

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Satureja hortensis* L. UÇUCU YAĞI YÜKLENMİŞ KİTOSAN
NANOPARTİKÜLLERİNİN VE KİTOSAN FİLMLEİN ÜRETİMİ
VE KARAKTERİZASYONU**

GİZEM CANSU FEYZİOĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
GIDA MÜHENDİSLİĞİ PROGRAMI**

**DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. FATİH TÖRNÜK**

İSTANBUL, 2016

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Satureja hortensis* L. UÇUCU YAĞI YÜKLENMİŞ KİTOSAN
NANOPARTİKÜLLERİNİN VE KİTOSAN FİLMLEİNİN ÜRETİMİ VE
KARAKTERİZASYONU**

Gizem Cansu FEYZİOĞLU tarafından hazırlanan tez çalışması 08.04.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

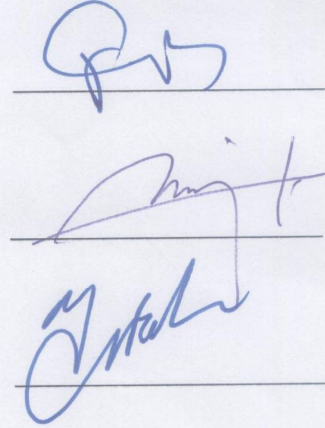
Yrd. Doç. Dr. Fatih TÖRNÜK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Yrd. Doç. Dr. Fatih TÖRNÜK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Hüsniye İMAMOĞLU
İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Muhammet Zeki DURAK
Yıldız Teknik Üniversitesi



ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca tez konumun belirlenmesinde, araştırma aşamasında, yön tayininde ve tamamlanmasında, bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen değerli danışman hocam, Sayın Yrd. Doç. Dr. Fatih TÖRNÜK'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca attığım her adımda ve aldığım her kararda benden desteğini esirgemeyen, varlıklarıyla hayattaki en büyük şanslarım olan canım annem ve babam, Zekiye ve Aytaç FEYZİOĞLU'na sevgi ve minnetlerimi sunarım. Tez çalışmamın laboratuvar aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve tecrübelerini paylaşan, Arş. Gör. Fatih BOZKURT ve Arş. Gör. Perihan Kübra ÇİÇEK'e, çalışmalarım sırasında başta motivasyon olmak üzere her türlü yardım ve desteği veren değerli arkadaşım Saliha MEMİŞ'e ve istatistik hesapları konusunda destek veren değerli arkadaşım Aslı MUSLU'ya teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam boyunca maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan ağabeylerim Barış ve Kurtuluş FEYZİOĞLU'na, moral kaynağım ve canımdan çok sevdiğim yeğenlerim Doruk Efe ve Buğra FEYZİOĞLU'na tüm kalbimle sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Nisan, 2016

Gizem Cansu FEYZİOĞLU

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xiii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	15
1.1 Literatür Özeti	16
1.2 Tezin Amacı	24
1.3 Hipotez.....	24
BÖLÜM 2	
KURAMSAL TEMELLER.....	25
2.1 Enkapsülasyon Çeşitleri.....	25
2.1.1 Nanoenkapsülasyon	25
2.1.2 Mikroenkapsülasyon (ME).....	26
2.2 Enkapsülasyon Metotları.....	27
2.2.1 Püskürterek Kurutma	27
2.2.2 Koaservasyon.....	28
2.2.3 Ekstrüzyon.....	28
2.2.4 Dondurarak Kurutma	29
2.2.5 Lipozom Dağıtma	29
2.2.6 İyonik Jelasyon	30
2.3 İyonik Jelleşme Yöntemiyle Üretilen Nanopartiküller ile Film Üretimi	31
2.4 Hammadde	33
2.4.1 Kitosan	33
2.4.2 <i>Satureja hortensis</i> L. (zahter)	35

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM	36
3.1 Materyal	36
3.2 Yöntem.....	37
3.2.1 Zahter Bitkisinden Uçucu Yağ Elde Edilmesi.....	37
3.3 Uçucu Yağ Yüklenmiş Kitosan Nanopartiküllerinin Üretimi ve Karakterizasyonu	37
3.3.1 Uçucu Yağ Yüklenmiş Kitosan Nanopartiküllerinin Hazırlanması	37
3.3.2 Zetapotansiyel ve Boyut Ölçümleri	38
3.3.3 Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi (EE).....	39
3.3.4 Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi	39
3.3.5 Antioksidan Etkinliğinin Belirlenmesi (AOA).....	40
3.3.6 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi	40
3.3.7 Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi (SEM).....	40
3.3.8 Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC).....	41
3.4 Uçucu Yağ Yüklenmiş Kitosan Filmlerinin Üretimi ve Karakterizasyonu	41
3.4.1 Uçucu Yağ Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinden Film Üretimi	41
3.4.2 FTIR.....	42
3.4.3 Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC).....	42
3.4.4 Kitosan Filmlerinin Antioksidan Aktivitesinin (AOA) Belirlenmesi	43
3.4.5 Uçucu Yağ Yüklü Kitosan Filmlerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	43
3.4.6 Uçucu Yağ Yüklenmiş Kitosan Filmlerinin Morfolojik Özellikleri (SEM)	44
3.4.7 Film Kalınlığı	44
3.4.8 Filmlerin Renk Ölçümleri	44
3.4.9 Filmlerin Mekanik Özellikleri	45
3.4.10 Suda Çözünürlük Testi.....	45
3.5 İstatistiksel Analiz	46

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	47
4.1 Uçucu Yağ Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu.....	47
4.1.1 Uçucu Yağ Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Boyut ve Zetapotansiyel Ölçümü	47
4.1.2 Enkapsülasyon Etkinliği (EE)	49
4.1.3 Uçucu Yağ Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Antibakteriyel Aktiviteleri	50
4.1.4 Uçucu Yağ Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Antioksidan Aktiviteleri (AOA)	51
4.1.5 FTIR.....	53
4.1.6 SEM	54
4.1.7 DSC.....	55
4.2 Uçucu Yağ Yüklü Kitosan Filmlerin Karakterizasyonu.....	57
4.2.1 FTIR.....	57
4.2.2 DSC.....	58

4.2.3	Filmlerin Antibakteriyel Aktiviteleri	59
4.2.4	Fimlerin Antioksidan Aktivitesi (AOA)	62
4.2.5	Renk Değişimi	64
4.2.6	Film Kalınlığı	65
4.2.7	Suda Çözünürlük Testi (Sw).....	66
4.2.8	Filmlerin Mekanik Özellikleri	67
4.2.9	Filmlerin SEM Görüntüleri	68
 BÖLÜM 5		
SONUÇ VE ÖNERİLER		70
5.1	Uçucu Yağ Yüklü Kitosan Nanopartikülleri için Elde Edilen Sonuçlar	70
5.2	Uçucu Yağ Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinden Üretilen Filmlere İlişkin Sonuçlar	72
KAYNAKLAR		74
ÖZGEÇMİŞ.....		86

SİMGE LİSTESİ

a^*	Kırmızı ve yeşil renk değeri
A_{kontrol}	Kontrol absorbans değeri
$A_{\text{örnek}}$	Örnek absorbans değeri
b^*	Sarı ve mavi renk değeri
ΔE^*	Toplam renk farkı
L^*	Beyaz ve siyah renk değeri
m_1	Kurutmadan önceki ağırlık
m_2	Kurutmadan sonraki ağırlık
P	İstatistikte anlamlılık seviyesi
ω	Nem kütlesi fraksiyonu ($m_1.m_2$)

KISALTMA LİSTESİ

AOA	Antioksidan Aktivite
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
DPPH	2,2 difenil-1-pikrilhidrazin
DSC	Diferansiyel Tarama Kalorimetresi
EB	Kopma Anındaki Uzama
EE	Enkapsülasyon Etkinliği
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GRAS	Genel Olarak Güvenilir
KF	Kitosan Film
NP	Nanopartikül
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TPP	Tripolifosfat
TS	Çekme Dayanımı
ZP	Zetapotansiyel

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1 İyonik jelleşme yönteminin şematik olarak gösterimi.....	33
Şekil 2.2 Kitin ve kitosanın kimyasal yapıları.....	33
Şekil 3.1 <i>Satureja hortensis</i> L. bitkisi.....	36
Şekil 3.2 Yağ ve kitosan solüsyonlarının hazırlanması	38
Şekil 3.3 Ürettiğimiz farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklü kitosan film örnekleri	42
Şekil 4.1 Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklenmiş kitosan nanopartiküllerinin boyutu	48
Şekil 4.2 Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklenmiş kitosan nanopartiküllerinin antioksidan aktiviteleri (AOA).....	52
Şekil 4.3 Uçucu yağ yüklenmiş kitosan nanopartiküllerinin antiradikal aktiviteleri (Troloks Eşdeğerliliği).....	53
Şekil 4.4 Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklü kitosan nanopartiküllerinin FTIR spektrumları.....	54
Şekil 4.5 Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklü kitosan nanopartiküllerinin SEM görüntüleri (A:%0, B:%1, C:%1,2, D:%1,4, E:%1,5).....	55
Şekil 4.6 Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklü kitosan nanopartiküllerine ait DSC termogramları	56
Şekil 4.7 Uçucu yağ yüklü ve yüksüz kitosan filmlerinin FTIR spektrumları.....	58
Şekil 4.8 Uçucu yağ yüklenen ve yüklenmeyen kitosan film örneklerine ait DSC termogramı	59
Şekil 4.9 Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklü filmlerin agar plak üzerinde antimikrobiyal etkisi	61
Şekil 4.10 Uçucu yağ yüklü kitosan filmlerinin antioksidan aktiviteleri.....	62
Şekil 4.11 Uçucu yağ yüklü kitosan filmlerinin troloks eşdeğerliliği olarak antioksidan aktiviteleri	63
Şekil 4.12 Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklü kitosan filmlerin suda çözünürlük oranları	67
Şekil 4.13 Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklü filmlerin SEM görüntüleri (A:KF0, B:KF1, C:KF1.2, D:KF1.4, E:KF1.5).....	69

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 4.1 Uçucu yağ yüklü kitosan nanopartiküllerinin zeta potansiyelleri ve enkapsülasyon etkinlikleri.....	49
Çizelge 4.2 Uçucu yağ yüklü ve yüksüz kitosan nanopartiküllerinin antibakteriyel aktiviteleri	51
Çizelge 4.3 Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklü kitosan filmlerinin antibakteriyel aktiviteleri	60
Çizelge 4.4 Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklü kitosan filmlerin L^* , a^* , b^* ve ΔE değerleri	65
Çizelge 4.5 Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklenen kitosan filmlerin kalınlık değerleri	65
Çizelge 4.6 Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklü kitosan filmlerin mekanik özellikleri.....	68

***Satureja hortensis* UÇUCU YAĞI YÜKLENMİŞ KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERİNİN VE KİTOSAN FİLMLEİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

Gizem Cansu FEYZİOĞLU

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Fatih TÖRNÜK

Nanobüyükölçekteki kitosan nanopartiküllerinin avantajları sayesinde kitosana olan ilgi artmış ve kitosanın farklı endüstrilerde kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu çalışmada, farklı konsantrasyonlarda (%0, %1, %1,2, %1,4 ve %1,5) *Satureja hortensis* (zahter) uçucu yağının nanoenkapsülasyonu için iyonik jelleşme tekniği kullanılarak kitosan nanopartikülleri üretilmiş ve bunlar daha sonra biyobozunur film üretiminde kullanılmıştır. Hem nanopartiküller hem de biyobozunur filmler karakterize edilmiştir. Nanopartiküllerin partikül boyutları farklı pH değerlerinde 140,25 nm ile 237,40 nm arasında değişmiş ve artan pH değerlerine bağlı olarak partikül boyutunun da arttığı ($P<0,05$) görülmüştür. Zahter uçucu yağı yüklü kitosan nanopartikülleri zeta potansiyel değerleri, antioksidan ve antibakteriyel aktivite, enkapsülasyon etkinliği, FTIR, DSC ve SEM özellikleri bakımından da karakterize edilmiştir. Nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri -7,54 ve -21,12 mV aralığında bulunmuş, antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri, yüklenen uçucu yağ konsantrasyonuna bağlı olarak artış göstermiştir. En yüksek enkapsülasyon etkinliği (%40,70) NP1.4 (%1,4 uçucu yağ yüklü kitosan nanopartikülü) örneğine ait olmuştur. SEM görüntüleri ışık saçılım tekniği ile elde edilen partikül boyutu verilerini desteklemiştir.

Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ (%0, %1, %1,2, %1,4 ve %1,5) yüklenen kitosan bazlı biyobozunur filmlerin; kalınlık, mekanik ve morfolojik (SEM) özellikleri, DSC, FTIR, antioksidan ve antibakteriyel aktiviteleri, renk özellikleri ve suda çözünürlük kabiliyetleri incelenmiştir. Kitosan filmlere yüklenen uçucu yağ konsantrasyonunun artması film kalınlığının, antioksidan ve antibakteriyel etkilerinin (*Escherichia coli*

O157:H7 ATCC 33150, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* FMC19 ve *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium ATCC 14028'a karşı) önemli düzeyde yükselmesine ($P<0,05$) neden olmuştur. DPPH radikaline karşı antioksidan aktiviteleri %58,14 – 66,08 arasında tespit edilmiştir. SEM görüntüleri, nanopartiküllerden film oluşumu esnasında nanopartiküllerde kümeleşmelerin olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak bu çalışmada suda çözünür özellikte zahter uçucu yağı yüklü kitosan nanopartikülleri başarı ile üretilmiş ve bunların aktif biyobozunur film üretiminde kullanım potansiyelleri ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Satureja hortensis* L., kitosan, iyonik jelleşme, nanoenkapsülasyon, nanopartikül, biyobozunur film.

ABSTRACT

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF CHITOSAN NANOPARTICLES AND CHITOSAN FILMS LOADED WITH *Satureja hortensis* ESSENTIAL OIL

Gizem Cansu FEYZİOĞLU

Department of Food Engineering

MSc. Thesis

Advisor: Assist. Prof. Dr. Fatih TORNUK

As a result of advantages of nanoscale chitosan nanoparticles, interest to chitosan has been increased and correspondingly use of chitosan has been more widespread in different industries. In this study, chitosan nanoparticles were produced for nanoencapsulation of *Satureja hortensis* (summer savory) essential oil at different concentrations (0%, 1%, 1,2%, 1,4% and 1,5%) by using ionic gelation method and then they were used for biodegradable film production. Both the nanoparticles and the biodegradable films were characterized. The particle sizes of the nanoparticles ranged from 140,25 nm to 237,40 nm at different pH levels (pH 4.5, 6 and 10) while it was seen that the size increased ($P<0,05$) depending on the increasing pH values. Chitosan nanoparticles loaded with summer savory essential oil were also characterized for their zeta potential values, antioxidant and antimicrobial activity, encapsulation efficiency, FTIR, DSC and SEM. Zeta potential values of the nanoparticles were in the range of -7,54 and -21,12 mV. Antimicrobial and antioxidant activities were dependent to essential oil level loaded. The highest ($P<0.05$) encapsulation efficiency (40,70%) was belonging to NP1.4 (the sample loaded with 1,4% of essential oil). SEM images also supported the particle size data obtained from light scattering technique.

Chitosan based biodegradable films loaded different levels of essential oil (0%, 1%, 1,2%, 1,4% and 1,5%) were characterized for their thickness, mechanical and morphological (SEM) properties, DSC, FTIR, antioxidant and antibacterial activity (against *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 33150, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* FMC19 and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium ATCC 14028), color properties and

water solubility capabilities. Increasing levels of loaded essential oil concentration resulted in significantly higher ($P<0,05$) film thickness, antioxidant and antibacterial properties. Antioxidant activity of the films against DPPH radical ranged from 55,14% to 66,08%. SEM images showed that some aggregations were observed by film formation from the nanoparticles. In conclusion, in this study, water soluble chitosan nanoparticles loaded with summer savory essential oil were successfully produced and their potential to use in active biodegradable films was presented.

Keywords: *Satureja hortensis* L., chitosan, ionic gelation, nanoencapsulation, nanoparticles, biodegradable film.

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Gıda katkı maddeleri en geniş anlamıyla; tek başlarına gıda sayılmayan, ancak bir gıdaya üretim, işleme, paketlenme, depolama gibi aşamalarda kasıtlı olarak katılan bileşenlerdir. Gıdalara katılmasındaki temel amaç ise; gıdanın geçtiği çeşitli aşamalarda meydana gelebilecek tat, koku, görünüş, yapı ve diğer özellikleri korumak, raf ömrünü arttırmak ve kalitesini uzun süre muhafaza etmektir. Gıda üreticileri de bu gibi sebeplerle izin verilen bazı oranlarda gıda katkı maddesi kullanmaktadırlar. Bu maddelerin kullanımı, ürünlerde iyileştirilmesi istenen özellikler konusunda gelişme sağlamış ve ekonomik kayıpların azaltılmasına da yardımcı olmuştur. Kalite düzeyi düşük hammaddelerden gıda üretildiğinde veya kullanımına izin verilen gıda katkı maddesi limitlerinin üzerine çıktığında, tüketicinin aldatılması, bilhassa tüketici sağlığının olumsuz yönde etkilenmesi söz konusu olmaktadır. Bu sebeplerden ötürü de, yapay gıda katkı maddelerinin kullanımında kısıtlamalar meydana gelmiştir. Bu yüzden son yıllarda doğal kaynaklı ve toksik etkisi olmadığı bilinen katkı maddeleri tercih edilmektedir. Katkı maddelerinin antimikrobiyal etkiye sahip olmaları da ayrı bir öneme sahiptir. Üzerinde çeşitli araştırmalar yapılan kitosan, günümüzde önemli bir gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Çeşitli fonksiyonel özelliklere sahip olması, bakteri, maya ve küf gibi çeşitli mikroorganizma gruplarına karşı antimikrobiyal etkisinden dolayı gıda endüstrisinde çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır [1]. Kitosan, deniz canlılarının kabuğunda, böceklerin kütiküllerinde ve belirli fungusların hücre duvarında bolca bulunan kitinin deasetilasyonu ile elde edilmektedir [2]. Toksik olmayan bir polimer olan kitosan iyi bir kapsülleme özelliği gösterir [3]. Kitosan mekanik mukavemetinden ötürü film oluşturucu özelliğine sahip olmakla birlikte, oldukça yavaş biyolojik ayrımı sebebiyle de doku mühendisliği, ilaç dağıtımı ve ambalajın birçok uygulama alanında yer almaktadır [4]. Kitosan filminin en önemli avantajları ise; yarı geçirgen, sert, esnek ve kolay yırtılmayan dayanıklı bir

materyal olmalarıdır. Bu özellikleri sayesinde bir takım ticari polimerle karşılaştırılabilmektedirler [5,6]. Gıdaların raf ömrünü uzatmak ve duyuşal özelliklerini iyileştirmek için bitki ve baharatların özleri üzerinde de yoğunlaşmaktadır [7]. Uçucu yağlar, bitkisel materyallerden (çiçek, tomurcuk, tohum, yaprak, dal, ağaç kabuğu, otlar, meyve ve kökler) elde edilmiş aromatik bileşiklerdir. Uçucu yağlar, kimyasal koruyuculara doğal alternatifler olarak kabul edilmiş ve bunların minimal işlem görmüş gıda maddelerinde kullanımları sağlanmıştır [8]. Ancak bazı gıda maddeleri ile etkileşimleri ve gıdaların lezzetinde meydana getirebildikleri değişimler sebebiyle kullanımları sınırlıdır [9].

Ambalaj, gıdanın korunmasında önemli bir rol oynamaktadır [10]. Taze ve işlenmiş gıdalarda mikrobiyal kontaminasyon, gıdanın yüzeyinde yüksek yoğunlukta görülür, bu yüzden mikrobiyal gelişmenin etkili bir şekilde kontrolü gerekmektedir [11]. Antimikrobiyal film ve paketlenme, aktif paketlenmeye yenilik getirmekle beraber, ambalajlanmış ürünle temas eden gıdanın yüzeyinde mikroorganizmaların gelişmesini inhibe etmek ya da geciktirmek için geliştirilmiştir [12].

1.1 Literatür Özeti

Biyoaktif maddeler, ışık, oksijen, kimyasal maddeler gibi çevresel faktörlere maruz kaldıklarında olumsuz etkilenirler. Enkapsülasyon gibi bazı yeni teknolojiler ile aktif maddelerin korunması, aktivite kaybının azaltılması ve biyoyararlılığın artırılması son yıllarda yapılan ve yapılmakta olan çalışmalarla kanıtlanmıştır [13]. Enkapsülasyon; katı, sıvı veya gaz halindeki gıda ya da diğer maddelerin karbonhidrat, protein, lipid veya türevlerinden elde edilmiş kaplama materyalleriyle paketlenmesi şeklinde tanımlanabilmektedir [1,14,15]. Kaplanan malzemeye "aktif" madde, kaplamada kullanılan malzemeye ise "taşıyıcı" veya "enkapsülant" denilmektedir [16]. Enkapsülasyonun gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılması yanı sıra ziraat, tıp, kimya, veterinerlik, eczacılık, biyoteknoloji gibi bir çok alanda da kullanımı mevcuttur [3,4,17]. Enkapsülasyon teknolojisinin ilk kullanılmaya başlanması, yaklaşık 40-50 yıl öncesine dayanmaktadır [18]. A.Boake, Roberts & Co, Ltd. isimli İngiliz şirketi 1932 yılında, gam arabik kullanarak, püskürterek kurutma tekniği ile gıda aroması üretmiştir. Bu üretim sonrasında sprey kurutma yöntemi, gıda ve içecek endüstrisinde önemli bir uygulama haline gelmiştir [19].

Uygun enkapsülasyon tekniğini seçiminde tüketici talepleri, besleyicilik değeri, depolama stabilitesi gibi çeşitli özellikler rol oynamaktadır. Enkapsülasyon tekniğini seçerken;

- Gıdaların üretiminin ve işlenmesinin hangi koşullarda gerçekleşeceği,
- Aktif maddelerin fizikokimyasal özellikleri,
- Enkapsüle ürün tüketici kullanımına sunulmadan önce hangi koşullarda depolanacağı,
- Gıda içerisinde hangi partikül büyüklüğünde bulunacağı,
- Ekonomik maliyetinin ne olacağı

gibi soruların cevaplandırılması gerekmektedir. Sonrasında ise kaplama materyali ve kaplama yöntemi seçilerek, yasal düzenlemeye uygunluğu kontrol edildikten sonra enkapsüle ürünü elde etme süreci başlatılmalıdır [20].

Enkapsülasyon metotlarını kullanırken; enkapsüle edilecek maddenin etrafında sızıntı oluşturmayacak şekilde bir zar tabakası meydana gelmesine ve istenmeyen maddelerin dışarıda tutulmasına dikkat edilmelidir [21]. Bu kaplama teknolojisinin gıda endüstrisinde uygulanmasının sebeplerini şöyle sıralayabiliriz:

- Sıcaklık, nem, oksijen ve ışık gibi çevre koşullarından olumsuz etkilenen maddelerin enkapsüle edilerek raf ömürlerinin arttırılması,
- Tat ve aroma gibi maddelerin dışarıya taşınım hızının azaltılması,
- Enkapsüle edilecek maddenin, degradasyondan korunması amacıyla reaksiyona girme yeteneğinin azaltılması,
- Kullanım kolaylığı sağlamak amacıyla bazı fiziksel özelliklerin değiştirilmesi,
- İstenmeyen tat ve kokunun engellenmesi,
- Karışım içerisinde birbiriyle reaksiyona girebilecek maddelerin ayrılması,
- Az miktarda kullanım gerektiğinde, homojen olarak seyreltilebilmesi [22].

Enkapsülasyonda kullanılan kaplama materyallerinden bahsedilecek olursa; bu materyallerin doğal olmasının yanı sıra biyobozunur olması, gıdayı çevresel etmenlerden koruması, kaplanan madde ile reaksiyona girmemesi ve gıdada kullanıma uygun olması gerekmektedir. Gıda sanayinde kaplama materyali olarak, maliyetinin düşük olması nedeniyle yaygın olarak polisakkaritler kullanılmaktadır. Gam arabik, pektin, nişasta ve

türevleri, en sık kullanılan polisakkaritlerdir. Ayrıca deniz kaynaklı kitosan, ksantan ve dekstran gibi hayvansal ve mikrobiyal polisakkaritlerin yanı sıra kazein, gluten, jelatin gibi protein türevleri ile gliserin, yağ asitleri gibi lipid türevleri de kaplama materyali olarak yaygın şekilde kullanılmaktadırlar [23]. Etkili bir kaplama materyali; çözücü uzaklaştırma, stabilize etme, aktif maddeyi tutabilme, emülsiyon oluşturma ve yüksek konsantrasyonda iyi reolojik özelliklere sahip olma gibi kıstasları barındırmalıdır [19,24].

Aktif bileşenlerin kapsüllenmesinde kullanılan metotları üç başlık altında sıralamak mümkündür:

1-Fiziksel metotlar: püskürtmeli kurutma, dondurarak kurutma, hava süspansiyon kaplama ve ekstrüzyon.

2-Fizikokimyasal metotlar: lipozom içine hapsedme ve koaservasyon (basit veya karmaşık)

3-Kimyasal metotlar: faz ayrımı ve ara yüz polimerizasyonu.

Enkapsülasyon uygulamalarında yaygın olarak kapsüllenen aktif maddeleri şöyle sıralayabiliriz:

- Esansiyel yağlar,
- Probiyotikler ve prebiyotikler,
- Mineral ve vitaminler,
- Proteinler ve organik asitler,
- Enzimler, tatlandırıcılar, aromalar,
- Antioksidanlar ve yağ asitleri [25].

Calvo vd. [26] yaptıkları bir çalışmada, yeni bir hidrofilik nanopartikül üretmiş ve proteinlerin tutulmasının yanında kontrollü salımındaki faydalarını değerlendirmişlerdir. Katyonik polisakkarit olarak kitosan tercih edilmiştir. Partiküllerin meydana gelmesi, kitosanın tripolifosfat (TPP) gibi anyonik bir polimerle iyonik etkileşimi sonucu sıvı-jel geçişine dayanmaktadır. Üretilen kitosan nanopartikülleri 250-1000 nm arasında değişmektedir. Deneyin başlangıcında kitosan, farklı derişimlerde hazırlanan asetik asit çözeltilerinde çözündürülerek (%0,05, %0,1, %0,5 ve %1 (w/v)) nanopartiküllerin oluşmaya başladığı derişim aralığını tespit etmek amaçlanmıştır. Asetik asit derişimi bütün deneylerde kitosandan 1,75 kat daha fazla seçilmiştir. TPP çözeltisi ise kitosan çözeltisi ile

aynı derişimlerde hazırlanmıştır. TPP çözeltileri (0,25, 1,0, 2,0, 2,5 ve 3,0 mL) oda sıcaklığında, manyetik karıştırıcıda, 5 mL'lik kitosan çözeltisine ilave edilmiştir. Elde edilen örneklerde berrak çözelti, bulanık süspansiyon ve kümeleşmeler olmak üzere üç farklı fazın meydana geldiği gözlemlenmiştir. En küçük partikülboyutu (260 nm), en düşük derişimlerde elde edilmiştir. İlk kez iyonik jelleşme tekniği kullanılarak kitosan nanopartikülleri üretimi bu çalışma ile gerçekleşmiştir.

Amidi vd. [27] çalışmalarında ovalbümini kapsülleyerek, N-trimetil kitosan (TMC) nanopartikülleri vasıtasıyla antijenlerin burundan verilmesini araştırmışlardır. Ovalbümün yüklenen nanopartiküller saflaştırma işleminden geçirildikten sonra, partikül büyüklükleri 479 ± 32 nm olarak belirlenmiştir. Çalışmada, ovalbümün-TMC nanopartiküllerinin burunda taşıyıcı bir sistem olarak kullanılabilirliğini test etmek için *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda toksisite testleri yapılmış ve eş odaklı lazer mikroskobu ile TMC nanopartiküllerinin sıçanların burun epiteline alınması incelenmiştir. TMC nanopartiküllerinin, proteinler için iyi bir yükleme kapasitesine sahip oldukları ve burun mukozasına bağlanabilmelerini sağlayan pozitif yüklerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Ovalbümün yüklü TMC nanopartiküllerinin burna verilmesi sonucu, fare burnu epitel dokusu tarafından absorbe edilip, alt mukoza tabakasına doğru gittiği saptanmıştır. Bu yöntemle ilk kez canlı bir örnekte, protein yüklenmiş TMC nanopartiküllerinin burundaki mukoza tabakasını geçebilme kabiliyetleri incelenmiştir.

Qi vd. [28], kitosan nanopartiküllerine bakır yükleyerek, canlı vücut haricindeki yapay bir ortamda, çeşitli organizmalara karşı antimikrobiyal aktivitelerini incelemişlerdir. Kitosan nanopartiküllerini, çapraz bağlanma maddesi TPP kullanarak iyonik jelleşme tekniğiyle elde etmişlerdir. Elde edilen nanopartiküllerin büyüklüğü 28,3-48,7 nm arasında olup, bu nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerini (boyut, zeta potansiyeli, FTIR, AFM, XRD) tespit etmişlerdir.

