

**İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**GIDA AMBALAJ MALZEMESİ HEDEFLİ BERBERİN KATKILI KİTOSAN  
FİLMERİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Seray ÖZTÜRK**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Kimya Programı**

**HAZİRAN 2022**



**GIDA AMBALAJ MALZEMESİ HEDEFLİ BERBERİN KATKILI KİTOSAN  
FİLMLEİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Seray ÖZTÜRK  
(509201222)**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Kimya Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. F. Bedia ERİM BERKER  
Eş Danışman: Öğr. Gör. Dr. Zeynep KALAYCIOĞLU**

**HAZİRAN 2022**



İTÜ, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün 509201222 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Seray ÖZTÜRK, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı, “GIDA AMBALAJ MALZEMESİ HEDEFLİ BERBERİN KATKILI KİTOSAN FİMLERİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :** **Prof. Dr. Fatma Bedia ERİM BERKER** .....  
İstanbul Teknik Üniversitesi

**Eş Danışman :** **Öğr. Gör. Dr. Zeynep KALAYCIOĞLU** .....  
İstanbul Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri :** **Prof. Dr. Ayşegül GÖLCÜ** .....  
İstanbul Teknik Üniversitesi

**Doç. Dr. Gülşen AKIN EVİNGÜR** .....  
Piri Reis Üniversitesi

**Doç. Dr. Hakan KAYGUSUZ** .....  
Altınbaş Üniversitesi

**Teslim Tarihi :** **2 Haziran 2022**  
**Savunma Tarihi :** **23 Haziran 2022**





*Anneme, babama ve kardeşime,*





## ÖNSÖZ

Lisans sürecimden bugüne kadar bilgi, birikim, tecrübe ve desteğini esirgemeyen, bu yüksek lisans tez çalışmasının yürütücüsü ve fikir öncüsü olan çok değerli hocam, danışmanım Prof. Dr. F. Bedia ERİM BERKER'e sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın çok sevdiğim, çok değer verdiğim bir diğer yürütücüsü, eş danışmanım Öğr. Gör. Dr. Zeynep KALAYCIOĞLU'na tüm manevi destekleri ve esirgemediği tüm bilgiler için ve en çok da bu yolculuğuma kattığı güzellikler için çok teşekkür eder, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Bu tez çalışmasının bir parçası olan, bilgi ve desteklerine çeşitli deneylerde başvurduğum sayın hocalarım Prof. Dr. Emrah TORLAK ve Doç. Dr. Gülşen AKIN EVİNGÜR'e katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca destek ve motivasyon sağlayan hocalarım Araş. Gör. Nilay KAHYA ve Araş. Gör. Veselina ADIMCILAR'a çok teşekkür etmek isterim.

POLİTEKNİK METAL A.Ş.'de kariyerimin ilk adımlarını atmama olanak sağlayan Dr. Can AKYIL ve Yük. Müh. Pınar AFŞİN'e hem kariyer yolculuğumdaki hem de tez sürecindeki destekleri için çok teşekkür ederim.

Uzun yıllardır arkadaşım ve sonrasında da meslektaşım olan Dila ÇETİN, İremnaz EYÜBOĞLU ve Sude AYIK'a kucak dolusu sevgilerimi sunarım.

Bu yüksek lisans tez çalışması İTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 43404). İstanbul Teknik Üniversitesi'ne ve İTÜ BAP birimine bilim destekçisi olduklarından dolayı minnettarım.

Son olarak hayattaki en büyük destekçilerim, biricik anneme, babama ve kardeşime her daim yanımda olup bana şans oldukları için kucak dolusu sevgilerimi sunarım.

Bilime olan merakımın ve motivasyonumun hayat boyu devam etmesi dileğiyle...

Haziran 2022

Seray ÖZTÜRK  
(Kimyager)



## İÇİNDEKİLER

|                                                                                             | <u>Sayfa</u> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>ÖNSÖZ.....</b>                                                                           | <b>vii</b>   |
| <b>İÇİNDEKİLER .....</b>                                                                    | <b>ix</b>    |
| <b>KISALTMALAR .....</b>                                                                    | <b>xi</b>    |
| <b>SEMBOLLER .....</b>                                                                      | <b>xiii</b>  |
| <b>ÇİZELGE LİSTESİ.....</b>                                                                 | <b>xv</b>    |
| <b>ŞEKİL LİSTESİ.....</b>                                                                   | <b>xvii</b>  |
| <b>ÖZET.....</b>                                                                            | <b>xix</b>   |
| <b>SUMMARY .....</b>                                                                        | <b>xxi</b>   |
| <b>1. GİRİŞ .....</b>                                                                       | <b>1</b>     |
| <b>2. KİTOSAN .....</b>                                                                     | <b>5</b>     |
| 2.1 Kitin ve Kitosan .....                                                                  | 5            |
| 2.2 Kitin ve Kitosanın Özellikleri .....                                                    | 6            |
| 2.3 Kitosanın Fiziksel Formları.....                                                        | 8            |
| 2.3.1 Hidrojeller .....                                                                     | 9            |
| 2.3.2 Mikroküreler .....                                                                    | 9            |
| 2.3.3 Filmler .....                                                                         | 9            |
| 2.4 Kitosanın Çapraz Bağlanması .....                                                       | 9            |
| <b>3. BERBERİN.....</b>                                                                     | <b>13</b>    |
| 3.1 Berberinin Yapısı ve Özellikleri .....                                                  | 13           |
| 3.2 Berberinin Çözünürlüğü ve Siklodekstrinler .....                                        | 14           |
| 3.3. Berberinin Farmakolojik Kullanım Alanları .....                                        | 17           |
| 3.4 Literatür İncelemesi .....                                                              | 19           |
| <b>4. DENEYSEL KISIM.....</b>                                                               | <b>21</b>    |
| 4.1 Kullanılan Kimyasallar .....                                                            | 21           |
| 4.2 Kullanılan Cihazlar .....                                                               | 21           |
| 4.3 Film Çözeltilerinin Hazırlanması .....                                                  | 21           |
| 4.4 Kitosan Bazlı Filmlerin Hazırlanması ve Çapraz Bağlanması.....                          | 22           |
| 4.5 Kitosan Filmlere Uygulanan Fiziksel Testler .....                                       | 23           |
| 4.5.1 Filmlerin şişme miktarlarının belirlenmesi .....                                      | 23           |
| 4.5.2 Filmlerin çözünürlük miktarlarının belirlenmesi .....                                 | 23           |
| 4.5.3 Filmlerin su buharı geçirgenliği .....                                                | 23           |
| 4.6 Mekanik Testler .....                                                                   | 24           |
| 4.7 Kitosan Filmlerin Antioksidan ve Antibakteriyel Aktiviteleri.....                       | 24           |
| 4.7.1 DPPH analizi .....                                                                    | 24           |
| 4.7.2 Kitosan bazlı filmlerin DPPH analizi ile antioksidan aktivitesinin belirlenmesi ..... | 25           |
| 4.7.3 Kitosan bazlı filmlerin antibakteriyel aktivitesi.....                                | 26           |
| <b>5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....</b>                                                        | <b>27</b>    |
| 5.1 Kitosan Bazlı Filmler .....                                                             | 27           |
| 5.2 Kitosan Bazlı Filmlerin Çapraz Bağlanması .....                                         | 28           |
| 5.3 Fiziksel Testler .....                                                                  | 29           |

|                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.3.1 Kitosan bazlı filmlerin şişme miktarları.....           | 29        |
| 5.3.2 Kitosan bazlı filmlerin çözünürlük miktarları.....      | 30        |
| 5.3.3 Kitosan bazlı filmlerin su buharı geçirgenliği.....     | 31        |
| 5.4 Mekanik Testler.....                                      | 33        |
| 5.5 Kitosan Bazlı Filmlerin Antioksidan Aktiviteleri .....    | 34        |
| 5.6 Kitosan Bazlı Filmlerin Antimikrobiyal Aktiviteleri ..... | 36        |
| 5.7 Tartışma.....                                             | 39        |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>                                         | <b>41</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>                                          | <b>47</b> |



## KISALTMALAR

|                  |                                       |
|------------------|---------------------------------------|
| <b>2-HP-β-CD</b> | : 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin |
| <b>BHA</b>       | : Bütil hidroksianisol                |
| <b>BHT</b>       | : Bütil hidroksitoluen                |
| <b>DMAPE</b>     | : Düşük molekül ağırlıklı polietilen  |
| <b>DNA</b>       | : Deoksiribonükleik asit              |
| <b>DPPH</b>      | : 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil       |
| <b>KOB</b>       | : Koloni oluşturan birim              |
| <b>PET</b>       | : Polietilen teraftalat               |
| <b>PP</b>        | : Polipropilen                        |
| <b>PV</b>        | : Polivinil klorür                    |
| <b>TPP</b>       | : Tripolifosfat                       |
| <b>UV</b>        | : Ultraviyole                         |
| <b>YMAPE</b>     | : Yüksek molekül ağırlıklı polietilen |



## SEMBOLLER

|                      |                    |
|----------------------|--------------------|
| <b>A</b>             | : Alan             |
| <b>°C</b>            | : Santigrad derece |
| <b>cm</b>            | : Santimetre       |
| <b>dk</b>            | : Dakika           |
| <b>h</b>             | : Saat             |
| <b>mg</b>            | : Miligram         |
| <b>m<sup>2</sup></b> | : Metrekare        |
| <b>mL</b>            | : Mililitre        |
| <b>mm</b>            | : Milimetre        |
| <b>MPa</b>           | : Mega paskal      |
| <b>µL</b>            | : Mikrolitre       |
| <b>Pa</b>            | : Paskal           |
| <b>t</b>             | : Zaman            |





## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

|                                                                                                       |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Çizelge 5. 1 :</b> Film bileşenlerinin miktarlarının belirlenmesi için denenen miktarlar.<br>..... | <b>27</b> |
| <b>Çizelge 5.2 :</b> Üç farklı film türüne ait % şişme sonuçları.....                                 | <b>29</b> |
| <b>Çizelge 5.3 :</b> Filmlerin % çözünürlük sonuçları. ....                                           | <b>31</b> |
| <b>Çizelge 5.4 :</b> Filmlerin su buharı geçirgenliği. ....                                           | <b>32</b> |
| <b>Çizelge 5.5 :</b> Kitosan bazlı filmlerin su buharı geçirgenliğinin karşılaştırılması. ....        | <b>32</b> |
| <b>Çizelge 5.6 :</b> Filmlerin mekanik özellikleri. ....                                              | <b>33</b> |
| <b>Çizelge 5.7 :</b> Filmlerin % inhibisyon sonuçları. ....                                           | <b>34</b> |



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

|                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1 : Kitinden kitosan eldesinin şematik gösterimi. ....                                                                                                       | 5  |
| Şekil 2.2 : A: kitinin, B: kitosanın kimyasal yapısı. ....                                                                                                           | 5  |
| Şekil 2.3 : Kitosanın reaktif fonksiyonel grupları. ....                                                                                                             | 7  |
| Şekil 2.4 : Kitosanın çeşitli fiziksel formları. ....                                                                                                                | 8  |
| Şekil 2.5 : TPP-kitosan reaksiyon mekanizması ....                                                                                                                   | 11 |
| Şekil 3.1 : İzokinolin yapısı. ....                                                                                                                                  | 13 |
| Şekil 3.2 : Berberinin kimyasal yapısı. ....                                                                                                                         | 14 |
| Şekil 3.3 : Berberin klorürün kimyasal yapısı. ....                                                                                                                  | 15 |
| Şekil 3.4 : A: $\alpha$ , B: $\beta$ ve C: $\gamma$ siklodekstrinin kimyasal yapısı. ....                                                                            | 15 |
| Şekil 3.5 : Berberinin bazı biyoaktif etkileri. ....                                                                                                                 | 17 |
| Şekil 3.6 : Berberinin yapı fonksiyon ilişkisi. ....                                                                                                                 | 18 |
| Şekil 3.7 : Berberinin antidiyabetik aktivitesinin kısa bir yapı fonksiyon ilişkisi. ....                                                                            | 18 |
| Şekil 5.1 : Çapraz bağlı A: Kit-Su, B: Kit-CD-Ber ve C: Kit-CD filmleri. ....                                                                                        | 28 |
| Şekil 5.2 : Filmlere ait % şişme değerlerinin karşılaştırılması. ....                                                                                                | 30 |
| Şekil 5.3 : Filmlerin zamana bağlı % şişme sonuçları. ....                                                                                                           | 30 |
| Şekil 5.4 : Filmlerin gerilim-gerinim eğrileri. ....                                                                                                                 | 33 |
| Şekil 5.5 : Filmlerin % DPPH aktiviteleri. ....                                                                                                                      | 34 |
| Şekil 5.6 : Filmlerin (A) <i>B. Cereus</i> ve (B) <i>S. Typhimurium</i> bakterilerine karşı gösterdiği antibakteriyel aktiviteler. ....                              | 37 |
| Şekil 5.7 : Kitosan bazlı filmlerin log KOB/ g film türünden (A) <i>B. Cereus</i> ve (B) <i>S. Typhimurium</i> bakterilerine karşı antibakteriyel aktiviteleri. .... | 37 |



## **GIDA AMBALAJ MALZEMESİ HEDEFLİ BERBERİN KATKILI KİTOSAN FİLMLERİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

### **ÖZET**

Gıda ambalajları gıdanın raf ömrünün uzamasında ve gıdayı dış etkenlerden korumada birincil rol oynar. Gıda endüstrisinin sahip olduğu geniş yelpaze, doğru orantılı olarak ambalaj endüstrisinin büyümesine yol açar. Ambalaj malzemelerinin kaynak olarak petrokimyasal bazlı ürünlerden elde edilmesi, atık ambalajların bir çevresel soruna dönüşmesine neden olur. Çevresel kirliliği önlemek için gelişen hassasiyetlerle birlikte doğa dostu ambalaj malzemeleri oluşturulmaya başlanmıştır. Doğa dostu olarak ifade edilen ambalaj malzemeleri, biyobozunur ve biyoyumlu özellikler taşırlar. Bu çalışmada, bir biyopolimer olan kitosana berberin klorür standardı eklenerek alternatif bir gıda ambalaj malzemesi oluşturmak hedeflenmiştir.

Kitosan, birçok canlının yapı polisakkariti olan kitinin deasetilasyonu sonucu elde edilen bir biyopolimerdir. Seyreltik asit ile hazırlanan kitosan çözeltisi, çözelti dökme tekniği ile film haline getirilir. Böylece kitosan, ambalaj malzemesi olarak kullanılabilen bir yapıya dönüştürülür. Ayrıca kitosan, biyobozunurluk, biyoyumluluk, biyoyararlılık ve toksik olmama gibi önemli özelliklere de sahiptir. Kitosanı çeşitli biyoaktif ürünlerle katkılandırmak mümkündür. Bu sayede sentetik gıda koruyucuları kullanmadan doğal kaynaklar yoluyla gıdaların bozulmasını önleyebilecek gıda ambalaj malzemeleri geliştirilebilir.

Bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında kitosan filmin katkılandırılması berberin klorür standardı ile sağlanmıştır. Berberin, çeşitli bitkilerin yapısında bulunan bir alkaloid bileşiktir. Berberin katkısı ile kitosan filme antioksidan ve antimikrobiyal aktivite kazandırılarak, berberin içerikli kitosan filmin aktif paketleme ürünü olması hedeflenmiştir. Berberin klorür standardının suda çözünmesi 2-hidroksipropil- $\beta$ -siklodekstrin kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Saf kitosan film, berberin ilaveli film ve berberin hariç tüm bileşenleri içeren kontrol filmin özellikleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Elde edilen filmler sodyum tripolifosfat çözeltisi ile fiziksel olarak çapraz bağlanmıştır. Hazırlanan 3 farklı filmin şişme, çözünürlük, su buharı geçirgenliği ve çekme kuvvetine yönelik deneyler yapılmıştır. Ayrıca filmlerin, antioksidan ve antibakteriyel aktiviteleri de incelenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, berberin klorür standardı içeren kitosan filmin, kontrol film ve saf kitosan filme göre fiziksel özelliklerinin iyileştiği gözlenmiştir. Berberin katkısının kitosan filmlerin antioksidan ve antibakteriyel aktivitesini artırdığı da görülmüştür.

Yapılan çalışmalar ve elde edilen sonuçlar ışığında berberin klorür standardı içeren kitosan filmin alternatif bir gıda ambalaj malzemesi olabileceği sonucuna başarı ile ulaşılmıştır.



