



**Yarı Mamul Taze Meyve Ve Sebzeler İçin Katmanlı Depozisyon Yöntemi İle Yeni Nesil  
İnce Yenilebilir Kaplamaların Geliştirilmesi**

**Program Kodu: 3001**

**Proje No: 114O696**

Proje Yürütücüsü:  
**Yrd. Doç. Dr. Beste Bayramoğlu**

**Bursiyer(ler):**

Sinem Üney

Nazan Koca

Ekim 2016

İZMİR



## ÖNSÖZ

Bu projenin amacı, kitozan ve sodyum kazeinat kullanılarak katmanlı depozisyon ile çok katmanlı (LbL) yenilebilir kaplamaların elde edilmesi; pH, adsorpsiyon süresi ve katman sayısı gibi parametrelerin film oluşumuna ve yapısına etkilerinin çoklu disiplinler bir yaklaşımla incelenmesidir. Film oluşumu UV-Vis spektrofotometre, yüzey plazmon rezonansı gibi tekniklerle takip edilmiş, elde edilen kaplamaların yüzey karakterizasyonu atomik kuvvet mikroskobu, taramalı elektron mikroskobu, kontak açısı, renk parametreleri ölçümleri ile gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda oksijen ve su buharı geçirgenliği ile başarılı bir şekilde elde edilen kaplamaların stabiliteleri de test edilmiştir. Çalışmalar İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü (İYTE)'de gerçekleştirilmiştir. Yüzey karakterizasyonu İYTE Malzeme Araştırma Merkezi tarafından gerçekleştirilmiştir. Proje TÜBİTAK tarafından desteklenmiş olup, proje kapsamında iki adet Yüksek Lisans tezi yürütülmüştür.

Çalışmanın yürütülmesi için gereken maddi desteği veren TÜBİTAK'a ve çalışmada kullanılan polipropilen filmleri temin eden POLİNAS'a teşekkür ederiz.

## İÇİNDEKİLER



ÖNSÖZ .....	i
TABLO LİSTESİ .....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
ÖZET .....	vi
ABSTRACT .....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ .....	1
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	6
3.1 Gereçler.....	6
3.2 Yöntem.....	7
3.2.1 Kitozan ve Sodyum Kazeinat Çözeltilerinin Hazırlanması.....	7
3.2.2 Sodyum Kazeinatın Kritik Misel Konsantrasyonunun Belirlenmesi .....	7
3.2.3 Kitozan ve Sodyum Kazeinatın Çeşitli Konsantrasyon ve pH Değerlerindeki Çözeltiler İçinde Fiziksel ve Elektriksel Özelliklerinin Belirlenmesi.....	8
3.2.4 Kitozan ve Kazein Çözeltilerinin Kırılma İndisi Tayini .....	8
3.2.5 Kuvartz ve Cam Substratların Temizlenmesi .....	9
3.2.6 Katmanlı Depozisyon Yöntemi ile LbL Kaplama Oluşturma.....	9
3.2.7 UV-Vis Spektrofotometri ile Kaplama Oluşumunun İzlenmesi.....	10
3.2.8 Yüzeysel Plazmon Rezonansı (YPR) ile Kaplama Oluşumunun İzlenmesi .....	10
3.2.9 Atomik Kuvvet Mikroskobu (AKM) ile Görüntüleme .....	11
3.2.10 Taramalı Elektron Mikroskobu (TEM) ile Görüntüleme.....	12
3.2.11 Su Buharı ve Gaz Geçirgenliği Tayini .....	12
3.2.12 Kontak Açısı Ölçümleri .....	13
3.2.13 Renk Tayini .....	13
3.2.14 Stabilite Analizi .....	13
3.2.15 İstatistiksel Analiz.....	14
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	14
4.1 Sodyum Kazeinatın Kritik Misel Konsantrasyonu .....	14
4.2 Kitozan ve Sodyum Kazeinat Çözeltilerinin Zeta Potansiyeli ve Parçacık Büyüklüğü Analizi ..	16
4.3 UV-Vis Spektrofotometri ile Katmanlı Depozisyon Deneyleri .....	23
4.3.1 Çözelti pH Değerinin Etkisi .....	24
4.3.2 Adsorpsiyon Süresinin Etkisi .....	25
4.3.3 Katman Sayısının Etkisi .....	28



4.4 YPR ile Katmanlı Depozisyon Deneyleri.....	29
4.4.1 Katmanlı Depozisyonda Adsorpsiyonun Dengeye Geldiği Sürenin YPR ile Belirlenmesi .	29
4.4.2 Farklı Adsorpsiyon Sürelerinde Katmanlı Depozisyon İşleminin 'Yerinde' İzlenmesi.....	30
4.5 AKM Analizleri .....	33
4.6 TEM Analizleri.....	43
4.7 Oksijen ve Su Buharı İletim Hızı .....	46
4.8 Kontak Açısı .....	47
4.9 Renk Tayini.....	48
4.10 Stabilite Deneyleri .....	49
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	53
6. EKLER.....	55
6.1 Kitozan ve Kazein Mono-tabakalarının Kırılma İndislerinin Belirlenmesi .....	55
6.2 YPR ile Katman Kalınlığı Hesaplamaları.....	57
7. KAYNAKLAR .....	58

## TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Sodyum kazeinatın kritik misel konsantrasyonuna (KMK) pH'ın etkisi .....	15
---	----



Tablo 2. Kitozan ve sodyum kazeinatın pH'a bağlı zeta potansiyeli ve parçacık büyüklüğü değişimi.....	17
Tablo 3. LbL kaplamaların yüzey pürüzlülüğünün katman sayısı ve adsorpsiyon süresine bağlı değişimi .....	41
Tablo 4. LbL kaplamalarda kalınlığın katman sayısı ve adsorpsiyon süresine bağlı değişimi. ....	42
Tablo 5. 10 dk adsorpsiyon süresi ile elde edilen kaplamaların oksijen ve su buharı iletim hızına katman sayısının etkisi.....	47
Tablo 6. LbL kaplamaların yüzey kontak açısına (KA) katman sayısı ve adsorpsiyon süresinin etkileri. ....	48
Tablo 7. Koronalı polipropilen (PP) üzerinde hazırlanan LbL kaplamalarda katman sayısı ve adsorpsiyon süresinin film renk parametrelerine etkisi. ....	49
Tablo 8. Kitozan ve sodyum kazeinatın spesifik kırılma indisi ( $n_D/dC$ ) ve saf (dehidre) polielektrolit katmanının kırılma indisi değerleri .....	56

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Daldırma yöntemi ile elektrostatik etkileşime dayalı katmanlı depozisyon işlemi .....	4
--	---

Şekil 2. Kondüktometrik metot ile sodyum kazeinatın pH 5,5'taki kritik misel konsantrasyonunun belirlenmesi .....	15
Şekil 3. % 0,2 (w/v) kitozan çözeltilerinde farklı pH'larda ışık şiddeti, hacim ve parçacık sayısına göre ortalama parçacık büyüklüğü dağılımları .....	20
Şekil 4. % 0,5 (w/v) kitozan çözeltilerinde farklı pH'larda ışık şiddeti, hacim ve parçacık sayısına göre ortalama parçacık büyüklüğü dağılımları. ....	21
Şekil 5. % 0,2 (w/v) sodyum kazeinat çözeltilerinde farklı pH'larda ışık şiddeti, hacim ve parçacık sayısına göre ortalama parçacık büyüklüğü dağılımları.....	22
Şekil 6. % 0,5 (w/v) sodyum kazeinat çözeltilerinde farklı pH'larda ışık şiddeti, hacim ve parçacık sayısına göre ortalama parçacık büyüklüğü dağılımları.....	23
Şekil 7. UV-Vis spektrofotometri ile pH'ın katmanlı depozisyon olayına etkisinin izlenmesi. .	25
Şekil 8. UV-Vis spektrofotometri ile farklı pH birleşimlerinde adsorpsiyon süresinin katmanlı depozisyon olayına etkisinin izlenmesi. ....	27
Şekil 9. Sabit yüzey plazmon rezonansı (YPR) açısında (71,3°) zamana bağlı yansıyan ışık şiddeti değişimi.....	30
Şekil 10. Adsorpsiyon süresinin kitozan ve sodyum kazeinatın katmanlı depozisyon olayına etkisinin yüzey plazmon rezonansı (YPR) ile izlenmesi. ....	32
Şekil 11. Kitozan ve sodyum kazeinatın farklı adsorpsiyon süreleri ile gerçekleştirilen katmanlı depozisyon olayında yüzey plazmon rezonansı (YPR) açısının (depozit edilen madde miktarının) katman sayısına göre değişimi.....	33
Şekil 12. Atomik kuvvet mikroskobu ile katman sayısı ve adsorpsiyon süresinin yüzey morfolojisine etkilerinin belirlenmesi. ....	37
Şekil 13. Sıvı ortamdaki (' <i>yerinde</i> ') atomik kuvvet mikroskobu taramaları ile katman sayısı ve adsorpsiyon süresinin yüzey morfolojisine etkilerinin belirlenmesi.....	39
Şekil 14. Havada atomik kuvvet mikroskobu taramaları ile katman kalınlıklarının çizik yöntemiyle belirlenmesi. ....	43
Şekil 15. Koronalı polipropilen film ve katmanlı depozisyon ile üzerine hazırlanan kaplamaların taramalı elektron mikroskobu ile elde edilen yüzey görüntüleri.....	44
Şekil 16. Kitozan ve kazein katmanlarının yüzey morfolojilerinin taramalı elektron mikroskobu ile karşılaştırılması.....	45
Şekil 17. Koronalı boş polipropilen (PP) film ile 10 dk adsorpsiyon süresi ile katmanlı depozisyon sonucu kaplanmış PP filmin kesit yüzeylerinin taramalı elektron mikroskobu ile karşılaştırılması. ....	46
Şekil 18. Katman sayısı ve üst katman çeşidinin % 93 bağıl nemde oda sıcaklığında (25 <sup>0</sup> C) saklanan kaplamaların yüzey morfolojileri üzerindeki zamana bağlı etkileri.....	50
Şekil 19. Suda bekletilen LbL kaplamalarda zamanla suda çözünmeye bağlı kayıpların UV-Vis spektrofotometre ile takibi. ....	52



Şekil 20. Katman sayısı ve üst katman çeşidinin suda 15 gün boyunca bekletilen LbL kaplamaların yüzey morfolojileri üzerindeki zamana bağlı etkilerinin taramalı elektron mikroskobu ile analizi .....	53
Şekil 21. Kitozan ve sodyum kazeinat çözeltilerinin konsantrasyona bağlı kırılma indisi değişimleri.....	56
Şekil 22. Cr+Au+SiO <sub>2</sub> kaplı YPR sensörünün a) saf su ve b) etanoldeki taramaları ile elde edilen yüzey plazmon rezonansı (YPR) eğrilerinin Fresnel eşitliklerine uydurulması ile hesaplanan katman kalınlıkları.....	58

## ÖZET

Bu çalışmanın amacı kitozan ve sodyum kazeinat kullanılarak katmanlı depozisyon ile çok katmanlı (LbL) yenilebilir kaplamaların elde edilmesidir. pH, adsorpsiyon süresi ve katman sayısının film oluşumuna etkileri incelenmiştir. Film oluşumu UV-Vis spektrofotometre ve yüzey plazmon rezonansı (YPR) ile '*yerinde*' takip edilmiştir. Sonuçlar, LbL kaplama oluşumunun sadece her iki polielektrolitin de ortalama yük yoğunluğuna sahip olduğu pH birleşiminde (5,5-5,5) gerçekleştiğini göstermiştir.



UV-Vis spektrofotometre ve YPR analizleri, kaplama oluşumunun adsorpsiyon süresine bağlı olarak farklı geliştiğini göstermiştir. Kaplamaların yüzey morfolojileri atomik kuvvet mikroskobu (AKM) ve taramalı elektron mikroskobu (TEM) ile incelenmiştir. Tüm sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde, kitozan ve kazein moleküllerinin katmanlar arası/içi difüzyonu ile meydana gelen tümleşik yapıların yüzeyde satürasyona neden olduğu, bu durumun işlemin sekteye uğramasına sebep olduğu anlaşılmaktadır. 2 dk daldırma süresinin adsorpsiyonun dengeye gelmesi için yeterli olmaması sebebiyle, katman sayısından bağımsız olarak fasıllı kaplamalar elde edildiği; 10 dk adsorpsiyon süresi ile 12. katmana doğru işlem devam ettikçe çıplak alanların da doldurularak daha homojen ve fasılasız filmler elde edildiği belirlenmiştir. Ancak, yüzey satürasyonu dolayısıyla film kalınlığında artış gözlemlenememiştir.

AKM analizleri depozisyon adımları arası kurutma işleminin daha pürüzlü yüzeylerin oluşmasına sebep olduğunu göstermiştir. 10 dk adsorpsiyon süresi ile 2 dk'ya göre daha homojen ve fasılasız, ancak daha pürüzlü katmanlar elde edildiği görülmüştür.

Elde edilen LbL kaplamaların (~250 nm) koronalı polipropilenin su buharı ve oksijen bariyer özelliğinde iyileştirme gerçekleştirmediği belirlenmiştir. Renk ölçümleri ile saydam ve renksiz kaplamalar elde edildiği, kontak açısı ölçümleri ile de hidrofobik yüzeyler oluşturulduğu belirlenmiştir.

Başarılı bir şekilde elde edilen kaplamaların stabilitesi test edilmiştir. Depolama veya nakliye sırasında (% 93 bağıl nemde) uygun sıcaklık koşullarının sağlanamaması durumunda kaplamaların mikro-yapısında herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir. Ancak, oda sıcaklığında suda 15 gün boyunca bekletilen kaplamaların yüzeyinde zamana bağlı olarak gelişen bir erozyon tespit edilmiştir. Bu erozyonu önlemek, daha kalın ve gaz geçirgenliği düşük kaplamalar elde etmek için çapraz bağlayıcı ajanların kullanımı düşünülebilir.

**Anahtar kelimeler:** Katmanlı depozisyon, çok katmanlı filmler, yenilebilir kaplamalar, yarı mamul taze meyve ve sebzeler

## ABSTRACT

The aim of this project is to develop multilayered edible coatings from chitosan and sodium caseinate by Layer-by-Layer (LbL) assembly. The effects of pH, adsorption time and number of layers on multilayer formation were investigated. Film formation was monitored by UV-Vis spectrophotometry and surface plasmon resonance (SPR) *in situ*. The results indicate a successful LbL coating formation only for the pH combination 5,5-5,5, where both polyelectrolytes possess medium charge densities.





The surface morphology of the layers were examined by atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM). All results, when evaluated together, suggest that inter-/intra-diffusion of chitosan and casein molecules during the deposition process eventually results in a saturation at the surface, which causes an interruption of LbL assembly. It was determined that 2 min adsorption time was not sufficient to fabricate uniform and continuous layers, but 10 min adsorption time was as the process was continued up to 12 layers. Nevertheless, there have not been observed any increase in the thickness due to surface saturation. AFM results showed that drying inbetween deposition steps produces rougher surfaces. The coatings fabricated with 10 min adsorption time were found to be continuous, more homogeneous, but rougher compared to those fabricated with 2 min.

No improvement in the gas barrier properties of coronated polypropylene was observed due the application LbL coatings (~250 nm). Color measurements showed that the coatings were transparent and colorless. Contact angle measurements indicated the formation of hydrophobic layers especially due to chitosan.

The stability of the coatings were also tested. No apparent difference in the microstructure of the layers was found when stored at % 93 relative humidity and 25<sup>0</sup>C. However, when they were kept in water at 25<sup>0</sup>C for 15 days, a time dependent erosion of surface was observed. Use of crosslinkers might help to prevent this erosion.

**Keywords:** Layer-by-Layer assembly, multilayered films, edible coatings, minimally processed fresh fruits and vegetables



## 1. GİRİŞ

Çağımızın getirdiği hızlı yaşam tarzı ve beslenme alışkanlıklarının yön değiştirmesi nedeniyle, günümüzde minimal işlem görmüş taze meyve ve sebzelerin tüketimine olan talep gittikçe artmaktadır. Buna paralel olarak, raf ömrü işlenmemiş taze ürünlere nazaran çok daha az olan bu tür gıdaların raf stabilitesini korumaya yönelik çalışmalar da hız kazanmıştır. Ancak, elde edilen veriler henüz tamamıyla etkin bir çözüm bulunamadığını göstermektedir. Yarı mamul taze meyve ve sebzelerin tazeliğini korumada modifiye atmosfer paketlemenin tek başına yeterli olmadığı, uygulamaya destekleyici olarak kullanılan yenilebilir film ve kaplamaların da ürün üzerinde bazı istenmeyen duyuusal etkilere yol açabildiği görülmüştür. Bu tür istenmeyen etkileri minimize etmenin bir yolu çok ince, fakat işlevselliğini koruyan yenilebilir kaplamalar üretmek olabilir. Bir 'tabandan yukarıya' nano-fabrikasyon tekniği olan ve iki veya daha çok çeşit maddenin fizikokimyasal etkileşimleri sonucu birbirleri üzerine ardışık olarak tutunmalarına dayanan katmanlı depozisyon, bu hedef için umut vaat edici bir yöntemdir.

Bu çalışmada, kitozan ve sodyum kazeinat kullanılarak katmanlı depozisyon ile çok katmanlı (LbL) yenilebilir kaplamaların elde edilmesi hedeflenmiştir. pH, adsorpsiyon süresi ve katman sayısının film oluşumuna ve yapısına etkileri incelenmiştir. Çok katmanlı bir yenilebilir kaplamanın işlevselliğinde kimyasının yanında yapısının da etkili olacağı gerçeğini göz önünde bulundurarak, elde edilen kaplamalarda 'yapı-işlev' ilişkisinin farklı tekniklerle, çoklu disiplinler bir yaklaşımla araştırılması hedeflenmiştir.

Kitozan ve kazeinden katmanlı depozisyon işlemi ile yenilebilir kaplama oluşumu ve elde edilen ürünlerin özelliklerinin sistematik bir biçimde incelendiği çalışma, 3 ana kısımdan oluşmaktadır. İlk kısımda kitozan ve kazeinin çeşitli konsantrasyon ve pH değerlerindeki seyreltik çözeltilerde sahip oldukları zeta potansiyeli ve ortalama hidrodinamik çapı ölçümleri gerçekleştirilmiş, burada edinilen veriler doğrultusunda belirlenen uygun değerlerle ikinci kısımda yer alan katmanlı depozisyon deneylerine geçilmiştir. Son olarak, başarılı bir şekilde oluşturulan çok katmanlı yapılar kapsamlı bir biçimde karakterize edilmiştir.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Taze meyve ve sebzeler hasat edildikten sonra zamanla fizyolojik ve biyokimyasal bozunmaya uğrayarak tazeliklerini yitirirler. Bozunma, özellikle minimal işlem (yıkama, soyma, kesme, dilimleme vb. gibi) gören -yarı mamul- meyve ve sebzeler için daha yüksek bir hızda gerçekleşir. Bunun nedeni, dokuların mikrobiyal saldırıya karşı savunmasız bırakılmalarının yanı sıra, mekanik işlemde geçen üründe meydana gelen yaralanmaların, taze meyve ve sebzelerin raf ömrüyle ters orantılı ilişkide olduğu bilinen solunum, terleme ve



bazı kimyasal reaksiyonların hızlarını arttırmasıdır. Sonuç olarak üründe esmerleşme, su kaybı ile meydana gelen büzüşme, yumuşama, saydamlaşma, pigmentlerin oksidasyonu ve bozunması, yüzey dehidrasyonuna bağlı beyazlama ve/veya kötü tat ve koku oluşumu gibi istenmeyen değişimler görülebilir. Bu tür reaksiyonların hızını düşürmenin bir yolu ürünün bulunduğu ortamdaki havanın bileşimini değiştirmekten geçer. Düşük oksijen (%1-5) ve yüksek karbon dioksit (%5-10) oranlarına sahip bir ortamda ürünün solunumuyla birlikte dokularda meydana gelen diğer biyokimyasal olaylar da yavaşlar. Aynı zamanda, bazı mikroorganizmaların taze sebze ve meyvelerin yüzeyinde büyümeleri kontrol altına alınabilir (Rojas-Graü vd., 2009). Böylece ürünün bozunmaya başlaması bir süre ertelenebilir. Ürünü çevreleyen ortamın pasif veya aktif olarak bu şekilde değiştirilmesi *modifiye atmosfer paketleme (MAP)* ile mümkündür. Bu yöntemde çoğunlukla kullanılan plastik film çeşitleri polivinil klorür, polietilen, propilen ve polistrendir. Modifiye atmosfer paketlemenin taze meyve ve sebzelerin kalite parametreleri üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalar literatürde oldukça geniş yer tutmaktadır (Jacobsson vd., 2004; Artes-Hernandez vd., 2006; Beaudry, 2000; Charles vd., 2003; Church ve Parsons, 1995; Geesan vd., 1985; Tano vd., 2007; Kader vd., 1989; Mangaraj vd., 2009; Caleb vd., 2011). Günümüzde birçok işlenmemiş taze meyve ve sebze ve sadece birkaç çeşit yarı mamul sebze için başarılı ticari uygulamaları mevcut olan modifiye atmosfer paketleme yöntemi, ne yazık ki aynı başarıyı minimal işlem görmüş taze ürünlerde, özellikle yarı mamul taze meyvelerde gösterememiştir (Al-Ati ve Hotchkiss, 2002). Bunun nedenleri, bu ürünlerdeki yüksek fenolik madde miktarı, mekanik işlemlerle dokularda meydana gelen yaralanmaların bozunmayı tetiklemesi ve artan bozunma hızını kontrol altında tutmada mevcut MAP sistemlerin tek başına yeterli olmamaları olarak sayılabilir. Paketlemede kullanılan polimerik filmlerin yapıları nedeniyle seçici geçirgenlik özelliğinden yoksun olmaları en önemli etkenlerden biridir. Dolayısıyla, yarı mamul meyve ve sebzelerin tazeliklerinin korunması için genellikle yardımcı bir yöntemden daha yararlanması önerilmektedir (Rojas-Graü vd., 2009). Etkili seçeneklerden biri yenilebilir film ve kaplamalardır.

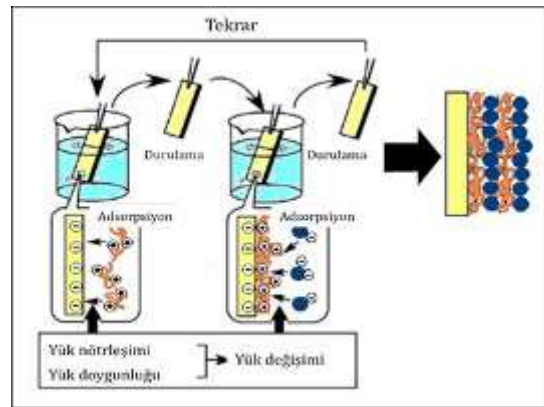
Yenilebilir film ve kaplamalar tarımsal kökenli, doğal ve biyolojik olarak geri dönüşümlü maddelerden yapılan, böylece çevrenin korunmasına katkıda bulunan, hem gıdayı mekanik etkilere ve çeşitli bozunma mekanizmalarına karşı dirençli tutmaya yardımcı bir paket hem de gıda bileşeni görevi üstlenen yenilebilir ambalajlar olarak tanımlanabilir (T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, 2009). Aynı zamanda, bünyesinde çeşitli aroma bileşikleri, antioksidantlar, antimikrobiyal maddeler, mineral ve vitaminlerin de tutunmasına olanak verdiğinden, sadece uygulandıkları gıdanın raf stabilitesini ve güvenliğini sağlamakta değil, gıdaya işlevsellik katmakta da etkili olabilirler. Dolayısıyla, yenilebilir film ve kaplamalar, MAP'a hem yardımcı hem de alternatif bir yöntem olarak kullanılabilirler. Ancak, yapımında kullanılan biyopolimerlerin doğasından kaynaklı olarak *kısmi* su buharı bariyer özelliğine sahip



olmalarından, yükleme, boşaltma ve nakliye sırasında hasarı önleme gerekliliğinden ve en önemlisi hijyenik sebeplerden ötürü, yenilebilir film ve kaplamaların gıdalarda kullanımı mutlaka takviye ambalajlama gerektirir (Debeaufort vd., 1998).

Günümüzde pek çok taze meyve ve sebze ürünlerinde kullanılmakta olan yenilebilir kaplamaların minimal işlem görmüş taze meyve ve sebzelerde etkinliklerinin araştırılması yaklaşık 40 sene öncesine dayanmaktadır. 1972'de Bryan'ın ikiye bölünmüş greyfurt meyvelerini greyfurt suyu içinde dağılmış düşük metoksilli pektin ve keçiyoynuzu zamkı karışımı ile kaplama yönteminin patenti ilk kayıt altına alınmış örneklerden biridir (Bryan, 1972). Bu tarihten beri, çeşitli polisakkaritler, proteinler, yağlar, mumlar, antimikrobiyal ve antioksidant maddeler, mineraller ve bunların farklı birleşimleri ile elde edilen yenilebilir kaplamaların yarı mamul meyve ve sebzelerde solunum hızını yavaşlatma (Wong vd., 1994; Lee vd., 2003), su kaybını azaltma (Wong vd., 1994; Pavlath vd., 1993), aroma kaybını azaltma (Olivas vd., 2003), mikrobiyal bozunmaya karşı direncini arttırma (Baldwin vd., 1996; Roller ve Seedhar, 2002), oksidasyon tepkimelerine bağlı bozunmayı geriletme (Perez-Gago vd., 2006; Tien vd., 2001), rengi koruma (Baldwin vd., 1996; Lee vd., 2003; Pavlavth vd., 1993; Perez-Gago vd., 2006) gibi hususlarda yardımcı olduğunu gösteren pek çok çalışma yürütülmüştür. Ancak, geleneksel yöntemlerle elde edilen yenilebilir kaplamaların yarı mamul taze meyve ve sebzelerde kullanımını sınırlayan bazı yönleri söz konusu olabilir. Bunlardan biri, kaplamaların yapımında kullanılan bazı maddelerin uygulandıkları ürünün rengi, kokusu, tadı ve görünümü gibi duyuşsal özellikleri üzerinde istenmeyen etkiler yaratmalarıdır, ki bu durumun tüketicinin tercihini olumsuz yönde etkileyeceği aşıkardır. Örneğın, yapımında bazı plastikleştiriciler, yağ asitleri, esansiyel yağlar ve antioksidantların kullanıldığı yenilebilir kaplamaların uygulandıkları üründe istenmeyen tat ve/veya kokulara sebep olduğu tespit edilmiştir (Burt, 2004; Rojas-Graü vd., 2006; Vargas vd., 2006). Bir diğerk olumsuz etki ise, kalın bir yenilebilir kaplamanın taze meyve veya sebzenin dış ortamla olan gaz alışverişini fazlaca sınırlayarak üründe oksijensiz solunuma neden olması ve böylece istenmeyen tat ve kokuların oluşması şeklinde görülebilir (Cisneros-Zevallos ve Krochta, 2003). Bu tür istenmeyen etkileri minimize etmenin bir yolu çok ince (nano ölçekte) yenilebilir kaplamalar üretmek olabilir. Ancak, mevcut yöntemlerle bu ölçekte kontrollü bir şekilde yenilebilir kaplama üretimi ve gıdaya uygulanması mümkün görünmemektedir. Yenilebilir kaplama oluşumunda kullanılan geleneksel yöntemler daldırma, püskürtme, fırça ile sürme (ve takiben kurutma) olarak sıralanabilir (Dhall, 2013). Bu tekniklerle gıdaya uygulanan kaplamanın kalınlığı ve homojenliği büyük ölçüde kullanılan çözeltinin akışkanlığına bağlıdır. Diğerk yandan, çok ince bir yenilebilir kaplamanın oldukça düşük olacağı tahmin edilen gaz bariyer özelliğinin, uygulanacağı taze meyve ve sebzenin raf stabilitesini sağlamada yeterli olup olmayacağı bir soru işareti oluşturabilir. Ancak, bu sorunun üstesinden çok katmanlı yapılar sayesinde gelinebilir. Zira, düşük molekül ağırlığına sahip bileşenlerin çok fazlı polimer

karışımları içerisinde taşınımalarının modellenmesi ile taşınım yönüne dik açıda dizilmiş çok katmanlı bir yapının teorik olarak kompozit bir yapıya göre çok daha iyi bariyer özelliklerine sahip olacağı gösterilmiş, bu bulgu deneysel çalışmalarla da desteklenmiştir (Paul ve Bucknall, 1999; Lagaron vd., 2003). Dolayısıyla, çok ince, homojen ve yeterli düzeyde gaz bariyer özelliğine sahip bir yenilebilir kaplama üretimi için, kaplamanın morfolojisi (ve böylece işlevselliği) üzerinde yeterli kontrol sağlayabilecek yeni tekniklere ihtiyaç olduğu açıktır. Nanoteknoloji alanında son 20 yıldır yaygın olarak kullanılan katmanlı depozisyon (Layer-by-layer Deposition/Assembly (LbL)) yöntemi bu hedef için umut vaat edici bir tekniktir. Bir 'öztoplaşım' (self-assembly) yöntemi olan katmanlı depozisyon, iki veya daha çok çeşit maddenin (polimerler, nanoparçacıklar, moleküller, nanotüpler, miseller, vs.) fizikokimyasal etkileşimleri (elektrostatik, hidrofobik, hidrojen bağları, vs.) sonucu birbirleri üzerine ardışık olarak tutunmalarına (adsorpsiyon) dayanır ve bu nedenle 'tabandan yukarıya' nanofabrikasyon metodu olarak sınıflandırılır (Ariga vd., 2007). En yaygın olarak zıt yüklü polielektrolitlerin birbirleri ile elektrostatik etkileşimlerine dayanarak gerçekleştirilen katmanlı depozisyon işlemi Şekil-1'de gösterilmektedir. Özetle, belli bir yüzey yüküne sahip substrat karşıt yüklü polielektrolitin seyreltik çözeltisine daldırılır ve polielektrolitin adsorpsiyonu için bekletilir. Yüzeyde biriken fazla polielektrolitin uzaklaştırılması için substrat saf suda durulanır. Ardından, yüzey yükü değişmiş substrat karşıt yüklü diğer polielektrolit çözeltisine daldırılarak sonraki katmanın oluşumu sağlanır. Yüzeydeki fazla birikim durulama aşamasıyla uzaklaştırılır. Döngüsel olarak tekrar edilen bu işlem ile arzu edilen katman sayısına sahip çok katmanlı filmler/kaplamalar elde edilebilir.



