

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOPOLİMER TEMELLİ BİYOAKTİF YENİLEBİLİR FİMLERİN  
HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Deniz ARSLAN

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA  
2024

Her hakkı saklıdır

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### BİYOPOLİMER TEMELLİ BİYOAKTİF YENİLEBİLİR FİLMLEİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Deniz ARSLAN

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ

Turunçgiller, vücudun genel canlılığını ve sağlığını etkileyen dengeli bir diyetin önemli bir bileşenidir. Meyve hasat edildiğinde, oksijen tüketimi ile karbondioksit üretimi arasındaki gaz dengesindeki değişiklikler, depolama, işleme ve nakliye aşamalarındaki bozulmalar ve besin içeriğindeki kayıplar meyvenin çürümmesine neden olan temel faktörlerdir. Organik turunçgil meyveleri, hasat sonrası uzun bir ömre sahip olsalar da özellikle mantar enfeksiyonları nedeniyle hasat sonrası çürümeye eğilimlidirler. BU tez çalışmasında, turunçgil meyvelerinin hasat sonrasında tat, doku ve besin değerlerinin tüketilene kadar korunması amacıyla doğal biyoyumlu kitosan bazlı bir paketleme malzemesinin üretimi ve karakterizasyonu amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, çapraz bağlayıcı ajanlar kullanılarak biyoaktif antifungal ajanın kitosan polimerine modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Modifiye kitosan yapıların FTIR-ATR, TGA-DSC, SEM, WCA, WVP, su tutma kapasitesi ve optik analizleri yapılmıştır. Ayrıca, modifiye kitosan yapıların turunçgil meyvelerinde hastalıklara neden olan patojenik mantarlara ve oomisetlere karşı etkinliği ve sitotoksitesi araştırılmıştır. FTIR-ATR analizleri, antifungal ajanın başarıyla kitosana modifiye edildiğini göstermiştir. TGA-DSC analizi, modifiye yapıların stabilitesini koruduğunu göstermiştir. SEM analizi sonrasında, modifiye yapıların morfolojilerinde değişiklik gözlemlenmemiştir. WCA analizi, modifiye kitosan yapıların kitosana kıyasla daha hidrofilik olduğunu göstermiştir. UV ışığına karşı modifiye kitosan yapıların, kitosana göre çok daha güçlü bir koruma sağladığı gözlemlenmiştir. Sitotoksite testi, modifiye kitosan yapılarının hayvan hücrelerinde toksik etkisinin olmadığını ortaya koymuştur. Antifungal çalışmalar, modifiye kitosan yapıların birçok mantar ve oomiset türüne karşı etkili olduğunu kanıtlamıştır. Bu tez çalışması, TÜBİTAK tarafından 119N496 numaralı proje ile desteklenmiştir.

**Ağustos 2024, 68 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Sürdürülebilirlik, gıda ambalajı, kovalent immobilizasyon, biyobozunurluk, antimikrobiyal aktivite

## ABSTRACT

Master Thesis

### PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF BIOPOLYMER-BASED BIOACTIVE EDIBLE FILMS

Deniz ARSLAN

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ

Citrus fruits are an important component of a balanced diet that affects overall vitality and health. When the fruit is harvested, changes in the gas balance between oxygen consumption and carbon dioxide production, deterioration during storage, processing, and transport, and losses in nutritional content are key factors leading to fruit spoilage. Although organic citrus fruits have a long shelf life post-harvest, they are particularly prone to post-harvest decay due to fungal infections. This thesis aims to produce and characterize a natural biocompatible chitosan-based packaging material to preserve the taste, texture, and nutritional values of citrus fruits until consumption. To this end, cross-linking agents were used to modify the chitosan polymer with a bioactive antifungal agent. The modified chitosan structures were analyzed using FTIR-ATR, TGA-DSC, SEM, WCA, WVP, water holding capacity, and optical analyses. Additionally, the effectiveness and cytotoxicity of the modified chitosan structures against pathogenic fungi and oomycetes responsible for diseases in citrus fruits were investigated. FTIR-ATR analyses indicated that the antifungal agent was successfully modified onto chitosan. TGA-DSC analysis demonstrated that the modified structures maintained their stability. SEM analysis revealed no significant changes in the morphology of the modified structures. WCA analysis showed that the modified chitosan structures were more hydrophilic compared to chitosan. It was observed that the modified chitosan structures provided significantly stronger protection against UV light compared to chitosan. Cytotoxicity tests showed that the modified chitosan structures did not have toxic effects on animal cells. Antifungal studies confirmed that the modified chitosan structures were effective against various fungal and oomycete species. This thesis was supported by TÜBİTAK under project number 119N496.

**September 2024, 68 pages**

**Key Words:** Sustainability, food packaging, covalent immobilization, biodegradability, antimicrobial activity

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Tezimdeki yolculuğum boyunca bana rehberlik eden ve kıymetli tecrübelerini paylaşarak beni yönlendiren, sorularıma sabırla ve özenle cevap vererek beni destekleyen danışmanım Prof. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ'ye (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Öğretim Üyesi) teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar arkadaşım doktora öğrencisi Ayşe GÜNYAKTI'ya laboratuvar deneylerinden analiz cihazlarının kullanımına kadar her adımda akademik tecrübesini cömertlikle paylaştığı, sorunlarım olduğunda her zaman çözüm bulmamda yardımcı olduğu için kendisine teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan ve beni her zaman destekleyen anneme sevgi dolu rehberliği ve güçlü desteği için sonsuz teşekkürlerimi iletmek istiyorum.

Tez çalışmam sürecinde kullandığım bilgisayar programlarında ve şekil tasarımlarında bana sağladıkları destek ve rehberlik için sevgili arkadaşlarım Armağan ERDOĞAN ve Yiğit GÖKALP'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans tez çalışmam sürecinde 119N496 numaralı proje kapsamında maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna (TÜBİTAK) teşekkür ederim.

Deniz ARSLAN  
Ankara, Eylül 2024

## İÇİNDEKİLER

<b>TEZ ONAY SAYFASI</b>	
<b>ETİK.....</b>	<b>i</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>iii</b>
<b>ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....</b>	<b>iv</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....</b>	<b>vii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ .....</b>	<b>viii</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ .....</b>	<b>ix</b>
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ VE KURAMSAL TEMELLER .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Yenilebilir Film ve Kaplamalar .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1.1 Polisakkarit bazlı yenilebilir film ve kaplamalar .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1.2 Protein bazlı yenilebilir film ve kaplamalar .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1.3 Lipid bazlı yenilebilir film ve kaplamalar .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.4 Kompozit yenilebilir film ve kaplamalar .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Yenilebilir Film ve Kaplamaların Hazırlanması ve Uygulanması .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3 Kitosan Bazlı Yenilebilir Filmler .....</b>	<b>25</b>
<b>2.3.1 Kitosanın çapraz bağlayıcı ajanlar ile kimyasal modifikasyonu .....</b>	<b>28</b>
<b>2.4 Narenciye Meyvesi .....</b>	<b>33</b>
<b>2.5 Narenciye Meyvesinin Hasat Sonrası Mantar Enfeksiyonu .....</b>	<b>35</b>
<b>2.6 Narenciye Meyvesi İçin Yenilebilir Filmler ve Uygulamaları.....</b>	<b>36</b>
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler .....</b>	<b>41</b>
<b>3.2 Antifungal Lemon Medium (LM) Sentezi.....</b>	<b>41</b>
<b>3.3 LM ile Modifiye Edilmiş Kitosan Yapıların Sentezi (CHI-LM).....</b>	<b>42</b>
<b>3.3.1 EDC/NHS reaksiyonu ile LM bağlı kitosan sentezi (CHI-EDC/NHS-LM) ....</b>	<b>42</b>
<b>3.3.2 DSS çapraz bağlayıcı ajan ile LM bağlı kitosan sentezi (CHI-DSS-LM) .....</b>	<b>43</b>
<b>3.3.3 Çapraz bağlayıcı ajanlar (EELDI veya DDI) ile LM bağlı kitosan sentezi ....</b>	<b>44</b>
<b>3.4 LM ile Modifiye Edilmiş Kitosan Yapıların (CHI-LM) Karakterizasyonu .....</b>	<b>44</b>
<b>3.4.1 CHI-LM toz yapıların FTIR-ATR analizi .....</b>	<b>45</b>
<b>3.4.2 CHI-LM toz yapıların termal analizi .....</b>	<b>45</b>
<b>3.4.3 CHI-LM filmlerin morfolojik yapı tayini .....</b>	<b>45</b>

3.4.4 CHI-LM filmlerin ıslatılabilirlik tayini.....	45
3.4.5 CHI-LM filmlerin su tutma kapasitesinin tayini .....	46
3.4.6 CHI-LM filmlerin su buharı geçirgenliği tayini.....	46
3.4.7 CHI-LM filmlerin optik analizi .....	47
3.5 CHI ve CHI-LM Yapıların Antifungal Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	47
3.6 Kitosan ve LM ile Modifiye Edilmiş Kitosan Yapıların Sitotoksitesite Analizi ...	48
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	49
4.1 CHI ve CHI-LM Yapıların Analizleri.....	49
4.1.1 CHI ve CHI-LM yapıların FTIR-ATR analizi.....	49
4.1.2 CHI ve CHI-LM yapıların TGA/DSC analizi .....	52
4.1.3 CHI ve CHI-LM yapıların morjolojik yapı tayini .....	54
4.1.4 CHI ve CHI-LM yapıların ıslatılabilirlik tayini.....	54
4.1.5 CHI ve CHI-LM yapıların su tutma kapasitesi tayini.....	55
4.1.6 CHI ve CHI-LM yapıların WVP tayini .....	57
4.1.7 CHI ve CHI-LM yapıların optik analizi .....	59
4.2 CHI ve CHI-LM Yapıların <i>In Vitro</i> Testleri .....	60
4.2.1 CHI ve CHI-LM yapıların antifungal aktivitesinin belirlenmesi.....	60
4.2.2 CHI ve CHI-LM yapıların sitotoksitesinin belirlenmesi .....	62
5. SONUÇ.....	63
KAYNAKLAR .....	65
ÖZGEÇMİŞ.....	68

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

a	Ağırlık
A <sub>0</sub>	Kuru ağırlık
A <sub>t</sub>	Belirli bir t anındaki ağırlık
Au-Pd	Altın-Paladyum
cm	Santimetre
dk	Dakika
gr	Gram
h	Hacim
M <sub>a</sub>	Molekül ağırlığı
M	Molar
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
mg	Miligram
m <sup>2</sup>	Metrekare
nm	Nanometre
P	Basınç
Rpm	Dakikada Devir
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
°C	Santigrat
°	Derece

### Kısaltmalar

AA	Asetik asit
CHI	Kitosan
DDI	Dimeryl-diizosiyanat
DSS	Suberat Bis(sulfosüksinimidil) sodyum tuzu
EELDI	L-lizin etil ester dihidroklorür
EDC	Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür
FTIR-ATR	Fourier dönüşümlü kızılötesi – zayıflatılmış toplam yansıtma
LM	<i>Lemon Medium</i>
MES	2-morfolinoetansülfonik asit tampon çözeltisi
NHS	N-hidroksi sukkinimid
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
TGA-DSC	Termogravimetrik analiz ve diferansiyel taramalı kalorimetre
UV	Ultraviyole
WCA	Su temas açısı
WVP	Su buharı geçirgenliği

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Tez çalışmasının şematik özeti .....	5
Şekil 2.1 Yenilebilir kaplamaların sınıflandırılması .....	13
Şekil 2.2 Yenilebilir kaplamaların uygulanması .....	25
Şekil 2.3 Kitinin deasetilasyonu ile kitosan oluşumu .....	27
Şekil 2.4 Kitosanın antibakteriyel etkisi .....	27
Şekil 2.5 Nisin ile immobilize edilmiş kitosan film üretimi .....	32
Şekil 2.6 Turunçgillerin mantar hastalıkları.....	36
Şekil 2.7 Depolama öncesi kontrol, kitosan ve kitosan-karboksimetilselüloz ile kaplanan limonlar.....	36
Şekil 2.8 Depolama sonrası kontrol, kitosan ve kitosan-karboksimetilselüloz ile kaplanan limonlar.....	37
Şekil 2.9 Mısır nişastası, fesleğen esansiyel yağı ve selüloz nanofiberler ile kaplanan mandalinalar .....	37
Şekil 2.10 Farklı çözeltilerin mandalinalara katman olarak uygulanması .....	38
Şekil 2.11 Mandalina meyvelerinin oda sıcaklığında zamanla değişimi .....	38
Şekil 4.1 CHI ve LM'nin FTIR-ATR spektrumlar .....	50
Şekil 4.2 CHI-LM yapıların FTIR-ATR spektrumları.....	51
Şekil 4.3 CHI, LM ve CHI-LM yapıların TGA-DSC spektrumları.....	53
Şekil 4.4 CHI ve CHI-LM yapıların SEM görüntüleri .....	54
Şekil 4.5 CHI ve CHI-LM yapıların WCA görüntüleri .....	55
Şekil 4.6 CHI-LM yapıların reaksiyon şeması.....	57
Şekil 4.7 CHI ve CHI-LM yapıların dalgaboyuna karşılık geçirgenlik (%T) spektrumları .....	59
Şekil 4.8 CHI ve CHI-LM yapıların L929 hücrelerine inkübasyonu sonrası L929 hücrelerinin zamana karşılık hücre canlılığı .....	62

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Fenolikler, nanopartikül ve uçucu yağlar kullanarak kitosan bazlı yenilebilir filmlerin işlevselliğini geliştirilmesi ve meyve ve sebzelerin gösterdiği işlevsellik türü .....	9
Çizelge 2.2 Fenolikler, nanopartikül ve uçucu yağlar kullanarak aljinat bazlı yenilebilir filmlerin işlevselliğini geliştirilmesi ve meyve ve sebzelerin gösterdiği işlevsellik türü .....	10
Çizelge 2.3 Meyve ve sebzelerde kitosan bazlı film ve kaplamalara eklenen doğal ekstraktlar .....	12
Çizelge 2.4 Polisakarit bazlı yenilebilir kaplamaların gıda üzerindeki etkileri .....	14
Çizelge 2.5 Protein bazlı yenilebilir kaplamaların formülasyonları, uygulama yöntemleri ve özellikleri.....	18
Çizelge 2.6 Yenilebilir kompozit filmlerin işlevselliğini artırmak için lipid bileşenlerinin kullanımı.....	20
Çizelge 2.7 Yenilebilir kompozit filmlerin işlevselliğini artırmak için aktif bileşenlerin gıda üzerinde kullanımı .....	22
Çizelge 2.8 Akıllı ve aktif kitosan film uygulamaları.....	28
Çizelge 2.9 Akıllı ve aktif kitosan filmlerinin narenciye meyvesi üzerinde uygulamaları.....	34
Çizelge 4.1 CHI ve CHI-LM yapıların %SR değerleri .....	56
Çizelge 4.2 CHI ve CHI-LM yapıların WVP değerleri .....	58
Çizelge 4.3 CHI ve CHI-LM yapıların 280 ve 660nm'deki %T değerleri .....	60
Çizelge 4.4 CHI ve CHI-LM yapıların mantar türlerine karşı antifungal aktivitesi .....	61

## 1. GİRİŞ

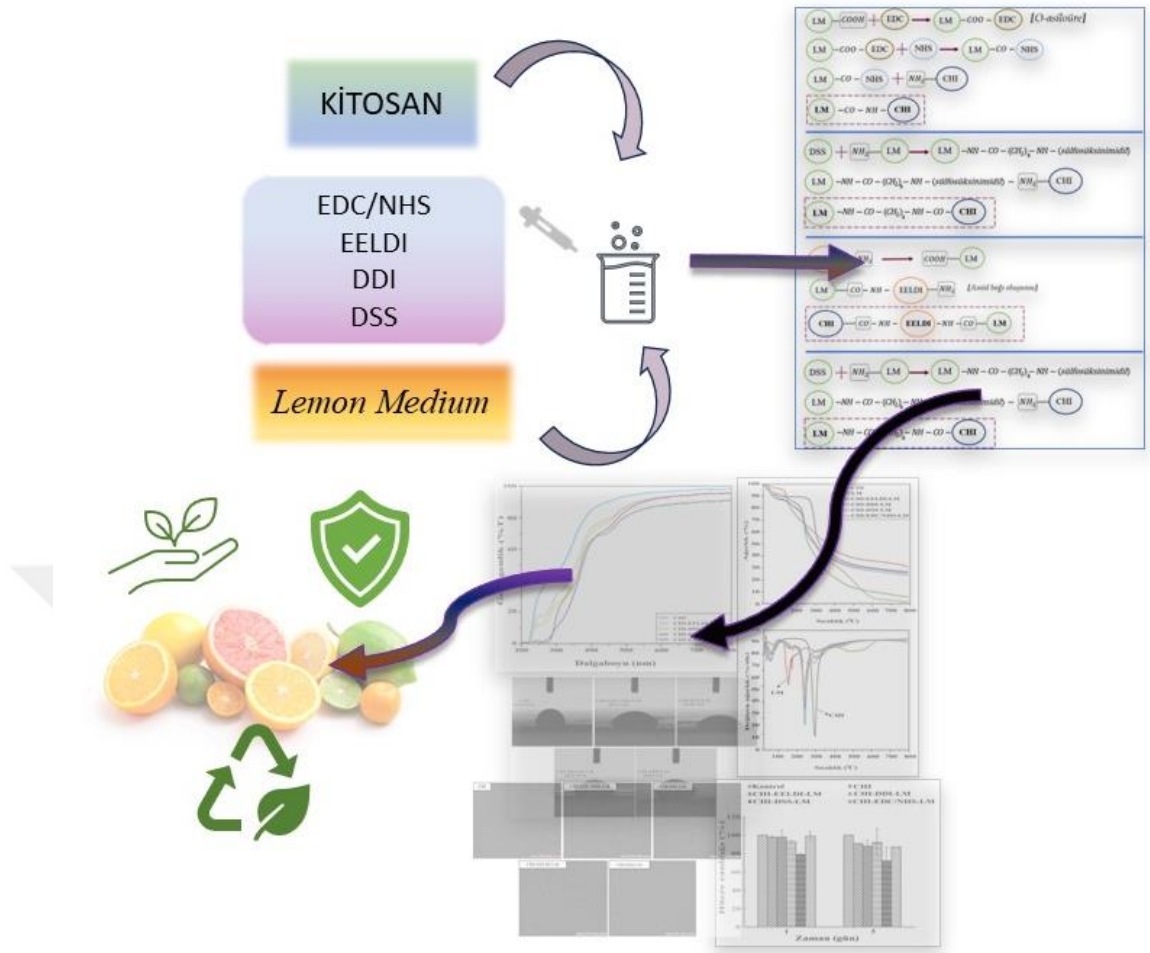
Günümüzde tüketiciler, sağlığa yararlı bileşenlerle zenginleştirilmiş ve yüksek kaliteli meyveler talep etmektedir. Dünya nüfusunun sürekli artması, taze, sağlıklı ve besleyici gıda ürünlerine olan talebi de artırmakta; bu durum, gıdaların kısa raf ömrü ile birleştiğinde büyük miktarda gıda israfına yol açmaktadır. Gıda israfı, küresel bir sorun haline gelmiş ve azaltılması gereken temel bir zorluk olarak öne çıkmaktadır. Bir gıda ürününün raf ömrü, bileşenlerin kalitesi, yapısı, bileşimi, işlenme yöntemleri, üretim koşulları ve paketleme sistemine bağlı olarak belirlenmektedir. Bu bağlamda, raf ömrü, gıda ürününün önerilen saklama koşullarında ve etiket bilgilerine uygun şekilde, istenilen duyuşal, kimyasal, fiziksel, mikrobiyolojik ve fonksiyonel özelliklerini değiştirmeden güvenli bir şekilde tüketilebileceği süre olarak tanımlanmaktadır. Raf ömrünün artırılması, gıdanın orijinal özelliklerini daha uzun süre korumasına yardımcı olarak gıda ve ambalaj atıklarının azalmasını sağlamaktadır. Küresel nüfus artışı, gıda üretimini artırmakta, ancak bu büyüme iklim istikrarı ve ekosistemler için ciddi tehditler oluşturmakta ve çevresel bozulmayı hızlandırmaktadır. Ambalaj, daha temiz bir dünya için dairesel ekonomi eylem planında önemli bir konu olarak ele alınmaktadır. Bu strateji, ambalaj atığını azaltmayı, malzemelerin yeniden kullanımını ve geri dönüşümünü teşvik etmeyi hedeflemektedir. Estetik kriterler ve gıda ürünlerinin dayanıklılığı, gıda israfının başlıca nedenleri arasında yer almaktadır. Avrupa Birliği'nin yeşil çevre girişimi çerçevesinde, 2050 yılına kadar iklim nötrlüğüne ulaşma hedefi doğrultusunda, Avrupa Komisyonu 2020'de "Döngüsel Ekonomi Eylem Planı"nı tanıtmıştır. Bu plan, ambalajların yeniden kullanılmasını ve geri dönüştürülmesini teşvik eden yeni kuralları içermektedir; ayrıca biyolojik olarak parçalanabilen veya kompostlaştırılabilen plastiklerin kullanımına geçişi de teşvik etmektedir. Mikrobiyolojik kontaminasyon, gıdanın %25'inden fazlasını kaybetmesine neden olmaktadır. Paketleme, depolama, taşıma ve dağıtım süreçlerinde gıdanın bozulmasını önleyerek önemli bir rol oynamaktadır. Paketlemenin temel amaçları olan koruma, içirme, bilgi ve kolaylık, artık modifiye atmosfer paketleme ve yenilebilir filmler gibi yeni işlevsel sistemlere evrilmiştir. Aktif paketleme, paket, ürün ve çevre arasındaki etkileşimi ifade etmektedir. Gıda endüstrisi, giderek daha talepkar bir pazarla karşı karşıya kalmakta ve bu durum, kalite, güvenlik ve sürdürülebilirlik taleplerine yanıt vermek için yeni çözümler

geliştirilmesine zemin hazırlamaktadır. Ancak, biyolojik olarak parçalanmayan paketleme malzemeleri, ekosistemler için yüksek toksik emisyon olumsuz etkilere yol açabilmektedir. Bu bağlamda, araştırmalar gıda kalitesini korumak için aktif paketleme sistemlerinde sürdürülebilir ilerlemelere odaklanmaktadır. Birçok kurum, sürdürülebilir üretim ve bölgesel biyolojik kaynakların akıllı kullanımı üzerine çalışmalar yaparak, dairesel bir biyoekonomi modeline geçişin önemini vurgulamaktadır. Endüstriyel atıklardan elde edilen aktif kimyasalların yenilebilir filmlere entegre edilmesi, malzeme araştırmalarında önemli bir trend haline gelmiştir. Bu süreç, sadece kalıntıların potansiyel raf ömrünü uzatmakla kalmayıp, aynı zamanda plastik atıkların azaltılmasına da katkı sağlamaktadır. Araştırmalar, gıda ambalajında antimikrobiyal ve biyolojik olarak parçalanabilir yenilebilir filmlerin ve kaplamaların geliştirilmesi için farklı malzeme ve tekniklerin keşfine odaklanmaktadır. Limon esansiyel yağı, nişasta ve kitosan gibi doğal kaynaklardan elde edilen bileşenler, bu malzemelerin mekanik özelliklerini ve antimikrobiyal aktivitelerini artırarak raf ömrünü uzatma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, yenilebilir kaplamalar ve aktif gıda ambalajları, gıda israfını azaltma ve raf ömrünü uzatma yönünde etkili bir çözüm sunarak döngüsel biyoekonomiye katkıda bulunmaktadır. Meyveler, içerdikleri vitaminler, lifler, antioksidanlar ve mineraller ile insan vücudunun bağışıklığını koruma ve kanser riskini azaltma gibi beslenme açısından temel öneme sahiptir. Meyve hasat edildiğinde, oksijen tüketimi ve karbondioksit üretimi arasındaki gaz dengesindeki değişiklikler, depolama, işleme ve nakliye aşamalarındaki bozulmalar ve besin içeriğindeki kayıplar, meyvenin çürümesine neden olan temel faktörlerdendir. Turunçgiller, insan beslenmesi ve sağlığı için önemli olan potasyum, demir, kalsiyum, fosfor, magnezyum, C vitamini, fenolik bileşikler, hidroksisinnamik asit, flavonoid bileşikler gibi besinleri ve kardiyovasküler hastalıklar ile kanser riskini azaltan biyoaktif bileşenleri içermektedir. Ancak, narenciyelerde mavi-yeşil küflenmelere neden olan *Penicillium italicum* ve *Penicillium digitatum* gibi mantarlar, hasat sonrası bozulmanın ana nedenlerinden olup, yetiştiriciler ve tedarikçiler için ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu mantarlar, insan sağlığı için toksik etkiler oluşturabilen mikotoksinler üretmektedir. Mikotoksinler, bağışıklık sisteminde bozulmalara, DNA hasarına ve böbrek sorunlarına neden olabilmektedir. *G. citricarpa* ise siyah nokta ve ekşi çürüme hastalıklarına yol açarak, hücre dışı endopolisakkaridaz salgılayarak doku bozulmasını hızlandırmaktadır. *Alternaria* türleri,

