



**T.C.
YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KOMBUCHA İÇECEĞİ ÜRETİMİ ARTIĞINDAN KARBON
NOKTASI SENTEZİ VE BUNUN AKTİF GIDA AMBALAJI
OLARAK KULLANIM POTANSİYELİNİN
ARAŞTIRILMASI**

ZEHRA VERGİLİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman: Dr.Öğr. Üyesi Nurcan DOĞAN

**AĞUSTOS – 2023
YOZGAT**

T.C.
YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOOLJİ ANABİLİM DALI

KOMBUCHA İÇECEĞİ ÜRETİMİ ARTIĞINDAN KARBON
NOKTASI SENTEZİ VE BUNUN AKTİF GIDA AMBALAJI
OLARAK KULLANIM POTANSİYELİNİN
ARAŞTIRILMASI

ZEHRA VERĐİLİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Nurcan DOĞAN

AĞUSTOS – 2023

YOZGAT



YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ONAY FORMU

T.C.

YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Enstitümüzün Biyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans/Doktora Programı öğrencisi Zehra Vergili'nin hazırladığı “**Kombucha İçeceği Üretimi Artıgından Karbon Noktası Sentezi ve Bunun Aktif Gıda Ambalajı Olarak Kullanım Potansiyelinin Araştırılması**” başlıklı tezi ile ilgili tez savunma sınavı, Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri gereğince 28/08/2023 Çarşamba günü saat 10.00'da yapılmış, tezin onayına oy birliği ile karar verilmiştir.

Başkan :Dr. Öğr. Üyesi Zekiye KOCAKAYA

Jüri Üyesi :Dr. Öğr. Üyesi NurcanDOĞAN.....

(Danışman)

Jüri Üyesi :Dr. Öğr. Üyesi Cemhan DOĞAN

ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve sayılı Enstitü Yönetim Kurulu Kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

KYT-FRM-110/00

Prof. Dr. Hasan Güner BERKANT

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

TEZBEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan eder, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Zehra VERGİLİ

28/08/2023

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezim boyunca benden destek ve deneyimlerini esirgemeyen, tez çalışmamın her aşamasında öneri ve bilgileriyle bana yol gösteren, danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nurcan DOĞAN'a, tüm çalışmam boyunca bana yardımcı olan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Cemhan DOĞAN'a, sevgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen aileme ve varlığıyla bana her zaman ışık olan yol arkadaşım İrem GÖKŞEN'e teşekkür ederim.

Zehra VERGİLİ

28/08/2023

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KOMBUCHA İÇECEĞİ ÜRETİMİ ARTIĞINDAN KARBON NOKTASI SENTEZİ VE BUNUN AKTİF GIDA AMBALAJI OLARAK KULLANIM POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

ZEHRA VERGİLİ

YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜYESİ NURCAN DOĞAN

Bu tez, Kombucha artık materyallerinden olan SCOBY kullanılarak karbon noktalarının sentezlenmesi ve bunun aktif gıda ambalajı olarak kullanım potansiyelinin araştırılması üzerine odaklanmaktadır. Sentezlenen karbon noktaları, morfolojik ve yapısal özellikleri TEM, UV/visible spektrofotometre ve FTIR analizleriyle karakterize edilmiştir. TEM görüntülemesi, homojen boyutlu (9.27-9.41 nm) yuvarlak karbon noktaları elde edildiğini göstermiştir. UV/visible ışık emilim spektrumu, karbon noktalarının başarılı bir şekilde sentezlendiğini ve güçlü UV emici özelliklere sahip olduğunu doğrulamıştır. FTIR spektrumu, karbon noktalarının yüzey yapıları hakkında bilgi sağlamıştır. Sonraki adımda, L929 fare fibroblast hücre hattı kullanılarak karbon noktalarının sitotoksikite değerleri ölçülmüştür. Düşük konsantrasyonlarda herhangi bir toksik etki gözlenmezken, yüksek konsantrasyonlarda bir miktar toksisite artışı tespit edilmiştir. Ardından, sodyum aljinat ve CMC karışımından oluşan solüsyona farklı konsantrasyonlarda karbon noktası eklenerek film oluşturulmuştur. Film örnekleri, DPPH yöntemiyle önemli ölçüde antioksidan aktivite göstermiştir. Ayrıca, filmlerin *L. Monocytogenese* karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu bulgular, Kombucha artıklarından elde edilen karbon noktalarının aktif gıda ambalajı olarak potansiyeline ve antimikrobiyal özelliklerine sahip olabileceğini göstermektedir. Bu tez, artık materyallerin sürdürülebilir ve değerlendirilebilir bir şekilde kullanılmasına yönelik önemli katkılar sunmaktadır ve gelecekteki ambalajlama sektörü için çevre dostu ve etkili çözümler sağlama potansiyeline sahiptir.

2023, xi + 57 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Ambalaj, Ambalaj olarak kullanım, Kombucha, Kombucha içeceği.

ABSTRACT

MASTER THESIS

INVESTIGATION OF CARBON DOT SYNTHESIS FROM KOMBUCHA BEVERAGE PRODUCTION WASTE AND ITS POTENTIAL USE AS ACTIVE FOOD PACKAGING

ZEHRA VERGİLİ

**YOZGAT BOZOK UNIVERSITY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
DEPARTMENT OF BIOLOGY**

SUPERVISOR: ASST. PROF. DR. NURCAN DOĞAN

This thesis focuses on the synthesis of carbon dots using SCOBY, which is a byproduct of Kombucha, and investigates their potential use as active food packaging. The synthesized carbon dots are analyzed for their morphological and structural properties using TEM, UV/visible spectrophotometry, and FTIR (analysis). TEM imaging reveals the formation of homogeneous spherical carbon dots with a size range of 9.27-9.41 nm. The UV/visible absorption spectrum confirms the successful synthesis of carbon dots with strong UV-absorbing properties. FTIR spectrum provides information about the surface structures of the carbon dots. In the subsequent step, cytotoxicity values of carbon dots are measured using the L929 mouse fibroblast cell line. At low concentrations, no toxic effects are observed, while a slight increase in toxicity is detected at higher concentrations. Then, films are formed by adding carbon dots to a solution of sodium alginate and CMC (Carboxymethyl Cellulose) at different concentrations. The film samples exhibit significant antioxidant activity through the DPPH method. Furthermore, the films are found to possess antimicrobial activity against *L. monocytogenes*. These findings indicate the potential of carbon dots derived from Kombucha waste as active food packaging with antimicrobial properties. This thesis makes significant contributions to the sustainable and resourceful utilization of waste materials, offering eco-friendly and effective solutions for the future packaging industry.

2023, xi+ 69 Pages

Keywords: Packaging, Use as Packaging, Kombucha, Kombucha Drink.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEZ ONAY SAYFASI.....	ii
TEZ BEYANI.....	iii
ÖNSÖZ.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL (KURAMSAL, KAYNAK) BİLGİLER.....	5
2.1. Kombucha.....	5
2.1.1. Kombucha Mikroflorası.....	6
2.1.2. Kombucha Çayının Biyoaktif Özellikleri.....	7
2.1.3. Kombucha ve Kombucha Kültürü Üretimi.....	10
2.2. Karbon Noktaları.....	12
2.2.1. Karbon Noktalarının Sentez Yöntemleri.....	13
2.2.2. Yeşil Sentez Yoluyla Karbon Noktaları Üretimi.....	15
2.2.3. Doğal Kaynaklı Karbon Noktaları.....	16
2.2.4. Karbon Noktalarının Sitotoksitesisi ve Biyoaktivitesi.....	18
2.2.5. Karbon Noktalarının Aktif Gıda Paketlemede Kullanımı.....	20
2.3. Gıda Ambalajlama Teknolojisi.....	22
2.3.1. Aktif Gıda Ambalajlama ve Uygulamaları.....	23
2.3.2. Biyopolimer Bazlı Filmler ve Uygulamaları.....	25
2.3.3. Solvent Dökme Yöntemi ile Film Üretimi.....	26
2.3.4. Nanoteknoloji ve Gıda Ambalajlama Endüstrisinde Kullanımı.....	26
2.3.5. Gıda Atıklarının Değerlendirilmesi ve Biyobozunur Ambalaj Üretimi.....	27
2.4. Kombucha Kültürü ve Filmlerin Üretiminde Kullanılan Materyaller.....	28
2.4.1. Kombucha Kültürü Üretimi.....	28
2.4.1.1. Siyah Çay.....	28

2.4.1.2. Sakkaroz	29
2.4.2. Filmlerin Üretimi	29
2.4.2.1. Sodyum Aljinat.....	30
2.4.2.2. Karboksimetilselüloz (CMC).....	30
2.4.2.3. Gliserol	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1. Materyal	32
3.2. Yöntem.....	32
3.2.1. Fermantasyon ve SCOPY Üretimi	32
3.2.2. Karbon Noktaların Sentezi	33
3.2.3. Karbon Noktaların Karakterizasyonu	34
3.2.4. Karbon Noktaların Toksikite Testi.....	34
3.2.5. Filmlerin Üretimi	35
3.2.6. <i>In-vitro</i> Antioksidan Aktivite	35
3.2.7. <i>In-vitro</i> Antimikrobiyal Aktivite	36
3.2.8. İstatistiksel Analiz	36
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	37
4.1. Karbon Noktaların Karakterizasyonu	37
4.2. Karbon Noktaların Sitotoksiteleri	39
4.3. Filmlerin Antioksidan Aktiviteleri.....	40
5. SONUÇ.....	42
6. KAYNAKLAR.....	44

TABLolar LİSTESİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Karbon noktaları sentezinde kullanılan gıda/atık/artıkları ve sentezlenme yöntemleri	17
Tablo 4.1. Filmlerin antioksidan aktiviteleri	41
Tablo 4.2. Filmlerin <i>L. monocytogenes</i> e karşı antibakteriyel aktiviteleri	42



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Gıda artıklarından hidrotermal yöntem ile sentezlenen ve yeşil ışığa yapan KN'leri içeren solüsyon	15
Şekil 2.2. Karbon noktalarının gıda endüstrisinde uygulama alanları	22
Şekil 3.1. SCOBY üretimi için akış diyagramı.....	33
Şekil 4.1. Karbon noktalarının TEM görüntüleri.....	37
Şekil 4.2. Karbon noktalarının UV/görünür bölge spektrumları	38
Şekil 4.3. Karbon noktalarının normal ve UV ışık altında görünüşleri.....	38
Şekil 4.4. Karbon noktalarının FTIR Spektrumu.....	39

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
°C	: Derece
Ca	: Kalsiyum
CMC	: Karboksimetilselüloz
CO ₂	: Karbondioksit
Cu	: Bakır
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
FDA	: ABD Gıda ve İlaç İdaresi
FDA	: Food and Drug Administration
Fe	: Demir
GKN	: Grafen Kuantum Noktaları
K	: Potasyum
KN	: Karbon noktaları
KPN	: Karbonize Polimer Noktaları
M.Ö.	: Milattan Önce
Mn	: Manganez
Na	: Sodyum
Ni	: Nikel
nm	: Nanometre
SCOBY	: Kambucha Kültürü
UV	: Ultraviyole
Vb.	: Ve benzeri
Vd.	: Ve diğerleri
Zn	: Çinko
α	: Alfa
β	: Beta

1. GİRİŞ

Gıda ambalajları, gıda ürünlerinin korunması, taşınması ve tüketiciye sunulması amacıyla kullanılan kaplama ve paketleme materyalleridir. Gıda ambalajları, gıdaların raf ömrünü uzatmak, taze, güvenli ve hijyenik bir şekilde tüketiciye ulaşmasını sağlamak, ürünün fiziksel, kimyasal ve biyolojik kontaminasyonlardan korumak gibi önemli işlevleri yerine getirmektedir. Gıda ambalajlarının tarihsel sürecine bakıldığında; cam, tahta, kâğıt, karton metal, plastik, alüminyum folyo, vakumlu ambalajlar ve esnek ambalajlar gibi çeşitli malzemelerden üretilmektedir. Gıda ambalajlamadaki esas gelişmeler ise I. ve II. Dünya Savaşları arasındaki ve sonraki dönemlere tekabül etmektedir. Askeri gıdaları güvenli kılmak için tek kullanımlık alüminyum folyolar, polietilen, polivinil plastikler, aseptik paketleme, fleksografik baskı ve esnek ambalajlama teknolojisi sektördeki en büyük yenilikler arasında değerlendirilmektedir. Günümüzde gıda ambalajları önceliği metal, cam ve karton ambalajlardan daha ucuz olması, esnek, dayanıklı ve hafif olması, kullanım kolaylığı, geri dönüştürme potansiyeli sebebiyle muadilleri olan polipropilen, polyester ve polivinil alkol polimerleri vb. plastik menşeli ambalajlara bırakmıştır. Fakat plastik menşeli ambalajlar, doğada uzun süre çözünmediklerinden dolayı ciddi çevre kirliliği sorunlarına yol açmakta ve bu sorun gün geçtikçe kontrol edilemez boyutlara ulaşmaktadır. Plastik atık sayısındaki artışın 2030'lu yıllarda günümüzden iki kat fazla olacağı öngörülmektedir. Plastiklerin yaratmış olduğu bu kirlilik ekosistem için ciddi bir sınır ötesi tehdit haline gelmiştir (Patrício Silva vd., 2021). FDA (Food and Drug Administration)'nın 2011 yılı raporuna göre her yıl yaklaşık 1.3 milyar ton gıda çöpe atılmaktadır. Bu durum gıda israfına neden olmakla birlikte, bir başka açıdan bakılacak olursa %20-30'unun geneli plastik ambalajlı olan ürünlerden oluştuğu düşünüldüğünde büyük çevresel problemlere de neden olacaktır (Dobrucka, 2013). Ayrıca ekosisteme bu denli zararlı olan plastikler gıda ambalajı olarak kullanıldığında muhtemel migrasyon riskinden dolayı sağlık üzerinde de ciddi problemlere sebep olabilmektedir (Wang vd., 2021). Çünkü spesifik özellikler kazanabilmeleri için plastiklere çeşitli toksik katkı maddeleri ilave edilebildiği gibi üretiminde kullanılan monomerler de toksik olabilmektedir. Gıda ile teması esnasında da söz konusu toksik monomerler ve toksik katkı maddeleri gıda ve içeceklere göç ederek endokrin bozucu, karsinojenik, tümörijenik ve gelişim bozukluklarına yol açıcı etkileri olabilmektedir (Cherif Lahimer vd., 2017).

Plastiklerin yaratmış olduğu sorunların bir kısmı uygun biyopolimer diğer bir ifade ile biyobozunur malzemeler kullanılarak giderilebilir. Biyopolimerler, doğal olarak oluşan ve

biyolojik yollarla parçalanabilen polimerlerdir. Bu polimerler, biyo-dönüşümlü ve çevre dostu özellikleri nedeniyle gıda endüstrisinin de arasında bulunduğu çeşitli endüstrilerde giderek daha fazla kullanılmaktadır. Biyopolimerler, geleneksel petrokimya kökenli polimerlerle karşılaştırıldığında daha sürdürülebilir ve çevre dostu bir alternatif sunmakta olup, doğada kısa süre içerisinde bozuna bildiklerinden dolayı atık sorununu kısmen bertaraf edebilir. Kitosan, selüloz asetat, pullulan, karboksimetil selüloz, zein, zein prolamin, jelatin, kolajen, hordein vb. gıda ambalajında başarılı şekilde kullanılan biyopolimer materyaller olarak sınıflandırılabilir (Saberı Riseh vd., 2023).

Gıda perakende sektörünün hızlı büyümesi paketleme materyalleri ihtiyacına yönelik talebi arttırması yanında uzun raf ömrüne sahip olan gıda ihtiyacını da artırmıştır. Paketlenmiş gıda ürünleri, belirlenmiş muhafaza şartlarına uyulduğunda son kullanma tarihine kadar güvenli bir şekilde tüketilebilirler. Geleneksel gıda ambalaj malzemeleri, gıdayı sadece fiziksel, kimyasal ve biyolojik tehlikelere karşı korumakla sınırlıyken, aktif gıda ambalaj sistemleri bunlara ilaveten daha fazla işlevsellik sunar. Bu sistemler, oksijen tutucu, tat ve koku tutucu, nem emici, etilen emici, antioksidan, antimikrobiyal ve diğer birçok ekstra özellik kazandırarak gıda ambalajlama endüstrisine yeni fırsatlar sunar (Özdemir & Floros, 2004). Gıda ürünlerinin raf ömrü, çeşitli faktörlere bağlı olarak değişebilir ve hammadde seçiminden, üretim tekniklerine, depolama koşullarından sevkiyat ve dağıtım süreçlerine kadar birçok etkene bağlı olarak şekillenmektedir. Dahası proses içerisinde gıdalarda kontrol edilemeyen kontaminasyon ve paketleme sonrası oksidasyon problemleri olabilmekte, raf ömürlerinin kısalmasına sebebiyet verebilmekte hatta tatta değişikliklere sebebiyet vermeden patojen mikroorganizmalar çeşitli sağlık problemlerine neden olabilmektedir. Gıdaların raf ömrünü uzatmak için geleneksel ve en etkili yöntem koruyucu gıda katkı maddelerinin kullanımı iken, bilinçli tüketicilerin özellikle koruyucu içeren gıdalardan kaçınma eğilimi, sektörde yeni arayışlara yol açmıştır. Gıda endüstrisi, tüm bu aşamalarda ürünlerin kalitesini ve güvenliğini korumak ve aynı zamanda çevreye zarar vermeyen inovatif ve etkili ambalaj çözümlerine odaklanmaktadır. Son yirmi yılda yapılan gelişmeler, aktif gıda ambalajlamasının en iyi alternatiflerden birisi olduğunu göstermektedir. Bu yenilikçi ambalajlama yöntemi, gıdaların kalitesini ve raf ömrünü artırmak için etkili çözümler sunmaktadır.

Aktif ambalajlama sistemlerinde en yaygın uygulamalardan birisi aktif bir bileşenin ambalaj materyaline entegrasyonudur. Karbon noktaları (KN) adı verilen yeni bir karbon bazlı nanomalzeme türü araştırmacılar arasında ilgi odağı haline gelmiştir. KN'ler, birçok fizikokimyasal ve biyoaktif özellikleri sayesinde iyi biyo-uyumluluk, benzersiz optik

özellikler, renkli fotoluminesans düşük üretim maliyeti, çevre dostu, yüksek stabilite ve elektron hareketliliği gibi özelliklere sahiptir. Söz konusu ultrafonksiyonel özellikler sayesinde, KN'ler farklı disiplinlerde uygulama alanları bulmuştur ve kimya ve malzeme bilimcileri tarafından yoğun olarak araştırılmaktadır. Sahip olduğu bu özelliklerinden dolayı günümüzde daha fazla tıbbi teşhis, biyogörüntüleme, fotokataliz, optoelektronik cihazlar, güneş pilleri, LED vb. malzemelerin geliştirilmesinde kullanılabildiği gibi son zamanlarda gıda paketlenmede, gıda sahtekârlıklarının, ağır metallerin, toksinlerin ve böcek ilaçlarının tespitinde, gıdalarda oksidasyonun kontrolünde ve raf ömrünün arttırılmasında da başarıyla uygulanmaktadır. Birçok yöntemle üretilebilen KN'ler toksik olmayan, çevre dostu, kolay uygulama gibi artıları nedeniyle yeşil sentez yöntemlerinden birisi olan hidrotermal yöntem umut vaat etmektedir. Bu yaklaşımda çeşitli bitkiler veya mikroorganizmalar kullanılarak sürdürülebilir, çevre dostu ve güvenli deney avantajları sunulmaktadır. KN'ler, ışımaya yapan küresel parçacıklar olup, 10 nm'den daha küçük boyutlarda floresans özelliğine sahiptirler. Ayrıca, doğal materyallerden ve evsel, tarımsal ve endüstriyel atık veya artık gibi ucuz doğal karbon kaynaklarından düşük maliyetle üretilebilmektedirler. Bu nedenle, KN'ler nanomalzeme araştırmalarında gelecekte daha geniş bir uygulama alanına sahip olabilecek atık/artık hammaddelerin yüksek katma değerli maddelere dönüşümünü sağlayan umut verici materyaller olarak değerlendirilmektedir. KN'lerin yukarıda sıralanan tüm faydaları ile birlikte ayrıca antimikrobiyal, antikanser ve antioksidan özelliklerinin olduğu da bilinmektedir. Hidrotermal yöntemi ile elde edilen KN'lerin kanser terapisinde güvenle uygulanabileceği, aşırı oksidasyon hasarının neden olduğu hastalıkların biyogörüntülenmesi ve tedavisinde kullanılabileceği ve gıda patojenlerine karşı inhibisyon etkilerinin olduğu deklere edilmiştir.

Kombucha, dünya genelinde binlerce yıldır sağlığa olan faydaları ile tüketilen serinletici bir içecektir (Sun vd. 2015). Kombucha, demlenmiş siyah çayın tatlandırılması ve Simbiyotik Bakteri ve Maya Kolonisi (SCOBY) ile aşılmasının ardından karışımın 7-10 gün boyunca aerobik koşullar altında inkübe edilerek fermantasyona bırakılması suretiyle üretilir (Villarreal-Soto vd., 2019). Fermantasyon sonucunda elde edilen Kombucha, organik asitler, vitaminler, mineraller, diyet lifi, esansiyel amino asitler, çeşitli enzimler ve ikincil metabolitler bakımından zengin bir içecektir (Miranda vd., 2016). Selülozik bir biyofilm olan SCOBY'nin mikroflorasında asetik asit bakterileri (De Roos & De Vuyst, 2018), laktik asit bakterileri (Marsh vd., 2014) ve osmofilik mayalar simbiyotik bir ilişki içerisinde (Coton vd., 2017). Kombucha mikrobiyal konsorsiyumundaki simbiyotik ilişki şu şekilde

açıklanabilir: Maya, sakkarozu glukoz ve fruktoza parçalayarak onları bakterilere kullanılabilir hale getirir. Bunun karşılığında, bakteriler azot fiksasyonuna ve biyofilm sentezine katılır, bu da topluluğu olası kontaminanlardan korumaya yardımcı olur (Villarreal-Soto vd., 2018). Kombucha fermentasyonun ilk günlerinde SCOBY'deki bakteriler görsel olarak fark edilebilen yüzen bir tabaka oluşturur ve fermentasyon ilerledikçe kalınlaşır. Bu tabakanın çeşitli faydalı özellikleri olsa da genellikle kombucha içeceğinin elde edilmesi amacıyla fermentasyonun sonunda yan ürün olarak atılır. SCOBY, bitki selülozuna göre yapısal olarak daha ince ve dallanmamış bir tür bakteriyel selülozdur, su ortamlarına dayanıklılık ve daha büyük bir yüzey alanı gibi benzersiz avantajlar sağlar (Latanya vd., 2021). Ayrıca, SCOBY bitkisel fermentasyonda kullanılan bitkiye bağlı olarak antioksidan ve antimikrobiyal aktivite sergileyebilir (Ramírez Tapias vd., 2020). Bu faydaların yanı sıra, biyolojik uyumluluğu, çevre dostu ve toksik olmamasından dolayı tekstil, tıp ve gıda ambalajlama gibi çeşitli alanlarda kullanılmalarını mümkün kılar (Laavanya vd., 2021). Literatürde SCOBY genellikle içeceği olan kombucha bazında değerlendirilmiştir. Yine de SCOBY'nin film olarak karakterize edildiği sınırlı çalışmalar olsa da (Ramírez Tapias vd., 2020), genellikle atık materyal olarak değerlendirilmiştir. Kombucha'dan karbon noktalarının üretimine yönelik literatürde çalışma var olmakla birlikte, bilindiği kadarıyla SCOBY'den karbon noktalarının sentezine yönelik bir çalışma rapor edilmemiştir.