## **PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF FOOD PACKAGING MATERIAL TARGETED FILMS WITH THE ADDITION OF BERBERINE TO CHITOSAN FILMS**

### **SUMMARY**

Food packaging takes an active role in both extending the shelf life of the food and protecting the food from external factors. The wide range of the food industry leads to growth directly proportional to the packaging industry. As a result of increased food consumption, packaging materials are produced exceedingly. Obtaining packaging materials from petrochemical-based substances as a source causes becoming an environmental problem of waste packaging. Although plastic and its derivatives, which are traditional packaging materials, are effective in protecting foods, they create serious environmental problems that present the food industry as a source of pollution and social concern. Increasing sensitivity to environmental pollution has enabled the production of eco-friendly packaging materials. Packaging materials, which are expressed as eco-friendly, have biodegradable and biocompatible properties. In this master's degree thesis, it was targeted to generate an alternative food packaging material by adding berberine chloride standard to chitosan as a biopolymer.

Chitosan is a deacetylation product of chitin which is the structural polysaccharide of many living beings. Some insects, sea creatures, and fungies carry chitin structurally. Chitosan is obtained from chitin by some processes. Prepared with a diluted acid solution, chitosan is turned into a film by a solution casting process. Firstly, chitosan is dissolved with a diluted acid then this solution is poured into a petri dish. Poured film solution is dried at room temperature or a specific temperature in an oven. Lastly, the dried film is peeled from the petri dish. By using this method, chitosan is converted to a form that can be used as a packaging material. In addition to this, chitosan has biodegradability, biocompatibility, bioavailability, and non-toxicity properties. These properties make the chitosan film eco-friendly material. Though the traditional plastic packagings have some advantages such as plenty of availability, mechanical properties and cost efficiency, this type of packaging causes environmental pollution and accumulation of some greenhouse gases such as carbon dioxide and methane. Furthermore, to reduce the effect of plastic packaging pollution, recycling have to be used but the recycling process requires energy and cost-efficiency. At this point, chitosan film can be a good candidate for its biodegradability property. It is possible to add various products to the chitosan. In this way, it is gained to chitosan such properties antioxidant and antibacterial activities which are responsible for preventing the spoilage of foodstuffs. Antioxidants are compounds that prevent radical oxidation reactions.

These types of substances are added to the foodstuffs to prevent them from spoilage. Generally, some synthetic antioxidants such as butylated hydroxy anisol (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) are added to the foods but some research is shown that these substances have negative impacts on the human body.

When considered from this point, chitosan has advantages because it can be incorporated with some natural antioxidant sources. Using this application active food packaging materials can be developed that can prevent foodstuffs from spoilage through natural antioxidants without using synthetic antioxidants. It was understood from the 'active' expression that the packaging material supplemented with natural sources plays an active role in food packaging. Traditional packaging materials cover the foodstuffs and protect them from external factors. In the contrary, active packaging materials play a role not only in coverage but also in preventing spoilage of the foodstuffs.

It is usually utilized from vegetable oils, fruit, and vegetable extracts as additive substances. In this thesis study, berberine which is a compound that can be found in many plants is used as a standard form. This form is berberine chloride standard. The chitosan film which was including the berberine chloride standard showed antioxidant activity by comparison with the control film. The antioxidant activity was measured with the DPPH method. This method is based upon the reduction reaction. Antioxidant substance reacts with the DPPH and the reaction has resulted in the reduction of DPPH. More reducing means more antioxidant capability. Furthermore, the reaction is followed and calculation is done by absorbance change. This easy application makes the DPPH analysis popular. It is applied easily and got results in a short time.

Within the scope of this master thesis, berberine which is an alkaloid compound found in the structure of various plants, has been used to increase the efficiency of chitosan film. Using berberine provides antioxidant activity to chitosan film. Chitosan has a mild antibacterial property against some microorganisms which is one of the essential properties to protect the foods. In this study, berberine incorporation increased the antibacterial activity of chitosan film against *Bacillus cereus* and *Salmonella Typhimurium*. The physical properties of the film with increased antioxidant and antimicrobial properties as an active food coating material were also determined.

It has benefited from cyclodextrin to dissolve the berberine chloride standard. Cyclodextrins are substances like a truncated cone shape. These substances have a hydrophobic cavity and hydrophilic outer surface. This type of structure makes cyclodextrins popular for water-insoluble substances. The dissolving of the berberine chloride standard is provided with the hydrophobic cavity of the cyclodextrin. In this master study, 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin has been used to dissolve the berberine chloride standard. After dissolving of the berberine chloride standard, it is incorporated with chitosan solution. The incorporated solution is the film solution containing a berberine additive. This film solution is poured into a petri dish and then dried in the oven.

The properties of pure chitosan film, berberine added film and control film containing all components except berberine were examined comparatively. All the films have been crosslinked with sodium tripolyphosphate solution. The crosslinking process has been done after the films have been dried. After all, the steps are completed, the film samples have been kept in a humidity cabinet that has 25 °C temperature and 50 % relative humidity.



Characterization experiments were carried out on all the films. These are swelling, solubility, water vapor permeability, tensile strength, and antioxidant and antibacterial activity tests. Physical tests, antioxidant and antibacterial activity results of chitosan film containing berberine chloride were more successful than control film and pure chitosan film in terms of properties of a food packaging material. The addition of berberine chloride made the chitosan film more durable. The fact that the addition of berberine chloride increases the antioxidant and antibacterial activity of the film is an indication that the obtained films can prevent the deterioration of foodstuffs. In the light of the studies and the results obtained, it has been successfully concluded that chitosan film containing berberine chloride can be an alternative food packaging material. Finally, it is advisable to apply the combination of chitosan with some natural substances. Applications of biopolymeric materials cover a very wide area. Increasing environmental pollution, problems, and concerns are prompting us to do something about saving nature for generations to come. Scientific research is opening a new door and view in many areas like this master thesis. Not only this study but also many other academic studies aim to give a point of view on this subject. This study aimed to develop a product that will solve environmental concerns and shed light on this issue in the future. Moreover, increasing sensitivity to environmental issues can create a new sustainable world. Governments, organizations, and public attention are necessary at this point. Like many other problem solving, environmental problems require working together.



## 1. GİRİŞ

Gıda ambalajı, gıdanın dış etkenlerden korunmasında birincil rol oynar. Ambalajlamanın esas amaçları ise gıdayı en ekonomik şekilde bozulmadan tutmak, gıda güvenliğini sağlamak ve zararlı çevresel etkilerini en aza indirmektir [1]. Ambalaj aynı zamanda gıdaların depolanması ve hazırlanması esnasında gerçekleşebilecek kimyasal, fiziksel ve biyolojik değişimleri (bozulmaları) önleyebilir [2].

Plastik ambalajlar, düşük fiyat, hafiflik, kullanım kolaylığı ve korozyon direnci nedeniyle ambalaj malzemeleri arasında popülerlik göstermektedir [3]. Geleneksel ambalaj materyallerinden olan plastik ve türevleri gıdaların korunmasında etkili olsa da ciddi çevre sorunları yaratmaktadır [4]. Gıda ambalajlamada kullanılan plastik reçinelerden bazıları, yüksek molekül ağırlıklı polietilen (YMAPE), düşük molekül ağırlıklı polietilen (DMAPE), polietilen teraftalat (PET), polipropilen (PP) ve polivinil klorürdür (PVC) [3]. Plastik endüstrisi çoğunlukla fosil kaynaklara bağlıdır. Bu materyaller sahip oldukları bariyer ve mekanik özellikler, bol bulunabilirlik ve maliyet etkinliği gibi özelliklerden dolayı tercih edilirler. Ancak plastik ürünlerin imha edilmesi sera gazı emisyonu, karbondioksit ( $CO_2$ ) ve metan gazı ( $CH_4$ ) birikimine neden olup önemli çevre sorunlarına yol açmaktadır [5]. Son yıllarda, doğal kaynakların sınırlı olması, gıda güvenliği ve petrokimyasal kaynaklı plastik ürünlerin neden olduğu çevre sorunları nedeniyle biyolojik olarak parçalanabilen biyo-bazlı ambalaj ürünleri ilgi görmeye başlamıştır. Bu hedefle, biyobozunur ve yenilebilir karbonhidrat polimerlerinden olan nişasta, selüloz türevleri, kitosan ve pektin gibi gıdaların raf ömrünü uzatmayı hedefleyen paketleme malzemeleri geliştirilmektedir [6]. Polisakkarit tipi doğal polimerler arasında bulunan kitosan kabuklu canlıların kabuklarından, bazı eklem bacaklıların üst derisinden ve mantarların hücre duvarı gibi biyolojik kaynaklardan elde edilen kitinin deasetilasyonu sonucu oluşturulan doğal bir polimerdir [7].

Kitosanın toksik olmadığı, biyobozunur, biyofonksiyonel ve biyouyumlu özellikler gösterdiği, antimikrobiyal ve antifungal gibi pek çok biyoaktiviteye sahip olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir [4]. Kitosan filmler ise esneklik, dayanıklılık, sağlamlık, tokluk ve yüksek kırılma direnci gibi özellikler göstermelerinin yanı sıra orta seviyede su ve oksijen geçirgenliğine sahiptirler [7].

Günümüzde, bir gıda ambalajının sadece dış faktörlere karşı fiziksel bir bariyer olması dışında ambalajın bazı ek fonksiyonlara da sahip olması beklenmektedir. Bu noktada da devreye aktif paketler girer [8]. Aktif paketlenme, paketlenmiş ürünün kalitesini korurken, gıdanın raf ömrünü uzatmak, güvenlik veya duyuşsal özelliklerini iyileştirmek için ambalaj bileşenleri ve gıda ile etkileşime giren bir paketlenme sistemi olarak tanımlanabilir [9]. Bunlara ek olarak, aktif ambalajlar antioksidan ve antimikrobiyal özellikler taşırlar. Renklendiriciler, tatlandırıcılar, bazı besinler ve baharatlar içerebilirler [8].

Kitosanın diğer biyomolekül bazlı aktif filmlerle karşılaştırılması sonucunda gösterdiği hafif antibakteriyel özelliği ile diğer polisakkaritlere göre daha avantajlı olduğu sonucuna varılmıştır [4]. Gıdanın uzun raf ömrüne sahip olması ve kalite devamlılığı için aktif kompozit filmler üretmek amacıyla, kitosan filmler doğal antioksidan özleriyle birleştirilerek kullanılırlar [10].

Berberin, birçok bitki türünden elde edilen kuarterner izokinolin alkaloididir. Alkaloidlerin hiperlipidemi, diyabet, metabolik sendrom, polikistik over sendromu, obezite, karaciğer yağlanması, kolesterol, koroner arter hastalığı gibi birçok hastalığa karşı tedavi edici etkiye sahip olduğu; antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser aktiviteleri klinik çalışmalar tarafından gösterilmiştir [11,12]. Ayrıca berberin, ishal önleyici, sıtma önleyici ve mide ağrısına karşı bir ilaç olarak hem modern hem de geleneksel tıpta kullanılmaktadır [13].

Kitosanın, *Porphyromonas gingivalis*, *Escherichia coli*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus mutans* türlerine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirtilmiştir [14]. Kitosan filmlerin yumurta, çeşitli meyve ve sebze, süt ürünleri ve et gibi gıdalardaki etkisi incelenmiş, gıdaya kitosan film uygulamasının gıdaların kalitesini ve raf ömrünü artırdığı, kontaminasyona ve mikrobiyal bozulmalara karşı koruma sağladığı gözlemlenmiştir [15].

Berberinin, *Bacillus cereus* gibi Gram pozitif ve *Salmonella typhimurium* gibi Gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel; çeşitli mikroorganizmalara karşı ise antimikrobiyal aktivite gösterdiği bilinmektedir [13]. Berberinin saf sudaki çözünürlüğü (<1 mg/mL, 25 °C) çok düşüktür [16,17]. Sudaki çözünürlüğünü artırmak için siklodekstrinlerden faydalanılmaktadır. Siklodekstrinler, hidrofobik iç boşluğa ve hidrofilik dış yüzeye sahip kesik koni şeklindeki, çeşitli küçük moleküllerle inklüzyon kompleksi oluşturabilen yapılardır [18,19]. Özellikle de sudaki çözünürlüğü düşük olan ilaçlar gibi bazı moleküllerin çözünürlüğünü artırarak biyoyararlanımını iyileştirirler [19].

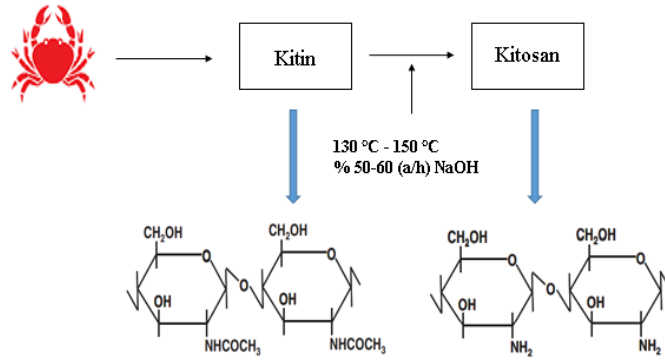
Bu yüksek lisans tez çalışmasında, kitosanın film oluşturabilme özelliğinden faydalanarak bir gıda ambalaj malzemesi geliştirilmiştir. Bu ambalaj malzemesi aynı zamanda berberin klorür standardı ile de katkılandırılarak antioksidan ve antibakteriyel aktivite gösteren bir aktif paketleme sistemi oluşturulmuştur. Berberin klorür standartının sudaki çözünürlüğü ise 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin (2-HP- $\beta$ -CD) ile artırılarak, berberinin kitosan film içinde homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır. Elde edilen berberin klorür katkılı kitosan filmin gıda ambalaj malzemesi için uygunluğu ise çeşitli fiziksel, mekanik ve kimyasal testler yoluyla ölçülmüştür. Uygulanan fiziksel ve mekanik testler; şişme, çözünürlük, su buharı geçirgenliği ve gerilme kuvvetidir. Bunlar dışında filmlerin antioksidan ve antibakteriyel aktivite özellikleri de biyokimyasal testler sonucunda değerlendirilmiştir.



## 2. KİTOSAN

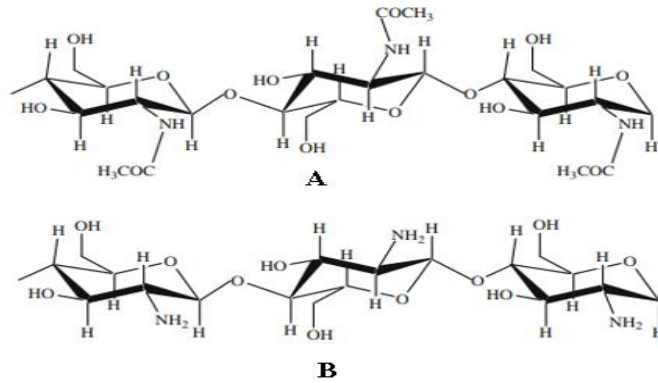
### 2.1 Kitin ve Kitosan

Kitosan yengeç, karides ve kerevit gibi deniz canlılarının kabuklarında bulunan ve önemli bir bileşen olan kitinin deasetilasyonu sonucu elde edilen bir karbonhidrat biyopolimeridir [13]. Kitin, selülozdan sonra doğada en çok bulunan polisakkarittir. Kitin, 2-asetamido-2-deoksi-glukopiranoz polimeri, kitosan ise kitinin N-deasetil türevidir [20].



**Şekil 2.1 :** Kitinden kitosan eldesinin şematik gösterimi.

Şekil 2.1'de görüldüğü gibi kitinden kitosa dönüşümünün elde edilmesi 130-150 °C sıcaklıkta, %50-60 konsantrasyondaki NaOH çözeltisi ile sağlanır [21].



**Şekil 2.2 :** A: kitinin, B: kitosa'nın kimyasal yapısı [20].

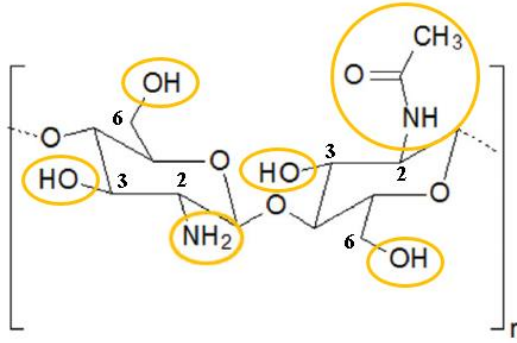
Şekil 2.2' de kitin ve kitosanın kimyasal yapıları gösterilmektedir. Deasetilasyon genellikle tüm zincir boyunca homojen ve eksiksiz olarak gerçekleşmez. Ticari kitosan genel olarak %70-95 deasetilasyon derecesine ve  $10^4$  g/mol ile  $10^6$  g/mol arasında bir molekül ağırlığına sahiptir. Deasetilasyon derecesine ve molekül ağırlıklarına bağlı olarak kitosan örneklerinin uygulamaları ve biyopolimerin son hali belirlenir [22]. Deasetilasyon derecesi, glukozamin/ N-asetil glukozamin oranı ile ifade edilir. Bu oran, kitin kitosana dönüştürüldüğünde artar. N-asetil glukozamin yüzdesinin glukozamin yüzdesinden fazla olduğunda biyopolimer kitin olarak adlandırılırken; glukozamin yüzdesinin N-asetil glukozaminden fazla olduğu biyopolimer yapısı ise kitosan olarak adlandırılır [23]. Kitosanın çözünürlüğü, biyobozunurluğu, reaktivitesi ve birçok substratın adsorpsiyonu polimerik zincirdeki protonlanmış amino gruplarının miktarına bağlıdır. Dolayısıyla da asetillenmiş ve asetillenmemiş glukozamin birimlerinin oranına bağlıdır [24].