örneğin *Alternaria citri*, narenciyede siyah çürükler oluşturmaktadır. Ayrıca, hasat ve işleme sırasında fiziksel hasarlar, narenciye meyvelerinde fizyolojik anormalliklere neden olabilmektedir. Narenciyelerin raf ömrünü uzatmak için düşük sıcaklıkta depolama, sentetik mum kaplama, kimyasal işlemler ve modifiye atmosferde depolama/paketleme gibi çeşitli hasat sonrası koruma yöntemleri uygulanmıştır. Ancak, bu paketleme yöntemleri tüketiciler ve çevre için biyolojik olarak parçalanamadığından zararlıdır. Gıda güvenliği konusundaki artan endişeler, ekolojik ve sürdürülebilir, doğal, yenilebilir ve biyolojik olarak parçalanabilir maddelerin kullanımını teşvik etmektedir. Bu durum, sentetik ve geleneksel yöntemlerin yerine alternatif yaklaşımların uygulanmasını acil bir ihtiyaç haline getirmiştir. Günümüzde tüketiciler, kimyasal ve sentetik koruyucu maddelerden arındırılmış daha güvenli ve doğal gıdalar arayışındadır. Bu talebi karşılamak amacıyla, biyoaktif bileşiklerle zenginleştirilmiş yenilebilir kaplamalar geliştirilmiştir. Bu kaplamalar, gıdanın olgunlaşmasını geciktirerek, daha sağlıklı ve güvenli gıda seçenekleri sunmakta ve tüketicilerin sağlık riskleri olmaksızın gıdaların tadını çıkarmasını sağlamaktadır. Yenilebilir kaplamalar, gıda ürünlerinin yüzeyine dikkatlice uygulanarak atmosferden gaz ve nemin geçişini engelleyen bir bariyer oluşturmaktadırlar. Bu sayede gıda bozulmasını azaltarak, hücresel solunumu ve mikrobiyal yayılımı engellemektedirler. Olgunlaşmayı geciktirmekle kalmayıp, aynı zamanda geleneksel sentetik ambalajların kullanımını azaltarak gıda endüstrisine ait atıkları da minimize etmektedirler. Zamanla, çeşitli bileşikler içeren birçok yenilebilir kaplama önerilmiştir. Hem yenilebilir hem de biyolojik olarak parçalanabilir olan bu kaplamaların ve filmlerin oluşturulmasında kullanılan bileşenler, geniş bir doğal kaynak yelpazesine dayanmaktadır ve yapısal karmaşıklıkları ile işlevsel çeşitlilikleriyle karakterize edilmektedir. Bu bileşenler genellikle polisakkaritler, proteinler ve lipitler olarak sınıflandırılır. Ayrıca, yenilebilir kaplamalar, patojenlerin gıda yüzeyinde büyüme riskini azaltarak ürünün raf ömrünü uzatmaya yardımcı olurken, paketlenmiş veya kaplanmış ürünlerin duyu kalitesini de iyileştirebilmektedir. Organik asitler, enzimler, bakteriyosinler, mantar öldürücüler, doğal özler ve vitaminler gibi gıda katkı maddeleri, bu kaplamalarda yer alabilmektedir. Yenilebilir kaplama formüle edildikten sonra, ek bileşiklerin etkilerinin incelenmesi önemlidir; çünkü bu bileşenlerin eklenmesi, kaplamanın temel işlevsel özelliklerini değiştirebilmektedir. Bir bileşenin kaplamanın işlevselliği üzerindeki etkisi, konsantrasyonu, kararlılığı, kimyasal yapısı ve

formülasyonda kullanılan polimerle olan etkileşimi gibi faktörlerden etkilenmektedir. Literatürde, gıdanın raf ömrünü artırmaya yardımcı olan çeşitli yenilebilir kaplamalar bulunmaktadır ve bu çalışmalar, gıda güvenliğini ve kalitesini artırma potansiyeline sahiptir. Yenilebilir filmler ve kaplamalar, yenilebilirlik, biyoyumluluk, biyobozunurluk, gaz geçişini engelleme, toksik olmama ve düşük maliyet gibi özellikleri ile gıdaların raf ömrünü uzatma konusunda önem arz etmektedir. Ayrıca, biyoaktif, antioksidan ve antimikrobiyal maddeleri taşıyıcı olarak kullanılabilmesi de bu ambalajların değerini artırmaktadır. Yenilebilir film ve kaplamalarda kullanılan doğal biyopolimerlerin mekanik, kimyasal ve fiziksel özellikleri ile gazlara ve buhara karşı doğal geçirgenlikleri kullanılarak gelişmiş özelliklere sahip yenilebilir filmler üretilmektedir. Kitosan, toksik olmayan, tatsız, biyoyumlu, antibakteriyel ve antioksidan özelliklere sahip doğal bir biyopolimerdir. Literatürde, meyve ve sebzelerin bozulmasını önlemek amacıyla kitosanın yaygın olarak kullanıldığı belirtilmektedir. Sonuç olarak, organik turunçgil meyveleri hasat sonrası uzun bir ömre sahip olsa da özellikle mantar enfeksiyonları nedeniyle hasat sonrası çürümeye eğilimlidirler. Bu nedenle, ürünlerin biyolojik, fizikokimyasal ve fizyolojik özelliklerini değiştirmeden meyvelerin raf ömrünü artırmak için alternatif yeşil stratejilere ihtiyaç vardır.

Tez çalışması kapsamında, turunçgil meyvelerinin hasat sonrasında tat, doku ve besin değerlerinin tüketilene kadar korunması için doğal biyoyumlu bir paketleme malzemesinin üretimi ve karakterizasyonu amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, farklı çapraz bağlayıcı ajanlar (EDC/NHS, DSS, EELDI, DDI) kullanılarak biyoaktif antifungal ajan *Lemon Medium*'un (LM) kitosan polimerine (CHI) modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Modifiye kitosan yapılarının (CHI-EDC/NHS-LM, CHI-DSS-LM, CHI-EELDI-LM, CHI-DDI-LM) FTIR-ATR, TGA-DSC, SEM, WCA, WVP, su tutma analizleri ve optik analizleri yapılmıştır. Ayrıca, modifiye kitosan yapılarının turunçgil meyvelerinde hastalıklara neden olan patojenik mantarlara ve oomisetlere karşı antifungal etkinliği, *Universitat de València Estudi General (UVEG-CECT)*'da Prof. Giuseppe tarafından yapılan çalışmalarda incelenmiştir. Son olarak, CHI ve CHI-LM yapılarının sitotoksitesi fare fibroblast hücrelerinin (L929) metabolik davranışlarını değerlendirmek amacıyla MTT analizi ile belirlenmiştir ve tez çalışmasının grafiksel özeti sunulmuştur (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Tez çalışmasının şematik özeti

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ VE KURAMSAL TEMELLER

Bu bölümde tez çalışması kapsamında kullanılan genel bilgiler ve literatür bilgisi sunulmuştur. İlk ana başlıkta yenilebilir film ve kaplamalar, bunların bileşenleri, uygulama amacı ve yöntemleri incelenmiştir. Daha sonra, tez çalışması kapsamında önemli bir yer tutan kitosan polimeri, kitosan temelli yenilebilir film ve kaplamalar ile ilgili çalışmalara yer verilmiştir. Son olarak narenciye meyvesi için yapılan yenilebilir film ve kaplamalar ile ilgili çalışmalar incelenmiştir.

### 2.1 Yenilebilir Film ve Kaplamalar

Yenilebilir gıda ambalajları, 300 µm'den ince bir tabaka şeklinde olup, gıdaların üzerinde veya arasında kullanılabilen katman olarak tanımlanmaktadır. Bu ambalajlar, gıdalarla birlikte tüketilebilmektedir. Yenilebilir film ve kaplama arasındaki fark kısaca; yenilebilir filmler gıdaların üzerine veya aralarına yerleştirilirken, yenilebilir kaplamalar gıdaların yüzeyine ince bir zar tabaka şeklinde uygulanmaktadır. Yenilebilir ambalajların, genel olan güven kabul edilen (GRAS) listesinde bulunan bileşenleri içermesi, sindirilebilir olması, toksik olmaması ve alerjik reaksiyonlara neden olmayan maddeler içermesi gibi koşulları sağlaması gerekmektedir. Tarihte, ilk olarak 12. ve 13. yüzyıllarda Çin'de narenciye meyvelerinin su kaybını azaltmak için narenciyelere mumla kaplama yapılmış, 15. yüzyılda ise Japonya'da soya sütü proteininden “Yuba” adı verilen film kullanılmıştır. Yuba filmi, etleri, meyve ve sebzeleri sararak koruma sağlayan bir ambalaj malzemesi olarak tanımlanmıştır. Yenilebilir ambalajlar, gaz geçişini kontrol edebilme, nem geçişini engelleme, gıdaları fiziksel, kimyasal ve zararlı patojenlerden koruma, UV ışığından koruma sağlama; ayrıca antimikrobiyal, antioksidan ve diğer aktif bileşenleri taşıma gibi işlevlere sahiptir. Yenilebilir ambalajlar, taze ve işlenmiş gıdaların kalitesini ve raf ömrünü artırmaktadır (Nair vd. 2023). Biyopolimer bazlı yenilebilir ambalajlar, petrol içeren plastik bazlı ambalajlar (polietilen, polipropilen, polietilen tereftalat vb.) yerine çevre dostu, ekonomik bir alternatif olarak görülmektedir (Sharma vd. 2024). Plastik ambalajlar, toksik bileşenlerin meyvelere geçmesi, mikroplastiklerin su kütlelerinde ve hayvanlarda birikmesi gibi nedenlerden dolayı çevre ve insan sağlığı için risk oluşturmaktadır. Yenilebilir filmler ve kaplamalar, meyve ve sebzelerdeki solunum ve

terleme oranlarını, renk değişimini, su ve besin kaybını, mekanik hasarı azaltmaktadır. Yenilebilir ambalajların mekanik, bariyer, termal, optik, nem, antimikrobiyal gibi birçok özelliği, çeşitli çapraz bağlama ajanları, antioksidan ve antimikrobiyal ajanlar, plastikleştiriciler, organik ve inorganik dolgu maddeleri gibi katkı maddeleri kullanılarak geliştirilebilmektedir (Sharma vd. 2024). Yenilebilir paketlenme malzemeleri temel olarak üç ana bileşenden (polimer, plastikleştiriciler ve fonksiyonel katkı maddeleri) oluşmaktadır (Petkoska vd. 2021). Polimerler, doğal kaynaklardan üretilen malzemeler (polisakkaritler, proteinler ve lipidler), mikroorganizmalardan üretilen malzemeler (polihidroksialkanoat, polihidroksibütirat, polihidroksivaleerat, bakteriyel selüloz vb.) ve biyobazlı monomerlerden üretilen malzemeler (polilaktik asit, polivinil alkol vb.) olarak sınıflandırılmaktadır (Petkoska vd. 2021). Polisakkaritler, gıda ürünlerinin etrafında film oluşturmak için büyük potansiyele sahip, kararlı ve toksik olmayan maddelerdir. Nişasta, aljinatlar, karragenan, kitosan ve zamklar gibi bileşenler bu gruba dahildir. Doğal zamklar, deniz yosunu özlerinden (aljinatlar, agar), tohumlardan (galaktomannanlar) veya köklerden elde edilebilmektedir. Polisakkaritli kaplamalar, askorbik asit, sitrik asit, limon otu yağı, tarçın yaprağı yağı ve hindistan cevizi yağı gibi biyoaktif bileşenlerin eklenmesini kolaylaştırarak gıda bozulmasını geciktirmeye yardımcı olmaktadır. Nişasta, tahıllar ve sebzeler gibi gıdalarda bol miktarda bulunduğu için düşük maliyetli ve biyolojik olarak parçalanabilir özelliklere sahiptir. Çilek, elma, ananas ve mango gibi meyvelerde kaplama olarak uygulanmış ve gıda depolamada olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Petkoska vd. 2021). Selüloz, suya çözünmez olmasına rağmen gıda kaplamalarında umut verici bir polisakkarittir. Karboksimetilselüloz (CMC), metilselüloz (MC), hidroksi propilselüloz ve hidroksi propil metilselüloz gibi selüloz türevleri, gıda kaplamaları için uygulanabilmektedir. Selüloz zamkları, muz, papaya ve mango gibi meyvelerin olgunlaşmasını önlemek için uzun süredir etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Aljinat, alglerden izole edilen ve yarı saydam kaplamalar oluşturma yeteneğine sahip bir bileşiktir. Aljinat kaplamaları, 'Gala' elmaları, papayalar, kavunlar ve armutlar üzerinde test edilmiş ve olgunlaşmanın geciktiği ile meyvenin susuz kalmasının önlenediği gözlemlenmiştir. Proteinler, hayvansal ve bitkisel kaynaklardan elde edilen yenilebilir kaplamalar oluşturma potansiyeline sahiptir. Hayvansal proteinler arasında peynir altı suyu, kazein, kolajen ve jelatin bulunurken, bitkisel proteinler arasında mısırdan elde edilen zein, buğdaydan elde edilen glüten, soya proteini, bezelye proteini, pirinç kepeği

proteini ve fıstık proteini yer almaktadır. Protein bazlı kaplamalar gazlara karşı iyi bariyerler oluştururken, gıdaların su geçirmez hale getirilmesinde daha az etkili olabilmektedir. Peynir altı suyu proteini ve kazein, yüksek besin kalitesine sahip olduğu için gıda kaplama amacıyla tercih edilmektedir. Mısırdan elde edilen zein ise meyve ve sebzelerin yanı sıra fındık, elma ve armutları kaplamak için yaygın olarak kullanılmakta ve depolama sırasında kilo kaybını geciktirmektedir. Lipitler, gıda kaplaması olarak kullanıldığında su kaybını önlemektedir; bu moleküller suya düşük afiniteye sahip olduğu için daha iyi bir kalite ve görünüm sağlamaktadır. Yaygın olarak kullanılan yenilebilir lipitler arasında balmumu, kandelilla mumu, karnauba mumu ve yağ asitleri bulunmaktadır. Karnaubu mumu, gıdaya parlaklık sağlamaz veya atmosferden etkili bir şekilde izole etmez, ancak neme karşı mükemmel bir bariyer görevi görmektedir. Genellikle elma ve turunçgillerin kaplanmasında gomalak gibi diğer kaplamalarla birlikte kullanılır. Balmumu, daha kompakt ve kalın biyo-kaplamalar oluşturmak için bezelye nişastası ve selüloz türevleri gibi diğer kaplamalarla bir arada kullanılmıştır. Gıda kaplaması oluşturmak için kullanılan yöntemler, gıdanın maruz kalacağı uzun vadeli koşullara bağlıdır ve bu koşullar hem gıda ürünü hem de kaplama için uyumlu olmalıdır (Yuvaraj vd. 2021). Kaplamalar, kurutma, ısıtma, soğutma veya pıhtılaşma yoluyla gıdaya uygulanabilmektedir. Uygulama yöntemi, kaplamanın etkinliğini etkileyebileceğinden, en iyi sonuçları elde etmek için uygun yöntemlerin seçilmesi önemlidir. Kaplama malzemesinin durumu, sıvı, süspansiyon, emülsiyon veya toz şeklinde olabilir; bu da uygulama için farklı tekniklerin kullanılmasını gerektirmektedir. Temel olarak, biyokütleden üretilen biyobozunur ve biyobazlı maddeler; proteinler (hayvansal ve bitkisel proteinler), polisakaritler (bitkisel, hayvansal, mikrobiyal) ve lipidler (petrol bazlı, bitkisel ve mineral yağlar) olarak şekil 2.1'de gösterildiği gibi sınıflandırılmaktadır (Yuvaraj vd. 2021). Plastikleştiriciler, ambalajların esneklik ve dayanıklılık gibi özelliklerini artırmada önemli rol oynamaktadır; ayrıca kabarcık oluşumu ve çatlama gibi sorunları önlemek için de kullanılmaktadır. Genellikle poliyoller ve şeker bazlı (sorbitol, mannitol, sakkaroz, gliserol, monogliserid vb.) maddeler içermektedirler (Mitelut vd. 2021). Yenilebilir filmler ve kaplamalarda birçok katkı maddesi kullanılmaktadır (Çizelge 2.1, 2.2). Örneğin, antioksidanlar, antimikrobiyal ajanlar, esansiyel yağlar, çapraz bağlama ajanları, probiyotikler, lipid emülsiyonları, lifler

ve bitki özleri gibi bileşenler, yenilebilir ambalajların bariyer, termal, optik, nem ve antimikrobiyal özelliklerini geliştirebilmektedir (Dintcheva vd. 2020).

Çizelge 2.1 Fenolikler, nanopartikül ve uçucu yağlar kullanarak kitosan bazlı yenilebilir filmlerin işlevselliğini geliştirilmesi ve meyve ve sebzelerin gösterdiği işlevsellik türü (Nair vd. 2020)

Meyve/Sebze	Fonksiyonel Bileşik	Fenolik/Nanopartikül/ Uçucu Yağ	İşlevsellik Türü
Elma	Zeytin yağı özü	Fenolik	Antioksidan
Portakal	<i>Wickerhamomyces anomalous</i>	Fenolik	Antifungal
Dolma biber	<i>Byrsonima crassifolia</i>	Fenolik	Antimikrobiyal
Yaban mersini	Yaban mersini yaprağı özü	Fenolik	Antimikrobiyal+Antioksidan
Elma	Muz kabuğu özü	Fenolik	Antioksidan
Papaya	Mentha	Uçucu Yağ	Antifungal
Elma	Tarçın yağı	Uçucu Yağ	Antimikrobiyal+ Antifungal
Mangaba	Cambessedes	Uçucu Yağ	Antimikrobiyal
Çilek	PE, GE, NS, NT	Nanopartikül	Antimikrobiyal
Salatalık	Trans-cinnamaldehyde	Nanopartikül	Antifungal
Domates	<i>Flourensia cernua</i> özü	Nanopartikül	Antimikrobiyal+ Antifungal
Guava	Salisik asit	Nanopartikül	Antioksidan
Üzüm	Salisik asit	Nanopartikül	Antioksidan+ Antifungal

Çizelge 2.2 Fenolikler, nanopartikül ve uçucu yağlar kullanarak aljinat bazlı yenilebilir filmlerin işlevselliğini geliştirilmesi ve meyve ve sebzelerin gösterdiği işlevsellik türü (Nair vd. 2020)

Meyve/Sebze	Fonksiyonel Bileşik	Fenolik/Nanopartikül /Uçucu Yağ	İşlevsellik Türü
Jujube meyvesi	Çiçek yağı	Fenolik	Antioksidan
Goji	Lotus yaprağı özütü	Fenolik	Antioksidan
Şeftali	Rhubarb özütü	Fenolik	Antifungal+ Antioksidan
Üzüm	Vanillin	Fenolik	Antifungal
Ahududu	Eugenol	Uçucu Yağ	Antimikrobiyal
Papaya	Oregano	Uçucu Yağ	Antimikrobiyal
Kavun	Soya yağı	Uçucu Yağ	Antimikrobiyal+ Antifungal
Elma	Tarçın yağı	Uçucu Yağ	Antifungal
Çilek	D-limonene	Nanopartikül	Antioksidan
Okra	ATNE & ASNE	Nanopartikül	Antifungal
Patates	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Nanopartikül	Antimikrobiyal
Berries	<i>Bacillus subtilis</i>	Nanopartikül	Antifungal

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından sentezlenen, aynı türden veya farklı cinslerden bakterileri inhibe edebilen peptitler veya ribozomal proteinlerdir. Genellikle laktik asit bakterileri tarafından üretilirler ve fermente edilmiş veya edilmemiş gıdalarda istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini önlemek için antimikrobiyal madde olarak kullanılmaktadırlar (Dintcheva vd. 2020).

Avantajları arasında termostabil olmaları, hipoalerjenik özellik taşımaları ve gastrointestinal sistemde kolayca parçalanmaları bulunur. Etki mekanizmaları, hücre geçirgenliğini artırarak bakteri ölümüne neden olan gözenekler oluşturacak şekilde hücre reseptörlerine bağlanmalarıyla gerçekleşmektedir (Mujtaba vd. 2023). Reaktif oksijen

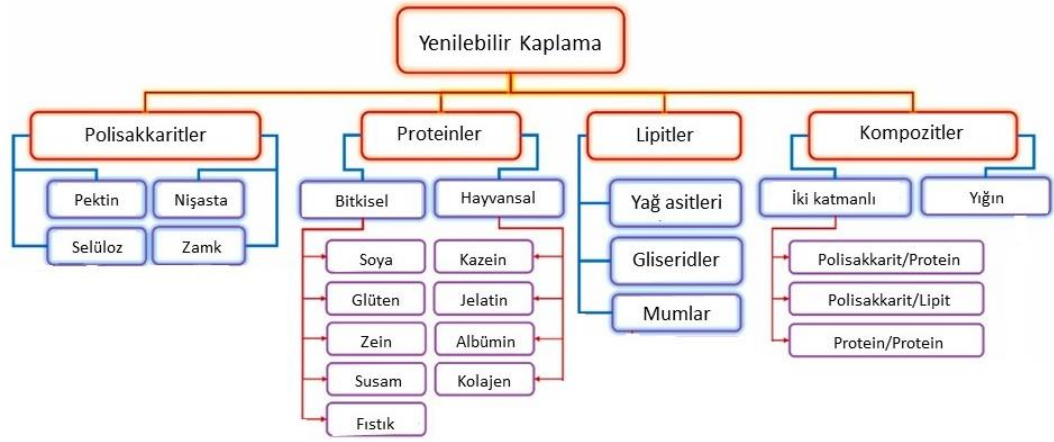
türleri (ROS), gıda ve biyolojik sistemlerde oksidasyondan sorumludur ve gıdalardaki kimyasal bozulmanın önemli nedenlerindedir. Lipit peroksidasyonu, besin değerinin kaybına ve lipit içeren gıdaların raf ömrünün azalmasına yol açan yaygın bir oksidatif süreçtir. Diğer bir süreç olan enzimatik esmerleşme ise meyve ve sebzelerde fenolik bileşiklerin oksidasyonu ile koyu pigmentlerin oluşumunu ifade etmektedir. Biyolojik organizmalarda ROS, lipid oksidasyonuna ve DNA'da mutasyonlara yol açarak kanser riskini artırabilmektedirler. Bu nedenle, antioksidanların gıdalara eklenmesi, oksidatif süreçleri önlemenin ana yöntemlerinden biridir. Antioksidanlar, ROS oluşumunu engelleyen veya peroksidasyonu başlatan serbest radikalleri temizleyen mekanizmalarla çalışmaktadır (Cruz vd. 2023). Doğal antioksidanlar genellikle bitkilerden, sebzelerden ve baharatlardan elde edilir ve fenolik bileşikler, vitaminler ve karotenoidler olarak üç gruba ayrılmaktadır. E vitamini ve C vitamini en önemli vitaminlerdir. Karotenoidler arasında ise  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -karoten, likopen ve lutein örnek verilmiştir. Kitosan, antibakteriyel ve antioksidan özelliklere sahip bir madde olarak öne çıkar. Antioksidan aktivitesi, yağların oksidasyonu sırasında oluşan uçucu aldehitlerle kararlı bir florosfer oluşturmasıyla ilişkilendirilmektedir. Kitosan filmlerinin veya kaplamalarının antioksidan özelliklerini artırmak için, uçucu yağlar veya bitkisel ekstraktlar gibi biyoaktif bileşenlerin eklenmesi yaygın bir stratejidir (Cruz vd. 2023). Esansiyel yağ bileşiklerinin antioksidan aktivitesinde rol oynayan etki mekanizmaları arasında serbest radikal temizleme, zincir başlatma önleme, indirgeyici ajan kullanımı, peroksit sonlandırma, singlet oksijen söndürme ve metal iyonlarının katalizör olarak bağlanması gibi çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır. Meyve (üzüm, nar, hurma) ve sebze (brokoli, patates, kabak) gibi çeşitli kaynaklardan elde edilen bitkisel özler, antioksidan özellikleri ve lipit oksidasyonunu azaltma yetenekleri açısından yaygın olarak incelenmiştir. Bu özlerin çoğu, karotenoidler, antosiyaninler ve tokoferoller gibi farklı bileşenlerin karışımını içerdiğinden, belirgin bir fenolik bileşik profiline sahip değildir. Ayrıca, bu gıdaların ve hammaddelerin işlenmesi sırasında ortaya çıkan yan ürünler, atık miktarını ve ekonomik kayıpları azaltarak döngüsel ekonomiyi destekleyen değerli antioksidan bileşenler sunmaktadır. Bitki ve bitkisel matrislerden elde edilen fenolik bileşiklerin profili ve konsantrasyonu, iklim, tür, yetiştirme yöntemi ve kullanılan ekstraksiyon yöntemi ile çözücü gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Son yıllarda, biyoaktif kitosan kaplamaların meyve ve sebzelerin raf ömrünü uzattığı; solunum oranlarını

azaltarak, mikrobiyal gelişimi engelleyerek ve olgunlaşmayı geciktirerek yaygın olarak gösterilmiştir. Meyve ve sebzelerde kitosan bazlı film ve kaplamalara eklenen doğal ekstraktlar çizelge 2.3’te verilmiştir (Tebar vd. 2023).

Çizelge 2.3 Meyve ve sebzelerde kitosan bazlı film ve kaplamalara eklenen doğal ekstraktlar (Tebar vd. 2023)

<b>Eklene n Öz</b>	<b>Ürün</b>	<b>Biyoaktif Molekül</b>	<b>Etki</b>
Zeytin yaprağı ve zeytin posası özleri	Elma ve çilek	Polifenolik	Antimikrobiyal aktivite↑
Nar kabuğu özütü	Domates	Polifenolik	Ağırlık kaybı↓
Üzüm çekirdeklerinden elde edilen prosiyanidinler	Kivi	Polifenolik	Antimikrobiyal aktivite↑ Raf ömrü↑
Zeytin yaprağı özütü	Kiraz	Polifenolik	Antioksidan aktivite↑
Meyve özütü	Elma	Polifenolik	Antioksidan aktivite↑
Meyve özütü	Mandalina	Polifenolik	Antimikrobiyal aktivite↑ Raf ömrü↑
“Byrsonima Crassifolia” özütü	Dolmalık biber	Polifenolik	Antimikrobiyal aktivite↑

Sonuç olarak, yenilebilir filmler ve kaplamalar; yenilebilirlik, biyoyumluluk, biyobozunurluk, gaz geçişini engelleme, toksik olmama ve düşük maliyet gibi özellikleri ile gıdaların raf ömrünü uzatma konusunda önem arz etmektedir. Ayrıca, biyoaktif, antioksidan ve antimikrobiyal maddeleri taşıyıcı olarak kullanılabilmeleri de bu ambalajların değerini artırmaktadır.



