



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



BİTKİ ÖZÜTÜ KATKILI ALJİNAT
HİDROJELLERİNİN ÜRETİMİ VE
KARAKTERİZASYONU

Elif Büşra ZORLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Şubat-2021
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Elif Büşra Zorlu tarafından hazırlanan ‘‘Bitki    t   Katkılı Aljinat Hidrojellerin   retimi ve Karakterizasyonu’’ adlı tez çalışması 11/02/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliğı ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK L  SANS TEZ   olarak kabul edilmiştir.

Jüri   yeleri

  mza

Başkan

Doç. Dr. Ayşe KALEMTAŞ

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Gülsüm AYDIN

  ye

Dr. Öğr. Üyesi   lk   SOYDAL

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Sait Gezgın
FBE Müdürü

Bu tez   alışması Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP) tarafından 19201103 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Elif Büşra Zorlu

Tarih: 11/02/2021

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ ÖZÜTÜ KATKILI ALJİNAT HİDROJELLERİNİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

Elif Büşra ZORLU

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Gülsüm AYDIN

2021, 70 Sayfa

Jüri

Doç. Dr. Ayşe KALEMTAŞ
Dr. Öğr. Üyesi Gülsüm AYDIN
Dr. Öğr. Üyesi Ülkü SOYDAL

Ekolojik dengenin bozulmasına sebep olmaları nedeniyle sentetik polimerlerin kullanımlarının azaltılmasına çalışılmaktadır. Bu amaca yönelik yapılan çalışmalar, biyolojik olarak sentezlenebilen ve doğada kendiliğinden yok olabilen doğal polimerler, diğer bir deyişle biyopolimerler üzerinde yoğunlaşmıştır. Aljinat bu kapsamda yaygın olarak kullanılan doğal polimerlerden biridir. Aljinat esaslı filmler üretilerek antimikrobiyal ve sağlamaştırıcı maddelerle desteklenebilmekte ve farklı kompozitleri oluşturulabilmektedir. Bu tür biyobozunur filmlere daha verimli, kullanışlı ve dayanıklı olmalarını sağlamak için aktif bileşenler eklenebilmektedir. Bu aktif bileşenlerden biri bitki özütleri olup yapılmış olan bu tez çalışmasında *Hibiscus sabdariffa* (Hbs) bitki özütü kullanılmıştır. Hbs bitki özütü katkı aljinat filmler üretilerek fiziksel, mekanik ve antibakteriyel özellikleri açısından karakterizasyonları yapılmıştır.

Üretilen filmlere değişen oranlarda Hbs özütü (%1-3), gliserol (%10-30) ve CaCO₃ (0.01-0.03 g/g aljinat) eklenerek farklı formülasyonlarda kompozit filmler elde edilmiştir. Filmlerin su içeriği, şişme, çözünürlük, kalınlık, antibakteriyel aktivite, FTIR spektrumları, mekanik özellikleri ve optik mikroskop görüntüleri incelenerek farklı oranlardaki ilavelerin belirtilen özelliklere etkileri incelenmiştir. Üretilen tüm film setlerinde artan Hbs özütü miktarlarıyla birlikte filmlerin şişme ve su içeriği değerlerinde anlamlı azalma, çözünürlük değerlerinde ve antibakteriyel aktivitelerinde ise anlamlı bir artış gözlenmiştir. (p<0.05) Farklı oranlarda Hbs özütü ve gliserol ilave edilen her iki grubun kalınlıklarında anlamlı artışlar gözlenmiştir. Buna bağlı olarak her iki film setinin su buharı geçirgenliklerinde de artış profiline rastlanmıştır. İncelenen optik mikroskop görüntülerinde Hbs özütü oranının artmasıyla film yapılarının daha fazla pürüzlü ve gözenekli hale geldiği ve aynı durumun artan gliserol konsantrasyonunda da meydana geldiği görülmüştür. Elde edilen FTIR spektrumlarında Hbs özütünün aljinat film yapısına katılarak etkileşim gösterdiği oluşan yeni pik bandıyla saptanmıştır. Bitki özütü ilavesiyle filmlerin daha kırılkan olduğu tespit edilerek gerilme mukavemeti (TS) ve uzama yüzdelerinde (%E) anlamlı azalış gözlenmiştir. Artan gliserol konsantrasyonlarında ise TS değerleri değişiklik göstermezken, uzama yüzdelerinde %30 gliserol katkı filmler gliserol eklenmeyen filmlere kıyasla anlamlı artış göstermiştir.

Literatür incelendiğinde Hbs özütü katkı aljinat esaslı film üretimi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. İlk kez bu tez kapsamında üretilen Hbs özütü katkı aljinat filmler bu konuda literatüre katkı sağlayacaktır. Elde edilen filmlerin antibakteriyel özellikleri sayesinde gıda ambalajlama veya yara örtüleri gibi uygulamalarda kullanım potansiyelleri bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: aljinat, antibakteriyel aktivite, bitki özütleri, biyopolimer, *Hibiscus sabdariffa*

ABSTRACT

MS THESIS

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF PLANT EXTRACT INCORPORATED ALGINATE HYDROGELS

Elif Busra ZORLU

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN BIOTECHNOLOGY

Advisor: Asst. Prof. Dr. Gulsum AYDIN

2021, 70 Pages

Jury

Assoc. Prof. Dr. Ayse KALEMTAS

Asst. Prof. Dr. Gulsum AYDIN

Asst. Prof. Dr. Ulku SOYDAL

Efforts are being made to reduce the use of synthetic polymers due to the deterioration of ecological balance. Studies for this purpose have focused on natural polymers, in other words biopolymers that can be synthesized biologically and disappear spontaneously in nature. Alginate is one of the natural polymers commonly used in this context. By producing alginate-based films, they can be supported with antimicrobial and strengthening agents and different composites can be formed. Active ingredients can be added to such biodegradable films to make them more efficient, useful and durable. One of these active ingredients is plant extracts. *Hibiscus sabdariffa* (Hbs) plant extract was used in this thesis study. Hbs plant extract added alginate films were produced and their physical, mechanical and antibacterial properties were characterized.

Composite films in different formulations were obtained by adding different amounts of Hbs extract (1-3%), glycerol (10-30%) and CaCO₃ (0.01-0.03 g / g alginate) to the produced films. By examining the water content, swelling, solubility, thickness, antibacterial activity, FTIR spectra, mechanical properties and optical microscope images of the films, the effects of different additions on the specified properties were examined. A significant decrease in the swelling and water content values of the films and a significant increase in the solubility values and antibacterial activities were observed with the increasing amount of Hbs extract in all film sets produced. (p <0.05) Significant increases were observed in the thicknesses of both groups to which different amounts of Hbs extract and glycerol were added. Accordingly, an increase profile was found in the water vapor permeability of both film set insets. In the optical microscope images examined, it was observed that the film structures became more rough and porous with the increase of Hbs extract ratio and the same situation occurred with increasing glycerol concentration. In the FTIR spectra obtained, it was determined that the Hbs extract interacted with the alginate film structure with the new peak band formed. A significant decrease was observed in tensile strength (TS) and elongation percentages (E%), as it was determined that the films were more fragile with the addition of plant extract. While TS values did not change in increasing glycerol concentrations, the elongation percentages of films with 30% glycerol showed a significant increase compared to films without glycerol.

When the literature is examined, no study has been found on the production of alginate based film with Hbs extract. Hbs extract doped alginate films produced for the first time within the scope of this thesis will contribute to the literature on this subject. Thanks to the antibacterial properties of the films obtained, they have potential use in applications such as food packaging or wound dressings.

Keywords: alginate, antibacterial activity, biopolymer, *Hibiscus sabdariffa*, plant extracts

ÖNSÖZ

Lisans eğitimimin bitmesiyle ve mesleğimi daha ileriye taşıma gayesi ile lisansüstü eğitimimin de sonuna gelmiş bulunmaktayım. Her zaman insan için ve akabinde ülkemizin ve vatanımızın kalkınması için bilim yapmanın şart olduğunu özümseyerek, ahlaklı, saygılı bir istikamette yolculuğuma devam ederken;

Çevresel, ekolojik farkındalığının artmasını sağlayarak bu tez çalışmasının oluşmasının yolunu açan ve yüksek lisans eğitimim boyunca tecrübe ve bilgilerinden yararlandığım danışman hocam, sayın Dr. Öğr. Üyesi Gülsüm AYDIN'a,

Beraber çalışmalar gerçekleştirerek her koşulda yardımlarını esirgemeyen laboratuvar arkadaşım Cenani ÖZTÜRK'e,

Çalışmamız için maddi destek sağlayan Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne

Bana pek çok farklı alanlarda disiplinler arası çalışma fırsatı sunan, akademi ve sivil toplum sahasını birleştirme hedefimde desteklerini benden esirgemeyen, her zaman akıl danışabileceğim, insani ve ahlaki değerleri ile örnek aldığım sonsuz hoşgörüsü ve sabrı için değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Muhammed İktal ALP'e,

Her zaman bana motivasyonel olarak güç veren ve yanımda olan yakın arkadaşlarım ve Geleceğin Bilimi ailesine,

Ve en önemlisi tüm eğitim hayatım boyunca arkamda olarak desteklerini benden esirgemeyen, benimle beraber öğrenen, sonsuz sevgi ve saygı duyduğum babam Muhammed ZORLU'ya, annem Serap ZORLU'ya ve kardeşim Esmâ Nur ZORLU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum ve bu çalışmamı onlara ithaf ediyorum.

Elif Büşra Zorlu
KONYA-2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
ÖNSÖZ	ix
İÇİNDEKİLER	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Polimerler.....	4
2.2. Doğal Polimerler.....	5
2.3. Aljinat	8
2.3.1. Aljinatın uygulama alanları	12
2.3.1.1. Biyomedikal uygulamalar.....	13
2.3.1.2. Gıda ambalajlama uygulamaları	14
2.3.1.3. Tekstil uygulamaları	16
2.3.1.4. Tarım uygulamaları.....	16
2.3.1.5. Diğer uygulamalar	16
2.4. Hidrojel Filmlere Takviyeler	17
2.4.1. Antimikrobiyal Ajanlar	17
2.4.1.1. Bitki özütleri	18
2.4.1.1.1. <i>Hibiscus sabdariffa</i> bitkisi	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
3.1. Materyaller.....	23
3.2. Yöntem.....	23
3.2.1. Bitki özütlerinin hazırlanması.....	23
3.2.2. Filmlerin üretimi	24
3.2.3. Film kalınlıkları	26
3.2.4. Şişme- çözünürlük- su içeriği testleri	26
3.2.5. Su buharı geçirgenlik (WVP) testleri.....	27
3.2.6. Antibakteriyel aktivite testi.....	28
3.2.7. Fourier Transform Infrared Spektrometre (FTIR) analizi	29
3.2.8. Mekanik testler	29
3.2.9. Optik mikroskop analizi.....	30
3.2.10. İstatistik analizleri.....	30
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	31
4.1. Film Özellikleri.....	31
4.2. Antibakteriyel Aktivite Testi	33
4.3. Şişme- Çözünürlük- Su İçeriği Testleri	43

4.3.1. Şişme testi	43
4.3.2. Çözünürlük testi	44
4.3.3. Su içeriği testi	45
4.4. Kalınlık	47
4.4.1. Farklı oranlarda Hbs özütü içeren aljinat filmlerin kalınlıkları	47
4.4.2. Farklı oranlarda gliserol içeren aljinat filmlerin kalınlıkları	48
4.5. Optik Mikroskop Analizi	49
4.5.1. Farklı oranlarda Hbs özütü içeren aljinat filmlerin görüntüleri	49
4.5.2. Farklı oranlarda gliserol içeren aljinat filmlerin görüntüleri	49
4.6. Su Buharı Geçirgenlik (WVP) Testleri.....	50
4.6.1. Farklı oranlarda Hbs özütü içeren aljinat filmlerin su buharı geçirgenlikleri	51
4.6.2. Farklı oranlarda gliserol içeren aljinat filmlerin su buharı geçirgenlikleri ..	51
4.7. FTIR Analizi	52
4.7.1. Farklı oranlarda Hbs özütü içeren aljinat filmlerin FTIR analizi	52
4.7.2. Farklı oranlarda gliserol içeren aljinat filmlerin FTIR analizi.....	53
4.8. Mekanik Testler	54
4.8.1. Farklı oranlarda Hbs özütü içeren aljinat filmlerin mekanik testleri	55
4.8.2. Farklı oranlarda gliserol içeren aljinat filmlerin mekanik testleri	56
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	57
5.1. Sonuçlar	57
5.2 Öneriler	58
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	70

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

dk:	Dakika
g:	Gram
m:	Metre
mm:	Milimetre
mL:	Mililitre
s:	Saniye
°C:	Santigrat Derece
ΔP:	Kısmi Su Buharı Basıncı Farkı
μL:	Mikrolitre

Kısaltmalar

Alj:	Aljinat
ATCC:	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
BS:	<i>Bacillus subtilis</i>
Ca:	İç Çapraz Bağlamada Kullanılan Kalsiyum Karbonat-GDL
CaCO ₃ :	Kalsiyum Karbonat
EC:	<i>Escherichia coli</i>
FTIR:	Fourier Transform Infrared Spektrometresi
GDL:	Glukono Delta Lakton
Gli:	Gliserol
Hbs:	<i>Hibiscus Sabdariffa</i> Bitki Özütü
Kob:	Koloni Oluşturan Birim
KP:	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
SA:	<i>Staphylococcus aureus</i>
TS:	Gerilme Mukavemeti
%E:	Yüzde Uzama

1. GİRİŞ

Dünyada sanayileşmenin de artmasıyla ekosistemde çevre kirliliği, küresel ısınma, sera etkisi, karbondioksit salınımı gibi hasarlar meydana gelmektedir. Günümüzde petrol türevli sentetik polimerler birçok alanda yoğun bir şekilde kullanılmakta ve bunların kullanımı doğada olumsuz etkiler oluşturmaktadır. Üretilen plastiklerin %80 kadarı, depolama alanlarında ve doğal ortamlarda atık olarak birikmekte ve doğada artan bir tehlike oluşturmaktadır. Sentetik polimerlerin 400 yıla varan bozulma sürelerinin olması gibi çevresel etkilere ilişkin genel endişeler; biyolojik olarak kolay bozunan, kaynağını doğadan alabilen, yenilenebilir, çevre dostu malzemelere olan ilgiyi de beraberinde getirmiştir. (Al Awwaly ve ark., 2010) Petrol esaslı polimerlere ideal bir ikame maddesi olarak kullanılan organik maddeler diğer bir deyişle; biyopolimerler, kullanışlı özellikleri sayesinde doğa dostu biyoplastik geliştirme süreçleriyle son yıllarda ilgi görmektedir. (Sadasiyuni ve ark., 2019) Biyopolimerler, zararlı yan ürün oluşturmaksızın ideal olarak doğada CO₂ ve suya indirgenebilmektedir. (Karan ve ark., 2019) 2019 yılına kadar küresel plastik üretimi 9.3 milyar tona ulaşmış ve bu üretimin %78'i plastik atığa dönüşmüştür. 2050 yılına kadar ise bu üretimin 12 milyar tona yükselmesi beklenmektedir. (Geyer ve ark., 2017) Oldukça büyük olan bu pazarda biyoplastiklerin payı incelendiğinde hala küresel plastik üretiminin %1'ini aşamamış olduğu görülmektedir. Toksik etki oluşturmama ve düşük enflamatuar etki yaratma gibi avantajlara sahip olan biyopolimerler fosil yakıtlar yerine plastik malzemelerin üretiminde tercih edilmeye başlanmıştır. (Janik ve ark., 2018) Ortaya çıkan bu endüstri alanında biyolojik temelli polimerik malzeme sınıflarının geliştirilmesi ve mevcut polimerlerin performanslarının da iyileştirilmesi gerekmektedir. Sınırlı mekanik performans gibi çeşitli dezavantajları olabilen biyopolimerlerden kompozitler üretilmektedir. Kompozitler; farklı polimerlerle kombinasyon halinde veya çeşitli ilavelerle oluşturulabilmektedir. Oluşturulan yeni yapılar tıpta yeni nesil uygulamalarında, elektronik ve otomotiv sektöründe, havacılık ve savunma alanında, gıda ambalajlama gibi pek çok alanda görmek mümkündür. Özellikle biyolojik yapılarla temas halinde olacak uygulamalarında biyopolimer bazlı ürünler canlı sistemlerle etkileşime girmeyecek şekilde tasarlanmaktadır. (Lee ve Mooney, 2012)

Bakteriler, algler, bitkiler ve hayvanlar gibi pek çok doğal organizmadan elde edilen biyopolimerler genel olarak güvenli kabul edilen (GRAS) polisakkarit ve protein

grubunda yer almaktadırlar. (Jo ve Lee, 2020) Bu grubun içerisinde kollajen, ipek gibi fibril proteinler; albümin gibi globüler proteinler; selüloz ve agaroz gibi nötral polisakkaritler; kitosan ve nişasta gibi katyonik polisakkaritler ile aljinat ve pektin gibi anyonik polisakkaritler yer almaktadır.

Günlük hayatta sıklıkla kullanılan plastiklerin %5'inden az bir kısmının geri dönüştürülebildiği ve her sene gıda ambalaj malzemelerinin %8 oranında arttığı göz önüne alındığında; doğada çok fazla plastik atık oluştuğu görülmektedir. Tüketicilerin güvenli gıdaya taleplerinin artmasıyla birlikte son zamanlarda yeşil paketleme malzemeleri geliştirilmektedir. (Tavassoli-Kafrani ve ark., 2016; Wang ve ark., 2017)

Günümüz çalışmalarında yeşil ve yenilenebilir kaynaklar olmaları nedeniyle biyopolimerler pek çok uygulamada kullanılmaktadır. Son dönemlerde oldukça popüler olan ve yoğun bir şekilde kullanılan bir biyopolimer olan aljinat; özellikle gıda ambalajları (Wang ve Rhim, 2015; Garavand ve ark., 2017; Salama ve ark., 2018), yara örtüleri (Kaygusuz ve ark., 2017; Rezvanian ve ark., 2017; Shahzad ve ark., 2019; Ture, 2019), atık giderme (Kaygusuz ve ark., 2015b; Zhang ve ark., 2016) ve ilaç salım sistemleri (Kaygusuz ve ark., 2015a) gibi birçok uygulamada kullanılmaktadır. Özellikle biyobozunur gıda ambalajlaması ve biyoyumlu yara örtüleri çalışmalarında kullanılan polimer esaslı filmler; antimikrobiyal, antioksidan, mekanik iyileştirici, koruyucu gibi maddeleri içerebilmektedir. (Zhang ve ark., 2015)

Daha güçlü üç boyutlu bir ağ oluşturmak için farklı moleküler zincirler arasında kimyasal bağların oluşumunu sağlayan çapraz bağlama yöntemleri aljinat filmlerin mekanik, fiziksel ve termal özelliklerini iyileştirmektedir. Garavand ve ark. (2017)'nin bu alandaki yenilikçi stratejileri; çapraz bağlama prosedürlerinin geliştirilmesidir. Çapraz bağlama maddeleri, özellikle karbonhidrat veya protein türevli biyopolimer malzemeler için uygundur. Çapraz bağlayıcılar, özellikle aljinat gibi biyopolimerlerin mekanik ve bariyer özelliklerindeki doğal eksiklikleri gidererek daha uygulanabilir bir forma getirmektedir. (Azeredo ve Waldron, 2016)

Bitkiler sahip oldukları karmaşık kimyasal yapılarından dolayı geçmişten bugüne kadar geleneksel birçok uygulamada kullanılmıştır. (Esen, 2008) Eski çağlardan bu yana bitkilerden barınak, giyecek, yiyecek, baharat, parfüm ve ilaç başta olmak üzere pek çok alanda yararlanılmıştır. Bitkiler besin ve enerji sağlama gibi yaşamsal faaliyet taşımayan ve büyüme-gelişme evrelerinde doğrudan görev almayan sekonder metabolit olarak adlandırılan organik maddeler üretirler. Bitkilerin doğal yapılarında bulunan bu sekonder metabolitler ve bu metabolitlerin kombinasyonları, boyadan gıda endüstrisine

kadar çeşitli alanlarda kullanılan aktif doğal ürünlerdir. Aktif doğal bileşenlerin biyopolimerlerle birlikte kullanım çalışmaları tamamen biyobozunur ve sitotoksisite göstermeyen ürünlerin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Bu ürünler özellikle medikal ve gıda endüstrisinde güvenilir malzeme ihtiyacını karşılamaya aday ürünler olarak görülmektedir. Bitki özütlerinin de pek çoğu bu çalışmalarda polimer destekleyici özelliklerde kullanılmaktadır.

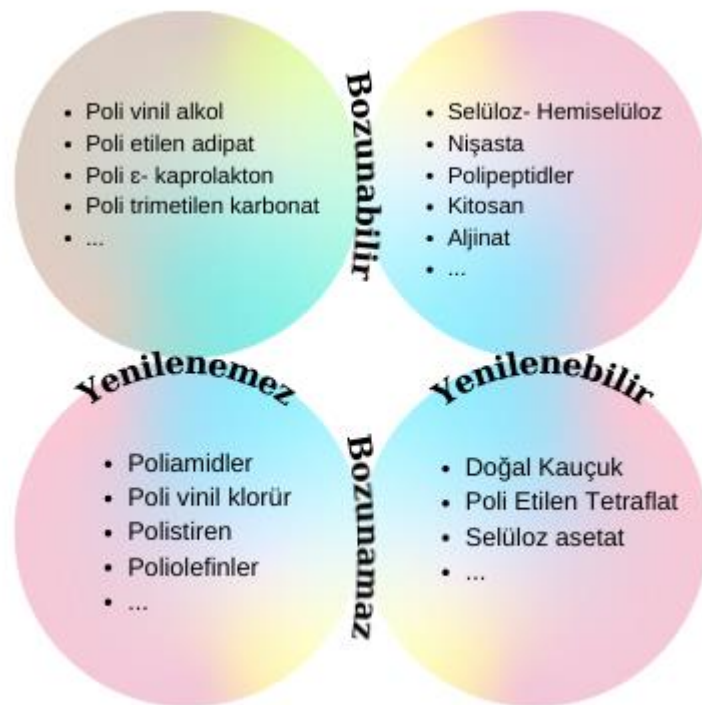
Bu bilgiler doğrultusunda bu çalışma ile hem gıda ambalajlama hem de medikal alanda yara örtüsü potansiyeli taşıyacak hidrojel film üretilmesi ve karakterize edilmesi hedeflenmiştir. Gliserol ilavesi ve iç çapraz bağlama uygulanmış aljinat filmlerine *Hibiscus sabdariffa* bitkisi özütü eklenerek filmlere antibakteriyel aktivite kazandırılması amaçlanmıştır. Hazırlanan filmlerin antibakteriyel aktiviteleri, şişme-çözünürlük-su içeriği-kalınlık testleri, su buharı geçirgenliği analizleri, mekanik testleri ve FTIR analizleri yapılarak sonuçları tartışılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Polimerler

Polimerler; monomer olarak adlandırılan birden fazla tekrar eden yapılardan oluşan uzun zincirli moleküllerdir. Yaşamın başlangıcından itibaren polimerler; protein, DNA, RNA ve polisakkaritler gibi doğal formlarda var olmuştur. Eski zamanlardan beri insanlar polimerleri giyim, savunma, gıda koruma, taşımacılık, ev malzemeleri ve diğer gereksinimlerini sağlamak adına kullanmışlardır. Genel olarak termoplastikler, elastomerler ve termosetler olmak üzere 3 temel polimer sınıfı vardır. (Robert J. Young ve Lovell, 2011)

Polimerler doğal veya sentetik kaynaklı olabilmektedirler. Ekolojik olarak bakıldığında polimerlerin hammadde kaynağı ve bozunabilirliği en önemli faktörlerden olmuştur. Bu doğrultuda, polimerleri Şekil 2.1’de gösterildiği gibi birbiriyle örtüşen dört kategoriye ayırabilmek mümkündür. (Imre ve ark., 2019) Sentetik türevli polimerlerin, mekanik özelliklerinin iyi olması dolayısıyla daha geniş kullanım alanları bulunmakta ancak doğal kaynaklı polimerler de biyoyumluluklarının daha yüksek olması ile ilgi çekmektedir. (Doppalapudi ve ark., 2014)



Şekil 2.1. Polimerlerin sınıflandırılması

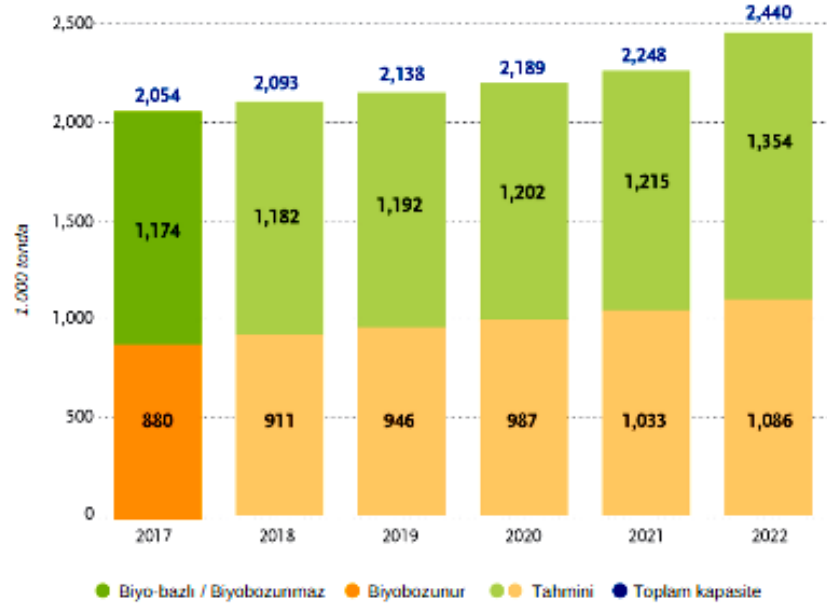
2.2. Doğal Polimerler

Petrol kaynaklı polimerlerin yenilenebilir olmayışı ve çevre üzerinde olumsuz etkiler oluşturmaları bu polimerlere alternatif ürün arayışlarını gündeme getirmiş ve bu durumun sonucu olarak doğal polimerlerle (biyopolimerler) ilgili birçok çalışma yapılmıştır. (Garavand ve ark., 2017) Biyopolimerleri; “biyolojik materyalden kimyasal olarak sentezlenen veya canlı organizmalar tarafından tamamen biyolojik yollarla doğal kaynaklardan üretilen polimerler” olarak tanımlayan Imre ve ark. (2019) biyopolimer bir malzemenin aşağıdaki sınıflardan bir veya daha fazlasının kriterlerini taşımasını öngörürler;

- i. Biyobazlı biyopolimerler: Tamamen veya kısmen biyokütleden oluşan polimerler,
- ii. Biyolojik olarak parçalanabilen biyopolimerler: Bakteri veya diğer organizmalar tarafından oluşturulabilen polimerler,
- iii. Biyouyumlu biyopolimerler: İnsan veya hayvan dokusuyla uyumlu, yani işlevini yerine getirirken vücuda zarar vermeyen polimerler.

