

UÇUCU YAĞ İÇEREN KİTOSAN BAZLI FİLMLERİN KARAKTERİZASYONU

Ece Söğüt*, Atıf Can Seydim

Süleyman Demirel Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta/Türkiye

Geliş / Received: 26.03.2018; Kabul / Accepted: 02.06.2018; Online baskı / Published online: 05.07.2018

Söğüt, E., Seydim, A.C. (2018). Uçucu yağ içeren kitosan bazlı filmlerin karakterizasyonu. *GIDA* (2018) 43 (4): 624-634 doi: 10.15237/gida.GD18040

Söğüt, E., Seydim, A.C. (2018). Characterization of chitosan based films incorporated with essential oils. *GIDA* (2018) 43 (4): 624-634 doi: 10.15237/gida.GD18040

ÖZ

Bu çalışmada, kekik yağı (TO, %2), üzüm çekirdeği yağı (GSO, %2) ve nar çekirdeği yağı (PSO, %2) eklenmiş kitosan (CH) filmler hazırlanmıştır. Film örnekleri, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile elde edilen görüntüleri, su buharı geçirgenliği (WVP), mekanik testler ve optik özellikler ile karakterize edilmiştir. Antimikrobiyel aktivite ve filmlerin salım davranışı da incelenmiştir. SEM görüntüleri, CH-TO filmlerin, CH-GSO ve CH-PSO filmlerle karşılaştırıldığında daha homojen bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. CH filmlerin elastikiyeti yağ ilavesiyle geliştirilirken, filmlerin gerilme kuvvetinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. CH filmlere esansiyel yağ ilavesi, filmlerin kalınlık, WVP ve su tutma kapasitesi değerlerinde önemli ölçüde azalışa neden olurken ($p<0.05$), filmlerin çözünürlük değerleri etkilenmemiştir. CH filmlere esansiyel yağ ilavesi, filmlerin optik özelliklerini etkilememiştir ($p>0.05$). En yüksek salım hızı, CH-TO film örneklerinde gözlenmiştir ($p<0.05$). Tüm film örnekleri, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı antimikrobiyel aktivite göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Kitosan, kekik yağı, üzüm çekirdeği yağı, nar çekirdeği yağı, antimikrobiyel

CHARACTERIZATION OF CHITOSAN BASED FILMS INCORPORATED WITH ESSENTIAL OILS

ABSTRACT

In this study, thyme oil (TO, 2%), grape seed oil (GSO, 2%), and pomegranate seed oil (PSO, 2%) added chitosan (CH) films were prepared. Film samples were characterized by scanning electron microscopy (SEM), water vapor permeability (WVP), tensile, and optical properties. The antimicrobial activity and release behavior of films were also studied. SEM images showed that CH-TO films were more homogeneous when compared to CH-GSO, and CH-PSO films. The elasticity of films was improved upon the addition of oils while there was no significant change in tensile strength. The incorporation of oils significantly reduced thickness, WVP and water-uptake values of films ($p<0.05$) while the solubility did not change significantly. The optical properties of films were not significantly affected by the addition of oils. The highest release rate was observed in CH-TO film samples ($p<0.05$). All film samples showed antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: Chitosan, thyme oil, grape seed oil, pomegranate seed oil, antimicrobial

*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ ececgdas@sdu.edu.tr,

☎ (+90) 246 211 1734

☎ (+90) 246 237 0859

GİRİŞ

Petrol türevli plastik ambalaj malzemelerinin kullanımının artması ve doğada çok uzun süreçlerde bozunmaları, bu materyallerin çevreye ve yer altı sularına zarar vermesine neden olmaktadır. Bu nedenle, yenilebilir ve biyobozunur ambalaj malzemeleri üzerine yapılan çalışmalarda önemli bir artış görülmektedir (Xu vd., 2005). Bu alanda, yenilenebilir kaynaklardan elde edilen polimerler içerisinde en çok çalışılanlardan birisi kitosandır (CH). CH, biyobozunur, toksik etki göstermeyen, antimikrobiyel etkiye sahip ve pek çok polimerle uyum sağlayabilen bir materyaldir (Dutta vd., 2004; Weska vd., 2007; Youn vd., 2007). Esansiyel yağlar; terpenler, flavonoidler, karotenler gibi çeşitli biyoaktif bileşenler içerdikleri için hem antioksidatif hem de antimikrobiyel etkiye sahip bileşenlerdir (Burt, 2004). Ancak, esansiyel yağların sahip olduğu güçlü aroma, renk gibi özellikleri bu bileşenlerin doğrudan gıda içerisinde kullanımını kısıtlamaktadır. Bu nedenle, esansiyel yağlar gibi aktif bileşenlerin doğrudan gıda içerisinde değil gıda ambalaj malzemelerinin içerisinde kullanımı tercih edilmektedir. Bunun yanı sıra, tüketicilerin gıda güvenliği konusunda bilinçlenmesi, özellikle taze ürünler ve az işlem görmüş ürünler için de aktif bileşen içeren ambalaj materyallerinin kullanımını desteklemektedir (Lee, 2005). Antimikrobiyel özellik gösteren esansiyel yağlar içerisinde kekik yağı en yüksek potansiyele sahip olanlardan biridir. Kekik yağında bulunan baskın bileşen karvakroldür (%50-80), halen gıda katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır (Kulisic vd., 2004). Kekik yağının pek çok mikroorganizmayı etkin bir şekilde inhibe ettiği ve gıdaların raf ömrü üzerine olumlu etkileri olduğu faklı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Seydim ve Sarıküş, 2006; Martínez-Romero vd., 2007; Guarda vd., 2011; De Sousa vd., 2012). Benzer şekilde nar çekirdeği ve üzüm çekirdeği yağı gibi esansiyel yağların da antimikrobiyel ve antioksidan özelliklere (Abbasi vd., 2008; Lutterodt vd., 2011; Agostini vd., 2012; Costantini vd., 2014; Rombaut vd., 2014; Shinagawa vd., 2015; Garavaglia vd., 2016; Xylia vd., 2017; Çavdar vd., 2017) sahip olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Antimikrobiyel ve/veya antioksidan etki gösteren bileşenlerin CH

