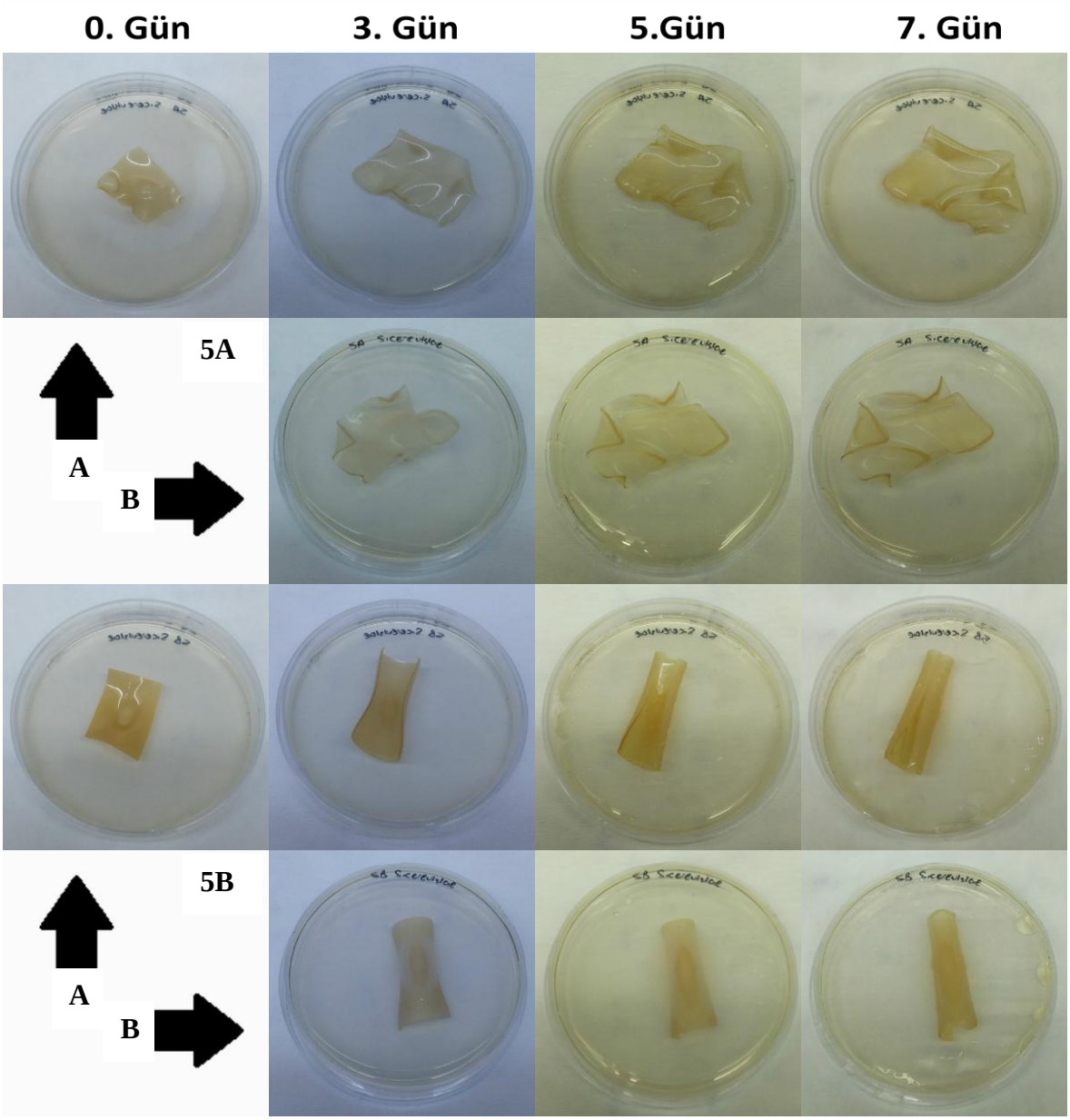
Şekil 4.81. *Saccharomyces cerevisiae* için %1 Cloisite 30B ve %3 Cloisite 30B filmlerinin petri görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*2A: %1 Cloisite 30B, 2B: %3 Cloisite 30B



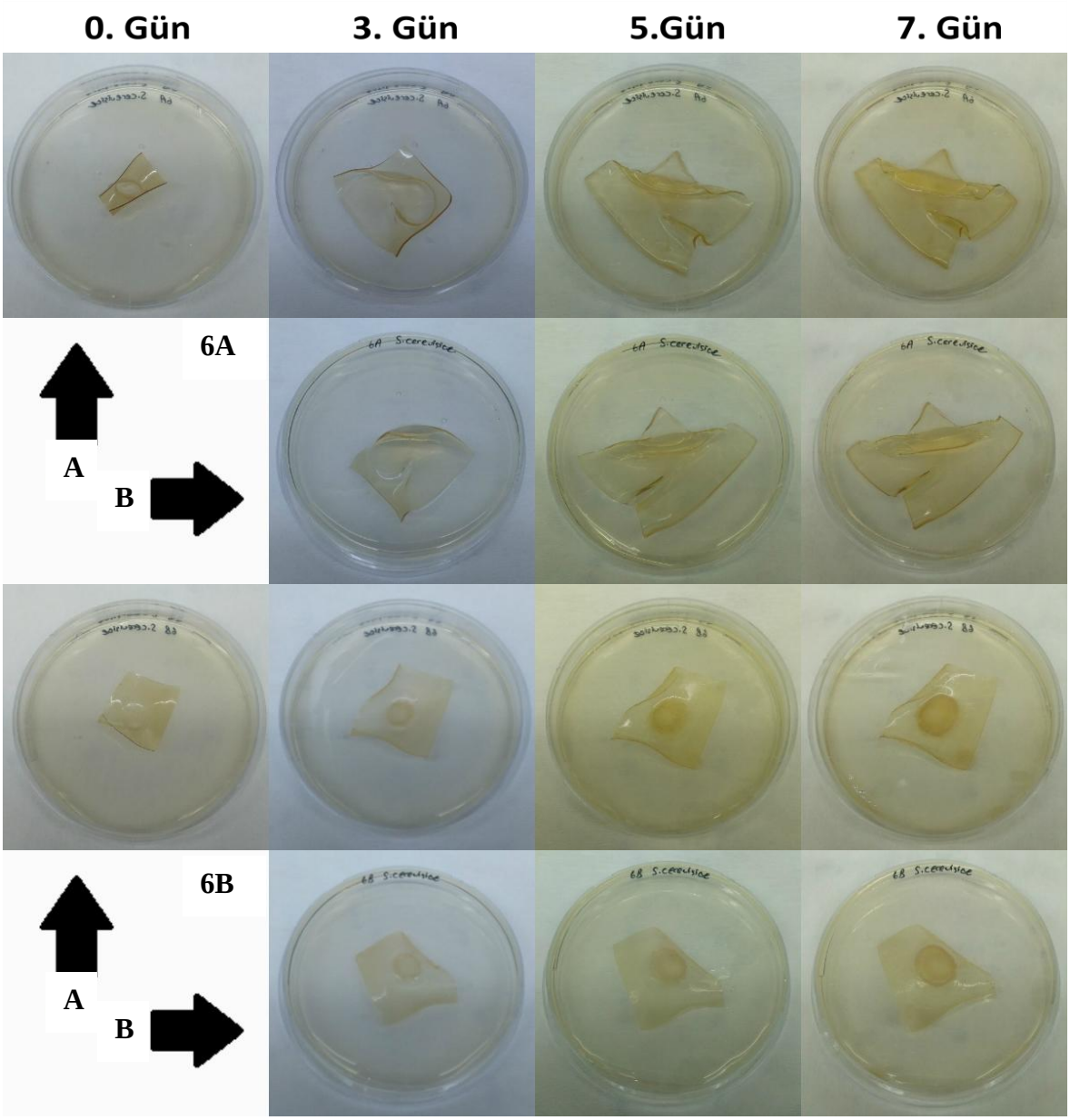
Şekil 4.82. *Saccharomyces cerevisiae* için %1 Boraks ve %3 Boraks filmlerinin petri görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*3A: %1 Boraks, 3B: %3 Boraks