**Şekil 1.** Daldırma yöntemi ile elektrostatik etkileşime dayalı katmanlı depozisyon işlemi. Ariga vd. (2007)'den alınarak modifiye edilmiştir.

Uygulamadaki kolaylığı, masrafsız ve çevreye zararsız bir işlem olması, birçok yüzeye (düzlemsel, silindirik, küresel, vs.) uygulanabilirliği, film yapısına çok çeşitli malzemelerin dahil edilmesine olanak sağlaması ve film kalınlığı ve morfolojisi üzerinde sağladığı yüksek kontrol gibi avantajlarından dolayı, katmanlı depozisyon işlemi, 1991'de Decher vd.'nin



tanıtımından beri, elektriksel, optik, biyomedikal, membran cihazları gibi pek çok alandaki uygulamalarda araştırma konusu olarak yer almıştır (Yoo vd., 2008). Buna karşılık, gıda bilimi ve teknolojisi uygulamalarındaki araştırmalar oldukça yenidir. 2000'li yılların başlarından itibaren gıda alanında çoğunlukla enkapsülasyon (Priya vd., 2011; Klinkesorn vd., 2005) ve emülsiyon sistemlerinin stabilizasyonu (Jourdain vd., 2008; Ogawa vd., 2003) çalışmalarında yararlanılan katmanlı depozisyon işlemi, son yıllarda gıda paketlenme ve yenilebilir kaplama çalışmalarında da yer almaya başlamıştır. Sentetik paketlenme malzemeleri üzerindeki katmanlı depozisyon çalışmalarına bakıldığında, genellikle polipropilen (PP), polistiren (PS) veya polietilen tereftalat (PET) filmlerin gaz bariyer özelliklerini geliştirmeye yönelik denemeler yapıldığı görülmektedir (Pinheiro vd., 2012; Gu vd., 2013; Holder vd., 2012; Laufer vd., 2012; Laufer vd., 2013; Li vd., 2013; Priolo vd., 2010; Jang vd., 2008). Bunların dışında, antimikrobiyal gibi işlevsel (Elsabee vd., 2008) ve biyoaktif (biyokatalitik (Wong vd., 2013)) paketlenme malzemesi geliştirmeye yönelik birkaç deneme de mevcuttur. Ancak elde edilen ürünlerin gıda üzerindeki denemelerinin henüz başlangıç aşamasında olduğu anlaşılmaktadır. Bilindiği kadarıyla, kitozan, kil ve karagenandan elde edilen bir LbL kaplamanın direk olarak uygulaması yalnızca kabuklu muz üzerinde mevcuttur (Laufer vd., 2013). Yüzeyi modifiye sentetik paket malzemelerinin etkinliği ise taze domates üzerinde uygulanarak araştırılmıştır. Kitozan ve pektinden elde edilen LbL kaplama ile iç yüzeyi modifiye edilen PP paket malzemesinin antibakteriyel ve antifungal özellikler gösterdiği ve paket içinde muhafaza edilen domateslerin raf stabilitesinde belirgin bir iyileşme olduğu görülmüştür (Elsabee vd., 2008).

Katmanlı depozisyon ile yenilebilir kaplama geliştirme çalışmalarına bakıldığında ise, literatürde oldukça az sayıda rapor olduğu farkedilmektedir. Önceleri protein veya polisakkaritler kullanılarak farklı koşullarda LbL kaplama oluşumunun denenmesi ve elde edilen kaplamaların karakterizasyonuna yönelik araştırmalar yapıldığı görülmektedir (Rudra vd., 2006; Bayramoglu ve Stroeve, 2010; Carneiro-da-Cunha vd., 2010; Pinheiro vd., 2012). Taze ürünlerdeki uygulamaları ise henüz çok yenidir. Bu uygulamaların özellikle yarı mamul taze meyvelerde gerçekleştirilmiş olmasının tesadüf olmadığı, günümüzde bu tür gıdalara karşı artmakta olan talep göz önünde bulundurulduğunda daha iyi anlaşılmaktadır. Bilindiği kadarıyla, şimdide dek dilimlenmiş armut (Medeiros vd., 2011), mango (Medeiros vd., 2012; Souza vd., 2015), papaya (Brasil vd., 2012), ananas (Mantilla vd., 2013), karpuz (Sipahi vd., 2013), kavun (Moreira vd., 2014; Poverenov vd., (2013, 2014)), kantalu kavunu (Martíñon vd., 2014) üzerinde denemeleri yapılan genellikle polisakkarit bazlı yenilebilir LbL kaplamalar ile umut vaat edici sonuçlar elde edilmiştir. Ancak bu çalışmalarda, elde edilen çok katmanlı yapıların bütüncül bir karakterizasyonunun eksikliği dikkat çekmektedir. Bir çoğunda kaplamaların yapısal özelliklerinin ikinci plana atıldığı ve sadece uygulandıkları meyvenin kalite parametreleri baz alınarak yarı mamul ürünün raf ömrü üzerindeki etkilerinin





incelendiği görülmektedir. Medeiros vd. (2012)'nin çalışmalarında elde edilen kaplamaların kalınlık ve gaz geçirgenlikleri üzerinde durulmuş olsa da, daha geniş kapsamlı ve yüksek çözünürlükte bir karakterizasyonun eksikliği göze çarpmaktadır. Böylesi bir çok katmanlı yapıda, 'yapı - işlev' ilişkisinin etkin biçimde anlaşılabilmesi için, her katmanda yüksek çözünürlükte karakterizasyona, bunun için de günümüzde nanoteknolojinin sunduğu farklı yöntemlere ihtiyaç duyulduğu açıktır. Dikkat çeken bir diğer nokta ise, -mevcut çalışmaların sayısının azlığıyla da ilişkili olarak- çoğunlukla sadece polisakkaritlerden yararlanılmış olması ve bu sebeple kaplamaların su buharı bariyer ve mekanik özelliklerinde arzu edilen iyileşmenin elde edilememiş olmasıdır. Oysa, daha önce çeşitli proteinler, polisakkaritler ve yağların karışımlarından oluşturulan 'kompozit' film ve kaplamalarla hem gaz geçirgenliği hem de mekanik dayanıklılığı bakımından daha verimli sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Dolayısıyla, bugün gelinen noktada, daha çok çeşit doğal yenilebilir malzeme ile farklı yapılarda kaplamaların denenmesi suretiyle mevcut çalışmaların sayısının artırılması gerekliliği aşikardır. Araştırmalardan yüksek faydada sonuçlar elde etmek için ise, 'yapı-işlev' ilişkisinin çoklu disiplinler bir yaklaşımla incelenmesi zaruridir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Gereçler

Deneylerde orta molekül ağırlığına sahip, % 81 deasetile edilmiş kitozan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) ve sığır sütünden elde edilmiş sodyum kazeinat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) kullanılmıştır. Kitozan çözeltilerinin hazırlanmasında asetik asit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) kullanılmış, çözeltilerin pH değerlerinin ayarlanması uygun molaritedeki NaOH ve HCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) solüsyonları ile gerçekleştirilmiştir.

Üzerinde katmanlı depozisyonun gerçekleştirildiği substratlar, UV-Vis spektrometre için kuvarz lamlar (50 x 25 x 1 mm, Lightpath Optical, Birleşik Krallık), yüzey plazmon rezonansı (YPR) deneyleri için üzeri Cr+Au+SiO<sub>2</sub> kaplı özel sensörler (Bionavis, Finlandiya), atomik kuvvet mikroskobu analizleri için cam lamlar (Marienfeld, Almanya) ve diğer tüm analizler için koronalı polipropilen (PP) filmlerdir (Polinas Plastik Sanayi ve Ticaret A.Ş., Manisa). Cam ve kuvarz substratlar ile kuvarz küvetlerin temizliği için % 2 (v/v)'lik Hellmanex III (Fluka, Almanya) çözeltisi ve saf etanol (Merck Millipore, Almanya) kullanılmıştır. Temizlenen substratlar saf azot gazı (Güneş Sınai Gazlar İmalat ve Tic. A.Ş., Türkiye) ile kurutularak temiz bir kaptaki saklanmıştır.

Elde edilen LbL kaplamalar birçok analiz öncesinde içerisinde silika jel granülleri (BDH, VWR Chemicals, Belçika) bulunan desikatörlerde % 0 bağıl nemde kurutma işlemine tabi



tutulmuştur. Stabilité deneylerinde % 93 bağıl nemi sağlamak içinse doymuş potasyum nitrat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) çözeltisi kullanılmıştır.

Atomik kuvvet mikroskobu deneylerinde sıvı ortamdaki taramalarda Scanasyt-Fluid + probu (Bruker, Almanya), hava ortamındaki taramalarda ise Rtespa probu (Bruker, Almanya) kullanılmıştır.

## **3.2 Yöntem**

### **3.2.1 Kitozan ve Sodyum Kazeinat Çözeltilerinin Hazırlanması**

Bu çalışmada kitozan çözeltileri %1 (v/v)'lik asetik asit çözeltisi içerisinde % 0,2 ve % 0,5 (w/v) konsantrasyonlarında oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı yardımıyla (250 rpm, 4-24 saat) hazırlanmıştır. Çözeltilerin arzu edilen pH değerlerine (3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5) ayarlanması uygun miktardaki 5 M HCl veya 5 M NaOH solüsyonları ile gerçekleştirilmiştir. Sodyum kazeinat çözeltileri ultra saf suda (18 mΩ, Milli-Q Ultrasaf Su Sistemi, Millipore) % 0,2 ve % 0,5 (w/v) konsantrasyonlarında oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı yardımıyla (250 rpm, 4-24 saat) hazırlanmıştır. Çözeltilerin arzu edilen pH değerlerine (5,5; 6, 7, 8) ayarlanması uygun miktardaki 1 M HCl veya 1 M NaOH solüsyonları ile gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.2 Sodyum Kazeinatın Kritik Misel Konsantrasyonunun Belirlenmesi**

Sodyum kazeinat iyonik yüzey aktif bir maddedir ve belirli bir konsantrasyonun (kritik misel konsantrasyonu) üzerindeki çözeltilerde misel yapılar oluşturur. Projede hedef katmanlı depozisyon işleminin sodyum kazeinatın misel oluşturmadığı konsantrasyonlarda yapılması olduğundan, öncelikle sodyum kazeinatın kritik misel konsantrasyonunun (KMK) tayini gerçekleştirilmiştir. Bunun için kondüktometrik metottan yararlanılmıştır. Ölçümler soğutmalı su banyosu (J1154OS – Termal, Türkiye) içerisinde, Hanna Instruments EC 215 iletkenlik ölçer cihazı (Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak şu şekilde yapılmıştır: % 4 (w/v) olarak hazırlanan sodyum kazeinat çözeltisine ardışık olarak % 0,2 değerinde seyreltme işlemi uygulanarak, elde edilen 20 değer noktasındaki iletkenlik değerleri ölçülmüştür. Ölçümler sırasında sıcaklık, soğutmalı su banyosu yardımıyla 22°C ±0.2'de sabit tutulmuş ve her ölçüm öncesinde termometre ile sıcaklık kontrolü yapılmıştır. Sodyum kazeinatın kritik misel konsantrasyonu pH değerine bağlı olarak değişim gösterebileceğinden, çalışılacak her pH değerinde (5,5, 6, 7, 8) ayrı tayin yapılmıştır. Her numune 2 ayrı tekrar halinde hazırlanmış, elde edilen 2 verinin aritmetik ortalaması sonuç olarak kabul edilmiştir. Elde edilen iletkenlik (K)- konsantrasyon (C) verilerinden iletkenliğin konsantrasyona oranı (K/C) ve karekök





konsantrasyon ( $C^{1/2}$ ) deęerleri hesaplatılmıř, elde edilen grafiklerde dūřuk konsantrasyon deęerlerinden yūksek konsantrasyon deęerlerine geçiřte gōzlemlenen kırılma noktası (sodyum kazeinatın KMK'sı) ilgili deęerlerin basit doęrusal regresyonu eřitliklerinin keřiřtięi nokta olarak tespit edilmiřtir.

### 3.2.3 Kitozan ve Sodyum Kazeinatın eşitli Konsantrasyon ve pH Değerlerindeki ōzelti ler İçinde Fiziksel ve Elektriksel Özelliklerinin Belirlenmesi

Polielektrolitlerin ōzelti ler içerisindeki davranıřlarını ve dolayısıyla katmanlı depozisyon iřleminin seyrini belirleyen en Őnemli faktōrlerden biri ōzelti içerisindeki zeta potansiyeli deęeri, bir dięeri ise parçacık bōyūklūęüdür. Bu nedenle, bu çalıřmada kitozan için % 0,2 ve % 0,5 (w/v) konsantrasyonlarında 6 farklı pH (3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5)'de, kazein için ise, % 0,2 ve % 0,5 (w/v) konsantrasyonlarında 4 farklı pH (5,5, 6, 7, 8)'de zeta potansiyel ve ortalama hidrodinamik ap Őlūmleri parçacık bōyūklūk ve zeta potansiyel Őlūm sistemi (Zetasizer Nano-ZS, Birleřik Krallık) kullanılarak gerçekleřtirilmiřtir. Cihaz, parçacık bōyūklūęūnū, dinamik iřık saçılımı iřlemi ile Őltūęū parçacık Brown hareketinden yola çıkarak Stokes-Einstein denklięi (Eřitlik 1) aracılıęıyla hesaplar. Zeta potansiyelini ise, numuneye uygulanan elektroforez iřlemi sonucunda, Őlūmlerini Lazer Doppler HızŐler prensibiyle gerçekleřtirdięi elektroforetik hareketlilięinden (parçacık hızından), Henry denklięi (Eřitlik 2) aracılıęıyla hesaplar.

$$D = kT/6\pi\eta R_h \quad (1)$$

$$U_E = 2\epsilon z f(Ka)/3\eta \quad (2)$$

Burada D, difūzyon katsayısı; k, Boltzmann katsayısı ( $1.38 \times 10^{-23}$  JK<sup>-1</sup>); T, sıcaklık;  $\eta$ , dinamik viskozite;  $R_h$ , hidrodinamik yarıçap;  $U_E$ , elektroforetik hareketlilik;  $\epsilon$ , dielektrik katsayısı; z, zeta potansiyeli ve f(Ka) ise, Henry fonksiyonudur.

Hazırlanan ōzelti ler 0,45  $\mu$ m gōzenek çaplı selūloz asetat şırınga filtresinden (Isolab, Almanya) geçirilerek Őzel kōvetlere aktarılmıştır. Her numune 2 ayrı tekrar halinde, standart sapmaların yūksek çıkması durumunda ise 4 tekrar halinde hazırlanmıştır. Her numune için 3 Őlūm yapılmış, dolayısıyla sonuçlar elde edilen 6 (veya 12) değerin ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

### 3.2.4 Kitozan ve Kazein ōzelti lerinin Kırılma İndisi Tayini



Bu kısımda, Yüzey Plazmon Rezonansı (YPR) verilerinden katman kalınlığı bilgisinin elde edilebilmesi için gerekli olan, kitozan ve kazein çözeltilerinin konsantrasyona bağlı kırılma indisi değişimlerinin ( $dn/dC$ ) belirlenmesi hedeflenmiştir. Ölçümler Mettler Toledo RE50 refraktometre (Ohio, ABD) ile şu şekilde gerçekleştirilmiştir. Olabildiğince yüksek konsantrasyonlarda hazırlanan kitozan (%2 (w/v)) ve kazein (% 10 (w/v)) stok çözeltileri ardışık olarak seyreltilerek, her seyreltmede kırılma indisi ölçümü alınmıştır. Ölçümler 3 tekrar halinde gerçekleştirilmiştir. Her iki polielektrolit için ayrı ayrı kırılma indisi-konsantrasyon grafiği çizdirilmiş ve elde edilen doğruların lineer regresyonu ile  $dn/dC$  değerleri hesaplanmıştır.

Polielektrolitlerin çözelti içerisinde tamamiyle çözünmelerini sağlamak adına solüsyonlar manyetik karıştırıcıda 24 saat karışıma bırakılarak hazırlanmıştır. % 2 (w/v)'lik kitozan çözeltisi 60°C'de 7 saat karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 16 saat karışmaya bırakılmıştır.

### **3.2.5 Kuvartz ve Cam Substratların Temizlenmesi**

Katmanlı depozisyonun dış faktörlerden etkilenmesini önlemek için, işleme başlamadan önce kullanılacak substratların (UV-Vis spektrometre analizleri için kuvartz lamalar ve AKM/TEM/kontak açısı analizleri için cam diskler) tam olarak temizlenmesi gerekmektedir. Temizleme işlemi Artyukhin ve Stroeve (2003)'nin metodu izlenerek gerçekleştirilmiştir. Kuvartz veya cam substratlar 55°C'de öncelikle deiyonize su (18 m $\Omega$ , Milli-Q Ultrasaf Su Sistemi, Millipore) içerisinde, daha sonra %2 (v/v) Hellmanex III çözeltisinde ve son aşamada saf etanolde 15'er dakika ultrasonikasyona maruz bırakılmıştır. Her aşama sonrasında substratlar bol miktarda deiyonize su ile durulanmış ve son aşama bitiminde azot gazı ile tamamen kurutularak depozisyon işlemine kadar temiz bir kapta saklanmıştır.

### **3.2.6 Katmanlı Depozisyon Yöntemi ile LbL Kaplama Oluşturma**

Daldırma yöntemi ile katmanlı depozisyon işlemi şu şekilde gerçekleştirilmiştir: Yüzeyi negatif yüklü substrat (UV-Vis spektrometri analizleri için kuvartz lam, AKM analizi ve kontak açısı ölçümleri için cam disk ve tüm diğer analizler için koronali polipropilen (PP) film), uygun pH'deki kitozan çözeltisinde 2, 10 veya 20 dk bekletilmiştir. Adsorpsiyon süresi sonunda çözeltilerden çıkarılan substrat, yüzeyindeki zayıf bağlı fazla kitozani atmak için çözelti ile aynı pH değerine sahip deiyonize su küvetinde 1 dk boyunca durulanmıştır. Yukarıdaki adımlar uygun pH'deki sodyum kazeinat çözeltisi ile tekrarlanarak substrat üzerinde ilk iki katmanlı yapı elde edilmiştir. İşlem toplamda 12 katmana kadar sürdürülmüş, hazırlanan



numuneler saf nitrojen gazı ile kurutulduktan sonra analize kadar uygun koşullarda temiz bir ortamda saklanmıştır.

### **3.2.7 UV-Vis Spektrofotometri ile Kaplama Oluşumunun İzlenmesi**

Bu metot katmanlı depozisyon yöntemi ile LbL kaplama oluşumunun izlenmesi amacıyla her depozisyon aşamasında kullanılmıştır. Ölçümler Perkin Elmer Lambda 25 UV-Vis spektrometre (Amerika Birleşik Devletleri) ile gerçekleştirilmiştir. UV ışığı soğurmeyen kuvarz lamalar üzerinde her katman için ayrı ayrı hazırlanan ve kurutulan kaplamalar cihazın katı numune tutacağına yerleştirilerek 190-400 nm aralığında taramaya bırakılmıştır. Elde edilen spektrada proteinlerin uyarılma dalga boyu olan 280 nm'deki absorbansın takibi ile çok katmanlı kaplama oluşumu izlenmiştir. Ölçümler oda sıcaklığında en az 2 kez tekrarlanmış, her ölçüm referans (kaplamasız kuvarz lam) değeriyle düzeltilmiştir.

### **3.2.8 Yüzeysel Plazmon Rezonansı (YPR) ile Kaplama Oluşumunun İzlenmesi**

Katmanlı depozisyon yöntemi ile elde edilen LbL kaplamaların her depozisyon adımında yerinde karakterizasyonu için yüzeysel plazmon rezonansı cihazı (BioNavis SPR-Navi 200, Finlandiya) hem tarama hem de sabit açı modunda kullanılmıştır. Optik prizma Kretschmann konfigürasyonunda olup, YPR sensörü olarak 2 nm Cr + 50 nm Au + 10 nm SiO<sub>2</sub> kaplı özel bir cam substrat (BioNavis, Finlandiya) kullanılmıştır. Silikon dioksit katmanının amacı, daldırma yöntemi ile katmanlı depozisyon işleminin gerçekleştirildiği kuvarz yüzeyin taklit edilmesi ve eksi yüklü bir yüzey elde edilmesidir.

YPR sensörü üzerinde katmanlı depozisyon işlemi ile LbL kaplamaların oluşturulması, Kısım 3.2.6'da belirtilen izleme göre, ancak oluşturulan filmin yerinde karakterizasyonuna olanak sağlamak için cihazın akış hücresinde gerçekleştirilmiştir. İlk katmanın oluşumu için, uygun konsantrasyon ve pH değerine sahip kitozan çözeltisi şırınga yardımıyla cihazın akış hücresine enjekte edilerek adsorpsiyon süresi boyunca (2 dk veya 10 dk) bekletilmiştir. Bu süre sonunda akış hücresine aynı pH değerine sahip deiyonize su gönderilerek durulama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde oluşturulan ilk katmanın YPR taraması açılma tarama modunda gerçekleştirilmiştir. İkinci katmanın oluşumu için aynı adımlar uygun konsantrasyon ve pH değerindeki sodyum kazeinat çözeltisi ile tekrarlanmıştır. Bu izleme takip ederek 10-12 katman elde edilmiş ve her katmanın karakterizasyonu Winspall 3.02 (Max Planck Polimer Araştırma Enstitüsü, Almanya) yazılımı ile gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan bütün çözeltiler öncelikle 0,45 µm selüloz asetat şırınga filtresinden (Isolab, Almanya) geçirilip, 15 dk boyunca ultrasonikasyona (Elmasonic S40, Almanya) maruz bırakılarak gazı alındıktan sonra akış hücresine enjekte edilmiştir.

### 3.2.9 Atomik Kuvvet Mikroskobu (AKM) ile Görüntüleme

AKM, elde edilen LbL kaplamaların (ilk 2 katman + 5. ve 6. katmanlar ve son katman için) kalınlığı, yüzey morfolojisi ve pürüzlülüğünü belirlemek için kullanılmıştır. Taramalar Digital Instruments – MMSPM Nanoscope IV Taramalı Uç Mikroskobu (Amerika Birleşik Devletleri) ile, veri analizleri ise, NanoScopeAnalysis v1.4 (Bruker, Almanya) programı ile gerçekleştirilmiştir.

Substrat olarak 1x1 cm boyutlarında cam lamlar hazırlanmıştır. Hem havada hem de sıvı ortamda taramalar yapılmıştır. Havada taramalar için hazırlanan numuneler öncelikle desikatör içerisinde (% 0 bağıl nem) kurumaya bırakılmış, kuruma işlemi tamamlandıktan sonra taramaya alınmıştır. Havada taramalar silikon uçlu prob (300 kHz rezonans frekansı, 40 N/m yay sabiti) ile dinamik modda gerçekleştirilmiştir. Sıvı ortamdaki taramalar ise, katmanlar cihazın akış hücresinde oluşturulduktan sonra 'yeryinde' (*in situ*) gerçekleştirilmiştir. Taramalar silikon nitrat uçlu prob (150kHz rezonans frekansı, 0.7 N/m yay sabiti) ile statik modda gerçekleştirilmiştir. Her iki ortamda da 100x100  $\mu\text{m}^2$ , 50x50  $\mu\text{m}^2$  ve 10x10  $\mu\text{m}^2$ 'lik alanlar şeklinde taramalar yapılmıştır. Her taramadan sonra elde edilen görüntüler birinci veya ikinci dereceden düzleştirilmiştir.

Elde edilen katmanların yüzey topoğrafyalarından yüzey pürüzlülükleri hesaplanmıştır. Yüzey pürüzlülüğü, kök ortalama karesel pürüzlülük (Eşitlik 3) ve ortalama pürüzlülük (Eşitlik 4) olarak iki şekilde hesaplanmıştır.

$$R_{rms} = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^N (z_n - z_{av})^2}{N}}$$

(3)

$$R_a = \frac{1}{L} \int_0^L |f(x)| dx$$

(4)

Burada  $R_{rms}$ , kök ortalama karesel pürüzlülük;  $z_n$ , ölçülen yükseklik değeri;  $z_{av}$ , görüntülenen alanda ölçülen yükseklik değerlerinin ortalaması;  $N$ , görüntülenen alandaki toplam ölçüm noktası;  $R_a$ , ortalama pürüzlülük;  $f(x)$ , orta çizgisine oranlı pürüzlülük eğrisi;  $L$  ise, pürüzlülük eğrisinin uzunluğudur.  $R_{rms}$ , ölçülen yüzey yüksekliği sapmalarının karekök ortalamasını ifade ederken,  $R_a$ , orta çizgisine oranlı yüzey yüksekliği sapmalarının mutlak değerinin aritmetik ortalamasını ifade etmektedir. Yüzey pürüzlülüğü ölçümleri için her bir



numunenin en az 3 farklı alanı (100  $\mu\text{m}$  x 100  $\mu\text{m}$ ) taranmış ve sonuçlar bu taramaların aritmetik ortalaması olarak verilmiştir.

Katman kalınlığı ölçümleri sadece havada taramalarda gerçekleştirilmiştir. Bunun için, depozisyon adımı sonrasında numune yüzeyi, ucu parafilm ile sarılmış steril bistüri yardımıyla hafifçe (substratı zedelemeyen) çizilmiş ve oluşan çizimin derinliğinden (AKM ile elde edilen yükseklik profili verisinden elde edilir) katman kalınlığı hesaplanmıştır. Kalınlık ölçümleri aynı çizimin en az 3 farklı kısmında tekrarlanmış ve sonuçlar tekrarların aritmetik ortalaması olarak verilmiştir.

### **3.2.10 Taramalı Elektron Mikroskobu (TEM) ile Görüntüleme**

Elde edilen LbL kaplamaların üst yüzey ve kesit yüzeyi yapısının karakterizasyonu için Taramalı Elektron Mikroskobu (Philips XL 30S FEG, FEI Company, Eindhoven, Hollanda; FEI Quanta 250 FEG, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılmıştır. TEM analizleri için koronalı polipropilen (PP) filmler substrat olarak kullanılmıştır ve katmanlı depozisyon yöntemi ile koronalı film üzerinde çok katmanlı yapı elde edilmiştir. Hazırlanan numuneler öncelikle desikatör içerisinde (% 0 bağıl nem) kurumaya bırakılmış, kuruma işlemi tamamlandıktan sonra taramaya alınmıştır. Numuneler argon gazı varlığında K550 X püskürtmeli kaplama sisteminde (Quorum Technologies, Londra, Birleşik Krallık) 0.05 nm altın (Au) ile kaplanmıştır. Bu aşama substrata elektriksel iletkenlik özelliğinin verilmesi için gereklidir. Görüntülemeler 2  $\mu\text{m}$  ile 100  $\mu\text{m}$  arasındaki uzaklıklarda, 3kV hızlandırma voltajı ile gerçekleştirilmiştir. Her örnek için en az iki numune görüntülenmiştir.

### **3.2.11 Su Buharı ve Gaz Geçirgenliği Tayini**

Elde edilen LbL kaplamaların su buharı geçirgenliği ASTM F1249 standardına göre Mocon Permatran-W su buharı geçirgenliği ölçüm cihazı (model 3/33, ABD) ile ölçülmüştür. Ölçümler 37,8  $^{\circ}\text{C}$ 'de ve % 90 bağıl nemde, 100  $\text{cm}^3/\text{dk}$  azot gazı akış hızı ile gerçekleştirilmiştir.

LbL kaplamaların oksijen geçirgenliği ise, ASTM D1434-82 standardına göre Lyss L100-5000 manometrik gaz geçirgenliği ölçüm cihazı (PBI Dansensor, Danimarka) ile gerçekleştirilmiştir. Ölçümler 23  $^{\circ}\text{C}$ 'de ve % 0 bağıl nemde, 5-10  $\text{cm}^3/\text{dk}$  gaz akışı ile gerçekleştirilmiştir.

Her iki deneyde de substrat olarak koronalı PP filmler kullanılmış ve analiz edilecek her kaplama için en az iki adet numunede ölçüm yapılmıştır.



### 3.2.12 Kontak Açısı Ölçümleri

Elde edilen LbL kaplamaların ıslanırılığının katman sayısı ve üst katman çeşidine bağlı olarak değişimini incelemek amacıyla 'durağan damla' metodu ile kontak açısı ölçümleri (KSV Instruments, Attention Theta, Finlandiya) gerçekleştirilmiştir. Buna göre, 5 uL distile su cam lamlar üzerinde hazırlanmış LbL kaplamalar üzerine otomatik bir mikroşırınga yardımıyla damlatılmış, damla ile yüzeyin görüntüsü cihaza bağlı bir kamera tarafından zamana bağlı olarak çekilerek kaydedilmiştir. Yüzeyde duran su damlasının hava arayüzeyi ile üzerinde durduğu LbL kaplama ile arasındaki arayüzeyin kesiştiği noktada oluşturduğu açı (kontak açısı), cihazın dijital yazılımı ile analiz edilmiştir.

Ölçümler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Analiz edilen her kaplama için en az 2 örnekte, her örneğin yüzeyinde en az 5 farklı alanda ölçüm yapılmış ve sonuçlar bu ölçümlerin aritmetik ortalaması olarak verilmiştir.