filmlere eklenmesi, CH filmlerin aktif özelliklerini geliştirmek için kullanılabilecek yöntemlerden birisidir (Bakkali vd., 2008; Bonilla vd., 2014). Esansiyel yağlar ve aktif bileşenler, CH filmlerin kapladıkları gıda yüzeyine diffüze olarak antioksidan ya da antimikrobiyel etki gösterebilirler. Bu sayede, aktif bileşenlerle yenilebilir veya biyobozunur polimerlerin kombinasyonu ile yeni ambalaj materyallerinin geliştirilmesi sağlanmaktadır. Bu çalışmanın amacı, kekik (TO), nar (PSO) ve üzüm çekirdeği yağı (GSO) içeren CH filmlerin su buharı geçirgenliği, mekanik ve optik özellikleri ile antimikrobiyel etkilerini belirlemektir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Çalışmalarda kullanılan kitosan (CH, %85 asetilleşme derecesi), magnezyum nitrat $Mg(NO_3)_2$, gliserol, asetik asit, etanol ve diğer kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, ABD) den temin edilmiştir. Esansiyel yağlar (kekik yağı, TO; üzüm çekirdeği yağı, GSO; nar çekirdeği yağı, PSO) sırasıyla Denizli'de faaliyet gösteren yerel bir firma ve Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü (BATEM)'den temin edilmiştir.

Film Üretimi

Kitosan filmler, dökme yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. CH (%1.5, ağırlıkça) %1'lik (ağırlıkça) asetik asit çözeltisinde tamamen çözüldürüldükten sonra, %0.3 (ağırlıkça) gliserol eklenerek homojen hale getirilmiştir. Esansiyel yağlar, TO, GSO ve PSO, CH ağırlığı bazında %2 oranında CH film çözeltisine eklenmiş ve 5 dakika boyunca homojenizatörde (DAIHAN HG-15A, Kore) homojenize edilmiştir. Yapılan ön çalışmalarda %2'nin altındaki konsantrasyonlar (özellikle GSO ve PSO için) için filmlerin zayıf aktif özellik gösterdiği ve %2'den daha yüksek oranlarda (özellikle TO için keskin ve rahatsız edici bir aroma ile birlikte) ise filmin yapısının bozulduğu gözlenmiştir. Bu yüzden, hem seçilen üç uçucu yağ için karşılaştırma yapılabilecek bir oran olarak hem de filmin yapısını bozmadan film içerisinde bile aktif özellikler gösterebilecek minimum değer olarak %2 seçilmiştir. Her bir film çözeltisinden 50 g teflon kaplı petrilerin

(Ø=150mm) merkezine dökülüp homojen bir şekilde yayılmıştır. Dökülen film çözeltileri oda koşullarında kurutulduktan sonra 25°C ve % 50 bağıl nemde bir hafta boyunca bekletilmiş ardından karakterizasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Filmler, içerisine eklenen TO, GSO ve PSO için filmler sırasıyla CH-TO, CH-GSO ve CH-PSO şeklinde kodlanmıştır. Koşullandırılan film örneklerinin kalınlıkları rastgele 6 bölüm seçilerek dijital mikrometre (QuantuMike IP65, Mitutoyo, Japonya) ile ölçülmüştür.

Karakterizasyon Analizleri

Film örneklerinin yüzey ve kesit özelliklerinin belirlenmesi

Film örneklerinin yüzey ve kesit görüntüleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) (FEI Quanta 250 FEG, Oregon USA) kullanılarak düşük vakum altında görüntülenmiştir (10 kV). Örneklerin mikro-yapılarının belirlenmesi için görüntüler 500-2000 kat büyütme altında elde edilmiştir.

Mekanik özellikler ve su buharı geçirgenliği (WVP)

Film örneklerinin mekanik özellikleri; çekme dayanımı (TS) ve kopma noktasındaki uzama (ϵ , %) değerleri ASTM D882 standart metodu (ASTM, 2001) kullanılarak Lloyd LR5 üniversal test (Londra, Birleşik Krallık) cihazı ile ölçülmüştür. Film örneklerinin su buharı geçirgenlik değerleri ise (WVP) E96-95 gravimetrik metodu (ASTM, 1995) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Geçirgenlik ölçümleri film katmanının %100 bağıl neme maruz bırakılıp, %50 bağıl nem ortam koşullarında kapların periyodik olarak (2 gün boyunca her 1.5 saatte) ağırlıklarının alınması ile gerçekleştirilmiştir. Film örneklerinin (2x2 cm) suda çözünürlük ve su tutma kapasitesi değerleri Pereda vd. (2010)'un önerdiği yöntem ile belirlenmiştir.