Şekil 4.83. *Saccharomyces cerevisiae* için %1 Etil pirüvat ve %3 Etil pirüvat filmlerinin petri görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*4A: %1 Etil pirüvat, 4B: %3 Etil pirüvat



Şekil 4.84. *Saccharomyces cerevisiae* için %1 Bor nitrür ve %3 Bor nitrür filmlerinin petri görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*5A: %1 Bor nitrür, 5B: %3 Bor nitrür



Şekil 4.85. *Saccharomyces cerevisiae* için %1 Limon esansiyel yağı ve %3 Limon esansiyel yağı filmlerinin petri görüntüsü
*A satırı petrilerin üst yüzeyini B satırı ise filmlerin alt yüzeyinin görüntüsüdür.
*6A: %1 Limon esansiyel yağı, 6B: %3 Limon esansiyel yağı

Kontrol petrisinde 3 günlük inkübasyon süresi sonunda üreme olmuştur. Ancak filmlerin olduğu petrilerde 7 günlük inkübasyon sonunda herhangi bir mikroorganizma üretememiştir. Bundan dolayı spot ekim yöntemi ile çalışmada elde edilen tüm filmlerin *Saccharomyces cerevisiae* 'a karşı antifungal etkisi olduğu tespit edilmiştir.

BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu tez çalışmasında iki farklı konsantrasyona (%1 ve %3) sahip closite 30B, boraks, etil pirüvat, bor nitrür ve limon esansiyel yağı içeren kitosan nanokompozit filmler elde edilmiştir. Elde edilen bu filmlerin bazı fiziksel özellikleri, antioksidan aktiviteleri, biyobozunurluk ve antimikrobiyal özellikleri belirlenmiştir. Filmlerin antimikrobiyal özellikleri disk difüzyon, canlı hücre sayım ve spot ekim yöntemi olmak üzere üç farklı yöntem kullanarak belirlenmiştir.

Yapılan analizler doğrultusunda filmlerin kalınlığı 0,213-0,312 mm arasında değiştiği belirlenmiştir. En düşük film kalınlığı %1 etil pirüvat, en yüksek film kalınlığı ise %3 etil pirüvat içeren filmde tespit edilmiştir. Film nem değerleri %12,74-24,98 aralığında değişirken en düşük nem değeri %3 limon esansiyel yağı, en yüksek nem değeri ise %1 etil pirüvat filminde tespit edilmiştir. Ayrıca filmlerin suda çözünürlük değerleri %10,48-%23,21 aralığında değişim göstermektedir. En yüksek görünür yoğunluk değeri kontrol kitosan filminde, en düşük görünür yoğunluk değeri ise %3 limon esansiyel yağı içeren filmde tespit edilmiştir. Filmlerin renk değerleri incelendiğinde L*, a*, b* değerlerinin sırasıyla 73,41-85,44; -1,21-3,33; 11,83-33,75 aralığında değiştiği belirlenmiştir. En düşük beyazlık indeksi %3 Cloisite 30B, en yüksek beyazlık indeksi %1 limon esansiyel yağı içeren filmlerde; en düşük sarılık indeksi %1 limon esansiyel yağı, en yüksek sarılık indeksi kontrol filminde tespit edilmiştir.

Filmlerin biyobozunurluk özelliği incelendiğinde ise %1 etil pirüvat, %1 bor nitrür ve %1 limon esansiyel yağı içeren filmlerde distile su ve aktif çamur içerisinde tamamen kaybolduğu belirlenmiştir. En düşük çözünürlük ise %3 bor nitrür içeren filmde tespit edilmiştir. Hidroklorik asit içerisinde muhafaza edilen filmlerde en yüksek çözünürlük %3 bor nitrür, en düşük çözünürlük %1 Cloisite 30B filminde; sodyum hidroksit içerisinde muhafaza edilen filmlerde ise en yüksek çözünürlük %3 limon esansiyel yağı, en düşük çözünürlük ise %3 boraks filminde tespit edilmiştir. Ayrıca tuz çözeltisi içerisindeki filmlerden %1 Cloisite 30B, %1 boraks, %1 etil pirüvat, %1 bor nitrür ve %1 limon esansiyel yağı tuz çözeltisi içerisinde tamamen kaybolmuştur.

Filmlerde DPPH yöntemi ile belirlenen antioksidan aktivite değerleri %16,74-35,69 aralığında değişirken en yüksek antioksidan aktivite boraks flminde tespit edilmiştir. Ayrıca tüm maddelerin %1 etken madde içeren konsantrasyonları, kontrol kitosan filminden yüksek antioksidan aktivite göstermiştir.

Filmlerin antimikrobiyal etkisinin belirlenmesinde üç farklı yöntem kullanılmıştır. Buna göre disk difüzyon yöntemi ile filmlerin yüzeye transfer olan mikroorganizma gelişimine etkisi, canlı hücre sayım yöntemi ile film içerisindeki etken madde salınımı ile filmin mikroorganizma gelişimine etkisi, spot ekim yöntemiyle ise film ile kaplanmış gıdaya dışarıdan bir mikroorganizma bulaşması durumunda filmin mikroorganizmaya karşı olan etkisi belirlenmiştir.