## 2.2 Kitin ve Kitosanın Özellikleri

Doğal aminopolisakkaritler olan kitin ve kitosan polimerleri, benzersiz yapılara, çok boyutlu özelliklere, son derece karmaşık işlevlere, biyomedikal ve endüstriyel alanlarda geniş kapsamlı uygulamalara sahiptirler [24]. Doğal olarak bol miktarda bulunan ve yenilebilir polimerler olan kitin ve kitosan, biyolojik bozunabilirlik, biyolojik uyumluluk, zehirli olmama ve adsorpsiyon gibi özellikler taşırlar [25]. Selüloz, dekstran, pektin, aljinik asit, agar, agaroz ve karragenan gibi doğal olarak oluşan birçok polisakkarit nötral veya asidik özellik gösterirken kitin ve kitosan bazik polisakkaritlerdir [20]. Kitin ve selüloz,  $\beta$  (1-4) – anhidroglukozidik bağa sahip olmaları ve doğal yapı polisakkaritleri olarak bulunmaları gibi özellikler açısından benzerlik gösterebilir de karakteristik özellikleri bakımından birbirlerinden ayrılırlar [20,25]. Kitinin deasetilasyon derecesi yaklaşık %50'ye ulaştığında, sulu asidik ortamda çözünür hale gelir ve kitosan olarak adlandırılır. Bu çözünürlük, tekrarlanan D-glukozamin ünitelerinin C<sub>2</sub> pozisyonundaki –NH<sub>2</sub> fonksiyonel gruplarının protonlanması ile gerçekleşir. Sonuç olarak polisakkarit, asidik ortamda bir polielektrolite dönüşür [26]. Kitin, son derece hidrofobik olup suda ve birçok organik çözücünde çözünmez. Heksafloroizopropanol, hekzafloroaseton, kloroalkollerin mineral asitlerinin sulu çözeltisi ile konjugasyonunda ve %5 lityum klorür içeren dimetilasetamid çözeltilerinde kitin çözünürlüğe sahiptir.



Kitosan ise seyreltik formik asit ve asetik asit çözeltilerinde çözünür [20]. Şekil 2.3'te gösterildiği gibi kitosan, sırasıyla C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> ve C<sub>6</sub> pozisyonlarında olmak üzere 3 tane reaktif fonksiyonel gruba sahiptir. Bu gruplar sırasıyla; amino/asetamido grubu, birincil ve ikincil hidroksil grupları şeklindedir.



**Şekil 2.3 :** Kitosanın reaktif fonksiyonel grupları.

Kitosanın yapısında bulunan amino fonksiyonel grupları, kitosanın yapısal ve fiziko-kimyasal özelliklerindeki farklılıklara katkıda bulunan ana faktörlerdendir. Amino gruplarının rastgele dağılmış olması, molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağları oluşumunu kolaylaştırır [27].

Genel hatlarıyla kitosanın önemli bazı kimyasal ve biyolojik özellikleri aşağıdaki gibi sıralanabilir [25, 28-30]:

Kimyasal özellikler:

- Lineer bir poliamindir.
- Reaktif aminogruplar içerir.
- Reaktif hidroksil grupları vardır.
- Birçok geçiş metaliyle şelat oluşturur.

Biyolojik özellikler:

- Doğal bir polimerdir.
- Normal vücut bileşenlerine biyolojik olarak parçalanabilir.
- Güvenilirdir ve zehirli değildir.
- Diş eti bağ dokusu üzerinde yenileyici etkiye sahiptir.
- Kemik oluşumundan sorumlu genç kemik hücrelerinin oluşumunu hızlandırır.
- Antitümör, antikanser, antioksidan, antimikrobiyal, anti-inflamatuvar aktivitelere sahiptir.

- g) Hemostatik, fungistatik ve spermisit etki gösterir.
- h) Merkezi sinir sistemi yatıştırıcıdır.

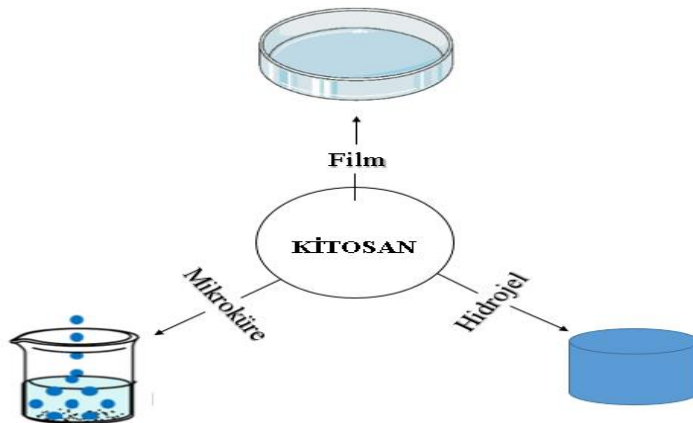
Kitosanın katyonik özelliği diğer bileşiklerle elektrostatik etkileşimler kurmasını sağlar. Kitosan bu özelliklerinden dolayı yenilenebilir filmlerin oluşturulmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu özellikler ek olarak, geçirgen film oluşturma kapasitesi ve mekanik özellikleri sayesinde çeşitli paketlenme ihtiyaçlarında uygulanacak bir film bileşeni olma özelliği taşır [31].

Kitin gibi malzemelerin antibakteriyel aktivitesi, mikroorganizmaların hücre içi moleküllerinin sızmasına yol açan bakteri hücre duvarlarının negatif yükleriyle etkileşime giren pozitif yükleriyle bağlantılıdır [23].

Kitosandan elde edilen biyofilmler, gıdaların uzun süreli depolanmasına olanak sağlar. Sebzelerin, meyvelerin, tahılların ve balıkların antimikrobiyal özellikteki kitosan film ile kaplanmasıyla kitosan, mikrobiyal istilayı geciktirir ve koruyucu bir bariyer gibi davranarak gıdanın duysal ve besleyici kalitesini de artırır [23].

### 2.3 Kitosanın Fiziksel Formları

Kitosan ve kitosan karışımları çeşitli fiziksel formlarda bulunabilirler. Bu fiziksel formlar arasında reçineler, mikroküreler, hidrojeller, filmler ve lifler yer alır. Belirli bir fiziksel formun seçimi, belirli uygulamalar için kullanılacak sistem konfigürasyonuna bağlıdır. Hedeflenen formun şekillendirilmesi karışım bileşenlerinin uygun oranlarda karıştırılması ve şekil verme yöntemleri ile sağlanır [32]. Kitosanın fiziksel formlarına örnekler Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4 : Kitosanın çeşitli fiziksel formları.

### **2.3.1 Hidrojeller**

Hidrojeller, yüksek sayıda hidrofilik grup veya alana sahip çapraz bağlı polimer ağlarından oluşurlar. Bu ağlar suya karşı yüksek ilgiye sahiptir fakat polimer zincirleri arasındaki fiziksel ve kimyasal bağlar suda çözünmesini önler. Hidrojeller, suyun ağlar arasına girip şişme sağlamasıyla şekil alırlar. Tamamen şişmiş olan hidrojeller, yumuşak ve kauçuk gibi bir kıvam, su veya diğer biyolojik sıvılarla düşük bir arayüz gerilimine sahip olma gibi özellikleriyle de canlı dokularla ortak bazı özelliklere sahiptir [33].

### **2.3.2 Mikroküreler**

Kitosan mikroküreleri, antibiyotikler, antihipertansif ajanlar, antikanser ajanlar, proteinler, peptid ilaçlar ve aşıların kontrollü salınımı için sıklıkla çalışılan ilaç dağıtım sistemleridir. Kitosan mikroküreleri, birçok ilaç için kontrollü salım sağlarken; protein gibi bozulabilen yapıların biyoyararlanımını ve hidrofilik yapıların epitel tabaka boyunca alımını artırır [34].

### **2.3.3 Filmler**

Kitosanın, özellikle cilt bakımı, kozmetik, kontakt lensler, membranlar ve diğer çeşitli teknolojilerdeki ayırıcılar gibi birçok uygulama için faydalı olmasını sağlayan bir döküm tekniği ile kolayca film haline getirilebileceği bilinmektedir [32]. Film oluşturma kapasitesi, iyi mekanik özellikleri ve şeffaf bir yapı oluşturmaları sayesinde de çeşitli paketleme ihtiyaçlarında uygulama alanı bulmaktadır [35]. Kitosan film oluşturma süreçlerinde en çok kullanılan yöntem çözelti dökme yöntemidir. Bu süreç ilk olarak toz halde bulunan kitosanın seyreltik bir asit çözeltisinde çözünmesiyle başlar. Kitosan çözeltisi genel olarak bir petri kabına dökülerek oda sıcaklığında ya da belirli bir sıcaklıkta etüvde kurumaya bırakılır. Son olarak kuruyan film petri kabından soyularak ayrılır [21].

## **2.4 Kitosanın Çapraz Bağlanması**

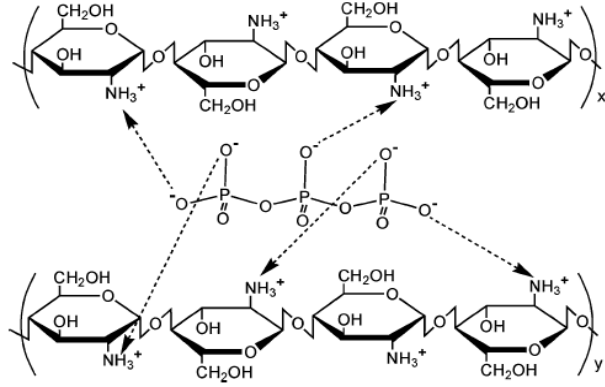
Kitosan birçok ürün haline getirilmiş olmasına rağmen; yüksek su emme, düşük mekanik kararlılık ve özellikle de uygulamalarını sınırlandıran zayıf asidik koşullarda çözünürlük gibi bazı dezavantajlara sahiptir [36].

Polimer ağı, çapraz bağlama işlemleri uygulanarak modifiye edilebilir [37]. Kimyasal ve mekanik olarak daha kararlı kitosan ürünleri elde etmek için kitosan üzerinde modifikasyonlar yapılır. Biyopolimerik malzemelerin özelliklerini ve stabilitesini iyileştirmesine yönelik yaygın çalışmalardan biri kimyasal ve/veya fiziksel çapraz bağlamadır [36]. Çapraz bağlama mekanik dayanım, kimyasal kararlılık, şişme, geçirgenlik, çözünürlük ve ilaç salımı gibi durumlar üzerinde etkilere sahiptir [38]. Çapraz bağlama reaksiyonları esas olarak Schiff bazı veya Michael tipi katılma reaksiyonları ile meydana gelirler [37]. Buna ek olarak çok çeşitli çapraz bağlama türleri mümkündür:

- a) Kovalent çapraz bağlama
- b) İyonik çapraz bağlama
- c) Fiziksel çapraz bağlama (Van der Waals, hidrojen bağları ve diğer etkileşimler aracılığıyla) şeklinde sıralama yapılabilir [39].

Kitosanı çapraz bağlamak için kullanılan bağlayıcılar, glutaraldehit, formaldehit, tripolifosfat ve poliaspartik asit sodyum tuzu örnek verilebilir [38]. Ancak, glutaraldehit ve formaldehit toksik olduğu için çeşitli sağlık sorunlarına ve yan etkilere neden olmaktadır [38].

Kitosan ( $pK_a = 6,5$ ), asidik ortamda polikasyoniktir ve sodyum tripolifosfat (TPP) ve sodyum sülfat ( $Na_2SO_4$ ) gibi negatif yüklü türlerle etkileşir. TPP ile çapraz bağlanmış farklı fiziksel formlarda kitosanın literatürde örnekleri mevcuttur [40, 41]. Kitosanın TPP ile etkileşimi protein ve aşı dağıtımında verimli bir şekilde kullanılabilen biyouyumlu çapraz bağlı kitosan nanoparçacıklarının oluşumunu sağlar [40]. TPP-kitosan mikropartikülleri, kitosanın pozitif yüklü amino grubu ile tripolifosfatın  $P_3O_{10}^{5-}$  anyonu arasındaki iyonik etkileşim ile oluşur. TPP-kitosan mikropartiküllerinin mekanizması, kitosanın zayıf bir polibaz olması, çözelti pH değerinin azalması ve kitosanın amino grubunun iyonlaşmasının artmasına dayanmaktadır. Düşük pH değerinde TPP,  $P_3O_{10}^{5-}$  anyonlarına ayrışır. Bu nedenle TPP-kitosan mikropartiküllerinin asidik TPP çözeltisinde tamamen iyonik çapraz bağlama baskın olarak hazırlanır [41]. TPP-kitosan reaksiyon mekanizması Şekil 2.5'te gösterilmiştir.



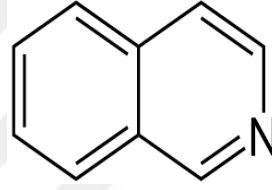
Şekil 2.5 : TPP-kitosan reaksiyon mekanizması [41].



### 3. BERBERİN

#### 3.1 Berberinin Yapısı ve Özellikleri

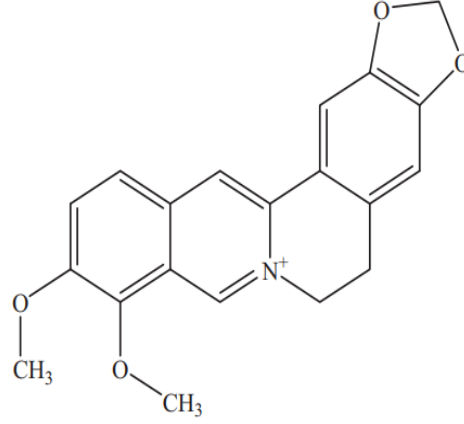
Alkaloidler, bakteri, mantar, deniz hayvanları, mikroorganizmalar ve bitkiler gibi çeşitli organizmalar tarafından ikincil metabolitler olarak üretilen bileşiklerdir. Doğada çeşitli yapılarla yaygın olarak bulunurlar ve önemli farmakolojik aktivitelere sahiptirler [42]. İzokinolin alkaloidleri, bitkiler aleminde en bol bulunan alkaloidlerden biridir. İzokinolin alkaloidleri, araştırma ve ilaç keşfinde dikkate değer bir önem göstermiş olan bir grup doğal üründür [12]. Şekil 3.1’de izokinolin yapısı gösterilmiştir.



Şekil 3.1 : İzokinolin yapısı [43].

İzokinolin alkaloidleri yapısal olarak homojen bir grup değildir. Farklı oksijenlenme derecelerine ve molekül içi yeniden düzenlemelere, dağılımlarına ve ana sisteme bağlı ek halkaların varlığına göre benzilizokinolin, aporfin, protoberberin, benzo[c]fenantridin, protopin, ftalideizokinolin, morfinan ve emetin alkaloidleri olmak üzere 8 alt gruba ayrılırlar [42]. İzokinolin alkaloidleri, Berberidaceae, Rutaceae, Fumariaceae, Rubiaceae, Amaryllidaceae, Magnoliaceae, Papaveraceae, Menispermaceae, Ranunculaceae, Cactaceae ve Annonaceae gibi bitki ailelerinde ağırlıklı olarak bulunmaktadır [12]. Son derece önemli biyolojik aktivitelere sahip olan izokinolin alkaloidleri, geleneksel tıpta da kullanılırlar. Çok geniş spektrumda farmakolojik aktiviteye sahip biyodinamik ajanlardan olan izokinolin alkaloidlerin farmakolojik kullanım çeşitliliği; hipolipidemik, yara iyileştirme, antidiyabetik, antioksidan, antimikrobiyal, antitümör, antibakteriyel ve karaciğer koruyucu olma şeklinde sıralanabilir [12].

Berberin, izokinolin alkaloidler sınıfına ait bir kuarterner amonyum tuzudur [44]. Berberidaceae, Papaveraceae, Fumaraceae, Menispermaceae ve diğer birçok bitki familyasında berberin yaygın olarak bulunmaktadır [42].