Qi ve Xu [29], kitosan nanopartiküllerine kurşun tutulması üzerine yaptıkları başka bir çalışmada, iyonik jelleşme tekniğini kullanmışlardır. 40-100 nm arasındaki büyüklüklere sahip nanopartiküller elde etmişlerdir. Kitosan nanopartiküllerinin, kurşun iyonlarını adsoplama izotermeleri ve adsorplama kapasiteleri belirlenmiştir. Adsoplama kapasitesi üzerine; başlangıç derişimi, adsorplayıcı miktarı ve boyutu, sıcaklık, pH ve çalkalanma süresinin etkisi incelenmiştir. Kitosan nanopartiküllerinin kurşun iyonlarını etkili bir şekilde tuttuğu ve fosfor iyonlarının ortama girmesiyle de kapasitenin arttığı bildirilmiştir.

Deng vd. [30] partikül büyüklüğü 50-280 nm arasında değişen, lizozim yüklü kitosan nanopartiküllerini iyonik jelleşme yöntemiyle üretmişlerdir. Molekül ağırlığı yüksek kitosanın; yüksek lizozim kapsülleme verimliliği ve yüksek yükleme kapasitesi göstermesine rağmen, düşük salım hızına sahip olduğu gözlenmiştir. Kitosanın molekül ağırlığı azaltıldığında ise; kapsülleme verimliliği önce artış göstermiş, akabinde azalmıştır. Yükleme kapasitesi ve salım hızı da, molekül ağırlığındaki azalmaya bağlı olarak düşüş göstermiştir. TPP miktarının artmasına bağlı olarak, kapsülleme verimliliği ve yükleme kapasitesi yükselmiş, salım hızı da artmıştır. Başlangıçtaki lizozim derişiminin yükselmesiyle yükleme kapasitesi artmış, bunun yanı sıra kapsülleme verimliliği ve salım hızı azalmıştır. Sonuç olarak, proteinin taşınım ihtiyaçlarının karşılanabilmesi için gerekli bir takım parametrelerin ayarlanabileceği bildirilmiştir.

Nualkaekul vd. [31] kalsiyum-aljinat taneciklerini iyonik jelleşme yöntemini kullanarak üretmişlerdir. Aljinat konsantrasyonu 0,6-3 aralığında iken, kalsiyum klorür çözeltisi de 0,05-1,5 aralığında çalışılmıştır. Elde edilen kapsüllerin büyüklüğünün ise titreşim sistemine, şırınga çapına, çözeltinin vizkozitesine ve şırınga ile kalsiyum klorür çözeltisi arasındaki mesafeye bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Hu vd. [32] iyonik jelleşme yöntemini kullanarak yaptıkları bir çalışmada, 10-100 nm aralığında partikül büyüklüğüne sahip kitosan nanopartikülleri üretmişlerdir. Elde ettikleri bu nanopartikülleri, asit boyama maddesi olan Asit Yeşili 27'yi, sulu bir çözeltiden adsorplayarak uzaklaştırmak amacıyla kullanmışlardır. Nanopartiküllerdeki adsorplama kapasitesini, taneciklerdeki kitosan ağırlığını baz alarak 2103,6 mg/g olarak hesaplamışlardır. Hesaplanan bu değerin, mikrobeyutlu kitosana göre bir hayli yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Rangrong vd. [13] yaptıkları bir çalışmada, çapraz bağlama maddesi TPP'yi kullanarak ve su içinde bir yağ emülsiyonu oluşturarak, iyonik jelleşme tekniğiyle askorbil palmitat (AP) yüklü kitosan nanopartikülleri sentezlemişlerdir. Elde edilen kitosan nanopartikülleri küresel bir yapıya sahip olmakla birlikte, partikül büyüklüğünün SEM görüntülerinde 60-100 nm, TEM de ise 30-60 nm arasında tespit edilmiştir. AP'nin yükleme kapasitesi %8-20, enkapsülasyon verimliliği ise %39-77 olarak belirlenmiştir. AP'nin kitosana olan oranının artmasıyla yükleme kapasite yükselmiş, enkapsülasyon etkinliği azalmıştır. AP'nin etanol içerisinde difüzyon yoluyla salınım mekanizması yaklaşık bir saatte

tamamlanmıştır. TPP konsantrasyonunun azalmasıyla ve yükleme kapasitesinin artmasıyla, AP salınım miktarında da artış olduğu saptanmıştır.

Lee vd. [34] kitosanı çeşitli fonksiyonel gruplar ile modifiye ederek hidrofobik çevreyi hidrofilik sisteme çevirmeyi ve partikül yığılmasını önlemeyi amaçlamışlardır. Kitosanı hegzanoik ve benzoik anhidrit ile N-açilleyerek, homojen ve metanollü bir ortamda, açillenme derecesini Hidrojen Nükleer Manyetik Rezonans (H-NMR) ile belirlemişlerdir. N-açil partiküllerini TPP kullanarak elde etmişlerdir ve bu partiküller dondurarak kurutulduktan sonra parçacık büyüklüğü, zeta potansiyeli ve kan uygunluğu testleri yapmışlardır. N-açil nanopartiküllerinin büyüklüğünün 160-200 nm aralığında oldukları, aynı zamanda da biyouyumlu oldukları tespit edilmiştir.

Zhang vd. [34], iyonik jelleşme tekniğini kullanarak 90-220 nm aralığındaki büyüklüklere sahip nanopartiküller üretmişlerdir. Sıcaklık, pH, kitosan/TPP oranı, yüksek deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığının partikül büyüklüğü üzerine etkisi incelenmiştir. Partikül büyüklüğünün sıcaklık ve pH yükseldikçe arttığını ve minimum partikül boyutunun kitosan/TPP oranı 5 iken oluştuğunu bildirmişlerdir.

Wen Fan vd. [35] düşük molekül ağırlıklı kitosan nanopartiküllerini TPP kullanarak iyonik jelleşme yöntemiyle üretmişlerdir. Üretilen kitosan nanopartiküllerinin ortalama 138 nm boyutunda olduğu ve zeta potansiyellerinin ise +35 mV olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca üretilen kitosan nanopartiküllerinin, en az 20 gün boyunca oda sıcaklığında iyi bir depolama stabilitesine sahip olduğu saptanmıştır.

Grenha vd. [36], kitosan nanopartiküllerine protein yüklemiş ve bu partikülleri kullanarak, akciğere protein yüklenmiş partikülleri taşıyan mikrokapsüller üretmişlerdir. Protein yüklenmiş nanopartiküller akciğere ulaşmak için bu mikrokapsüllere etkili bir şekilde bağlanmış ve mikrokapsüllerin suyla temasından sonra nanopartiküllerin salınım gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada partikül büyüklüğünün 280-420 nm arasında olduğu ve kitosan/TPP oranı yükseldikçe partikül büyüklüğünün de arttığı belirtilmiştir.

Mirmohammad Sadeghi ve diğerleri [37] yaptıkları bir çalışmada, arap zıkkı ve kitosanı kullanarak iyonik jelleşme metoduyla insülin yüklü nanopartiküller üretmişlerdir. Çeşitli formülasyonlar 2^3 faktöriyel tasarımları kullanılarak hazırlanmıştır. Birleşimlerdeki optimum verimliliğe F₂, F₅ ve F₈ formülasyonlarında ulaşılmıştır. Fosfat tampon çözeltisindeki (pH 6,5 ve pH 7,2) insülinin salınım profilinin, asidik ortamdakinden tamamiyle farklı olduğu görülmüştür. Diğer ortam pH' ları ile kıyaslandığında, 6,5 pH'

daki insülin yüklü nanopartiküllerin salınımı sonucunda, arabik gam zincirlerindeki genişlemenin oldukça yüksek olduğu görülmüştür. F₈ ve F₅ formülasyonları için sırasıyla 0,49 ve 0,82 değerleri bulunmuştur. Çalışma sonucunda, kullanılan bu yöntemle polimer zincirlerinin gevşediği ve difüzyonla salım kontrolünün mümkün olabileceği belirlenmiştir. Ayrıca bu yöntemin, diyabet hastalarına insülini daha az miktarda vermek adına farklı bir teknik olduğu bildirilmiştir

Baik vd. [38] mikroenkapsülasyon uygulanmış balık yağlarının oksidasyona olan dirençlerini ölçmek amacıyla, antioksidanların ve nemin etkisini araştırmışlardır. Herhangi bir antioksidan katılmadan enkapsüle edilmiş yağların, açıkta bulunan yağlara göre oksidasyona karşı 10 kat daha dayanıklı olduklarını bildirmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada [39], aminopeptidaz enzimine mikroenkapsülasyon işlemi uygulanarak Cheddar peynirinin olgunlaşma sürecini hızlandırmak hedeflenmiştir. Bu amaçla kaplama materyali olarak aljinat-kitosan-kalsiyum klorür (%1,6-0,1-0,1) kompleksi tercih edilmiştir. Çalışma sonucunda enzim eklenmeyen kontrol grubu ile aminopeptidaz enzimi enkapsüle edilmiş peynir örneklerinin proteoliz düzeyleri ve duysal özellikleri karşılaştırılmıştır. Kıyaslama sonucunda enkapsüle edilen enzimleri içeren peynirlerin tat, aroma ve tekstürel özelliklerinin serbest enzim içeren peynirlere göre daha iyi olduğu gözlenmiştir. Ayrıca enkapsüle edilmiş enzim içeren örneklerin depolama süresi boyunca, serbest enzim içeren örneklere göre daha fazla serbest aminoasit miktarına sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu araştırma sonucu, kapsüllenen enzimin proteoliz etkinliğini arttırdığını ve aminopeptidaz enziminin de olgunlaşmayı hızlandığını ortaya koymuştur.

Sheu ve arkadaşları [40], *Lactobacillus bulgaricus* bakterisini sodyum aljinat ile kapsülleyerek dondurulmuş sütlü tatlılardaki canlı hücre sayılarını araştırmışlardır. Elde edilen bulgulara göre; enkapsüle edilen hücreler ile enkapsüle edilmeyen hücrelerin canlı kalma oranları sırası ile %90 ve %30 olarak belirlenmiştir. Ayrıca çapı 30 µm'den büyük olan hücrelerin, çapı 15 µm olanlara göre daha fazla canlı kaldıkları tespit edilmiştir.

Zivanovic vd. [41] yaptıkları bir çalışmada, kekik uçucu yağı (%1 ve %2 oranlarında) yükleyerek elde ettikleri kitosan filmleri ile salam örneklerini kaplayarak, filmin *Escherichia coli* O157:H7 üzerindeki mikrobiyolojik etkisini araştırmışlardır. 5 °C' de 10 günlük muhafaza sonucunda, *Escherichia coli* O157:H7 sayısının ortalama 3 log düzeyinde azaldığını bildirmişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada [42], kitosandan elde edilen filmlerin *E. coli* O157:H7 ve *Staphylococcus aureus* suşları üzerinde antibakteriyel etkisinin bulunduğunu, hatta kitosana uçucu yağ yüklenerek söz konusu etkinin arttırılabileceği bildirilmiştir.

El Ghaouth vd. [43] kitosan film ile kaplanan (15 mg/mL) çileklerde, küf gelişimini ve bu sebeplerden kaynaklanan bozulmaların önemli ölçüde geciktirildiğini bildirmişlerdir.

Chien vd. [44] yaptıkları bir çalışmada, yenilebilir kitosan ile kaplanan dilimlenmiş mangonun kalitesi ve raf ömrü üzerine filmin etkisini araştırmışlardır. Dört farklı konsantrasyonda ki kitosan çözeltileri (%0, 0,5, 1,0, 2,0) dilimlenen mangolar ile muamele edilmiş, ardından poliviniliden klorür (PVDC) ile kaplanarak 25 °C’de muhafaza edilmiştir. Kitosanın su kaybını geciktirmesi ve duyuşal özelliklerini muhafaza etmesinin yanında, mikroorganizma gelişimini de engellediği bildirilmiştir.

Cheah ve Page [45], havuçların % 2-4 kitosan film ile kaplanması sonucu, bozulmanın önemli ölçüde azaldığını (%88’den %28’e) rapor etmişlerdir.

Roller ve Covill [46], kitosan film ile kaplanan (9 mg/g) karideslerin 5 °C’de muhafaza edilmesi sonucu bozulmaya sebep olan mikroorganizma sayısının azaldığını, ancak 25 °C’de muhafaza edilen karideslerde ise kitosanın koruyucu bir etki göstermediğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, asetik asit ve soğukta muhafaza ile kitosanın kombine edilmesi durumunda, koruyucu etkisinin olabileceği sonucuna varmışlardır.

Nanocar isimli Amerikan firması, gıdaların raf ömrünü uzatmak ve şişe ambalajların gaz geçirgenliği özelliklerini geliştirmek için nanobileşen olarak tercih edilen montmorillonit kil kullanarak, biranın 11 haftaya kadar muhafazasını ve nanokompozit bazlı plastik şişelerin ürünlerin raf ömrünü 30 haftaya kadar dayanıklı hale getirilebilmesini sağlamıştır [47,48].

Ferreira vd. [49] kitosan ile peynir altı suyu proteinlerini kombine ederek sentezledikleri yenilebilir filmlerin, asit pH değerlerine baktıklarında, %75 oranında protein taşıyıcısı olma kapasitelerinin bulunduğunu bildirmişlerdir.

Sothivel vd. [50] dil balığı protein ununu, soya protein konsantresini, yumurta albüminini ve kitosanı yenilebilir film halinde, üç ay boyunca derin dondurucuda muhafaza edilmiş pembe salmon filetolarına uygulayarak kalitelerine olan etkilerini araştırmışlardır. Kitosan ve soya proteinlerinin, yağ oksidasyonuna etki ederek oksidasyonu geciktirdiklerini saptamışlardır.

1.2 Tezin Amacı

Kitosan toksik olmayan, antimikrobiyal etkiye sahip bir katkı maddesidir. Ayrıca bariyer oluşturma özelliğinden ötürü yenilebilir film ve kaplamada kullanmak için de ideal bir materyaldir. Uçucu yağlar ise aromatik bitkilerin çeşitli kısımlarından elde edilen; antiseptik, antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerine sahip uçucu ürünlerdir. Kitosan ve uçucu yağ arasında oluşturulan bir kompleks olan kitosan nanopartikülleri ile (emülsiyon-yağ kombinasyonu sağlanarak) stabilite ve toksikolojik bozukluklar gibi birtakım dezavantajların önüne geçilmektedir. Uçucu yağların kitosan polimerine enkapsülasyonu ile oluşan partikülde ki aktif maddeler, direkt maruz kaldığı çevre koşullarından korunabilmektedir. Bu çalışma, uçucu yağların kontrollü bir şekilde salımını sağlayarak, gıda endüstrisinde uçucu yağ yüklenmiş suda çözünabilir gıda katkı maddesi elde etmek ve bunu antimikrobiyal bir film haline getirerek, ambalaj materyali olarak kullanmak amacıyla yapılmıştır. Bu materyallerin biyobozunur olması, gıda ambalaj film uygulamalarında etkili özellikler göstermesi ve yenilebilir olması önemli avantajlarıdır. Bunun yanı sıra sağlık açısından güvenilir ve ekonomik bir üretim prosesine sahip olması, söz konusu filmlerin tercih edilmesinin en önemli sebeplerindendir.

1.3 Hipotez

Nanoboyutta kitosan elde etmek için çok sayıda yöntem mevcuttur. İyonik jelleşmenin en sık kullanılan yöntemlerden biri olduğu bilinmektedir. İyonik jelleşme yöntemiyle kararlı, küçük parçacık büyüklüğüne sahip ve küresel yapıda partiküller elde edilebileceği düşünülmektedir. Uçucu yağ ve kitosanın mikrobiyal inaktivasyon üzerine etkisi bilindiği için, uçucu yağ yüklü nanopartiküllerin ve bu nanopartiküllerden elde edilen filmin mikroorganizma yükünü azaltacağı beklenmektedir. Biyoaktif bileşenlerin kapsüllenmesi sonucu, gıda matriksi içinde diğer bileşenlerle reaksiyona girmelerinin engellenebileceği düşünülmektedir. Ayrıca kullanılan yöntemin karmaşık ve yüksek maliyetli olmaması, ekonomik olması bakımından önemli bir avantajdır. Sentezlenen uçucu yağ yüklü nanopartiküller ile yenilebilir filmlerin biyoyararlılığa önemli katkılarının olacağı düşünülmektedir.

KURAMSAL TEMELLER

2.1 Enkapsülasyon Çeşitleri

- Nanoenkapsülasyon (200 nm = 0,2 μm 'den küçük)
- Mikroenkapsülasyon (0,2-5,00 μm)
- Makroenkapsülasyon (5,000 μm 'den büyük) [51]

2.1.1 Nanoenkapsülasyon

Nanoemülsiyonlar, içerisinde 50-200 nm boyutunda nanopartikül barındıran, birbiri içerisinde çözünmeyen, apolar yapıları sayesinde enkapsüle etme özellikleri bulunan nanoölçekli damlacıklardır. Mekanik olanlar (yüksek enerjili) ve mekanik olmayanlar olmak üzere iki çeşit nanoemülsiyon üretimi mevcuttur. Mekanik olanlara; basınç homojenizasyon ve ultrasonik yöntemler örnek verilebilir, mekanik olmayanlara ise çözücü-difüzyon yöntemi örnek gösterilebilir. Balık yağı ve yağda çözünen vitaminler gibi (suda çözünmeyen bileşikler) bileşenlerin, sindirim sisteminde emilerek biyoyararlılığı sağlamaları, nanoemülsiyonların iyi bir taşıyıcı ortam olduğunu göstermektedir [52]. Gıdaların nanokapsülasyonuna ait çalışmalarda genellikle nanolipozom, nanoşelat ve archeosome (*Archaeobacter*'lerin ürettiği bir lipozom) gibi lipit kapsüller veya doğal polimer bazlı kapsüller kullanılmaktadır [53]. Su içeriği yüksek ürünlerde nanoenkapsüle edilen bileşenler daha kolay çözünebilmektedirler ve bunların biyoyararlılıkları daha fazla olmaktadır [54]. Nano kapsül haline getirilen ürün olumsuz çevre koşullarından daha az etkilenmesinin yanı sıra, kötü tat ve kokuyu da minimuma indirmektedir [55]. Örneğin; Avustralya'nın ünlü bir fırınında, sadece mideye ulaştığında açılabilen nanoenkapsüle

edilmiş balık yağı içeren ekmek üretilmiştir. Bu sayede, balık yağının hoşla gitmeyen tadı algılanmadan ürün tüketilmektedir [56]. Günümüzde sitrik asit, benzoik asit, karoten gibi nanokapsüle edilmiş pek çok ürün bulunmaktadır [57]. Nanoemülsiyonların partikül büyüklüğü mikroemülsiyonlardan daha küçüktür ve optik olarak şeffaf görünümündedirler. Mikroemülsiyonlar ise ışıktaki çok yönlü saçılma gösterirler ve beyaz opak görünümündedirler. Bu da nanoemülsiyonların, içeceklerde bileşen taşıyıcı olarak kullanımında istenen bir özelliktir [55].

Taklit ve taşışın önlenmesinde, sağlığa zararlı maddelerin tespitinde nanoteknoloji pek çok kolaylık sağlamaktadır. 2008 yılında Çin’de yapılan bir çalışmada, süt ürünü tüketen pek çok kişide melamin bulaşısının hastalığa yol açtığı belirlenmiş ve 2010’da Miami Üniversitesi profesörü Na Li ve arkadaşları, altın nanopartiküller üreterek sütteki melamini kolayca tespit etme tekniğini geliştirmişlerdir [58]. Eğer süt melamin içeriyorsa, altın nanopartiküller eklendiğinde karışımın rengi pembeden maviye dönmektedir. Yine yapılan başka bir çalışmada, et ve ürünlerinde domuz etini tespit etmek için altın nanopartiküllerden faydalanılmıştır [59]. Kaliforniya’da bir yağ firması, kızartma yağına ekledikleri nano gözenekli seramik tanecikler ile yağın kullanım süresini uzatırken, kısa kızartma süresinde daha az yağ ile kızartılmış gevrek yapılı patatesler elde etmişlerdir. İsrail’de bir işletme ise, yağda çözünemeyen vitamin ve minerallerin enkapsüle edildiği nanopartikülleri kullanarak yağ üretmiş, bu sayede günlük tüketimde bile bu bileşenleri alınabilir hale getirmiştir [60].

2.1.2 Mikroenkapsülasyon (ME)

Mikroenkapsülasyon; katı, sıvı ve gaz halindeki gıda bileşenlerinin, enzimlerin veya diğer aktif maddelerin çevresinin bir veya birden fazla film tabakası ile kaplanarak, µm veya mm aralığındaki büyüklüklere sahip mikrokapsüller elde edilmesi işlemidir. Elde edilen mikrokapsüller homojen bir duvar ile çevrilidir. Mikrokapsül içerisinde bulunan madde "iç faz" veya "dolgu" olarak tanımlanırken, dış kısmı oluşturan duvar ise "kaplama materyali" veya "kabuk" olarak ifade edilmektedir. Gıda endüstrisinde katı, sıvı veya gaz halindeki bileşenlerin, gıda saflığında kaplama materyalleri ile kaplanmasında mikroenkapsülasyon tekniğinden yararlanılmaktadır [61]. Bu teknik ile genellikle vitaminler, mineraller, renk ve aroma maddeleri, enzimler, katı ve sıvı yağlar mikrokapsüllenmektedir [22]. Bu yöntemdeki temel amaç;

- Gıda bileşenlerini olumsuz çevre koşullarının etkisinden (sıcaklık, nem, ışık, hava gibi) korumak ve stabilitesini sağlamak,
- Sıvıları katı forma dönüştürmek,
- Aktif bileşenlerin kontrollü salınımını sağlamak,
- Aroma maddeleri arasında oluşabilecek istenmeyen tat ve bozulmaları önlemek,
- Depolama sırasında oluşabilecek bozulmaları önlemek,
- Beslenme ile ilgili kayıpları minimize etmek [62,63].

ME yönteminde, hücreler 0,45 μm 'den daha küçük gözeneklere sahip, çapı 5-300 μm arasında değişen kaplama materyalinin içerisine hapsedilir. Prosesdeki ilk basamak kaplama için uygun materyalin tespit edilmesidir. Kaplama materyali olarak da film oluşturabilen şekerler, proteinler, protein esaslı bileşikler, selüloz, gamlar, polisakkaritler, veya lipidler kullanılabilir [64,65]. Mikroenkapsülasyon da kullanılacak kaplama materyalinin; yüksek geçirgenliğe sahip, ortamla uyum sağlayabilecek, yüksek stabiliteli, toksik olmayan, ekonomik, enkapsüle edilecek bileşen ile reaksiyona girmeyecek gibi özelliklere sahip olması gerekmektedir [66]. Belirtilen tüm özellikleri taşıyan bir kaplama maddesi mevcut olmadığı için temel kaplama maddesi; antioksidan, şelat ajanları veya biyosüpfaktan gibi taşıyıcı ajanlarla ya da diğer kaplama materyalleriyle birlikte kullanılmaktadır [67].

Temel olarak mikroenkapsülasyon tekniği ile doğal bileşenlere bir takım yararlı spesifik özellikler yüklenerek, gıda endüstrisinin bir çok alanında farklı amaçlarla bu teknikten faydalanılmaktadır [68]. Son yıllarda, bilhassa fonksiyonel gıdaların öneminin artması mikroenkapsülasyon tekniğini gıda endüstrisi için önemli kılmaktadır [69].

2.2 Enkapsülasyon Metotları

2.2.1 Püskürterek Kurutma

Püskürterek kurutma yöntemi, aktif materyalin taşıyıcı sistem ile emülsiyonuna ve dispersiyonuna dayanmaktadır. Elde edilen emülsiyon ve dispersiyon homojenize edildikten sonra, homojen kitle püskürmeli kurutucuya verilerek sıcak havayla temas eden su buharlaştırılır ve numune kurutulmuş olur [21,70]. Gıda endüstrisinde kullanılan en eski yöntemlerden biridir. Ekonomik olmasının yanında esnek ve kullanışlı olması sebebiyle de

gıda uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntemle elde edilen partiküllerin 10-100 µm arasında değişmektedir [21,23]. Ayrıca bu prosesle su aktivitesi azaldığı için mikrobiyolojik bozulmaların önüne geçilerek, taşıma ve depolama maliyetleri de azaltılmış olur. Bu yöntem genellikle antioksidan, yağ ve aroma gibi bileşenlerin kaplanması veya sıvı formun katı forma dönüştürülmesinde sıklıkla kullanılmaktadır [71]. Kaplanacak aktif maddelerin yüksek sıcaklıklarda bozulma riskinin olması bu yöntemin en büyük dezavantajıdır [21]. Ancak, buna rağmen kurutucuyla olan temas süresinin oldukça kısa olması sebebiyle bu dezavantaj minimize edilebilmektedir [72].

Yapılan çalışmalarla, süt tozu üretimi ile püskürterek kurutma prosesi geliştirilmiştir. Aktif madde olan süt yağı kapsülün özünü oluşturup, taşıyıcı sistemi ise süt proteinleri ve laktoz karışımı oluşturmaktadır. Böylece, kaplayıcı materyal olan karışım, süt yağının oksidasyona karşı korumuş olmaktadır. Bu çalışma kapsamında laktoz camsı yapıyı oluştururken, süt proteinleri ise film oluşturma ve emülsifiye etme vazifesi görmektedir [61].

2.2.2 Koaservasyon

Pahalı bir metot olan koaservasyon yönteminden, polifenoller gibi bozulmaya eğilimli aktif maddelerin enkapsülasyonunda yararlanılır [21]. Bu proses, sıvı fazın polimerik çözeltisinden ayrılan kaplama fazının, çekirdek materyalini homojen bir tabaka halinde sarması esasına dayanmaktadır [22,71]. Balık yağı, vitamin, yağ aromaları ve enzimlerin enkapsülasyonu için kullanışlı bir metottur. Pahalı ve karmaşık bir proses olmasının yanında, pek çok ülkede kullanımın kısıtlı olduğu gluteraldehit kullanımını gerektirmesi büyük bir dezavantajıdır [66]. Basit ve kompleks olmak üzere iki tip koaservasyon mevcuttur. Basit koaservasyonda tek tip polimer kullanılırken, kompleks koaservasyonda birden fazla polimer kullanılmaktadır [73]. Bu yöntemle kaplanan partiküllerin büyüklüğü 30-100 µm arasında değişmektedir [74].

Enkapsülasyon uygulamalarında ilk kullanılan yöntem koaservasyon yöntemidir. Green ve Scheicer 1955’de, basınca duyarlı karbonsuz kopya kağıdı üretmeye yönelik çalışmalarını bu yöntemle sürdürmüşlerdir [75].

2.2.3 Ekstrüzyon

Bu yöntem genellikle aroma maddelerinin enkapsülasyonunda kullanılmaktadır [22]. Gliserin, glukoz, sakkaroz ve glukoz şurubu en sık kullanılan kaplama materyalleridir [76].

Bu yöntem, uçucu ve stabil olmayan tat ve aroma bileşenlerinin, camsı karbonhidrat matriksi içerisinde enkapsüle edilmesi esasına dayanmaktadır [66,77]. Isıya duyarlı aroma maddeleri ekstrüzyon metodu ile enkapsüle edilerek, oksidasyona karşı dayanıklı kapsüller elde edilmektedir [78]. En önemli avantajı söz konusu aktif bileşenlerin oksidasyonunu önleyerek ürünlerin raf ömrünün uzatılmasıdır. Proses aşamasında meydana gelen bariyer sayesinde oksijen giriş ve çıkışları kontrol altında tutulur ve herhangi bir hava akımı camsı matriksten çok yavaş geçer. Yapılan çalışmalarda püskürterek kurutma yöntemi ile enkapsüle edilen uçucu yağların raf ömrü 1 yıl iken, ekstrüzyon yöntemiyle enkapsüle edilen uçucu yağların raf ömrünün 5 yıla kadar çıktığı gözlemlenmiştir. Ekstrüzyon yönteminde kullanılabilecek kaplama materyalinin kısıtlı olması ve 500-1000 µm büyüklüğünde partiküller oluşturması yöntemin en büyük dezavantajlarıdır [66].