Biyopolimer malzemelerin sınıflandırılması özellikle uygulama alanına bağlı olarak tanımlaması yapılabilmektedir. Yaygın kullanımdaki biyopolimerlerin; “doğal, biyobazlı, biyolojik olarak parçalanabilen makromoleküller” olmasının yanı sıra örneğin biyomedikal uygulamalar için “biyo-uyumlu” terimi sıklıkla kullanılmaktadır.

Biyopolimerlerin; bir organizmanın yaşam döngüsünün farklı aşamaları boyunca enzimler tarafından veya çevresel değişikliklere yanıt olarak sürekli manipüle edilebilmeleri onları canlı üzerindeki uygulamalarında “akıllı” ve “uyarlanabilir” malzemeler olarak adlandırılabilmelerini sağlamıştır. Biyopolimerlere karşı artan talep neticesinde ortaya çıkan ürünler pazarı da büyümektedir. European Bioplastics tarafından toplanan en son piyasa verilerine göre (Şekil 2.2) 2017’de yaklaşık 2.05 milyon ton olan küresel biyopolimer üretim kapasitesinin 2022’de yaklaşık olarak 2.44 milyon tona çıkması beklenmektedir. (Bioplastics, 2017) Bu yöndeki yatırım ve araştırmaların artmasıyla beraber biyopolimerlerin optik, biyolojik ve mühendislik uygulamalarında birçok geleneksel malzemenin yerini alması beklenmektedir.

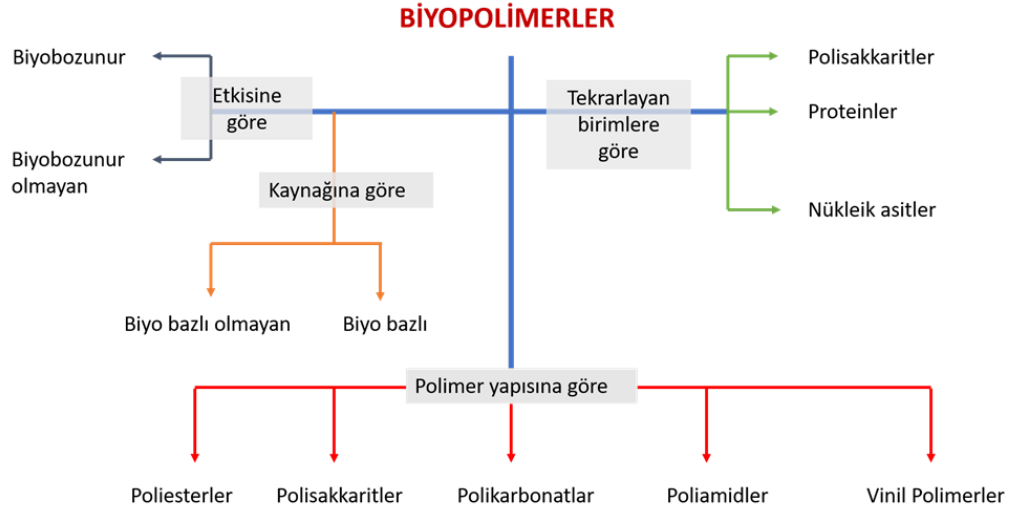


Şekil 2.2. European Bioplastics 2017-2022 küresel biyoplastik üretim verileri ve tahminleri (Bioplastics, 2017)

Kullanılan monomerik birimlere ve oluşan biyopolimerin yapısına göre üç ana biyopolimer sınıfı vardır:

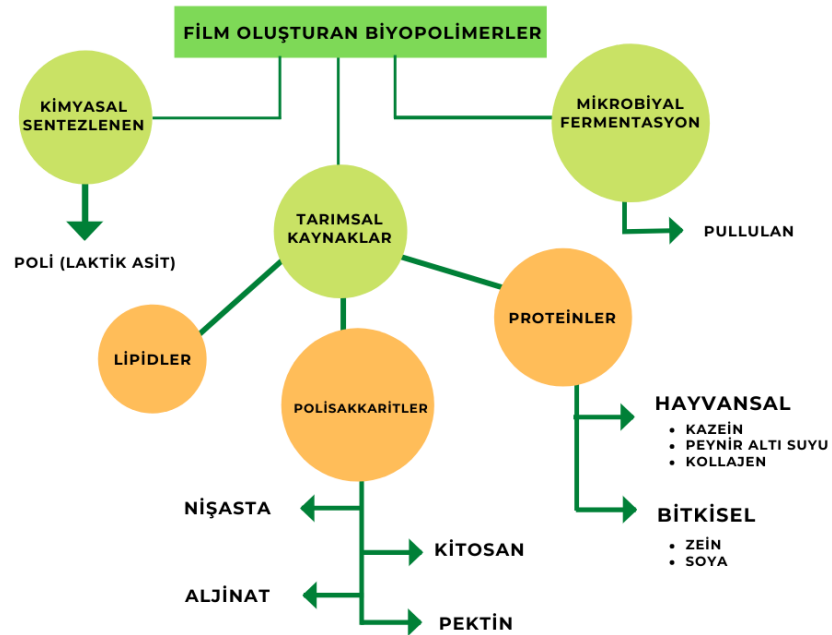
- i. Polinükleotidler (RNA ve DNA)- 13 veya daha fazla nükleotid monomerinden oluşan uzun polimerler,
- ii. Polipeptitler- kısa amino asit polimerler,
- iii. Polisakkaritler- doğrusal bağlı polimerik karbonhidrat yapılar. (Pattanashetti ve ark., 2017)

Temelde bu biyopolimerler biyouyumlu, biyobozunur ve antibakteriyel aktivite gibi önemli özellikler sergilemektedirler. (Pattanashetti ve ark., 2017) Birçok farklı uygulamada kullanılabilen biyolojik kökenli polimerler günlük yaşamda önemli bir yer tutmaktadır. Özellikle son yıllarda doku mühendisliği, tıbbi implantlar, yara iyileştirme/yara örtüleri ve ilaç salım sistemleri gibi klinik uygulamalarda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. (Moohan ve ark., 2019) Yaygın olarak kullanılan biyopolimerlerin genel olarak ortaya çıkan sınıflandırılmaları Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Biyopolimerlerin sınıflandırılmaları

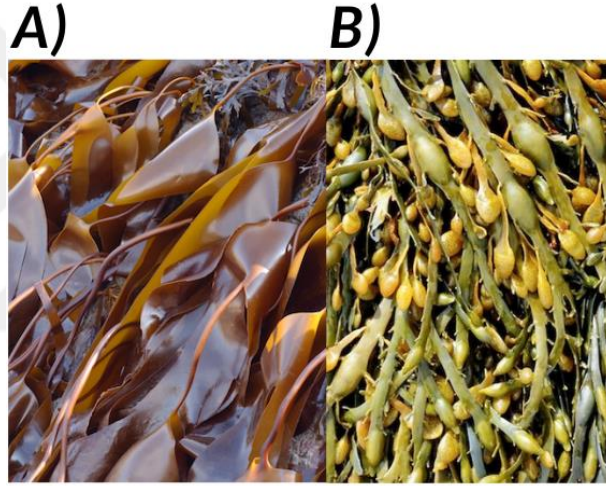
Biyopolimerler pek çok uygulamada hidrojel film formunda kullanılmaktadır. Hidrojel filmler; büyük miktarda suyu emme kabiliyetine sahip üç boyutlu polimer ağlardır. (Wang ve Rhim, 2015) Hidrojel film oluşturan farklı biyopolimerlerin sınıflandırılması Şekil 2.4’te gösterilmektedir. Protein ve polisakkarit bazlı filmlerin çoğu genellikle düşük ve orta bağıl nemde oksijene karşı uygun bariyer özellikleri göstermektedir. (Ghanbarzadeh ve Oromiehi, 2008)



Şekil 2.4. Film oluşturan farklı biyopolimerlerin sınıflandırılması

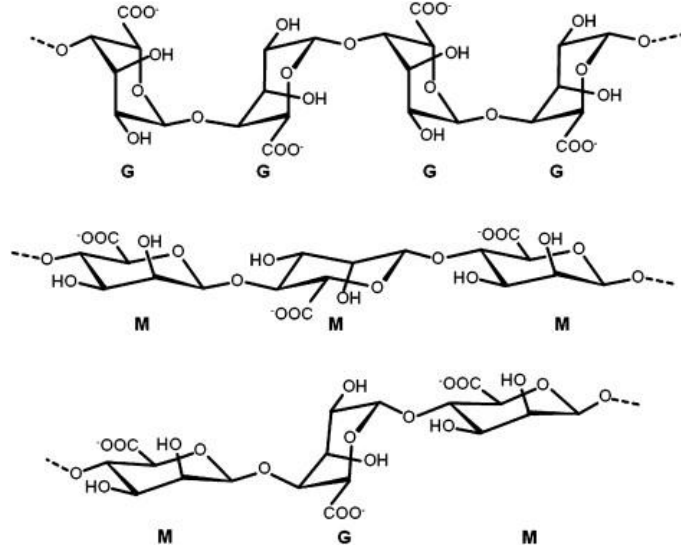
2.3. Aljinat

Aljinat, mannuronik asit ve guluronik asit olmak üzere iki çeşit yapı birimine sahip anyonik bir polisakkarittir. (Wroblewska-Krepsztul ve ark., 2019) Hem kahverengi deniz yosunu türlerinden (Phaeophyceae- *Laminaria digitata* ve *Ascophyllum nodosum*- Şekil 2.5) seyreltik alkali ile ekstrakte edilebilen hem de toprak bakterilerinde kapsüler polisakkarit olarak bulunan aljinat; bol bulunan, düşük maliyetli ve hidrofilik özellikte bir karbonhidrattır. (Rhim, 2004; Hecht ve Srebnik, 2016) Sulak alanlarda bulunan yosun bolluğundan dolayı, doğada çok miktarda aljinat materyali bulunmaktadır. Endüstriyel aljinat üretimi yılda yaklaşık 30.000 tondur.



Şekil 2.5. Kahverengi deniz yosunları A) *Laminaria digitata*, B) *Ascophyllum nodosum* (Seaweed, 2020)

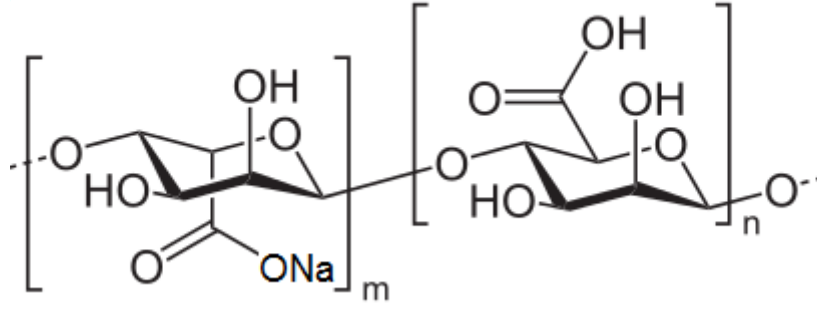
Aljinat moleküler olarak; (1→4) bağlı β -D-mannuronik asit ve α -L-guluronik asit birimleri ile değişen kompozisyon ve sıralı bir yapıya sahiptir. Aljinatın zincir yapısı ve blok dağılımı Şekil 2.6'da gösterilmiştir. Bloklar ardışık G birimlerinden (GGGGGG), ardışık M birimlerinden (MMMMM) ve karma olarak G/M birimlerinden oluşabilmektedir. (Lee ve Mooney, 2012)



Şekil 2.6. Aljinat polimerindeki G bloğu, M bloğu ve G/M bloklarının kimyasal yapıları (Lee ve Mooney, 2012)

Endüstriyel uygulamalarının temelinde; su tutma, jelleşme, koyulaştırma ve sağlamlaştırma gibi benzersiz kolloidal özellikleri bulunan aljinat, kolayca film oluşturma potansiyeline sahiptir. (Rhim, 2004; Maizura ve ark., 2007; Berberoglu, 2018) Aljinat monomer bileşimi ve dizisi, jel oluşumu için bir ön koşul olduğundan jellerin yapısal özelliklerini ciddi derecede etkileyebilmektedir. (Draget ve Taylor, 2011; Hecht ve Srebnik, 2016) Su yosununun farklı kısımları, yıl içindeki farklı hasat zamanları, mevsimsel değişiklikler aljinat yapı bloklarını değiştirebilmektedir. Farklı kaynaklardan izole edilen aljinatların, M/G içerikleri ve blok uzunlukları bakımından gösterdikleri farklılıklar ile günümüzde 200'den fazla farklı türü üretilmiş durumdadır. (Tønnesen ve Karlsen, 2002) Zincirde bulunan M/G oranı bir su yosunundan diğerine farklılık gösterebilmektedir. M/G oranının 1'den küçük olması durumu, güçlü bağlar oluşturma yeteneğine sahip çok miktarda guluronik asit bulunduğunu göstermektedir. Bu oranın 1'den büyük olması ise daha düşük guluronik asit ve buna bağlı olarak daha yumuşak ve elastik yapı oluşmasını sağlamaktadır. (Blanco-Pascual ve ark., 2014) Zincir stabilitesinin, özellikle MG bloğu <MM bloğu <GG bloğu şeklindeki bir aljinat bileşiminde arttığı bilinmektedir. (Smidsrød ve ark., 1973)

Aljinat, aljinik asidin kalsiyum, magnezyum ve sodyum tuzları olarak kahverengi su yosunlarının hücre duvarlarında bulunmaktadır. (McHugh, 2003) Kalsiyum ve magnezyum aljinatlar suda çözünmezken; sodyum aljinat suda kolayca çözünebilmektedir. Şekil 2.7'de sodyum aljinatın moleküler yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Sodyum aljinatın moleküler yapısı

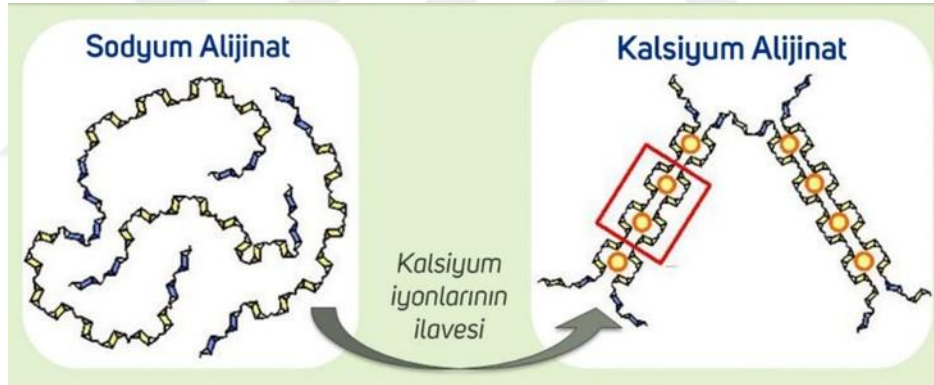
Kendi ağırlığının 200-300 katı su tutma yeteneğine sahip olan aljinat film yapısına biyoaktif bileşenler ilave edilerek kompozitler üretilmektedir ve bu kompozitlerin yara örtüsü, ilaç salım sistemleri, atık giderimi ve daha pek çok alanda kullanımı ile ilgili çalışmalar yürütülmektedir. (Gardner, 2004) Aljinat filmler hidrofilik matrisler olduğundan mekanik direncini, su bariyer özelliklerini, yapışkanlığını ve sertliğini geliştirebilmek adına farklı plastikleştiriciler ekleme ve/veya katyonlarla seçici olarak çapraz bağlama işlemleri yapılmaktadır.

Film kalitesini arttırmak ve esneklik sağlayabilmek adına doğal polimerlerle üretilen film yapılarına plastikleştiriciler ilave edilebilmektedir. Plastikleştiriciler polimer formlarına eklenen uçucu olmayan ve düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir. Bir plastikleştiricinin film içerisinde etkili olabilmesi için polimer ile molekül yapısı benzer olmalıdır. Aljinat gibi karbonhidratlar için en sık kullanılan plastikleştiriciler poliollerdir (özellikle sorbitol ve gliserol). Polioller, zincirler arasındaki hidrojen bağlarını azalttıkları için moleküler hacmi arttırmaktadırlar. Moleküler hacmin artması ile filmlerin esnekliği de artmaktadır. Aljinat filmlerinde sıklıkla kullanılan plastikleştiriciler arasında gliserol, en pratik ve etkili olanıdır. Kolay bulunur ve ucuzdur ancak suda son derece çözünürdür. Sudaki çözünürlüğü filmlerin nemli ortamlarda kullanımı sınırlandırabilmektedir. (Berberoğlu, 2018)

Aljinat filmlerine iki ve üç değerlikli iyonların (özellikle Ca^{2+}) ilavesiyle çözünmeyen yapılar oluşturulabilmektedir. (Rhim, 2004) İyonların aljinat çözeltisine geçişi, suda çözünür aljinatın karşı iyonları (örneğin; sodyum iyonunu) ile değişim sürecini sağlar. Bu iyonik çapraz bağlanma, aljinat zincirinin karboksil grupları ile katyonlar arasındaki etkileşimlerin bir sonucu olarak daha sert bir polimer yapısının oluşmasını sağlamaktadır. Magnezyum, manganez, alüminyum ve demir iyonlarından daha etkili ve sık kullanılan kalsiyum iyonları çapraz bağlayıcı olarak jelleştirmede

kullanılmaktadır. (Cha ve Chinnan, 2004; Kaygusuz ve ark., 2017) Liling ve ark. (2016) Ca^{2+} , Mn^{2+} ve Zn^{2+} ile çapraz bağlanan filmler arasında Ca^{2+} ile hazırlanmış filmlerin en ideal mekanik ve su buharı geçirgenliği özelliklerine sahip olduklarını göstermişlerdir.

Aljinat jelleşmesi; kalsiyum iyonları ve polimerin yapısındaki G blokları arasında gerçekleşmektedir. Kalsiyum iyonlarının seçici bağlanmasının; M ve MG bloklarına karşı düşük olduğu, artan G blokları içeriği ile belirgin bir şekilde arttığı birçok çalışmada gösterilmiştir. (Haug ve Smidsrød, 1970; Hecht ve Srebnik, 2016) Başka bir deyişle, G blok içeriği fazla olan aljinatlardan daha güçlü jeller elde edilebilmektedir. Bu sayede iyonlar, M ve G bloklarının arasına girerek “Yumurta kutusu (Egg box)” modeli denilen yapıyı oluşturmaktadır. (Grant ve ark., 1973) “Yumurta kutusu” modeli Şekil 2.8’de şematize edilmiştir. Çok değerlikli katyonlar aljinattaki sodyum ile yer değiştirerek uzun molekülü bir arada tutmaktadırlar. (Berberoğlu, 2018) Bu yapı sayesinde polimer matrisin kolay çözünmesi ve parçalanması engellenerek fiziksel ve mekanik özellikleri iyileştirilebilmektedir.



Şekil 2.8. İyonik çapraz bağlama ile hazırlanmış kalsiyum aljinat "yumurta kutusu" modeli

Aljinatın kalsiyum ile çapraz bağlanması iki yöntem ile gerçekleştirilebilmektedir. Birincisi; jellerin suyunun uzaklaştırılmasından sonra CaCl_2 solüsyonuna daldırıldığı dış çapraz bağlama (difüzyon) yöntemidir. İkincisi ise; Ingar Draget ve ark. (1990)’nın önerdiği şekilde, asitlendirilmiş bir ortamda çözünmeyen kalsiyum tuzundan iyonların yavaşça serbest bırakılması yoluyla oluşturulan iç çapraz bağlama (dahili) yöntemidir. İç çapraz bağlama yönteminde özellikle kalsiyum karbonat (CaCO_3), düşük çözünürlüğü ile jelleşme oranını yavaşlatarak aljinat jellerin aktiflik süresini uzatabilmektedir. Örneğin bir aljinat çözeltisi, suda çözünmeyen CaCO_3 ile karıştırılır ve sonrasında elde edilen aljinat/ CaCO_3 çözeltisine; pH’ı düşürerek Ca^{2+}

iyonunu CaCO_3 'ten ayıran glukono delta lakton (GDL) eklenir. Bu sayede açığa çıkan Ca^{2+} , jelleşme sürecini başlatmaktadır. (Crow ve Nelson, 2006) Dış çapraz bağlama yönteminde aljinat ve kalsiyum iyonları arasında hızlı çapraz bağlama gerçekleşirken iç çapraz bağlamada jelasyon yavaş olduğundan daha homojen bir yapı oluşturulabilmektedir. Bu iki yöntemin kombinasyonu halinde de aljinat filmler üretilmektedir. İki farklı çapraz bağlama yönteminin karşılaştırılmasını ilk kez doğrudan Crossingham ve ark. (2014) yapmıştır.

Son zamanlarda hidrojel film yapısına çapraz bağlama ajanları eklenerek geçirgenlik ve termo-mekanik özelliklerin geliştirilmesine yönelik çeşitli girişimlerde bulunulmuştur. Yang ve ark. (2016) aljinat ve silikon dioksiti birleştirmiştir. Plastikleştirici olarak gliserin ve çapraz bağlayıcı olarak da kalsiyum klorür kullanarak nanokompozit filmler üretmiş ve filmlerin fiziksel, mekanik ve optik özelliklerini incelemiştir. Hazırladıkları manyetik aljinat nano-kompozitlerde Kloster ve ark. (2017)'da plastikleştirici olarak gliserini kullanmışlar ve mekanik özelliklerini analiz etmişlerdir. Polimer-polimer kompozit çalışmalarında aljinat ve pektinden oluşan kompozitlerde (Silva ve ark., 2009) gliserin konsantrasyonunun %3'ten düşük olması durumunda filmlerin kırılgan olduğu gözlenmiştir.

2.3.1. Aljinatın uygulama alanları

Aljinatın doğal bir kaynak olarak mevcut potansiyeli dikkate alındığında birçok endüstri alanında ve uygulamalarda kullanılmaktadır. Üç ana özelliği bulunan aljinatın, kullanım alanları aşağıdaki özelliklerine dayanmaktadır; (McHugh, 2003)

- Sulu çözeltilerin viskozitesini artırır.
- Sıcaklık olmaksızın kalsiyum tuzu ilavesiyle jel oluşturabilir.
- Film oluşturur.

Doğrusal yapısına bağlı olarak, aljinat katı halde güçlü filmler ve yeterli lifli yapılar oluşturabildiğinden iyi bir film oluşturucu malzeme olarak kabul edilmektedir. (Blanco-Pascual ve ark., 2014) Biyomedikal, gıda ambalajlama, tekstil, tarım ve başka birçok uygulamalarda aljinat kullanımı oldukça yaygındır. Aljinatın birçok uygulamada farklı formlarda kullanıldığı bilinmektedir.