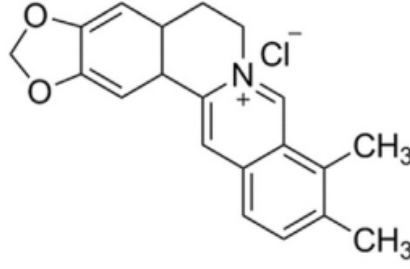
**Şekil 3.2 :** Berberinin kimyasal yapısı [45].

Şekil 3.2’de kimyasal yapısı gösterilen berberin, Ayurveda ve Çin tıbbında kanıtlanmış tıbbi geçmişi olan bir kuarterner benzilizokinolin bitki alkaloididir. *Hydrastis canadensis* (altınmühür), *Coptis chinensis* (sırma kök), *Berberis aquifolium* (mahonya), *Berberis vulgaris* (karamuk) gibi birçok bitkinin ve bazı Hint baharatlarının kök, kök sapı ve gövde kabuğunda aktif bileşen olarak bulunmaktadır [16]. Berberinin kuvvetli bir sarı renge sahip olması berberin türlerinin geçmişte yün, deri ve ahşap boyamalarında kullanılmasını da açıklar. Ultraviyole ışık altında 75160 renk indeksi ile çok güçlü bir sarı floresans gösterir [44]. Sarı renkli bir benzilizokinolin alkaloidi olan berberin, birçok ülkede hem geleneksel hem de modern tıpta ishal önleyici, mide ağrısı ve sıtmaya karşı kullanılmaktadır. Berberin aynı zamanda antibakteriyel ve antimikrobiyal aktivite de göstermektedir [13].

### 3.2 Berberinin Çözünürlüğü ve Siklodekstrinler

Kuarterner protoberberin izokinolin alkaloidi olan berberin, klinik olarak önemli olan çok çeşitli bitki kök ve gövdelerinden doğal olarak oluşan ve iyi bilinen bir ilaçtır [46]. Doğal olarak oluşturulmasının yanı sıra berberin kimyasal sentezle de üretilmektedir. Berberinin klinik amaçla kullanımı daha çok klorür ve sülfat tuzları ile sağlanmaktadır. Şekil 3.3’te berberin klorürün kimyasal yapısı gösterilmiştir.



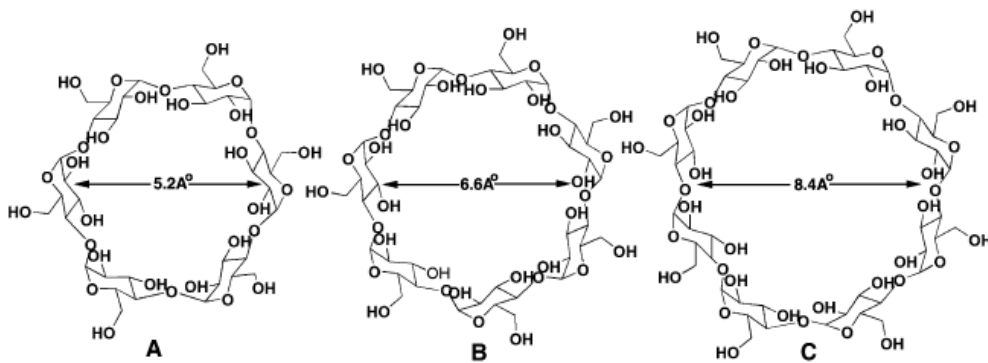


**Şekil 3.3 :** Berberin klorürün kimyasal yapısı [47].

Berberin acı tada sahip, kokusuz ve yoğun sarı renklidir. Suda çok az, etanolde ve metanolde ise iyi çözünür [16]. Berberinin suda az çözünmesi, vücuttaki emilimini önemli ölçüde azaltır ve tedavi edici özelliğini kısıtlar. Berberinin sudaki çözünürlüğünü ve dolayısıyla biyoyararlanımını artırmak ve için siklodekstrin çözeltileri kullanılır ve oluşan inklüzyon kompleksi berberinin suda çözünmesini sağlar [18].

Siklodekstrinler, özel kimyasal molekül yapıları sayesinde çeşitli moleküllerle inklüzyon kompleksi oluşturabilme yeteneği olan, hidrofobik iç boşluğa ve hidrofilik dış yüzeye sahip kesik koni benzeri yapılardır [18,19].

Doğal siklodekstrinler  $\alpha$ -1,4 bağlı oligosakkaritlerdir ve 6,7 ya da 8 glikoz birimi içeren bu yapılar glikoz biriminin sayısına göre sırasıyla  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  siklodekstrinler olarak adlandırılırlar [48]. Şekil 3.4'te 3 farklı siklodekstrinin kimyasal yapıları ve çap farklılıkları gösterilmiştir.



**Şekil 3.4 :** A:  $\alpha$ , B:  $\beta$  ve C:  $\gamma$  siklodekstrinin kimyasal yapısı [49].

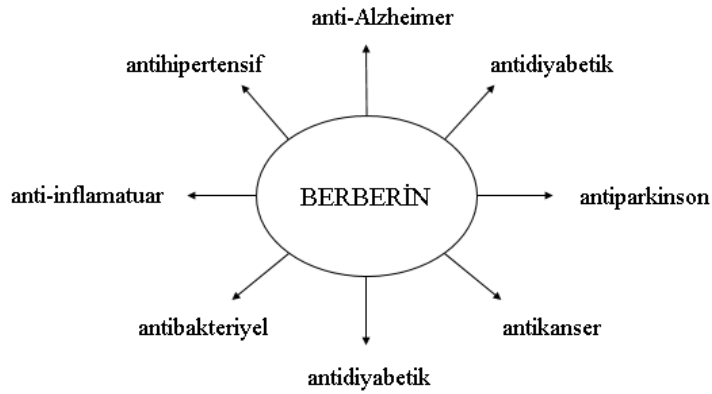
Moleküler yapısının ve şeklinin bir sonucu olarak siklodekstrinler, konuk molekülü iç boşlukta tutabilme gibi benzersiz yeteneği ile bir tür moleküler kap görevi görürler [19]. X-ışını yapılarından, siklodekstrinlerin ikincil hidroksil grupları ( $C_2$  ve  $C_3$ ) halkanın geniş kenarına, birincil hidroksil grupları ( $C_6$ ) halkanın diğer tarafına, apolar  $C_3$  ve  $C_5$  hidrojenleri ile eter benzeri oksijenler ise molekülün iç kısmına yerleşirler. Bu durum, mikro heterojen çevre olarak adlandırılan, suda çözülebilen hidrofilik dış yüzey ve hidrofobik matris olmasını sağlayan apolar bir boşluktan meydana gelir. Bu boşluk sayesinde siklodekstrinler, çeşitli konuk hidrofobik moleküllerle inklüzyon kompleksler oluşturabilirler [49].

İnklüzyon kompleks oluşumu esnasında ne bir kovalent bağ kırılır ne de bir kovalent bağ oluşur. Siklodekstrinlerin lipofilik boşluğu, uygun boyuttaki apolar kısımların boşluk içerisine girebileceği bir mikro ortam oluşturarak, inklüzyon kompleks oluşumu sağlar. Kompleks oluşumundaki ana itici güç, entalpi açısından zengin su moleküllerinin boşluktan salınmasıdır. Apolar-apolar bir etkileşim elde etmek ve siklodekstrin halka gerilmesini azaltmak için su molekülleri çözelti içindeki daha hidrofobik konuk moleküllerle yer değiştirirler ve bu durum daha kararlı bir enerjiyle sonuçlanır [49]. Bunun dışında siklodekstrinin aktif bir ilaçla inklüzyon kompleks oluşturma yeteneği başka birkaç faktöre de dayanır. Bunlardan ilki sterik etkidir. Sterik etki de siklodekstrinin boyutunun ilaç molekülünün boyutunun oranına veya aktif bileşenin anahtar fonksiyonel grubuna bağlıdır. Eğer ki aktif bileşen çok büyük olursa siklodekstrin boşluğa uymaz [19].

İnklüzyon komplekslerinin farmasötik formülasyonlarda çeşitli uygulamaları mevcuttur. Bu uygulama alanlarına; az çözünen ilaçların çözünürlüğünü artırmak, biyouyumluluğu geliştirmek, acı bir tada sahip etken maddenin tadını maskelemek, çiğnenebilir ve ağızda dağılan tablet formülasyonlar geliştirmek, ıstık, ısı ve oksidatif bozulmaya karşı ilaçları stabilize etmek gibi örnekler verilebilir [19]. Siklodekstrinler, toksik olmayan, suda çözünebilen ve kolaylıkla modifiye edilebilen yapılardır. Yüksek biyolojik yararlılık göstermeleri, ilaç moleküllerinin neden olduğu dezavantajları ortadan kaldırırken; ilaç moleküllerinin iyileştirici etkinliğini artırarak ilaç endüstrisinde popüler hale gelmiştir. Bulunan 3 farklı tür siklodekstrin arasından  $\beta$ -siklodekstrin sahip olduğu düşük fiyat ve boşluk boyutu gibi özellikler nedeniyle en yaygın kullanıma sahip siklodekstrin grubudur [18].

### 3.3. Berberinin Farmakolojik Kullanım Alanları

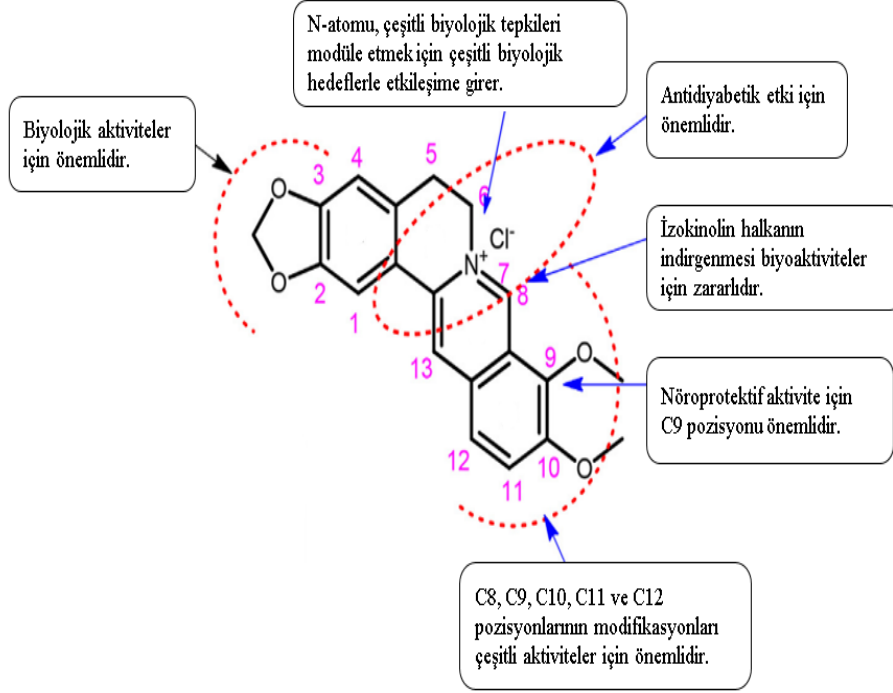
Berberin, antioksidan aktiviteden nörotransmitter modülasyonuna, enzimlerden, moleküler hedeflere ve immünomodülasyona kadar çok geniş bir spektrumda farmakolojik etki gösterir [16]. Berberin ve türevlerinin sahip olduğu biyoaktivitelerden bazıları Şekil 3.5'te gösterilmiştir:



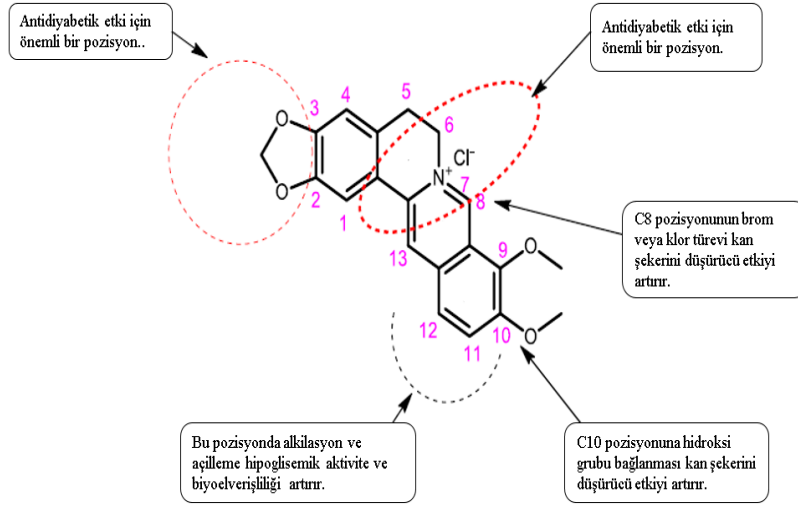
**Şekil 3.5 :** Berberinin bazı biyoaktif etkileri [50].

Berberinin antioksidan ve anti-inflamatuvar özelliği, tip-2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisiyle özellikle ilgilidir. Obezite ve tip-2 diyabet metabolik hastalıklarda, artan oksidatif stres ortak özelliktir. Oksidatif stres çoklu mekanizmalar yoluyla insülin direncini veya diyabeti tetikleyebilir ya da bozabilir [44]. Süperoksit anyonu ( $O_2^- \bullet$ ), hidroksil radikali ( $OH\bullet$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi reaktif oksijen türleri, pankreas  $\beta$  hücrelerinde apoptozis ile hasara neden olurken insülin salgısının azalmasına yol açar [51].

Şekil 3.6' da berberinin yapı fonksiyon ilişkisi gösterilmiştir. Genel olarak berberinin biyolojik aktiviteleri, C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> pozisyonundaki metilendioksi grubu ile ilişkilidir. Uzun zincirli alkilasyon (C<sub>5</sub>-C<sub>9</sub>) biyoelverişlilik için de faydalı olan hidrofobikliği artırır. C<sub>8</sub> ve C<sub>13</sub> pozisyonları ise modifikasyonlara yatkın konumlardır ve hatta berberinden daha iyi biyoaktif maddeler elde edilmesini sağlar. C<sub>9</sub> pozisyonu ise nöroprotektif aktiviteye sahiptir [12]. Şekil 3.7'de berberinin antidiyabetik aktivitesinin kısa bir yapı fonksiyon ilişkisi özetlenmiştir.



Şekil 3.6 : Berberinin yapı fonksiyon ilişkisi [12].



Şekil 3.7 : Berberinin antidiyabetik aktivitesinin kısa bir yapı fonksiyon ilişkisi [12].

### 3.4 Literatür İncelemesi

Son zamanlarda geleneksel gıda ambalaj malzemelerinin neden olduğu çevre sorunları nedeniyle biyobazlı gıda ambalaj malzemelerinin kullanımı giderek artmaktadır. Proteinler, lipidler ve polisakkaritler gibi bazı biyo-bazlı polimerler, geleneksel plastik ambalajların kullanımından kaynaklanan kentsel katı atık problemini çözmek için alternatif ambalaj malzemeleri olarak ortaya çıkmıştır [52]. Kitosan ise biyobozunur, biyouyumlu, zehirli olmama ve antimikrobiyal aktivite gösterme gibi özelliklerle bu alanda ön plana çıkmaktadır [7, 31].

Van den Broke ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada kitosanın antimikrobiyal ve film oluşturuıcı özelliklere sahip olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca kitosanın kaplama, film ve karışım uygulamalarının gıdaların korunması ve raf ömürlerinin uzamasında etkisi olduğu belirtilmiştir [53].

Yapılan literatür araştırması sonucunda kitosanın, çeşitli bitki ekstraktları ile katkılandırılmış örneklerine rastlanmaktadır. Kullanılan bitkiler, aktif paketlenme filmi geliştirmeye yönelik antioksidan ve antibakteriyel özellikler elde etmek amacıyla tercih edilmektedir. Bu yönde yapılan çalışmalardan birinde Peng ve arkadaşları, aktif ambalaj malzemeleri geliştirmek amacıyla siyah ve yeşil çay özleri içeren kitosan kompozit filmleri konulu bir çalışma yürütmüşler ve çay ekstraktlarının DPPH radikal indirgeme aktivitesini önemli ölçüde artırdığı sonucuna ulaşmışlardır [54]. Kalaycıoğlu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, zerdeçal ekstraktı ilave edilmiş kitosan filmlerin hem fiziksel özelliklerinin iyileştiği hem de antimikrobiyal aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir [55]. Rambabu ve arkadaşları kitosan filme mango yaprağı ekstraktı ilavesiyle [10], Abdollahi ve arkadaşları ise biberiye yağı ekleyerek aktif paketlenme malzemesi [56] geliştirmişlerdir. Böylece antioksidan ve antibakteriyel aktivitesi artırılmış kitosan filmler literatürde yer bulmuştur. Bu yüksek lisans tez çalışmasında kitosan filmlerin katkılandırılması, berberin klorür standartı ile yapılmıştır. Berberin, birçok çeşitli bitki ve bazı Hint baharatlarının yapısında bulunan aktif bir bileşendir [16]. Berberinin geleneksel ve modern tıpta kullanımı mevcuttur, antimikrobiyal ve antibakteriyel etkilere sahiptir. Kitosan ve berberinin birlikte kullanımına dair bir çalışma Ke ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir [13].