Bu çalışmada, genellikle atık bir materyal olarak değerlendirilen SCOBY'den KN'larını yeşil sentez yöntemlerinden birisi olan hidrotermal yöntem kullanarak sentezlenmesi, antimikrobiyal, antioksidan ve toksite yönünden karakterize edilmesi ve sonrasında farklı oranlarda KN içeren sodyum aljinat bazlı film üretilip, karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL (KURAMSAL, KAYNAK) BİLGİLER

2.1. Kombucha

Kombucha çayı Mançurya'da M.Ö. 220 yıllarında tüketimi başlanmış, ardından Rusya'da da tüketilmeye başlanmıştır. Kore'de bulunan Kombu isminde bir Doktor, M.S. 414 yılında dönemin imparatoru olan Inkyo'yu tedavi etmek amacıyla fermente kombucha çayını Japonya'ya getirmiştir. Bu çaya imparatoru tedavi etmek amacıyla Japonya'ya getiren doktorun adı verilerek, "Kombu'nun çayı" anlamına gelen Kombucha ifadesi kullanılmaya başlanmıştır (Kubilay, 2014). Kombucha çayının ilk olarak Çin'de kullanıldığı daha sonra Japonya, Kore, Rusya ve Uzakdoğu ülkelerinde kullanılmaya başlandığı bilinmektedir. Ticariyollar ve II. Dünya Savaşı'nın da etkisiyle, eski Sovyetler Birliği olarak bilinen bölgede, Avrupa ve Amerika'ya ulaştığı ve çayın tüketiminin yaygınlaştığı bilinmektedir. Bazı kayıtlara göre Japon savaşçıları kendilerine enerji vermesi için savaş süresi boyunca cephede yanlarında ve su şişelerinde Kombucha çayını taşımışlardır. "Kombu" deniz yosunu anlamına gelen *Laminaria japonica*'ya, "Cha" kelimesi ise çay kelimesine karşılık gelmektedir (El-Taher, 2011). Kombu, Combuchu, geleneksel adı ile mantar çayı büyük bir oranda Asya'da tüketilmekte olan geleneksel fermente bir içecektir (Sreeramulu vd., 2000). Doğu Asya'dan gelerek birçok ülkede farklı adlara sahip olan bir fermantasyon içecek olan kombucha tatlı ve ekşimsi bir lezzete sahiptir (Kumar vd., 2008). Fermente işlemini tamamlaması genellikle 8-10 gün arasında farklılık göstermektedir. Fermente işleminin ürünleri temel olarak CO₂, etanol, asetik ve glukonik asitten oluşmaktadır. Fermantasyon ortamında laktik asit, glukuronik asit, fenolik asit, B vitamini grupları, enzimler gibi minör bileşenlerde oluşmaktadır (Rousin, 1996). Kombucha çayı fermantasyon süresini doldurduktan sonra yüzeyde kalan bir selülozik jel tabakası ve ekşi sıvı bölge olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Kombucha mantarı görünüm olarak jelatinimsi görünüme sahiptir (Malbaşa vd., 2008). Leal vd.(2018) göre mayaların ve bakterilerin simbiyotik konsorsiyumları gelişim göstermeye başladıkça üründe ortaya çıkmakta olan selüloz yapı, çay üst tabakasındaki mikroorganizmaların gelişebilmesi için oksijen sağlamak ve UV ışınların ortaya çıkarabileceği zararlı etkilerinden koruma sağlamaktadır (Değirmencioğlu vd., 2019). Kombucha üretiminde genellikle substrat siyah çay tercih edilmekte ancak oolong, yeşil çay vb. kullanımına da oldukça yer verilmektedir. Ek olarak, bu ürün çok az sıklıkta melisa, nane, dut ve yasemin gibi aromalarla da üretilebilmektedir (Watawana vd., 2015). Siyah ve yeşil

ay en verimli substratları oluşturmaktadır. Bunun nedeni ise bu çayların, mantar hücrelerinin büyüyebilmesi için ihtiyaç duydukları nitrojen bakımından zengin olan kafein, teofilin gibi prin çeşitlerine sahip olmalarıdır (Essawet vd., 2015). Fermente bir ürün olan Kombu ayının üretiminde kullanılan aya ek olarak mikroorganizmaların kullanabilmesi için diğer bir substrat olarak karbon kaynaklarına da gereksinim bulunmakta olup daha fazla sakkaroz ve bal vb. tatlandırıcılar kullanılmaktadır. Kombucha ayının fermantasyonunda etkili olan mayalar invertaz enzimi kullanılarak ekstrakte biçimde bulunan karbon kaynağı (genellikle sakkaroz) hidrolize etmektedir. Mayalar bu sakkarozun hidrolizi sonucu oluşan fruktoz ve glukozu etanole dönüştürmekte bu etanolde asetik asit bakterileriyle birlikte asetik asite dönüştürülmektedir (Essawet vd., 2015). Kombucha kültür ile fermente edilmiş çay oluşumunu sağlamak için aerobik şartlarda, farklı gün ve sıcaklık değerleri kullanılmakta ve sürecin sonunda çeşitli asitlik değerleri gözlenmektedir (Essawet vd., 2015). Fermantasyon ortalama oda sıcaklığında 7-10 gün arası aerobik ortamda inkübasyona bırakılarak tamamlanmaktadır (Taşçı vd., 2010). Fermantasyon sırasında ve sonunda çay st yüzeyinde gelişmiş olan jelimsi tabaka Simbiyotik Bakteri ve Maya Kolonisi (SCOBY) olarak adlandırılmaktadır. Kombucha sahip olduğu tada ek olarak terapötik ve profilaktif etkilerinden dolayı tercih edilmektedir (Greenwalt vd., 1998; Teoh vd., 2004; Battikh vd., 2013). Kombucha ayı retiminde kullanılan çeşitli substratlar, fermantasyon süreleri, tatlandırıcılar ve başlatıcı kültür mikroflorası, birbirinden farklı içeceklerin oluşmasına neden olur. Bu eşitlilik, kombucha' nın kimyasal bileşimleri ve biyolojik aktiviteleri üzerinde etkili olduğu bilinmektedir (Jayabalan vd., 2014). Kombuchanın yararlı etkileri; yapısında bulunan çay polifenolleri, aminoasitler, vitaminler, antibiyotikler ve fermantasyon sürecinde üretilen farklı mikrontrientler, glukuronik, glukonik ve laktik asitlerle ilişkilendirilmektedir (Jayabalan vd., 2007). Kombu ayının yararları şu şekilde sıralanmaktadır; kanı detoksifiye etmek, kolesterol seviyesini düşürmek, tansiyonu ve iltihap problemlerini azaltmak, artrit, romatizma ve gut belirtilerini hafifletmek, karaciğer faaliyetlerini desteklemek, bağırsak fonksiyonlarını normalleştirmek, bağırsak florasını dengelemek, obeziteyi azaltmak, hemoroidi iyileştirmek, iştahı düzenlemek, diyabet ve kansere karşı koruyucu etki, antibiyotik etkisinin bulunması, bronşit ve astımı rahatlatmak, bağışıklık sistemini ve genel metabolizmayı güçlendirmektir (Kaya vd., 2022).

2.1.1. Kombucha Mikroflorası

Kombucha, şekerli çay içinde zoogleal matta asetik asit bakterilerinin ve ozmofilik maya türlerinin simbiyotik büyümesi sonucunda oluşan fermente bir içecektir. Sahip olmuş olduğu mikroflora başlangıç kültürü olan SCOBY'nin mikroflorasına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. SCOBY'nin mikroflorası asetik asit bakterilerini (De Roos & De Vuyst, 2018), laktik asit bakterilerini (Marsh vd., 2014) ve osmofilik mayaları barındırmaktadır (Coton vd., 2017). Kombucha da, asetik bakterileri (*Acetobacter xylinum*, *Acetobacter xylinum*, *Bacterium glukonicum*, *Acetobacter aceti*, *Gluconobacter liquefaciens*, *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter suboxydans* ve *Acetobacter pasteurianus*), laktik asit bakterileri (*Lactobacillus bulgaricus*) ve mayalar (*Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulasporea delbrueckii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces lambicus*, *Brettanomyces custersii*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces inconspicua* ve *Candida stellata*) simbiyotik ilişki içerisinde dirler (Ebrahimi Pure vd., 2017). Mayalar, kombucha fermantasyonunda önemli bir rol oynarlar ve öncelikle karbon kaynağı olan şekerli anaerob ortamda alkol ve karbondioksit (CO_2) dönüştürürler. Bu süreç, çayın alkollü kısmını oluşturur. Daha sonra florada bulunan bakteriler alkolü aerobik şartlarda asetik asite dönüştürerek kombucha'nın asitli tadını oluştururlar. Asetik asit, kombucha'ya ekşi tadını veren hâkim asittir. *Acetobacter* ve *Gluconacetobacter* cinsi bakteriler Kombucha çayının oluşumunu tamamlamanın yanı sıra önemli tat ve koku maddelerini meydana getirmesi açısından önemlidir. Kombucha üretiminde öncelikli fermantasyonu başlatan maya kompozisyonu oldukça değişken olmakla birlikte *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces* ve *Saccharomyces*'in en sık rastlanan cinsler arasında değerlendirilmiştir. Bakterilerin esas olarak asetik asit, glukonik asit üretiminden sorumludur (Greenwalt vd., 2000).

2.1.2. Kombucha Çayının Biyoaktif Özellikleri

Kombucha, birçok ülkede binlerce yıldır geleneksel olarak tüketilen ve sağlığa faydalarıyla bilinen serinletici, fermente hafif tatlı ve gazlı bir asitli içecektir (Sun vd., 2015). Kombucha tüketimi son senelerde giderek artış göstermekte, sağlıklı yaşam içecekleri için yenilikler ve alternatifler aranmaktadır. Günümüzde kombucha çayı ticari olarak da değer kazanmakla birlikte tüketimi birçok ülkede gün geçtikçe artmaktadır. Temel olarak fonksiyonel özellikleri ve sağlık çekicilikleri ile ilgili iddialar nedeniyle dünya çapında en popüler düşük alkollü içeceklerden biri olarak kabul edilmektedir (Watawana vd., 2015). Kombucha kültürü yani SCOBY içindeki başlıca asetik asit bakterileri ve mayalarla birlikte mikroflorası bulunan,

jelimsi bir zar benzeri tabakadır. Bu zarın mikrobiyotası, kökenine bağlı olarak değişebilir ve bazen laktik asit bakterilerini de içerebilir. Kombucha içeriğinde probiyotik mikroorganizmaları barındırır. Tıpkı diğer tüm fermente ürünlerde olduğu gibi, SCOBY'nin başlangıçtaki kompozisyonu son ürünün işlevselliğini de etkiler. Bununla birlikte kombuchanın bileşimi hammadde olarak kullanılan azot kaynağına göre de değişmekle birlikte, hammaddesinden tamamen farklı karakteristikler sergiler. Kombucha üretimi geleneksel yöntemlere göre yapıldığından standardizasyon söz konusu olmayıp, içeceğin nihai bileşimi büyük ölçüde kullanılan SCOBY'nin kompozisyonuna, ham maddelere ve süreçte benimsenen fizikokimyasal parametrelere bağlı olarak değişmektedir. Çeşitli çalışmalarda bu mikroorganizma topluluğunun coğrafi kökene (Chakravorty vd., 2016) ve aynı zamanda çoklu fermantasyonlar arasında pasajlamaya bağlı olarak büyük farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir (Marsh vd., 2014). Fermantasyondan sonra oluşan yeni içecek, organik asitler, vitaminler, mineraller, diyet lifi, esansiyel amino asitler, çeşitli enzimler ve ikincil metabolitler açısından zengindir (Chu & Chen, 2006). Kombucha'nın içerdiği metabolitler antimikrobiyal (Cardoso vd., 2020), antitümör (Jayabalan vd., 2014), antihipertansif (Vitas vd., 2020), immün düzenleyici (Villarreal-Soto vd., 2020), diyabetin tedavisi ve önlenmesi, kolesterol ve trigliserit düzeylerinin düşürülmesi (Hosseini vd., 2016), antioksidan, antikanser, antiinflamatuvar gibi faydalı etkilere sahiptir. Kombucha, fenolik bileşikler ağırlıklı olmak üzere biyoaktif özelliklere sahip maddelerden oluşmaktadır. Bunlar, kombucha'da bulunan ana antioksidan grubunu temsil eder ve içeceğin sağlık yararlarından sorumludurlar. Kombucha'da bulunan fenolik bileşikler arasında flavonoidler, özellikle kateşinler ana bileşiklerdir (Jayabalan vd., 2007), ancak içecek glukonik asit, glukuronik asit ve asetik asit gibi diğer önemli bileşikler de ihtiva etmektedir. Glukuronik asit karaciğeri detoksifiye etme ve koruma özelliklerine sahiptir (Hyun vd., 2016) ve asetik asit antimikrobiyal aktiviteye sahiptir (Cardoso vd., 2020). Polifenoller, flavonoidler, izoflavonlar, fenolik asitler, karotenoidler, kumarinler gibi bazı fitokimyasallar açısından zengin olan gıdalar, serbest radikal oluşumunu önlemeye yardımcı olur, oksidatif stresi azaltır ve insanların dejeneratif hastalıklara karşı korunmasına yardımcı olur ve yüksek antioksidan aktiviteye sahiptirler. Önceki çalışmalar, siyah çayın veya yeşil çayın, polifenoller ve flavonoller, kateşinler ve kafein gibi antioksidan maddeler bakımından zengin olduğunu göstermiştir (Lee vd., 2002). Bu nedenle, kombucha çayı üretiminde kullanılan çayın çeşidi ve miktarı ile fermantasyon sürecinin sonucu olan nihai ürünün, antioksidan aktivite üzerinde etkisi olduğu düşünülmektedir. Fermantasyon sürecinde kombucha çaylarının serbest radikal süpürme

yeteneklerini ve toplam fenolik madde miktarını incelenmişlerdir. Çalışmada fenolik bileşikler, DPPH radikali üzerindeki süpürücü aktivite, süperoksit radikali ve hidroksil radikali aracılı linoleik asit oksidasyonuna karşı inhibitör aktivitenin fermantasyon döneminde arttığı tespit edilmiştir. Bu değişikliklerin örneklerdeki kompleks fenolik bileşiklerin fermantasyon sürecine bağlı artan asitlik ile modifikasyonu ile açıklanmış ve çay konsorsiyumundaki bakteri ve mayalar tarafından salınan enzimlerin parçalanmasıyla ilişkilendirilmiştir (Jayabalan vd., 2008). Kombuchanın içeriği; etanol, CO₂,asetik asit, glukonik asit buna ek olarak okzalik asit, şekerler, sakkarik asit, laktik asit, 2,5-ketoglukonik asit, 5- ketoglukonik asit, B₁, B₆, B₁₂, C vitamini gibi suda çözünmekte olan vitaminler, etil glukonat, flavonoller, kateşinler, teoflavinler vb. çay bileşenleri, amilaz, invertaz gibi hidrolitik enzimlerin yanında Na, Cu, K, Ca, Mn, Fe, Zn ve Ni gibi elementler ve aminoasitlerden oluşturmaktadır (Essawet vd., 2015). Kombucha ayrıca probiyotik bir içecek gibi davranarak insanlarda gastrointestinal mikrobiyal florayı etkilemekle ve bağırsak florasının dengelenmesine yardımcı olarak bağırsak aktivitelerinin normalleşmesini bir ölçüde kolaylaştırmasıyla da ilişkilendirilmektedir (Watawana vd., 2015). Aynı zamanda, saç, cilt ve tırnak sağlığını iyileştirme, stres ve sinir bozukluklarını azaltma, uykusuzluğu hafifletme, baş ağrılarını azaltma, alkol bağımlısı bir kişinin alkol arzusunu azaltma ve mesane enfeksiyonlarının oluşumunu önleme gibi yeteneklere sahip olduğu bilinmektedir. Böbrek kalsifikasyonunun azaltılması da bu içeceğin faydalı etkileri arasında bilinir (Jayabalan vd., 2014). Menstrual bozukluklarının ve menopozal sıcak basmalarının azaltılması, göz görüşünün iyileştirilmesi, hücrel rejenerasyon, vücuttaki bez sistemlerinin uyarılması, bronşit ve astımı hafifletme ve genel metabolizmanın artırılması gibi daha birçok sağlık faydası, Kombuchanın tüketimi ile ilişkilendirildiği iddia edilmektedir (Jayabalan vd., 2014). Bu içeceğin faydalı etkileri, fermantasyon sırasında suya salınan metabolik ürünlerin varlığına atfedilmektedir ve çoğu sağlık faydasının serbest radikal yakalama potansiyeline bağlandığı hipotez edilmektedir. Mikrobiyal topluluk, fermantasyon süreciyle siyah çayın serbest radikal yakalama aktivitesini artırma yeteneğine sahiptir (Dufresne & Farnworth, 2000). Ayrıca, glukuronik asit içeceğe faydalı özellikler kazandırır. Glukuronik asit normalde sağlıklı bir karaciğer tarafından üretilen ve oldukça suya çözünebilir bir karboksilik asittir. Bu asit glukozamin ve kondroitin sülfata dönüştürülebilir ve bunlar kollajenle ilişkilidir ve aynı zamanda eklemlerde bir yağlayıcı görevi görür (Watawana vd., 2015). Fermantasyon sürecindeki mikrobiyal konsorsiyum tarafından üretilen bütirik asitin insan hücrel zarlarını koruduğu bilinmektedir. Glukuronik asit ile birleştiğinde, bu kompleks bağırsak duvarlarını

güçlendirmeye ve parazitlere karşı koruma sağlamaya yeteneğe sahiptir (Dufresne & Farnworth, 2000). Kombucha çayı C vitamini açısından önemli ölçüde zengin bir içecektir. Özellikle ihtiva ettiği bazı AAB suşları C vitamini sentezlemedeki rolü bulunmaktadır. Yapılan çalışma da fermantasyona bağlı olarak çaylarda 2 katından fazla C vitamini sentezlenmektedir (Bauer-Petrovska & Petrushevska-Tozi, 2000). *Annona muricata* L. yaprakları ile yapılan kombucha'da 7. ve 14. günlerde C vitamini analizi yapılmış ve fermantasyon işlemi esnasında C vitamini seviyesinde önemli seviyede artış gözlemlenmiştir (Candra vd., 2021). C vitamini güçlü bağışıklık sistemi, kollajen üretimi, yara iyileşme, diş ve diş eti sağlığı, cilt yenilenmesi, kıkırdak, tendon, bağ dokusu yenilenmeleri vb. çok sayıda olumlu etkiye sahiptir. Ayrıca en yaygın antioksidan vitaminlerden biridir. Bu nedenle, C vitamini oksidasyon ile ilişkili birçok hastalığın önlenmesine yardımcı olur (du Toit vd., 2001). Kombucha çayının içindeki antimikrobiyal bileşenler bakteriler ve fermantasyonundan sorumlu mayalar tarafından üretilen olası metabolitler ve/veya bileşenlerdir. Bu bileşenlerden en önemlisi ise yüksek asetik asit içeriği olması yanında etanol ve çeşitli organik asitler de antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde rol oynamaktadır (Greenwalt vd., 1998). Greenwalt vd. (1998) tarafından yapılan çalışmada siyah çay ve yeşil çayın yaprakları kullanılarak kombucha üretilmiş ve toplam asit içeriği 33 g/L'ye ulaşana kadar fermente edilmiştir. Fermente çaylardan alınan örnekler de yine ikiye bölünmüş ve bir yarısının pH değeri 7'ye ayarlanarak organik asitlerin (özellikle asetik asit) etkisinin ortadan kaldırılması sağlanmıştır. Fermente edilen ve nötralize edilmeyen kombucha çayları *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus cereus*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Buna karşılık, fermente edilmemiş çay ve nötralize edilmiş fermente çay önemli ölçüde antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. Bu nedenle, kombucha çayının antimikrobiyal aktivitesinin asetik asitten kaynaklandığı belirtilmiştir.

Kombucha üzerinde bulunan birçok raporun kişisel deneyimlere ve tanıklıklara dayandığı görünebilir, ancak son zamanlarda bilim insanları, in vitro ve in vivo çalışmalardan elde edilen terapötik etkileri aydınlatan bilimsel kanıtlar sunmuşlardır. Bununla birlikte, diğer fermente ürünler gibi yoğurt gibi yapılan çalışmaların sayısına kıyasla bu içecek üzerinde yapılan çalışmalar çok düşüktür.