2.2.4 Dondurarak Kurutma

Liyofilizasyon olarak da bilinen bu yöntemde, ürün -90 ile -40 °C arasındaki düşük sıcaklıklarda dondurulur ve meydana gelen buz kristalleri süblimasyonla üründen uzaklaştırılır [20]. Proses üç aşamada gerçekleştirilir. İlk aşama olan dondurma aşamasında; ürün şoklanır ya da gıdadaki su, derin dondurucuda buz kristallerine dönüşür. 2. aşama olan temel kurutma aşamasında; süblimasyon sonucu buz kristalleri uzaklaştırılır. Son aşama olan ikinci kurutmada ise; gıdada bulunan bağlı su uzaklaştırılır [23]. Böylece suda çözünen aktif madde ve kaplayıcı materyalin dondurularak kurutulması sonucu, porlu yapıda partiküller elde edilir [20]. Bu yöntem aroma maddelerinin, suda çözünür bileşiklerin ve ısıya duyarlı maddelerin enkapsülasyonunda kullanılmaktadır [19]. Dondurarak kurutmada aroma kaybının minimum olmasının yanı sıra; pahalı bir metot olması, uzun süren bir işlem gerektirmesi ve meydana gelen porlu yapıların iyi birer bariyer görevi görememesi gibi dezavantajları da mevcuttur [20]. Maliyetinin ucuz olması sebebiyle gıda endüstrisinde mikroenkapsülasyon prosesi genellikle püskürtmeli kurutma ile yapılmasına rağmen, dondurarak kurutma yönteminin ısıya duyarlı bileşenlerin enkapsülasyonuna alternatif olabileceği belirtilmektedir [79].

2.2.5 Lipozom Dağıtma

Fosfolipidlerin suda çözünmesi sonucu meydana gelen, membran yapısına sahip küreciklere "lipozom" denilmektedir. Gıda endüstrisinde kullanılmalarının amacı; vitamin, antioksidan ve enzimlerin stabilitesini arttırmaktır. İlk kez Cambridge Üniversitesinde

Çalışma yapan bir takım araştırmacı tarafından geliştirilmiştir. Lipozomların oluşum mekanizmasında lipit ve su molekülleri arasındaki hidrofobik - hidrofilik reaksiyonlar bulunması sebebiyle, beslenme ve tarım uygulamalarında da bu yöntemden yararlanılmaktadır. Yöntemin en önemli avantajları, enkapsüle edilmiş maddenin raf ömrünün uzun süre muhafaza edilmesi ve sindirim sisteminde önemli oranda biyoyararlılık sağlamasıdır [21, 71].

Lipozomlar içerisinde enzim tutuklanmasına dair yapılan bir mikroenkapsülasyon çalışmasında, Saint-Paulin peynirinin olgunlaşması gerçekleştirilmiştir. Söz konusu çalışmayı yapan araştırmacılar, bu işlem ile olgunlaşma hızının arttığını belirtmişlerdir. Sonuç olarak iyonik lipozomların, n  tr  l lipozomlardan daha çok enzim tutabilme kapasitesine sahip olduklarını ifade etmişlerdir [71].

2.2.6 İyonik Jelasyon

Literatürde, nanoboyutta kitosan partikülleri hazırlamak için kullanılan çok fazla yöntem bulunmaktadır. Bu tekniklerden en çok kullanılanları iyonik jelasyon [26] ve ters misel [80] teknikleridir. Ters misel tekniğinde partikül büyüklüğü çok daha k   k ve kararlı parçacıklar   retilse de, çapraz bağlayıcı maddenin toksik etkisi ve bırakabileceği artıklardan dolayı, iyonik jelasyon tekniği daha fazla tercih edilmektedir [81]. Kimyasal apraz bağlayıcıların toksik ve istenmeyen etkilerine karşı, fiziksel çapraz bağlayıcılar kullanılır. Kitosan ile zıt yüklü bir bağlayıcının tersinir bağlanması sonucu enkapsülasyon gerçekleşmektedir. Çapraz bağlayıcı olarak da genellikle TPP kullanılmaktadır. İyonik jelasyon yöntemi, (+) yüklü amin grupları ile tripolifosfat gibi polianyonların (-) gruplarının iyonik etkileşimine dayanır [82] ve neticesinde, kitosan ile bağlayıcı madde arasında biyolojik olarak uyumlu ve toksik olmayan bir kompleks meydana gelir [83]. Kitosan, alkali ve n  tr  l koşullar altında çözünmeyen ancak asidik koşullar altında organik ve inorganik asitlerle (asetik asit, hidroklorik asit, glutamik asit gibi) reaksiyona girebilen bir maddedir [84]. TPP ise, çoklu bağ yapma özelliği ve toksik olmayışı sebebiyle en fazla kullanılan çapraz bağlayıcı ajanlardan biridir, aynı zamanda çok fazla multivalent özelliğe sahiptir [82]. Kitosan nanopartikülleri hazırlamak için geliştirilmiş tekniklerden en göze çarpanı iyonik jelasyon yöntemidir. Kontrol edilebilir bir prosesde gerçekleşmesi, stabil oluşu ve ortamda serbest bir organik çözücü bulunması yöntemin en önemli avantajlarıdır [15]. İlk kitosan nanopartikülleri, Calvo ve arkadaşları tarafından kitosan ve TPP arasında iyon jelasyon tekniği ile hazırlanmıştır [26]. Pek çok çalışmada da bu yöntemle oluşan

kitosan partiküllerinin; proteinler, hidrofilik-hidrofobik ilaçlar ve vitaminler gibi çeşitli aktif maddelerin enkapsülasyonunda kullanıldığı bildirilmiştir [13]. Söz konusu proses de, aktif madde ve polimer çözeltisi homojen hale getirildikten sonra, çapraz bağlayıcı materyal bir şırınga yardımıyla damlacıklar halinde çözeltiye eklenmesiyle küresel parçacıklar elde edilir. Kitosan ile bağlayıcı materyal yarı geçirgen bir zar oluşturarak, kapsül yüzeyi daha düzgün kapsüller oluşmasını sağlar. Üretilen partiküllerin boyutu ise; titreşim sistemine, kaplayıcı maddenin vizkozitesine ve polimer çözeltisi ile şırınga arasındaki mesafeye bağlıdır [31]. Kitosanın yanı sıra, aljinat ve pektin çözeltisinin kalsiyum solüsyonuna damlatılması (iyonik jelasyon), peynir altı suyu proteinlerinin sıcak solüsyona damlatılması (sıcak jelasyon) ve jelatin çözeltisinin soğuk solüsyona damlatılması (soğuk jelasyon) ile de mikropartiküller elde edilebilmektedir [85].

2.3 İyonik Jelleşme Yöntemiyle Üretilen Nanopartiküller ile Film Üretimi

Nanokompozit ambalajların gıda paketlemede kullanılması 1990'lı yıllara dayanmaktadır. Söz konusu filmlerin temelini, polimer bir matriks ve bu matrikse gömülü bir dolgu malzemesi oluşturmaktadır [86]. İyonik jelleşme ile kitosan ve TPP molekülleri arasında elektrostatik etkileşim gerçekleştirilmesi sonucu, kitosan nanopartikülleri kendiliğinden oluşmaktadır. Kitosanın asetik asit çözeltisi içerisinde çözündürülmesi ile saf kitosan çözeltisi hazırlanır. Plastikleştirici olarak da çözeltiye gliserol katılmaktadır. Gliserol, sorbitol, mannitol, polietilen glikol gibi birçok plastikleştirici yenilebilir film teknolojisinde kullanılabilmektedir [87,88]. Nanoemülsiyonlar, minimal düzeyde işlenmiş meyve sebzeler veya sıvı gıdalara lipofilik malzemeleri taşımak, korumak veya lipofilik maddeyi enkapsüle etmek amacıyla hazırlanmaktadır [89]. Film elde edilecek nanoemülsiyonların, küçük partikül boyutuna sahip olmasının önemli iki sonucu vardır;

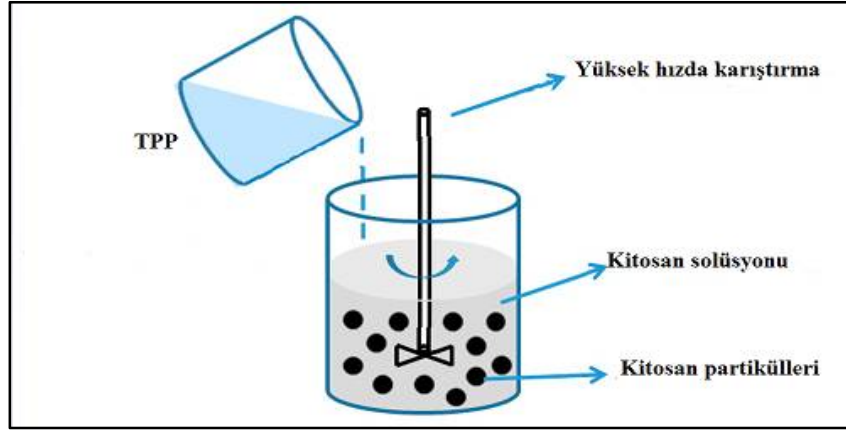
- Gıdanın fizikokimyasal ve duyuşsal özelliklerini geliştirilmesi,
- Kütle birim başına düşen yüzey alanının artmasıyla lipofilik bileşenlerin (aktif maddelerin) aktivitelerinin artmasıdır [90].

Bu durum aynı zamanda aktif bileşenlerin daha düşük dozlarda kullanılmasını sağlamaktadır.

Son zamanlarda, uçucu yağ yüklenmiş nanoemülsiyonların fizikokimyasal özelliklerinin iyileştirilmesine yönelik çok sayıda çalışma mevcuttur [91]. Nanoemülsiyonların temelini polisakkaritler oluşturur ve yenilebilir film formulasyonunda uçucu yağlar önemli birer

ajandır. Kitosanın bariyer oluşturma özelliğinin olması, kitosanı yenilebilir ve antimikrobiyal özellikte ideal bir madde haline getirmektedir. Yapılan birçok çalışmada, kitosanın kaplama materyali olarak kullanıldığı gıdalarda hem raf ömrünü, hem de kalitesini arttırdığı belirtilmiştir [92,93]. Geçmiş yıllarda yüksek hızlı homojenizasyonla ya da bu tür düşük enerjili ultrasonik tekniklerle nanoemülsiyonlara dayalı film formülasyonları oluşturulmuştur [94]. Kurutma işlemi ise etüvde, infrared yardımıyla veya oda sıcaklığında 30-36 saat bekletilerek film elde etme prosesi tamamlanmaktadır. Kitosan bazlı filmlerde çapraz bağlayıcı maddenin konsantrasyonu yükseldikçe, filmlerdeki etkin madde salınımının ve su tutma kapasitesinin azaldığı bildirilmiştir. Filmlerin kalınlığı, su tutma kapasitesi ve etkin madde salımı kullanılan kitosanın molekül ağırlığına bağlı olarak değişebilmektedir [95].

Bir gıdanın yüzeyinde oluşturulan, gıdayı olumsuz sayılabilecek etkilerden koruyan, ince tabakalı, tamamen doğal kaynaklardan elde edilmiş, gıdanın katmanları arasına uygulandığında nem ve gaz gibi etkilerin kontrolünü sağlayabilen, yenilebilir nitelikteki ambalaj materyallerine "yenilebilir kaplamalar" adı verilmektedir [96,97]. Gıda maddelerinde kullanılan bu kaplama materyalleri protein, polisakkarit ve lipit kökenlidir. Kullanılan bu doğal hammaddelerin güvenilirliği kabul edilmiş olmalı, yavaş ve kontrollü bir şekilde gıdanın solunumuna izin vermelidir [98]. Yenilebilir filmler, gıdaların raf ömrünü uzatmanın yanı sıra paketleme malzemesinin ekonomik verimliliğini de arttırmaktadırlar. Ayrıca bu filmler, gıdada meydana gelebilecek lezzet ve aroma maddelerinin kaybını azaltmanın yanında, suyun üründen buharlaşmasının düzenlenmesini, gıdaya oksijen, karbondioksit ve lipit transferini de gerçekleştirmektedirler [99,100,101,102]. Su ve aroma maddelerinin yanı sıra antioksidanların, antimikrobiyal maddelerin, vitaminlerin ve çeşitli pigmentlerin ürün içerisinde tutulmasını sağlamaktadırlar. Film yapısında bulunan antimikrobiyal maddenin filmde gıda yüzeyine difüze olması sebebiyle, hem filmde hem de gıda yüzeyinde antimikrobiyal etki meydana gelir [103,104]. Yenilebilir filmlerin kullanımı yeni bir uygulama değildir, ancak son yıllarda gittikçe önem kazanmaktadır. Çin’de, nem kayıplarını azaltmak için portakal ve limonlar mum ile, Avrupa’da ise (16.yy) et yüzeyleri yağlarla kaplanıyordu. Yağların yanı sıra, jelatinin de kaplama materyali olarak kullanılmaya başlanması 19. yy’da gerçekleşmiştir. Daha sonra ki yıllarda ise, işlenmiş et ürünlerinde hayvan bağırsağı yerine kaplama materyali olarak yenilebilir kollojen kaplamalar kullanılmaya başlanmıştır [99,105]. Şekil 2.1’ de iyonik jelleşme yöntemi şematik olarak gösterilmiştir.

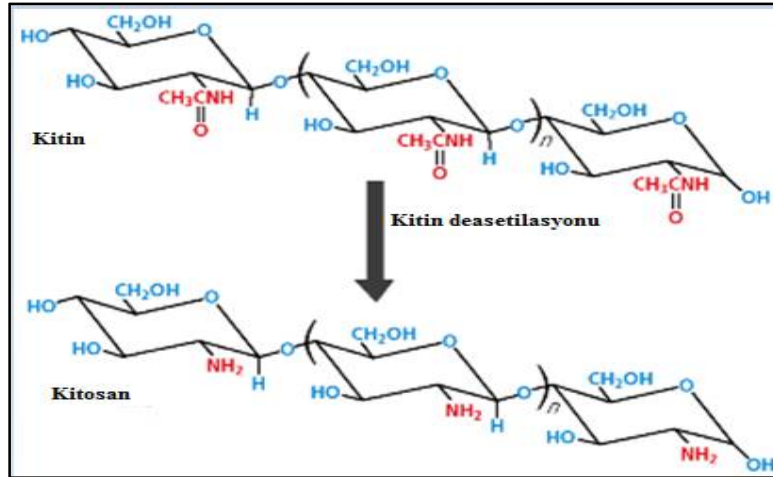


Şekil 2.1 İyonik jelleşme yönteminin şematik olarak gösterimi [106]

2.4 Hammadde

2.4.1 Kitosan

Kitosan β -(1,4)-glikozidik bağlarıyla bağlı, D-glukozamin ve N-asetil D-glukozamin kopolimerinden oluşan katyonik bir doğal polisakkarittir [14]. Yengeç ve karides gibi kabuklu deniz canlılarının dış iskeletlerinde ve kelebeklerin kanatlarında bulunur ve kitinin kısmi deasetilasyonu sonucu elde edilmiştir. Selülozdan sonra doğada en sık bulunan biyopolimerdir [107,108]. Şekil 2.2’de kitosanın kimyasal yapısı görülmektedir.



Şekil 2.2 Kitin ve kitosanın kimyasal yapıları [109]

Kitosan ilk kez Henri Braconnot tarafından 1811 yılında keşfedilmiştir ve Braconnot, mantarın bulundurduğu kitini sülfirik asit ile çözmeye çalışmış ancak herhangi bir başarı elde edememiştir. Hoppe Seyler ise 1894’de kitini 180 °C’de potasyum hidroksit ile muamele etmiş (deasetilasyon) ve kitosanı elde etmiştir [110]. Kitosan elde edilmeden

önce ürün kabukları öncelikle yıkanarak üzerinde bulunabilecek kum ve yabancı maddelerden temizlenir. Sonrasında ise üzerinde kalabilecek doku kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla "deproteinizasyon" adı verilen; %3 NaOH ile 30 dakika boyunca kabukların kaynatılması işlemi uygulanır. Bu işlemin ardından ürün soğutulur ve herhangi bir alkali kalıntısı kalmaması için su ile durulanır. Bir sonraki aşamada ise kabuklar 30 dakika boyunca %3 HCl ile muamele edildikten sonra (deminerilizasyon) iyice durulanır ve su miktarı maksimum %6 olacak şekilde pres uygulanır. Böylece kitin elde edilmiş olur. Kitine deasetilasyon işlemi uygulanarak; kostik asit çözeltisinde 90-95 °C'de ortalama 1.5 saat muamele edilir, süzülür ve alkali kalmaması amacıyla iyice yıkanır. Suyun fazlası pres uygulanarak uzaklaştırılır ve böylece kitosanın yaş formu elde edilir. Yaş kitosan da toz haline getirilmeden önce, nem miktarı %5'in altında olacak şekilde güneşte kurutulur ve paketlenerek 3 aya kadar kuru ortamda muhafazası sağlanır [108,111].

Kitosan beyaz renkli, tatsız, kokusuz, saydam partikül veya toz formunda bulunabilen, sindirim enzimleri tarafından hidroliz edilemeyen bir materyal olmasının yanı sıra nem tutma, film oluşturma, çöktürme, enzim ve mikroorganizma inhibe etme gibi çeşitli fonksiyonlara sahiptir [112,113,114]. Bariyer oluşturma kabiliyetinden ötürü antimikrobiyal özellikte yenilebilir film ve kaplamalar için ideal bir malzemedir. Kitosanın Japonya ve Kore'de gıda katkı maddesi olarak kullanımı yasaldır, ABD'de ise GRAS listesinde bulunmaktadır [92,93]. Kitosan bazlı filmlerin üretiminde solvent olarak genellikle asetik asit kullanılmaktadır ve film yarı geçirgen özellikte olduğu için iç atmosferi değişebilmektedir [115]. Kitosan gıda sanayinde yaygın olarak film şeklinde kullanılmaktadır. Özellikle meyve ve sebzelerin raf ömrünün uzatılmasında ve kalitelerinin uzun süre muhafaza edilmesinde kullanım potansiyeli oldukça yüksektir. Gıdaların kitosan bazlı filmle kaplanması sonucu ambalaj içerisindeki kısmi oksijen basıncı azalırken, gıda ile bulunduğu ortam arasındaki sıcaklık da nem alışverişi sayesinde kontrol altında tutulmaktadır. Böylece, solunum ve enzimatik esmerleşme de kontrol edilebilmektedir. Ayrıca kitosandan; tekstür ayarlanması, renk stabilizasyonu, doğal aromanın korunması gibi konularda da faydalanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, kitosanın polikasyonik özelliğinden ötürü antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu ve antioksidan özelliğinin ise, polimer zincirindeki amino ve aktif hidroksil gruplarından kaynaklandığı tespit edilmiştir [116,117,118,119,120]. İyi derecede biyouyumluluğu, biyobozunurluğu, katyonik karakterde ve çevre dostu olmasında dolayı kitosan, son yıllarda çeşitli sektörlerde oldukça önem kazanmıştır [15,121,122].

2.4.2 *Satureja hortensis* L. (zahter)

Satureja hortensis L. (zahter) bitkisi İstanbul başta olmak üzere, Sakarya, Ankara, Zonguldak, Amasya, Samsun, Tokat, Diyarbakır, Adana, Erzurum gibi ülkemizin çeşitli illerinde yetişmektedir. Tek yıllık bir bitkidir ve çiçeklerini rengi eflatun, morumsu ve beyazdır. Genellikle kayalık ve erozyona meyilli alanlarda yayılım göstermektedir. Bitkinin kurutulmuş çiçekli ve yapraklı dallarından drog (hayvan ve bitkilerin kök, yaprak, kabuk, kanat gibi kısımlarından kurutarak veya özel metotlarla elde edilen ham veya yarı ham madde) olarak faydalanılmaktadır. Drogda uçucu yağ oranı % 0,3-2 arasında değişmektedir. *Satureja hortensis* L. bitkisinden elde edilen uçucu yağın antimikrobiyal etkisinin bulunduğunu ve gıdaların bozulmasını engellemek amacıyla kullanılabileceği bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, zahter bitkisine ait uçucu yağ ana bileşeni kalvakrol olarak belirlenmiştir. Bitkiden elde edilen uçucu yağ veriminin ise, en fazla çiçeklenme döneminde yapılan hasattan alındığı tespit edilmiştir [123].

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Çalışmada kitosan nanopartiküllerini elde etmek amacıyla yengeç kabuklarından elde edilmiş kitosan (%85 deasetile edilmiş), Sigma-Aldrich'den (Almanya) satın alınmış sodyum tripolifosfat (sTPP, teknik kalite) ve asetik asit (>99,7 saflık) kullanılmıştır. Tween 80 ise Merck'den (Almanya) temin edilmiştir. Zahter aromatik bitkisinden kurutularak ayrılmış kısımlar Kayseri'deki yerel bir baharatçıdan temin edilmiştir.



Şekil 3.1 *Satureja hortensis* L. bitkisi

3.2 Yöntem

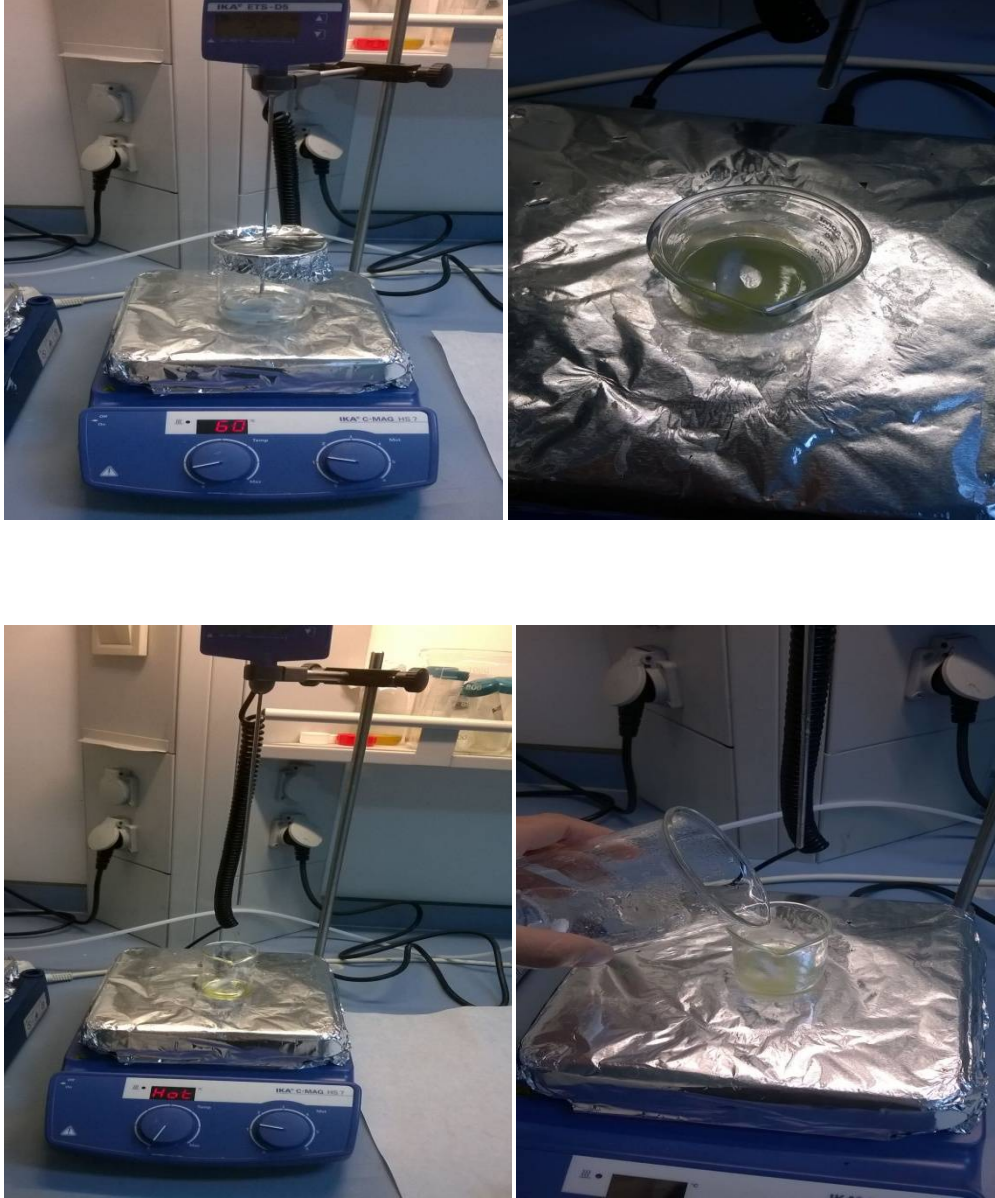
3.2.1 Zahter Bitkisinden Uçucu Yağ Elde Edilmesi

Kurutulmuş bitki yapraklarından elde edilen uçucu yağ ekstraksiyonu, Göktürk [124] ve arkadaşları tarafından Klavenger cihazı kullanılarak tarif edilen metoda göre gerçekleştirilmiştir. Buhar damıtma yönteminde, yaklaşık 200 gram bitki materyali kullanılmış ve damıtma sonucu soğutma tüneline ayrılan uçucu yağ özütleri elde edilmiştir. Söz konusu damıtma ve soğutma işlemi ortalama 3 saat sürmüştür. Elde edilen uçucu yağ, cam tüpte ve tüpün kapağı parafinlenerek kullanılıncaya kadar buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.3 Uçucu Yağ Yüklenmiş Kitosan Nanopartiküllerinin Üretimi ve Karakterizasyonu

3.3.1 Uçucu Yağ Yüklenmiş Kitosan Nanopartiküllerinin Hazırlanması

İlk olarak saf su içerisinde asetik asit solüsyonu hazırlanarak (1% v:v, 40 mL), manyetik karıştırıcı vasıtasıyla 60 °C sıcaklıkta 30 dakika boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra solüsyona kitosan (0,5% w:v) ilave edilerek, aynı şartlar altında kitosan tamamen eriyip homojen bir karışım elde edilinceye dek (yaklaşık 45 dakika kadar) karıştırılmaya devam edilmiştir. Solüsyon homojen hale geldikten sonra, 2N'lik NaOH ile pH 4,7-4,8 civarında bir değere ayarlanmıştır. Elde edilen karışım 10 dakika kadar daha manyetik karıştırıcıda kaldıktan sonra, önceden hazırlanmış olan uçucu yağ-tween 80 (1:0,5, v:v) karışımı, hedef kitosan çözeltisine damlalar halinde dahil edilmiştir. Çalışma, uçucu yağın 5 farklı konsantrasyonu üzerinde (0% (kontrol), 1%, 1,2%, 1,4% ve 1,5%, v:v) gerçekleştirilmiştir. Daha sonra karışım homojen bir emülsiyon haline gelinceye dek, ortalama 1,5 saat oda sıcaklığında karıştırılmaya devam edilmiştir. Çözelti iyice homojen hale geldikten sonra, hazırlanmış olan 12 mL'lik TPP (0,05%, w:v) çözeltisi yavaşça ve damlalar halinde, 1000 rpm de karışan manyetik karıştırıcı eşliğinde, yağ ve kitosan çözeltisine damlatılmıştır. 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştıktan sonra, elde edilen nanopartiküller santrifüj tüpüne alınarak ve tüplerin kapak kısmı hava almayacak şekilde parafinlenerek, kullanılıncaya kadar 4 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.2 Yağ ve kitosan solüsyonlarının hazırlanması

3.3.2 Zetapotansiyel ve Boyut Ölçümleri

Nanopartiküllerin koloidal dağılım stabilitelerini belirlemek amacıyla, zetasizer kullanılarak nanopartiküllerin zetapotansiyelleri ölçülmüştür (Nano ZSP, Malvern Instruments Corp., Worcestershire, İngiltere). Ölçümler 25 °C’de, elektrot içeren kapiler hücre kullanılarak ve dağıtıcı ajan olarak saf su içerisinde gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar ilk 10 ölçümün ortalaması şeklinde kaydedilmiştir. Uçucu yağ yüklenmiş kitosan nanopartiküllerinin boyutu ise bir nanopartikül boyut ölçüm cihazı (Nano ZSP, Malvern Instruments Corp., Worcestershire, İngiltere) ile, nanopartiküller saf su ile seyreltilerek ve 10-15 dakika ultrases dalgasına maruz bırakıldıktan sonra ölçülmüştür. Ölçümler 173’lük

açıyla yapılmıştır. Dinamik ışık saçılımı (DLS), ortalama partikül çapını belirlemek için kullanılmıştır.

3.3.3 Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi (EE)

İlk olarak uçucu yağ yüklenmiş kitosan nanopartiküllerinden 100 µL alınarak, 5 mL 1 M'lık HCl çözeltisi ile karıştırılmış, ardından 95 °C'deki ultrasonik su banyosunda (Daihan, WUC-D10H, Kuzey Kore) 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Su banyosundan çıkartıldıktan ve soğuduktan sonra, 1 mL etanol eklenerek manyetik karıştırıcıda iyice karıştırılmıştır. Ardından 9000 rpm'de ve oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra, elde edilen supernatantların absorbans değerleri, 250 ile 400 arasında değişen dalga boylarında ölçülmüştür. Eşitlik 3.1'de ki formüle göre, kapsülleme verimliliği yüzde olarak hesaplanmıştır [125] :

$$\%EE = \left(\frac{\text{Yüklenen uçucu yağın ağırlığı}}{\text{Uçucu yağın başlangıç ağırlığı}} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

3.3.4 Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi

Uçucu yağ yüklenmiş kitosan nanopartiküllerinin antibakteriyel aktivitesi üç bakteri suşuna karşı incelenmiştir (*E. coli* O157:H7 ATCC 33150, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Listeria monocytogenes* ATCC 19118). Analiz yöntemi olarak, Törnük [126] tarafından bildirilen broth dilisyon metodu kullanılmıştır. Öncelikle taze bakteri kültürü elde etmek için, Nutrient Broth (Merck, Almanya) içerisindeki bakteri suşları 37 °C'de 24 saat boyunca iki kez aktifleştirilmiştir. Aktif hale getirilmiş bakteri suşlarından ($\sim 10^5$ – 10^6 kob/mL) ve farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ içeren kitosan nanopartikül örneklerinden %5 (v:v) oranında alınarak, steril Nutrient Broth' lara (7 mL) ilave edilmiştir. Bakteri suşu ve kitosan nanopartiküllerini içeren test tüpleri 1 dakika vortekslenmiş ve çalkalamalı inkübatörde 140 rpm de 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Bakteri sayımları, 0., 12. ve 24. saatlerde yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda süspanse edilmiş örnekler, peptonlu su (MRD, Merck, Almanya) ile 10 kat seyreltilmiş ve Nutrient Agar üzerine damlatma tekniği ile ekimi yapılmıştır. İnkübasyon sonunda koloniler sayılmış ve logaritmik değerlere çevrilmiştir.