Optik özellikler

Opaklık testi, Friesen vd. (2015)'in uyguladığı metot kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Test edilecek her bir film spektrofotometre kuvetinin boyutlarına uyacak şekilde 1x4 cm boyutlarında kesilmiştir. Film örneklerinin 400-800 nm dalga boyları arasındaki absorbans spektrumları ve 450

nm dalga boylarındaki transmittans değerleri (T, %) UV-Visible (Schimadzu, UV-1601, Japonya) spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir. Film örneklerine ait renk değerleri ise renk ölçüm cihazı (CR-400, Konica Minolta, Inc., Japonya) ile beyaz kalibrasyon plakası (Y=92.7, x=0.3160, y=0.3321) kullanılarak belirlenmiştir. Ölçümler kalibrasyon levhası ile kalibre edildikten sonra CIE L^* , a^* ve b^* (parlaklık 'L', kırmızı-yeşil 'a' ve sarı-mavi 'b') değerleri alınarak gerçekleştirilmiştir.

Salım Çalışmaları

Film örneklerinden aktif bileşen salımı miktarının belirlenmesi için gıda simülantı olarak Simülant A (etanol, hacimce %10) seçilmiştir (Avrupa Birliği Yönetmeliği No: 2016/1416). Simülant ile muamele edilen film örnekleri (5 mg film/mL) çalkalamalı karıştırıcıda tutularak (25°C) analiz boyunca örnekleme yapılmış ve farklı zaman aralıklarında absorbansları ölçülmüştür. Film örneklerinden aktif bileşen salınım miktarının belirlenmesi için zamana bağlı olarak elde edilen aktif bileşen absorbans değerleri ile Korsmeyer-Peppas model (Korsmeyer vd., 1983) kullanılmıştır. M_t/M_∞ t zamanda salınan aktif bileşen oranını, K hız sabitini ve n difüzyon sabitini vermek üzere aşağıdaki denklik kullanılmıştır.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n \quad (1)$$

Antimikrobiyel Aktivite

Filmlerin antimikrobiyel aktivitelerini test etmek için *Escherichia coli* (ATCC 26922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ve *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) kültürleri kullanılmıştır. Brain Heart Infusion (BHI) Broth, kullanılarak 37°C'de geliştirilen kültürlerin konsantrasyonu McFarland dansitometresi (Biosan, Litvanya) yardımıyla 10^5 - 10^6 kob/mL konsantrasyona ayarlanmıştır. Yaklaşık 5 log konsantrasyondaki kültürden BHI agar içeren petrilere 200 µL aktarılmış ve besi yerinin mikroorganizmayı tamamen absorbe etmesi beklenmiştir. Film örnekleri (1 cm çapında) inoküle edilen petrilere yerleştirilip belli bir süre beklendikten sonra 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 16-24 saat inkübasyondan sonra film

örneklerinin altında gelişim olup olmadığı kontrol edilmiş ve film etrafında mikroorganizma gelişimi gözlenmeyen inhibisyon alan çapları (cm) ölçülmüştür.

İstatistiksel analiz

Uygulamalar arasındaki fark, varyans analizi (ANOVA) ve Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak %95 güven aralığında belirlenmiştir (Minitab 18, Brandon, UK). Tüm analizler aynı formülasyona ait farklı film örnekleri kullanılarak 2 tekrar ve 3 paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Film Karakterizasyon Analizleri

Film örneklerine ait SEM yüzey ve kesit görüntüleri Şekil 1'de gösterildiği gibidir. Film örnekleri, CH ve esansiyel yağlar arasındaki etkileşime bağlı olarak farklı yapılar sergilemiştir. GSO ve PSO içeren CH filmler, CH ve CH-TO filmlerle karşılaştırıldığında daha düzensiz/pürüzlü bir yapı sergilemiştir. CH-PSO ve CH-GSO filmlerde yağ damlaları kolaylıkla seçilirken, CH-TO filmlerinin daha homojen bir yapıya sahip olduğu görülmektedir. Farklı araştırmacılar tarafından, *Carum copticum* (Jahed vd., 2017a) ve *Origanum vulgare ssp. gracile* esansiyel yağı (Jahed vd., 2017b) içeren CH filmler ve CH bazlı kompozit filmler (Choo vd., 2016; Soni vd., 2016) için benzer yapılar rapor edilmiştir.