Bu çalışmada berberin yüklenmiş kitosan-aljinat kompleks membranından berberinin kontrollü salımı gerçekleştirilmiştir. Berberin salımına ait bir başka çalışma ise Zhou ve arkadaşları tarafından yapılmış olup, berberin klorür yüklü kitosan mikrokürelerinin osteoartrit (kireçlenme) hastalığı tedavisi için *in vitro* çalışmalar yürütülmüştür [56]. Çalışma sonucunda, berberin yüklenmiş kitosan mikrokürelerinin, berberinin tek başına kullanımına kıyasla osteoartritin tedavisinde daha faydalı olacağı gözlemlenmiştir [56]. Benzer bir çalışma da Mahya ve grubu tarafından omuriliği onarmak amacıyla polisakkarit bazlı hidrojel içinde kapsüllenmiş berberin yüklü kitosan nanoparçacıkları kullanarak gerçekleştirilmiştir [57]. Çalışma sonucunda, kitosan nanoparçacıklı kalsiyum-aljinat hidrojelinin berberin için uygun bir polimerik taşıyıcı olabileceği ve berberinin kontrollü salımının süresini artırdığı da görülmüştür [57].

Literatür incelemesi sonucunda da görüldüğü gibi kitosan filmlerin alternatif bir gıda ambalaj malzemesi olarak çeşitli bitki ekstraktları ile katkılandırılarak kullanılabildiği görülmektedir. Berberin katkısı ise daha çok ilaç salım sistemlerinde incelenmiştir. Bu yüksek lisans tez çalışması, kitosan-berberin birleşiminin aktif gıda ambalaj malzemesi olarak kullanımını öneren ilk çalışmadır.

## **4. DENEYSEL KISIM**

### **4.1 Kullanılan Kimyasallar**

Asetik asit (glasiyal, %100) ve gliserin Merck markadır. Berberin klorür, 2,2 difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), (2-hidroksipropil)- $\beta$ -siklodekstrin ( $M_w \sim 1460$ ), kitosan (düşük molekül ağırlıklı, %75-85 deasetilasyon derecesine sahip), metanol, sodyum tripolifosfat (%85 teknik) Sigma Aldrich markadır. Bütün çözeltiler ultra saf su ile hazırlanmıştır.

### **4.2 Kullanılan Cihazlar**

Bu tez çalışmasında Mettler Toledo (Greifensee, İsviçre) marka hassas terazi, Nüve (Ankara, Türkiye) marka etüv, su banyosu ve test kabini, IKA (Staufen, Almanya) marka manyetik karıştırıcı kullanılmıştır. Ultrasonik banyo Bandelin Sonorex (Berlin, Almanya), ultrasaf su cihazı ise Elga Purelab (Buckinghamshire, İngiltere) marka Option-Q modeldir.

Filmlerin antioksidan aktivitelerinin tayininde Shimadzu (Kyoto, Japonya) marka UV-Vis spektrofotometre kullanılmıştır.

Film kalınlıkları 0,001 mm hassasiyetlikte bir dijital mikrometre (Mitutoyo, Tokyo, Japonya) ile ölçülmüştür.

Çekme-koparma deneyleri ise 0,1 cm/dk hızında, 10 cm prob boyuna sahip ve 500 N hassasiyetli yük hücresi bulunan INSTRON (Massachusetts, ABD) marka 3345 model cihazı ile ölçülmüştür.

### **4.3 Film Çözeltilerinin Hazırlanması**

Kitosan stok çözeltisi %1'lik asetik asit (h/h) çözeltisinde kitosan konsantrasyonu % 2 (a/h) olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti manyetik karıştırıcı ile 1 gün boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır.

Berberin içeren kompozit kitosan filmler, kitosan stok çözeltisine berberin çözeltisinin ilave edilmesi ile elde edilmiştir. Berberin çözeltisi ise 0,01 g berberin klorür standartının 9,65 mL 20 mM 2-HP- $\beta$ -CD çözeltisinde çözünmesiyle hazırlanmıştır.

Film çözeltilerine plastikleştirici etki yapan gliserol eklenmiştir. Fiziksel testlerin, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerin değerlendirilmesi ve karşılaştırılması amacıyla 3 farklı film çözeltisi hazırlanmıştır:

1. Kit-Su: 15 mL % 2'lik kitosan stok çözeltisi + 9,65 mL saf su + 350  $\mu$ L gliserol
2. Kit-CD: 15 mL % 2'lik kitosan stok çözeltisi + 9,65 mL 20 mM 2-HP- $\beta$ -CD çözeltisi + 350  $\mu$ L gliserol
3. Kit-CD-Ber: 15 mL % 2'lik kitosan stok çözeltisi + 9,65 mL 20 mM 2-HP- $\beta$ -CD ve 0,01 g berberin içeren çözelti + 350  $\mu$ L gliserol

Film çözeltileri manyetik karıştırıcıda 2 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak homojen hale gelmeleri sağlanmıştır. 2 saat sonunda çözelti içerisinde oluşan baloncukları ortadan kaldırabilmek için 15 dk boyunca film çözeltileri ultrasonik banyoda bekletilmiştir.

#### **4.4 Kitosan Bazlı Filmlerin Hazırlanması ve Çapraz Bağlanması**

Kitosan bazlı filmler (Kit-Su, Kit-CD, Kit-CD-Ber) çözelti dökme yöntemi ile hazırlanmıştır. Hazırlanan 25 mL'lik film çözeltileri 90 mm çapında pleksiglas petri kutularına dökülmüş ve 24 saat boyunca 40 °C'de etüv içerisinde çözücü buharlaşmaya bırakılmıştır. Buharlaşma sonunda oluşan filmler petri kabından ayrılarak %5'lik (a/h) sodyum tripolifosfat (NaTPP) çözeltisi ile çapraz bağlanmıştır. Çapraz bağlama işlemi filmlerin 25 mL hacimde çapraz bağlayıcı çözeltisinde 5 dk boyunca bekletilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Bu süre sonunda çapraz bağlayıcı çözeltisinden çıkarılan filmler 1 dk boyunca saf su ile yıkanmıştır. Çapraz bağlama işlemi sonucunda filmler 25°C ve %50 bağıl nem koşulundaki klimatik nem kabinde kurutulmaya bırakılmıştır. Filmler kullanım aşamasına kadar aynı nem kabini koşullarında muhafaza edilmiştir.



## 4.5 Kitosan Filmlere Uygulanan Fiziksel Testler

### 4.5.1 Filmlerin şişme miktarlarının belirlenmesi

Hazırlanan filmlerin saf suda şişme davranışları incelenmiştir. 2 cm x 2 cm boyutunda parçalar halinde kesilen filmler 40°C sıcaklıktaki etüvde 30 dk boyunca kurutulmuştur. Kuru filmler tartılmış ve ağırlıkları ( $M_1$ ) kaydedilmiştir. Ardından filmler 50 mL saf su içeren falkon tüpler içerisine konulmuş ve falkon tüpler 25 °C'deki su banyosuna yerleştirilmiştir. Filmler 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 ve 180. dakikalarda falkon tüplerden çıkarılıp peçete yardımı ile hafif bir kurulama yapıldıktan sonra tartılmış ve ağırlıkları ( $M_2$ ) kaydedilmiştir. Yüzde şişme miktarlarının hesaplanması için Eşitlik 4.1 kullanılmıştır:

$$\% \text{ Şişme} = \frac{(M_2 - M_1)}{M_1} \times 100 \quad (4.1)$$

Her film örneği için 3 tekrar test yapılmıştır.

### 4.5.2 Filmlerin çözünürlük miktarlarının belirlenmesi

Hazırlanan filmlerin saf sudaki çözünürlük oranının belirlenmesi için 2 cm x 2 cm boyutlarında kesilen filmler 105 °C'deki etüvde 1 saat boyunca kurutulmuştur. Film parçaları kuruduktan sonra tartılmış ve ağırlıkları ( $M_1$ ) kaydedilmiştir. Kuru filmler 50 mL saf su içeren falkon tüplere yerleştirilmiş ve falkon tüpler 25°C'deki su banyosunda 24 saat boyunca bekletilmiştir. 24 saat sonunda filmler falkon tüpten çıkarıldıktan sonra 105°C'deki etüvde kurutmaya bırakılmıştır. Kurutma sonucunda film parçaları tartılmış ve ağırlıkları ( $M_2$ ) kaydedilmiştir. Yüzde çözünürlük Eşitlik 4.2'deki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Çözünürlük} = \frac{(M_1 - M_2)}{M_1} \times 100 \quad (4.2)$$

Her film örneği için 3 tekrar test yapılmıştır.

### 4.5.3 Filmlerin su buharı geçirgenliği

Filmlerin su buharı geçirgenliği E96-95 gravimetrik metodu (ASTM, 1995) kullanılarak belirlenmiştir. Literatür verilerinin pek çoğu bu yöntemi tercih ettiği için, karşılaştırma yapabilmek adına bu yöntem tercih edilmiştir [55]. Su seviyesi şişenin 2 cm altında olacak şekilde borosilikat cam şişeler saf su ile doldurulmuştur. Filmler

şişelerin ağzına sıkı bir şekilde bağlanmıştır ve şişelerin tartımı alınmıştır. Şişeler %20 bağıl nem ve 37°C sabit sıcaklıktaki test kabineye yerleştirilmiştir. 1, 2, 3, 4, 5, ve 6 saat sonunda şişeler tartılmış ve ağırlıkları kaydedilmiştir. Ağırlıktaki değişimin zamana karşı grafiği en küçük kareler yöntemi ile çizilmiştir. Bu grafiğin eğimi (m) ve filmin alanı (A) kullanılarak su buharı iletim oranı (WVTR) hesaplanmıştır (Eşitlik 4.3):

$$WVTR = \frac{m}{A} \quad (4.3)$$

Filmlerin su buharı geçirgenliği (WVP) Eşitlik 4.4 kullanılarak hesaplanmıştır,  $\Delta P$  ise kısmi su buhar basıncıdır:

$$WVP = \frac{WVTR}{\Delta P} \times \text{film kalınlığı} \quad (4.4)$$

Film kalınlıkları kumpas ile ölçülmüştür.

#### 4.6 Mekanik Testler

Filmlerin mekanik testleri ASTM D882-10 metodu takip edilerek (Instron, 5944, ABD) mekanik test cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen mekanik testler ile her bir film örneğine ait Young's modülü, çekme dayanımı ve kopma anındaki uzama değerleri ve tokluk hesaplanmıştır. Her film örneği için 3 tekrar test yapılmıştır.

#### 4.7 Kitosan Filmlerin Antioksidan ve Antibakteriyel Aktiviteleri

Kitosan bazlı filmlerin antioksidan ve antibakteriyel aktiviteleri incelenmiştir. Bu amaçla kullanılan metotlardan bu kısımda bahsedilmiştir.

##### 4.7.1 DPPH analizi

Bir kromojen radikali olan DPPH (2,2- difenil-1- pikrilhidrazil), ilk olarak Blois tarafından bir antioksidan modeli olan tiyol içerikli aminoasit sisteinin kantitatif olarak aminoasit içeriğinin belirlenmesinde kullanılmıştır [58]. Bu yöntem, 1958 yılında Blois tarafından kavramsallaştırılarak kararlı serbest DPPH radikalinin, sisteinin H atomunu bağlayabilme yeteneği ilk kez gösterilmiştir. Bu tespitten yaklaşık otuz yıl kadar sonra da DPPH analizi, antioksidan özelliklerin karakterizasyonu için dikkatleri üzerine çekmiştir [59].

DPPH, bileşiklerin serbest radikal süpürücüler ve hidrojen donörleri olarak davranabilme yeteneğini ölçmek ve gıdaların antioksidan aktivitelerini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan hızlı, basit ve ucuz bir yöntemdir [60]. DPPH testi, bir antioksidan molekülün serbest radikal süpürme potansiyelinin değerlendirilmesi için rutin olarak uygulanır. Saf bileşiklerin de antioksidan özelliklerinin değerlendirilmesi için standart ve basit bir kolorimetrik yöntem olarak kabul edilir.

DPPH• radikali, koyu mor renge sahip birkaç kararlı organik azot radikallerinden biridir [61]. DPPH analiz yöntemi ise bir serbest radikal olan DPPH•'in indirgenmesine dayanır. Tek elektronlu serbest bir radikal olan DPPH•, 515 nm'de (mor renk) maksimum absorbands verir. Antioksidanların DPPH• ile reaksiyon vermesi sonucu, serbest radikal DPPHH yapısına indirgenir. Sonuç olarak DPPH•'in absorbandsında azalma görülür. DPPHH formunda sarı renk oluşur. Renk ne kadar giderilebildiyse indirgeme yeteneği o kadar yüksektir [59, 62].

#### **4.7.2 Kitosan bazlı filmlerin DPPH analizi ile antioksidan aktivitesinin belirlenmesi**

Her bir film örneğinden 250 mg tartılarak ufak parçalara ayrıldı ve antioksidan aktivite testinde kullanılmak üzere 2 saat boyunca 5 mL saf metanol içerisinde bekletildi. DPPH çözeltisi 1 mM konsantrasyonda olacak şekilde saf metanolde hazırlandı. Hazırlanan film çözeltilerinden 900 µL, DPPH çözeltisinden ise 100 µL alınarak eppendorf tüpüne eklendi ve 1 saat boyunca karanlıkta bekletildi. Saf metanol ile 515 nm'de blank ayarı yapıldıktan sonra film çözeltilerinin absorbandsları ölçüldü. Sonuçlar % engelleme (inhibisyon) cinsinden hesaplandı.

$$\% Engelleme (Inhibisyon) = \frac{A_{DPPH} - A_{\text{örnek}}}{A_{DPPH}} \times 100 \quad (4.4)$$

Analizler her bir film örneğinden 3 tekrarlı olacak şekilde yapıldı.

#### 4.7.3 Kitosan bazlı filmlerin antibakteriyel aktivitesi

Kitosan bazlı filmlerin antibakteriyel aktiviteleri ISO 22196 standardına göre belirlenmiştir [55]. 50 mm x 50 mm boyutlarındaki film örnekleri, UV işlemi ile sterilize edildikten sonra steril petri kabına yerleştirilmiştir. *Bacillus Cereus* ve *Salmonella Typhimurium* bakterilerinden oluşan 200 µL miktarındaki test aşıları filmlerin üzerine damlatıldıktan sonra filmler, 40 mm x 40 mm boyutlarındaki polipropilen film ile kaplanmıştır. 35°C ve % 90 bağıl nem koşulları altında 4 saat süren temastan sonra filmler üzerinde hayatta kalan bakteriler sayılmıştır ve sonuçlar log KOB/ örnek ve log indirgenme olarak ifade edilmiştir.



## 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde, deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlara yer verilmiştir.

### 5.1 Kitosan Bazlı Filmler

Öncelikle değişik oranda kitosan içeren filmler dökülerek ön denemeler yapılmış ve film görünümü olarak en uygun kitosan çözeltisinin %1'lik asetik asit (h/h) çözeltisinde, kitosan konsantrasyonu %2 (a/h) olacak şekilde hazırlanan çözelti olduğu tespit edilmiştir. Berberini suda çözmek için 20 – 25 mM aralığındaki 2-HP- $\beta$ -CD çözeltileri hazırlanmıştır. 20 mM üzerindeki 2-HP-  $\beta$ -CD konsantrasyonlarında çözeltinin kitosan çözeltisine ilavesi ile şeffaf film eldesi mümkün olmamıştır. 20 mM'dan daha az konsantrasyonda 2-HP- $\beta$ -CD çözeltisi berberinin çözünmesi için yeterli olmamıştır. %2'lik kitosan çözeltisine 0,1 g/L – 0,01 g/L aralığında değişen konsantrasyonlarda berberin içeren farklı konsantrasyonlarda 2-HP-  $\beta$  -CD çözeltisi ilave edilmiş ve en uygun formülasyon belirlenmeye çalışılmıştır. 0,01 g'ın üzerindeki berberin miktarında filmlerde katlanamama ve çok fazla hava kabarcığı meydana gelmiştir. Film bileşenlerine ait miktar denemeleri ve kullanılan miktarlar Çizelge 5.1' de ifade edilmiştir.