3.3.5 Antioksidan Etkinliğinin Belirlenmesi(AOA)

DPPH (2,2 difenil-1-pikrilhidrazin hidrat) metodu ilk kez Brand – Williams vd. [126] tarafından kararlı DPPH radikaliyle karşı bitki ekstraktının radikal yakalama aktivitesini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Daha sonra Sanchez-Moreno vd. [127] yöntemi değiştirerek kullanmaya başlamışlardır. Uçucu yağ yüklenmiş kitosan nanopartiküllerinin antioksidan aktiviteleri (AOA), Singh vd. [128]’nin kullandığı yöntemin modifiye edilmesi sonucu, nanopartiküllerin 2,2-difenil-1-pikrilhidrazin (DPPH) radikaliyle yakalama testleri yapılarak belirlenmiştir. Elde edilen nanopartikül örneklerinden 0,1 mL alınmış ve 4,9 mL alınan 0,1 mM’lık DPPH solüsyonuna eklenmiştir. Elde edilen karışım 30 dakika boyunca karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Kontrol olarak örnek yerine metanol konulmuş ve spektrofotometrede 517 nm dalgaboyunda ölçüm yapılmıştır (Shimadzu, UV 1800, Japonya). Antioksidan aktivite aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır (AOA) :

$$\%AOA = \frac{(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}})}{A_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (3.2)$$

A_{kontrol} : Kontrol absorbans değeri (metanol)

$A_{\text{örnek}}$: Uçucu yağ içeren nanopartiküllerin absorbans değeri

Bu çalışma kapsamında elde edilen anti radikal aktivite sonuçları, troloks eşdeğerliliği cinsinden de ifade edilmiş olup, sonuçlar Eşitlik 3.3’de sunulan formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Troloks eşdeğerlilik (mg/L)} = [(5,288 \times \text{ARA}\%) - 6,376] \times \text{Dilüsyon Faktörü} \quad (3.3)$$

3.3.6 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi

Uçucu yağ yüklü kitosan nanopartiküllerinin moleküler karakterizasyonu, bir DLaTGS dedektörü ve KBr ışın ayıracıyla donatılmış FTIR (Bruker Tensor 27, Bremen, Almanya) spektroskopisi tarafından ölçülmüştür. Ölçüm 400-4000 cm^{-1} arasındaki frekanslarda ve 4 cm^{-1} çözünürlükte gerçekleştirilmiştir.

3.3.7 Taramalı Elektron Mikroskopu Analizi (SEM)

Kitosan nanopartiküllerinin morfolojik özellikleri taramalı elektron mikroskopuyla analiz edilmiştir (SEM LEO 440 Stereoscan). Öncelikle, örnekler liyofilize edilmiş ve dijital SEM mikro grafiklerine ulaşılmıştır.

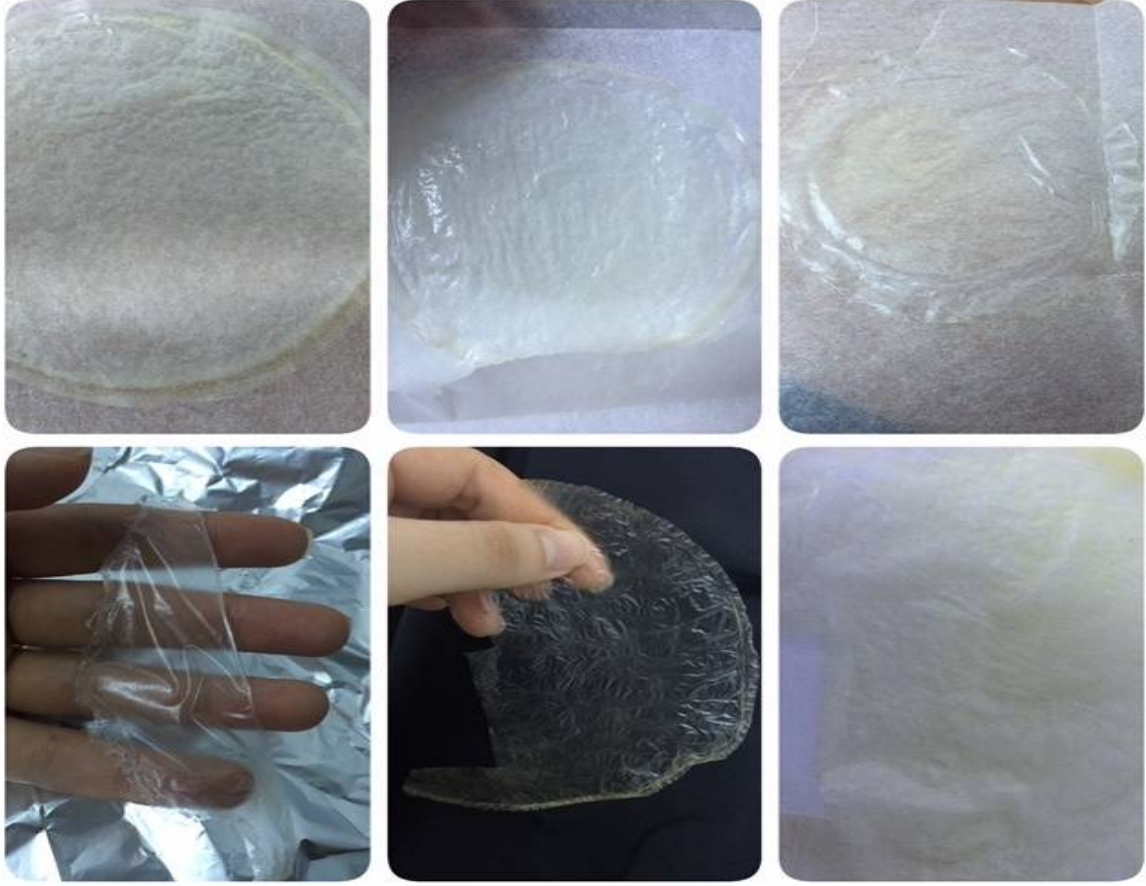
3.3.8 Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC)

Farklı konsantrasyonlardaki uçucu yağlarla zenginleştirilmiş kitosan nanopartiküllerinin termal özelliklerini incelemek amacıyla, DSC cihazı (DSC Q20, TA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Alüminyum kaplı DSC kapları içerisine nanopartikül örneği (5-10 mg) konulmuş ve 10 °C/dk ısıtma oranı ile azot atmosferinde 40 °C'den 400 °C'ye kadar ısıtılmıştır. Örneğe verilen enerji (mW), sıcaklık ve zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilmiştir.

3.4 Uçucu Yağ Yüklenmiş Kitosan Filmlerinin Üretimi ve Karakterizasyonu

3.4.1 Uçucu Yağ Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinden Film Üretimi

Film üretim prosesi, bölüm 3.2.2' de izah edilen yöntemle hazırlanan uçucu yağ yüklü kitosan nanopartiküllerinin üretim basamaklarıyla aynıdır. Fakat; kitosan, asetik asit ve saf su emülsiyonu oluştuktan sonra tek fark olarak % 0,5 (v/v) oranında gliserol (Merck, Almanya) ilave edilip, TPP ve farklı konsantrasyonlardaki uçucu yağlarında (%1, %1,2, %1,4 ve %1,5) eklenmesiyle işlem basamaklarına devam edilmiştir. Elde edilen solüsyon, teflon tavaya dökülerek 40 °C'de 3,5 saat boyunca 1,3 m/s sabit hıza sahip kabin fırını ile kurutulmuştur (Memmert UF110, Almanya). Elde edilen filmler, oda sıcaklığında karakterizasyon işlemleri yapılınca dek muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.3 Ürettiğimiz farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklü kitosan film örnekleri

3.4.2 FTIR

Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklü kitosan film örnekleri ve uçucu yağ yüklenmeyen kontrol örneklerine ait spektrumlar, oda sıcaklığında bir FTIR (Bruker Tensor 27, Bremen, Almanya) spektroskopisi tarafından ölçülmüştür. Analizde yaklaşık olarak 0,045-0,055 mm kalınlığında filmler kullanılmıştır. Uçucu yağa ait spektrumlar, KBr diskleri ile elde edilmiştir. Ölçüm $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ arasındaki frekanslarda ve 4 cm^{-1} çözünürlükte gerçekleştirilmiştir.

3.4.3 Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC)

Kitosan filmlerinin (kontrol ve farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklü film örnekleri) erime ve kristalizasyon sıcaklıklarının belirlemesi amacıyla, DSC cihazı (DSC Q20, TA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Alüminyum kaplı DSC kapları içerisine 5-10 mg ağırlığında ve yaklaşık 0,045-0,055 mm kalınlığında kitosan film örnekleri konulmuş ve 10

°C/dk ısıtma oranı ile azot atmosferinde 40 °C'den 400 °C'ye kadar ısıtılmıştır. Örneğe verilen enerji (mW), sıcaklık ve zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilmiştir.

3.4.4 Kitosan Filmlerinin Antioksidan Aktivitesinin (AOA) Belirlenmesi

Kitosan filmlerinin (kontrol ve farklı konsantrasyonlardaki uçucu yağ yüklü film örnekleri) AOA değerleri, Byun ve ark. [130] tarafından belirlenen yöntemle göre 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radikalini yakalama testi ve Sing vd. [128]'nin kullandıkları yöntem modifiye edilerek tespit edilmiştir. İlk olarak 0,1 g film örneği küçük parçalar halinde kesilmiş ve üzerine 2 mL metanol eklenmiştir. Elde edilen karışım, 3 dk vortekste (Stuart, BioCote, İngiltere) karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 3 saat boyunca bekletilmiştir. Daha sonra tekrar 3 dk vortekslenmiş ve santrifüj cihazında (Thermo Scientific, Multifuge X3 FR, Almanya) 2300 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant DPPH radikali yakalama testinde kullanılmıştır. Bu amaçla, elde edilen metanol ekstraktından 0,1 mL alınmıştır ve 4,9 mL alınan 0,1 mM'lık DPPH solüsyonuna eklenmiştir. Elde edilen karışım 30 dakika boyunca karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Her bir örnek 3 paralelli çalışılmıştır. Kontrol olarak örnek yerine metanol konulmuştur ve spektrofotometrede (Shimadzu, UV 1800, Japonya) 517 nm dalgaboyunda ölçüm yapılmıştır. AOA, aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır :

$$\%AOA = \frac{(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}})}{A_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (3.4)$$

A_{kontrol} : Kontrol absorbans değeri (metanol)

$A_{\text{örnek}}$: Uçucu yağ içeren nanopartiküllerin absorbans değeri

Elde edilen sonuçlar, troloks eşdeğerliliği şeklinde de hesaplanmıştır.

3.4.5 Uçucu Yağ Yüklü Kitosan Filmlerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklenmiş kitosan filmlerinin antimikrobiyal etkisi, Emiroğlu ve ark. [131] tarafından bildirilen, agar difüzyon yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Stok kültürlerden *E. coli* O157:H7 ATCC 33150, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* FMC19 ve *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 'a ait koloniler Nutrient Broth (Merck, Almanya) besiyerine inoküle edilmiştir. Nutrient Broth'lar, inokülüm miktarları standart değerlere ulaşmaya kadar 37 °C'de

inkübasyona bırakılmıştır. Aktif hale getirilmiş her bir bakteri kültüründen ($\sim 10^5$ – 10^6 kob/mL) 0,1 mL alınarak steril swab yardımıyla Nutrient Agar besiyerine ekimleri yapılmıştır. Yüzey ekimi yapılmış agar plağı üzerine, farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklenmiş kitosan filmlerinden ve hiç yağ yüklenmemiş kitosan filminden, her bir kenarı 1 cm olacak şekilde kare parçalar kesilmiş ve dörde bölünmüş agar üzerine dört paralel olacak şekilde yerleştirilmiştir. Film örnekleri, agar üzerine yerleştirilmeden önce yüzey sterilizasyonunu sağlamak için UV (EximLab, Çin)’ de 10 dk boyunca bekletilmiştir. Petriler 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda, film parçalarının etrafından oluşan berrak zon çapları ölçürek antimikrobiyal etki değerlendirilmiştir. Sonuçlar mm olarak cetvel ile hassas şekilde ölçülmüştür.

3.4.6 Uçucu Yağ Yüklenmiş Kitosan Filmlerinin Morfolojik Özellikleri (SEM)

Üretilen uçucu yağ yüklü filmlerin yüzey morfolojileri ve nanopartiküllerin polimer matriksi içerisindeki dağılımları Everhardt Thornley ETD, STEM dedektörü ve EDS dedektörüyle donanımlı QUANTA FEG 250 tipi bir taramalı elektron mikroskobu kullanılarak analiz edilmiştir.

3.4.7 Film Kalınlığı

Üretilen filmlerin kalınlıkları, 0,001 mm hassasiyetli dijital bir mikrometre (Mitutoyo, IP65 COOLANT PROOF, Japonya) kullanılarak ölçülmüştür.

3.4.8 Filmlerin Renk Ölçümleri

Üretilen uçucu yağ yüklü kitosan filmlerinin renk parametreleri (L^* , a^* , b^*), renk ölçüm cihazı (CR-400 Konica, Minolta, Tokyo, Japonya) kullanılarak belirlenmiştir. Ölçüm yapılmadan önce beyaz plakayla cihazın kalibrasyonu yapılmıştır. Kalibrasyon sonrasında film örnekleri, beyaz plaka üzerine konularak ölçümler yapılmış ve Hunter L^* , a^* ve b^* parametreleri elde edilmiştir. Söz konusu parametrelerden L^* değeri (0-100) siyah ve beyaz arasındaki renkleri, a^* değeri (+: kırmızı, -: yeşil) yeşil ve kırmızı arasındaki ve b^* değeri (+: sarı, -: mavi) ise sarı ile mavi arasındaki renkleri tanımlamak için kullanılmaktadır [132]. Her bir örnek için, filmlerin 3 farklı noktasından ölçüm yapılmıştır. Her bir örnek için elde edilen ölçümlerin ortalaması alınarak, eşitlik 3.5’e göre değerler hesaplanmıştır:

$$\Delta E^* = [(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2]^{0.5} \quad (3.5)$$

ΔL : $L_{\text{standart}} - L_{\text{örnek}}$

Δa : $a_{\text{standart}} - a_{\text{örnek}}$

Δb : $b_{\text{standart}} - b_{\text{örnek}}$ olarak tanımlanmaktadır.

Beyaz standart değerleri de sırasıyla: L; 91,80, a; 4,35 ve b; 0,25'dir.

3.4.9 Filmlerin Mekanik Özellikleri

Uçucu yağ yüklü kitosan filmlerinin ve yüksüz kontrol film örneklerinin çekme dayanımları (TS, tensile strength) ve kopma anındaki uzama (EB, elongation at break) özellikleri ASTM-D882 kodlu standart metoda [133] göre tekstür analiz cihazı (TA.HD Plus Stable Micro Systems Teksture Analyser, İngiltere) kullanılarak analiz edilmiştir. Ölçüm işleminde 5 kg'lık yük hücresi kullanılmış ve ölçüm oda sıcaklığında (24 ± 1 °C) gerçekleştirilmiştir. Film örnekleri dikdörtgen biçiminde (6 cm–1 cm) kesilmiş ve çekme probunun uç kısımlarından tutturulmuştur. Problar arası mesafe 50 mm olarak ayarlanmış ve filmler 10 mm/saniye hızda gerilmiştir. Gerilme ve kopma eğrilerini içeren grafiklerden TS (MPa) ve EB (%) parametreleri elde edilmiştir. TS, eksenel yük altındaki bir cismin kesit alanı başına düşen kuvvet olarak tanımlanırken, EB ise bu kuvvet altında o cismin boyca uzama oranı olarak ifade edilmektedir. Test edilen farklı konsantrasyonlarda ki film örneklerinin aritmetik ortalamaları alınarak değerlendirme yapılmıştır.

3.4.10 Suda Çözünürlük Testi

Kitosan filmlerinin suda çözünürlükleri Irissin-Mangata, Bauduin, Boutevin, ve Gontard [134] tarafından kullanılan metodun modifiye edilmesi ile belirlenmiştir. Öncelikle, film örnekleri kare biçiminde kesilmiş (3 cm x 3 cm) ve kurutma öncesinde tartılarak ağırlıkları (m_1) kaydedilmiştir. Daha sonra 1,3 m/s sabit hıza sahip kabin fırınında (Mettler UF110, Munich, Almanya) 105 °C'de 24 saat boyunca kurutulmuştur. Kurutulduktan sonra ortalama 30 dk desikatörde bekletilmiş ve kurutma sonrası tartımları alınarak (m_2), kilo kaybı oranı ($m_1 - m_2$) olan nem kütlesi fraksiyonu (ω) belirlenmiştir. Kurutulan film örnekleri daha sonra 20 mL saf su içerisinde, manyetik karıştırıcıyla (C-MAG HS7), oda sıcaklığında 3 saat boyunca karıştırılmıştır. Üç saat sonunda, film örnekleri filtre kağıtları (FilterLab, 400x400 mm) ile süzölmüş ve kabin fırınında 105 °C'de 24 saat kurutulmuştur. Kurutma sonrasında örnekler tekrar 30 dk desikatörde bekletilmiş ve tartılarak ağırlıkları

(m_3) kaydedilmiştir. Çalışma 3 paralelli olarak gerçekleştirilmiş ve aritmetik ortalamaları alınarak hesaplanmıştır. Eşitlik 3.6'e göre sudaki çözünme oranları hesaplanmıştır :

$$S(\%) = \left[\frac{m_1 (1-\omega) - m_3}{m_1 (1-\omega)} \right] \quad (3.6)$$

3.5 İstatistiksel Analiz

Farklı oranlarda uçucu yağ yüklü kitosan nanopartikülleri ve filmleri için elde edilen veriler arasındaki istatistiksel fark, Windows tabanlı SAS 8.2 istatistiksel analiz yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir (SAS Institute, Cary, North Carolina, Amerika). Ortalamalar arasındaki önemli fark %95 anlamlılık düzeyindeki Tukey çoklu karşılaştırma testi ile doğrulanmıştır. Tüm analizler en az iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

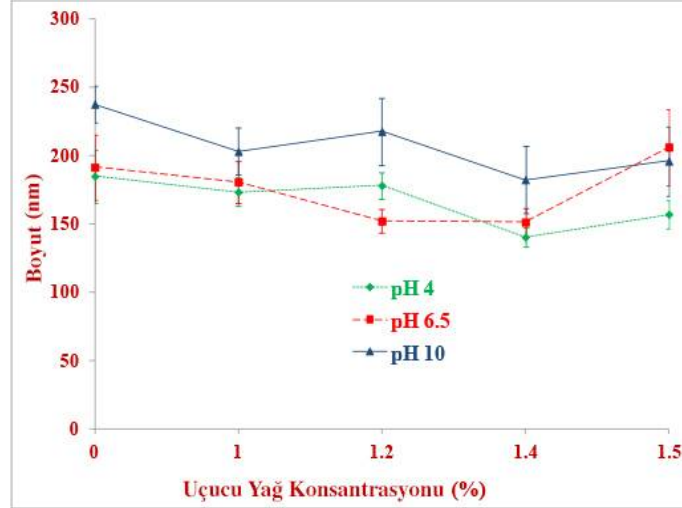
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 Uçucu Yağ Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

4.1.1 Uçucu Yağ Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Boyut ve Zetapotansiyel Ölçümü

Bu çalışmada kitosan nanopartiküllerinin boyut ölçümü, gıdaların değişen pH koşullarına karşı stabilitelerini belirlemek amacıyla kitosan nanopartiküllerinin farklı pH'larda ölçülmesi şeklinde gerçekleşmiştir. Şekil 4.1' de gösterildiği gibi pH' ları 4,5, 6 ve 10 olan uçucu yağ yüklü nanopartiküllerin ortalama boyut büyüklükleri dinamik ışık saçımı (DLS) tekniğiyle belirlenmiştir. Nanopartiküllerin ortalama büyüklükleri 140,25 nm ile 237,40 nm arasında değişmektedir. Genellikle, pH düzeyi yükseldikçe kitosan nanopartikülleri arasında kümeleşmeden kaynaklanan bir çap artışı meydana gelmiştir. Ayrıca uçucu yağ konsantrasyonunda ki artış, nanopartikül boyutunda küçük ancak önemli ($P<0,05$) bir azalışa sebep olmuştur. Keawchaoon ve Yoksan [125] yaptıkları bir çalışmada, karvakrol yüklü kitosan nanopartiküllerinin hidrodinamik çapının 532,5–716,6 nm arasında değiştiğini gözlemlemiştir ve bizim yaptığımız ölçümlerle kıyaslandığında bu sonuçların oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Bu farklılık, kitosan solüsyonunda kullanılan kitosanın konsantrasyonundan kaynaklanmış olabilir. Çünkü polimer konsantrasyon artışının, daha yüksek boyutlu partiküllerin oluşmasına sebep olduğu önceki çalışmalarda bildirilmiştir [135]. Elde ettiğimiz bulgular Liu vd. [136]'ın yaptıkları bir çalışmada ulaştıkları "kitosan konsantrasyonunun artmasıyla partikül boyutu artmaktadır" sonucuyla uyum göstermektedir. Bize ait çalışmada kullanılan kitosan konsantrasyonu (%0,5 w/v), Keawchaoon ve Yoksan [125] 'ın kullandığı miktardan daha düşüktür. %1,5 uçucu yağ yüklü kitosan nanopartikül örneği en küçük ($P<0,05$) boyut büyüklüğüne sahipken, diğer

nanopartikül örnekleri arasındaki boyut farkı istatistiksel olarak önemsizdir ($P>0,05$). Bu çalışmada, Keawchaoon ve Yoksan [125] ve Woranuch and Yoksan [137]'in yapmış oldukları çalışmadan farklı bir sonuç da elde edilmiştir, çünkü Yoksan vd. kullandıkları ojenol ve karvakrol konsantrasyonun yükselmesiyle partikül büyüklüğünün arttığı sonucuna ulaşmışlardır.



Şekil 4.1 Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklenmiş kitosan nanopartiküllerinin boyutu

Kitosan nanopartikülleri, pozitif yüklü kitosan ile negatif yüklü tripolifosfat (TPP) arasında meydana gelen etkileşim sonucu oluşmuştur [138]. Çizelge 4.1' de gösterildiği gibi, farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklü kitosan nanopartiküllerinin zeta potansiyelleri -7,54 ile -21,12 arasında değişmektedir. Artan uçucu yağ konsantrasyonuna bağlı olarak zeta potansiyel değerleri önemli ($P<0,05$) ölçüde azalma göstermiştir. Lertsutthiwong, Rojsitthisak, ve Nimmannit [139] yaptıkları bir çalışmada, farklı molekül ağırlığına sahip kitosan ve aljinalardan hazırlanan zerdeçal uçucu yağı yüklü nanopartiküllerin zeta potansiyel değerlerini -21,8 ile -23,1 değerleri arasında belirlemişlerdir. Sonuç olarak zeta potansiyelinin kitosanın molekül ağırlığından etkilenmediğini bildirmişlerdir. Aynı kişiler yaptıkları farklı bir çalışmada [140], sürfaktan olarak Tween 80'in kullanıldığı, zerdeçal uçucu yağı yüklü aljinat nanopartiküllerinin zeta potansiyellerinin daha büyük olduğunu gözlemlemişlerdir. Diğer yandan, aljinat nanopartiküllerine ait zeta potansiyellerinin zerdeçal uçucu yağı konsantrasyonuna bağlı olmadığını tespit etmişlerdir.

Çizelge 4.1 Uçucu yağ yüklü kitosan nanopartiküllerinin zeta potansiyelleri ve enkapsülasyon etkinlikleri

Örnek	ZP (mV)	Uçucu yağ enkapsülasyon miktarı (g)	EE (%)
NP0	-7,54±0,51 ^a	-	-
NP1	-10,48±1,54 ^{ba}	0,35±0,01 ^d	35,07±0,76 ^c
NP1.2	-9,68±0,41 ^a	0,45±0,00 ^c	37,71±0,09 ^{bc}
NP1.4	-13,01±3,40 ^b	0,57±0,01 ^{ba}	40,70±0,36 ^a
NP1.5	-21,12±1,06 ^c	0,58±0,02 ^a	38,55±1,00 ^{ba}

a-d: Aynı sütun içerisindeki farklı harfler veriler arasında fark olduğunu ($P<0,05$) göstermektedir.

NP0: Saf kitosan nanopartikülleri (kontrol)

NP1: %1 uçucu yağ yüklenmiş kitosan nanopartikülleri

NP1.2: %1,2 uçucu yağ yüklenmiş kitosan nanopartikülleri

NP1.4: %1,4 uçucu yağ yüklenmiş kitosan nanopartikülleri

NP1.5: %1,5 uçucu yağ yüklenmiş kitosan nanopartikülleri

ZP: Zetapotansiyel

EE: Enkapsülasyon etkinliği

4.1.2 Enkapsülasyon Etkinliği (EE)

Uçucu yağa ait enkapsülasyon etkinliği spektrofotometrik olarak hesaplanmıştır. Çizelge 4.1'deki sonuçlardan da görüldüğü gibi, uçucu yağların enkapsülasyon etkinliği %35,0 ile %40,70 arasında değişmektedir. Uçucu yağ konsantrasyonunun, başlangıç konsantrasyonundan %1,4 konsantrasyonuna kadar yükselmesiyle EE artış göstermiş, ancak %1,5 uçucu yağ konsantrasyonuna gelindiğinde kapsülleme etkinliği %38,55'e kadar düşmüştür. Bu nedenle, maksimum EE'nin %1,4 uçucu yağ yüklenmiş nanopartikül örneklerinde olduğu tespit edilmiştir. EE, kitosanın bu değeriyle sınırlandırılmıştır. Elde edilen bulgular daha önce yapılmış çalışmalarla uyumlu bulunmuştur [125,141]. Çizelge 4.1'de nanopartikül örneklerindeki uçucu yağ enkapsülasyonuna ait değerler gösterilmiştir. İlk başlardaki uçucu yağ konsantrasyonunun ($P<0,05$) yükselmesiyle, EE önemli ölçüde artmaktadır. Ayrıca, elde edilen bulgular EE değerleri ile ilişkilendirilmiştir.

4.1.3 Uçucu Yağ Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Antibakteriyel Aktiviteleri

Çizelge 4.2’de de gösterildiği gibi, uçucu yağ yüklü kitosan nanopartiküllerinin gıda kaynaklı *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* bakterilerine karşı antibakteriyel aktiviteleri test edilmiştir. Bu çalışmada, nanopartiküllerin bakteriler üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonu bulunmaya çalışılmış fakat başarılı olunamamıştır. Çünkü tüplere eklenen mikroorganizma ve nanopartikül örneklerinin bulanıklığa sebep olması sebebiyle minimum inhibisyon konsantrasyonu hesaplanamamıştır. Bakterilerin nanopartiküllere olan antibakteriyel duyarlılığı *L. monocytogenes* > *E. coli* O157:H7 > *S. aureus* şeklinde sıralama göstermiştir. Nanopartiküllerle muamele edilmeyen bakteri popülasyonlarında önemli ($P < 0,05$) artışlar meydana gelmiştir. Uçucu yağ yüklenmeyen kitosan nanopartikülleri ile kontrol örnekleri karşılaştırıldığında, yüksüz kitosan örneklerinin bakteri sayısında önemli ($P < 0,05$) azalmalar olduğu görülmüş ve dolayısıyla saf kitosanın da antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Kitosanın antibakteriyel etkinliği, önemli bir zar depolarizasyonuna eşleşmiş bakteri hücre zarının geçirgenliğinin yükselmesi gibi çeşitli bir kaç faktöre atfedilebilir [142]. Uçucu yağ yüklü nanopartikül örnekleri (NP1, NP1.2, NP1.4 ve NP1.5), brothlardaki *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 bakterilerinin tamamını inhibe ederken, *S. aureus*’da ise uçucu yağ konsantrasyon artışına bağlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçların, Güllüce vd. [143]’nin toplam 23 bakteri ve 15 küf izolatına karşı uçucu yağın antimikrobiyal ve antifungal etkilerini inceledikleri araştırma sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür. Zahter uçucu yağının antibakteriyel mekanizması göz önünde bulundurulduğunda, etkinin sadece tek bir madde veya mekanizmadan kaynaklanmadığı, uçucu yağın yapısındaki farklı bileşenlerin ve bunların dizilimlerinin de inhibisyonu etkileyebileceğini bildirmişlerdir. Hidrofobiklik uçucu yağlar için önemli bir özellik olmasının yanı sıra, bakteri hücre zarındaki lipidlerin parçalanmasına sebep olarak, hücre içerisinde bulunan iyonların ve diğer hücre içi maddelerin hücre dışına çıkmasına ve dolayısıyla hücrenin ölümüne sebep olmaktadır [144].