2.1.3. Kombucha ve Kombucha Kültürü Üretimi

Kombucha kültürü jelatine ve düz diske benzeyen zar yapısı formundadır. Kombucha kültürü çay ve şekerden oluşan besleyici solüsyonunda yaşamını sürdürerek her proste yenilenmektedir. Yeni bir kombucha ürününün hazırlanması için, uygun karbon kaynağı (şeker), substrat (çay vb.) ve başlangıç kültürüne (SCOBY) ek olarak bir miktar da kombucha çayı da gerekmektedir. Aslında fermantasyon süreci sirke üretimine benzer şekilde işlemektedir. İlave edilecek kombucha çayı ortaya çıkarılacak son ürünün ortalama %10-20'si kadar olmalıdır. Kombucha çayı solüsyona başlangıç aşamasında eklenilerek istenilen mikroorganizmalar için uygun pH seviyesini sağlayarak kültürün büyümesini başlatmaktadır. Ancak yine de tam bir standardizasyon söz konusu olmayıp, oranlar değişebilmektedir. Azot menşei olarak çayın demlenmesi mikroorganizmaların büyümesine katkı sağlamaktadır (Villarreal-Soto vd., 2018). Kombucha fermantasyonu oda sıcaklığında ve ortalama 7-10 gün arasında aerobik ortamda inkübasyona bırakılarak tamamlanmaktadır (Taşçı vd., 2010). Fermantasyon sırasında kabın ağzı açık biçimde ve etrafında fermantasyonu olumlu şekilde etkileyecek. Kombucha fermantasyonun gerçekleşeceği kabın ağzının tülbent gibi hava almayı sağlayacak bir bez yardımı ile kapatılması hem ürünün içerisine yabancı birtakım maddelerin girmesinin de önüne geçecek hem de oksijenli solunumun gerçekleşmesini sağlayacaktır. Kombucha kültürü, asetik asit bakterilerinin ve ozmofilik mayaların mutualistliğinden ortaya çıkmaktadır (Malbaša vd., 2008). Kombucha kültürüne bakıldığında bu kültürü *Saccharomyces ludwigii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces inconspicua*, *Debaryomyces hansenii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Brettanomyces* spp., *Kloeckera* spp., *Zygosaccharomyces kombuchaensis* (Wang vd., 2013). *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulospora* spp., *Pichia* spp., *Mycotorula* spp., *Mycoderma* spp., gibi mayalar (Jayabalan vd., 2014) ile *Acetobacter xylinum*, *Bacterium gluconicum*, *Acetobacter xylinoides*, *Gluconobacter liquefaciens*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter suboxydans* ve *Acetobacter pasteurianus* gibi asetik asit bakterileri ve laktik asit bakterileri grubundan *Lactobacillus bulgaricus* oluşturmaktadır (Wang vd., 2013). *Medusomyces gisevii* diğer adıyla çay mantarının gelişim gösterebilmesi bakterilerle osmofilik mayaların çoğalmasına bağlı olarak; karbon kaynağını kullanmakta olan asetik asit bakterileri fermantasyon sırasında, selülozik yapıdakalın “zooglea biyofilm” tabakasını oluşturarak simbiyotik bakteri-maya yapılarının beraber kalmasını sağlamaktadır (Mo vd., 2008; Jayabalan, 2010; Jayabalan, 2014). *Gluconacetobacter xylinus* tarafından metabolik ürün olarak ortaya çıkan jölemsi düz disk yapısında bir zardan meydana gelmektedir (Vitas vd 2013). Aerobik mikroorganizma olan *Gluconacetobacter xylinus*, substrat içerisinde selülozik

bir formdaki sıvı- hava arasında bir ara yüz yaratan Kombucha mantar tabakasını meydana getirmektedir. (Nguyen vd 2010). Reiss (1994), Çay mantarının kaynağıyla, fermantasyon zamanıyla, karbon kaynağının oranıyla ilişkili olarak metabolik bileşenler ve konsantrasyonları yaratmaktadır. 50 g/l sakkaroz kullanımıyla optimum düzeyde etanol ve laktik asit oluşumunu sağladığı çalışmalarda belirtilmiştir (Şarkaya, 2019). Bu ürün özellikle ev ortamında üretilmekte olup ticari olarak üretimi sınırlı şekildedir (Jayabalan vd., 2014). Geleneksel üretim biçiminde siyah veya yeşil çay %5–10 sakaroz ile fermente işlemi gerçekleştirilir (Emiljanowicz vd., 2020 , Massoud vd, 2022). Fermantasyon sırasında kesinlikle hareket ettirilmemeli ve çalkalanmamalıdır. İdeal asitlik gelişiminden sonra fermantasyon sonlandırılmazsa çayın hoşça giden hafif meyvemsi ve ekşi lezzeti yerini sirkeye benzer bir tada bırakmaktadır. “Kombucha” hafif alkol ve asitin etkisiyle elma şarabına benzeyen birlezzete sahiptir (Goh vd., 2012; Watawana vd., 2015). Fermantasyon işlemi tamamlandıktan sonra, SCOBY ürünün içerisinden çıkarılır ve az oranda yeni fermente edilmiş çay ile beraber saklanır. Geriye kalan kombucha birkaç gün süre ile ikincil bir fermente için süzülür ve şişelenme işlemi yapılır ya da 4 °C'lik bir sıcaklıkta muhafaza edilir (Jayabalan vd. 2011).

2.2. Karbon Noktaları

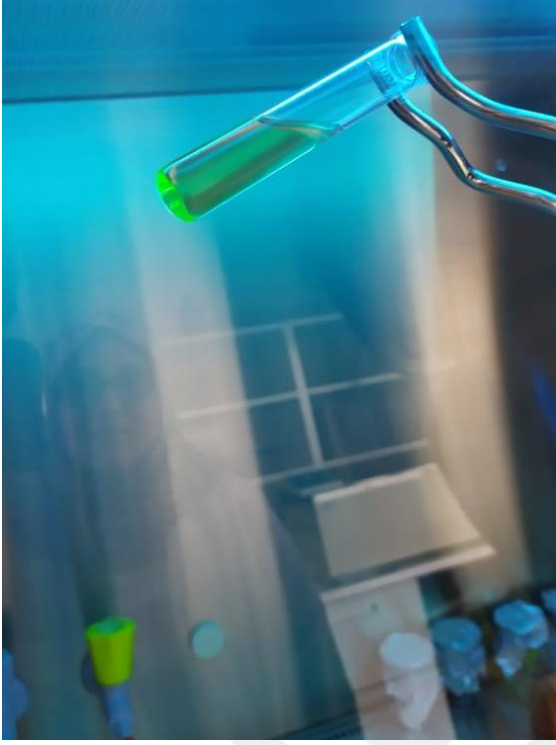
Karbon bazlı malzemeler, malzeme biliminin gelişmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Karbon noktalar (KN) 2004 senesinde tek duvarlı karbon nanotüplerin saflaştırılması esnasında tesadüf eseri keşfedilmiş olmasına rağmen işlevselliği, teknik uygulamaları ve yeşil sentez yoluyla da üretilebildiği için dikkatleri üzerinde toplamıştır (Liu vd., 2020). KN'ler, 10 nm'den küçük boyutları olan ve en önemlisi floresan özellik gösteren küresel parçacıklar olarak bilinirler. Yeni bir karbon bazlı nanomalzeme türü olarak kabul edilen KN'ler yüksek biyouyumluluk, benzersiz optik özellikler, renkli fotoluminesans, yüksek stabilite, düşük üretim maliyeti, çevre dostu, atık ve artık hammaddelerin katma değeri yüksek maddelere dönüşümü, biyoaktif özellikleri, yüksek stabilite ve elektron hareketliliği vb. çeşitli fizikokimyasal ve biyoaktif özellikleri nedeniyle dikkat çekmektedir. O yıllarda KN'ler “floresans karbon” olarak isimlendirilmiştir. 2006 yılında bir kimyasal yüzey pasifleştirme ajanı kullanımıyla yüksek kuantum verimli floresans KN'leri sentezlemişlerdir. Bu çalışmayla birlikte bu nanoparçacıklara "karbon noktaları" ismi verilmiştir (Sun vd., 2006). KN'ler oksijen gruplarınca bol yüzeye sahip, çeşitli hacimsel miktarlarda grafitik ve turbostratik karbonun kombinasyonundan oluşan, nano ölçekli karakteristik boyutlarda yarı küresel yapıda

parçacıklardır (L. Li vd., 2019). KNP'lerin yapısı, grafit parçalar bulunduran bir karbon çekirdekten ve farklı yüzey fonksiyonel grupları bulunduran bir kabuktan meydana gelen bir çekirdek/kabuk (core/shell) modeli olarak kabul görmektedir. KN'lerin fotolüminesans işlevi bu çekirdek ve/veya yüzey kromofor gruplarının konjuge parçalarından ortaya çıkmaktadır. KNP yüzeyleri zengin miktarda nitrojen/oksijen temelli gruplar bulundurmaktadır ve yüzeyleri çeşitli fonksiyonel gruplar ile basit şekilde modifiye edilebilmektedir (Feng vd., 2020). Ağır metal içerikli yarı iletken kuantum noktalarının yüksek toksisitesi, insan sağlığı ve çevre üstündeki etkisi sonucu biyoloji ve çevresel uygulamalarda sınırlı şekilde kullanımı vardır. KN'lerin daha düşük toksisite, iyi biyoyoumluluk, zengin kimyasal stabilite ve mükemmel derecede biyolojik unsurlara sahip olduğu belirtilmiştir. Bu zengin kimyasal, fizikselve biyolojik unsurlarından ötürü KN'lerin sensörler, biyomedikal ürünler, optoelektronik, enerji cihazları, fotokataliz gibi birçok uygulamada zengin kullanım potansiyeline sahiptir (Khairul Anuar vd., 2021). KN'lerin keşfedilmesinden günümüze kadar pek çok bilim insanları tarafından KN'lerin fotofiziksel davranışının temelini anlamak, yüzeylerini modifiye edebilmek, farklı sentez metotları geliştirmek ve bunları diğer uygulamalarda kullanmak için birçok detaylı araştırmalar yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir.

2.2.1. Karbon Noktalarının Sentez Yöntemleri

Birçok araştırmacı tarafından KN'ler sentez metotları açısından detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Son birkaç senede, farklı kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip olan KN'lere ulaşmak için birçok yöntem geliştirilmiştir. Literatürdeki çalışmalar, sentez esnasında kullanılmış olan karbon kaynağı, sentez metodu ve yüzey pasivasyon ajanı gibi değişkenlerin KN'lerin yüzey niteliklerinin değiştirilerek fizikokimyasal ve yapısal niteliklerini değiştirdiğini göstermiştir. Fakat kullanılan hiçbir metot KN'lerin fizikokimyasal niteliklerini tam olarak kontrol edememektedir. Buna rağmen araştırmacılar, KN'lerin niteliklerini etkileyen bazı unsurları belirlemişlerdir. Örneğin, KN'lerin reaksiyon hali, parçacık büyüklüğü ve zamanı kontrol altına alınarak düzenlenebilmektedir. Aynı zamanda pasivasyon ajanlarının kullanımı ile belirlenen fonksiyonel gruplar ile KN'lerin yüzeyleri işlevsel hale getirilebilmiştir. Bundan dolayı, KN'lerin işlevselliğinde kesin bir şekilde kontrol sağlamak için etkili bir sentez becerisi belirlemek çok önemlidir (De &Karak, 2017). KN'ları genel olarak grafen kuantum noktaları (GKN), karbon kuantum noktaları (KKN) ve karbonize polimer noktaları (KPN) olarak sınıflandırılırlar. Genel olarak KN'lerin üretiminde 2

yöntemden yararlanılmaktadır. Yukarıdan aşağıya yaklaşımda, KN'ler, tek ve çok duvarlı karbon nanotüpler veya grafit tozu gibi başlangıç materyallerinden lazer ablasyon, ark deşarjı, elektrokimyasal oksidasyon metotları ile sentezlenme işlemi yapılmaktadır ve genel olarak sentez kimyasal ve fiziksel koşullar altında gerçekleştirilmektedir. Aşağıdan yukarıya yaklaşımda ise ultrasonik sentez, mikrodalga piroliz ve hidrotermal/solvotermal metotlar uygulanmaktadır. Aşağıdan yukarıya yaklaşımda KN'ler, biyokütle, yüzey pasifleştirme ajanları ve doğal, ucuz ve sürdürülebilir organik karbon kaynaklarından sentezlenmektedir. Son yıllarda yukarıdan aşağı yaklaşımına karşıt olarak aşağıdan yukarı yaklaşımında kullanılan termal ve hidrotermal sentez metotları, mikrodalga ve piroliz gibi yöntemler sentez reaksiyonunun daha kısa zamanda gerçekleşmesi, sentezlenmiş olan partikül büyüklüğünün daha küçük ve daha fazla kuantum işlevine sahip olması, ekonomik olarak uygun olması ve çevre dostu oluşu gibi faydaları sebebiyle tercih edilmektedir (Alas vd., 2020; De & Karak, 2017). Yeşil sentez yaklaşımı kullanılarak, toksik özellik göstermeyen karbon nanomalzemeleri (KN) doğal malzemelerden hızlı ve güvenli bir şekilde sentezlenebilmektedir. Bitkiler, mikroorganizmalar, mutfak atıkları, endüstriyel artıklar ve çeşitli kimyasallar gibi karbon kaynakları, KN'lerin sentezinde kullanılan çeşitli materyaller arasında sayılabilir (Himaja vd., 2014; S. Hu vd., 2016). Karbon içeren gıda, gıda ve endüstriyel atık ve/veya artıklarından doğal, toksik olmayan ve ekonomik yöntemlerle KN'ler sentezlenerek katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülebilir. Günümüzde, KN'ler tıbbi teşhis, biyoalgılama, biyogörüntüleme, fotokataliz, optoelektronik cihazlar, güneş pilleri ve LED'ler gibi farklı alanlarda başarıyla kullanılmaktadır. Ayrıca, son dönemde gıda paketlenmesi, gıda sahtekârlıklarının tespiti, ağır metaller, toksinler ve böcek ilaçlarının analizi, gıdalardaki oksidasyon kontrolü ve raf ömrünün artırılması gibi uygulamalarda da başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Şekil 2.1'de gıda artıklarından hidrotermal yöntem ile sentezlenen ve yeşil ışığa yapan KN'leri içeren solüsyon görülmektedir.



Şekil 2.1. Gıda artıklarından hidrotermal yöntem ile sentezlenen ve yeşil ışığa yapan KN'leri içeren solüsyon

2.2.2. Yeşil Sentez Yoluyla Karbon Noktaları Üretimi

Günümüz koşulları dikkate alındığında çevre dostu başta olmak üzere ve aynı zamanda maliyeti düşük biyolojik sentezleme yöntemleri öne çıkan tercihler arasındadır (Nagar & Devra, 2018). Bu türdeki biyolojik sentez yollarından biri olan yeşil sentez yöntemi hakkında bitkilerin materyallerinden, mikroorganizmalardan, proteinler ve enzimler gibi biyolojik malzemelerin kullanıldığı çevreyle dost bir yaklaşım türü olduğu söylenebilir. Mikroorganizmalar kullanılan sentezlerin kontaminasyon riskinin oldukça yüksek oluşu nedeniyle bitki materyalli yeşil sentez yöntemleri daha fazla tercih edilen yöntemdir. Yeşil sentez yöntemleri mikrodalga ışınım, hidrotermal yöntem, yeşil çözücüler ve biosentez kullanımı yapan tüketicilere hitap etmektedir. KN'ler ve karbon temelli diğer malzemeler ve yarı iletken yapıları kuantum noktalar arasında kıyas yapıldığında, pahalı prekürsörlere yada karışık ekipman işlem süreçlerine gereksinim duyulmadan yeşil sentez yöntemi kullanılmasıyla biyokütle ve biyo ilişkili atıklarında dahil olduğu doğal, maliyeti az ve bunların yanı sıra sürdürülebilirlik özelliği olan karbonlar içeren pekmez, kola, kahve gibi ve gıda atıkları gibi organik kaynaklar kullanılarak elde edilme avantajına sahiptir (Sharma vd., 2017). Farklı kimyasal ve fiziksel kimyasal özellikler içeren KN'lerin elde edilebilmesi için

farklı türde birçok strateji bulunmaktadır. Yeşil sentez yöntemi kullanılarak özellikle gıda kaynaklı atık ve artıkların kullanımı ile KN'lerin sentezi mümkün olabilmekte ve bu durum atık üretiminde düşüş sağlanmasına yardımcı olması yanında katma değeri yüksek ürünlere dönüşmesine de imkân sağlamaktadır.

2.2.3. Doğal Kaynaklı Karbon Noktaları

Karbon noktalarının (KN) sentezinde, çevre dostu ve uygun maliyetli yöntemler kullanılması için sürekli farklı kaynaklar araştırılmaktadır. Yenilenebilir doğal ürünlerin veya süreçlerin türevleri veya doğal olarak meydana gelen maddelerin KN'lerin sentezinde kullanılması son zamanların popüler konuları arasında değerlendirilmektedir. KN'ler, inorganik malzemeler arasında grafen, karbon siyahı, mum gibi karbon kaynaklarını ve organik malzemeler arasında polimerler, bitki özleri, gıda ve gıda atık veya artıklarını içeren çeşitli kaynaklardan sentezlenebilmektedir. Karbon noktaları (KN) doğal malzemelerden, tarımsal, evsel ve endüstriyel atık ve/veya artık uygun doğal karbon kaynaklarından ekonomik olarak üretilebilen doğal materyallerdendir. Ekonomik, kolay bulunabilir ve çevre dostu gibi avantajları hasebiyle organik gıda atık ve artıkları inorganik malzemelere göre daha fazla tercih edilmektedir (Alas vd., 2020). Gıda menşeli materyaller çevresel atıkları azaltma, uygun maliyet ve bol miktarda bulunabilme gibi avantajlar sunduğu için daha sürdürülebilir ve çevre dostu olarak kabul edilirler. Yapılan çalışmalarda KN'ler muz kabukları, kahve telvesi, portakal kabukları, fıstık kabukları, kavun kabukları vb. pek çok atık ve/veya artık doğal kaynaklardan meydana getirildiği gibi, süt, lahana, yumurta, un, ekmek vb. direk gıda kaynaklarından da sentezlenebilmektedir. Doğal gıda kaynaklarından ve gıda atık veya artıklarından elde edilen KN'ler Tablo2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Karbon noktaları sentezinde kullanılan gıda/atık/artıkları ve sentezlenme yöntemleri

Gıda Kaynağı	Sentezlenme Yöntemi	Referans	Gıda Kaynağı	Sentezlenme Yöntemi	Referans
Atık portakal kabuğu	Hidrotermal-Karbonizasyon yöntemi (200 °C)	(Chan & Liu, 2016)	Üzüm yaprağı	Hidrotermal yöntem (150°C)	(Saberi vd., 2018)
Jelatin	Hidrotermal yöntem (200 °C)	(Liang vd., 2013)	Mango kabuğu	Kalsinasyon (300°C)	(Jiao vd., 2019)
Sarımsak	Hidrotermal yöntem	(Zhao vd., 2015)	Kahve telvesi	Hidrotermal yöntem (220 °C)	(Hong & Yang, 2021)
Portakal suyu	Hidrotermal yöntem (120 °C)	(Sahu vd., 2012)	Karpuz kabuğu	Karbonizasyon (220°C)	(Zhou vd., 2012)
Elma suyu	Hidrotermal-Karbonizasyon yöntemi (150 °C)	(Mehta vd., 2015)	Un	Piroliz (470°C)	(Teng vd., 2014)
Bal	Otoklavla direk ısıtma (100 °C)	(X. Yang vd., 2014)	Soya fasulyesi	Hidrotermal-Karbonizasyon yöntemi (250-850 °C)	(S. Wang vd., 2020)
Süt	Hidrotermal yöntem (180 °C)	(L. Wang & Zhou, 2014)	Soğan kabuğu	Otoklavla direk ısıtma (120 °C)	(Bandi vd., 2016)
Arı polen atığı	Hidrotermal yöntem (180 °C)	(Shan vd., 2022)	Nar kabuğu atığı	Karbonizasyon (200°C)	(Qureshi vd., 2021)
Fıstık kabuğu	Karbonizasyon (220°C)	(Xue vd., 2016)	Yoğurt	Mikrodalga (800 W)	(Dinc & Kara, 2018)
Askorbik asit	Hidrotermal yöntem (140 °C)	(Chan & Liu, 2016)	Glukoz	Hidrotermal yöntem (200 °C)	(Z.-C. Yang vd., 2011)
Patates kabuğu	Hidrotermal yöntem (200 °C)	(Min vd., 2022)	Siyah çay	Hidrotermal yöntem (200 °C)	(Konwar vd., 2015)
Bayat ekmek	Hidrotermal yöntem (180 °C)	(Gokul Eswaran vd., 2022)	Şeker kamışı suyu	Hidrotermal yöntem (120 °C)	(Mehta vd., 2015)
Pirinç kabuğu	Hidrotermal yöntem ve Kalsinasyon	(Thongsai vd., 2019)	Sakkaroz	Mikrodalga (100 W)	(Chandra vd., t.y.)
Zerdeçal	Hidrotermal yöntem (200 °C)	(Ezati vd., 2022)	Sığır serum albümini	Hidrotermal yöntem	(Zhang vd., 2012)

2.2.4. Karbon Noktalarının Sitotoksitesi ve Biyoaktivitesi

Karbon noktalarının (KN) sitotoksite ve biyoaktivite özellikleri, bu malzemelerin biyomedikal ve gıda uygulamalarında kullanım potansiyelini belirlemek açısından önemli bir konudur. Boyutları 1 ila 100 nm arasında değişen nanomalzemelerin küçük boyutları, kuantum etkileri ve yüksek yüzey alanı/hacim oranı onlara benzersiz özellikler kazandırır. Bu özellikler gıda endüstrisi için çeşitli avantajlar sunmaktadır. Nanoteknoloji gıda endüstrisinde yeni sayılabilecek uygulamalar olup, kalitenin iyileştirilmesi, raf ömrünün uzatılması, maliyetin düşürülmesi, besleyici değerinin artırılması vb. alanlarda yararlanılmaktadır. Nanomalzemeler, doğal olarak oluşan, tesadüfen sentezlenen ve kasıtlı olarak üretilen olarak sınıflandırılır. Farklı kimyasal bileşimlere sahip üretilen nanoparçacıkların potansiyel faydalarından dolayı gıda ambalajı ve gıda güvenliği başta olmak üzere gıda endüstrisinde kullanım alanı bulmuştur. Nanoteknoloji gıdalarda aroma ve tekstür geliştirilebilmesinde, antimikrobiyal özellik kazandırmada, patojenlerin tespitinde, biyoaktif maddelerin taşınması ve kontrollü salınımında, fonksiyonel gıda geliştirme de kullanılmaktadır. Ayrıca gıda ambalaj materyallerinde akıllı özellik kazandıran biyosensör olarak kullanılabilir (Baysal, 2020). Nanoteknoloji artık gıda endüstrisinin birçok alanında yaygın olarak uygulanıyor olsa da, bazı nanoteknolojik uygulamaların gıdalarda toksik etkiler de oluşturduğu da deklere edilmektedir (Bouwmeester vd., 2009; Karimi vd., 2018). Gıdalarda nanopartiküllerin kullanımının insan ve çevre insan sağlığı üzerindeki öngörülemeyen etkileri nedeniyle hala tartışma konusudur. Bununla birlikte geçmişi çok da eskiye dayanmayan kolay, düşük maliyetli sentez stratejileri, toksisitesi düşük veya toksik olmayan yüksek ışık yayma kapasitesi ve yenilenebilir hammaddelerden yüksek performanslı olarak üretilen KN'ler dikkat çekmiştir. 2012 yılında (Sk vd., 2012) tarafından günlük gıda öğelerimizde doğal olarak bulunduğu ilk defa şeker karamelinde izole edilmiştir. Daha sonrasında ekmek, çay şekeri, bisküvi ve mısır gevreklerinde de KN'ler tespit edilmiştir. KN'ler fonksiyonel gruplara, lüminesans, UV koruması, antioksidan ve antibakteriyel özellikler gibi mükemmel ultrafonksiyonel özelliklere sahiptir (Konwar vd., 2015). KN'lerin günümüzde daha fazla tıbbi teşhis, biyoalgılama, biyogörüntüleme, fotokataliz, optoelektronik cihazlar, güneş pilleri, LED vb. malzemelerin geliştirilmesinde kullanılabilirliği gibi son zamanlarda gıda paketlemede, gıda sahtekârlıklarının, ağır metallerin, toksinlerin ve böcek ilaçlarının tespitinde, gıdalardaki fonksiyonel bileşiklerin tespitinde, yasaklı katkı maddelerinin tespitinde, gıda kalitesi ve güvenliğinin sağlanmasında, gıdalarda oksidasyonun kontrolünde ve raf ömrünün arttırılmasında da başarıyla uygulanmaktadır (Ezati vd., 2022; Konwar vd.,