**Çizelge 5.1 :** Film bileşenlerinin miktarlarının belirlenmesi için denenen miktarlar.

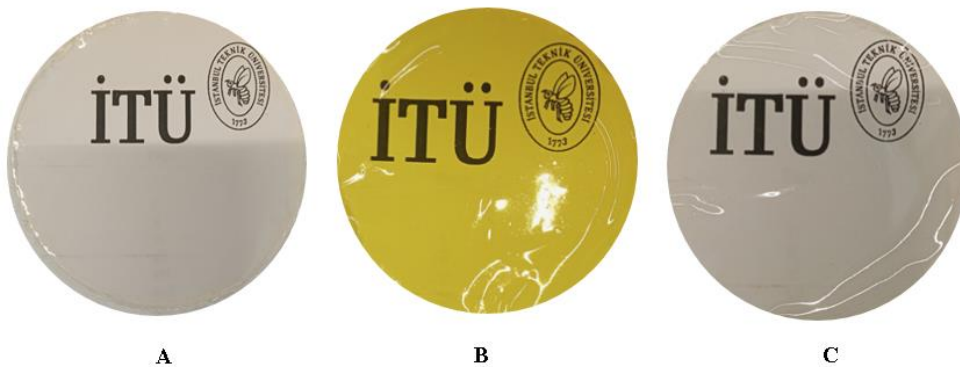
| Bileşen           | Denenen miktar aralığı    | Kullanılan miktar |
|-------------------|---------------------------|-------------------|
| 2-HP- $\beta$ -CD | 20 mM – 25 mM             | 20 mM             |
| Berberin          | 0,1 g – 0,01 g            | 0,01 g            |
| Gliserol          | 150 $\mu$ L - 700 $\mu$ L | 350 $\mu$ L       |

Görsel ve duyuşal testler ile en uygun formülasyonun 9,65 mL 20 mM 2-HP- $\beta$ -CD çözeltisinde çözülmüş 0,01 g berberin olduğu tespit edilmiştir. Filmlere esneklik kazandırmak için film çözeltilerine 150-700  $\mu$ L aralığında değişen hacimlerde plastikleştirici olarak gliserol eklenmiştir. 350  $\mu$ L'den daha düşük hacimlerde filmler

Çapraz bağlanma sonucu kırılğan bir yapıya, daha yüksek hacimlerde ise ıslak bir görüntüye sahip olmuştur. Sonuç olarak ‘15 mL %2’lik kitosan stok çözeltisi + 9,65 mL 20 mM 2-HP-β-CD ve 0,01 g berberin içeren  zelti + 350 μL gliserol’ ile şeffaf, esnek ve elle kolay kırılmayan özellikte filmler elde edilmiştir.

## 5.2 Kitosan Bazlı Filmlerin apraz Bağlanması

Hazırlanan filmler, %5’lik (a/h) NaTPP  zeltisi kullanılarak fiziksel olarak çapraz bağlanmıştır. Fiziksel apraz bağlanma, filmlerin çözünürlüğü ve mekanik dayanımı bakımından önemli etkilere sahiptir. Kitosan filmler, asidik ortamda ve suda çözünürlüğü sahiptir. Gıda ambalaj malzemesi olarak kullanılacak bir filmin su ile teması sonucunda çözünür olması istenmeyen bir durumdur. Filmlerin çözünürlüğünü azaltmak amacıyla da filmlere fiziksel çapraz bağlama işlemi uygulanmıştır. Uygulama sonucunda da filmlerin çözünürlüğü azaltılmıştır. Çapraz bağlamanın sağlamış olduğu diğer bir avantaj ise filmlerin mekanik dayanımının fiziksel çapraz bağlanma ile artmış olmasıdır. Çapraz bağlanmamış filmlerin, çekme, katlama ve şekil verme gibi durumlara karşı daha dayanıksız olduğu gözlemlenmiştir. Bir ambalajın sahip olması gereken esneklik ve kolay şekil alma gibi özellikleri gliserol eklenmesiyle ile sağlansa da fiziksel dayanım çapraz bağlama yöntemiyle başarılmıştır. Sonuç olarak gliserol içeren çapraz bağlı filmler, gıda ambalajı olabilecek bir yapıya sahip olmuştur. Sırasıyla apraz bağlanmış Kit-Su, Kit-Ber ve Kit-CD filmlerin görünümleri şekil 5.1’de verilmiştir.



**şekil 5.1 :** apraz bağlı **A:** Kit-Su, **B:** Kit-CD-Ber ve **C:** Kit-CD filmleri.

### 5.3 Fiziksel Testler

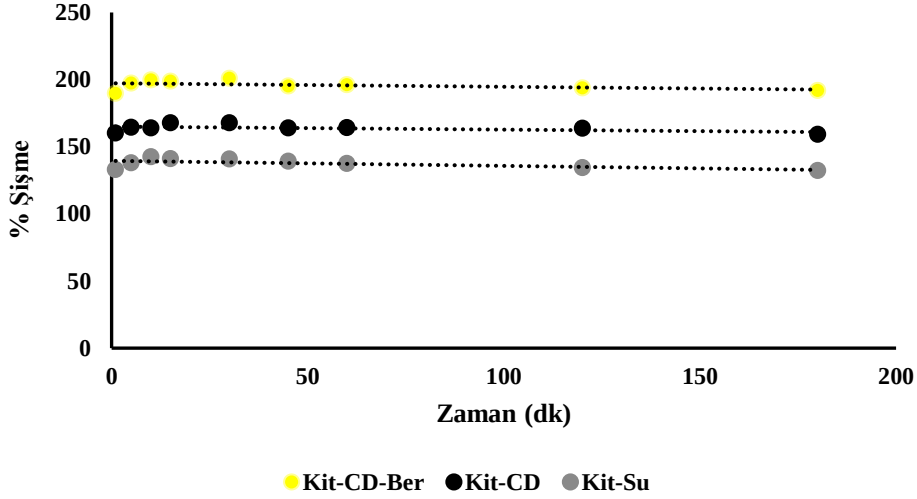
#### 5.3.1 Kitosan bazlı filmlerin şişme miktarları

Filmlerin saf sudaki şişme miktarları Bölüm 4.5.1’de bahsedildiği gibi hesaplanmış ve sonuçlar % şişme miktarı  $\pm$  SS (standart sapma) olarak Çizelge 5.2’de verilmiştir. Şişme miktarı, filmlerin suya karşı dayanımının bir ölçüsü olan önemli bir özelliktir. Yapılan deney sonucunda berberin katkılı film, katkı içermeyen filmlere göre daha yüksek oranda şişme davranışı göstermiştir. Gıda ambalajı olarak kullanılacak bir filmin su ve nemi absorblayabilirliği önemli bir özelliktir. Kit-CD-Ber kodlu filme ait sonuçta da görüldüğü gibi berberin katkısı filmin şişme davranışı üzerinde olumlu bir etki yaratmıştır.

**Çizelge 5.2 : Üç farklı film türüne ait % şişme sonuçları.**

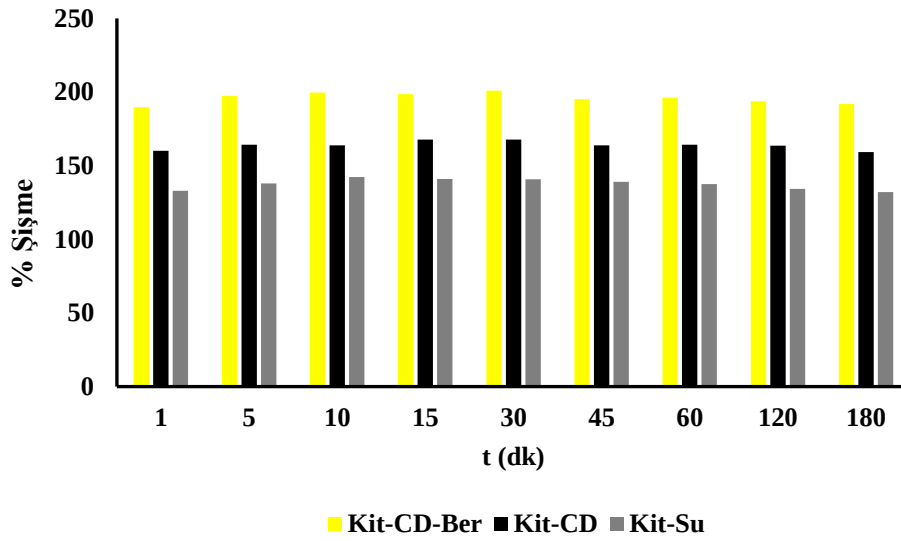
| Film türleri<br>Zaman (dk) | Kit-CD-Ber      | Kit-CD          | Kit-Su           |
|----------------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| 1                          | 189,7 $\pm$ 3,2 | 160,0 $\pm$ 5,6 | 132,9 $\pm$ 5,4  |
| 5                          | 197,3 $\pm$ 4,4 | 164,3 $\pm$ 8,0 | 138,0 $\pm$ 3,8  |
| 10                         | 199,7 $\pm$ 3,6 | 163,9 $\pm$ 5,6 | 142,4 $\pm$ 7,4  |
| 15                         | 198,6 $\pm$ 5,5 | 167,8 $\pm$ 2,9 | 141,0 $\pm$ 8,0  |
| 30                         | 200,9 $\pm$ 7,8 | 167,7 $\pm$ 5,1 | 140,8 $\pm$ 7,8  |
| 45                         | 195,2 $\pm$ 6,6 | 163,9 $\pm$ 3,8 | 139,1 $\pm$ 6,3  |
| 60                         | 196,2 $\pm$ 4,5 | 164,2 $\pm$ 5,5 | 137,5 $\pm$ 10,9 |
| 120                        | 193,8 $\pm$ 6,1 | 163,7 $\pm$ 5,4 | 134,3 $\pm$ 3,8  |
| 180                        | 191,9 $\pm$ 2,8 | 159,2 $\pm$ 8,6 | 132,1 $\pm$ 4,3  |

Filmlerin zamana bağlı % şişme değerlerinin karşılaştırılması Şekil 5.2’deki grafikte verilmiştir.



**Şekil 5.2 :** Filmlere ait % şişme değerlerinin karşılaştırılması.

Şekil 5.2 ve 5.3'te görüldüğü gibi Kit-Su formülasyonu 10 dk sonunda %142,4 şişme gösterirken, Kit-CD filmi %163,9 oranında şişme göstermiştir. Berberin katkılı film ise 10 dk sonunda %199,7 şişmiştir.



**Şekil 5.3 :** Filmlerin zamana bağlı % şişme sonuçları.

### 5.3.2 Kitosan bazlı filmlerin çözünürlük miktarları

Suda çözünürlük kitosan bazlı filmlerin suya karşı dayanımının belirlenmesinde önemli bir diğer deneysel adımdır. Yüzde cinsinden filmlere ait çözünürlük sonuçları Çizelge 5.3'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlar saf kitosan filmin en düşük çözünürlük değerine, berberin katkılı filmin ise en yüksek çözünürlük değerine sahip olduğunu göstermiştir.



Kit-CD filminin çözünürlüğünde ise saf kitosan filme göre artış görülmüştür. Bu durum, 2-HP-β-CD katkısının kitosan bazlı filmlerin çözünürlüğünü artırdığını göstermektedir. Ayrıca 2-HP-β-CD ve berberin katkısının bir aradaki kullanımı, berberin katkılı filmin çözünürlüğünü artırdığı görülmektedir. Filmlerin suda çözünürlük farklılıkları, filmlerin şişme değerleri ile uyumludur.

**Çizelge 5.3 : Filmlerin % çözünürlük sonuçları.**

|                   | Kit-CD-Ber | Kit-CD     | Kit-Su    |
|-------------------|------------|------------|-----------|
| % Çözünürlük ± SS | 18,0 ± 2,4 | 10,1 ± 2,8 | 8,0 ± 4,0 |

Kit-Ber filminin suda çözünürlüğü artmasına rağmen çözünme yüzdesi kabul edilebilir orandadır. Filmler şekillerini değiştirmemiştir. Bu çözünme saf su içinde 24 saat sürede tespit edilmiştir. Dolayısı ile su içeren gıda ile temasta çözünmenin daha az olacağı beklenebilir. Öte yandan filmin su ile temasta az miktarda çözünmesi filme ilave edilen antioksidan ve antimikrobiyal aktif maddenin gıdaya difuzyonunu sağlayacağından aktif madde gıdanın korunmasına katkı sağlayacaktır.

### 5.3.3 Kitosan bazlı filmlerin su buharı geçirgenliği

Geçirgenlik, belirli sıcaklık ve bağıl nem koşullarında birim uzunluktaki düzgün yüzeyli bir malzemenin birim alanından, iki yüzey arasındaki buhar basıncı farkı nedeniyle gerçekleşen su buharı geçiş oranı olarak tanımlanır (ASTM E96-80). Su buharı geçirgenliği, film kalınlığı, ortamın bağıl nemi, ortam sıcaklığı ve formülasyona ilave edilen katkılardan etkilenir.

Filmlerin su buharı geçirgenlikleri ASTM metodu kullanılarak Kısım 4.5.3'te anlatıldığı gibi hesaplanmıştır. Hesaplanan su buharı iletim hızları (WVTR) ve su buharı geçirgenlikleri (WVP) olarak Çizelge 5.4'te verilmiştir.

**Çizelge 5.4 : Filmlerin su buharı geçirgenliği.**

|                                             | Kit-CD-Ber                                           | Kit-CD                                               | Kit-Su                                               |
|---------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| WVTR $\pm$ SS<br>(g/gün m <sup>2</sup> )    | 1049 $\pm$ 4,0                                       | 1833 $\pm$ 5,3                                       | 998 $\pm$ 0,005                                      |
| WVP $\pm$ SS<br>(g mm/ h m <sup>2</sup> Pa) | 2,09 x 10 <sup>-3</sup> $\pm$ 0,2 x 10 <sup>-3</sup> | 3,65 x 10 <sup>-3</sup> $\pm$ 2,7 x 10 <sup>-3</sup> | 1,99 x 10 <sup>-3</sup> $\pm$ 1,3 x 10 <sup>-3</sup> |

Kit-Su filminin su buharı geçirgenliği 1,99 x 10<sup>-3</sup> g mm/ h m<sup>2</sup> Pa bulunurken, aynı bağıl nem, sıcaklık ve kalınlıktaki Kit-CD filminin 3,65 x 10<sup>-3</sup> g mm/ h m<sup>2</sup> Pa olarak saptanan su buharı geçirgenliği Kit-Su filminin su buharı geçirgenliğinden yaklaşık 2 kat fazla bulunmuştur.

Berberin katkılı filmin su buharı geçirgenliği (2,09 x 10<sup>-3</sup> g mm/ h m<sup>2</sup> Pa) Kit-CD filmininki ile karşılaştırıldığında ise berberin katkısının filmin su buharı geçirgenliğini düşürdüğü görülmektedir. Berberin ile 2-HP- $\beta$ -CD arasında oluşan inklüzyon kompleksi su moleküllerinin geçişini güçleştirmiş olabilir. Berberin katkılı film ile saf kitosan filmin su buharı geçirgenlik değerleri ise hemen hemen aynı bulunmuştur.

Elde edilen filmlerin su buharı geçirgenlik (WVP) değerleri ve/veya su buharı iletim hızları (WVTR) literatürde mevcut diğer kitosan filmler ile Çizelge 5.5'te karşılaştırılmıştır. Kit-Ber filmi, literatürde bulunan zerdeçal katkılı kitosan film [55], elma polifenolü içeren kitosan film [6] ve çay polifenollerini içeren kitosan filmler [63] ile kıyaslanmıştır.

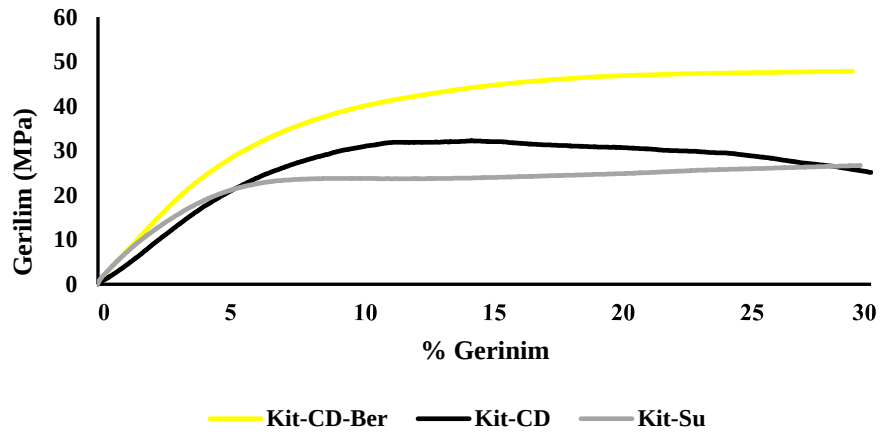
**Çizelge 5.5 : Kitosan bazlı filmlerin su buharı geçirgenliğinin karşılaştırılması.**

| Film                                        | WVP (g mm/ h m <sup>2</sup> Pa) |
|---------------------------------------------|---------------------------------|
| Kit-CD-Ber                                  | 2,09 x 10 <sup>-3</sup>         |
| Zerdeçal ekstraktı içeren kitosan film [55] | 5,51 x 10 <sup>-4</sup>         |
| Elma polifenolü içeren kitosan film [6]     | 2,7 x 10 <sup>-4</sup>          |
| Çay polifenolü içeren kitosan film [63]     | 2,4 x 10 <sup>-4</sup>          |

Literatürdeki bazı kitosan bazlı filmler ile kıyaslandığında berberin katkısının kitosan filmin su buharı geçirgenliği üzerinde önemli ölçüde etkili olduğu görülmektedir.