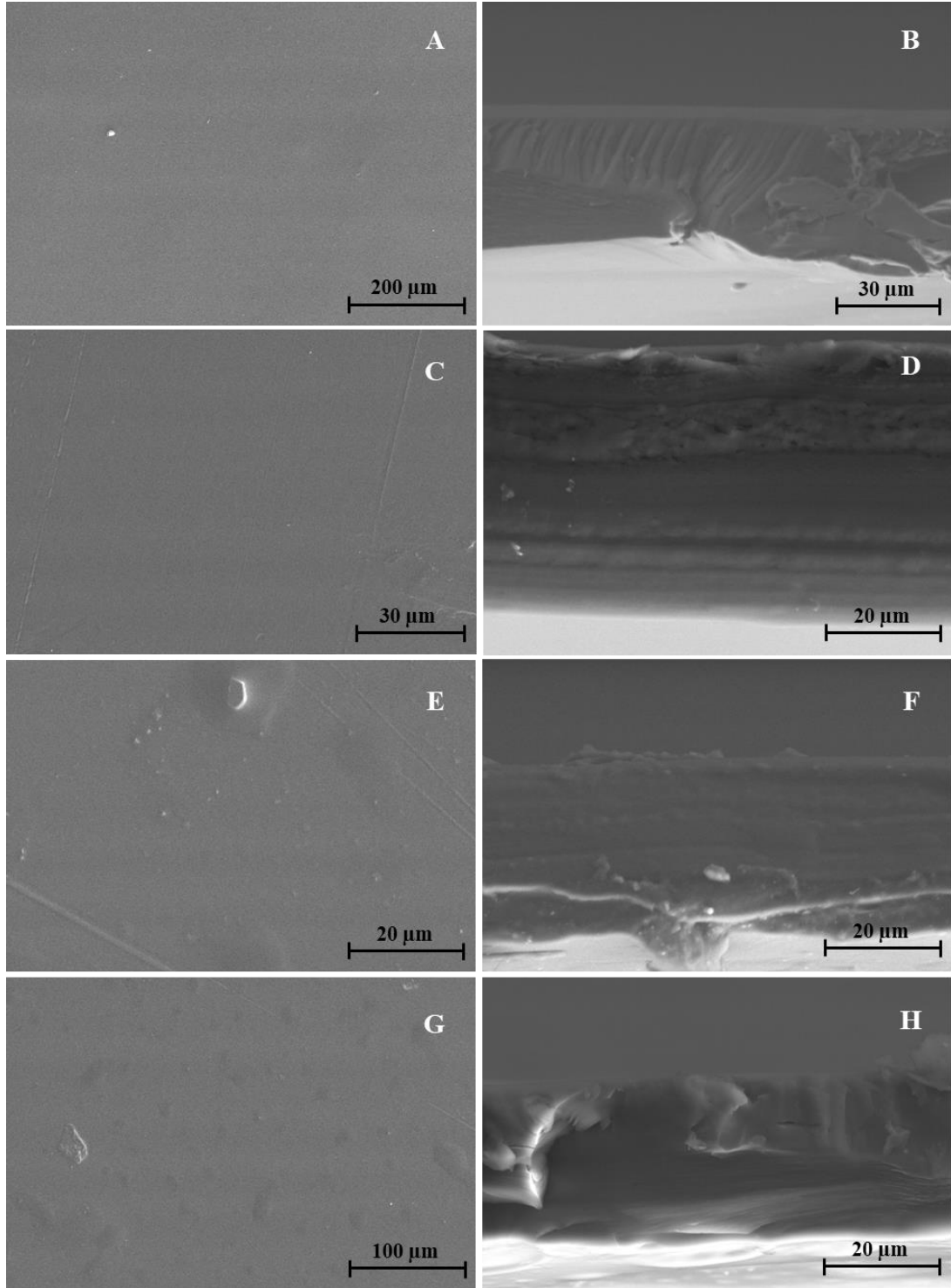
Film örneklerine ait kalınlık ve mekanik özellikler Çizelge 1'de verildiği gibidir. CH filmlerin kalınlık değerleri film içerisine TO, GSO ve PSO eklenmesiyle önemli ölçüde azalmıştır ($p < 0.05$). Film örneklerinin kalınlıklarında görülen bu farklılık CH film yapısı ve bu yapıya eklenen diğer bileşenler arasındaki etkileşimler nedeniyle oluşabilmektedir (Talon vd., 2017). Film örneklerine ait TS değerleri $32.14 \pm 1.28 - 38.58 \pm 2.36$ MPa değerleri arasında değişmektedir. En yüksek TS değerini CH-GSO film örnekleri gösterirken ($p < 0.05$), en düşük TS değeri CH filmlerde görülmüştür. CH filmlere esansiyel yağ ilavesi CH filmlerin TS değerlerinde artışa neden olmuştur. Filmlerin elastikiyet değerleri arasında istatistiki olarak fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). En düşük elastikiyet değerleri ise en yüksek TS değerlerine bağlı olarak CH-GSO filmlerde gözlenmiştir. TS değerindeki artış, CH film ve esansiyel yağlar arasında çapraz bağ oluşumunun gerçekleşmiş olabileceğini göstermektedir. Benzer şekilde, Abdollahi vd. (2012), biberiye yağı içeren CH filmler için CH kontrol filmlerin TS ve elastikiyet değerlerinde sırasıyla %7 ve %40 artış meydana geldiğini göstermişlerdir. Hossenli vd. (2009) aynı zamanda CH filmlerle kekik, tarçın ve karanfil yağının kombine edilmesiyle CH filmlerin elastikiyet özelliklerinin geliştirildiğini göstermiştir.

Çizelge 1. Örneklerine ait kalınlık, gerilme kuvveti (TS) ve elastikiyet (ϵ , %) değerleri
Table 1. Thickness, tensile strength (TS), and elasticity (ϵ , %) values of film samples

Film Örnekleri <i>Film samples</i>	Kalınlık (μm) <i>Thickness (μm)</i>	TS (MPa) <i>TS (MPa)</i>	ϵ (%) <i>ϵ (%)</i>
CH	50.33 ± 2.52^a	32.14 ± 1.28^b	35.05 ± 7.03^a
CH-TO	41.67 ± 2.50^b	33.23 ± 3.09^{ab}	40.71 ± 3.82^a
CH-PSO	40.33 ± 3.21^b	33.56 ± 3.03^{ab}	36.92 ± 1.36^a
CH-GSO	43.67 ± 4.16^b	38.58 ± 2.36^a	33.98 ± 5.79^a

^{a-b} Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p < 0.05$)