Çizelge 4.2 Uçucu yağ yüklü ve yüksüz kitosan nanopartiküllerinin antibakteriyel aktiviteleri

		Antibakteriyel Aktivite (log kob/mL)		
		0.saat	12.saat	24.saat
<i>E. coli</i> O157:H7	Kontrol	5,34±0,06 ^{aC}	8,82±0,15 ^{aB}	11,79±0,33 ^{aC}
	NP0	5,34±0,06 ^{aC}	7,27±0,20 ^{bB}	8,96±0,16 ^{bC}
	NP1	5,34±0,06 ^{aA}	<1,00 ^{cB}	<1,00 ^{cB}
	NP1.2	5,34±0,06 ^{aA}	<1,00 ^{cB}	<1,00 ^{cB}
	NP1.4	5,34±0,06 ^{aA}	<1,00 ^{cB}	<1,00 ^{cB}
	NP1.5	5,34±0,06 ^{aA}	<1,00 ^{cB}	<1,00 ^{cB}
<i>L. monocytogenes</i>	Kontrol	5,01±0,15 ^{aC}	>8,00 ^{aB}	11,72±0,03 ^{aA}
	NP0	5,01±0,15 ^{aA}	3,16±0,08 ^{bC}	4,12±0,04 ^{bB}
	NP1	5,01±0,15 ^{aA}	<1,00 ^{cB}	<1,00 ^{cB}
	NP1.2	5,01±0,15 ^{aA}	<1,00 ^{cB}	<1,00 ^{cB}
	NP1.4	5,01±0,15 ^{aA}	<1,00 ^{cB}	<1,00 ^{cB}
	NP1.5	5,01±0,15 ^{aA}	<1,00 ^{cB}	<1,00 ^{cB}
<i>S. aureus</i>	Kontrol	4,90±0,12 ^{aC}	9,95±0,24 ^{aB}	13,55±0,05 ^{aA}
	NP0	4,90±0,12 ^{aC}	7,89±0,11 ^{bB}	10,59±0,03 ^{bA}
	NP1	4,90±0,12 ^{aA}	3,27±0,19 ^{cB}	4,56±0,22 ^{cA}
	NP1.2	4,90±0,12 ^{aA}	2,94±0,34 ^{cB}	4,83±0,31 ^{cA}
	NP1.4	4,90±0,12 ^{aA}	2,86±0,28 ^{cC}	3,38±0,15 ^{dB}
	NP1.5	4,90±0,12 ^{aA}	<1,00 ^{dB}	<1,00 ^{cB}

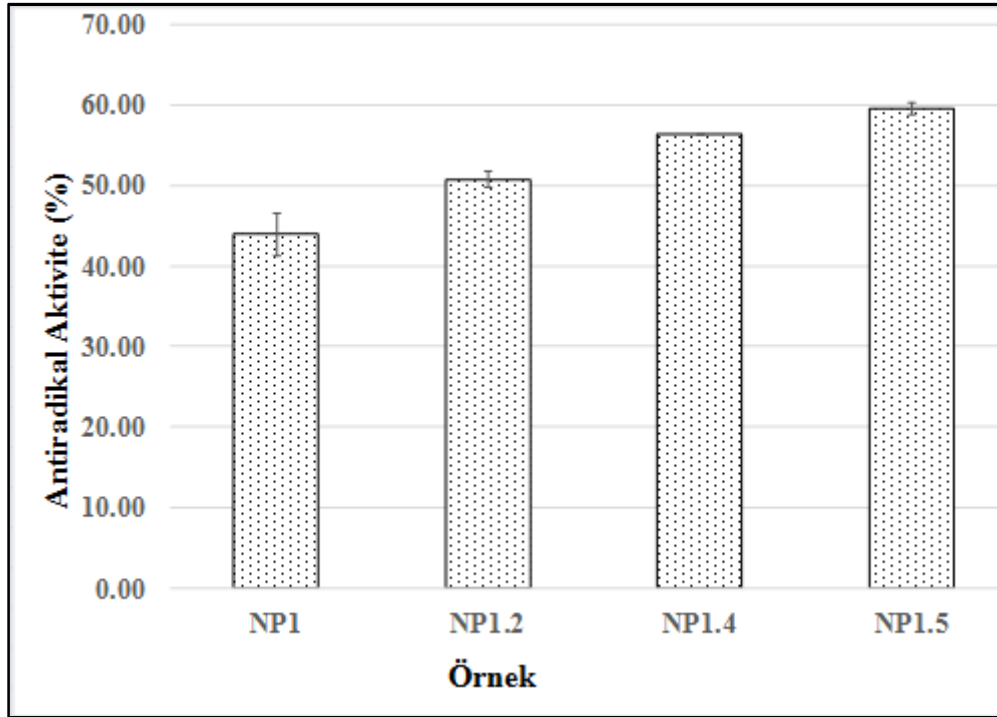
NP0: Saf kitosan nanopartikülleri (kontrol), NP1: %1 uçucu yağ yüklenmiş kitosan nanopartikülleri, NP1.2: %1,2 uçucu yağ yüklenmiş kitosan nanopartikülleri, NP1.4: %1,4 uçucu yağ yüklenmiş kitosan nanopartikülleri, NP1.5: %1,5 uçucu yağ yüklenmiş kitosan nanopartikülleri

a-e: Aynı sütundaki birbirinden farklı olan küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0,05$) olduğunu göstermektedir. A-C: Aynı satırdaki birbirinden farklı olan büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0,05$) olduğunu göstermektedir.

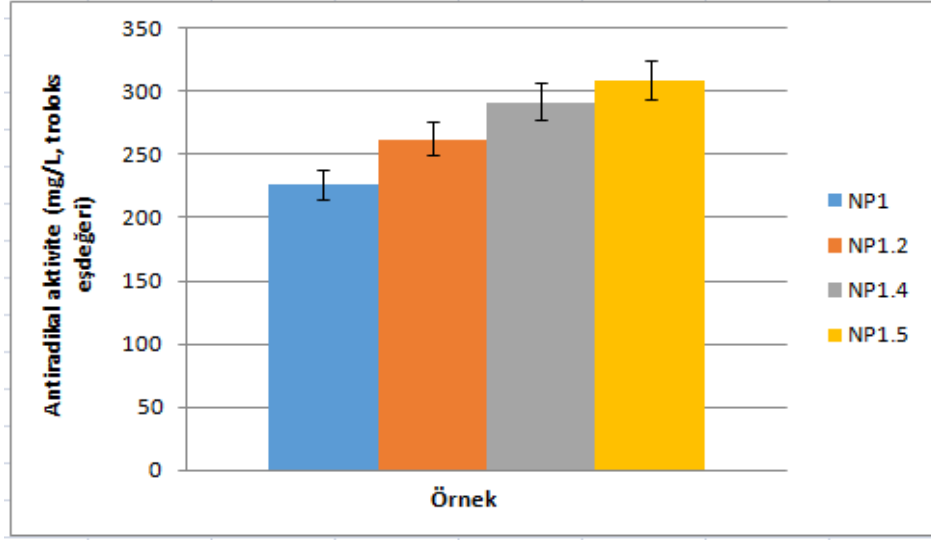
4.1.4 Uçucu Yağ Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Antioksidan Aktiviteleri (AOA)

Bu çalışmada, uçucu yağ yüklü biyoaktif kitosan nanopartiküllerinin serbest DPPH radikalini yakalama düzeyi, Şekil 4.2’de de belirtildiği gibi yüzde olarak, Şekil 4.3’de troloks eşdeğerliliği olarak gösterilmiştir. Uçucu yağ içermeyen nanopartikül örnekleri (kontrol) hiç bir AOA göstermezken, uçucu yağ yüklü nanopartikül örnekleri %43,66 – 59,65 arasında değişen düzeylerde AOA göstermiştir. Nanopartiküllerin troloks

eşdeğerliliği cinsinden AOA'leri ise 226,24-309,05 mg/L olarak hesaplanmıştır. Kitosan nanopartiküllerine yüklenen uçucu yağ konsantrasyonu arttıkça ($P<0,05$), %AOA düzeyi de artış göstermiştir. Uçucu yağ veya bu gibi diğer ekstraktların serbest radikali yakalama aktivitelerine dair çalışmalar literatürde de yer almaktadır [143]. Söz konusu etki timol, karvakrol ve γ -terpinen gibi fenolik bileşenlerin varlığıyla bağdaştırılabilmektedir [145]. Bu tip fenolik bileşikler aynı zamanda, önemli ölçüde antioksidan etki gösteren nanokapsüllerden biyoaktif maddelerin salınımını kontrol etmek amacıyla kullanılmaktadır [137,146,147,148]. Bu çalışmayla, biyoaktif maddenin saf formu ile kapsüllenmiş formu karşılaştırılmış ve kapsül formun fenolikleri sıcaklık ve oksijen gibi çevresel faktörlerin olumsuz etkilerinden koruyarak daha yüksek antioksidan etki gösterdiği saptanmıştır.



Şekil 4.2 Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklenmiş kitosan nanopartiküllerinin antioksidan aktiviteleri (AOA)



Şekil 4.3 Uçucu yağ yüklenmiş kitosan nanopartiküllerinin antiradikal aktiviteleri (Troloks Eşdeğerliliği)

NP1: %1 uçucu yağ yüklü kitosan nanopartikülleri

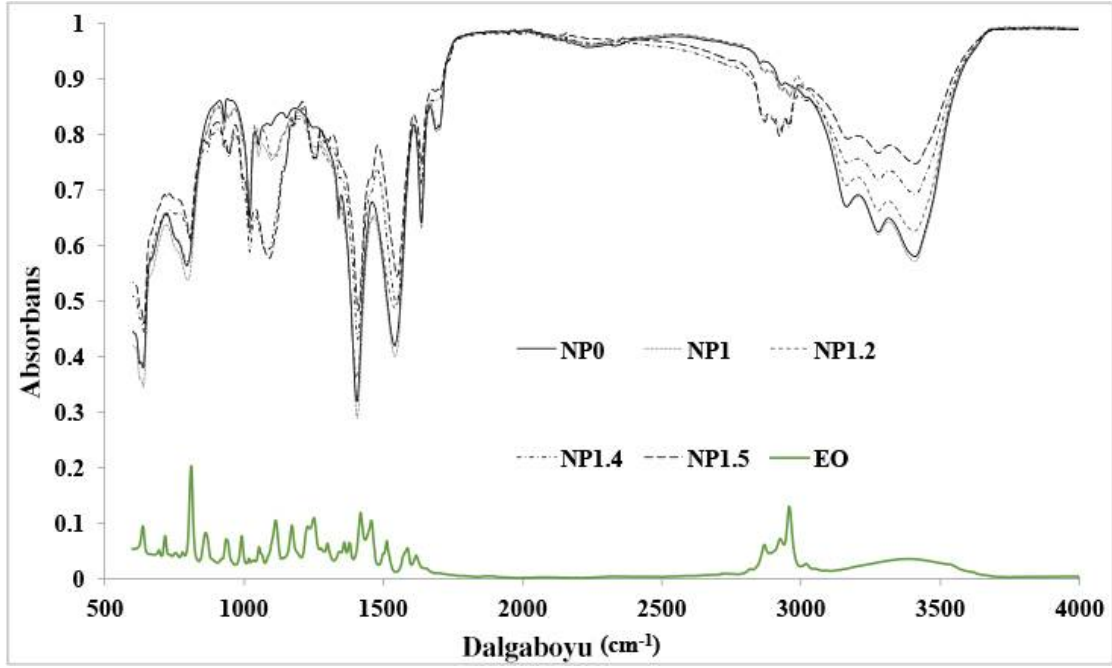
NP1.2: %1,2 uçucu yağ yüklü kitosan nanopartikülleri

NP1.4: %1,4 uçucu yağ yüklü kitosan nanopartikülleri

NP1.5: %1,5 uçucu yağ yüklü kitosan nanopartikülleri

4.1.5 FTIR

FTIR analizi, uçucu yağ yüklü ve uçucu yağ yüklenmemiş kitosan nanopartiküllerini karakterize etmek amacıyla yapılmıştır. Uçucu yağ ekstraktı ve saf kitosan parçacıklarının spektrumları da analiz edilmiştir. Örneklerle ait FTIR spektrumları Şekil 4.4’de gösterilmiştir. Uçucu yağ kompozisyonu içerisinde diğer farklı yağ kompozisyonlarının var oluşu sebebiyle, saf uçucu yağa ait pik sayısı oldukça fazla gözlenmiştir. Genel olarak piklerin çoğunluğu uçucu yağ konsantrasyonuna bağlı olarak oluşmuştur. Kitosan nanopartiküllerinde bulunan uçucu yağın iyi bir etkileşim göstererek etkili bir şekilde kapsüllendiği saptanmıştır. 1080 cm^{-1} ’deki pik, kitosandaki amino gruplarını göstermektedir [149]. Uçucu yağ konsantrasyonunun artışına bağlı olarak nanopartiküllere ait pik zirvesi 2959 cm^{-1} olarak saptanmıştır. Bu pik, uçucu yağ ve kitosan matriksi içerisindeki karvakrol varlığını göstermektedir [125].



Şekil 4.4 Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklü kitosan nanopartiküllerinin FTIR spektrumları

NP0: Saf kitosan nanopartikülleri (kontrol)

NP1: %1 uçucu yağ yüklenmiş kitosan nanopartikülleri

NP1.2: %1,2 uçucu yağ yüklenmiş kitosan nanopartikülleri

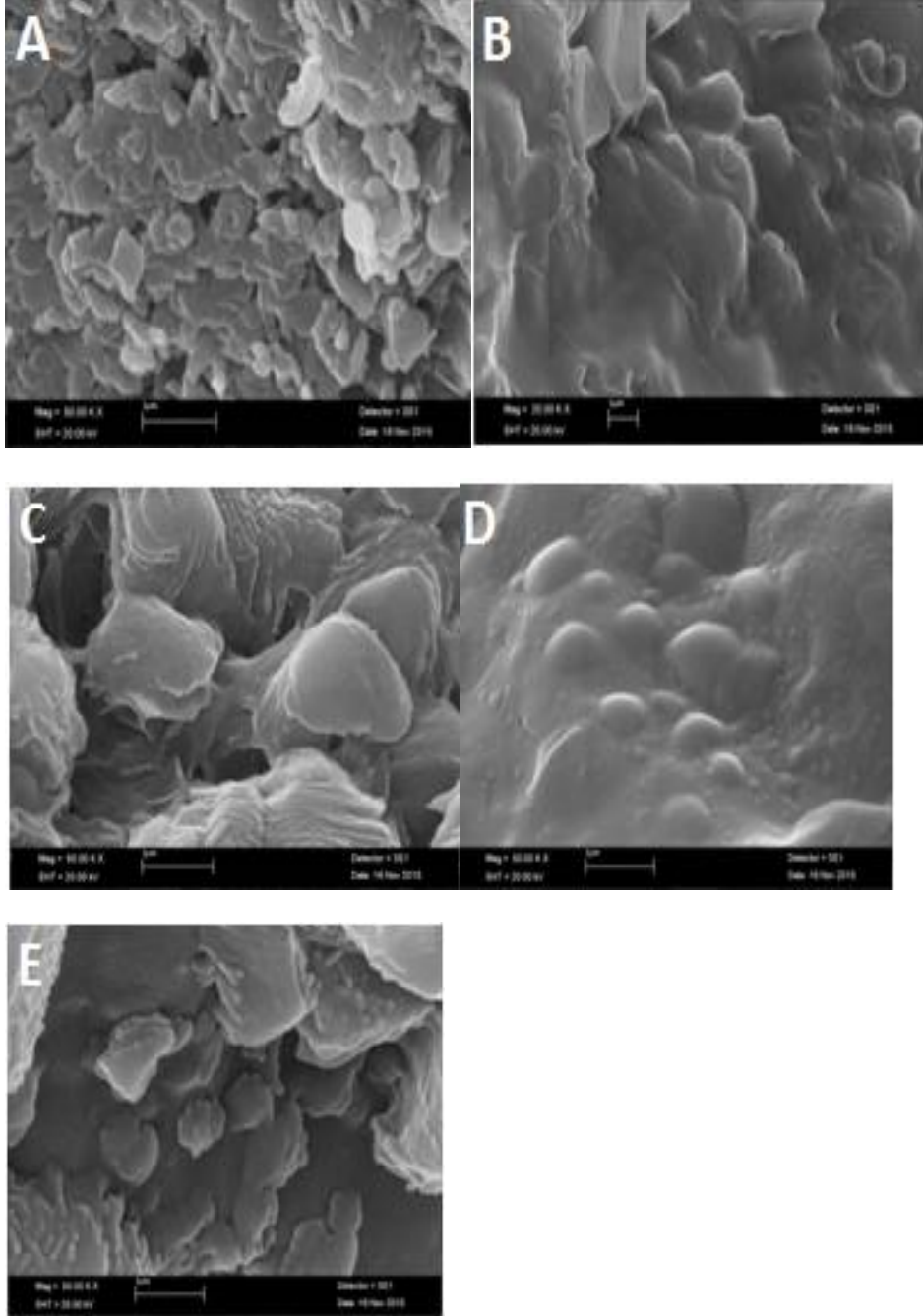
NP1.4: %1,4 uçucu yağ yüklenmiş kitosan nanopartikülleri

NP1.5: %1,5 uçucu yağ yüklenmiş kitosan nanopartikülleri

4.1.6 SEM

SEM görüntüleri, nano ölçekli örneklerin morfolojik yapısı ve parçacık yapısı hakkında bilgi vermektedir. Şekil 4.5’de farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklü kitosan nanopartiküllerinin SEM görüntüleri gösterilmektedir. Şekil 4.5a’da, 100-250 nm çapa sahip saf kitosan nanopartiküllerine ait nano ölçekli parçacıklar gösterilmiştir. Şekillerde de görüldüğü gibi, uçucu yağ enkapsüle edilmiş nanopartiküller bazı bölgelerde kümeleşmeden ötürü küresel formda görülmektedir. Ayrıca, içerisine farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklenen kitosan düzgün bir yüzey yapısı meydana getirmiştir. SEM görüntüleri ile ölçülen parçacık boyutlarının zetasizer ile ölçülen boyutlardan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, örnekler uygulanan liyofilizasyon prosesi esnasında örneklerin stabilitelerinin azalmasından veya agregasyon

oluşumu gibi sebeplerden kaynaklanabilmektedir. Kitosan nanopartikülleri için benzer sonuçlar Abreu, Oliveira, Paula, ve de Paula [150] tarafından da saptanmıştır.

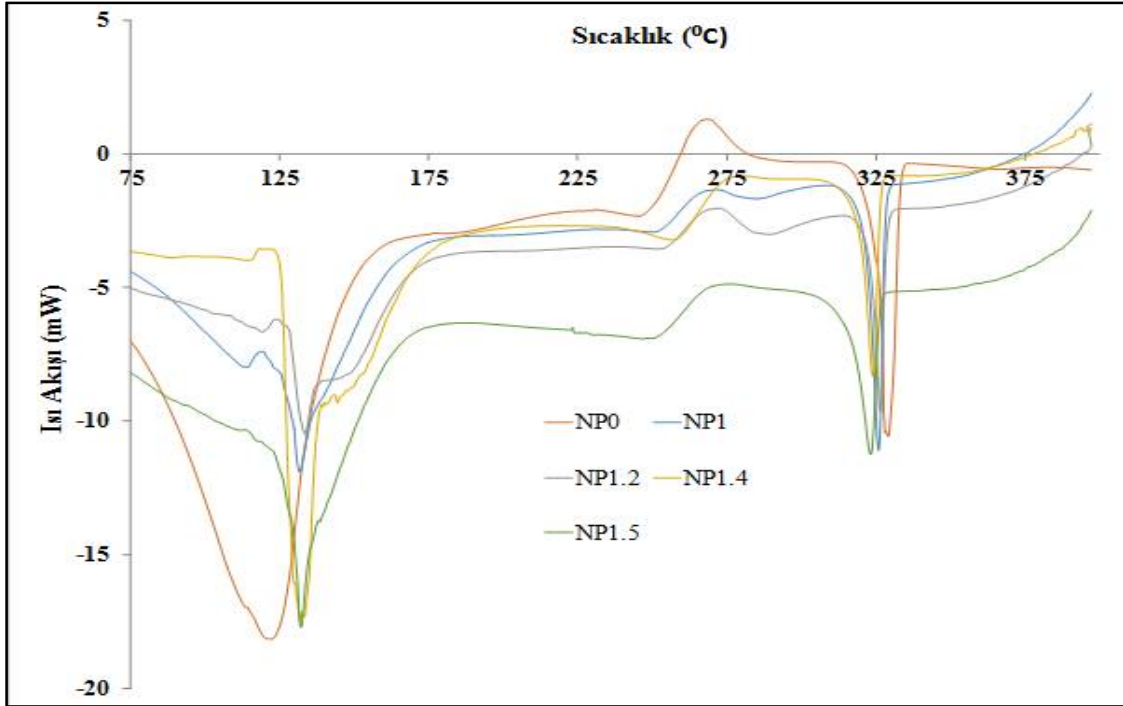


Şekil 4.5 Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklü kitosan nanopartiküllerinin SEM görüntüleri (A:%0, B:%1, C:%1,2, D:%1,4, E:%1,5)

4.1.7 DSC

Uçucu yağ yüklenmiş ve uçucu yüklenmemiş kitosan nanopartiküllerinin termal özellikleri Şekil 4.6'da da gösterildiği gibi, DSC ile ölçülmüştür. Yüksüz kitosan nanopartikülünün

DSC termogramından da görüldüğü üzere, su buharlaşmasını gösteren endotermik pik 120,2 °C ve nanopartiküllerin bozunmasını gösteren ekzotermik pik ise 266 °C olarak saptanmıştır. Uçucu yağ yüklü nanopartiküllerdeki endotermik pikin daha yüksek derecelerde (yaklaşık 130-132 °C) olduğu gözlenmiş olup, bunun daha yüksek su-polimer etkileşimi ve nanopartikülün artan su tutma kapasitesine bağlı olarak artması şeklinde yorumlanmıştır [151]. Uçucu yağ yüklü nanopartiküllerdeki ekzotermik piklerin, yüksüz nanopartiküllerdeki piklere göre daha yüksek sıcaklıklara (269,3 ile 279,4 °C arasında) tekabül ettiği görülmüştür. Elde edilen bulgular dikkate alındığında, uçucu yağ yüklü kitosan nanopartiküllerinin yüksüz kitosan nanopartiküllerine göre daha iyi termal stabilite gösterdiği sonucuna varılmıştır. Paula, Sombra, Cavalcante, Abreu ve de Paula [152] tarafından yapılan bir çalışmada, *Lippia spoides* uçucu yağı ve kitosan/kaju polimerleri arasında benzer bir etkileşim kurulmuş ve aynı sonuca ulaşılmıştır.



Şekil 4.6 Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklü kitosan nanopartiküllerine ait DSC termogramları

NP0: Yüksüz kitosan nanopartikülleri (kontrol)

NP1: %1 uçucu yağ yüklenmiş kitosan nanopartikülleri

NP1.2: %1,2 uçucu yağ yüklenmiş kitosan nanopartikülleri

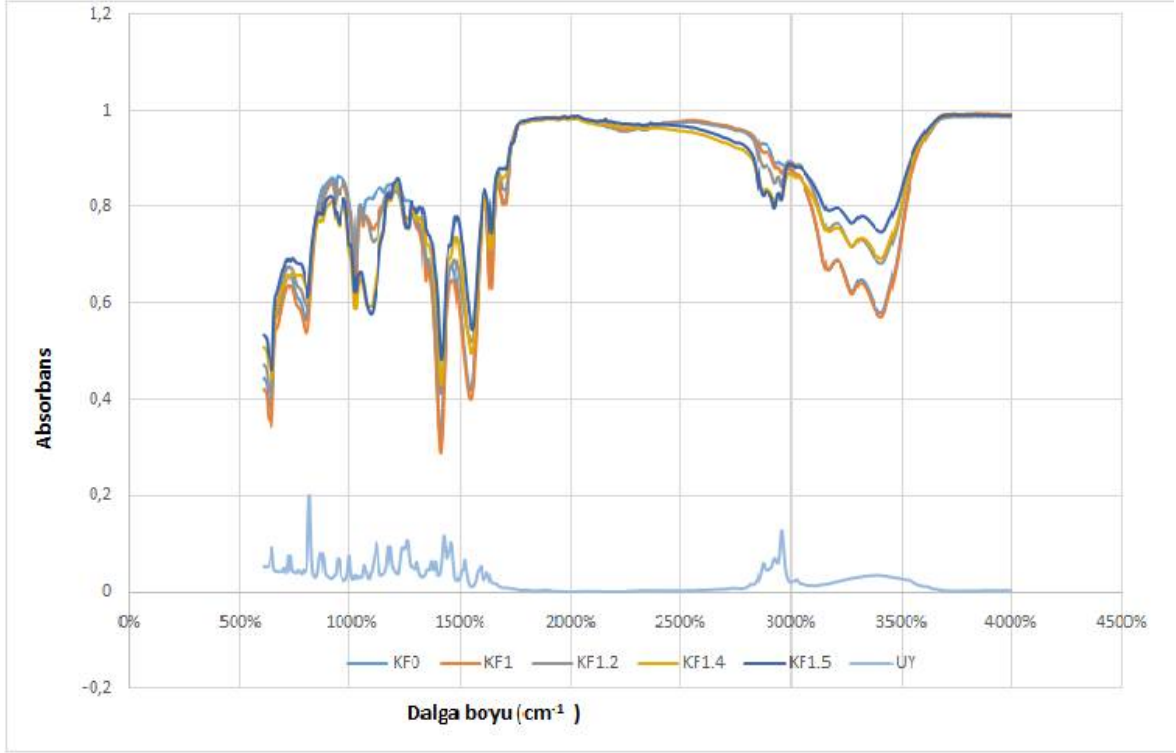
NP1.4: %1,4 uçucu yağ yüklenmiş kitosan nanopartikülleri

NP1.5: %1,5 uçucu yağ yüklenmiş kitosan nanopartikülleri

4.2 Uçucu Yağ Yüklü Kitosan Filmlerin Karakterizasyonu

4.2.1 FTIR

Kitosan, asetik asit ile amin gruplarının küçük bir oranının, amid bağları vasıtasıyla karakterize olmuş bir amino glikozdur. Şekil 4.7’de, farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklenmiş kitosan filmlerin, saf zahter uçucu yağının ve saf kitosan filminin 4000-500 cm^{-1} dalgaboylarındaki FTIR spektrumları gösterilmektedir. 1474 cm^{-1} yakınlarındaki pik, kitosandaki N-H bağlarının kıvrımını gösterirken, 1520 cm^{-1} yakınlarındaki pik ise kitosandaki C=O bağlarındaki gerilmeyi ifade etmektedir. Bu piklerin, deasetilasyon derecesi kitosandan daha düşük olan N-asetilglukozamini temsil etme ihtimali de mevcuttur [153,154]. 3300 cm^{-1} deki pik, güçlü absorpsiyonu ifade ederken, 895 cm^{-1} ile 1010 cm^{-1} arasındaki pikler C-O bağlarının ayrıldığını ve O-H ve N-H bağlarındaki gerilme titreşimini göstermektedir [155,156]. 1500 cm^{-1} yakınlarındaki pik, ikincil amidlerin güçlü titreşimlerini ifade etmektedir. 3400 cm^{-1} ’de beliren piklerin ise O-H ve N-H bağlarındaki güçlü gerilim titreşiminden kaynaklandığı bildirilmiştir [155,156]. FTIR spektrumda C-H gerilme bölgesi olan 3027 cm^{-1} ’deki pik, CH_2 ’nin asimetric modu olarak değerlendirilmiştir [156,157]. Kitosan filmlere uçucu yağın katılmasıyla dalga boylarında ve pik şiddetlerinde değişiklik olmadığı ve büyük bir yapısal değişimin meydana gelmediği benzer çalışmalarda bildirilmiştir [155]. Schulz vd., uçucu yağın ana bileşenleri olan karvakrol ve timolün, en karakteristik spektrumları oluşturduğunu bildirmişlerdir. Uçucu yağ konsantrasyonunun artışına bağlı olarak kitosan filmlerine ait pik zirvesi 2991 cm^{-1} olarak saptanmıştır. Bu pik, uçucu yağ ve kitosan matriksi içerisindeki karvakrol varlığını göstermektedir [125]. Ayrıca bu spektrumlar, kitosanın fonksiyonel gruplarıyla uçucu yağın aktif grupları arasında herhangi bir etkileşimin olmadığını göstermektedir [155].