2.3.1.1. Biyomedikal uygulamalar

Aljinat uzun yıllardır insan sağlığını korumayı ve iyileştirmeyi hedef alan çeşitli uygulamalarda yoğun olarak kullanılan bir biyopolimerdir. Örneğin; ilaç salınımında yardımcı madde, yara örtüsü, diş ölçü malzemesi olarak kullanılmaktadır. Jel oluşturucu özelliği ile pek çok mide rahatsızlıklarında özellikle de Gaviscon gibi ticari olarak satılan reflü baskılayıcı ilaç formülasyonlarında kullanılmaktadır. (Lindow ve ark., 2003) Aljinat hidrojel, canlı dokuların hücre dışı matrislerine yapısal benzerliği sayesinde yara iyileşmesi, protein gibi biyoaktif ajanların iletimi ve hücre nakli gibi birçok uygulamada kullanılmaktadır. (Jejurikar ve ark., 2011)

Sodyum aljinat, yara iyileşme süreçlerinde aktif avantajları olduğundan yara örtüsü uygulamaları için önemli bir polimerdir. Literatürdeki çalışmalar aljinatın insan makrofajlarını aktive ettiğini ve yara iyileşme sırasındaki inflamasyona karşı pro-inflamatuvar sinyali ürettiğini göstermektedir. (Thomas ve ark., 2000) En önemlisi aljinat, yara ortamı için gerekli nem dengesini de oluşturarak yara örtüsü malzemelerinin hidrofilik karakterini güçlendirebilmektedir. Su tutma kapasitesi oldukça yüksek olan aljinatın fazla eksüda üreten yaralar için de yara örtüsü kompozisyonlarında kullanıldığı bilinmektedir. Kalsiyum aljinat liflerinden yara ortamına salınabilen Ca^{2+} iyonlarının keratinosit proliferasyonunda görev aldığı ve yara iyileşmesini desteklediği bilinmektedir. (Lansdown, 2002) Aljinat esaslı filmler, akut ve kronik yaraların tedavisinde yara örtüsü olarak kullanılmaktadır. (Boateng ve ark., 2008) Algicell™ (Derma Sciences), AlgiSite M™ (Smith & Nephew), Comfeel Plus™ (Coloplast), Kaltostat™ (ConvaTec), Sorbsan™ (UDL Laboratories) ve Tegagen™ (3M Healthcare) gibi pek çok marka olmak üzere çeşitli aljinat yara örtülerinin ticari olarak satışı mevcuttur.



Şekil 2.9. Ticari olarak satılan Comfeel Plus™ aljinat yara örtüsü ve kullanımı (Coloplast)

Aljinat küçük kimyasal ilaçlardan makromoleküler proteinlere kadar çeşitli ilaç moleküllerinin kontrollü salınımında kullanılmakta ve tedaviler gerçekleştirilebilmektedir. Lee ve Mooney (2012) yaptıkları çalışmada; 1.5 saatte flurbiprofen salımı yapan iyonik olarak çapraz bağlanmış aljinat jel tasarlamışlardır.

Aljinat bazlı hidrojeller, insan dokularının hücre dışı matrisine benzer birçok özelliğe sahiptir. (Reakasame ve Boccaccini, 2018) Bu sebeple aljinat filmlerin doku mühendisliği, doku ve organ nakil uygulamalarında kullanılması hedeflenmektedir. (Moohan ve ark., 2019) Doku mühendisliği yaklaşımıyla aljinat hidrojelleri taşıdığı hücreleri istenen bölgeye teslim etmek, yeni doku oluşumları için ortam sağlamak ve tasarlanan dokuların yapılarını ve fonksiyonelliğini kontrol etmek adına kullanılmaktadır. (Lee ve Mooney, 2001) Hidrojeller canlı hücreleri barındıracak kadar büyük gözenekler içerebilmektedir. (Hoffman, 2002)

2.3.1.2. Gıda ambalajlama uygulamaları

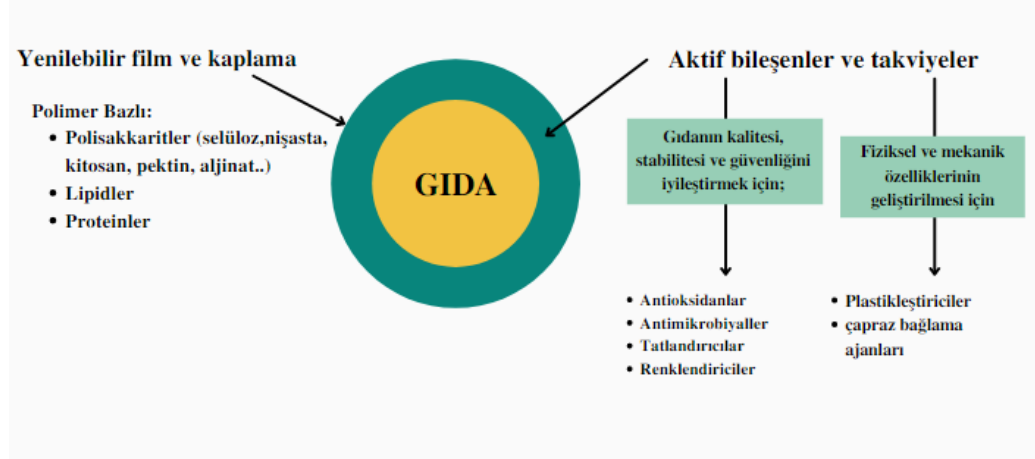
Ambalaj, gıda endüstrisinde kullanılan önemli bir etmendir. Gıdalardaki bozulma ve patojen mikroorganizmaların büyümesini önlemek için ısıtma işlemi, tuzlama ve asitleştirme gibi geleneksel koruma teknikleri gıda endüstrileri tarafından uzun süredir kullanılmaktadır. Ancak bu teknikler genellikle besin değerlerinde kabul edilemez kayıplara da neden olabilmektedir. (Del Nobile ve ark., 2012) Koruma teknikleri ile ilgili yeni stratejiler ile doğal polimer ve bileşenlerin kullanılarak çevresel etkinin minimize edildiği aktif paketleme uygulamaları üzerinde durulmaktadır. (Mir ve ark., 2018) Gıda ürünleri lipid oksidasyonuna karşı oldukça hassastır ve bu sadece gıdanın kalitesini etkilemekle kalmaz aynı zamanda zararlı bileşiklerin oluşumu ile tüketici güvenirliliğini de etkilemektedir. (Aloui ve ark., 2021) Gıda ambalajlamalarında aktif paketleme; ürünlerin kontaminasyonunun engellenerek gıda kaynaklı hastalıkların yayılmaması için önemli bir uygulamadır. (Appendini ve Hotchkiss, 2002) Aljinat esaslı aktif paketler; doğada parçalanmadan uzun süre kalan, petrol türevli plastik ambalajlar yerine kullanılmakta ve çabuk bozulan gıdaların mikrobiyolojik olarak güvenliğini arttırmaktadır. Yenilebilir ve biyolojik olarak parçalanabilir ambalajlar; ürünlerin depolanması sırasında ağırlık kaybını ve nem dengede tutarak gıdaların kalitesini arttırmaktadırlar. Aynı zamanda oksijen ve karbondioksit geçişine karşı bariyer oluşturabilmektedirler. Gıdaların korunması, dağıtımı ve pazarlanması üzerinde önemli etkileri olan aktif ambalajlamalarda aljinat; film ve kaplama formülasyonları ile

kullanılmaktadır. Yenilebilir film ve kaplamalarda aljinatın kullanım uygulamaları ve sonuçları Çizelge 2.1’de sunulmuştur. (Tavassoli-Kafrani ve ark., 2016) İdeal film ve kaplamalar gıda üzerinde ince bir tabaka oluşturmakta ve su, buhar, nem veya sıcaklığa karşı seçici geçirgenlik oluşturmaktadır. (Chlebowska-Smigiel A. ve ark., 2008)

Çizelge 2.1. Çeşitli aljinat film ve kaplamaların gıdalar üzerindeki uygulamaları

Ürün	Sonuç	Referans
Taze kesilmiş ananas	Raf ömrünü uzatma	(Azarakhsh ve ark., 2014)
Mikrodalgada pişirilebilecek yiyecek	Isınma verimliliğini arttırma	(Albert ve ark., 2012)
Brokoli	Patojenlerin büyümesi engelleme	(Takala ve ark., 2013)
Dondurulmuş çipura	Daha az kimyasal ve bakteriyel bozunma	(Song ve ark., 2011)
Shiitake mantarı	Bozulma azaltma	(Jiang ve ark., 2013)
Taze kesilmiş karpuz	Raf ömrünün uzatılması, maya ve küflerin büyüme inhibesi	(Sipahi ve ark., 2013)

Yenilebilir film ve kaplamalar özellikle antimikrobiyaller, antioksidanlar, renklendiriciler, tatlandırıcılar ve baharatlar gibi gıda katkı maddelerinin taşıyıcıları olabilmektedir. (Şekil 2.10) Literatürde antimikrobiyal bileşikler içeren aktif paketlemenin gıda kaynaklı mikroorganizmaların büyümesini azaltabileceği veya geciktirebileceği gösterilmiştir. (Cha ve Chinnan, 2004) Bu yenilikçi gıda paketlenme çalışmalar gıda güvenliğinin sağlanması nedeniyle son yıllarda büyük bir ilgi görmüştür. (Mir ve ark., 2018) Ananas, muz, mango, armut, brokoli gibi yenilebilir kaplamaların taze kesilmiş meyveler üzerindeki etkilerini belirlemek için mevcut çalışmalar bulunmaktadır. Azarakhsh ve ark. (2014) taze kesilmiş ananasın aljinat bazlı yenilebilir kaplamasına limon otu yağının eklenmesinin etkilerini incelemiştir. Sonuçlar, antimikrobiyal limon otu yağının eklenmesinin hem ananasın raf ömrünün uzamasına hem de kalite korunması potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Başka bir çalışmada Takala ve ark. (2013) +4°C’de saklanan taze brokoli üzerinde *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium*’un büyümelerini engellemek adına aljinat film formülasyonuna çeşitli esansiyel yağ ve bitki özütleri dahil etmişlerdir. Ürettikleri biyoaktif filmler ile kısa süreli depolamada mikroorganizma büyümeleri kontrol altına almışlardır.



Şekil 2.10. Yenilebilir film ve kaplamaların kompozisyonları (Valdés ve ark., 2017)

2.3.1.3. Tekstil uygulamaları

Aljinatlar, kumaş boyama işlemlerinde kıvam arttırıcı ve koyulaştırma amaçlı kullanılabilir. Kumaşın yapısında bulunan selüloz ile birleşerek reaktif boyalarla etkileşime girmemektedir. Bu sayede kumaş renk kalitesindeki azalmaların da önüne geçilmiş olmaktadır. (McHugh, 2003)

2.3.1.4. Tarım uygulamaları

Toksik olmayan ve doğada kolay bozunabilen aljinat polimeri tarım uygulamalarında mahsullerin yabancı otlardan korunması, zararlı ot mücadelesi, çevre şartlarının stabilizasyonu gibi durumlarda kullanılabilir. Özellikle yabancı otların gelişimine engel olmak amacıyla toprağın üzerinin örtüldüğü malçlama uygulamalarında yeni dönemde plastik malzemelerin kullanımı yerine biyopolimer malzemelerin kullanımı dikkat çekicidir. Aljinat, bozunmasından sonra ortaya çıkan yosun oligosakkaritlerin bir kısmı bazı bitkiler tarafından emilerek büyümeyi teşvik edici avantajlar sağlamaktadır. (Liling ve ark., 2016)

2.3.1.5. Diğer uygulamalar

Aljinat biyopolimeri kozmetik sektöründe nemlendirici malzeme ve mutfak sanatlarında jöle benzeri malzeme olarak da kullanılabilir. (Al-Remawi, 2012)

2.4. Hidrojel Filmlere Takviyeler

Hidrojel filmlerin üretiminde polisakkaritler, proteinler, lipitler ve polyesterler veya bu malzemelerin kombinasyonlarıyla oluşan kompozitler kullanılmaktadır. Aljinat; bol bulunurluğu, sürdürülebilirliği, biyobozunurluğu, biyouyumluluğu, düşük immünojenitesi sebebiyle medikal, farmasötik, gıda ambalajı endüstrilerinde artan potansiyelleri ile hidrojel film formlarında kullanılmaktadır. (Hoffman, 2002; Farris ve ark., 2009; Norajit ve ark., 2010; Rhim ve Wang, 2013) Farklı katkı maddeleriyle birleştirilen hidrojel filmler ile istenen özelliklere sahip yeni bir ürünün oluşturulmasını sağlanabilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda kimyasal modifikasyonlar, plastikleştirici ilaveleri, farklı biyopolimerlerle kompozit oluşturmalar, talebe yönelik spesifik takviye maddeleri eklemeleri gibi çeşitli stratejiler geliştirilmektedir. (Garavand ve ark., 2017) Genel olarak filmlerin fizikokimyasal özelliklerini iyileştirmek veya değiştirmek için nano boyutlu kil, metal veya metalik oksitler gibi nanolifler, polimer-polimer kombinasyonları, antioksidan/antibakteriyel özellik kazandıran malzemelerin kullanımına yönelik parametreler denenmektedir. (Myung ve ark., 2008)

2.4.1. Antimikrobiyal Ajanlar

Aljinat hidrojeller, istenmeyen mikroorganizmaların büyümesine engel olabilmek adına çeşitli uygulamalarda kullanıldıklarında önemli derecede doğal antimikrobiyal etkiye sahip değildir. Bu nedenle aljinat film uygulamalarında çeşitli antimikrobiyal ajanlar kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan bazı sentetik antimikrobiyal ajanlar; sodyum benzoat, sorbik asit, sülfidler, nitritler, klor dioksit, karbondioksit, organik asitler, antibiyotikler ve bakteriyosinlerdir. Farmasötik, medikal ve gıda ambalajı endüstrilerinde bu ajanların kullanımı, olası sağlık riskleri ve uzun vadeli toksisite oluşturmaları sebebiyle sınırlandırılmıştır. Günümüzde daha çok doğal tıbbi bileşiklerin kullanımına yönelik araştırmalar yapılmaktadır. Bitkilerden ve bitkilerin yenilebilir kısımlarından elde edilen doğal özler, flavonoidler, fenolik asitler, tanenler gibi yüksek fenolik bileşik içerikleriyle antimikrobiyal ve antioksidan bileşik kaynakları araştırılmaktadır. (Aloui ve ark., 2021) Gümüş iyonları ve nanopartiküller (Babu ve ark., 2010; Marie Arockianathan ve ark., 2012), uçucu yağlar (Pranoto ve ark., 2005; Benavides ve ark., 2012; Liakos ve ark., 2014) aljinat film kompozitlerini

antimikrobiyal hale getirmek için uzun zamanlardan beri kullanılmaktadır. Sitotoksik etki oluşturmamaları ve biyoyumlu olmaları sayesinde birçok uygulamadaki film formülasyonlarına dahil edilen bitkisel bileşenler popüler hale gelmektedir. Örneğin; Liakos ve ark. (2014) sodyum aljinat matrislerinde dağılmış doğal uçucu yağlardan yapılmış antimikrobiyal ve antifungal özelliklere sahip kompozit filmler üretmişlerdir.

Sayısız antimikrobiyal ajanın bulunmasına rağmen, bitki özütlerinden elde edilen doğal ajanlar; antibakteriyel, antifungal ve antioksidan özellikler ile pek çok alanda kullanılmaktadır. (Nouri ve Mohammadi Nafchi, 2014) Daha önce pek çok çalışma bitki özütlerinin doğrudan gıda ürünlerine dahil edildiğinde mikrobiyal kontaminasyonu önlediğini göstermiştir. (Tajik ve ark., 2015; Besbes ve ark., 2016) Fakat bu bileşenlerin gıdanın içinde hızlı difüzyonu ve diğer bileşenlerle olası etkileşimleri koruyucu etkilerini de azaltabilmektedir. Bu açıdan doğal bitki özütlerinin biyo bazlı polimerik matrislere eklenmesi difüzyonun kontrol edilebilmesini sağlayabilmektedir. (Valdés ve ark., 2017)

2.4.1.1. Bitki özütleri

Bitki özlü biyolojik olarak parçalanabilen filmlerin in vitro antimikrobiyal ve antioksidan aktivite çalışmalarından elde edilen olumlu sonuçlar, yeni antimikrobiyal madde geliştirme çalışmaları için bitkilerin zengin birer araştırma kaynağı olarak görülmelerini sağlamıştır.

Tıbbi bitkiler içeriklerinde bulunan fitokimyasallar ile kimyasal yapılarının zengin olması ve doğal kökenli olmaları sayesinde sitotoksik ve mutajenik potansiyel oluşturmamaktadırlar. (Hacıoğlu, 2005; Mir ve ark., 2018) Rios ve Recio (2005) PubMed’de yapmış oldukları bir taramada 1966-1994 yılları arasında tıbbi bitkilerin antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili 115 makalenin yayınlandığını, 1995-2004 yılları arasında ise bu sayının 307’ye çıktığını belirtmişlerdir. Bu rakamlar bilim camiasının gün geçtikçe bitkilerin tıbbi özelliklerine karşı daha fazla ilgi gösterdiğini ispatlamaktadır.

Dou ve ark. (2018) jelatin-sodyum aljinat polimer karışımına çay polifenollerinin eklenmesinin, geliştirilmiş mekanik ve sınırlayıcı bariyer özelliklerinin yanısıra ideal antioksidan kapasitesi ile sonuçlandığını göstermişlerdir.

Aromatik veya tıbbi bitkilerin çeşitli yöntemlerle elde edilen özütlerinin antimikrobiyal etkilere sahip oldukları bilinmektedir. (Okeke ve ark., 2001; Rios ve

Recio, 2005; Canales ve ark., 2007) Bitki özütlerinden bazıları kateşin, epikateşin, karvakrol ve timol gibi yüksek fenolik bileşik ile aktif antimikrobiyal özelliklere sahiptir. (Li ve ark., 2012; Peng ve ark., 2013) Literatürde yapılan pek çok çalışmada hidrojel filmlere bu aktif özelliğin kazandırılması amacıyla bitki özütlerinin kullanımına rastlanmıştır. Polimer bazlı film formülasyonlarına bitki özütlerinin dahil edilmesi daha öncelerden Durango ve ark. (2006) tarafından gösterilmiştir. Jagannath ve ark. (2006) *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *L. monocytogenes*, *Pseudomonas spp.*, ve *Salmonella typhimurium* mikroorganizmalarını inhibe etme yeteneği sergileyen *Melia azadirachta* özütü ile yapılmış kazein-nişasta filmlerini test etmişlerdir. Diğer bir yandan Wang ve ark. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada ise *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi mikroorganizmaların büyümesini inhibe edebilmek adına poli (ϵ -kaprolakton)- kitosan filmlerine üzüm çekirdeği ekstresi eklenmiştir. Başka bir çalışmada Uthaya Kumar ve ark. (2019) deniz yosunu bazlı filmlere neem tohum özütü dahil edildiğinde Gram-pozitif bakterilere karşı yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip ürünler elde edilmiştir.

Bitki özütlerin film formülasyonlarına eklenmesi; özellikle gıda ambalajlama endüstrisinde gıda kalitesinin bozulmasının engellenmesine ve raf ömrünün uzatılmasına katkıda bulunmaktadır. Buna bir örnek olarak; Siripatrawan ve Noipha (2012) kitosan bazlı aktif filmlere yeşil çay özütü ilave ederek sosislerin depolama süreleri boyunca mantar, maya ve laktik-asit bakterilerine karşı korunmalarını sağlamışlardır.

Biyolojik olarak parçalanabilen filmlerine bitki özütlerinin eklenmesi farklı türde modifikasyonlara sebep olabilmektedir. Yapılan çalışmalarda bunun sebebinin bitki özütlerinde elde edilen bileşenlerin olduğu bildirilmiştir. (Norajit ve ark., 2010; Peng ve ark., 2013; Tan ve ark., 2015) Bitki özütünün fenolik bileşiklerinin hidrojen bağları ile polisakkarit/protein molekülleri arasında oluşan bağ sebebiyle polimer içindeki moleküller arası etkileşimler artmaktadır. (Wang ve ark., 2012) Farklı bitki özütleri film formülasyonlarının; kalınlık, su buharı geçirgenliği, mekanik özellikler, şişme ve çözünürlük gibi özelliklere etkileri Çizelge 2.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Farklı Bitki özütlerinin biyopolimer bazlı filmlere etkileri

Bitki Özütü	Polimer	Su Buharı Geçirgenliği	Kalınlık (mm)	Gerilme Mukavemeti (MPa)	Kopmada Uzama (%)	Referans
<i>Hibiscus</i>	Niştasta	1.26 – 2.93 a	0.18 - 0.27	0.75 – 1.63	38.79- 81.51	(Cruz-Gálvez ve ark., 2018)
<i>Hibiscus</i>	Niştasta	2.63 – 6.52 a	0.09-0.212	~ 2 - 5	~ 40 - 80	(Gómez-Al dapa ve ark., 2020)
Ginseng	Aljinat	1.72–2.28 b	0.07-0.132	8.05–22.20	19.32–27.95	(Norajit ve ark., 2010)
Mersin Meyvesi	Aljinat	5.8 – 15.5 c	-	38 – 131	1.3 – 6.3	(Cheikh ve ark., 2020)
Yeşil Çay	Kitosan	0.0871-0.2562 d	-	23.66–28.35	54.62–60.73	(Siripatrawan ve Noipha, 2012)
Üzüm Çekirdeği	Kitosan	-	0.27–0.55	8.84–54.9	4.72–96.8	(Tan ve ark., 2015)
Kekik	Kitosan	11.3-11.6 e	-	11- 13	39–70	(Talón ve ark., 2017)
Kekik	Niştasta	6.9- 8.3 e	-	7.3-9.8	29- 30	(Talón ve ark., 2017)
Meşe Palamudu	Aljinat	~ 2.5 – 4 f	-	12 – 26	12 – 25	(Aloui ve ark., 2021)
Çay Polifenolleri	Jelatin / Sodyum Aljinat	0.138 – 0.228 e	-	39.14 – 72.05	12.93 – 17.31	(Dou ve ark., 2018)
Goji Berry Özütü	Niştasta	2.13 – 3.53 g	0.077 – 0.095	26.32 – 12.42	7.39 – 12.36	(Kim ve ark., 2020)

a: ($\times 10^{-10}$ g/msPa) **b:** ($\times 10^{-7}$ gm/m²dayPa), **c:** (g μ m / day cm² Pa) **d:** (g mm /m²d kPa), **e:** [gmm/(hm²kPa)] **f:** (g. mm/m².KPa.day) **g:** ($\times 10^{-9}$ g/msPa)

2.4.1.1.1. *Hibiscus sabdariffa* bitkisi

Malvacea (Ebegümeciler) ailesine ait bitkilerden doğal olarak elde edilen özütler birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Bu ailenin önemli bir cinsi de tropikal ve subtropikal bölgelere dağılmış ve yaklaşık 300 kadar türe sahip olan *Hibiscus*'tur. (Şen, 2011) *Hibiscus* (*Hibiscus sabdariffa* Linne), jamaika veya roselle olarak da bilinen, Orta ve Güney Amerika, Güneydoğu Asya da dahil olmak üzere birçok alanda yetişmesine rağmen, tropikal Afrika'ya özgü tek yıllık bir bitkidir. (Vargas-León ve ark., 2018) Genellikle içeceklerde, reçel ve jöle yapımlarında kıvamlaştırıcı olarak kullanılmakta olup Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından doğal tatlandırıcı olarak kabul edilmiştir. (21 CFR 172.510) (Tsai ve ark., 2002; Higginbotham ve ark., 2014) *H. Sabdariffa* çiçekleri antosiyanin kaynağı olmasından kaynaklı kırmızı renktedir. (Mohamed ve ark., 2007) Besinsel olarak askorbik asit yani C vitamini içermektedir. (Ali ve ark., 2005)

Dünya çapında birçok farklı isimle – ebegümeci çayı, zobo, roselle çayı, kırmızı kuzukulağı çayı, ekşi çay olarak – bilinen popüler olarak tüketilen çayları mevcuttur. (Ali ve ark., 2005; McKay ve ark., 2010) Halk arasında hipertansiyon, apseler ve kalp hastalıklarında kullanılan ilaç niteliğindedir. (Tepsorn, 2009) Yapılan çalışmalarda konsantre *H. Sabdariffa* çaylarının hipertansiyonlu ve tip 2 diyabetli hastalarda kan basıncını düşürdüğü bildirilmiştir. (Herrera-Arellano ve ark., 2004)



Şekil 2.11. *Hibiscus sabdariffa* L. bitkisi (Tropicals, 2020)

Hibiscus cinsinin türleri çeşitli iklimlerde yetişmesine bağlı olarak farklı biyoaktif özellikler sergileyebilmektedir. Yapılan farmakolojik araştırmalar ile bazı türlerinin faydalı biyolojik aktiviteleri tespit edilmiştir. (Holser ve ark., 2004) Maganha ve ark. (2010) tarafından derlenen bir makalede; *Hibiscus* bitkisinde basınç düşürücü, antidiyaretik, antikanser, antidiyabetik, antioksidan ve antibakteriyel özellik sağlayan

pek çok metabolit tanımlanmıştır. İçerdiği çeşitli fitokimyasallar sayesinde hem serbest formda hem de şekerlerle bağlantılı fenolik bileşikler ile biyolojik aktiviteleri kullanılabilir. (Vargas-León ve ark., 2018) Çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan *Hibiscus* bitkisinin kronik hastalıkların önlenmesinde rol alabilecek biyoaktif bileşenlere sahip olduğu yapılan araştırmalarla bildirilmiştir. (Maganha ve ark., 2010; McKay ve ark., 2010)

Alian ve ark. (1983) tarafından yayınlanan çalışmada *Hibiscus sabdariffa* bitki içerikli içeceklerin özellikle *Escherichia coli*, *Salmonella typhosa* ve *Klebsiella pneumoniae*'ye karşı bakterisidal etkisini göstermişlerdir. Borrás-Linares ve ark. (2015)'nin da yapmış olduğu çalışmalarda *Hibiscus sabdariffa* bitkisinin antimikrobiyal özelliklerini değerlendirmişlerdir. *Hibiscus* bitki özütleri gram-negatif (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*) ve gram-pozitif (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*) bakterilere karşı test edilmiş ve etanol ekstraktlarının test edilen tüm bakteri suşlarına karşı etkili olduğu, gram-pozitif bakterilere karşı daha büyük bir etki gösterdiği belirtilmiştir. Olaleye (2007) metanol ile elde edilen özütlerin 0.30 ± 0.2 mg/ml den 1.30 ± 0.2 mg/ml 'e kadar konsantrasyonlarda *S. aureus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Clostridium sporogenes*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, ve *Pseudomonas sp.* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

Gıda endüstrisinde plastik ambalajların yerine doğal polimerlerin kullanıldığı pek çok uygulamalar bulunmaktadır. Aktif ambalajlamalarda özellikle gıda ürünlerinin bakteriyel korumalarının sağlanması için polimer solüsyonlarına *Hibiscus sabdariffa* bitki özütlerinin ilave edilmesiyle kompozitler oluşturulmaktadır. Cruz-Gálvez ve ark. (2018) elde ettikleri *Hibiscus* özütlerini patates nişastasından ürettikleri filmlere dahil ederek sosisler üzerinde mikrobiyal etkilerini gözlemlemişlerdir. Nişasta ile bir başka örnek olarak; Gómez-Aldapa ve ark. (2020) yapmış oldukları çalışmalarında *Hibiscus sabdariffa* bitki özütü ile mısır nişastası filmleri hazırlayarak *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı pozitif sonuçlar veren antimikrobiyal bir etki tespit etmişlerdir.