^{a-b} Different letters in the same column indicate significant differences between samples ($p < 0.05$)



Şekil 1. Film örneklerine ait SEM görüntüleri (500-2000X büyütme) (A:CH yüzey, B:CH kesit, C:CH-TO yüzey, D:CH-TO kesit, E:CH-PSO yüzey, F:CH-PSO kesit, G:CH-GSO yüzey, H:CH-GSO kesit)
Figure 1. SEM images of film samples (500-2000X magnification) (A:CH surface, B:CH cross-section, C:CH-TO surface, D:CH-TO cross-section, E:CH-PSO surface, F:CH-PSO cross-section, G:CH-GSO surface, H:CH-GSO cross-section)

Çizelge 2, film örneklerinin su buharı geçirgenlik, suda çözünürlük değerlerini ve su tutma kapasitelerini göstermektedir. CH filmler en yüksek WVP değerlerini gösterirken, en düşük WVP değeri GSO içeren CH filmlerde gözlenmiştir ($p<0.05$). CH filmlere TO ve PSO ilavesi de CH filmlerin WVP değerlerinde azalmaya neden olmuştur ($p<0.05$). Benzer sonuçlar, Yasser, (2017) tarafından *Ziziphora clinopodioides* esansiyel yağı ve üzüm çekirdeği ekstraktı içeren CH filmler için gösterilmiştir. CH filmlerin suda çözünürlük değerleri, CH filmlere esansiyel yağ ilavesi ile istatistiksel olarak değişim göstermemiştir, ancak esansiyel yağ içeren CH filmlerin çözünürlük değerlerinin CH filmlerden daha düşük olduğu gözlenmiştir ($p>0.05$). Elde edilen sonuçlar kekik yağı (Abdollahi vd., 2012) ve tarçın yağı (Ojagh vd., 2010), içeren CH filmlerle ilgili yapılan çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermektedir. CH-PSO ve CH-GSO filmlerin su tutma kapasitesi, CH-TO ve CH filmlere göre daha düşük değerlere sahiptir ($p<0.05$). CH

filmlerin su tutma kapasitesi esansiyel yağ içeren filmlerden daha yüksektir ($p<0.05$). Uçucu yağların hidrofobik karakterleri nedeniyle, filmlere ilave edilen uçucu yağlar, filmlerin daha az su tutmasına, suda çözünürlüklerinin azalmasına ve su buharı geçirgenlik değerlerinin düşmesine neden olmuştur. Bunun yanı sıra, polimerik yapıların su tutma kapasiteleri polimerdeki moleküller arası zincirlerin etkileşimlerine de bağlıdır (Mayachiew ve Devahastin, 2010). CH filmlere ilave edilen esansiyel yağlar ve CH film ağı arasındaki kovalent ve hidrojen bağları hidrojen gruplarının oluşumunu kısıtlayarak su molekülleri ile hidrofilik bağların oluşmasına engel olmaktadır. Bu şekilde elde edilen yapı CH filmlerin suya olan ilgisini azaltarak hidrofobik bir yapı oluşturmaktadır (Siripatrawan ve Harte, 2010). Çalışma bulguları, aktif bileşen içeren CH filmler için farklı araştırmacıların elde ettiği sonuçlarla benzerlik göstermektedir (Vargas vd., 2009; Mayachiew ve Devahastin, 2010; Pereda vd., 2010).

Çizelge 2. Film örneklerine ait su buharı geçirgenlik (WVP), suda çözünürlük ve su tutma kapasitesi değerleri

Table 2. Water vapor permeability (WVP), water solubility, and water uptake values of film samples

	WVP (g-mm/kPa-h-m ²) WVP (g-mm/kPa-h-m ²)	Suda çözünürlük (%) Water solubility (%)	Su tutma (%) Water uptake (%)
CH	77.59±1.64 ^a	24.91±4.82 ^a	316.52±20.03 ^a
CH-TO	27.95±0.82 ^c	18.27±3.76 ^a	289.93±6.31 ^{ab}
CH-PSO	35.07±0.32 ^b	18.20±4.64 ^a	253.72±14.54 ^c
CH-GSO	29.37±1.92 ^c	20.97±3.90 ^a	264.69±9.46 ^{bc}

^{a-c} Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p<0.05$)

^{a-c} Different letters in the same column indicate significant differences between samples ($p<0.05$)

Film örneklerinin transmittans, opaklık ve renk değerleri (L^* , a^* ve b^*) Çizelge 3'te gösterilmiştir. En yüksek transmittans ($p>0.05$) ve en düşük opaklık ($p<0.05$) değerleri CH filmlerde gözlenmiştir. CH filmlere esansiyel yağ ilavesiyle, CH filmlerin transmittans değerlerinde istatistiki olarak fark gözlenmezken, TO ve PSO ilavesi CH filmlerin opaklık değerlerini önemli ölçüde arttırmıştır ($p<0.05$). Genel olarak, yüksek transmittans değerlerine sahip filmler düşük

opaklık değerleri göstermiştir. Bu durum, film yapısı içerisindeki yağ damlalarının, ışığın film boyunca dağılımını arttırarak, CH filmlerin ışığa geçirgenliğini azaltmasıyla açıklanabilir (Tongnuanchan vd., 2013). Aynı zamanda, yüksek transmittans değerlerinin film yapısına giren bileşenler ile film arasındaki homojen karışım ve etkileşimle pozitif korelasyon gösterdiği belirtilmektedir (Li vd., 2006). Benzer şekilde, Riberio-Santos vd., (2017) esansiyel yağ ilavesinin

filmlerin transmittans değerlerini azalttığını göstermiştir. Filmlerin renk değerleri arasında önemli bir fark bulunmazken en düşük a^* değerleri ve en yüksek b^* değerleri CH-GSO

filmlerde gözlenmiştir. CH filmlere TO ve PSO ilavesi filmlerin b^* değerlerini önemli ölçüde düşürmüştür ($p < 0.05$).