Şekil 4.7 Uçucu yağ yüklü ve yüksüz kitosan filmlerinin FTIR spektrumları

KF0: Uçucu yağ yüklenmeyen kitosan film örneği

KF1: %1 Uçucu yağ yüklenen kitosan film örneği

KF1.2: %1,2 oranında uçucu yağ yüklenen kitosan film örneği

KF1.4: %1,4 oranında uçucu yağ yüklenen kitosan film örneği

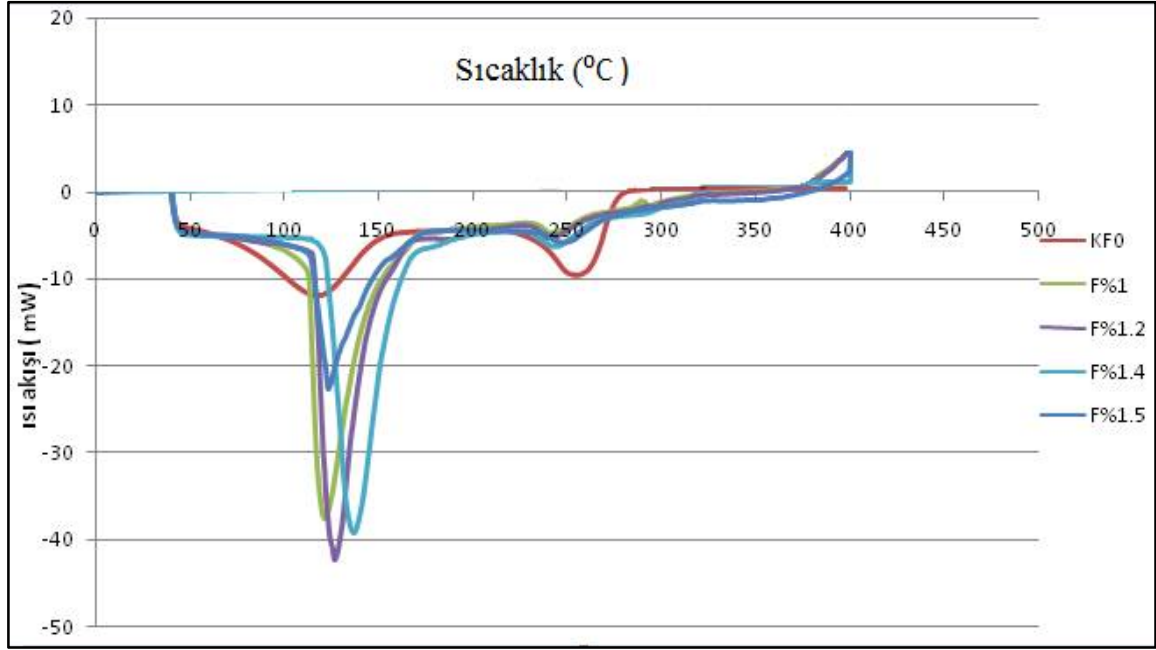
KF1.5: %1,5 oranında uçucu yağ yüklenen kitosan film örneği

UY: Saf zahter uçucu yağı ekstraktı

4.2.2 DSC

Uçucu yağ yüklenen ve uçucu yağ yüklenmeyen kitosan film (KF0) örneklerinin termal özellikleri Şekil 4.8’de de görüldüğü gibi DSC ile ölçülmüştür. Uçucu yağ yüklenmeyen kitosan filmlerinin DSC termogramından da görüldüğü gibi endotermik piki 116,42 °C iken, ekzotermik pik ise yaklaşık 279,54 °C’ye tekabül etmektedir. Uçucu yağ yüklü filmlerdeki endotermik pikin daha yüksek derecelerde (yaklaşık 122-134 °C) olduğu gözlenmiş olup, bunun daha yüksek su-polimer etkileşimi ve filmin artan su tutma kapasitesine bağlı olarak artması şeklinde yorumlanmıştır [151]. Uçucu yağ yüklü nanopartiküllerdeki ekzotermik piklerin, yüksüz nanopartiküllerdeki piklere göre daha yüksek sıcaklıklara tekabül ettiği görülmüştür (285,63-318,21 °C). Düşük sıcaklıklarda

meydana gelen endotermik etki, kitosan filmlerinin hazırlanmasında kullanılan (asetik asit, su, gliserol) solvent maddelerin buharlaşması şeklinde yorumlanabilmektedir. Daha yüksek sıcaklıklarda oluşan ekzotermik pikler ise, polimerlerin dekompozisyonu şeklinde ifade edilmektedir. Elde edilen bulgular, Altıok vd.'nin [158] yapmış oldukları çalışma sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur.



Şekil 4.8 Uçucu yağ yüklenen ve yüklenmeyen kitosan film örneklerine ait DSC termogramı

KF0: Uçucu yağ yüklenmeyen kitosan film örneği

KF1: %1 Uçucu yağ yüklenen kitosan film örneği

KF1.2: %1,2 oranında uçucu yağ yüklenen kitosan film örneği

KF1.4: %1,4 oranında uçucu yağ yüklenen kitosan film örneği

KF1.5: %1,5 oranında uçucu yağ yüklenen kitosan film örneği

4.2.3 Filmlerin Antibakteriyel Aktiviteleri

Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ içeren kitosan filmlerin *E.coli* O157:H7, *B.cereus*, *S.aureus* ve *Salmonella* Typhimurium'a karşı antimikrobiyal aktivitesi, inkübasyon sonunda Nutrient Agar (Merck, Almanya) plaklarında oluşan inhibisyon zon çaplarının ölçülmesiyle belirlenmiştir. Kontrol (uçucu yağ içermeyen), %1, %1,2, %1,4 ve %1,5 oranlarında uçucu yağ içeren kitosan filmlerinin *E.coli* O157:H7, *B.cereus*, *S.aureus* ve

Salmonella Typhimurium üzerindeki antimikrobiyal etkileri sonucunda oluşan zon çapları (mm), Çizelge 4.3’ de gösterilmiştir:

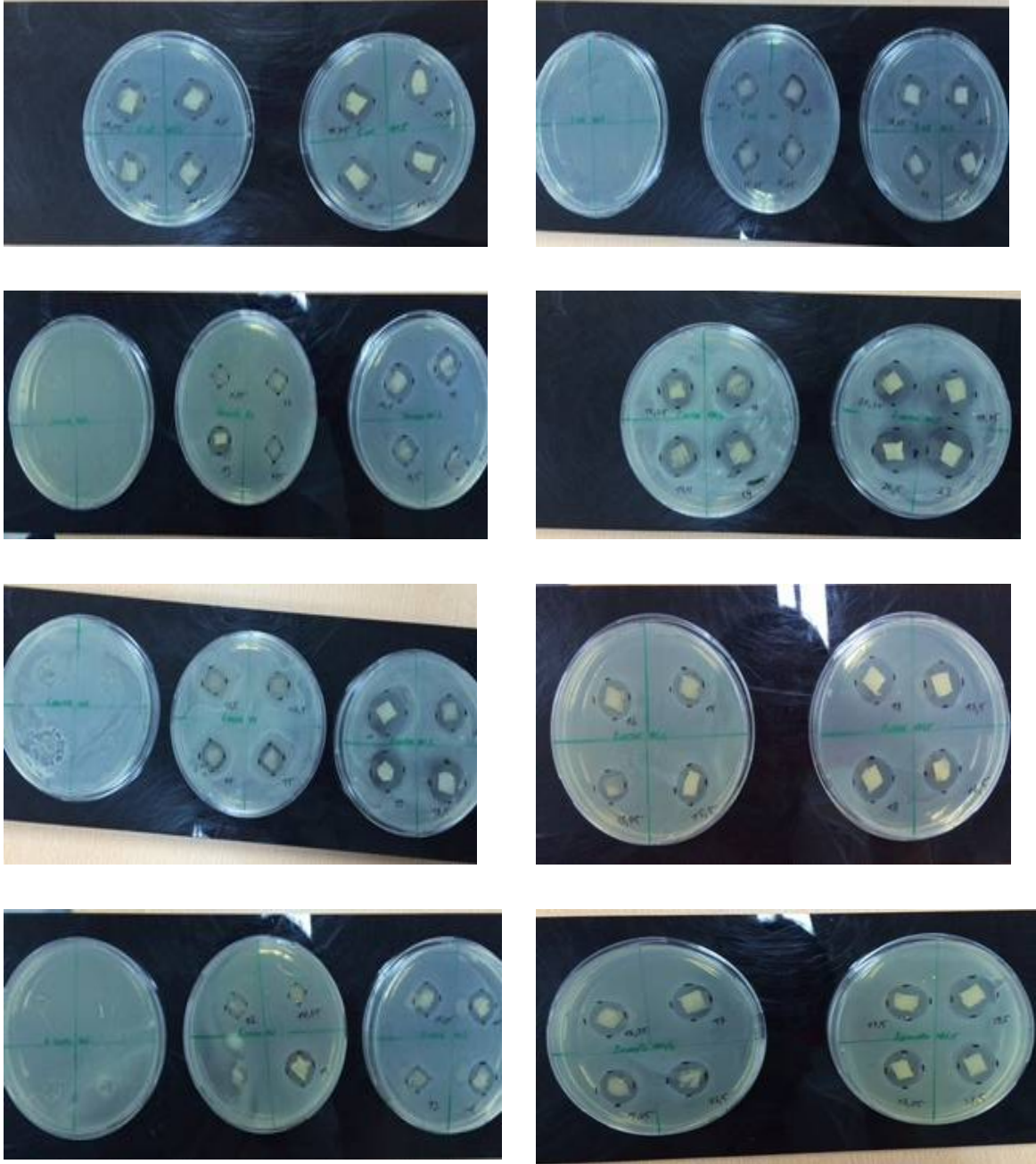
Çizelge 4.3 Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklü kitosan filmlerinin antibakteriyel aktiviteleri

Zon çapları (mm)					
Örnekler	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	Film altı üreme*
KF0	0 ^{cA}	0 ^{dA}	0 ^{dA}	0 ^{dA}	+
KF1	15,62±0,59 ^{bA}	11,81±0,94 ^{cC}	14±1,2 ^{cAB}	12,43±1,96 ^{cBC}	-
KF1.2	17,87±1,26 ^{aA}	15,68±1,37 ^{bB}	18,93±1,55 ^{bA}	14,62±1,08 ^{bB}	-
KF1.4	18,19±0,8 ^{aA}	16,38±0,52 ^{bB}	18,06±0,65 ^{bA}	15,06±0,96 ^{bC}	-
KF1.5	18,94±0,89 ^{aB}	18,19±1,02 ^{aB}	20,87±1,45 ^{aA}	17,75±0,70 ^{aB}	-

KF0: Uçucu yağsız kontrol örneği; KF1: %1 uçucu yağ yüklü film örneği; KF1.2: %1,2 uçucu yağ yüklü film örneği; KF1.4: %1,4 uçucu yağ yüklü film örneği; KF1.5: %1,5 uçucu yağ yüklü film örneği; *(+) Film altında üreme pozitif; (-) Film altında üreme negatif. a-c: Aynı sütündeki birbirinden farklı olan küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0,05$) olduğunu göstermektedir. A-C: Aynı satırdaki birbirinden farklı olan büyük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0,05$) olduğunu göstermektedir.

Agar difüzyon testi sonucunda uçucu yağ içermeyen kontrol kitosan filmlerin, inhibisyon zonu oluşturmadığı ve istatistiksel olarak önemli bir antibakteriyel etkisinin olmadığı görülmüştür ($P>0,05$). En yüksek antimikrobiyal etkinin %1,5 (v/v) uçucu yağ konsantrasyonu ile *S. aureus* üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Zahter uçucu yağı içerisinde karvakrol gibi hidrofobik bileşenler bulunmasından dolayı, antimikrobiyal etki mekanizmasının uçucu yağın hidrofobikliğiyle de ilişkili olduğu daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Hidrofobik esansiyel yağ, hücre zarının lipid tabakasına katılmaktadır, bu yapısal bozulma da zar geçirgenliğinin artmasına sebep olmaktadır [158]. Çalışma sonucunda, filmlerdeki artan uçucu yağ konsantrasyonuna bağlı olarak, bakteri gelişiminde önemli bir azalma ($P<0,05$) olduğu sonucuna varılmıştır. Altıok vd.’nin [158] yapmış olduğu benzer bir çalışmada da, kekik yağı yüklü kitosan filmlerin en büyük antimikrobiyal etkiyi *E. coli* ve *S. aureus* üzerinde gösterdiği ve yapmış olduğumuz çalışma ile benzer sonuçlara varıldığı görülmüştür. Elde edilen sonuçlar arasındaki küçük

farklılıklar, zon çapının mikroorganizma gelişme oranı ile antimikrobiyal maddenin besiyerine difüzyon oranına bağlı olarak değişiklik göstermesinden kaynaklanabileceği daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir [159]. Mikroorganizmaların agar plak üzerindeki etkileri şekil 4.9’da gösterilmiştir.



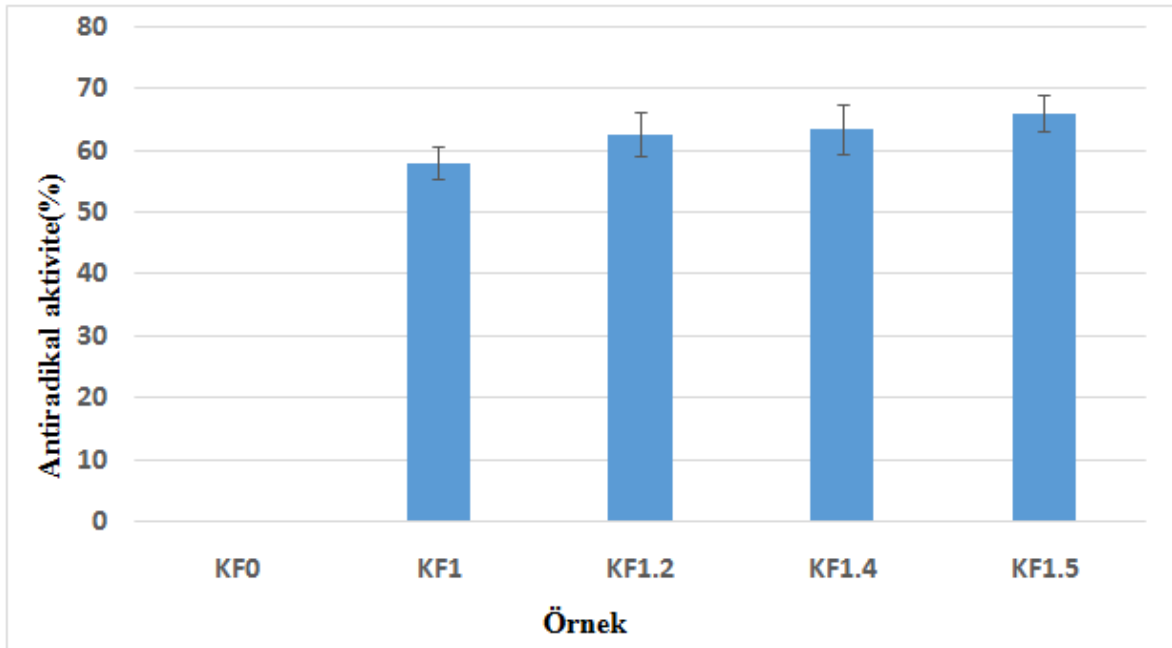
şekil 4.9 Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklü filmlerin agar plak üzerinde antimikrobiyal etkisi

López-Mata vd., farklı konsantrasyonlarda (%0,5, %1, %1,5) karvakrol yükledikleri kitosan filmlerin, *E. coli* O157:H7 ve *S. Typhimurium* bakterileri üzerindeki antibakteriyel

etkisini incelemiş ve karvakrol konsantrasyonunun artışıyla beraber filmlerin inhibasyon etkisinin de arttığını tespit etmişlerdir [160].

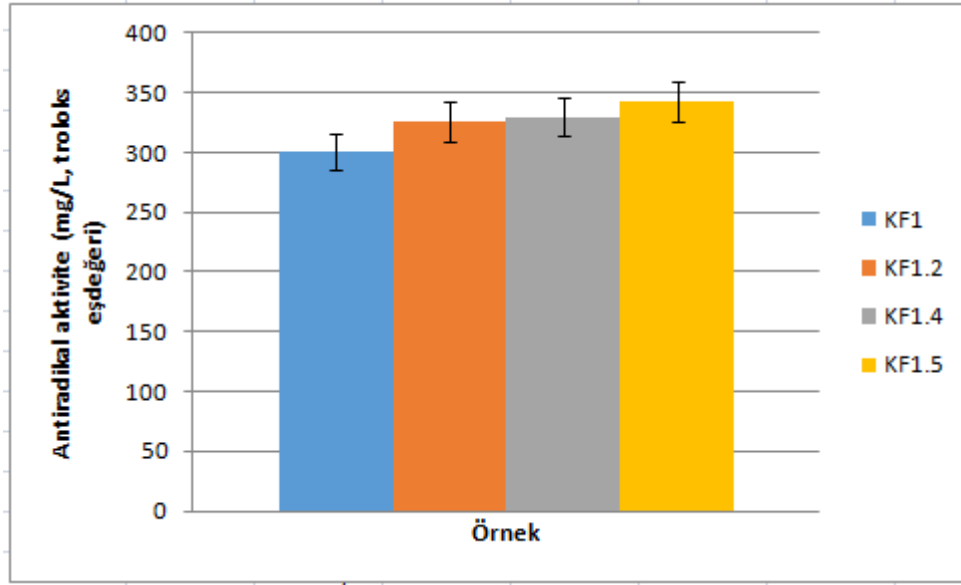
4.2.4 Fimlerin Antioksidan Aktivitesi (AOA)

Bu çalışmada, uçucu yağ yüklü fimlerin AOA, DPPH metodu ile belirlenmiştir. Uçucu yağ yüklü kitosan filmlerinin serbest DPPH radikalini yakalama düzeyi, Şekil 4.10'da belirtildiği gibi yüzde olarak, Şekil 4.11'de ise troloks eşdeğerliliği türünden gösterilmiştir. Uçucu yağ içermeyen nanopartikül örnekleri (kontrol) hiç bir AOA göstermezken, uçucu yağ yüklü kitosan film örnekleri %58,14 – 66,08 arasında değişen düzeylerde AOA göstermiştir. Filmlerin troloks eşdeğeri cinsinden AOA'leri ise 301,06 - 343,05 mg/L olarak hesaplanmıştır. Kitosan filmlere dahil edilen uçucu yağ konsantrasyonu arttıkça antioksidan aktivitenin de arttığı ($P<0,05$) saptanmıştır. Ancak %1,4 ve %1,5 uçucu yağ yüklü filmlerin AOA arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P>0,05$) bulunamamıştır. Konsantrasyon artışına bağlı olarak güçlenen antioksidan aktivitenin, uçucu yağ içerisinde bulunan karvakrol ve timol gibi fenolik bileşenlerin varlığından kaynaklandığı daha önceki çalışmalarda da bildirilmiştir [158].



KF0: Uçucu yağsız kontrol örneği; KF1: %1 uçucu yağ yüklü film örneği; KF1.2: %1,2 uçucu yağ yüklü film örneği; KF1.4: %1,4 uçucu yağ yüklü film örneği; KF1.5: %1,5 uçucu yağ yüklü film örneği

Şekil 4.10 Uçucu yağ yüklü kitosan filmlerinin antioksidan aktiviteleri



KF0: Uçucu yağsız kontrol örneği; KF1: %1 uçucu yağ yüklü film örneği; KF1.2: %1,2 uçucu yağ yüklü film örneği; KF1.4: %1,4 uçucu yağ yüklü film örneği; KF1.5: %1,5 uçucu yağ yüklü film örneği

Şekil 4.11 Uçucu yağ yüklü kitosan filmlerinin troloks eşdeğerliliği olarak antioksidan aktiviteleri

Gıdaların raf ömrünü sınırlandıran ve kalite kaybına yol açan önemli etmenlerden biri de oksidatif bozulmadır. Oksidatif bozulma sonucunda gıdaların doku yapısında, renginde kokusunda ve tadında istenmeyen değişiklikler oluşmaktadır. Oksidasyona bağlı olarak ortaya çıkan kötü koku ve ransit tadın oluşmasında antioksidanların rolü büyüktür. Antioksidanlar kötü tat ve kokuyu ortadan kaldırmaz ya da oksidasyonu engellemezler. Bu maddeler, gıda veya ambalajların yapısına dahil edilerek oksidasyonu geciktirir veya engellerler [161]. Bu amaçlarla literatürde, ambalaj materyallerine bitki ekstraktı, BHT ve BHA gibi doğal ve sentetik antioksidanlar katılmış çok sayıda çalışma mevcuttur [126]. Ancak son zamanlarda, sentetik antioksidanların canlı organizmada bir takım kanserojenik ve teratojenik etkisinden dolayı, doğal antioksidanlar tercih edilmektedir. Baharat ve doğal aromatik bitkilerin yapılarında bulunan fenolik bileşiklerin antiradikal etkileri arasında; serbest radikalleri yok etme, metal iyonlarıyla kompleks meydana getirme ve tekli oksijen oluşumunu engelleme gibi aktiviteler bulunmaktadır [161]. Bu çalışmadaki amaçlardan biri de, kitosan filmlerine uçucu yağ ilave ederek antioksidan özellik kazandırmaktır. Antioksidan aktiviteyi belirlemek için çok sayıda yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemlerden biri de DPPH yöntemidir. Bu yöntem, bitkilerden ya da gıdalardan elde edilen ekstratlar ya da bileşenlerdeki serbest radikali yakalama aktivitesini belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır [162].

Siripatrawan ve Harte [126]'nin yapmış oldukları benzer bir çalışmada %2, %5, %10 ve %20 oranlarında yeşil çay ekstraktı yüklenen kitosan filmler üretilmiş ve bu filmlerin antioksidan aktiviteleri DPPH metoduyla belirlenmiştir. Araştırma sonucunda, yeşil çay konsantrasyonu arttıkça antioksidan aktiviteninde arttığı tespit edilmiştir.

Altinok vd. [158] tarafından yapılan başka bir çalışmada da, %0,2, %0,4, %0,6, %0,8, %1 ve %1,2 oranlarında kekik uçucu yağı yüklenen kitosan filmler üretilmiş ve bu filmlerin antioksidan aktiviteleri ABTS metodu kullanılarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, uçucu yağ konsantrasyonu arttıkça antioksidan aktivitenin de arttığı ve maksimum antioksidan etkinin %1,2 uçucu yağ konsantrasyonunda olduğu sonucuna varılmıştır.

4.2.5 Renk Değişimi

Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklü ve yüksüz kitosan filmlerine ait L^* , a^* , b^* ve ΔE değerleri Çizelge 4.4' de gösterilmiştir. L^* değerleri arasında, istatistiksel olarak önemli bir fark ($P>0,05$) bulunamamıştır. En düşük L^* değerine, %1,2 oranında uçucu yağ yüklü filmin sahip olduğu görülmüştür. Kitosan filmlerin L^* değerine ilişkin literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde, birbirinden farklı sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Bunun sebebinin ise, çalışmalarda kullanılan kitosanların farklı kaynaklardan temin edilmesi, dolayısıyla da kitosan elde edilme prosesinde farklı işlerin uygulanmasının L^* değerini etkileyebileceği bildirilmiştir [160]. Film örneklerinin ΔE değerleri 1,63 ile 9,23 arasında değişmekte olup, en yüksek ΔE değerinin %1,5 (v/v) uçucu yağ oranına sahip kitosan filmde olduğu belirlenmiştir. Konsantrasyon artışına bağlı olarak, filmlerin ΔE değerleri istatistiksel olarak artmıştır ($P<0,05$). b^* değerinde meydana gelen artış, uçucu yağ konsantrasyonu yükseldikçe filmlerde oluşan sarımsı rengin arttığını göstermektedir. Bu da, uçucu yağ içerisinde bulunan ve düşük dalga boyunda ışık adsorbsiyonuna sahip fenolik maddelerin ve β -(1-4)-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoz ünitelerinin varlığı ve artışı ile açıklanmaktadır [160,163]. Ayrıca Tween 80'in de sarımsı renk ile ilişkili olduğu, dolayısıyla film rengini ve b^* değerini etkileyebileceği önceki çalışmalarda bildirilmiştir [160]. Filmlerdeki uçucu yağ konsantrasyonunun artışına bağlı olarak, b^* değeri de istatistiksel olarak artmıştır ($P<0,05$). En yüksek a^* değerinin, kontrol örneğinde olduğu tespit edilmiştir. Nanoemülsiyonlardan oluşan yenilebilir filmlerle ilgili yapılmış olan çalışmalar incelendiğinde, nanopartikül boyutu azaldıkça renk farkında azaldığı bildirilmiştir [164]. Ancak bu çalışmada, uçucu yağ artışına bağlı partikül boyutunun azalmasıyla, renk değişimi artış göstermiştir. Casariego vd. karvakrol yüklü kitosan

filmlerinde, yüksüz kontrol örneğinin en yüksek L^* değerine sahip olduğunu ve karvakrol eklendiğinde bu değerin azaldığını belirtmişlerdir [160].

Çizelge 4.4 Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklü kitosan filmlerin L^* , a^* , b^* ve ΔE değerleri

Örnek	L^*	a^*	b^*	ΔE
KF0	90,16±1,04 ^a	4,28±0,07 ^a	0,17±0,09 ^e	1,63±1,04 ^d
KF1	91,00±0,53 ^a	3,80±0,14 ^b	4,42±0,43 ^d	4,31±0,35 ^c
KF1.2	88,56±2,97 ^a	3,13±0,29 ^c	6,12±0,83 ^c	7,22±1,57 ^b
KF1.4	90,42±2,73 ^a	2,98±0,21 ^c	7,59±1,03 ^b	7,91±1,57 ^{ab}
KF1.5	88,53±1,38 ^a	3,17±0,09 ^c	8,72±1,10 ^a	9,23±1,18 ^a

KF0: Uçucu yağsız kontrol örneği; KF1: %1 uçucu yağ yüklü film örneği; KF1.2: %1,2 uçucu yağ yüklü film örneği; KF1.4: %1,4 uçucu yağ yüklü film örneği; KF1.5: %1,5 uçucu yağ yüklü film örneği

a-e: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0,05$) olduğunu göstermektedir.

Çalışma sonuçları, López-Mata vd.'nin [160] karvakrol yüklü kitosan filmlerin renk parametrelerine ilişkin sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur.

4.2.6 Film Kalınlığı

Çalışma sonucunda farklı konsantrasyonlardaki uçucu yağlardan elde edilen kitosan filmlere ait kalınlık değerleri Çizelge 4.5’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5 Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklenen kitosan filmlerin kalınlık değerleri

Örnek	Film Kalınlığı (mm)
KF0	0,039±0,001 ^c
KF1	0,041±0,003 ^c
KF1.2	0,045±0,001 ^b
KF1.4	0,053±0,003 ^a
KF1.5	0,055±0,000 ^a

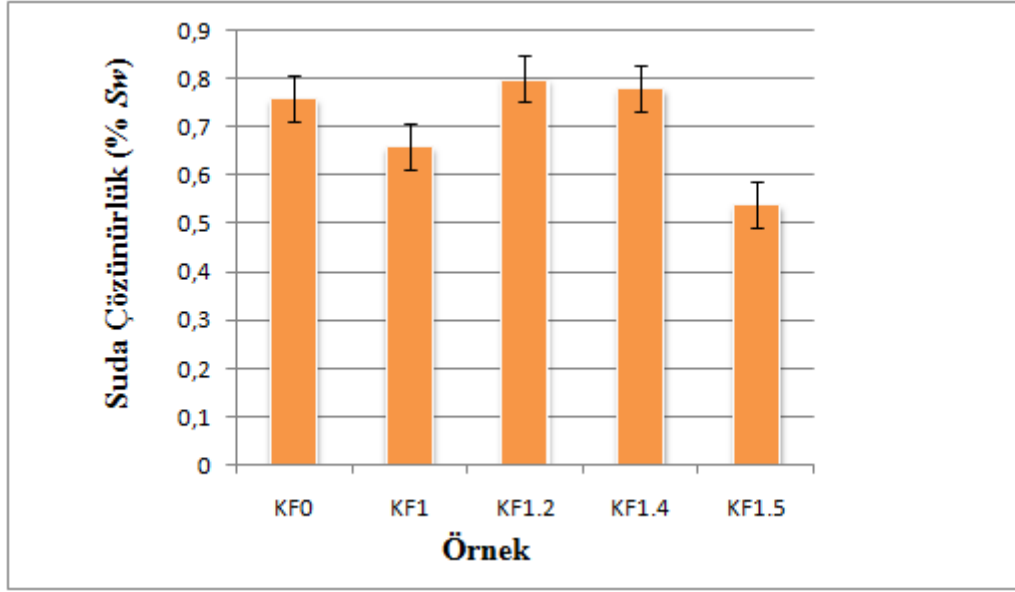
KF0: Uçucu yağsız kontrol örneği; KF1: %1 uçucu yağ yüklü film örneği; KF1.2: %1,2 uçucu yağ yüklü film örneği; KF1.4: %1,4 uçucu yağ yüklü film örneği; KF1.5: %1,5 uçucu yağ yüklü film örneği

a-c: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0,05$) olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.5’de görüldüğü gibi, film kalınlıkları 39 mm ile 55 mm arasında değişmektedir. Her bir örnek için, filmin 5 farklı noktasından ölçüm yapılmış ve ortalamaları alınmıştır. Alejandra Acevedo-Fanive ark. ürettikleri aljinat, kekik yağı, limon yağı ve adaçayı yağı yüklü filmlerin kalınlıklarını sırasıyla 50 μm , 46 μm , 42 μm ve 38 μm olarak ölçmüşlerdir [164]. Film örnekleri içinde en fazla kalınlığa ($P<0,05$) KF1.4 ve KF1.5 örneklerinin sahip olduğu görülmekle birlikte, bu iki örnek arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P>0,05$) bulunamamıştır.