Şekil 2.1 Yenilebilir kaplamaların sınıflandırılması

### 2.1.1 Polisakkarit bazlı yenilebilir film ve kaplamalar

Polisakkaritler, monodisakkaritlerin glikozit bağı ile birbirine bağlanarak oluşan polimer zincirleridir. Yenilebilir ambalajlarda biyopolimer olarak kullanılmalarının sebepleri; toksik olmamaları, doğada bol miktarda bulunmaları, uygun fiyatlı olmaları ve kullanımlarının kolay olmasıdır. Polisakkaritlere selüloz, nişasta, alginat, kitosan ve pektin gibi örnekler verilebilmektedir. Polisakkarit bazlı ambalajlar, iyi bir mekanik dayanıma sahipken, genellikle zayıf su buharı bariyer özelliklerine sahiptirler çünkü genelde hidrofilyk bir yapıya sahiptirler. Polisakkaritler ambalajlara sertlik, yoğunluk, yapışkanlık ve viskozite kazandırmaktadır. Polisakkaritlerin zayıf özelliklerini geliştirmek için çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. Bu yöntemler arasında pH değişiklikleri, çözücü değişiklikleri, çapraz bağlama, kimyasal değişiklikler ve nanoteknoloji kullanımı yer almaktadır. Ayrıca, polisakkaritlerin hidrofiliğini azaltmak için trigliseridler, asetile monogliseridler, serbest yağ asitleri ve bitkisel yağlar gibi farklı yağ ve yağ asitleri, hidroklorid matrisine eklenerek su buharı bariyer özellikleri geliştirilebilmektedir (Sharma vd. 2024). Kitosan, müsilaj ve lavandan oluşan biyobazlı kompozit kaplamalar tatlı kiraz meyvelerine uygulanmış ve hem pazar hem de soğuk depolama koşullarında hasat sonrası parametreler açısından test edilmiştir. Sonuçlar, tatlı kirazların raf ömrünün, azalmış ağırlık kaybı, fungal bozulma, toplam flavonoid, L-askorbik asit ve oksalik asit gibi önemli hasat sonrası özelliklerini koruduğunu ve raf ömrünün uzatılabileceğini göstermiştir (Mujtaba vd. 2023). Limonun pektin bazlı yenilebilir kaplama ile kaplandığı

çalışmada, kontrol meyvelerine kıyasla kaplanan limonların kimyasal, fiziksel ve fizyolojik özelliklerinin daha iyi olduğunu göstermiştir (Maftoonazad vd. 2019). Çalışmalarda (Çizelge 2.4), farklı polisakaritlerle formüle edilmiş yenilebilir kaplamaların, meyve ve sebzelerin ağırlık/kütle kaybını azalttığı ve bu sayede kuru madde ile nem kaybını önlediği görülmektedir. Terleme, toplam su kaybının %90'ını oluştururken, solunum bu kaybın %10'undan daha azını sağlamaktadır. Yüksek su içeriğine sahip veya ince kabuklu meyve ve sebzelerde (örneğin şeftali, domates) bu kayıplar, hasat sonrası kalite bozulmalarına yol açarak ekonomik kayıplara neden olabilir. Yenilebilir kaplamalar, depolama sırasında ağırlık/kütle kararlılığını artırarak ürünlerin pazar değeri ve tüketici kabul edilebilirliğini olumlu yönde etkileyebilir. Ayrıca, bitki epidermisindeki gözenek yapıları su kaybını kontrol ederken, moleküler düzeyde polisakarit bazlı kaplamalar, hidrojen bağları oluşturarak kaybı azaltmaktadır.

Çizelge 2.4 Polisakarit bazlı yenilebilir kaplamaların gıda üzerindeki etkileri (Cruz vd. 2023)

<b>Kaplama Malzemesi</b>	<b>Kaplanan Gıda</b>	<b>Kaplamanın Başlıca Etkisi</b>
Aloe vera	Lychee meyvesi	↓ Kahverengileşme indeksi, ağırlık kaybı, süperoksit anyon, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve MDA içeriği ≈ Toplam antosiyanin, toplam fenolik ve askorbik asit
Aloe vera	Papaya meyvesi	↑ Raf ömrü
Aloe vera, alginat	Domates	↑ Raf ömrü ↓ Ağırlık kaybı, hastalık şiddeti
Aloe vera	Kayısı	≈ Sertlik, toplam fenolik ve askorbik asit içerikleri
Aloe vera	Shogun mandalinası	↓ Ağırlık kaybı ≈ Toplam fenolikler
Nişasta	Böğürtlen	≈ Sertlik ve antosiyanin içeriği ↓ Mikroorganizmalar, küf ve maya sayıları
Nişasta	Armut	≈ Renk, doku, hücre zarı geçirgenliği, toplam fenolik

Çizelge 2.4 Polisakarit bazlı yenilebilir kaplamaların gıda üzerindeki etkileri (Cruz vd. 2023) (devam)

<b>Kaplama Malzemesi</b>	<b>Kaplanan Gıda</b>	<b>Kaplamanın Başlıca Etkisi</b>
Selüloz	Mandalina	↓ Patojen etkisi ↓ Ağırlık ve nem kaybı
Selüloz, balmumu	Mango	≈ Renk ve sertlik ↓ Ağırlık kaybı, hastalık şiddeti
Selüloz	Kiraz	↑ Raf ömrü ↓ Ağırlık kaybı, hastalık şiddeti
Selüloz, limon esansiyel yağı, aljinat, pektin	Salatalık	↑ Raf ömrü ↓ Ağırlık kaybı
Aljinat	Gül elması	↓ Ağırlık kaybı, solunum hızı ↑ Raf ömrü
Aljinat	Domates	↑ UV koruması, bariyer, termal ve mekanik özellikler ↓ Ağırlık kaybı
Aljinat, kitosan, zein, nişasta	Patates	↑ Raf ömrü ↓ Ağırlık kaybı ≈ Sertlik ve renk
Aljinat	Üzüm	↓ Ağırlık kaybı ≈ Sertlik, renk, fenolikler ↑ Antioksidan aktivite
Aljinat, selüloz	Çilek	↓ Renk değişimi ↓ Ağırlık kaybı ↑ Toplam fenolik ve flavonoid içerikleri
Aljinat, probiyotik bakteri ( <i>Lactobacillus casei LC-01</i> )	Taze kesilmiş yacon	↓ Ağırlık kaybı ↓ Kahverengileşme
Aljinat	Şeftali	↓ Ağırlık kaybı ↓ Solunum hızı ↓ Sertlik
Aljinat	Taze kesilmiş kavun	↓ Ağırlık kaybı ≈ Sertlik, renk

Çizelge 2.4 Polisakarit bazlı yenilebilir kaplamaların gıda üzerindeki etkileri (Cruz vd. 2023) (devam)

<b>Kaplama Malzemesi</b>	<b>Kaplanan Gıda</b>	<b>Kaplamamın Başlıca Etkisi</b>
Selüloz, kitosan, kurkumin	Kivi	↓ Ağırlık kaybı ↓ Solunum hızı ↑ Antimikrobiyal aktivite
Kitosan, sinnamaldehit	Portakal	↓ Ağırlık kaybı ≈ C vitamini ve askorbik asit içeriği
Kitosan	Mandalina	≈ C vitamini ve askorbik asit içeriği ↑ Raf ömrü
Kitosan	Tangerin narenciyesi	↓ Ağırlık kaybı ↓ Solunum hızı ↑ Antimikrobiyal aktivite
Kitosan, timol ve quinoa proteini	Çilek	↓ Ağırlık kaybı, ↑ Antifungal aktivite ≈ Lezzet ve aroma
Nişasta	Mango	↓ Kahverengileşme ↑ Antifungal aktivite
Guar zankı, aloe vera jeli	Mango	↑ Raf ömrü ↓ Ağırlık kaybı ≈ C vitamini ve askorbik asit içeriği
Arabik zankı, karragenan, ksantan zankı, limon otu esansiyel yağı	Çilek	↑ Raf ömrü ↓ Ağırlık kaybı ≈ Toplam antosiyanin, toplam fenolik ve askorbik asit

### 2.1.2 Protein bazlı yenilebilir film ve kaplamalar

Proteinler, 20 farklı amino asidin peptid bağları ile bağlandığı heteropolimerlerdir. Mısır, buğday, soya fasulyesi, yer fıstığı, süt ve jelatin gibi farklı kaynaklardan elde edilebilen proteinler, amino asit dizilimindeki farklılıklar sayesinde istenen ambalaj özellikleri geliştirilebilmektedir. Bu özellikler fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemlerle değiştirilebilmektedir. Protein bazlı filmler ve kaplamalar, hidrofobik bir yapıya sahip olmalarına rağmen su buharı difüzyonu geçirgenliği konusunda zayıf olarak kabul

edilmektedir. Ancak, karbondioksit ve oksijen geçirgenliği için iyi bariyer özellikleri göstermektedirler. Yenilebilir protein kaplamalarında gluten, kollajen, zein, kazein ve peynir altı suyu proteini kullanılmaktadır. Protein bazlı biyopolimerlere kazein, peynir altı suyu proteini, zein, gluten, bezelye proteini, keratin, kollajen gibi örnekler verilebilmektedir (Yousuf vd. 2018). Zein proteinine tannik asidin çapraz bağlandığı ve guava meyvelerinin kaplandığı çalışmada, guava meyvesinin ağırlık kaybının, yumuşamanın, etilen üretiminin ve oksijen geçirgenliğinin yavaşladığı ve azaldığı görülmüştür (Santos vd. 2018). Peynir altı suyu proteini ile mango kabuğu özü içeren yenilebilir kaplama üzerine yapılan çalışmada ise, brokolilerin renk, solunum hızı ve fenolik içerik parametrelerinin kontrol sebzelerine göre iyileştirildiği gözlemlenmiştir (Elsayed vd. 2022). Proteinler, su ile etkileşime girdiğinde jelleşme veya filmlenme özelliği göstermektedir. Bu özellikleri sayesinde gıda ürünlerinin yüzeyinde bir bariyer oluşturarak gaz ve nem geçişini engellemektedir. Böylece oksidasyonu ve mikrobiyal büyümeyi azaltmaktadırlar, bu da gıdanın bozulma sürecini yavaşlatmaktadır. Ayrıca, bu kaplamalar genellikle doğal ve yenilebilir olduğu için, gıda güvenliği açısından da tercih edilmektedir. Gıda endüstrisinde hem besin kaybını azaltmak hem de çevre dostu ambalaj çözümleri arayışında önemli bir yer tutmaktadır (Mihalca vd. 2021). Araştırmacılar, aktif paketlemede biyopolimer kullanımına yoğunlaşmıştır. Bu biyopolimerler arasında proteinler, çeşitli bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilmektedir. Moringa oleifera tohumları, %40 protein içeren önemli bir antioksidan kaynağıdır. Ayrıca, böcekler ve balık yan ürünleri de protein kaynağı olarak dikkate alınmaktadır. Mısır, buğday ve soya gibi bitkilerden elde edilen proteinler ile kolajen, keratin, kazein ve jelatin gibi hayvansal protein türleri bulunmaktadır ve birçok çalışma mevcuttur (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5 Protein bazlı yenilebilir kaplamaların formülasyonları, uygulama yöntemleri ve özellikleri (Mihalca vd. 2021)

Formülasyon	Kaplama Oluşturma Yöntemi	Özellikler
Sodyum kazeinat, balmumu ve yağ asitleri	Film emülsiyonları	↑ Sertlik, ↓ Su geçirgenliği
Jelatin, çözünebilir nişasta ve polioller	Sulu çözeltilerin kurutulması ile döküm tekniği	↓ Elastiklik ve gerilme mukavemeti (yüksek gliserol)
Sığır derisi ve domuz derisi jelatini	Döküm tekniği	↑ Su geçirgenliği jelatin içeriği
Jelatin ve kazein	Transglutaminaz ile çapraz bağlama	↑ Uzama
Peynir altı suyu proteini konsantresi ve sodyum kazeinat	Döküm tekniği	↑ Delinmeye karşı direnç
Süt proteinleri	Transglutaminaz katalizli polimerizasyon	↓ Nem transferi ↓ Su buharı direnci
Kitosan-peynir altı suyu proteini	Döküm tekniği	İyi nem içeriği ↓ Su aktivitesi
Ayçiçeği proteini	Döküm tekniği	↓ Suda çözünürlük ↓ Cam geçiş sıcaklığı

### 2.1.3 Lipid bazlı yenilebilir film ve kaplamalar

Lipid bazlı yenilebilir ambalajlar, doğal kaynaklardan elde edilen mumlar, asilgliseroller veya yağ asitleri bazlı kaplamalardır. Lipidler gıda ambalajlarına yüzey parlaklığı ve su buharına karşı bariyer sağlamakta etkilidir çünkü lipidler hidrofobik bir yapıya sahiptir. Ancak, lipid tabakaları genellikle kırılğan, opak ve mekanik dayanıklılığı düşük bir yapıya sahiptir. Lipid bazlı yenilebilir film ve kaplamalar, doğal yağlar ve lipidlerden (yağ asitleri, fosfolipitler vb.) elde edilen malzemelerdir. Bu kaplamalar, gıda ürünlerinin yüzeyine uygulanarak oksijen ve nem geçişini engelleyen bir bariyer oluşturmaktadırlar. Bu sayede gıdanın bozulma sürecini yavaşlatır, raf ömrünü uzatır ve tazeliğini korumaya

yardımcı olmaktadır. Lipid bazlı kaplamaların en önemli avantajlarından biri, gıdalara eklenen aroma ve tatları koruyabilmeleri, ayrıca yağda çözünebilen vitaminler ve biyoaktif bileşenler gibi besin maddelerini de içerebilmeleridir. Bununla birlikte, bu kaplamalar genellikle suya karşı düşük geçirgenlik gösterir, bu nedenle nemli gıda ürünleri için daha az etkili olabilmektedir. Ek olarak, lipid bazlı kaplamalar, gıda güvenliği açısından doğal ve yenilebilir olmaları nedeniyle tercih edilmektedir. Bu kaplamalar, çevre dostu ambalaj çözümleri arayışında önemli bir rol oynamaktadır ve gıda israfını azaltma hedeflerine katkıda bulunmaktadır. Çeşitli çalışmalar, lipid bazlı film ve kaplamaların taze, dondurulmuş veya işlenmiş gıdaların kalitesini korumada etkin olduğunu göstermiştir (Yousuf vd. 2018). Doğada ekonomik ve bol miktarda bulunmalarıyla bilinen lipitler, yenilebilir filmlerde ve kaplamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Geçtiğimiz birkaç yıl içinde, birçok çalışma, yalnızca lipit veya lipit bazlı kompozit kaplamanın, meyve ve sebzelerin hasat sonrası raf ömrünü uzatmak için avantajlı bir seçenek olarak başarıyla karakterize edildiğini bildirmiştir (Çizelge 2.6). Sonuç olarak yenilebilir yağ asitleri ve mumlar gibi lipit malzemeleri, esneklik ve hidrofobisite sağlamak amacıyla hidrofilik biyopolimerlere eklenerek yenilebilir filmler oluşturulmaktadır. Bu kaplamalar, neme ve oksijene karşı bariyer oluşturarak gıda kalitesini korur; ancak hızlı oksitlenme ve duyuşsal özellikleri olumsuz etkileme gibi sorunlar mevcuttur. Ayrıca, bazı lipitlerin katı olması uygulamayı zorlaştırmaktadır. Bu zorlukların üstesinden gelinmesi, lipit kaplamaların pratik hale gelmesi için önem arz etmektedir. Lipit kaplamaların yeni gıda ürünleri için kullanımını sınırlı kalmaktadır, bu nedenle gıdaların raf ömrünü uzatmak için bu alandaki araştırmaların artırılması gerekmektedir. Ayrıca, lipitlerin yenilebilir filmlerin özellikleri üzerindeki etkisine ilişkin araştırma eksikliği devam etmektedir. Bu nedenle, gelecekteki araştırma çabaları çeşitli lipit maddeleri içeren biyolojik olarak parçalanabilir yenilebilir filmlerin önemli özelliklerini incelemeye odaklanmalıdır. Ek olarak, etkileşim için diğer mekanizmalar araştırılmalı ve gıdaların kalitesini iyileştirme ve raf ömrünü uzatma potansiyellerini değerlendirmek için gıda sistemlerine uygulanması gerektiği düşünülmüştür (Devi vd. 2024).

Çizelge 2.6 Yenilebilir kompozit filmlerin işlevselliğini artırmak için lipid bileşenlerinin kullanımı (Devi vd. 2024)

Lipid bileşeni	Film tipi	Etki
“Candelilla wax” (%1-7 a/h)	Peynir altı suyu protein izolat bazlı film	↑ Filmin esnekliği ↓ WVP ↓ Çekme dayanımı azalırken ≈ Elastik modül ↑ Mekanik özellikler
“Shellac” (%20-60 a/h), stearik asit (%0-2 a/h)	Bezelye nişastası- “guar gum” film	↓ WVP ↓ Çekme dayanımı ≈ Elastik modül ↑ Mekanik özellikler
“Beeswax” (%25- 50 a/a)	Kitosan nanopartikül matrisi ve selüloz nanokristal film	↓ WVP ↓ Mukavemet
“Shellac”	“Konjac glukomannan-shellac” film	↑ Mekanik özellikler ↑ Bariyer özellikleri
“Rapeseed” yağı	Peynir altı suyu protein izolat film	↑ Hidrofilik yapı ↓ Nem içeriği
Balmumu	Agar/maltodekstrin film	↑Hidrofobik yapı ↓Su ve oksijen geçirgenliği
Karnauba mumu	Nişasta bazlı film	↑ Termal stabilite ↓ Mikrobiyal büyüme
Karnauba mumu	Aljinat ve peynir altı suyu protein bazlı film	↑ Mekanik özellikler ↑ Bariyer özellikleri

#### 2.1.4 Kompozit yenilebilir film ve kaplamalar

Kompozit kaplamalar, proteinler veya polisakaritler ile lipidlerin kombinasyonu olarak tanımlanmaktadır. Kompozit ambalajların temel amacı, protein veya polisakaritlerin güçlü mekanik yapısal özelliklerini lipidlerin güçlü su buharı bariyer özellikleriyle

birleştirerek ambalajın işlevselliğini artırmaktır (Yousuf vd. 2018). Kitosan, mősilaj ve lavandan oluşan biyobazlı kompozit kaplamalar tatlı kiraz meyvelerine uygulanmış ve hem pazar hem de soğuk depolama koşullarında hasat sonrası parametreler açısından test edilmiştir. Sonuçlar, tatlı kirazların raf ömrünün, kontrol meyvelerine kıyasla ağırlık kaybının ve fungal etkinin azaldığını, toplam flavonoid, L-askorbik asit ve oksalik asit gibi önemli hasat sonrası özelliklerin korunduğunu ve raf ömrünün uzadığını göstermiştir (Mujtaba vd. 2023). Bu tür kaplamalar, genellikle daha iyi mekanik özellikler, su buharı ve gaz geçirgenliği ile yüksek antimikrobiyal etkinlik sunmaktadır. Örneğin, polisakkarit bazlı bir film, protein veya lipid birleştirildiğinde hem esneklik hem de su geçirmezlik gibi istenen özellikleri geliştirebilmektedir. Ayrıca, biyoaktif bileşenlerin (vitaminler, antimikrobiyal ajanlar) entegre edilmesi, gıdanın besin değerini artırır ve raf ömrünü uzatmaktadır. Kompozit yenilebilir kaplamalar, evre dostu ve doğal olmaları nedeniyle gıda güvenliği açısından da avantaj sağlamaktadır. Bu kaplamalar, gıda israfını azaltma çabalarına katkıda bulunarak, sürdürülebilir ambalaj zmleri arasında önemli bir yer edinmektedir. Sonuç olarak, birden fazla biyopolimerin birleştirildiği kompozit yenilebilir filmler ve kaplamalar üzerinde yoğun bir araştırma mevcuttur (izelge 2.7). Bu kompozit yapılar, taze meyve ve sebzeler, et, süt ürünleri ve deniz ürünleri gibi farklı gıda sistemlerinin raf ömrünü ve kalitesini artırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, belirli bir kompozit film veya kaplamanın etkinliği, kullanılan biyopolimerlerin seçimine ve bunlar arasındaki uyumluluğa bağlıdır. Bu sistemlerin gerçek gıda ürünleri üzerindeki uygulanabilirliğini artırmak için duyuusal değerlendirme alanında daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Ayrıca, çeşitli polisakarit, protein ve lipid kaynaklarından elde edilen bu kompozit filmler, antimikrobialler, antioksidanlar, probiyotikler ve vitaminler gibi biyoaktif bileşenlerin korunması ve kontrollü salımı için taşıyıcı araçlar olarak da kullanılabiliceği raporlanmıştır (Devi vd. 2024).

Çizelge 2.7 Yenilebilir kompozit filmlerin işlevselliğini artırmak için aktif bileşenlerin gıda üzerinde kullanımını (Devi vd. 2024)

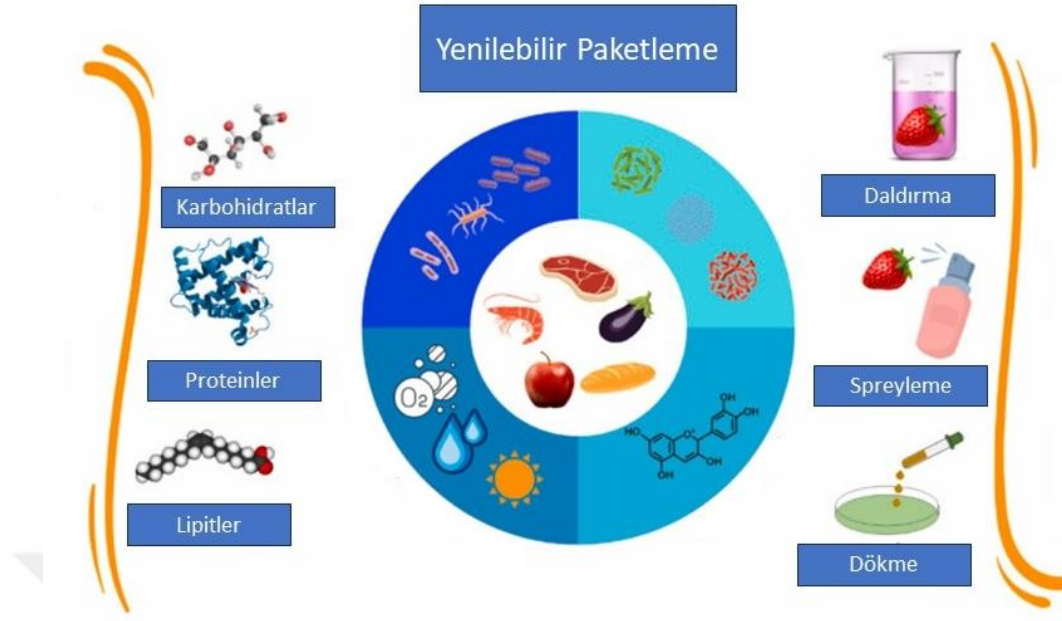
Meyve	Kaplama Malzemesi	Aktif Bileşenler	Kaplama Avantajları
Elma	Soya proteini, aljinat, CMC, kitosan	Kekik esansiyel yağı, tarçın kabuğu, ferulik asit, askorbik asit, üzüm çekirdeği esansiyel yağı	↑ UV koruması, bariyer, termal ve mekanik özellikler ↓ Ağırlık kaybı ↑ Antimikrobiyal aktivite
Böğürtlen	Nişasta	Asetik asit veya laktik asit	≈ Sertlik ve antosiyanin içeriği ↓ Mikroorganizmalar, küf ve maya sayıları
Yaban mersini	Kitosan	Yaban mersini yaprağı özü	↑ Raf ömrü ↓ Ağırlık kaybı, hastalık şiddeti
Narenciye meyvesi	Kitosan, jelatin	Nar kabuğu özütü, sinnamaldehit	≈ Sertlik, toplam fenolik ve askorbik asit içerikleri ↓ Patojen etkisi ↓ Ağırlık ve nem kaybı
Şeftali	CMC, kitosan, aljinat	Soya fasulyesi yağı, klorojenik asit, oleik asit, salisilik asit	≈ Sertlik, toplam fenolik ve askorbik asit içerikleri ↓ Mikroorganizmalar, küf ve maya sayıları
Armut	CMC, kitosan	Soya fasulyesi yağı, oleik asit, kimyon esansiyel yağları	≈ Sertlik ve antosiyanin içeriği ↓ Mikroorganizmalar, küf ve maya sayıları ≈ Renk, doku, toplam fenolik
Çilek	Aljinat, pektin, kitosan, MC, HPMC	Öjenol, kurkumin, limon ve kimyon esansiyel yağı	↓ Patojen etkisi ↓ Ağırlık ve nem kaybı ↑ Raf ömrü

## 2.2 Yenilebilir Film ve Kaplamaların Hazırlanması ve Uygulanması

Yenilebilir filmler hazırlamak için iki ana yöntem kullanılmaktadır: ıslak yöntem (çözücü dökme) ve kuru işlem (ekstrüzyon). Çözücü dökme yöntemi, biyopolimerlerin uygun çözücüde çözülüp katkı maddeleri ile karıştırıldıktan sonra bir petri kabına veya cam levha üzerine dökülmesi, kurutulması ve film tabakasının elde edilmesi olarak tanımlanmıştır (Basumatary vd. 2023). Çözücü dökme yöntemi, düşük sıcaklıkta homojen ve optik olarak şeffaf bir film elde edilmesini sağlamaktadır. Ancak, bu yöntem, uzun kuruma süresi, ticari ölçüğe dönüştürmedeki zorluklar, ısıya duyarlı maddelerin denatürasyonu ve toksik çözücünün biyopolimer yapısına geçmesi gibi dezavantajlara sahiptir (Suhag vd 2020). Ekstrüzyon yönteminde ise film bileşenleri karıştırılır, ardından sıkıştırılarak ekstrüde edilir, kurutulur ve şekil verilmektedir. Bu yöntemin temel avantajları, kısa sürede düşük enerji tüketimi ile ve minimum çözücü kullanımıyla daha çeşitli şekillendirme seçenekleri sunmasıdır. Ancak, bu yöntem için polimerlerin düşük neme ve yüksek sıcaklığa dayanıklı olması gerekmekte olup, ekipman maliyeti ve bakımı da yüksektir (Vazquez vd. 2023).