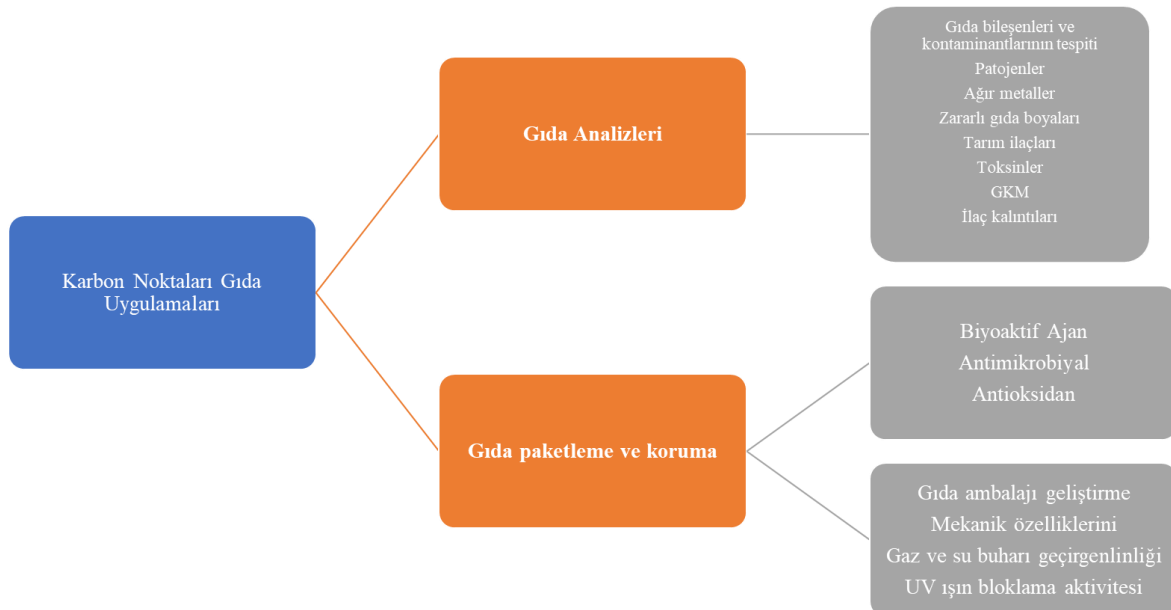
2015; Moradi vd., 2021; Qu vd., 2018; Shi vd., 2019). Gıda artık ve atıklardan kısaca yenilenebilir kaynakların KN'lerin sentezlenmesinde hidrotermal yöntem en yaygın kullanılan ucuz, toksisitesi düşük, çevre dostu bir uygulama olarak kabul edilmekte olup çalışmalar genellikle bu yöntem üzerinde yoğunlaşmaktadır (Shi vd., 2019). KN'lerin toksisite çalışmaları, yüksek stabilite, hidrofilik yapı ve biyouyumluluk gibi özelliklerinin, ağır metal temelli kuantum noktalarına kıyasla hem in vitro hem de in vivo koşullarda daha düşük sitotoksositeye sahip olduklarını göstermiştir (Alas vd., 2020). İnsan karaciğer hücre hattında bulunan HepG2 hücreleri 0.1–1mg/ml konsantrasyonundaki KN çözeltisine 24 saat maruz bırakılmış ve hücre metabolik aktivitesini değerlendirilmiştir. 0.5 mg/ml'den daha düşük konsantrasyonlarda KN çözeltisine maruz bırakılan hücrelerin %90 ila %100 arasında canlılığa sahip olduğu gözlemlenmiştir (Ray vd., 2009). KN'lerin H1299 kanser hücreleri üzerindeki sitotoksosite etkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışmada KN nanokomplekslerinin hücreler üzerinde ihmal edilebilir sitotoksositeye sahip olduğu deklere edilmiştir. Ayrıca, antikanser ilacı olan doksorubisin (Dox) yüklü KN nanokompleksleri, H1299 akciğer kanseri hücreleri üzerinde daha fazla sitotoksosite etkisi göstermiştir (C. Yang vd., 2015). Fareler ve sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen in vivo çalışmalarda ise fotoluminesan özellik gösteren KN'lerin akut toksisite, subakut toksisite ve genotoksositeye sebep olamadığı ve hayvanların ana organlarında herhangi bir anormallik veya lezyon saptanmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışma, KN'lerin potansiyel olarak tümör hücresi takibinde ve diğer uygulamalarda güvenli bir şekilde kullanılabileceğini ortaya koymuştur (K. Wang vd., 2013). Birçok çalışma, KN'lerin antibakteriyel, antioksidan ve anti-inflamatuar gibi biyoaktif özellikleri incelemiştir. Yüzey fonksiyonel grupları, yüzey yükü, şekil ve parçacık büyüklüğü gibi faktörler, KN'lerin antibakteriyel aktivitelerini etkileyen önemli faktörler olarak belirlenmiştir. Spermidinden sentezlenen KN'nin, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* ve *S. aureus*'a karşı güçlü antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca KN'nin minimal inhibitör konsantrasyonunun spermidinden ~2500 kat daha düşük olduğu ve bakteri zarını ciddi şekilde bozan yüksek pozitif yüklü süper-katyonik yapıya sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, in vitro sitotoksosite ve in vivo morfolojik ve fizyolojik kornea değişiklikleri gibi çalışmalarda da olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Jian vd., 2017). Travlou vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada nitrojen katkılı KN'lerin yüzeyindeki amid bağlarının ve amino gruplarının antibakteriyel özellikleri artırdığını ve bu grupların protik formlarının hücre zarındaki fosfolipidlerle elektrostatik etkileşime girerek bakteriyel ölüme neden olduğu rapor etmiştir (Travlou vd., 2018). Son 10 yıldaki çalışmalar KN'lerin reaktif oksijen

türlerinin (ROS) eliminasyonu için etkili antioksidanlar olarak kullanılabilmesi yönündedir. Hindistan cevizi kabuğundan sentezlenen KN'lerin, serbest radikaller üzerinde güçlü süpürücü etkiye sahip olduğunu bildirilmiştir (Chunduri vd., 2016). Üzüm ve çay artıkları kullanılarak sentezlenen KN'lerin antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, KN'lerin yağa antioksidan katkı maddesi olarak eklendiğinde daha yüksek oksidasyon kararlılığına sahip olduğunu raporlanmıştır (Murru vd., 2020). Bu çalışmalar, KN'lerin ROS eliminasyonunda ve antioksidan aktivitede potansiyel uygulamalarının olduğunu göstermektedir. Özellikle bitki atıklarından yeşil sentez yöntemi ile sentezlenen KN'lerin doğal bir antioksidan kaynağı olarak kullanımını gıda endüstrisi gibi alanlarda çevre dostu ve sürdürülebilir alternatif olarak kullanılabilmesini göstermektedir.

2.2.5. Karbon Noktalarının Aktif Gıda Paketlemede Kullanımı

Geçmişte çok da eskiye dayanmayan kolay, düşük maliyetli sentez stratejileri, toksisitesi düşük veya toksik olmayan yüksek ışık yayma kapasitesi ve yenilenebilir hammaddelerden yüksek performanslı olarak üretilen KN'ler üzerine dikkati çekmiştir. 2012 yılında (Sk vd., 2012) tarafından günlük gıda öğelerimizde doğal olarak bulunduğu ilk defa şeker karamelinde izole edilmiştir. Daha sonrasında ekmek, çay şekeri, bisküvi ve mısır gevreklerinde de KN'ler tespit edilmiştir. KN'ler fonksiyonel gruplara, lüminesans, UV koruması, antioksidan ve antibakteriyel özellikler gibi mükemmel ultrafonksiyonel özelliklere sahiptir (Konwar vd., 2015). KN'lerin günümüzde daha fazla tıbbi teşhis, biyoalgılama, biyogörüntüleme, fotokataliz, optoelektronik cihazlar, güneş pilleri, LED vb. malzemelerin geliştirilmesinde kullanılabildiği gibi son zamanlarda gıda paketlemede, gıda sahtekârlıklarının, ağır metallerin, toksinlerin ve böcek ilaçlarının tespitinde, gıdalardaki fonksiyonel bileşiklerin tespitinde, yasaklı katkı maddelerinin tespitinde, gıda kalitesi ve güvenliğinin sağlanmasında, gıdalarda oksidasyonun kontrolünde ve raf ömrünün arttırılmasında da başarıyla uygulanmaktadır (Ezati vd., 2022; Konwar vd., 2015; Moradi vd., 2021; Qu vd., 2018; Shi vd., 2019). Gıda artık ve atıklardan kısaca yenilenebilir kaynakların KN'lerin sentezlenmesinde hidrotermal yöntem en yaygın kullanılan ucuz, toksisitesi düşük, çevre dostu bir uygulama olarak kabul edilmekte olup çalışmalar genellikle bu yöntem üzerinde yoğunlaşmaktadır (Shi vd., 2019). Gıda uygulamalarında KN'lerin kullanımı genellikle 2 kategoride değerlendirilebilir. Bunlardan ilk kullanım alanı patojenlerin, ağır metallerin, zararlı gıda boyalarının, tarım ilaçlarının, toksinlerin, gıda katkı maddelerinin ve ilaç kalıntılarının tespiti gibi gıda analizleridir. İkincisi ise gıda ambalajlarına biyoaktif ajan olarak antioksidan ve

antimikrobiyal özellik kazandırmak yanında ambalaj materyallerine mekanik, gaz değişimi ve su buharı geçirgenliği, UV ışınlarını bloklama aktivitesi gibi özelliklerini geliştirmek için kullanılabilir (Moradi vd., 2021). Araştırmacılar, son dönemlerde KN'lerin gıda koruma alanındaki uygulama potansiyelini üzerine yoğunlaşmışlardır. Gıda paketlenme teknolojisinde KN'ler gibi aktif bileşenlerin entegrasyonu paketlenme teknolojisine büyük imkanlar sunar. Gıda ürününün raf ömrünü ve tazeliğini arttırmaya yönelik yeni teknolojiler geliştirmek, hızlı analiz için yöntemler ve araçlar tasarlamak, çevre dostu gıda ambalajları üretmek için farklı kaynaklardan elde edilen KN'ler kullanılmıştır. Gıda paketlenme sistemlerinde kullanılan polimer filmlerin termal stabilitesi, su bariyeri performansı ve mekanik performansı mekanik ambalaj malzemelerinde dikkat edilmesi gereken özelliklerdendir. KN'lerin polimer filmlerindeki su bariyeri, termal geliştirme etkileri, mekanik soya proteini izolatu (SPI), polivinilalkol (PVA), kitosan ve karboksimetil selüloz (CMC) dahil olmak üzere çeşitli ambalaj malzemelerinde gösterilmiştir (Zhao vd., 2022). Doğal bozunabilirlik, kolay bulunabilirlik, iyi biyoyumluluk özelliklerine sahip bir tür makromolekülü olan SPI, yenilebilir ambalajlar ve filmler üretmek için ideal bir malzemedir. Bunlarla beraber, aşırı su hassasiyetinden dolayı SPI temelli malzemelerin mekanik özelliklerini iyileştirmek ve su emilimini en aza indirmek gibi özelliklerini iyileştirmek amacıyla bazı araştırmacılar SPI filmlerinin performansını artırmak için SPI matrisine KN'leri eklemişlerdir. Döküm yöntemi ile soya fasulyesi proteini izolatu/karbon nanoparçacık (SPI/KNP) biyo-kompozit filmi hazırlandığı çalışmada KN katkısının SPI filminin mekanik özellikler, termal kararlılık, su buharı geçirgenliği gibi özellikleri dahil olmak üzere geliştirdiği gösterilmiştir (Li vd., 2016). Şekil 2.2'de Karbon noktalarının gıda endüstrisinde uygulama alanları şematize edilmiştir.



Şekil 2.2. Karbon noktalarının gıda endüstrisinde uygulama alanları

2.3. Gıda Ambalajlama Teknolojisi

Gıda ambalajı hem tüketicilerin hem de endüstrinin ihtiyaç ve beklentilerini karşılarken gıda ürünlerini de makul bir maliyetle koruyan sistemlerdir. Artan nüfus karşısında gıdalara olan talebin artması, uzun mesafeli ulaşım ihtiyacı ve nakliye giderlerinin yüksek olması da göz önüne alındığında paketlenmiş gıdaların bozulma belirtisi göstermeden ve kaliteden ödün vermeden muhafaza edilmesi önem arz etmektedir. Gıdaların ambalajlanmasında temel yaklaşım gıdanın üretimi tamamlandıktan sonra son tüketiciye ulaşınca kadar onu fiziksel, kimyasal ve biyolojik tehlikelere karşı korumaktır. Modern gıda ambalajlama teknolojisinin ilk temellerinin 19. yüzyılda Nicholas Appert tarafından konservenin icadı ile atıldığı kuvvetli varsayımlardandır. 20. yüzyılın başlarında gıdaların ambalajlanmasında Michael Owens tarafından kalay kaplı çelik kutular, cam şişeler ve tahta sandıkların yiyecek ve içecek dağıtımında kullanılması ve Robert Gair tarafından ambalajla ilgili diğer buluşlar ile sektör canlanmış ve gıda taşımacılığı gelişmiştir. Daha sonrasında balmumunun ve petrol bazlı malzemelerin kuru tahıllar ve bisküvilerin taşınmasında kullanılması ile hız kazanmıştır (Diana Twede, 2015). Gıda ambalajlamada esas gelişmeler I. ve II. Dünya Savaşları arasındaki ve sonraki dönemlerde olmuştur. Özellikle askeri gıdaları güvenli kılmak için alüminyum folyolar, elektrikle çalışan paketleme makineleri, polietilen, polivinil plastikler, aseptik paketleme, metal bira kutuları, fleksografik baskı ve esnek ambalajlama bu yenilikler arasında sayılabilir. Polipropilen, polyester ve etilen vinil alkol polimerlerindeki gelişmeler metal, cam ve karton ambalajlar yerini daha fazla ucuz olması, kullanım kolaylığı vb. sebeplerden dolayı plastik menşeli ambalajlara bırakmıştır. 20. yüzyılın sonlarına doğru ise aktif paketleme ve akıllı paketleme teknolojisinin gelişmesi ile gıda ambalajlama teknolojisi çağ atlamıştır. 21. yüzyılda ise ambalaj malzemeleri nanoteknoloji ile entegrasyon içerisine girmiş ve ambalaj malzemelerinin yapısal ve mekanik özellikleri iyileştirilmiştir (Brody vd., 2008).

Nanoteknolojinin gıda katkı maddesi ve gıda ambalaj endüstrisinde uygulama alanı bulması, kalitesinden ödün vermeden raf ömrü arttırılmış gıdaların üretilmesini mümkün kılmaktadır. Nanoteknolojiler daha az enerji ile daha küçük boyutta ihtiyaca uygun malzeme üretimini sağladığından birçok alanda başarı ile kullanılmaktadır (Adpekar vd., 2020). Nanoteknolojinin gıda ambalaj endüstrisinde kullanılması ile hem gıdaların raf ömrü

arttırılabilir hem de tüketicilerin ürünü henüz satın almadan önce tazeliği hakkında bilgilendirilmesi sağlanabilir (Silvestre vd., 2011).Günümüzde ambalaj sektörü, küresel endüstrinin önemli bir parçası haline gelmiş olup, gelişmiş ülkeler için Gayri Safi Milli Hasılanın %2'si gibi yüksek oranı tek başına oluşturmaktadır (Robertson, 2005). Bu orana gıda için kullanılan ambalajların katkısı yadsınamaz boyutlardadır. Bu bağlamda, özellikle son on yılda, gıdaların raf ömrünü uzatan, çevreye en az zarar veren ve düşük maliyetli ambalajlara olan talep artmıştır. Günümüzde gıda sektöründe yaygın olarak plastik, cam, karton, kâğıt ve teneke ambalajlar kullanılmaktadır. Söz konusu bu ambalajların avantajları ve dezavantajları olmakla birlikte ambalaj endüstrisi dinamiktir ve sürekli yeni arayışlar içerisindedir. Bununla birlikte ambalaj endüstrisinde petrol esaslı plastikler esneklik, dayanıklılık, geri dönüştürülebilir ve ucuz olması gibi özelliklerinden dolayı en çok tercih edilen malzemelerdendir. Ancak plastik menşeli ambalajlar doğada uzun sürede çözündüğünden dolayı büyük çevre kirliliği problemlerine neden olmaktadır. Hatta 2030 yılına kadar plastik atık sayısında iki kat artış öngörülmekle birlikte plastikler doğal ekosistemler için ciddi bir sınır ötesi tehdit haline gelmiştir (Patrício Silva vd., 2021). Aynı zamanda çevreye bu denli zararlı olan plastikler gıda ambalajı olarak kullanıldığında muhtemel migrasyon riskinden dolayı sağlık üzerinde de ciddi problemlere sebep olabilmektedir (Wang vd., 2021). Bir başka bakış açısıyla bakılacak olursa bir gıda ambalajı gıda israfının da önüne geçebilir. FDA (Food and Drug Administration)'nın 2011 yılı raporu göre her yıl yaklaşık 1.3 milyar ton gıda çöpe atılmakta ve bu israfın %20-30'unu satın alınan ambalajlı ürünler oluşturmaktadır. Aktif ve akıllı gıda ambalaj sistemlerinin gelişmesi ile gıda israfının azaltılması hedeflenmektedir (Dobrucka, 2013). İşte tam bu noktalarda ihtiyaca hizmet edebilecek yenilikler arasında doğal polimerler, nanokompozit ambalajlar, nanofiber ambalajlar, biyobozunur ambalajlar ile aktif ve akıllı ambalajlar sayılabilir. Sektörel ve tüketici ihtiyaçlarını karşılamak için son yıllarda, nano yapıdaki aktif bileşiklerin gıda ambalaj malzemelerine entegrasyonu söz konusudur (Senthil Muthu Kumar vd., 2019).

2.3.1. Aktif Gıda Ambalajlama ve Uygulamaları

Geleneksel gıda ambalajları, çevrenin gıda üzerindeki olumsuz etkilerini önlemek için pasif bir bariyer olarak tanımlanmaktadır. Geleneksel ambalajlar, gıda ve ambalaj-çevre arasındaki etkileşimi mümkün olduğunca azaltmak için tasarlanmış olsa da, aktif gıda paketleri gıdanın güvenliğini ve kalitesini korumayı amaçlamaktadır (Smith vd., 2018). Aktif ambalajların odak noktası, ambalaj içindeki gıdanın çevre koşullarını değiştirerek raf ömrünü bir aktif bileşen

kullanarak artırmaktır. Bu aktif bileşenler, gıdanın doğal bozulma süreçlerini yavaşlatarak ve kalitesini uzun süre koruyarak tüketicilere daha taze ve uzun süreli kullanım olanağı sunar. İçinde bulunan ürünün tazelik, raf ömrü ve garantisi koruma amacıyla kullanılan, özel üretim koşullarına sahip olan ambalaj türüne aktif ambalaj denir. Aktif ambalaj, bazı teknolojilerin sayesinde ürünlerin üzerinde bulunan farklı değerlendirme ve özellikleri yerine getirme işlemi yapabilir. Aktif ambalaj olarak adlandırılan bu tür özel ambalajlar çoğunlukla kozmetik, ilaç ve gıda gibi hassas şekilde korunması gereken ürünlerde kullanılarak en güvenli şekilde kullanıcılarına ulaştırılmasını sağlar. Yapı ve işlevlerine göre çeşitleri olabilir. Örneğin oksijen absorpsiyonu olan ambalajlar gıda ve oksijenin etkileşimini dengeleyerek ürünlerin raf ömürlerini uzatır. Nem absorblu ambalajlar ise neme maruz kalınmasını engelleyerek bozulma ihtimallerini en aza indirger. Aromatik koruma ambalajları ürünlerin içeriğinde bulunan aromaların dağılmasını önleyerek içerisinde kalmasını sağlar. Antibakteriyel ambalajlar mikroorganizma gibi canlıların üreme durumunu engeller. Sıcaklığın kontrolünü yapabilme özelliği olan ambalajlar ürünlere dair sıcaklıkların hassasiyetlerini korumak, taşınırken ya da depolanırken uygun koşullar sağlamaktadır (Vermeiren vd., 1999; Wyrwa & Barska, 2017; Yildirim vd., 2018). Gıda perakende sektörünün hızla büyümesi daha uzun süre raf ömrüne sahip gıda ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. Yakın bir geçmişe kadar gıdaların raf ömrünü uzatmak için en etkili yöntemi koruyucu gıda katkı maddelerinin kullanılması oluştururken bilinçli tüketicilerin koruyucu içeren gıdalardan uzak durması nedeniyle sektörde yeni alternatif arayışlarına zemin hazırlamıştır. Son yirmi senedeki gelişmeler tam bu noktada geliştirilen aktif gıda ambalajlamanın en iyi seçeneklerden birisi olduğunu göstermektedir.