Biyopolimerlerle oluşturulan filmlere *Hibiscus* bitki özütlerinin eklenmesi sadece antimikrobiyal olarak aktivite göstermekle kalmaz, aynı zamanda film dayanıklılığını ve genel uygulamalarını iyileştirmektedir. (Mir ve ark., 2018)

Literatürdeki çalışılan pek çok farklı polimer kompozisyonlarına bakıldığında aljinat ve *Hibiscus* bitki özütü ikilisine rastlanmamıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

Deneylerde kullanılan sodyum aljinat ve kalsiyum karbonat (CaCO_3) Katkı Dünyası'ndan, gliserol (%99.5) Sigma-Aldrich'den, glukono delta lakton (GDL) Smart Kimya Tic. ve Dan. Ltd. Şti'den, kurutulmuş *Hibiscus sabdariffa* bitkisi çiçekleri Bağdat Baharatları Gıda San. ve Tic. Ltd. Şti'den temin edilmiştir. Film solüsyonlarının hazırlanmasında distile su kullanılmıştır.

Antibakteriyel testler için *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) ve *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) kullanılmıştır. Nutrient Broth Merck'ten ve bakteriyolojik agar HIMEDIA'dan temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitki özütlerinin hazırlanması

Hibiscus sabdariffa bitkisinin kurutulmuş çiçekleri (Şekil 3.1) blender yardımıyla ilk olarak ince bir toz haline getirilmiştir. Bitkinin özütü 1:10 (g/ml) oranında kurutulmuş çiçeklerin distile suya ilave edilmesi ve 10 dakika kaynatılmasıyla elde edilmiştir. Daha sonra sulu çözelti oda sıcaklığında dinlenmeye bırakılmıştır. Soğuması beklendikten sonra katı faz filtre kağıdından süzülerek ayrılmış ve nihai özüt elde edilmiştir. Hazırlanan özütler başka bir işlem olmaksızın taze olarak film solüsyonlarında kullanılmıştır.

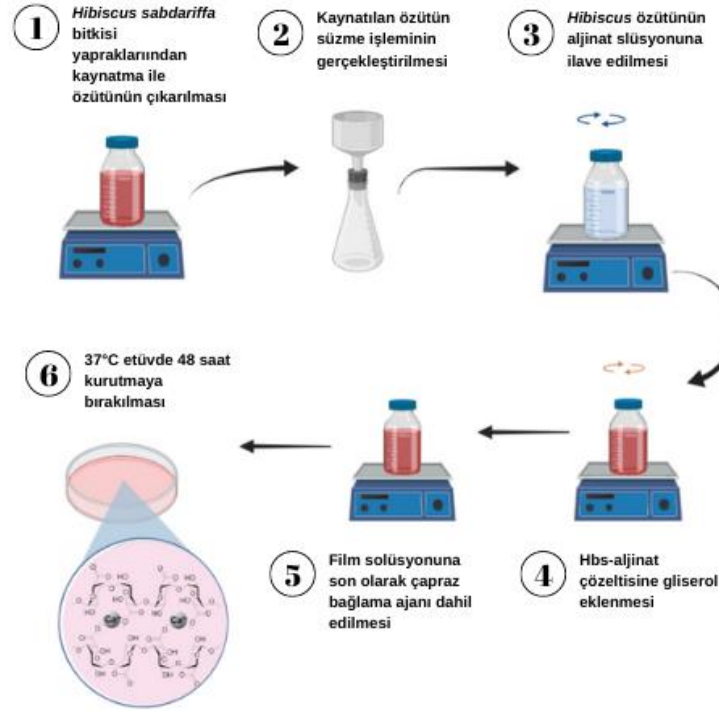


Şekil 3.1. *Hibiscus sabdariffa* bitkisinin kurutulmuş çiçekleri (Tropicals, 2020)

On dakikalık kaynatma süresi; *Hibiscus* bitkisinin antibakteriyel aktifliğini sağlayan yüksek polifenol ve antosiyanin içeriği için Sindi ve ark. (2014) tarafından elde edilen bulgulara göre en uygun zaman olarak belirtilmiştir.

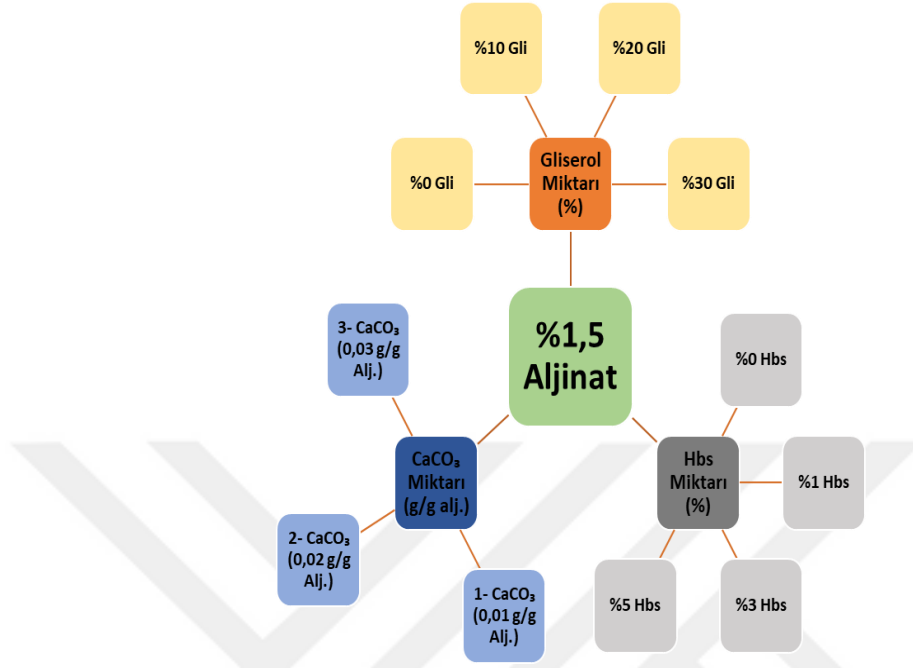
3.2.2. Filmlerin üretimi

Aljinat esaslı biyolojik olarak parçalanabilen filmler, jel dökme metoduyla Şekil 3.2’de şematize edildiği şekilde hazırlanmıştır. %1.5 (w/w) sodyum aljinat distile suda homojen bir çözelti elde edilene kadar 70°C sıcaklıkta kuvvetli bir şekilde karıştırılmıştır. Ardından aljinat çözeltisine %0, 10, 20, 30 (w/w aljinat) gliserol eklenerek 30 dakika karıştırmaya devam edilmiştir. Antibakteriyel ajan olarak belirlenen *Hibiscus* özütleri farklı oranlarda (%1,3,5 v/v) film solüsyonuna dahil edilerek tamamen çözeltiye karışması sağlanmıştır. Son olarak iç çapraz bağlama yöntemine bağlı olarak CaCO_3 (0.01, 0.02, 0.03 g/g aljinat) ve GDL (5.4 g/g kalsiyum karbonat) çözeltisi film solüsyonuna dahil edilmiştir.



Şekil 3.2. Aljinat filmlerinin hazırlanma aşamaları (BioRender.com ile hazırlanmıştır.)

Farklı oranlarda gliserol, CaCO_3 ve Hbs özütü ilave edilerek hazırlanan filmlerin bileşimleri Şekil 3.3'te gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Film üretimi için kullanılan malzeme oranları

Şekil 3.3'te gösterilen bileşimlerde hazırlanan film örneklerinin şişme, çözünürlük, su içeriği ve antibakteriyel özellikleri test edilen veriler doğrultusunda belli bir CaCO_3 oranı belirlenmiş ve film üretimlerinde bu oran sabit tutulmuştur. Çizelge 3.1'de gösterilen kompozisyonlarda filmler hazırlanarak farklı setler halinde analizleri yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Farklı Hbs özütü ve gliserol oranlarında hazırlanan film kompozisyonlarına verilen isimlendirmeler

Örnek İsimleri	Film kompozisyonu ¹
0 Hbs	CaCO ₃ (0.02 g/g alj.) +%20 Gliserol
1 Hbs	CaCO ₃ (0.02 g/g alj.) +%20 Gliserol +%1 Hbs
3 Hbs	CaCO ₃ (0.02 g/g alj.) +%20 Gliserol +%3 Hbs
5 Hbs	CaCO ₃ (0.02 g/g alj.) +%20 Gliserol +%5 Hbs
3 Hbs + 0 Gli	CaCO ₃ (0.02 g/g alj.) +%3 Hbs
3 Hbs + 10 Gli	CaCO ₃ (0.02 g/g alj.) +%10 Gliserol +%3 Hbs
3 Hbs + 20 Gli	CaCO ₃ (0.02 g/g alj.) +%20 Gliserol +%3 Hbs
3 Hbs + 30 Gli	CaCO ₃ (0.02 g/g alj.) +%30 Gliserol +%3 Hbs
5 Hbs + 0 Gli	CaCO ₃ (0.02 g/g alj.) +%5 Hbs
5 Hbs + 10 Gli	CaCO ₃ (0.02 g/g alj.) +%10 Gliserol +%5 Hbs
5 Hbs + 20 Gli	CaCO ₃ (0.02 g/g alj.) +%20 Gliserol +%5 Hbs
5 Hbs + 30 Gli	CaCO ₃ (0.02 g/g alj.) +%30 Gliserol +%5 Hbs

¹ Filmler %1.5 aljinat kullanılarak hazırlanmıştır.

Hazırlanan çözeltiler, 9 cm çapındaki plastik petri kaplarına 20'şer ml dökülmüş ve oda sıcaklığında 48 saat boyunca tutularak film içerisindeki suyun uzaklaştırılması sağlanmıştır.

3.2.3. Film kalınlıkları

Üretilen filmlerin kalınlıkları bir dijital mikrometre (Mitutoyo, MDC-25SX, Japonya) kullanılarak oda sıcaklığında ölçülmüştür. Rastgele seçilen 5 farklı bölgenin film kalınlıkları ölçülmüş ve ortalama kalınlık değerleri (mm) belirlenmiştir. Su buharı geçirgenliği ve mekanik test hesaplamalarında kullanılan kalınlık değerleri de bu şekilde ölçülmüştür.

3.2.4. Şişme- çözünürlük- su içeriği testleri

Filmlerin şişme, çözünürlük ve su içeriği değerleri Jamroz ve ark. (2018)'nin belirttiği şekilde belirlenmiştir. Film numunelerinden 1.5 cm çapında çıkarılan disklerin başlangıç ağırlıkları tartılmış (W_1) ve daha sonra 24 saat 70°C etüvde kurutulmuşlardır. 1 gün sonunda etüvden çıkartılan numunelerin ağırlıkları tartılarak (W_2) tamamen batacak şekilde su dolu kaplara şişmelerinin hesaplanması için koyulmuştur. Filmlerin distile su içerisinde tamamen batmasına dikkat edilmiştir. 24 saat sonunda su

içerisinden çıkartılan numuneler tartılmış (W_3) ve tekrar çözünme hesaplamaları için 70°C etüve bırakılmıştır. 1 günün sonunda etüvden çıkartılan numunelerin ağırlıkları tartılmıştır (W_4). Her bir numune için ölçümler en az 3 kez tekrar edilmiş ve ortalama değerleri hesaplanmıştır. Su içerikleri, şişme ve çözünürlük değerleri (%) aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

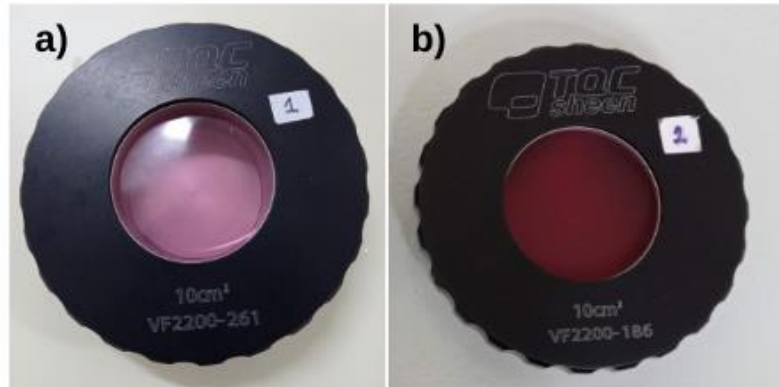
$$\% \text{ Su içeriği} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100 \quad (3.1)$$

$$\% \text{ Şişme} = \frac{W_3 - W_2}{W_2} \times 100 \quad (3.2)$$

$$\% \text{ Çözünürlük} = \frac{W_2 - W_4}{W_2} \times 100 \quad (3.3)$$

3.2.5. Su buharı geçirgenlik (WVP) testleri

Su buharı geçirgenliği deneyleri Berberoglu (2018) ile Peng ve Li (2014) tarafından kullanılan yöntemlerde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Film örnekleri geçirgenlik kaplarına (Şekil 3.4) yerleştirildikten sonra $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık ve $\%75 \pm 1$ bağıl neme (doymuş NaCl çözeltisi kullanılarak ayarlanmıştır) sahip bir desikatöre konmuştur. Bu koşullar, su buharının filminden geçişi için basınç farkı oluşturarak deney süresi boyunca kaplarda ağırlık kaybına yol açacaktır.



Şekil 3.4. Su buharı geçirgenliği analizinde kullanılan geçirgenlik kapları. a) %1 Hbs özütü katkılı aljinat filmin ve b) %5 Hbs özütü katkılı aljinat filmin yerleştirildiği kap

Geçirgenlik kaplarının ağırlıkları; 8 saat boyunca her iki saatte bir ve son olarak 24. saatin sonunda ölçülmüştür. Lineer regresyon yöntemiyle ağırlık kaybına karşı zaman eğrisinin eğimi bulunmuş ve film alanına bölünerek su buharı geçirgenliği oranı (WVTR) hesaplanmıştır. Her formülasyondan 3 dairesel örnek (10 cm²) çıkarılmış ve deney 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. WVTR'nin hesaplanması ile WVP değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır. Testler 3 tekrarlı yapılmıştır ve ortalama-standart hatalar hesaplanmıştır.

$$WVP = \frac{WVTR \times L}{\Delta P} \quad (3.4)$$

WVP: Su buharı geçirgenliği (g/msPa)

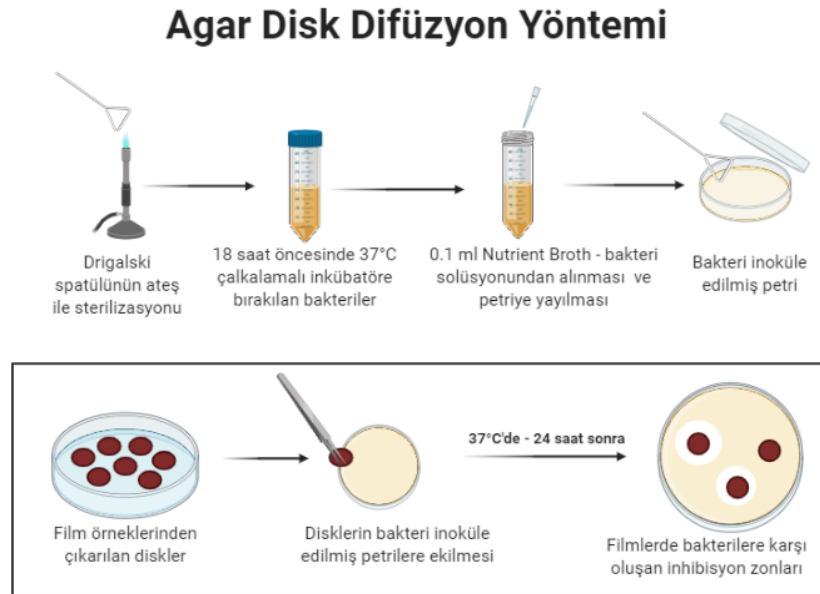
WVTR: Su buharı geçirgenliği oranı (g/m² s)

L: Ortalama film kalınlığı (m)

ΔP : Filmin her iki yüzü arasındaki kısmi su buharı basıncı farkı (7.922 x 10³ Pa)

3.2.6. Antibakteriyel aktivite testi

Farklı oranlarda Hbs özütü, gliserol ve CaCO₃ ilave edilen aljinat filmlerin antibakteriyel aktiviteleri, agar disk-difüzyon yöntemine göre belirlenmiştir. (Şekil 3.5)



Şekil 3.5. Antibakteriyel aktivite testinin temel aşamalarını gösteren şema (BioRender.com ile hazırlanmıştır.)

Antibakteriyel aktivite, iki Gram negatif (*Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*) bakteri ve iki Gram pozitif (*Staphylococcus aureus* ve *Bacillus subtilis*) bakteriye karşı değerlendirilmiştir. Testler için; her bir bakteri süsünün 100 µL kültürü (1×10^6 kob /mL) homojen olarak Nutrient Agar içeren plakların yüzeyine yayılmıştır. Sentezlenen filmlerden 0.9 cm çapında diskler çıkarılarak UV ışığı altında 10 dakika sterilize edilmiştir. Steril diskler bakteri inokülasyonu yapılmış agar plaklarının üzerine yerleştirilmiştir. 37°C’de 24 saat inkübasyon sonrasında disklerin etrafında oluşan zon çapları ölçülmüştür.

3.2.7. Fourier Transform Infrared Spektrometre (FTIR) analizi

Film örneklerinin FT-IR spektrumları 4 cm^{-1} çözünürlüklü 4000- 400 cm^{-1} aralığında Thermo Scientific Nicolet i550 model spektrometre cihazı ile oda sıcaklığında ölçülmüştür. Elde edilen FT-IR spektrumları üretilen filmlerdeki fonksiyonel grupların olası etkileşimlerini belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

3.2.8. Mekanik testler

Filmlerin gerilme mukavemeti (TS) ve kopmada uzama yüzdesi (%E) Shimadzu AGS–X (Japan) mekanik test cihazı kullanılarak oda sıcaklığında test edilmiştir. Filmler şerit halinde 50 mm x 10 mm boyutlarında kesilerek cihaza yerleştirilmiştir. Filmler kopana kadar bilgisayardan germe kuvveti 0.5 m/dk hız ile uygulanmıştır. Her bir filminden en az 4 ölçüm alınmıştır. TS (MPa) ve %E değerleri sırasıyla denklem (3.5) ve (3.6)’ya göre hesaplanmıştır.

$$TS = \frac{F_{max}}{L \times W} \quad (3.5)$$

F_{max} : Kopma anındaki maksimum kuvvet (N)

L: Numune kalınlığı (mm)

W: Numune genişliği (mm)

$$\%E = \frac{\Delta L}{L} \times 100 \quad (3.6)$$

ΔL : Kopma anındaki uzunluk farkı (mm)

L: Numune uzunluğu (mm)

3.2.9. Optik mikroskop analizi

Farklı oranlarda Hbs özütü ve gliserol içeren aljinat filmlerin yüzey özellikleri optik mikroskopunda 100X mercekte incelenmiştir.

3.2.10. İstatistik analizleri

İstatistik analizler SPSS 17.0 istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen verilere tek-yönlü ANOVA (one-way ANOVA) uygulanmış ve %5'lik seviyede değerlendirilmiştir. Ortalamalar arasındaki farklılıklar LSD (Least Significant Difference) testi kullanılarak $p < 0.05$ seviyesinde belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Film Özellikleri

Oluşturulan tüm kompozit aljinat filmler incelendiğinde fiziksel olarak formları oldukça düzgün, çatlama olmaksızın ve petrilerden kolayca çıkarılabilir halde üretilmişlerdir. Şekil 4.1’de jel dökme yöntemiyle hazırlanan ve petri içerisinde kurumaya bırakılan bir aljinat film solüsyonu gösterilmiştir. Hbs konsantrasyonunun artmasıyla beraber daha pürüzlü yüzeyler gözlenmiştir. Tan ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada greyfurt çekirdeği özütü ilave edilen kitosan esaslı filmler üretilmiştir. Filmlere farklı oranlarda özüt ilave edilmiş ve özüt miktarı arttıkça daha pürüzlü yüzeyler olduğu gözlenmiştir. Araştırmacılar bu durumun kullandıkları greyfurt çekirdeği özütünün hidrofilikliğinden kaynaklanmış olabileceğini bildirmişlerdir. Medina Jaramillo ve ark. (2015) da Paraguay çayı ekstresi katkılı nişasta filmler üretmişlerdir. Bu araştırmacılar da elde ettikleri filmlerin yüzey pürüzlülüğünün ekstre oranı arttıkça arttığını rapor etmişlerdir. Tarafımızdan yapılmış olan çalışmada elde edilen sonuçlar her iki araştırmacı grubunun elde ettiği sonuçlar ile benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.1. Petriye dökülerek kurumaya bırakılan bir aljinat film solüsyonu

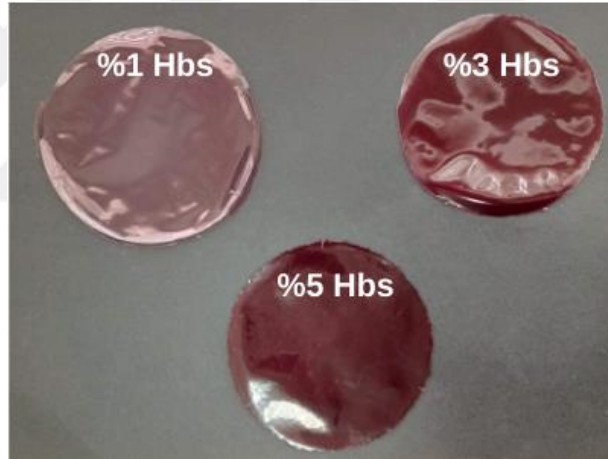
Bitki özütlerinin aljinat formülasyonuna dahil edilmesinin film renk özelliklerini değiştirdiği gözlenmiştir. Hbs eklenmesi ile daha koyu ve daha kırmızı hale gelen filmler Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Film örneklerinin nitel olarak bakıldığında

opaklığının, artan Hbs konsantrasyonu ile arttığı gözlemlenmiştir. Yüksek oranda bitki özütü içeren aljinat filmlerin yüzeyinin partiküllü bir hal aldığı görülmüştür.