Yenilebilir kaplamaların gıdalara uygulanmasında kullanılan teknikler arasında fırçalama, püskürtme ve daldırma yöntemleri bulunmaktadır (Şekil 2.2). Daldırma işlemi, basit bir teknik olup laboratuvar ortamında kolayca uygulanabilmektedir. Daldırma, uygulanması kolay ve maliyet açısından avantajlı olduğu için en yaygın kaplama yöntemlerinden biridir. Bu metodoloji, kaplama sıvısının, süspansiyonun veya emülsiyonun kullanıldığı üç aşamadan oluşmaktadır: daldırma ve bekleme süresi, biriktirme ve çözücünün buharlaşması. İlk adımda, gıda kaplama sıvısına sabit bir hızda daldırılarak ve yüzeyi kaplama ile temas ederek kaplamayı hapsetmektedir. İkinci aşamada, daldırmadan sonra gıda sabit tutulur, bu sayede fazla kaplama dışarı atılır ve ince katmanlar elde edilmektedir. Son adımda ise, fazla kaplamanın buharlaşması sağlanmaktadır. Daldırma süresi gıda ürününe ve kaplamanın amacına göre 5 ila 30 saniye arasında değişmektedir. Bu yöntemin avantajları arasında gıdanın tüm yüzeyinin eşit şekilde kaplanması ve farklı yüzeylere uygulanabilmesidir, dezavantajları arasında kaplamanın çok kalınlaşması durumunda gıdanın solunumunu engelleyebilmesi ve mikroorganizmaların birikmesine yol açabilmesidir. Bu tekniğin avantajları, basit, kısa

ve düşük maliyetli olmasıdır; ancak, çok sayıda film çözeltisi kullanılması gerektiğinden hazırlık süreci uzun sürebilmektedir. Püskürtme, kaplama damlacıklarının gıda yüzeyine dağıtıldığı bir diğer yöntemdir. Bu yöntemde, düşük hızlı ve silindirik püskürtme akışını içeren hava püskürtme atomizasyonu, yüksek viskoziteli kaplamalar için hava destekli havasız atomizasyon ve basınçlı atomizasyon gibi çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Püskürtme yönteminde, basınç, viskozite, yüzey sıcaklığı ve kaplama gerilimi gibi unsurlar son kaplama performansını önemli ölçüde etkilemektedir. Püskürtmenin avantajları arasında çok katmanlı kaplama oluşturarak iki veya daha fazla farklı kaplamanın uygulanabilmesi ve kaplama kalınlığının kontrol edilebilmesidir. Bu yöntemin avantajları, daha az film çözeltisi kullanılması, kontaminasyon olasılığının düşük olması ve geniş yüzeyli gıdalara uygulanabilmesidir (Pinto vd. 2023). Fırçalama yönteminde ise film çözeltisi doğrudan gıdanın yüzeyine bir fırça ile sürülür; ancak, bu yöntemde yeterli film yayılımı ve katman kalınlığının kontrolü için uzmanlık gerektirmektedir. Hangi kaplama tekniğinin kullanılacağı, gıdanın türüne, büyüklüğüne, dokusunma ve yapısına bağlıdır. Örneğin, püskürtme yöntemi daha ince tabakalar oluşturmak için tercih edilirken, fırçalama yöntemi daha büyük boyuttaki gıdaların kaplanması için kullanılmaktadır (Tahir vd. 2019). Tava kaplama yöntemi, gıda maddelerinin dönen bir kabın içine yerleştirilip kaplamanın püskürtülmesi veya serpilmesi ile gıda yüzeyine homojen bir şekilde uygulanmasını sağlamaktadır. Ardından kaplama kurutulur. Bu yöntem, sert yüzeylerde ince veya kalın kaplama katmanları oluşturmak için idealdir ve boyut değişkenliği olsa bile çok sayıda gıda maddesinin aynı anda kaplanmasına olanak tanımaktadır. Ayrıca, şeffaf, esnek ve parlak bir kaplama malzemesi üretilmektedir. Ancak, işlem sırasında suyun buharlaşması gerektiği için bu sürecin zaman alıcı olabileceği ve kaplamanın kademeli olarak eklenmesi gerektiği için gıda maddelerinin birbirine yapışma riski bulunmaktadır (Tahir vd. 2019).



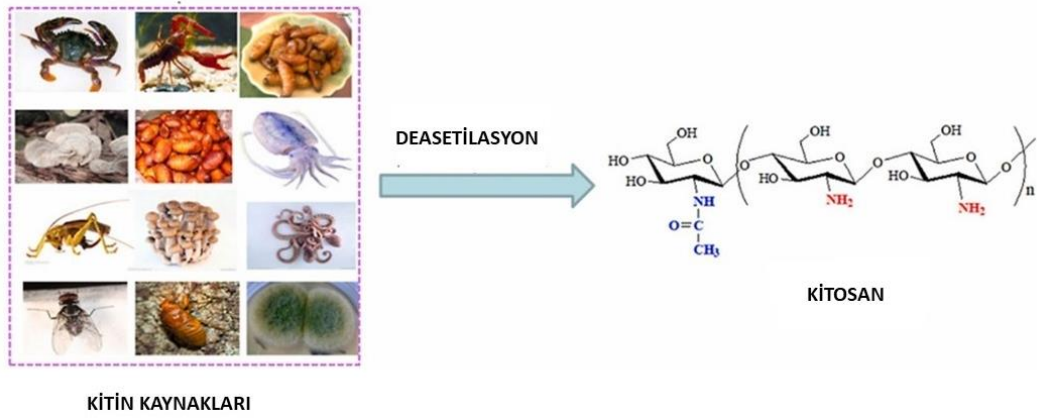
Şekil 2.2 Yenilebilir kaplamaların uygulanması

### 2.3 Kitosan Bazlı Yenilebilir Filmler

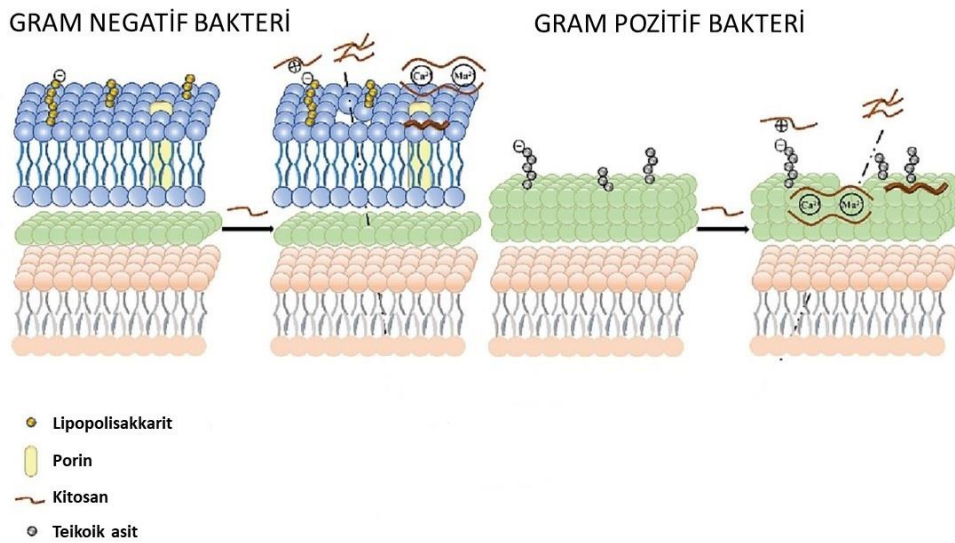
Kitosan, toksik olmayan, tatsız, biyoyumlu, antibakteriyel, antioksidan özelliklerle sahip doğal bir biyopolimerdir. Kabuklu deniz hayvanlarının dış iskeletlerinde, mantar hücre duvarlarında ve deniz canlılarının kabuklarında bulunan kitinin alkali ortamda deasetilasyonu ile elde edilmektedir (Şekil 2.3). Literatürde, meyve ve sebzelerin bozulmasını önlemek amacıyla kitosanı çok yaygın olarak kullanıldığı belirtilmiştir. Bunun en önemli sebeplerinden biri kitosanın çok sayıda amino ve hidroksil gruplarına sahip olmasıdır (Wang vd. 2024). Kitosanın deasetilasyon derecesi ve moleküler ağırlığı, kitosanın kimyasal özelliklerini etkilemektedir. Yüksek moleküler ağırlıklı kitosanın, daha güçlü moleküler arası hidrojen bağlarına sahip olduğu bunun da amino ve hidroksil gruplarının dış ortamla etkileşiminin azalmasına neden olduğu bilinmektedir. Buna karşılık, düşük moleküler ağırlıklı kitosanın daha zayıf moleküler arası hidrojen bağlarına sahip olduğu ve dolayısıyla daha fazla sayıda aktif amino grupları ve hidroksil gruplarına sahip olduğu raporlanmıştır (Qui vd. 2020). Örneğin, amino gruplarının sayısının artması kitosanın antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesinin arttığını göstermiştir. Kitosanın antibakteriyel etkisinin, negatif yüklü bakteri hücre duvarı ile pozitif yüklü amino grupları

arasındaki elektrostatik etkileşim sonucu bakterinin hücre zarının zarar görmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Şekil 2.4). Benzer şekilde, kitosanın antifungal etkisinin, mantarların negatif yüklü hücre duvarı ile kitosanın pozitif gruplarının etkileşimi sonucu fungal hücrelerin duvarının bozulmasından kaynaklandığı raporlanmıştır (Mondal vd. 2022). Kitosanın antioksidan özelliği ise, kitosanın amino ve hidroksil gruplarına atfedilmektedir. Kitosanın yapısındaki fonksiyonel gruplar ile gıdalarda oksidatif bozulma sonucu oluşan serbest radikaller arasında reaksiyon gerçekleşir, bu da serbest radikallerin sayısını azaltarak gıdaların raf ömrü uzatılmaktadır (Qui vd. 2020). Ayrıca, kitosanın meyve ve sebzelerde suyun buharlaşmasından kaynaklanan nem kaybını önleyerek bariyer görevi gördüğü raporlanmıştır (Chaiwong vd. 2020). Konsantrasyon, pH, sıcaklık, çözücü gibi etkenler kitosan film yapısını etkilemektedir (Riseh vd. 2023). Kitosan, farklı deasetillenmiş derecelerde ve moleküler ağırlıklarda ticari olarak üretilen, işlevsel özellikleri ve antimikrobiyal etkileri ile dikkat çeken bir bileşiktir. Mantarlar, mayalar ve bakteriler dahil olmak üzere birçok bozulma mikroorganizmasına karşı yüksek antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Özellikle narenciye, elma, mango, üzüm, çilek, yaban mersini, marul, havuç ve domates gibi çeşitli taze bahçe ürünlerinde hasat sonrası hastalıkların azaltılmasına yönelik olumlu etkileri rapor edilmiştir. Ancak, kitosanın antimikrobiyal aktivitesi; kitosan türü, asetilasyon derecesi, moleküler ağırlık, konsantrasyon, ortam pH'ı, hedef mikroorganizma ve kaplamadaki diğer bileşenlerin varlığı gibi birçok faktöre bağlıdır. Antimikrobiyal ve antifungal özelliklerinin yanı sıra, kitosanın memeliler için toksisite eksikliği, yenilebilirlik, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve birçok bileşikle biyouyumluluk gibi diğer önemli özellikleri de vardır. Bu nedenlerle, kitosan ve türevleri, hasat sonrası işleme ve taze meyve ve sebzelerin uzun süreli depolanması için etkili bir seçenek olarak değerlendirilmiştir (Tebar vd. 2023). Kitosan ve türevleri, taze turunçgillerin hasat sonrası korunması için en çok denenilen antifungal yenilebilir kaplamalar arasında yer almaktadır. Hem tek başlarına hem de diğer antifungal bileşenlerle formüle edilerek araştırılmışlardır. Kitosan ve kitosan bazlı kaplamaların en önemli araştırma uygulamalarını içeren bir özet, çizelge 2.8'de yer almaktadır; bu tabloda varsa ek antimikrobiyal ajanlar, hedef patojenler, antifungal aktivite değerlendirmeleri yer almaktadır. Bitkiler ve bitkisel ham maddeler, gıda endüstrisi ve diğer alanlarda potansiyel olarak kullanılan zengin bileşik kaynaklarıdır. Geleneksel olarak, bitkilerin

kök, gövde, çiçek, meyve ve dallarından elde edilen ham özütler, önleyici ve tedavi edici amaçlarla kullanılmaktadır. Antibakteriyel aktivite, genellikle bu biyoaktif bileşiklerin kombinasyonundan kaynaklanmaktadır. Son yıllarda, bitki özütlerini aktif gıda ambalaj filmleri ve yenilebilir filmlere, özellikle biyolojik olarak parçalanabilir polisakkarit ve kitosan filmlerine dahil etme üzerine araştırmalar yapılmıştır (Çizelge 2.8). Çeşitli bitki özütlerinin gıda koruması amaçlı ambalaj filmlerindeki antibakteriyel etkileri değerlendirilmiş, ancak film üretimindeki metodolojik tutarsızlıklar, farklı çalışmalar arasında karşılaştırma yapmayı zorlaştırmaktadır (Tebar vd. 2023).



Şekil 2.3 Kitinin deasetilasyonu ile kitosan oluşumu



Şekil 2.4 Kitosanın antibakteriyel etkisi

Çizelge 2.8 Akıllı ve aktif kitosan film uygulamaları (Tebar vd. 2023)

<b>Aktif Bileşenler</b>	<b>İşlev</b>	<b>Gıda</b>
Muz kabuğu özütü	Antioksidan	Elma
Mango yaprağı özütü	Antioksidan	Kaju fıstığı
Zeytin posası	Antioksidan	Fındık
Sitrik asit	Antioksidan	Yeşil biber
$\alpha$ -tokoferol	Antioksidan	Mantar
Baharat özleri	Antioksidan	Domuz eti
Üzüm çekirdeği özütü	Antioksidan/Antimikrobiyal	Sosis
$\epsilon$ -polilizin	Antioksidan/Antimikrobiyal	Dana filetosu
İnceltmiş genç elma polifenolleri	Antioksidan/Antimikrobiyal	Ot sazanı
Kayısı çekirdeği EO	Antioksidan/Antimikrobiyal	Ekmekek
Potasyum sorbat	Antimikrobiyal	Tereyağlı kek
Fıstık kabuğu ve pembe biber özü	Antimikrobiyal	Tavuk
Jelatin	Antimikrobiyal	Soyulmuş karides
Kestane özütü	Antimikrobiyal	Taze makarna

Sonuç olarak, kitosandan elde edilen yenilebilir filmler ve kaplamalar, şeffaf veya hafif sarımsı, pürüzsüz ve esnek özellikler taşıırken, yüksek mekanik dirence sahiptir. Bu materyaller hidrofilik, biyouyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir ve çok çeşitli gıda grupları için uygundur. Kitosanın önemli bir özelliği, mantarların yanı sıra gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı gösterdiği güçlü antimikrobiyal aktivitedir. Bu, kitosanın deasetilasyon derecesi, moleküler ağırlığı ve konsantrasyonu gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişim göstermektedir. Kitosan filmlerinin özellikleri, kullanılan katkı maddeleri ve formülasyon bileşenlerine göre farklılık göstermektedir. Oksijen ve karbondioksit geçirgenliği ile mekanik ve termal özellikler bu faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Ayrıca, kitosan, polifenolik bileşikler, bakteriyosinler, uçucu yağlar ve bitki özleri gibi biyoaktif maddelerin taşıyıcısı olarak yeni aktif ambalaj malzemeleri geliştirmede

kullanılabilmektedir. Antibakteriyel özelliklerin artırılması için kitosan filmleri, gümüş nanopartiküller ile birleştirilerek iyileştirilebilir; ancak bu teknoloji henüz gelişim aşamasındadır ve daha fazla araştırma gerektirmektedir. Bu filmlerin en büyük avantajlarından biri, biyoaktif bileşiklerin gıdalara yavaş ve kontrollü bir şekilde geçişini sağlamasıdır. Et, balık, süt ürünleri ve meyve-sebzeler gibi çeşitli gıda ürünlerinde lipid oksidasyonu ve mikrobiyolojik stabilite üzerindeki etkilerini değerlendirmek için birçok çalışma yapılmıştır (Tebar vd. 2023).

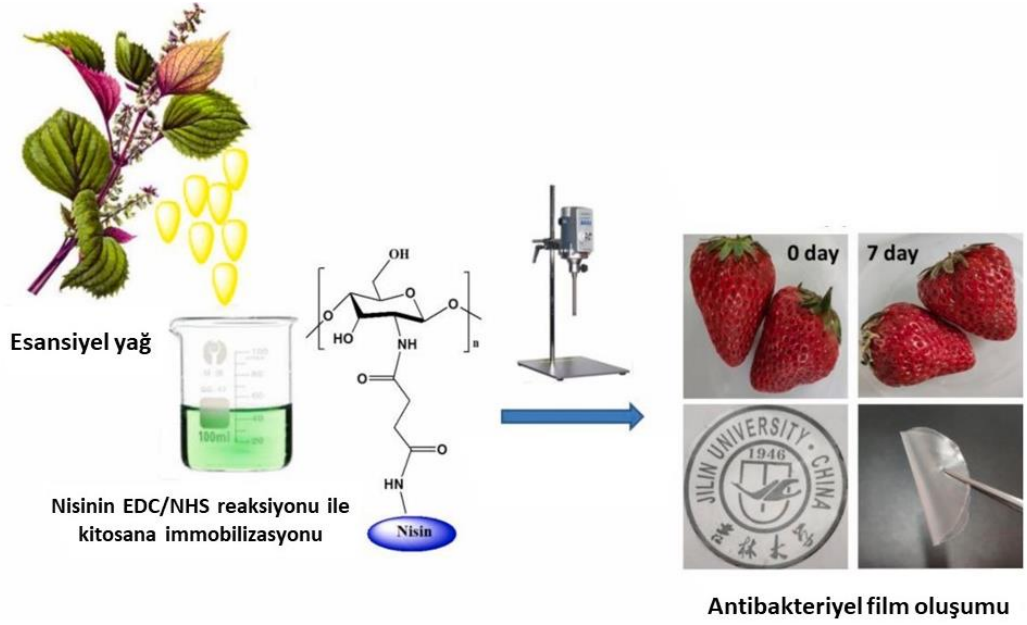
Özetle, Kitosan, selülozdan sonra en bol ikinci polisakkarit olan kitinden elde edilir. Endüstriyel düzeyde kitosanın ana kaynağı, kabukluların (karides, yengeç, ıstakoz) kabuklarıdır. Kitosanın üretimi, dekalsifikasyon, deproteinizasyon ve deasetilasyon gibi kimyasal işlemleri içermektedir. Geleneksel asidik ve alkali yöntemlerin çevreye zararlı etkileri nedeniyle, biyolojik yöntemler daha sürdürülebilir alternatifler olarak öne çıkmaktadır. Mikrodalga teknolojisi, geleneksel yöntemlere göre daha hızlı ve verimli bir alternatif olarak kullanılmakta, ekstraksiyon sürelerini önemli ölçüde azaltmaktadır. Ancak, kabuklu deniz ürünlerinden elde edilen kitin ile kitosan üretimi, alerjen ve kirletici kalıntılar nedeniyle zorluklar içermektedir. Bu bağlamda, algler kitin ve kitosan için potansiyel bir biyolojik kaynak olarak dikkat çekmektedir. Kitosan ve kitin ürünleri, dünya genelinde birçok üretici ve tedarikçi tarafından temin edilmektedir. Kitosan film ve kaplamalarının üretimi son yıllarda incelenmiş olsa da çoğu laboratuvar ölçeğinde kalmıştır. Döküm yöntemi yaygın olarak kullanılsa da endüstriyel ölçeklendirme için alternatif yöntemler gerekmektedir. Mekanik özelliklerin zayıflığı, kitosan filmlerinin bir diğer kısıtlayıcı yönüdür ve bu nedenle araştırmalar, filmlerin mekanik stabilitesini artırmak için farklı bileşenlerin eklenmesine odaklanmaktadır. Biyoaktif kitosan kaplamalar, gıda raf ömrünü uzatmada ve gıda kalitesini korumada etkilidir. Ancak, kitosan ve biyoaktif bileşikler arasındaki etkileşimlerin daha iyi anlaşılması ve yüksek sıcaklıklarda etkinliklerini koruma konusundaki zorluklar nedeniyle daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Ayrıca, bu ambalaj malzemelerinin ticari başarı için uzun süreli etkinlik göstermesi de kritik bir meseledir. Nanoteknoloji, bu sorunların üstesinden gelmek ve kitosan bazlı kaplamaların etkinliğini artırmak için umut verici bir yöntemdir (Tebar vd. 2023).

### 2.3.1 Kitosanın çapraz bağlayıcı ajanlar ile kimyasal modifikasyonu

Çok sayıda çalışma, polisakkarit bazlı kaplamaların taze meyvelerin kalitesini korumada etkili olduğunu göstermiştir. Bu kaplamalar, esas olarak bitkilerden elde edilen doğal antimikrobiyal maddeler için taşıyıcı görevi görebilmektedir. Solunum oranlarını azaltarak, kilo kaybını önleyerek, doku ve lezzeti koruyarak, mikroorganizmaların çoğalmasını ve metabolik aktivitelerini engellemeye yardımcı olmaktadır. Bitki kaynaklı antimikrobiyal bileşiklerin kaplamalara dahil edilmesi, hasat sonrası meyvelerde ve asgari düzeyde işlenmiş ürünlerde mikrobiyal kontaminasyonu etkili bir şekilde azaltmaktadır. Polisakkaritlerden yapılan yenilebilir kaplamalar, taze ve asgari düzeyde işlenmiş meyve ve sebzeler için koruyucu bir bariyer sağlamaktadır. Bu kaplamalar, iç gaz bileşimini kontrol edebilir, solunum oranlarını azaltabilir ve doğal antimikrobiyal bileşikleri bünyelerine katarak ürün kalitesinin korunmasına ve mikrobiyal kontaminasyonun azaltılmasına katkıda bulunabilmektedirler. Yenilebilir kaplamalar, geleneksel gıda ambalajlarıyla ilişkili çevresel endişeleri ele alırken, aynı zamanda gelişmiş ürün kalitesi ve daha uzun raf ömrüne yönelik tüketici taleplerine yanıt olarak ortaya çıkmıştır. Minimum işlenmiş meyveler için yenilebilir kaplamalar, her bir ürünün iç atmosferini kontrol ederek niteliksel değişiklikleri ve buna bağlı kayıpları azaltarak modifiye atmosfer ambalajına bir alternatif sunmaktadır. Ayrıca, ürünlerin raf ömrünü uzatmayı amaçlayan yarı geçirgen bir bariyer sağlamaktadırlar. Bu da nem, çözünen madde göçü, gaz değişimi ve solunum hızını (oksijen ve karbondioksite karşı seçici geçirgenlik nedeniyle) azaltarak gerçekleşmektedir. Kitosan, sahip olduğu amino ve hidroksil fonksiyonel gruplar sayesinde birçok kimyasal reaksiyona girebilmektedir; bu reaksiyonlara, asilasyon, esterleşme, eterleşme ve kovalent çapraz bağlama reaksiyonları örnek verilebilir. Bu reaksiyonlar,  $-NH_2$ ,  $-OH$ , glikozidik bağlar veya bu bağların kombinasyonlarını içeren çeşitli kitosan türevlerinin oluşumuna olanak sağlamaktadır. Bu reaksiyonlar ile modifiye edilen kitosanın, çözünürlük, elektrostatik yük, porozite ve mekanik dayanımı artırılmaktadır. Kitosanın en yaygın modifiye reaksiyonları EDC/NHS kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bunun dışında radikal modifikasyonlar, bromür ile modifikasyonlar ve Schiff bazlı modifiye yöntemleri bulunmaktadır (Chen vd. 2023). Literatürde, ana polimerik matris olarak kitosan kullanılarak geliştirilen aktif filmlerin çoğu, güçlü antioksidan ve antimikrobiyal özellikler taşımaktadır. Bu durumun başlıca

nedeni, son yıllarda meyveler, sebzeler, baklagiller ve tohumlarda yaygın olarak bulunan uçucu yağlar ile fenolik bileşikler gibi doğal kaynaklardan elde edilen aktif ajanlara yönelik artan ilginin olmasıdır. Bu aktif maddeler, biyolojik olarak parçalanabilir polimerik matrislerle birleştirildiğinde, gıda kaplamaları veya filmleri geliştirmek için umut verici bir araç sunmaktadır. Gıdaya doğrudan uygulanan bu aktif ajanlar, raf ömrünü uzatmaya ve gıda güvenliğini garanti altına almaya yardımcı olmaktadır. Örneğin, ağaç çayı, bergamot, karanfil tomurcuğu, tarçın ve okaliptüs globulus gibi çeşitli uçucu yağlarla birleştirilen kitosan filmleri hem antimikrobiyal hem de antioksidan özellikler göstermektedir.

EDC/NHS ile kitosanın çapraz bağlanarak modifiye edilmesi, yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Kısaca, EDC'nin kitosanın karboksil gruplarıyla reaksiyonu sonucunda kararsız O-asiloüre ara ürünü oluşur. Oluşan ara ürünler, NHS ile reaksiyona girerek yarı stabil NHS esterleri oluşturur. Kitosanın amino grupları, oluşan yarı stabil NHS ester ara ürünleri ile reaksiyona girerek amid bağları oluşturur ve ile modifiye kitosan elde edilir. Ancak, EDC/NHS ile yapılan kitosan modifikasyonunda pH değerinin kritik olduğu gözlemlenmiş ve optimum pH aralığının 5.5-8 olduğu belirtilmiştir (Chen vd. 2023). EDC/NHS ile modifikasyon yöntemi yüksek bir immobilizasyon sağlar, ancak fazla EDC ve NHS eklenmesi kompleks oluşumuna yol açabilmektedir (Hu vd. 2016). Bu nedenle, reaksiyon süresi, reaktant miktarı ve pH değeri oldukça önemlidir. Wang vd. (2021) tarafından yapılan çalışma, şekil 2.5'te gösterildiği gibi nisinin EDC/NHS ile kitosana immobilize edilerek oluşturulan ve perilla frutescens esansiyel yağının eklendiği kompozit kitosan filmlerin çileklerin raf ömrünü uzatmadaki etkisini incelemiştir. Perilla frutescens esansiyel yağının antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin, nisinin ise antibakteriyel etkisinin çileklerin bakteriyel kontaminasyonunu ve oksidatif bozulmasını engelleyerek çileklerin tazeliğini koruduğunu göstermiştir (Wang vd. 2021).