Geleneksel olarak kullanılan gıda ambalaj malzemelerinin tersine, aktif gıda ambalaj sistemleri gıdayı sadece kimyasal, fiziksel ve biyolojik tehditlere karşı korumakla kalmaz aynı zamanda oksijen tutucu, etilen emici, tat ve koku tutucu nem emici, antioksidan, antimikrobiyal vb. fazladan birçok özellik sağlaması ile de gıda ambalajlama endüstrisine yenilikler sunar (Özdemir & Floros, 2004). Aktif ambalajlama genel çerçeveye salıcı ve tutucu sistemler olarak iki kategoride değerlendirilmektedir (López-de-Dicastillo vd., 2010). Aktif ambalajlamada kullanılmakta olan salıcı ve tutucu sistemlerin kullanımı tamamıyla gıdanın niceliğine ve niteliğine bağlı olarak değişmektedir. Burada temel ilke ya ortamın salıcı/tutucu yapılar ile modifikasyonuna ya da bir veya daha fazla biçimde fonksiyonel bileşenin gıda ambalaj matrisine gömülmesi ya da enkapsüle edilmesiyle biyoaktif özelliklerini ambalaj materyalinde göstermesi ve bundan ötürü gıdanın raf ömrünün kaliteden taviz

vermeden arttırılmasına dayanmaktadır. Gıdaların mikroorganizmaların saldırılarına ve oksidasyona karşı korunması aktif ve akıllı ambalajlama uygulamasından en çok istenilen unsurlar olmakla beraber gıdaların son tüketim tarihine kadar hakiki özelliklerini koruması için farklı metotlardan da yararlanılmaktadır. Akıllı ambalajlama endüstrisi yeniliklere açık olup bu alandaki gelişmeler hız kesmeden devam etmektedir.

2.3.2. Biyopolimer Bazlı Filmler ve Uygulamaları

Bugün dünya genelinde yılda yaklaşık 200 milyon ton olan düzinelerce farklı sentetik plastik üretilmektedir. Bunun 12 milyon tonun üzerindeki kısmını tek başına ambalaj endüstrisi karşılamaktadır (Zhang vd., 2002). Sentetik petrokimya bazlı polimerler, çeşitli ambalaj malzemelerinde yaygın olarak kullanılmasına rağmen, biyolojik olarak parçalanabilme problemleri nedeniyle kullanımdan sonra önemli bir atık kaynağı haline gelmektedirler. Bu sorunun bertarafı için biyobozunur, biyoyumlu, kompostlanabilir, çevre dostu, yenilenebilir, sürdürülebilir, yeşil ve biyopolimerler gibi kelimeler son zamanlarda ambalajlarda en sık aranan anahtar kelimelerdendir. Tüketicilerin yüksek kaliteli gıdalara olan talebinin artması ve sınırlı doğal kaynaklar ve çevre ile ilgili endişeler ile, ürün kalitesini koruyabilen ve atık imha sorunlarını azaltabilen yenilebilir veya biyolojik olarak parçalanabilen ambalaj malzemeleri üretmek için yenilenebilir kaynakların kullanımı araştırılmaktadır. Buna göre, bitki ve hayvan kaynaklarından elde edilen polisakkaritler, proteinler, lipitler ve bunların kompozitleri gibi çeşitli yenilenebilir biyopolimerler, biyolojik olarak parçalanamayan petrokimyasal bazlı muadillerinin yerini alacak yenilebilir/biyobozunur ambalaj malzemelerinin geliştirilmesi için araştırılmaktadır (Cuq vd., 1998; Guilbert vd., 1996). Biyopolimer esaslı ambalaj malzemeleri, gıda kalitesini iyileştirmede ve üründe mikrobiyal gelişmeyi en aza indirerek raf ömrünü uzatmada ambalaj malzemesi olarak bazı faydalı özelliklere sahiptir. Sadece neme, su buharına, gazlara ve çözünen maddelere karşı bariyer görevi görmezler, aynı zamanda bazı aktif maddelerin taşıyıcılar ile gıdaların kalitesini iyileştirir ve raf ömrünü uzatırlar. Biyopolimer filmlere antioksidan, antifungal ve antibakteriyel vb. özellikler kazandırılarak yapılan başarılı çalışmalar literatüre kaydedilmiştir (Rhim & Ng, 2007). Doğal biyopolimerler, sentetik polimerlere göre biyolojik olarak parçalanabilir ve yenilebilir oldukları kadar yenilebilir olmaları bakımından da avantajlıdır. Bununla birlikte, bu filmlerin nispeten zayıf mekanik ve su buharı bariyeri özellikleri, endüstriyel kullanımları için büyük bir sınırlamaya neden olmaktadır. Protein ve polisakkarit filmler genellikle düşük ila orta bağıl nemde oksijene karşı iyi bariyerlerdir ve iyi mekanik

özelliklere sahiptir; ancak hidrofilik yapıları nedeniyle su buharına karşı bariyerleri zayıftır. Araştırma çabaları, mekanik ve su buharı bariyer özelliklerini iyileştirmek için doğal biyopolimer bazlı filmlerin özellik modifikasyonuna odaklanmıştır (Avena-Bustillos & Krochta, 1993; Gontard vd., 1994).

2.3.3. Solvent Dökme Yöntemi ile Film Üretimi

Polimerik kaplamalar, substrat üzerine polimer-çözücü çözeltisi uygulanarak yapılmaktadır. İnce film polimerik kaplamalar, ince film kaplama teknolojisi kullanılarak yapılır ve sentetik elyaflarda, fotoğraf filmlerinde, manyetik ortamlarda vb. kullanılır. Polimer filmleri dökmek için birkaç yöntem vardır. Film hazırlamada genel olarak kullanılan en eski ve daha az maliyetli uygulanan yöntemlerden birisi solvent dökme yöntemidir. Bu yöntemde bir polimer, makul minimum katı içeriği ve viskozitesi olan kararlı bir çözelti oluşturan uçucu bir çözücü içinde çözülür. Bu çözelti ya kalıba dökülür ya da altlık üzerine bir fırça ile uygulanır ve ardından fazla çözelti kazınır. Alt tabaka, toplu işlem durumunda sabit olabilir veya sürekli işlem durumunda sabit bir hızda hareket edebilir. Islak kaplama, çok bölgesel kurutucularda kurutulur ve alt tabakadan çıkarılır. Düşük viskoziteli homojen çözelti ve kaplamanın çıkarılması, yardımcı çözücü sistemleri, aşırı basınçta çözünme, polimerlerin veya kopolimerlerin özel moleküler ağırlık dağılımının kullanımı, plastikleştiriciler ve ayırıcı maddeler gibi katkı maddeleri vb. kullanılarak kontrol edilebilir. Bu teknik, mühendislik plastiği, optik filmler, tıbbi filmler ve elektronik uygulamalar için sac şekillendirme üretiminde kullanılır. Şu anda solvent kaplama teknolojisi, son derece yüksek kalite gereksinimleri olan filmlerin üretimi için çok çekici hale geliyor. Bu tekniğin avantajları, tekdüze kalınlık dağılımı, maksimum optik saflık ve son derece düşük pusluluktur. Optik yönelim neredeyse izotropiktir ve filmler mükemmel düzlüğe ve boyutsal kararlılığa sahiptir (Arya, 2014; Siemann, 2005).

2.3.4. Nanoteknoloji ve Gıda Ambalajlama Endüstrisinde Kullanımı

Nanoteknoloji boyutları 100 nm ve daha az maddelerden yeni sistemler veya yapılar oluşturma ve bu sistemlerin manipülasyonu, karakterizasyonu ve analiz etme hususlarını esas alır. Nano teriminin kaynağı uzunluk biriminden gelmekte ve nanometre metrenin milyarda birini ifade etmektedir. Bu boyuttaki küçük yapıların eşsiz ve yeni fonksiyonel işlevler taşıdıklarının ortaya çıkarılması ile nanoteknolojiye olan ilgi ve bu araştırma çerçevesinde

yürütülen çalışmalar son zamanlarda giderek hız kazanmaktadır. Bu boyuttaki küçük malzemelerin, daha büyük malzemelerle kıyaslandıklarında farklı niteliklere sahip oldukları gözlenmektedir. Kimyasal reaktivite, fiziksel güç, elektrik iletkenliği, optik etkiler ve manyetizma gözlemlenen farklılıklar arasındadır (Ray vd., 2009). Ambalaj üreticileri ürünü daha uzun zaman boyunca taze tutmak üstünde çalışırken, tüketicilerin beklentisi ise ürünün tazeliğini daha paketi açmadan görmektir. Günümüzde yürütülen çalışmalar her iki unsurunda nanoteknoloji ile gerçekleştirilebileceğini göstermektedir. Nanoteknolojinin pek çok uygulaması vardır. Günümüze kadar yapılan nanoteknoloji araştırmalarının birçoğu otomasyon, ilaç, elektronik sektöründe olmuştur. Bu sektörlerden ortaya çıkan bilgilerle nanoteknolojiyi çevrenin korunması, gıda güvenliğindeki uygulamalar ve nutrientlerin dağıtımını gibi tarım ve gıda ürünlerinde kullanılmasına uyarlamak mümkündür. Nanoteknoloji bu alandaki araştırmacılara ambalaj materyalinin yapısını molekül seviyede değiştirilebilme şansı sunmaktadır. Araştırmacılar molekülleri yeni baştan tasarlayarak birçok özelliği bir araya getirebilmektedirler. Farklı sıvı ve gaz geçirgenlikleri ortaya çıkarılabilmektedir. Nano parçacıkların ilave edilmesi ile gıdalarda alev ve ışığa direnç, güçlü ısıl ve mekanik performans ve gazlara yönelik yüksek bariyer işlevi sağlanmaktadır. Gıdanın tazeliğini korumak ve donmuş gıdanın daha önceden çözünüp çözünmediğini görebilmek bu ambalajlar sayesinde mümkün kılınmıştır. Nano-yapılandırılmış malzemeler ile antimikrobiyal, oksijen absorblayıcı, ve gaz geçirgenliğine sahip filmler oluşturulabilmektedir. Ambalajın içinde bulunan kirli havayı dışarı çıkarmak için nano-kompozit film tabakası kullanılmaktadır. Nano-malzeme ile yapılandırılmış polimerler radyasyon kürlenme ile birleştiklerinde çok dayanıklı ve güçlü filmler ortaya çıkmaktadır (Kaya-Celiker & Mallikarjunan, 2012). Nanoteknoloji gıda ambalajlamada; aktif özellikte ve akıllı nano ambalajlar, nanokompozit ambalaj malzemeleri ve biyobozunur nanokompozit ambalaj malzemeleri olmak üzere 3 farklı sınıfta değerlendirilmektedir.

2.3.5. Gıda Atıklarının Değerlendirilmesi ve Biyobozunur Ambalaj Üretimi

Kabuk, posa, kabuk, tohumlar, küspe, kabuklar, küspe vb. gıda atıkları kolayca bulunmakta, atık veya artık olarak değerlendirilmekte olup, toplam gıda ağırlığının yaklaşık %30-50'sini oluşturmaktadır. Gıda atıklarının faydası, bileşimi ve değerli bileşiklerin ekstraksiyon maliyeti ile değerlendirilebilir. Atık ürünler, paketlenme sisteminin antioksidan ve antimikrobiyal potansiyeline katkıda bulunabilecek flavonoller, polifenoller ve tanenler gibi biyoaktif bileşiklerden oluşabilir (Jönsson & Martín, 2016). Antosiyaninler, kurkumin,

betalainler, tanenler, klorofil, brazilin ve diğer fenolik bileşikler gibi birçok bileşik gıda atıklarından ekstrakte edilebilir. Bu bileşikler, biyolojik olarak parçalanabilen bir polimer matris ile karıştırıldığında bir gösterge görevi görür ve önemli etkiler sağlamaktadır. Tarımsal ve endüstriyel gıda atıklarından elde edilen polifenoller dikkat çekicidir. Ayrıca, başka türlü ekonomik değeri olmayan gıda atıklarının katma değeri veya değerlendirilmesi olasılığı, bunu uygun maliyetli bir seçenek haline getirmektedir. Bu filmler ayrıca çevre dostu ve sürdürülebilir bir ambalaj malzemesi olarak da sunulabilir. Son araştırma çalışmalarında biyopolimerik filmlere dahil edilen gıda atıklarından biyoaktif polifenolik pigmentler kullanımından başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Bhargava vd., 2020).

2.4. Kombucha Kültürü ve Filmlerin Üretiminde Kullanılan Materyaller

2.4.1. Kombucha Kültürü Üretimi

Kombucha, asetik asit bakterilerini ve mayaları simbiyotik olarak beraber bulunduran kombucha kültürünün, karbon kaynağı (şeker) içeren çayı mayalamasıyla neticesinde oluşmaktadır. Bu sebeple şeker ve çay kombucha üretiminde kullanılan ana bileşenlerdir. Geleneksel olarak ve çalışma kapsamında siyah çay kullanıldığı için siyah çay literatür özeti olarak sunulmuştur. Ancak bununla birlikte yeşil çay başta olmak üzere diğer çay çeşitlerinden de üretilebilmektedir.

2.4.1.1 Siyah Çay

Çay, dünyadaki en popüler alkolsüz içeceklerden birisi olup, *Camellia sinensis* bitki yaprakları kullanılarak üretilmektedir (Yang & Hong, 2013). Temel çay türleri görünüm, aroma, tat ve renk gibi farklı kalite özelliklerine sahiptir. Siyah çayın üretim süreci, çay polifenolik bileşiklerinin çay yapraklarında doğal olarak yapısında bulunan polifenol oksidaz tarafından oksitlenmesi ile devam etmektedir. Siyah çayın ayırt edici tadı, acılık, burukluk, tatlılık, malt tadı, yeşil/çimsi tat, karamel benzeri ve saman benzeri özellikler gibi çeşitli özelliklerin birleşiminden kaynaklanmaktadır (Alasalvar vd., 2012). Siyah çaydaki buruk tat, kateşinler, theaflavinler ve flavonol glikozitlerden kaynaklanır (Scharbert vd., 2004). Düzenli çay alımı, koroner kalp hastalığı, ateroskleroz, azaltılmış mutajenite ve inflamasyon riskini düşürmeye katkıda bulunabilecek in vivo antioksidan durumu ile ilişkilidir (Kris-Etherton & Keen, 2002). Çay polifenolleri, çay bileşenlerinin en önemli grubudur ve antioksidan,

antikanserojenik ve antiaterosklerotik dahil olmak üzere çok çeşitli farmasötik özelliklere sahiptir (Atoui vd., 2005).

2.4.1.2. Sakkaroz

Fermente gıdaların üretimi, insanlık tarihindeki en eski gıda işleme tekniklerinden birisidir. Medeniyetin başlangıcından bu yana, insanlar süt, et ve sebzeler gibi çeşitli gıdaları muhafaza etmek ve besin değerini artırmak amacıyla fermantasyon yöntemlerini kullanmışlardır. Ancak, mikrobiyolojinin gelişimi ve 1850'lerden itibaren günlük hayatta yaygın kullanımı, fermantasyonun biyolojik temelini anlaşılmasını sağlamıştır. Bu sayede, bakteri, maya ve küflerin fermantasyon süreçlerindeki temel rolü anlaşılmış ve sonuç olarak daha kontrollü ve etkili fermantasyonlar elde edilmiştir. Gıda substratlarının fermantasyonu, asıl amacı gıdaların korunmasını sağlamak olan bir yöntemdir. Gıdaların fermantasyon yoluyla muhafaza edilmesi, genellikle karbonhidratların ve ilgili türevlerin yükseltgenmesi prensibine dayanır. Fermantasyon sonucunda ortaya çıkan nihai ürünler genellikle asit, alkol ve karbon dioksit gibi maddelerdir. Bu ürünler, gıdalarda bozulmaya neden olan mikroorganizmaların büyümesini kontrol eder ve aynı zamanda oksidasyonun sınırlı düzeyde gerçekleşmesini sağlar (Caplice & Fitzgerald, 1999). Şeker içerikli malzemeler (şeker kamışı, şeker pancarı, tatlı sorgum, keçiyoynuzu vb.), hidrolize edilebilir polisakkaritler (nişasta gibi) ve lignoselülozik maddeler de dahil olmak üzere katma değeri yüksek ürünlerin üretiminde birçok hammadde türü karbon kaynağı olarak kullanılarak fermantasyonu hızlandırır. "Sakkaroz, bitkilerde en yaygın bulunan ve temel olarak karbonhidratların bir türü olan disakkarittir. Bir sakkaroz molekülü, bir adet β -D-Fruktoz ve bir adet α -D-Glukoz bileşiğinden oluşur. Bu iki bileşik, α , β -1-2 glikozidik bağ ile birbirine bağlanmıştır. Sakkarozun oluşumu sırasında, bu bileşiklerin birleşimiyle bir su molekülü açığa çıkar. Sakkaroz, sükröz veya çay şekeri olarak da bilinir ve genellikle tatlandırıcı olarak kullanılır. Şeker kamışı, şeker pancarı ve diğer bitkilerde bol miktarda bulunur. Sakkaroz, kimyasal formülü $C_{12}H_{22}O_{11}$ olan bir disakkarittir. Sakkarozun tatlılığı ve kolaylıkla çözünmesi nedeniyle birçok gıda ve içeceğin ana bileşenlerinden biri olarak kullanılır. Aynı zamanda şekerin vücutta enerji kaynağı olarak kullanılması ve fermente ürünlerin üretiminde karbon kaynağı kullanılması açısından da önemlidir (Tarhan, 2017).

2.4.2. Filmlerin Üretimi

2.4.2.1. Sodyum Aljinat

Sodyum aljinat, kahverengi alglerden ekstrakte edilebilen doğal bir polisakkarittir. Sodyum aljinat, yüksek biyo-uyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilir ve yenilenebilir gibi bazı üstün özelliklere sahiptir. Ayrıca, bol miktarda bulunan hidroksil ve karboksil grupları, ağır metal iyonları için yüksek adsorpsiyon afinitesine sahiptir. Bununla birlikte, sodyum aljinatın mekanik mukavemeti, kararlılığı, ısı direnci nispeten düşüktür (Gao vd., 2017). FDA (ABD Gıda ve İlaç İdaresi), aljinatları GRAS (genel olarak güvenli olarak kabul edilir) olarak sınıflandırılan maddeler olarak tanırlar ve EFSA (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi), aljinat ve ilgili tuzların kuantum statis dozlarında kullanımına izin vermiştir (Heydari vd., 2020). Aljinatlar, aljinik asidin sodyum, kalsiyum ve magnezyum tuzları şeklinde buldukları kahverengi alglerin (*Laminaria digitata/Ascophyllum nodosum*) hücre duvarlarından izole edilebildiği gibi mikroorganizmalar tarafından da sentezlenebilirler. Aljinat, lineer, anyonik, suda çözünür bir polisakkarittir ve en yararlı özelliği - düşük çözünürlüğe sahip güçlü jeller veya polimerler oluşturmasıdır (Gheorghita (Puscaselu) vd., 2020). Bileşimleri nedeniyle aljinatlar, lifli yapıya (katı halde) sahip güçlü filmler oluşturabilir ve geleneksel malzemelerle karşılaştırılabilir özelliklere sahip iyi filmojenik malzemeler olarak kabul edilirler. Sodyum aljinat, toksik olmayan, biyolojik olarak parçalanabilen, biyolojik olarak uyumlu ve ucuz bir hidrokolloidlerdendir. Gıda endüstrisinde, porsiyonlu ürünler için bir ambalaj malzemesi olarak etin dehidrasyonunu sınırlayan, jel oluşumunda bir koyulaştırıcı ajan olarak ve içecek endüstrisinde bir kolloidal stabilize edici ajan olarak birçok uygulamalarda kullanılmaktadır. Tüm aljinat türlerinden sodyum aljinat, belirli spesifik özelliklere sahip filmler oluşturabilir: direnç, parlaklık, tatsızlık veya kokusuzluk, esneklik, suda çözünürlük ve O₂ veya yağlara karşı düşük geçirgenlik vb. özelliklere sahiptir (Majdinasab vd., 2018).