### 3.2.13 Renk Tayini

Daldırmalı katmanlı depozisyon yöntemi ile koronalı PP filmler üzerinde oluşturulan LbL kaplamaların renk koordinatları (CIE L\*, a\*, b\*) Minolta CR-400 kromametre (Konica Minolta, Japonya) ile ölçülmüştür. Öncelikle, cihazın beyaz noktası kalibrasyonu illuminant D65 için yapılmış, çapı 8,5 cm boyutunda kesilen LbL kaplamalı PP filmler beyaz bir fon üzerine yerleştirilerek renk koordinatları aynı film üzerindeki 5 farklı noktada belirlenmiştir. Her kaplama için 2 örnekte ölçüm yapılmış ve sonuçlar 10 ölçümün aritmetik ortalaması olarak verilmiştir. Katman sayısına ve adsorpsiyon süresine bağlı renk değişimini görebilmek adına, ölçümler farklı adsorpsiyon süreleri ile hazırlanmış her kaplama için 5. ve son katmanda gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.14 Stabilite Analizi

Elde edilen kaplamaların bütünlüğü ve stabilitesi zorlaştırılmış koşullarda, 2 farklı ortamda test edilmiştir. En uygun koşullarda başarılı bir şekilde elde edilen LbL kaplamalarda katman sayısı ve üst katman çeşidinin stabilite üzerindeki etkilerini görebilmek adına analizler, kontrol örnekle birlikte 4 farklı kaplama için 2 tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak, depolama veya nakliye sırasında uygun sıcaklık koşullarının sağlanamaması durumunda kaplamaların stabilitesinde herhangi bir değişiklik olup olmayacağı araştırmak



üzere, örnekler 3 hafta boyunca oda sıcaklığında (25 °C), % 93 bağıl nemde saklanmıştır. Kontrol numunesi ise, % 93 bağıl nemde 4 °C'de saklanmıştır. Numuneler ağız açık bir saklama kabında, bağıl nemi doymuş potasyum nitrat çözeltisi ile kontrol edilen bir desikatörün içinde muhafaza edilmiştir. Sıcaklık kontrolü için desikatörler, sıcaklığı 25 °C'ye ve kontrol numunesi için 4 °C'ye ayarlı iki farklı inkübatörde (Nüve EN120, Türkiye; Sanyo, Japonya ) tutulmuştur. Aynı daldırma çözeltileri kullanılarak hazırlanmış kaplamaların yüzey morfolojileri, 5., 15. ve 21. günlerde, 4 °C'de muhafaza edilen kontrol numunelerinin ise 21. gündeki yüzey morfolojileri TEM ile görüntülenerek karşılaştırılmıştır.

İkinci olarak, LbL kaplamaların su ile temas halinde bütünlüklerini koruyup koruyamadıkları test edilmiştir. Örnekler 15 gün boyunca içi saf su dolu ağız kapalı bir saklama kabında, oda sıcaklığına (25 °C) ayarlı bir inkübatörde saklanmıştır. Aynı daldırma çözeltileri kullanılarak hazırlanmış örneklerin yüzey morfolojileri, 24 saat, 4., 9. ve 15. günlerde TEM ile görüntülenerek karşılaştırılmıştır. Kaplamalarda suda çözünmeye dayalı herhangi bir kayıp olup olmadığı ise, UV-Vis spektrometre ile kaplamaların daldırıldığı saf su örneklerinin 190-400 nm dalga boyu aralığındaki absorbans spektrumları incelenerek belirlenmiştir.

### **3.2.15 İstatistiksel Analiz**

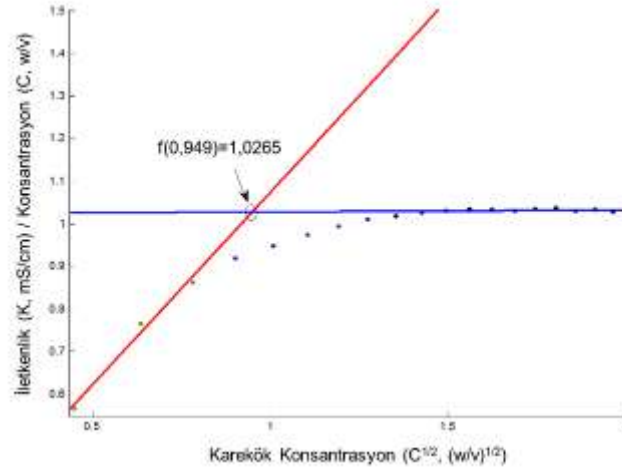
Tüm deneyler en az 2 tekrar halinde gerçekleştirilmiş ve her numune için ilgili analizde belirtildiği kadar (en az 2) ölçüm alınmıştır. Sonuçlar elde edilen verilerin aritmetik ortalaması şeklinde standart sapma değerleriyle birlikte verilmiştir. Tüm sonuçlar tek yönlü varyans analizi ile kontrol edilmiş, belirgin farklılıklar ( $p \leq 0.05$ ) Tukey testi ile belirlenmiştir.

## **4. BULGULAR VE TARTIŞMA**

### **4.1 Sodyum Kazeinatın Kritik Misel Konsantrasyonu**

Sodyum kazeinat iyonik yüzey aktif bir maddedir ve konsantrasyonu kritik misel konsantrasyonu üzerindeki çözeltilerde misel yapılar oluşturur. Projede hedef katmanlı depozisyon işleminin sodyum kazeinatın misel oluşturmadığı konsantrasyonlarda yapılması olduğundan, öncelikle sodyum kazeinatın kritik misel konsantrasyonunun (KMK) tayini

gerçekleştirilmiştir. Kısım 3.2.2’de belirtildiği şekilde elde edilen verilerden çizdirilen grafiklere bir örnek Şekil 2’de verilmektedir. Grafikte de görüldüğü gibi, K/C değerleri düşük konsantrasyondan orta konsantrasyonlara geçişte artış gösterirken yüksek konsantrasyonlarda plato değere ulaşmaktadır. Düşük konsantrasyonlardaki değerlerin basit doğrusal regresyonu eşitliği ile yüksek konsantrasyonlardaki değerlerin basit doğrusal regresyonu eşitliğinin kesiştiği nokta sodyum kazeinatın KMK’sını vermektedir. Bu şekilde hesaplatılan KMK değerleri Tablo 1’de verilmektedir.



**Şekil 2.** Kondüktometrik metod ile sodyum kazeinatın pH 5,5’taki kritik misel konsantrasyonunun belirlenmesi

**Tablo 1.** Sodyum kazeinatın kritik misel konsantrasyonuna (KMK) pH’ın etkisi. (İstatistiksel olarak belirgin farklılıklar Tek Yollu Varyans Analizi ile test edilmiş ve belirgin farklar ( $p \leq 0.05$ ) Tukey testi ile belirlenmiştir. Farklı üstel harflere sahip değerler önemli ölçüde farklı bulunmuştur.)

pH	KMK (%w/v)	Eklenen İyon Kuvveti (mM)
5,5	0,90 ± 0,03 <sup>b</sup>	13,80671 (HCl)
6	0,850 ± 0,008 <sup>b</sup>	10,88032 (HCl)
7	1,15 ± 0,05 <sup>a</sup>	-
8	1,11 ± 0,13 <sup>a</sup>	9,017937 (NaOH)

Tablo 1’de görüldüğü gibi, sodyum kazeinatın pH 7 ve 8’de elde edilen kritik misel konsantrasyonları pH 5 ve 6’da elde edilenden istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur. Bu durumun oluşmasına etki eden iki faktör olduğu düşünülmektedir. Birinci olarak, ortamın pH’ı kazeinlerin izoelektrik noktası olan 4,6’ya aklaştıkça kazein moleküllerinin net etkili yüzey yük yoğunluğunda düşüş görülür (Kısım 4.2’deki zeta potansiyeli ölçümleri bunu



doğrulmaktadır, Bkz. Tablo 2). İkinci olarak ise, ortamın pH'ını düşürmek için eklenen HCl çözeltisinin sebep olduğu iyon kuvvetindeki artış ve dengeleyici iyonların varlığı kazein molekülleri arasında mevcut olan elektrostatik etkileşimlerin perdelenmesine neden olmaktadır. Böylece, kazein molekülleri daha düşük konsantrasyonda bir araya gelerek misel yapılar oluşturabilirler.

Elde edilen sonuçlar sodyum kazeinatın KMK'sının pH 7 ve 8'de %1,1 (w/v) iken daha düşük pH'larda % 0,9 (w/v) civarında olduğunu göstermektedir. Bu değer sodyum kazeinatın çalışmada kullanılabilir üst konsantrasyon sınırını belirlemiş olmaktadır. Bu nedenle çalışmada sodyum kazeinatın misel oluşturmadığı varsayılan % 0,2 ve % 0,5 (w/v) konsantrasyonları kullanılmıştır.

#### **4.2 Kitozan ve Sodyum Kazeinat Çözeltilerinin Zeta Potansiyeli ve Parçacık Büyüklüğü Analizi**

Kitozan ve sodyum kazeinatın pH'a bağlı zeta potansiyeli ve parçacık büyüklüğü değişimi standart sapmalarıyla birlikte Tablo 2'de verilmektedir. Arzu edilen pH değerine ulaşmak için eklenen NaOH veya HCl çözeltilerinin sebep olduğu iyon kuvvetindeki artış da eklenmiştir.

% 0,2 (w/v) kitozan sonuçlarına bakıldığında, genel eğilimin, beklenildiği üzere, pH arttıkça zeta potansiyelinin düştüğü şeklinde olduğu görülmektedir. Bu durum pKa değeri 6,5 olan kitozanın iyonlaşma derecesinin düşük pH'larda yüksek iken, pH değeri arttıkça (6,5'a yaklaştıkça) düşmesinden kaynaklanmaktadır. Bir polielektrolit molekülün etkili yüzey yükünü gösteren zeta potansiyeli de molekülün iyonlaşma derecesiyle doğru orantılı olduğundan düşüş göstermektedir. Carneiro-da-Cunha vd. (2010) % 0,2 (w/v) konsantrasyonuna sahip pH 3,5'taki kitozanın zeta potansiyeli değerini +38,4 mV olarak rapor etmişlerdir. Bu çalışmada da, aynı pH ve konsantrasyondaki kitozan için  $+30,63 \pm 9,9$  mV değerinin elde edilmesi sonuçların doğruluğuna işaret etmektedir.

% 0,5 (w/v) kitozan çözeltilerinin pH'a bağlı zeta potansiyeli değişimi ise, % 0,2 (w/v) kitozan çözeltilerindeki kadar net bir eğilim göstermemektedir. Ortamın pH'ı azaldıkça zeta potansiyelinde artış beklenirken, pH 3,5'ta artışın sekteye uğradığı görülmektedir. Bu durum ortamdaki iyon çeşidindeki keskin değişiklikten kaynaklı olabilir (Tablo 2). Na<sup>+</sup> ve OH<sup>-</sup> ile karşılaştırıldığında oldukça büyük olan Cl<sup>-</sup> iyonları kitozan moleküllerinin pozitif yüzey yük potansiyelini perdeleyerek net etkili yüzey potansiyelinde düşüşe neden olmuş olabilir.

Kazein çözeltilerinin pH'a bağlı zeta potansiyeli sonuçları standart sapmalar içerisinde değerlendirildiğinde de, beklenildiği üzere, genel eğilimin pH arttıkça zeta potansiyelinde düşüş (magnitüdünde artış) şeklinde olduğu görülmektedir. Bu durum kazeinin izoelektrik

noktasının ~4,6 olmasından ileri gelmektedir (Proteinlerin izoelektrik noktalarının üzerinde pH arttıkça negatif olan yüzey yükü miktarında artış görülür).

**Tablo 2.** Kitozan ve sodyum kazeinatın pH'a bağlı zeta potansiyeli ve parçacık büyüklüğü değişimi. (Çözeltilerin pH ayarlamaları için eklenen iyon konsantrasyonları da verilmektedir.)

Konsantrasyon (w/v)- pH	Zeta Pot.(mV) ± SD	Par. Büyüklüğü (nm) ± SD	PDI ± SD	Eklenen İyon Konsantrasyonu (mM)
0,2% kitozan- 3	45,95 ± 15,25	2998,5 ± 901,6	0,81 ± 0,27	1,8 (HCl)
0,2% kitozan - 3,5	30,63 ± 9,90	2445,0 ± 86,3	0,74 ± 0,20	5,2 (NaOH)
0,2% kitozan - 4	22,88 ± 5,63	940,3 ± 199,1	0,99 ± 0,02	22,8 (NaOH)
0,2% kitozan - 4,5	25,83 ± 1,98	301,1 ± 37,8	0,97 ± 0,05	63,8 (NaOH)
0,2% kitozan - 5	17,38 ± 1,67	165,5 ± 0,9	0,97 ± 0,02	102,7 (NaOH)
0,2% kitozan - 5,5	15,47 ± 1,08	116,8 ± 5,5	0,99 ± 0,01	127,9 (NaOH)
0,5% kitozan - 3	27,87 ± 10,56	8240,0 ± 182,4	0,65 ± 0,12	12,6 (HCl)
0,5% kitozan - 3,5	13,76 ± 3,03	3862,50 ± 2163,04	0,84 ± 0,22	2 (HCl)
0,5% kitozan - 4	43,63 ± 1,41	7318,0 ± 3343,2	0,61 ± 0,19	15,9 (NaOH)
0,5% kitozan - 4,5	30,95 ± 2,42	3931,5 ± 659,7	0,79 ± 0,07	52,9 (NaOH)
0,5% kitozan - 5	21,25 ± 5,21	3028,0 ± 2040,7	0,78 ± 0,31	85,9 (NaOH)
0,5% kitozan - 5,5	13,28 ± 7,10	1003 ± 411	1 ± 0	110 (NaOH)
0,2% kazein- 5,5	-12,95± 5,79	254,6 ± 90,7	0,29 ± 0,14	0,8 (HCl)
0,2% kazein- 6	-20,72 ± 4,13	157,4 ± 54,5	0,38 ± 0,19	0,5 (HCl)
0,2% kazein- 7	-22,18 ± 1,34	181,7 ± 68,8	0,37 ± 0,13	-
0,2% kazein- 8	-25,68± 1,16	160,9 ± 9,5	0,26 ± 0,01	0,4 (NaOH)
0,5% kazein- 5,5	-18,16 ± 2,53	158,5 ± 24,1	0,26 ± 0,07	2,4 (HCl)
0,5% kazein- 6	-20,28 ± 0,35	130,5 ± 3,5	0,295 ± 0,002	1,2 (HCl)
0,5% kazein- 7	-23,45± 1,96	168,7 ± 1,8	0,26 ± 0,01	-
0,5% kazein- 8	-21,17 ± 6,32	179,2 ± 2,2	0,27 ± 0,02	1 (NaOH)

Dinamik ışık saçılımı, Brownian hareketi gösteren parçacıkların yer aldığı bir süspansiyonda ışık saçılımı şiddetinin zamana bağlı dalgalanmalarını ölçer. Saçılan ışık şiddetindeki dalgalanmaların analizi parçacıkların difüzyon katsayısının belirlenmesine



olanak sağlar. Stokes-Einstein denkleğinden yola çıkarak da parçacık büyüklükleri elde edilir. Dinamik ışık saçılımı, düşük çözünürlüklü bir teknik olup, ancak aralarında büyüklükçe 3 faktörden fazla fark olan maddeler için belirgin (ayrık) parçacık büyüklüğü dağılımları verebilmektedir. Ancak, yine de, elde edilen verilerin doğru bir şekilde yorumlanmasıyla parçacık büyüklüğü dağılımları nispeten dar olan çok dağılıtlı (polidispers) sistemler hakkında da önemli bilgiler elde edilebilir (Ball, 2015).

Dinamik ışık saçılımı tekniğı ile elde edilen en önemli verilerden biri ortalama hidrodinamik çapı (Z-ave diameter), bir diğeri ise polidispersite indeksidir. Z-ave büyüklüğü, sistemde yer alan parçacıkların sebep olduğı ışık saçılımının miktarı baz alınarak hesaplanır. Polidispersite indeksi ise, parçacık büyüklük dağılımının genişliğini temsil eder (Ball, 2015). Dolayısıyla, hem Z-ave büyüklüğü hem de polidispersite indeksi ortamda bulunan en ufak kümelenmelere bile oldukça duyarlıdır. Bu nedenle, dinamik ışık saçılımı tekniğı ile elde edilen Z-ave büyüklüğü ancak tekil dağılıtlı (monodisperse) sistemler için tek başına anlamlıdır. Çoklu dağılıtlı sistemler için bu değer tek başına yanıltıcı olabilir. Bu durum şu şekilde açıklanabilir. Biyomoleküllerin veya polimerlerin yer aldığı çözeltilerde bir parçacığın sebep olduğı ışık saçılımı molekül ağırlığının karesiyle doğru orantılıdır. Dolayısıyla, sistemde yer alan en ufak bir kümelenme, ışık saçılımı miktarında, dolaylı olarak da Z-ave değerinde sıçrayışlara sebep olabilmektedir. Bu aşamada, dinamik ışık saçılımı tekniğinin bir sistem için uygun olup olmadığı değerlendirilmesi polidispersite indeksine bakılarak yapılabilir. Genel olarak, polidispersite indeksi 0,1'den küçük olan tekil dağılıtlı sistemler için Z-ave büyüklüğünün gerçeğı yansıttığı düşünülürken, polidispersite indeksi 0,7'den büyük olan çok dağılıtlı sistemler için sonuçların yanıltıcı olabileceğı kabul edilmektedir. Böyle bir durumda ise, hacim ve parçacık sayısı dağılımları mutlaka değerlendirilmelidir. Sistemde bulunan farklı büyüklükteki parçacıkların hacimsel olarak birbirlerine oranlarını tanımlayan 'Hacimsel dağılım' ve sistemdeki farklı büyüklükteki parçacıkların sayısal olarak birbirlerine olan oranlarını tanımlayan 'Parçacık sayısal dağılım', dinamik ışık saçılımı metodu ile elde edilen ışık şiddeti tabanlı dağılımdan yola çıkarak Mie teorisi ile hesaplanabilir.

Yukarıdaki bilgiler ışığında, farklı konsantrasyon ve pH'lardaki kitozan ve sodyum kazeinat çözeltilerine ait Tablo 2'de verilen ortalama parçacık büyüklük (Z-ave) ve polidispersite indeksi değerleri Şekil 3-6'da verilen hacim ve parçacık sayısı dağılımları ile birlikte değerlendirildiğinde şu sonuçlar çıkmaktadır:

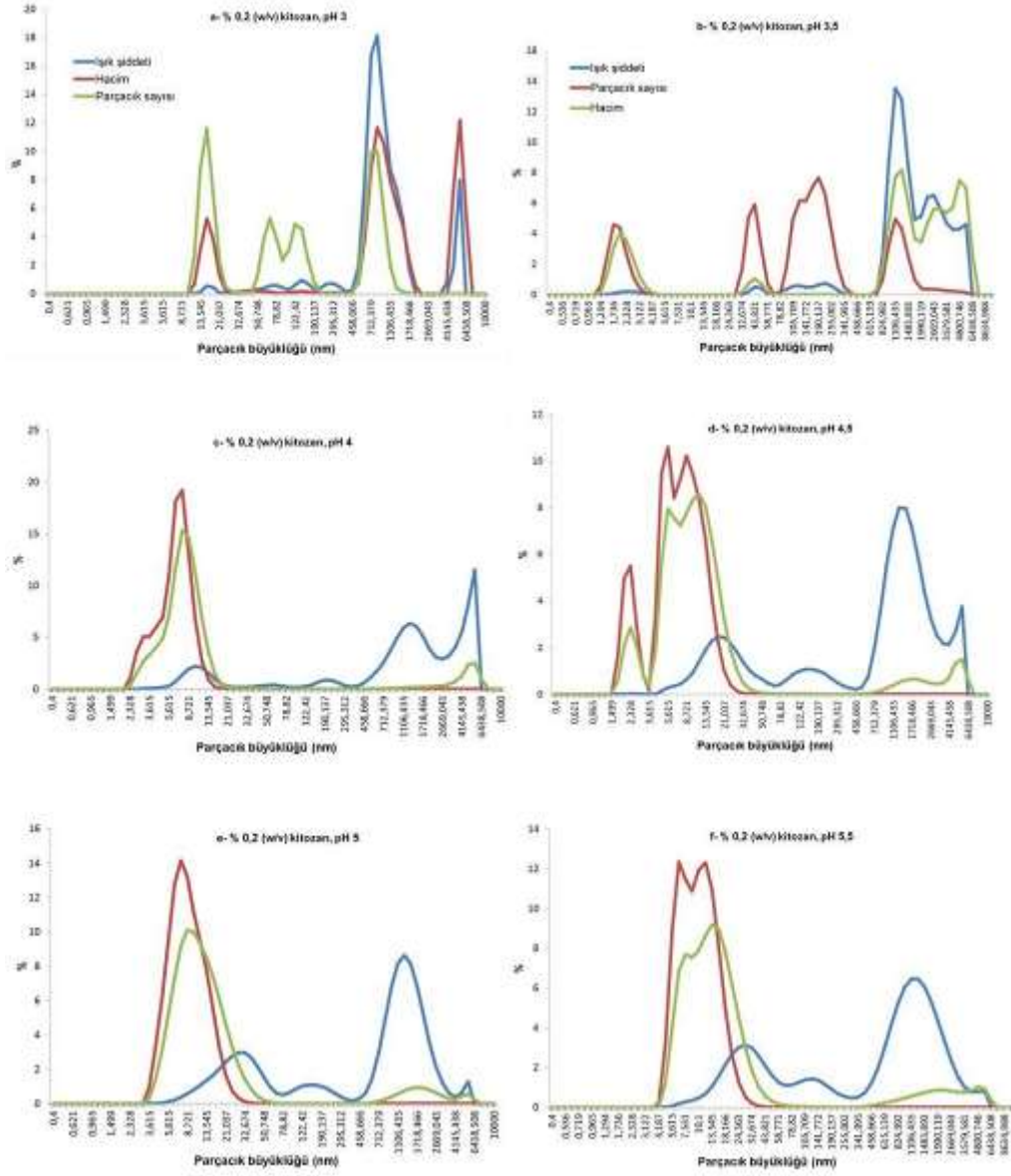
i. Her iki konsantrasyonda da kitozan çözeltilerinin polidispersite indekslerinin oldukça yüksek olduğı görülmektedir ( $> 0,7$ ). Bu durum, hacim ve parçacık sayısı dağılımlarının da ışık saçılımı dağılımlarıyla birlikte değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir. Yine de, elde edilen Z-ave değerlerinin literatürdeki benzer çalışmaların sonuçlarıyla benzerlik göstermesi sonuçların doğruluğuna işaret etmektedir. Örneğın, Carneiro-da-Cunha vd. (2010) bir çalışmada % 0,6 (w/v) konsantrasyonuna sahip pH 3,5'taki kitozanın ortalama

hidrodinamik çapını 2590 nm olarak rapor etmişlerdir. Bu çalışmada ise, aynı pH'de % 0,5 (w/v) konsantrasyonundaki kitozanın ortalama hidrodinamik çapı standart sapmalarıyla birlikte  $3862,5 \pm 2163,04$  olarak tespit edilmiştir (Tablo 2). Carneiro-da-Cunha vd. (2010)'nin çalışmasında kullanılan kitozanın moleküler ağırlığının ve elde edilen Z-ave değerlerinin standart sapmalarının belirtilmemiş olması sonuçların karşılaştırılmasını zorlaştırır da, sonuçların benzerliği orta molekül ağırlığına sahip kitozanın kullanımını işaret etmektedir.

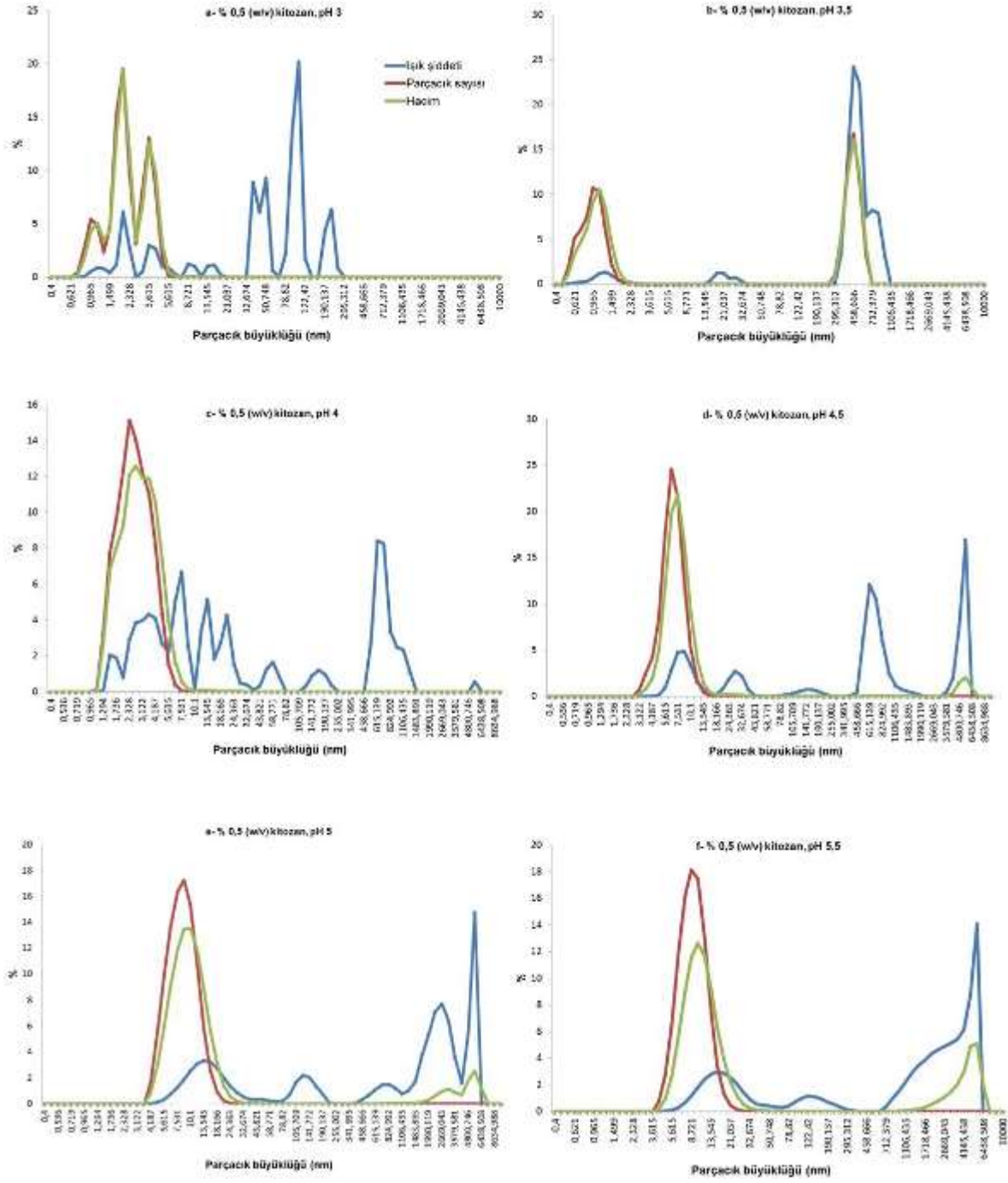
ii. Şekil 3 ve 4 incelendiğinde, yukarıda bahsedilen durumun farklı pH'lardaki kitozan çözeltilerinde dahi geçerli olduğu görülmektedir. Örneğin, Şekil 3a'da pH 3'te % 0,2 (w/v) kitozana ait parçacık büyüklük dağılımları ayrı ayrı incelenirse, ışık şiddeti bazlı parçacık büyüklük dağılımının büyük küme yapıları işaret ettiği, buna karşılık hacimsel ve parçacık sayısal dağılımlarının bireysel ve ufak kümeleri işaret ettiği görülür. Özellikle parçacık sayısal dağılım incelendiğinde, Z-ave değerinin yüksek çıkmasına neden olan büyük kümelerin çözelti içerisinde yok denecek kadar az miktarda bulunduğu anlaşılmaktadır. Kısaca, elde edilen sonuçlar çalışılan pH ve konsantrasyonlardaki kitozan çözeltilerinde parçacıkların hem bireysel hem de ufak kümeler halinde bir arada bulunduğunu göstermektedir.

iii. Her iki konsantrasyondaki sodyum kazeinat çözeltilerinin de polidispersite indekslerinin 0,4'ten düşük olduğu görülmektedir. Bu durum, sodyum kazeinat çözeltilerinin dinamik ışık saçılımı tekniği ile analizinin makul sonuçlar vereceği orta derecede polidispersiteye sahip olduğu anlamına gelmektedir. Zira, kazein için elde edilen Z-ave büyüklükleri (ortalama olarak 160 nm, Tablo 2), Şekil 5 ve 6'da yer alan hacimsel veya parçacık sayısal dağılımların işaret ettiği parçacık büyüklüklerine kıyasla ciddi farklılıklar göstermemektedir.

iv. Şekil 5 ve 6'daki hacimsel ve parçacık sayısal dağılımlar incelendiğinde, çözeltide baskın olarak bulunan kazein parçacıklarının pH 5,5'ta 80-100 nm civarında iken, pH arttıkça daha küçük kümelerin (~60 nm ve ~25 nm) ve kazein monomerlerinin (~10nm) bir arada bulunduğu sistemlerin oluştuğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlar literatürü doğrular niteliktedir. Kazein monomerlerinin ortalama hidrodinamik çapının ~9 nm olduğu bilinmektedir (Mezdour, Brule, & Korolczuk, 2006). Sodyum kazeinat moleküllerinin çözelti içerisindeki yapılarının incelendiği deneysel çalışmalar, kazeinatın doğal olarak çözüldüğü pH 7'deki sulu çözeltisi içerisinde çoğunlukla ~10 nm boyutundaki monomerler ve kazein partikülleri (10-20 nm) karışımı halinde bulunduğunu göstermektedir (Loveday, 2010; Qi, 2007). Ayrıca, çözelti içinde farklı kazein partiküllerinin birleşerek kümeler oluşturduğu ve bu kümelerin ortalama dönüş yarıçapının (radius of gyration) 22-48 nm aralığında olduğu rapor edilmiştir (Loveday, 2010).

