

**Kontrollü Salım Özelliklerine Sahip Antimikrobiyal, Nanokompozit Gıda  
Ambalaj Filmlerinin Geliştirilmesi**

**Proje No: 110M440**

Prof. Dr. Sacide ALSOY ALTINKAYA

Bahar Başak PEKŞEN ÖZER

Pelin OYMACI

Metin UZ

Melda BÜYÜKÖZ

HAZİRAN 2013

İZMİR

## ÖNSÖZ

Bu rapor "Kontrollü Salım Özelliklerine Sahip Antimikrobiyal, Nanokompozit Gıda Ambalaj Filmlerinin Geliştirilmesi" başlıklı TÜBİTAK-MAG-110M440 No'lu araştırma projesinin sonuçlarını içermektedir. Çalışma antimikrobiyal ajan yüklü nanotaneciklerin hazırlanması ve bu nanotaneciklerin kontrollü salım özelliğine sahip, mekanik ve bariyer özellikleri iyileştirilmiş antimikrobiyal gıda ambalaj filmlerinin hazırlanması amacıyla önerilmiştir. 1 Mayıs 2011 tarihinde, telif bedeli hariç 83950 TL'lik bütçe ile İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Mühendisliği Bölümü'nde yürütölmek üzere desteklenmeye başlanan proje 1 Mayıs 2013'de tamamlanmıştır.

Projede bir yüksek lisans ve 2 doktora öğrencisi proje bütçesi ile desteklenmiş, proje kapsamında bir yüksek lisans çalışması yapılmıştır. Projeden elde edilen sonuçlar 21-25 Nisan 2013 tarihleri arasında Hollanda'da düzenlenen 9. Avrupa Kimya Mühendisliği ve 2. Avrupa Biyoteknoloji Kongresi'nde poster sunum olarak sunulmuştur.

Peynir üretimi sırasında yan ürün olarak ortaya çıkan peynir altı suyu izolatından (WPI) filmlerin hazırlandığı projenin ilk kısmında kitosan nanotaneciklerin filmlerin mekanik ve bariyer özellikleri üzerine olan etkileri incelenmiştir. Projenin ikinci kısmında doğal bir antimikrobiyal ajan olan lizozim (LIS) serbest halde ya da poliakrilik asit ile tanecik oluşturarak filmlere ilave edilmiş, salım hızının filmlerin antimikrobiyal aktivitesine olan etkisi araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda kitosan nanotaneciklerin WPI filminin mekanik ve bariyer özelliklerinin iyileştirilmesinde, PAA/LIS komplekslerinde kontrollü salım yapabilen, antimikrobiyal, WPI bazlı gıda ambalaj filmlerinin hazırlanmasında kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	8
ABSTRACT .....	9
1. GİRİŞ .....	10
2. GENEL BİLGİLER .....	13
2.1. Antimikrobiyal Ambalaj .....	13
2.1.1. Antimikrobiyal Ambalajlamada Kullanılan Antimikrobiyal Ajanlar .....	13
2.1.2. Antimikrobiyal Ambalaj Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler .....	15
2.1.3. Kontrollü Salım Yapabilen Antimikrobiyal Gıda Ambalaj Filmleri .....	16
2.2. Gıda Ambalajı Uygulamalarında Nanokompozitler .....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	17
3.1. Malzemeler .....	17
3.2. Kitosan/Peynir Altı Suyu Proteini İzolatı Bazlı Nanokompozitlerin Hazırlanması .....	18
3.2.1. Kitosan Nanotanecik Üretimi .....	18
3.2.2. Kitosan Nanotaneciklerin Karakterize Edilmesi .....	18
3.2.3. Kitosan/Peynir Altı Suyu Proteini İzolatı (WPI) Bazlı Nanokompozit Filmlerin Hazırlanması .....	18
3.2.4. Kitosan/Peynir Altı Suyu Proteini İzolatı (WPI) Bazlı Nanokompozit Filmlerin Morfolojik ve Mekanik Özelliklerinin Belirlenmesi .....	19
3.2.5. Kitosan/Peynir Altı Suyu Proteini İzolatı (WPI) Bazlı Nanokompozit Filmlerin Su Buharı Geçirgenliklerinin Belirlenmesi .....	19
3.2.6. Kitosan/Peynir Altı Suyu Proteini İzolatı (WPI) Bazlı Nanokompozit Filmlerin Serbest Boşluk Hacimlerinin (Free Volume) Belirlenmesi .....	20
3.2.7. Kitosan/Peynir Altı Suyu Proteini İzolatı (WPI) Bazlı Nanokompozit Filmlerin Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi .....	21
3.3. Poliakrilik Asit/Lizozim Kompleksi İçeren WPI Bazlı Antimikrobiyal Ambalaj Filmlerinin Hazırlanması .....	21
3.3.1. Poliakrilik Asit/Lizozim Kompleksinin Hazırlanması .....	21
3.3.2. Poliakrilik Asit/Lizozim Kompleksinin Karakterize Edilmesi .....	23
3.3.3. Poliakrilik Asit/Lizozim Kompleksi İçeren WPI Filmlerinin Hazırlanması .....	23
3.3.4. Poliakrilik Asit/Lizozim Kompleksi İçeren WPI Filmlerinin Morfolojisinin Belirlenmesi .....	23
3.3.5. Poliakrilik Asit/Lizozim Kompleksi İçeren WPI Filmlerinin Mekanik Özelliklerinin Belirlenmesi .....	24
3.3.6. Poliakrilik Asit/Lizozim Kompleksi İçeren WPI Filmlerinin Salım Kinetiklerinin Belirlenmesi .....	24

3.3.7. Poliakrilik Asit/Lizozim Kompleksi İçeren WPI Filmlerinden Salınan Lizozimin Aktivitesinin Belirlenmesi .....	24
3.3.8. Poliakrilik Asit /Lizozim Kompleksi İçeren WPI Filmlerinin Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	25
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	25
4.1. Kitosan/Peynir Altı Suyu Proteini İzolatı Bazlı Nanokompozitlerin Hazırlanması.....	25
4.1.1. Kitosan Nanotanecik Üretimi ve Karakterizasyonu .....	25
4.1.2. Kitosan/Peynir Altı Suyu Proteini İzolatı (WPI) Bazlı Nanokompozit Filmlerin Morfolojik ve Mekanik Özellikleri.....	31
4.1.3. Kitosan/Peynir Altı Suyu Proteini İzolatı (WPI) Bazlı Nanokompozit Filmlerin Su Buharı Geçirgenlikleri .....	35
4.1.4. Kitosan/Peynir Altı Suyu Proteini İzolatı (WPI) Bazlı Nanokompozit Filmlerin Antimikrobiyal Özellikleri .....	36
4.2. Poliakrilik Asit/Lizozim Kompleksi İçeren WPI Bazlı Antimikrobiyal Ambalaj Filmlerinin Hazırlanması .....	37
4.2.1. Poliakrilik Asit/Lizozim Komplekslerinin Karakterize Edilmesi .....	37
4.3. Poliakrilik Asit/Lizozim Kompleksi İçeren WPI Filmlerinin Morfolojik ve Mekanik Özelliklerinin Karakterize Edilmesi .....	39
4.4. Poliakrilik Asit/Lizozim Kompleksi İçeren WPI Filmlerinden Lizozimin Salım Kinetiğinin Belirlenmesi.....	42
4.4.1. PAA/LIS Oranının Lizozimin Salım Hızına Olan Etkisi .....	43
4.4.2. PAA'nın Molekül Ağırlığının Lizozimin Salım Hızına Olan Etkisi.....	45
4.5. Poliakrilik Asit/Lizozim Kompleksi İçeren WPI Filmlerinin Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	47
4.5.1. WPI Filmlerinden Salınan Lizozimin Aktivitesinin Belirlenmesi .....	47
4.5.2. Nutrient Besiyeri ile Yapılan Antimikrobiyal Testler.....	48
4.5.3. Müller Hinton Besiyeri ile Yapılan Antimikrobiyal Testler.....	50
5. SONUÇLAR.....	53
KAYNAKLAR .....	54

## TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Antimikrobiyal Ambalajlamada Kullanılan Antimikrobiyal Ajanlar .....	14
Tablo 3.1. Film Kompozisyonları .....	23
Tablo 4.1. Ticari kitosan ile fraksiyonlanmış ve deasetile edilmiş kitosan tozları kullanılarak farklı sıcaklık ve CS/TPP oranlarında üretilen taneciklerin ortalama boyutları.....	27
Tablo 4.2. Ticari kitosan ile fraksiyonlanmış ve deasetile edilmiş kitosan tozları kullanılarak farklı sıcaklık ve CS/TPP oranlarında üretilen taneciklerin ortalama elektrik potansiyelleri ...	28
Tablo 4.3. Ticari kitosan ile fraksiyonlanmış ve deasetile edilmiş kitosandan farklı sıcaklıklarda hazırlanan taneciklerin polidispersite indeksleri.....	30
Tablo 4.4. Lizozimin PAA içine yüklenme oranları .....	38
Tablo 4.5. PAA/LIS komplekslerinin boyutu ve zeta potansiyel değerleri .....	38
Tablo 4.6. Lizozimin farklı filmlerden salım süreleri ve salınan toplam lizozim miktarları .....	46
Tablo 4.7. Besiyeriye ilave edilen HCl'in koloni sayısı üzerine olan etkisi.....	49
Tablo 4.8. Plastikleştirici ajan olarak filme ilave edilen gliserolün koloni sayısı üzerine olan etkisi .....	49
Tablo 4.9. Lizozimin farklı ortamlardaki aktivitesi.....	51
Tablo 4.10. Lizozimin farklı besiyerleri içerisindeki aktivitesi .....	51

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Kontrollü salım sistemlerinde aktif ajanın yüzey konsantrasyonunun zamana göre değişimi .....	16
Şekil 3.1. Tipik bir HPLC kromatogramı .....	22
Şekil 3.2. Lizozim konsantrasyonunun HPLC ile tayininde kullanılan kalibrasyon grafiği .....	22
Şekil 4.1. Kitosan ile TPP arasındaki iyonik jelleşme (çapraz bağ oluşumu)reaksiyonu.....	26
Şekil 4.2. Ticari ve fraksiyonlanmış, deasetile edilmiş kitosan tozunun FTIR spektrumu .....	26
Şekil 4.3. Ticari kitosan ile fraksiyonlanmış ve deasetile edilmiş kitosan tozundan 25 °C ve 4 °C'de üretilmiş nanotaneciklerin boyut dağılımları (CS/TPP=4).....	29
Şekil 4.4. Fraksiyonlanmış ve deasetile edilmiş kitosan tozundan 25°C'de hazırlanmış nanotaneciğin boyutunun zamanla değişimi (CS/TPP=4) .....	30
Şekil 4.5. Nanotaneciklerin a) 25000X büyütmede b)100000X büyütmede taramalı elektron mikroskobu ile alınan görüntüleri .....	31
Şekil 4.6. WPI ve Kitosan/WPI bazlı nanokompozit filmlerin SEM görüntüleri.....	32
Şekil 4.7. WPI ve %4 nanotanecik içeren WPI filmlerinin gerilim gerinim grafiği .....	33
Şekil 4.8. Kitosan nanotanecik miktarına göre WPI filmlerin çekme mukavemeti ve % uzama değerlerindeki değişim .....	34
Şekil 4.9. Kitosan nanotanecik miktarına göre WPI filmlerin elastisite modülündeki değişim	34
Şekil 4.10. Kitosan nanotanecik miktarına göre WPI filmlerin serbest boşluk hacimlerindeki değişim .....	35
Şekil 4.11. Kitosan nanotanecik miktarına göre WPI filmlerin su buharı geçirgenliğindeki değişim .....	36
Şekil 4.12. Nanotanecik içermeyen peynir altı suyu izolatı film (a) ile %4 CS/TPP nanotanecik içeren WPI filmin (b) antibakteriyel test sonuçları.....	36
Şekil 4.13. Poliakrilik asit-lizozim kompleksinin oluşum mekanizmaları.....	37
Şekil 4.14. Peynir altı suyu izolatı (WPI), serbest lizozim içeren WPI ve PAA/LIS kompleksi içeren WPI (SNP-WPI) filmlerin SEM görüntüleri. Büyütme: 5000x. ....	39
Şekil 4.15. Serbest Lizozim + SNP (2kDa) kompleksini içeren WPI filmlerin TEM mikrografileri (a) 200nm (b)100nm .....	40
Şekil 4.16. Aynı konsantrasyonda WPI içeren filmlere farklı PAA/LIS komplekslerin eklenmesiyle çekme mukavemeti ve % uzama değerlerindeki değişim .....	41

Şekil 4.17. Aynı konsantrasyonda WPI içeren filmlere farklı PAA/LIS komplekslerinin eklenmesiyle filmlerin elastisite modül değerlerindeki değişim.....	42
Şekil 4.18. Liozimin PAA/LIS kompleksinden salım mekanizması.....	43
Şekil 4.19. PAA/LIS Oranının Liozimin Salım Hızına Olan Etkisi. PAA'nın Molekül ağırlığı: 2 kDa .....	44
Şekil 4.20. PAA/LIS Oranının Liozimin Salım Hızına Olan Etkisi . PAA'nın Molekül Ağırlığı: 450 kDa ....	44
Şekil 4.21. PAA'nın Molekül Ağırlığının Liozimin Salım Hızına Olan Etkisi. PAA/LIS: 0.1 .....	45
Şekil 4.22. PAA'nın Molekül Ağırlığının Liozimin Salım Hızına Olan Etkisi . PAA/LIS: 0.3 .....	46
Şekil 4.23. Serbest olarak ve PAA ile kompleks oluşturarak filme ilave edilen liozimin filmlerden salınan miktarının zamana göre değişimi .....	47
Şekil 4.24. WPI Filmlerinden Salınan Liozimin Aktivitesinin Zamana Göre Değişimi.....	48
Şekil 4.25. Film içermeyen besi yeri+bakterinin (pozitif kontrol), serbest liozim yüklü WPI film ile küçük ve büyük PAA/LIS kompleksi içeren WPI filmlerin bulunduğu ortamda bakteri sayısındaki artışın zamana göre değişimi .....	50
Şekil 4.26. Uzun süreli antimikrobiyal test sonuçları .....	52

## ÖZET

Antimikrobiyal gıda ambalaj malzemelerinde aktif maddenin kontrollü salımı kritiktir. Bu çalışmada kontrollü salım antimikrobiyal ajanı nanotanecik içine yükleyerek sağlanmıştır. Doğal bir antimikrobiyal ajan olan lizozim serbest halde ya da poliakrilik asit (PAA) ile tanecik oluşturarak peynir altı suyu izolatu (WPI) filmlerine ilave edilmiştir. Serbest lizozim içeren filmlerden salımın çok hızlı olduğu, 45 dakika gibi kısa bir sürede lizozimin tamamının ortama geçtiği, PAA içine yüklenmesi durumunda ise salım hızının oldukça yavaşladığı gözlenmiştir. PAA'nın molekül ağırlığı ile PAA/LIS oranının lizozimin salım hızı üzerinde oldukça etkili olduğu belirlenmiştir. Her iki parametrenin artması ile daha büyük boyutta tanecikler elde edilmiş ve bu tanecikleri içeren filmlerden lizozimin salım hızı düşmüştür. Film hazırlama esnasında lizozimin aktivitesinde kayıp yaşanmış, ancak salınan aktivite zamanla değişim göstermemiştir. Lizozim hem serbest, hem de PAA/LIS kompleksi içinde filme ilave edildiğinde ortama kontrollü bir şekilde salınarak antimikrobiyal etkisini daha uzun süre koruyabilmiştir. Çalışmada PAA/LIS komplekslerinin yanısıra kitosan nanotanecikler de hazırlanmış, bu taneciklerin WPI filmlerinin mekanik ve bariyer özellikleri üzerine olan etkileri incelenmiştir. %2 oranına kadar kitosan nanotanecik içeren filmlerin mekanik ve bariyer özelliklerinde önemli bir değişiklik olmazken, % 4 nanotanecik ilavesiyle çekme mukavemetinde ani bir artış, % uzama değerinde ve su buharı geçirgenliğinde de azalma gözlenmiştir. Ayrıca, kitosan nanotanecikler WPI filmlere antibakteriyel özellik de kazandırmıştır. Filme ilave edilen nanotanecik miktarının % 6'ya artırılması sonucunda homojen dağılımın sağlanamamasından dolayı mekanik ve bariyer özelliklerindeki iyileşme azalmaya başlamıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara dayanarak kitosan nanotaneciklerin WPI filminin mekanik ve bariyer özelliklerinin iyileştirilmesinde, PAA/LIS komplekslerinin de kontrollü salım yapabilen, antimikrobiyal özelliğe sahip WPI filmlerinin hazırlanmasında kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler : Nanokompozit, antimikrobiyal ambalaj, kontrollü salım, lizozim, peynir altı suyu izolatu, kitosan nanotanecik, iyonik jelleşme



## **ABSTRACT**

Controlled release of antimicrobial agents from food packaging materials is a critical issue and in this study, this has been achieved by encapsulating the antimicrobial agent into nanoparticles. Lysozyme which is a natural antimicrobial agent was added into whey protein isolate films in a free form or in a particle encapsulated with polyacrylic acid. It has been observed that all of the free lysozyme in the films released rapidly almost in 45 minutes, on the other hand, encapsulating the lysozyme into PAA significantly slowed down the release rate. The molecular weight of PAA and the ratio of PAA to lysozyme used during the synthesis of PAA/LIS complexes were found to be effective on the release rate of lysozyme. With an increase in both parameters, larger complexes were obtained, as a result, the release rate of lysozyme from the films containing these complexes decreased. During film preparation, the loss in the activity of lysozyme occurred, however, released activity did not show a change with time. Lysozyme when incorporated into the films in a free and complex form released at a controlled rate, thus, maintained its antimicrobial activity for a longer time. In addition to PAA/LIS complexes, chitosan nanoparticles were also prepared and their effects on the mechanical and barrier properties of WPI films were investigated. While the mechanical and barrier properties of the films containing up to 2 % chitosan nanoparticles did not change significantly, an increase in tensile strength and decrease in the elongation and water vapor permeability of the films were observed with 4 % nanoparticle addition. Furthermore, chitosan nanoparticles provided antibacterial properties to the films. Increasing nanoparticle content in the films from 4 to 6 % caused a decrease in the mechanical and barrier properties of the films due to inhomogeneous distribution of the particles. Based on the results obtained in this study, it is suggested that chitosan nanoparticles and PAA/LIS complexes can be used in the improvement of mechanical and barrier properties of WPI films and in the preparation of antimicrobial WPI films with controlled release properties, respectively.

Keywords: Nanocomposite, antimicrobial packaging, controlled release, lysozyme, whey protein isolate, chitosan nanoparticle, ionic gelation.

## 1. GİRİŞ

Son yıllarda gıda kaynaklı mikrobiyal salgınlardaki artış nedeni ile antimikrobiyal ambalaj filmlerine olan ilgi artmıştır. Geleneksel olarak antimikrobiyal ajanlar gıdaya mikrobiyal üremeyi kontrol etmek ve raf ömrünü uzatmak için direkt olarak ilave edilmektedir. Ancak bu uygulama, ajanın hızla tükenmesinden dolayı kısa sürede koruma etkisini yitirmesi ve bozunma reaksiyonlarının gerçekleştiği gıda yüzeyini seçici bir şekilde hedefleyememesinden dolayı etkili değildir. Antimikrobiyal paketleme bu dezavantajları ortadan kaldırmak için alternatif bir yöntemdir. Bu tür malzemelerde en çok aranan özellik antimikrobiyal ajanın kontrollü salımıdır. Filmden gıda yüzeyine hızlı salım antimikrobiyal ajanın kısa sürede tükenmesine yol açar ve bu sürenin sonunda gıda yüzeyi korumasız kalır. Öte yandan salım hızının yavaş olduğu durumlarda da yüzeyde bozunma başlayabilir. Aktif ajanın kontrollü salımı gıda yüzeyindeki konsantrasyonunun uzun süre aynı oranda, mikrobiyolojik bozunmaya engel olacak minimum konsantrasyonun (MIC) üstünde bir seviyede tutulmasını sağlar, bu nedenle ambalajlanan gıdanın raf ömrünün uzatılabilmesi açısından gereklidir.

Kontrollü salım sistemlerinin eczacılık alanındaki uygulamaları oldukça eskiye dayanmakla birlikte gıda endüstrisindeki uygulamaları yeni ve sınırlıdır. Kontrollü salım yapabilen ambalaj filmleri hazırlamak amacıyla uygulanan stratejiler filmin yapısını, dolayısıyla aktif maddenin film içindeki difüzyon hızını değiştirmeye yöneliktir. HAN ve Floros (1998) aktif maddenin salım hızının kontrolünün üç katmanlı film yapısıyla sağlanabileceğini öne sürmüştür. Dış katman aktif maddenin çevreye salımını önlemek, orta katman aktif maddeyi depolamak, iç katman da gıdaya salım hızını kontrol etmek amacıyla tasarlanmıştır. Dış ve iç katman için aktif maddenin difüzyon hızının yavaş olduğu, orta katman içinse difüzyonun hızlı olduğu polimerlerin seçilmesi ile salım hızının kontrol edilebileceği vurgulanmıştır. BUONOCORE ve grubu (2003; 2004; 2005) model antimikrobiyal ajan olarak seçtikleri lizozimin tek ve üç katmanlı polivinil alkol filmlerden salım hızını kontrol etmek için filme ilave edilen çapraz bağlayıcı ajan miktarını değiştirmişlerdir. MASTROMATTEO ve ark. (2009)'da antimikrobiyal ajan olarak timol (thymol) içeren zein bazlı tek ve üç katmanlı ambalaj filmleri hazırlamışlardır. Tek katmanlı filmlerin kalınlıklarını değiştirerek, üç katmanlı filmlerin de iç ve dış katmanına farklı miktarlarda doğal lif ilave ederek salım hızını kontrol etmeye çalışmışlardır. OZDEMİR ve Floros (2001) antimikrobiyal ajan olarak potasyum sorbat içeren, peynir altı suyu proteini izolesinden yenebilir ambalaj filmleri hazırlamışlar,

salım hızını kontrol etmek için filme ilave edilen plastikleştirici ajan miktarını değiştirmişlerdir. ICONOMOPOULOU ve Voyiatzis (2005) oldukça yaygın kullanılan bir antibakteriyel ajan olan triklosanı yüksek yoğunluklu polietilen içine ilave etmişler ve film yapısını değiştirmek için farklı çekme oranlarında filmleri aksel yönde gerdirmişlerdir. Triklosanın gerdirilmiş filmlerden olan salım hızının gerdirilmemiş olanlara göre daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmanın sonucu polimer filmlerinin farklı oranlarda gerdirilmesinin aktif maddenin filmde kontrollü salımının sağlanmasında alternatif bir yöntem olabileceğini önermişlerdir. GEMILI ve ark. (2009a, 2009b) faz değişim yöntemini kullanarak lizozim, L-askorbik asit ve L-tirosin içeren selüloz asetat bazlı antimikrobiyal ve antioksidan özelliğe sahip gözenekli yapıda ambalaj filmleri hazırlamışlardır. Kullanılan aktif maddelerin salım hızı, polimer çözeltisinin kompozisyonunu, böylece filmlerin gözenekliliklerini değiştirerek kontrol edilmeye çalışılmıştır.