Disk difüzyon yöntemine göre *E. coli*, *S.* Typhimurium, *B. cereus*, *S. aureus*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *A. arborescens* ve *A. flavus*'a karşı %1 limon esansiyel yağı içeren filmin en yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Buna karşın *P. digitatum*, *P. citrinum* ve *P. expansum*'a karşı en yüksek antimikrobiyal etki %1 etil pirüvat içeren kitosan filmlerde tespit edilmiştir. Canlı hücre sayım yöntemine göre ise *E. coli* için %1 boraks, *S.* Typhimurium için kontrol, *B. cereus* için %1 boraks ve *S. aureus* için %1 etil pirüvat filminin en yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. *S. cerevisiae* için %3 boraks, *C. albicans* için ise %3 limon esansiyel yağı içeren filmin en yüksek antifungal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca *P. citrinum* için %3 bor nitrür, *A. arborescens* için %1 etil pirüvat filminin en yüksek antifungal etki gösterdiği belirlenmiştir. Spot ekim yönteminde ise tüm filmlerin yüzeyinde inkübasyon süreleri boyunca herhangi bir üreme olmadığı için *S. aureus*, *S.* Typhimurium ve *S. cerevisiae* kültürlerine karşı tüm filmlerin antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu şeklinde bir değerlendirme yapılmıştır. %1 boraks, %1 etil pirüvat, %3 bor nitrür ve %3 limon esansiyel yağı içeren filmler *A. arborescens*'e karşı; kontrol, %1 Cloisite 30B, %3 Cloisite 30B, %3 boraks, %3 bor nitrür ve %3 limon esansiyel yağı içeren filmler ise *P. citrinum* 'a karşı mikroorganizma gelişimini geciktirici etki göstermiştir. 3 antimikrobiyal test yöntemi karşılaştırıldığında herbir mikroorganizma suşu için değerler de farklılık görülmüştür. Ancak filmlerin antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesinde kullanılan disk difüzyon yöntemi ile elde edilen sonuçların literatür ile daha çok paralellik gösterdiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak etil pirüvat ve limon esansiyel yağı etken maddelerinin film içerisinde kullanılması, ticari haldekine göre daha düşük antimikrobiyal aktiviteye yol açtığı belirlenmiştir. Ancak Cloisite 30B, boraks ve bor nitrürün film içerisinde kullanımı ticari haldekine göre antimikrobiyal aktivitede artışa yol açtığı belirlenmiştir.

Cloisite 30B, boraks, etil pirüvat, bor nitrür ve limon esansiyel yağı içeren filmler ile yapılacak bir sonraki çalışmalarda ürün özelliklerinin belirlenmesi sırasında birden fazla analiz methodu ile çalışılması, filmlerin farklı konsantrasyonlar da hazırlanarak optimum film özelliklerinin belirlenmesi, farklı ürün gruplarının elde edilen filmler ile kaplanması

gibi çalışmalar önerilmektedir. Ayrıca filmlerin belirlenen biyobozunurluk ve görünür yoğunluk değerleri ile gaz bariyer özelliği, termal direnci gibi mekanik özellikleri hakkında değerlendirme yapılsa da elde edilen filmlerin bu özellklerine ait spesifik analizlerin yapılması gerekmektedir. Çalışmada hazırlanan %1 limon esansiyel yağı, %1 etil pirüvat ve %1 bor nitrür filmi fungal bozulmanın sıklıkla karşılaşıldığı turunçgillerin kaplanmasında kullanılabilir.

KAYNAKLAR

Anonim 1, Sodium tetraborate decahydrate. (b.t.). Alındı Aralık 22, 2018. https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/221333?lang=en&region=TR

Anonim 2, Alfa Aesar™ Boron nitride, Refractory Brushable Paint, BN 10%. (b.t.) Alındı Aralık 22, 2018. https://www.fishersci.co.uk/shop/products/boron-nitride-refractory-brushable-paint-bn-10-2/p-7058802

Anonim 3, Ethyl pyruvate, 98%, Alfa Aesar™. (b.t.). Alındı Aralık 22, 2018. https://www.fishersci.ca/shop/products/ethyl-pyruvate-98-4/aaa1504536

Anonim 4, What About Lemon Essential Oil? – Health, Cleaning and More. (b.t.). Alındı Aralık 22, 2018. https://thenaturalwalk.com/what-about-lemon-essential-oil-health-cleaning-and-more

Achachlouei B. F., Zahedi Y., 2018. Fabrication and Characterization of CMC-based Nanocomposites Reinforced with Sodium Montmorillonite and TiO_2 Nanomaterials. Carbohydrate Polymers, 199:415-425.

Adekunte A. O., Tiwari B. K., Cullen P. J., Scannell A. G. M., O'donnell C. P., 2010. Effect of Sonication on Colour, Ascorbic Acid and Yeast Inactivation in Tomato Juice. Food Chemistry, 122(3):500-507.

Ahmed S., Ikram S., 2016. Chitosan and Gelatin Based Biodegradable Packaging Films with UV-light Protection. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 163:115-124.

Alburquenque C., Bucarey S. A., Neira-Carrillo A., Urzúa B., Hermosilla G., Tapia C. V., 2010. Antifungal Activity of Low Molecular Weight Chitosan Against Clinical Isolates of *Candida* spp. Medical Mycology, 48(8):1018-1023.

Ali A., Xie F., Yu L., Liu H., Meng L., Khalid S., Chen L., 2018. Preparation and Characterization of Starch-Based Composite Films Reinfoced by Polysaccharide-Based Crystals. Composites Part B: Engineering, 133:122-128.

Al-Naamani L., Dobretsov S., Dutta J., Burgess J. G., 2017. Chitosan-Zinc Oxide Nanocomposite Coatings for the Prevention of Marine biofouling. Chemosphere, 168:408-417.

Amalraj A., Gopi S., Thomas S., Haponiuk J. T., 2018. Cellulose Nanomaterials in Biomedical, Food, and Nutraceutical Applications: a Review. In Macromolecular Symposia, 380(1):1800115.

Arash B., Reza R. M., Mahmoud S. K., Babak G., Roya S., 2018. Physico-Mechanical and Antimicrobial Properties of Tragacanth/hydroxypropyl Methylcellulose/beeswax Edible Films Reinforced with Silver Nanoparticles. International journal of biological macromolecules.

Armentano I., Puglia D., Luzi F., Arciola C. R., Morena F., Martino S., Torre L., 2018. Nanocomposites Based on Biodegradable Polymers. Materials, 11(5):795.

Arora A., Padua G.W., 2010. Review: Nanocomposites in Food Packaging. Journal of Food Science. 75:1.

Avella M., De Vlieger J. J., Errico M. E., Fischer S., Vacca P., Volpe M. G., 2005. Biodegradable Starch/Clay Nanocomposite Flms for Food Packaging Applications. Food Chemistry, 93:467–474.

Azevedo V. M., Dias M. V., Borges S. V., Costa A. L. R., Silva E. K., Medeiros É. A. A., Nilda de Fátima F. S., 2015. Development of Whey Protein Isolate Bio-Nanocomposites: Effect of Montmorillonite and Citric Acid on Structural, Thermal, Morphological and Mechanical Properties. Food Hydrocolloids, 48:179-188.

Bahrami A., Mokarram R. R., Khiabani M. S., Ghanbarzadeh B., Salehi R., 2018. Physico-Mechanical and Antimicrobial Properties of Tragacanth/hydroxypropyl Methylcellulose/beeswax Edible Films Reinforced with Silver Nanoparticles. International Journal of Biological Macromolecules.

Benhabiles M. S., Salah R., Lounici H., Drouiche N., Goosen M. F. A., Mameri N., 2012. Antibacterial Activity of Chitin, Chitosan and Its Oligomers Prepared from Shrimp Shell Waste. Food Hydrocolloids, 29(1):48-56.