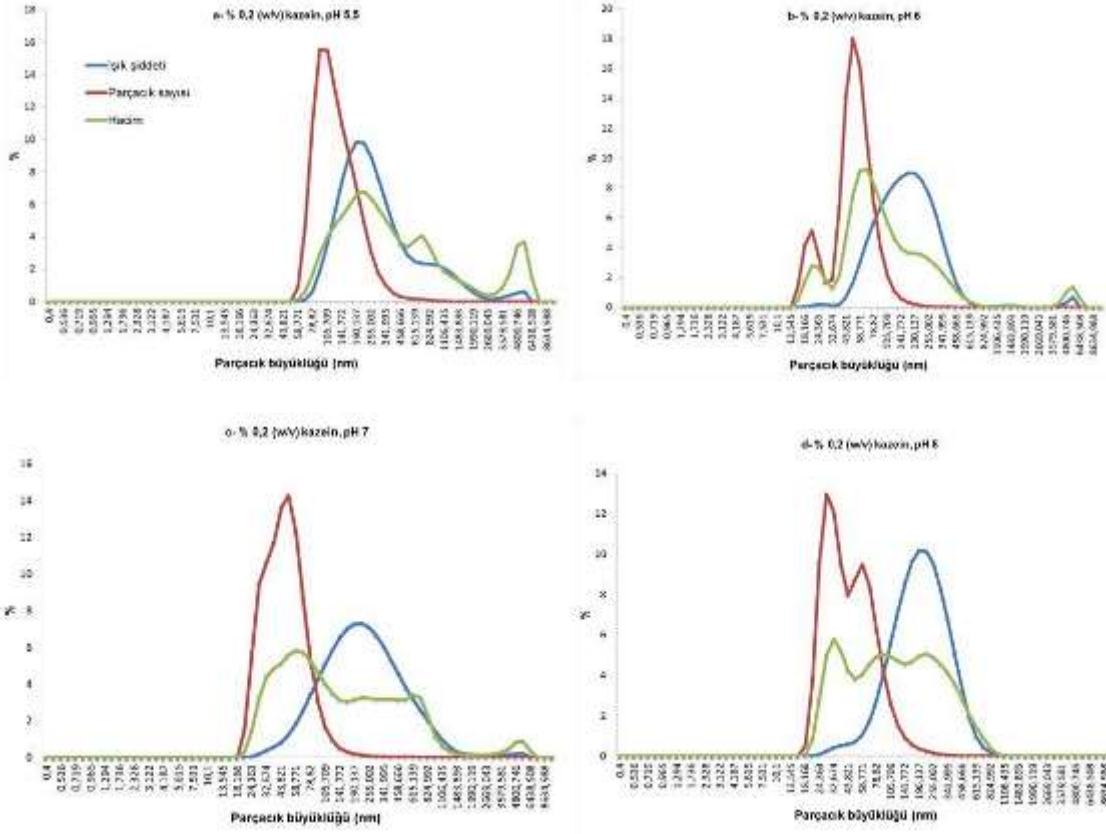


**Şekil 3.** % 0,2 (w/v) kitozan çözeltilerinde farklı pH'larda (a=3; b=3,5; c=4; d=4,5; e=5; f=5,5) ışık şiddeti, hacim ve parçacık sayısına göre ortalama parçacık büyüklüğü dağılımları

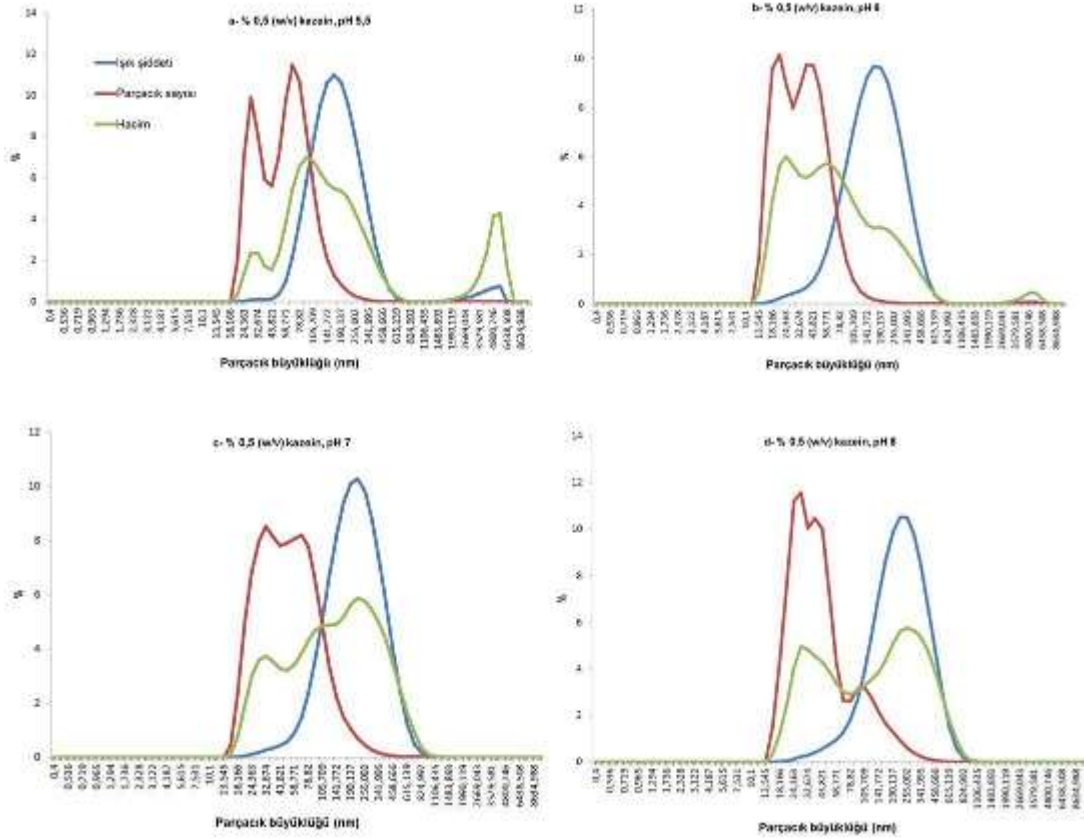


**Şekil 4.** % 0,5 (w/v) kitozan çözeltilerinde farklı pH'larda (a=3; b=3,5; c=4; d=4,5; e=5; f=5,5) ışık şiddeti, hacim ve parçacık sayısına göre ortalama parçacık büyüklüğü dağılımları.





**Şekil 5.** % 0,2 (w/v) sodyum kazeinat çözeltilerinde farklı pH'larda (a=5,5; b=6; c=7; d=8) ışık şiddeti, hacim ve parçacık sayısına göre ortalama parçacık büyüklüğü dağılımları



**Şekil 6.** % 0,5 (w/v) sodyum kazeinat çözeltilerinde farklı pH'larda (a=5,5; b=6; c=7; d=8) ışık şiddeti, hacim ve parçacık sayısına göre ortalama parçacık büyüklüğü dağılımları

Bu kısımda elde edilen sonuçlar doğrultusunda, kitozan ve kazein ile katmanlı depozisyon deneylerinde kullanılacak olan konsantrasyon değerleri her iki polielektrolit için de % 0,2 (w/v) olarak belirlenmiştir. Çalışılması uygun görülen pH değerleri ise, her iki polielektrolitin de en yüksek net etkili yük yoğunluğuna sahip oldukları (kitozan pH 3-kazein pH 8), ikisinin de ortalama (ve magnitüd olarak neredeyse eşit) net etkili yük yoğunluğuna sahip oldukları (kitozan pH 5,5-kazein pH 5,5) ve birinin ortalama değerinin yüksek net etkili yük yoğunluğuna sahip oldukları (kitozan pH 5,5-kazein pH 8) birleşimler olarak belirlenmiştir.

#### 4.3 UV-Vis Spektrofotometri ile Katmanlı Depozisyon Deneyleri

UV-Vis spektrofotometri deneyleri ile kitozan ve sodyum kazeinat ile LbL kaplama oluşumunun takibi gerçekleştirilmiş ve çözeltilerin pH değeri (dolayısıyla polielektrolitlerin net etkili yük yoğunluğu), daldırma (adsorpsiyon) süresi ve katman sayısı gibi etmenlerin katmanlı depozisyona etkileri incelenmiştir. pH etkisini gözlemlemek üzere, zeta potansiyeli sonuçlarından yola çıkılarak, her iki polielektrolitin de yüksek (pH 3-pH 8), ortalama (pH 5,5-

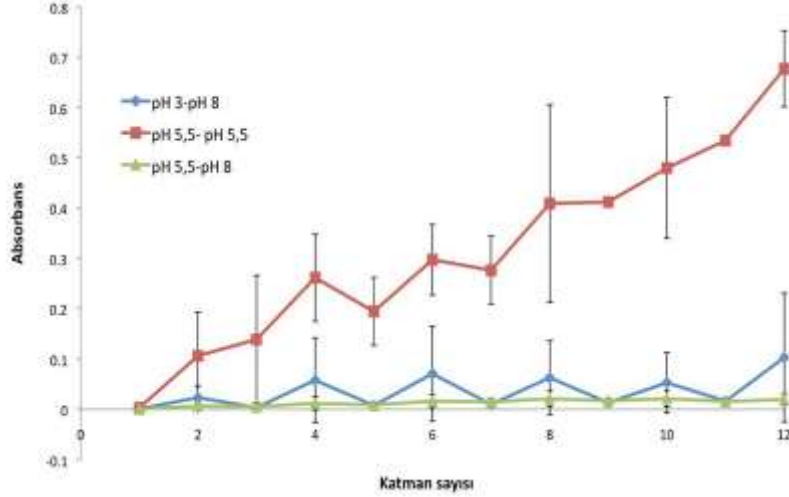




pH 5,5) ve birinin ortalama-diğerinin yüksek yük yoğunluğuna sahip olduğu (pH 5,5-pH 8) pH birleşimleri çalışılmıştır. Daldırma sũresi olarak ise, 2, 10 ve 20 dakika denenmiştir. Bu sũreler ile, sırasıyla, adsorpsiyonun dengeye ulaşamayacağı kadar kısa, adsorpsiyonun henũz dengeye ulaştığı ve relaksasyona sebebiyet verebilecek kadar uzun daldırma sũrelerinin film oluşumuna etkisinin gözlemlenmesi amaçlanmıştır. Adsorpsiyonun dengeye geldiği sũrenin belirlenmesi YPR ile gerçekleştirilmiş olup, Kısım 4.4.1'de anlatılmaktadır. Belirtilen pH birleşimleri ve daldırma sũrelerinde LbL kaplama oluşumu 12 katmana kadar izlenmiştir.

#### 4.3.1 Çözelti pH Değerinin Etkisi

şekil 7'de adsorpsiyonun dengeye geldiği daldırma sũresi (10 dakika) ile elde edilen Absorbans-Katman sayısı grafiği görũlmektedir. Diğer daldırma sũreleri (2 ve 20 dakika) ile de oldukça benzer film oluşumu eğrileri elde edildiğinden gösterilmemiştir. Anlaşıldığı gibi, kitozan ve sodyum kazeinat ile katmanlı depozisyon ancak iki polielektrolitin de ortalama (ve magnitũd olarak ortak) etkili yũzey yük yoğunluğuna sahip oldukları pH 5,5'ta gerçekleşmiştir. Dolayısıyla, burada elde edilen sonuçlar v. Klitzing (2006)'nın zayıf polielektrolitlerle çok katmanlı film oluşumu için ortalama bir iyonlaşma derecesinin uygun olduğu tezini doğrular niteliktedir. Literatũrde de, bazı zayıf polielektrolitlerle katmanlı depozisyon işlemi ortalama bir iyonlaşma derecesi ile gerçekleştirildiğinde film kalınlığında belirgin bir pik görũldũđũ çok katmanlı film çalışmaları yer almaktadır (Yoo vd., 1998; Shiratori ve Rubner, 2000). Kitozan pH 3-kazein pH 8 ve kitozan pH 5,5-kazein pH 8 birleşimlerinde film oluşumunun gözlemlenememesi ise şu şekilde açıklanabilir. Asidik/bazik sulu çözeltide pozitif/negatif yük yoğunluğu ile substrat üzerine tutunan kitozan/kazein katmanı, sonraki aşamada daldırıldığı bazik/asidik sodyum kazeinat/kitozan çözeltisinde iyonlaşma derecesinde keskin bir dũřũř (veya net elektriksel yükũnün tersine dönmesi olayı) yaşamaktadır ve bu sebeple katmanlı depozisyonun devamı için gerekli yũzey 'artık' yük miktarını sağlanamadığından katmanlı depozisyon işlemi sekteye uğramaktadır.



**Şekil 7.** UV-Vis spektrofotometri ile pH'ın katmanlı depozisyon olayına etkisinin izlenmesi. (280 nm'deki absorbans takip edilmiştir. Adsorpsiyon süresi: 10 dakika. Hata çubukları standart sapmaları temsil etmektedir.)

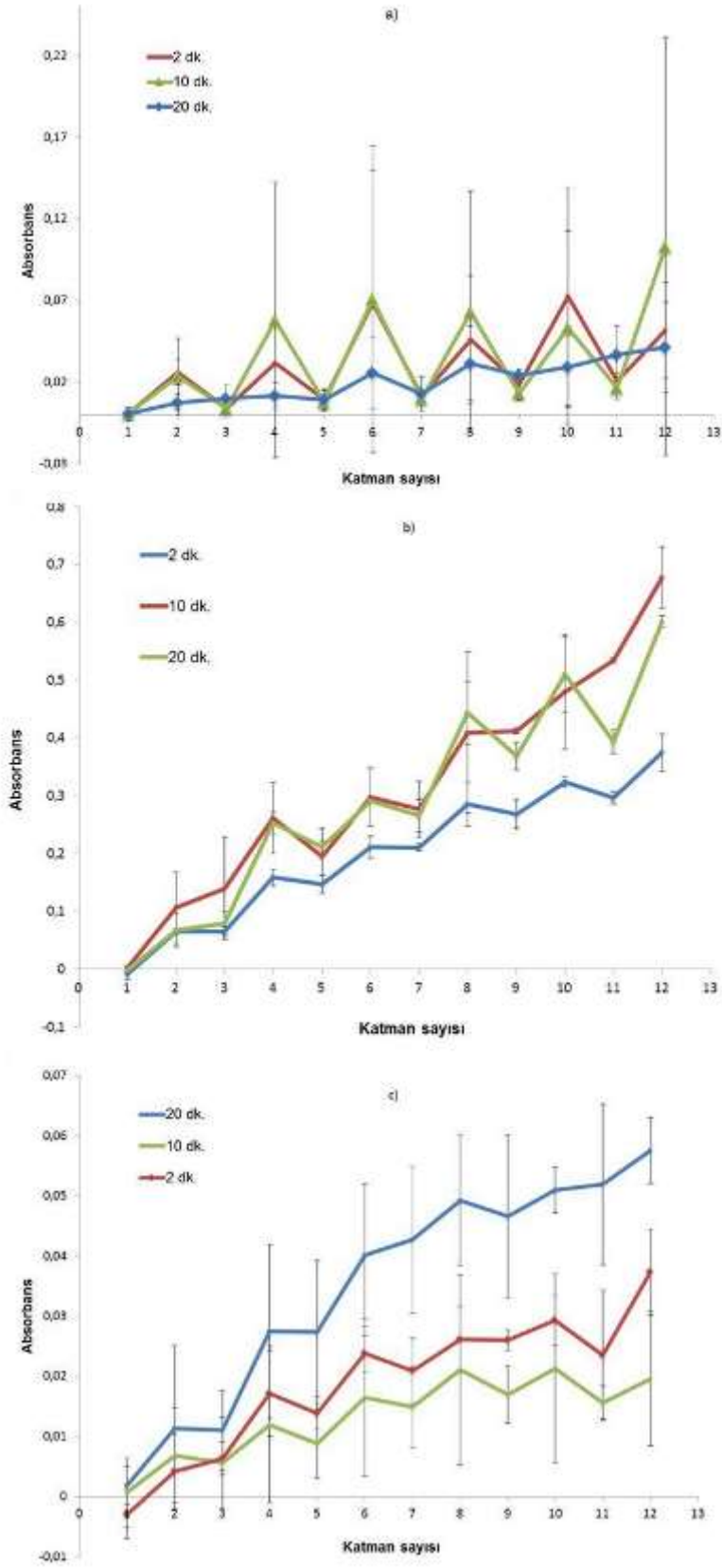
#### 4.3.2 Adsorpsiyon Süresinin Etkisi

Şekil 8a, b ve c'de, sırasıyla, kitozan pH 3-kazein pH 8, kitozan pH 5,5-kazein pH 5,5 ve kitozan pH 5,5-kazein pH 8 birleşimlerinde gerçekleştirilen katmanlı depozisyon işleminin adsorpsiyon (daldırma) süresine bağlı olarak gelişimi verilmektedir. Her iki polielektrolitin de maksimum yük yoğunluğuna sahip olduğu pH 3-pH 8 birleşiminde yukarıda belirtilen sebepten dolayı dengeli bir katmanlı film oluşumu gerçekleşemediğinden sonuçların standart sapmaları oldukça yüksek çıkmıştır (Şekil 8a).

Literatürde elektrostatik etkileşime dayalı katmanlı depozisyon çalışmalarında genel varsayım, daldırma işlem süresi ne kadar uzun olursa katmanlı depozisyonun o kadar başarılı olacağıdır. Zira her daldırma adımında adsorpsiyon olayının kinetik olarak tersinir olmadığı (Bertrand vd., 2000; Zacharia vd., 2007) ve adsorpsiyonun dengeye geldiği sürenin 10-20 dk olduğu düşünülmektedir (Kurth ve Osterhout, 1999; Zacharia vd., 2007). Bu nedenle daldırma süresi tipik olarak 5-20 dk arasında değişmektedir (Vidyasagar vd., 2012; Nguyen vd., 2011). Ancak, Xiang vd. (2013) bu varsayımın güçlü polielektrolitlerin katmanlı depozisyonu için geçerli sayılabilir olmasına karşın zayıf polielektrolitlerin katmanlı depozisyonu için geçerli olmayabileceğini ileri sürmüşlerdir. Zira, zayıf polielektrolitler, geleneksel daldırma süreleri ile gerçekleştirilen katmanlı depozisyon işlemi sırasında, yüzeyden salma (desorpsiyon), film içinde interdifüzyon ve/veya karşıt yüklü polielektrolit ile çözelti içinde çözünebilen tümleşik yapı meydana getirme ve böylece filminden ayrılma gibi film oluşum eğilimini büyük ölçüde değiştiren özellikler göstermişlerdir (Bayramoglu ve Stroeve, 2010; Jomaa ve Schlenoff, 2005; Zacharia vd., 2007). Bu çalışmada kullanılan



kitozan ve kazein de zayıf polielektrolitler olduğundan bu tür davranışlar sergileme olasılığı yüksek görülmektedir. Dolayısıyla, adsorpsiyon süresinin film oluşumuna etkisini gözlemek amacıyla 3 farklı daldırma süresi (2, 10 ve 20 dk) denenmiştir.



**Şekil 8.** UV-Vis spektrofotometri ile farklı pH birleşimlerinde adsorpsiyon süresinin katmanlı depozisyon olayına etkisinin izlenmesi. 280 nm'deki absorbans takip edilmiştir. Hata



çubukları standart sapmaları temsil etmektedir. a) % 0,2 (w/v) kitozan pH 3- % 0,2 (w/v) kazein pH 8, b) % 0,2 (w/v) kitozan pH 5,5- % 0,2 (w/v) kazein pH 5,5, c) % 0,2 (w/v) kitozan pH 5,5- % 0,2 (w/v) kazein pH 8.

Şekil 8'de görüldüğü gibi adsorpsiyon süresinin etkisi farklı pH birleşimlerinde farklı sonuçlar vermiştir. Her iki polielektrolitin de maksimum yük yoğunluğuna sahip olduğu pH 3- pH 8 birleşiminde, adsorpsiyon süresinden bağımsız olarak, ardışık depozisyon adımları sırasında yeterli artık yük miktarı sağlanamadığından katmanlı film oluşumunun gerçekleşmediği anlaşılmaktadır. Her iki polielektrolitin de ortalama (ve magnitud olarak neredeyse eşit) yük yoğunluğuna sahip olduğu pH 5,5-pH 5,5 birleşiminde ise, 10 ve 20 dakikalık daldırma sürelerinin film oluşumunda farklılık yaratmadığı, ancak 2 dakikalık daldırma süresinin katmanlı film oluşum doğrusunun eğiminde düşüşe neden olduğu görülmektedir. Bu durum, pH 5,5-5,5 birleşiminde katmanlı depozisyon işleminin adsorpsiyon süresine bağlı olarak farklı geliştiğine işaret etmektedir. Bu sonuç, aşağıda sonuçları tartışılan zamana bağlı YPR deneyleri ve AKM ile TEM analiz sonuçları ile de desteklenmektedir ve aşağıda tartışılmaktadır.

Şekil 8c'de kitozanın ortalama, kazeinin ise yüksek yük yoğunluğuna sahip oldukları pH 5,5-pH 8 birleşimlerinde elde edilen film oluşum eğrileri yer almaktadır. Burada pH 5,5-pH 5,5 birleşiminden farklı bir tablo sergilendiği görülmektedir. Öncelikle, tüm adsorpsiyon sürelerinde film oluşum eğrisinin 6 katmana kadar lineer olduğu, sonrasında bir platoya dönüşme eğilimi gösterdiği anlaşılmaktadır.

#### 4.3.3 Katman Sayısının Etkisi

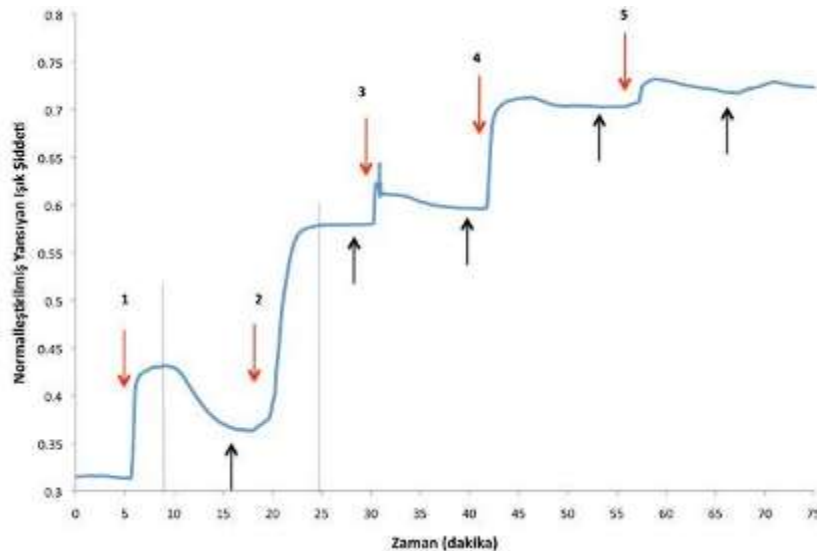
Şekil 8b'de görüldüğü gibi, pH 5,5-5,5 birleşiminde, 280 nm'deki absorpsiyon katman sayısı ile birlikte artmaktadır. Bu durum film oluşumunun devam ettiğine işaret etmektedir. Ancak, aşağıda tartışılan yüzey plazmon rezonans (YPR), atomik kuvvet mikroskobu (AKM) ve taramalı elektron mikroskobu (TEM) sonuçları bu film oluşumunun her adsorpsiyon adımında düzenli bir şekilde yeni bir katman oluşması şeklinde gerçekleşmediğini göstermiştir. YPR sinyalinde zamana (dolayısıyla katman sayısına) bağlı değişim katmanlı depozisyon olayının 5. katmandan sonraya sekteye uğrayarak, sonraki adımlarda film kalınlığında önemli bir değişim olmadığına işaret etmektedir (Şekil 10). Bu sonuç AKM ile kalınlık ölçüm sonuçları ile de desteklenmektedir (Tablo 4). Bunun yanında, AKM ve TEM görüntüleme ile 5 katmana kadar oluşturulan kaplamalarda tam bir yüzey kaplaması elde edilemediği, depozisyon işleminin devamı ile çıplak alanların da kaplandığı belirlenmiştir (Şekil 12, 15). Dolayısıyla, UV-Vis spektrometre analizlerinde katman sayısı ile birlikte görülen

absorbanstaki artışın, birbirini takip eden depozisyon adımları boyunca yüzeyde biriken toplam madde miktarını yansıttığı söylenebilir.

#### 4.4 YPR ile Katmanlı Depozisyon Deneyleri

##### 4.4.1 Katmanlı Depozisyonda Adsorpsiyonun Dengeye Geldiği Sürenin YPR ile Belirlenmesi

Kitozan ve sodyum kazeinatla katmanlı depozisyon işleminin dengeye geldiği süre, bir 'yerinde' karakterizasyon yöntemi olan YPR ile pH 5,5-5,5 birleşiminde gerçekleştirilen deneylerle belirlenmiştir. Katmanlı depozisyon işleminin 'yerinde' takibi için analiz sabit açılı modunda (Au ile  $\text{SiO}_2+\text{H}_2\text{O}$  arayüzeyinde yüzey plazmon rezonansı olayının gerçekleştiği açılı olan  $71,3^\circ$ 'de) yapılarak yansıma sinyalinin zamana bağlı değişimi direkt olarak gözlemlenmiş, böylece adsorpsiyonun dengeye geldiği süre (zamana bağlı YPR sinyalinin plato oluşturmaya başladığı süre) belirlenebilmiştir. Şekil 9'da ardışık olarak 5 katmana kadar tekrar edilen bu işleme ait zamana bağlı YPR sinyali değişimi gösterilmektedir. Şekilde kırmızı oklar kitozan/kazein çözeltilerinin enjekte edildiği zamanı, siyah oklar ise, durulama çözeltisinin enjekte edildiği zamanı temsil etmektedir. Göze yardımcı olması amacıyla çizilen dikey çizgiler ilk iki katmanda adsorpsiyonun dengeye geldiği (sinyalin platoya ulaştığı) zamanları göstermektedir. Şekilden de anlaşıldığı gibi, adsorpsiyonun dengeye geldiği sürenin 4-8 dakika olduğu görülmektedir. Sistemdeki minimal akış ( $10 \text{ uL/dk}$ ) da göz önünde bulundurulduğunda, durağan olan daldırılmalı katmanlı depozisyon deneylerinde adsorpsiyonun dengeye geldiği sürenin ortalama olarak 10 dakika olduğu düşünülmektedir.



**Şekil 9.** Sabit yüzey plazmon rezonansı (YPR) açısında ( $71,3^\circ$ ) zamana bağlı yansıyan ışık şiddeti değişimi (% 0,2 (w/v) kitozan – pH 5,5 + % 0,2 (w/v) kazein - pH 5,5). Kırmızı ve siyah oklar, sırasıyla daldırma ve yıkama çözeltilerinin enjekte edildiği zamanları göstermektedir. 1. ve 2. katmanların enjeksiyonundan sonra görülen dikey çizgiler adsorpsiyonun dengeye geldiği zamanı göstermektedir.