Şekil 2.5 Nisin ile immobilize edilmiş kitosan film üretimi (Wang vd. 2021)

Kitosana biyoaktif ajanların immobilizasyonu amacıyla çapraz bağlayıcı olarak izosiyanatların kullanıldığı çalışmaların sayısı oldukça azdır. İzosiyanatlar, amino grupları ile güçlü kovalent bağlar oluşturarak stabil ve güçlü yapılar elde edilmesini sağlar, bu da çapraz bağlama oranının artırarak etkili yapıların oluşmasına olanak sağlar. Literatürde, izosiyanatlar genellikle polilaktik asitin kitosana çapraz bağlanmasında kullanılmıştır. Örneğin, PLA ve kitosanın izosiyanat kullanılarak çapraz bağlandığı ve elde edilen malzemelerin mekanik özelliklerinin iyileştirildiği rapor edilmiştir. Birçok çalışmada izosiyanatların, polimerlerin çapraz bağlanmasında ve fonksiyonel özelliklerinin artırılmasında önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir (Tebar vd. 2023). Çalışmalar, kitosan filmlerine diğer aktif bileşiklerin eklenmesinin mekanik, bariyer ve işlevsel özellikleri üzerinde ilginç etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Ortaya çıkan sonuçlar, fenolik bileşiklerin varlığının hem mekanik hem de bariyer özelliklerini iyileştirdiğini göstermiştir. Filmlerin işlevsel özelliklerine gelince, esansiyel yağlar, fenolik bileşikler ve meyve özleri eklenerek filmlerin antimikrobiyal ve antioksidan kapasitesi önemli ölçüde iyileştirilmiştir.

## 2.4 Narenciye Meyvesi

Narenciye meyveleri, küresel olarak en çok üretilen ve ihraç edilen meyve cinslerinden biri olarak kabul edilmektedir. Başlıca Çin, Brezilya ve Hindistan gibi ülkelerde yetiştirilmektedir. Narenciye yetiştiriciliği dünya çapında yaklaşık 11,42 milyon hektardır ve yılda 179 milyon ton narenciye üretimi gerçekleştirilmektedir. 2017 yılında 73,3 milyon ton portakal, 33,4 milyon ton mandalina, 17,2 milyon ton limon, 9,5 milyon ton greyfurt ve 13,5 milyon ton diğer narenciye meyvelerinin üretimi gerçekleştirilmiştir. Çin, yıllık 82,7 milyon ton ile turunçgil meyveleri üretiminde lider ülkedir ve ardından 18,14 milyon ton ile Brezilya ve 1,053 milyon ton ile Hindistan gelmektedir. Turunçgiller insan beslenmesi ve gelişimi için önemli olan; potasyum, demir, kalsiyum, fosfor, magnezyum, C vitamini, fenolik bileşikler, hidrokisinnamik asit, flavonoid bileşikler ve kardiyovasküler hastalıkları ve kanser riskini azaltan biyoaktif bileşenler içermektedir. Turunçgiller, klimakterik meyveler gibi solunum hızı ve etilen üretiminde belirgin artışlar göstermedikleri için olgunlaşma süreçlerinde önemli değişiklikler yaşamazlar. Ancak, uygun bir şekilde işlenip depolanmadıklarında, önemli fizyolojik kayıplara maruz kalabilmektedirler. Bu kayıplar genellikle kilo kaybı ve fizyolojik bozukluklardan kaynaklanmaktadır. Su kaybı, doğrudan satılabilir ağırlığın kaybına yol açmanın yanı sıra, görünüm kayıpları (solma ve buruşma) ve yumuşama gibi olumsuz etkilerde bulunarak kaliteyi ve tüketici kabul edebilirliğini düşürmektedir. Düşük bağıl nemden yüksek bağıl neme ani geçişler, kabukta çukurlaşma, sap ucunda kabuk bozulması ve düğme dokusunun buruşması gibi fizyolojik bozuklukları tetikleyebilmektedir. Ayrıca, optimum olmayan sıcaklıklarda, donma noktasının üzerinde depolanan turunçgiller soğuk hasarına uğramaktadır; bu da kabuğun çökmesi ile kendini gösterir ve çeşitli semptomlar yaratabilmektedir. Mekanik hasarlar, genellikle hasat ve elleçleme sırasında meydana gelmektedir; kabuk aşınması, sert elleçleme ve diken delinmeleri gibi durumlar, fırça yanığı ve zebra derisi gibi belirtilerle sonuçlanabilmektedir. Sağlıklı turunçgiller, hastalıklı meyvelerin işlenmesi sırasında mantarların konidileriyle kontamine olabilmektedirler; kabuk sağlam olduğunda enfeksiyon gerçekleşmez, ancak yaralardaki sporlar, oda sıcaklığında hızlı bir şekilde enfeksiyona yol açabilmektedir. Ek olarak, *Geotrichum citri-aurantii*, *Aspergillus niger* ve *Rhizopus stolonifer* gibi diğer yara patojenleri de hasat sonrası kayıplara neden olabilmektedirler. Bu bağlamda,

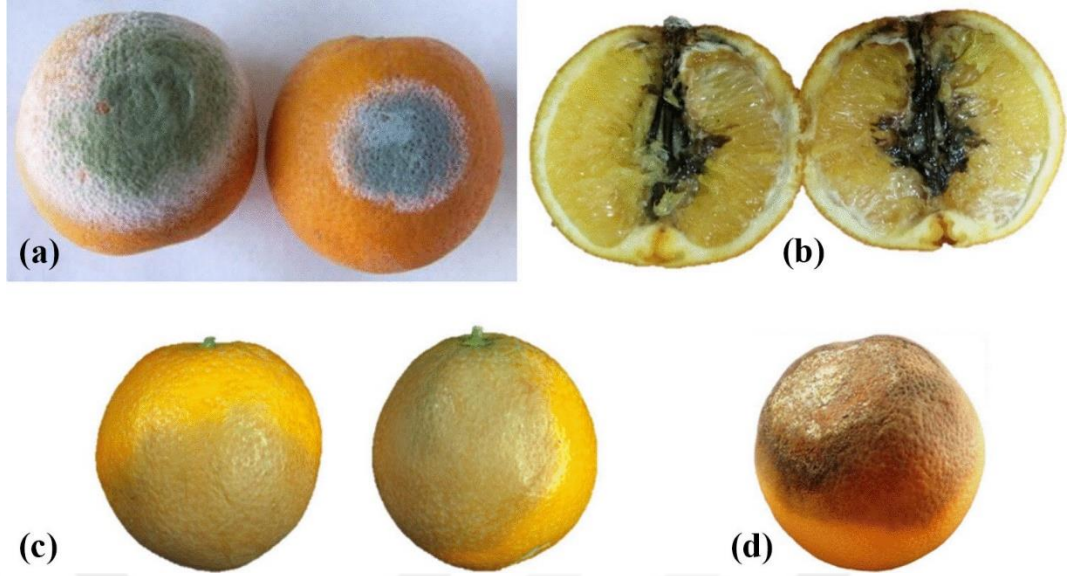
turunçgillerin hasat sonrası korunması için uygun depolama, işleme ve elleçleme yöntemlerinin önemi bir kez daha vurgulanmaktadır. Turunçgillerin, antioksidan, anti-inflamatuar, antikanser, nöroprotektif ve kardiyovasküler koruyucu özelliklerinin; fenolik asitler, flavonoidler, askorbik asit, ferulik asit, naringin, hidrosinamik asit, siyanürlü glukozit, alkaloidler, limonoidler ve uçucu yağlar gibi biyoaktif bileşiklerinden kaynaklandığı daha önceki çalışmalarda raporlanmıştır. Turunçgillerin temel çeşitleri portakal, misket limonu, mandalina, limon ve greyfurttur. Turunçgillerdeki bileşenler, narenciyenin türüne göre değişiklik göstermektedir. Örneğin, mandalina ve portakal C vitamini, antioksidan, lif, potasyum, flavonoid açısından zenginken, greyfurt daha yüksek miktarda antioksidan, antosiyanin ve C vitamini içermektedir (Kumar vd. 2024). Narenciyeler aynı zamanda en çok işlenen meyve türlerinden biridir. Örneğin, meyvelerinin suyu çıkarılarak şaraba fermente edilebilmektedir. Turunçgillerden yapılan gıda ürünlerine jöle, kek, turta, marmelat ve şekerleme örnek olarak verilebilir. Ayrıca, turunçgillerin kabuk, çekirdek ve posa gibi atık kısımlarının değerlendirilmesi gıda sektöründe büyük bir uygulama alanına sahiptir. Örneğin, narenciye kabukları kurutulmuş uçucu yağlar ve aromatik bileşikler üretmek için kullanılmaktadır. Ancak narenciyelerin hasat sonrası raf ömrü 1-2 hafta gibi kısa bir süredir. Akıllı ve aktif kitosan filmlerinin narenciye meyvesi üzerinde uygulamaları çizelge 2.9’da verilmiştir.

Çizelge 2.9 Akıllı ve aktif kitosan filmlerinin narenciye meyvesi üzerinde uygulamaları

Narenciye	Kaplama Malzemesi	Konsantrasyon (a/h)	Antimikrobiyal Ajan	Hedef Patojen
Misket Limonu	Kitosan	%2, 4, 6, 8	Limon otu yağı	<i>Penicillium digitatum</i> , <i>Penicillium italicum</i>
Mandalina	Kitosan	%1,0	–	<i>P. digitalatum</i>
Mandalina Greyfurt	CMC Kitosan	%1,0, %1,5	–	
Portakal	Oligokitosan	%1,5	–	<i>C. gloeosporioides</i>
Portakalı	Kitosan	%0,5	–	<i>P. digitatum</i>
Portakalı	Kitosan	%0,5	–	<i>P. digitatum</i>
Limonu	Kitosan	%0,5	–	<i>P. digitatum</i>
Greyfurt	Kitosan	%1	Bergamot otu	<i>P. digitatum</i>
Portakal	Kitosan	%2	Kekik ağacı yağı	<i>P. italicum</i>
Portakal	Kitosan	%2	–	<i>Guignardia citricarpa</i>

## 2.5 Narenciye Meyvesinin Hasat Sonrası Mantar Enfeksiyonu

Özellikle *penicillium italicum* ve *penicillium digitatum* gibi mantarlar, içerdikleri sitrin, patulin ve tremorgenik gibi insan sağlığı için toksik etkiler oluşturabilen mikotoksinler üretmektedir. Mikotoksinler, bağışıklık sisteminde büyüme bozuklukları, DNA hasarı ve böbrek hasarı gibi sağlık sorunlarıyla doğrudan ilişkilendirilmektedir. Narenciyelerde mavi-yeşil küflenmelere neden olan *Penicillium italicum* ve *Penicillium digitatum* gibi mantarlar, hasat sonrası bozulmanın ana nedenlerindedir ve bu durum, yetiştiriciler ve tedarikçiler için ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Özellikle, *P. digitatum* narenciye meyvelerinde %90 oranında hasat sonrası kayıplara neden olmaktadır. *G. citricarpa* ise siyah nokta ve ekşi çürüme hastalıklarına yol açarak, hücre dışı endo-polisakkaridaz salgılayarak doku bozulmasını hızlandırdığı bilinmektedir. *Alternaria* türleri, örneğin *Alternaria citri*, narenciyede siyah çürükler oluşturmaktadır (Şekil 2.6). Ayrıca, hasat ve sonrası işleme sırasında fiziksel hasarlar, narenciye meyvelerinde fizyolojik anormalliklere neden olabilmektedir. Narenciyelerin raf ömrünü uzatmak için düşük sıcaklıkta depolama, sentetik mum kaplama, kimyasal işlemler ve modifiye atmosferde depolama/paketleme gibi çeşitli hasat sonrası koruma yöntemleri uygulanmıştır. Ancak bu paketleme yöntemleri tüketiciler ve çevre için biyolojik olarak parçalanamadığından zararlıdır. Bu nedenle, maaliyetli ve sentetik olan geleneksel yöntemlere alternatif olarak sürdürülebilir ve yenilebilir kaplamalar geliştirmek için çok sayıda çalışma yapılmakta ve yapılmaya devam edilmektedir (Devi vd. 2023).

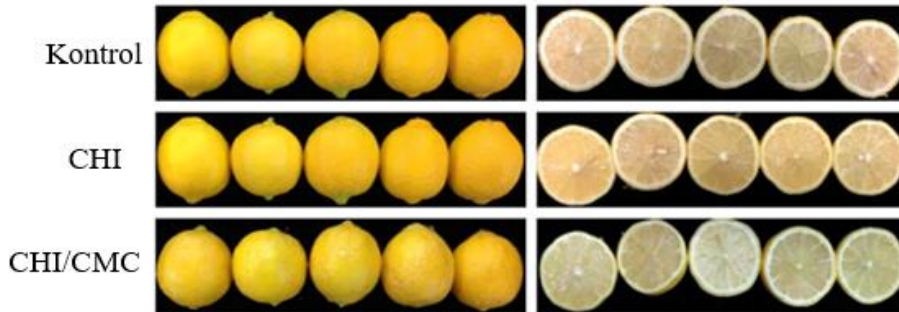


Şekil 2.6 Turunçgillerin mantar hastalıkları

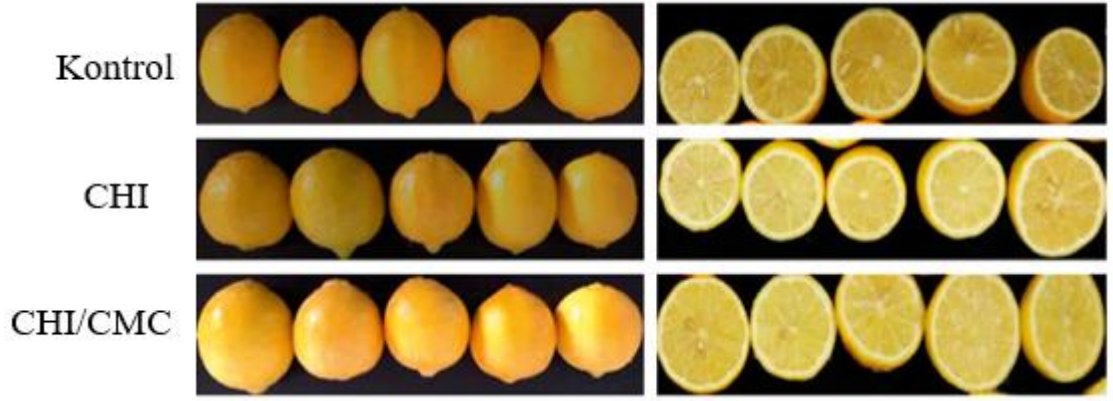
a) *P. Digitatum* ve *P. italicum*'un neden olduğu yeşil ve mavi küfler, b) *A. Alternata*'nın neden olduğu siyah çürükler, c) *Phytophthora citrophthora*'nın neden olduğu kahverengileşme d) *Colletotrichum gloeosporioides*'in neden olduğu antraknoz hastalığı

## 2.6 Narenciye Meyvesi İçin Yenilebilir Filmler ve Uygulamaları

Limonların hasat sonrası korunması amaçlanan Chen vd. 2020 tarafından yapılan çalışmada kitosan ve karboksimetilselülozün katman olarak birleştirilerek limonların sertliği, besin içeriği ve renk değişimini engellediği belirtilmiştir. Kontrol olarak kaplanmamış limonlar kullanılmış ve kitosan (CHI) ve kitosan/karboksimetilselüloz (CHI-CMC) arasındaki fark da gözlemlenmiştir (Şekil 2.7, 2.8).

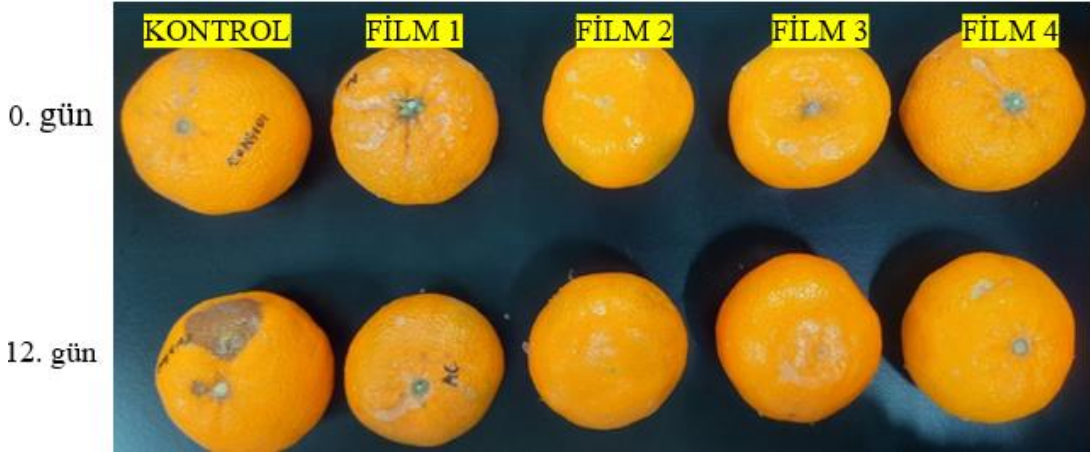


Şekil 2.7 Depolama öncesi kontrol, kitosan ve kitosan-karboksimetilselüloz ile kaplanan limonlar (Chen vd. 2020)



Şekil 2.8 Depolama sonrası kontrol, kitosan ve kitosan-karboksimetilselüloz ile kaplanan limonlar (Chen vd. 2020)

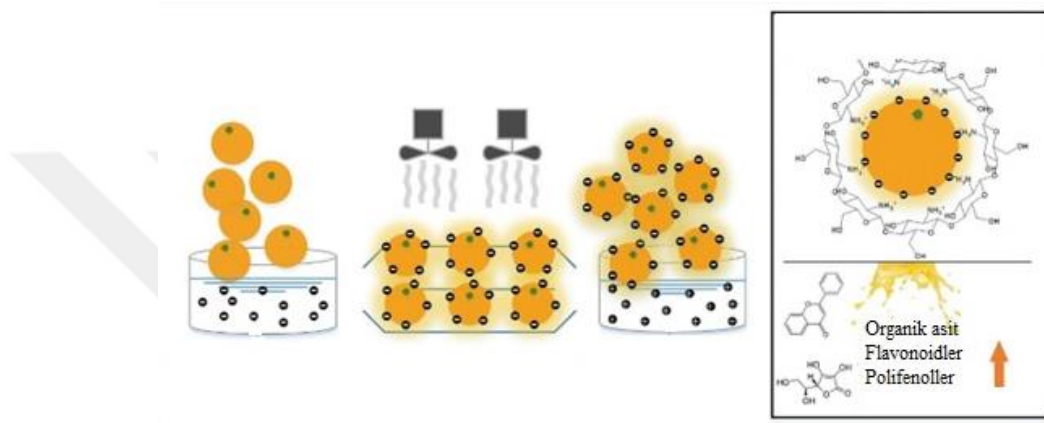
Mısır nişastası, fesleğen esansiyel yağı ve selüloz nanofiberler içeren emülsiyon yöntemi ile yenilebilir filmler hazırlanarak mandalina meyve kalitesini korumak amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda, mandalinaların kontrol grubuna kıyasla yenilebilir filmle kaplanan mandalinaların ağırlık kaybında azalma ve renk değerlerini korumada iyileşme gözlemlenmiş, bu da mandalinaların raf ömrünün uzadığını göstermiştir (Wigati vd. 2023). Şekil 2.9’da farklı oranlarda selüloz kullanılarak kaplanan mandalinaların 12 gün depolama sonrasındaki görüntüleri verilmiştir.



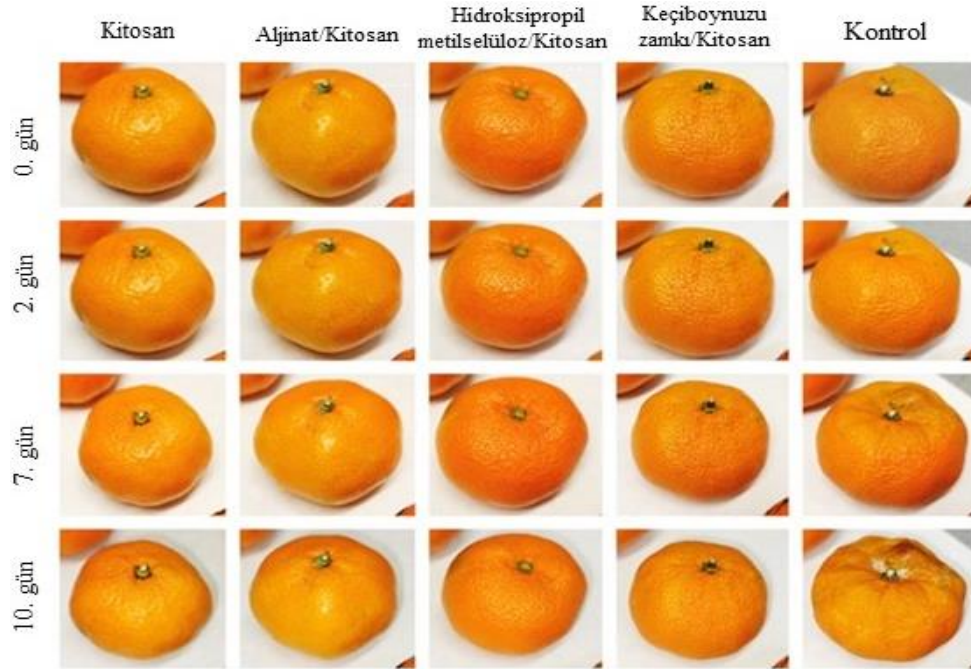
Şekil 2.9 Mısır nişastası, fesleğen esansiyel yağı ve selüloz nanofiberler ile kaplanan mandalinalar (Wigati vd. 2023)

Mandalinaların hasat sonrası korunması amacıyla yapılan çalışmada dört farklı çözelti hazırlanmıştır: kitosan çözeltisi, aljinat/kitosan çözeltisi, hidroksipropil

metilselüloz/kitosan çözeltisi ve keçiboynuzu zamkı/kitosan çözeltisi (Şekil 2.10). Sonuçlar, mandalinaların antioksidan aktivitesinde, renk parametrelerinde ve besin içeriklerinde iyileşme sağlandığını göstermiştir (Juric vd. 2023). En iyi iyileşme hidroksipropil metilselüloz/kitosan çözeltisi ile kaplanan mandalinalarda görülmüştür (Şekil 2.11). Kitosanın, *P. digitatum*'un neden olduğu yeşil küf üzerinde etkisi, çeşitli çalışmalarda incelenmiştir. Aşılardan önce limon meyvesine kitosan uygulandığında, aşılı kabuk yaralarında mantar gelişimi neredeyse yok denecek kadar azalmıştır.



Şekil 2.10 Farklı çözeltilerin mandalinalara katman olarak uygulanması (Juric vd. 2023)



Şekil 2.11 Mandalina meyvelerinin oda sıcaklığında zamanla değişimi (Juric vd. 2023)

Kitosan, hem *in vitro* hem de *in vivo* deneylerde %0,02 ila %0,5 konsantrasyonlarda test edilmiştir. *In vitro* testlerde %0,1'den yüksek konsantrasyonlar, patojen büyümesini tamamen engellemiştir. *In vivo* çalışmalarda ise %0,5 konsantrasyonda uygulanan kitosan, "Valencia" ve "Washington Navel" portakalları, "Femminello" limonları ve "Marsh Seedless" greyfurtları üzerinde yeşil küf gelişimini önemli ölçüde azaltmıştır. Kitosanın antifungal etkileri, patojen üzerinde doğrudan bir fungitoksik aktivite ile ilişkilendirilmektedir. Başka bir çalışmada, *P. digitatum* veya *P. italicum* ile aşılamaadan 24 saat önce "Göbek" portakallarınakitosan uygulandığında, 20 °C'de 23 gün sonra hastalık insidansı ve şiddetinin kaplanmış örneklerde kaplanmamış kontrollere göre önemli ölçüde daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Kitosanın antifungal aktivitesi, yeşil küfe karşı mavi küfe göre daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, kitosan uygulaması, peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi enzimlerin aktivitelerini artırmış, glutatyon ve hidrojen peroksit seviyelerini yükseltmiştir.