Bibi S., Jamil A., Yasin T., Rafiq M. A., Nawaz M., Price G. J., 2018. Ultrasound Promoted Synthesis and Properties of Chitosan Nanocomposites Containing Carbon Nanotubes and Silver Nanoparticles. European Polymer Journal.

Bozkurt F., Tornuk F., Toker O. S., Karasu S., Arici M., Durak M. Z., 2016. Effect of Vaporized Ethyl Pyruvate as a Novel Preservation Agent for Control of Postharvest quality and Fungal Damage of Strawberry and Cherry fruits. LWT-Food Science and Technology, 65:1044-1049.

Butnaru E., Cheaburu C. N., Yilmaz O., Pricope G. M., Vasile C., 2016. Poly (vinyl alcohol)/Chitosan/Montmorillonite Nanocomposites for Food Packaging Applications: Influence of Montmorillonite Content. High Performance Polymers, 28(10):1124-1138.

Cavallaro G., Lazzara G., Milioto S., Parisi F., Sparacino V., 2015. Thermal and Dynamic Mechanical Properties of Beeswax-halloysite Nanocomposites for Consolidating Waterlogged Archaeological Woods. Polymer Degradation and Stability, 120:220-225.

Cencetti C., Bellini D., Pavesio A., Senigaglia D., Passariello C., Virga A., Matricardi P., 2012. Preparation and Characterization of Antimicrobial Wound Dressings Based on Silver, Gellan, PVA and Borax. Carbohydrate Polymers, 90(3):1362-1370.

Chambi, H., Grosso, C., 2006. Edible Films Produced with Gelatin and Casein Cross-Linked with Transglutaminase. Food Research International, 39(4):458-466.

Chen, X., Wu, P., Rousseas, M., Okawa, D., Gartner, Z., Zettl, A., & Bertozzi, C. R. (2009). Boron nitride nanotubes are noncytotoxic and can be functionalized for interaction with proteins and cells. *Journal of the American Chemical Society*, *131*(3), 890-891.

Chen Y., Wu Y., Wang D., Li H., Wang Q., Liu Y., Chen Y., 2018. Understanding the Mechanisms of How Poly Aluminium Chloride Inhibits Short-chain Fatty Acids Production From Anaerobic Fermentation of Waste Activated Sludge. Chemical Engineering Journal, 334:1351-1360.

Chien P. J., Chou C. C., 2006. Antifungal Activity of Chitosan and Its Application to Control Post-harvest Quality and Fungal Rotting of Tankan Citrus Fruit (Citrus tankan Hayata). Journal of the Science of Food and Agriculture, 86(12):1964-1969.

Cicek H., Kocak G., Ceylan Ö., Kutluca E. A., Dikmen Z., Bütün, V., 2018. Antibacterial poly {(4-vinyl phenylboronic acid)-co-[2-(dimethylamino) ethyl methacrylate]} Copolymers and Their Application in Water-based Paints. Journal of Applied Polymer Science, 135(22):46245.

Cioffi N., Torsi L., Ditaranto N., Tantillo G., Ghibelli L., Sabbatini L., Bleve-Zacheo T., D'Alessio M., Zambonin P. G., Traversa E., 2005. Copper Nanoparticle/Polymer Composites with Antifungal and Bacteriostatic Properties. Chem. Mater, 17: 5255-5262.

Cozmuta A. M., Turila A., Apjok R., Ciocian A., Cozmuta L. M., Peter A., Benković, T., 2015. Preparation and Characterization of Improved Gelatin Films Incorporating Hemp and Sage Oils. Food Hydrocolloids, 49:144-155.

Cozzolino C. A., Campanella G., Türe H., Olsson R. T., Farris, S., 2016. Microfibrillated Cellulose and Borax as Mechanical, O_2-barrier, and Surface-Modulating Agents of Pullulan Biocomposite Coatings on BOPP. Carbohydrate Polymers, 143:179-187.

Cyras V. P., Manfredi L. B., Ton-That M. T., Vázquez A., 2008. Physical and Mechanical Properties of Thermoplastic Starch/montmorillonite Nanocomposite Films. Carbohydrate Polymers, 73(1):55-63.

Çoban Ö. E., Patır B., 2010. Antioksidan Etkili Bazı Bitki ve Baharatların Gıdalarda Kullanımı. Gı. Tekn. El. Derg., 5(2):7-19.

Da Silva M. A., Iamanaka B. T., Taniwaki M. H., Kieckbusch T. G., 2013. Evaluation of the Antimicrobial Potential of Alginate and Alginate/Chitosan Films Containing Potassium Sorbate and Natamycin. Packaging Technology and Science, 26(8):479-492.

Dananjaya S. H. S., Kumar R. S., Yang M., Nikapitiya C., Lee J., De Zoysa M., 2018. Synthesis, Characterization of ZnO-chitosan Nanocomposites and Evaluation of Its Antifungal Activity Against Pathogenic *Candida albicans*. International Journal of Biological Macromolecules, 108:1281-1288.

Dash S., Kisku S. K., Swain S. K., 2012. Effect of Nanoclay on Morphological, Thermal, and Barrier Properties of Albumin Bovine. Polymer Composites, 33(12): 2201-2206.

De Azeredo H. M., 2009. Nanocomposites for Food Packaging Applications. Food Research International, 42(9):1240-1253.

De Azeredo H. M. C., Mattoso L. H. C., McHugh, T. H., 2011. Nanocomposites in Food Packaging–a Review. In Advances in Diverse Industrial Applications of Nanocomposites. InTech.

De Elguea-Culebras G. O., Bourbon A. I., Costa M. J., Muñoz-Tebar N., Carmona M., Molina A., Vicente A. A., 2019. Optimization of a Chitosan Solution as Potential Carrier for the Incorporation of Santolina Chamaecyparissus L. solid by-product in an Edible Vegetal Coating on 'Manchego'Cheese. Food Hydrocolloids, 89:272-282.

De Silva R. T., Mantilaka M. M. M. G. P. G., Ratnayake S. P., Amaratunga G. A. J., De Silva K. N., 2017. Nano-MgO Reinforced Chitosan Nanocomposites for High Performance Packaging Applications with Improved Mechanical, Thermal and Barrier Properties. Carbohydrate Polymers, 157:739-747.

Demir A., Seventekin N., 2009. Kitin, Kitosan ve Genel Kullanım Alanları. Teks. Tekn. El. Derg., 2:92-103.

Duangmal K., Saicheua B., Sueeprasan S., 2008. Colour Evaluation of Freeze-dried Roselle Extract as a Natural Food Colorant in a Model System of a Drink. LWT-Food Science and Technology, 41(8):1437-1445.

Dufresne A., 2017. Cellulose Nanomaterial Reinforced Polymer Nanocomposites. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 29:1-8.

Duncan T. V., 2011. Applications of Nanotechnology in Food Packaging and Food Safety: Barrier Materials, Antimicrobials and Sensors. Journal of Colloid and Interface Science, 363(1):1-24.