#### 5.4 Mekanik Testler

Gıda ambalaj mazlemelerinin sahip olması gereken en önemli özelliklerinden biri mekanik dayanımdır. Bu bağlamda da kitosan bazlı filmlerin çekme dayanımları ve kopma anındaki uzamalarına yönelik ölçümler yapılmıştır.



Şekil 5.4 : Filmlerin gerilim-gerinim eğrileri.

Young's modülü (E) bir kompozitin elastik deformasyona karşı ne kadar dirençli olduğunu bir ölçüsüdür. Gerilim-gerinim eğrilerinin (Şekil 5.4) doğrusal kısımlarının eğimleri filmlerin Young's modülü değerlerini vermektedir. Çekme dayanımı ise bir malzemenin kopuncaya ve kırılıncaya kadar dayanabileceği en yüksek çekme gerilmesidir. Bu gerilme, gerilim-gerinim eğrisindeki en yüksek gerilme değeridir. Kırılma gerinimi ve kırılma mukavemeti de yine bu eğrinin özelliklerinden bulunmuştur.

Çizelge 5.6 : Filmlerin mekanik özellikleri.

| Film türleri           | Kit-CD-Ber | Kit-CD | Kit-su |
|------------------------|------------|--------|--------|
| Mekanik özellikler     |            |        |        |
| Gerilme direnci (MPa)  | 48,9       | 32,3   | 21,8   |
| Young's modülü (MPa)   | 3265       | 2873   | 2516   |
| Kırılma gerinimi (MPa) | 48,9       | 21,5   | 21,5   |
| Kırılma mukavemeti (%) | 30         | 30     | 30     |

Şekil 5.4 ve Çizelge 5.6 incelendiğinde, berberin katkısı ile hazırlanan kitosan film örneğinin en yüksek gerilme direnci, Young's modülü, kırılma gerinimi ve kırılma mukavemetine sahip olduğu görülmektedir. Kitosan filmin mekanik özelliklerini iyileştiren bu etkinin polimer zincirleri arasındaki moleküller arası kuvvetten dolayı meydana geldiği kanısına varılabilir.

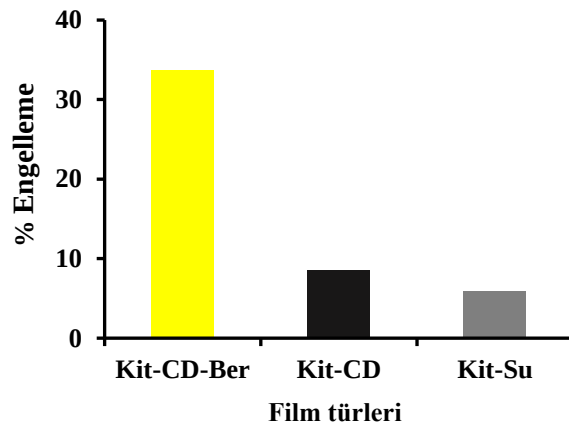
### 5.5 Kitosan Bazlı Filmlerin Antioksidan Aktiviteleri

Elde edilen filmlere uygulanan DPPH analizi sonucunda hesaplanan % inhibisyon sonuçları Çizelge 5.7’de ve Şekil 5.5’te gösterilmiştir.

**Çizelge 5.7 :** Filmlerin % inhibisyon sonuçları.

|              | Kit-CD-Ber | Kit-CD    | Kit-Su    |
|--------------|------------|-----------|-----------|
| % İnhibisyon | 33,7 ± 4,1 | 8,6 ± 3,8 | 5,9 ± 0,6 |

Antioksidan olarak davranan madde, DPPH radikalini indirgeme görevi görür. Absorbans değişimi ile bu davranışın takibi yapılır. Antioksidan madde, DPPH’i indirgeyerek en çok absorbans değişimine sebep olur. % engelleme sonucuyla berberin katkısının filmin antioksidan aktivitesi üzerinde önemli bir etki yarattığı görülmektedir.



**Şekil 5.5 :** Filmlerin % DPPH aktiviteleri.

Elde edilen sonuçlar, berberin katkılı kitosan filmin antioksidan aktivitesinin kontrol ve saf kitosan filmlere göre daha yüksek olduğunu göstermektedir. Berberin katkısı, kitosan filmin antioksidan aktivitesini önemli ölçüde artırmaktadır.

Serbest radikallerin neden olduğu çeşitli reaksiyonların önüne geçmek gıdaların korunması ve tazeliğini sürdürme açısından çok önemlidir. Antioksidanlar, serbest radikalleri indirgeyerek gıdaların bozulmasını önleyebilmekte ya da geciktirebilmektedir.

Kitosanın radikal indirgeme mekanizması, serbest radikalın kararlı makromolekül radikalleri oluşturmak için kalıntı serbest amino ( $\text{NH}_2$ ) grupları ile reaksiyona girmesi ve  $\text{NH}_2$  gruplarının bir hidrojen iyonunu çözültiden absorblayarak amonyak ( $\text{NH}_3^+$ ) gruplarını oluşturabilmesi ile ilgilidir. Berberin ilavesiyle antioksidan aktivitenin artması ise biyoaktif berberin molekülünün mevcudiyeti ile ilişkilidir.

Berberinin antioksidan aktivitesine yönelik çalışmalara literatürde rastlamak mümkündür. Shirwaikar ve arkadaşları tarafından berberinin antioksidan aktivitesine yönelik çalışma yapılmıştır. Çeşitli antioksidan analiz yöntemleri kullanılan bu çalışmada, farklı konsantrasyonlardaki berberinin numunlerinin antioksidan aktiviteleri ölçülmüştür.

DPPH analizi sonucunda % 0-80 aralığında inhibisyon elde edilmiştir [64].

Pongkittiphan ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada berberin ve berberinin fenolik türevlerinin antioksidan aktivitesine yöneliktir. Bu çalışma kapsamında berberin ve berberin türevlerinin antioksidan aktivitesi DPPH analizi kullanılarak belirlenmiştir. Çalışma sonuçları berberinin antioksidan aktivite gösterdiğini bunun yanı sıra berberinden sentezlenen diğer berberin türevlerinin de antioksidan aktivitesinin yüksek miktarda olduğu sonucuna ulaşılmıştır [65].

Film örneklerinin DPPH indirgeme kapasiteleri literatür değerleri ile uyum sağlamaktadır.

Rambabu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada kitosan filme çeşitli fenolik bileşikler ve flavaoidler içeren mango yaprağı ekstraktı eklenmiştir. Mango yaprağı ekstraktının yapısında bulunan aktif bileşenler DPPH radikalının indirgenmesini sağladığı belirtilmiştir. Fenolik bileşikler ve flavanoidlerin kuvvetli birer antioksidan olduğu sonucuna ulaşılmıştır [10].

Zhang ve grubu tarafından yapılan çalışmada kitosan filme çam fıstığı, yer fıstığı kabuklarının ve hünnap yaprağının ekstraktları eklenmiştir. Bu ürünlerin gıda endüstrisinde atılan yan ürünlerden olduğu belirtilmiştir ancak zengin fenolik ve flavanoid içerikleri sayesinde antioksidan özellik gösterdikleri ifade edilmiştir. Bu besin atıklarından oluşan ekstraktların kitosan filme eklenmesinin DPPH radikalını indirgemede başarılı olduğu sonucuna varılmıştır [66].

Qin ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada kitosan filmine çay polifenollerı eklenmiştir. Polifenollerın ilavesi ile kitosan filmlerinin serbest radikal indirgeme aktivitesinin arttığı belirtilmiştir. Polifenollerın, kitosan filmlerin antioksidan aktivitesini geliştirmek için kullanılabilecek iyi bir antioksidan olduğu sonucuna varılmıştır. Çay ekstraktında bulunan fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteden sorumlu olduğu vurgulanmıştır [67].

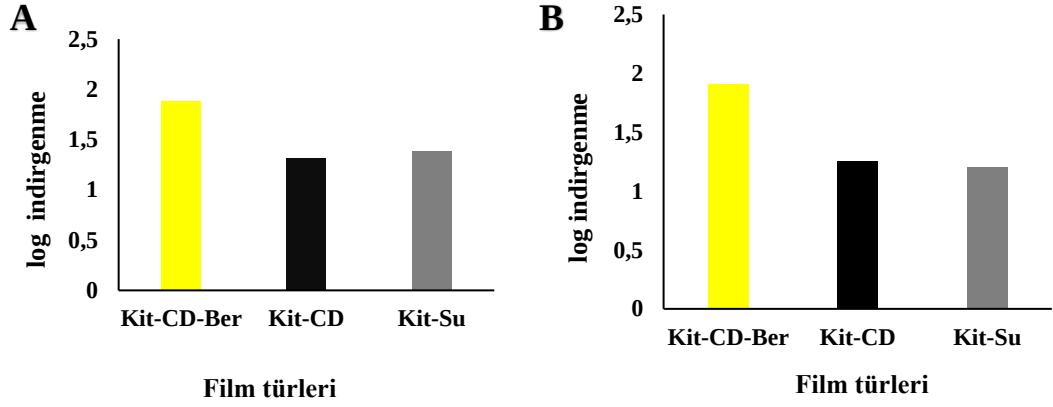
### **5.6 Kitosan Bazlı Filmlerin Antimikrobiyal Aktiviteleri**

Kitosanın sahip olduğu birkaç antimikrobiyal aktivite mekanizması mevcuttur. Bu mekanizmalar řu şekildedir:

- a) Pozitif yüklü kitosan molekülleri, bakteri yüzeyindeki negatif yüklere bağlanır. Bakteri zarı ile kitosan hücre geçirgenliğini değiştirmek için etkileşir.
- b) Kitosanın besinler ve başlıca metallerle olan şelasyonu mikrobiyal büyümeyi engeller.
- c) Hücre yüzeyindeki kitosan, besinlerin hücreye girmesini önleyen bir polimer zar oluşturabilir ya da aerobik bakteri büyümesini önleyebilecek bir oksijen bariyeri olarak davranabilir [68].

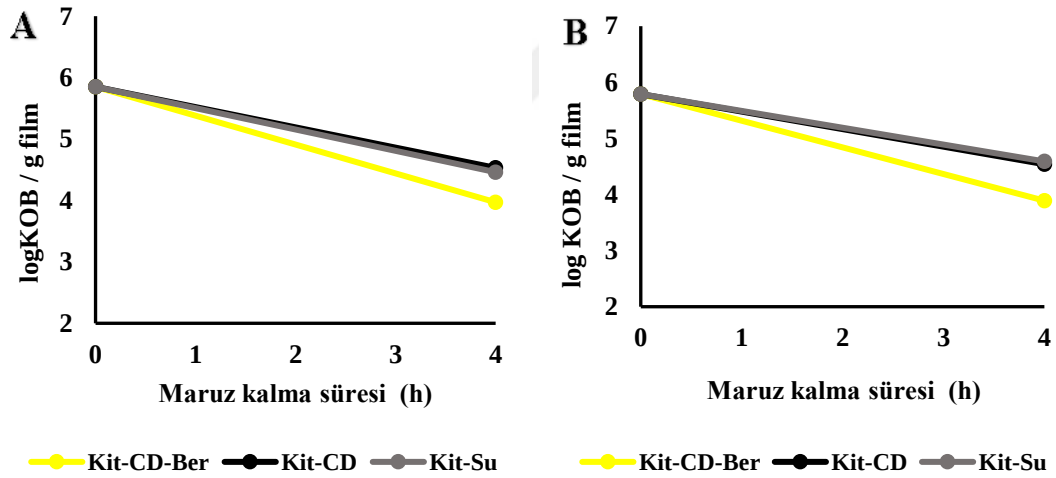
İnhibisyon aktivite mekanizması, moleköl ağırlığı, deasetilasyon derecesi ve bakteri türüne göre farklılık gösterir [69]. Deasetilasyon derecesi, polisakkaritteki serbest amino grupların içeriğini belirler. Kitosanı birçok uygulamasındaki performansını etkileyen deasetilasyon derecesi, çok iyi bilinen ve en önemli kimyasal özelliklerinden biridir. Genel olarak da destilasyon derecesi ne kadar büyükse antimikrobiyal aktivitenin de o kadar büyük olması beklenir [68].

Kitosan bazlı filmlere uygulanan antimikrobiyal aktivite deneyi sonucunda elde edilen sonuçlar log indirgenme ve logKOB / g örnek cinsinden Şekil 5.6 ve Şekil 5.7’de gösterilmiştir.



**Şekil 5.6 :** Filmlerin (A) *B. Cereus* ve (B) *S. Typhimurium* bakterilerine karşı gösterdiği antibakteriyel aktiviteler.

Kitosan bazlı filmlerin antimikrobiyal aktivitelerine dair sonuçlar, 4 saat boyunca *B. cereus* ve *S. typhimurium* bakterileri ile film yüzeylerinin temas halinde olması sonucunda ulaşılmıştır. Dört saat sonunda yüzeyinde en az sayıda bakteri bulunan filmin en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu sonucuna elde edilir.



**Şekil 5.7 :** Kitosan bazlı filmlerin log KOB/ g film türünden (A) *B. Cereus* ve (B) *S. Typhimurium* bakterilerine karşı antibakteriyel aktiviteleri.

Sonuçlar, berberin katkılı kitosan filmin yüzeyinde hem *B. Cereus* hem de *S. Typhimurium* bakterilerinin yüksek oranda giderildiğini göstermiştir. Kontrol film (Kit-CD) ve saf kitosan filmin de bakterilerin giderilmesinde etkili olduğu elde edilen sonuçlarda görülmektedir. Ancak berberin katkısı kitosan bazlı filmin antimikrobiyal aktivitesini önemli ölçüde artırmıştır.

Gıda ambalajı olarak tercih edilecek bir ürünün yüzeyinde bakterilerin varlığı ve yaşayabilme ihtimalleri gıda güvenliği açısından istenmeyecek bir durumdur. Bu durumun önüne geçebilmek için gıda ambalajı olarak kullanılacak filme antimikrobiyal aktivite kazandırılması, gıdaların bakteriyel bozulmalara karşı korunması gerekmektedir. Bu çalışmada hazırlanan kitosan bazlı filmin antimikrobiyal aktivitesinin berberin klorür standardı ile artırıldığı sonucuna ulaşılmıştır.

Berberinin antibakteriyel aktivitesine dair literatürde çeşitli çalışmalar mevcuttur.

Peng ve arkadaşları berberinin *Streptococcus agalactiae* bakterisine karşı antibakteriyel aktivitesini ve antibakteriyel aktivite mekanizmasını incelemiştir. Yapılan deneyler berberinin *S. agalactiae* bakterisine karşı antibakteriyel etkiye sahip olduğunu göstermiştir. *S. agalactiae* bakterisinin hücre zarının berberin tarafından hasara uğratıldığı, protein ve DNA sentezinin engellendiği vurgulanmıştır [70].

Kang ve grubu tarafından yapılan çalışma berberinin *Actinobacillus pleuropneumoniae* bakterisine karşı gösterdiği antibakteriyel etki üzerinedir. Domuzlarda yaygın olan ve sağlık sorunları oluşturduğu ifade edilen *A. pleuropneumoniae* bakterisine karşı berberinin antibakteriyel aktivitesinden faydalanılmıştır. Berberinin *A. Pleuropneumoniae* bakterisinin tedavisinde kullanılabilecek potansiyel bir bileşen olduğu ifade edilmiştir [71].



## 5.7 Tartışma

Artan ekolojik kaygılarla birlikte birçok sektör çevre dostu ürünlere yönelmektedir. Bu sektörler arasında, ambalaj ürünlerin fazlasıyla kullanıldığı gıda sektörü geniş yer tutmaktadır. Günümüzde kullanılan gıda ambalajları bir bariyer görevi görerek gıdayı dış etkenlerden koruyabilmekte ve gıdanın bozulmasını geciktirmekte hatta önleyebilmektedir.