Son yıllarda antimikrobiyal nanokompozit gıda ambalaj malzemelerinin hazırlanması konusunda yapılan çalışmalar artmaya başlamıştır. Bu çalışmalarda antimikrobiyal ajan olarak genellikle nanoboyutlu gümüş, TiO<sub>2</sub>, ZnO gibi inorganik malzemeler kullanılmıştır. AVELLA ve grubu (2007) isotaktik polipropilen (PP) içine kalsiyum karbonat nanotaneçikleri ilave etmişler, bu filmlerin katkısız PP filmlere göre mekanik özelliklerinin iyileştiğini, oksijen ve CO<sub>2</sub> geçirgenliklerinin azaldığını ve elma halkalarının özelliği bozulmadan 10 güne kadar paketlemek için kullanılabilirliğini göstermişlerdir. CHANDRAMOULEESWARAN ve ark. (2007) polipropilen/ZnO nanokompozitleri hazırlamışlar ve filmlerin iki patojenik bakteriye (*Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*) karşı oldukça iyi antibakteriyel etki göstermesinden dolayı gıda ambalaj filmi olarak kullanılabilirliğini öne sürmüşlerdir. CERRADA ve grubu (2008) TiO<sub>2</sub> içeren etilen vinilalkol (EVAL) bazlı ambalaj filmlerinin dokuz farklı gram pozitif ve gram negatif bakteri üzerinde etkili olduklarını ve filmlerin antimikrobiyal etkinliklerinin TiO<sub>2</sub> miktarı ile birlikte arttığını bulmuşlardır. YOKSAN ve Chirachanchai (2010) kitosan stabilizatör olarak kullanarak gümüş nanotaneçikleri üretmişler, bu taneçiklerin kitosan çözeltisi içinde altı ay süreyle stabil kaldığını gözlemlemişler, gümüş yüklü nanotaneçikleri kitosan/nişasta bazlı filme ilave ederek antimikrobiyal ambalaj filmi hazırlamışlardır. Nanotaneçik ilave edilmiş filmlerin çekme mukavemetleri ve oksijen gaz geçirgenliklerinde çok az bir iyileşme, *E. coli*, *S. aureus* and *B. cereus* bakterilerine karşı da antimikrobiyal etkinliklerinde artış gözlenmiştir. TANKHIWALE ve Bajpai (2010) laktik asit tutturulmuş kitosan filmine gümüş nanotaneçikleri yüklemişler

ve filmin *E.coli* bakterisi üzerinde etkili olduğunu bulmuşlar, dolayısıyla antibakteriyel gıda ambalaj malzemesi olarak kullanılabileceğini önermişlerdir. AL-NABUSI ve ark. (2006) laktoferrini sıcaklığa duyarlı mikrokapsüller içine yükleyerek peynir altı suyu proteini izolesinden elde edilmiş yenebilir filmlere ilave etmişlerdir. Diğer taraftan laktoferrin kapsüllenmeden direk olarak da filme ilave edilmiştir. Her iki tip filmin de antimikrobiyal aktiviteleri etin bozulmasına sebep olan *Carnobacterium viridans* organizması kullanılarak test edilmiştir. *Carnobacterium viridans* ile inkübe edilen sucuk halkaları hazırlanan filmler ile sarılmış, vakum altında 4 °C ve 10 °C'de 28 gün süre ile depolanmıştır. Mikrokapsül içine yüklenerek filme ilave edilen laktoferrinin, serbest halde mikrokapsüllenmeden direk ilave edilene göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Antimikrobiyal ajan içeren mikro ve nanotaneciklerle gıda ambalaj filmlerinin hazırlandığı çalışmalarda sadece antimikrobiyal özellikler incelenmiş, bu ajanların filmde salımı konusuna hiç değinilmemiştir.

Bu projenin amacı mekanik ve bariyer özellikleri iyileştirmek ve antimikrobiyal ajanın kontrollü salımını sağlayabilmek için biyo-nanokompozit gıda ambalaj filmleri hazırlamaktır. Fosil yakıtlarından elde edilen, petrol bazlı polimerlerin aşırı tüketimi sonucu ortaya çıkan çevre kirliliği, bu polimerlere alternatif olarak biyopolimerlere olan ilginin artmasına yol açmıştır. Sentetik polimerlere göre daha düşük mekanik ve bariyer özelliklerine sahip biyopolimerlerin gıda ambalajı olarak kullanımının artırılabilmesinde biyo-nanokompozit malzemeler önemli bir yere sahiptir. Bu projede gıda ambalajlarının hazırlanması için peynir üretimi sırasında çok yüksek miktarlarda ortaya çıkan ve yeterince değerlendirilemeyen bir yan ürün olan peynir altı suyu izolatu (WPI) kullanılmıştır. Projenin ilk kısmında, WPI filmlerinin mekanik ve bariyer özelliklerinin kitosan nanotanecik ilavesiyle nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Nanotanecik yapımında kullanılan kitosan doğal, toksik olmayan, biyobozunur, biyouyumlu ve antimikrobiyal özelliklerinden dolayı seçilmiştir. Gıda sanayiinde kaplama malzemesi, ambalaj uygulamaları, jelleştirici katkı maddesi, antimikrobiyal koruyucu ve fonksiyonel gıda maddesi olarak kullanılmaktadır. Projenin ikinci kısmında doğal bir antimikrobiyal ajan olan lizozim (LIS) poliakrilik asit (PAA) ile kapsülendirilerek tanecik içinde ve kapsüllenmeden serbest olarak WPI filmlere ilave edilmiştir. PAA/LIS taneciklerini hazırlama koşullarının ve lizozimin filme serbest ya da tanecik içinde ilave kapsülendirilerek ilave edilme şeklinin salım hızı ve filmlerin antimikrobiyal aktiviteleri üzerindeki etkileri incelenmiştir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Antimikrobiyal Ambalaj**

Gıdalarla insanlara geçen hastalıkların önlenmesi için gıdalarda mikroorganizmanın kontrol altına alınması mikrobiyolojik bozulmaların geciktirilmesi veya tamamen engellenmesi oldukça önemlidir. Mikrobiyal gelişmenin önlenmesinde geleneksel olarak kullanılan yöntemler düşük sıcaklıklarda yada kontrollü ve modifiye atmosferde muhafaza, kimyasal koruyucuların ilave edilmesi ve su aktivitesinin düşürülmesidir (konsantrasyon ve kurutma). Bu yöntemlere alternatif olarak son yıllarda antimikrobiyal ambalajlamadan da yararlanılmaya başlanmıştır. Küflerin ve aerobik bakterilerin gelişimini önlemek, yüksek su aktivitesine sahip çeşitli gıdalarda mikrobiyal bozulmayı engellemek ve özellikle fırın ürünlerinin ambalajlanmasında küf ve mayaların gelişmesini önlemek amacıyla gıda ambalajlarına oksijen emici, nem tutucu ve alkol salıcı tablet, kesecik ya da pedler eklenmektedir. Bu yöntem antimikrobiyal ambalajlamanın en başarılı ticari uygulamalarından biridir. Antimikrobiyal ajanlar solventle çözülmüş polimer çözeltisinin içine ya da ısıtılarak eriyik hale getirilmiş polimerin içine direk olarak ilave edilebilir. Hem antimikrobiyal madde, hem de polimerin fonksiyonel grupları içermesi durumunda antimikrobiyal maddelerin iyonik ya da kovalent bağlarla polimerlere immobilizasyonu mümkündür. Antimikrobiyal ambalajlamada kendiliğinden antimikrobiyal özelliklere sahip polimerlerde kullanılmaktadır. Bunlardan en yaygın olanı antifungal özellikleri olan kitosandır.

#### **2.1.1. Antimikrobiyal Ambalajlamada Kullanılan Antimikrobiyal Ajanlar**

Antimikrobiyal özellik taşıyan polimerik malzemelerin gıda alanındaki uygulamaları diğer alanlara kıyasla nispeten daha yenidir. Tablo 2.1'de ambalaj materyallerine ilave edilen antimikrobiyal ajanlar ve etkili oldukları mikroorganizmalar listelenmektedir. Bu maddelere ilaveten, laktoperoksidaz ve laktoferrin gibi enzimler, antimikrobiyal peptitler, hidrokinonlar ve kateflinler gibi doğal fenolikler, bazı yağ asiti esterleri, antibiyotikler ve bakır gibi metallerinde polimerlerin içinde uygulanması potansiyeli vardır (HOTCHKISS, 1997).

**Tablo 2.1. Antimikrobiyal Ambalajlamada Kullanılan Antimikrobiyal Ajanlar  
(APPENDINI ve Hotchkiss, 1998)**

<b>Antimikrobiyal Ajan Mikroorganizma</b>	<b>Polimer</b>	<b>Hedef</b>
Organik Asitler/Anhidritler <ul style="list-style-type: none"> <li>• Propiyonik Asit</li> <li>• Benzoik Asit</li> <li>• Sorbik Asit</li> <li>• Asetik Asit</li> <li>• Laktik Asit</li> <li>• Malik Asit</li> </ul>	Yenilebilir Filmler EVA LLDPE	Küfler
İnorganik Gazlar <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sülfür Dioksit</li> <li>• Klorindioksit</li> </ul>	Çeşitli Poliolefinler	Küfler, Bakteriler,
Metaller <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gümüş</li> </ul>	Çeşitli Poliolefinler	Bakteriler
Bakteriyosin <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nisin</li> <li>• Pediosin</li> <li>• Laktisin</li> </ul>	Yenilebilir Filmler Selüloz LDPE	Gram(+) bakteriler
Fungusitler <ul style="list-style-type: none"> <li>• Benomil</li> <li>• İmazalil</li> </ul>	LDPE	Küfler
Enzimler <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lizozim</li> <li>• Glukoz Oksidaz</li> </ul>	Selüloz Asetat PS Yenilebilir Filmler	Gram(+) bakteriler
Şelat Ajanları <ul style="list-style-type: none"> <li>• EDTA</li> </ul>	Yenilebilir Filmler	Gram(-) bakteriler
Bitki Ekstratları <ul style="list-style-type: none"> <li>• Geryfurt Çekirdeği Ekstratı</li> <li>• Allil isotiyosiyanat</li> <li>• Uçucu yağlar</li> <li>• Hinokitiol</li> <li>• Bamboo tozu</li> </ul>	LDPE Selüloz Filmler Yenilebilir Filmler	Küfler Mayalar Bakteriler
Parabenler <ul style="list-style-type: none"> <li>• Propilparaben</li> <li>• Etilparaben</li> </ul>	Kille Kaplanmış Selüloz LDPE	Küfler

Kısaltmalar : EVA: Etilen Vinil Asetat, LLDPE: Doğrusal Düşük Yoğunluklu Polietilen,  
PS : Polistiren, PE : Polietilen

Gıda sanayiinde en sık kullanılan doğal antimikrobiyal ajanlardan biri lizozimdir. Lizozim, birçok doku, vücut sıvısında ve yumurta akında kuru maddenin % 3,5'i oranında bulunan, aminoasit esterlerinden meydana gelen peptit zinciri yapısında olan bir enzimdir. Özellikle gram pozitif bakterilerin hücre duvarlarındaki polisakkarit yapıya etki ederek, mikroorganizma faaliyetini yok etmektedir. Lizozimin gıda proseslerinde kullanımına Dünya sağlık örgütü (WHO) tarafından izin verilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri dahil birçok ülkede sert ve yarı sert peynirlerde gıda katkı maddesi olarak kabul edilmiştir. Lizozim antimikrobiyal ambalaj elde etmek üzere polivinil alkol (PVOH), naylon, selüloz, zein, soya proteini, kitosan, peynir altı suyu proteini, sodyum aljinat ve jelatin gibi sentetik ve doğal farklı polimerlere ilave edilmiştir (FERNANDEZ ve ark., 2008).

### **2.1.2. Antimikrobiyal Ambalaj Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler**

Antimikrobiyal ambalaj malzemelerinin hazırlanmasında sentetik ve doğal polimerler kullanılmış olmakla birlikte, petrol bazlı olan sentetik polimerlerin aşırı tüketimi sonucu ortaya çıkan çevre kirliliği nedeni ile biyopolimerlere olan ilgi artmıştır. Biyopolimerler elde edildikleri kaynağa bağlı olarak 3 grupta toplanmaktadır (WEBER, 2000).

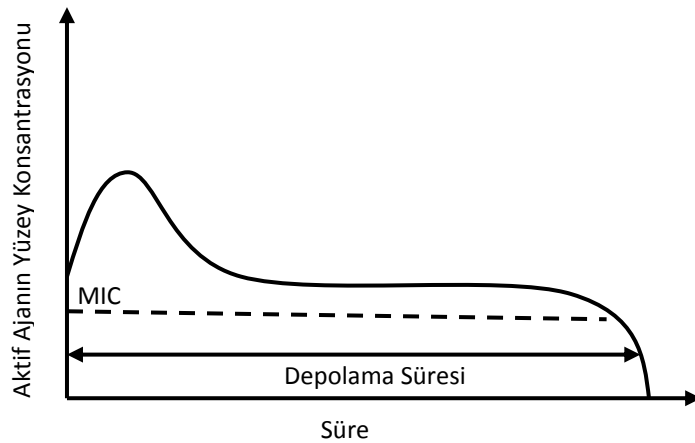
1. Doğrudan biyolojik kütlelerden ekstrakte edilmiş polimerler: Kazein ve gluten gibi proteinler ile nişasta ve selüloz gibi polisakkaritler bu grupta yer alan biyopolimerlerdir.
2. Yenilenebilir biyolojik kaynaklı monomerler kullanılarak kimyasal sentez sonucu üretilen polimerler. Fermantasyon sonucu elde edilen laktik asit monomerinden üretilen polilaktik asit bu gruba giren biyopolimerlere en güzel örnektir.
3. Mikroorganizmalar veya genetik olarak modifiye edilmiş bakteriler ile üretilen polimerler. Bu grupta en sık kullanılan biyopolimerden biri polihidroksilalkonatlarıdır.

Peynir altı suyu proteini peynir üretimi esnasında çok miktarda elde edilen bir yan ürün olan peynir suyundan elde edilir. Peynir altı suyu izolatına (WPI) antimikrobiyal ajan olarak laktik asit, propiyonik asit, kitooligosakkaritler ilave edilerek yenilebilir filmler hazırlanmıştır (RAMOS ve ark., 2012). Bu filmlerin peynir yüzeyinde kontaminasyona sebep olan mikroorganizmaların baskılanmasında etkili olduğu gözlenmiştir. Kekik yağı, sodyum laktat ve poli-L-lisin ilave edilmiş WPI filmlerinin dana etindeki toplam mikrobiyal yükü azalttığı (ZINOVIADOU ve ark., 2011), (WPI)/Cloisite 30B organo-kil kompozit filmlerin *Listeria monocytogenes* bakterisine karşı etkin oldukları (SOTHORNVIT ve ark., 2010), polipropilen

film üzerine kaplanan ve nisin içeren WPI kaplamaların *Lactobacillus plantarum*'u önemli oranda inhibe ettiği (LEE ve ark, 2008), laktoperoksidaz içeren WPI filmlerin de *Penicillium commune* üzerinde etkili olduğu bulunmuştur (MIN ve Krochta, 2005). Baharat uçucu yağların antimikrobiyal madde olarak WPI filmine ilave edildiği bir başka çalışmada filmlerin *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* ve *Lactobacillus plantarum* bakterileri üzerinde etkinlikleri test edilmiş ve en yüksek antimikrobiyal aktivite gösteren filmin kekik yağı içeren olduğu bulunmuştur (SEYDIM ve Sarikus, 2006).

### 2.1.3. Kontrollü Salım Yapabilen Antimikrobiyal Gıda Ambalaj Filmleri

Antimikrobiyal ambalaj malzemelerinde aranan en önemli özelliklerden birisi, antimikrobiyal maddelerin kontrollü bir hızda gıda ortamına salımıdır. Filmden gıda ortamına çok hızlı salım ajanın kısa sürede tükenmesine ve bu sürenin sonunda gıda yüzeyinin korumasız kalmasına, çok yavaş salımı ise antimikrobiyal ajan gıda yüzeyine ulaşmadan bozunmanın başlamasına neden olabilir. Şekil 2.1'de görüldüğü gibi kontrollü salım, gıda yüzeyinde antimikrobiyal ajan konsantrasyonunun uzun süre aynı oranda, mikrobiyolojik bozunmaya engel olacak minimum konsantrasyonun (MIC) üstünde bir seviyede tutulmasını sağlar. Bu sürenin uzunluğu gıdanın raf ömrünü belirleyen önemli bir faktördür.



**Şekil 2.1. Kontrollü salım sistemlerinde aktif ajanın yüzey konsantrasyonunun zamana göre değişimi**

Kontrollü salım sistemlerinin eczacılık alanındaki uygulamaları oldukça eskiye dayanmakla birlikte gıda endüstrisindeki uygulamaları yeni ve sınırlıdır. Kontrollü salım yapabilen ambalaj filmleri hazırlamak amacıyla uygulanan stratejiler filmin yapısını, dolayısıyla aktif maddenin film içindeki difüzyon hızını değiştirmeye yöneliktir. Bu amaçla, filmler



hazırlanırken içine farklı oranlarda plastikleştirici ajan, çapraz bağlayıcı ajan yada polimer ilave edilerek filmlerin plastikleşme ve çapraz bağlanma dereceleri ile gözeneklilikleri ve gözenek boyutları değiştirilmiş, filmlerin katman sayısı artırılmış yada üretim esnasında polimer zincirleri belli bir yönde gerdirilerek konumları değiştirilmiştir (HAN ve Floros, 1998; BUONOCORE ve ark., 2003; 2005; MASTROMATTEO ve ark., 2009; OZDEMİR ve Floros, 2001; ICONOMOPOULOU ve Voyiatzis, 2005; GEMILI ve ark, 2009).

## **2.2. Gıda Ambalajı Uygulamalarında Nanokompozitler**

Biyopolimerler doğada bozunabilmeleri nedeni ile daha az atık oluşumuna sebep olarak çevreyi daha az kirletmektedirler. Bu nedenle petrol türevlerinden elde edilen sentetik polimerlere kıyasla ambalaj malzemesi olarak özellikle son yıllarda dikkat çekmeye başlamışlardır. Biyopolimerlerin kullanımını kısıtlayan en önemli sorunlar hidrofilik yapıları nedeni ile su buharı geçirgenliklerinin yüksek ve mekanik özelliklerinin de düşük olmasıdır. Polimerik nanokompozitler biyopolimerlerin bu dezavantajlarını ortadan kaldırmak için ilgi çekmektedir. Tipik olarak kullanılan nano boyuttaki dolgu malzemeleri kil ve silikatlardır. Az miktarda nano kil eklenmesi ile WPI'in su buharı geçirgenliğinde azalma gözlenmiştir (SOTHORNVIT ve ark., 2009,2010). Bunun sebebi nanokilin tabaka şeklindeki yapısının filme dolambaçlı bir yapı katarak su buharının film boyunca geçişini yavaşlatmasıdır. WPI filminin içerisine farkı yüzdelerde TiO<sub>2</sub> eklenerek de filmin mekanik özelliklerinde iyileşme, su buharı geçirgenliğinde ise fark edilir derecede azalma kaydedilmiştir (ZHOU ve ark., 2009). İnorganik nanotaniciklerin yanısıra selüloz bazlı nanofiberler nişasta ve kitosan nanotanicikler de nanokompozit üretiminde dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır (DE AZEREDO, 2009). Nanotanicikler gıda ambalaj filmlerine antimikrobiyal yada akıllı ambalaj özelliği kazandırmak amacıyla da ilave edilmektedir (DAMM ve ark., 2008; LI ve ark., 2009; XIAO-E ve ark., 2004; LIAO ve ark., 2005).

## **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

### **3.1. Malzemeler**

Kitosan (düşük molekül ağırlıklı), sodyum trifosfat pentabazik (TPP), *Micrococcus lysodeikticus*, poliakrilik asit (ortalama molekül ağırlığı 2000, ve 450,000 g/mol (Da) Sigma-

Aldrich'ten alındı. Asetik asit ve gliserol Panreac'tan alındı. Müller Hinton besiyeri (Broth), hidroklorik asit, asetonitril Merck'ten temin edildi. Trifloroasetik asit ROTH'tan alındı. Müller Hinton agar Fluka'dan temin edildi. Bakteriyolojik Pepton Oxoid'den alındı. Salım testlerinde kullanılan lizozim (molekül ağırlığı 14400 g/mol, Aktivitesi 22770 U/mg) Applichem'den, antibakteriyel testlerde kullanılan lizozim (molekül ağırlığı 14400 g/mol, aktivitesi  $\geq$  40,000U/mg, saflık  $\geq$  90%) Sigma-Aldrich'ten alındı. Peynir altı suyu proteini izolatu Davisco Foods'dan getirildi.

### **3.2. Kitosan/Peynir Altı Suyu Proteini İzolatı Bazlı Nanokompozitlerin Hazırlanması**

#### **3.2.1. Kitosan Nanotanecik Üretimi**

Nanotanecik oluşumu için ticari kitosan (CS) kullanılmıştır. Öncelikle 100 mg kitosan 25 ml %1'lik asetik asit çözeltisi içinde, CS/TPP oranı 4 olacak şekilde tartılan tripolifosfat (TPP) tozu da 25 ml su içinde çözülmüştür. Ardından, tripolifosfat çözeltisi kitosan çözeltisi içine kontrollü bir şekilde büret yardımıyla 4 ml/dk hızda damlatılmıştır. Oda sıcaklığında ve 500 rpm karıştırma hızında gerçekleşen 2 saatlik reaksiyon sonucunda kitosan nanotanecikler elde edilmiştir. Nanotaneciklerin eldesi için 10000 rpm ve oda sıcaklığında 25 dakika santrifüjlenerek çöktürme işlemi yapılmıştır.