2.4.2.2. Karboksimetilselüloz (CMC)

Selüloz, en bol bulunan doğal biyopolimerlerden birisidir. Son yıllarda kâğıt, tekstil, gıda, ilaç ve veterinerlik endüstrileri tarafından yoğun kullanımının yanı sıra selüloz, petrol türevlerinin yerine de giderek daha fazla kullanılmaya başlandı (Lakshmi vd., 2017). Aslında, selüloz türevleri iyi bariyer özellikleri ve geri dönüştürülebilirlikleri ve biyolojik olarak parçalanabilirlikleri nedeniyle gıda endüstrisinde artan bir ilgi uyandırmıştır (Lavoine vd., 2014). Bununla birlikte, geleneksel plastiklerin yerine doğal polimerlerin kullanımını teşvik eden yeni nesil ambalajlara eğilim vardır. Nanoselüloz bitkilerden, bakterilerden veya

tunikatlardan elde edilebilir, daha yaygın olarak pamuk, pamuk linterleri, kenaf lifi, buğday samanı ve ağaç lifi gibi bitkilerden elde edilir (Csiszár & Nagy, 2017). Karboksimetilselüloz (CMC), selüloz zincirinde karboksimetil (CH_2COOH) grupları ve hidroksil grupları içeren suda çözünür bir selüloz türevidir. Fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri sayesinde CMC, oksijen ve karbondioksit bariyeri malzemesi olarak kullanılmıştır. CMC, nispeten düşük konsantrasyonda yüksek viskozitesi nedeniyle gıdalara stabilite ve kalınlık sağlamak için bir gıda katkı maddesi olarak kullanılır. Ayrıca, biyobozunurluğu ve biyouyumluluğu nedeniyle biyobozunur filmler hazırlamak için selüloz türevleri arasında yaygın olarak kullanılmaktadır CMC, yüksek optik şeffaflık ve yüksek kimyasal stabilite ile iyi film oluşturma özelliklerine sahiptir (Fernández-Santos vd., 2022)

2.4.2.3. Gliserol

Plastikleştiriciler, ambalaj film üretimi için gerekli malzemelerdir, çünkü sadece polisakkarit içeren filmler çok sert, kırılğan ve esnek değildirler. Film hazırlamada yaygın olarak plastikleştiriciler olarak kullanılan gliserol ve sorbitol, moleküller arasındaki hidrojen bağı azaltarak ve polisakkaritlerin polimer ağına interkalasyonları üzerine polimerler arasındaki moleküller arası aralığı artırarak filmlerinin esnekliğini geliştirir (Lim vd., 2020). Gliseroller lipid bazlı ambalaj malzemeleri geliştirilmesi için gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (Meerasri & Sothornvit, 2020). Plastikleştiriciler arasında, gliserol, suda çözünür, polar, uçucu olmayan, düşük moleküler ağırlık ve her karbondaki bir hidroksil grubu gibi davrandığı veya niteliklere sahip olduğu için biyopolimerlerde en çok kullanılanlardan birisidir. Kapsamlı araştırmalarda farklı polimer bazlı filmlerde gliserol ilavesi ile gerilme mukavemetindeki azalmanın, kopmada uzamadaki artışın ve kalınlığın daha belirgin olduğunu gözlemlenmiştir (Gonçalves vd., 2019).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

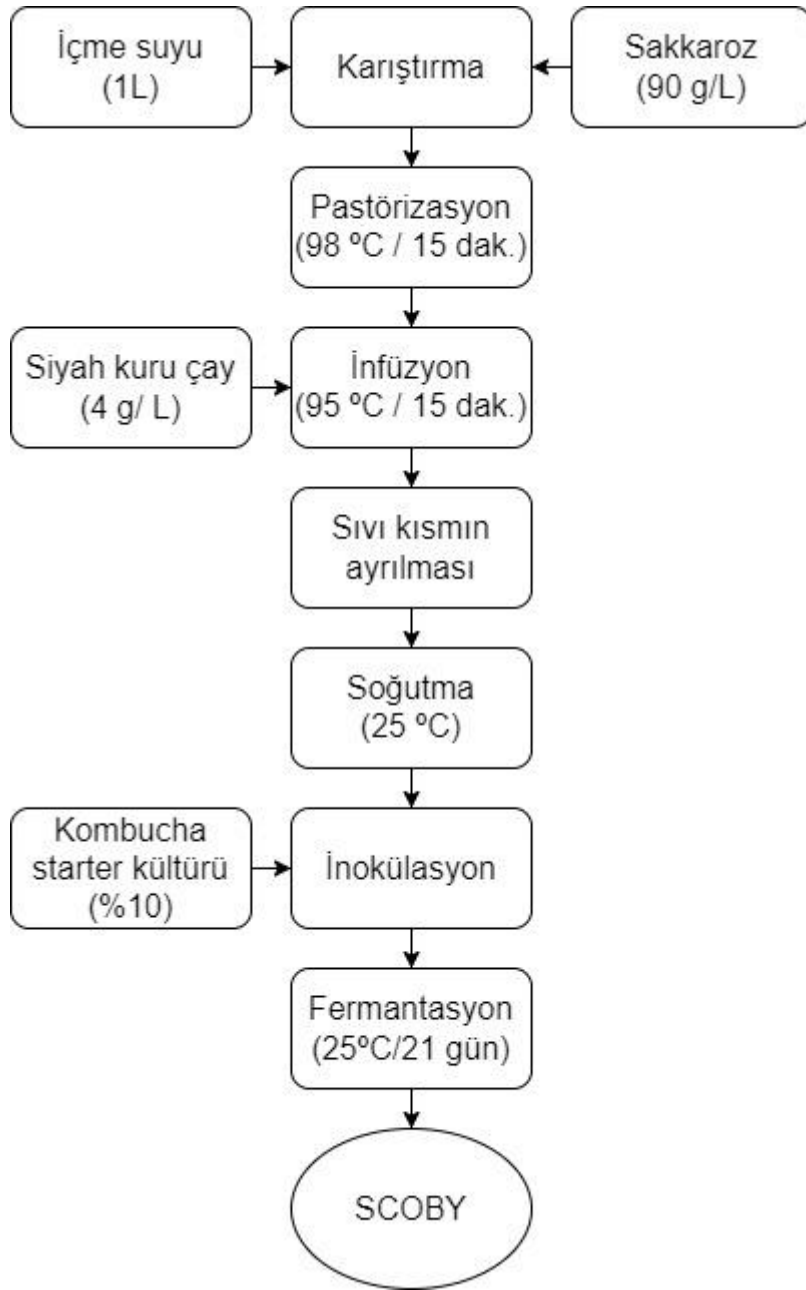
3.1. Materyal

Siyah çay (Doğuş, Türkiye) ve kristalize şeker (sakkaroz) Yozgat ilindeki tedarikçilerden satın alınmıştır. Kombucha başlangıç kültürü, Yozgat Bozok Üniversitesi, Boğazlıyan Meslek Yüksekokulu (Yozgat, Türkiye)'nden temin edilmiştir. Filmlerin üretiminde kullanılan sodyum aljinat Smart Kimya Ltd. Şti (İzmir/Türkiye)'den ve karboksimetil selüloz ise Kayseri şeker A.Ş (Kayseri/Türkiye)'den tedarik edilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar, aksi belirtilmedikçe Merck (Darmstadt, Almanya)'den satın alınmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Fermantasyon ve SCOBY Üretimi

Karbon noktalarının üretimi için gerekli olan SCOBY üretimi için stok kombucha kültürü kullanılmıştır. Bu kültür, 4 g/L siyah çay ve 90 g/L şeker içeren bir karışım kullanılarak elde edilmiştir. Önceden belirlenen siyah çay ve şeker miktarları karıştırılarak 90 g sükröz 1 litre kaynar suda tamamen eritilmiştir. Ayrıca, 4 g siyah çay çelik demleme süzgecine konulmuş ve 1 litre kaynar su ile 20 dakika boyunca demlenmiştir. Demleme süzgeci çıkarıldıktan sonra siyah çay 25 °C'ye soğutulmuştur. Elde edilen siyah çay, %10'luk başlangıç kombucha sıvı kültürü ile inoküle edilmiştir. Bu başlangıç kültürü, daha önce üretilen sağlıklı kombucha kültüründen alınarak kullanılmıştır. İnokülasyon işlemi tamamlandıktan sonra, karışım filtreli cam kavanozlara dökülmüş ve karanlık oda koşullarında (25±2 °C) 21 gün boyunca inkübe edilmiştir. 21 günün sonunda, kombucha sıvı kültürünün yüzeyinde oluşan SCOBY adı verilen jelatinimsi tabaka kavanozdan dikkatlice alınmıştır. Alınan SCOBY, distile su ile yıkanarak temizlenmiştir. Yıkama işlemi sırasında durulama suyunun pH değeri 7.0±0.2 aralığında ayarlanmıştır. Yıkanan SCOBY biyokütleleri, karbon noktalarının üretiminde kullanılmak üzere inaktive edilmiştir. İnaktive etme işlemi, SCOBY'de bulunan canlı mikroorganizmaların etkinliğini durdurmak için 2 saat boyunca 105 °C'lik bir etüvde gerçekleştirilmiştir. Bu işlem, SCOBY'nin yapısal özelliklerini koruyarak istenmeyen mikroorganizmaların yok edilmesini sağlamıştır. Sonuç olarak, yukarıda açıklanan yöntemler kullanılarak elde edilen inaktive edilmiş SCOBY biyokütlesi, karbon noktalarının üretiminde kullanılmak üzere uygun hale getirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. SCOBY üretimi için akış diyagramı

3.2.2. Karbon Noktalarının Sentezi

Atık bazlı karbon noktalarının sentezi, Roy vd., (2021) tarafından geliştirilen hidrotermal yöntem kullanılarak gerçekleştirildi. Başlangıçta, SCOBY, Warring blander yardımıyla 5 dakika boyunca homojenize edildi. Bu adım, SCOBY'nin daha iyi dağılmasını ve homojen bir karışım elde edilmesini sağladı. Homojenize edilen SCOBY'den 40 gram tartıldı ve üzerine 60 mL saf su ilave edildi. Karışım, teflon astarlı paslanmaz çelik reaktör (250 mL) içerisinde 200 °C'de 6 saat boyunca etüvde bekletildi. Hidrotermal süreç, atık bazlı karbon noktalarının

oluşmasını sağladı ve bu karbon noktaları sonraki aşamalarda kullanılmak üzere hazırlandı. Hidrotermal işlem sonrasında, karışım 25 °C'ye soğutuldu ve 10,000 rpm hızında 20 dakika süreyle santrifüjlenerek faz ayrımı gerçekleştirildi. Böylece, saf karbon noktalarının elde edilmesi için süpernatant ayrıldı. Santrifüjlenen süpernatant, 0.22 µm gözenek çapına sahip mikro membran filtreden geçirildi. Bu filtrasyon işlemi, daha küçük parçacıkların ve kirleticilerin ayrılmasını sağladı ve saf karbon noktalarının elde edilmesine katkı sağladı. Son adımda, süzüntü liyofilizasyon işlemine tabi tutularak toz haline getirildi. Böylece, atık bazlı karbon noktaları uzun süreli muhafaza edilecek hale getirildi ve ambalaj üretimi ve analizler için kullanıma hazır hale getirildi.

3.2.3. Karbon Noktaların Karakterizasyonu

Absorpsiyon spektrumu, UV-vis spektrofotometre (Mecasys Optizen POP Series UV/Vis, Seoul, Kore) kullanılarak belirlendi. Bu spektrofotometre, numunenin UV ve görünür ışık aralığında (200 ila 800 nm) emilim özelliklerini değerlendirmek için kullanıldı. Bu analiz, numunedeki kimyasal bağların özelliklerini ve konsantrasyonunu belirlemeye yönelik önemli bilgiler sağladı. Morfoloji incelemesi, TEM (Geçirimli Elektron Mikroskobu, JEM-2100F, JEOL, Ltd., Tokyo, Japonya) ile gerçekleştirildi. Bu yüksek çözünürlüklü transmisyon elektron mikroskobu, numunenin nanometre ölçeğindeki yapılarını ve parçacık boyutunu detaylı bir şekilde incelemek için kullanıldı. Elde edilen görüntüler, ImageJ yazılımı kullanılarak parçacık boyutu ve dağılımı hakkında bilgi sağladı. Numunelerin kimyasal yapıları, zayıflatılmış toplam yansıma-Fourier dönüşümü kızılötesi spektrofotometre (ATR FTIR) kullanılarak analiz edildi. ATR (Attenuated Total Reflectance) teknolojisi, numunenin yüzeyine düşen ışığın bir kısmının yansıtılması ve iç kısımlarına nüfuz ederek numunenin kimyasal yapıları hakkında bilgi sağlamasını sağlar. Bu analiz, numunenin moleküler kompozisyonunu ve kimyasal bağlarını belirlemek için kullanıldı. FTIR spektrometresi, geniş bir dalga numarası aralığında (4000 ila 400 cm⁻¹) numunenin emilim spektrumunu elde etmek için kullanıldı.

3.2.4. Karbon Noktaların Toksikite Testi

L929 fibroblast hücreleri, KN'nın biyouyumluluğunu değerlendirmek amacıyla kullanıldı. Bu hücreler, Dulbecco'nun modifiye Eagle ortamı (DMEM) (Corning, Glendale, AZ, ABD) içinde %10 fetal sığır serumu (Gibco, Franklin Lakes, NJ, ABD) ve %1

antibiyotik/antimikotik solüsyonu ile desteklenerek kültürlenmiştir. Inkübasyon süresince, hücreler 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO₂ ile nemlendirilen bir inkübatörde tutulmuştur. Kültür ortamı her iki günde bir değiştirilerek, hücrelerin %80'e ulaşan konfluenta olması sağlanmıştır. KN'nın etkisini değerlendirmek için, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolyum bromür (MTT) tahlili kullanılmıştır. Bu yöntem, metabolik olarak aktif hücrelerde mitokondriyal dehidrojenazın reaksiyonunu kullanarak tetrazolyum tuzlarını çözünmez formazana (mor bileşik) indirgemektedir. MTT testi için, L929 hücreleri 96 oyuklu plakalara (7 x 10³ hücre/oyuk) ekilmiş ve gece boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler, farklı KN konsantrasyonları (0.1, 0.2 ve 0.5 mg/mL) ile 24-72 saat boyunca muamele edilmiştir. Uygulama sonrasında, her kuyucuğa 20 µL 2 mg/mL MTT solüsyonu eklenmiş ve 37°C'de 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra formazan kristalleri dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözülmüş ve absorbans değerleri 570 nm dalga boyunda bir mikropilaka okuyucu (Molecular Devices, CA, ABD) kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen veriler, üç tekrarlı olarak deneyden elde edilmiş ve ortalama ± standart sapma (SD) olarak sunulmuştur.

3.2.5. Filmlerin Üretimi

Film çözeltileri, sodyum aljinat (7.5 g/L, W/V film solüsyonu), CMC (2.5 g/L) ve gliserolün (5 g/L) bir su banyosunda (~60 °C) 500 dev/dak hızında 2 saat boyunca mekanik olarak karıştırılarak 350 mL su içinde çözüldürüldü. Çözeltiye farklı konsantrasyonlarda KN (5 g/L, 10 g/L ve 15 g/L, W/V film solüsyonu) ve filmleri güçlendirmek için (1.5 g/L) CaCl₂ ilave edildi. Ardından, 15 dakika boyunca 35 °C daha karıştırma işlemi yapılarak toplam çözelti hacmi distile su kullanılarak 400 ml'ye tamamlandı. Çözeltiler, hava balonlarını gidermek amacıyla 1500 G'de 3 dakika süreyle santrifüjlenip, ardından pleksiglas plakalara (260 mm x 260 mm) döküldü. Daha sonra, 60 ± 2 °C sıcaklıktaki bir fırında yaklaşık 36 saat boyunca kurutulan filmler kalıptan ayrılarak analizlerde kullanılmak üzere hazır hale getirildi.

3.2.6. *In-vitro* Antioksidan Aktivite

In-vitro antioksidan aktivite, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) yöntemi kullanılarak belirlendi. Bu amaçla, 0.1 mL ekstrakt, 3.9 mL (25 mg/L) metanolik DPPH solüsyonu ile karıştırıldı ve karışım karanlık bir yerde oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübe edildi. Inkübasyon süresinin sonunda, 515 nm dalga boyunda absorbans değeri kaydedildi. Antioksidan aktivite, aşağıda verilen eşitlik yardımıyla hesaplandı (Başyigit vd., 2020).

$$\text{AADPPH (\%)} = (\text{Absorbanskontrol} - \text{Absorbansörnek} / \text{Absorbanskontrol}) * 100$$

Bu yöntemde DPPH radikali, karışıma eklenen antioksidan maddeler tarafından nötralize edildiğinde rengi soluk mordan sarıya döndü. Absorbans değeri ölçülen karışım sayesinde antioksidan aktivite hesaplanarak, ekstraktın antioksidan kapasitesi değerlendirildi

3.2.7. *In-vitro* Antimikrobiyal Aktivite

In-vitro antimikrobiyal aktivite çalışması, örneklerin gıda kaynaklı patojenler olan gram-negatif bakteri *E. coli* ve gram-pozitif bakteri *L. monocytogenes*'a karşı olan etkinlikleri belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Başlangıçta, patojen stok kültürleri yeniden üretildi. Bu işlem için kültürler, 5 mL Mueller Hinton Broth (MHB) içine özenle inoküle edildi ve 35 °C'de 1 gece boyunca inkübe edildi. Inkübasyonun ardından, bakteri hücrelerinin yoğunluğu OD600 absorbansta 10⁸ CFU/mL'ye ulaşana kadar uygun şekilde seyreltildi. Antimikrobiyal aktivite, Dannenberg vd., (2017) yöntemi kullanılarak disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Bu aşamada, 100 µL seyreltilmiş bakteri hücre süspansiyonu, Mueller Hinton Agar (MHA) içine enjekte edildi ve steril eküvyon aracılığıyla agar yüzeyine saat yönünde 3 tur döndürülerek yayma yöntemi ile inoküle edildi. Ardından, besiyeri sıvı absorpsiyonu için 5 dakika bırakıldı ve steril edilmiş (UV ile) filmlerden kesilerek 6 mm çapında diskler agar yüzeyine yerleştirildi.

Petri kapları, 35 °C'de 24 saat boyunca inkübe edildi. Inkübasyonun sonrasında, disklerin çevresinde oluşan inhibisyon zonları kumpasla ölçüldü. Bu zonlar, antimikrobiyal aktivitenin varlığını ve etkinliğini gösterir.

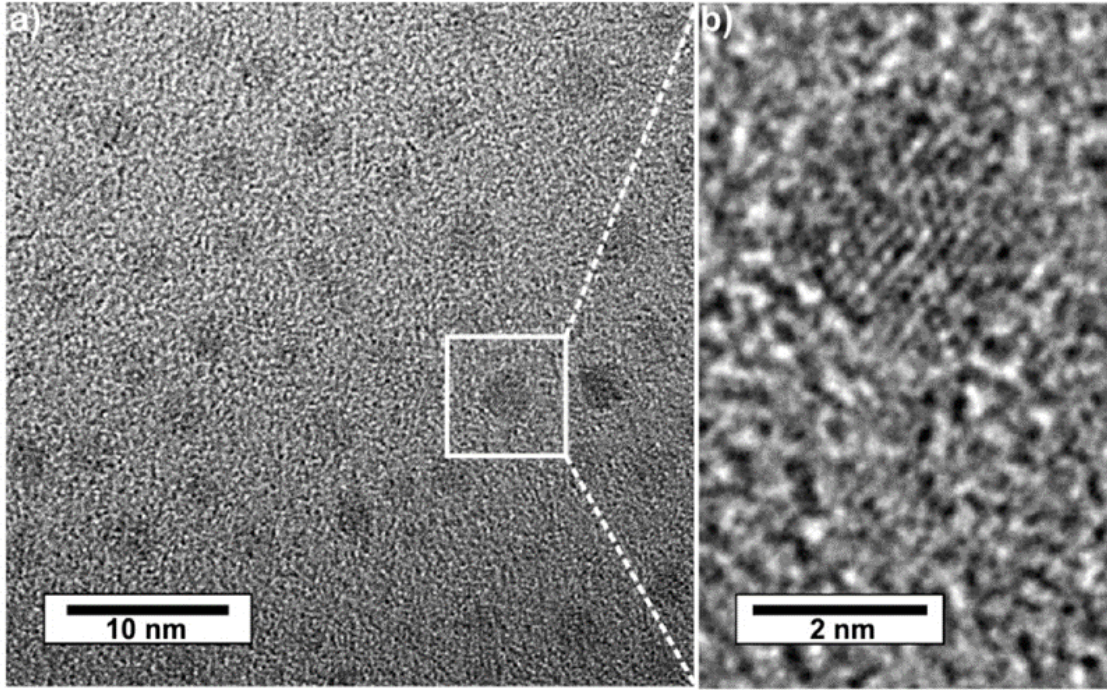
3.2.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 20 (Chicago, IL, ABD) yazılımı kullanılmıştır. Tedaviler arasındaki farkları karşılaştırmak için varyans analizi (ANOVA) ve Duncan çoklu test karşılaştırmaları yöntemleri kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

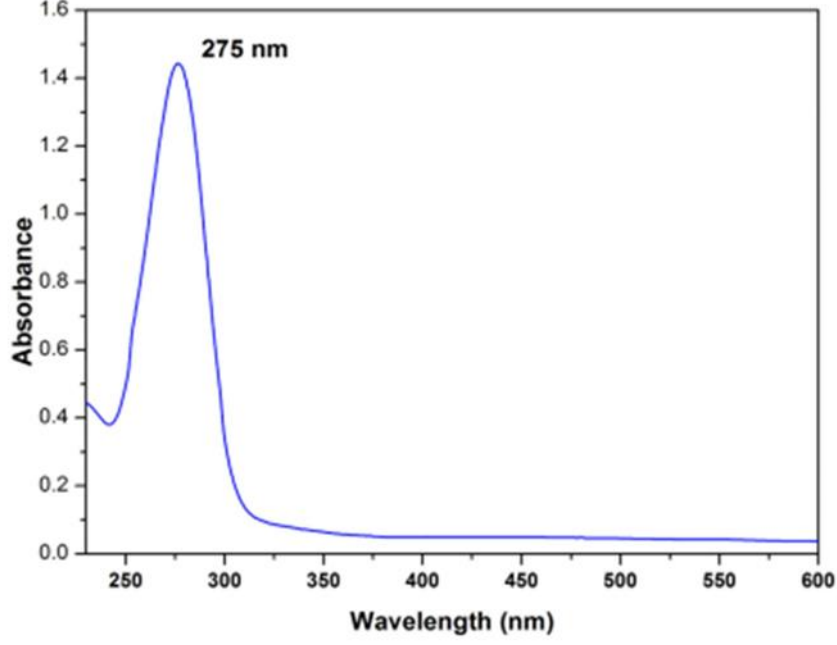
4.1. Karbon Noktalarının Karakterizasyonu

Karbon Noktalarının (KN) morfolojik özellikleri, transmisyon elektron mikroskobu (TEM) görüntüleme yöntemi kullanılarak belirlenmiş olup, görüntüler Şekil 4.1'de gösterilmiştir. KN'ler, agregasyon oluşturmada stabil bir süspansiyon oluşturdular. TEM görüntüleri, yaklaşık olarak yuvarlak KN parçacıklarının homojen bir boyutta oluştuğunu gösterdi ve bu boyutun daha önce bildirilen kuantum boyut aralığında olduğu tespit edildi (L. Hu vd., 2014; Qian vd., 2014)

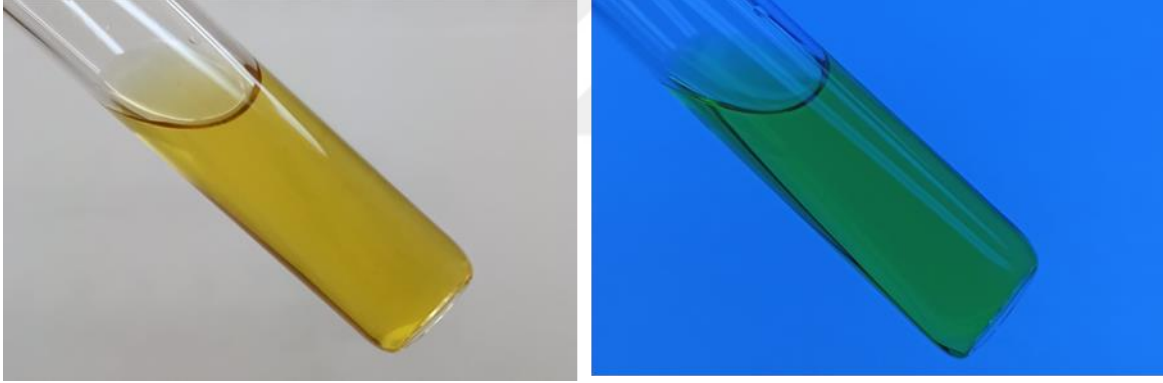


Şekil 4.1. Karbon noktalarının TEM görüntüleri

KN çözeltisinin UV/visible ışık emilim spektrumu ve görselleri Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de gösterilmiştir. Kuantum sınırlama etkisi nedeniyle, KN çözeltisinin kahverengi rengi, UV uyarımı ile yoğun bir yeşil ışığa dönüştü, bu da KN'nin başarılı bir şekilde sentezlendiğini doğruladı (Roy vd., 2021). Ayrıca, KN çözeltisi, KN'nin $n-\pi^*$ geçişi ile ilişkilendirilen 310 nm'de güçlü bir ışık emilim tepe noktası gösterdi (Pandiyani vd., 2020). Bu nedenle, KN'lerin güçlü UV emici özelliklere sahip olduğu ve bu özelliklerin UV önleyici ambalajlama uygulamaları için önemli olduğu düşünülmektedir.