4.2.7 Suda Çözünürlük Testi (S_w)

Şekil 4.12’de, farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklü ve yüksüz kitosan filmlerinin suda çözünürlük oranları (S_w) % olarak gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre, en yüksek çözünürlüğün %1,2 oranında (v/v) uçucu yağ yüklü, en düşük çözünürlüğün ise %1,5 oranında (v/v) uçucu yağ yüklü kitosan filmde olduğu görülmektedir ve grafik düzensiz bir artış-azalış sergilemektedir. KF0, KF1.2 ve KF1.4 örnekleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P>0,05$) olmadığı ve diğer örneklerle kıyasla, istatistiksel olarak en yüksek ($P<0,05$) çözünürlüğe yine bu üç örneğin sahip olduğu tespit edilmiştir. Konuyla ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde, gliserol gibi plastikleştirici etkiye sahip madde miktarındaki değişikliklerin çözünürlük oranını etkilediği bildirilmektedir. Yenilebilir filmlerde kullanılan hem temel malzemenin hem de poliol plastikleştiricilerin hidrofilik doğasından dolayı, bu maddelerin konsantrasyon artışı S_w değerinde de yükselmeye sebep olduğu önceki çalışmalarda tespit edilmiştir [165]. Abdollahi vd. [166], farklı konsantrasyonlarda biberiye uçucu yağı yüklenmiş kitosan filmlerinin suda çözünürlüklerini incelediklerinde, uçucu yağ konsantrasyon artışına bağlı bir azalmanın olduğunu tespit etmişlerdir. Rubilar ve arkadaşları ise, farklı konsantrasyonlarda karvakrol yüklenmiş kitosan filmlerin suda çözünürlüklerinin, karvakrol ilavesinden etkilenmediğini bildirmişlerdir [167]. Kitosan filmlerin suda çözünürlüklerinin, kitosanın fonksiyonel gruplarına ve plastikleştirici maddenin su tutma kapasitesine bağlı olduğu önceki çalışmalarda bildirilmiştir [168].



Şekil 4.12 Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklü kitosan filmlerin suda çözünürlük oranları

KF0: Uçucu yağsız kontrol örneği; KF1: %1 uçucu yağ yüklü film örneği; KF1.2: %1,2 uçucu yağ yüklü film örneği; KF1.4: %1,4 uçucu yağ yüklü film örneği; KF1.5: %1,5 uçucu yağ yüklü film örneği

4.2.8 Filmlerin Mekanik Özellikleri

Filmlerin, çekme dayanımı (tensile strength, TS) ve kopma anındaki uzama (elongation at break, EB) gibi mekanik özellikleri ile ilgili parametreler vardır. Çekme dayanımı, çekme testi sırasında filmde oluşan azami gerilmeyi ifade etmektedir. Kopma anındaki uzama miktarı ise, ambalajın uzama özelliğini ortaya koymaktadır [158]. Çizelge 4.6'da da görüldüğü gibi, filme eklenen uçucu yağ miktarı arttıkça uzama miktarında bir azalma meydana gelmiştir. Bununla birlikte uçucu yağ konsantrasyonunun, istatistiksel bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir ($P < 0,05$). Kitosan filmlere uçucu yağ ilavesinin, filmin uzama kabiliyetini azalttığı saptanmıştır. İstatistiksel olarak en yüksek ($P < 0,05$) EB değerleri KF0, KF1 ve KF1.2 örneklerinde tespit edilmiş ve bu filmler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P > 0,05$) bulunmamıştır. Filmlerde ki uçucu yağ konsantrasyonu arttıkça, filmdeki gözenek yapısı ve gözenek boyutu da arttığından dolayı uzama yüzdesi düşmeye başlamıştır.

Çizelge 4.6 Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklü kitosan filmlerin mekanik özellikleri

Örnek	Çekme Dayanımı (MPa)	Kopma Anındaki Uzama (%)
KF0	0,19±0,00 ^b	183,89±5,98 ^a
KF1	1,53±0,06 ^a	182,74±6,80 ^a
KF1.2	1,41±0,14 ^a	169,32±3,38 ^a
KF1.4	0,17±0,01 ^b	128,97±17,99 ^b
KF1.5	1,46±0,32 ^a	107,57±2,60 ^c

KF0: Uçucu yağsız kontrol örneği (kontrol); KF1: %1 uçucu yağ yüklü film örneği; KF1.2: %1,2 uçucu yağ yüklü film örneği; KF1.4: %1,4 uçucu yağ yüklü film örneği; KF1.5: %1,5 uçucu yağ yüklü film örneği

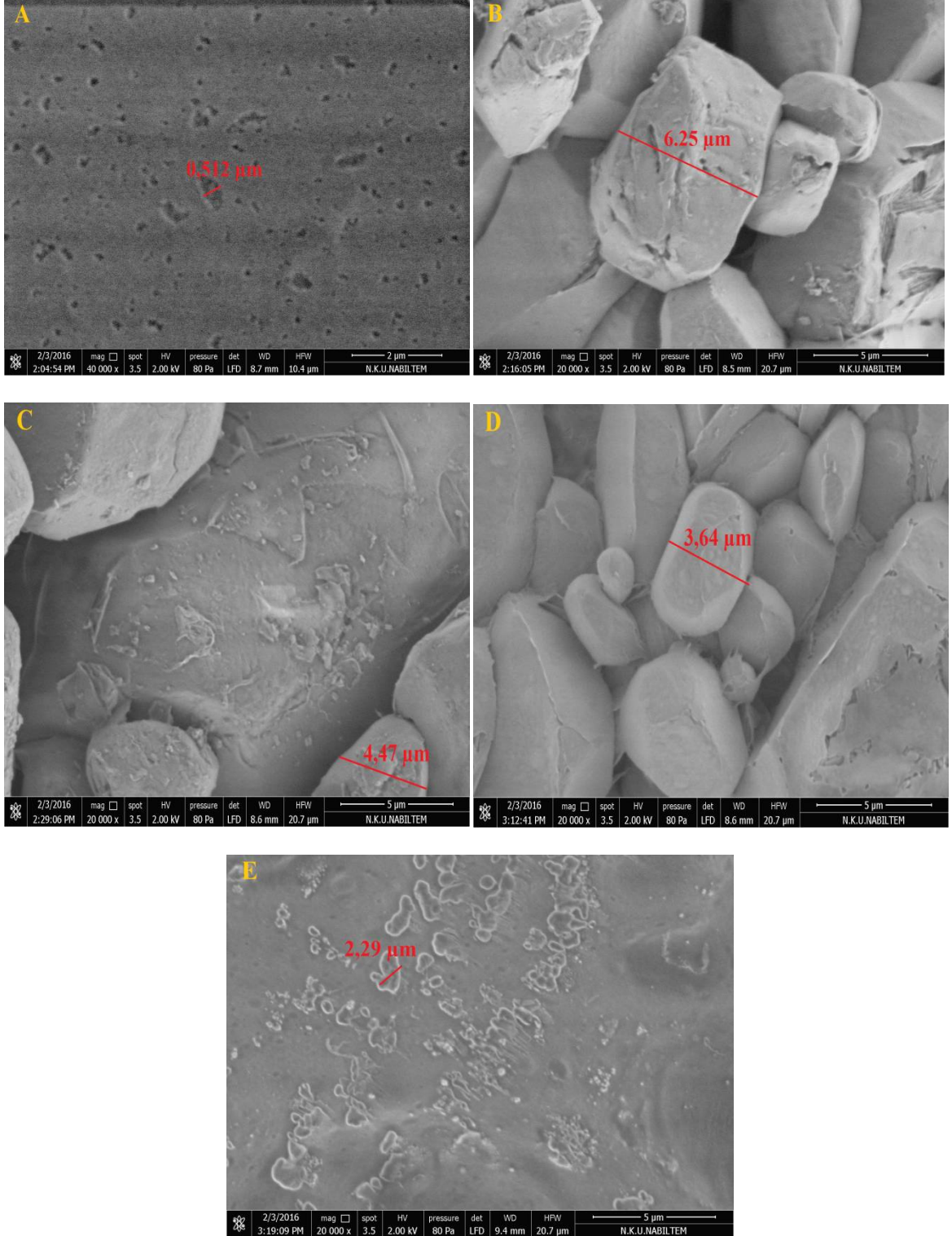
a-c: Aynı sütundaki birbirinden farklı olan küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli fark ($P<0,05$) olduğunu göstermektedir.

Filmlerin çekme dayanımlarına bakıldığında KF1, KF1.2 ve KF1.5 örnekleri ile KF0 ve KF1.4 örnekleri arasındaki farklar istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($P>0,05$). Altıok ve ark. [158] farklı konsantrasyonlarda kekik uçucu yağı yükledikleri film örneklerinin mekanik testi sonuçları ve López-Matavd.'nin [160] karvakrol yükledikleri kitosan filmlerinin mekanik testi sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur.

4.2.9 Filmlerin SEM Görüntüleri

Şekil 4.13'de, farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklenen kitosan filmlerinin ve uçucu yağ yüklenmeyen kontrol örneğinin SEM görüntüleri verilmiştir. Görüntüler incelendiğinde nanokapsüllerin, mikrokapsül şeklinde modifiye oldukları anlaşılmaktadır. Partikül büyüklüklerinin 512 nm ile 6250 nm arasında değiştiği tespit edilmiştir. Klikerson ve Namatsila, kitosan filmlerde meydana gelen mikrokapsüllerin Tween-80'den kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir [169]. Marco A. López-Mata ve arkadaşları, farklı konsantrasyonlarda karvakrol yükledikleri kitosan filmlerin SEM görüntülerinde, film yüzeyine gömülü, büyüklüğü 2 μm ile 7 μm arasında değişen mikrokapsüller gözlemlemişlerdir. Bunun sebebinin ise, pozitif yüklü kitosan ile negatif yüklü Tween-80 arasındaki etkileşim sonucu, damlacıkların agregasyonundan ve karvakrol dağılımının

filmin hidrofilik/hidrofobik dengesini etkilemiş olabileceğinden kaynaklandığını rapor etmişlerdir [160].



Şekil 4.13 Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklü filmlerin SEM görüntüleri (A:KF0, B:KF1, C:KF1.2, D:KF1.4, E:KF1.5)

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında, iyonik jelasyon tekniğiyle farklı konsantrasyonlarda (%1, %1,2, %1,4 ve %1,5) zahter uçucu yağı yüklenmiş kitosan nanopartikülleri üretilmiş ve üretilen bu nanopartiküllerden biyobozunur film elde edilmiştir. Hem uçucu yağ yüklenen nanopartiküllerin hem de üretilen filmlerin karakterizasyon işlemleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

5.1 Uçucu Yağ Yüklü Kitosan Nanopartikülleri için Elde Edilen Sonuçlar

- İyonik jelasyon yönteminde çapraz bağlayıcı olarak TPP kullanılmıştır ve TPP' nin emülsiyona ilavesinin yavaş ve damlalar halinde olması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır. Aksi halde emülsiyon içersinde topaklanmaların olduğu ve homojen bir emülsiyon oluşmadığı yapılan çalışmalarla görülmüştür. TPP'nin emülsiyona damlatılması sırasında, emülsiyonla damlatılan materyal (pastör pipeti) arasındaki mesafeninde, karışımın homojenliği açısından önem arz ettiği gözlenmiştir.
- Kitosan nanopartiküllerinin boyutu üzerine ortam pH'sının etkisi incelenmiş, asidik ortamda nanobüyükölükte partiküller sentezlenebilirken bazik ortama (pH>6) geçildiğinde partiköl boyutunun arttığı görülmüştür. Sonuç olarak, iyonik jelleşmeyle bazik ortamda daha fazla büyüölükge sahip kitosan partiküllerinin oluştuğu gözlenmiştir.
- En küçük partiköl büyüölüküne (140,25 nm) sahip uçucu yağ yüklü kitosan nanopartikülleri (NP1.4), pH 4' de çalışıldığında sentezlenmiştir.

- İyonik jelasyon yöntemiyle üretilen kitosan nanopartikülleri, SEM analizi için liyofilizasyon işlemi uygulanması sonucunda, partiküllerin bazı bölgelerde birleştiği görülmüştür.
- Zetasizer da boyut ölçümü yapılmadan önce, ultrases dalgasının partikül boyutuna etkisine bakılmıştır. En küçük ve stabil büyüklüğe sahip nanopartiküllerin, 15 dakika ultrases işlemine tabii tutulduktan sonra oluştuğu gözlenmiştir.
- SEM fotoğraflarına bakıldığında, partikül boyutunun zetasizerdaki ölçümlere göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Oluşan bu farkın, parçacıkların liyofilizasyon sırasında birbirine yapışmalarından ve kümeleşmelerinden olduğu tahmin edilmektedir.
- Boyut analizi, örnekler 4-5 kat seyreltilerek gerçekleştirilmiştir. Seyreltme miktarı arttıkça nanopartikül boyutunda azaldığı görülmüştür. Bu durum, seyreltme sonucunda birim hacme düşen partikül miktarı azaldığından, partiküllerin kendiliğinden birbirlerine yapışma eğilimlerinin de azalması şeklinde yorumlanabilmektedir.
- Uçucu yağ konsantrasyon artışına bağlı olarak partikül boyutunun azaldığı görülmüştür.
- FTIR spektrumuna ve enkapsülasyon etkinliğine bakıldığında, uçucu yağın iyonik jelleşme yöntemiyle başarılı bir şekilde kapsüllendiği gözlenmiştir.
- Uçucu yağ konsantrasyonuna bağlı antimikrobiyal ve antioksidan etki incelendiğinde, uçucu yağ konsantrasyon artışının bakteri (*E. coli* O157:H7 ATCC 33150, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Listeria monocytogenes* ATCC 19118) inhibisyonu üzerinde önemli bir etkisinin olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde nanopartiküllerdeki uçucu yağ konsantrasyon artışıyla antioksidan etkinin de arttığı görülmüştür.
- Yakın gelecekte, farklı hücre hatlarında zahter uçucu yağı içeren biyoaktif kitosan nanopartiküllerinin sitotoksitesinin *in vitro* şartlarda incelenmesi planlanmaktadır. Günümüzde, uçucu yağ salım kinetiğini karakterize etmek amacıyla farklı çalışmalar sürdürülmektedir.

5.2 Uçucu Yağ Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinden Üretilen Filmlere İlişkin

Sonuçlar

- Bu çalışmada, gıda maddelerinin kalite özelliklerinin korunmasında ve raf ömrünün uzatılmasında umut vadeden, kitosana farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklenerek sentezlenen nanopartiküllerden üretilmiş biyobozunur filmlerin antibakteriyel, antioksidan, fiziksel ve mekanik özellikleri incelenmiştir.
- Uçucu yağ yüklü kitosan solüsyonlarına film formatına dönüştürülmeden önce santifüj işlemi uygulanamamıştır. Yüksek devirli santrifüj işlemi uygulandığında, kapsül yapısının bozulduğu yağ fazının tortu şeklinde santrifüj tüpünde toplandığı görülmüştür. Bu durumda filme dönüştürülmek istendiğinde, kurutulan filmin homojen bir görünüm sergilemediği gözlenmiştir.
- Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ yüklenen filmler arasında, en güçlü antibakteriyel aktiviteyi %1,5 (v/v) oranında uçucu yağ yüklü filmler göstermiştir. Dolayısıyla uçucu yağ konsantrasyonuna bağlı olarak filmlerin antibakteriyel etkisinde artış göstermiştir. Çalışmada kullanılan bakteriler arasında, antibakteriyel filmlere karşı en hassas olan bakteri türü *S.aureus* olarak belirlenmiştir.
- Nanopartiküllerde de olduğu gibi, %1,5 (v/v) oranında uçucu yağ yüklü filmin en yüksek antioksidan etkiyi gösterdiği görülmüştür. Buradan hareketle, ambalaj içerisindeki aktif madde (uçucu yağ) miktarının artışıyla, oksidasyonun önüne geçebilme etkisinin de artacağı düşünülmektedir.
- Filmlerin mekanik dayanımının uçucu yağ oranı arttıkça azaldığı görülmüştür.
- Filmlerin suda çözünürlükleri incelendiğinde, farklı konsantrasyonlar arasında düzenli bir artış veya azalış izlenememiştir. Bu durumda, konsantrasyon artışına bağlı bir genelleme yapılamamaktadır.
- Literatürde yapılmış olan gliserol, uçucu yağ ve kitosan bazlı filmlerin SEM görüntüleri incelendiğinde, genel olarak nano boyuttan mikro boyuta geçişin söz konusu olduğu görülmektedir. Bununda çoğunlukla partiküllerin agregasyonundan ve kümeleşmesinden meydana geldiği belirtilmiştir. Bu çalışma sonuçları da söz konusu çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

Elde edilen bu sonuçlar ışığında söz konusu çalışma ile ilgili olarak şu öneriler sunulabilir;

- Kitosan bazlı nanopartikül sentezinde kullanılacak kitosanın özellikleri iyi bilinmelidir (molekül ağırlığı, deasetilasyon derecesi gibi). İyonik jelleşme tekniğinde partiküller arasında yoğun kümeleşmeler meydana gelmektedir, bu nedenle küçük boyutlara sahip partiküller elde edilmesi çeşitli parametrelere bağlı durumdadır. Etkili parametrelerin uygun bir şekilde ayarlanması, nano boyutta partikül sentezi açısından önemlidir.
- Uçucu yağlar, bazı hastalıkların önlenmesi veya tedavi edilmesi konusunda ümit verici bir potansiyele sahiptir. Bununla birlikte, suda çözünürlüklerinin zayıf olması ve yüksek uçma potansiyelleri gibi dezavantajlarının olması, kısıtlı uygulama olanağını da beraberinde getirmektedir. Lipozomlarda uçucu yağların nanoenkapsülasyonu, katı yağ nanopartikülleri, nano ve mikro emülsiyonlar ve polimerik nanopartiküllerde uçucu yağ doz sınırını aşmamak, söz konusu aktif bileşenlerin uzun vadede güvenliğini sağlamak için umut verici bir stratejidir.
- Uçucu yağların nanokapsüllendiklerinde, suda çözünür hale gelmeleri ve termal dayanımlarının artması, gıda katkı maddesi olarak kullanılabilme potansiyellerini artırmaktadır.
- Mekanik özellikleri daha yüksek filmler üretilmesi amacıyla, partiküllerin nanoboyutta olması şartıyla kitosan miktarının artırılması söz konusu olabilir.

Daha ileri ki çalışmalarda, nanokapsüllerin sitotoksitesine yönelik çalışmaların yapılması önerilebilir.

KAYNAKLAR

- [1] Shahidi, F., Arachchi, J.K.V. ve Jeon, Y.J.,(1999).“Food Applications of Chitin and Chitosans”, Trends Food Science Technology, 10: 37-51.
- [2] Luo, Y., Zhang, B., Whent, M., Yu, L. ve Wang, Q., (2011). “Preparation and Characterization of Zein/Chitosan Complex for Encapsulation of α -Tocopherol, and Its in Vitro Controlled Release Study”, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 85: 145-152.
- [3] Dodane, V. ve, Vilivalam, V.D., (1998). “Pharmaceutical Application of Chitosan”, Pharm. Sci. Technology Today, 1: 246-53.
- [4] Tien, C.L., Lacroix, M., Ispaz-Szabo, P. ve, Mateescu, M. A., (2003). “N-Acetylated Chitosan: Hydrophobic Matrices for Controlled Drug Release”, J Control Release, 93: 1-13.
- [5] Butler, B. L., Vergano, P. J., Testin, R. F., Bunn, J. N. ve Wiles, J. L., (1996). “Mechanical and Barrier Properties of Edible Chitosan Films as Affected by Composition and Storage”, Journal of Food Science, 61: 953-955.
- [6] Kittur, F. S., Kumar, K. R. ve Tharanathan, R. N., (1998). “Functional Packaging Properties of Chitosan Films”, Z Lebensm Unters Forsch A, 206: 44-47.
- [7] Botsoglou, N.A., Grigoropoulou, S.M., Botsoglou, E., Govaris, A. ve Papageorgiou, G., (2003). “The Effects of Dietary Oregano Essential Oil and α -Tocopheryl Acetate on Lipid Oxidation in Raw and Cooked Turkey During Refrigerated Storage”, Meat Science, 65: 1193-1200.
- [8] Nychas, G.J.E., (1995). “Natural Antimicrobials Fromplants. In: Gould, G.W. (Ed.), New Methods of Food Preservation”, Blackie Academic and Professional, London, 58-89.
- [9] Burt, S., (2004). “Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Application in Food a Review”, International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253.
- [10] Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J.A. ve Voilley, A., (1998). “Edible Barriers: a Solution to Control Water Migration in Foods. In: Risch, S.J. (Ed.), Food packaging”, American Chemical Society, Washington, DC, 9-16.

- [11] Padgett, T., Han, I.Y. ve Dawson, P.L., (1998). "Incorporation of Food-Grade Antimicrobial Compounds into Biodegradable Packaging Films", *Journal of Food Protection*, 61: 1330-1335.
- [12] Appendini, P. ve Hotchkiss, J.H., (2002). "Review of Antimicrobial Food Packaging", *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3: 113-126.
- [13] Yoksan, R., Jirawutthiwongchai, J., Arpo, K., (2010). "Colloids and Surfaces B: Biointerfaces", 76: 292-297.
- [14] Roberts, G.A.F., (1992) "Chitin Chemistry, The Macmillan Press", London.
- [15] Agnihotri, S.A., Mallikarjuna, N.N. ve Aminabhavi, T.M., (2004). *J. Control. Release* 100: 5-28.
- [16] Wang, X., Li, X., Chen, L., Xie, F., Yu, L. ve Li, B., (2011). "Preparation and Characterisation of Octenyl Succinate Starch as a Delivery Carrier for Bioactive Food Components", *Food Chemistry*, 126: 1218-1225.
- [17] Demir, A., Seventekin, N., (2009). "Kitin, Kitosan ve Genel Kullanım Alanları", *Tekstil Teknolojileri Elektrik Dergisi*, 3: 92-103.
- [18] Chen, M.J. ve Chen, K.N., (2007). "Applications of Probiotic Encapsulation in Dairy Products. In: Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems", Ed: Lakkis, M., Blackwell Publishing, U.S.A., 83-112.
- [19] Barbosa-Canovas, G.V., Ortega-Rivas, E., Juliano, P. ve Yan, H., (2005). "Food Powders; Physical Properties, Processing and Functionality, Kluwer Academic", New York, 199-219.
- [20] Zuidam, N.J. ve Shimon, E., (2010). "Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them. In: Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing", Eds.: Zuidam, N.J., Nedovic, V.A., Springer, London, 7-29.
- [21] Fang, Z. ve Bhandari, B., (2010). "Encapsulation of Polyphenols a Review", *Trends in Food Science & Technology*, 21(10): 510-523.
- [22] Desai, K. G. H. ve Jin Park, H., (2005). "Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients", *Drying Technology*, 23(7): 1361-1394.
- [23] Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S. ve Bugarski, B., (2011). "An Overview of Encapsulation Technologies for Food Applications", *Procedia Food Science*, 1: 1806-1815.
- [24] Ubbink, J. ve Krüger, J., (2006). "Physical Approaches for the Delivery of Active Ingredients in Foods", *Trends in Food Science and Technology*, 17: 244-254.
- [25] Quintanilla-Carvajal, M. X., Camacho-Diaz, B. H., Meraz-Torres, L. S., Chanona-Perez, J. J. ve Alamilla-Beltran, L., (2010). "Nanoencapsulation: A New Trend in Food Engineering Processing", *Food Engineering Review*, 2: 39-50.
- [26] Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J.L. ve Alonso, M.J., (1997). "Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers", *Journal of Applied Polymer Science*, 63: 125-132.
- [27] Amidi, M., Romeijn, S.G., Borchard, G., Junginger, H.E., Hennink, W.E. ve Jiskoot, W. (2006). "Preparation and Characterization of Protein Loaded N-

- Trimethylchitosan Nanoparticles as Nasal Delivery System”, *Journal of Controlled Release*, 111: 107-116.
- [28] Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C. ve Zou, X. (2004a), “Preparation and Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles”, *Carbohydrate Research*, 339: 2693-2700.
 - [29] Qi, L. ve Xu, Z. (2004b), “Lead Sorbtion From Aqueous Solutions on Chitosan Nanoparticles, Colloids and Surfaces A: Physicochem”, *Engineering Aspects*, 251: 183-190.
 - [30] Deng, Q.Y., Zhou, C.R. ve Luo, B.H. (2006), “Preparation and Characterization of Chitosan Nanoparticles Containing Lysozyme”, *Pharmaceutical Biology*, 44: 336-342.
 - [31] Nualkaekul, S., Lenton, D., Cook, M.T., Khutoryanskiy, V.V. ve Charalampopoul, D., (2012). “Chitosan Coated Alginate Beads for the Survival of Microencapsulated Lactobacillus Plantarum in Pomegranate Juice”, *Carbohydrate Polymers*, 90: 1281-1287.
 - [32] Hu, Z.G., Zhang, J., Chan, W.L. ve Szeto, Y.S., (2006). “The Sorption of Acid Dye onto Chitosan Nanoparticles”, *Polymer*, 47: 5838-5842.
 - [33] Lee, D.W., Powers, K. ve Baney, R., (2004). “Physicochemical Properties and Blood Compatibility of Acylated Chitosan Nanoparticles”, *Carbohydrate Polymers*, 58: 371-377.
 - [34] Zhang, H., Oh, M., Allen, C. ve Kumacheva, E., (2004). “Monodisperse Chitosan Nanoparticles for Mucosal Drug Delivery”, *Biomacromolecules*, 5: 2461-2468.
 - [35] Fan W., Yan, W., Xu, Z., Ni, H., (2012). “Formation Mechanism of Monodisperse, Low Molecular Weight Chitosan Nanoparticles by Ionic Gelation Technique”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90: 21-27.
 - [36] Grenha, A., Seijo, B. ve Remunan-Lopez, C., (2005). “Microencapsulated Chitosan Nanoparticles for Lung Protein Delivery”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25: 427-437.
 - [37] Avadi, M.R., Sadeghi A.M.M, Abedin S., Atyabi, F., Dinarvand, R. ve Tehrani, M.R., (2010). “Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine”, 6:58-63.
 - [38] Baik, M.Y., Suhendro, E.L., Nawar, W.W., McClements, D.J., Decker, E.A. Chinachoti, P., (2004). “Effects of Antioxidants and Humidity on the Oxidative Stability of microencapsulated Fish Oil”, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 81(4): 355-360.
 - [39] Peker, H. ve Arslan, S., (2011). “Mikroenkapsülasyon ve Süt Teknolojisinde Kullanım Alanları”, *Akademik Gıda*, 9(6): 70-80.
 - [40] Sheu, T.Y., Marshall, R.T. ve Heymann, H., (1993). “Improving Survival of Culture Bacteria in Frozen Desserts by Microentrap”, *Journal of Dairy Science*, 76: 1902-1907.
 - [41] Zivanovic, S., Chi, S. ve Draughton, A.E., (2005). “Antimicrobial Activity of Chitosan Films Enriched with Essential Oils”, *Journal of Food Science*, 70: 45-51.