Duran M., Aday M. S., Zorba N. N. D., Temizkan R., Büyükcan M. B., Caner C., 2016. Potential of Antimicrobial Active Packaging 'Containing Natamycin, Nisin, Pomegranate and Grape Seed Extract in Chitosan Coating'to Extend Shelf Life of Fresh Strawberry. Food and Bioproducts Processing, 98:354-363.

Dursun S., Erkan N., Yerlitaş M., 2010., Doğal Biyopolimer Bazlı (Biyobozunur) Nanokompozit Filmler ve Su Ürünlerindeki Uygulamaları. Journal of Fisheries Sciences.com, 4(1): 50-77.

Echeverría I., Eisenberg P., Mauri, A. N., 2014. Nanocomposites Films Based on Soy Proteins and Montmorillonite Processed by Casting. Journal of Membrane Science, 449:15-26.

Fabra M. J., López-Rubio A., Lagaron J. M., 2014. Biopolymers for Food Packaging Applications. In Smart Polymers and Their Applications, 476-509.

Goy R. C., Britto D. D., Assis O. B. (2009). A Review of The Antimicrobial Activity of Chitosan. Polímeros, 19(3):241-247.

Guerra I. C. D., de Oliveira P. D. L., de Souza Pontes A. L., Lúcio A. S. S. C., Tavares J. F., Barbosa-Filho J. M., de Souza E. L., 2015. Coatings Comprising Chitosan and Mentha Piperita L. or Mentha× villosa Huds Essential Oils to Prevent Common Postharvest Mold Infections and Maintain the Quality of Cherry Tomato Fruit. International Journal of Food Microbiology, 214:168-178.

Han Y., Yu M., Wang L., 2018. Soy Protein Isolate Nanocomposites Reinforced with Nanocellulose Isolated From Licorice Residue: Water Sensitivity and Mechanical Strength. Industrial Crops and Products, 117:252-259.

Hossain F., Follett P., Salmieri S., Vu K. D., Fraschini C., Lacroix M., 2019. Antifungal Activities of Combined Treatments of Irradiation and Essential Oils (EOs) Encapsulated Chitosan Nanocomposite Films in vitro and in situ Conditions. International Journal of Food Microbiology, 295:33-40.

Hsouna A. B., Halima N. B., Smaoui S., Hamdi N., 2017. Citrus Lemon Essential Oil: Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities with Its Preservative Effect Against *Listeria monocytogenes* Inoculated in Minced Beef Meat. Lipids in Health and Disease, 16(1):146.

Hu D., Wang H., Wang L., 2016. Physical Properties and Antibacterial Activity of Quaternized Chitosan/carboxymethyl cellulose Blend Films. LWT-Food Science and Technology, 65:398-405.

Jedrzejczak-Silicka M., Trukawka M., Dudziak M., Piotrowska K., Mijowska E., 2018. Hexagonal Boron Nitride Functionalized with Au Nanoparticles—Properties and Potential Biological Applications. Nanomaterials, 8(8):605.

Kanatt S. R., Rao M. S., Chawla S. P., Sharma A., 2012. Active Chitosan–Polyvinyl Alcohol Films with Natural Extracts. Food Hydrocolloids, 29(2):290-297.

Kaur P., Thakur R., Choudhary A., 2012. An in Vitro Study of the Antifungal Activity of Silver/Chitosan Nanoformulations Against Important Seed Borne Pathogens. International Journal of Scientific & Technology Research, 1(7):83-86.

Kıvanç M., Barutca B., Koparal A. T., Göncü Y., Bostancı S. H., Ay N., 2018. Effects of Hexagonal Boron Nitride Nanoparticles on Antimicrobial and Antibiofilm Activities, Cell Viability. Materials Science and Engineering: C, 91:115-124.

Kisku S. K., Swain S. K., 2012. Synthesis and Characterization of Chitosan/Boron Nitride Composites. Journal of the American Ceramic Society, 95(9):2753-2757.

Kristo E., Biliaderis C. G., 2007. Physical Properties of Starch Nanocrystal-Reinforced Pullulan Films. Carbohydrate Polymers, 68(1):146-158.

Kumar P., Sandeep K. P., Alavi S., Truong V. D., Gorga R. E., 2010. Preparation and Characterization of Bio-nanocomposite Films Based on Soy Protein Isolate and Montmorillonite Using Melt Extrusion. Journal of Food Engineering, 100(3):480-489.

Lee M. H., Kim S. Y., Park H. J., 2018. Effect of Halloysite Nanoclay on the Physical, Mechanical and Antioxidant Properties of Chitosan Films Incorporated with Clove Essential Oil. Food Hydrocolloids.

Lizárraga-Laborín L. L., Quiroz-Castillo J. M., Encinas-Encinas J. C., Castillo-Ortega M. M., Burruel-Ibarra S. E., Romero-García J., Rodríguez-Félix D. E., 2018. Accelerated Weathering Study of Extruded Polyethylene/poly (lactic acid)/chitosan films. Polymer Degradation and Stability, 155:43-51.

Lozano-Navarro J.I., Diaz-Zavala N. P., Velasco- Santos C., Melo-Banda J. A., Parama-Gorcia U., Paraguay-Delgado F., Garcio- Alamila R., Martinez-Hernande A. L., Zapien- Castillo S., 2018. Chitosan-Starch Films with Natural Extracts: Physical, Chemical, Morphological and Thermal Properties. Materials. doi:10.3390/ma11010120.

Luo M., Cao Y., Wang W., Chen X., Cai J., Wang L., Xiao J., 2019. Sustained-release Antimicrobial Gelatin Film: Effect of Chia Mucilage on Physicochemical and Antimicrobial Properties. Food Hydrocolloids, 87:783-791.

Moreira M. D. R., Pereda M., Marcovich N. E., Roura S. I., 2011. Antimicrobial Effectiveness of Bioactive Packaging Materials from Edible Chitosan and Casein Polymers: Assessment on Carrot, Cheese, and Salami. Journal of Food Science, 76(1):M54-M63.

Motamedi E., Nasiri J., Malidarreh T. R., Kalantari S., Naghavi M. R., Safari M., 2018. Performance of Carnauba Wax-Nanoclay Emulsion Coatings on Postharvest Quality of 'Valencia'Orange Fruit. Scientia Horticulturae, 240:170-178.

Nataraj D., Sakkara S., Meghwal M., Reddy N., 2018. Crosslinked Chitosan Films with Controllable Properties for Commercial Applications. International Journal of Biological Macromolecules, 120:1256-1264.

Noshirvani N., Ghanbarzadeh B., Gardrat C., Rezaei M. R., Hashemi M., Le Coz C., Coma V., 2017. Cinnamon and Ginger Essential Oils to Improve Antifungal, Physical and Mechanical Properties of Chitosan-carboxymethyl Cellulose Films. Food Hydrocolloids, 70:36-45.

Ortiz-Duarte G., Pérez-Cabrera L. E., Artés-Hernández F., Martínez-Hernández G. B., 2019. Ag-chitosan Nanocomposites in Edible Coatings Affect the Quality of Fresh-Cut Melon. Postharvest Biology and Technology, 147:174-184.