#### **3.2.2. Kitosan Nanotaneciklerin Karakterize Edilmesi**

Elde edilen CS nanotaneciklerin boyutu, boyut dağılımı ve yük yoğunluğu dinamik ışık saçınımı (Malvern Zetasizer Nanoseries Nano-ZS) cihazı ile ölçülmüştür. Taneciklerin stabilitesi ise farklı zamanlarda yapılan boyut ve boyut dağılımı ölçümleriyle belirlenmiştir. Nanotaneciklerin morfolojik karakterizasyonu için taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Görüntü alabilmek için tanecikler saf su kullanılarak 1: 10000 oranında seyreltilmiştir. Seyreltilmiş olan örnekten 3  $\mu$ l alınarak taramalı elektron mikroskobu standlarına yapıştırılmış olan iletken karbon bantlara damlatılmış ve 24 saat çeker ocakta kurumaya bırakılmıştır. İletkenlik kazandırılması için altınla kaplanan örneklerden ikincil elektron detektörü olan ETD detektörü kullanılarak farklı büyütmelerde görüntüler alınmıştır.

#### **3.2.3. Kitosan/Peynir Altı Suyu Proteini İzolatı (WPI) Bazlı Nanokompozit Filmlerin Hazırlanması**

Kitosan nanotanecik içeren filmlerle, nanotanecik içermeyen kontrol filmi %5'lik WPI'den hazırlanmıştır. Bu amaçla 0.5 g WPI deiyonize su içerisinde çözüldükten sonra WPI: Gliserol

oranı 60:40 olacak şekilde gliserol eklenmiştir. WPI'nın sudaki çözünürlüğünü engellemek amacıyla, çözelti 90°C'lik su banyosunda 30 dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığında soğumasına izin verilmiştir. Bu esnada, çöktürülen kitosan nanotanecikler deiyonize su içerisinde dağıtılarak, oda sıcaklığındaki WPI çözeltisine damlatılmıştır. Homojen bir dağılım elde etmek için çözelti 15 saat karıştıktan sonra polipropilen destek üzerine dökülmüştür. Filmler kuruması için 25°C ve %40 neme sahip nemlendirme kabininde 20 saat bekletilmiştir.

### **3.2.4. Kitosan/Peynir Altı Suyu Proteini İzolatı (WPI) Bazlı Nanokompozit Filmlerin**

#### **Morfolojik ve Mekanik Özelliklerinin Belirlenmesi**

Filmlerin morfolojik özelliklerini belirlemek için taramalı elektron mikroskobu (FEI Quanta 250 FEG, ESEM) kullanılmıştır. Sıvı azot altında dondurulan numuneler pens ile kırılarak film kesitleri hazırlanmıştır. Yine karbon bantlar üzerine film kesitleri dik ve aynı yükseklikte olacak şekilde dikkatlice yapıştırılmıştır. Daha sonra numuneler iletkenlik kazandırmak için altın ile kaplanmıştır. İkincil elektron detektörü olan ETD detektörü kullanılarak farklı büyütme oranlarında görüntüler alınmıştır.

Filmlerin mekanik özellikleri ASTM D 882-02 standardına uygun olarak belirlenmiştir. Mekanik test için Texture analyzer (TA XT Plus) cihazının çekme modu kullanılmıştır. Filmler, numune eni 5 mm olacak şekilde neşter yardımıyla kesilmiş ve kalınlıkları on bölgeden ölçülerek ortalamaları alınmıştır. Numuneler, ölçümden 48 saat önce 25°C ve %50 neme sahip nemlendirme kabininde tutulmuştur. Başlıklar arasındaki ilk uzunluk 50 mm ve çekme hızı 25 mm/dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Ölçümler beş kez tekrar edilmiştir. Kaydedilen gerilim ve uzama verileri kullanılarak oluşturulan grafikten filmlerin çekme mukavemeti, elastisite modülü ve toplam uzama yüzdesi belirlenmiştir.

### **3.2.5. Kitosan/Peynir Altı Suyu Proteini İzolatı (WPI) Bazlı Nanokompozit Filmlerin Su Buharı Geçirgenliklerinin Belirlenmesi**

WPI filmlerinin su buharı geçirgenliği için ölçülecek film alanı 5 cm<sup>2</sup> olacak şekilde maskeleme yapılmıştır. Filmlerin geçirgenliği oda sıcaklığında, %25 neme sahip ortamda ve 100 cm<sup>3</sup>/dk azot gazı akışında test edilmiştir (PERMATRAN-W® Model 3/33 Plus, Mocon). Yapılan ölçüm sonucunda cihazdan su buharı iletim hızı (WVTR) elde edilmiştir. Film kalınlıkları on bölgeden ölçülerek ortalamaları alınmıştır. Geçirgenlik aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Geçirgenlik} = \frac{WVTR}{S(R_1 - R_2)} \times L$$

WVTR: Su buharı iletim hızı (g/m<sup>2</sup>gün)

S: Test sıcaklığında suyun buhar basıncı

R<sub>1</sub>: Ayarlanan bağıl nem (25% neme sahip bölmedeki R<sub>1</sub> değeri=0.25)

R<sub>2</sub>: Kuru azotun bağıl nemi (R<sub>2</sub>=0)

L: Filmin kalınlığı (mm)

### **3.2.6. Kitosan/Peynir Altı Suyu Proteini İzolatı (WPI) Bazlı Nanokompozit Filmlerin Serbest Boşluk Hacimlerinin (Free Volume) Belirlenmesi**

Filmlerdeki serbest boşluk hacminin hesaplanması için Simha ve Boyer yaklaşımı temel alınarak geliştirilen molar termal genleşme modeli kullanılmıştır (KREVELEN, 2009). Serbest hacim moleküller arasındaki boşlukla ilişkilidir. Lastiksi veya eriyik bölgeden aşırı soğutma, serbest hacmin çok küçük olduğu ve moleküllerin ya da zincirlerin daha fazla hareket edemeyeceği sıcaklığa ulaşıncaya kadar yapılabilir. Bu sıcaklıkta camsı faza geçiş yapılır. Bu durumun olduğu sıcaklığa da camsı geçiş sıcaklığı denir. Camsı yapının genleşmesi, sabit serbest hacimde moleküller tarafından doldurulan dolu bölgelerin genleşmesiyle meydana gelir (KREVELEN, 2009). Bu durumda camsı fazda yapı içinde hapsolan fazlardan serbest hacim bulunmaktadır. Ancak lastiksi bölgedeki genleşme esasen serbest hacmin genleşmesinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle serbest hacim, lastiksi ve camsı bölgelerdeki ekstrapole yapılmış molar hacim farkı olarak tanımlanabilir. Nanokompozit filmlerin sıcaklığa göre boyut değişimini ölçmek için Dinamik Mekanik Analiz (TA Instruments DMAQ800) cihazı kullanılmıştır. Filmler 5 mm genişlikte ve 35 mm uzunluğunda kesilmiş, on farklı noktadan kalınlıklarının ölçümü yapılarak ortalama değer alınmıştır. Cihazın ince filmler için çekme başlıkları kullanılmıştır. Kontrollü gerilim modunda filmlerin sıcaklığı -40°C'den 20°C'ye çıkartılarak sıcaklığa bağlı uzunluğundaki değişim ölçülmüştür. Elde edilen grafiklerde, camsı geçiş sıcaklığına karşılık gelen noktadaki eğim değişimi camsı ve lastiksi bölgenin sınırını göstermektedir. Bu iki bölge iki ayrı grafikte çizdirilip, elde edilen denklemlerden 0 °K'e ekstrapolasyon yapılmıştır. Bu noktadaki uzunluklar arasındaki fark serbest hacim değeri olarak hesaplanmıştır.

### **3.2.7. Kitosan/Peynir Altı Suyu Proteini İzolatı (WPI) Bazlı Nanokompozit Filmlerin**

#### **Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi**

Antimikrobiyal testler disk-difüzyon metodu kullanılarak yapılmıştır. Müller-Hinton agar hazırlanıp otoklavlandıktan sonra petrilere dökülmüştür. Petrilere 24 saat bekletilerek sterilite kontrolünden geçirildikten sonra 3 petriye *E.coli* (ATCC 25922) kültürü ekilmiş ve 24 saat 37°C' de büyümeye bırakılmıştır. 24 saat sonunda bu kültürden eküvyon çubuğuyla alınarak 10 ml pepton suya dağıtılmış ve optik densitesi 0.5 McFarland olacak şekilde McFarland cihazı ile bakteri konsantrasyonu ayarlanmıştır. *E. coli* için 0.5 McFarland değeri  $3 \times 10^8$  koloniyeye tekabül etmektedir. Daha sonra bu pepton sudan yine eküvyon çubuğuyla alınarak ateş başında petrilere yayılmıştır. Yayma işlemi aynı petri için 3 kez farklı açılarda swab çubuğu yardımıyla tarama yapılarak gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonunda tüm agar yüzeyi hiç boşluk kalmayacak şekilde *E. coli* ile sıvanmıştır. Test edilecek olan filmler çapı 15 mm olacak şekilde kesilmiştir. Her filminden üçer adet numune hazırlandıktan sonra steril kabin içerisinde UV altında filmlerin iki yönü de birer dakika sterile edilerek film üstüne önceden bulaşmış olan bakterilerin öldürülmesi sağlanmıştır. Daha sonra tüm filmler petrilere yerleştirilmiş ve inkübatörde 24 saat 37 °C'de tutulmuştur. Filmlerin bakteri üzerindeki inhibisyon aktivitesi agarla temas ettiği alana eküvyon çubukla dokunulup herhangi bir bulaşma ve bulanıklık farklılığı olup oluşmadığına bakılarak belirlenmiştir.

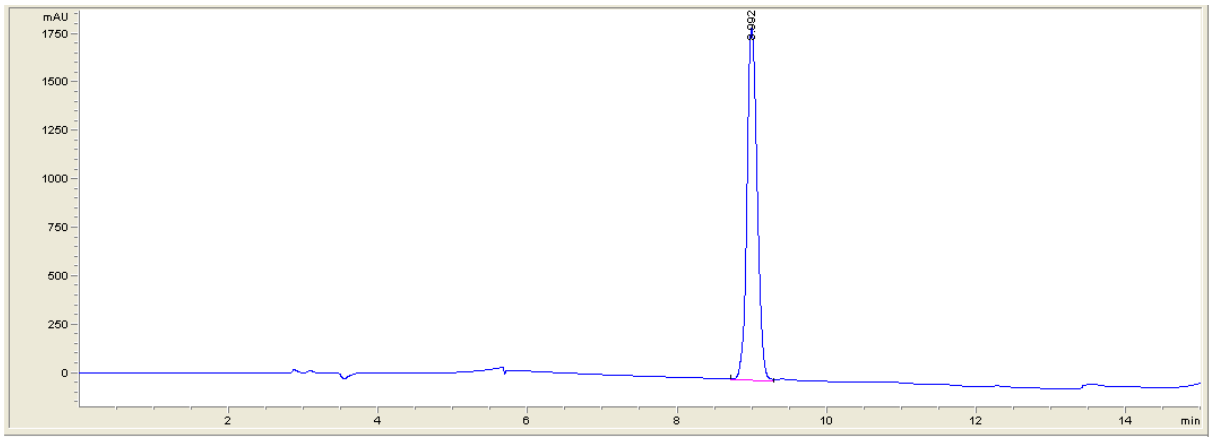
### **3.3. Poliakrilik Asit/Lizozim Kompleksi İçeren WPI Bazlı Antimikrobiyal Ambalaj**

#### **Filmlerinin Hazırlanması**

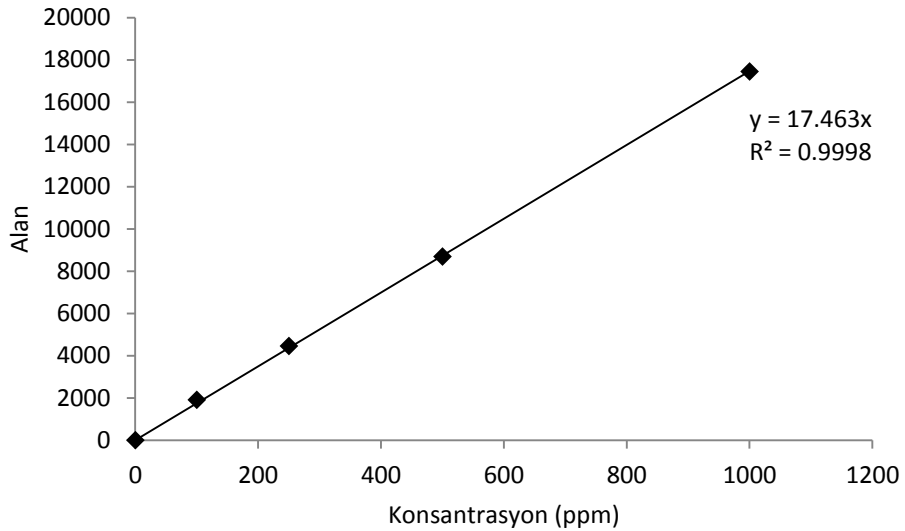
##### **3.3.1. Poliakrilik Asit/Lizozim Kompleksinin Hazırlanması**

Poliakrilik asit (PAA) (Mv=450 kDa, 2 kDa) ve lizozim (Mv=14.4 kDa), 10 mM'lık fosfat tampon çözelti (pH=7.0) içerisinde çözüldükten sonra sırasıyla SNP, BNP adlı tanecikleri oluşturmak için PAA/LIS oranı (g/g), 0.1 ve 0.3 olacak şekilde karıştırılmıştır. Bir dakika boyunca karıştıktan sonra, faz ayrışması olana kadar yaklaşık 2 saat bekletilmiştir. Faz ayrışması gerçekleştikten sonra, PAA-LIS kompleksini elde etmek için çözelti 3000 rpm ve 25°C'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Üstteki faz çökmüş taneciklerden ayrılarak HPLC yöntemi ile yüklenmeyen lizozim miktarları belirlenmiştir. PAA'ya ilave edilen lizozim miktarından yüklenmeyen miktar çıkarılarak taneciklere yüklenen lizozim belirlenmiştir. Bu değer yüzde yüklenme verimi (yüzde YV) olarak raporlanmıştır. [% Yüzde YV=Yüklenen lizozim (mg) x 100/Toplam çözeltiye ilave edilen lizozim (mg)].

Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile lizozim miktarının belirlenebilmesi için 5 µm çapında silika tanecik içeren 250x4.6 mm boyutlarında C18 ters faz kolon kullanılmıştır. 0.1% trifluoroasetikasit tampon çözeltisini içeren su-asetonitril karışımı kademeli olarak kolondan geçirilmiştir. İlk 10 dakika içerisinde trifluoroasetikasit tampon çözeltisi %100' den %20' ye düşürülmüş daha sonra 5 dakika stabilizasyon için beklenmiştir. Örnekler 225 nm'de pik vermektedir ve lizozimin kolonda kalış süresi (retention time) 8.9 dakikadır. Şekil 3.1'de tipik bir HPLC kromatogramı, Şekil 3.2'de de lizozim konsantrasyonunu belirlemede kullanılan kalibrasyon grafiği verilmektedir.



Şekil 3.1. Tipik bir HPLC kromatogramı



Şekil 3.2. Lizozim konsantrasyonunun HPLC ile tayininde kullanılan kalibrasyon grafiği

### 3.3.2. Poliakrilik Asit/Lizozim Kompleksinin Karakterize Edilmesi

Üretilen poliakrilik asit/lizozim komplekslerinin boyut ve boyut dağılımı dinamik ışık saçınımı (Malvern Zetasizer) cihazı ile ölçülmüştür. Tüm komplekslerin su ve salım ortamı içerisindeki zeta potansiyelleri yine aynı cihazla ölçülmüştür.

### 3.3.3. Poliakrilik Asit/Lizozim Kompleksi İçeren WPI Filmlerinin Hazırlanması

Film oluşumu için öncelikle % 5'lik WPI çözeltisi 90°C su banyosunda 30 dakika tutularak denature edilmiştir. Oda sıcaklığına gelen WPI çözeltisine, lizozim üç farklı şekilde ilave edilmiştir: 1) Serbest olarak 2) PAA ile kompleks oluşturmuş şekilde 3) Hem serbest hem de PAA ile kompleks oluşturmuş şekilde. Serbest lizozim direk olarak, santrifüjle çöktürülen PAA/LIS kompleksi ise deiyonize su içerisinde yeniden dağıtıldıktan sonra WPI çözeltisine damlatılmıştır. Son olarak çözeltiye WPI/GliseroL oranı 1 olacak şekilde plastikleştirici gliserol de eklendikten sonra karıştırılarak polipropilen destek üzerine dökülmüştür. Film 25°C ve % 40 nemde kurutulmuştur.

**Tablo 3.1. Film Kompozisyonları**

PAA Molekül Ağırlığı (kDa)	PAA/LIS	Film Kodu	WPI (g)	Gliserol (g)	PAA (g)	LIS (g)
2	0.1	SNP	0.5	0.5	0.008	0.08
450						
2	0.3	BNP			0.024	
450						
2	0.1	Serbest Lizozim+SNP			0.004	0.04+0.04
450						
2	0.3	Serbest Lizozim+BNP			0.012	
450						
-	-	Serbest Lizozim			-	0.08

### 3.3.4. Poliakrilik Asit/Lizozim Kompleksi İçeren WPI Filmlerinin Morfolojisinin Belirlenmesi

Poliakrilik asit/ Lizozim kompleksleri içeren filmlerin morfolojinin belirlenmesi için taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Görüntü alabilmek için filmler sıvı azot içerisinde kırılmış ve kesitleri incelenmek üzere taramalı elektron mikroskobu standlarına yapıştırılmıştır. İletkenlik kazandırılması için altınla kaplanan örneklerden ikincil elektron detektörü olan ETD detektörü kullanılarak farklı büyütme oranlarında görüntüler alınmıştır. Filmler

yüksek kontrastlı geçirmeli elektron mikroskobu (TEM-FEI, Tecnai G<sup>2</sup> Spirit Bio(TWIN)) ile de ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda incelenmiştir. Hızlanma voltajı olarak 80kV seçilmiştir. Epoksi reçineden yapılmış blok (8x4x10mm) üzerine yerleştirilmiş örneklerden elmas bıçak yardımıyla oda sıcaklığında 100 nm kalınlığında kesitler alınmıştır ve yüzeyleri düzeltilmiştir.

### **3.3.5. Poliakrilik Asit/Lisozim Kompleksi İçeren WPI Filmlerinin Mekanik Özelliklerinin Belirlenmesi**

Filmlerin mekanik özelliklerini belirlemek için ASTM D 882-02 standardına uygun olarak çekme testi yapılmıştır. Filmler 5 mm genişlikte ve 50 mm test açıklığı olacak şekilde kesilerek numuneler hazırlanmıştır. Her film için en az beş numune kullanılmıştır. Numuneler, kopana kadar 25 mm/dk hızında çekilmiştir. Kaydedilen gerilim ve uzama verileri kullanılarak oluşturulan grafikten filmlerin çekme mukavemeti, elastisite modülü ve toplam uzama yüzdesi belirlenmiştir.

### **3.3.6. Poliakrilik Asit/Lisozim Kompleksi İçeren WPI Filmlerinin Salım Kinetiklerinin Belirlenmesi**

PAA-LIS kompleksi içeren filmler 4 cm x 4 cm boyutlarında kesilerek 40 ml pH 4.5 sodyum asetat tampon çözelti içeren erlenlere daldırılmış ve 100 rpm'de 10°C'de soğutmalı çalkalamalı inkübatörde salım testlerine başlanmıştır. Farklı zamanlarda örnekler alınmış ve alınan örnek hacmi kadar ortama pH 4.5 sodyum asetat tampon çözeltisi eklenmiştir. Zamana bağlı olarak lisozimin filminden salınan yüzdesi, salım ortamından örnek alınarak HPLC ile tayin edilmiştir. Film kompozisyonları Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

### **3.3.7. Poliakrilik Asit/Lisozim Kompleksi İçeren WPI Filmlerinden Salınan Lisozimin Aktivitesinin Belirlenmesi**

*Micrococcus lysodeikticus* süspansiyonunun absorbansındaki azalmanın UV/VIS spektrofotometre ile 660nm'de 30°C'de iki dakika boyunca izlenmesi ile belirlenmiştir. *Micrococcus lysodeikticus* süspansiyonu konsantrasyonu 0.26 mg/ml olacak şekilde 0.05M pH 7 sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır. Analiz için 0.1ml örnek 1.15ml süspansiyonla karıştırılmıştır. Aktivite absorbans –zaman grafiğinin doğrusal olarak değiştiği ilk bölgesi kullanılarak hesaplanmış ve ünite/cm<sup>2</sup> film olarak raporlanmıştır. Bir ünite bir dakika içerisindeki 0.001 birimlik absorbans değişimini göstermektedir.