Chen vd. düşük (15 kDa) ve yüksek (357 kDa) moleküler ağırlıklı kitosan kaplamalarının yeşil ve mavi küf gelişimi ile "Murcott" mandalinalarının kalitesi üzerindeki etkilerini incelemiştir. %0,2 oranındaki düşük moleküler ağırlıklı kitosan, her iki küfe karşı da etkili antifungal aktivite göstermiş ve meyvenin sertliği, titrasyon asitliği, askorbik asit seviyesi ve su içeriğini iyileştirmiştir. Düşük moleküler ağırlıklı kitosanın performansı, sentetik kimyasal fungusit tiyabendazol ile karşılaştırıldığında benzer seviyelerde etkili bulunmuştur. Bir başka çalışmada, iki farklı moleküler ağırlığa (92,1 kDa ve 357,3 kDa) sahip kitosanın (%0,05-%0,2) *P. digitatum* ve *P. italicum*'a karşı antifungal aktivitesi ve "Tankan" meyvesinin hasat sonrası kalitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Kitosanın etkinliği, türüne ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişim göstermiştir. Kitosan, 24°C'de inkübasyon sırasında patojenlerin büyümesini ve çürüten meyve yüzdesini azaltmıştır. Ayrıca, kitosana muamele edilen meyveler, buzdolabında uzun süreli saklama sırasında iyi kimyasal ve fiziksel özellikler göstermiştir. Deng vd., kitosanın enzimatik hidrolizinden elde edilen bir türev olan oligokitosanın, *C. gloeosporioides* ile aşılama portakallardaki antraknoz gelişimi üzerindeki etkisini incelemiştir. Oligokitosana tedavi edilen meyveler, kontrol meyvelerine göre daha düşük hastalık insidansı ve şiddeti göstermiştir. Yazarlar, bu tedavinin meyve kabuğundaki doğal antifungal bileşiklerin içeriğini ve savunma enzimlerinin aktivitesini artırarak hastalıklara karşı güçlü bir direnç

gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca, glikolkitosan da tek başına veya diğer tedavilerle birlikte portakal ve limonlarda yeşil küf kontrolü için test edilmiştir. İki narenciye çeşidi olan "Fortune" mandalinaları ve "Valencia" portakalları, ticari bir kitosan bazlı kaplama ürünü ile kaplanmış ve çürüme, fungistatik etki ve meyve kalite özellikleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Kaplamalı meyvelerin olgunlaşma süreci ve çürüme gelişimi, manyetik rezonans görüntüleme tekniği ile takip edilmiştir. Sonuçlar, kitosan ürününün her iki narenciye türünde de olgunluğu geciktirdiğini ve çürümeyi azalttığını göstermiştir; bu, "Fortune" mandalinalarının ve "Valencia" portakallarının sırasıyla 6 ve 22 hafta boyunca etkili bir şekilde korunmasını sağlamıştır. Brezilya'daki çalışmalar, kitosan kaplamalarının "Valencia" portakallarında, sekiz gün boyunca 25°C'de veya 21 gün boyunca 3°C'de depolandığında *Phyllosticta citricarpa*'nın neden olduğu önemli bir karantina hastalığı olan siyah noktanın gelişimini önleme potansiyelini ortaya koymuştur.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu bölümde tez çalışması kapsamında gerçekleştirilmiş olan deneysel çalışmaların yöntemleri ile ilgili bilgiler sunulmaktadır. Öncelikle deneysel çalışmalarda kullanılan malzemeler tanımlanmıştır. Ardından, kitosan polimerine biyoaktif antifungal ajan olan *lemon medium* (LM)'nin immobilizasyonu ve modifikasyon yöntemleri açıklanmıştır. Son olarak, LM ile immobilize edilmiş kitosan yapıların (CHI-EDC/NHS-LM, CHI-DSS-LM, CHI-EELDI-LM, CHI-DDI-LM) karakterizasyonlarına değinilmiştir. Uygun yöntemler ile karakterize edilen kitosan ve modifiye kitosan yapılarla gerçekleştirilen ve hasat sonrası çürümeye neden olan fungal suçlar ile antifungal aktivite çalışmaları açıklanmış ve modifiye kitosan yapıların toksisitesinin belirlenmesine yönelik olarak yürütülen *in vitro* sitotoksite çalışmalarına değinilmiştir.

#### 3.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler

Tez çalışması kapsamında kullanılan kitosan (CHI, deasetilasyon derecesi  $\geq$  %75, orta molekül ağırlığı), Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Suberat Bis(sulfosüksinimidil) sodyum tuzu (DSS), Santa Cruz (Amerika) firmasından satın alınmıştır. L-lizin etil ester dihidroklorür (EELDI), Alpha Aesar firmasından temin edilmiştir. Dimeryl-diizosiyanat (DDI), Molekula firmasından satın alınmıştır. Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDC), N-hidroksi sukkinimid (NHS), asetik asit (AA), 2-morfolinoetansülfonik asit tampon çözeltisi (MES) ve fosfat tampon çözeltisi hazırlamada kullanılan tabletler (PBS, pH: 7.4), Sigma-Aldrich firmasından satın alınmıştır.

#### 3.2 Antifungal Lemon Medium (LM) Sentezi

Biyoaktif antifungal ajan LM, Valensiya Üniversitesi Önleyici Tıp ve Halk Sağlığı, Gıda Bilimleri, Adli Tıp ve Toksikoloji Bölümünde sentezlenmiş ve temin edildiği hali ile kullanılmıştır. Sentez yöntemi kısaca, limon kabuğu tozunun fermantasyonu temeline dayanmaktadır. 50gr Limon kabuğu tozu ve 400 mL distile su, 150 rpm'de 5 dakika

karıştırılarak homojenleştirilmiştir. Ortaya çıkan sıvı besiyeri, 8 µm parçacık boyutu aralığına sahip kalitatif filtre kağıdından (Whatman® Filtre kağıdı, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) süzülmüştür. Limon kabuğu suyuna 1:5 oranında sulu bir besin çözeltisi (%0,49 glikoz, %0,49 maya ekstraktı, %0,49 tripton, %0,12 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, %0,31 NaCl, %0,12 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, %0,01 MgSO<sub>4</sub> ve %0,003 MnSO<sub>4</sub>) ilave edilerek fermantasyon işlemi başlatılmıştır. Lemon Medium üç gün boyunca 37°C'de fermente edilmiştir. Daha sonra fermente edilmiş LM sterilizasyon için 121°C'de 21 dakika boyunca otoklavlanmıştır (Spada vd. 2021).

*Lactoplantibacillus plantarum* suşu 5H1, üstel faz büyümesine (12 saat) ulaşılan kadar Man Rogosa ve Sharpe broth (MRS-B) (Oxoid, Dublin, İrlanda) besi ortamında 37°C'de büyütülmüştür. Daha sonra sterilize edilmiş LM ortamı, 1:100 (h/h) oranında bir *L. plantarum* 5H1 süspansiyonu ile aşılanmıştır ve 72 saat boyunca 37°C'de 120 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında elde edilen ve antifungal biyoaktif ajanı içeren ortam, sprey kurutma ekipmanı OLT-SD8000B (XIAMEN Ollital Technology Co., Ltd., Xiamen, Fujian, Çin) kullanılarak kurutulmuş ve toz haline getirilmiştir (AntiFun-LM) (Palou vd. 2015).

### **3.3 LM ile Modifiye Edilmiş Kitosan Yapıların Sentezi (CHI-LM)**

Kitosan polimerine, biyoaktif antifungal ajan LM'nin immobilizasyonu dört farklı çapraz bağlayıcı ajan (EDC/NHS, DSS, EELDI ve DDI) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Immobilizasyon çalışmalarında farklı reaktif grupların aktive edilmesi ile LM bağlı modifiye kitosan yapılar elde edilmiştir.

#### **3.3.1 EDC/NHS reaksiyonu ile LM bağlı kitosan sentezi (CHI-EDC/NHS-LM)**

EDC/NHS kullanılarak antifungal ajan LM'nin kitosana immobilize edildiği çalışmalar karbodiimid kimyası ile gerçekleştirilmiştir. CHI-EDC/NHS-LM sentezi biyoaktif ajan LM'nin karboksil gruplarının aktif hale getirilmesi ve aktif LM'nin CHI polimerinin amino ve hidroksil grupları ile reaksiyonunun gerçekleştirildiği iki aşamadan

oluşmaktadır. Öncelikle kitosan çözeltisi (%1 (a/h), %0,7 (h/h) AA içerisinde, 25mL) hazırlanmıştır. Sentezin ilk aşamasında EDC ve NHS, MES tampon çözeltisi (12mM, 20mL) içerisinde çözülmüştür. Bu çözeltiliye 120 mg LM eklenerek 1 saat boyunca manyetik karıştırıcıda buz banyosu içerisinde reaksiyon gerçekleştirilmiş ve LM aktif hale getirilmiştir. Sentezin ikinci aşaması için önceki reaksiyon sonucunda elde edilen aktif LM çözeltisi, önceden hazırlanan CHI çözeltisine (%1 (a/h), 25mL %0,7 (h/h) AA içerisinde) manyetik karıştırıcı üzerinde damla damla eklenmiş ve 12 saat süreyle oda sıcaklığında karıştırılmıştır. CHI-EDC/NHS-LM sentezi için LM miktarı sabit tutulmuş ve reaksiyon oranı CHI:EDC:NHS/0.064:30:30 mM olarak belirlenmiştir. Reaksiyon sonucunda elde edilen LM ile modifiye edilmiş kitosan yapıdan (CHI-EDC/NHS-LM) reaksiyona girmeyen maddelerin uzaklaştırılması amacıyla çözelti 72 saat boyunca saf suya karşı diyaliz edilmiştir (*cut off 14,000*). Diyaliz sonrası petri kabına alınan çözelti -20°C'de dondurulduktan sonra liyofilizatörde (Christ-Alpha 2-4 LD) kurutularak toz haline getirilmiştir.

### 3.3.2 DSS çapraz bağlayıcı ajan ile LM bağlı kitosan sentezi (CHI-DSS-LM)

Antifungal ajan LM'nin kitosana immobilizasyonunda kullanılan diğer bir çapraz bağlayıcı ajan, homobifonksiyonel amin-amin çapraz bağlayıcı ajan DSS'dir. Sentez işleminde kullanılmak üzere CHI çözeltisi (%1 (a/h), %0,7 (h/h) AA içerisinde, 25mL) hazırlanmıştır. Öncelikle LM'nin amino gruplarının aktif hale getirilmesi amacıyla; 120 mg LM, PBS (pH: 7.4, 5mL) içinde çözülmüştür. Bu çözeltiliye 9 mg DSS eklenmiştir ve 2 saat süreyle oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Aktif LM çözeltisi, kitosan çözeltisine damla damla eklenerek 8 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmaya devam edilmiştir. Reaksiyon sonucunda elde edilen modifiye edilmiş kitosan yapı (CHI-DSS-LM) 72 saat boyunca saf suya karşı diyalize edilmiştir (*cut off 14,000*). Diyaliz sonrası petri kabına alınan çözelti -20°C'de dondurulduktan sonra liyofilizatörde kurutulmuştur.

### 3.3.3 Çapraz bağlayıcı ajanlar (EELDI veya DDI) ile LM bağlı kitosan sentezi

İzosiyanat yapısındaki EELDI veya DDI çapraz bağlayıcı ajanların kullanıldığı immobilizasyon çalışmalarında, öncelikle antifungal ajan LM'nin amino gruplarının aktif edilmesi amaçlanmıştır. EELDI ile yapılan immobilizasyonda ilk olarak 120mg LM, PBS (pH: 7.4, 5mL) içerisinde çözülmüştür. Bu çözeltiye 1µL EELDI eklenerek 40°C'de 1 saat manyetik karıştırıcı üzerinde su banyosu içerisinde karıştırılmış ve LM yapısında bulunan amino grupları aktif hale getirilmiştir. Ardından oda sıcaklığına getirilen çözelti, damla damla önceden hazırlanan CHI çözeltisine (%1 (a/h), %0,7 (h/h) AA içerisinde, 25mL) eklenerek 30 dakika 40°C'de manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Sonrasında elde edilen çözelti oda sıcaklığına soğutulduktan sonra 4 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Ardından elde edilen çözelti 8 saat süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir. Reaksiyon sonucunda elde edilen modifiye LM bağlı kitosan yapı (CHI-EELDI-LM) 72 saat saf su içerisinde diyalize edilmiştir (*cut off* 14,000). Diyaliz sonrasında petri kabına alınan çözelti -20°C'de dondurulduktan sonra liyofilizatörde kurutulmuştur. DDI çapraz bağlayıcı ajanı ile gerçekleştirilen immobilizasyon işlemi için tüm açıklanan işlemler aynı şekilde uygulanmış ancak 1µL EELDI yerine 1µL DDI kullanılmıştır. Immobilizasyon işlemleri sonunda elde edilen yapılar CHI-EELDI-LM ve CHI-DDI-LM olarak adlandırılmıştır.

### 3.4 LM ile Modifiye Edilmiş Kitosan Yapıların (CHI-LM) Karakterizasyonu

LM ile modifiye edilmiş tüm kitosan yapıların (CHI-LM) karakterizasyon çalışmalarında toz halinde veya film formunda örnekler kullanılmıştır. Film formunda örneklerin hazırlanması amacıyla, toz/liyofilize formdaki CHI-LM yapılar %0,7 (h/h)'lik AA içinde %1 (a/h) oranında çözüldükten sonra petri kaplarına dökülerek 24 saat boyunca 30°C'de kurutulmuş ve film haline getirilmiştir. Fourier dönüşümlü kızılötesi – zayıflatılmış toplam yansıtma (FTIR-ATR) ve diferansiyel taramalı kalorimetre ve termogravimetrik (TGA-DSC) analizleri CHI-LM yapıların liyofilize/toz hali kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM), su-temas açısı ölçümleri (WCA), şişme kapasitesi tayini, su buharı geçirgenliği (WVP) ve optik özellikler ise film formundaki CHI-LM örnekler kullanılarak analiz edilmiştir.

### **3.4.1 CHI-LM toz yapıların FTIR-ATR analizi**

Kitosan (CHI) ve kitosanın LM ile modifikasyonu sonrası (CHI-LM) elde edilen liyofilize edilmiş yapıların kimyasal yapılarının tayini amacıyla ATR modunda 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyu aralığında 4  $\text{cm}^{-1}$  çözünürlükte FTIR-ATR (Thermo Scintefic Nicolet iS10) analizleri gerçekleştirilmiştir.

### **3.4.2 CHI-LM toz yapıların termal analizi**

Kitosan ve LM ile modifiye edilmiş kitosan yapıların bozunma davranışı termogravimetrik analiz ve diferansiyel taramalı kalorimetre cihazı (TGA/DSC, SDT 650 *Simultane*) ile belirlenmiştir. Analizler azot ortamında 25-800°C aralığında ve 10°C/dk ısıtma hızında gerçekleştirilmiştir.

### **3.4.3 CHI-LM filmlerin morfolojik yapı tayini**

CHI ve CHI-LM yapılar ile hazırlanan filmlerin yüzey morfolojileri taramalı elektron mikroskopisi (SEM, QUANTA 400F *Field Emission*) ile analiz edilmiştir. Örnekler, görüntülemeye önce alüminyum numune tutuculara monte edilmiş ve Au-Pd ile kaplanmıştır.

### **3.4.4 CHI-LM filmlerin ıslatılabilirlik tayini**

Kitosan ve LM yüklü modifiye edilmiş kitosan filmlerin ıslatılabilirlik özellikleri su-temas açısı ölçümleri (WCA *Kruss DSA30*) ile belirlenmiştir. Filmler lamellere sabitlendikten sonra filmlerin 3 farklı noktası üzerine yaklaşık 2  $\mu\text{L}$  hacminde saf su damlası damlatılmış ve WCA değerleri kaydedilmiştir. Analiz 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Karakeçili vd. 2007).

### 3.4.5 CHI-LM filmlerin su tutma kapasitesinin tayini

CHI ve CHI-LM filmlerin su tutma kapasitesini belirlemek amacıyla şişme deneyleri gravimetrik analiz ile gerçekleştirilmiştir. Film formundaki numunelerin (2x2cm) ilk ağırlıkları tartılıp 37°C'deki PBS (pH:7.4, 5mL) içerisine yerleştirilmiştir. 37°C'deki PBS içerisinden alınan filmlerin fazla suyu filtre kağıdına emdirilerek belirli zaman aralıklarında filmler sabit tartıma ulaşana kadar ölçüm alınmıştır. Filmlerin yüzde şişme oranı (SR) **eşitlik 3.1** yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\% SR = \frac{A_t - A_0}{A_0} \times 100 \quad (3.1)$$

Bu eşitlikte;  $A_0$  filmin kuru kütleini,  $A_t$  ise sabit ağırlığa ulaşılan t zamanındaki film kütleini ifade etmektedir.

### 3.4.6 CHI-LM filmlerin su buharı geçirgenliği tayini

CHI ve CHI-LM filmlerinin su buharı geçirgenliğini belirlemek amacıyla WVP analizleri gerçekleştirilmiştir. Öncelikle liyofilize örneklerin film haline getirilmesi için film çözeltileri (%1 (a/h), %0,7 (h/h) AA içerisinde, 20mL) hazırlanmıştır. Hazırlanan film çözeltileri cam petrilere (8cm çap) dökülüp 30°C'de kurutularak  $5 \times 10^{-5}$ m kalınlıkta filmler elde edilmiştir. Filmlerin su buharı geçirgenliği ASTM E96 standartlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca, WVP analizi için  $5 \times 10^{-3}$ m<sup>2</sup> ağız genişliğine sahip cam bir kap kullanılmıştır. Cam kap, 100mL saf su ile doldurulduktan sonra kabın üzeri hazırlanan film ile kapatılarak düzenek desikatöre konulmuştur. Film ile ağzı kaplanan cam kabın ilk ve 24 saat sonundaki kütleleri tartılmıştır. Filmlerin su buharı geçirgenliği **eşitlik 3.2** kullanılarak hesaplanmıştır.

$$WVP \left( \frac{g}{s.m.Pa} \right) = \frac{\Delta a.x}{\Delta t.A.\Delta P} \quad (3.2)$$

Burada,  $\Delta a$  cam kabın ilk ve 24saat sonunda ölçülen ağırlık farkını (g), x film kalınlığını (m),  $\Delta t$  deney süresini (s),  $\Delta P$  25°C'deki su buharı basınç farkını (2985 Pa) ifade

etmektedir. WVP analizleri 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve standart sapma değerleri ile verilmiştir.

### 3.4.7 CHI-LM filmlerin optik analizi

CHI ve CHI-LM filmlerinin optik özellikleri 280-800 nm dalga boyu aralığında UV-VIS spektrofotometre (Genesys 10S UV-Vis, ThermoScientific) kullanılarak analiz edilmiştir. Filmlerin (n=3) ultraviyole ışık ve görünür ışık geçirgenlikleri 280nm ve 660nm'de ölçümler alınarak değerlendirilmiştir.

### 3.5 CHI ve CHI-LM Yapıların Antifungal Aktivitelerinin Belirlenmesi

CHI ve CHI-LM yapıların özellikle narenciyede hasat sonrası hastalıklara sebep olan patojenik mantarlara ve oomisetlere karşı etkinliğinin araştırılmasına yönelik çalışmalar *Universitat de València Estudi General (UVEG-CECT)*'da Prof. Giuseppe tarafından gerçekleştirilmiştir. *In vitro* antifungal aktivite testlerinde; *Aspergillus strains* (*A. niger* CECT 2088, *A. fumigatus* CECT 20827, *A. terreus* CECT 20404, *Aspergillus flavus* ISPA 8111 and N1F2), *Penicillium strains* (*P. expansum* CECT 2278, *P. digitatum* CECT 2954 and N2F1, *P. commune* CECT 20767, *P. italicum* CECT 20332, N1F1 and OF4), *Alternaria alternata* (ISPA 646 ve ITEM 8121), *Fusarium oxysporum* (ISPA 7067), *Fusarium proliferatum* (CBS 145950), *Plenodomus tracheiphilus* (Pt 7), *Phytophthora nicotianae* (P4K3F8), *Ph. citrophthora* (AX1aR), *Cladosporium strains* (*Cl. vicinum* OF1, *Cl. xanthochromaticum* P1F1, *Cl. anthropophilum* P1F2, *Cl. cladosporioides* M3F2), *Colletotrichum strain* (*C. gloeosporioides* RD9B, *C. acutatum* C9D2C ve UWS 149) mantar ve suşları kullanılmıştır (Riolo vd. 2023, Dopazo vd. 2021).

CHI ve CHI-LM filmlerinin antifungal aktivitesi standart agar difüzyon analizleriyle test edilmiştir. Bu amaçla, yukarıda belirtilen suşların konidial süspansiyonu (konsantrasyon  $10^4$  conidia mL<sup>-1</sup>), steril pamuklu çubuklar kullanılarak PDA kaplarının yüzeyi üzerinde tabakalara ayrılmış ve daha sonra CHI (kontrol) veya CHI-LM filmlerden 20x20 mm'lik bir örnek hazırlanarak substratın yüzeyine yerleştirilmiştir. PDA kapları 5 gün boyunca

karanlıkta 25°C'de inkübe edilmiştir. Çalışmalar, her patojen için, üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve test sonuçları ampirik bir ölçekle ifade edilmiştir. Buna göre; (-) mantar inhibisyonu yok; (+) filmin altında kısmi büyüme inhibisyonu; (++) filmin altında belirgin mantar inhibisyonunu ifade etmektedir.

### **3.6 Kitosan ve LM ile Modifiye Edilmiş Kitosan Yapıların Sitotoksitesite Analizi**

CHI ve CHI-LM yapıların sitotoksitesi fare fibroblast hücreleri (L929) kullanılarak 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromür (MTT) analizi ile test edilmiştir. Bu amaçla CHI ve CHI-LM filmler çapı 0,5 cm olacak şekilde hazırlanıp MTT analizi öncesinde 1 saat boyunca UV ışığı altında sterilize edilmiştir. Öncelikle, %10 (h/h) FBS ve %1 (h/h) PenStrep içeren DMEM kültür ortamı hazırlanmıştır. L929 fare hücreleri, 96 gözlü plakalara  $1 \times 10^4$  hücre olacak şekilde DMEM ortamına ekilmiştir. Hücreler, yüzeye tutunması için 24 saat boyunca standart kültür koşullarında (37°C, %5CO<sub>2</sub> atmosferi) hazırlanan ortamda bekletilmiştir. CHI (kontrol) ve CHI-LM filmler mikropalakların gözüne yerleştirilmiştir. L929 fare hücrelerinin üremesi belirlenen kültür sürelerinde (1, 2 ve 3.gün) MTT analizi ile takip edilmiştir. Belirli inkübasyon sürelerinin sonunda filmler çıkarılmıştır ve kültür ortamı uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, her bir göze 200 µL DMEM ve 20 µL MTT (2,5 mg mL<sup>-1</sup> Dulbecco'nun PBS içinde)) eklenmiştir ve plaklar karanlıkta 37°C'de etüvde 4 saat bekletilmiştir. 4 saat sonunda oluşan formazan kristallerinin çözünmesi için her bir göze 133 µL 2-propanol (0,04M HCl içinde) ve 33 µL sodiyum dodekil sülfat (SDS, %3 a/h) eklenmiştir. Son olarak, oluşan mor renkli çözeltinin 570nm'de mikropalaka okuyucuda (BioTek, Epoch, Gen3.13) absorbans ölçümleri alınmıştır (Karakeçili vd. 2019).

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

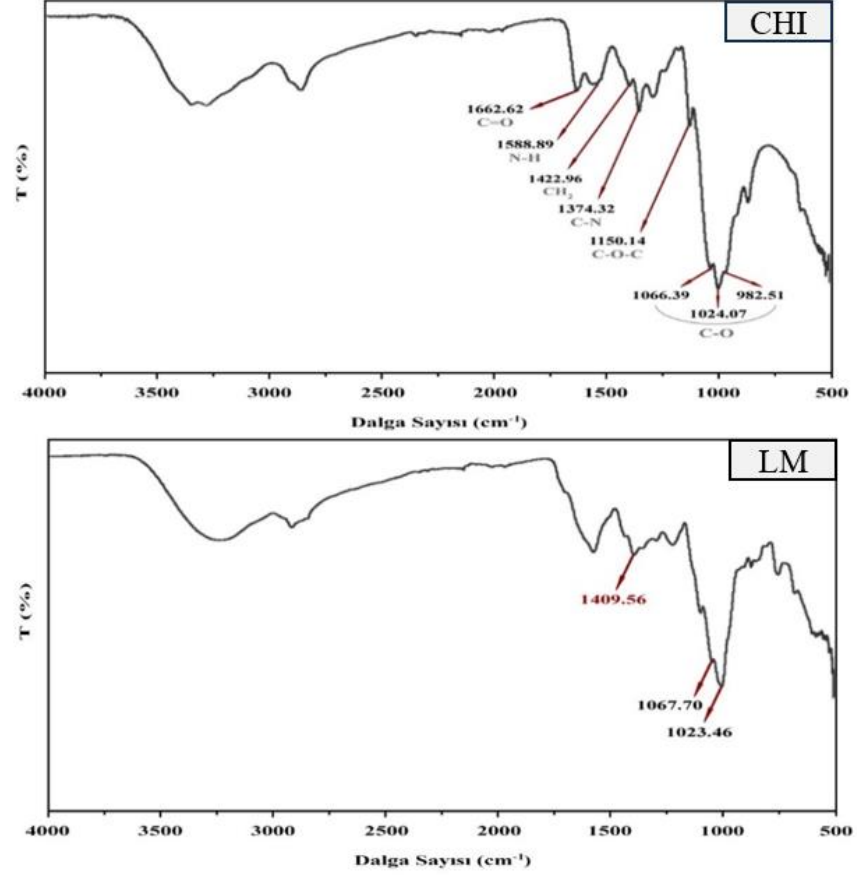
Bu bölümde deneysel çalışmaların sonucunda elde edilen sonuçlar sunulmuştur. Öncelikle toz formundaki CHI-LM yapıların FTIR-ATR ve TGA/DSC analizlerinden elde edilen sonuçlar açıklanmıştır. Ardından, film formundaki CHI-LM yapıların SEM, WCA, su tutma kapasitesi, WVP ve optik analizlerinden elde edilen bulgulara değinilmiştir. Ardından, CHI ve CHI-LM yapıların spesifik olarak narenciye türlerinde hastalıklara neden olan patojenik mantarlara ve oomisetlere karşı gösterdiği antifungal etkinliğini araştırmak amacıyla yürütülen *in vitro* çalışmalardan elde edilen sonuçlar sunulmuştur. Son olarak, CHI ve CHI-LM yapıların sitotoksitesinin belirlenmesi amacıyla L929 fare fibroblast hücreleri üzerinde yapılan *in vitro* MTT testi sonucunda elde edilen hücre canlılığı yüzde (%) olarak sunulmuştur.