Şekil 4.2. Farklı oranlarda Hbs özütü içeren aljinat film solüsyonları. Soldan sağa sırasıyla %0, %1, %3 ve %5 Hbs özütü içeren aljinat filmleri

Hazırlanan film solüsyonları, oda sıcaklığında yaklaşık 48 saat bekletilerek kurutulmuştur. Kurumuş ve petriden çıkarılmış olan kompozit filmler Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Oda sıcaklığında kurutulmuş film örnekleri

4.2. Antibakteriyel Aktivite Testi

Bitki özütlerinin polimer bazlı filmlere dahil edilmesi ile antibakteriyel özellikte ürünler elde edilmektedir. Bu antibakteriyel özellik sayesinde üretilen filmler gıda ambalajlama veya medikal endüstrilerinde güvenilir ve kolaylaştırıcı kullanıma sahip olabilmektedir. Yapılmış olan çalışmada %1'in üzerinde Hbs özütü içeren aljinat filmlerin geniş bir antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Özellikle gıda ambalajlama uygulamaları için *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakterileri gıda üzerinde toksin üreten patojen mikroorganizmalar olduklarından, onlara karşı dirençli ürünler geliştirmek önem arz etmektedir. (Aloui ve ark., 2021)

Bacillus subtilis, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı üretilmiş olan tüm kalsiyum aljinat filmlerde antibakteriyel aktivite tespit edilmiştir. Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de farklı oranlarda Hbs özütü, gliserol ve çapraz bağlayıcı içeren filmlerin test bakterilerine karşı oluşturdukları inhibisyon zonları görülmektedir. Hbs özütü miktarının artmasının tüm durumlarda zon çaplarının artmasına neden olduğu görülmüştür. Hbs özütü içermeyen kontrol filmlerinde herhangi bir inhibisyon zonu görülmemiştir. Her bir bakteri için elde edilen inhibisyon zon çapları Çizelge 4.1, Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'te görülmektedir. %3 ve %5 Hbs özütü içeren filmlerin analiz edilen dört bakteri suşuna karşı antibakteriyel etki gösterdiği gözlenmektedir. *Staphylococcus aureus*, aktif filmlere en duyarlı bakteri iken en az duyarlı olan *Klebsiella pneumoniae* olmuştur. %5 Hbs özütü oranına sahip filmler *Staphylococcus aureus*'a karşı 25 mm inhibisyon zon çapı oluşmasına neden olmuştur ve bu gözlenen en büyük inhibisyon zon çapı olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. %5 Hbs özütü katkılı filmlerin oluşturduğu inhibisyon zon çapları ¹

		BS	KP	SA	EC
1 Ca	Gli10	22.33 ± 0.66 a A	9.66 ± 0.66 a B	25.00 ± 0.00 a C	15.33 ± 0.88 a D
	Gli20	23.33 ± 0.66 a A	13.66 ± 0.66 b B	23.33 ± 0.33 a A	11.00 ± 1.00 b C
	Gli30	24.66 ± 0.88 a A	17.00 ± 0.57 c B	23.33 ± 1.20 a A	14.00 ± 1.52 ab B
2 Ca	Gli10	21.00 ± 0.00 a A	11.33 ± 1.20 a B	23.33 ± 0.88 a A	17.00 ± 0.57 a C
	Gli20	21.66 ± 1.33 a A	14.66 ± 0.33 b B	22.00 ± 1.00 a A	14.00 ± 0.57 bc B
	Gli30	23.66 ± 2.33 a A	16.00 ± 0.57 b B	22.66 ± 1.45 a A	15.00 ± 0.57 c B
3 Ca	Gli10	24.00 ± 0.57 a A	9.00 ± 0.00 a B	21.00 ± 1.00 a A	20.33 ± 3.92 a A
	Gli20	21.00 ± 2.00 a A	13.00 ± 1.00 b B	21.66 ± 0.66 a A	12.66 ± 0.66 a B
	Gli30	24.66 ± 0.33 a A	17.33 ± 0.66 c B	23.33 ± 0.66 a A	18.66 ± 0.33 a B

¹ İnhibisyon zonları mm cinsinden ölçülmüştür. Aynı satırdaki farklı büyük harflere ve aynı sütundaki farklı küçük harflere sahip değerler istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p < 0.05$)

Çizelge 4.2. %3 Hbs özütü katkılı filmlerin oluşturduğu inhibisyon zon çapları ¹

		BS	KP	SA	EC
1 Ca	Gli10	19.00 ± 0.57 a A	9.00 ± 0.00 a B	18.33 ± 1.45 a A	12.33 ± 0.33 a C
	Gli20	19.33 ± 0.33 a A	10.00 ± 1.00 ab B	18.33 ± 1.20 a A	9.00 ± 0.00 b B
	Gli30	19.66 ± 0.33 a A	12.00 ± 0.57 b B	18.66 ± 0.33 a A	10.33 ± 1.33 ab B
2 Ca	Gli10	15.66 ± 0.88 a A	9.00 ± 0.00 a B	20.00 ± 2.08 a C	13.00 ± 0.57 a A
	Gli20	19.00 ± 1.0 b A	10.00 ± 1.00 a B	19.33 ± 0.33 a A	12.00 ± 3.00 a B
	Gli30	18.33 ± 0.88 ab A	10.33 ± 1.33 a B	20.00 ± 1.00 a A	9.00 ± 0.00 a B
3 Ca	Gli10	20.00 ± 0.57 a A	9.00 ± 0.00 a B	18.00 ± 0.57 a C	14.33 ± 0.66 a D
	Gli20	18.33 ± 0.88 a A	9.00 ± 0.00 a B	18.33 ± 0.88 ab A	9.00 ± 0.00 b B
	Gli30	18.66 ± 0.66 a A	9.00 ± 0.00 a B	20.33 ± 0.33 b C	13.00 ± 0.00 c D

¹ İnhibisyon zonları mm cinsinden ölçülmüştür. Aynı satırdaki farklı büyük harflere ve aynı sütundaki farklı küçük harflere sahip değerler istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir (p<0.05)

Çizelge 4.3. %1 Hbs özütü katkılı filmlerin oluşturduğu inhibisyon zon çapları ¹

		BS	KP	SA	EC
1 Ca	Gli10	13.66 ± 1.20 a A	9.00 ± 0.00 a B	11.00 ± 2.00 a AB	9.00 ± 0.00 a B
	Gli20	9.00 ± 0.00 b A	9.00 ± 0.00 a A	11.33 ± 1.20 a B	9.00 ± 0.00 a A
	Gli30	9.00 ± 0.00 b A	9.00 ± 0.00 a A	11.00 ± 1.00 a B	9.00 ± 0.00 a A
2 Ca	Gli10	11.33 ± 1.20 a A	9.00 ± 0.00 a B	9.00 ± 0.00 a B	9.00 ± 0.00 a B
	Gli20	10.66 ± 1.66 a A	9.00 ± 0.00 a A	10.00 ± 1.00 a A	9.00 ± 0.00 a A
	Gli30	10.33 ± 1.33 a A	9.00 ± 0.00 a A	11.33 ± 1.20 a A	9.00 ± 0.00 a A
3 Ca	Gli10	12.00 ± 1.52 a A	9.00 ± 0.00 a B	9.00 ± 0.00 a B	9.00 ± 0.00 a B
	Gli20	11.00 ± 2.00 a A	9.00 ± 0.00 a A	9.00 ± 0.00 a A	9.00 ± 0.00 a A
	Gli30	9.00 ± 0.00 a A	9.00 ± 0.00 a A	9.00 ± 0.00 a A	9.00 ± 0.00 a A

¹ İnhibisyon zonları mm cinsinden ölçülmüştür. Aynı satırdaki farklı büyük harflere ve aynı sütundaki farklı küçük harflere sahip değerler istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir (p<0.05)

ANOVA analizi, inhibitör aktivitenin gram-pozitif bakterilere karşı gram-negatif bakterilere kıyasla daha belirgin olduğunu ortaya koymuştur. Daha önce Siripatrawan ve Vitchayakitti (2016) tarafından açıklandığı üzere, gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler arasındaki bu farkın temel nedeni hücre duvarı yapılarındaki farklılıklardır. Gram-pozitif bakterilerin dış hücre duvarı, biyoaktif moleküllerin bağlanmasını ve hücre içerisine geçişini sağlayacak çok sayıda gözenekli asidik polisakkaritlerden ve peptidoglikandan oluşmaktadır. Gram-negatif bakteriler ise hücre duvarından ayrı olarak biyoaktif moleküllerin hücre içerisine geçişini engelleyen lipopolisakkarit, lipid ve proteinlerden oluşan ek bir dış zara sahiptir. (Erand ve ark., 2016)

Genel olarak Hbs özütü katkılı aljinat filmlerin patojenik bakterilere karşı iyi antibakteriyel etki sergilediği görülmüştür. Üretilmiş olan filmlerin bu bağlamdaki antibakteriyel etkileri sayesinde bu ürünlerin gıda ambalajı olarak kullanılması durumunda mikrobiyal bozunmanın engellenmesi ve lipid oksidasyonunun geciktirilmesi ve böylece gıda endüstrilerinde raf ömürlerinin uzatılması sağlanabilecektir.

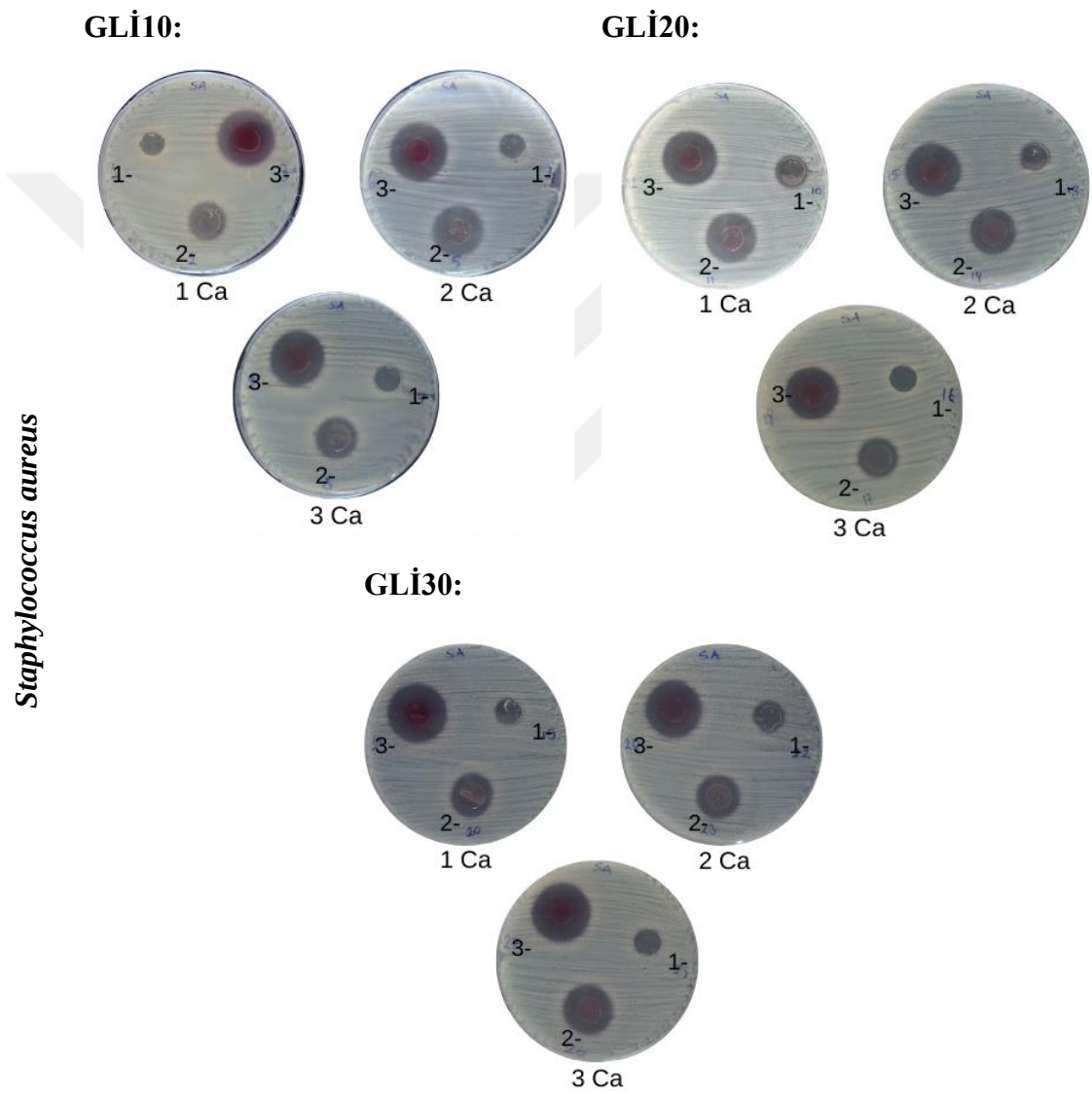
Çapraz bağlayıcı ve gliserol oranlarının sabit tutulduğu, değişken oranlarda Hbs özütü içeren filmlere yapılan antibakteriyel aktivite testinde 9 ile 22 mm arasında değişiklik gösteren inhibisyon zon çapları elde edilmiş ve Çizelge 4.4'te gösterilmiştir. Genel setlerde görülen *Staphylococcus aureus* 'a karşı olan duyarlılık burada yine görülmektedir. Aljinat filmlerine %5 oranında Hbs ilave edilen örnekler, tüm durumlara karşı anlamlı bir farklılık ile en yüksek değere sahiptir. Aynı film örnekleri gram-negatif bakterilere karşı daha fazla direnç göstermiştir. En yüksek Hbs özütü içeriğine sahip film *Klebsiella pneumoniae*'ye karşı 14.66 mm çaplık bir zon oluşturmuştur.

Farklı gliserol ve çapraz bağlama oranlarının kullanılması aljinat filmlerin antibakteriyel aktivitesine yönelik direkt bir etki meydana getirmemiştir. Kuvvetli antibakteriyel bileşenlere sahip olan Hbs filmlerde etkisini değiştirmeyen bir aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

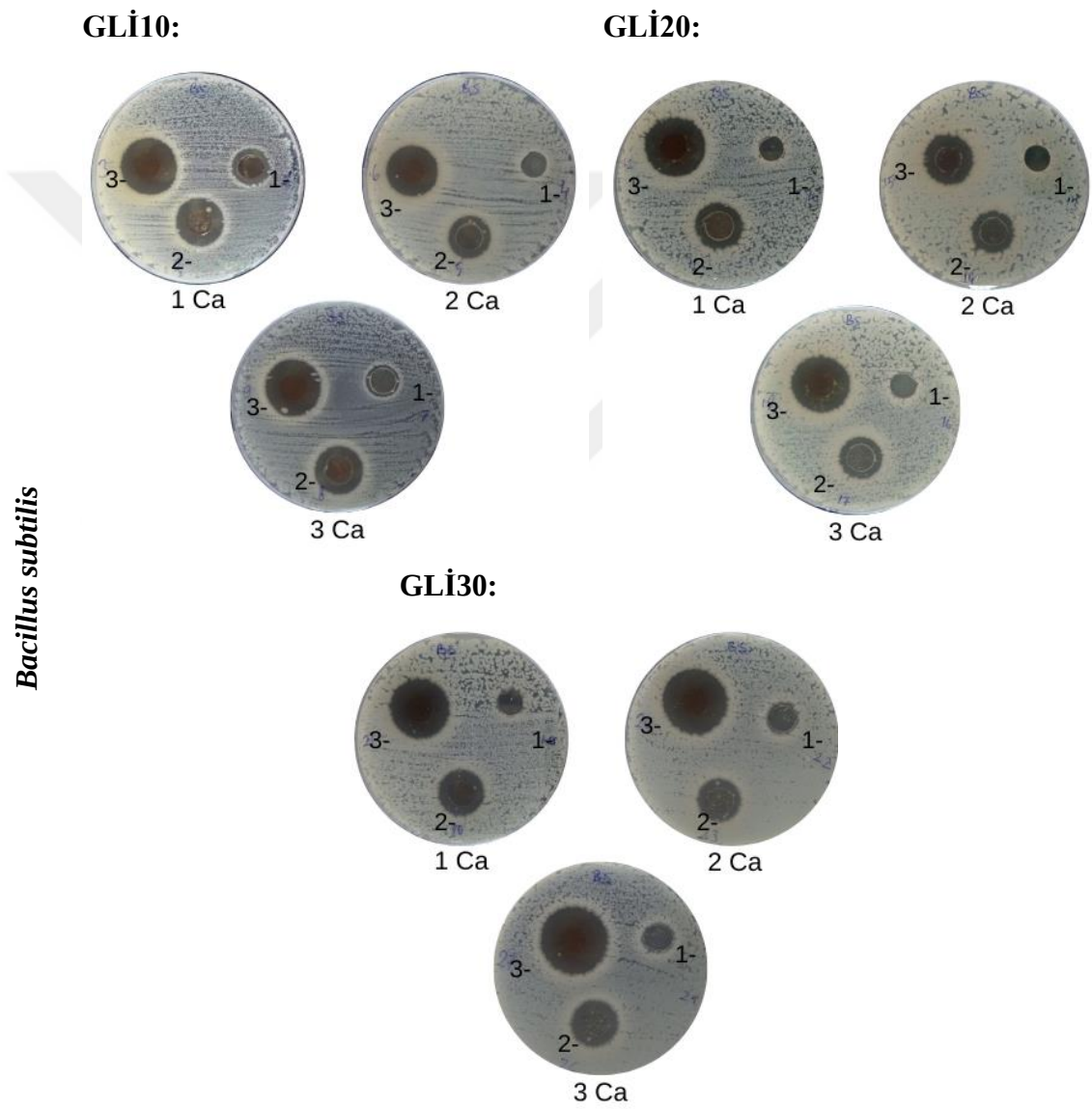
Çizelge 4.4. Üretilen filmlerin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zon çapları ¹

Bakteriler	Hbs oranları (v/v)	İnhibisyon Zon Çapı
<i>Staphylococcus aureus</i>	%0	9.0 ± 0.0 a
	%1	10.0 ± 1.0 a
	%3	19.33 ± 0.33 b
	%5	22.0 ± 1.0 c
<i>Bacillus subtilis</i>	%0	9.0 ± 0.0 a
	%1	10.66 ± 1.66 a
	%3	19.0 ± 1.0 b
	%5	21.66 ± 1.33 b
<i>Escherichia coli</i>	%0	9.0 ± 0.0 a
	%1	9.0 ± 0.0 a
	%3	11.0 ± 2.0 ab
	%5	14.0 ± 0.57 b
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	%0	9.0 ± 0.0 a
	%1	9.0 ± 0.0 a
	%3	10.0 ± 1.0 a
	%5	14.66 ± 0.33 b

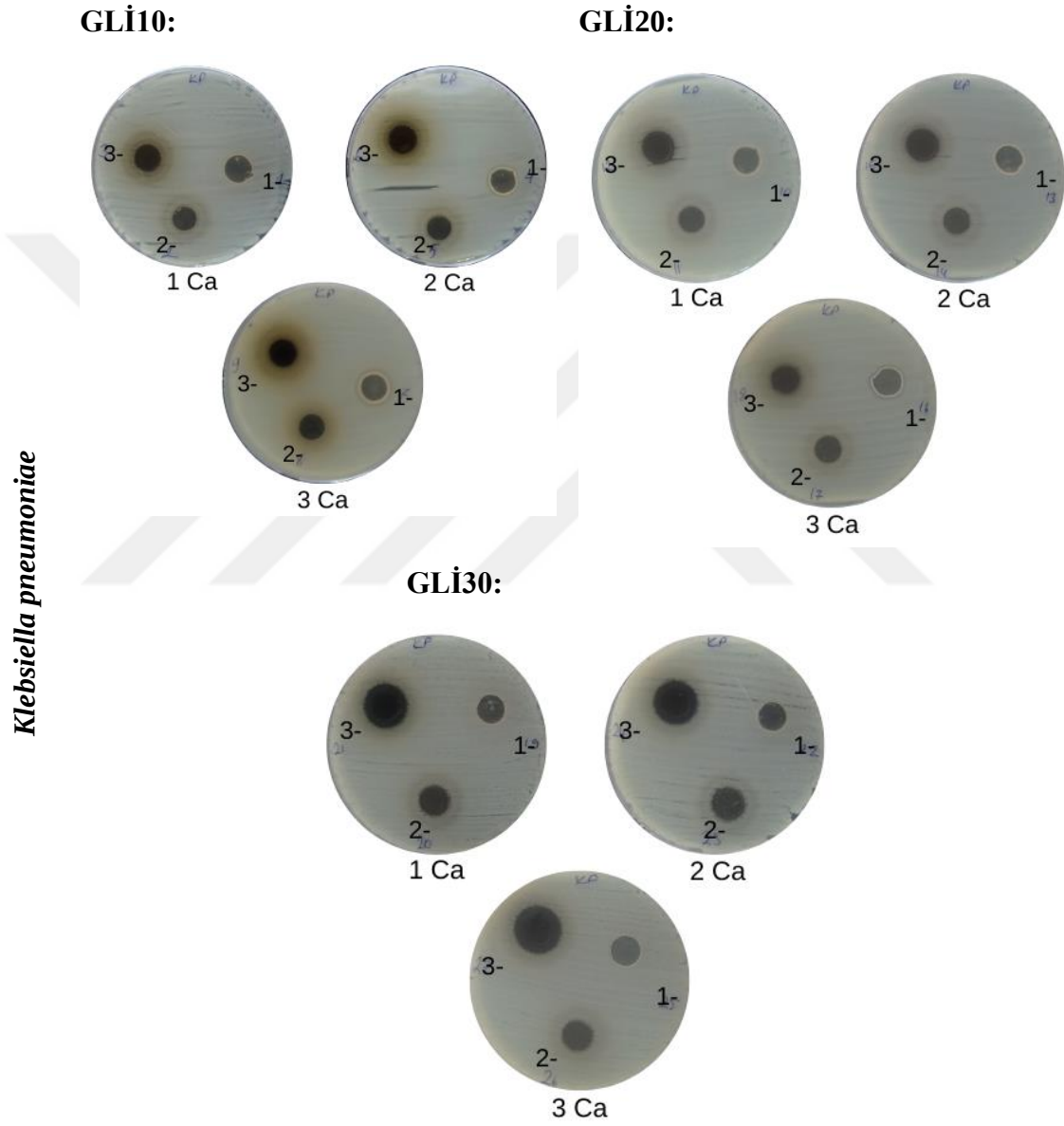
¹ İnhibisyon zonları mm cinsinden ölçülmüştür. Aynı sütundaki farklı küçük harflere sahip değerler istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p < 0.05$).



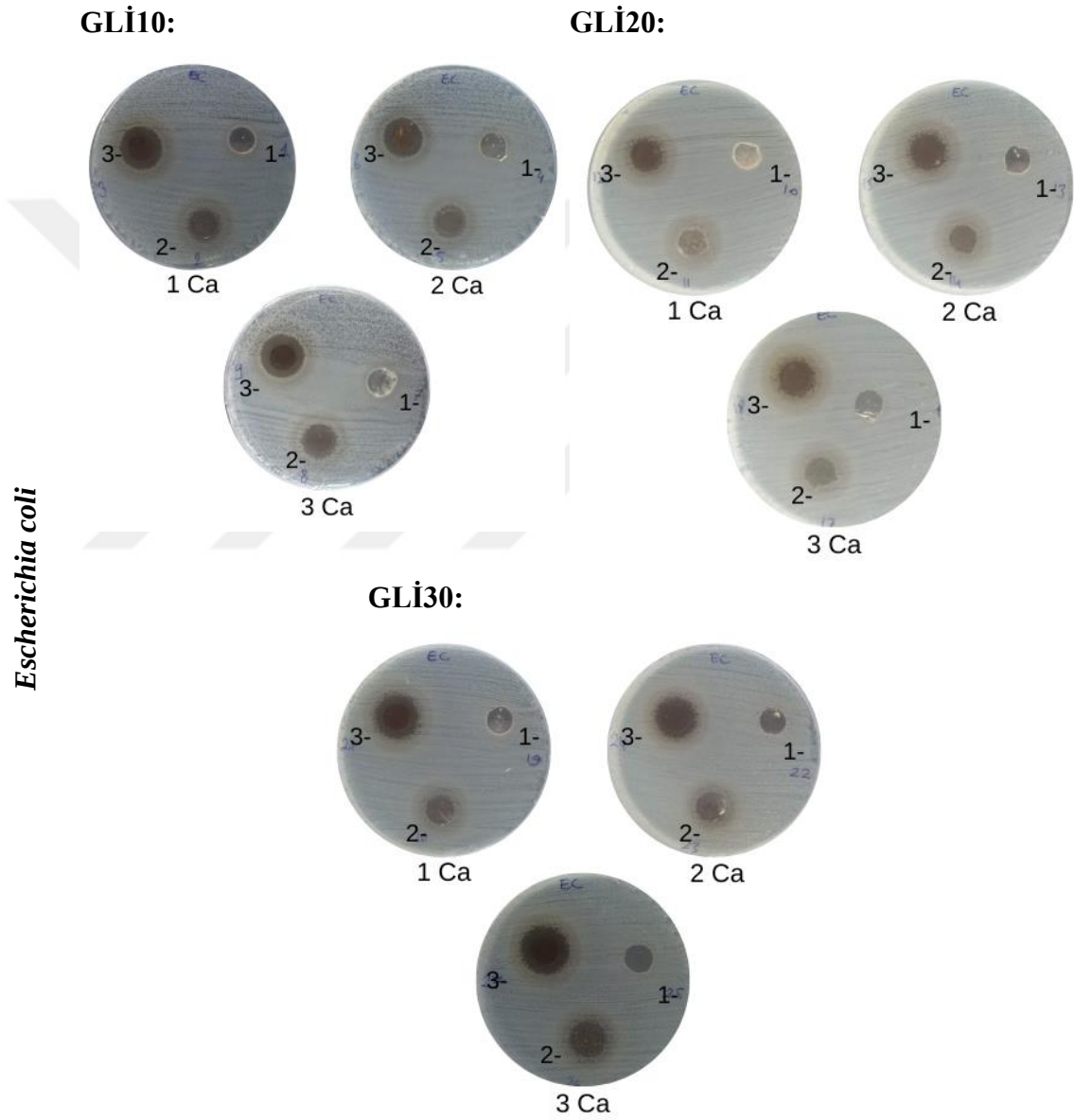
Şekil 4.4. Farlı oranlarda gliserol (%10, %20, %30), çapraz bağlayıcı (0.01, 0.02, 0.03 g/g aljinat) ve Hbs özütü (%1, %3, %5) içeren filmlerin *Staphylococcus aureus* 'a karşı oluşturdıkları inhibisyon zonları



Şekil 4.5. Farklı oranlarda gliserol (%10, %20, %30), çapraz bağlayıcı (0.01, 0.02, 0.03 g/g aljinat) ve Hbs özütü (%1, %3, %5) içeren filmlerin *Bacillus subtilis* 'e karşı oluşturdukları inhibisyon zonları



Şekil 4.6. Farklı oranlarda gliserol (%10, %20, %30), çapraz bağlayıcı (0.01, 0.02, 0.03 g/g aljinat) ve Hbs özütü (%1, %3, %5) içeren filmlerin *Klebsiella pneumoniae* 'ye karşı oluşturdukları inhibisyon zonları



Şekil 4.7. Farklı oranlarda gliserol (%10, %20, %30), çapraz bağlayıcı (0.01, 0.02, 0.03 g/g aljinat) ve Hbs özütü (%1, %3, %5) içeren filmlerin *Escherichia coli* 'ye karşı oluşturdukları inhibisyon zonları

4.3. Şişme- Çözünürlük- Su İçeriği Testleri

Aljinat filmlerine çapraz bağlama işlemi yapılmadığında suda kolaylıkla çözündükleri bilinmektedir. Çapraz bağlanan aljinat filmler şişmekte fakat direk çözünmemektedir. Bu nedenle çalışmamızda aljinat solüsyonuna çapraz bağlayıcı eklenerek iç çapraz bağlı filmlerin üretilmesi amaçlanmıştır. Farklı Hbs, gliserol ve iç çapraz bağlama oranı bulunan 30 adet filmin su içerikleri, suda şişmeleri ve çözünürlükleri incelenmiştir ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5, Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7’de ayrı ayrı verilmiştir.