### **3.3.8. Poliakrilik Asit /Lisozim Kompleksi İçeren WPI Filmlerinin Antimikrobiyal**

#### **Özelliklerinin Belirlenmesi**

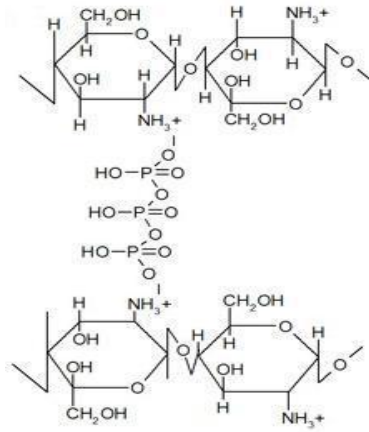
Hazırlanan filmlerin antibakteriyel özellikleri *Listeria innocua* bakterisine karşı incelenmiştir. Öncelikle *L. innocua* stoktan alınıp önceden hazırlanmış petrilerdeki Müller Hinton agar üzerine yayıldıktan sonra 24 saat 37°C'de inkübe edilmiş ve bakteri çoğalması sağlanmıştır. Elde edilen bakteri kolonileri pamuklu svap ile toplanarak 0.1%'lik peptonlu su içerisinde çözünmüş ve McFarland değeri 0.5'e ayarlanmıştır. Böylelikle  $3 \times 10^8$  CFU/ml'lik bakteri çözeltilisi elde edilmiştir. Elde edilen çözelti seri şekilde yapılan seyreltmeler sonucunda  $3 \times 10^4$  CFU/ml'ye ayarlanmıştır. Bunu takiben test edilecek filmleri içeren 15ml'lik besi yerlerine  $3 \times 10^4$  CFU/ml'lik bakteri çözeltilisinden 150µl eklenmiş ve test ortamındaki başlangıç bakteri konsantrasyonunun  $3 \times 10^2$  CFU/ml olması sağlanmıştır. Daha sonra steril olarak hazırlanan Müller Hinton sıvı besiyerleri (15ml) hava alan kapaklı 75 cm<sup>2</sup> hücre kültürü erlenlerine konulmuştur. Test edilecek filmler steril ortamda 64 cm<sup>2</sup> alana sahip olacak şekilde (8cm x 8cm) üretilmiş ve tamamı 15ml'lik sıvı besiyerine yerleştirilmiştir. Hazırlanan erlenler 10°C'de 100 rpm'de çalkalamalı inkübatörde bekletilmiştir. Farklı günlerde alınan örnekler (100µl) önceden hazırlanmış petrilerdeki katı besi yerlerine yayılmış ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda petrilerde oluşan koloniler sayılarak bakteri sayısındaki değişim hesaplanmıştır. Bu testlerde, film içermeyen sadece bakteri içeren sıvı besi yeri pozitif kontrol, sadece besiyeri de negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

## **4. BULGULAR ve TARTIŞMA**

### **4.1. Kitosan/Peynir Altı Suyu Proteini İzolatı Bazlı Nanokompozitlerin Hazırlanması**

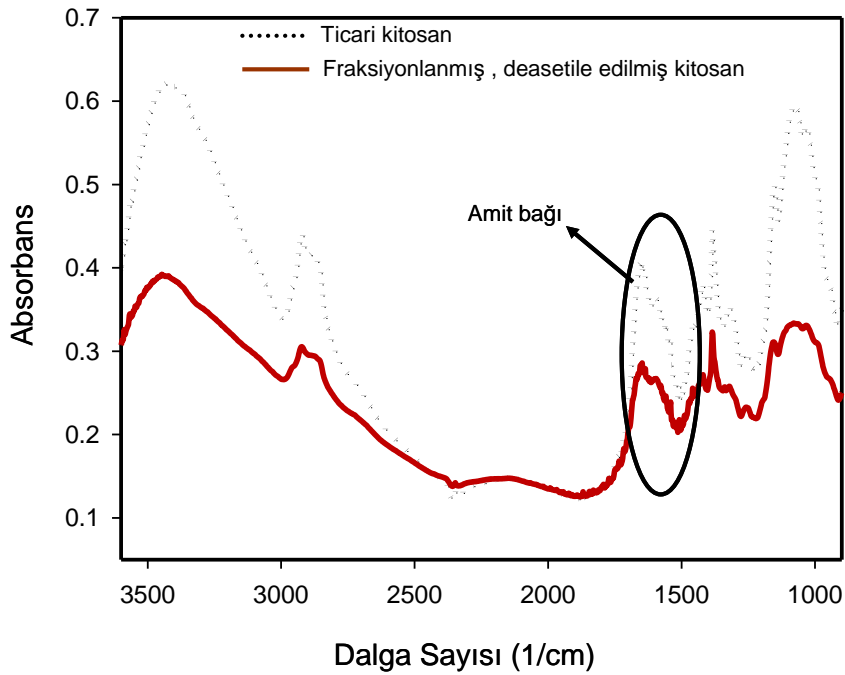
#### **4.1.1. Kitosan Nanotanecik Üretimi ve Karakterizasyonu**

Kitosan nanotanecikler iyonik jelleşme metodu ile hazırlanmıştır. Şekil 4.1'de gösterildiği gibi bu metodla nanotanecik oluşumu katyonik bir polimer olan kitosanın pozitif grupları ile tripolifosfat (TPP) polianyonunun negatif grupları arasında çapraz bağ oluşumuna dayanmaktadır.



**Şekil 4.1. Kitosan ile TPP arasındaki iyonik jelleşme (çapraz bağ oluşumu) reaksiyonu**

Nanotaneçik oluşumu için hem ticari, hem de fraksiyonlama ve deasetilasyon işlemleri sonucu modifiye edilmiş olan kitosan (CS) kullanılmıştır. Ticari kitosanın modifiye edilmesi sonucu deasetilasyon derecesindeki değişim FTIR ile belirlenmiştir. Şekil 4.2’de verilen FTIR spektrumu ticari kitosan için  $1655\text{ cm}^{-1}$  dalga boyunda güçlü absorpsiyon veren amin gruplarının absorpsiyonlarının deasetile edilmiş örneklerde azaldığını göstermektedir. Bu azalma ticari kitosanın modifiye edilmesi sonucu amin gruplarına bağlı asetil gruplarının uzaklaştırıldığının bir göstergesidir.



**Şekil 4.2. Ticari ve fraksiyonlanmış, deasetile edilmiş kitosan tozunun FTIR spektrumu**

Fraksiyonlama ve deasetilasyon işlemleri ile, CS/TPP oranı ve reaksiyon sıcaklığının elde edilen nanotaneceklerin boyutları üzerindeki etkisi Tablo 4.1’de özetlenmiştir. Sonuçlar, CS/TPP oranının değişiminin hem ticari hem de modifiye edilmiş kitosandan 4°C ve 25 °C’de hazırlanan nanotaneceklerin boyutu üzerinde istatistiki açıdan önemli bir etkisi olmadığını göstermiştir ( $p<0.05$ ). Düşük CS/TPP oranlarında (CS/TPP: 3,0 ve 3,5) özellikle fraksiyonlanmış ve deasetile edilmiş kitosandan hazırlanan nanotaneceklerde çökme eğilimi gözlenmiştir. CS/TPP oranının artması ile birlikte nanotaneceklerin boyutları da artmıştır. Bu durum TPP oranının yeterli olmaması nedeni ile kitosanın amin gruplarının önemli bir kısmının çapraz bağ yapamamasından kaynaklanmaktadır.

**Tablo 4.1. Ticari kitosan ile fraksiyonlanmış ve deasetile edilmiş kitosan tozları kullanılarak farklı sıcaklık ve CS/TPP oranlarında üretilen taneciklerin ortalama boyutları**

CS/TPP oranı	Ortalama Tanecik Boyutu (nm)			
	Ticari kitosan		Fraksiyonlanmış ve deasetile edilmiş kitosan	Fraksiyonlanmış ve deasetile edilmiş kitosan
	25°C	4°C	25°C	4°C
3,0	138 ±34 <sup>a</sup>	62 ±10 <sup>b</sup>	125 ±24 <sup>a</sup>	-----
3,5	159 ±8 <sup>a</sup>	78±29 <sup>b</sup>	249±10.6	-----
4,0	204 ±2	108 ±2.1	128 ±9.2 <sup>a</sup>	88 ±4.7
4,5	245±5	97 ±1.4	168±7.7 <sup>c</sup>	162±8.6 <sup>c</sup>
5,0	263 ±6	203 ±4.2 <sup>d</sup>	227 ±22 <sup>d</sup>	186±4.2
5,5	333±11 <sup>e</sup>	301±0.7 <sup>f</sup>	339 ±12 <sup>e</sup>	275±15.5 <sup>f</sup>

\* a, b, c, d, e, f. Aynı harfler istatistiksel olarak farklı olmayan durumları göstermektedir,  $p>0.05$ .

Nanotanecek oluşumu esnasında reaksiyon sıcaklığının 4 °C’den 25 °C’ye artırılması hem ticari, hem de modifiye edilmiş kitosandan hazırlanan nanotaneceklerin boyutunun artmasına neden olmuştur. Bu artış iki sebeple açıklanabilir. Birincisi, yüksek sıcaklıklarda daha az oranda TPP anyonlarının oluşması nedeni ile iyonik jelleşme derecesinin düşmesidir. İkinci sebep ise düşük sıcaklıklarda reaksiyonun daha yavaş ilerlemesi nedeni ile kitosanın pozitif grupları ile tripolifosfat (TPP) polianyonunun negatif grupları arasında çapraz bağ

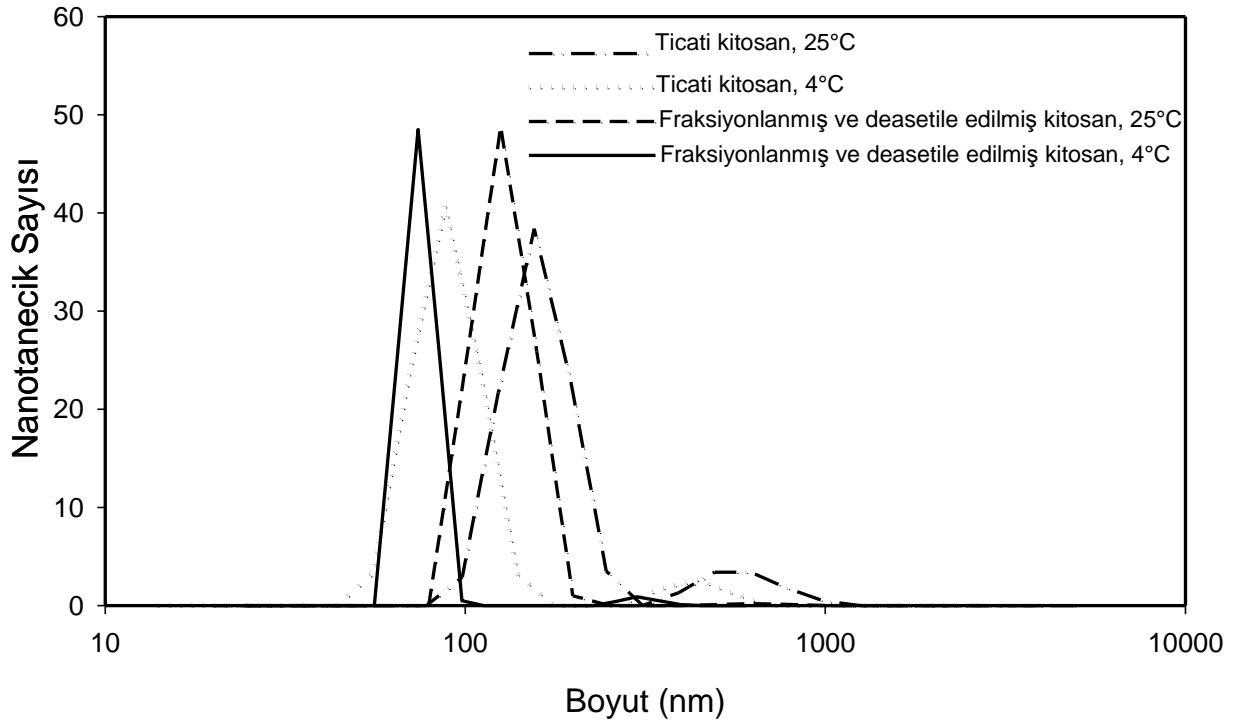
oluşumunun daha yüksek oranda gerçekleşmesi, böylece, iyonik jelleşme derecesinin artmasıdır. Her bir reaksiyon sıcaklığında, CS/TPP oranının 4, 4,5 ve 5 olduğu durumlarda ticari ve modifiye edilmiş kitosandan hazırlanan nanotaneciklerin boyutlarının istatistiki olarak birbirinden farklı olduğu bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Beklendiği gibi bu oranlarda ticari kitosandan hazırlanan nanotaneciğin boyutu fraksiyonlanıp deasetile edilmiş kitosandan elde edilenlere göre daha büyüktür. Bu durum hem fraksiyonlama sonucu polimer zincirlerinin kısalması, hem de kitosanın deasetilasyon derecesinin artmasından kaynaklanmaktadır.

Tablo 4.2’de, hazırlanan nanotaneciklerin ortalama elektrik potansiyelleri listelenmektedir. Beklendiği gibi tüm nanotaneciklerin net yükü pozitifdir. Ticari kitosandan hazırlanan nanotaneciklerin ortalama elektrik potansiyelleri sıcaklığın artması ile birlikte azalırken, modifiye edilmiş kitosandan 4°C ve 25°C’de hazırlanan nanotaneciklerin elektrik potansiyelleri arasında önemli bir fark bulunmamıştır. Ancak, 25°C’de modifiye edilmiş kitosandan hazırlanan nanotaneciklerin elektrik potansiyel ölçümlerinin standard sapmaları oldukça yüksektir. Tüm nanotaneciklerin elektrik potansiyel değerlerinin +30 mV’un üstünde olması bu taneciklerin kısa süre içinde stabilitelerini koruyabileceklerini göstermiştir.

**Tablo 4.2. Ticari kitosan ile fraksiyonlanmış ve deasetile edilmiş kitosan tozları kullanılarak farklı sıcaklık ve CS/TPP oranlarında üretilen taneciklerin ortalama elektrik potansiyelleri**

CS/TPP oranı	Ortalama Elektrik Potansiyeli (mV)			
	Ticari kitosan	Ticari kitosan	Fraksiyonlanmış ve deasetile edilmiş kitosan	Fraksiyonlanmış ve deasetile edilmiş kitosan
	25°C	4°C	25°C	4°C
3,0	32±1.7	54±2.8	50±7.0	56±1.0
3,5	31±4.0	58±0.7	53±11.3	55±1.5
4,0	39±1.0	61±0.6	59±12.7	56±2.9
4,5	42±0.6	62±0.6	55±17.7	55±0.7
5,0	42±1.5	65±2.0	49±14.7	59±3.2
5,5	42±1.5	63±2.0	56 ±13.9	57±2.0

Kitosanın fraksiyonlanması ve deasetilasyon derecesinin artırılmasının nanotaneceklerin boyut dağılımı üzerindeki etkisi CS/TPP oranının 4 olduğu durum için Şekil 4.3’de gösterilmektedir. Ticari kitosan tozundan elde edilen nanotanecekler daha geniş bir boyut dağılımına sahiptir, aynı zamanda iki farklı ortalama boyutta tanecik içermektedir. Diğer taraftan modifiye edilmiş kitosandan elde edilen nanotaneceklerin tek bir ortalama boyut etrafında dağılım gösterdiği ve dar bir boyut dağılımına sahip oldukları gözlenmiştir.



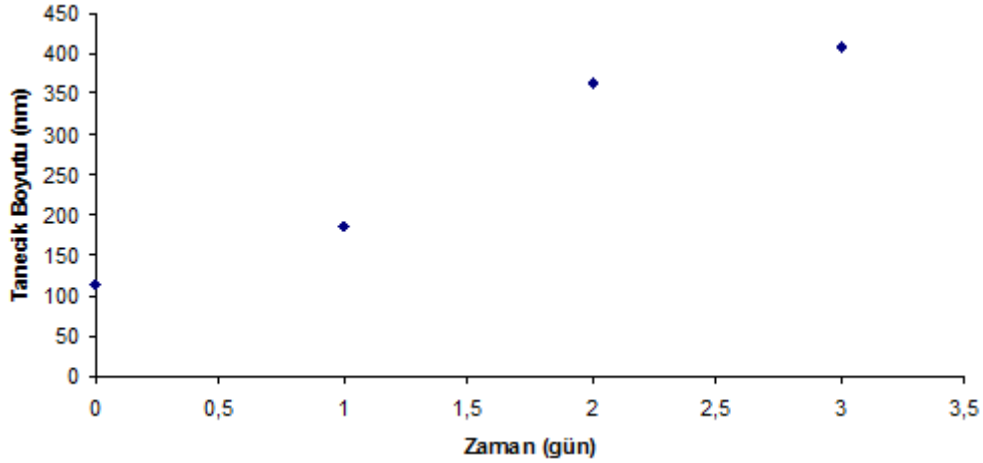
**Şekil 4.3. Ticari kitosan ile fraksiyonlanmış ve deasetile edilmiş kitosan tozundan 25 °C ve 4 °C’de üretilmiş nanotaneceklerin boyut dağılımları (CS/TPP=4)**

Boyut dağılımının en önemli göstergesi polidispersite indeksidir (PDI). Şekil 4.3’deki boyut dağılımlarından elde edilen PDI değerleri Tablo 4.3’te verilmiştir. Görüldüğü üzere, fraksiyonlanmış ve deasetile edilmiş örneklerin PDI değerleri ticari kitosana oranla daha düşüktür yani bu nanotaneceklerin boyut dağılımları daha dardır.

**Tablo 4.3. Ticari kitosan ile fraksiyonlanmış ve deasetile edilmiş kitosandan farklı sıcaklıklarda hazırlanan taneciklerin polidispersite indeksleri.**

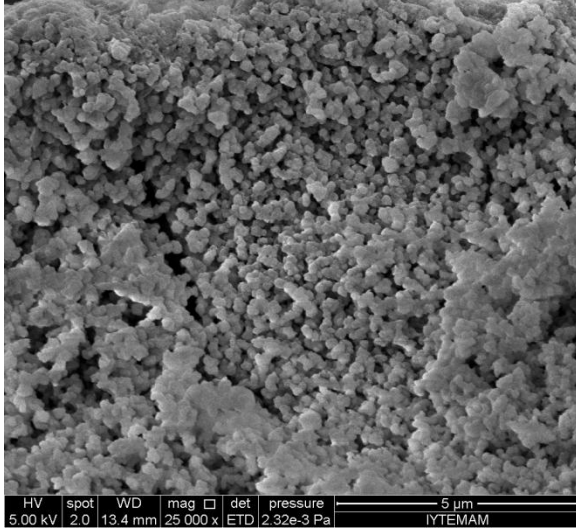
CS/TPP Oranı	Polidispersite İndeksi (PDI)			
	Ticari Kitosan	Ticari Kitosan	Deasetile Edilmiş Kitosan	Deasetile Edilmiş Kitosan
	25°C	4°C	25°C	4°C
4	0.701	0.765	0.454	0.496

Nanotaneciklerin uzun sürelerde stabilitelerinde bir değişim olup olmadığı farklı zamanlarda tanecik boyutunun ölçülmesi ile belirlenmiştir. Şekil 4.4'ten görüldüğü gibi CS/TPP oranı 4'e ayarlanarak, fraksiyonlanmış ve deasetile edilmiş kitosan tozundan 25 °C'de hazırlanan nanotaneciğin boyutu 3 gün içinde yaklaşık 4 kat artış göstermiştir. 5 günün sonunda ise gözle görülür derecede topaklanma ve çökme gözlemlenmiştir. Bu sonuç, nanotaneciklerin hazırlanmasını takiben kısa süre içinde kullanılmayacağı durumlarda liyofilize edilip toz halde saklanması gerektiğini ortaya koymaktadır.

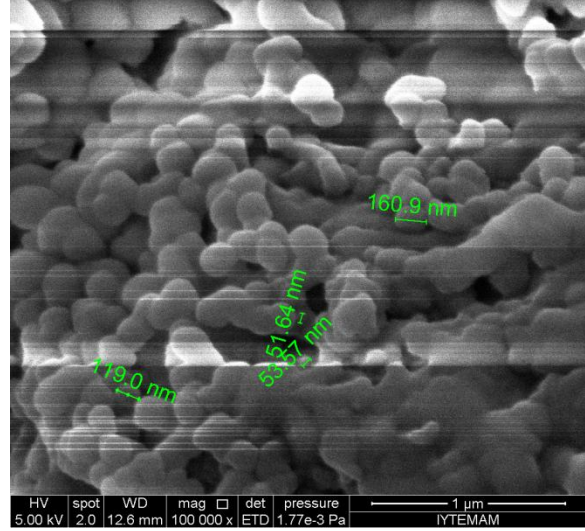


**Şekil 4.4. Fraksiyonlanmış ve deasetile edilmiş kitosan tozundan 25°C'de hazırlanmış nanotaneciğin boyutunun zamanla değişimi (CS/TPP=4)**

Nanotaneciklerin morfolojik karakterizasyonu için taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Şekil 4.5'de farklı büyütme oranlarında elde edilen kitosan nanotaneciklerinin görüntüleri yer almaktadır. Şekil 4.5a'da görüldüğü üzere, tanecikler küreseldir. Bu görüntü, dinamik ışık saçınımı yöntemiyle nanotaneciğin boyutunu belirlemek için kullanılan modeldeki küresel yapı kabulünü doğrulamaktadır.



a) 25000X



b) 100000X

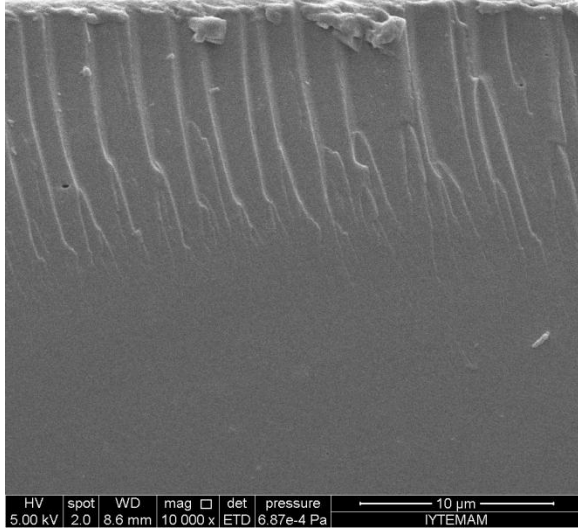
**Şekil 4.5. Nanotaneciklerin a) 25000X büyütmede b)100000X büyütmede taramalı elektron mikroskobu ile alınan görüntüleri**

Karakterizasyon sonuçlarının tümü değerlendirildiğinde kitosanın modifiye edilmesinin ve reaksiyon sıcaklığının oda sıcaklığının oldukça altında tutulmasının ( $4^{\circ}\text{C}$ ) nanotaneciklerin boyut ve boyut dağılımı açısından çok önemli farklar yaratmadığı görülmüştür. CS/TPP oranının 3 ve 3,5 olduğu durumlarda nanotaneciklerin kısa sürede stabilitesini kaybettiği gözlemlendiğinden, nanokompozit hazırlanması için kullanılacak nanotaneciklerin ticari kitosandan, CS/TPP oranını 4, reaksiyon sıcaklığını da  $25^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlayarak hazırlanmasına karar verilmiştir.