### 4.1 CHI ve CHI-LM Yapıların Analizleri

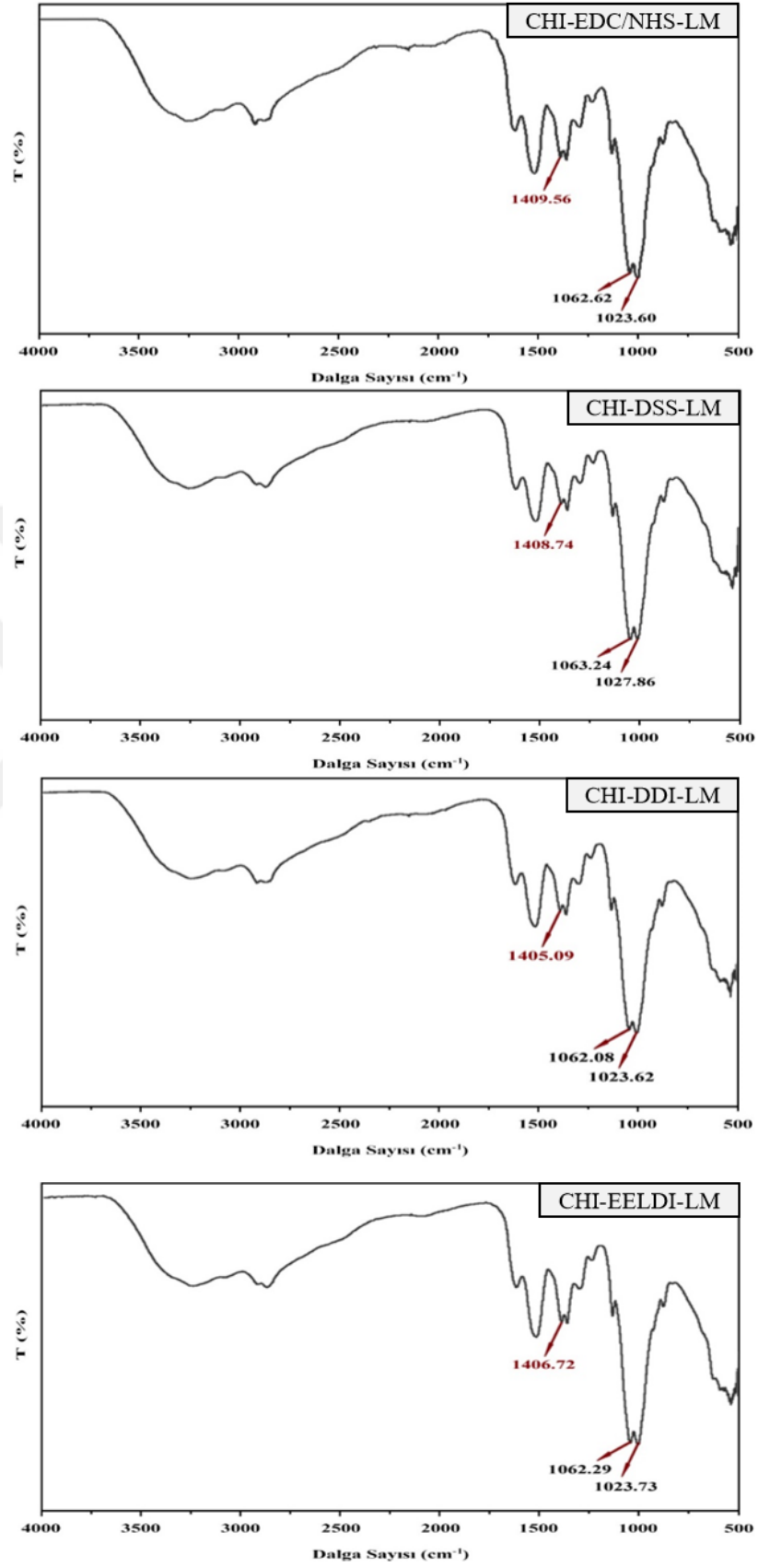
#### 4.1.1 CHI ve CHI-LM yapıların FTIR-ATR analizi

CHI, LM ve CHI-LM yapıların (CHI-EDC/NHS-LM, CHI-DSS-LM, CHI-EELDI-LM ve CHI-DDI-LM) FTIR-ATR spektrumları şekil 4.1 ve şekil 4.2’de verilmiştir. Kitosanın (CHI) FTIR-ATR spektrumundaki  $1662\text{ cm}^{-1}$ ’deki piki amid I’in C=O gerilmesini ve  $1588\text{ cm}^{-1}$ ’de görülen karakteristik piki amid II’nin N-H bükülmesini temsil etmektedir. Kitosan spektrumundaki  $1422\text{ cm}^{-1}$ ’deki pik  $\text{CH}_2$  bükülmesini ve  $1374\text{ cm}^{-1}$ ’deki pik ise amid III’ün C-N gerilmesini temsil etmektedir. CHI spektrumunda görülen  $1150\text{ cm}^{-1}$ ’deki soğurma bandı, kitosanın C-O-C köprüsünün asimetrik gerilmesini göstermektedir. Son olarak CHI spektrumundaki  $1056\text{ cm}^{-1}$ ,  $1024\text{ cm}^{-1}$  ve  $982\text{ cm}^{-1}$ ’deki bantlar C-O gerilmelerini göstermektedir (Şekil 4.1). Biyoaktif antifungal ajan LM’nin kitosana bağlanması sonrasında tüm modifiye CHI-LM yapılarında  $1662\text{ cm}^{-1}$ ’den  $1633\text{ cm}^{-1}$ ’e ve  $1588\text{ cm}^{-1}$ ’den  $1533\text{ cm}^{-1}$ ’e kaymalar görülmüştür. LM’ye ait  $1409\text{ cm}^{-1}$ ’deki karakteristik pik (Şekil 4.1) tüm CHI-LM yapılarında açıkça görülmüştür (Şekil 4.2). CHI spektrumunda  $1422\text{ cm}^{-1}$ ’deki  $\text{CH}_2$  bükülmesi, immobilizasyon sonrasında tüm CHI-LM yapılarının spektrumundan kaybolduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca tüm CHI-LM spektrumlarında, kitosanın  $1056\text{-}982\text{ cm}^{-1}$  civarındaki üçlü bantları LM’nin karakteristik

pikleri olan  $1062\text{ cm}^{-1}$  ve  $1023\text{ cm}^{-1}$ 'de iki ayrı pike dönüştüğü görülmüştür (Şekil 4.2). Bu da FTIR-ATR analizlerinden elde edilen sonuçların, LM'nin tüm bağlayıcılar (EDC/NHS, DSS, EELDI ve DDI) ile CHI yapısına başarılı bir şekilde immobilize edildiğini göstermektedir.



Şekil 4.1 CHI ve LM'nin FTIR-ATR spektrumları

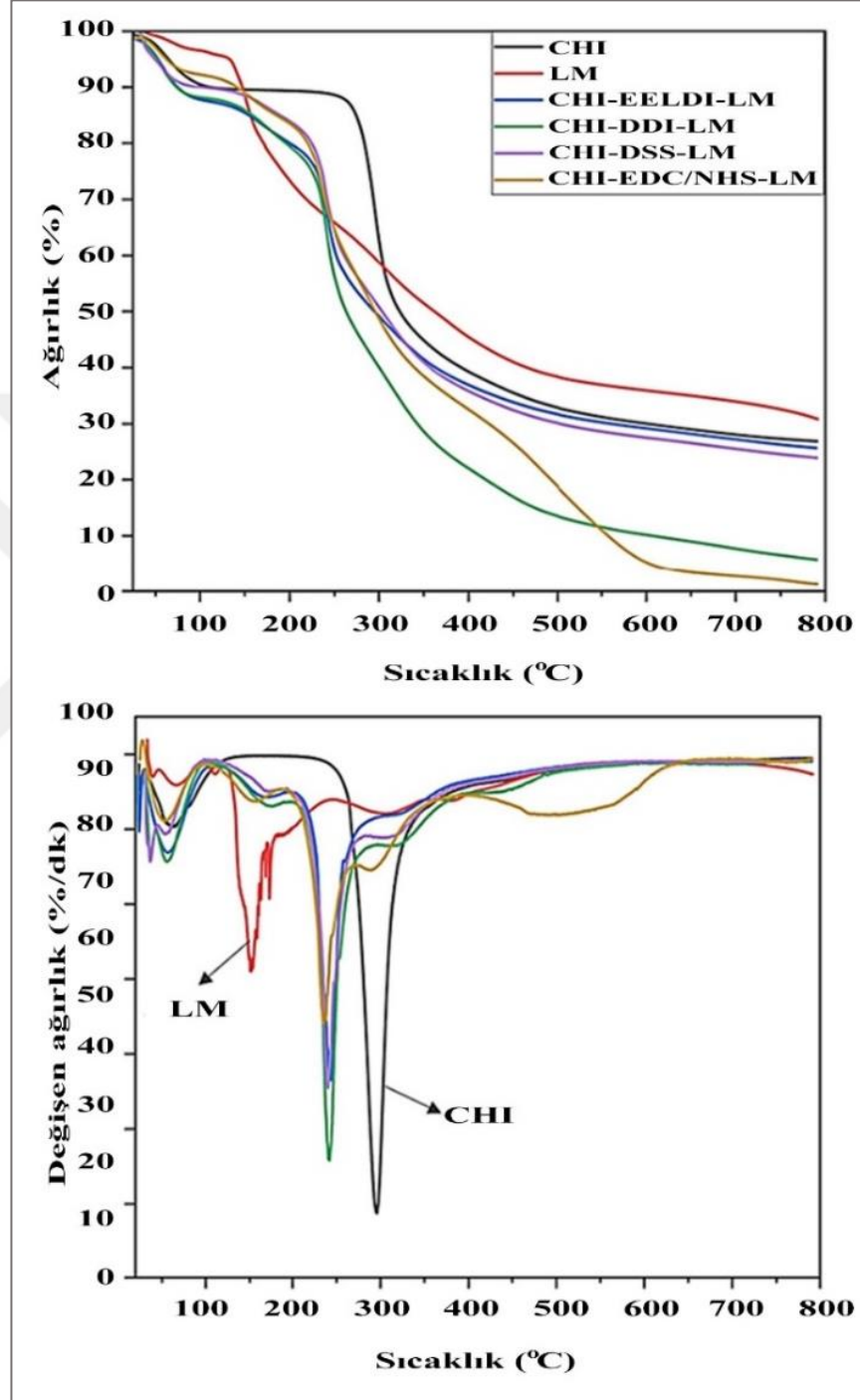


Şekil 4.2 CHI-LM yapıların FTIR-ATR spektrumları

#### 4.1.2 CHI ve CHI-LM yapılarının TGA/DSC analizi

CHI ve CHI-LM için TGA/DSC analiz sonuçları şekil 4.3'te verilmiştir. Kitosana (CHI) için TGA diyagramı incelendiğinde, kitosanın ilk olarak ~%5 ağırlık kaybının 25-100 °C'de olduğu görülmüştür. Bu ağırlık kaybının, literatürde farklı asitlerle çapraz bağlanan kitosan filmlerinin termal bozunmasında görüldüğü gibi adsorbe edilen suyun buharlaşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Qiao vd. 2021, Felipe vd. 2023, Roy vd. 2022, Zhang vd. 2022). Kitosana ait ikinci bozulma ~270-310°C'de gerçekleşmiştir, yaklaşık 300°C'de toplam ağırlık kaybı %75 olarak gözlemlenmiştir. Kitosanın DCS diyagramındaki 286°C'deki ekzotermik pik, bu ağırlık kaybına karşılık gelmektedir. LM'nin TGA diyagramı incelendiğinde, ~40-140°C'de belirgin bozulma pikleri gözlemlenmiştir. LM'nin ~150°C'den ve ~400°C'ye ağırlık kaybettiği ve bunun adsorbe edilmiş suyun buharlaşmasından kaynaklandığı düşünülmüştür (Qiao vd. 2021, Roy vd. 2022). LM'nin DSC diyagramındaki 152, 172, 306 ve 384°C'lerde görülen maksimum pikleri, LM'nin TGA diyagramındaki ~150-400°C aralığındaki ağırlık kayıplarına karşılık gelmektedir. LM'nin 384°C ve 800°C'de ağırlık kaybı sırasıyla %53 ve %69 olarak görülmüştür. CHI-LM yapılarının TGA/DSC diyagramları incelendiğinde, CHI termal ayrışmasının 300°C'den tüm CHI-LM yapılarında bu sıcaklığın ~240°C'ye kaydığı görülmüştür. LM'ye ait 305-380°C civarındaki bozulma, 305-385°C'deki tüm CHI-LM yapılarında açıkça gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, LM'nin CHI'ye başarılı bir şekilde bağlandığını göstermektedir. Kitosanın itakonik asit ile çapraz bağlandığı ve meyve özü eklendiği bir çalışmanın TGA/DSC analizi incelendiğinde, bileşenlerin aynı şekil 4.3'te görüldüğü gibi farklı yapılarının çok aşamalı ayrışmalara neden olduğu görülmüştür (Felipe vd. 2023). Literatürde, kitosana/jelatin bazlı filmin genipin ile çapraz bağlanarak biberiye esansiyel yağı eklenmesi sonucunda elde edilen filmlerin TGA/DSC diyagramları incelendiğinde, kimyasal immobilizasyonun ve biyoaktif dolgu maddesinin filmin termal stabilitesini anlamlı ölçüde değiştirmediği belirtilmiştir (Roy vd. 2022). Rips vd. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, kitosana vanilin veya transsinnamaldehitin kovalent immobilizasyon ile bağlandığı ve bu bağlamanın termal stabiliteyi az da olsa düşürdüğü ancak filmlerin termal stabilitesinde anlamlı bir değişim yaratmadığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, literatür çalışmaları kimyasal

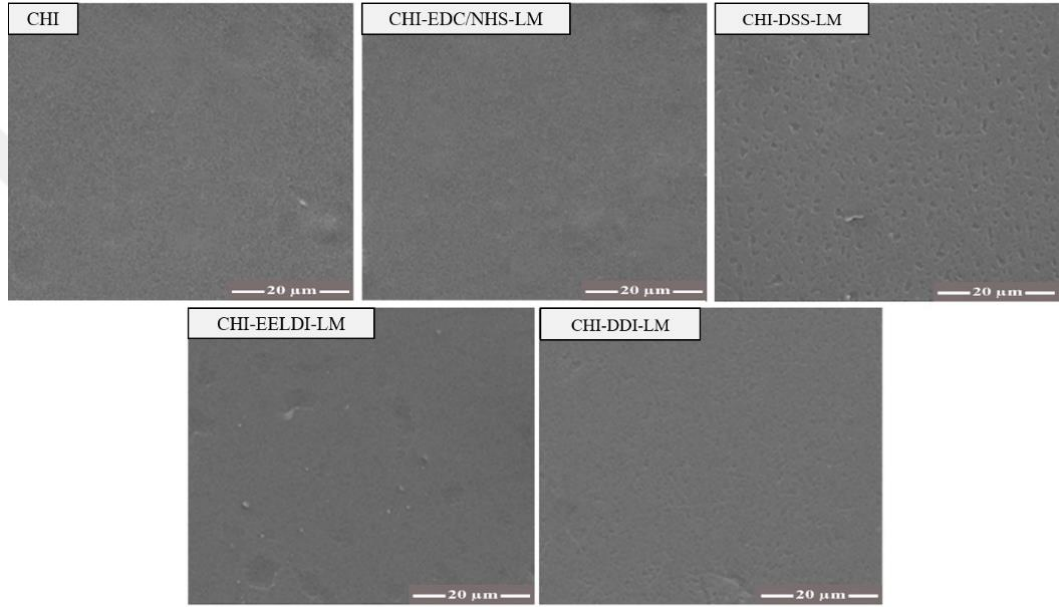
immobilizasyonun ve biyoaktif antifungal ajan LM'nin, kitosanın termal stabilitesini önemli ölçüde değiştirmediğini desteklemektedir.



Şekil 4.3 CHI, LM ve CHI-LM yapıların TGA-DSC spektrumları

### 4.1.3 CHI ve CHI-LM yapıların morjolojik yapı tayini

CHI ve CHI-LM yapılarının yüzey morfolojileri SEM analizi ile incelenmiştir. Analiz sonucunda elde edilen görüntüler şekil 4.4'te gösterilmektedir. SEM analizi sonucunda, CHI ve CHI-LM yapıların yüzey morfolojilerinde önemli düzeyde bir değişim gözlemlenmemiştir ve immobilizasyon işleminin hiçbir mikro yapıyı etkilemediği sonucuna varılmıştır.

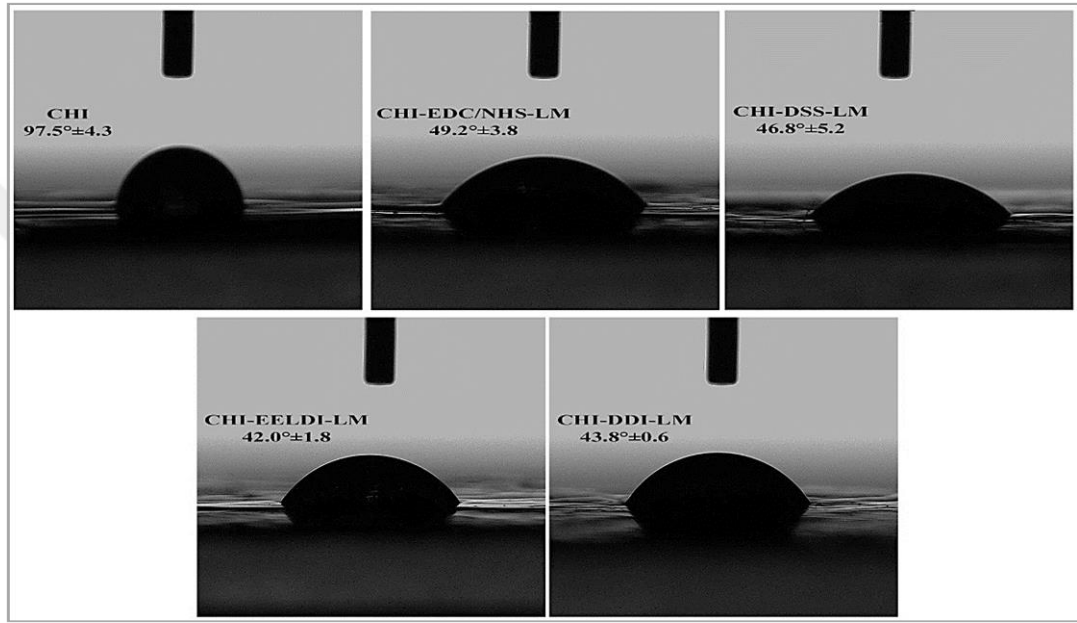


Şekil 4.4 CHI ve CHI-LM yapıların SEM görüntüleri

### 4.1.4 CHI ve CHI-LM yapıların ıslatılabilirlik tayini

CHI ve CHI-LM film yapılarının WCA değerleri şekil 4.5'te verilmiştir. WCA analiz sonuçlarına göre, CHI filmi için WCA değeri  $97,5^{\circ} \pm 4,3$  olarak hesaplanmıştır, bu da kitosanın hidrofobik bir film yüzeyine sahip olduğunu göstermektedir. Immobilizasyon sonrası elde edilen CHI-LM filmlerinin WCA değerleri ise  $42-49^{\circ}$  aralığında ölçülmüştür, bu da CHI-LM filmlerinin hidrofilik olduğunu göstermektedir. Kitosanın farklı asitler ile çapraz bağlandığı çalışmalarda WCA değerlerinde benzer düşüşler gözlemlenmiştir (Zhang vd. 2022, Felipe vd 2023). WCA değerlerindeki düşüşün, LM yapısındaki hidrofilik amino gruplarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Rahman vd. (2022)

tarafından yapılan çalışma, hidrofilik amino gruplarının WCA değerlerinde düşüşe neden olduğunu desteklemektedir. Ayrıca, %SR değerlerine göre WCA değerlerinin yüksek olması beklenirken, düşük olması, su damlasının CHI-LM yapılarına damlatıldığı anda absorbe olmasında ve bu durumun filmlerde deformasyona yol açarak ölçümün zorlaşmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu durum Felipe vd. (2023) tarafından yapılan çalışma ile desteklenmektedir.



Şekil 4.5 CHI ve CHI-LM yapıların WCA görüntüleri

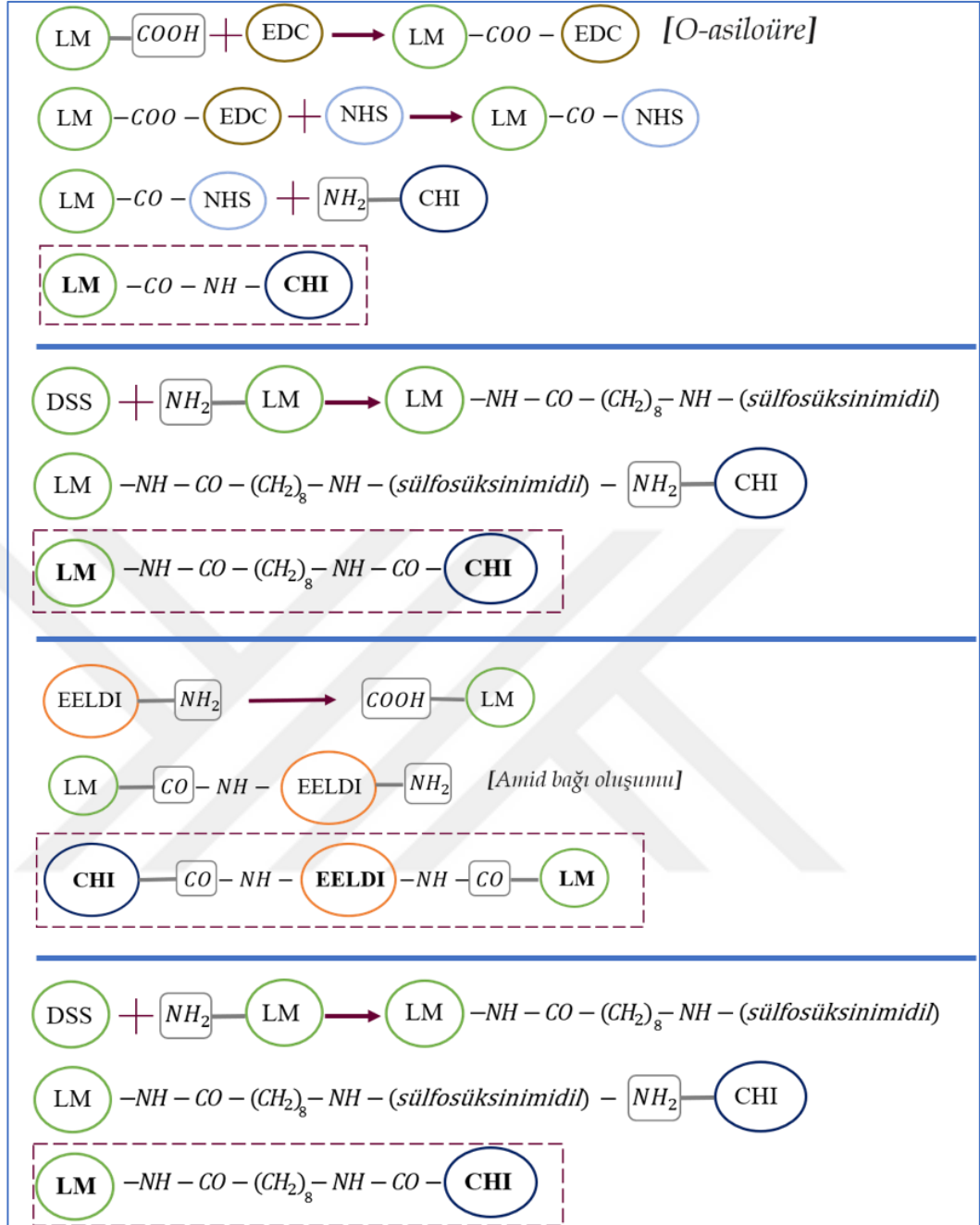
#### 4.1.5 CHI ve CHI-LM yapıların su tutma kapasitesi tayini

CHI ve CHI-LM yapıların yüzde şişme oranı (%SR), CHI ve CHI-LM yapıların su tutma kapasitesinin tayini amacıyla hesaplanmış ve çizelge 4.1’de verilmiştir. %SR değeri, kullanılan polimerin veya biyoaktif ajanın özelliklerine, polimer ve ajan arasındaki etkileşime ve bu etkileşim sonucunda elde edilen yapının yüzey boşluğu, gözenek yapısı ve çapraz bağlanma yoğunluğu gibi özelliklerinden etkilenmektedir. CHI’nın hidrofilik grupları ve su molekülleri arasında oluşan hidrojen bağları nedeniyle, en yüksek %SR değeri (%190) CHI polimerinde görülmüştür. CHI yapısına LM’nin kovalent bağ ile immobilizasyonu sonrasında elde edilen CHI-LM yapılarının %SR değerinin kritik ölçüde değişmediği gözlemlenmiştir. Bu durum, kullanılan çapraz bağlayıcıların ve LM

miktarının, CHI polimerinin su geçirgenliğine engel olacak şekilde iç çapraz bağlanma oluşturmadığının bir göstergesi olarak yorumlanmıştır. WCA değerlerindeki düşüşe bağlı olarak %SR değerlerinde bir artış olması beklenirken (Yildiz vd. 2021), çizelge 4.1’de görüldüğü üzere düşüş gözlemlenmiştir. Bu çelişki literatürde de benzer şekilde rapor edilmiştir (Felipe vd. 2023, Li vd. 2012). Bunun sebebinin, şekil 4.6’da görülen çapraz bağlanma reaksiyonları sonucunda su moleküllerinin çapraz bağlı kitosan polimer zincirleri arasına girerek hızlı bir şekilde tutulması ve bu nedenle şişme değerlerinin sabit kalmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Felipe vd. (2023) tarafından yapılan çalışma bu durumu desteklemektedir.