Othman S. H., 2014. Bio-nanocomposite Materials for Food Packaging Applications: Types of Biopolymer and Nano-sized Filler. Agriculture and Agricultural Science Procedia, 2: 296-303.

Ölçer H., Akın B., 2008. Starch: Biosynthesis, Granule Structure and Genetic Modifications. DPÜ Fe. Bil. Ens. Derg., 16: ISSN 1302- 3055.

Özcan, G., Demirel Zorba N. N., 2016. Combined Effect of Ultrasound and Essential Oils to Reduce *Listeria monocytogenes* on Fresh Produce. Food Science and Technology International, 22(4):353-362.

Park S., Stan S. D. Darschel M. A., Zhao Y., 2005. Antifungal Coatings on Fresh Strawberries (Fragaria × ananassa) to Control Mold Growth During Cold Storage. Journal of Food Science, 70: 4.

Pathare P. B., Opara U. L., Al-Said F. A. J., 2013. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: a Review. Food and Bioprocess Technology, 6(1):36-60.

Pelissari F. M., Grossmann M. V., Yamashita F., Pineda E. A. G., 2009. Antimicrobial, Mechanical, and Barrier Properties of Cassava Starch-Chitosan Films Incorporated with Oregano Essential Oil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(16):7499-7504.

Peña A., Sánchez N. S., Calahorra M., 2013. Effects of Chitosan on *Candida albicans*: Conditions for Its Antifungal Activity. BioMed Research International.

Peng Y., Li Y., 2014. Combined Effects of Two Kinds of Essential Oils on Physical, Mechanical and Structural Properties of Chitosan Films. Food Hydrocolloids, 36:287-293.

Perdones Á., Escriche I., Chiralt A.,Vargas M., 2016. Effect of Chitosan–Lemon Essential Oil Coatings on Volatile Profile of Strawberries During Storage. Food chemistry, 197:979-986.

Perinelli D. R., Fagioli L., Campana R., Lam J. K., Baffone W., Palmieri G. F., Bonacucina G., 2018. Chitosan-based Nanosystems and Their Exploited Antimicrobial Activity. European Journal of Pharmaceutical Sciences.

Polat S., Fenercioğlu H., 2014. Gıda Ambalajlarında Nanoteknoloji Uygulamaları: İnorganik Nanopartiküllerin Kullanımı. Gıda/The Journal of Food, 39(3).

Popović S. Z., Lazić V. L., Hromiš N. M., Šuput D. Z., Bulut S. N., 2018. Biopolymer Packaging Materials for Food Shelf-Life Prolongation. In Biopolymers for Food Design, 223-277.

Prasad P., Kochhar A., 2014. Active Packaging in Food Industry: a Review. Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology, 8(5):1-7.

Quintero R. I., Galotto M. J., Rodriguez F., Guarda, A., 2014. Preparation and Characterization of Cellulose Acetate Butyrate/Organoclay Nanocomposites Produced by Extrusion. Packaging Technology and Science, 27(6):495-507.

Rahvalı F., 2016. Kitosan/Farklı Tip Cloisite ile Nanokompozit Filmlerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Türkiye.

Rancic A., Sokovic M., van Griensven L. J. L. D., Vukojevic J., Brkic D., Ristic M., 2003. Antimicrobial Action of Limonene. Matières Médicales (Belgrade), 23:83-88.

Rhim J. W., Ng P. K., 2007. Natural Biopolymer-Based Nanocomposite Films for Packaging Applications. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 47(4):411-433.

Rhim J. W., Hong S. I., Park H. M., Ng, P. K., 2006. Preparation and Characterization of Chitosan-based Nanocomposite Films with Antimicrobial Activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(16):5814-5822.

Rhim J. W., Lee S. B., Hong S. I., 2011. Preparation and Characterization of Agar/Clay Nanocomposite Films: The Effect of Clay Type. Journal of Food Science, 76(3): N40-N48.

Roller S., Covill N., 1999. The Antifungal Properties of Chitosan in Laboratory Media and Apple Juice. International Journal of Food Microbiology, 47(1-2):67-77.

Roy Choudhury S., Goswami A., 2013. Supramolecular Reactive Sulphur Nanoparticles: a Novel and Efficient Antimicrobial Agent. Journal of applied microbiology, 114(1): 1-10.

Sahraee S., Milani J. M., Ghanbarzadeh B., Hamishehkar H., 2017. Effect of Corn Oil on Physical, Thermal, and Antifungal Properties of Gelatin-Based Nanocomposite Films Containing Nano Chitin. LWT-Food Science and Technology, 76:33-39.

Saita K., Nagaoka S., Shirosaki T., Horikawa M., Matsuda S., Ihara H., 2012. Preparation and Characterization of Dispersible Chitosan Particles with Borate Crosslinking and Their Antimicrobial and Antifungal Activity. Carbohydrate Research, 349:52-58.

Salarbashi D., Tafaghodi M., Bazzaz B. S. F., Bazeli J., 2018. Characterization of a Green Nanocomposite Prepared from Soluble Soy Bean Polysaccharide/Cloisite 30B and Evaluation of Its Toxicity. International Journal of Biological Macromolecules, 120: 109-118.

Sánchez-González L., Cháfer M., Chiralt A., González-Martínez C., 2010. Physical Properties of Edible Chitosan Films Containing Bergamot Essential Oil and Their Inhibitory Action on *Penicillium italicum*. Carbohydrate Polymers, 82(2):277-283.

Schmid M., Müller K., 2019. Whey Protein-Based Packaging Films and Coatings. In Whey Proteins, 407-437.

Sébastien F., Stéphane G., Copinet A., Coma V., 2006. Novel Biodegradable Films Made From Chitosan and Poly (lactic acid) with Antifungal Properties Against Mycotoxinogen Strains. Carbohydrate Polymers, 65(2):185-193.

Shah A., Hussain I., Murtaza G., 2018. Chemical Synthesis and Characterization of Chitosan/Silver Nanocomposites Films and Their Potential Antibacterial Activity. International Journal of Biological Macromolecules, 116:520-529.

Shankar S., Rhim J. W., 2018. Preparation of Sulfur Nanoparticle-Incorporated Antimicrobial Chitosan Films. Food Hydrocolloids, 82:116-123.

Silvestre C., Duraccio D., Cimmino S., 2011. Food Packaging Based on Polymer Nanomaterials. Progress in Polymer Science, 36(12):1766-1782.

Singh K., Mishra A., Sharma D., Singh K., 2019. Antiviral and Antimicrobial Potentiality of Nano Drugs. In Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems,343-356.

Siripatrawan U., Harte B. R., 2010. Physical Properties and Antioxidant Activity of an Active Film From Chitosan Incorporated with Green Tea Extract. Food Hydrocolloids, 24(8):770-775.

Siriprom W., Sangwaranatee N., Tongwanichniyom S., Aminah N. S., Teanchai K., Chamchoi N., 2018. Antibacterial Effects of Biodegradable Chitosan-Papia Undulata Shell Composite Films. Materials Today: Proceedings, 5(7):14799-14802.