Kitosan filmlerin gıda ambalaj malzemesi olarak uygulanabilirliğine dair literatürde fazla sayıda çalışmaya rastlamak mümkündür. Bu çalışmalarda kitosan filmin aktivitesini artırmak, özelliklerini iyileştirmek için kullanılan çok çeşitli biyoaktif maddeler karşımıza çıkmaktadır. Bu tez çalışmasında, literatürde ilk defa berberin klorür standardı ile katkılandırılmış kitosan filminden aktif bir gıda ambalaj malzemesi oluşturulmuştur. Uygulanan çeşitli fiziksel testler ve mekanik testler ile berberin katkılı filmin kontrol ve saf kitosan filmlere kıyasla daha başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür. Ayrıca berberin katkısı, filmin antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesini de iyileştirmiştir. Bu da geleneksel ambalajların aksine kitosan-berberin kompozit filminin doğrudan gıdayı korumada rol alabilmesini sağlar.

Bir gıda ambalajının sadece gıdayı koruma aşamasına odaklanmak, sonrasında oluşabilecek atıkları düşünmemek yanlış bir yaklaşımdır. Geliştirilen berberin katkılı kitosan filmin en önemli avantajlarından biri doğal ve biyobozunur kaynaklardan elde edilmesidir. Sonuç olarak, bu yüksek lisans tez çalışması doğal ve biyobozunur kaynaklardan elde edilen kitosan-berberin kompozit filmini alternatif bir aktif paketlenme örneği olarak sunmaktadır.



## KAYNAKLAR

- [1] **Sharma, S., Barkauskaite, S., Jaiswal, A.K. & Jaiswal, S.** (2020). Essential oils as additives in active food packaging, *Food Chemistry*, 343, 128403.
- [2] **Khaneghah, A.M., Hashemi, S.M.B. & Limbo, S.** (2018). Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions, *Food and Bioprocess Technology*, 111, 1-19.
- [3] **Jang, Y.C., Lee, G., Kwon, Y., Lim, J.H. & Jeong, J.H.** (2020). Recycling and management practices of plastic packaging waste towards a circular economy in South Korea, *Resources, Conservation and Recycling*, 158, 104798.
- [4] **Aider, M.** (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review, *LWT- Food Science and Technology*, 43, 837-842.
- [5] **Asgher, M., Qamar, S.A., Bilal, M. & Iqbal, H.M.N.** (2020). Bio-based active food packaging materials: Sustainable alternative to conventional petrochemical-based packaging materials, *Food Research International*, 137, 109625.
- [6] **Sun, L., Sun, J., Chen, L., Niu, P., Yang, X. & Guo, Y.** (2017). Preparation and characterization of chitosan film incorporated with thinned young apple polyphenols as an active packaging material, *Carbohydrate Polymers*, 163, 81-91.
- [7] **Priyadarshi, R., Sauraj, Kumar, B. & Negi, Y.S.** (2018). Chitosan film incorporated with citric acid and glycerol as an active packaging material for extension of green chili shelf life. *Carbohydrate Polymers*, 195, 329-338.
- [8] **Pańczyk, E.M., Staroszczyk, H., Gottfried, K., Kolodziejska, I. & Pajak, A.W.** (2015). Antimicrobial properties of chitosan solutions, chitosan films and gelatin-chitosan films, *Polimery*, 60 (11-12), 735-741.
- [9] **Yildirim, S.** (2011). Active packaging for food biopreservation, *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation*, 460-489. Oxford: Woodhead.
- [10] **Rambabu, K., Bharath, G., Banat, F., Show, P.L. & Cocolletzi, H.H.** (2019). Mango leaf extract incorporated chitosan antioxidant film for active food packaging, *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 1234-1243.

- [11] **Tillhon, M., Ortiz, L.M.G., Lombardi, P. & Scovassi, A.I.** (2012). Berberine: New perspectives for old remedies, *Biochemical Pharmacology*, 84 (10), 1260-1267.
- [12] **Singh, S., Pathak, N., Fatima, E. & Negi, A.S.** (2021). Plant isoquinoline alkaloids: Advances in the chemistry and biology of berberine, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 226, 113839.
- [13] **Ke, G., Xu, W. & Yu, W.** (2010). Preparation and properties of drug-loaded chitosan-sodium alginate complex membrane, *International Journal of Polymeric Materials*, 59, 184–191.
- [14] **Sarasam, A.R., Brown, P., Khajotia, S.S., Dmytryk, J.J. & Madihally, S.V.** (2008). Antibacterial activity of chitosan-based matrices on oral pathogens, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19, 1083-1090.
- [15] **Martínez-Camacho, A. P., Cortez-Rocha, M.O., Ezquerro-Brauer, J.M., Graciano-Verdugo, A.Z., Rodríguez-Félix, F., Castillo-Ortega, M.M., ....Plascencia-Jatomea, M.** (2010). Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties, *Carbohydrate Polymers*, 82, 305–315.
- [16] **Kumar, A., Ekavali, Chopra, K., Mukherjee, M., Pottabathini, R. & Dhull, D.K.** (2015). Current knowledge and pharmacological profile of berberine: An update, *European Journal of Pharmacology*, 761, 288-297.
- [17] **Url-1** <<https://www.fishersci.com/shop/products/berberine-chloride-thermo-scientific/AAJ6231106>>
- [18] **Xiao, L., Poudel, A.J., Huang, L., Wang, Y., Abdalla, A.M.E. & Yang, G.** (2020). Nanocellulose hyperfine network achieves sustained release of berberine hydrochloride solubilized with  $\beta$ -cyclodextrin for potential anti-infection oral administration, *International Journal of Biological Macromolecules*, 153, 633-640.
- [19] **Jambhekar, S.S., & Breen, P.** (2015). Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: Structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex, *Drug Discovery Today*, 21 (2), 356-362.
- [20] **Jayakumar, R., Prabakaran, M., Nair, S.V., Tokura, S., Tamura, H. & Selvamurugan, N.** (2010). Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications, *Progress in Material Science*, 55, 675-709.
- [21] **Muxiko, A., Etxabide, A., Uranga, J., Guerrero, P. & De La Caba, K.** (2017). Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 1358-1368.
- [22] **Moura, C.M.D., Moura, J.M.D., Soares, N.M. & Pinto, L.A.D.A. &** (2011). Evaluation of molar weight and deacetylation degree of chitosan during chitin deacetylation reaction: Used to produce biofilm, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 50, 351-355.

- [23] **Hamed, I., Özzoğul, F. & Regenstein, J.M.** (2016). Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan and chitooligosaccharides): A review, *Trends in Food Science & Technology*, 48, 40-50.
- [24] **Pillai, C.K.S., Paul, W. & Sharma, P.** (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation, *Progress in Polymer Science*, 34, 641-678.
- [25] **Dutta, P.K., Dutta, J. & Tripathi, V.S.** (2004). Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications, *Journal of Scientific & Industrial Research*, 63, 20-31.
- [26] **Rinaudo, M.** (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications, *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632.
- [27] **Ngo, D.H., Vo, T.S., Ngo, D.N., Kang, K.H., Je, J.Y., Pham, H.N.D., ... Kim, S.K.** (2015). Biological effects of chitosan and its derivatives, *Food Hydrocolloids*, 51, 200-216.
- [28] **Kim, S.** (2018). Competitive biological activities of chitosan and its derivatives: Antimicrobial, antioxidant, anticancer, and anti-inflammatory activities, *International Journal of Polymer Science*, 1-13. doi : 10.1155/2018/1708172.
- [29] **Wang, W., Xue, C. & Mao, X.** (2020). Chitosan: Structural modification, biological activity and application, *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 4532-4546.
- [30] **Xia, W., Liu, P., Zhang, J. & Chen, L.** (2011). Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides, *Food Hydrocolloids*, 25, 170-179.
- [31] **Rubilar, J.F., Cruz, R.M.S., Silva, H.D., Vicente, A.A., Khmelinski, I. & Vieira, M.C.** (2013). Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract, *Journal of Food Engineering*, 115, 466–474.
- [32] **El-hefiam, E.A., Nasef, M. & Yahaya, A.H.** (2011). Chitosan physical forms: A short review, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5 (5), 670-677.
- [33] **Bhattarai, N., Gunn, J. & Zhang, M.** (2010). Chitosan- based hydrogels for controlled, localized drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 83-99.
- [34] **Sinha, V.R., Singla, A.K., Wadhawan, S., Kaushik, R., Kumria, R., Bansal, K. & Dhawan, S.** (2004). Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs, *International Journal of Pharmaceutics*, 274, 1-33.
- [35] **Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Cerqueira, M.A., Rocha, C.M.R., Avides, M.C., Quintas, M.A.C. & Vicente, A.A.** (2011). Physico-chemical characterization of chitosan-based edible films incorporating bioactive compounds of different molecular weight, *Journal of Food Engineering*, 106, 111-118.

- [36] **Natarj, D., Sakkara, S., Meghwal, M. & Reddy, N.** (2018). Crosslinked chitosan films with controllable properties for commercial applications, *International of Biological Macromolecules*, 120, 1256-1264.
- [37] **Rivero, S., García, M.A. & Pinotti, A.** (2010). Crosslinking capacity of tannic acid in plasticized chitosan films, *Carbohydrate Polymers*, 82, 270-276.
- [38] **Abraham, S., Rajamanickam, D. & Srinivasan, B.** (2018). Preparation, characterization and cross-linking of chitosan by microwave assisted synthesis, *Science International*, 6 (1), 18-30.
- [39] **Tillet, G., Boutevin, B. & Ameduri, B.** (2011). Chemical reactions of polymer crosslinking and post-crosslinking at room and medium temperature, *Progress in Polymer Science*, 36, 191-217.
- [40] **Bhumkar, D. R. & Pokharkar, V. B.** (2006). Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note, *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 7 (2), E138-E143.
- [41] **Yang, C. H., Lin, S. Y., Huang, K. S., Huang, Y. C., Wang, E. C., Jhong, J. Y. & Kuo, C. Y.** (2008). Microfluidic emulsification and sorting assisted preparation of monodisperse chitosan microparticles, *Lab Chip*, 9 (1), 145-150.
- [42] **Bhadra, K. & Kumar, G.S.** (2010). Therapeutic potential of nucleic acid binding isoquinoline alkaloids: binding aspects and implications for drug design, *Medicinal Research Reviews*, 33 (6), 821-862.
- [43] **Kukula-Koch, W.A. & Widelski, J.** (2017). Alkaloids, *Pharmacognosy*, 163-198, Cambridge: Academic Press.
- [44] **Cicero, A.F.G. & Baggioni, A.** (2016). Berberine and its role in chronic disease. In: Gupta, S., Prasad, S., Aggarwal, B. (eds) *Anti-inflammatory Nutraceuticals and Chronic Diseases, Advances in Experimental Medicine and Biology*, 928, [https://doi.org/10.1007/978-3-319-41334-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-41334-1_2)
- [45] **Mohammadzadeh, N., Mehri, S. & Hosseinzadeh, H.** (2017). Berberis vulgaris and its constituent berberine as antidotes and protective agents against natural or chemical toxicities, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20 (5), 538-551.
- [46] **Avery, M.A., Battu, S.K., Chittiboyina, A.G., Maddineni, S., Majumdar, S. & Repka, M.A.** (2010). Physicochemical characterization of berberine chloride: a perspective in the development of a solution dosage form for oral delivery, *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 11 (3), 1466-1475.
- [47] **Lu, Q., Dun, J., Chen, J.M., Liu, S., & Sun, C.C.** (2019). Improving solid-state properties of berberine chloride through forming a saltcocrystal with citric acid, *Internatinal Journal of Pharmaceutics*, 554, 14-20.

- [48] **Zoeller, T., Dressman, J.B. & Klein, S.** (2012). Application of a ternary HP- $\beta$ -CD-complex approach to improve the dissolution performance of a poorly soluble weak acid under biorelevant conditions, *International Journal of Pharmaceutics*, 430, 176-183.
- [49] **Hazra, S., Hossain, M. & Kumar, G.S.** (2014). Studies on  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -cyclodextrin inclusion complexes of isoquinoline alkaloids berberine, palmatine and coralyne, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 78 (1), 311-323.
- [50] **Gaba, S., Saini, A., Singh, G. & Monga, V.** (2021). An insight into the medicinal attributes of berberine derivatives: A review, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 38, 116143.
- [51] **Li, Z., Geng, Y.N., Jiang, J.D. & Kong, W.J.** (2014). Antioxidant and anti-inflammatory activities of berberine in the treatment of diabetes mellitus, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 214, <https://doi.org/10.1155/2014/289264>
- [52] **Sogut, E. & Seydim, A.C.** (2018). The effects of chitosan and grape seed extract-based edible films on the quality of vacuum packaged chicken breast fillets, *Food Packaging and Shelf Life*, 18, 13-20.
- [53] **Van den Broek, L.A., Knoop, R.J., Kappen, F.H.J., Boeriu, C.G.** (2015). Chitosan films and blends for packaging material, *Carbohydrate Polymers*, 116, 237- 242.
- [54] **Peng, Y., Wu, Y. & Li, Y.** (2013). Development of tea extracts and chitosan composite films for active packaging materials, *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 282-289.
- [55] **Kalaycıoğlu, Z., Torlak, E., Evingür, G.A., Özen, İ. & Erim, F.B.** (2017). Antimicrobial and physical properties of chitosan films incorporated with turmeric extract, *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, 882-888.
- [56] **Zhou, Y., Liu, S., Ming, J., Li, Y., Deng, M. & He, B.** (2017). Sustained release effects of berberine-loaded chitosan microspheres on in vitro chondrocyte culture, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43 (10), 1703-1714.
- [57] **Mahya, S., Ai, J., Shojae, S., Khonakdar, H.A., Darbemamieh, G. & Shirian, S.** (2021). Berberine loaded chitosan nanoparticles encapsulated in polysaccharide-based hydrogel for the repair of spinal cord, *International Journal of Biological Macromolecules*, 182, 82-90.
- [58] **Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K. & Çapanoğlu, E.** (2016). Antioxidant activity/capacity measurement: II. Hydrogen atom transfer (HAT)-based, mixed mode (ET/HAT) and lipid peroxidation assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64 (5), 997-1027.
- [59] **Mishra, K., Ojha, H. & Chaudhury, N.K.** (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH• assay: A critical review and results, *Food Chemistry*, 130, 1036-1043.

- [60] **Kedare, S.B. & Singh, R.P.** (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, *Journal of Food Science and Technology*, 48, 412-422.
- [61] **Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B., Berker, K.I. & Özyurt, D.** (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the cuprac assay, *Molecules*, 12, 1496-1547.
- [62] **Patel, R.M. & Patel, N.J.** (2011). In vitro antioxidant activity of coumarin compounds by DPPH, super oxide and nitric oxide free radical scavenging methods, *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, 1, 52-68.
- [63] **Wang, L., Dong, Y., Men, H., Tong, J. & Zhou, J.** (2013). Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols, *Food Hydrocolloids*, 32 (1), 35-41.
- [64] **Shirwaikar, A., Shirwaikar, A., Rajendran, K. & Punitha, I.S.R.** (2006). In vitro antioxidant studies on the benzyl tetra isoquinoline alkaloid berberine, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29 (9), 1906-1910.
- [65] **Pongkittiphan, V., Chavasiri, W. & Supabphol, R.** (2015). Antioxidant effect of berberine and its phenolic derivatives against human fibrosarcoma cells, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16, 5371-5376.
- [66] **Zhang, X., Lian, H., Shi, J., Meng, W. & Peng, Y.** (2020). Plant extracts such as pine nut shell, peanut shell and jujube leaf improved the antioxidant ability and gas permeability of chitosan films, *International Journal of Biological Macromolecules*, 148, 1242-1250.
- [67] **Qin, Y.Y., Yang, J.Y., Lu, H.B., Wang, S.S., Yang, J., Yang, X.C., Chai, M. ve ark.** (2013). Effect of chitosan film incorporated with tea polyphenol on quality and shelf life of pork meat patties, *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 312-316.
- [68] **Hosseinnejad, M. & Jafari, S.M.** (2016). Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan, *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 467-475.
- [69] **Feng, X.Q., Fu, G.Q., Li, X.F., Su, Z.X., Wang, T.P. & Yang, S.** (2010). Chitosan kills Escherichia coli through damage to be of cell membrane mechanism, *Carbohydrate Polymers*, 79, 493-499.
- [70] **Peng, L., Kang, S., Yin, Z., Jia, R., Song, X., Li, L., Li, Z. ve ark.** (2015). Antibacterial activity and mechanism of berberine against Streptococcus agalactiae, *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8 (5), 5217-5223.
- [71] **Kang, S., Li, Z., Yi, Z., Jia, R., Song, X., Li, L., Chen, Z., ve ark.** (2015). The antibacterial mechanism of berberine against Actinobacillus pleuropneumoniae, *Natural Product Research*, 29 (23), 2203-2206.



## ÖZGEÇMİŞ

**Ad Soyad** : Seray ÖZTÜRK

|  |
|--|
|  |
|--|

## ÖĞRENİM DURUMU

**Lisans** : 2020, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü

**Yüksek Lisans** : 2022, İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, Kimya Programı

## MESLEKİ DENEYİM

Politeknik Metal A.Ş., AR-GE Mühendisi, 2022 - devam ediyor.