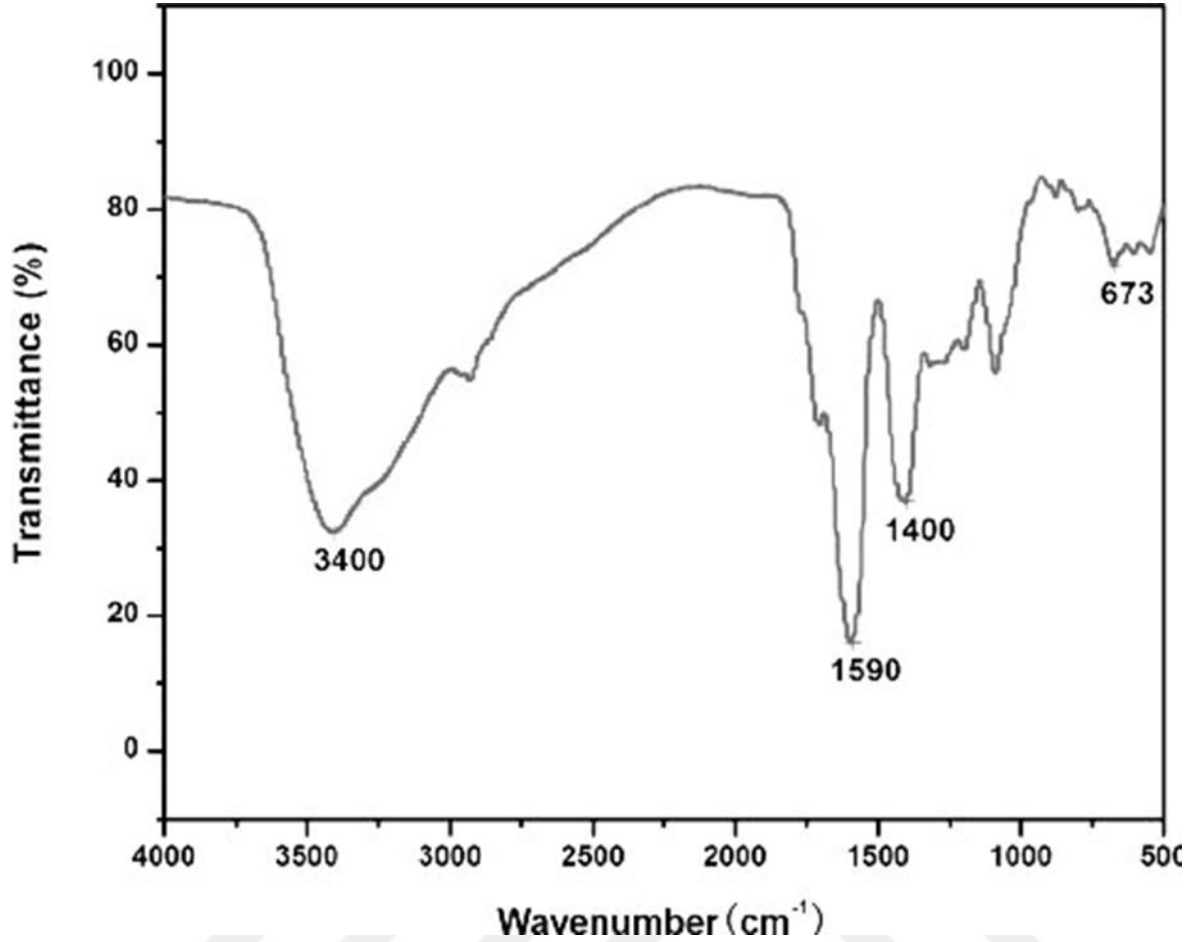


Şekil 4.2. Karbon noktalarının UV/görünür bölge spektrumları



Şekil 4.3. Karbon noktalarının normal ve UV ışık altında görünüşleri.

KN'nin FTIR spektrumu Şekil4.4 incelendiğinde, $1068-960\text{ cm}^{-1}$ ve 616 cm^{-1} arasındaki emilim tepe noktaları, aromatik C-H bükülme titreşimleri ve C-O/C-C gerilme titreşimleriyle ilişkilendirildi (Y. Li vd., 2020). Ayrıca, KN'nin yüzey fonksiyonel gruplarına bağlı olarak, O-H gerilme (3225 cm^{-1}), C=O (1667 cm^{-1}) ve O-C-H/C-O-H titreşimlerinin kombinasyonuna (1579 cm^{-1}) ve C-H/O-H bağlarının deformasyonuna (1108 cm^{-1}) bağlı emilim bandı gözlemlendi (Saranti vd., 2022). Bu FTIR verileri, KN'nin yüzey yapıları hakkında bilgi sağlamaktadır.



Şekil 4.4. Karbon noktalarının FTIR Spektrumu

4.2. Karbon Noktaların Sitotoksisiteleri

Yapılan çalışmada, KN'lerin farklı konsantrasyonları L929 fare fibroblast hücre hattında değerlendirilmiş ve 72 saat sonra hücre canlılığına olan etkileri incelenmiştir. Sonuçlar, KN konsantrasyonunun hücre canlılığı üzerinde önemli bir etkisi olduğunu ortaya koymuştur. Düşük konsantrasyonda (0.1 mg/mL), KN'nin neredeyse hiçbir sitotoksik etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. Bu durum, KN'lerin düşük konsantrasyonlarda hücreler için zararlı olmadığını ve hücre sağlığı açısından güvenli olduklarını göstermektedir.

Ancak, yüksek konsantrasyonda (1.0 mg/mL), KN'nin sitotoksik etkileri kısmen de olsa artmıştır. Bu yüksek konsantrasyon, hücrelerin büyümesini ve çoğalmasını olumsuz etkilemiştir. Bu sonuçlar, KN'lerin yüksek konsantrasyonlarda hücreler üzerinde toksik etkilere sahip olabileceğini ve dikkatli kullanılması gerektiğini vurgulamaktadır. Bu nedenle, KN'lerin biyo-uyumluluğu ve sitotoksitesi, uygulama alanları düşünülerek dikkatli bir şekilde değerlendirilmelidir. KN'lerin sitotoksik etkilerinin altında yatan mekanizmalar hala

tam olarak anlaşılmamıştır. Ancak, küçük boyutları nedeniyle hücre zarını kolayca geçebileceği ve hücre içi metabolizmayı etkileyebileceği düşünülmektedir (Havrdova vd., 2016). Bu, KN'lerin hücre içindeki biyokimyasal süreçleri değiştirerek hücre sağlığını etkileyebileceği anlamına gelir. Ayrıca, KN'lerin biyolojik sistemlerle etkileşimi, yüzeylerindeki fonksiyonel gruplar ve elektrostatik etkileşim gibi faktörlere bağlı olarak da değişebilir. Bu nedenle, KN'lerin sitotoksitesini anlamak için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmanın sonuçları, KN'lerin güvenli kullanımı için önemli bilgiler sunmaktadır. KN'lerin düşük konsantrasyonlarda neredeyse hiçbir sitotoksik etkiye sahip olduğu ve hücreler üzerinde düşük toksisite gösterdiği düşünüldüğünde, onların hücre etiketleme ve boyama gibi uygulamalarda güvenle kullanılabilmesi sonucuna varılabilir. Ancak, yüksek konsantrasyonlarda dikkatli olunması ve güvenli kullanım koşullarının sağlanması önemlidir. Bu çalışma, KN'lerin gıda ambalajlama uygulamaları gibi çeşitli alanlarda potansiyel kullanımlarının değerlendirilmesi açısından da önemli bir adımdır. Bu alandaki ileri araştırmalar, KN'lerin sitotoksik etkilerinin altında yatan mekanizmaları ve potansiyel toksisiteyi azaltma yöntemlerini daha iyi anlamamıza yardımcı olacaktır.

4.3. Filmlerin Antioksidan Aktiviteleri

Bu çalışmada, KN'lerin serbest radikal temizleme yeteneğinin değerlendirilmesi yapılmış ve sonuçlar Tablo 4.1'de gösterilmiştir. KN'lerin yüksek temizleme yeteneği, serbest radikallerle etkili bir şekilde etkileşim kurma kabiliyetine dayanmaktadır. KN'lerin yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, DPPH deneyleri sırasında serbest radikalleri etkili bir şekilde temizleyerek daha kararlı ürünlere dönüşmelerine olanak sağlamaktadır.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, film içerisine eklenen KN'nin antioksidan aktivitesini önemli ölçüde arttırdığını göstermektedir. KN ilavesiyle antioksidan aktivite önemli ölçüde artmıştır. Bu artış, KN'nin yüksek temizleme yeteneği ve serbest radikal temizleme kapasitesi ile açıklanabilir.

Literatürde de benzer sonuçlar bulunmaktadır, KN ilavesiyle biyopolimer bazlı filmlerde yüksek antioksidan aktivite rapor edilmiştir. Bu çalışmadaki bulgular, KN'nin pektin(Ezati vd., 2022), karagenan(Khan vd., 2023) gibi diğer biyopolimerlerle de uyumlu olabileceğini ve ambalajlanmış gıdaların oksidatif bozulmasını önleme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma, KN'lerin filmlerde antioksidan aktiviteyi arttırdığını ve serbest radikal temizleme kabiliyetine sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Bu bilgi, gıda ambalajlama endüstrisinde oksidatif bozulmaya karşı etkili bir koruyucu önlem olarak KN içeren filmlerin kullanımına olanak sağlayabilir. Gelecekteki çalışmalar, KN'lerin farklı biyopolimer matrislerle uyumluluğunu ve oksidatif bozulmaya karşı koruyucu etkilerini daha ayrıntılı olarak araştırmalıdır. Ayrıca, KN ilavesinin ambalajlama materyallerinin gıdaların raf ömrü ve kalitesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek, endüstriyel uygulamaları geliştirmek için önemli olacaktır.

Tablo 4.1. Filmlerin antioksidan aktiviteleri

	Film-0KN	Film-5KN	Film-10KN	Film-15KN
%DPPH indirgeme	8.1±0.5	12.2±0.6	36.7±0.4	67.5±0.3

4.3. Filmlerin Antimikrobiyal Aktiviteleri

KN'lerin antibakteriyel etkinliği disk-diffüzyon yöntemleriyle kalitatif olarak değerlendirilmiştir. Tablo 4.2'de görüldüğü gibi, yöntem mikroorganizmaların KN'lere karşı hassasiyetini inhibisyon bölgesinin büyüklüğü aracılığıyla gösterir ve bu durum KN'lerin çözünürlüğü, dağılım yeteneği sayesinde kolaylaştırılır (Dong vd., 2020; Ghirardello vd., 2021). Disk-diffüzyon test sonuçları, KN'lerin *E. coli* üzerinde herhangi bir inhibisyon bölgesine neden olmadığını, ancak *L. monocytogenes* üzerinde önemli etkinlik gösterdiğini gösterdi. *L. monocytogenes* için inhibisyon bölgesi yaklaşık 6 mm olarak tespit edildi.

KN'nin antibakteriyel etkinliği, bakteri yüzeyinde Reaktif oksijen türleri(ROS) oluşumuyla ilişkilendirilebilir. O_2^- , OH^- ve HO_2^- gibi ROS'lar, elektrostatik kuvvetlerle mikrobiyal yüzeye bağlanır ve proteinler, lipitler ve nükleotitlerle etkileşime girerek ciddi hücresel fizyolojik hasara neden olan zar proteinlerinin deforme olmasına yol açar, sonuç olarak geçirgenliği artırır ve hücre lizi ile ilişkili DNA çoğalmasını bozar (Dwyer vd., 2009). KN ilave edilen kompozit filmler, *L. monocytogenes*'e karşı *E. coli*'ye göre daha güçlü antibakteriyel etkinlik göstermiştir. Bu durumun temel nedeni hücre duvarı yapısındaki farklılıklar ve KN etkileşimlerine olan afinitesi olabilir (Ezati vd., 2022). Gram-pozitif bakteriler, ROS'un zararlı etkilerine daha duyarlıdır, çünkü kalın, göreceli olarak gözenekli peptidoglikan tabakasını içeren bir dış zar içermezler. Gram-negatif bakterilerin hücre duvarı, ince peptidoglikan

tabakanın iki hücre zarı arasında yer aldığı ve iç ve dış yüzeylerde fosfolipitler ve lipopolisakkaritlerden oluşan karmaşık bir yapıya sahiptir. Bu nedenle, KN doğrudan peptidoglikan tabakayla etkileşime giremez, çünkü hidrofobik peptidoglikan tabakanın neden olduğu dış hücre zarına başarılı bir şekilde nüfuz edemez (Qing vd., 2020). Öte yandan, Gram-pozitif bakterilerin basit hücre duvarı yapısı, KN'nin bakterilere nüfuz edebilmesine ve bakteriyel infiltrasyona neden olmasına izin verir, bu da bakteri parçalanmasına yol açar (Qing vd., 2020). Bu, yabancı bileşiklere karşı geçirgenlik bariyeri oluşturur ve dolayısıyla görece zayıf etkileşimler ve KN'lerin bakteri hücrelerine girmesini engeller, bu da Gram-negatif bakterilerde zayıf antibakteriyel etki ile sonuçlanır (Varghese & Balachandran, 2021).

Tablo 4.2. Filmlerin *L. monocytogenes* e karşı antibakteriyel aktiviteleri

	Film-0KN	Film-5KN	Film-10KN	Film-15KN
Zon çapı (mm)	-	2.1±0.1	3.4±0.2	6±0.2

5. SONUÇ

Bu tezde, Kombucha artığı olan SCOBY kullanılarak sentezlenen karbon noktalarının morfolojik ve yapısal özellikleri kapsamlı bir şekilde analiz edilmiştir. TEM, UV/visible spektrofotometre ve FTIR analizleri, homojen boyutlu yuvarlak karbon noktaları elde edildiğini, güçlü UV emici özelliklere sahip olduklarını ve belirli yüzey fonksiyonel gruplarına sahip olduklarını doğrulamıştır. Bu nedenle, bu karbon noktalarının aktif gıda ambalajı olarak kullanılma potansiyeli oldukça yüksektir.

L929 fare fibroblast hücre hattı kullanarak yapılan sitotoksosite testleri, düşük konsantrasyonlarda karbon noktalarının toksik olmadığını göstermiştir. Ancak, yüksek konsantrasyonlarda bir miktar toksisite artışı gözlenmiştir. Bu nedenle, karbon noktalarının kullanılacağı ambalajlama sistemlerinde güvenli konsantrasyonlarının belirlenmesi önemlidir.

Sodyum aljinat ve CMC karışımından oluşan filmler, DPPH yöntemiyle önemli ölçüde antioksidan aktivite sergilemiştir. Ayrıca, filmlerin L. monocytogenes'e karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak, E. coli'ye karşı antimikrobiyal etki gözlenmemiştir. Bu sonuçlar, karbon noktalarının antimikrobiyal ambalajlama uygulamaları için potansiyel bir seçenek olduğunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak, Kombucha artıklarından elde edilen karbon noktalarının aktif gıda ambalajları için kullanım potansiyeli olduğu ve antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu görülmüştür. Bu çalışma, artık materyallerin değerlendirilmesi ve sürdürülebilir ambalajlama çözümlerinin geliştirilmesi açısından önemli bir adım oluşturmaktadır. Gelecekte, bu karbon noktalarının ambalajlama endüstrisinde çevre dostu ve etkili seçenekler olarak değerlendirilmesi önemli bir araştırma alanı olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Adpekar, P. D., Rama, A., Rani, U., & Naha, A. (2020). Electrospun nanofibres and their biomedical applications. *Research journal of pharmacy and technology*, 13(11), 5569-5575. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2020.00972.5>
- Alas, M. O., Alkas, F. B., Aktas Sukuroglu, A., Genc Alturk, R., & Battal, D. (2020). Fluorescent carbon dots are the new quantum dots: An overview of their potential in emerging technologies and nanosafety. *Journal of materials science*, 55(31), 15074-15105. <https://doi.org/10.1007/s10853-020-05054-y>
- Alasalvar, C., Topal, B., Serpen, A., Bahar, B., Pelvan, E., & Gökmen, V. (2012). Flavor characteristics of seven grades of black tea produced in Turkey. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(25), 6323-6332. <https://doi.org/10.1021/jf301498p>
- Arya, R. K. (2014). Measurement of concentration profiles in thin film binary polymer-solvent coatings using confocal raman spectroscopy: Free volume model validation. *Drying technology*, 32(8), 992-1002. <https://doi.org/10.1080/07373937.2014.880714>
- Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G., & Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food chemistry*, 89(1), 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.075>
- Avena-Bustillos, R. j., & Krochta, J. m. (1993). Water vapor permeability of caseinate-based edible films as affected by pH, calcium crosslinking and lipid content. *Journal of food science*, 58(4), 904-907. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb09388.x>
- Bauer-Petrovska, B., & Petrushevska-Tozi, L. (2000). Mineral and water soluble vitamin content in the kombucha drink. *International journal of food science & technology*, 35(2), 201-205. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2000.00342.x>
- Baysal, G. (2020). Gıda endüstrisinde nanosistemlerin kullanımı. *GIDA*, 45(3), 517-529. <https://doi.org/10.15237/gida.GD20012>
- Bhargava, N., Sharanagat, V. S., Mor, R. S., & Kumar, K. (2020). Active and intelligent biodegradable packaging films using food and food waste-derived bioactive compounds: A review. *Trends in food science & technology*, 105, 385-401. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.015>

- Bouwmeester, H., Dekkers, S., Noordam, M. Y., Hagens, W. I., Bulder, A. S., de Heer, C., ten Voorde, S. E. C. G., Wijnhoven, S. W. P., Marvin, H. J. P., & Sips, A. J. A. M. (2009). Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 53(1), 52-62. <https://doi.org/10.1016/J.YRTPH.2008.10.008>
- Brody, A. L., Bugusu, B., Han, J. H., Sand, C. K., & McHugh, T. H. (2008). Innovative food packaging solutions. *Journal of food science*, 73(8). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00933.x>
- Candra, A., Prasetyo, B. E., & Tarigan, J. B. (2021). Study of vitamin C level of soursop leaves (*Annona muricata* L.) and galactomannan utilization in kombucha during fermentation. *AIP conference proceedings*, 2342(1), 100007. <https://doi.org/10.1063/5.0045669>
- Caplice, E., & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *International journal of food microbiology*, 50(1), 131-149. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00082-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00082-3)
- Cardoso, R. R., Neto, R. O., dos Santos D'Almeida, C. T., do Nascimento, T. P., Pressete, C. G., Azevedo, L., Martino, H. S. D., Cameron, L. C., Ferreira, M. S. L., & Barros, F. A. R. de. (2020). Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food research international*, 128, 108782. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108782>
- Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., & Gachhui, R. (2016). Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International journal of food microbiology*, 220, 63-72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015>
- Cherif Lahimer, M., Ayed, N., Horriche, J., & Belgaied, S. (2017). Characterization of plastic packaging additives: Food contact, stability and toxicity. *Arabian journal of chemistry*, 10, S1938-S1954. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.07.022>
- Chu, S.-C., & Chen, C. (2006). Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *food chemistry*, 98(3), 502-507. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.080>

- Chunduri, L. A. A., Kurdekar, A., Patnaik, S., Dev, B. V., Rattan, T. M., & Kamiseti, V. (2016). Carbon quantum dots from coconut husk: Evaluation for antioxidant and cytotoxic activity. *materials focus*, 5(1), 55-61. <https://doi.org/10.1166/mat.2016.1289>
- Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume-Labarthe, L., Fall, A., Daube, G., & Coton, E. (2017). Unraveling microbial ecology of industrial-scale kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS microbiology ecology*, 93(5). <https://doi.org/10.1093/FEMSEC/FIX048>
- Csiszár, E., & Nagy, S. (2017). A comparative study on cellulose nanocrystals extracted from bleached cotton and flax and used for casting films with glycerol and sorbitol plasticisers. *carbohydrate polymers*, 174, 740-749. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.103>
- Cuq, B., Gontard, N., & Guilbert, S. (1998). Proteins as agricultural polymers for packaging production. *Cereal chemistry*, 75(1), 1-9. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1998.75.1.1>
- Dannenberg, G. da S., Funck, G. D., Cruxen, C. E. dos S., Marques, J. de L., Silva, W. P. da, & Fiorentini, Â. M. (2017). Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: Potential for application as active packaging for sliced cheese. *LWT - food science and technology*, 81, 314-318. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.002>
- De, B., & Karak, N. (2017). Recent progress in carbon dot–metal based nanohybrids for photochemical and electrochemical applications. *Journal of materials chemistry A*, 5(5), 1826-1859. <https://doi.org/10.1039/C6TA10220D>
- De Roos, J., & De Vuyst, L. (2018). Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Current opinion in biotechnology*, 49, 115-119. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.007>
- Diana Twede, S. E. M. S. (2015). Cartons, crates and corrugated board, second edition: Handbook of paper and ... - Diana Twede, Susan E. M. Selke, Donatien-Pascal Kamdem, David Shires—google books. İçinde *DEStech*.
- Dobrucka, R. (2013). The future of active and intelligent packaging industry. *Logforum*, 9(2), 103-110.
- Dong, X., Liang, W., Meziani, M. J., Sun, Y.-P., & Yang, L. (2020). Carbon dots as potent Antimicrobial agents. *theranostics*, 10(2), 671-686. <https://doi.org/10.7150/thno.39863>