#### **4.4.2 Farklı Adsorpsiyon Sürelerinde Katmanlı Depozisyon İşleminin ‘Yerinde’ İzlenmesi**

Bu kısımda YPR deneyleri tarama modunda gerçekleştirilmiştir. Böylece, metal dielektrik arayüzeyinde gerçekleşen depozisyon olayına bağlı YPR açısındaki kayma zamana bağlı olarak gözlemlenebilmiştir. Şekil 10’da pH 5,5-5,5 birleşiminde 2 ve 10 dakika adsorpsiyon süreleri ile gerçekleştirilen deneylere ait grafikler yer almaktadır. Kırmızı oklar her depozisyon adımında numune (kitozan veya kazein) çözeltilerinin, mavi oklar ise durulama çözeltisinin enjekte edildiği zamanları göstermektedir. Örnek olarak, Şekil 10a incelendiğinde şu sonuçlar ortaya çıkmaktadır:

i. İlk enjeksiyon (1 numaralı ok) ile sensör üzerinde kitozan adsorpsiyonunun hızlı bir şekilde gerçekleşmeye başladığı, zamanla yüzeyde biriken birbirine zayıf bağlı fazla kitozan moleküllerinin akışla birlikte yüzeyden geri salınmaya başladığı görülmektedir. Altta kalan kitozan tabakasının yüzeye sıkıca tutunmuş olduğu, durulama çözeltisinin enjeksiyonu ile YPR açısında bir düşüş gözlemlenmemesinden (daha fazla yüzeyden salınma gerçekleşmediğinden) anlaşılmaktadır.

ii. İkinci adımda kazein çözeltisinin enjeksiyonu (2 numaralı ok) ile YPR açısında ani bir artış gözlemlenmektedir. Bu durum, bir önceki adımda yüzeye sıkıca tutunan kitozan moleküllerinin etkili bir biçimde yüzey yükünü tersine (pozitif) dönüştürmüş olduğunun göstergesidir. Zamanla kazein adsorpsiyonunun dengeye geldiği ve plato oluşturduğu görülmektedir. 10 dakika sonrasında durulama çözeltisinin akış hücreğine girmesiyle YPR açısında sürpriz bir artış görülmektedir. Bu durum, yüzeydeki kazein moleküllerinin oluşturduğu yapıların içine su moleküllerini hapsederek şişme göstermesinden kaynaklı olabilir.

iii. Üçüncü adımda kitozanın enjeksiyonu (3) ile YPR açısında yine ufak bir artış gözlemlenmektedir. Ancak, kısa süre sonra yerini YPR açısında düşüğe bırakmaktadır. Bu durumun yüksek olasılıkla altta üst üste kümelenmiş birbirine zayıf bağlı kazein moleküllerinin yüzeye tutunan pozitif yüklü kitozan molekülleri ile çözünebilir kompleksler oluşturarak yüzeyden salınmalarından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Proje



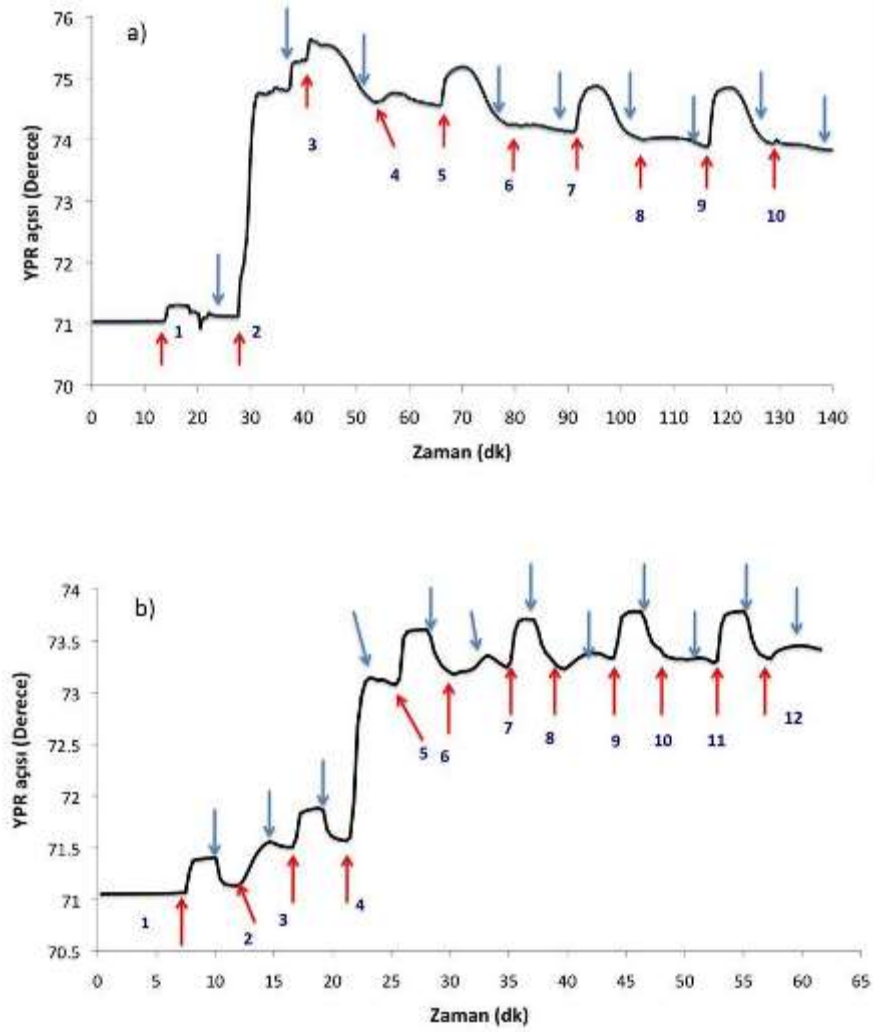
yürütücüsünün daha önceki çalışmasında da benzer bir durum gözlemlenmiştir (Bayramoğlu ve Stroeve, 2010).

iv. Sonraki depozisyon adımlarında da benzer şekilde, numune enjeksiyonu ile YPR açısında artış, zamanla adsorpsiyonun dengeye gelerek plato oluşturması ve akışla birlikte yüzeyde zayıf bağlı fazla materyalin yüzeyden salınması şeklinde gerçekleştiği görülmektedir.

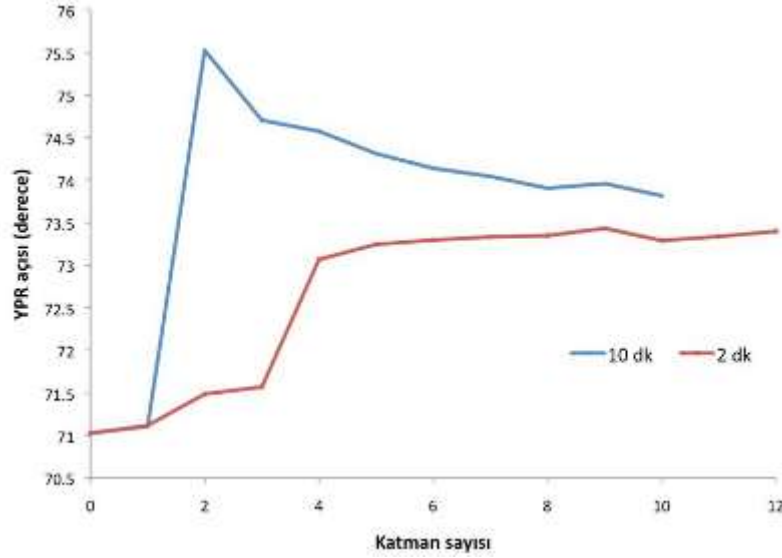
v. Dikkati çeken bir nokta ise, UV-Vis absorbans sonuçlarının işaret ettiği aksine, 5-6. katmandan sonra film kalınlığında artış olmadığı görülmektedir. Bu durum, aşağıda tartışılan AKM ve TEM görüntüleri ile açığa kavuşmaktadır. Analizler, 5-6. katmana kadar fasıllı bir kaplama oluşumu gözlemlenirken, depozisyonun devamı ile boşlukların doldurularak daha homojen bir kaplama oluştuğunu göstermektedir. Bunun yanında, kitozan ve kazein moleküllerinin katmanlar arası veya katman içi hareketliliğinin de etkisi olduğu düşünülmektedir. İlk 4-5 katmanın oluşması için geçen sürede alt katmanlardaki kitozan ve/veya kazein molekülleri birbirleri arasında difüze ederek yüzeyde bir saturasyona sebep olmuş, bu durum katmanlı depozisyonun devamı için gerekli olan yüzey yük değişimini engellediğinden depozisyon sekteye uğramış olabilir. Literatürde katmanlar arası difüzyonun tespit edildiği çalışmalar rapor edilmiştir (v Klitzing, 2006). Bu varsayım, AKM ve TEM analiz sonuçları ile de desteklenmekte ve ilgili kısımlarda tartışılmaktadır.

Şekil 10b'de aynı işlem 2 dk adsorpsiyon süresi ile tekrarlandığında elde edilen sonuçlar yer almaktadır. 10 dk adsorpsiyon süresi ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında, 2 dk adsorpsiyon süresi ile daha düzenli (desorpsiyon olayının sadece durulama aşamasında görüldüğü) bir film oluşumu gerçekleştiği görülmektedir. Ancak bu durum tüm yüzeyin etkin bir biçimde kaplandığı anlamına gelmemektedir. Zira, aşağıda sonuçları tartışılan AKM analizlerinden 2 dk adsorpsiyon süresi ile katmanlı depozisyon işleminin '*tamamlanmamış*' (tüm yüzeyin kaplanmadığı, fasıllı) katmanlar oluşturduğu anlaşılmaktadır. Bu durum, yukarıda verilen UV-Vis spektrofotometre sonuçları (2dk adsorpsiyon süresi ile 10 dk'ya göre daha düşük absorbans gözlemlenmesi) ile de desteklenmektedir. Aynı zamanda, 2 dk adsorpsiyon süresi ile de LbL kaplama oluşumunun 5. katmandan sonra sekteye uğradığı ve elde edilen kaplamanın 10 dk adsorpsiyon süresi ile elde edilen kaplamadan daha ince olduğu görülmektedir (Bu sonuç, atomik kuvvet mikroskobu analiz sonuçları ile de desteklenmektedir). Elde edilen bulgular, beklenildiği üzere 2 dakikanın adsorpsiyonun dengeye gelmesi için yeterli olmadığına işaret etmektedir. 10 dakikanın ise daha fazla madde depozisyonuna neden olduğu kadar, meydana gelen çözünebilir komplekslerin yüzeyden salınmasına olanak verecek kadar uzun bir süre sağlıyor olduğuna işaret etmektedir.





**Şekil 10.** Adsorpsiyon süresinin kitozan ve sodyum kazeinatın katmanlı deposizyon olayına etkisinin yüzey plazmon rezonansı (YPR) ile izlenmesi. a) 10 dk adsorpsiyon süresi, b) 2 dk adsorpsiyon süresi. (% 0,2 (w/v) konsantrasyonlarında, pH 5,5-pH 5,5 birleşiminde çalışılmıştır. Kırmızı oklar kitozan ve kazein solüsyonlarının, mavi oklar ise yıkama solüsyonlarının enjekte edildiği zamanları göstermektedir. İlk katman kitozan katmanıdır.)



**Şekil 11.** Kitozan ve sodyum kazeinatın farklı adsorpsiyon süreleri ile gerçekleştirilen katmanlı depozisyon olayında yüzey plazmon rezonansı (YPR) açısının (depozit edilen madde miktarının) katman sayısına göre değişimi. (% 0,2 (w/v) konsantrasyonlarında, pH 5,5-pH 5,5 birleşiminde çalışılmıştır.)

Yüzey plazmon rezonansı tekniğinin diğer bir özelliği de, elde edilen YPR eğrilerinin Fresnel eşitliğine uydurulması ile katman kalınlığı ve refraktif indeks değerlerinin belirlenebiliyor olmasıdır. Ancak, bu hesaplamalar arayüzeyde biriken filmin doğrusal, homojen ve izotropik olduğu varsayımıyla yapılmaktadır. AKM ve TEM ile görüntüleme ile elde edilen bulgular, bu çalışmada elde edilen LbL kaplamalar için bu varsayımın doğru olmayacağını göstermiştir. Zira, bu varsayım doğrultusunda gerçekleştirilen Fresnel simülasyonları ile YPR sensörü üzerindeki Cr, Au ve SiO<sub>2</sub> katman kalınlıkları doğru bir biçimde hesaplanabilmişken, sensör üzerinde oluşturulan LbL kaplamalar için hesaplanan katman kalınlık ve refraktif indeks değerlerinin gerçeği hiçbir şekilde yansıtmadığı görülmüştür. Bu durumun kitozan ve kazein ile belirtilen koşullarda gerçekleştirilen katmanlı depozisyon işleminde yüzeyden geri salınım (desorpsiyon), çözünür tümleşik yapıların oluşumu vb. olayların kontrol edilememiş olmasından dolayı - AKM ve TEM görüntüleme ile de anlaşıldığı gibi - tüm yüzeyin homojen bir şekilde kaplanamamış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. YPR eğrilerinin Fresnel benzetiminin homojen olmayan katmanların nicel karakterizasyonu için uygun olmadığı anlaşıldığından, katman kalınlıkları hesaplanamamıştır. Kısım 6.2'de sensör üzerindeki metal ve SiO<sub>2</sub> katmanların WinSpall 3.02 yazılımı ile Fresnel benzetimi sonucu elde edilen katman kalınlık ve refraktif indeks değerleri örnek olarak verilmiştir.

#### 4.5 AKM Analizleri

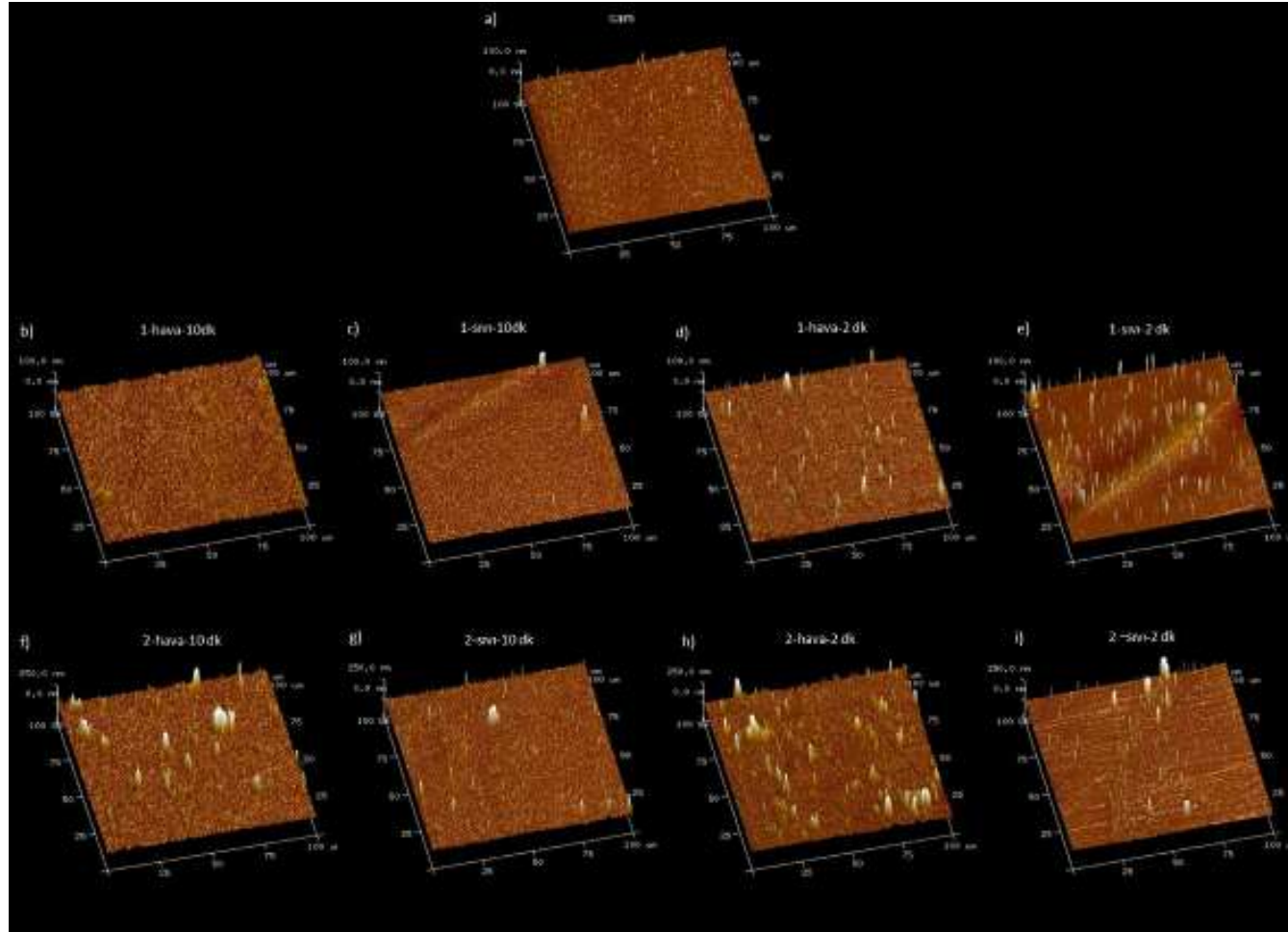
Şekil 12'de % 0,2 (w/v) konsantrasyonlarında ve pH 5,5-5,5 birleşiminde başarılı bir şekilde elde edilen LbL kaplamaların hava ve sıvı ortamlarda taranan yüzeylerin 3 boyutlu görüntüleri yer almaktadır. Hava ve sıvı taramalarından elde edilen yüzey topoğrafyalarını doğru bir şekilde karşılaştırabilmek için, her katmanın data skalası kendi içinde eşitlenmiştir. 10 dk adsorpsiyon süresi ile elde edilen kaplamalarda son katman hariç her katman için hava ve sıvı ortamlarda alınan yüzey topoğrafyası görüntüleri karşılaştırıldığında, sıvı taramalarının hava taramalarına nazaran daha homojen ve pürüzsüz bir yüzey yapısına işaret ettiği görülmektedir. Bu tablo aşağıda verilen yüzey pürüzlülüğü sonuçları ile desteklenmektedir (Tablo 3). Ancak, bu durum numunelerin hazırlanması ile yüzey taramalarının gerçekleşmesi arasında geçen süre ile ilişkilidir. Sıvı ortamdaki taramalar, cihazın akış hücresinde her katman oluşturulduktan hemen sonra alınmışken, havada taramalar, numunelerin dışarıda hazırlanarak bir desikatörde kurumaya bırakılmasından sonra alınmıştır. Dolayısıyla, sıvı ortamdaki taramalar katmanlı depozisyon olayının 'yerinde' karakterizasyonunu sağlarken, havada taramalar katmanlı depozisyon ile elde edilen kaplamaların kuruduktan sonraki yüzey yapılarının karakterizasyonunu sağlamaktadır. İkinci koşulda, özellikle düşük sayıdaki katmanlar için yüzey pürüzlülüğünün yüksek olmasının nedeni, numunelerin kurumaya bırakıldığı ekstra süre içerisinde (ortamdaki su yavaş yavaş uzaklaştığından) moleküllerin hareketliliklerine devam ederek, hem düzlemsel hem de katmanlar arası difüzyonları sonucu küme yapıların meydana gelmesi olarak açıklanabilir. Şekil 12 f, j, n'de 2, 5 ve 6. katmana ait yüzey taramalarında belirgin bir şekilde görünen adacıkların varlığı da buna işaret etmektedir. Literatürde yer alan benzer çalışmalarda da depozisyon adımları arası kurutma işleminin daha pürüzlü yüzeyler oluşmasına neden olduğu rapor edilmiştir (Lvov vd., 1999). Ayrıca, yukarıda değerlendirilen YPR sonuçları da, kitozan ve kazeinin pH 5,5-5,5 birleşimindeki katmanlı depozisyonunun 5-6. katmana kadar devam ettiğine işaret etmektedir. Bu durumun moleküllerin katmanlar arası veya katman içi hareketliliğinden dolayı oluşan tümeşik yapıların yüzeyde saturasyona sebebiyet vermesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Literatürde zayıf polielektrolitler ile katmanlı depozisyonda katmanlar arası difüzyonun tespit edildiği çalışmalar yer almaktadır (V Klitzing, 2006). Katmanlı depozisyonun işleminin devam etmesi ile (11-12. katmana kadar) depozisyonun yüzeyde çıplak kalan alanlarda gerçekleşerek daha homojen ve fasılasız kaplamalar elde edildiği TEM analizleri ile görülmektedir (Şekil 15).

Şekil 12'de dikkat çeken diğer bir nokta, son katmanın yüzey morfolojisinin, diğer katmanlar için yukarıda analizi yapılan durumun aksine, hem hava (Şekil 12r) hem de sıvı taramalarında (Şekil 12s) benzer özellikler göstermesidir. Tablo 3'te verilen yüzey pürüzlülüğü değerlerine bakıldığında da, 12. katmana ait hava ve sıvı taramalarında elde edilen değerlerin istatistiksel olarak belirgin farklar göstermediği anlaşılmaktadır. Yukarıda

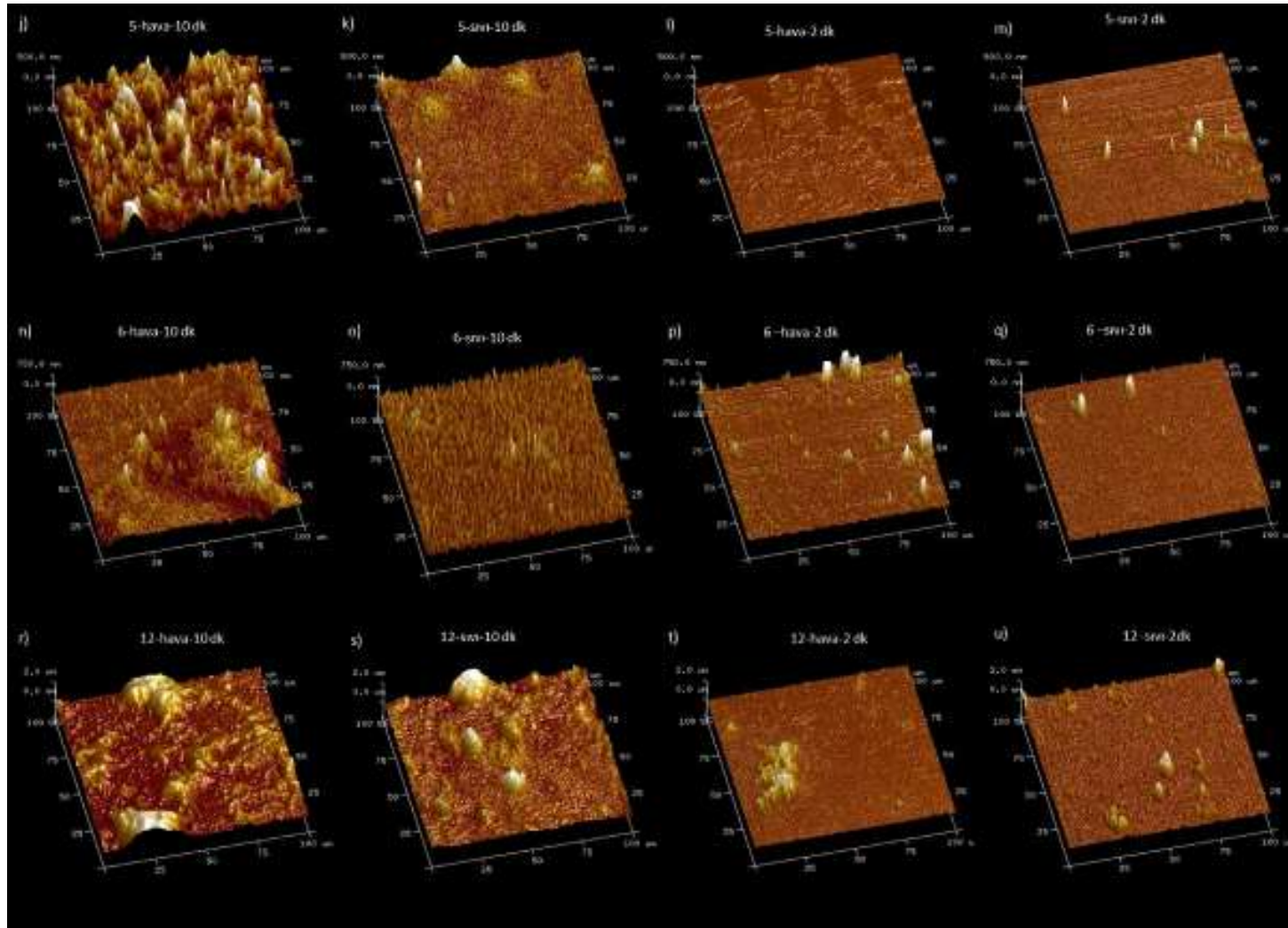


bahsedildiği gibi 5. katmandan sonra katmanlı depozisyon olayı yüzey satürasyonundan solayı sekteye uğramakta, sonraki adsorpsiyon adımları boyunca moleküllerin katmanlar arası ve düzlemsel hareketleri ise devam etmektedir. Dolayısıyla, sıvı ortamda 'yerinde' karakterizasyonu gerçekleştirilen katmanlı depozisyon olayının 12. katmanda sonlandırılmasına kadar geçen sürede (her katman için 10'ar dakika + ara katmanların taraması için toplamda yaklaşık 2 saat) katmanlar arası difüzyon olayının dengeye geldiği anlaşılmaktadır.

2 dk adsorpsiyon süresi ile elde edilen kaplamaların yüzey taramaları (Şekil 12) ve hesaplanan yüzey pürüzlülüğü değerlerine (Tablo 3) bakıldığında ise, hem hava/sıvı ortamı taramalarının hem de katman sayısının yüzey pürüzlülüğüne etkisi olmadığı anlaşılmaktadır. Bu durumun 2 dakikanın adsorpsiyonun dengeye gelmesi için yeterli bir süre olmamasıyla ilintili olduğu düşünülmektedir. Yüzeyde fasıllı katmanlar oluştuğundan, hava ortamındaki analizler için harcanan ekstra sürenin moleküllerin özellikle düzlemsel (katman içi) difüzyonuna katkısı olmadığı anlaşılmaktadır. 2 dk adsorpsiyon süresi ile fasıllı katmanlar oluştuğu Şekil 13'teki sıvı hücre taramalarından açıkça görülmektedir. 10 dk adsorpsiyon süresi ile elde edilen katmanlarla karşılaştırıldığında, 2 dk adsorpsiyon süresinin tam anlamıyla yüzey kaplamı sağlamadığı, dolayısıyla birbirini izleyen katmanların morfolojisi arasında belirgin farklılıklar oluşmadığı anlaşılmaktadır. Oysa 10 dk ile katmanlı depozisyon olayında ilk katmandan 12. katmana doğru gidildikçe farklı yapılardaki kitozan ve kazein katmanlarının oluşumu açıkça gözlemlenmektedir. Ayrıca katman sayısı arttıkça moleküller arası tümleşik yapıların arttığı ve gittikçe büyüyen adacıkların oluştuğu da görülmektedir. Bu sonuçlar YPR analizlerini destekler niteliktedir.

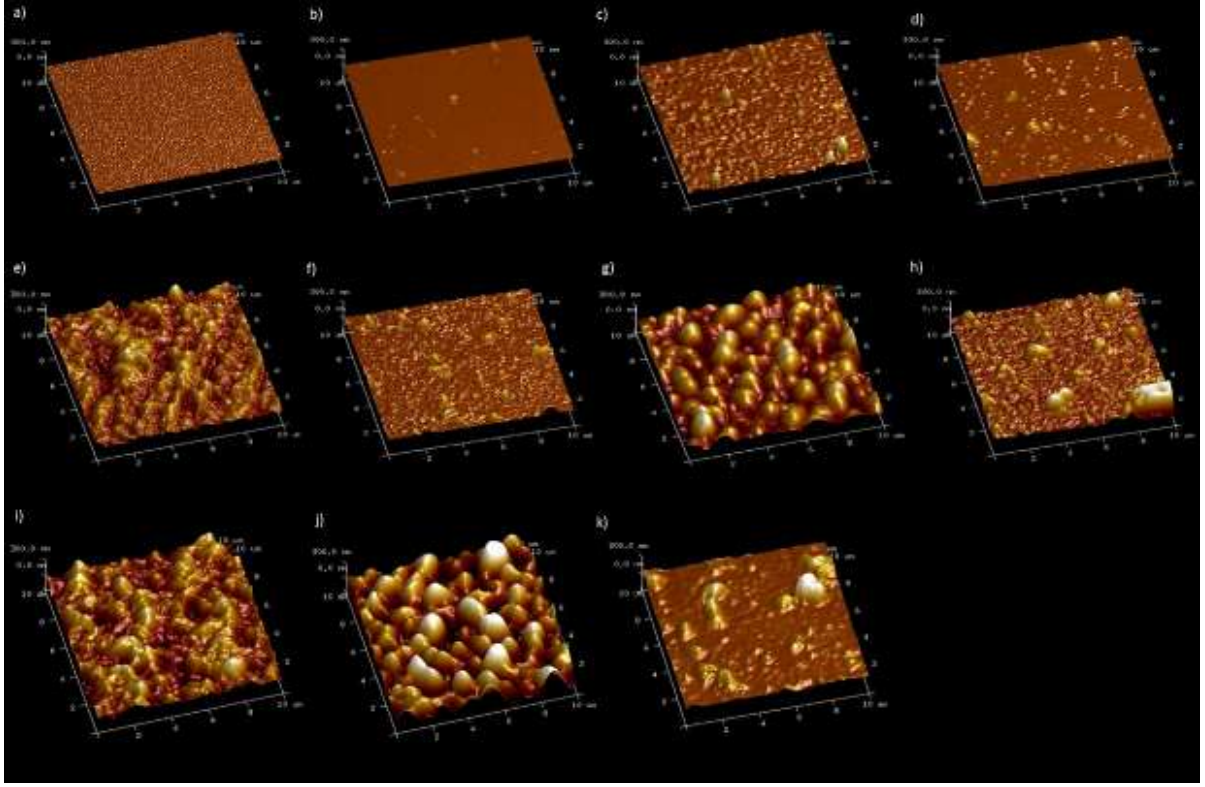


**Şekil 12.** Atomik kuvvet mikroskobu ile katman sayısı ve adsorpsiyon süresinin yüzey morfolojisine etkilerinin belirlenmesi. Taramalar  $100 \times 100 \text{ um}^2$ lik alanlarda, hava ve sıvı ortamda gerçekleştirilmiştir. (a)Boş cam yüzey, (b)1. katman-hava-10 dk, (c)1. katman-sıvı-10 dk, (d)1. katman-hava-2 dk, (e)1. katman-sıvı-2 dk, (f)2. katman-hava-10 dk, (g)2. katman-sıvı-10 dk, (h)2. katman-hava-2 dk, (i)2. katman-sıvı-2 dk,



**Şekil 13 (devam).** (j) 5. katman-hava-10 dk, (k) 5. katman-sivi-10 dk, (l) 5. katman-hava-2 dk, (m) 5. katman-sivi-2 dk, (n) 6. katman-hava-10 dk, (o) 6. katman-sivi-10 dk, (p) 6. katman-hava-2 dk, (q) 6. katman-sivi-2 dk, (r) 12. katman-hava-10 dk, (s) 12. katman-sivi-10 dk, (t) 12. katman-hava-2 dk, (u) 12. katman-sivi-2 dk.





**Şekil 14.** Sıvı ortamdaki ('*yerinde*') atomik kuvvet mikroskobu taramaları ile katman sayısı ve adsorpsiyon süresinin yüzey morfolojisine etkilerinin belirlenmesi. Taramalar  $10 \times 10 \text{ um}^2$ 'lik alanlarda gerçekleştirilmiş olup, görüntüler aynı data skalasına ayarlanmıştır. (a) 1. katman-kitozan-10 dk, (b) 1. katman-kitozan-2 dk, (c) 2. katman-kazein-10 dk, (d) 2. katman-kazein-2 dk, (e) 5. katman-kitozan-10 dk, (f) 5. katman-kitozan-2 dk, (g) 6. katman-kazein-10 dk, (h) 6. katman-kazein-2 dk, (i) 11. katman-kitozan-10 dk, (j) 12. katman-kazein-10 dk, (k) 12. katman-kazein-2 dk.