Çizelge 3. Film örneklerinin optik özellikleri
Table 3. Optical properties of film samples

	T (%) T (%)	Opaklık (AU nm/mm) Opacity (AU nm/mm)	L^* L^*	a^* a^*	b^* b^*
CH	82.03±0.61 ^a	384.47±50.01 ^b	95.93±0.13 ^a	-0.27±0.05 ^a	4.20±0.13 ^{ab}
CH-TO	78.63±2.14 ^a	618.44±26.79 ^a	95.99±0.15 ^a	-0.27±0.01 ^a	3.71±0.21 ^c
CH-PSO	78.10±0.46 ^a	675.64±63.89 ^a	95.90±0.05 ^a	-0.31±0.01 ^a	4.16±0.09 ^b
CH-GSO	80.60±2.33 ^a	446.57±49.54 ^b	95.51±0.17 ^b	-0.37±0.01 ^b	4.54±0.11 ^a

^{a-c} Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p < 0.05$)

^{a-b} Different letters in the same column indicate significant differences between samples ($p < 0.05$)

Salım Çalışmaları

Çizelge 4, gıda simülantı A için film örneklerine ait Korsmeyer-Peppas sabitlerini (salım hızları) göstermektedir. Salım kinetikleri, deneysel verilerin Korsmeyer-Peppas denkliği kullanılarak hesaplanması sonucu elde edilmiş ve salımın modele uygunluğu R^2 değerleri ile gösterilmiştir

(Çizelge 4). CH-TO ve CH-GSO film örnekleri 0.5'ten yüksek n değerlerine sahip olup difüzyon bu film örnekleri için Fick kuralına uymaktadır. Ancak, CH-PSO örneklerine ait n değerleri oldukça düşüktür, bu durum bu film örneklerinin seçilen simülant içerisinde kısmi olarak çözünmesi ile açıklanabilir.

Çizelge 4. Gıda simülantı A için Korsmeyer-Peppas sabitleri
Table 4. Korsmeyer-Peppas constants for food simulant A

	n	K	R^2
CH-TO	0.44±0.12 ^{ab}	3.52±0.33 ^a	0.93
CH-PSO	0.33±0.06 ^b	2.72±0.31 ^b	0.94
CH-GSO	0.65±0.01 ^a	1.81±0.33 ^c	0.96

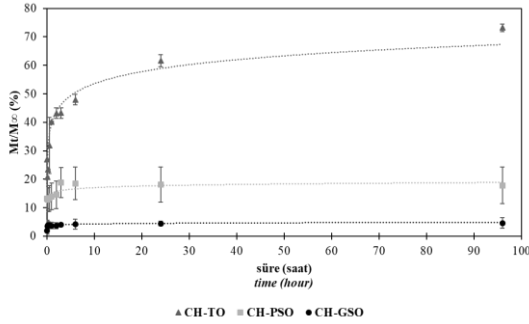
^{a-c} Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p < 0.05$)

^{a-b} Different letters in the same column indicate significant differences between samples ($p < 0.05$)

CH filmlere ilave edilen esansiyel yağların gıda simülantı A'ya salım hızı, ilave edilen esansiyel yağ için baskın bulunan aktif bileşen kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmalarda kullanılan PSO, linoleik asit, konjuge linoleik asit (pünisik asit), α -eleostearik asit, hidroksisinamik asit ve flavonoidler gibi pek çok aktif bileşen içermektedir (Abbasi vd., 2008; Kiralan vd., 2009; Costantini vd. 2014) ve baskın bileşen %73 oranında içerdiği pünisik asittir (Kiralan vd.,

2009). Benzer şekilde, TO ve GSO salınımı için, sırasıyla baskın aktif bileşenler olan karvakrol (Safaei-Ghomi vd., 2009) ve gallik asit (Garavaglia vd., 2016) kalibrasyon eğrileri kullanılmıştır. Şekil 2, zamanın bir fonksiyonu olarak film örneklerinden aktif bileşen salım değerlerini göstermektedir. Farklı esansiyel yağların simülant A için farklı salım davranışı sergilediği görülmektedir. CH-TO filmler en yüksek salınım hızına sahipken, en düşük salınım hızı CH-GSO

filmlerde gözlenmiştir. Bu durum TO'nun etanolde diğer esansiyel yağlara göre daha fazla çözündüğünü göstermektedir.



Şekil 2. Film örneklerinden zamanla kümülatif aktif bileşen salım miktarı

Figure 2. Cumulative release rate of film samples

Çizelge 5. Film örneklerine ait inhibisyon çapları (mm)

Table 5. Zone of inhibition diameters of film samples (mm)

	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
CH	*	*	*	*
CH-TO	15	20	17	22
CH-GSO	13	*	*	15
CH-PSO	*	*	*	13

*Film örneklerinin altında gelişim gözlenmemiştir.