- du Toit, R., Volstedt, Y., & Apostolides, Z. (2001). Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents. *Toxicology*, *166*(1), 63-69. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00446-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00446-2)
- Dufresne, C., & Farnworth, E. (2000). Tea, kombucha, and health: A review. *Food research International*, *33*(6), 409-421. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00067-3)
- Dwyer, D. J., Kohanski, M. A., & Collins, J. J. (2009). Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. *Current opinion in microbiology*, *12*(5), 482-489. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.06.018>
- Ebrahimi Pure, A., Ghods Mofidi, S. M., Keyghobadi, F., & Ebrahimi Pure, M. (2017). Chemical composition of garlic fermented in red grape vinegar and kombucha. *Journal of functional foods*, *34*, 347-355. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2017.05.018>
- Essawet, N. A., Cvetković, D., Velićanski, A., Čanadanović-Brunet, J., Vulić, J., Maksimović, V., & Markov, S. (2015). Polyphenols and antioxidant activities of kombucha beverage enriched with coffeeberry® extract. *Chemical industry and chemical engineering quarterly*, *21*(3), 399-409.
- Ezati, P., Roy, S., & Rhim, J. W. (2022). Pectin/gelatin-based bioactive composite films reinforced with sulfur functionalized carbon dots. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*, *636*, 128123. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2021.128123>
- Feng, T., Tao, S., Yue, D., Zeng, Q., Chen, W., & Yang, B. (2020). Recent advances in energy conversion applications of carbon dots: From optoelectronic devices to electrocatalysis. *Small*, *16*(31), 2001295. <https://doi.org/10.1002/sml.202001295>
- Fernández-Santos, J., Valls, C., Cusola, O., & Roncero, M. B. (2022). Composites of cellulose nanocrystals in combination with either cellulose nanofibril or carboxymethylcellulose as functional packaging films. *International journal of biological macromolecules*, *211*, 218-229. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.049>
- Gao, X., Zhang, Y., & Zhao, Y. (2017). Biosorption and reduction of Au (III) to gold nanoparticles by thiourea modified alginate. *Carbohydrate polymers*, *159*, 108-115. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.095>

- Gheorghita (Puscaselu), R., Gutt, G., & Amariei, S. (2020). The use of edible films based on sodium alginate in meat product packaging: An eco-friendly alternative to conventional plastic materials. *Coatings*, *10*(2), article 2. <https://doi.org/10.3390/coatings10020166>
- Ghirardello, M., Ramos-Soriano, J., & Galan, M. C. (2021). Carbon dots as an emergent class of antimicrobial agents. *Nanomaterials*, *11*(8), article 8. <https://doi.org/10.3390/nano11081877>
- Gonçalves, S. M., dos Santos, D. C., Motta, J. F. G., Santos, R. R. dos, Chávez, D. W. H., & Melo, N. R. de. (2019). Structure and functional properties of cellulose acetate films incorporated with glycerol. *Carbohydrate polymers*, *209*, 190-197. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.031>
- Gontard, N., Duchez, C., Cuq, J.-L., & Guilbert, S. (1994). Edible composite films of wheat gluten and lipids: Water vapour permeability and other physical properties. *International journal of food science & technology*, *29*(1), 39-50. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb02045.x>
- Greenwalt, C. J., Ledford, R. A., & Steinkraus, K. (1998). Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea kombucha. *LWT - food science and technology*, *31*(3), 291-296. <https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0354>
- Greenwalt, C. J., Steinkraus, K. H., & Ledford, R. A. (2000). Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects. *Journal of food protection*, *63*(7), 976-981. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.7.976>
- Guilbert, S., Gontard, N., & Gorris, L. G. M. (1996). Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *LWT - food science and technology*, *29*(1), 10-17. <https://doi.org/10.1006/fstl.1996.0002>
- Havrdova, M., Hola, K., Skopalik, J., Tomankova, K., Petr, M., Cepe, K., Polakova, K., Tucek, J., Bourlinos, A. B., & Zboril, R. (2016). Toxicity of carbon dots – effect of surface functionalization on the cell viability, reactive oxygen species generation and cell cycle. *Carbon*, *99*, 238-248. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.12.027>
- Heydari, S., Jooyandeh, H., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2020). The impact of quodume Shirazi seed mucilage-based edible coating containing lavender essential oil on the quality enhancement and shelf life improvement of fresh ostrich meat: An

- experimental and modeling study. *Food science & nutrition*, 8(12), 6497-6512. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1940>
- Himaja, A. L., Karthik, P. S., Sreedhar, B., & Singh, S. P. (2014). Synthesis of carbon dots from kitchen waste: Conversion of waste to value added product. *Journal of fluorescence*, 24(6), 1767-1773. <https://doi.org/10.1007/S10895-014-1465-1/FIGURES/6>
- Hosseini, S. A., Rasouli, L., Gorjian, M., & Yadollahpour, A. (2016). A comparative study of the effect of kombucha prepared from green and black teas on the level of blood glucose and lipid profile of diabetic rats. *International journal of pharmaceutical research & Allied Sciences*, 5(2), 93-102.
- Hu, L., Sun, Y., Li, S., Wang, X., Hu, K., Wang, L., Liang, X., & Wu, Y. (2014). Multifunctional carbon dots with high quantum yield for imaging and gene delivery. *Carbon*, 67, 508-513. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2013.10.023>
- Hu, S., Wei, Z., Chang, Q., Trinchi, A., & Yang, J. (2016). A facile and green method towards coal-based fluorescent carbon dots with photocatalytic activity. *Applied surface science*, 378, 402-407. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2016.04.038>
- Hyun, J., Lee, Y., Wang, S., Kim, J., Kim, J., Cha, J., Seo, Y.-S., & Jung, Y. (2016). Kombucha tea prevents obese mice from developing hepatic steatosis and liver damage. *Food science and biotechnology*, 25(3), 861-866. <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0142-3>
- Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., & Sathishkumar, M. (2014). A review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 13(4), 538-550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>
- Jayabalan, R., Marimuthu, S., & Swaminathan, K. (2007). Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food chemistry*, 102(1), 392-398. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.032>
- Jayabalan, R., Subathradevi, P., Marimuthu, S., Sathishkumar, M., & Swaminathan, K. (2008). Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food chemistry*, 109(1), 227-234. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.037>

- Jian, H.-J., Wu, R.-S., Lin, T.-Y., Li, Y.-J., Lin, H.-J., Harroun, S. G., Lai, J.-Y., & Huang, C.-C. (2017). Super-cationic carbon quantum dots synthesized from spermidine as an eye drop formulation for topical treatment of bacterial keratitis. *ACS Nano*, *11*(7), 6703-6716. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b01023>
- Jönsson, L. J., & Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource technology*, *199*, 103-112. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009>
- Karimi, M., Sadeghi, R., & Kokini, J. (2018). Human exposure to nanoparticles through trophic transfer and the biosafety concerns that nanoparticle-contaminated foods pose to consumers. *Trends in food science & technology*, *75*, 129-145. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2018.03.012>
- Kaya-Celiker, H., & Mallikarjunan, K. (2012). Better nutrients and therapeutics delivery in food through nanotechnology. *Food engineering reviews*, *4*(2), 114-123. <https://doi.org/10.1007/s12393-012-9050-3>
- Khairol Anuar, N. K., Tan, H. L., Lim, Y. P., So'aib, M. S., & Abu Bakar, N. F. (2021). A review on multifunctional carbon-dots synthesized from biomass Waste: Design/fabrication, characterization and applications. *Frontiers in energy research*, *9*, 67. <https://doi.org/10.3389/FENRG.2021.626549/BIBTEX>
- Khan, A., Priyadarshi, R., Bhattacharya, T., & Rhim, J.-W. (2023). Carrageenan/Alginate-based functional films incorporated with allium sativum carbon dots for UV-Barrier food packaging. *Food and bioprocess technology*, *16*(9), 2001-2015. <https://doi.org/10.1007/s11947-023-03048-7>
- Konwar, A., Gogoi, N., Majumdar, G., & Chowdhury, D. (2015). Green chitosan-carbon dots nanocomposite hydrogel film with superior properties. *Carbohydrate polymers*, *115*, 238-245. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2014.08.021>
- Kris-Etherton, P. M., & Keen, C. L. (2002). Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Current opinion in lipidology*, *13*(1), 41.
- Laavanya, D., Shirkole, S., & Balasubramanian, P. (2021). Current challenges, applications and future perspectives of scoby cellulose of kombucha fermentation. *Journal of cleaner production*, *295*, 126454. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126454>

- Lakshmi, D. S., Trivedi, N., & Reddy, C. R. K. (2017). Synthesis and characterization of seaweed cellulose derived carboxymethyl cellulose. *Carbohydrate polymers*, *157*, 1604-1610. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.042>
- Lavoine, N., Desloges, I., & Bras, J. (2014). Microfibrillated cellulose coatings as new release systems for active packaging. *Carbohydrate polymers*, *103*, 528-537. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.035>
- Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2002). Antioxidant activity of black tea vs. green tea. *The journal of nutrition*, *132*(4), 785. <https://doi.org/10.1093/jn/132.4.785>
- Li, L., Li, M., Liang, J., Yang, X., Luo, M., Ji, L., Guo, Y., Zhang, H., Tang, N., & Wang, X. (2019). Preparation of core-shell CQD@PANI Nanoparticles and their electrochemical properties. *ACS applied materials & interfaces*, *11*(25), 22621-22627. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b00963>
- Li, Y., Chen, H., Dong, Y., Li, K., Li, L., & Li, J. (2016). Carbon nanoparticles/soy protein isolate bio-films with excellent mechanical and water barrier properties. *Industrial crops and products*, *82*, 133-140. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.072>
- Li, Y., Gao, J., Xu, X., Wu, Y., Zhuang, J., Zhang, X., Zhang, H., Lei, B., Zheng, M., Liu, Y., & Hu, C. (2020). Carbon dots as a protective agent alleviating abiotic stress on rice (*Oryza sativa* L.) through promoting nutrition assimilation and the defense system. *ACS applied materials & interfaces*, *12*(30), 33575-33585. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c11724>
- Lim, W. S., Ock, S. Y., Park, G. D., Lee, I. W., Lee, M. H., & Park, H. J. (2020). Heat-sealing property of cassava starch film plasticized with glycerol and sorbitol. *Food packaging and shelf life*, *26*, 100556. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100556>
- Liu, J., Li, R., & Yang, B. (2020). Carbon dots: A new type of carbon-based nanomaterial with wide applications. *ACS central science*, *6*(12), 2179-2195. https://doi.org/10.1021/ACSCENTSCI.0C01306/ASSET/IMAGES/LARGE/OC0C01306_0007.JPEG
- López-de-Dicastillo, C., Gallur, M., Catalá, R., Gavara, R., & Hernandez-Muñoz, P. (2010). Immobilization of β -cyclodextrin in ethylene-vinyl alcohol copolymer for active food packaging applications. *Journal of membrane science*, *353*(1-2), 184-191. <https://doi.org/10.1016/J.MEMSCI.2010.02.049>

- Majdinasab, M., Hosseini, S. M. H., Sepidname, M., Negahdarifar, M., & Li, P. (2018). Development of a novel colorimetric sensor based on alginate beads for monitoring rainbow trout spoilage. *Journal of food science and technology*, *55*(5), 1695-1704. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3082-5>
- Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2014). Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food microbiology*, *38*, 171-178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.003>
- Meerasri, J., & Sothornvit, R. (2020). Characterization of bioactive film from pectin incorporated with gamma-aminobutyric acid. *International journal of biological macromolecules*, *147*, 1285-1293. <https://doi.org/10.1016/j.ijbioac.2019.10.094>
- Miranda, B., Lawton, N. M., Tachibana, S. R., Swartz, N. A., & Hall, W. P. (2016). Titration and HPLC characterization of kombucha fermentation: A laboratory experiment in food analysis. *Journal of chemical education*, *93*(10), 1770-1775. https://doi.org/10.1021/ACS.JCHEMED.6B00329/ASSET/IMAGES/ACS.JCHEMED.6B00329.SOCIAL.JPEG_V03
- Moradi, M., Molaei, R., Kousheh, S. A., T. Guimarães, J., & McClements, D. J. (2021). Carbon dots synthesized from microorganisms and food by-products: Active and smart food packaging applications. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.2015283>.
- Muru, C., Badía-Laíño, R., & Díaz-García, M. E. (2020). Synthesis and characterization of green carbon dots for scavenging radical oxygen species in aqueous and oil samples. *Antioxidants*, *9*(11), article 11. <https://doi.org/10.3390/antiox9111147>
- Nagar, N., & Devra, V. (2018). Green synthesis and characterization of copper nanoparticles using azadirachta indica leaves. *Materials chemistry and physics*, *213*, 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2018.04.007>
- Özdemir, M., & Floros, J. D. (2004). Active food packaging technologies. *Critical reviews in food science and nutrition*, *44*(3), 185-193. <https://doi.org/10.1080/10408690490441578>
- Pandiyam, S., Arumugam, L., Srengan, S. P., Pitchan, R., Sevugan, P., Kannan, K., Pitchan, G., Hegde, T. A., & Gandhirajan, V. (2020). Biocompatible carbon quantum dots derived from sugarcane industrial wastes for effective nonlinear optical behavior and

- antimicrobial activity applications. *ACS omega*, 5(47), 30363-30372. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03290>
- Patrício Silva, A. L., Prata, J. C., Walker, T. R., Duarte, A. C., Ouyang, W., Barcelò, D., & Rocha-Santos, T. (2021). Increased plastic pollution due to COVID-19 pandemic: Challenges and recommendations. *Chemical engineering journal*, 405, 126683. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2020.126683>
- Qian, Z. S., Shan, X. Y., Chai, L. J., Ma, J. J., Chen, J. R., & Feng, H. (2014). DNA nanosensor based on biocompatible graphene quantum dots and carbon nanotubes. *Biosensors and bioelectronics*, 60, 64-70. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.04.006>
- Qing, W., Chen, K., Yang, Y., Wang, Y., & Liu, X. (2020). Cu²⁺-doped carbon dots as fluorescence probe for specific recognition of Cr(VI) and its antimicrobial activity. *Microchemical journal*, 152, 104262. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104262>
- Qu, J., Wei, Q., and, D. S.-C. reviews in food science, & 2018, undefined. (2018). Carbon dots: Principles and their applications in food quality and safety detection. *Taylor & Francis*, 58(14), 2466-2475. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1437712>
- Ramírez Tapias, Y. A., Peltzer, M. A., Delgado, J. F., & Salvay, A. G. (2020). Kombucha tea By-product as source of novel materials: Formulation and characterization of films. *Food and bioprocess technology*, 13(7), 1166-1180. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02471-4>
- Ray, S. C., Saha, A., Jana, N. R., & Sarkar, R. (2009). Fluorescent carbon nanoparticles: Synthesis, characterization, and bioimaging application. *The journal of physical chemistry c*, 113(43), 18546-18551. <https://doi.org/10.1021/jp905912n>
- Rhim, J.-W., & Ng, P. K. W. (2007). Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 47(4), 411-433. <https://doi.org/10.1080/10408390600846366>
- Robertson, G. L. (2005). *Food packaging: Principles and practice, second edition*. <https://doi.org/10.1201/9781420056150>
- Roy, S., Ezati, P., & Rhim, J.-W. (2021). Gelatin/carrageenan-based functional films with carbon dots from enoki mushroom for active food packaging applications. *ACS applied polymer materials*, 3(12), 6437-6445. <https://doi.org/10.1021/acsapm.1c01175>

- Saberi Riseh, R., Gholizadeh Vazvani, M., Hassanisaadi, M., & Skorik, Y. A. (2023). Micro/nano-carboxymethyl cellulose as a promising biopolymer with prospects in the agriculture sector: A review. *Polymers*, 15(2), article 2. <https://doi.org/10.3390/polym15020440>
- Saranti, A., Tiron-Stathopoulos, A., Papaioannou, L., Gioti, C., Ioannou, A., Karakassides, M. A., Avgoustakis, K., Koutselas, I., & Dimos, K. (2022). 3D-printed bioactive scaffolds for bone regeneration bearing carbon dots for bioimaging purposes. *Smart materials in medicine*, 3, 12-19. <https://doi.org/10.1016/j.smaim.2021.11.002>
- Scharbert, S., Holzmann, N., & Hofmann, T. (2004). Identification of the astringent taste compounds in black tea infusions by combining instrumental analysis and human bioresponse. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(11), 3498-3508. <https://doi.org/10.1021/jf049802u>
- Senthil Muthu Kumar, T., Senthil Kumar, K., Rajini, N., Siengchin, S., Ayrilmis, N., & Varada Rajulu, A. (2019). A comprehensive review of electrospun nanofibers: Food and packaging perspective. *Composites part B: engineering*, 175, 107074. <https://doi.org/10.1016/J.COMPOSITESB.2019.107074>
- Sharma, V., Tiwari, P., & Mobin, S. M. (2017). Sustainable carbon-dots: Recent advances in green carbon dots for sensing and bioimaging. *Journal of materials chemistry B*, 5(45), 8904-8924. <https://doi.org/10.1039/C7TB02484C>
- Shi, X., Wei, W., Fu, Z., Gao, W., Zhang, C., Zhao, Q., Deng, F., & Lu, X. (2019). Review on carbon dots in food safety applications. *Talanta*, 194, 809-821. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.005>
- Siemann, U. (2005). Solvent cast technology – a versatile tool for thin film production. İçinde N. Striebeck & B. Smarsly (Ed.), *Scattering methods and the properties of polymer materials* (ss. 1-14). Springer. <https://doi.org/10.1007/b107336>
- Silvestre, C., Duraccio, D., & Cimmino, S. (2011). Food packaging based on polymer nanomaterials. *Progress in polymer science*, 36(12), 1766-1782. <https://doi.org/10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2011.02.003>
- Sk, M. P., Jaiswal, A., Paul, A., Ghosh, S. S., & Chattopadhyay, A. (2012). Presence of amorphous carbon nanoparticles in food caramels. *Scientific reports*, 2. <https://doi.org/10.1038/srep00383>

- Smith, J. R., Frens, J. J., Snider, C. B., & Claeys, K. C. (2018). Impact of a pharmacist-driven care package on staphylococcus aureus bacteremia management in a large community healthcare network: A propensity score-matched, quasi-experimental study. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 90(1), 50-54. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.10.001>
- Sun, T. Y., Li, J. S., & Chen, C. (2015). Effects of blending wheatgrass juice on enhancing phenolic compounds and antioxidant activities of traditional kombucha beverage. *Journal of food and drug analysis*, 23(4), 709-718. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.01.009>
- Sun, Y.-P., Zhou, B., Lin, Y., Wang, W., Fernando, K. A. S., Pathak, P., Meziari, M. J., Harruff, B. A., Wang, X., Wang, H., Luo, P. G., Yang, H., Kose, M. E., Chen, B., Veca, L. M., & Xie, S.-Y. (2006). Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence. *Journal of the american chemical society*, 128(24), 7756-7757. <https://doi.org/10.1021/ja062677d>
- Tarhan, K. (2017). *Kombucha çayı üretiminde farklı substrat kaynaklarının kullanımı*. <http://acikerisim.akdeniz.edu.tr/xmlui/handle/123456789/3200>
- Travlou, N. A., Giannakoudakis, D. A., Algarra, M., Labella, A. M., Rodríguez-Castellón, E., & Badosz, T. J. (2018). S- and N-doped carbon quantum dots: Surface chemistry dependent antibacterial activity. *Carbon*, 135, 104-111. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2018.04.018>
- Varghese, M., & Balachandran, M. (2021). Antibacterial efficiency of carbon dots against gram-positive and gram-negative bacteria: A review. *Journal of environmental chemical engineering*, 9(6), 106821. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106821>
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Van Beest, M., De Kruijf, N., & Debevere, J. (1999). Developments in the active packaging of foods. *Trends in food science & technology*, 10(3), 77-86. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00032-1](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00032-1)
- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P., Renard, T., Rollan, S., & Taillandier, P. (2019). Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. *Process biochemistry*, 83, 44-54. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2019.05.004>

- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J.-P., & Taillandier, P. (2018). Understanding kombucha tea fermentation: A review. *Journal of food science*, 83(3), 580-588. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>
- Villarreal-Soto, S. A., Bouajila, J., Pace, M., Leech, J., Cotter, P. D., Souchard, J.-P., Taillandier, P., & Beaufort, S. (2020). Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, kombucha. *International journal of food microbiology*, 333, 108778. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108778>
- Vitas, J., Vukmanović, S., Čakarević, J., Popović, L., & Malbaša, R. (2020). Kombucha fermentation of six medicinal herbs: Chemical profile and biological activity. *Chemical industry and chemical engineering quarterly*, 26(2), 157-170.
- Wang, C., Huang, P., Qiu, C., Li, J., Hu, S., Sun, L., Bai, Y., Gao, F., Li, C., Liu, N., Wang, D., & Wang, S. (2021). Occurrence, migration and health risk of phthalates in tap water, barreled water and bottled water in Tianjin, China. *Journal of hazardous materials*, 408, 124891. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2020.124891>
- Wang, K., Gao, Z., Gao, G., Wo, Y., Wang, Y., Shen, G., & Cui, D. (2013). Systematic safety evaluation on photoluminescent carbon dots. *Nanoscale research letters*, 8(1), 122. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-122>
- Watawana, M. I., Jayawardena, N., Gunawardhana, C. B., & Waisundara, V. Y. (2015). Health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha. *Journal of chemistry*, 2015, e591869. <https://doi.org/10.1155/2015/591869>
- Wyrwa, J., & Barska, A. (2017). Innovations in the food packaging market: Active packaging. *European food research and technology*, 243(10), 1681-1692. <https://doi.org/10.1007/S00217-017-2878-2/TABLES/2>
- Yang, C. S., & Hong, J. (2013). Prevention of chronic diseases by Tea: Possible mechanisms and human relevance. *Annual review of nutrition*, 33(1), 161-181. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071811-150717>
- Yang, C., Thomsen, R. P., Ogaki, R., Kjems, J., & Teo, B. M. (2015). Ultrastable green fluorescence carbon dots with a high quantum yield for bioimaging and use as theranostic carriers. *Journal of materials chemistry B*, 3(22), 4577-4584. <https://doi.org/10.1039/C5TB00467E>

- Yildirim, S., Röcker, B., Pettersen, M. K., Nilsen-Nygaard, J., Ayhan, Z., Rutkaite, R., Radusin, T., Suminska, P., Marcos, B., & Coma, V. (2018). Active packaging applications for Food. *Comprehensive reviews in food science and food Safety*, 17(1), 165-199. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12322>
- Zhang, L., Ruan, D., & Gao, S. (2002). Dissolution and regeneration of cellulose in NaOH/thiourea aqueous solution. *Journal of polymer science part B: Polymer physics*, 40(14), 1521-1529. <https://doi.org/10.1002/polb.10215>
- Zhao, L., Zhang, M., Mujumdar, A. S., & Wang, H. (2022). Application of carbon dots in food preservation: A critical review for packaging enhancers and food preservatives. *Critical reviews in food science and nutrition*, 0(0), 1-19. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2039896>