Tablo 3'te adsorpsiyon süresinin katman yüzey pürüzlülüğüne etkisi de görülmektedir. Katmanların oluştuğu andaki yapılarının karşılaştırılmasına imkan tanıyan sıvı ortam taramalarında 2dk adsorpsiyon süresi ile 10 dk adsorpsiyon süresinin yüzey pürüzlülüğüne etkileri sadece 12. katmanda istatistiksel olarak farklı bulunmuştur. 10 dk adsorpsiyon süresi ile elde edilen 12 katmanlı yapının yüzey pürüzlülüğü 2 dk ile elde edilenden yüksek görünmektedir. Bunda 2 dk adsorpsiyon süresi ile katmanlı depozisyonun 5. katmandan sonra tamamiyle durmuş olmasının ve elde edilen kaplamanın kalınlıkça 10 dk ile elde edilenden düşük olmasının (Tablo 4) payı olduğu düşünülmektedir. Yüzeyde oluşan katmanların kurutulduktan sonraki morfolojilerinin karşılaştırılmasına imkan tanıyan hava





ortamındaki taramalarda ise, 6. katman dışındaki katmanlarda 10 dk adsorpsiyon süresinin 2 dk'ya göre daha pürüzlü yüzeyler oluşturduğu görülmektedir.

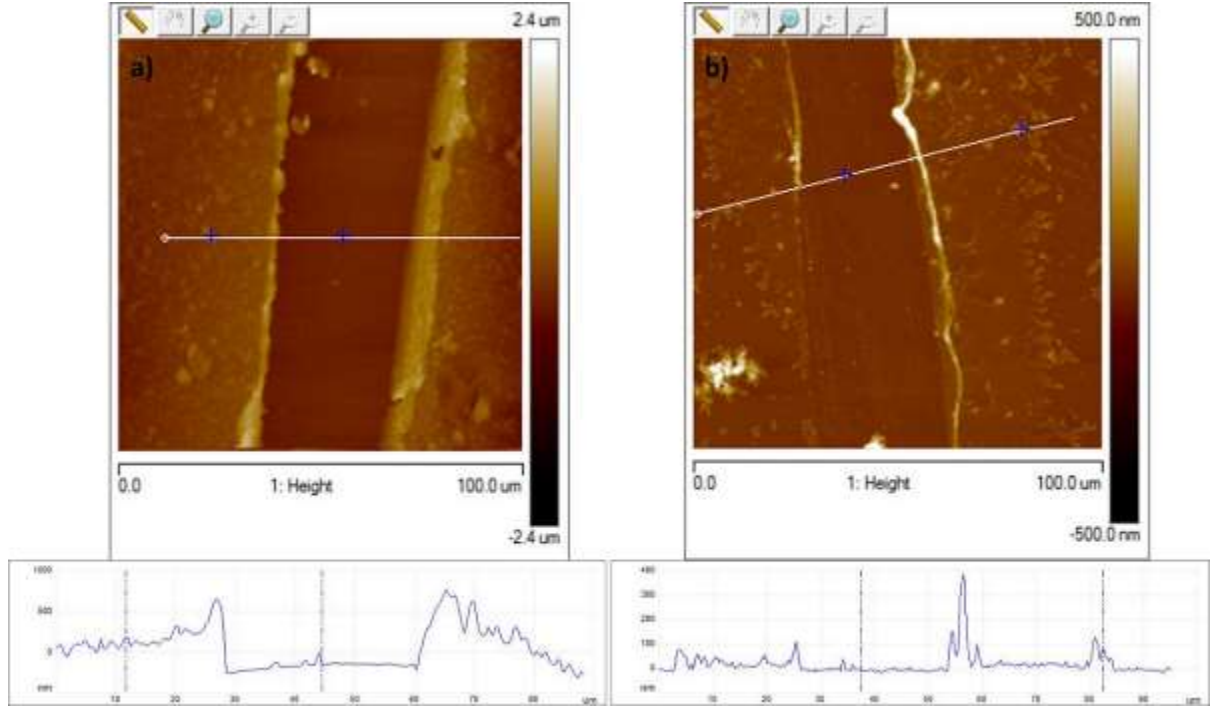
**Tablo 3.** LbL kaplamaların yüzey pürüzlülüğünün katman sayısı ve adsorpsiyon süresine bağlı değişimi. (Atomik kuvvet mikroskobu ile hava ve sıvı ortamlarda 100x100  $\mu\text{m}^2$ lik yüzey taramaları ile elde edilmiştir. İstatistiksel olarak belirgin farklılıklar Tekli Varyans Analizi ile test edilmiş ve belirgin farklar ( $p \leq 0.05$ ) Tukey testi ile belirlenmiştir. Her kolonda farklı üstel harflere sahip değerler ve her satırda farklı bazal harflere sahip değerler önemli ölçüde farklı bulunmuştur.)

Ortam/Katman sayısı	2 dk.		10 dk.	
	$R_{\text{rsm}} \text{ (nm)} \pm \text{SD}$	$R_{\text{a}} \text{ (nm)} \pm \text{SD}$	$R_{\text{rsm}} \text{ (nm)} \pm \text{SD}$	$R_{\text{a}} \text{ (nm)} \pm \text{SD}$
<b>Hava-5. katman</b>	$z33,18 \pm 30,93^{\text{d}}$	$\underline{Z}20,00 \pm 27,60^{\text{A}}$	$vwx248,67 \pm 45,35^{\text{ab}}$	$\underline{VW}203,33 \pm 43,98^{\text{A}}$
<b>Hava-6. katman</b>	$wxyz107,00 \pm 106,84^{\text{ab}}$	$\underline{XYZ}69,89 \pm 80,69^{\text{A}}$	$vwxy237,33 \pm 48,42^{\text{abc}}$	$\underline{VWXYZ}178,67 \pm 59,01^{\text{AB}}$
<b>Hava-12. katman</b>	$xyz83,77 \pm 75,97^{\text{ab}}$	$\underline{Z}46,73 \pm 50,84^{\text{A}}$	$vw237,80 \pm 119,84^{\text{ab}}$	$\underline{VWX}181,40 \pm 96,85^{\text{A}}$
<b>Sıvı-5. katman</b>	$z35,25 \pm 10,92^{\text{ab}}$	$\underline{Z}12,34 \pm 2,53^{\text{A}}$	$yz35,80 \pm 3,52^{\text{c}}$	$\underline{YZ}26,70 \pm 4,70^{\text{B}}$
<b>Sıvı-6. katman</b>	$z37,64 \pm 10,53^{\text{ab}}$	$\underline{Z}15,84 \pm 3,55^{\text{A}}$	$wxyz99,80 \pm 30,06^{\text{bc}}$	$\underline{VWXYZ}81,73 \pm 25,62^{\text{AB}}$
<b>Sıvı-12. katman</b>	$vwxyz171,25 \pm 104,65^{\text{a}}$	$\underline{WXYZ}97,10 \pm 66,28^{\text{A}}$	$v331,67 \pm 82,51^{\text{a}}$	$\underline{V}237,67 \pm 55,97^{\text{A}}$

**Tablo 4.** LbL kaplamalarda kalınlığın katman sayısı ve adsorpsiyon süresine bağlı değişimi. (Atomik kuvvet mikroskobu ile hava ortamında taramalardan (100x100  $\mu\text{m}^2$ ) çizik yöntemi ile elde edilmiştir. İstatistiksel olarak belirgin farklılıklar Tekli Varyans Analizi ile test edilmiş ve belirgin farklar ( $p \leq 0.05$ ) Tukey testi ile belirlenmiştir. Her kolonda farklı üstel harflere sahip değerler ve her satırda farklı bazal harflere sahip değerler önemli ölçüde farklı bulunmuştur.)

Katman no.	Toplam kalınlık (nm) $\pm$ SD	
	2 dak.	10 dak.
1. katman	z49,75 $\pm$ 16,82 <sup>a</sup>	yz90,17 $\pm$ 20,69 <sup>bc</sup>
2. katman	z48,85 $\pm$ 94,31 <sup>a</sup>	z31,67 $\pm$ 14,26 <sup>c</sup>
5. katman	z38,89 $\pm$ 28,42 <sup>a</sup>	xy200,17 $\pm$ 113,68 <sup>ab</sup>
6. katman	z35,47 $\pm$ 58,44 <sup>a</sup>	yz98,50 $\pm$ 59,34 <sup>bc</sup>
12. katman	z33,60 $\pm$ 28,21 <sup>a</sup>	x269,67 $\pm$ 98,25 <sup>a</sup>

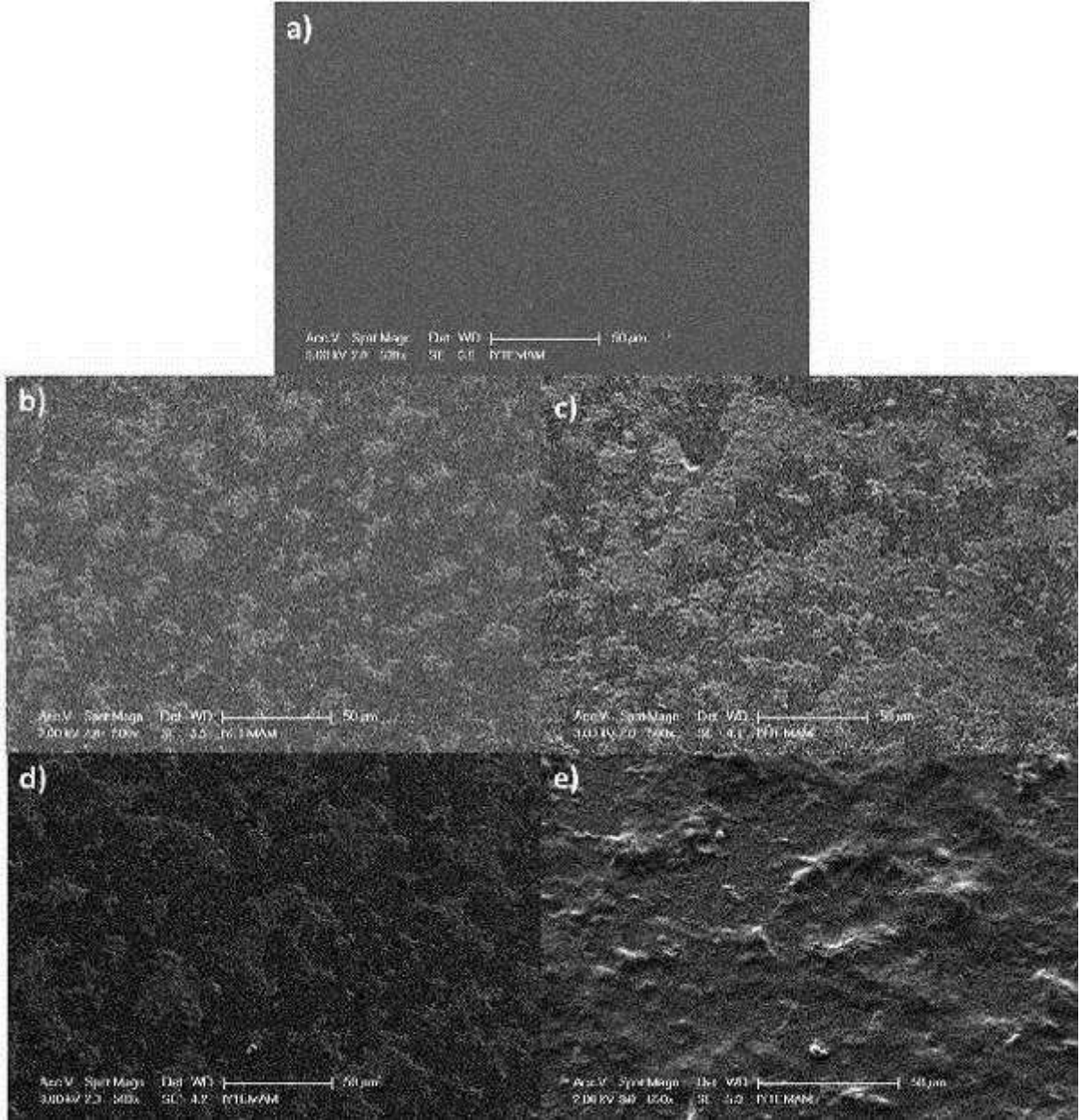
Tablo 4'te verilen katman kalınlığı değerleri incelendiğinde, yukarıda değerlendirilen YPR sonuçlarının doğrulanmış olduğu görülmektedir. Her iki adsorpsiyon süresi ile elde edilen kaplamalarda, 5. ve 12. katman kalınlıklarının istatistiksel olarak belirgin bir farklılık göstermediği anlaşılmaktadır. Bu da, YPR ile elde edilmiş olan kitozan ve kazein ile katmanlı depozisyonun 5. katmandan sonra sekteye uğradığı çıkarımını doğrulamaktadır. Dolayısıyla, 10 dk adsorpsiyon süresi ile katmanlı depozisyon işleminde YPR ve AKM sonuçları bir arada değerlendirildiğinde, katmanlı depozisyon sırasında kitozan ve kazein moleküllerinin katmanlar arası/içi difüzyonu ile meydana gelen tümleşik yapıların yüzeyde satürasyona neden olduğu, bunun da depozisyonun devamı için gerekli olan yüzey yük değişimini engellemesine ve böylece işlemin sekteye uğramasına sebep olduğu anlaşılmaktadır. 2 dk adsorpsiyon süresiyle katmanlı depozisyon işleminde ise, katman oluşumunun 'tamamlanmamış' olduğu, hem 1. katmandan 12. katmana kadar kalınlıklarda istatistiksel olarak belirgin farklar görülmemesinden, hem de 10 dk ile elde edilen kaplamaların çok daha yüksek kalınlık değeri vermiş olmasından anlaşılmaktadır. Şekil 14'te her iki adsorpsiyon süresi ile elde edilen kaplamalarda çizik yöntemi ile katman kalınlığı tayinine örnek resimler yer almaktadır.



**Şekil 15.** Havada atomik kuvvet mikroskobu taramaları ile katman kalınlıklarının çizik yöntemiyle belirlenmesi. Taramalar  $100 \times 100 \text{ } \mu\text{m}^2$ lik alanlarda yapılmıştır. Her görüntünün altında şekildeki beyaz kesit çizgisine ait yükseklik profili verilmektedir. (a) 12. katman-10 dk adsorpsiyon süresi, (b) 12. katman-2 dk adsorpsiyon süresi.

#### 4.6 TEM Analizleri

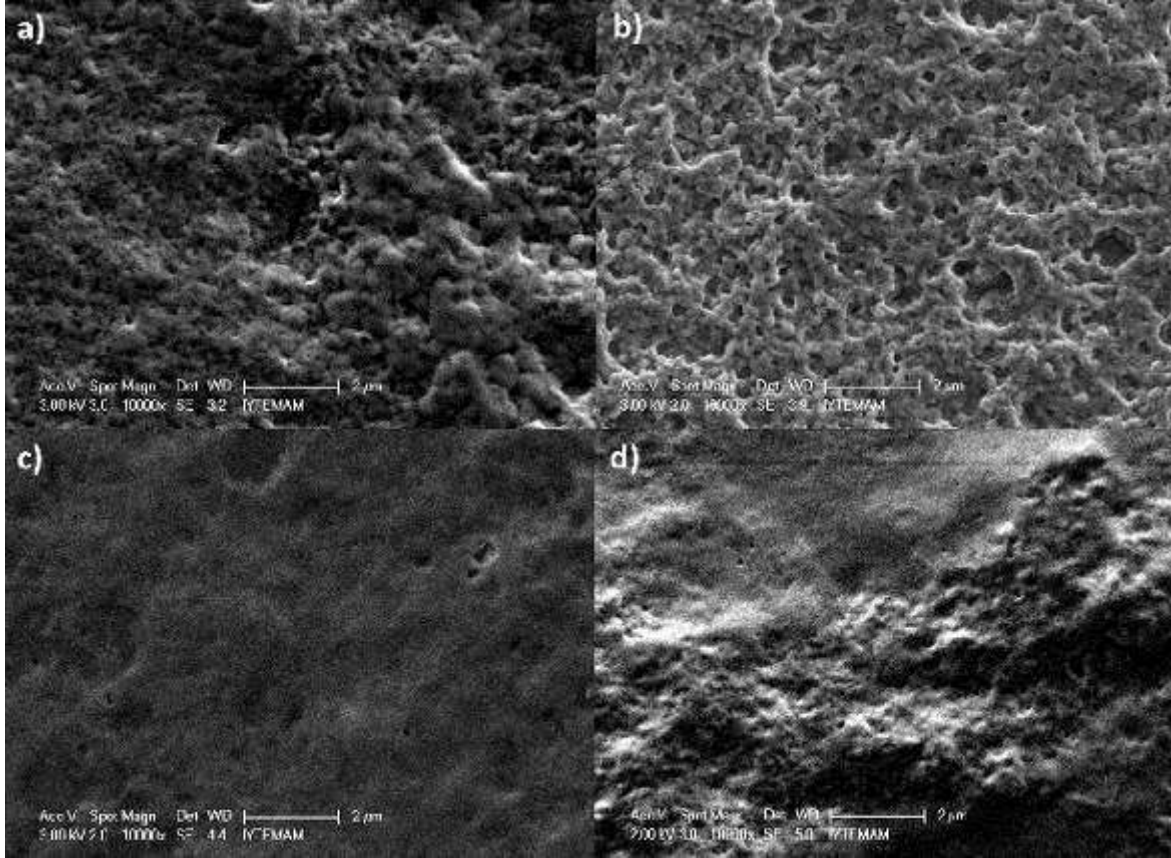
Şekil 15'te yüzeyi koronalı boş PP filmin ve film üzerine katmanlı depozisyon yöntemi ile elde edilen kaplamaların TEM yüzey görüntüleri yer almaktadır. Görüntülerden 2 dk adsorpsiyon süresi ile yüzeyde tamamiyle homojen ve fasılasız bir film oluşturulmadığı anlaşılmaktadır. 10 dk adsorpsiyon süresi ile 2 dk'ya göre daha homojen ve fasılasız, ancak daha pürüzlü (katman kalınlığının referans düzlemde daha değişken olduğu) katmanlar elde edildiği görülmektedir. Bunun nedeni yukarıda tartışıldığı üzere, moleküllerin katmanlar arası ve içi hareketliliğinden kaynaklı tümleşik yapıların meydana gelmesidir. 2 dk adsorpsiyon süresinin 10 dk'ya göre depozisyonun dengeye gelmesi açısından yetersiz olduğu TEM görüntülerinden de açıkça anlaşılmaktadır. Tüm bu sonuçlar AKM analiz sonuçlarını destekler niteliktedir.



**Şekil 16.** Koronali polipropilen film ve katmanlı depozisyon ile üzerine hazırlanan kaplamaların taramalı elektron mikroskobu ile elde edilen yüzey görüntüleri. (a) Boş koronali polipropilen film, (b) 5. Katman-2 dk adsorpsiyon süresi, (c) 5. Katman-10 dk adsorpsiyon süresi, (d) 12. Katman-2 dk adsorpsiyon süresi, (e) 12. Katman-10 dk adsorpsiyon süresi.

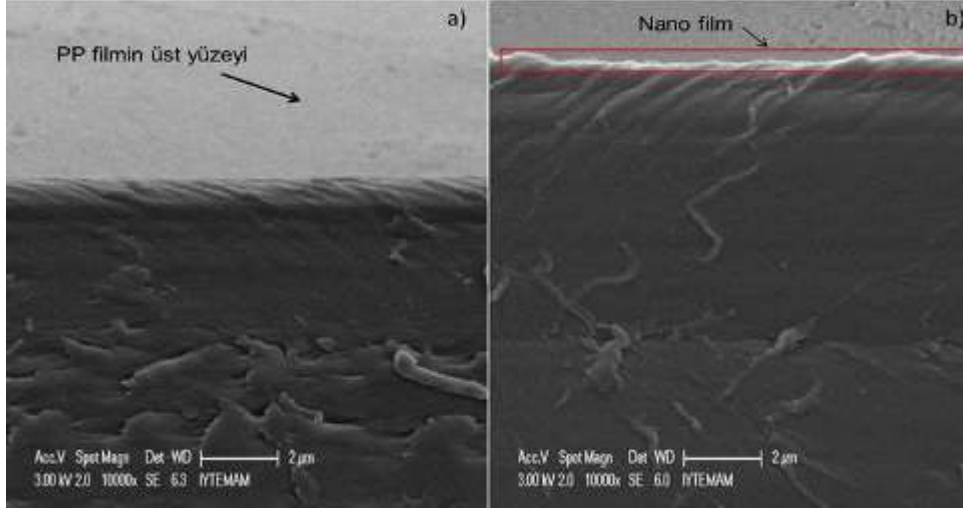
Şekil 16'da kitozan ve kazein katmanlarının yüzey morfolojileri arasındaki farkın net bir şekilde görülebildiği daha küçük ölçekli görüntüler yer almaktadır. Kitozan katmanları daha örümcekli bir yapıya sahipken, kazeinin adsorpsiyonu ile boşlukların doldurulduğu ve daha pürüzsüz bir yapı elde edildiği görülmektedir. 2 dk ile 10 dk adsorpsiyon sürelerinin bu yapıya etkisi görülmemektedir.





**Şekil 17.** Kitozan ve kazein katmanlarının yüzey morfolojilerinin taramalı elektron mikroskobu ile karşılaştırılması. (a) 5. Katman (kitozan)- 2dk, (b) 5. katman (kitozan)-10 dk, (c) 12. katman-2 dk, (d) 12. katman-10 dk.

Şekil 17’de boş polipropilen film ve üzerinde hazırlanan 12 katmanlı kaplamanın kesit görüntüleri yer almaktadır. TEM’in duyarlılığının getirmiş olduğu kısıtlamalar ve elde edilen kaplamaların nano-ölçekte olması (~270 nm) dolayısıyla LbL kaplamanın beligin bir şekilde ayırt edilemediği görülmektedir. Ancak, boş PP filmin kesit görüntüsü ile karşılaştırıldığında kaplamanın varlığı ayırt edilebilmektedir. Boş filmin kesit yüzeyinin üst yüzeye yakın kısmı düz ve keskin bir çizgi şeklinde görünürken, kaplamalı filmin kesit yüzeyinin üst yüzeye yakın kısmı Şekil 17b’de görüldüğü gibi dalgalı bir yapıdadır. 2dk adsorpsiyon süresi ile 10 dk’ya göre oldukça ince ve fasılalı kaplamalar elde edilmiş olduğundan, yukarıda bahsedilen kısıtlamalar sebebiyle TEM ile filmin ayırt edilebileceği bir kesit görüntüsünün elde edilemeyeceği aşikardır. Bu nedenle 2 dk adsorpsiyon süresi ile hazırlanan kaplamaların kesit görüntüsü alınmamıştır.



**Şekil 18.** Koronali boş polipropilen (PP) film ile 10 dk adsorpsiyon süresi ile katmanlı depozisyon sonucu kaplanmış PP filmin kesit yüzeylerinin taramalı elektron mikroskobu ile karşılaştırılması. (a) boş PP filmin kesit yüzeyi (b) kaplanmış (12 katman) PP filmin kesit yüzey görüntüsü.

#### 4.7 Oksijen ve Su Buharı İletim Hızı

Tablo 5'te 10 dk adsorpsiyon süresinde katmanlı depozisyon ile başarılı bir şekilde elde edilen kaplamaların oksijen ve su buharı iletim hızı ölçüm sonuçları yer almaktadır. Görüldüğü gibi, substrat olarak kullanılan koronali polipropilenin (PP) oksijen ve su buharı iletim hızı ile PP+LbL kaplamaların oksijen ve su buharı iletim hızları arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Aynı zamanda katman sayısının da gaz geçirgenliği üzerinde etkili olmadığı anlaşılmaktadır. Elde edilen kaplamaların AKM ve TEM ile belirlenen kalınlık ve yüzey morfolojileri göz önünde bulundurulduğunda, bu durumun olağan olduğu görülmektedir. Literatürdeki benzer çalışmalarda, oksijen ve su buharı bariyer özelliğine sahip olduğu iddia edilen LbL kaplamaların kalınlığının ~500 nm civarında olduğu ve kaplamanın substratın çift tarafına gerçekleştirildiği bilinmektedir (de Medeiros vd., (2011, 2012). Bu çalışmada elde edilen LbL kaplamaların ise, substratın tek tarafında oluşturulmuş olması ve kalınlığın ~ 250 nm civarında olması koronali PP filmin gaz bariyer özelliğinde iyileşme görülememesini anlaşılır kılmaktadır. Kısım 4.4.2'de tartışılan YPR analizleri katmanlı depozisyon işleminin 5-6. katmandan sonra sekteye uğradığını göstermektedir. Bu nedenle daha kalın bir LbL yapı elde edilememiştir. Ancak, yüzeyde satürasyona sebebiyet vererek katmanlı depozisyon işleminin sekteye uğramasına neden olan moleküllerin katmanlar arası veya katman içi hareketliliğini ve/veya moleküller arası çözünür komplekslerin oluşarak yüzeyden geri salınımını engelleyecek çapraz bağlayıcı ajanların

kullanımı ile daha kalın kaplamalar elde edilebileceği düşünülmektedir. İlerideki bir projede değerlendirilmesi planlanmaktadır.

2 dk adsorpsiyon süresi ile 10 dk'ya göre çok daha ince ve 'tamamlanmamış' kaplamalar elde edilmiş olduğu AKM ve TEM analizleri ile tespit edilmiş olduğundan, bu yapıların gaz bariyer özelliğine sahip olmayacağı öngörülerek su buharı ve oksijen iletim hızı ölçümleri gerçekleştirilmemiştir.

**Tablo 5.** 10 dk adsorpsiyon süresi ile elde edilen kaplamaların oksijen ve su buharı iletim hızına katman sayısının etkisi. (İstatistiksel olarak belirgin farklılıklar Tekli Varyans Analizi ile test edilmiş ve belirgin farklar ( $p \leq 0.05$ ) Tukey testi ile belirlenmiştir. Her kolonda farklı üstel harflere sahip değerler önemli ölçüde farklılığı temsil eder.)

Örnek	Oksijen iletim hızı (ml/m <sup>2</sup> .gün.atm)mm	Su buharı iletim hızı (g/m <sup>2</sup> .gün.mmHg)mm
Koronalı propilen (PP) film	287,8 ± 0,0 <sup>A</sup>	6,57 ± 0,02 <sup>a</sup>
Koronalı PP + 5 katman	265,0 ± 39,7 <sup>A</sup>	6,24 ± 0,10 <sup>a</sup>
Koronalı PP + 12. katman	284,5 ± 12,0 <sup>A</sup>	5,95 ± 0,42 <sup>a</sup>

#### 4.8 Kontak Açısı

Durağan damla metodu ile ölçümü gerçekleştirilen yüzey kontak açısı değerleri Tablo 6'da verilmiştir. Düşük kontak açısı değerlerinin hidrofilik yüzeylere, yüksek değerlerin ise hidrofobik yüzeylere işaret ettiği bilinmektedir. Sonuçlar incelendiğinde şu değerlendirmeler yapılabilir:

i. Boş cam substratın yüzeyi hidrofilik özellikte iken, katmanların oluşumu ile hidrofobik özellik kazandığı görülmektedir. Dolayısıyla, kitozan ve kazeinin moleküler yapılarının yüzey kimyasında sebep oldukları değişim sonucu yüzeye hidrofobik özellik kazandırdığı söylenebilir. Her iki polielektrolitin de yüzey yük yoğunluğunun düşük olmasının etkili olduğu düşünülmektedir.

ii. Her iki adsorpsiyon süresinde de 5. katmanın (kitozan) en hidrofobik olduğu anlaşılmaktadır. Kitozan katmanı için tespit edilen kontak açısı değeri (71-88<sup>o</sup>) benzer çalışmalarındaki sonuçlarla paralellik göstermektedir (Acevedo-Fani vd., 2015). Bunun dışında, katman sayısı arttıkça yüzeyin hidrofilik özellik kazandığı görülmektedir. Bu durum, katmanlı depozisyon işlemi ilerledikçe artan toplam işlem süresine paralel olarak katmanlar arası



geçişim (interpenetrasyon) olayının artmasından kaynaklanıyor olabilir. Şekil 12'de katmanlar arası geçişim açıkça görülmektedir. Böyle bir durumda yüzeyin ıslanırılık özelliği en son depozit edilen polimerden çok, her iki polimerin karışımından kaynaklı olmaktadır (Acevedo-Fani vd., 2015; Yoo vd., 1998. Başka bir etken ise, kazeinin su tutması sebebiyle katmanda şişme görülmesi olabilir (Pinheiro vd., 2012).

iii. 2 dk adsorpsiyon süresi ile 10 dk'ya göre tüm katmanlarda daha hidrofobik yüzeyler elde edildiği görülmektedir. Bu durum da yukarıdaki neden-sonuç ilişkileriyle ilintili olabilir.

**Tablo 6.** LbL kaplamaların yüzey kontak açısına (KA) katman sayısı ve adsorpsiyon süresinin etkileri. (Su damlası yüzeye değdikten 30 sn sonra ölçüm alınmıştır. İstatistiksel olarak belirgin farklılıklar Tekli Varyans Analizi ile test edilmiş ve belirgin farklar ( $p \leq 0.05$ ) Tukey testi ile belirlenmiştir. Her kolonda farklı üstel ve her satırda farklı bazal harflere sahip değerler önemli ölçüde farklı bulunmuştur.)

Örnek	KA(°)-2 dk	KA(°)-10 dk
Boş cam	$z41,971 \pm 7,075^d$	$z41,971 \pm 7,075^D$
5. katman (kitozan)	$v88,075 \pm 15,188^a$	$wx71,443 \pm 11,241^A$
6. katman (kazein)	$w78,766 \pm 7,495^b$	$xy64,258 \pm 4,207^B$
12. katman (kazein)	$x67,213 \pm 5,258^c$	$y57,005 \pm 5,032^C$

#### 4.9 Renk Tayini

Elde edilen kaplamaların renk parametreleri üzerinde adsorpsiyon süresi ve katman sayısının etkilerini görmek için ölçümler 2 dk ve 10 dk adsorpsiyon süreleri ile hazırlanan 5 ve 12 katmanlı kaplamalar üzerinde Kısım 3.2.13'te belirtildiği şekilde yapılmıştır. Tablo 7'de kontrol örnek (koronalı PP film) ve kontrol üzerinde hazırlanmış kaplamaların  $L^*$ ,  $a^*$  ve  $b^*$  değerleri verilmektedir.  $L^*$  açıklık (aydınlık) koordinatlarını temsil ederken,  $a^*$  ve  $b^*$ , sırasıyla, yeşil-kırmızı ve sarı-mavi koordinatları temsil etmektedir.