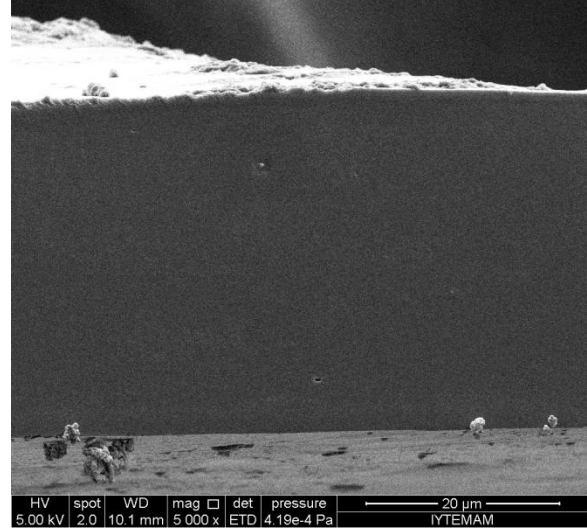
#### **4.1.2. Kitosan/Peynir Altı Suyu Proteini İzolatı (WPI) Bazlı Nanokompozit Filmlerin**

##### **Morfolojik ve Mekanik Özellikleri**

Filmlerin morfolojik özelliklerini belirlemek için taramalı elektron mikroskobu (FEI Quanta 250 FEG, ESEM) kullanılmıştır. WPI filminin yoğun bir yapıda olduğu ve yapısında birtakım deformasyonları içerdiği (Şekil 4.6a), kitosan nanotanecik ilave edilmiş filmin ise oldukça homojen bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.6b).



a) WPI (10000x)



b) Kitosan/WPI (5000x)

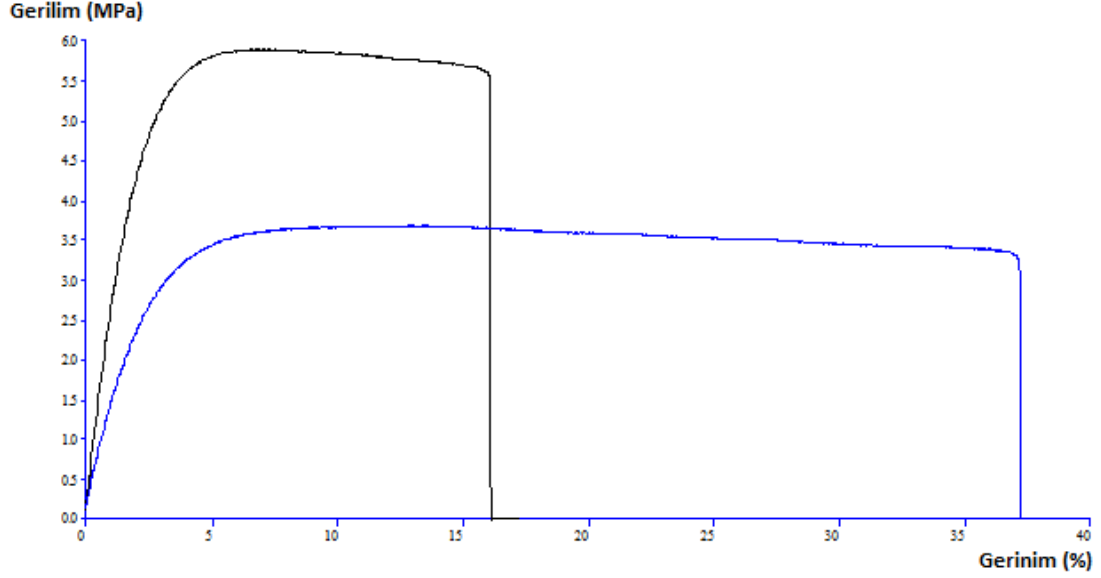
**Şekil 4.6. WPI ve Kitosan/WPI bazlı nanokompozit filmlerin SEM görüntüleri**

Şekil 4.7’de kitosan nanotanecek içeren ve içermeyen filmlere ait gerilim-gerinim grafiği görülmektedir. Filmler, tipik olarak önce elastik davranış ve belirli bir kuvvette oluşan akma bölgesinden sonra plastik değişim göstererek kopmuşlardır. Kitosan nanotaneceklerin WPI filme sağladığı mukavemetlendirme gözlenebilmektedir. Nanotanecek içermeyen WPI filmin çekme mukavemeti düşükken, % uzaması daha fazladır. Nanotaneceklerin polimer yapısında dağılarak, çekme yüküne karşı destek olacak bölgeler oluşturduğu ve matrisle girdiği etkileşim sayesinde filmi mukavemetlendirdiği anlaşılmaktadır. Çekme mukavemetindeki artışa zıt olarak, filmin güçlenmesi nedeniyle, doğal olarak yük altında % uzamasında azalma olmuştur.

Tanecek miktarına göre WPI filmlerin çekme mukavemeti ve kopma noktasında % uzama değerleri Şekil 4.8’de gösterilmektedir. %2 oranına kadar nanotanecek ilave edilmesi WPI filmin mekanik özelliklerinde önemli oranda bir değişikliğe sebep olmamıştır. Ancak, %4 nanotanecek içeren WPI filmlerin çekme mukavemetinde ani bir artış ve buna zıt olarak % uzama değerinde de azalma gözlenmiştir. Bu sonuçtan nanotaneceklerin belirli bir kompozisyondan sonra artan yüzey alanı sayesinde yapıda destekleyici noktalar oluşturdukları anlaşılmaktadır. Nanotanecek ilavesiyle kopma noktasındaki uzama değeri azalmakla birlikte en düşük % uzama değeri bile WPI filmininki ile karşılaştırılabilir düzeydedir. Filme ilave edilen nanotanecek miktarının % 4’den % 6’ya artırılması sonucunda

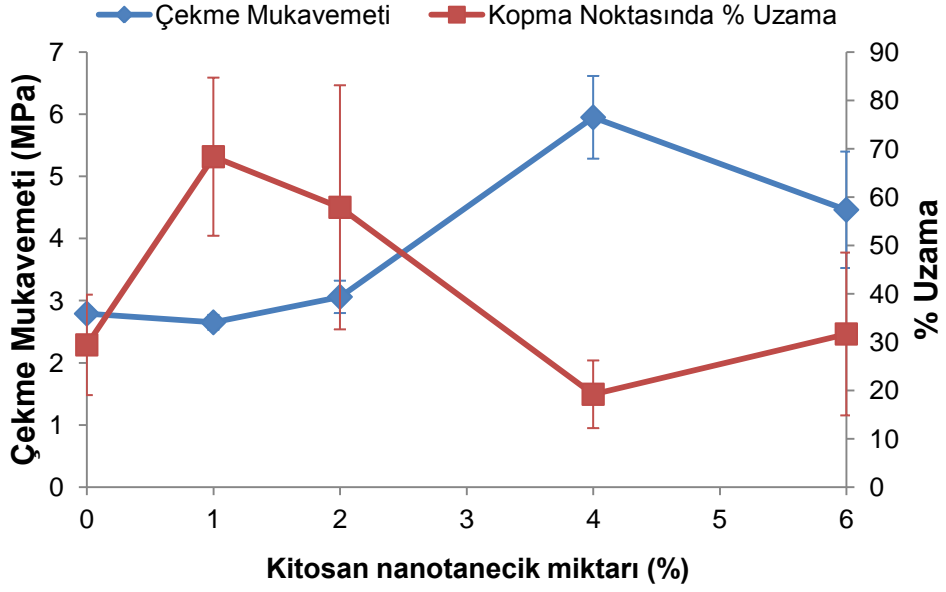


çekme mukavemetinde düşme başlamıştır. Bu durumun nanotaneceğin film içindeki homojen dağılımının sağlanamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



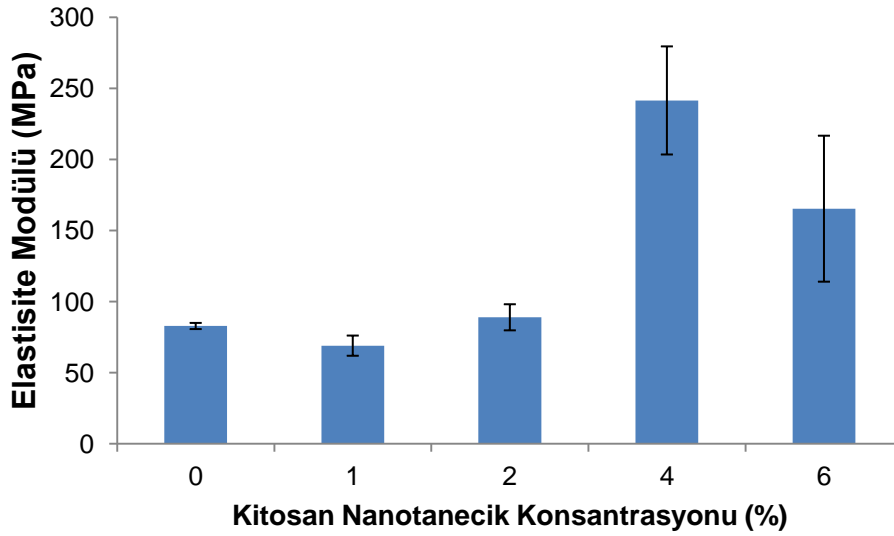
**Şekil 4.7. WPI ve %4 nanotanecek içeren WPI filmlerinin gerilim gerilim grafiği**

Bu çalışmada %4 oranında kitosan nanotanecek ilavesi WPI filmin çekme mukavemetindeki artış (% 113) diğer çalışmalara kıyasla oldukça fazladır. ZHOU ve grubu (2009) tarafından WPI filmine %1 oranında titanyum dioksit ( $TiO_2$ ) ilave edilerek çekme mukavemetinde maksimum %40 oranında, KADAM ve grubu (2013) tarafından ise %1.5 silika kaplı  $TiO_2$  nanotanecek ilavesi ile %15 civarında artış kaydedilmiştir. İnorganik yapıda olan  $TiO_2$  nanotanecekleri filme homojen bir şekilde dağıtabilmek kitosan nanotanecekler kadar kolay değildir. Bu çalışmalarda film yapısını bozmadan homojen bir şekilde ilave edilebilen nanotanecek miktarı %1- 1.5 ile sınırlı kaldığından mekanik özelliklerde yeterince iyileşme sağlanamamıştır.



**Şekil 4.8. Kitosan nanotanecek miktarına göre WPI filmlerin çekme mukavemeti ve % uzama değerlerindeki değişim**

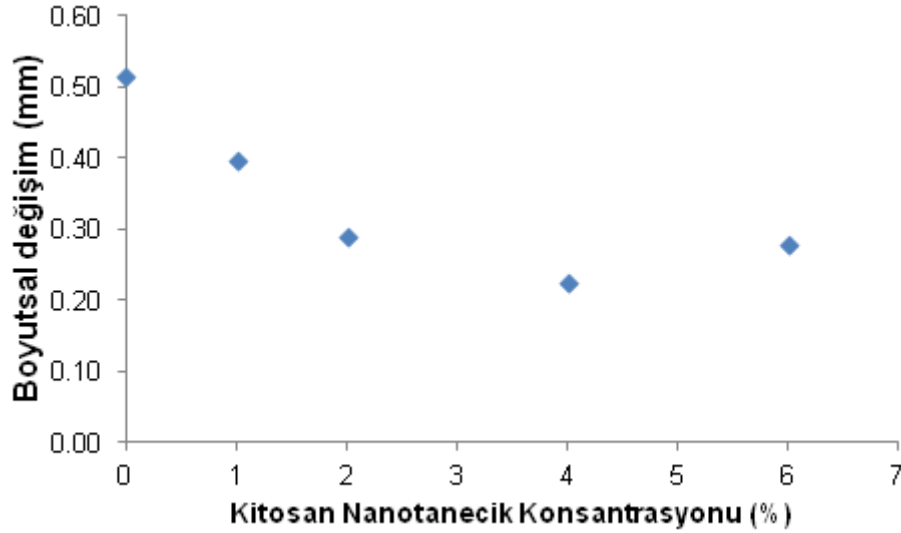
Şekil 4.9'dan görüldüğü gibi %4 kitosan nanotanecek konsantrasyonuna kadar elastisite modülünde dramatik bir değişim olmamış, ancak %4 ve %6 tanecek konsantrasyonlarında, filmlerin elastisite modülü artmıştır.



**Şekil 4.9. Kitosan nanotanecek miktarına göre WPI filmlerin elastisite modülündeki değişim**

Kitosan nanotaneceklerin polimer içerisinde homojen dağılımı ile filmlerin çekme mukavemetinin ve elastisite modülünün artmasıyla birlikte % uzama değerlerinin azalması bu taneceklerin antiplastikleştirici etki gösterdiğine işaret etmektedir. Kitosan

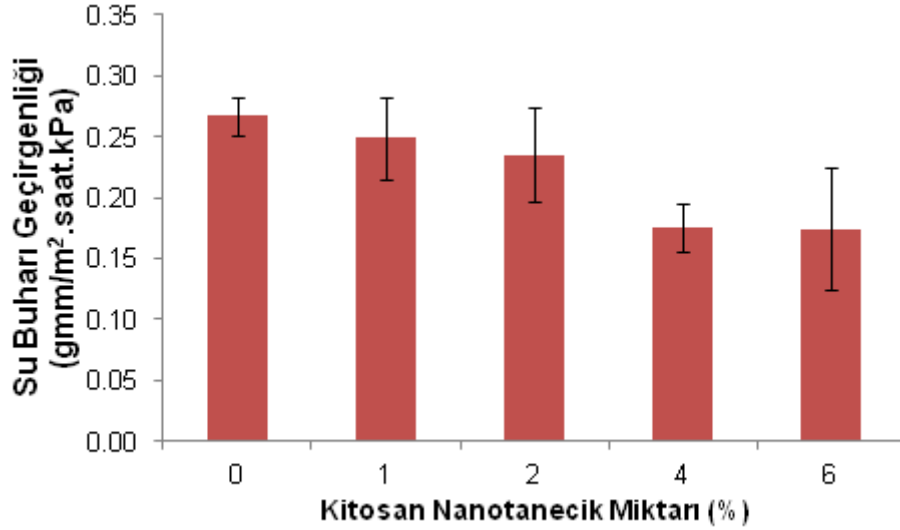
nanotaneceklerin antiplastikleştirici etki göstermesi Şekil 4.10'dan görüleceği gibi filmlerin serbest boşluk hacminin azalmasından kaynaklanmaktadır. En düşük serbest boşluk hacmine sahip olan % 4 nanotanecek içeren filmler en yüksek çekme mukavemetine sahiptir. Nanotanecek miktarının % 6'ya çıkarılması durumunda serbest boşluk hacminde artış gözlenmiştir. Bu durum taneceklerin film içinde topaklanması nedeni ile polimer zincirleri arasındaki mesafeyi açarak plastikleştirici etki göstermesinden kaynaklanmaktadır.



**Şekil 4.10. Kitosan nanotanecek miktarına göre WPI filmlerin serbest boşluk hacimindeki değişim**

#### **4.1.3. Kitosan/Peynir Altı Suyu Proteini İzolatı (WPI) Bazlı Nanokompozit Filmlerin Su Buharı Geçirgenlikleri**

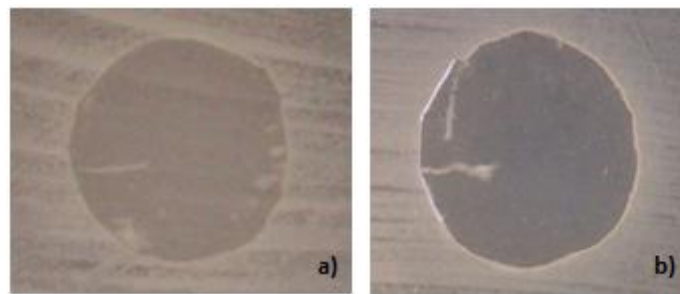
WPI filmlerin su buharı geçirgenliği, Şekil 4.11'de gösterildiği gibi % 4 oranında nanotanecek ilavesi ile birlikte azalma göstermiştir. WPI, yapısında bulunan oldukça yüksek orandaki polar amino asitler nedeniyle hidrofilik karaktere sahip bir polimerdir. WPI'ya göre daha düşük su buharı geçirgenliğine sahip kitosan nanotaneceklerin varlığında su buharının film boyunca geçişi için kat etmesi gereken mesafenin artması ve yüzey alanının azalması nedeniyle filmin su buharı geçirgenliği azalmaktadır. Ayrıca, Şekil 4.10'dan görüldüğü gibi nanotanecek ilave edilmesiyle WPI filminin yapısındaki zincirler arasındaki serbest boşluk hacmi azalarak, su buharının geçişi yavaşlamaktadır. Nanotanecek miktarı %6'ya çıkarıldığında homojen dağılımın sağlanamamasından ve buna bağlı olarak serbest boşluk hacminin %4 nanotanecek içeren filme kıyasla artmasından dolayı su buharı geçirgenliğinde daha fazla bir azalma kaydedilmemiştir.



**Şekil 4.11. Kitosan nanoparçecik miktarına göre WPI filmlerin su buharı geçirgenliğindeki değişim**

#### 4.1.4. Kitosan/Peynir Altı Suyu Proteini İzolatı (WPI) Bazlı Nanokompozit Filmlerin Antimikrobiyal Özellikleri

Peynir altı suyu izolatı filmlerinin bilinen bir antimikrobiyal aktivitesi yoktur. Beklenildiği gibi, *E.Coli*'ye karşı yapılan testler sonucunda, peynir altı suyu izolatı filmlerinin, üzerine bakteri yayılmış agarla temas ettiği bölgenin altında bakteri üremesi olduğu görülmüştür (Şekil 4.12a). %4 kitosan nanoparçecik içeren WPI filmin temas ettiği bölgede tamamen berraklaşma olduğu tespit edilmiş, kitosan nanoparçeciklerin filme antibakteriyel özellik kazandırdığı görülmüştür (Şekil 4.12b). Kitosanın antibakteriyel aktivitesi pozitif yüklü amin gruplarına bağlıdır. Bu gruplar, negatif yüklü hücre duvarlarıyla etkileşime girerek bakteri hücrelerini inhibe etmektedir. Kitosan nanoparçeciklerin film ortamından salınmaması nedeniyle, filmlerin etrafında parlak bir inhibasyon bölgesinin oluşmaması, sadece filmin temas ettiği noktalarda berraklaşma olması kitosan nanoparçeciklerin filmde salınmadığını göstermiştir.

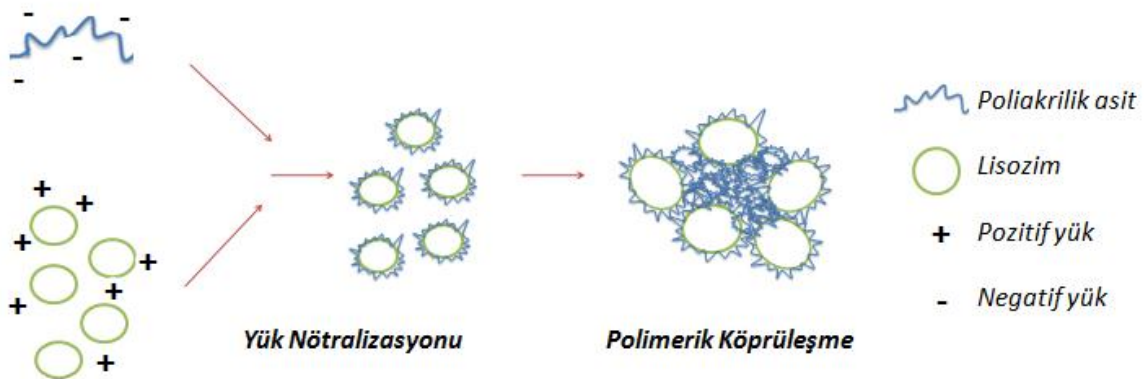


**Şekil 4.12. Nanoparçecik içermeyen peynir altı suyu izolatı film (a) ile %4 CS/TPP nanoparçecik içeren WPI filmin (b) antibakteriyel test sonuçları**

## 4.2. Poliakrilik Asit/Lizozim Kompleksi İçeren WPI Bazlı Antimikrobiyal Ambalaj Filmlerinin Hazırlanması

### 4.2.1. Poliakrilik Asit/Lizozim Komplekslerinin Karakterize Edilmesi

Poliakrilik asit (PAA)-lizozim kompleksler yük nötralizasyonu ve polimerik köprüleşme (polymer bridging) olmak üzere iki farklı mekanizma ile oluşmaktadır (Şekil 4.13). Lizozim ve PAA çözeltileri bir araya geldiği anda suda çözünmeyen kompleksler oluştururlar. Bu kompleksler Brownian hareketleriyle başlayan çarpışmalar sonucunda yük nötralizasyonu adı verilen elektrostatik birleşmeyle meydana gelirler. Daha sonra açıkta kalan lizozim ve kompleksler diğer komplekslerle biraraya gelerek büyür, çökerek en küçük boyutlu ilk tanecikleri oluşturur. Çöken tanecikler bir araya gelerek “polimer köprüleşme” olarak tanımlanan kayma-temelli çarpışmalar (shear induced collisions) sonucunda büyük topakları oluştururlar.



**Şekil 4.13. Poliakrilik asit-lizozim kompleksinin oluşum mekanizmaları**

Polimer köprüleşme mekanizması büyük molekül ağırlığına sahip PAA içeren komplekslerde, yük nötralizasyonu ise küçük molekül ağırlığına sahip PAA içeren komplekslerde baskın mekanizmadır. Kompleks oluşumu için 2 ve 450 kDa molekül ağırlıklarında 2 farklı tip PAA kullanılmıştır. Her bir molekül ağırlığı için PAA/LIS oranı 0.1 ve 0.3 olarak ayarlanarak komplekslerin boyutunun değişmesi sağlanmıştır. Kompleks oluşumu pH'sı 7 olan fosfat tampon içinde gerçekleştirilmiştir. Bu pH'da PAA net negatif yüke sahipken, lizozim pozitif yüklüdür. Böylece aralarındaki güçlü elektrostatik çekim lizozimin PAA ile hemen hemen 100 % oranında kompleks oluşturmasını sağlamıştır (Tablo 4.4).

**Tablo 4.4. Lizozimin PAA içine yüklenme oranları**

Kompleks Adı	PAA Molekül Ağırlığı (kDa)	PAA/LIS (wt/wt)	Yüzde Yüklenme Verimi (%)
SNP	2		97.4
	450		99.9
BNP	2	0.3	99.5
	450		99.1
Serbest Lizozim+SNP	2	0.1	97.2
	450		99.9
Serbest Lizozim+BNP	2	0.3	98.5
	450		97.3

Filmlerin zeta potansiyel değerleri deiyonize su ve salım ortamı olarak kullanılan pH 4.5 sodyum fosfat tampon içerisinde ölçülmüştür. Tablo 4.5’deki sonuçlar molekül ağırlığının ve PAA/ LIS oranının artmasıyla yük yoğunluğunun arttığını göstermektedir. Santrifüjlenerek çökertilip süpernatantlarından ayrılan kompleksler deiyonize suda tekrar dağıtılarak film çözeltilerine eklenmektedir. Taneciklerin deiyonize su içerisinde negatif zeta potansiyel değerine sahip olması pH 7’de negatif yüklü olan WPI içerisinde topaklanma olmadan homojen bir şekilde dağılımını, pH 4.5 tampon çözelti içerisinde pozitif zeta potansiyel değerine sahip olmaları da bu pH değerinde pozitif yüklü olan WPI filminden salımının gerçekleşmesi açısından kritiktir.