4.3.1. Şişme testi

Şişme yüzdesi, filmin su tutma kapasitesinin bir ölçüsüdür. (Wang ve Rhim, 2015) Çizelge 4.5’te gösterildiği üzere Hbs bitki özütü konsantrasyonunun artmasıyla film örnekleri daha düşük şişme potansiyeli göstererek anlamlı farklar meydana getirmiştir. Aljinat ve bitki özütü arasındaki moleküller arası etkileşimler film şişme değerlerini azaltmıştır. *Hibiscusun* içeriğindeki pektin sayesinde çapraz bağlamaya destek olarak filmlerin çok yüksek olan şişme değerlerini çeşitli uygulamalarda kullanabilecek ideal seviyelere indirdiği gözlenmiştir. Kontrol aljinat filmlerinin yüksek hidrofilikliğini etkileyen Hbs bu sayede şişme değerlerinde anlamlı bir azalma yaratmıştır. Hbs, hidrofilikliği ve şişme oranı çok yüksek (yaklaşık yüzde 10 000) olan katkısız aljinat filmlerin şişme değerlerinde anlamlı bir azalma oluşturmuştur. Şişme değerlerinde görülen bu düşüş aljinat ve Hbs arasında artan etkileşimlere bağlanabilir.

Gliserol konsantrasyonunun artması ile kontrol film örneklerine kıyasla anlamlı ölçüde azalış profili gözlenmiştir. Aynı azalma profili çapraz bağlayıcı oranının artmasıyla da gözlenmiştir.

Çizelge 4.5. Farklı kompozisyonlardaki aljinat filmlerin şişme değerleri (%) ¹

	% Hbs Filmler	%0 Gli	%10 Gli	%20 Gli	%30 Gli
1 Ca	%1 Hbs	-	10123.46 ± 347.41 a A	5028.82 ± 301.19 a B	6151.02 ± 400.05 a C
	%3 Hbs	-	3524.66 ± 264.46 b A	1410.107 ± 115.3 b B	2190.75 ± 89.25 b C
	%5 Hbs	-	2021.3 ± 290.3 c A	470.76 ± 35.76 c B	601.04 ± 42.84 c B
2 Ca	%0 Hbs	-	-	10046.78 ± 190.14 a	-
	%1 Hbs	-	9846.28 ± 696.29 a A	4591.42 ± 134.31 b B	3975.22 ± 224.93 a B
	%3 Hbs	2749.89 ± 141.49 A	3095.77 ± 230.92 b A	1320.44 ± 73.54 c B	1855.99 ± 123.24 b C
	%5 Hbs	1180.9 ± 90.83 A	1031.6 ± 76.25 c A	484.19 ± 74.33 d B	558.55 ± 36.04 c B
3 Ca	%1 Hbs	-	8092.51 ± 584.87 a A	3601.93 ± 161.73 a B	4482.58 ± 528.08 a B
	%3 Hbs	-	2296.9 ± 77.89 b A	1191.75 ± 71.11 b B	1178.46 ± 138.35 b B
	%5 Hbs	-	1020.21 ± 155.14 c A	466.01 ± 54.98 c B	265.78 ± 36.36 c B

¹ Aynı satırdaki farklı büyük harflere ve aynı sütundaki farklı küçük harflere sahip değerler istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p < 0.05$)

4.3.2. Çözünürlük testi

Çözünürlük; filmin suya karşı gösterdiği direncinin bir ölçüsüdür. (Wang ve Rhim, 2015) Film çözünürlüğü, filmlerin biyolojik olarak parçalanabilirliğini gösteren ve özellikle yenilebilir film üretimlerinde temel bir parametredir. Gıdaların depolanması ve korunması gibi amaçlarla üretilen kompozit filmlerin düşük çözünürlükte olması beklenmektedir. (Kim ve ark., 2017) Filmlerin çözünmezliği, gıdaların kalitesi ve bütünlüğü açısından ambalajlama endüstrisinde dikkat edilen bir noktadır. (de Moura ve ark., 2011) Çizelge 4.6’de verilen çözünürlük değerlerine bakıldığında tüm koşullarda bitki özütlerinin konsantrasyonunun artırılması film çözünürlüklerinde anlamlı bir artışa neden olmuştur. Norajit ve ark. (2010) aljinat filmlerine ginseng özütü eklediklerinde benzer şekilde filmlerin çözünürlüğünün arttığını tespit etmişlerdir.

Farklı konsantrasyonlarda gliserol içeren filmlerin çözünürlük oranlarına bakıldığında %10 gliserol ilave edilen filmlerin çözünürlüklerinin gliserol içermeyen

filmlerden istatistik olarak farklı olmadığı görülmektedir. %20 Gli içeren filmlerin çözünürlüklerinin gliserol içermeyen filmlerden anlamlı oranda ($p<0.05$) düşük, %30 Gli içeren filmlerin çözünürlüklerinin ise anlamlı oranda yüksek olduğu tespit edilmiştir. da Silva ve ark. (2009) da aljinat ve pektin kompozitlerinde gliserol konsantrasyonunun artmasıyla çözünürlük değerlerinde önemli derecede artış gözlemlenmiştir.

Filmlerin şişme ve çözünürlüklerinin; su difüzyonu, amino veya karboksil gruplarının iyonlaşması, hidrojen ve iyonik bağların kopması ile ilgili olduğu yapılan çalışmalarda vurgulanmaktadır. (Mathew ve ark., 2006)

Çizelge 4.6. Farklı kompozisyonlardaki aljinat filmlerin çözünürlük değerleri (%) ¹

	% Hbs	%0 Gli	%10 Gli	%20 Gli	%30 Gli
Filmler					
1 Ca	%1 Hbs	-	54.87 ± 1.37 a A	37.39 ± 2.42 a B	55.8 ± 3.94 a B
	%3 Hbs	-	63.81 ± 2.08 b A	55.44 ± 1.39 b B	60.4 ± 0.89 b A
	%5 Hbs	-	75.61 ± 2.47 c A	66.98 ± 0.63 c B	70.98 ± 0.81 b AB
2 Ca	%0 Hbs	-	-	62.86 ± 0.99 a	-
	%1 Hbs	-	46.88 ± 0.8 a A	32.22 ± 1.69 b B	55.68 ± 1.44 a C
	%3 Hbs	63.07 ± 0.47 AC	61.56 ± 0.96 b A	50.92 ± 1.99 c B	66.36 ± 1.32 b C
	%5 Hbs	71.8 ± 0.57 A	70.34 ± 0.63 c A	65.76 ± 1.47 a B	75.86 ± 1.17 c C
3 Ca	%1 Hbs	-	54.00 ± 0.7 a A	42.3 ± 1.8 a B	58.57 ± 2.21 a A
	%3 Hbs	-	64.58 ± 0.35 b A	59.78 ± 0.36 b B	67.68 ± 1.38 b C
	%5 Hbs	-	72.97 ± 0.6 c A	70.03 ± 0.68 c B	73.9 ± 0.45 c A

¹ Aynı satırdaki farklı büyük harflere ve aynı sütundaki farklı küçük harflere sahip değerler istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p<0.05$)

4.3.3. Su içeriği testi

Çizelge 4.7'te üretilen film kompozitlerinin su içeriği değerleri gösterilmektedir. Filmlerin su içerikleri %3.42 ve %13.61 arasında değişmektedir. Hbs içeriklerinin artmasına bağlı olarak belli bir değişiklik gözlenmemiştir. Sabit Hbs ve çapraz bağlama formülasyonlarında gliserol değerlerinin arttırılması su içerik değerlerinde genel olarak anlamlı azalmalar meydana getirmiştir. Benzer durumu Jamroz ve ark. (2018), gliserol ve aljinat arasındaki polisakkarit-su-protein etkileşimlerini sınırlandıran ve dolayısıyla

su içeriğini azaltan etkileşimleri meydana getirdiği şeklinde açıklamışlardır. Shaili ve ark. (2015) film yapısında bulunan su moleküllerinin plastikleştirici olarak davranarak filme esneklik kazandırabileceğini belirtmişlerdir. Azalan su içeriği sonuçlarına bakıldığında bu durum filmlerin fiziksel özelliklerini de etkileyebilmektedir.

Çizelge 4.7. Farklı kompozisyonlardaki aljinat filmlerin su içeriği değerleri (%) ¹

	% Hbs	%0 Gli	%10 Gli	%20 Gli	%30 Gli
Filmler					
1 Ca	%1 Hbs	-	3.42 ± 0.75 a A	12.94 ± 0.58 a B	5.89 ± 0.3 a C
	%3 Hbs	-	11.22 ± 0.73 b A	10.68 ± 0.53 b A	5.23 ± 0.67 a B
	%5 Hbs	-	12.97 ± 0.79 b A	12.13 ± 0.85 ab A	6.41 ± 0.15 a B
2 Ca	%0 Hbs	-	-	14.2 ± 0.66 a	-
	%1 Hbs	-	12.43 ± 1.45 a A	12.39 ± 0.27 ac A	6.53 ± 0.7 a B
	%3 Hbs	6.98 ± 0.68 A	11.92 ± 0.21 a B	10.38 ± 0.38 cb B	10.31 ± 1.34 b B
	%5 Hbs	8.86 ± 0.43 AC	13.61 ± 1.02 a B	10.2 ± 1.03 bd AC	7.3 ± 0.52 a C
3 Ca	%1 Hbs	-	12.52 ± 1.26 a A	12.59 ± 1.36 a A	3.61 ± 0.76 a B
	%3 Hbs	-	12.06 ± 1.92 a A	9.85 ± 0.48 b AB	7.68 ± 0.7 b B
	%5 Hbs	-	11.17 ± 1.68 a A	10.78 ± 0.71 ab A	7.98 ± 0.28 b A

¹ Aynı satırdaki farklı büyük harflere ve aynı sütundaki farklı küçük harflere sahip değerler istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p < 0.05$)

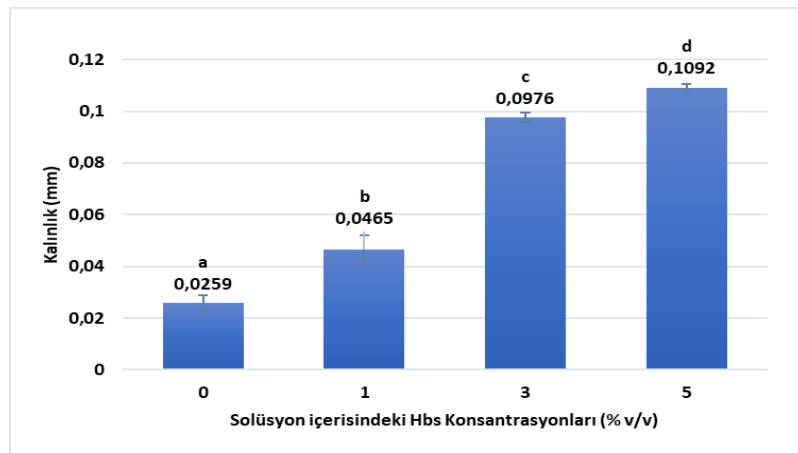
Bu aşamaya kadar yapılan testler sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde farklı oranlarda gliserol ve farklı oranlarında Hbs özütü ilave edilerek üretilen filmlerde istatistik olarak anlamlı farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla bu aşamadan sonra yapılan deneylerde bu iki film grubu kullanılmıştır ve elde edilen veriler bu iki grup için ayrı ayrı sunulmuştur. 0.02 g/g aljinat oranında eklenen CaCO₃, %20 gliserol ve %3 Hbs özütü miktarları optimum özelliklerde film üretilmesini sağlamıştır. Dolayısıyla farklı gliserol oranlarının filmlere etkisinin değerlendirildiği deneylerde yukarıda açıklanan oranlarda olmak üzere Hbs özütü ve CaCO₃ oranı sabit tutulmuştur. Farklı oranlarda Hbs özütü ilavesinin değerlendirildiği deneylerde de benzer şekilde gliserol ve CaCO₃ oranları sabit tutulmuştur.

4.4. Kalınlık

Gıda ambalajlama uygulamalarında piyasadaki film ve kaplamaların kalınlıkları genellikle 0.08-0.2 mm arasında değişmektedir. (Garavand ve ark., 2017) Yara örtüsü uygulamalarında ise insan derisinin kalınlığından daha düşük bir kalınlık istenmektedir. Dermis kalınlığı yaşa ve cinsiyete bağlı olarak 0.5 ile 2.0 mm arasında değişiklik gösterebilmektedir. (Bierhalz ve ark., 2016) Su buharı geçirgenliği veya farklı gazların taşınması gibi bariyer özelliklerinde kalınlık önemli bir rol oynamaktadır. İncelenen biyopolimer bazlı filmlerin çoğu orijinal olarak hidrofilik özellik gösterdiklerinden kalınlıkları farklı koşullara göre değişiklik gösterebilmektedir. Kalınlık parametresini, film solüsyonu içerisindeki çözünmüş madde konsantrasyonu ve film dökme kabının boyutu etkileyebilmektedir. (Sedyadi ve ark., 2016)

4.4.1. Farklı oranlarda Hbs özütü içeren aljinat filmlerin kalınlıkları

Bitki özütleri, biyolojik olarak parçalanabilen filmlerin kalınlığını etkilemektedir. Farklı konsantrasyonlarda Hbs ilave edilen filmlerin kalınlıkları 0.0259 ile 0.1092 mm arasında tespit edilmiştir. Ortalama kalınlık değerleri Şekil 4.8’te gösterilmektedir. Film oluşturucu çözeltilerin formülasyonunda Hbs oranının artması ile elde edilen filmlerde istatistiksel olarak anlamlı farklar gözlenmektedir. ($p < 0.05$)

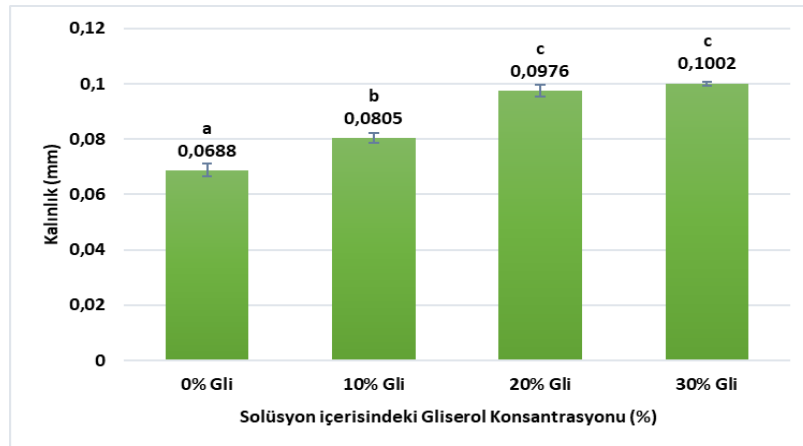


Şekil 4.8. Farklı Hbs özütü oranlarına sahip kompozit filmlerin kalınlık değerleri

Farklı oranlarda Hbs özütü içeren filmlerin kalınlık değerleri incelendiğinde günümüze kadar üretilmiş olan bitki özütü katkılı filmlerin kalınlık değerleri ile paralellik gösterdiği görülmektedir. Maryam Adilah ve ark. (2018) mango çekirdeği katkılı yenilebilir filmler üretmişler ve yaptıkları kalınlık testlerinde 0.056 ile 0.09 mm arasında sonuçlar elde etmişlerdir. Kalınlıklardaki bu artışların bitki özütlerinin polimer ile gerçekleştirdiği çapraz bağlanmadan kaynaklandığı düşünülmektedir. (Mir ve ark., 2018)

4.4.2. Farklı oranlarda gliserol içeren aljinat filmlerin kalınlıkları

Farklı gliserol konsantrasyonlarına sahip olan %3 Hbs özütü katkılı kompozit filmlerin kalınlık değerleri Şekil 4.9'te gösterilmiştir. %3 Hbs özütü katkılı kompozit filmlerde gliserol oranı arttıkça filmlerinin kalınlığının sürekli arttığı gözlenmiştir. Gliserol konsantrasyonun aljinat polimerinin ağırlığına bağlı olarak yüzdelik oranının artırılmasıyla %3 Hbs özütü katkılı kompozit filmlerinin kalınlıklarının sürekli arttığı gözlemlenmiştir. Gliserolün film kompozisyonunda moleküler hacmi artırması ile kalınlık değerlerini de arttırdığı Berberoglu (2018) tarafından belirtildiği üzere net olarak görülmüştür.

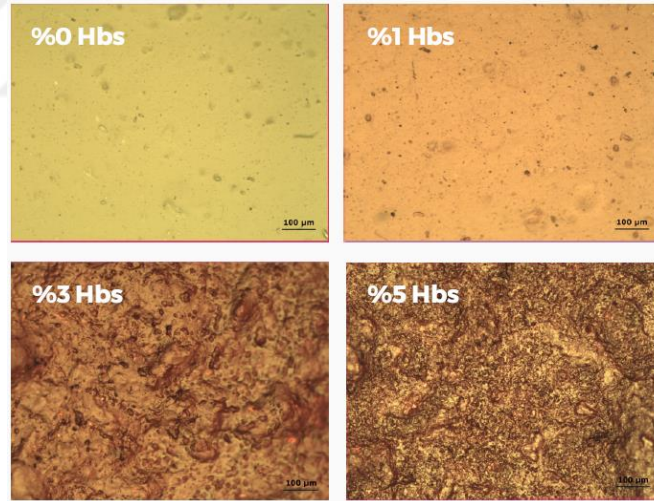


Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlarda gliserol içeren %3 Hbs özütü katkılı aljinat filmlerin kalınlık değerleri

4.5. Optik Mikroskop Analizi

4.5.1. Farklı oranlarda Hbs özütü içeren aljinat filmlerin görüntüleri

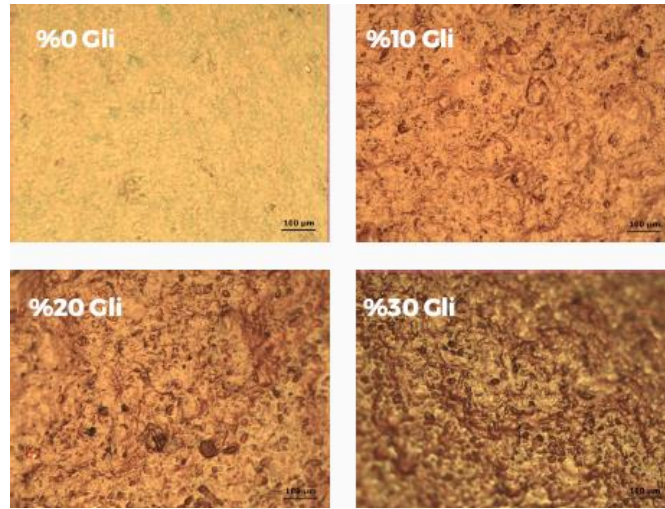
Üretilen film kompozitlerinin optik mikroskop görüntüleri Şekil 4.10'da verilmiştir. Görseller aljinat filmlerine dahil edilen farklı Hbs özütü miktarlarında önemli farklılıklar meydana getirmiştir. Özüt içermeyen aljinat filmler daha homojen ve pürüzsüz bir yüzeye sahiptir. Hbs özütü konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak elde edilen filmlerin yüzeylerinde pürüzlü ve gözenekli bir yapının oluştuğu görülmektedir. Bitki özütlerinin farklı film formülasyonlarına dahil edilmesi ile alınan sonuçlarda Tan ve ark. (2015) greyfurt çekirdeği özütünün film yapılarını daha pürüzlü hale getirdiğini belirtmişlerdir. Aynı şekilde Medina Jaramillo ve ark. (2015) da benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Görüntülerimiz bu noktada yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir.



Şekil 4.10. Farklı Hbs özütü oranlarına sahip kompozit filmlerin optik mikroskop görüntüleri

4.5.2. Farklı oranlarda gliserol içeren aljinat filmlerin görüntüleri

Farklı gliserol konsantrasyonlarında üretilen %3 Hbs özütü içeren filmlerin optik mikroskop görüntüleri Şekil 4.11'de verilmiştir. Bitki özütü ilavesiyle elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Gliserol oranlarının artmasıyla birlikte moleküler hacmin de artmasıyla film yapılarında gözenek artışları meydana gelmektedir.



Şekil 4.11. Farklı gliserol oranlarına sahip kompozit filmlerin optik mikroskop görüntüleri

4.6. Su Buharı Geçirgenlik (WVP) Testleri

Biyomedikal bir uygulama olan yara örtülerinden veya gıda ambalajlamalarında kullanılan malzemelerden genellikle nem geçişini önlemesi veya azaltması beklenmektedir. Bitki özütleri polimer bazlı filmlerin bariyer özelliklerini önemli ölçüde etkilemektedir. (Nouri ve Mohammadi Nafchi, 2014) Farklı oranlarda Hbs ve gliserol ilave edilen filmlerin su buharı geçirgenlik değerleri Çizelge 4.8’te gösterilmiştir.

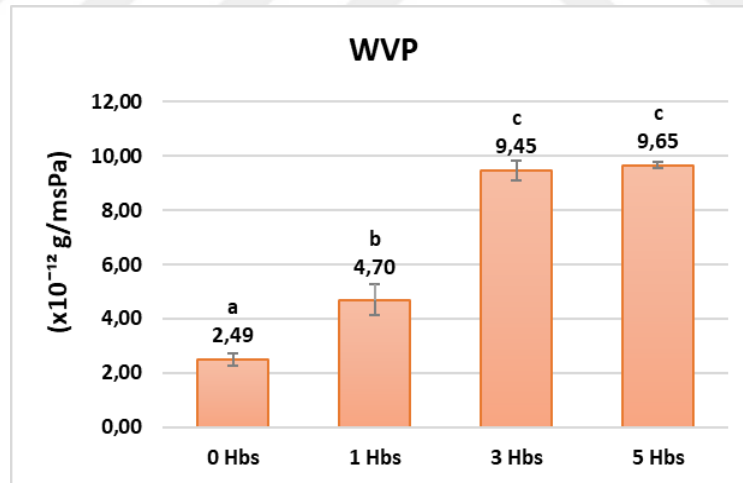
Çizelge 4.8. Farklı miktarlarda Hbs özütü ve gliserol içeren filmlerin su buharı geçirgenlikleri ¹

Örnekler	WVP ($\times 10^{-12}$ g/msPa)
0 Hbs (<i>kontrol</i>)	2.49 ± 0.2 a
1 Hbs	4.70 ± 0.55 b
3 Hbs	9.45 ± 0.37 c
5 Hbs	9.65 ± 0.1 c
3 Hbs + 0 Gli (<i>kontrol</i>)	5.52 ± 0.48 a
3 Hbs + 10 Gli	7.11 ± 0.16 b
3 Hbs + 20 Gli	9.45 ± 0.37 c
3 Hbs + 30 Gli	8.85 ± 0.06 c

¹ Aynı sütundaki farklı harflere sahip değerler istatistiksel olarak anlamlı oranda farklıdır ($p < 0.05$).

4.6.1. Farklı oranlarda Hbs özütü içeren aljinat filmlerin su buharı geçirgenlikleri

Farklı oranlarda Hbs özütü içeren aljinat filmlerin su buharı geçirgenlikleri 2.49×10^{-12} – 9.65×10^{-12} g/msPa arasında değişiklik göstermiş ve sonuçlar Şekil 4.12’de grafiklendirilmiştir. Hbs ilavesinin filmlerin daha gözenekli yapıda olmasına neden olduğu ve dolayısıyla su buharı geçirgenliğinde artışa sebep olduğu düşünülmektedir. Kim ve ark. (2020) bu artışların başlıca nedeninin kullandıkları bitki ekstresinin yüksek oranda hidrofilik olmasıyla ilişkili olduğunu savunmuşlardır. Benzer sonuçlara; moringa yaprağı özütü, kakao kahvesi özütü ve betel yaprağı özütü gibi bitki özütlerinin ilave edildiği nişasta filmlerinde de rastlanmıştır. (Nouri ve Mohammadi Nafchi, 2014; Kim ve ark., 2018; Ju ve ark., 2019) Kanmani ve Rhim (2014) de polimer bazlı filmlere üzüm çekirdeği özütü eklemişler ve bitki özütünün su buharı geçirgenliğini arttırdığını görmüşlerdir. Kitosan-nişasta film matrislerine nar kabuğu özü ekleyen Mehdizadeh ve ark. (2020) ise su buharı geçirgenliklerinde kontrol filmlerine kıyasla bir değişim gözlemlememişlerdir.