- [42] Torlak, E., (2009). “Doğal Antimikrobiyal Maddeler ile Hazırlanan Yenilebilir ve Kaplanmış Plastik Filmlerin Gıda Kaynaklı Bazı Patojenlere Etkileri”, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Konya.
- [43] El Ghaouth, A., Arul, J., Asselin, A. ve Benhamou, N., (1992). “Anti-fungal Activity of Chitosan on Two Post-Harvest Pathogens of Strawberry Fruits”, *Phytopathology*, 82: 398-402.
- [44] Chien, P.J., Sheu, F. ve Yang, F.H., (2007). “Effects of Edible Chitosan Coating on Quality and Shelf-Life of Sliced Mango Fruit”, *Journal of Food Engineering*, 78: 225-229.
- [45] Cheah, L. H., (1997). “Page BBC. Chitosan Coating for İnhibition of Sclerotinia Rot of Carrots”, *New Zealand Journal of Crop Horticultural Science*, 25: 89-92.
- [46] Roller, S. ve Covill, N., (2000). “The Antimicrobial Properties of Chitosan in Mayonnaise and Mayonnaise-Based Shrimp Salads”, *Journal of Food Protection*, 63: 202-209.
- [47] <http://ice.chem.wisc.edu/NanoDecisions/PDF/ Agriculture>, 14.01.2016.
- [48] Var, I. ve Sağlam, S., (2015). “Gıda Endüstrisinde Nanoteknoloji Uygulamaları”, *Gıda*, 40(2): 101-108.
- [49] Demircioğlu, N., İrkin, R., Demircioğlu, A. ve Kabasakal, A., (2009). “Kitosan ve Gıda Sanayisindeki Uygulamaları”, *Akademik Gıda*, 7(4): 35-41.
- [50] Kayaardı, S. ve Zengin, C., (2010). Celal Bayar Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Muradiye/Manisa, Türkiye.VI. Uluslararası Ambalaj Kongresi, Gıda Endüstrisinde Kitosanın Ambalaj Materyali Olarak Kullanımı.
- [51] King, A.H., (1995). “Encapsulation of Food Ingredients; A Review of Available Technology, Focusing on Hydrocolloids. In: Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients”, *ACS Symposium Series*, American Chemical Society, 590: 26-39.
- [52] Rao, J. ve McClements, D.J., (2011). “Food-Grade Microemulsions, Nanoemulsions and Emulsions: Fabrication from Sucrose Monopalmitate”, *Food Hydrocolloids*, 25: 1413-1423.
- [53] Bouwmeester, H., Dekkers, S., Noordam, M.Y., Hagens, W.I., Bulder, A.S., Heer, C., Voorde, S.E.C.G., Wijnhoven, S.W.P., Marvin H.J.P. ve Sips A.J.A.M., (2009). “Review of Health Safety Aspects of Nanotechnologies in Food Production”, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 53: 52-62.
- [54] Scrinis, G. ve Lyons, K., (2013). “Nano Functional Foods: Nanotechnology, Nutritional Engineering and Nutritionally Reductive Food Marketing”, *Innovation in Healthy and Functional Foods*, 547-552.
- [55] Fathi, M., Mozafari, M.R. ve Mohebbi, M., (2012). “Nanoencapsulation of Food Ingredients Using Lipid Based Delivery Systems”. *Trends Food Science Technology*, 23: 13-27.
- [56] [www. nanoforum.org](http://www.nanoforum.org), 21.12.2015.
- [57] The Government of the Hong Kong Special Administrative Region, (2010). *Nanotechnology and Food Safety, Risk Assessment Studies Report No. 41*.

- [58] Wei, F., Lam, R., Cheng, S., Lu, S., Ho, D. ve Li, N., (2010). "Rapid Detection of Melamine in Whole Milk Mediated by Unmodified Gold Nanoparticles", *Applied Physics Letters*, 96: 133-702.
- [59] Sonawane, S.K., Arya, S.S., LeBlanc, J.G. ve Jha, N., (2014). "Use of Nanomaterials in the Detection of Food Contaminants", *European Journal of Nutrition Food Safety*, 4(4): 301-317.
- [60] <http://ice.chem.wisc.edu/NanoDecisions/PDF/Agriculture.pdf>, 10.12.2015.
- [61] Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. ve Saurel, R., (2007). "Application of Spray-Drying in Microencapsulation of Food Ingredients: An Overview", *Food Research International*, 40: 1107-1121.
- [62] Kınık, Ö., Kavas, G. ve Yılmaz, E., (2003). "Mikroenkapsülasyon Tekniği ve Süt Teknolojisindeki Kullanım Olanakları", *Akademik Gıda* 28(4): 401-407.
- [63] Aloğlu, H. ve Öner, Z., (2010). "Peyniraltı Suyu Proteinlerinin Mikroenkapsülasyon Teknolojisinde Kaplama Materyali Olarak Kullanım Olanakları", *Akademik Gıda*, 8(3): 38-42.
- [64] Dubey, R., Shami, T.C. ve Bhasker Rao, K.U., (2009). "Microencapsulation Technology and Applications", *Defence Science Journal*, 59(1): 82-95.
- [65] Heidebach, T., Först, P. ve Kulozik, U., (2009). "Microencapsulation of Probiotic Cells by Means of Rennet-Gelation of Milk Proteins", *Food Hydrocolloids*, 23: 1670-1677.
- [66] Gouin, S., (2004). "Microencapsulation: Industrial Appraisal of Existing Technologies and Trends", *Trends in Food Science and Technology*, 15: 330-347.
- [67] Gökmen, S., Palamutoğlu, R. ve Sarıçoban C., "Gıda Endüstrisinde Enkapsülasyon Uygulamaları", *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 7(1): 36-50.
- [68] Açı, M., Yerlikaya, O. Ve Kınık, Ö., (2014). "Mikroenkapsülasyon ve Süt Teknolojisindeki Yeri", *Akademik Gıda*, 12(1): 97-107.
- [69] Kunz, B., Kruckeberg, S. ve Weissbrodt, J., (2003). "Chancen und Grenzen der Mikroverkapselung in der Modernen Lebensmittelverarbeitung", *Chemie Ingenieur Technik*, 75: 1733-1740.
- [70] Madene, A., Jacquot, M., Scher, J. ve Desobry, S., (2006). "Flavour Encapsulation and Controlled Release-A Review", *International Journal of Science and Technology*, 41: 1-21.
- [71] Peker, H. ve Arslan, S., (2011). "Mikroenkapsülasyon ve Süt Teknolojisinde Kullanım Alanları", *Akademik Gıda*, 9(6): 70-80.
- [72] Vidhyalakshmi, R., Bhakyaraj, R. ve Subhasree, R.S., (2009). "Encapsulation "The Future of Probiotics" A Review", *Advances in Biological Research*, 3(3): 96-103.
- [73] Gonnet, M., Lethuaut, L., ve Boury, F., (2010). "New Trends in Encapsulation of Liposoluble Vitamins", *Journal of Controlled Release*, 146: 276-290.
- [74] Acosta, E., (2009). "Bioavailability of Nanoparticles in Nutrient and Nutraceutical Delivery", *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14: 3-15.
- [75] Soper, J.C., (1995). "Utilization of Coacervated Flavors", 104-112.

- [76] Arshady, R., (1993). "Microcapsules for food", J. Microencapsulation, 10: 413-435.
- [77] Reineccius, G.A., (1991). "Carbohydrates for Flavor Encapsulation", Food Technology Chicago, 45: 144-147.
- [78] Koç, M., Sakin, M. ve Kaymak-Ertekin, F., (2010). Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 16(1): 77-86.
- [79] Heinzelmann, K., Franke, K., Jensen, B. ve Haahr, A., (2000). "Protection of Fish Oil from Oxidation by Microencapsulation Using Freeze-Drying Techniques", European Journal of Lipid Science and Technology, 114-121.
- [80] Banerjee, T., Mitra, S., Singh, A.K., Sharma, R.K., ve Maitra, A., (2002). "Preparation, Characterization and Biodistribution of Ultrafine Chitosan Nanoparticles", International Journal of Pharmaceutics, 243: 93-105.
- [81] Gökçe, Y., Cengiz, B., Yıldız, N., Aktaş, Z. ve Çalimli, A., "Kitosan Nanoparçacıklarının Büyüklük Dağılımları Üzerine Dondurarak Kurutmada Kullanılan Koruyucu Maddelerin Etkisi", Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü, Ankara.
- [82] Shu, X.Z. ve Zhu, K.J., (2002). "The Influence of Multivalent Phosphate Structure on the Properties of Ionically Cross-Linked Chitosan Films for Controlled Drug Release", European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 54: 235-243.
- [83] Lertsutthiwong, P., Rojsitthisak, P. ve Nimmannit, U., (2009). "Preparation of Turmeric Oil-Loaded Chitosan-Alginate Biopolymeric Nanocapsules", Materials Science and Engineering, 29: 856-860.
- [84] Illum, L., Jabbal-Gill, I. ve Hinchcliffe, M., (2001). "Chitosan as a Novel Nasal Delivery System for Vaccines", Advanced Drug Delivery Reviews, 51: 81-96.
- [85] Matalanis, A., Jones, O.G. ve McClements, D.J., (2011). "Structured Biopolymer-Based Delivery Systems for Encapsulation, Protection, and Release of Lipophilic Compounds", Food Hydrocolloids, 25: 1865-1880.
- [86] <http://www.isobelgesiizmir.com/Gida-Ambalajlari-ve-Nanoteknoloji-52-t.html>, 21.02.2016.
- [87] Perry, R.H. ve Green, D.W., (1997). "Perry's Chemical Engineers Handbook", 2581.
- [88] Ponce, A.G., Roura, S.I., del Valle, C.E. ve Moreira, M.R., (2008). "Antimicrobial and Antioxidant Activities of Edible Coatings Enriched with Natural Plant Extracts: In Vitro and In Vivo Studies", Postharvest Biology and Technology, 49: 294-300.
- [89] Bhargava, K., Conti, D.S., da Rocha, S.R.P. ve Zhang, Y., (2015). "Application of an Oregano Oil Nanoemulsion to the Control of Food borne Bacteria on Fresh Lettuce", Food Microbiology, 47: 69-73.
- [90] McClements, D.J., (2011). "Edible Nanoemulsions: Fabrication, Properties, and Functional performance", Soft Matter, 7(6): 2297-2316.
- [91] Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M.A., Soliva-Fortuny, R. ve Martín-Belloso, O., (2013). "Effect of Processing Parameters on Physicochemical Characteristics of

- Microfluidized Lemongrass Essential Oil-Alginate Nanoemulsions”, *Food Hydrocolloids*, 30(1): 401-407.
- [92] Peker İ., Oktar, F., Eroğlu, M. ve Morkoç, E., (2006).“Kerevit Kabuklarından Kitin Üretilmesi ve Kesilmiş Sütün Suyundan Laktoz İzolasyonu İşleminde Kullanılması”, TÜBİTAK Proje No: 104M017, Ankara.
- [93] No, H.K., Meyers, S.P., Prinyawiwatkul, W. ve Z. (2007). “Applications of Chitosan for Improvement of Quality and Shelf Life of Foods”, *Journal of Food Science*, 72(5): 87-100.
- [94] Bilbao-Sainz, C., Avena-Bustillos,R.J., Wood, D.F., Williams, T. G., ve McHugh, T. H., (2010). “Nanoemulsions Prepared by a Low-Energy Emulsification Method Applied to Edible Films”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(22): 11932-11938.
- [95] Cahit D., (2008). "Katı desteğe tutturulmuş oksim bileşiklerinin ve metal komplekslerinin sentezi ve karakterizasyonu", doktora tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [96] Keles, F., (2002).“Gıda Ambalajlama İlkeleri”, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Yayınları No:189, Erzurum.
- [97] Baldwin, E.A., (1994). “Edible Coatings for Fresh Fruits and Vegetables: Past, Present and Future”, 25-64.
- [98] Kader, A.A., Kasmire, R.F., Mitchell, F.G., Reid, M.S., Sommer, N.F. ve Thompson, J.F., (1985). *Postharvest Technology of Horticultural Crops: Cooperative Extension University of California Division of Agriculture and Natural Resources Special Publication*, 192 - 198.
- [99] Kester, J.J. ve Fennema, O.R., (1986).“Edible Films and Coatings: A Review”, *Food Technology*, 40(12): 47-58.
- [100] Mc Hugh, T.H. ve Krochta, J.M., (1994).“Permeability Properties of Edible Films, in *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*”, Technomic Publishing Company, 139-189.
- [101] Lerdthanangkul, S. ve Krochta, J.M., (1996). “Edible Coating Effects on Postharvest Quality of Green Bell Peppers”, *Journal of Food Science*, 61(1): 97-103.
- [102] Nisperos, M.O. ve Baldwin, E.A., (1996). “Edible Coatings for Whole and Minimally Processed Fruits and Vegetables”, *Food Australia*, 48(1): 27-31.
- [103] Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F. ve Deschamps, A., (2002). “Edible Antimicrobial Films Based on Chitosan Matrix”, *Journal of Food Science*, 67: 1162-1169.
- [104] Çağrı, A., Üstünol, Z. ve Ryser, E. T., (2002).“Inhibition of Three Pathogens on Bologna and Summer Sausage Using Antimicrobial Edible Films”, *Journal of Food Science*, 67(6): 2317-2324.
- [105] Ayana, B., (2007).“Antimikrobiyal yenilebilir filmlerin üretimi ve özelliklerinin belirlenmesi”, Yüksek lisans tezi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Mersin, 61.

- [106] Wang, Y., Li, P., Tran, T.T.D., Zhang, J. ve Kong, L., (2016). "Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer", *Nanomaterials*, 6(2): 26.
- [107] Shepherd, R., Reader, S., ve Falshaw, A., (1997). "Chitosan Functional Properties", *Glycoconjugate Journal*, 14: 535-542.
- [108] Bostan, K., Aldemir, T. ve Aydın, A., (2007). "Kitosan ve Antimikrobiyal Etkisi", *Türk Mikrobiyal Cemiyeti Dergisi*, 37(2): 118-127.
- [109] <http://www.journalagent.com/turkhijyen>, 18.02.2016.
- [110] http://www.vanderbilt.edu/AnS/psychology/health_psychology/chitosan1.html, 03.02.2016.
- [111] Yıldız, P.O ve Yangılar F., (2014). "Kitosanın Gıda Endüstrisinde Kullanımı", *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 30(3): 198-206.
- [112] No, H.K., Kim, S.H., Lee, S.H., Park, N.Y., Lee, S.H. ve Prinyawiwatku, W., (2006). "Stability and Antibacterial Activity of Chitosan Solutions Affected by Storage Temperature and Time", *Carbohydr Polym*, 65: 174-178.
- [113] Han, L. K., Kimura, Y. ve Okuda, H., (1999). "Reduction in Fat Storage During Chitin-Chitosan Treatment in Mice Fed a High-Fat Diet", *International Journal Obesity and Related Metabolic Disorders*, 23: 174-179.
- [114] Wuolijoki, E., Hirvela, T. ve Ylitalo, P., (1999). "Decrease in LDL Cholesterol with Microcrystalline Chitosan", *Methods and Findings Experimental and Clinical Pharmacology*, 21: 357-361.
- [115] Caner, C., Vergano, P. J. ve Wiles, J. L., (1998). "Chitosan Film Mechanical and Permeation Properties as Affected by Acid, Plasticizer, and Storage", *Journal of Food Science*, 63: 1049-1053.
- [116] Quattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Begin, A. ve Holley, R.A., (2000). "Inhibition of Surface Spoilage Bacteria in Processed Meats by Application of Antimicrobial Films Prepared with Chitosan", *International Journal of Food Microbiology*, 62: 139-148.
- [117] Jeon, Y.J., Shahidi, F. ve Kim, S.K., (2000). "Preparation of Chitin and Chitosan Oligomers and Their Applications in Physiological Functional Foods", *Food Review International*, 16: 159-176.
- [118] Kurt, Ş. ve Zorba Ö., (2005). "Kitin, Kitosan ve Türevlerinin Gıdalarda Kullanım Olanakları", *Gıda yıl*, 30: 371-378, Van.
- [119] Sun, T., Yao, Q., Zhou, D. ve Mao, F., (2008). "Antioxidant Activity of N-Carboxymethyl Chitosan Oligosaccharides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*", 18: 5774-5776.
- [120] Keser, O. ve Bilal, T., (2010). "Kitosan Oligosakkaritin Hayvan Beslemede Kullanımı Antioksidan, Antimikrobiyal ve Diğer Etkileri", *Lalahan Hayvan Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 50 (1): 41-52.
- [121] Synowiecki, J., Al-khatteb, A. ve Nadia, A., (2003). "Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and its Derivatives", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43: 145-171.

- [122] Shahidi, F. ve Abuzaytoun, R., (2005). "Chitin, Chitosan, and Co-Products: Chemistry, Production, Applications and Health Effects", *Advances in Food and Nutrition Research*, 49: 93-135.
- [123] Katar D., Arslan Y., Subaşı, İ. ve Bülbül, A., (2011). Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, Ankara Ekolojik Koşullarında Sater (*Satureja hortensis* L) Bitkisinde Uçucu Yağ ve Bileşenlerinin Ontogenetik Varyabilitesinin Belirlenmesi, Ankara.
- [124] Göktürk, R.S., Sağdıç, O., Özkan, G., Ünal, O., Aksoy, A., Albayrak, S. ve Durak, M.Z., (2013). "Essential Oil Compositions and Bioactivities of *Thymus Revolutus* and *Cyclotrichium Origanifolium*", *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16(6): 795-805.
- [125] Keawchaoon, L.ve Yoksan, R., (2011). "Preparation, Characterization and in vitro Release Study of Carvacrol-Loaded Chitosan Nanoparticles", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84(1): 163-171.
- [126] Törnük, F., (2014). "Biyoaktif Madde Yüklenmiş Nanokillerle Güçlendirilmiş Aktif Ambalaj Üretimi ve Gıda Ambalajlamada Kullanımı", Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.
- [127] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. ve Berset, C., (1995). "Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity", *Lebensm Wiss Technology*, 28: 25-30.
- [128] Sanchez-Moreno, C., (2002). "Methods Used to Evaluate The Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems", *Food Science and Technology International*, 8(3): 121-137.
- [129] Padmanabhan, P. ve Jangle, S.N., (2012). "Evaluation of DPPH Radical Scavenging Activity and Reducing Power of Four Selected Medicinal Plants and Their Combinations", *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 4(2): 143-146
- [130] Byun, Y., Kim, Y.T. ve Whiteside, S., (2010). "Characterization of an Antioxidant Polylactic Acid (PLA) Film Prepared with α -Tocopherol, BHT and Polyethylene Glycol Using Film Cast Extruder", *Journal of Food Engineering*, 100(2): 239-244.
- [131] Emiroğlu Karagöz, Z., Yemiş, P., Çoşkun Kodal, B. ve Candoğan, K., (2010). "Antimicrobial Activity of Soy Edible Films Incorporated with Thyme and Oregano Essential Oils on Fresh Ground Beef Patties", *Meat Science*, 86: 283-288.
- [132] Cemeroğlu B., (2011). "Gıda Analizleri", Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No: 34, 557.
- [133] Kahyaoğlu, T. ve Kurt, A., (2014). "Characterization of a New Biodegradable Edible Film Made from Salep Glucomannan", *Carbohydrate Polymers*, 104: 50-58.
- [134] Irissin-Mangata, J., Bauduin, G., Boutevin, B. ve Gontard, N., (2001). "New Plasticizers for Wheat Gluten Films", *European Polymer Journal*, 37: 1533-1541.
- [135] Guinebretière, S., Briançon, S., Fessi, H., Teodorescu, V.S., ve Blanchin, M.G. (2002). "Nanocapsules of Biodegradable Polymers: Preparation and Characterization by Direct High Resolution Electron Microscopy", *Materials Science and Engineering*, 21(1): 137-142.

- [136] Liu, C.G., Desai, K.G.H., Chen, X.G. ve Park H.J., (2005). "Linolenic Acid-Modified Chitosan for Formation of Self-Assembled Nanoparticles", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2): 437-441.
- [137] Woranuch S. ve Yoksan, R. (2013). "Eugenol-Loaded Chitosan Nanoparticles: I. Thermal Stability Improvement of Eugenol Through Encapsulation", *Carbohydrate Polymers*, 96(2): 578-585.
- [138] De Campos, A.M., Sánchez, A., ve Alons, M.A.J., (2001). "Chitosan Nanoparticles: A New Vehicle for the Improvement of the Delivery of Drugs to the Ocular Surface. Application to cyclosporin A", *International Journal of Pharmaceutics*, 224(1): 159-168.
- [139] Lertsutthiwong, P., Rojsitthisak, P. ve Nimmannit, U., (2009). "Preparation of Turmeric Oil-Loaded Chitosan-Alginate Biopolymeric Nanocapsules", *Materials Science and Engineering*, 29(3): 856-860.
- [140] Lertsutthiwong, P., Noomun, K., Jongaroonngamsang, N., Rojsitthisak, P. ve Nimmannit, U., (2008). "Preparation of Alginate Nanocapsules Containing Turmeric Oil", *Carbohydrate Polymers*, 74(2): 209-214.
- [141] Jang, K.I. ve Lee, H.G., (2008). "Stability of Chitosan Nanoparticles For L-Ascorbic Acid During Heat Treatment in Aqueous Solution", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(6): 1936-1941.
- [142] Raafat, D., Bargaen, K.V., Haas, A. ve Sahl, H.G. (2008). "Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound", *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12): 3764-3773.
- [143] Güllüce, M., Sökmen, M., Daferera, D., Ağar, G., Özkan, H., Kartal, N. ve Şahin, F., (2003). "In vitro Antibacterial, Antifungal, and Antioxidant Activities of the Essential Oil and Methanol Extracts of Herbal Parts and Callus Cultures of *Satureja hortensis* L", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(14): 3958-3965.
- [144] Burt, S., (2004). "Essential oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods a Review", *International Journal of Food Microbiology*, 94(3): 223-253.
- [145] Momtaz, S. ve Abdollahi, M., (2010). "An Update on Pharmacology of *Satureja* species: from Antioxidant, Antimicrobial, Antidiabetes and Anti-Hyperlipidemic to Reproductive Stimulation", *International Journal of Pharmacology*, 6(4): 454-461.
- [146] Fang, R., Jing, H., Chai, Z., Zhao, G., Stoll, S., Ren, F. ve Leng, X., (2011). "Design and Characterization of Protein-Quercetin Bioactive Nanoparticles", *Journal of Nanobiotechnology*, 9(1): 19-33.
- [147] Hu, B., Ting, Y., Zeng, X. ve Huang, Q., (2013). "Bioactive Peptides/Chitosan Nanoparticles Enhance Cellular Antioxidant Activity of Epigallocatechin-3-Gallate", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(4): 875-881.
- [148] Pan, K., Luo, Y., Gan, Y., Baek, S. J. ve Zhong, Q., (2014). "pH Driven Encapsulation of Curcumin in Self-Assembled Casein Nanoparticles for Enhanced Dispersibility and Bioactivity", *Soft Matter*, 10(35): 6820-6830.

- [149] Hosseini, S.F., Zandi, M., Rezaei, M. ve Farahmandghavi, F., (2013). "Two Step Method for Encapsulation of Oregano Essential Oil in Chitosan Nanoparticles: Preparation, Characterization and in vitro Release Study", *Carbohydrate Polymers*, 95(1): 50-56.
- [150] Abreu, F.O. M.S., Oliveira, E.F., Paula, H.C.B. ve de Paula, R.C.M., (2012). "Chitosan/Cashew Gum Nanogels for Essential Oil Encapsulation", *Carbohydrate Polymers*, 89(4): 1277-1282.
- [151] Kittur, F.S., Harish Prashanth, K.V., Udaya Sankar, K., ve Tharanathan, R. N., (2002). "Characterization of Chitin, Chitosan and Their Carboxymethyl Derivatives by Differential Scanning Calorimetry", *Carbohydrate Polymers*, 49(2): 185-193.
- [152] Paula, H.C.B., Sombra, F.M., Cavalcante, R.D.F., Abreu, F.O.M.S. ve de Paula, R.C.M., (2011). "Preparation and Characterization of Chitosan/Cashew Gum Beads Loaded with Lippia Sidoides Essential Oil", *Materials Science and Engineering: C*, 31(2): 173-178.
- [153] Balau, L., Lisa, G., Popa, M.I., Tura, V. ve Melnig, V., (2004). "Physico-Chemical Properties of Chitosan Films", *Central European Journal of Chemistry*, (4): 638.
- [154] Nunthanid, J., Puttipipatkachorn, S., Yamamoto, K. ve Peck, G.E., (2001). "Physical Properties and Molecular Behavior of Chitosan Films", *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27(2): 143-57.
- [155] Pranoto, Y., Rakshit, S.K. ve Salokhe, V.M., (2005). "Physical and Antibacterial Properties of Alginate-Based Edible Film Incorporated with Garlic Oil", *Food Research International*, 38(3): 267-72.
- [156] Xiao, C., Zhang, J., Zhang, Z. ve Zhang, L., (2003). "Study of Blend Films from Chitosan and Hydroxypropyl Guar Gum", *Journal of Applied Polymer Science*, 90: 1991-5.
- [157] Dhanikula, A.B. ve Panchagnula, R., (2004). "Development and Characterization of Biodegradable Chitosan Films for Local Delivery of Paclitaxel", *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 6(3): 1-12.
- [158] Altıok, D., Altıok, E. ve Tihminlioglu, F., (2010). "Physical, Antibacterial and Antioxidant Properties of Chitosan Films Incorporated with Thyme Oil for Potential Wound Healing Applications", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21: 2227-2236.
- [159] Clarissa Dos Santos Pires, A., Soares, N.F.F., Andrade, N.J., Silva, L.H.M., Camilloto, G.P. ve Bernardes, P.C., (2008). "Development and Evaluation of Active Packaging for Sliced Mozzarella Preservation", *Packaging Technology and Science*, 21: 375-383.
- [160] López-Mata, M.A., Ruiz-Cruz, S., Silva-Beltrán, N.P., Ornelas-Paz, J.J., Zamudio-Flores, P.B. ve Burrueal-Ibarra, S.E., (2013). Physicochemical, Antimicrobial and Antioxidant Properties of Chitosan Films Incorporated with Carvacrol, *Molecules*, 18: 13735-13753.
- [161] Çoban, Ö.E. ve Patır, B., (2010). "Antioksidan Etkili Bazı Bitki ve Baharatların Gıdalarda Kullanımı", *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5(2): 7-19.

- [162] Albayrak, S., Sagdıç, O. ve Aksoy, A., (2010). “Bitkisel Ürünlerin ve Gıdaların Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler”, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 26(4): 401-409.
- [163] Jouki, M., Mortazavi, S.A., Yazdi, F.T., ve Koocheki, A., (2014). “Characterization of Antioxidant-Antibacterial Quince Seed Mucilage Films Containing Thyme Essential Oil”, Carbohydrate Polymers, 99: 537-546.
- [164] Acevedo-Fani, A., Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M.A. ve Martín-Belloso, O., (2015). “Edible Films from Essential Oil Loaded Nanoemulsions: Physicochemical Characterization and Antimicrobial Properties”, Food Hydrocolloids, 47: 168-177.
- [165] Razavi, S.M.A., Amini, A.M. ve Zahedi, Y., (2015). “Characterisation of a New Biodegradable Edible Film Based on Sage Seed Gum: Influence of Plasticiser Type and Concentration”, Food Hydrocolloids, 43: 290-298.
- [166] Abdollahi, M., Rezaei, M. ve Farzi, G., (2012). “A Novel Active Bionanocomposite Film in Incorporating Rosemary Essential Oil and Nanoclay into Chitosan”, Journal of Food Engineering, 111: 343-350.
- [167] Rubilar, J.F., Cruz, R.M.S., Silva, H.D., Vicente, A.A., Khmelinskii, I. ve Vieira, M.C., (2013). “Physico-Mechanical Properties of Chitosan Films with Carvacrol and Grape Seed Extract”, Journal of Food Engineering, 115: 466-474.
- [168] Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H. ve Hosseini, S.M.H. (2010). “Development and Essential Oil Evaluation of a Novel Biodegradable Film Made Chitosan and Cinnamon with Low Affinity Toward Water”, Food Chemistry 122: 161–166.
- [169] Klinkesorn, U. ve Namatsila, Y., (2009). “Influence of chitosan and NaCl on Physicochemical Properties of Low Acid Tuna Oil in Water Emulsions Stabilized by Non Ionic Surfactant”, Food Hydrocolloid, 23: 1374-1380.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Gizem Cansu FEYZİOĞLU
Doğum Tarihi ve Yeri : 12.01.1991 / İSTANBUL
Yabancı Dili : İNGİLİZCE
E-posta : gcfeyzioğlu@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Gıda Mühendisliği	Yıldız Teknik Üniversitesi	2016
Lisans	Gıda Mühendisliği	Namık Kemal Üniversitesi	2013
Lise	Fen Bilimleri	Akşemsettin Anadolu Lisesi	2009

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2014-2015	MİGROS	Kaliteve Hijyen Mühendisi

YAYINLARI

Makale

Feyzioğlu, G.C. and Tornuk, F., (2016). “Development of Chitosan Nanoparticles Loaded with Summer Savory (*Satureja hortensis* L.) Essential Oil for Antimicrobial and Antioxidant Delivery Applications”, LWT-Food Science and Technology, 70: 104-110.

Kongre Bildirisi

Feyzioğlu, G.C. ve Törnük, F., (2015), “*Satureja hortensis* Uçucu Yağı Yüklenmiş Kitosan Nanopartiküllerinin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi”, 18. Biyoteknoloji Kongresi, 18-19 Aralık, 2015, KONYA.