*Not observed any growth under film samples

SONUÇ

Bu çalışmada, TO, PSO ve GSO içeren CH filmler üretilmiş ve bu yağların CH filmlerin fiziksel özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir. CH filmlere esansiyel yağ ilavesi, filmlerin kalınlık, WVP ve su tutma kapasitesi değerlerinde önemli ölçüde azalışa neden olurken, filmlerin çözünürlük değerleri etkilenmemiştir. CH filmlere esansiyel yağ ilavesi, filmlerin optik özelliklerini ve gerilme kuvvetini etkilememiş ancak elastikiyet değerlerinde artışa neden olmuştur. En yüksek salınım hızı ise, CH-TO film örneklerinde gözlenmiştir. Tüm film örnekleri, test mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel aktivite göstermiştir. Elde edilen sonuçlar, TO, PSO ve GSO içeren CH filmlerin sahip oldukları aktif özellikler sayesinde gıda ambalajlama

Antimikrobiyel Aktivite

CH, doğal olarak antimikrobiyel etkiye sahip olduğu için tüm film örneklerinin altında mikrobiyal gelişim gözlenmemiştir (Çizelge 5). Ancak, CH filmlerin etrafında inhibisyon alanı oluşmamıştır. Bu durum, agar difüzyon tekniğinde CH'ın agar boyunca diffüze olmaması ile bağlantılıdır ve CH'ın ancak direkt temas halinde olan mikroorganizmalara karşı etkili olabileceği anlaşılmaktadır (Coma vd., 2002). CH-GSO film örnekleri *E. coli* ve *P. aeruginosa*'ya karşı ve CH-PSO film örnekleri ise sadece *P. aeruginosa*'ya karşı inhibisyon alanı oluştururken CH-TO film örneklerinin tüm mikroorganizmalara karşı inhibisyon alanı oluşturduğu gözlenmiştir (Çizelge 5).

uygulamalarında kullanılabilir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

Abbasi, H., Rezaei, K., Emamdjomeh, Z., & Mousavi, S.M.E. (2008). Effect of various extraction conditions on the phenolic contents of pomegranate seed oil. *Eur J Lipid Sci Tech* 110(5):435-440.

Abdollahi, M., Rezaei, M., Farzi, G. (2012). Improvement of active chitosan film properties with rosemary essential oil for food packaging. *Int J Food Sci Tech* 47(4):847-853.

Agostini, F., Bertussi, R.A., Agostini, G., Dos, A., Santos, A.C., Rossato, M., Vanderlinde, R. (2012). Supercritical extraction from vinification residues: fatty acids, α -tocopherol, and phenolic

- compounds in the oil seeds from different varieties of grape. *Sci World J* 2012:790486.
- ASTM (1995). American Society for Testing and Materials. Standard test methods for water vapor transmission of materials. Standard Designations: E96-95. Philadelphia, PA.
- ASTM. (2001). American Society for Testing and Materials. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Standard Designations: D882. Philadelphia, PA.
- Avrupa Birliği Yönetmeliği. (2016). 2016/1416 of 24 August 2016 amending and correcting Regulation (EU) No 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, I. (2008). Biological effects of essential oils-a review. *Food Chem Toxicol* 46(2):446-475.
- Bonilla, J., Vargas, M., Atares, A., Chiralt, A. (2014). Effect of chitosan essential oil films on the storage-keeping quality of pork meat products. *Food Bioprocess Tech* 7(8):2443-2450.
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-A review. *Int J Food Microbiol* 94(3):223-253.
- Choo, K., Ching, Y.C., Chuah, C.H., Julai, S., Liou, N.S. (2016). Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-chitosan composite films reinforced with cellulose nanofiber. *Materials* 9(8):E644.
- Coma, V., Martial Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F. Deschamps, A. (2002). Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *J Food Sci* 67(3):1162-1169.
- Costantini, S., Rusolo, F., De Vito, V., Moccia, S., Picariello, G., Capone, F., Guerriero, E., Castello, G., Volpe, M. G. (2014). Potential anti-inflammatory effects of the hydrophilic fraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil on breast cancer cell lines. *Molecules* 19(6):8644-60.
- Çavdar, H.K., Yanık, D.K., Gök, U., Göğüş, F. (2017). Optimisation of Microwave Assisted Extraction of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed Oil and Evaluation of Its Physicochemical and Bioactive Properties. *Food Technol Biotech* 55(1):86-94.
- De Sousa, J.P., de Azeredo, G.A., de Araújo Torres, R., da Silva Vasconcelos, M.A., da Conceição, M.L., de Souza, E.L. (2012). Synergies of carvacrol and 1,8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables. *Int J Food Microbiol* 154(3):145-151.
- Dutta, P.K., Dutta, J., Tripathi, V.S. (2004). Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *J Sci Ind Res India* 63(1):20-31.
- Friesen, K., Chang, C., Nickerson, M. (2015). Incorporation of phenolic compounds, rutin and epicatechin, into soy protein isolate films: Mechanical, barrier and cross-linking properties. *Food Chem* 172:18-23.
- Garavaglia, J., Markoski, M.M., Oliveira, A., Marcadenti, A. (2016). Grape Seed Oil Compounds: Biological and Chemical Actions for Health. *Nutr Metab Insights* 9:59-64.
- Guarda, A., Rubilar, J.F., Miltz, J., Galotto, M.J. (2011). The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *Int J Food Microbiol* 146(2):144-150.
- Hosseini, M.H., Razavi, S.H., Mousavi, M.A. (2009). Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. *J Food Process Pres* 33(6):727-743.
- Jahed, E., Khaledabad, M.A., Almasi, H., Hasanzadeh, R. (2017a). Physicochemical properties of *Carum copticum* essential oil loaded chitosan films containing organic nanoreinforcements. *Carbohydr Polym* 164:325-338.
- Jahed, E., Khaledabad, M.A., Bari, M.R., Almasi, H. (2017b). Effect of cellulose and lignocellulose nanofibers on the properties of *Origanum vulgare* ssp. *gracile* essential oil-loaded chitosan films. *React Funct Polym* 117:70-80.
- Kıralan, M., Gölükçü, M., Tokgöz, H. (2009). Oil and Conjugated Linolenic Acid Contents of Seeds from Important Pomegranate Cultivars (*Punica granatum* L.) Grown in Turkey. *J Am Oil Chem Soc* 86(10):985-990.

- Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem* 85(4):633–640.
- Lee, D.S. (2005). Packaging containing natural antimicrobial or antioxidative agents. In: *Innovations in Food Packaging*, Han, J. (ed.), Elsevier Science & Technology Books, pp. 108–119.
- Li, B., Kennedy, J.F., Jiang, Q.G., Xie, B.J. (2006). Quick dissolvable, edible and heat sealable blend films based on konjac glucomannan-gelatin. *Food Res Int* 39:544–549.
- Lutterodt, H., Slavin, M., Whent, M., Turner, E., Yu, L.L. (2011). Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. *Food Chem* 128(2):391–399.
- Martínez-Romero, D., Guillén, F., Valverde, J.M., Bailén, G., Zapata, P., Serrano, Castillo, S., Valero, D. (2007). Influence of carvacrol on survival of *Botrytis cinerea* inoculated in table grapes. *Int J Food Microbiol* 115(2):144–148.
- Mayachiew, P., Devahastin, S. (2010). Effects of drying methods and conditions on release characteristics of edible chitosan films enriched with Indian gooseberry extract. *Food Chem* 118(3):594–601.
- Ojagh S.M., Rezaei M., Razavi S.H., Hosseini S.M.H. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chem* 122(1):161–166.
- Pereda, M., Aranguren, M.I., Marcovich, N.E. (2010). Caseinate films modified with tung oil. *Food Hydrocolloid* 24(8):800–808.
- Riberio-Santos, R., Ramos de Melo, N., Andrade, M., Azevedo, G., Machado, A. V., Carvalho-Costa, D., Sanches-Silva, A. (2017). Whey protein active films incorporated with a blend of essential oils: Characterization and effectiveness. *Packag Technol Sci* 31(1):27–40.
- Rombaut, N., Savoie, R., Thomasset, B., Bélliard, T., Castello, J. Hecke, E., Lanoisellé, J.L. (2014). Grape seed oil extraction: interest of supercritical fluid extraction and gas-assisted mechanical extraction for enhancing polyphenol co-extraction in oil. *CR Chim* 17(3):284–292.
- Safaei-Ghomi, J., Ebrahimabadi, A.H., Djafari-Bidgoli, Z., Batooli, H. (2009). GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. *Food Chem* 115(4):1524–1528.
- Seydim, A.C., Sarikus, G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Res Int* 39(5):639–644.
- Shinagawa, F.B., Santana, F.C., Torres, L.R.O., Mancini-Filho, J. (2015). Grape seed oil: a potential functional food. *Food Sci Technol (Campinas)* 35(3):399–406.
- Siripatrawan, U., Harte, B.R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloid* 24(8):770–775.
- Soni, B., Schilling, M.W., Mahmoud, B. (2016). Transparent bionanocomposite films based on chitosan and tempo-oxidized cellulose nanofibers with enhanced mechanical and barrier properties. *Carbohydr Polym* 151:779–789.
- Talon, E., Trifkovic, K.T., Vargas, M., Chiralt, A., Gonzalez-Martinez, C. (2017). Release of polyphenols from starch chitosan based films containing thyme extract. *Carbohydr Polym* 175:122–130.
- Tongnuanchan, P., Benjakul, S., Prodpran, T. (2013). Physico-chemical properties, morphology and antioxidant activity of film from fish skin gelation incorporated with root essential oils. *J Food Eng* 117(3):350–360.
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A. Gonzalez-Martinez, C. (2009). Characterization of chitosan-oleic acid composite films. *Food Hydrocolloid* 23(2):536–547.
- Weska, R., Moura, J., Batista, L., Rizzi, J., Pinto, L. (2007). Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology. *J Food Eng* 80(3):749–753.

Xu, Y.X., Kimb, K.M., Hanna, M.A., Nag, D. (2005). Chitosan- starch composite film: Preparation and characterization. *Ind Crop Prod* 21(2):185-192.

Xylia, P., Chrysargyris, A., Botsairs, G., Tzortzakis, N. (2017). Mint and pomegranate extracts/oils as antibacterial agents against *Escherichia coli* O157:57 and *Listeria monocytogenes* on shredded carrots. *J Food Safety* 38(1):1-8.

Yasser, S. (2017). The properties of chitosan and gelatin films incorporated with ethanolic red grape seed extract and *Ziziphora clinopodioides* essential oil as biodegradable materials for active food packaging. *Int J Biol Macromol* 99:746-753.

Youn, D., No, H., Prinyawiwatkul, W. (2007). Physical characteristics of decolorized chitosan as affected by sun drying during chitosan preparation. *Carbohydr Polym* 69:707-712.