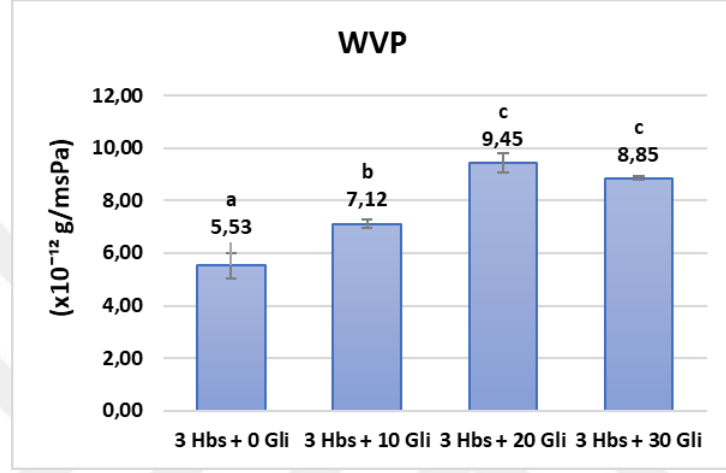


Şekil 4.12. Farklı oranlarda Hbs özütü içeren filmlerin su buharı geçirgenlik değerleri

4.6.2. Farklı oranlarda gliserol içeren aljinat filmlerin su buharı geçirgenlikleri

Farklı oranlarda gliserol içeren %3 Hbs özütü katkılı filmlerin su buharı geçirgenlik değerlerinin 5.52×10^{-12} – 9.45×10^{-12} g/msPa arasında değiştiği görülmüştür. (Şekil 4.13) Gliserol ilave edilen filmlerin tümünde su buharı geçirgenliği

gliserol içermeyen filmlere oranla istatistik olarak daha yüksek tespit edilmiştir. %20 ve %30 gliserol eklenen filmlerde değerler %10 gliserol katılan filmlere oranla daha yüksek olmuştur. Plastikleştiricinin formülasyona dahil edilmesi çözücü hareketliliğini destekleyerek film matrisinde su difüzyonunda artışa sebep olmuştur. (De Carvalho ve Grosso, 2004) Film yapısında meydana gelen bu değişiklikler su buharı hareketini arttırarak WVP'nin yükselmesine neden olmuştur.



Şekil 4.13. Farklı oranlarda gliserol içeren %3 Hbs özütü katkılı filmlerin su buharı geçirgenlik değerleri

4.7. FTIR Analizi

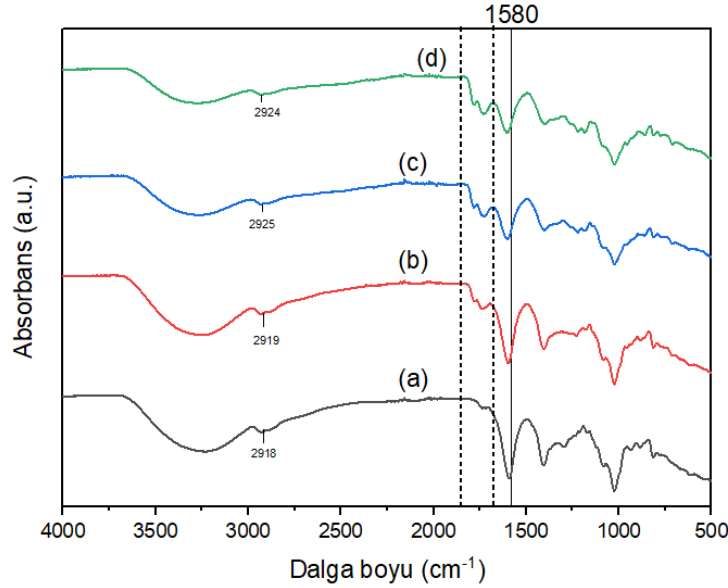
FTIR, fonksiyonel grupların tanımlanması ve malzemeler arasındaki etkileşimin belirlenmesinde güçlü bir teknik olarak kullanılmaktadır. (Abdelghany ve ark., 2019) Sodyum aljinat-gliserol-Hbs arasındaki potansiyel etkileşimleri araştırmak için FTIR spektrometresi kullanılmıştır. Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te farklı kompozisyonlardaki aljinat filmlerin absorpsiyon spektrumları gösterilmektedir.

4.7.1. Farklı oranlarda Hbs özütü içeren aljinat filmlerin FTIR analizi

Aljinat molekülleri arasındaki hidrojen bağları, film iç yapısı için önemli bir rol oynamaktadır. Hbs gibi bitki özütlerinin polimer film yapılarına dahil edilmesi yeni hidrojen bağları üretebilmektedir ve bu da iç yapıda değişikliklere neden olmaktadır. 800 cm⁻¹ ile 900 cm⁻¹ arasında gözlenen pikler polisakkarit yapılarına ait karakteristik piklerdir. Tüm örneklerin spektrumlarında 3000-3600 cm⁻¹'de gözlenen güçlü

absorpsiyon bandı, film yapılarındaki hidroksil O – H gruplarını göstermektedir. Sodyum aljinat yapısında olan C=O grubu spektrumlarda 1580 cm^{-1} 'de pik meydana getirmiştir. Hbs bitki özütü içermeyen (Şekil 4.14 (a)) ve farklı oranlarda Hbs özütü içeren (Şekil 4.14 (b, c, d)) aljinat filmlerin spektrumlarında C-H grubunun gerilim bantlarının sırasıyla 2918 cm^{-1} , 2919 cm^{-1} , 2925 cm^{-1} ve 2924 cm^{-1} olduğu belirlenmiştir.

Farklı oranlarda Hbs özütü içeren filmlerin spektrumlarında 1600 ile 1700 cm^{-1} 'de oluşan yeni piklerin bitki özütüne ait karakteristik absorpsiyon bantları olduğu keşfedilmiştir. Oluşan yeni pikler aromatik C=C çift bağının varlığını göstermektedir. (Sedyadi ve ark., 2016) Bu da Hbs içerisindeki polifenollerin aljinat ile etkileşime girerek yapıya katıldığını göstermektedir. Aljinat filmlerinde Hbs oranının artmasına bağlı olarak gözlemlenen 1500 cm^{-1} 'deki pik ucu absorpsiyonunun azalması film yapılarındaki azalan su içeriğini işaret edebilmektedir.

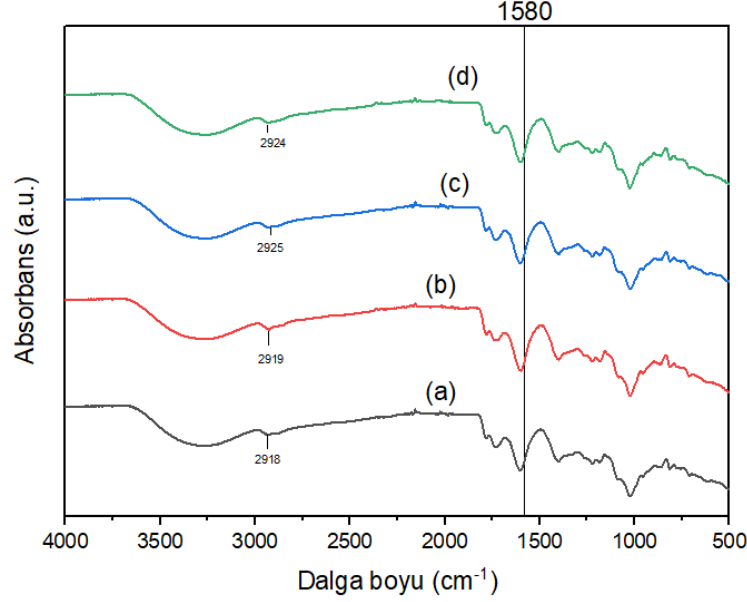


Şekil 4.14. (a) Hbs özütü içermeyen, (b) %1 Hbs özütü, (c) %3 Hbs özütü, (d) %5 Hbs özütü içeren filmlerin FTIR absorpsiyon spektrumları

4.7.2. Farklı oranlarda gliserol içeren aljinat filmlerin FTIR analizi

Farklı oranlarda gliserol içeren %3 Hbs aljinat filmlerin absorpsiyon spektrumları Şekil 4.15'te gösterilmiştir. *Hibiscus sabdariffa* bitkisine ait karakteristik olan bantlara tüm film örneklerinde rastlanmıştır. Değişen gliserol oranlarına bağlı olarak spektrumlarda bariz bir farka rastlanmamıştır. Farklı oranlarda Hbs özütü içeren

film örneklerine benzer şekilde sonuçlar elde edilmiştir. O – H ve C – H gruplarının bantları sırasıyla yaklaşık 3200 cm^{-1} ve 2900 cm^{-1} 'de gözlenmektedir. 1580 cm^{-1} ile 1400 cm^{-1} arasındaki pik – COO – grubuna aittir.



Şekil 4.15. (a) Gliserol içermeyen, (b) %10 Gli, (c) %20 Gli ve (d) %30 Gli içeren %3 Hbs özütü katkılı filmlerin FTIR absorpsiyon spektrumları

4.8. Mekanik Testler

Biyobozunur filmlerin mekanik özellikleri, filmlerin kimyasal yapısı ile ilgili bir ölçüttür. İyi bir mekanik mukavemete ve esnekliğe sahip filmler, genellikle gıda paketlenme uygulamaları için gıda ürünlerinin taşınması ve depolanması noktasında; yara örtüsü uygulamalarında etkin kullanımda dış gerilime dayanması için gereklidir. Gerilme mukavemeti ve kopmada uzama filmlerin dayanıklılığını ve esnekliğini tasvir etmek için kullanılmaktadır. (Dou ve ark., 2018) Test edilen filmlerin gerilme mukavemeti (TS) ve uzama yüzdesi (%E) değerleri Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10'da sunulmuştur.

TS; bir filmin kırılmadan hemen önceki maksimum çekme kuvvetidir. (Tharanathan, 2003) %E ise; bir filmin uzatılması sırasındaki maksimum uzunluk değişimidir.

4.8.1. Farklı oranlarda Hbs özütü içeren aljinat filmlerin mekanik testleri

Hbs özütü içeriğinin aljinat bazlı filmlerin mekanik davranışı üzerindeki etkisi, farklı endüstriyel uygulamalarda kabul edilen TS ve %E değerleri açısından araştırılmıştır. Hbs özütü içermeyen kalsiyum aljinat filmlerinin TS ve %E değerleri sırasıyla 39.78 ± 7.81 MPa ve $\%3.5 \pm 0.5$ olarak ölçülmüştür. (Çizelge 4.9) Hbs özütü konsantrasyonunun hacimce %0'dan %3'e yükseltilmesi aljinat filmlerin TS ve %E değerlerinde anlamlı bir azalışa sebep olmuştur. Gómez-Aldapa ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmaya benzer şekilde bitki özütünün konsantrasyonunun artmasıyla gerilme mukavemetinde anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. Bu durumun sebebi; film formülasyonuna dahil edilen bitki özütlerinin filmde heterojen bir yapıya neden olmasıdır. (Mir ve ark., 2018) Kim ve ark. (2020) da çalışmalarında nişasta filmlere goji berry özütü (GBE) ekleyerek gıda ambalajlama uygulamaları için filmlerin mekanik özelliklerine bakmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarda bitki özütü içeriğindeki artışla birlikte nişasta esaslı filmlerin TS değerlerinin 26.32 ± 2.30 MPa'dan 12.42 ± 0.68 MPa'ya düştüğünü rapor etmişlerdir. %5 Hbs özütü içeriğine sahip aljinat filmlerin kırılmalıklarının artması sebebiyle mekanik ölçümleri yapılamamıştır.

Hbs özütü konsantrasyonlarının artırıldığı filmlerin %E değerleri istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir. Benzer azalma eğilimine Mehdizadeh ve ark. (2020) kitosan-nişasta film matrislerine nar kabuğu özütü ilave ettiklerinde rastlamışlardır. Polifenol içeren bazı bitki özleri plastikleştirme etkileriyle film yapısına katkı sağlayabilmektedir. (Kim ve ark., 2020) Hbs bitki özütünde bulunan bazı flavonoid bileşenleri polimer zincirleri arasındaki moleküler arası etkileşimi zayıflatmakta ve kopma anındaki uzamasını arttırmaktadır. (Corrales ve ark., 2009)

Sonuç olarak Hbs özütü, sodyum aljinat filmlerinin sertliğini arttıran ve esnekliğini azaltan bir çapraz bağlama ajanı olarak kullanılabilmektedir.

Çizelge 4.9. Farklı oranlarda Hbs özütü içeren filmlerin TS ve %E değerleri ¹

Filmler	TS (MPa)	%E
0 Hbs (<i>kontrol</i>)	39.78 ± 7.81 a	3.5 ± 0.5 a
1 Hbs	9.64 ± 1.49 b	1.17 ± 0.05 b
3 Hbs	5.58 ± 2.08 b	0.83 ± 0.1 b
5 Hbs	TE	TE

¹ Aynı sütundaki farklı harflere sahip değerler istatistiksel olarak anlamlı oranda farklıdır. ($p < 0.05$)
TE: Tespit Edilememiştir.

4.8.2. Farklı oranlarda gliserol içeren aljinat filmlerin mekanik testleri

Farklı oranlarda gliserol içeren filmlerin TS ve %E değerleri Çizelge 4.10'de verilmiştir. Gerilme mukavemetleri ve uzama yüzdeleri sırasıyla 7.19 ile 5.58 MPa ve %0.83 ile %1.23 aralığında değişim göstermiştir. Elde edilen sonuçlarda gliserol konsantrasyonunun değişiminin anlamlı farklar meydana getirmediği gözlenmiştir. %10 Gliserol içeren aljinat filmlerde meydana gelen kırılmalık sebebiyle ölçümü yapılamamıştır.

Kontrol filmine kıyasla sadece gliserol oranının %30 olduğu aljinat filmlerinin uzama yüzdesi anlamlı bir fark oluşturarak artış göstermiştir.

Çizelge 4.10. Farklı oranlarda gliserol içeren filmlerin TS ve %E değerleri ¹

Filmler	TS (MPa)	%E
0 Gli (<i>kontrol</i>)	7.19 ± 1.25 a	0.89 ± 0.06 a
10 Gli	TE	TE
20 Gli	5.58 ± 2.08 a	0.83 ± 0.1 a
30 Gli	5.63 ± 1.33 a	1.23 ± 0.1 b

¹ Aynı sütundaki farklı harflere sahip değerler istatistiksel olarak anlamlı oranda farklıdır. (p<0.05) TE: Tespit Edilememiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Biyolojik bozunurluk ve biyoyuymuluk gibi özelliklere sahip polimerlerin, önemli endüstriyel uygulamalarda potansiyele sahip, çok yönlü malzemeler olduğu kanıtlanmıştır. Bu polimerlerin kullanılabilirliği, geliştirilmelerindeki çabayı ortaya koymaktadır. Doğal polimerlerden olan aljinat biyoyumlu, biyobozunur ve hafif jelleşme özellikleri sayesinde;

- Yara örtüleri, in vitro hücre kültürleri ve doku mühendisliği gibi medikal uygulamalarında,
- Kontrollü ilaç salım sistemleri gibi farmakolojik uygulamalarda,
- Ambalajlama ve yenilebilir gıda endüstrisi uygulamalarında büyük faydası ve potansiyeli bulunmaktadır.

Bu tez çalışmasında gliserol, çapraz bağlama ajanı ve *Hibiscus sabdariffa* bitkisi özütü katkılı aljinat hidrojel filmleri üretilmiştir. Hbs özütü katkısı ile antibakteriyel nitelik kazandırılan filmlere gliserol ilave edilerek aynı zamanda esneklik kazandırılmış ve başarıyla üretilen filmlerin karakterizasyonları yapılmıştır. İyi derecede su buharı geçirgenliği, şişme, çözünme, kalınlık ve mekanik özelliklere sahip filmler elde etmek için bu katkıların uygun miktarlarda kombine edilmesi gerekmektedir. Tamamen doğal kökenli maddeler olan aljinat ve *Hibiscus sabdariffa* bitkisi ile oluşturulan kompozit filmler biyoyumlu, biyobozunur ve sitotoksik olmayan ürünlerdir. Bu nedenle elde edilen filmler biyolojik tüm uygulamalarda güvenilir bir şekilde kullanılabilir. Filmlerin kullanılabileceği gerek yara ortamı gibi gerekse de gıda temaslı ambalajlamalar olsun kontaminasyon önemli bir risk oluşturmaktadır. Bu aşamada elde edilen filmlerin antibakteriyel aktivite göstermeleri önem kazanmaktadır. Bu tez çalışması ile *Hibiscus sabdariffa* bitki özütünün biyoyumlu ve biyobozunur aljinat filmlere başarıyla dahil edilebileceği ve yüksek antibakteriyel aktivite sergilenebileceği gösterilmiştir. Kalsiyum aljinat filmlerine Hbs ilavesi su içeriğinde önemli değişiklikler oluşturmazken genel olarak şişme potansiyelinde azalış, çözünürlük ve su buharı geçirgenliği değerlerinde ise artışa sebep olmuştur. Gliserol bir plastikleştirici olarak filmlere esneklik kazandırmış ve hidrofilik özelliğinden kaynaklı olarak sudaki çözünürlükleri arttırmıştır. Aljinat bazlı kompozit filmlerdeki Hbs özütü miktarındaki

artış film şeffaflığını etkileyerek opaklığını nitel olarak bakıldığında arttırdığı görülmüştür. Farklı antibakteriyel ajan ve polimerlerle yapılan literatürdeki çalışmalar incelendiğinde daha önce aljinat ve *Hibiscus* bitki özütü kompozisyonu bulunmamış olup ilk kez bu tez kapsamında aljinat – *Hibiscus* kompozit filmler üretilerek literatüre katkı sağlanmıştır.

5.2 Öneriler

Bu çalışma ile dünyada oluşan sentetik atıkların bir miktar bile olsa azaltılarak alternatif uygulamaların kullanılabilmesi öngörülmektedir. Geleceğe bakıldığında pek çok kullanım alanı olan aljinat esaslı malzemelerin önemli ölçüde gelişmesi muhtemeldir. Geliştirilen malzeme kompozitlerinin endüstriyel uygulamalarda kullanılabilmesi adına mekanik ve dayanıklılık özelliklerini iyileştirmek için daha fazla araştırmalar yapılmalıdır. Aljinatın temel özelliklerine ilişkin mevcut anlayışın ilerletilmesi ekoloji, sosyal, tıp ve sanayi alanlarında ilerlemeleri sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Doğal polimerlerin çevreye verdikleri minimum zarar ile hem medikal sektöründe hem de ambalajlama sektöründe daha aktif yer alması gelecek nesillere daha yaşanılır bir ortam sunabilecektir. Biyolojik olarak parçalanabilen ve çevre dostu olan ürünlerin yaygınlaştırılması gerekmektedir. Yenilebilir ve biyolojik olarak parçalanabilen ürünler çevresel sorunların azaltılmasında kilit rol oynamaktadır. Günümüzde bitki özütü katkılı polimer film çalışmalarına büyük bir ilgi bulunmaktadır. Bu yeni aktif film teknolojisinin ticari olarak geliştirilmesinin hedeflenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdelghany, A. M., Menazea, A. A. ve Ismail, A. M., 2019, Synthesis, characterization and antimicrobial activity of Chitosan/Polyvinyl Alcohol blend doped with Hibiscus Sabdariffa L. extract, *Journal of Molecular Structure*, 1197, 603-609.
- Al-Remawi, d. m., 2012, Sucrose as a Crosslinking Modifier for the Preparation of Calcium Alginate Films via External Gelation, *Journal of Applied Sciences*, 12, 727-735.
- Al Awwaly, K. U., Manab, A. ve Wahyuni, E., 2010, Pembuatan edible film protein whey: Kajian rasio protein dan gliserol terhadap sifat fisik dan kimia, *Jurnal Ilmu dan Teknologi Hasil Ternak*, 5, 45-56.
- Albert, A., Salvador, A. ve Fiszman, S. M., 2012, A film of alginate plus salt as an edible susceptor in microwaveable food, *Food Hydrocolloids*, 27 (2), 421-426.
- Ali, B. H., Al Wabel, N. ve Blunden, G., 2005, Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of Hibiscus sabdariffa L.: A review, *Phytotherapy Research*, 19 (5), 369-375.
- Alian, A., Al Ashwah, E. ve Eid, N. C. U. E. F. o. A., 1983, Antimicrobial properties of some Egyptian nonalcoholic beverages with special reference to tamarind [Egypt], v. 11.
- Aloui, H., Deshmukh, A. R., Khomlaem, C. ve Kim, B. S., 2021, Novel composite films based on sodium alginate and gallnut extract with enhanced antioxidant, antimicrobial, barrier and mechanical properties, *Food Hydrocolloids*, 113, 106508.
- Appendini, P. ve Hotchkiss, J. H., 2002, Review of antimicrobial food packaging, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3 (2), 113-126.
- Azarakhsh, N., Osman, A., Ghazali, H. M., Tan, C. P. ve Mohd Adzahan, N., 2014, Lemongrass essential oil incorporated into alginate-based edible coating for shelf-life extension and quality retention of fresh-cut pineapple, *Postharvest Biology and Technology*, 88, 1-7.
- Azeredo, H. M. C. ve Waldron, K. W., 2016, Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact – A review, *Trends in Food Science & Technology*, 52, 109-122.
- Babu, V. R., Kim, C., Kim, S., Ahn, C. ve Lee, Y.-I., 2010, Development of semi-interpenetrating carbohydrate polymeric hydrogels embedded silver nanoparticles and its facile studies on E. coli, *Carbohydrate Polymers*, 81 (2), 196-202.
- Benavides, S., Villalobos-Carvajal, R. ve Reyes, J. E., 2012, Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration, *Journal of Food Engineering*, 110 (2), 232-239.

- Berberoglu, M., 2018, Aljinat filmlerinde dış çapraz bağlama ve gliserin katkısının yapı ve fiziksel özelliklere etkileri, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, 23-70.
- Besbes, N., Joffraud, J.-J., Ben, K. I., Amri, M. ve Sadok, S., 2016, Antimicrobial and antioxidant activities of cactus polyphenols extract on seafood preservation, *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 6 (6), 1612-1620.
- Bierhalz, A. C. K., Westin, C. B. ve Moraes, Â. M., 2016, Comparison of the properties of membranes produced with alginate and chitosan from mushroom and from shrimp, *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 496-504.
- Bioplastics, E., 2017, Global production capacities of bioplastics 2017-2022, <https://www.european-bioplastics.org>.
- Blanco-Pascual, N., Montero, M. P. ve Gómez-Guillén, M. C., 2014, Antioxidant film development from unrefined extracts of brown seaweeds *Laminaria digitata* and *Ascophyllum nodosum*, *Food Hydrocolloids*, 37, 100-110.
- Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N. E. ve Eccleston, G. M., 2008, Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97 (8), 2892-2923.
- Borrás-Linares, I., Fernández-Arroyo, S., Arráez-Roman, D., Palmeros-Suárez, P. A., Del Val-Díaz, R., Andrade-González, I., Fernández-Gutiérrez, A., Gómez-Leyva, J. F. ve Segura-Carretero, A., 2015, Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*), *Industrial Crops and Products*, 69, 385-394.
- Canales, M., Hernandez, T., Serrano, R., Hernandez, L. B., Duran, A., Rios, V., Sigrist, S., Hernandez, H. L., Garcia, A. M., Angeles-Lopez, O., Fernandez-Araiza, M. A. ve Avila, G., 2007, Antimicrobial and general toxicity activities of *Gymnosperma glutinosum*: a comparative study, *J Ethnopharmacol*, 110 (2), 343-347.
- Cha, D. S. ve Chinnan, M. S., 2004, Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 44 (4), 223-237.
- Cheikh, D., Martín-Sampedro, R., Majdoub, H. ve Darder, M., 2020, Alginate bionanocomposite films containing sepiolite modified with polyphenols from myrtle berries extract, *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2079-2088.
- Chlebowska-Smigiel A. , Gniewosz M. ve M., G., 2008, An attempt to apply a pullulan coating to reduce oxidative changes and mass loss in nuts during storage, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 58 (1), 79-84.
- Coloplast, Comfeel Plus, <https://www.coloplast.com>, [Ziyaret tarihi: 23 Ocak 2021].
- Corrales, M., Han, J. H. ve Tauscher, B., 2009, Antimicrobial properties of grape seed extracts and their effectiveness after incorporation into pea starch films, *International Journal of Food Science and Technology*, 44 (2), 425-433.