**Tablo 4.5. PAA/LIS komplekslerinin boyutu ve zeta potansiyel değerleri**

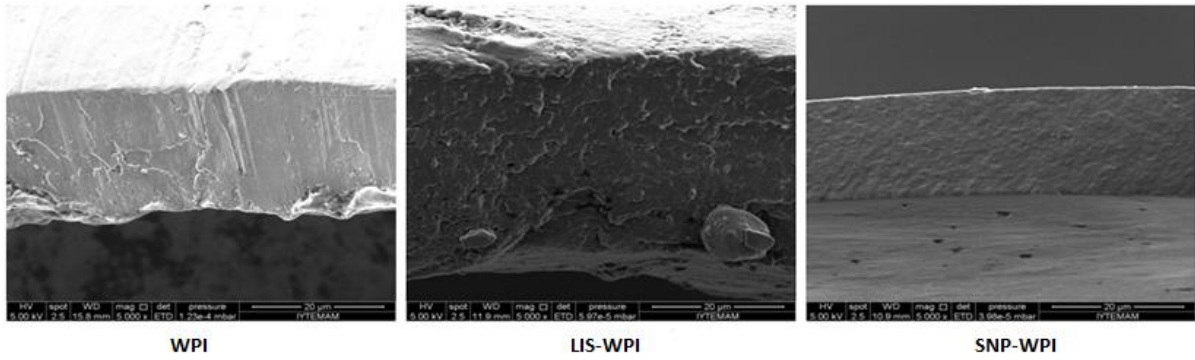
Kompleks Kodu	PAA Molekül Ağırlığı (kDa)	PAA/LIS wt/wt	Zeta Potansiyel (mV)		Boyut		
			Deiyonize Su	0.05 M pH 4.5 Na-Asetat Tampon	Boyut (d.nm)	% Sayı	Genişlik
<b>2SNP</b>	2	0.1	-7.0 ±0.7	10.2±0.9	31.9	100	7.53
<b>2BNP</b>	2	0.3	-8.7±0.3	10.7±0.2	361.9	100	40.2
<b>450SNP</b>	450	0.1	-11.1 ±1.2	12.0±0.3	427.5	100	51.2
<b>450BNP</b>	450	0.3	-13.6±1.1	14.9±1.1	665	99.9	17.5

Kompleks oluşumu esnasında PAA/LIS oranının ya da PAA’nın molekül ağırlığının artırılması daha büyük boyutta tanecikler elde edilmesine sebep olmuştur. 450 kDa PAA ile hazırlanan

komplekslere kıyasla 2 kDa PAA ile hazırlananların boyutu PAA/LIS oranının artışından çok daha fazla oranda etkilenmiştir. Tüm komplekslerin zeta potansiyel değerlerinin  $\pm 30$  mV'dan daha düşük olması stabil olmadıklarının bir göstergesidir.

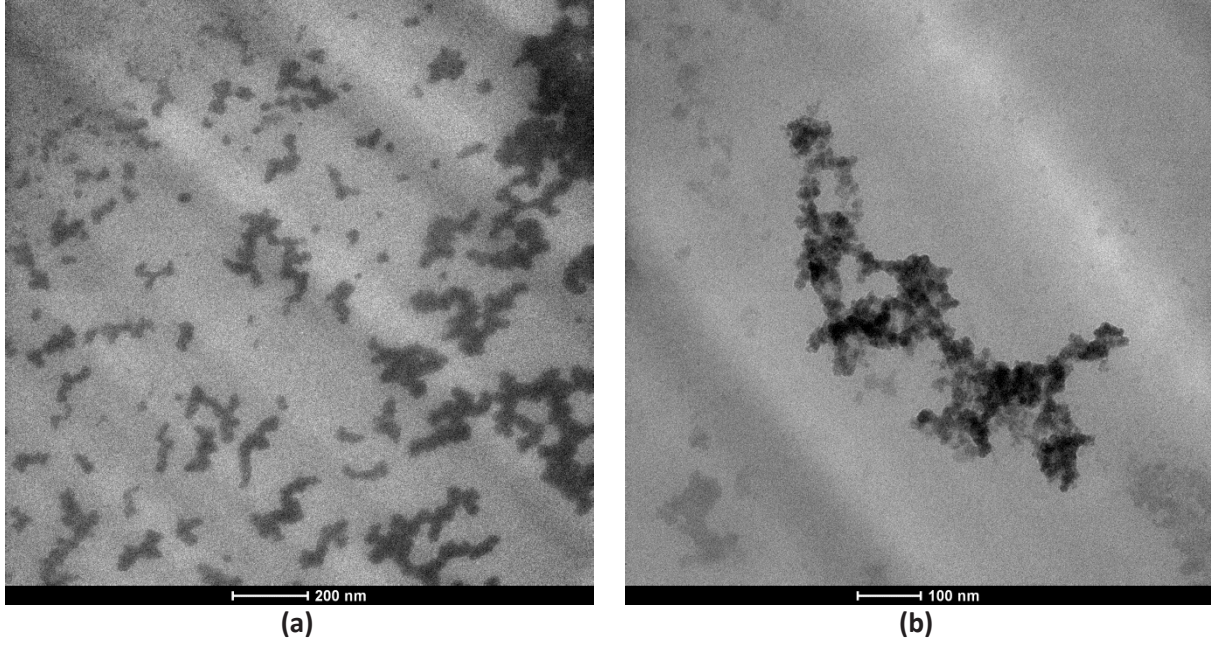
#### 4.3. Poliakrilik Asit/Lizozim Kompleksi İçeren WPI Filmlerinin Morfolojik ve Mekanik Özelliklerinin Karakterize Edilmesi

PAA-LIS kompleksi ilave edilmesi ile WPI filmlerinin yapısında oluşan değişimi gözlemek için filmlerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.14). SEM görüntülerinden WPI filmine ve serbest lizozim içeren WPI filmine kıyasla PAA/LIS kompleksi içeren filmin yapısının daha yoğun olduğu gözlenmiştir.



**Şekil 4.14. Peynir altı suyu izolatu (WPI), serbest lizozim içeren WPI ve PAA/LIS kompleksi içeren WPI (SNP-WPI) filmlerin SEM görüntüleri. Büyütme: 5000x.**

Hazırlanan filmlerden serbest lizozimden sonra en hızlı salım yapan serbest lizozim ile SNP (2kDa) kompleks yapısını içeren film (salım sonuçları aşağıda 4.4 numaralı kısımda verilmektedir) TEM ile incelenmiştir.

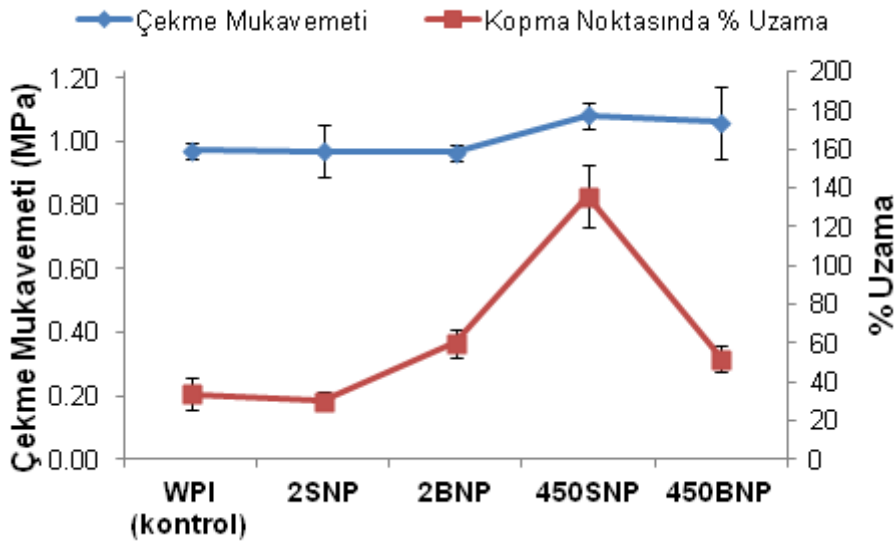


**Şekil 4.15.Serbest Lizozim + SNP (2kDa) kompleksini içeren WPI filmlerin TEM mikrografileri (a) 200nm (b)100nm**

Şekil 4.15'deki TEM mikrografileri filmde alınan kesit içerisinde komplekslerin morfolojisi boyutları ve film içerisindeki dağılımı hakkında bilgi vermektedir. Film kesitindeki ufak kalınlık değişimleri yer yer görüntü netliğini düşürmektedir. Siyah küresel tanecikler kompleksleri göstermektedir. Kompleksler yer yer tek düşmelerine rağmen genel dağılımda nanotanecik kümeleri mevcuttur. Bu kümelerin oluşma nedeni iki şekilde yorumlanabilir. Birincisi kuruma sırasında yapıların bir araya gelmesi diğeri ise komplekslerin oluşum mekanizması olan polimer köprüleşmedir. Polimer köprüleşme büyük molekül ağırlıklı poliakrilik asitten üretilen komplekslerde baskın mekanizma olarak bilinmekle birlikte küçük molekül ağırlıklı poliakrilik asitten üretilen taneciklerde de görülmektedir. Film üretimi sırasında ortam pH'ı 7 dir. Bu pH'ta komplekslerin ve WPI net yüklerinin negatif olması da taneciklerin dağılımını kümeleşme yönünde etkilediği düşünülmektedir. Tanecik boyutları 20 nm civarında gözlenmiştir. Bu boyutlar dinamik ışık saçınımı ölçümleri (31nm-genişlik 7.5nm) ile uyumludur. Şekil 4.15b'deki mikrografide kompleks yapılarına göre daha silik adacıklar görülmektedir. Bu adacıkların ortama eklenen serbest lizozim olduğu düşünülmektedir. İleri karakterizasyon teknikleri (boyama gibi) kullanılarak elde edilen görüntülerdeki kontrast farkı artırılabilir. Böylelikle lizozim ve kompleksin kompleks yapısındaki konumları netleştirilebilir. Şekil 4.16 ve 4.17'de farklı molekül ağırlığı ve poliakrilik asit/lizozim oranları kullanılarak hazırlanmış olan komplekslerin WPI filmlerin mekanik özelliklerinde yarattığı değişiklik



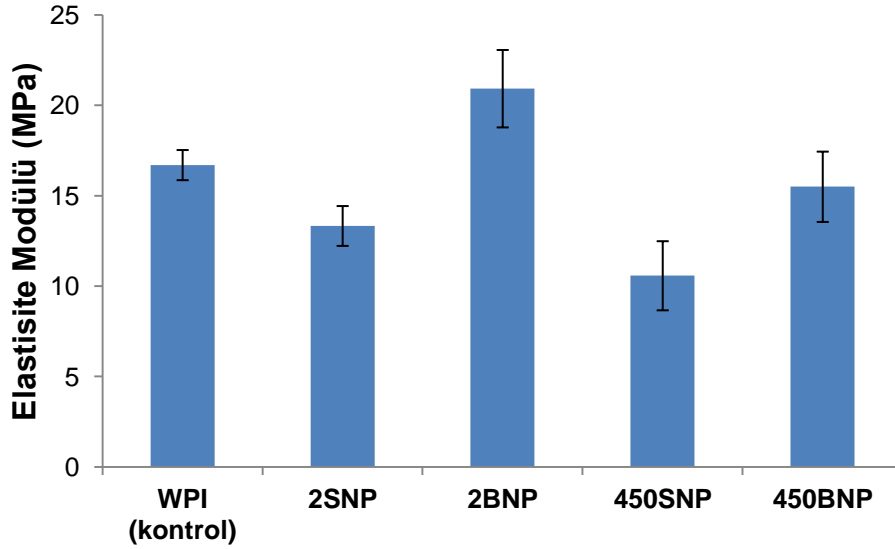
görülmektedir. Tanecik eklenmesiyle genel olarak çekme mukavemetinde belirgin bir değişim görülmemiştir. Bu da tanecikler ile polimer matrisin kuvvetli bir etkileşime girmediğini ve çekme mukavemetinin tanecik boyutundan bağımsız olduğunu göstermektedir. Ancak % uzama ve elastisite modül değerleri açısından farklı mekanik davranışlar gözlenmiştir. 2000 molekül ağırlığına sahip poliakrilik asit ile hazırlanan komplekslerden küçük tanecikli olanları içeren filmlerin (2SNP) % uzama değeri belirgin bir değişiklik göstermemiştir. Ancak polimer matrise dağılan tanecikler, filmin elastisite modül değerini azaltmıştır. Tablo 4.5'deki sonuçlardan görüldüğü gibi 2SNP, en küçük tanecik boyutuna sahiptir ve filmin elastik şekil değişimine karşı olan direncini biraz azaltmıştır. Küçük tanecik boyutu sayesinde polimer zincirlerinin arasına girerek belirli bir yüke kadar zincirlerin elastik şekil değiştirmesine yardımcı olmuştur. 2000 molekül ağırlıklı poliakrilik asit ile hazırlanan büyük taneciklerin (2BNP) WPI filmine ilave edilmesiyle % uzama ve elastisite modül değerlerinin arttırdığı gözlenmiştir. Bu tanecikler, küçük taneciklere nazaran, polimer



**Şekil 4.16. Aynı konsantrasyonda WPI içeren filmlere farklı PAA/LIS komplekslerin eklenmesiyle çekme mukavemeti ve % uzama değerlerindeki değişim**

zincirleri arasında daha fazla yer kaplayarak zincirleri genişletmiş ve hem filmin kopma noktasına kadar uzama değerlerini, hem de elastik şekil değişimine karşı olan direncini arttırmışlardır. 450000 molekül ağırlıklı poliakrilik asitlerle hazırlanan taneciklerde ise daha farklı davranış sergilenmiştir. Büyük nanotanecek (450BNP) içeren filmlerin % uzama değerleri polimer köprüleşmesi ile oluşan topaklanma nedeniyle küçük tanecikler (450SNP) ilave edilmiş filmlere nazaran daha düşüktür. Ancak küçük tanecikli filmin % uzama değeri

diğer filmlere göre hayli yüksek, elastisite modülü de diğer filmlere göre daha düşüktür. Bu durum taneciklerin yapıda daha düzgün dağıldığını, polimer zincirleri arasına girerek genişlemeye ve dolayısıyla % uzamanın artmasına yol açtığını göstermektedir.



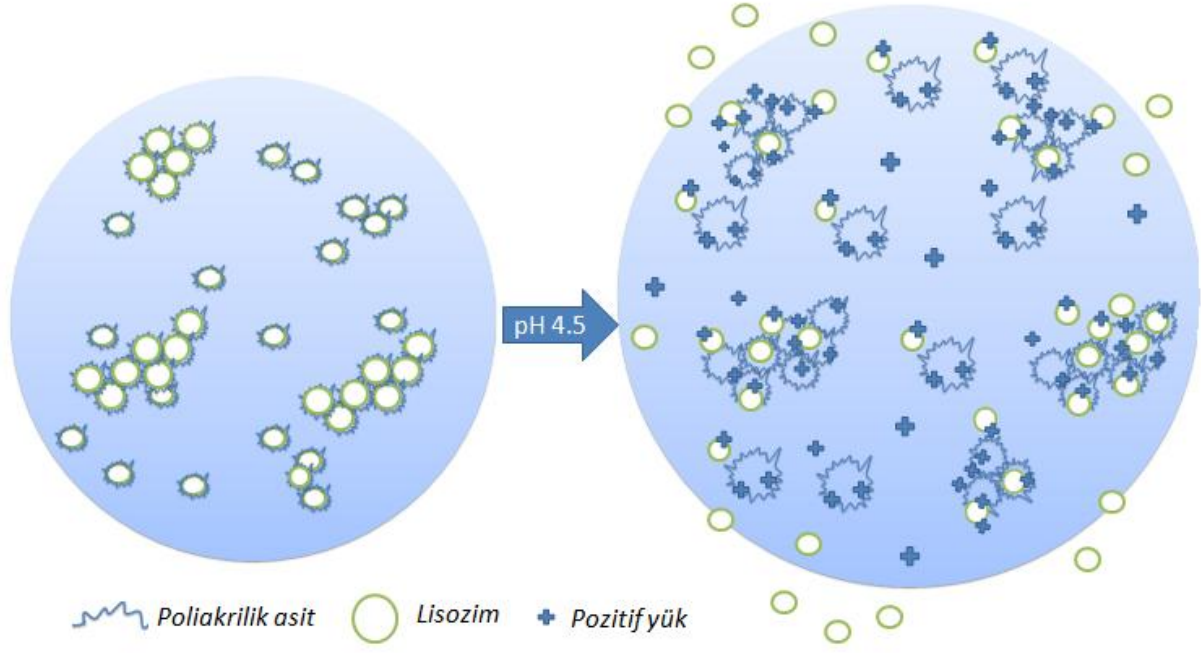
**Şekil 4.17. Aynı konsantrasyonda WPI içeren filmlere farklı PAA/LIS komplekslerinin eklenmesiyle filmlerin elastisite modül değerlerindeki değişim**

#### **4.4. Poliakrilik Asit/Lizozim Kompleksi İçeren WPI Filmlerinden Lizozimin Salım**

##### **Kinetiğinin Belirlenmesi**

Antimikrobiyal ambalaj filmlerinde aranan en önemli özellik antimikrobiyal ajanın kontrollü salımının sağlanabilmesidir. Bu amaçla, literatürde yapılan çalışmalarda filmler hazırlanırken içine farklı oranlarda plastikleştirici ajan, çapraz bağlayıcı ajan ya da polimer ilave edilerek filmlerin plastikleşme ve çapraz bağlanma dereceleri ile gözeneklilikleri ve gözenek boyutları değiştirilmiş, katman sayısı artırılmış ya da üretim esnasında polimer zincirleri belli bir yönde gerdirilerek konumları değiştirilmiştir. Bu projede yukarıda bahsedilen stratejilerden farklı olarak antimikrobiyal ajan bir polielektrolit ile kompleks oluşturarak nanotanecik içine yüklenip filme ilave edilmiş, salımı da nanotaneciğin boyutunu değiştirerek kontrol edilmiştir. Lizozim içeren komplekslerin boyutu polielektrolit olarak seçilen poliakrilik asitin molekül ağırlığı ile sentez esnasında poliakrilik asit/lizozim oranını değiştirerek kontrol edilmiştir.

Tüm salım deneyleri pH 4.5 sodyum asetat tampon çözelti içinde yapılmıştır. Hem lizozim, hem de PAA'nın pozitif yüke sahip olduğu bu pH'da elektrostatik itim gücünün baskın olması sonucu lizozim kompleksten ayrılıp, film içinde difüze ederek ortama salınır (Şekil 4.18).

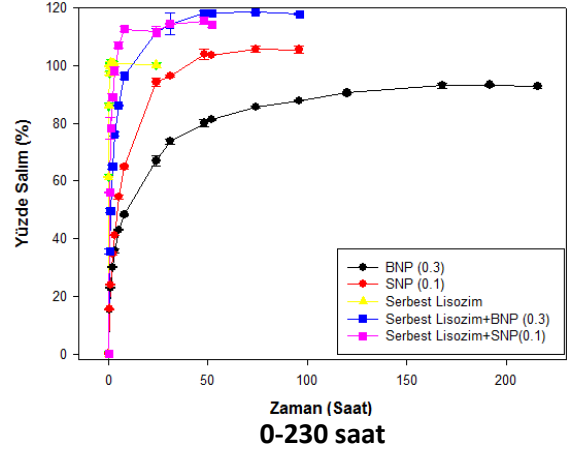
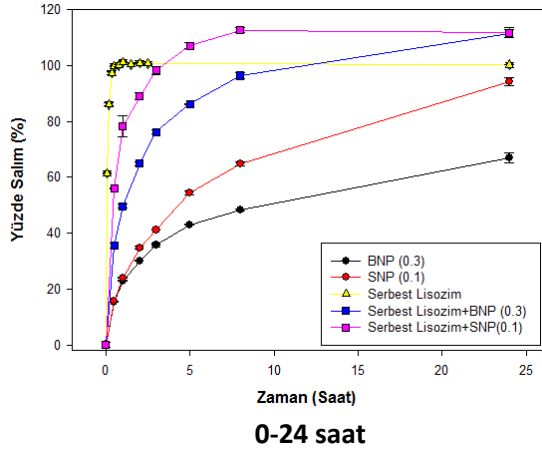


**Şekil 4.18. Lizozimin PAA/LIS kompleksinden salım mekanizması**

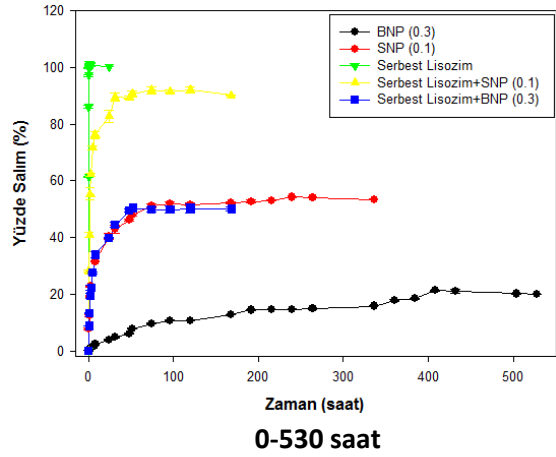
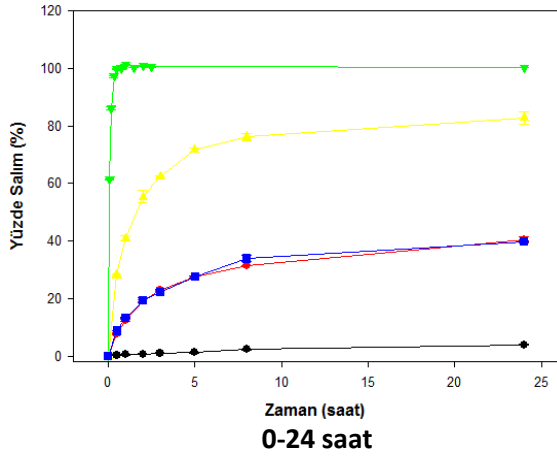
Salım verileri komplekslerdeki PAA'nın molekül ağırlığı 2kDa (Şekil 4.19) ve 450 kDa (Şekil 4.20) ve PAA/LIS oranı 0.1 (Şekil 4.21) ve 0.3 (Şekil 4.22) olacak şekilde ikişer alt grupta gösterilmiştir. Tüm grafiklerde sadece serbest lizozim içeren filmlerin salım verilerine de yer verilmiştir. Daha sonra tüm salım test sonuçları bir arada tek grafikte (Şekil 4.23) verilmiştir.