Tablo 7'de  $L^*$  değerlerinin oldukça yüksek olduğu görünmektedir. Bu durum örneklerin saydam olması ve ölçümlerin beyaz bir fon üzerinde alınmış olmasından kaynaklanmaktadır. LbL kaplamaların koronalı PP filmin aydınlık derecesini arttırdığı görülmektedir. 10 dk adsorpsiyon süresi ile hazırlanan kaplamalarda katman sayısı arttıkça aydınlık derecesi de artmaktadır. Bu durum yüzeyde biriken madde miktarı arttıkça kaplamaların beyazımsılaştığı anlamına gelebilir. Bu durum, sadece 10 dk adsorpsiyon süresi ile hazırlanan 12 katmanlı yapılarda çıplak gözle ayırt edilebilecek derecede gelişmiştir. Aydınlık derecesindeki artış

miktarının oldukça düşük olduğu göz önünde bulundurulduğunda, her iki adsorpsiyon süresi ile de oldukça saydam kaplamalar elde edildiği söylenebilir.

Kontrol filmle üzeri LbL film kaplı kontrol filmlerin  $a^*$  ve  $b^*$  değerleri karşılaştırıldığında, kırmızılık ve mavilik derecelerinde ufak bir artış olduğu görülmektedir. İstatistiksel olarak önemli bir artış olduğu tespit edilmiş olmasına rağmen, artış miktarı ve tüm koordinat skalası birlikte değerlendirildiğinde, her iki adsorpsiyon süresi ile de elde edilen kaplamaların renksiz olduğunu söylemek yanlış olmayacaktır. Saydam ve renksiz olan kontrol film üzerinde hazırlanan kaplamalar çıplak gözle değerlendirildiğinde renksiz oldukları kanısına varılmaktadır.

**Tablo 7.** Koronali polipropilen (PP) üzerinde hazırlanan LbL kaplamalarda katman sayısı ve adsorpsiyon süresinin film renk parametrelerine etkisi. (İstatistiksel olarak belirgin farklılıklar Tekli Varyans Analizi ile test edilmiş ve belirgin farklar ( $p \leq 0.05$ ) Tukey testi ile belirlenmiştir. Her kolonda farklı üstel ve her satırda farklı bazal harflere sahip değerler önemli ölçüde farklı bulunmuştur.)

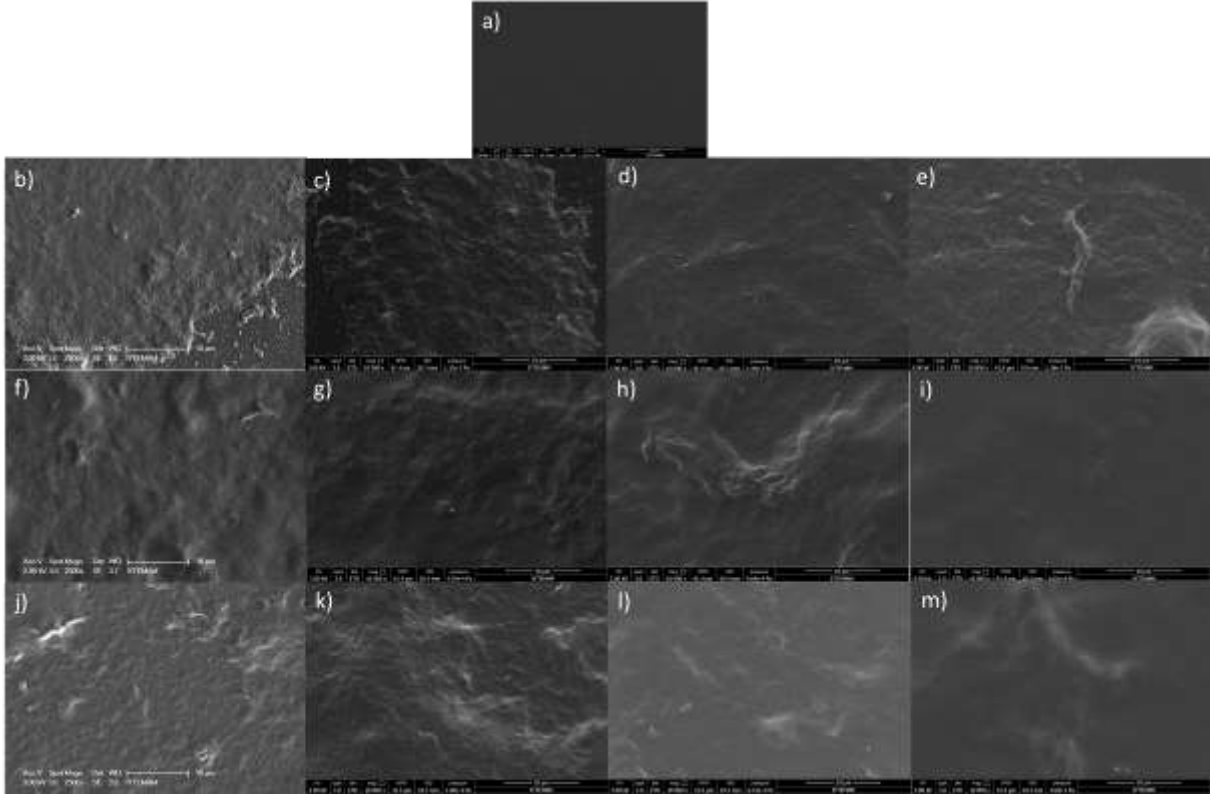
Örnek	$L^*$		$a^*$		$b^*$	
	2 dk	10 dk	2 dk	10 dk	2 dk	10 dk
Kontrol PP	$z90,115 \pm 0,1132^B$	$z90,115 \pm 0,1132^C$	$\underline{z}1,2885 \pm 0,02641^C$	$\underline{z}1,2885 \pm 0,02641^C$	$\underline{X}-3,132 \pm 0,04785^A$	$\underline{X}-3,132 \pm 0,04785^A$
Kontrol PP + 5 katman	$xy92,0125 \pm 0,1078^A$	$y91,957 \pm 0,13393^B$	$\underline{v}2,546 \pm 0,07301^B$	$\underline{w}2,6995 \pm 0,04784^A$	$\underline{Y}-5,07 \pm 0,11299^B$	$\underline{Z}-5,1895 \pm 0,06984^B$
Kontrol PP +12 katman	$y91,974 \pm 0,09549^A$	$x92,074 \pm 0,10485^A$	$\underline{x}2,6515 \pm 0,04158^A$	$\underline{w}2,695 \pm 0,03501^A$	$\underline{Z}-5,1605 \pm 0,06411^C$	$\underline{Z}-5,1945 \pm 0,03886^B$

#### 4.10 Stabilite Deneyleri

% 0,2 (w/v) konsantrasyonlarında, pH 5,5-5,5 birleşiminde, 10 dk adsorpsiyon süresi ile başarılı bir şekilde elde edilen kaplamaların bütünlüğü ve stabilitesi zorlaştırılmış koşullarda, 2 farklı ortamda test edilmiştir. Katman sayısı ve üst katman çeşidinin stabilite üzerindeki etkilerini görebilmek adına analizler, 5., 11. ve 12. katmanlar için gerçekleştirilmiştir.

Depolama veya nakliye sırasında uygun sıcaklık koşullarının sağlanamaması durumunda kaplamaların yapısında (mikrobiyal büyümeye bağlı) herhangi bir değişiklik olup olmayacağını araştırmak üzere, numuneler % 93 bağıl nemde ve oda sıcaklığında (25<sup>0</sup>C) 21 gün boyunca bekletilmiştir. Kaplamaların 5., 15. ve 21. günlerdeki, 4<sup>0</sup>C'de muhafaza edilen kontrol numunelerinin ise 21. gündeki TEM görüntüleme ile karşılaştırılan yüzey morfolojileri

Şekil 18'de yer almaktadır. Görüntüler tüm katmanlarda herhangi bir mikrobiyal büyümenin gerçekleşmediğine ve yüzeylerin mikro yapısında zamana bağlı bir değişimin olmadığına işaret etmektedir. Üst katman çeşidinin de bu koşullardaki stabiliteye etkisi olmadığı anlaşılmaktadır.



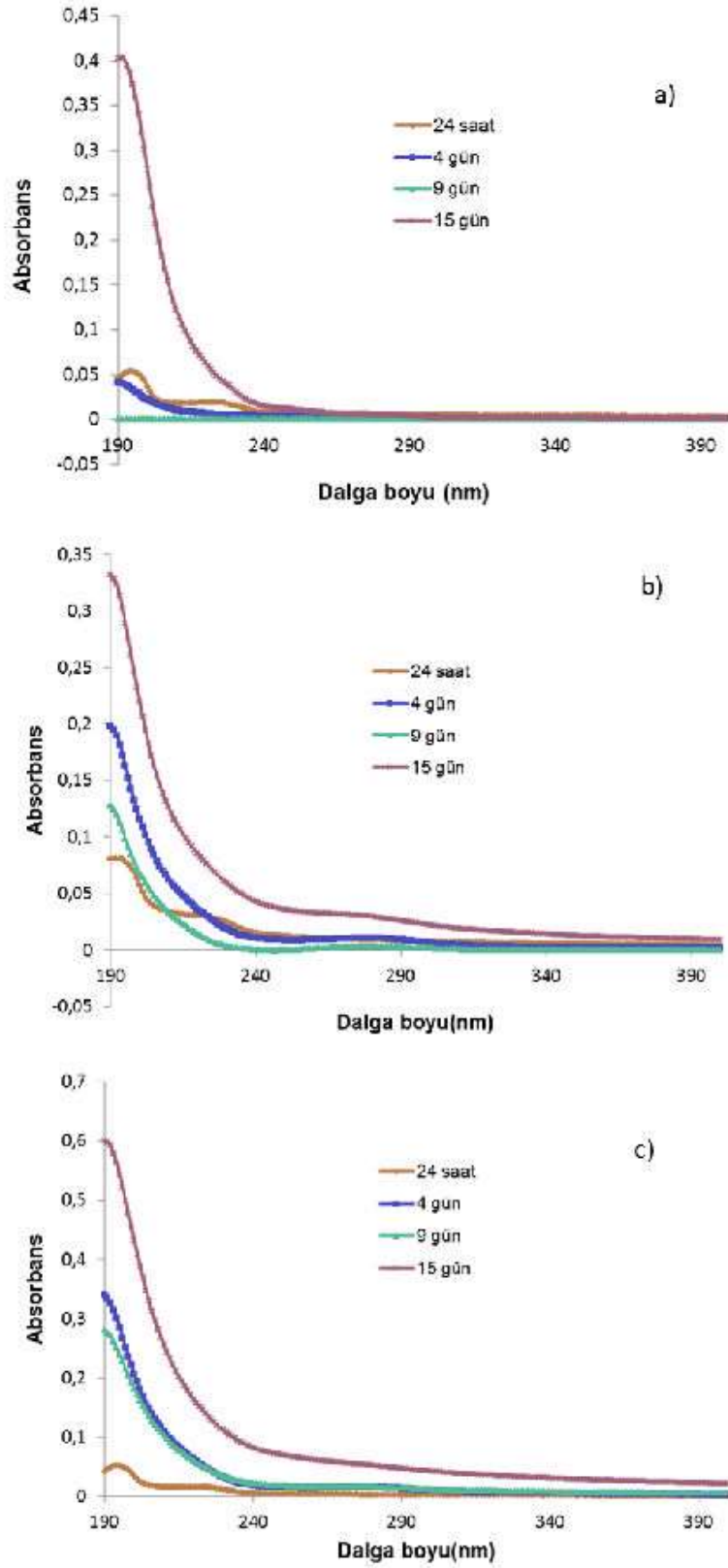
**Şekil 19.** Katman sayısı ve üst katman çeşidinin % 93 bağıl nemde oda sıcaklığında (25<sup>0</sup>C) saklanan kaplamaların yüzey morfolojileri üzerindeki zamana bağlı etkileri. Kontrol örnekler % 93 bağıl nemde 4<sup>0</sup>C'de muhafaza edilmiştir. a) Koronalı polipropilen, b) 5. Katman - 5. Gün, c) 5. Katman - 15. Gün, d) 5. Katman - 21. Gün, e) 5. Katman - 5. Gün - 4<sup>0</sup>C, f) 11. Katman - 5. Gün, g) 11. Katman - 15. Gün, h) 11. Katman - 21. Gün, i) 11. Katman - 21. Gün - 4<sup>0</sup>C, j) 12. Katman - 5. Gün, k) 12. Katman - 15. Gün, l) 12. Katman - 21. Gün, m) 12. Katman - 21. Gün - 4<sup>0</sup>C.

İkinci olarak, LbL kaplamaların su ile temas halinde bütünlüklerini koruyup koruyamadıkları test edilmiştir. Örnekler 15 gün boyunca içi saf su dolu ağzı kapalı bir saklama kabında, oda sıcaklığına (25 °C) ayarlı bir inkübatörde saklanmıştır. Kaplamalarda suda çözünmeye dayalı zamana bağlı herhangi bir kayıp olup olmadığı UV-Vis spektrometre ile kaplamaların daldırıldığı saf su örneklerinin 190-400 nm dalga boyu aralığındaki absorpsiyon spektrumları incelenerek belirlenmiştir (Şekil 19). Örneklerin yüzey morfolojileri de, 24 saat, ve 15. günlerde TEM ile görüntülenerek karşılaştırılmıştır (Şekil 20). UV-Vis spektrofotometre analizleri kaplamalarda zamana bağlı kayıpların olduğuna işaret

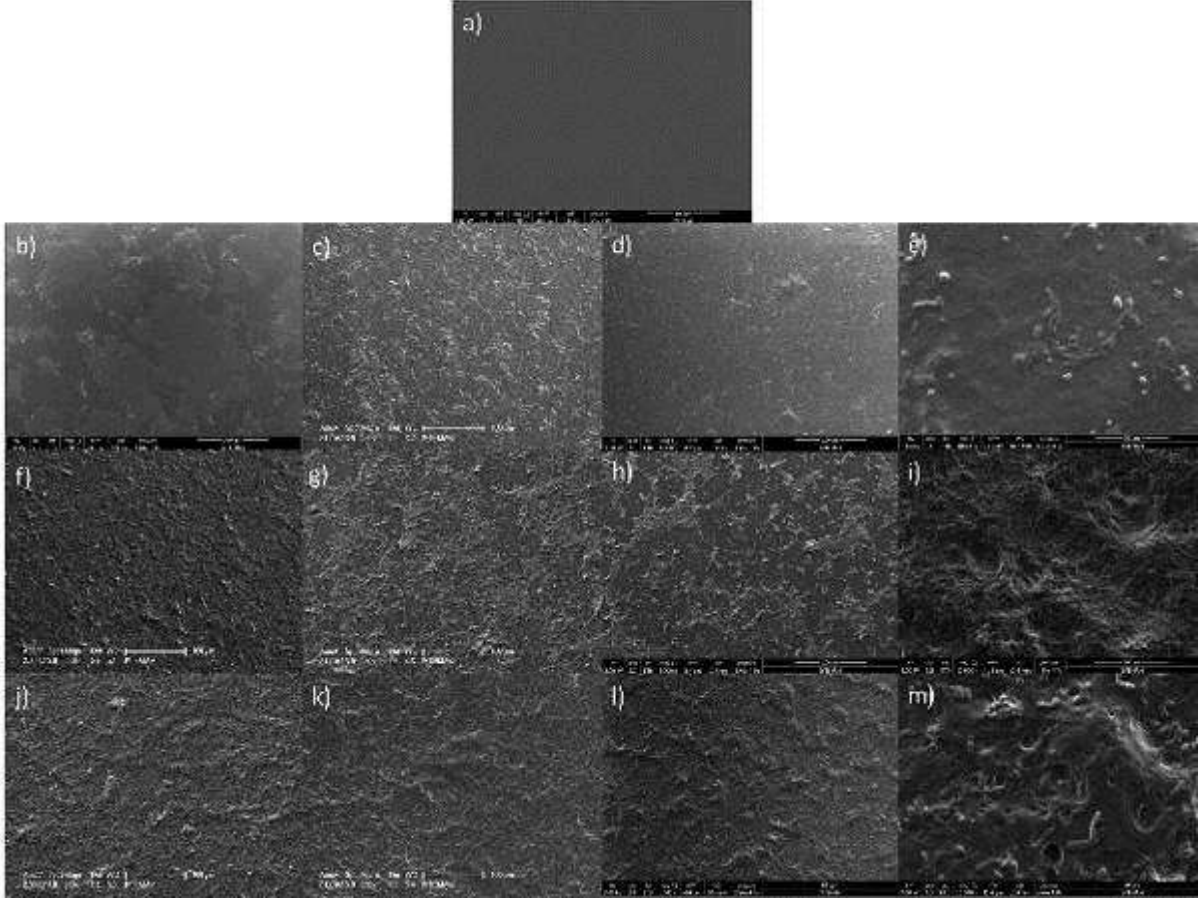


etmektedir. 5. katmanda ilk 24 saat ile 9 gün içerisinde çözünerek geri salınan madde miktarı önemli bir farklılık göstermezken, 15 gün sonunda artış göstermektedir (Şekil 18a). Yüzeyde zamana bağlı olarak gelişen erozyon ise, Şekil 20b-d'de açıkça görülmektedir. 11. ve 12. katmanlarda erozyonun 5. katmana göre zamana bağlı olarak daha devamlı bir şekilde gerçekleştiği hem UV-Vis spektrofotometre (Şekil 18b,c) hem de TEM görüntülerinden (Şekil 20f-h, j-l) anlaşılmaktadır. Bunda, kaplamaların oluşturulduğu 0. günde 5. katmanda tüm yüzeyin homojen bir şekilde kaplanmamış olmasının (Şekil 20b) etkisi olduğu düşünülmektedir.

Şekil 20 e,i,m'de tüm katmanların 15. gün sonundaki yüzey morfolojileri küçük ölçekte gösterilmektedir. Burada dikkati çeken nokta 5. ve 12. katmanlarda mikrobiyal büyüme gözlemlenmiş olmasıdır. Kazeince zengin olan 12. katmanda mikrobiyal büyüme gözlemlenirken, kitozanca zengin olan 11. katmanda mikrobiyal büyümenin tespit edilmemiş olması kitozanın olası antimikrobiyal etkisinden kaynaklanıyor olabilir. Ancak, bunu kesin bir dille ifade edebilmek için ilgili antimikrobiyal testlerin gerçekleştirilmesi gerekir. Kitozanca zengin olan (kazeine göre) 5. katmanda 15 gün sonunda gözlemlenen mikrobiyal büyümenin ise, kaplamanın çoğunlukla erozyona uğramış olmasından kaynaklandığı anlaşılmaktadır (Şekil 20e'deki küçük ölçekli görüntüde mikroorganizmaların çıplak PP yüzeyinde yoğunlaştığı gözlemlenmektedir). Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, elde edilen kaplamalarda suda çözünmeye bağlı kayıpların ve bozunmanın katman sayısı ve üst katman çeşidine bağlı olduğu anlaşılmaktadır. Elde edilen kaplamaların suda zamana bağlı olarak erozyona uğramasının, YPR analizlerinde tartışıldığı üzere, kitozan ve kazein arasında suda çözünebilir kompleksler oluşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



**Şekil 20.** Suda bekletilen a) 5 katmanlı, b) 11 katmanlı, c) 12 katmanlı LbL kaplamalarda zamanla suda çözünmeye bağlı kayıpların UV-Vis spektrofotometre ile takibi.



**Şekil 21.** Katman sayısı ve üst katman çeşidinin suda 15 gün boyunca bekletilen LbL kaplamaların yüzey morfolojileri üzerindeki zamana bağlı etkilerinin taramalı elektron mikroskobu ile analizi. Kontrol örnekler aynı koşullarda muhafaza edilen boş koronali polipropilen filmlerdir. a) Koronali polipropilen, b) 5. Katman - 0. gün, c) 5. Katman - 24 saat, d) 5. Katman - 15. Gün, e) 5. Katman - 15. Gün - 10 um ölçekli , f) 11. Katman - 0. Gün, g) 11. Katman - 24 saat, h) 11. Katman - 15. Gün, i) 11. Katman - 15. Gün - 10 um ölçekli, j) 12. Katman - 0. Gün, k) 12. Katman - 24 saat, l) 12. Katman - 15. Gün, m) 12. Katman - 15. Gün - 10 um ölçekli.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada kitozan ve sodyum kazeinat ile katmanlı depozisyon işlemine çözeltilerin pH değeri, her depozisyon adımında daldırma (adsorpsiyon) süresi ve katman sayısının etkileri incelenmiştir. Film oluşumu UV-Vis spektrofotometre ile takip edilmiştir. Sonuçlar, başarılı bir şekilde katmanlı (LbL) kaplama oluşumunun her iki polielektrolitin de ortalama etkili yüzey yük yoğunluğuna sahip olduğu pH 5,5-pH 5,5 birleşiminde gerçekleştiğini, kitozan pH 3-kazein pH 8 ve kitozan pH 5,5-kazein pH 8 birleşimlerinde ise film oluşumunun



gerçekleşmediğini göstermiştir. Bu pH birleşimlerinde katmanlı depozisyon işleminin sekteye uğramasının nedeninin, her iki polielektrolitin de bir sonraki depozisyon adımında ortam pH'nın değişmesiyle iyonlaşma davranışında keskin bir değişime uğraması ve böylece katmanlı depozisyonun devamı için gerekli yüzey 'artık' yük miktarının sağlanamaması olduğu düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlar, literatürde daha önce rapor edilen zayıf polielektrolitlerle çok katmanlı film oluşumu için ortalama bir iyonlaşma derecesinin uygun olduğu iddiasını desteklemektedir. Film karakterizasyonu yalnızca pH 5,5-5,5 birleşiminde hazırlanan kaplamalarda gerçekleştirilmiştir.

UV-Vis spektrofotometre ve film oluşumunun '*yerinde*' gözlemlenmesine olanak sağlayan yüzey plazmon rezonansı (YPR) analizleri, LbL kaplama oluşumunun adsorpsiyon süresine bağlı olarak farklı geliştiğine işaret etmektedir. Her iki adsorpsiyon süresinde de kitozan ve kazein arasında meydana gelen çözünür küme yapıların yüzeyden geri salınma olayının gerçekleştiği görülmüştür. Elde edilen kaplamaların yüzey morfolojileri atomik kuvvet mikroskobu (AKM) ve taramalı elektron mikroskobu (TEM) ile incelenmiştir. YPR, AKM ve TEM analiz sonuçları bir arada değerlendirildiğinde, katmanlı depozisyon sırasında kitozan ve kazein moleküllerinin katmanlar arası/içi difüzyonu ile meydana gelen tümleşik yapıların yüzeyde satürasyona neden olduğu, bu durumun depozisyonun düzenli bir şekilde devamı için gerekli olan yüzey yük değişimini engelleyerek işlemin sekteye uğramasına sebep olduğu anlaşılmıştır. 2 dk daldırma süresinin adsorpsiyonun dengeye gelmesi için yeterli olmaması sebebiyle, katman sayısından bağımsız olarak fasıllı kaplamalar elde edildiği görülmüştür. 10 dk adsorpsiyon süresi ile ise, 5-6 katmana kadar (çözünür komplekslerin yüzeyden geri salınımı dolayısıyla) benzer bir resim görülmüş olmakla birlikte, işlem devam ettikçe çıplak alanların da doldurularak daha homojen ve fasılsız filmler elde edildiği belirlenmiştir. Ancak, yüzey satürasyonu dolayısıyla film kalınlığında artış gözlemlenememiştir.

Sıvı ve hava ortamındaki AKM analizleri depozisyon adımları arası kurutma işleminin daha pürüzlü yüzeylerin oluşmasına sebep olduğunu göstermiştir. Bunun nedeni, numunelerin kurumaya bırakıldığı ekstra süre içerisinde moleküllerin hareketliliklerine devam ederek, hem düzlemsel hem de katmanlar arası difüzyonları sonucu küme yapıların meydana gelmesi olarak açıklanabilir. 10 dk adsorpsiyon süresi ile 2 dk'ya göre daha homojen ve fasılsız, ancak daha pürüzlü (katman kalınlığının referans düzlemde daha değişken olduğu) katmanlar elde edildiği görülmüştür. 2 dk adsorpsiyon süresi ile hazırlanan kaplamalarda katman sayısının yüzey pürüzlülüğüne etkisi olmadığı görülmüştür.

Çalışmada başarılı bir şekilde elde edilen LbL kaplamaların koronali polipropilenin (PP) su buharı ve oksijen bariyer özelliğinde çok ince (~250 nm) olmalarından dolayı herhangi bir iyileştirme gerçekleştirmediği belirlenmiştir. Bunun yanında, renk ölçümleri saydam ve renksiz kaplamalar elde edildiğini göstermiştir.



Kontakt açısı ölçümleri ile elde edilen kaplamaların hidrofobik yüzeylere sahip olduğu belirlenmiştir. Bunda her iki polielektrolitin de yüzey yük yoğunluğunun düşük olmasının etkili olduğu düşünülmektedir. Kitozan katmanının daha hidrofobik olduğu ve katman sayısı arttıkça kaplamaların hidrofilik özelliğinde bir artış gözlemlenmiştir. Bu durumun, katmanlı depozisyon işlemi ilerledikçe artan toplam işlem süresine paralel olarak katmanlar arası geçişim (interpenetrasyon) olayının artmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Başarılı bir şekilde elde edilen kaplamaların stabilitesi test edilmiştir. Depolama veya nakliye sırasında , çoğu meyve ve sebzenin saklanma koşulu olan % 93 bağıl nemde, uygun sıcaklık koşullarının sağlanamaması durumunda kaplamaların yapısında (mikrobiyal büyümeye bağlı) herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir. Ancak, oda sıcaklığında suda 15 gün boyunca bekletilen kaplamaların yüzeyinde zamana bağlı olarak gelişen bir erozyon tespit edilmiştir. Bu durumun yukarıda bahsi geçen çözünebilir komplekslerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar doğrultusunda, kitozan ve kazeinin katmanlı depozisyonunda, moleküllerin hem katmanlar arası ve katman içi hareketliliğini hem de moleküller arası çözünebilir komplekslerin oluşarak yüzeyden geri salınımını engellemeye yardımcı olacak çapraz bağlayıcı ajanların kullanılması gerektiği kanısına varılmıştır. Böylece katmanlı depozisyon olayının sekteye uğraması engellenerek arzu edilen katman kalınlığına ulaşılabileceği, böylece gaz bariyer özelliği olan kaplamalar elde edilebileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada hidrofobik bir yüzeye sahip olduğu belirlenmiş olan kaplamaların, daha yüksek katman sayısı sağlandığında, özellikle su buharı bariyer özelliğine sahip olacağı öngörülmektedir. Bu konunun ilerideki bir projede değerlendirilmesi planlanmaktadır.

## 6. EKLER

### 6.1 Kitozan ve Kazein Mono-tabakalarının Kırılma İndislerinin Belirlenmesi

Yüzey Plazmon Rezonansı (YPR) verilerinden katman kalınlığı bilgisinin Fresnel benzetimi ile elde edilebilmesi için arayüzeyde oluşan katmanın kırılma indisi üzerine gerçekçi bir tahminde bulunulması gerekmektedir. Bu tahmin katmanın içerisinde yer kaplayan polielektrolitin hacimsel fraksiyonu üzerinden aşağıdaki eşitlik aracılığıyla yapılır:

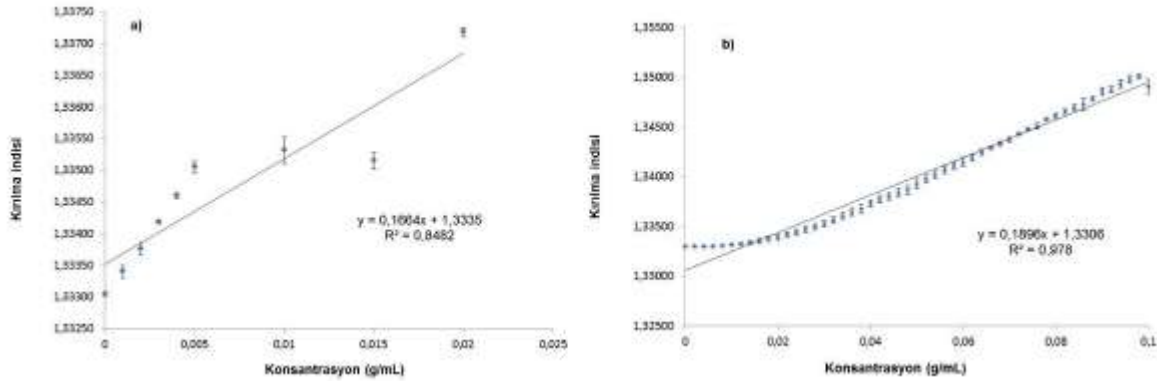
$$n_f = \phi n_p + (1 - \phi) n_s \quad (5)$$



Burada  $n_r$ ,  $n_p$  ve  $n_s$ , sırasıyla, katman, saf (dehidre) polielektrolit ve çözücü kırılma indislerini,  $\Phi$  ise, polielektrolitin katman içerisindeki hacimsel fraksiyonunu temsil etmektedir. Buradaki  $n_p$  değeri ise Eşitlik 6'dan hesaplanır.

$$\frac{dn}{dC} = (n_p - n_s)v_p \quad (6)$$

Burada,  $v_p$ , polielektrolitin kısmi özgül hacmi (0,57 mL/g kitozan; 0,73 mL/g kazein) ve  $dn/dC$ , polielektrolit çözeltisinde kırılma indisinin konsantrasyona bağlı değişimidir. Kitozan ve sodyum kazeinatın  $dn/dC$  değerleri, Kısım 3.2.4'te belirtildiği gibi her iki polielektrolit için ayrı ayrı elde edilen kırılma indisi-konsantrasyon doğrusunun eğiminden hesaplanmıştır. Şekil 21'de kitozan ve sodyum kazeinatın konsantrasyona bağlı kırılma indisi değişimi ve doğruların lineer regresyonu ile elde edilen eşitlikler görülmektedir.