- Crossingham, Y. J., Kerr, P. G. ve Kennedy, R. A., 2014, Comparison of selected physico-chemical properties of calcium alginate films prepared by two different methods, *Int J Pharm*, 473 (1-2), 259-269.
- Crow, B. B. ve Nelson, K. D., 2006, Release of bovine serum albumin from a hydrogel-cored biodegradable polymer fiber, *Biopolymers*, 81 (6), 419-427.
- Cruz-Gálvez, A. M., Castro-Rosas, J., Rodríguez-Marín, M. L., Cadena-Ramírez, A., Tellez-Jurado, A., Tovar-Jiménez, X., Chavez-Urbiola, E. A., Abreu-Corona, A. ve Gómez-Aldapa, C. A., 2018, Antimicrobial activity and physicochemical characterization of a potato starch-based film containing acetic and methanolic extracts of *Hibiscus sabdariffa* for use in sausage, *Lwt*, 93, 300-305.
- da Silva, M. A., Krause Bierhalz, A. C. ve Guenter Kieckbusch, T., 2009, *Carbohydr. Polym.*, 77.
- De Carvalho, R. A. ve Grosso, C. R. F., 2004, Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde, *Food Hydrocolloids*, 18 (5), 717-726.
- de Moura, M. R., Lorevice, M. V., Mattoso, L. H. ve Zucolotto, V., 2011, Highly stable, edible cellulose films incorporating chitosan nanoparticles, *J Food Sci*, 76 (2), N25-29.
- Del Nobile, M. A., Lucera, A., Costa, C. ve Conte, A., 2012, Food applications of natural antimicrobial compounds, *Frontiers in Microbiology*, 3 (287).
- Doppalapudi, S., Jain, A., Khan, W. ve Domb, A. J., 2014, Biodegradable polymers—an overview, *Polymers for Advanced Technologies*, 25 (5), 427-435.
- Dou, L., Li, B., Zhang, K., Chu, X. ve Hou, H., 2018, Physical properties and antioxidant activity of gelatin-sodium alginate edible films with tea polyphenols, *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 1377-1383.
- Draget, K. I. ve Taylor, C., 2011, Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications, *Food Hydrocolloids*, 25 (2), 251-256.
- Durango, A. M., Soares, N. F. F., Benevides, S., Teixeira, J., Carvalho, M., Wobeto, C. ve Andrade, N. J., 2006, Development and evaluation of an edible antimicrobial film based on yam starch and chitosan, *Packaging Technology and Science*, 19 (1), 55-59.
- Epand, R. M., Walker, C., Epand, R. F. ve Magarvey, N. A., 2016, Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858 (5), 980-987.
- Esen, M., 2008, *Verbascum pinetorum* (Boiss.) O. Kuntze Bitki Ekstraktının Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Antakya / Hatay, 1-6.
- Farris, S., Schaich, K. M., Liu, L., Piergiovanni, L. ve Yam, K. L., 2009, Development of polyion-complex hydrogels as an alternative approach for the production of

- bio-based polymers for food packaging applications: a review, *Trends in Food Science & Technology*, 20 (8), 316-332.
- Garavand, F., Rouhi, M., Razavi, S. H., Cacciotti, I. ve Mohammadi, R., 2017, Improving the integrity of natural biopolymer films used in food packaging by crosslinking approach: A review, *Int J Biol Macromol*, 104 (Pt A), 687-707.
- Gardner, R. L., 2004, Application of Alginate Gels to the Study of Mammalian Development, *Methods in Molecular Biology*, 254, 383-392.
- Geyer, R., Jambeck, J. R. ve Law, K. L., 2017, Production, use, and fate of all plastics ever made, (2375-2548 (Electronic)).
- Ghanbarzadeh, B. ve Oromiehi, A. R., 2008, Biodegradable biocomposite films based on whey protein and zein: barrier, mechanical properties and AFM analysis, *Int J Biol Macromol*, 43 (2), 209-215.
- Gómez-Aldapa, C. A., Díaz-Cruz, C. A., Castro-Rosas, J., Jiménez-Regalado, E. J., Velazquez, G., Gutierrez, M. C. ve Aguirre-Loredo, R. Y., 2020, Development of Antimicrobial Biodegradable Films Based on Corn Starch with Aqueous Extract of *Hibiscus sabdariffa* L., *Starch - Stärke*.
- Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C. ve Thom, D., 1973, Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model, *FEBS letters*, 32 (1), 195-198.
- Hacıoğlu, Ö., 2005, *Achillea* (Anthemideae) cinsi *Filipendulinae* ve *Santolinoidea* seksiyonunlarına ait yedi türün uçucu yağ kompozisyonları ve antimikrobiyal aktivite özellikleri, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü* Balıkesir.
- Haug, A. ve Smidsrød, O., 1970, Selectivity of Some Anionic Polymers for Divalent Metal Ions., *Acta Chemica Scandinavica*, 24, 843-854.
- Hecht, H. ve Srebnik, S., 2016, Structural Characterization of Sodium Alginate and Calcium Alginate, *Biomacromolecules*, 17 (6), 2160-2167.
- Herrera-Arellano, A., Flores-Romero, S., Chávez-Soto, M. A. ve Tortoriello, J., 2004, Effectiveness and tolerability of a standardized extract from *Hibiscus sabdariffa* in patients with mild to moderate hypertension: a controlled and randomized clinical trial, *Phytomedicine*, 11 (5), 375-382.
- Higginbotham, K. L., Burris, K. P., Zivanovic, S., Davidson, P. M. ve Stewart, C. N., Jr., 2014, Antimicrobial activity of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extracts against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in a microbiological medium and milk of various fat concentrations, *J Food Prot*, 77 (2), 262-268.
- Hoffman, A. S., 2002, Hydrogels for biomedical applications, *Advanced drug delivery reviews*, 1, 3-12.
- Holser, R. A., Bost, G. ve Van Boven, M., 2004, Phytosterol Composition of Hybrid *Hibiscus* Seed Oils, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52, 2546-2548.

- Imre, B., Garcia, L., Puglia, D. ve Vilaplana, F., 2019, Reactive compatibilization of plant polysaccharides and biobased polymers: Review on current strategies, expectations and reality, *Carbohydr Polym*, 209, 20-37.
- Ingar Draget, K., Østgaard, K. ve Smidsrød, O., 1990, Homogeneous alginate gels: A technical approach, *Carbohydrate Polymers*, 14 (2), 159-178.
- Jagannath, J. H., Radhika, M., Nanjappa, C., Murali, H. S. ve Bawa, A. S., 2006, Antimicrobial, mechanical, barrier, and thermal properties of starch-casein based, neem (*Melia azadirachta*) extract containing film, *Journal of Applied Polymer Science*, 101 (6), 3948-3954.
- Jamroz, E., Juszczak, L. ve Kucharek, M., 2018, Investigation of the physical properties, antioxidant and antimicrobial activity of ternary potato starch-furcellaran-gelatin films incorporated with lavender essential oil, *Int J Biol Macromol*, 114, 1094-1101.
- Janik, H., Sienkiewicz, M., Przybytek, A., Guzman, A., Kucinska-Lipka, J. ve Kosakowska, A., 2018, Novel Biodegradable Potato Starch-based Compositions as Candidates in Packaging Industry, Safe for Marine Environment, *Fibers and Polymers*, 19 (6), 1166-1174.
- Jejurikar, A., Lawrie, G., Martin, D. ve Grondahl, L., 2011, A novel strategy for preparing mechanically robust ionically cross-linked alginate hydrogels, *Biomed Mater*, 6 (2), 025010.
- Jiang, T., Feng, L. ve Wang, Y., 2013, Effect of alginate/nano-Ag coating on microbial and physicochemical characteristics of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) during cold storage, *Food Chemistry*, 141 (2), 954-960.
- Jo, Y. K. ve Lee, D., 2020, Biopolymer Microparticles Prepared by Microfluidics for Biomedical Applications, *Small*, 16 (9), e1903736.
- Ju, A., Baek, S. K., Kim, S. ve Song, K. B., 2019, Development of an antioxidative packaging film based on khorasan wheat starch containing moringa leaf extract, *Food Sci Biotechnol*, 28 (4), 1057-1063.
- Kanmani, P. ve Rhim, J.-W., 2014, Development and characterization of carrageenan/grapefruit seed extract composite films for active packaging, *International Journal of Biological Macromolecules*, 68, 258-266.
- Karan, H., Funk, C., Grabert, M., Oey, M. ve Hankamer, B., 2019, Green Bioplastics as Part of a Circular Bioeconomy, *Trends in Plant Science*, 24 (3), 237-249.
- Kaygusuz, H., Uysal, M., Adımcılar, V. ve Erim, F. B., 2015a, Natural alginate biopolymer montmorillonite clay composites for vitamin B2 delivery, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 30 (1), 48-56.
- Kaygusuz, H., Uzaşçı, S. ve Erim, F. B., 2015b, Removal of Fluoride from Aqueous Solution Using Aluminum Alginate Beads, *CLEAN - Soil, Air, Water*, 43 (5), 724-730.

- Kaygusuz, H., Torlak, E., Akin-Evingur, G., Ozen, I., von Klitzing, R. ve Erim, F. B., 2017, Antimicrobial cerium ion-chitosan crosslinked alginate biopolymer films: A novel and potential wound dressing, *Int J Biol Macromol*, 105 (Pt 1), 1161-1165.
- Kim, H., Yang, H. J., Lee, K. Y., Beak, S. E. ve Song, K. B., 2017, Characterization of red ginseng residue protein films incorporated with hibiscus extract, *Food Sci Biotechnol*, 26 (2), 369-374.
- Kim, S., Baek, S. K., Go, E. ve Song, K. B., 2018, Application of Adzuki Bean Starch in Antioxidant Films Containing Cocoa Nibs Extract, *Polymers (Basel)*, 10 (11).
- Kim, S., Kang, J.-H. ve Song, K. B., 2020, Development of a Sword Bean (*Canavalia gladiata*) Starch Film Containing Goji Berry Extract, *Food and Bioprocess Technology*, 13 (5), 911-921.
- Kloster, G. A., Muraca, D., Mosiewicki, M. A. ve Marcovich, N. E., 2017, Magnetic composite films based on alginate and nano-iron oxide particles obtained by synthesis “in situ”, *European Polymer Journal*, 94, 43-55.
- Lansdown, A. B. G., 2002, Calcium: A potential central regulator in wound healing in the skin, *Wound Repair and Regeneration*, 10 (5), 271-285.
- Lee, K. Y. ve Mooney, D. J., 2001, Hydrogels for tissue engineering, *Chemical Reviews*, 101 (7), 1869-1879.
- Lee, K. Y. ve Mooney, D. J., 2012, Alginate: Properties and biomedical applications, *Progress in Polymer Science*, 37 (1), 106-126.
- Li, J., Han, Q., Chen, W. ve Ye, L., 2012, Antimicrobial activity of Chinese bayberry extract for the preservation of surimi, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92 (11), 2358-2365.
- Liakos, I., Rizzello, L., Scurr, D. J., Pompa, P. P., Bayer, I. S. ve Athanassiou, A., 2014, All-natural composite wound dressing films of essential oils encapsulated in sodium alginate with antimicrobial properties, *Int J Pharm*, 463 (2), 137-145.
- Liling, G., Di, Z., Jiachao, X., Xin, G., Xiaoting, F. ve Qing, Z., 2016, Effects of ionic crosslinking on physical and mechanical properties of alginate mulching films, *Carbohydr Polym*, 136, 259-265.
- Lindow, S. W., Regnéll, P., Sykes, J. ve Little, S., 2003, An open-label, multicentre study to assess the safety and efficacy of a novel reflux suppressant (gaviscon advance®) in the treatment of heartburn during pregnancy, *International Journal of Clinical Practice*, 57 (3), 175-179.
- Maganha, E. G., Halmenschlager, R. d. C., Rosa, R. M., Henriques, J. A. P., Ramos, A. L. L. d. P. ve Saffi, J., 2010, Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus *Hibiscus*, *Food Chemistry*, 118 (1), 1-10.

- Maizura, M., Fazilah, A., Norziah, M. H. ve Karim, A. A., 2007, Antibacterial activity and mechanical properties of partially hydrolyzed sago starch-alginate edible film containing lemongrass oil, *J Food Sci*, 72 (6), C324-330.
- Marie Arockianathan, P., Sekar, S., Sankar, S., Kumaran, B. ve Sastry, T. P., 2012, Evaluation of biocomposite films containing alginate and sago starch impregnated with silver nano particles, *Carbohydrate Polymers*, 90 (1), 717-724.
- Maryam Adilah, Z. A., Jamilah, B. ve Nur Hanani, Z. A., 2018, Functional and antioxidant properties of protein-based films incorporated with mango kernel extract for active packaging, *Food Hydrocolloids*, 74, 207-218.
- Mathew, S., Brahmakumar, M. ve Abraham, T. E., 2006, Microstructural imaging and characterization of the mechanical, chemical, thermal, and swelling properties of starch-chitosan blend films, *Biopolymers*, 82 (2), 176-187.
- McHugh, D. J., 2003, A guide to the seaweed industry, *FAO Fisheries Technical Paper* FAO, 441, 39-47.
- McKay, D. L., Chen, C. Y. O., Saltzman, E. ve Blumberg, J. B., 2010, Hibiscus Sabdariffa L. tea (tisane) lowers blood pressure in prehypertensive and mildly hypertensive adults, *Journal of Nutrition*, 140 (2), 298-303.
- Medina Jaramillo, C., González Seligra, P., Goyanes, S., Bernal, C. ve Famá, L., 2015, Biofilms based on cassava starch containing extract of yerba mate as antioxidant and plasticizer, *Starch - Stärke*, 67 (9-10), 780-789.
- Mehdizadeh, T., Tajik, H., Langroodi, A. M., Molaei, R. ve Mahmoudian, A., 2020, Chitosan-starch film containing pomegranate peel extract and Thymus kotschyanus essential oil can prolong the shelf life of beef, *Meat Science*, 163, 108073.
- Mir, S. A., Dar, B. N., Wani, A. A. ve Shah, M. A., 2018, Effect of plant extracts on the techno-functional properties of biodegradable packaging films, *Trends in Food Science & Technology*, 80, 141-154.
- Mohamed, R., Fernández, J., Pineda, M. ve Aguilar, M., 2007, Roselle (Hibiscus sabdariffa) seed oil is a rich source of γ -tocopherol, *Journal of Food Science*, 72 (3), S207-S211.
- Moohan, J., Stewart, S. A., Espinosa, E., Rosal, A., Rodríguez, A., Larrañeta, E., Donnelly, R. F. ve Domínguez-Robles, J., 2019, Cellulose Nanofibers and Other Biopolymers for Biomedical Applications. A Review, *Applied Sciences*, 10 (1).
- Myung, D., Waters, D., Wiseman, M., Duhamel, P. E., Noolandi, J., Ta, C. N. ve Frank, C. W., 2008, Progress in the development of interpenetrating polymer network hydrogels, *Polym Adv Technol*, 19 (6), 647-657.
- Norajit, K., Kim, K. M. ve Ryu, G. H., 2010, Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract, *Journal of Food Engineering*, 98 (3), 377-384.

- Nouri, L. ve Mohammadi Nafchi, A., 2014, Antibacterial, mechanical, and barrier properties of sago starch film incorporated with betel leaves extract, *International Journal of Biological Macromolecules*, 66, 254-259.
- Okeke, M. I., Iroegbu, C. U., Eze, E. N., Okoli, A. S. ve Esimone, C. O., 2001, Evaluation of extracts of the root of *Landolphia owerrience* for antibacterial activity, *J Ethnopharmacol*, 78 (2-3), 119-127.
- Olaleye, M. T., 2007, Cytotoxicity and antibacterial activity of Methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*, *Journal of Medicinal Plants Research*, 1, 9-13.
- Pattanashetti, N. A., Heggannavar, G. B. ve Kariduraganavar, M. Y., 2017, Smart Biopolymers and their Biomedical Applications, *Procedia Manufacturing*, 12, 263-279.
- Peng, Y., Wu, Y. ve Li, Y., 2013, Development of tea extracts and chitosan composite films for active packaging materials, *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 282-289.
- Peng, Y. ve Li, Y., 2014, Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films, *Food Hydrocolloids*, 36, 287-293.
- Pranoto, Y., Salokhe, V. M. ve Rakshit, S. K., 2005, Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil, v. 38.
- Reakasame, S. ve Boccaccini, A. R., 2018, Oxidized Alginate-Based Hydrogels for Tissue Engineering Applications: A Review, *Biomacromolecules*, 19 (1), 3-21.
- Rezvanian, M., Ahmad, N., Mohd Amin, M. C. ve Ng, S. F., 2017, Optimization, characterization, and in vitro assessment of alginate-pectin ionic cross-linked hydrogel film for wound dressing applications, *Int J Biol Macromol*, 97, 131-140.
- Rhim, J.-W., 2004, Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films, *LWT - Food Science and Technology*, 37 (3), 323-330.
- Rhim, J. W. ve Wang, L. F., 2013, Mechanical and water barrier properties of agar/kappa-carrageenan/konjac glucomannan ternary blend biohydrogel films, *Carbohydr Polym*, 96 (1), 71-81.
- Rios, J. L. ve Recio, M. C., 2005, Medicinal plants and antimicrobial activity, *J Ethnopharmacol*, 100 (1-2), 80-84.
- Robert J. Young ve Lovell, P. A., 2011, The origins of polymer science and the polymer industry, In: *Introduction to Polymers*, Eds, *CRC Press*, p. 3-20.
- Sadasivuni, K. K., Saha, P., Adhikari, J., Deshmukh, K., Ahamed, M. B. ve Cabibihan, J. J., 2019, Recent advances in mechanical properties of biopolymer composites: a review, *Polymer Composites*, 41 (1), 32-59.

- Salama, H. E., Abdel Aziz, M. S. ve Sabaa, M. W., 2018, Novel Biodegradable and Antibacterial Edible Films Based on Alginate and Chitosan Biguanidine Hydrochloride, *Int. J. Biol. Macromol.*, 116, 443-450.
- Seaweed, S. T., 2020, information on marine algae, <https://www.seaweed.ie/index.php>, [Ziyaret tarihi: 31 Aralık 2020].
- Sedyadi, E., Aini, S. K., Anggraini, D. ve Ekawati, D. P., 2016, Starch-Glycerol Based Edible Film and Effect of Rosella (*Hibiscus Sabdariffa* Linn) Extract and Surimi Dumbo Catfish (*Clarias gariepinus*) Addition on Its Mechanical Properties, *Biology, Medicine, & Natural Product Chemistry*, 5 (2).
- Shahzad, A., Khan, A., Afzal, Z., Umer, M. F., Khan, J. ve Khan, G. M., 2019, Formulation development and characterization of cefazolin nanoparticles-loaded cross-linked films of sodium alginate and pectin as wound dressings, *Int J Biol Macromol*, 124, 255-269.
- Shaili, T., Abdorreza, M. N. ve Fariborz, N., 2015, Functional, thermal, and antimicrobial properties of soluble soybean polysaccharide biocomposites reinforced by nano TiO₂, *Carbohydrate Polymers*, 134, 726-731.
- Silva, M. A. d., Bierhalz, A. C. K. ve Kieckbusch, T. G., 2009, Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca²⁺ ions: Effect of the plasticizer concentration, *Carbohydrate Polymers*, 77 (4), 736-742.
- Sindi, H. A., Marshall, L. J. ve Morgan, M. R. A., 2014, Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of *Hibiscus sabdariffa*, *Food Chemistry*, 164, 23-29.
- Sipahi, R. E., Castell-Perez, M. E., Moreira, R. G., Gomes, C. ve Castillo, A., 2013, Improved multilayered antimicrobial alginate-based edible coating extends the shelf life of fresh-cut watermelon (*Citrullus lanatus*), *LWT - Food Science and Technology*, 51 (1), 9-15.
- Siripatrawan, U. ve Noipha, S., 2012, Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages, *Food Hydrocolloids*, 27 (1), 102-108.
- Siripatrawan, U. ve Vitchayakitti, W., 2016, Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis, *Food Hydrocolloids*, 61, 695-702.
- Smidsrød, O., Glover, R. M. ve Whittington, S. G., 1973, The relative extension of alginates having different chemical composition, *Carbohydrate Research*, 27 (1), 107-118.
- Song, Y., Liu, L., Shen, H., You, J. ve Luo, Y., 2011, Effect of sodium alginate-based edible coating containing different anti-oxidants on quality and shelf life of refrigerated bream (*Megalobrama amblycephala*), *Food Control*, 22 (3-4), 608-615.

- Şen, C., 2011, Hibiscus sabdariffa L. bitkisinin antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, *Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Edirne, 75.
- Tajik, H., Aminzare, M., Mounesi Raad, T., Hashemi, M., Hassanzad Azar, H., Raeisi, M. ve Naghili, H., 2015, Effect of Zataria multiflora Boiss Essential Oil and Grape Seed Extract on the Shelf Life of Raw Buffalo Patty and Fate of Inoculated *Listeria monocytogenes*, *Journal of Food Processing and Preservation*, 39 (6), 3005-3013.
- Takala, P. N., Vu, K. D., Salmieri, S., Khan, R. A. ve Lacroix, M., 2013, Antibacterial effect of biodegradable active packaging on the growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in fresh broccoli stored at 4 °C, *LWT - Food Science and Technology*, 53 (2), 499-506.
- Talón, E., Trifkovic, K. T., Nedovic, V. A., Bugarski, B. M., Vargas, M., Chiralt, A. ve González-Martínez, C., 2017, Antioxidant edible films based on chitosan and starch containing polyphenols from thyme extracts, *Carbohydrate Polymers*, 157, 1153-1161.
- Tan, Y. M., Lim, S. H., Tay, B. Y., Lee, M. W. ve Thian, E. S., 2015, Functional chitosan-based grapefruit seed extract composite films for applications in food packaging technology, *Materials Research Bulletin*, 69, 142-146.
- Tavassoli-Kafrani, E., Shekarchizadeh, H. ve Masoudpour-Behabadi, M., 2016, Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans, *Carbohydr Polym*, 137, 360-374.
- Tepsorn, R., 2009, Antimicrobial Activity of Thai Traditional Medicinal Plants Extract Incorporated Alginate-Tapioca Starch Based Edible Films against Food Related Bacteria Including Foodborne Pathogens, Doktor der Agrarwissenschaften, *Institute for Environmental and Animal Hygiene and Veterinary Medicine (with Animal Clinic), Faculty of Agricultural Sciences University of Hohenheim*, Pattani, Thailand 370.
- Tharanathan, R. N., 2003, Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future, *Trends in Food Science and Technology*, 14 (3), 71-78.
- Thomas, A., Harding, K. G. ve Moore, K., 2000, Alginates from wound dressings activate human macrophages to secrete tumour necrosis factor-alpha, *Biomaterials*, 21 (17), 1797-1802.
- Tønnesen, H. H. ve Karlsen, J., 2002, Alginate in drug delivery systems, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28 (6), 621-630.
- Tropicals, T., 2020, TROPICAL PLANT CATALOG, https://toptropicals.com/catalog/uid/hibiscus_sabdariffa.htm, [Ziyaret tarihi: 18 Aralık 2020].
- Tsai, P.-J., McIntosh, J., Pearce, P., Camden, B. ve Jordan, B. R., 2002, Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) extract, *Food Research International*, 35 (4), 351-356.

- Ture, H., 2019, Characterization of hydroxyapatite-containing alginate-gelatin composite films as a potential wound dressing, *Int J Biol Macromol*, 123, 878-888.
- Uthaya Kumar, U. S., Paridah, M. T., Owolabi, F. A. T., Gopakumar, D. A., Rizal, S., Amirul, A. A., Rahman, A. A., Alfatah, T., Mistar, E. M., Aprilia, N. A. S. ve Khalil, H. P. S. A., 2019, Neem leaves extract based seaweed bio-degradable composite films with excellent antimicrobial activity for sustainable packaging material, *BioResources*, 14 (1), 700-713.
- Valdés, A., Ramos, M., Beltrán, A., Jiménez, A. ve Garrigós, M. C., 2017, State of the art of antimicrobial edible coatings for food packaging applications, *Coatings*, 7 (4).
- Vargas-León, E. A., Díaz-Batalla, L., González-Cruz, L., Bernardino-Nicanor, A., Castro-Rosas, J., Reynoso-Camacho, R. ve Gómez-Aldapa, C. A., 2018, Effects of acid hydrolysis on the free radical scavenging capacity and inhibitory activity of the angiotensin converting enzyme of phenolic compounds of two varieties of jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), *Industrial Crops and Products*, 116, 201-208.
- Wang, K., Lim, P. N., Tong, S. Y. ve Thian, E. S., 2019, Development of grapefruit seed extract-loaded poly(ϵ -caprolactone)/chitosan films for antimicrobial food packaging, *Food Packaging and Shelf Life*, 22, 100396.
- Wang, L.-F., Shankar, S. ve Rhim, J.-W., 2017, Properties of alginate-based films reinforced with cellulose fibers and cellulose nanowhiskers isolated from mulberry pulp, *Food Hydrocolloids*, 63, 201-208.
- Wang, L. F. ve Rhim, J. W., 2015, Preparation and application of agar/alginate/collagen ternary blend functional food packaging films, *Int J Biol Macromol*, 80, 460-468.
- Wang, S., Marcone, M., Barbut, S. ve Lim, L. T., 2012, The Impact of Anthocyanin-Rich Red Raspberry Extract (ARRE) on the Properties of Edible Soy Protein Isolate (SPI) Films, *Journal of Food Science*, 77 (4), C497-C505.
- Wroblewska-Krepsztul, J., Rydzkowski, T., Michalska-Pozoga, I. ve Thakur, V. K., 2019, Biopolymers for Biomedical and Pharmaceutical Applications: Recent Advances and Overview of Alginate Electrospinning, *Nanomaterials (Basel)*, 9 (3).
- Yang, M., Xia, Y., Wang, Y., Zhao, X., Xue, Z., Quan, F., Geng, C. ve Zhao, Z., 2016, Preparation and property investigation of crosslinked alginate/silicon dioxide nanocomposite films, *Journal of Applied Polymer Science*, 133 (22).
- Zhang, L., Zeng, Y. ve Cheng, Z., 2016, Removal of heavy metal ions using chitosan and modified chitosan: A review, *Journal of Molecular Liquids*, 214, 175-191.
- Zhang, Y., Ma, Q., Critzer, F., Davidson, P. M. ve Zhong, Q., 2015, Physical and antibacterial properties of alginate films containing cinnamon bark oil and soybean oil, *LWT - Food Science and Technology*, 64 (1), 423-430.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Elif Büşra Zorlu