#### **4.4.1. PAA/LIS Oranının Lizozimin Salım Hızına Olan Etkisi**

Şekil 4.19, 4.20, 4.21 ve 4.22'deki sonuçlar lizozimin filme ilave edilme şeklinin filmde salım hızı üzerinde oldukça etkili olduğunu göstermektedir. Serbest halde filme ilave edilen lizozimin tamamı 45 dakikada ortama salınmaktadır. Bu durum biyopolimerlerden aktif maddelerin salım hızının kontrol edilebilmesi için yeni stratejiler geliştirilmesinin zorunluluğunu açıkça ortaya koymaktadır. Lizozimin yarısının serbest, yarısının da PAA ile kompleks oluşturularak filme ilave edilmesi durumunda (Serbest Lizozim+SNP(0.1) ve Serbest Lizozim+BNP(0.3) ) filmde salım hızı yavaşlamaktadır. En yavaş lizozim salım hızları ise lizozimin tamamının PAA ile kompleks oluşturularak (SNP (0.1) ve BNP (0.3) ) WPI filmlere ilave edildiği durumlarda gözlenmiştir.



**Şekil 4.19. PAA/LIS Oranının Lipozimin Salım Hızına Olan Etkisi. PAA'nın Molekül ağırlığı: 2 kDa**



**Şekil 4.20. PAA/LIS Oranının Lipozimin Salım Hızına Olan Etkisi . PAA'nın Molekül Ağırlığı: 450 kDa**

24 saatlik salım kinetiği dikkate alındığında lipozimin filmlerden salım hızları aşağıdaki sırayı takip etmektedir:

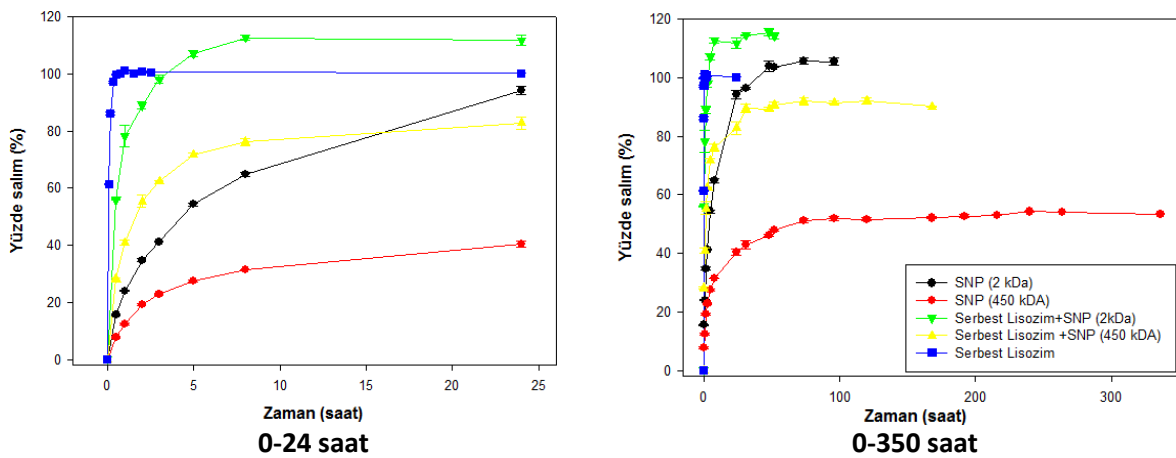
PAA'nın molekül ağırlığı: 2kDa Serbest Lipozim > Serbest Lipozim +SNP(0.1) > Serbest Lipozim +BNP(0.3)>SNP(0.1)>BNP(0.3)

PAA'nın molekül ağırlığı: 450kDa Serbest Lipozim > Serbest Lipozim +SNP(0.1) > Serbest Lipozim +BNP(0.3)≈SNP(0.1)>BNP(0.3).

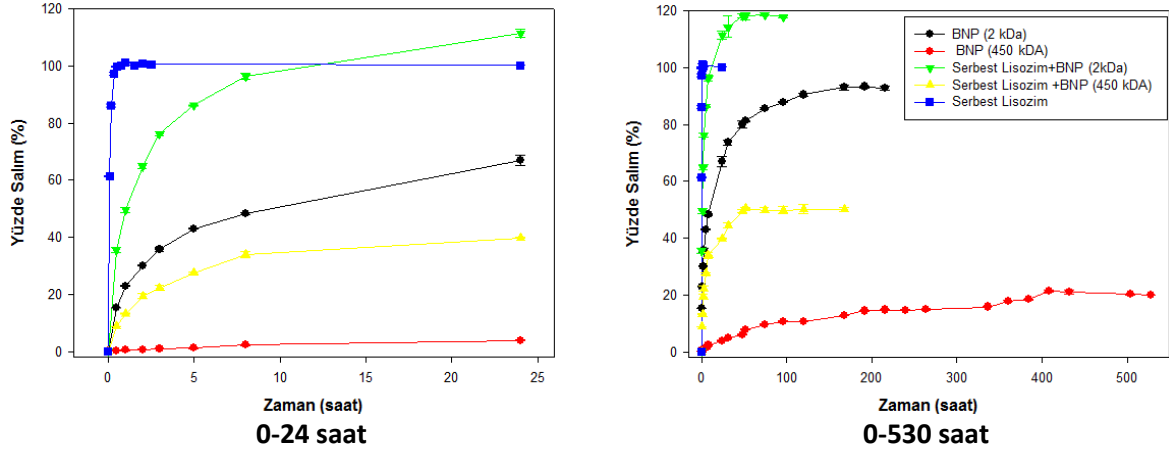
PAA/LIS oranının artması ile birlikte oluşan komplekslerin boyutu artmakta, böylece, lizozim PAA'dan ayrılıp filme difüze etme aşamasında daha büyük kütle transfer direnci ile karşılaşmakta ve salım hızı düşmektedir.

#### 4.4.2. PAA'nın Molekül Ağırlığının Lizozimin Salım Hızına Olan Etkisi

Şekil 4.21 ve 4.22'de PAA'nın molekül ağırlığının lizozimin salım hızına olan etkileri gösterilmektedir. Poliakrilik asitin molekül ağırlığı arttıkça doğrusal yük yoğunluğu artmaktadır. Bu durum artan elektrostatik etkileşimler sonucunda güçlü yapıda lizozim-poliakrilik asit komplekslerinin oluşmasına yol açmaktadır (KAMIYA ve Klivanov, 2003). Düşük molekül ağırlıklı PAA ile kompleks oluşumunda yük nötralizasyonu temel mekanizma iken, yüksek molekül ağırlıklı PAA'dan kompleks oluşurken bu mekanizma ile birlikte polimerik köprüleşme adı verilen diğer bir mekanizma da etkilidir. Çöken komplekslerin çekme kuvvetlerinin daha baskın olduğu bu durumda lizozimin kompleksden ayrılıp serbest hale geçmesi daha güçleştiğinden salım hızı da yavaşlamaktadır. Diğer taraftan 450 kDa molekül ağırlığında PAA, molekül ağırlığı 14.4 kDa olan lizozimi tamamen çevreleyebilecek hatta lizozimin etrafında belli kalınlıkta bariyer katmanı oluşturabilecek zincir uzunluğuna sahiptir. Bu durumda lizozimin serbest kalıp filmin içinde difüze edebilmesi için öncelikle PAA'nın oluşturduğu bariyer katmanını aşması gerekmektedir. 2 kDa PAA kullanılarak hazırlanan komplekslerde PAA'ya göre daha büyük molekül ağırlığına sahip olan lizozim PAA'yı çevrelediğinden, yüzeyden kolaylıkla koparak serbest hale geçmekte, dolayısıyla filmde salım hızı da 450 kDa PAA ile hazırlanan kompleksleri içeren filmlere göre daha yüksek olmaktadır.



Şekil 4.21. PAA'nın Molekül Ağırlığının Lizozimin Salım Hızına Olan Etkisi. PAA/LIS: 0.1



**Şekil 4.22. PAA'nın Molekül Ağırlığının Lizozim Salım Hızına Olan Etkisi . PAA/LIS: 0.3**

24 saatlik salım kinetiği dikkate alındığında lizozim filmlerden salım hızları aşağıdaki sırayı takip etmektedir:

PAA/LIS oranı: 0.1 Serbest Lizozim > Serbest Lizozim +SNP(2 kDa) > Serbest Lizozim +SNP(450 kDa)>SNP(2 kDa)>SNP(450 kDa)

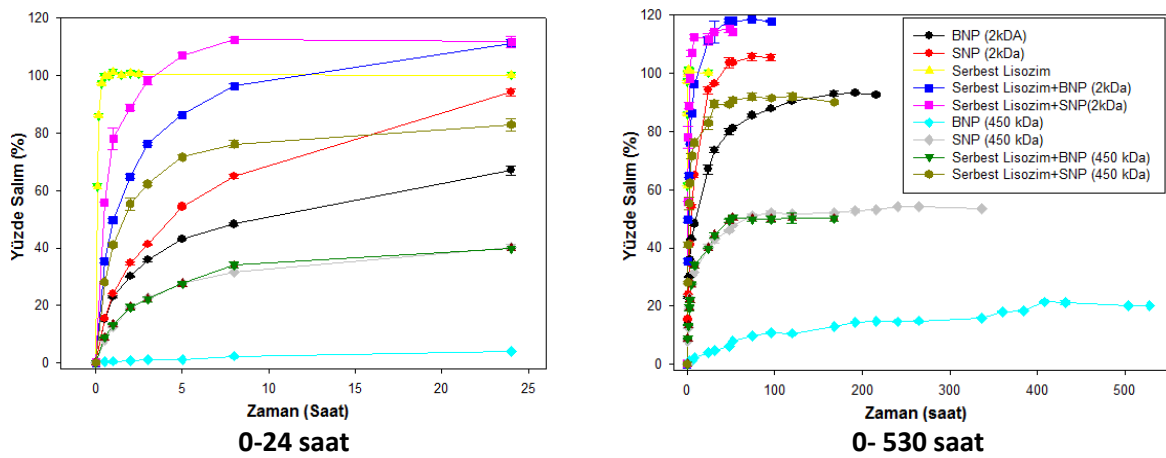
PAA/LIS oranı: 0.3 Serbest Lizozim > Serbest Lizozim +BNP(2 kDa) >BNP (2 KDa)> Serbest Lizozim +BNP(450 kDa)>BNP(450 kDa) .

**Tablo 4.6. Lizozim farklı filmlerden salım süreleri ve salınan toplam lizozim miktarları**

<b>Film Kodu</b>	<b>Salım süresi (saat)</b>	<b>Toplam salınan miktar (%)</b>
Serbest Lizozim (SL)	0,75	100.0
SNP(2 kDa)	74	105.7
BNP (2 kDa)	192	93.3
Serbest Lizozim+ SNP(2 kDa)	48	115.5
Serbest Lizozim+ BNP (2 kDa)	74	118.5
SNP(450 kDa)	264	54.1
BNP (450 kDa)	528	20
Serbest Lizozim+ SNP(450 kDa)	120	92
Serbest Lizozim+ BNP (450 kDa)	120	50.2

Tablo 4.6'da lizozim filmlerden salım süreleri, Şekil 4.23'de de tüm filmlerin salım profilleri verilmektedir. PAA'nın molekül ağırlığının ya da PAA/LIS oranının artırılmasının lizozim

salım hızını yavaşlatarak, salım sürelerini arttırdığı görülmüştür. Sadece serbest lizozim içeren filmlerden sonra en hızlı salım serbest lizozim ve SNP(2 kDa) komplekslerini (molekül ağırlığı 2 kDa PAA'dan, PAA/LIS oranı 0.1 olarak ayarlanarak hazırlanan kompleksler) bir arada içeren filmlerden görülmüştür. Test edilen filmlerden serbest lizozim+ BNP (450 kDa) komplekslerini birlikte içeren ve sadece BNP (450 kDa) komplekslerini içeren filmlerden salım miktarları sırasıyla %50 ve %20 dolaylarında sabitlenmiştir. Diğer filmlerden ise en az % 90 salım görülmüştür ve en uzun süre salım yapan film 2 kDa PAA'dan hazırlanmış kompleksleri içeren film olarak kaydedilmiştir. Salım verilerinin %100 üzerinde ve %90 civarında sabitlendiği filmlerde yer yer homojen olmayan dağılımlar olduğu düşünülmektedir.

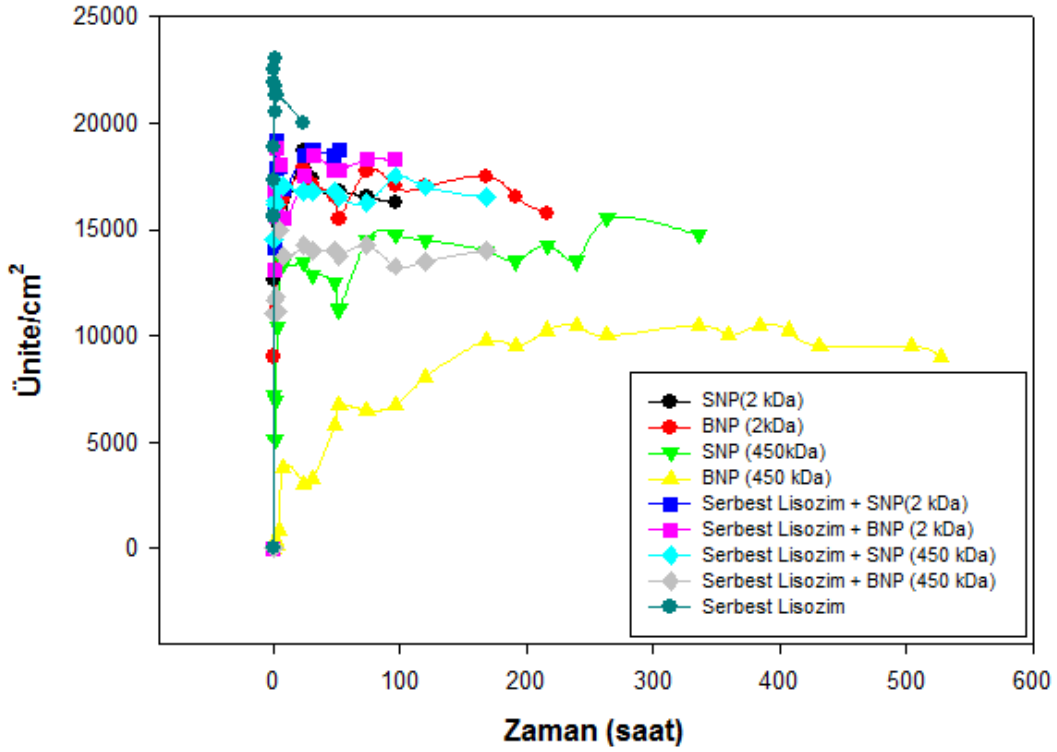


**Şekil 4.23. Serbest olarak ve PAA ile kompleks oluşturularak filme ilave edilen lizozimin filmlerden salınan miktarının zamana göre değişimi**

#### 4.5. Poliakrilik Asit/Lizozim Kompleksi İçeren WPI Filmlerinin Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi

##### 4.5.1. WPI Filmlerinden Salınan Lizozimin Aktivitesinin Belirlenmesi

Şekil 4.24 farklı WPI filmlerinden salınan lizozimin aktivitesinin zamana göre değişimini göstermektedir. Lizozimin aktivitesinin salınan miktarlarla paralel olduğu gözlenmiştir. En yüksek aktivite en hızlı lizozim salımının gerçekleştiği serbest lizozim içeren filmle, en düşük aktivite ise en az salım yapan BNP (450 kDa) kodlu 450 kDa PAA'dan PAA/LIS oranı 0.3'e ayarlanarak hazırlanan filmle kaydedilmiştir. Salınan lizozimin salım süresi boyunca aktivite kaybetmediği görülmektedir. Filme eklenen lizozimin serbest haldeki aktivitesi  $25430 \text{ U/cm}^2$  olarak ölçülmüştür. Bu değerle kıyaslandığında salım ortamında ölçülen aktiviteler yaklaşık % 10 daha düşüktür. Lizozimin aktivitesindeki kayıp kompleks içeren filmlerde serbest halde lizozim içeren filmlere oranla daha fazladır.



**Şekil 4.24. WPI Filmlerinden Salınan Lizozimin Aktivitesinin Zamana Göre Değişimi**

#### 4.5.2. Nutrient Besiyeri ile Yapılan Antimikrobiyal Testler

Projede antimikrobiyal testler için kontrollü salımın antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkisini, 24 saat ve optimum büyüme sıcaklığı olan 37 °C yerine uzun süreli ve soğuk ortam koşullarında (4-10°C) ve salım ortamı pH'sı olan pH 4.5'ta gösteren bir test metodu oluşturmak hedeflenmişti. Bu amaçla besiyeri pH'ı ortama HCl eklenerek pH 4.5'a çekilmiştir. HCl'in antibakteriyel etkisinin olup olmadığını tespit etmek amacıyla kontrol deneyleri yapılmıştır. Filmler  $3 \times 10^2$  bakteri konsantrasyonuna sahip besiyeri içerisine konulmuş ve bakteri sayısındaki değişim zamanla takip edilmiştir. Bu deneylerde 24 saatin sonunda HCl içeren ve içermeyen besiyeri ortamında başlangıçta 300 olan toplam koloni sayısındaki değişim gözlenmiştir. Ancak Tablo 4.7'deki sonuçlardan görüldüğü üzere, HCl bakteri koloni sayısında herhangi bir azalmaya yol açmamıştır.



**Tablo 4.7. Besiyeriye ilave edilen HCl'in koloni sayısı üzerine olan etkisi**

Besiyeri	Besiyeri + HCl
170 CFU/ml	150 CFU/ml
80 CFU/ml	210 CFU/ml
150 CFU/ml	300 CFU/ml
160 CFU/ml	290 CFU/ml
290 CFU/ml	200 CFU/ml
<b>Ortalama = 170 CFU/ml</b>	<b>Ortalama = 230 CFU/ml</b>

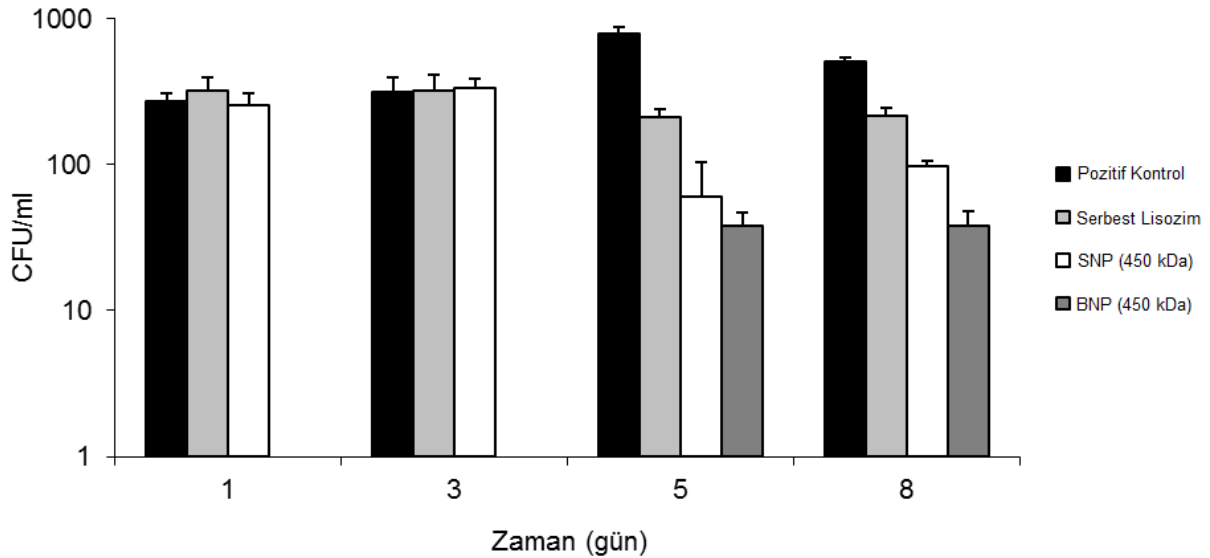
APPENDİNİ ve Hotchkiss (2002) antimikrobiyal filmlerin üretiminde kullanılan plastikleştiricilerin antimikrobiyal ajanın aktivitesi üzerinde olumsuz etkiye sebep olduğunu göstermişlerdir. WPI film üretiminde kullanılan gliserolün lizozim aktivitesini nasıl etkilediğini incelemek amacıyla  $3 \times 10^2$  bakteri konsantrasyonuna sahip 30 ml besiyeri (pH=4.5) içerisine, filme ilave edilen miktarla aynı olacak şekilde sadece lizozim ile lizozim ve gliserol birlikte eklenmiştir. Elde edilen sonuçlar gliserolün lizozim üzerinde önemli bir aktivite kaybına sebep olmadığını göstermiştir (Tablo 4.8).

**Tablo 4.8. Plastikleştirici ajan olarak filme ilave edilen gliserolün koloni sayısı üzerine olan etkisi**

Sadece lizozim içeren ortam	Lizozim + gliserol içeren ortam
80 CFU/ml	110 CFU/ml
160 CFU/ml	200 CFU/ml
50 CFU/ml	70 CFU/ml
20 CFU/ml	10 CFU/ml
60 CFU/ml	50 CFU/ml
<b>Ortalama = 74 CFU/ml</b>	<b>Ortalama = 88 CFU/ml</b>

WPI filmlerin antimikrobiyal etkinliğini belirlemek için lizozim miktarı 75 mg ve 150 mg olarak seçilmiştir. 75 mg lizozim içeren 4x4 boyutlarındaki filmler  $3 \times 10^2$  bakteri konsantrasyonundaki 30 ml besiyeri (pH 4.5) içerisine konarak 10°C ve 150 rpm'de inkübatörde bekletilmiş, ancak, 8 gün içinde bakteri sayısında herhangi bir değişime sebep olmamışlardır. Şekil 4.25'de 150 mg lizozim içeren filmlerin (serbest halde yada PAA ile kompleks oluşturmuş şekilde) bulunduğu ortamdaki bakteri sayısının zamana göre değişimi görülmektedir. Daha büyük boyutta PAA/LIS kompleksi içeren filmlerin antimikrobiyal etkinliğinin, küçük boyutta kompleks içeren filmlere göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Ancak, bu durumun filmde oluşan gözeneklerden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

Filmlerin gözenek problemi ortadan kaldırıldıktan sonra yapılan deney tekrarlarında kompleks içeren filmler serbest halde lizozim içeren filmlere kıyasla daha iyi sonuç göstermemiştir. Tekrar deneylerindeki tutarsızlığın lizozimin nutrient besiyeri içerisinde tam olarak çözünmemesinden kaynaklandığı gözlenmiştir.