Çizelge 4.1 CHI ve CHI-LM yapıların %SR değerleri

<b>Örnekler</b>	<b>% SR</b>
<b>CHI</b>	190,4±31,3
<b>CHI-EDC/NHS-LM</b>	138,5±11,9
<b>CHI-DSS-LM</b>	160,5±36,6
<b>CHI-EELDI-LM</b>	185,5±19,5
<b>CHI-DDI-LM</b>	151,6±51,7



Şekil 4.6 CHI-LM yapıların reaksiyon şeması

#### 4.1.6 CHI ve CHI-LM yapıların WVP tayini

CHI ve CHI-LM yapıların su buharı geçirgenliği tayini, filmlerin nem bariyeri özelliğini test etmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. CHI-LM filmleri, meyve ve atmosfer arasında bir tabaka oluşturduğundan, CHI-LM filmlerin su buharı geçirgenliğinin tayini oldukça

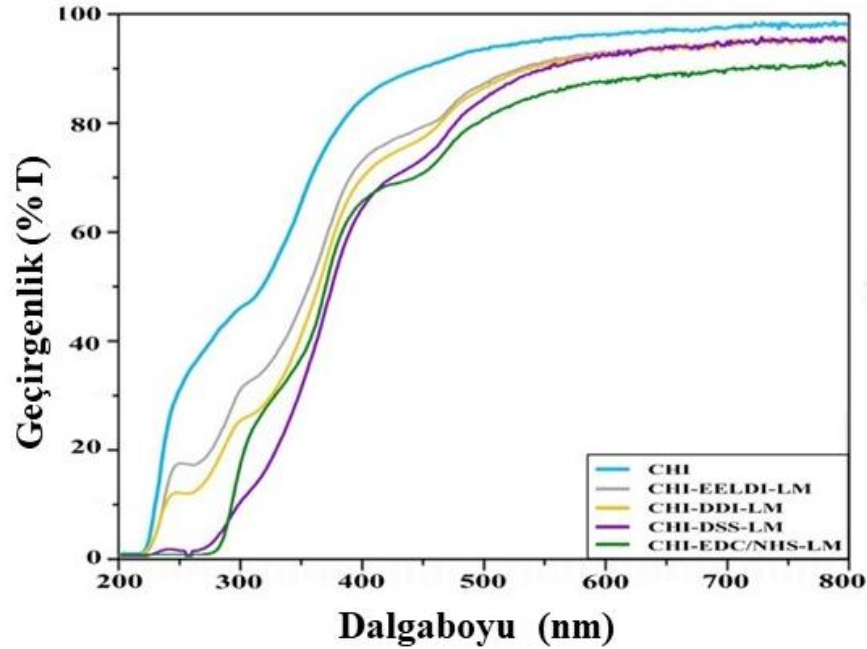
önemlidir. Çünkü nem kaybı, meyvenin kalitesi, tadı ve bozulma süresi gibi birçok özelliğini doğrudan etkilemektedir. Su buharı geçirgenliği (WVP), sulu gıda depolama uygulamaları için kritik bir parametredir ve genellikle ASTM E-96 statik yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bazı durumlarda, özellikle film veya kaplamanın gıda ile tüketilmesi hedefleniyorsa, yüksek suda çözünürlük tercih edilmektedir. Ancak, bazı biyopolimer bazlı yenilebilir filmler ve kaplamalar, zayıf su buharı bariyerleri ve düşük mekanik mukavemetleri nedeniyle gıda ambalajında sınırlı uygulama alanlarına sahiptir. Bu sınırlamaları aşmak amacıyla araştırmacılar, çapraz bağlama süreçlerini iyileştirmek ve yenilebilir filmlerin özelliklerini geliştirmek için çeşitli biyopolimerleri karıştırmayı veya yağlar ve mumlar gibi hidrofobik malzemeler eklemeyi önermişlerdir. Bu yöntemler, su buharı geçirgenliğini azaltarak ve mekanik dayanıklılığı artırarak gıda ambalajlarının performansını iyileştirmeyi hedeflemektedir. WVP tayini sonuçları çizelge 4.2’de verilmiştir. Vieira vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada, kitosanın WVP değerinin elde edilen sonuçla uyumlu olduğu görülmüştür; bu da WVP tayininin doğruluğunu göstermektedir. CHI ve CHI-LM yapıların WVP değerlerindeki küçük farkların, immobilizasyon ile meydana gelen moleküler arası bağlardan (Şekil 4.6) kaynaklandığı düşünülmektedir (Li vd. 2012, Zhang vd. 2022). WVP analizi sonucunda, CHI-LM yapıların WVP özelliklerinin CHI’den farklı olmadığı ve LM’nin kovalent immobilizasyon işleminin su buharı geçirgenliği sonuçlarını değiştirmediği görülmüştür. Literatürde, %SR değeri azalırken WVP değerlerinin değişmediği bir çalışmada, bu çelişkinin sebebinin çapraz bağlayıcıların SR değerini doğrudan etkilerken (bölüm 4.1.5’te açıklandığı üzere) WVP değerleri üzerinde etkisinin olmamasından kaynaklı olduğu düşünülmüştür (Felipe vd. 2023).

Çizelge 4.2 CHI ve CHI-LM yapıların WVP değerleri

Örnekler	$WVP, \frac{g}{s \cdot m \cdot Pa} \times 10^{-11}$
<b>CHI</b>	1,6±0,7
<b>CHI-EDC/NHS-LM</b>	1,2±0,4
<b>CHI-DSS-LM</b>	1,4±0,2
<b>CHI-EELDI-LM</b>	1,4±0,3
<b>CHI-DDI-LM</b>	1,3±0,2

#### 4.1.7 CHI ve CHI-LM yapıların optik analizi

CHI ve CHI-LM filmlerin UV-VIS spektrofotometre kullanılarak hem UV (280nm) hem de görünür ışık (660nm) geçirgenlikleri (%T) 80-880 nm dalga boyu aralığında ölçülmüş ve sonuçlar çizelge 4.3'te sunulmuştur. UV ışığı gıdalarda renk bozulmasına, besin kaybına ve tat bozukluklarına neden olmaktadır (Zhang vd. 2023) CHI yapısı, hem UV hem de görünür ışık altında yüksek şeffaflık göstermektedir (Zhang vd. 2022). Görünür ışık bölgesinde (660nm), CHI-LM filmlerinin ışık geçirgenliğinde önemli bir değişim gözlemlenmemiştir. Buna karşılık, UV ışık bölgesinde (280nm), CHI-LM filmlerinin UV ışığı geçirgenliği, CHI'ya kıyasla önemli ölçüde azalmıştır (Şekil 4.7). Bunun sebebinin, LM ajanının fenolik asit grupları gibi UV ışığını engelleyici gruplara sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Kitosanın sitrik asit ile çapraz bağlandığı bir çalışmada (Zhang vd. 2023), UV ışığını emebilen aromatik amino asit ve fenolik bileşenlerin UV ışığına koruma sağladığı gösterilmiştir; bu da elde edilen sonuçları desteklemektedir. Özetle, CHI-LM yapıları, CHI ile kıyaslandığında, filmlerin şeffaflığı ve görünür ışık bölgesindeki geçirgenliğinde değişiklik göstermemekte, ancak CHI-LM filmlerinin UV ışığına karşı koruma sağlamaktadır.



Şekil 4.7 CHI ve CHI-LM yapıların dalgaboyuna karşılık geçirgenlik (%T) spektrumları

Çizelge 4.3 CHI ve CHI-LM yapıların 280 ve 660nm'deki %T değerleri

Örnekler	T <sub>660</sub> (%)	T <sub>280</sub> (%)
CHI	90,4±0,5	38,6±1,2
CHI-EDC/NHS-LM	88,5±0,2	0,4±0,1
CHI-DSS-LM	88,2±0,1	1,1±0,1
CHI-EELDI-LM	84,3±0,2	4,1±0,3
CHI-DDI-LM	85,6±1,4	11,6±0,2

## 4.2 CHI ve CHI-LM Yapıların *In Vitro* Testleri

### 4.2.1 CHI ve CHI-LM yapıların antifungal aktivitesinin belirlenmesi

CHI ve CHI-LM filmlerin turunçgil meyvelerinde hasat sonrası hastalıklara (yeşil/mavi küf, leke, çürüme vb.) neden olan patojenler ve oomisetler üzerindeki antifungal etkisi *in vitro* olarak test edilmiştir. Sonuçlar, genel olarak LM'nin neredeyse tüm patojenlerin büyümesini önlediğini göstermiştir. CHI-LM filmlerin agar difüzyon testi sonuçları Çizelge 4.4'te verilmiştir. Çizelge 4.4'te görüldüğü üzere, tüm CHI-LM filmlerin *Penicillium* türleri üzerindeki antifungal etkisi kanıtlanmıştır. Ancak, daha nadir rastlanan *Alternaria alternata* ve *Ph. citrophthora* patojenlerinin büyümesini hiçbir CHI-LM yapısının engellemediği görülmüştür. CHI-EELDI-LM ve CHI-EDC/NHS-LM yapılarının daha nadir rastlanan *Aspergillus* türlerinin çoğunun büyümesini az da olsa önlediği gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, patojenlerin büyümesinin engellemede en etkili yapının CHI-EDC/NHS-LM olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.4 CHI ve CHI-LM yapıların mantar türlerine karşı antifungal aktivitesi

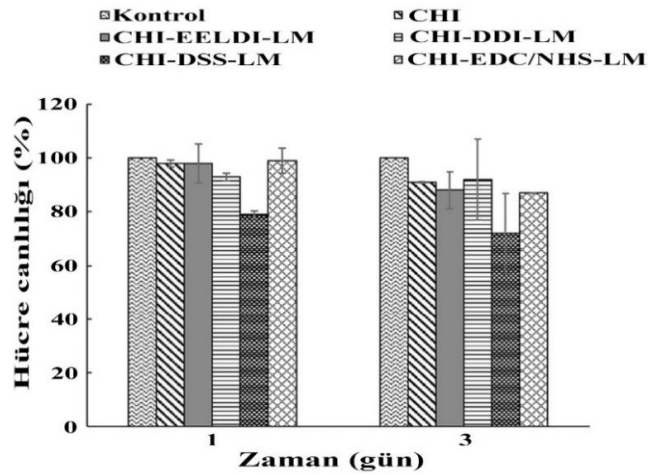
Mantar/oomisetler	CHI	CHI- EDC/NHS- LM	CHI- DSS- LM	CHI- EELDI- LM	CHI- DDI -LM
<i>Alternaria alternata</i> CECT 646	-	-	-	-	-
<i>A. alternata</i> ITEM 8121	-	+	+	+	+
<i>Aspergillus flavus</i> ISPA 8111	-	+	-	-	-
<i>A. flavus</i> NIF2	-	+	-	-	-
<i>A. fumigatus</i> CECT 20827	-	++	-	+	+
<i>A. niger</i> CECT 2088	-	++	-	-	-
<i>A. terreus</i> CECT 20404	-	+	-	+	-
<i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i>	-	++	-	+	+
<i>Cl. vicinum</i> OF1	-	++	-	+	+
<i>Cl. xanthochromaticu</i> <i>m</i> P1F1	-	++	-	++	++
<i>Colletotrichum</i> <i>acutatum</i> UWS	-	+	+	+	+
<i>C. acutatum</i> C9D2C	-	+	+	+	+
<i>C. gloeosporioides</i> RD9B	-	+	+	+	+
<i>Fusarium oxysporum</i> ISPA	-	++	+	+	+
<i>F. proliferatum</i> CBS 145950	-	++	+	+	+
<i>Penicillium commune</i> CECT	-	++	+	+	+
<i>P. digitatum</i> CECT 2954	-	++	++	++	++
<i>P. digitatum</i> N2F1	-	++	++	++	++
<i>P. expansum</i> CECT 2278	-	++	++	++	++

Çizelge 4.4 CHI ve CHI-LM yapıların mantar türlerine karşı antifungal aktivitesi (devam)

Mantar/oomisetler	CHI	CHI-EDC/NHS-LM	CHI-DSS-LM	CHI-EELDI-LM	CHI-DDI-LM
<i>P. italicum</i> CECT 20332	-	++	++	++	++
<i>P. italicum</i> OF4	-	++	++	++	+++
<i>P. italicum</i> NIF1	-	++	++	++	++
<i>Phytophthora citrophthora</i>	-	-	-	-	-
<i>Ph. nicotianae</i> P4K3F8	-	++	++	++	++
<i>Plenodomus tracheiphilus</i>	-	+	+	+	+

#### 4.2.2 CHI ve CHI-LM yapıların sitotoksitesinin belirlenmesi

CHI ve CHI-LM yapıların sitotoksitesini, MTT testi kullanılarak *in vitro* hücre çalışmalarıyla L929 fare fibroblast hücreleri üzerinde değerlendirilmiştir. Şekil 4.8’de gösterildiği gibi, hücrelerin metabolik aktivitesi ve canlılığı tüm CHI ve CHI-LM yapılarında %80’in üzerinde bulunmuştur. Sonuçlar, CHI ve CHI-LM yapıların L929 hücreleri üzerinde herhangi bir toksik etki göstermediğini ortaya koymuştur.



Şekil 4.8 CHI ve CHI-LM yapıların L929 hücrelerine inkübasyonu sonrası L929 hücrelerinin zamana karşılık hücre canlılığı

## 5. SONUÇ

Doğal atıklardan elde edilen biyoaktif maddeler içeren doğal polimerlerden hazırlanan paketlenme malzemeleri, insan sağlığı, sürdürülebilir çevre ve döngüsel ekonomi açısından büyük önem taşımaktadır. Kabuklu deniz hayvanlarından elde edilen doğal kitosan polimerinin antifungal ajan LM ile immobilizasyonu sonucunda, kitosan polimerinin antifungal aktivitesi ve UV ışığı koruması gibi özellikleri herhangi bir sitotoksositeye neden olmaksızın büyük ölçüde geliştirilmiştir. Bu modifiye kitosan yapıların, sentetik ve kimyasal kaplamalara alternatif olabileceği düşünülmektedir. Modifiye kitosan yapıların endüstriyel uygulamalara dönüştürülmesi, gerekli optimizasyon ve çeşitli stratejilerle zenginleştirilerek mümkün olacaktır. Turunçgillerin hasat sonrası hastalanmasına sebep olan mantarların öldürülmesinde kullanılan kimsayallar insan sağlığı ve çevre için tehdit oluşturmaktadır. Buna alternatif limon endüstrisinin atıklarından üretilen LM'nin kullanımı, döngüsel ekonomiye katkı sağlamakta ve gıda atığını azaltmaktadır. Dünya genelindeki narenciye ticaretinin yüksek ekonomik değeri, yeni antifungal yenilebilir kaplamaların geliştirilmesini önemli bir araştırma alanı haline getirmiştir. Mevcut literatürde, bu konuda ilgi çekici sonuçlar sunan birçok çalışma bulunmaktadır ve bu trendin önümüzdeki yıllarda artması beklenmektedir. Ancak, antifungal yenilebilir kaplamaların ticari uygulanabilirliği sınırlıdır; bu durum, geleneksel fungusitlerin etkinliği ve maliyet avantajı ile gıda sınıfı kaplama bileşenlerinin yenilebilir doğasıyla ilgili kısıtlamalardan kaynaklanmaktadır. Düşük toksisite ve kalıcılığın yanı sıra, tedavi edici veya önleyici aktivite eksikliği gibi dezavantajlar, bu kaplamaların ticari kullanımını zorlaştırmaktadır. Narenciye ihracat pazarlarının hasat sonrası çürümeye karşı minimum meyve kaybı gereksinimi göz önünde bulundurulduğunda, antifungal kaplamaların etki mekanizmalarının genellikle fungistatik olduğu ve etkilerinin meyve türü, çeşidi ve fiziksel durumu gibi özelliklere bağlı olduğu düşünülmektedir. Antifungal kaplamaların geliştirilmesi, yalnızca belirli hastalıkların kontrolü için değil, aynı zamanda hasat sonrası işleme prosedürleri ve meyve depolama potansiyeline uygun şekilde ticari olarak önemli portakal, mandalina, limon veya greylort çeşitlerine de uyarlanmalıdır. Gelecek araştırmalar, mevcut umut verici kaplamaların yeni uygulamalarını değerlendirmenin yanı sıra, farklı tipte antifungal kaplamaların alternatif hastalık kontrol yöntemleriyle birlikte uygulanması önem arz etmektedir.

Kitosan bazlı ambalajların petrol bazlı alternatiflerle rekabet edebilmesi için kapsamlı araştırmalara ihtiyaç vardır. Bu bağlamda, öncelikle kitosanın diğer malzemelerle kombinasyonları üzerinde daha fazla çalışma yapılması gereklidiği düşünölmektedir. Bunun yanı sıra, kitosan ambalajlarının hangi tür gıda maddeleriyle temas edebileceğini incelemek de önemlidir. Tüm bu çalışmalar, kitosan bazlı ambalajların pratik gereklilikleri karşılayabilmesi için kritik bir rol oynamaktadır. Sonuç olarak, narenciye meyvelerinin hasat sonrası raf ömrünün uzatılması, fizikokimyasal özelliklerinin (renk, doku, tat vb.) korunması, insan sağlığına zararlı mikroorganizmaların oluşumunun engellenmesi ve plastik ile gıda atıklarının azaltılması amacıyla sürdürülebilir, doğal, ekonomik ve gelişmiş özelliklere sahip alternatif bir paketleme malzemesi üretilmiştir.



## KAYNAKLAR

- Chen, H. 2023. Application of functionalized chitosan in food: A review. *Food Chemistry Advances*, (3), 101-234.
- Chen, X., Zhang, Q., Li, X. 2020. Chitosan-Based Layer-by-Layer Assembly: Towards Application on Quality Maintenance of Lemon Fruits. *Food Science and Technology*, (29), 456-470.
- Cruz, R., Amor, A., Reza, R. 2023. Application of Polysaccharide-Based Edible Coatings on Fruits. *Polysaccharide*, (4), 99-115.
- Devi, S. K., Saini, R., Kapoor, M. 2023. Carnauba wax-based sustainable coatings for prolonging postharvest shelf-life of citrus fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71, 1345-1355.
- Dintcheva, N. T., Jayakumar, M., Lee, J. 2020. Natural Compounds as Sustainable Additives for Biopolymers. *Biomacromolecules* 21, 3950-3963.
- Dopazo, V., Luz, C., Mañes, J., Quiles, J. M., Carbonell, R., Calpe, J., Meca, G. 2021. Bio-preservative potential of microorganisms isolated from red grape against food contaminant fungi, 13, 412.
- Elsayed, M., Saleh, S., El-Gawad, A. 2022. Effect of Whey Protein Edible Coating Incorporated with Mango Peel Extract on Postharvest Quality, Bioactive Compounds and Shelf Life of Broccoli. *Journal of Food Quality*, 45, 1120-1132.
- Felipe, J., de Souza, V., Almeida, J. 2023. Cross-linked chitin films: Reinforced with *Randia* sp. fruit extract. *Food Science and Technology*, 32, 299-310.
- Gago, J., Martín, J., Pérez, L. 2005. Effect of whey protein- and hydroxypropyl methylcellulose-based edible composite coatings on color change of fresh-cut apples. *Journal of Food Science*, 70, 77-85.
- Hu, Y., Zhang, Q., Wang, R. 2016. Polyphenol-chitosan conjugates: synthesis, characterization, and applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 133, 43-45.
- Karakeçili, A., Satriano, C., Gumusderelioglu, M., Marletta, G. 2007. Relationship between the fibroblastic behaviour and surface properties of RGD-immobilized PCL membranes. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, (18), 317-319.
- Karakeçili, A., Topuz, B., Korpayev, S., Erdek, M. 2019. Metal-organic frameworks for on-demand pH-controlled delivery of vancomycin from chitosan scaffolds. *Materials Science and Engineering*, 105-110.
- Kumar, A., Singh, R., Gupta, R. 2024. Next generation edible nanoformulations for improving post-harvest shelf-life of citrus fruits. *Innovations in Food Science and Technology*, 1523-4567.
- La Spada, F., Aloï, F., Coniglione, M., Pane, A., Cacciola, S. O. 2021. Natural biostimulants elicit plant immune system in an integrated management strategy of the postharvest green mold of orange fruits incited by *Penicillium digitatum*. *Frontiers in Plant Science*, 126-145.

- Maftoonaazad, N., Shahrabi, M., Zarghami, M. 2019. Application and Evaluation of a Pectin-Based Edible Coating Process for Quality Change Kinetics and Shelf-Life Extension of Lime Fruit (*Citrus aurantifolium*). *Food Science and Technology*, 30, 201-212.
- Mihalca, V., Kerezsi, A., Weber, A. 2021. Protein-Based Films and Coatings for Food Industry Applications. *Polymers*, 5, 57-69.
- Mondal, M., Banerjee, R., Paul, S. 2022. Antimicrobial Applications of Chitosan. *Journal of Food Protection*, 85, 412-424.
- Mujtaba, M., Ali, A., Khan, M. 2023. Understanding the effects of chitosan, chia mucilage, and levan-based composite coatings on the shelf life of sweet cherry. *Postharvest Biology and Technology*, 194, 112-396.
- Mumtaz, S., Ali, M., Noor, M. 2022. Chitosan conjugated silver nanoparticles: The versatile antibacterial agents. *International Journal of Biological Macromolecules* 203, 283-296.
- Nair, S., Kumar, S., Patel, R. 2023. Edible Packaging: A Technological Update for the Sustainable Future of the Food Industry. *Food Packaging and Shelf Life*, 100-834.
- Nair, S., Tomar, M., Punia, S. 2020. Enhancing the functionality of chitosan- and alginate-based active edible coatings/films for the preservation of fruits and vegetables: A review, 164, 304-320.
- Palou, L., Valencia-Chamorro, S., Pérez-Gago, M. 2015. Antifungal edible coatings for fresh Citrus fruit: a review, 5, 962-986.
- Petkoska, A., Tzeng, D., Dimitrova, I. 2021. Edible packaging: Sustainable solutions and novel trends in food packaging. *Sustainability*, 139-823.
- Pillai, C. K. S., Paul, P., James, M. 2024. Polysaccharide-Based Edible Biopolymer-Based Coatings for Fruit Preservation: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64, 875-894.
- Pinto, M., Barros, L., Ferreira, I. 2023. Edible Coatings and Films for Preparation of Grapevine By-Product Infusions and in Freshly Processed Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71, 1241-1253.
- Qiao, S., Liu, Y., Li, X. 2021. Structure and Properties of Chitosan Films: Effect of the Type of Acidic Solvent. *Food Hydrocolloids*, 114, 106-443.
- Rahman, M. M., Ahmed, M., Karim, M. 2022. Evaluation of Chitin-Based Biocomposites Reinforced with *Tectona grandis* Leaf and Stem Extracts for Physical and Thermal Properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 13, 51-64.
- Ribeiro, L. S., Silva, J., Souza, E. 2024. Sustainable Innovations in Edible Films and Coatings: An Overview. *Food Packaging and Shelf Life*, 32, 101-150.
- Riolo, M., Luz, C., Santilli, E., Meca, G., Cacciola, S. O. 2023. Antifungal activity of selected lactic acid bacteria from olive drupes. *Food Bioscience*, 52, 102-422.
- Riseh, H., Jafari, S., Zandi, M. 2023. Chitosan-Based Nanocomposites as Coatings and Packaging Materials for the Postharvest Improvement of Agricultural Products: A Review. *Food Chemistry*, 416, 135-954.

- Roy, S., Ghosh, S., Mandal, A. 2022. Genipin-Cross-Linked Gelatin/Chitin-Based Functional Films: Reinforced with Thyme Oil and Quercetin. *Journal of Applied Polymer Science*, 139, 491-574.
- Santos, R., Silva, E., Rodrigues, J. 2019. Enhancing Storage Stability of Guava with Tannic Acid-Crosslinked Zein Coatings. *Food Chemistry*, 292, 265-272.
- Sharma, V. D. 2024. Edible Packaging to Prolong Postharvest Shelf-Life of Fruits and Vegetables: A Review. *Food Chemistry Advances*, 4, 100-711.
- Suhag, P., Ali, S., Gupta, A. 2020. Film Formation and Deposition Methods of Edible Coating on Food Products: A Review. *Food Hydrocolloids*, 108, 106-173.
- Tahir, M., Khan, M., Ahmed, R. 2019. Recent Developments in Gum Edible Coating Applications for Fruits and Vegetables Preservation: A Review. *Food Hydrocolloids*, 90, 191-210.
- Tebar, N., Alvarez, J., Lopez, J. 2023. Chitosan Edible Films and Coatings with Added Bioactive Compounds: Antibacterial and Antioxidant Properties and Their Application to Food Products: A Review, 15, 23-96.
- Vazquez, M., Herrera, P., Lopez, L. 2023. Edible Coatings as a Natural Packaging System to Improve Fruit and Vegetable Shelf Life and Quality. *Food Chemistry*, 40, 135-153.
- Vieira, A., Santos, D., Lima, R. 2021. Design of Single-Layer Cross-Linked Edible Films and Coatings Based on Chitosan and Alginate Emulsion Formulations. *Journal of Applied Polymer Science*, 13, 12-55.
- Wang, L., Zhang, Y., Li, X. 2021. Composite Chitosan Films Prepared Using Nisin and *Perilla frutescens* Essential Oil and Their Use to Extend Strawberry Shelf Life. *Journal of Food Science and Technology*, 58, 3502-3512.
- Wang, L., Zhang, Q., Li, S. 2024. Application of Chitosan in Fruit Preservation: A Review. *Food Chemistry Advances*, 101-234.
- Wigati, T., Lee, J., Arifin, N. 2023. Application of Pregelatinized Corn Starch and Basil Essential Oil Edible Coating with Cellulose Nanofiber as Pickering Emulsion Agent to Prevent Quality-Quantity Loss of Mandarin Orange. *Food Chemistry*, 439, 135-275.
- Yuvaraj, N., Kumar, R., Babu, S. 2021. Advances in Bio Food Packaging – An Overview. *Journal of Food Science and Technology*, 58, 1871-1884.
- Zhang, X., Wang, Y., Liu, L. 2022. Role of Organic Acid Structures in the Physical and Antioxidant Properties of Cross-Linked Chitin Films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 188, 323-334.