Sodeifian G., Nikooamal H. R., Yousefi A. A., 2012. Molecular Dynamics Study of Epoxy/clay Nanocomposites: Rheology and Molecular Confinement. Journal of Polymer Research, 19(6):9897.

Soni B., Mahmoud B., Chang S., El-Giar E. M., 2018. Physicochemical, Antimicrobial and Antioxidant Properties of Chitosan/TEMPO Biocomposite Packaging Films. Food Packaging and Shelf Life, 17:73-79.

Sothornvit R., Hong S. I., An D. J., Rhim J. W., 2010. Effect of Clay Content on the Physical and Antimicrobial Properties of Whey Protein Isolate/Organo-Clay Composite Films. LWT-Food Science and Technology, 43(2):279-284.

Sothornvit R., Rhim J. W., Hong S. I., 2009. Effect of Nano-Clay Type on the Physical and Antimicrobial Properties of Whey Protein Isolate/Clay Composite Films. Journal of Food Engineering, 91(3):468-473.

Sukyai P., Anongjanya P., Bunyahwuthakul N., Kongsin K., Harnkarnsujarit N., Sukatta U., Chollakup R., 2018. Effect of Cellulose Nanocrystals From Sugarcane Bagasse on Whey Protein Isolate-Based Films. Food Research International, 107:528-535.

Sun T., Zhou D., Xie J., Mao F., 2007. Preparation of Chitosan Oligomers and Their Antioxidant Activity. European Food Research and Technology, 225(3-4):451-456.

Swain S. K., Dash S., Behera C., Kisku S. K., Behera L., 2013. Cellulose Nanobiocomposites with Reinforcement of Boron Nitride: Study of Thermal, Oxygen Barrier and Chemical Resistant Properties. Carbohydrate Polymers, 95(2): 728-732.

Tabesh E., Salimijazi H., Kharaziha M., Hejazi M., 2018. Antibacterial Chitosan-Copper Nanocomposite Coatings for Biomedical Applications. Materials Today: Proceedings, 5(7):15806-15812.

Tayel A. A., Moussa S., Wael F., Knittel D., Opwis K., Schollmeyer E., 2010. Anticandidal Action of Fungal Chitosan Against *Candida albicans*. International Journal of Biological Macromolecules, 47(4):454-457.

Tekin O., 2007. Eş-anlı Polimerizasyon ile Kil Modifikasyonu. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniversitesi, Türkiye.

Thomidis T., Exadaktylou E., 2010. Effect of Boron on the Development of Brown Rot (Monilinia laxa) on Peaches. Crop Protection, 29(6):572-576.

Tornuk F., Durak M. Z., 2015. A Novel Method for Fresh-Cut Decontamination: Efficiency of Vaporized Ethyl Pyruvate in Reducing *Staphylococcus aureus* and *E scherichia coli* O157: H7 from Fresh Parsley. Journal of Food Processing and Preservation, 39(6):1518-1524.

Tsai G. J., Zhang S. L., Shieh P. L., 2004. Antimicrobial Activity of a Low-Molecular-Weight Chitosan Obtained From Cellulase Digestion of Chitosan. Journal of Food Protection, 67(2):396-398.

Tuyen C. K., Nguyen M. H., Roach P. D., 2010. Effects of Spray Drying Conditions on the Physicochemical and Antioxidant Properties of the Gac (Momordica cochinchinensis) Fruit Aril Powder. Journal of Food Engineering, 98(3):385-392.

Tüğen A., 2018. Farklı Oranlarda Limon Yağı Katılmış Jelatin-Kitosan Filmlerinin Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi. Ege Üniversitesi, Türkiye.

Ulloa L., Ochani M., Yang H., Tanovic M., Halperin D., Yang R., Tracey K. J., 2002. Ethyl pyruvate Prevents Lethality in Mice with Established Lethal Sepsis and Systemic Inflammation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(19): 12351-12356.

Uran H., Çetin, B., 2018. Etil Pirüvat Buharının Tavuk Etinin Raf Ömrü Üzerine Etkisi. European Journal of Science and Technology, (14):255-260.

Valapa R. B., Loganathan S., Pugazhenthi G., Thomas S., Varghese T. O., 2017. An Overview of Polymer–Clay Nanocomposites. In Clay-Polymer Nanocomposites, 29-81.

Wang D., Shuai K., Xu Q., Liu X., Li Y., Liu Y., Yang Q., 2018. Enhanced Short-chain Fatty Acids Production From Waste Activated Sludge by Combining Calcium Peroxide with Free Ammonia Pretreatment. Bioresource Technology, 262:114-123.

Xiong H., Tang S., Tang H., Zou P., 2008. The Structure and Properties of a Starch-Based Biodegradable Film. Carbohydrate Polymers, 71(2):263-268.

Yen M. T., Yang J. H., Mau J. L., 2008. Antioxidant Properties of Chitosan from Crab Shells. Carbohydrate Polymers, 74(4):840-844.

Younes I., Sellimi S., Rinaudo M., Jellouli K., Nasri M., 2014. Influence of Acetylation Degree and Molecular Weight of Homogeneous Chitosans on Antibacterial and Antifungal Activities. International Journal of Food Microbiology, 185:57-63.

Youssef A. M., Abou-Yousef H., El-Sayed S. M., Kamel, S. (2015). Mechanical and Antibacterial Properties of Novel High Performance Chitosan/Nanocomposite Films. International journal of biological macromolecules, 76, 25-32.

Zhang B., Wang D. F., Li H. Y., Xu Y., Zhang L., 2009. Preparation and Properties of Chitosan–Soybean Trypsin Inhibitor Blend Film with Anti-*Aspergillus flavus* Activity. Industrial Crops and Products, 29(2-3):541-548.

Zhang X., Xiao G., Wang Y., Zhao Y., Su H., Tan T., 2017. Preparation of Chitosan-TiO_2 Composite Film with Efficient Antimicrobial Activities Under Visible Light for Food Packaging Applications. Carbohydrate Polymers, 169:101-107.

Zhao Y., Teixeira J. S., Gänzle M. M., Saldaña M. D., 2018. Development of Antimicrobial Films Based on Cassava Starch, Chitosan and Gallic Acid Using Subcritical Water Technology. The Journal of Supercritical Fluids, 137:101-110.

Zheng L. Y., Zhu J. F., 2003. Study on Antimicrobial Activity of Chitosan with Different Molecular Weights. Carbohydrate Polymers, 54(4):527-530.

Zhu C., Wang H., Mahmood Z., Wang Q., Ma H., 2018. Biocompatibility and Biodegradability of Polyacrylate/ZnO Nanocomposite During the Activated Sludge Treatment Process. PloS One, 13(11):e0205990.

Ziani K., Fernández-Pan I., Royo M., Maté J. I., 2009. Antifungal Activity of Films and Solutions Based on Chitosan Against Typical Seed Fungi. Food Hydrocolloids, 23(8):2309-2314.

Zivanovic S., Chi S., Draughan A. F., 2005. Antimicrobial Activity of Chitosan Films Enriched with Essential Oils. Journal of Food Science. 70:1.