**Şekil 4.25. Film içermeyen besi yeri+bakterinin (pozitif kontrol), serbest lizozim yüklü WPI film ile küçük ve büyük PAA/LIS kompleksi içeren WPI filmlerin bulunduğu ortamda bakteri sayısındaki artışın zamana göre değişimi**

#### 4.5.3. Müller Hinton Besiyeri ile Yapılan Antimikrobiyal Testler

Lizozimin nutrient besiyeri (broth) içerisindeki çözünürlüğünün ve aktivitesinin düşük olması nedeni ile farklı besiyeriler denenmiştir. Bunun için 1mg/ml lizozim Tryptic Soy Besiyeri (broth) (TSB), Müller Hinton Besiyeri (broth) (MHB) ve Brain Heart Infusion Besiyeri (broth) (BHI) içerisinde çözülmüştür. 24 saat sonunda lizozimin BHI ve MHB içerisinde çözüldüğü fakat TSB içinde çöktüğü gözlenmiştir.

Salım koşullarını birebir mimik edebilmek için antimikrobiyal testlerinde pH 4.5'ta yapılması öngörülmüş, ancak yapılan denemelerde lizozimin çökeldiği ve aktivitesinin düştüğü (Tablo 4.9) kaydedilmiştir. O nedenle bakteri koşullarında besiyeri pH'ında değişikliğe gidilmemesine (pH 7) karar verilmiştir. PAA/LIS kompleksi içeren filmlerden alınan 4cm<sup>2</sup> lik kesitler 10<sup>0</sup>C'de standard besiyeri (broth) pH'ında (pH 7) Tryptic Soy Besiyeri (broth) (TSB), Müller Hinton Besiyeri (broth) (MHB) ve Brain Heart Infusion Besiyeri (broth) (BHI) içerisine yerleştirilmiş ve 48 saat sonunda bu filmlerden salınan lizozimin aktiviteleri ölçülmüştür.

Tablo 4.10’da gösterilen sonuçlar doğrultusunda antimikrobiyal test çalışmalarına lizozimin çökelme probleminin gözlemlenmediği ve aktivitesinin yüksek olduğu MHB ile devam edilmiştir.

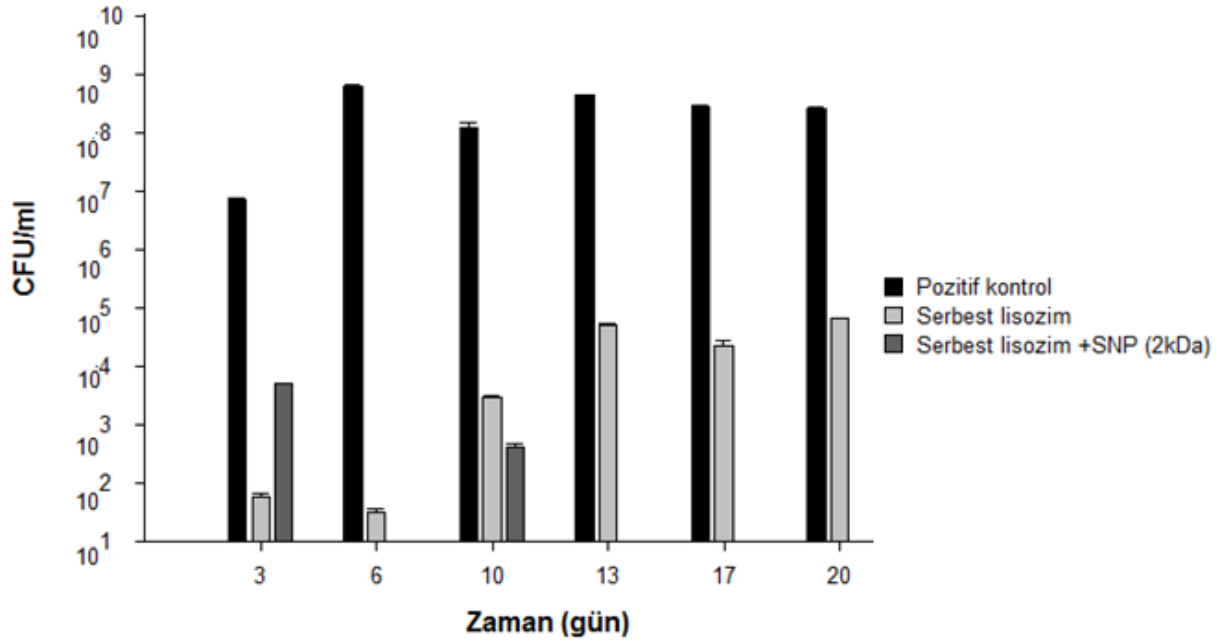
**Tablo 4.9. Lizozimin farklı ortamlardaki aktivitesi**

Ortam	Activity (U/mg)
Su	27740±3402
TSB (pH=4.5)	9912±1226

**Tablo 4.10. Lizozimin farklı besiyerleri içerisindeki aktivitesi**

	MHB	TSB	BHI
Salınan lizozim aktivitesi (U/cm <sup>2</sup> )	21244	23643	16532

KROCHTA ve grubu (2005) lizozim içeren WPI filmleri farklı başlangıç konsantrasyonlarındaki ( $\leq 10^3$ ) *Listeria Monocytogenes* üzerinde test etmişlerdir. Triptic soy broth (TSB) içerisinde *Listeria Monocytogenes*’e karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu 2mg/ml lizozim olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada besiyeri olarak MHB kullanılmakla birlikte Tablo 4.10’daki sonuçlardan görüldüğü gibi lizozimin TSB ve MHB içerisindeki aktiviteleri birbirine oldukça yakındır. Bu noktadan hareketle KROCHTA ve grubu (2005) tarafından *Listeria Monocytogenes* için belirlenen minimum inhibisyon konsantrasyonu ve salım verileri dikkate alınarak antimikrobiyal testler için serbest lizozim ve 2 kDa PAA ile PAA/LIS oranı 0.1’e ayarlanarak hazırlanan kompleksleri içeren filmler antimikrobiyal testlere tabi tutulmuştur. Testler 10 °C’de  $10^2$  CFU/ml bakteri konsantrasyonu içerisine toplam lizozim miktarı 160mg olan 16cm<sup>2</sup>’lik filmlerin yerleştirilmesiyle yapılmıştır. Yapılan denemelerin çoğunda filmlerde 10. gün sonunda küf ürediği görülmüştür. Küfün nedeni tespit edildikten sonra sorunsuz filmler üretilmiş ve Şekil 4.26’daki sonuçlar elde edilmiştir.



**Şekil 4.26. Uzun süreli antimikrobiyal test sonuçları**

Üçüncü günün sonunda alınan veriler, her iki filmde pozitif kontrole kıyasla belirgin bir antimikrobiyal inhibisyon gösterdiğini kanıtlamaktadır. Serbest lizozim içeren filmler bakteri sayısının başlangıç bakteri konsantrasyonunun altında kalmasını sağlarken, serbest lizozimle birlikte kompleks içeren filmler bakteri konsantrasyonunun başlangıç seviyesinin üzerine çıkmasına sebep olmuştur. Bu durum salım ortamından alınan lizozimin aktivite sonuçları ile paralellik göstermektedir. Kompleks içeren filmlerin hazırlanma koşullarına bağlı olarak lizozimin bir miktar aktivite kaybettiği kaydedilmiştir. Altıncı gün sonunda serbest lizozimle kompleks yapısını birlikte içeren filmde alınan örneklerde bakteri ortamından farklı puslu bir tabaka gözlemlenmiş, koloni sayılamamıştır. Aynı gün serbest lizozim içeren filmler koloni sayısının üçüncü güne oranla sabit kalmasını sağlamıştır. Onuncu gün sonunda kompleks içeren filmlerin bulunduğu ortamda tekrar bir mikrobiyal yük görülmüş fakat bu yükün miktarı başlangıç konsantrasyonunu aşmamıştır. Serbest lizozim içeren filmlerin bulunduğu ortamın bakteri konsantrasyonu ise artmıştır. Takip eden günlerde kompleks içeren filmlerin bulunduğu ortamda bakteri saptanmamış, serbest lizozim içeren filmli ortamdaki bakteri konsantrasyonunda önce artış gözlenmiş daha sonra bu konsantrasyon sabit kalmıştır. Bu sonuçlar bakteriyolojik ortamda serbest halde bulunan lizozimin zamanla aktivitesini yitirdiğini ve uzun süreli bir antimikrobiyal koruma sağlayamadığını göstermiştir. Hem serbest, hem de kompleks yapısında ortama eklenen lizozimin ise kontrollü bir şekilde ortama salınarak antimikrobiyal etkisini daha uzun süre muhafaza ettiği görülmektedir.

## 5. SONUÇLAR

Bu projede peynir üretimi sırasında çok yüksek miktarlarda ortaya çıkan bir yan ürün olan peynir altı suyu izolatu (WPI) kullanılarak gıda ambalaj filmleri hazırlanmış, filmlere doğal bir antimikrobiyal ajan olan lizozim yüklenmiştir. Filmlerin mekanik ve bariyer özelliklerini iyileştirmek için kitosan nanotanecekler kullanılmış, lizozimin filmlerden kontrollü salımını sağlayabilmek içinde poliakrilik asit (PAA) ile kapsüllenenek filmlere ilave edilmiştir. İyonik jelleşme yöntemi ile hazırlanan kitosan nanotanecekler 1 %, 2%, 4 % ve 6 % oranlarında filme ilave edilmiş, en iyi bariyer ve mekanik özellikler 4 % nanotanecek içeren filmlerde gözlenmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarda kullanılan inorganik nanotaneceklerle kıyasla, bu çalışmada hazırlanan kitosan nanotanecekler WPI filmlerin mekanik ve bariyer özelliklerinde daha fazla iyileşme sağlamış, filmlere antimikrobiyal özellikte kazandırmıştır. Lizozimin PAA ile kapsüllenenek filmlere ilave edilmesi filmlerden salım hızını oldukça yavaşlatmış, en hızlı salım lizozimi serbest olarak içeren filmlerden gerçekleşmiştir. Lizozim hem serbest, hem de PAA/LIS kompleksi içinde filme ilave edildiğinde ortama kontrollü bir şekilde salınarak antimikrobiyal etkisini daha uzun süre koruyabilmiştir. Projede geliştirilen yöntemin, özellikle buzdolabı koşullarında bile çoğalabilen *Listeria monocytogenes* gibi bakterilerin inhibe edilebilmesini sağlamak için, kontrollü salım yapabilen antimikrobiyal gıda ambalaj filmlerinin geliştirilmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Lizozim gibi izoelektrik noktası yüksek olan proteinlerin bir nanotanecek içine yüksek verimlilikle yüklenmesi ve salımının sağlanabilmesi kolay değildir. Bu çalışmada kullanılan yöntemde lizozim poliakrilik asit içine elektrostatik etkileşimle yüksek verimlilikte yüklenebilmiştir. PAA'nın molekül ağırlığı ile PAA/LIS oranını ayarlamak suretiyle lizozimin salım hızını da oldukça geniş bir aralıkta kontrol edebilmek mümkün olmuştur. Projede geliştirilen yöntem olan antimikrobiyal ajanın polielektrolitle kompleks oluşturup tanecik içinde filme ilave edilerek salım hızının kontrol edildiği yaklaşım, literatürde daha önce kullanılmamış, özgün bir yaklaşımdır. Antimikrobiyal testlerde uzun süre etkinlik gösteren filmlerle gıda denemelerinin yapılması planlanmaktadır.

## KAYNAKLAR

AL-NABULSI, A. A., Han, J. H., Liu, Z., Rodrigues-Vieira, E. T., Holley, R. A., Temperature-sensitive microcapsules containing lactoferrin and their action against *Carnobacterium viridans* on bologna, *Journal of Food Science* 71, 6, 208-214, (2006).

APPENDINI, P., Hotchkiss HJ., Immobilization of lysozyme on food contact polymers as potential antimicrobial films, *Packaging Technol. Sci.*, 10, 271-279, (1998).

APPENDINI, P., Hotchkiss, J., Review of antimicrobial food packaging, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3, 113-126, (2002).

AVELLA, M., Bruno, G., Errico, M.E., Gentile, G., Piciocchi, N., Sorrentino, A., Volpe, M.G., Innovative packaging for minimally processed fruits, *Packaging Technology and Science*, 20, 5, 325-335, (2007).

BUONOCORE, G. G., Conte, A., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., Nobile, M.A., Mono- and multilayer active films containing lysozyme as antimicrobial agent, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 4, 459-464, (2005).

BUONOCORE, G. G., Del Nobile, M. A., Panizza, A., Bove, S., Nicolais, L., Modeling the lysozyme release kinetics from antimicrobial films intended for food packaging applications, *Food Engineering and Physical Properties*, 68, 4, 1365-1370, (2003).

BUONOCORE, G. G., Sinigaglia, M., Corbo, M. R., Bevilacqua, A., La Notte, E., Del Nobile, M. A., Controlled release of antimicrobial compounds from highly swellable polymers, *Journal of Food Products*, 67, 6, 1190-1194, (2004).

CERRADA, M. L., Serrano, C., Sanchez-Chaves, M., Fernandez-Garcia, M., Fernandez-Martin, F., De Andres, A., Rioboo, R. J. J., Kubacka, A., Ferrer, M., Fernandez-Garcia, M., Self-sterilized EVOH- TiO<sub>2</sub> nanocomposites: Interface effects on biocidal properties, *Advanced Functional Materials*, 18, 13, 1949-1960, (2008).

CHANDRAMOULEESWARAN, S., Mhaske, S. T., Kathe, A. A., Varadarajan, P. V., Prasad, V., Vigneshwaran, N., Functional behaviour of polypropylene/ ZnO-soluble starch nanocomposites, *Nanotechnology*, 18, 38, 385702-385710, (2007).

DAMM, C., Munstedt, H., Rosch, A., The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver-nano- and microcomposites, *Materials Chemistry and Physics*, 108 (1), 61-66, (2008).

DE AZEREDO, H. M. C., Nanocomposites for food packaging applications, *Food Research International*, 42(9), 1240-1253, (2009).

FERNANDEZ, A., Cava, D., Ocio, M. J., Lagaron, J. M., Perspectives for biocatalysts in food packaging, *Trends in Food Science & Technology* 19(4), 198-206, (2008).

GEMILI, S., Yemenicioglu, A., Altinkaya, S.A., Development of antioxidant food packaging materials with controlled release properties, *Journal of Food Engineering* 96(3), 325-332,(2010).

GEMILI, S., Yemenicioglu, A., Altinkaya, S.A., Development of cellulose acetate based antimicrobial food packaging materials for controlled release of lysozyme, *Journal of Food Engineering*, 90, 453-462, (2009).

HAN, J. H., Floros, J. D., Simulating diffusion model and determining diffusivity of potassium sorbate through plastic to develop antimicrobial packaging films, *Journal of Food Processing and Preservation*, 22, 2, 107-122, (1998).

HOTCHKISS, J., Food packaging interactions influencing quality and safety, *Food Add. Contam.*, 14(6-7), 601-607 (1997).

ICONOMOPOULOU, S. M., Voyiatzis, G. A., The effect of the molecular orientation on the release of antimicrobial substances from uniaxially drawn polymer matrixes, *Journal of Controlled Release*, 103, 451- 464, (2005).

KADAM, D. M.,Thunga, M.,Wang, S.,Kessler, M. R.,Grewell, D.,Lamsal, B.,Yu, C. X., Preparation and characterization of whey protein isolate films reinforced with porous silica coated titania nanoparticles, *Journal of Food Engineering*, 117 (1), 133-140, (2013).

KAMIYA, N.,Klibanov, A. M., Controlling the rate of protein release from polyelectrolyte complexes, *Biotechnology and bioengineering*, 82 (5), 590-594, (2003).

KREVELEN, D. W. van (DirkWillem), Properties of polymers: their correlation with chemical structure : their numerical estimation and prediction from additive group contributions, ed: Te Nijenhuis K., 4th completely revised. ed., Elsevier, Oxford, 2009. Pp:90.

LEE, J. W., Son, Seok-Min, Hong, Seok-In, Characterization of protein-coated polypropylene films as a novel composite structure for active food packaging application, *Journal of Food Engineering*, 86(4), 484-493, (2008).

LI, H.,Li, F.,Wang, L.,Sheng, J.,Xin, Z.,Zhao, L.,Xiao, H.,Zheng, Y.,Hu, Q., Effect of nano-packing on preservation quality of Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill. var. *inermis* (Bunge) Rehd), *Food chemistry*, 114 (2), 547-552,(2009).

LIAO, F.,Chen, C.,Subramanian, V., Organic TFTs as gas sensors for electronic nose applications, *Sensor Actuat B-Chem*, 107 (2), 849-855,(2005).

MASTROMATTEO, M., Barbuzzi, G., Conte, A., Del Nobile, M. A., Controlled release of thymol from zein based film, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 222-227, (2009).

MIN, S., Harris, L.J., Han, J.H., *Listeria Monocytogenes* Inhibition By Whey Protein Films and Coatings Incorporating Lysozyme, *Journal of Food Protection*, 68 (11), 2317-2325, (2005).

MIN, S., Krochta, J. M., Inhibition of *Penicillium commune* by edible whey protein films incorporating lactoferrin, lactoferrin hydrolysate, and lactoperoxidase systems, *J Food Sci*, 70(2), M87-M94, (2005).

OZDEMIR, M., Floros, J. D., Analysis, modeling of potassium sorbate diffusion through edible whey protein films, *Journal of Food Engineering*, 47, 149-155, (2001).

RAMOS, O. L., Silva, Sara I., Soares, Jose C., Features and performance of edible films obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds, *Food Research International*, 45(1), 351-361, (2012).

SEYDIM, A. C., Sarikus, G., Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils, *Food Research International*, 39(5), 639-644, (2006).

SOTHORNVIT, R., Hong, S. I., An, D. J., Rhim, J. W., Effect of clay content on the physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/organo-clay composite films, *Lwt-Food Science and Technology*, 43(2), 279-284, (2010).

SOTHORNVIT, R., Rhim, J. W., Hong, S. I., Effect of nano-clay type on the physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/clay composite films, *Journal of Food Engineering*, 91 (3), 468-473, (2009).

TANKHIWALE, R, Bajpai, SK., Silver-Nanoparticle-Loaded Chitosan Lactate Films with Fair Antibacterial Properties, *Journal Of Applied Polymer Science*, 115, 3, 1894-1900, (2010).

WEBER, C.J., Biobased packaging materials for the food industry: Status and Perspectives, *Food Biopack Project Report*, The Royal Veterinary and Agricultural University Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C, Denmark, 2000.

XIAO-E, L., Green, A.N., Haque, S.A., Mills, A., Durrant, J.R., Light-driven oxygen scavenging by titania/polymer nanocomposite films, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 162 (2-3), 253-269, (2004).

YOKSAN, R., Chirachanchai, S., Silver nanoparticle-loaded chitosan-starch based films: Fabrication and evaluation of tensile, barrier and antimicrobial properties, *Materials Science & Engineering C-Materials For Biological Applications*, 30, 6, 891-897, (2010).

ZHOU, J. J., Wang, S. Y., Gunasekaran, S., Preparation and characterization of whey protein film incorporated with TiO<sub>2</sub> nanoparticles, *Journal of food science*, 74 (7), N50-6, (2009).

ZINOVIADOU, K. G., Koutsoumanis, Konstantinos P., Biliaderis, Costas G., Biopolymer-based films as carriers of antimicrobial agents ,11th International Congress on Engineering and Food, (Icef11) 1, 190-196, (2011).



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

<b>Proje No:</b> 110M440
<b>Proje Başlığı:</b> Kontrollü Salım Özelliklerine Sahip Antimikrobiyal, Nanokompozit Gıda Ambalaj Filmlerinin Geliştirilmesi
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Prof. Dr. Sacide ALSOY ALTINKAYA
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Bölümü, Urla, 35430, İzmir
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b>
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b> 01/05/2011-01/05/2013
<b>Öz (en çok 70 kelime)</b> <p>Bu çalışmada peynir altı suyu izolatu bazlı filmlerin mekanik ve bariyer özelliklerini iyileştirmek için kitosan nanotanecekler kullanılmış, en fazla iyileşme 4 % nanotanecek içeren filmlerde gözlenmiştir. Lisozim serbest olarak yada PAA ile kapsüllenecek tanecik içinde filmlere ilave edilmiş, en hızlı salım serbest lisozim içeren filmlerden gerçekleşmiştir. Lisozim hem serbest, hem de PAA/LIS kompleksi içinde filme ilave edildiğinde ortama kontrollü bir şekilde salınarak antimikrobiyal etkisini daha uzun süre koruyabilmiştir.</p>
<b>Anahtar Kelimeler:</b> Nanokompozit, antimikrobiyal ambalaj, kontrollü salım, lisozim, peynir altı suyu izolatu, kitosan nanotanecek, iyonik jelleşme
<b>Fikri Ürün Bildirim Formu</b> Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil x <input type="checkbox"/> <small>Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.</small>
<b>Projeden Yapılan Yayınlar:</b> <p>Pelin Oymacı, Metin Uz, Sacide Alsoy Altinkaya. "Preparation and Characterisation of Whey Protein Isolate/Chitosan Nanocomposite Food Packaging Materials With Improved Barrier and Mechanical Properties", 9th European Congress of Chemical Engineering and 2nd European Congress of Applied</p>

Biotechnology, World Forum The Hague The Netherlands, April 21-25, 2013 (Özet Bildiri-Poster)

**Ekte Bulunan “ARDEB Başarı Öyküsü Formu”, “Kazanımlar” Bölümünde Belirtilen Kriterlere Göre Proje Çıktılarınızın Başarı Öyküsü Niteliği Taşındığını Düşünüyorsanız “ARDEB Başarı Öyküsü Formu”nu doldurunuz.**