**Şekil 22.** Kitozan (a) ve sodyum kazeinat (b) çözeltilerinin konsantrasyona bağlı kırılma indisi değişimleri. Hata payları standart sapmaları temsil etmektedir.

Her iki polielektrolit için bulunan  $dn/dC$  değeri ve refraktometre ile ölçülen çözücü kırılma indisinin ( $n_s$ ) Eşitlik 6'ya yerleştirilmesi ile, saf (dehidre) polielektrolit mono-katmanlarının kırılma indisleri ( $n_p$ ) Tablo 8'deki gibi hesaplanmıştır. Kazein için elde edilen  $dn/dC$  değeri, literatürde proteinler için verilen  $dn/dC$  değeriyle (0,18 mL/g, Ball ve Ramsden, 1998) örtüşmektedir. Aynı zamanda, kitozan için elde edilen sonucun da literatürde verilen  $dn/dC$  aralığında (0,142-0,208 mL/g, (Weinhold vd., 2009) olduğu görülmektedir.

**Tablo 8.** Kitozan ve sodyum kazeinatın spesifik kırılma indisi ( $dn/dC$ ) ve saf (dehidre) polielektrolit katmanının kırılma indisi değerleri

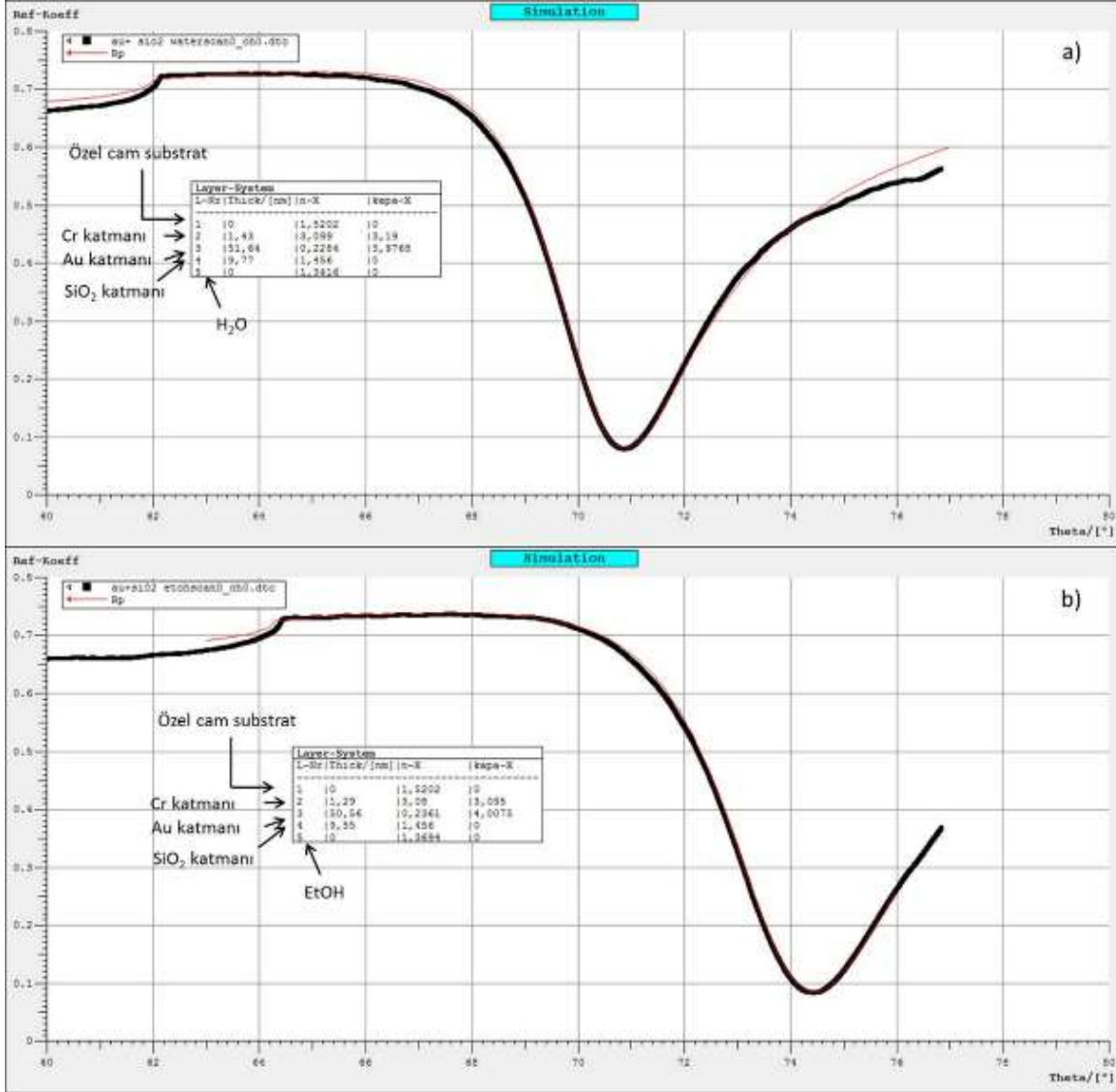
	$dn/dC$ (mL/g)	$n_p$
--	----------------	-------



Kitozan	0,1664	1,62
Kazein	0,1896	1,59

## 6.2 YPR ile Katman Kalınlığı Hesaplamaları

YPR ile her katmanda doğru bir kantitatif karakterizasyonu sağlamak için öncelikle sensör üzerindeki Cr, Au ve SiO<sub>2</sub> katmanlarının optik özellikleri ve kalınlıkları doğrulanmalıdır. Bunun için katmanlı depozisyon işlemine başlamadan önce sensörün iki farklı ortamda (su ve etanol) YPR açısız taraması alınmış ve elde edilen eğriler Fresnel eşitliklerine Winspall 3.02 yazılımı ile uydurulmuştur. Bu şekilde üç katman için iki farklı ortamda kalınlık-kırılma indis süreklileri elde edilmiştir. Cr, Au ve silikon dioksit katmanlarının kalınlık ve kırılma indislerinin her iki ortamda da aynı olması gerektiğinden ortak değerleri veren parametrelerin doğruluğu kabul edilmiştir. Kullanılan sensörlerden biri için örnek bir hesaplama Şekil 22'de verilmektedir. Bu sensörde Fresnel benzetimi sonucu Cr, Au ve SiO<sub>2</sub> katman kalınlıkları, sırasıyla, ~1,3 nm, ~51 nm ve ~10 nm olarak bulunmuştur.



**Şekil 23.** Cr+Au+SiO<sub>2</sub> kaplı YPR sensörünün a) saf su ve b) etanoldeki taramaları ile elde edilen yüzey plazmon rezonansı (YPR) eğrilerinin Fresnel eşitliklerine uydurulması ile hesaplanan katman kalınlıkları. Simülasyon Winspall 3.02 (Max Planck Polimer Araştırma Enstitüsü, Almanya) yazılımı ile gerçekleştirilmiştir.

## 7. KAYNAKLAR

Acevedo-Fani, A., Salvia-Turujillo, L., Soliva-Fortuny, R., Martin-Belloso, O. 2015.

“Modulating Biopolymer Electrical Charge to Optimize the Assembly of Edible Multilayer Nanofilms by the Layer-by-Layer Technique”, *BioMacromolecules*, 16, 2895-2903.

Al-Ati, T., Hotchkiss, J. H. 2002. "Application of Packaging and Modified Atmosphere to



- Fresh-cut Fruits and Vegetables". Fresh-cut Fruits and Vegetables: Science, Technology, and Market. Editör: Lamikanra, O. Florida: CRC Press LLC.
- Ariga, K., Hill, J., Ji, Q. 2007. "Layer-by-layer assembly as a versatile bottom-up nanofabrication technique for exploratory research and realistic application", *Physical chemistry chemical physics*, 9(19), 2319-2340.
- Artés-Hernández, F., Tomás-Barberán, F. A., Artés, F. 2006. "Modified atmosphere packaging preserves quality of SO<sub>2</sub>-free 'Superior seedless' table grapes", *Postharvest Biology and Technology*, 39, 146–154.
- Artyukhin, A. B., Stroeve, P. 2003. "Effects of Corrosive Chemicals on Solid-Supported Lipid Bilayers As Measured by Surface Plasmon Resonance", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 42(10), 2156–2162.
- Baldwin, E. A., Nisperos, M. O., Chen, X., Hagenmaier, R. D. 1996. "Improving storage life of cut apple and potato with edible coating", *Postharvest Biology and Technology*, 9(2), 151–163.
- Ball, S. (2015). Dynamic Light Scattering- Colloidal Gold: The Gold Standart for Drug Delivery. *Drug Development & Delivery*, 15(2), 32-35.
- Ball, V., Ramsden, J. J. 1998. "Buffer dependence of refractive index increments of protein solutions", *Biopolymers*, 46, 489-492.
- Bayramoglu, B., Stroeve, P. 2010. "Ultrathin Edible Coatings by Layer-By-Layer (LbL) Assembly Technique", 2010 Annual Meeting of the Institute of Food Technologists, Chicago, IL: IFT.
- Beaudry, R. M. 2000. "Responses of horticultural commodities to low oxygen: limits to the expanded use of modified atmosphere packaging", *HortTechnology*, 10(3), 491-500.
- Bertrand, P., Jonas, A., Laschewsky, A., Legras, R. 2000. "Ultrathin polymer coatings by complexation of polyelectrolytes at interfaces: suitable materials, structure and properties", *Macromolecular Rapid Communications*, 21, 319-348.
- Brasil, I. M., Gomes, C., Puerta-Gomez, A., Castell-Perez, M. E., Moreira, R. G. 2012. "Polysaccharide-based multilayered antimicrobial edible coating enhances quality of fresh-cut papaya", *LWT - Food Science and Technology*, 47, 39-45.
- Bryan, D. S. 1972. "Repared citrus fruit halves". U. S. Patent 19700102.
- Burt, S. (2004). "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review", *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- Caleb, O. J., Opara, U. L., Witthuhn, C. R. 2011. "Modified Atmosphere Packaging of Pomegranate Fruit and Arils: A Review", *Food and Bioprocess Technology*, 5, 15-30.
- Carneiro-da-Cunha, M. G., Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Carvalho, S., Quintas, M. A. C., Teixeira, J. A., Vicente, A. A. 2010. "Physical and thermal properties of a chitosan/alginate nanolayered PET film", *Carbohydrate Polymers*, 82.



- Charles, F., Sanchez, J., Gontard, N. 2003. "Active Modified Atmosphere Packaging of Fresh Fruits and Vegetables: Modeling with Tomatoes and Oxygen Absorber", *Journal of food science*, 68(5), 1736-1742.
- Church, I., Parsons, A. 1995. "Modified Atmosphere Packaging Technology: A Review", *J. Sci. Food Agric.*, 67, 143-152.
- Cisneros-Zevallos, L., Krochta, J. M. 2003. "Dependence of Coating Thickness on Viscosity of Coating Solution Applied to Fruits and Vegetables by Dipping Method", *Journal of Food Science*, 68(2), 503-510.
- de Medeiros, B. G. S., Pinheiro, A. C., Carneiro-da-Cunha, M. G., & Vicente, A. A. (2012). Development and characterization of a nanomultilayer coating of pectin and chitosan – Evaluation of its gas barrier properties and application on 'Tommy Atkins' mangoes. *Journal of Food Engineering*, 110(3), 457464.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. A., Voilley, A. 1998. "Edible Films and Coatings: Tomorrow's Packagings: A Review". *Critical reviews in food science and nutrition*, 38(4), 299–313.
- Decher, G., Hong, J. D., Schmitt, J. 1991. "Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-assembly Process: 2. Consecutive Adsorption of Anionic and Cationic Bipolar Amphiphiles and Polyelectrolytes on Charged Surfaces". *Physical Chemistry Chemical Physics*, 95(11), 1430-1434.
- Dhall, R. 2013. "Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: a review", *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(5), 435-450.
- Elsabee, M. Z., Abdou, E. S., Khaled S.A. Nagy, K. S. A., Eweis, M. 2008. "Surface modification of polypropylene films by chitosan and chitosan/pectin multilayer", *Carbohydrate Polymers*, 71, 187–195.
- Geesan, J., Browne, K., Maddison, K., Sheperd, J., & Guaraldi, F. 1985. "Modified Atmosphere Packaging to Extend the Shelf Life of Tomatoes", *Journal of Food Technology*, 20(3), 336-341.
- Gu, C.-H., Wang, J.-J., Yu, Y., Sun, H., Shuai, N., & Wei, B. 2013. "Biodegradable multilayer barrier films based on alginate/polyethyleneimine and biaxially oriented poly(lactic acid)", *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1579-1585.
- Holder, K. M., Priolo, M. A., Secrist, K. E., Greenlee, S. M., Nolte, A. J., Grunlan, J. C. 2012. "Humidity-Responsive Gas Barrier of Hydrogen-Bonded Polymer–Clay Multilayer Thin Films", *The Journal of Physical Chemistry C*, 116, 19851–19856.
- Jacobsson, A., Nielsen, T., Sjöholm, I., Wendin, K. 2004. "Influence of packaging material and storage condition on the sensory quality of broccoli", *Food Quality and Preference*, 15, 301–310.
- Jang, W-S., Rawson, I., Grunlan, J. C. 2008. "Layer-by-layer assembly of thin film oxygen



- barrier", *Thin Solid Films*, 516, 4819 – 4825.
- Jomaa, H., Schlenoff, J. 2005. "Accelerated exchange in polyelectrolyte multilayers by "catalytic" polyvalent ion pairing", *Langmuir*, 21(18), 8081-8084.
- Jourdaine, L., Leser, M. E., Schmitt, C., Michel, M., Dickinson, E. 2008. "Stability of emulsions containing sodium caseinate and dextran sulfate: Relationship to complexation in solution", *Food Hydrocolloids*, 22, 647–659.
- Kader, A. A., Zagory, D., Kerbel, E. L. 1989. "Modified Atmosphere Packaging of Fruits and Vegetables", *Critical reviews in food science and nutrition*, 28(1), 1-30.
- Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., Decker, E. A., McClements, D. J. 2005. "Encapsulation of emulsified tuna oil in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition", *Food Hydrocolloids*, 19, 1044–1053.
- Kurth, D. G., Osterhout, R. 1999. "In Situ Analysis of Metallo-supramolecular Coordination Polyelectrolyte Films by Surface Plasmon Resonance Spectroscopy", *Langmuir*, 15, 4842-4846.
- Lagarón, J. M., Giménez, E., Altava, B., Del-Valle, V., & Gavara, R. 2003. "Characterization of extruded ethylene-vinyl alcohol copolymer based barrier blends with interest in food packaging applications", *Macromolecular Symposia*, 198, 473-482.
- Laufer, G., Kirkland, C., Cain, A., Grunlan, J. 2012. "Clay-chitosan nanobrick walls: completely renewable gas barrier and flame-retardant nanocoatings", *ACS applied materials & interfaces*, 4(3), 1643-1649.
- Laufer, G., Kirkland, C., Cain, A., Grunlan, J. 2013. "Oxygen barrier of multilayer thin films comprised of polysaccharides and clay", *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 299-302.
- Lee, J. Y., Park, H. J., Lee, C. Y., Choi, W. Y. 2003. "Extending shelf-life of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents", *LWT - Food Science and Technology*, 36, 323–329.
- Li, F., Biagioni, P., Finazzi, M., Tavazzi, S., Piergiovanni, L. 2013. "Tunable green oxygen barrier through layer-by-layer self-assembly of chitosan and cellulose nanocrystals", *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 2128-2134.
- Loveday, S. M. R., M.A.; Creamer, L.K.; Singh, H. (2010). Rheological behavior of high-concentration sodium caseinate dispersions. *Journal of Food Science*, 75(2), 30-35.
- Lvov, Y., Ariga, K., Onda, M., Ichinose, I., & Kunitake, T. (1999). A careful examination of the adsorption step in the alternate layer-by-layer assembly of linear polyanion and polycation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 146(1-3), 337-346.
- Mangaraj, S., Goswami, T. K., Mahajan, P. V. 2009. "Applications of Plastic Films for Modified Atmosphere Packaging of Fruits and Vegetables: A Review", *Food Engineering Reviews*, 1, 133–158.



- Mantilla, N., Castell-Perez, M. E., Gomes, C., Moreira, R. G. 2013. "Multilayered antimicrobial edible coating and its effect on quality and shelf-life of fresh-cut pineapple (*Ananas comosus*)", *LWT - Food Science and Technology*, 51, 37-43.
- Martiñon, M. E., Moreira, R. G., Castell-Perez, E. M., & Gomes, C. (2014). Development of a multilayered antimicrobial edible coating for shelf-life extension of fresh-cut cantaloupe (*Cucumis melo* L.) stored at 4 °C. *LWT - Food Science and Technology*, 56(2), 341-350.
- Medeiros, B. G. S., Pinheiro, A. C., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., Carneiro-da-Cunha, M. G. 2011. "Polysaccharide/Protein Nanomultilayer Coatings: Construction, Characterization and Evaluation of Their Effect on 'Rocha' Pear (*Pyrus communis* L.) Shelf-Life", *Food and Bioprocess Technology*, 5, 2435–2445.
- Medeiros, B. G. S., Pinheiro, A. C., Carneiro-da-Cunha, M. G., Vicente, A. A. 2012. "Development and characterization of a nanomultilayer coating of pectin and chitosan – Evaluation of its gas barrier properties and application on 'Tommy Atkins' mangoes". *Journal of Food Engineering*, 110, 457–464.
- Mezdour, S., Brule, G., & Korolczuk, J. (2006). Physicochemical analysis of casein solubility in water-ethanol solutions. *Physicochemical analysis of casein solubility in water-ethanol solutions*.
- Moreira, S., Carvalho, W., Alexandrino, A., Paula, H., do Rodrigues, M., Figueiredo, R., . . . Brasil, I. (2014). Freshness retention of minimally processed melon using different packages and multilayered edible coating containing microencapsulated essential oil. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(10), 2192-2203.
- Nguyen, C. A., Argun, A. A., Hammond, P. T., Lu, X., Lee, P.S. 2011. "Layer-by-Layer Assembled Solid Polymer Electrolyte for Electrochromic Devices". *Chemistry of Materials*, 23, 2142–2149.
- Ogawa, S., Decker, E., McClements, D. 2003. "Production and characterization of O/W emulsions containing cationic droplets stabilized by lecithin-chitosan membranes", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2806-2812.
- Olivas, G. I., Rodriguez, J. J., Barbosa-Cánovas, G. V. 2003. "Edible Coatings Composed of Methylcellulose, Stearic Acid and Additives to Preserve Quality of Pear Wedges", *Journal of Food Processing and Preservation*, 27(4), 299-320.
- Paul, D. R., Bucknall, C. B. 1999. *Polymer Blends* (1. Baskı). New York: Wiley-VHC.
- Pavlath, A. E., Wong, D. S. W., Kumosinski, T. F. 1993. "New Coatings for Cut Fruits and Vegetables", *Chemtech*, 23(2), 36-40.
- Perez-Gago, M. B., Serra, M., Río, M. A. d. 2006. "Color change of fresh-cut apples coated with whey protein concentrate-based edible coatings", *Postharvest Biology and Technology*, 39, 84-92.





- Pinheiro, A. C., Bourbon, A. I., Medeiros, B. G. S., Silva, L. H. M., Silva, M. C. H., Carneiro-da-Cunha, M. G., Coimbra, M. A., Vicente, A. A. 2012. "Interactions between  $\kappa$ -carrageenan and chitosan in nanolayered coatings—Structural and transport properties", *Carbohydrate Polymers*, 87, 1081–1090.
- Priolo, M. A., Gamboa, D., Grunlan, J. C. 2010. "Transparent Clay–Polymer Nano Brick Wall Assemblies with Tailorable Oxygen Barrier", *ACS applied materials & interfaces*, 2(1), 312-320.
- Priya, A., Vijayalakshmi, S., Raichur, A. 2011. "Enhanced survival of probiotic *Lactobacillus acidophilus* by encapsulation with nanostructured polyelectrolyte layers through layer-by-layer approach", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11838-11845.
- Poverenov, E., Danino, S., Horev, B., Granit, R., Vinokur, Y., & Rodov, V. (2013). Layer-by-Layer Electrostatic Deposition of Edible Coating on Fresh Cut Melon Model: Anticipated and Unexpected Effects of Alginate–Chitosan Combination. *Food and Bioprocess Technology*, 7(5), 1424-1432.
- Poverenov, E., Rutenberg, R., Danino, S., Horev, B., & Rodov, V. (2014). Gelatin-Chitosan Composite Films and Edible Coatings to Enhance the Quality of Food Products: Layer-by-Layer vs. Blended Formulations. *Food and Bioprocess Technology*, 7(11), 3319-3327.
- Qi, P. X. (2007). Studies of casein micelle structure: the past and the present. *Le Lait*, 87(4-5), 363-383.
- Rojas-Graü, M. A., Sobrino-Lopez, A., Tapia, M. S., Martin-Belloso, O. 2006. "Browning Inhibition in Fresh-cut 'Fuji' Apple Slices by Natural Antibrowning Agents", *Journal of food science*, 71(1), 59-65.
- Rojas-Graü, M. A., Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R., Martin-Belloso, O. 2009. "The use of packaging techniques to maintain freshness in fresh-cut fruits and vegetables: a review", *International Journal of Food Science & Technology*, 44, 875–889.
- Roller, S., Seedhar, P. 2002. "Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruit at 4 degrees and 8 degrees C", *Letters in applied microbiology*, 35(5), 390-394.
- Rudra, J., Dave, K., Haynie, D. 2006. "Antimicrobial polypeptide multilayer nanocoatings", *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 17(11), 1301-1315.
- Shiratori, S. S., Rubner, M. F. 2000. "pH-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes", *Macromolecules*, 33, 4213-4219.
- Sipahi, R. E., Castell-Perez, M. E., Moreira, R. G., Gomes, C., Castillo, A. 2013. "Improved multilayered antimicrobial alginate-based edible coating extends the shelf life of fresh-cut watermelon (*Citrullus lanatus*)", *LWT - Food Science and Technology*, 51,

9-15.

- Souza, M. P., Vaz, A. F. M., Cerqueira, M. A., Texeira, J. A., Vicente, A. A., & Carneiro-da-Cunha, M. G. (2015). Effect of an Edible Nanomultilayer Coating by Electrostatic Self-Assembly on the Shelf Life of Fresh-Cut Mangoes. *Food and Bioprocess Technology*, 8(3), 647-654.
- Sukhishvili, S. A., Kharlampieva, E., Izumrudov, V. 2006. "Where Polyelectrolyte Multilayers and Polyelectrolyte Complexes Meet", *Macromolecules*, 39(26), 8873-8881.
- Tano, K., Oule, M. K., Doyon, G., Lencki, R. W., Arul, J. 2007. "Comparative evaluation of the effect of storage temperature fluctuation on modified atmosphere packages of selected fruit and vegetables", *Postharvest Biology and Technology*, 46, 212–221.
- T. C. Milli Eğitim Bakanlığı. "MEGEP Gıda Teknolojisi-Taze Sebze ve Meyveleri Satışa Hazırlama".  
<http://hbogm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/kursprogramlari/gida/moduller/TazeSebzVeMeyveleriSatisaHazirlama.pdf>, Son erişim tarihi: 28 Nisan 2014.
- Tien, C., Vachon, C., Mateescu, M. A., Lacroix, M. 2001. "Milk Protein Coatings Prevent Oxidative Browning of Apples and Potatoes", *Journal of food science*, 66(4), 512-516.
- v Klitzing, R. 2006. "Internal structure of polyelectrolyte multilayer assemblies", *Physical chemistry chemical physics*, 8(43), 5012-5033.
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., González-Martínez, C. 2006. "Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan–oleic acid edible coatings", *Postharvest Biology and Technology*, 41, 164-171.
- Vidyasagar, A., Sung, C., Losensky, K., Lutkenhaus, J. L. 2012. "pH-Dependent Thermal Transitions in Hydrated Layer-by-Layer Assemblies Containing Weak Polyelectrolytes", *Macromolecules*, 45, 9169–9176.
- Weinhold, M. X., Sauvageau, J. C. M., Keddig, N., Matzke, M., Tartsch, B., Grunwald, I., . . . Thöming, J. (2009). Strategy to improve the characterization of chitosan for sustainable biomedical applications: SAR guided multi-dimensional analysis. *Green Chemistry*, 11(4), 498-509. doi: 10.1039/B809941C
- Xiang, F., Tzeng, P., Sawyer, J., Regev, O., Grunlan, J. 2013. "Improving the Gas Barrier Property of Clay-Polymer Multilayer Thin Films Using Shorter Deposition Times", *ACS applied materials & interfaces*, doi:10.1021/am403445z.
- Yoo, D., Shiratori, S. S., Rubner, M. F. 1998. "Controlling Bilayer Composition and Surface Wettability of Sequentially Adsorbed Multilayers of Weak Polyelectrolytes", *Macromolecules*, 31, 4309-4318.
- Zacharia, N. S., Modestino, M., Hammond, P. T. 2007. "Factors influencing the interdiffusion of weak polycations in multilayers", *Macromolecules*, 40(26), 9523-9528.



**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Yrd. Doç. Dr. BESTE BAYRAMOĞLU
Proje No:	114O696
Proje Başlığı:	Yarı Mamul Taze Meyve ve Sebzeler İçin Katmanlı Depozisyon Yöntemi ile Yeni Nesil İnce Yenilebilir Kaplamaların Geliştirilmesi
Proje Türü:	3001 - Başlangıç AR-GE
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. MÜHENDİSLİK F. GIDA MÜHENDİSLİĞİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/09/2014 - 01/09/2016
Onaylanan Bütçe:	76000.0
Harcanan Bütçe:	58452.52
Öz:	<p>Bu çalışmanın amacı kitozan ve sodyum kazeinat kullanılarak katmanlı depozisyon ile çok katmanlı (LbL) yenilebilir kaplamaların elde edilmesidir. pH, adsorpsiyon süresi ve katman sayısının film oluşumuna etkileri incelenmiştir. Film oluşumu UV-Vis spektrofotometre ve yüzey plazmon rezonansı (YPR) ile ?yerinde? takip edilmiştir. Sonuçlar, LbL kaplama oluşumunun sadece her iki polielektrolitin de ortalama yük yoğunluğuna sahip olduğu pH birleşiminde (5,5-5,5) gerçekleştiğini göstermiştir.</p> <p>UV-Vis spektrofotometre ve YPR analizleri, kaplama oluşumunun adsorpsiyon süresine bağlı olarak farklı geliştiğini göstermiştir. Kaplamaların yüzey morfolojileri atomik kuvvet mikroskobu (AKM) ve taramalı elektron mikroskobu (TEM) ile incelenmiştir. Tüm sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde, kitozan ve kazein moleküllerinin katmanlar arası/içi difüzyonu ile meydana gelen tümleşik yapıların yüzeyde satürasyona neden olduğu, bu durumun işlemin sektöre uğramasına sebep olduğu anlaşılmaktadır. 2 dk daldırma süresinin adsorpsiyonun dengeye gelmesi için yeterli olmaması sebebiyle, katman sayısından bağımsız olarak fasıllı kaplamalar elde edildiği; 10 dk adsorpsiyon süresi ile 12. katmana doğru işlem devam ettikçe çıplak alanların da doldurularak daha homojen ve fasılsız filmler elde edildiği belirlenmiştir. Ancak, yüzey satürasyonu dolayısıyla film kalınlığında artış gözlemlenmemiştir.</p> <p>AKM analizleri depozisyon adımları arası kurutma işleminin daha pürüzlü yüzeylerin oluşmasına sebep olduğunu göstermiştir. 10 dk adsorpsiyon süresi ile 2 dk?ya göre daha homojen ve fasılsız, ancak daha pürüzlü katmanlar elde edildiği görülmüştür.</p> <p>Elde edilen LbL kaplamaların (~250 nm) koronalı polipropilenin su buharı ve oksijen bariyer özelliğinde iyileştirme gerçekleştirmediği belirlenmiştir. Renk ölçümleri ile saydam ve renksiz kaplamalar elde edildiği, kontak açısı ölçümleri ile de hidrofobik yüzeyler oluşturulduğu belirlenmiştir.</p> <p>Başarılı bir şekilde elde edilen kaplamaların stabilitesi test edilmiştir. Depolama veya nakliye sırasında (% 93 bağıl nemde) uygun sıcaklık koşullarının sağlanamaması durumunda kaplamaların mikro-yapısında herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir. Ancak, oda sıcaklığında suda 15 gün boyunca bekletilen kaplamaların yüzeyinde zamana bağlı olarak gelişen bir erozyon tespit edilmiştir. Bu erozyonu önlemek, daha kalın ve gaz geçirgenliği düşük kaplamalar elde etmek için çapraz bağlayıcı ajanların kullanımı düşünülebilir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Katmanlı depozisyon, çok katmanlı filmler, yenilebilir kaplamalar, yarı mamul taze meyve ve sebzeler
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- Multilayered Edible Coatings from Chitosan and Sodium Caseinate by Layer-by-Layer Assembly (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 2- EİB III. Gıda AR-GE Proje Pazarı 2015 (Yayımlı - Ulusal - Proje Pazarına Katılım), 3- Structural properties of model ultrathin edible coatings from chitosan and sodium caseinate prepared by Layer-by-Layer assembly: dipping versus spraying (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),