EKLERİ

EK 1. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

1.1.Tryptic Soy Broth (TSB)

Ek Çizelge 1. üzerinde içeriği belirtilen toz besiyeri, 30 g/L olacak şekilde distile suda çözündürüldükten sonra 25 °C de pH 7.3±0.2 ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

Ek Çizelge 1. TSB toz beiyeri içerik listesi

İçindekiler	**Miktar (g/L)**
Kazein	17.0
Soya bean	3.0
Sodyum klorit	5.0
Dipotasyum hidrojen fosfat	2.5
Glikoz	2.5

1.2.Tryptic Soy Agar (TSA)

30 g/L hazırlanan TSB besiyerine, %1.5 olacak şekilde agar ilave edilerek distile suda çözündürülmüştür. 25 °C'de pH 7.3±0.2 ayarlandıktan sonra 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

1.3.Potato Dextrose Broth (PDB)

Ek Çizelge 2. üzerinde içeriği belirtilen toz besiyeri, 24 g/L olacak şekilde distile suda çözündürüldükten sonra 25 °C de pH 5.1±0.2 ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

Ek Çizelge 2. PDB toz besiyeri içerik listesi

İçindekiler	**Miktar (g/L)**
Patates Nişastası	4.0
Dekstrose	20.0

1.4. Potato Dextrose Agar (PDA)

24 g/L hazırlanan PDB besiyerine, %1.5 olacak şekilde agar ilave edilerek distile suda çözündürülmüştür. 25 °C'de pH 5.1±0.2 ayarlandıktan sonra 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

1.5. Sabouraud Dextrose Broth (SDB)

30.0 g/L olacak şekilde ayarlanan dehidre besiyeri distile suda çözündürüldükten sonra pH 5.6±0.2 ayarlanmıştır. 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

1.6. Mueller Hinton Agar (MHA)

Ek Çizelge 3. Üzerinde belirtilen toz besiyeri, 34.0 g/L olacak şekilde ayarlanarak distile suda çözündürüldükten sonra pH 7.4±0.2 ayarlanmıştır. Sterilizasyon 115 °C sıcaklıkta 10 dakika süre ile gerçekleştirilmiştir.

Ek Çizelge 3. MHA toz besiyeri içerik listesi

İçindekiler	**Miktar (g/L)**
Et infüzyonu	2.0
Kazein hidrolizat	17.5
Nişasta	1.5
Agar	13.0

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Burcu KAYA

Doğum Yeri: Osmangazi

Doğum Tarihi: 25.09.1995

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği, 2014-2017 (3,40/4,00)
Ordu Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği, 2013-2014

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, 2017-2019 (3,86/4,00)

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI -Diğer

Kaya B. ve Zorba N. N., 2018. Farklı Su Aktivitesine Sahip Çeşitli Gıdalarda Küf ve Maya Yükünün Belirlenmesi İçin Kullanılan DRBC ve DG18 Besiyerlerinin Etkinliğinin Karşılaştırılması,*Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, *8*(2), 206-214.

b) Bildiriler -Uluslararası –Ulusal

Kaya B. ve Zorba N. N., 2019. Phenotypic Identification of Potential Mycotoxin Producing Alternaria Species Isolated from Bozcaada Karalahna and Çavus Grapes. 1st International Erciyes Agriculture, Animal and Food Sciences Conference, 24-27 Nisan 2019, Talas, Kayseri, Türkiye, Poster Sunum, ISBN 978-605-031-099-3:14.

Kaya B. ve Zorba N. N., 2019. Determination of Antibacterial and Antifungal Properties of Chitosan Based Nanocomposite Films Prepared with Borax and Boron Nitride. 1st International Erciyes Agriculture, Animal and Food Sciences Conference, 24-27 Nisan 2019, Talas, Kayseri, Türkiye, Sözlü Sunum, ISBN 978-605-031-099-3:11.

b) Katıldığı Projeler

ÇOMÜ-BAP-2019/2709- Çiğ Sütlerden Elde Edilen Enterobacteriaceae İzolatlarının Genişlemiş Spektrumlu BetaLaktamaz, AmpC batalaktamaz ve Karbapenemaz Aktivitesinin ve Biyofilm Özelliklerinin Araştırılması, Araştırmacı (2019- Devam Ediyor)

ÇOMÜ-BAP-2017/1373- Kitosan Filmlerin Antimikrobiyal Etkinliğinin Arttırılması, Lisansüstü Tez Projesi, Araştırmacı (2018-2019)

c) Katıldığı Kurs ve Seminerler, Aldığı Sertifikalar

Temel İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitimi, İstanbul İşletme Enstitüsü (Temmuz 2019, Sertifika Kodu: 130792760052)

Girişimcilik, İnovasyon ve Biyoteknoloji Sempozyumu, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi (10 Mayıs 2019, Katılım Belgesi)

1st International Erciyes Agriculture, Animal and Food Sciences Conference (24-27 Nisan 2019, Katılım Belgesi)

Literatür Tarama Teknikleri ve Pratik Araştırma İpuçları Eğitim Semineri, EBSCO (2019, Katılım Belgesi)

Kaizen Sürekli İyileştirme, Yönetim Akademisi (2018, Katılım Belgesi)

Fikri ve Sanai Hak Yönetimi (Patent, Faydalı Model vb.), Yönetim Akademisi (2018, Katılım Belgesi)

Yenilikçi Problem Çözme Teknikleri Triz, FAVEO Eğitim ve Danışmanlık (2018, Katılım Belgesi)

ISO 9001:2015 KYS İç Denetçi Eğitimi, FAVEO Eğitim ve Danışmanlık (2018, Katılım Belgesi)

Olympus Mikroskopi Semineri, İncekaralar (2018, Katılım Belgesi)

Girişimcilik ve Kariyer Zirvesi, İŞKUR (2017, Katılım Belgesi)

İşte İŞKUR İşte İstihdam Çanakkale Kariyer Günleri, İŞKUR (2016, Katılım Belgesi)

Değerler Eğitimi, Ordu GönüllüEğitimciler Derneği (2014, Katılım Belgesi)

Liderlik, Ordu Gönüllü Eğitimciler Derneği (2014, Katılım Belgesi)

d) Başarı ve Ödüller

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Üçüncülüğü, 2017

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Onur Öğrencisi, 2015

Necatibey Kız Teknik ve Meslek Lisesi, Teknik Lise İkinciliği, 2013

İŞ DENEYİMİ

Sarıkız Zeytincilik, Teknik Müdür (2017, Balıkesir)

GıdaBilinci.com, İçerik Üreticisi (2016, İnternet Sitesi)

Sayanora Pastaneleri, Satış Elemanı (2016, Bursa)

Şener Tahin Pekmez Helva Reçel Tarımsal Ürünler, Stajyer (2015, Bursa)

Beyab Gıda, Stajyer (2015, Bursa)

LC Waikiki, Destek Elemanı (2015, Bursa)

DSİ 1. Bölge Müdürlüğü, Stajyer (2010, Bursa)

İLETİŞİM

E-posta Adresi :burcukaya241@gmail.com