

Hemiselüloz Esaslı Polimerik Jel Filmlerin Antimikrobiyal ve Biyobozunma Özellikleri Üzerine Bitkisel Uçucu Yağların Etkisi

Şeyda Taşar¹ *1, Meltem ÇAKMAK KALKAN¹ , Dursun ÖZER¹ , Ahmet ÖZER¹ 
¹Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği, ELAZIĞ

(Alınış / Received: 08.05.2020, Kabul / Accepted: 20.08.2021, Online Yayınlanma / Published Online: 31.08.2020)

Anahtar Kelimeler

Hemicellulose
Bitkisel uçucu yağ
Polimerik jel film
Disk difüzyon yöntemi
Biyobozunma kinetiği

Öz: Bu çalışmada, hemiselüloz esaslı, bitkisel uçucu yağ takviyeli (nane, biberiye, kekik, karanfil, ısırgan, lavanta, çam terebenti, sarımsak ve ardıç) antimikrobiyal özellik gösteren jel film üretimi, serbest radikalik polimerizasyon mekanizmasına göre gerçekleştirilmiştir. Jel filmlerin antimikrobiyal aktivitesi ve biyobozunma davranışları araştırılmıştır. Agar (disk) difüzyon yöntemi kullanılarak incelenen antimikrobiyal analiz için *E. coli* stok kültürü kullanılmıştır. Görüntü analizi MATLAB R2017 versiyonu ile yapılmıştır. Jel filmlerin biyobozunma hızları üzerine bitkisel uçucu yağların etkisi, toprak florası içerisine gömme testleri yapılarak tespit edilmiştir. Jel filmlerin biyolojik bozunma davranışları Coats Redfern Metodu kullanılarak modellenmiştir. Bozunmayı en iyi temsil eden teorik model eşitliği tespit edilmiş ve bozunma hızı, en uygun model eşitliğine (ikinci dereceden kinetik $F(2)$) göre hesaplanmıştır. Biberiye, kekik, karanfil ve ısırgan otu uçucu yağı içeren polimerik filmlerin, antimikrobiyal etki gösterdiği gözlenmiştir. Yapılan kinetik analiz sonucu antimikrobiyal özellik taşıyan uçucu yağ türlerinin, biyobozunma hızını yaklaşık 5 kat düşürdüğü ancak, nihai bozunma yüzdesi üzerinde etkili olmadığı tespit edilmiştir. Polimerik filmlerin 60 günlük süre sonunda toprak florasında, %95-98 oranında bozunduğu belirlenmiştir.

The Effect of Vegetable Essential Oils on the Antimicrobial and Biodegradation Properties of Hemicellulose Based Polymeric Gel Films

Keywords

Hemicellulose
Essentials herbal oil
Polymeric gel film
Disc diffusion method
Biodegradations kinetic

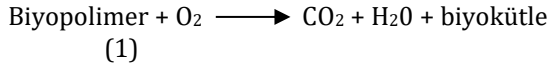
Abstract: In this study, hemicellulose-based, vegetable essential oil supplemented (mint, rosemary, thyme, clove, nettle, lavender, pine turpentine, garlic and juniper) gel film showing antimicrobial properties was produced according to the free radical polymerization mechanism. The antimicrobial activity and biodegradation behavior of gel films were investigated. *E. coli* stock culture was used for the antimicrobial analysis examined using the agar (disc) diffusion method. Image analysis was done with MATLAB R2017 version. The effect of vegetable essential oils on biodegradation rates was determined by embedding tests in soil flora. The biodegradation behaviors of gel films were modeled by using the Coats-Redfern Method. The theoretical model equation that best represents the biodegradation was determined and the rate of degradation was calculated according to the most suitable model equation (second-order kinetic $F(2)$). It has been concluded that polymeric films containing rosemary, thyme, clove, and nettle essential oil have an antimicrobial effect. The kinetic analysis conducted that the antimicrobial essential oil species reduced the rate of biodegradation approximately 5 times, but did not affect the final degradation percentage. It was determined that polymeric films were degraded 95-98% in the soil flora after 60 days.

*İlgili Yazar, email: sydtasar@firat.edu.tr

1. Giriş

Temel hammaddesi petrol olan sentetik polimerik mamullerin son yüzyılda artan kullanımı, yakın gelecekte iki temel büyük problemin oluşacağı düşüncelerini gündeme getirmiştir. Bunlar; (i) petrol rezervlerinin çok daha hızlı tükenme noktasına gelmesi ile enerji darboğazına girilecek olması (ii) biyobozunur nitelikte olmayan sentetik polimerlerin, çevrede birikmesi ile aşılamayan ekolojik sorunların ortaya çıkmasıdır. Bu nedenle petrol esaslı sentetik polimerlerin yerine, biyobozunur (doğada kendiliğinden bozunma yeteneğine sahip) özellik gösteren doğal polimerlerin kullanımının yaygınlaştırılması, ön görülen problemlerin çözümüne yönelik olarak, umut vaat edici çözüm olarak görülmüş ve araştırmalar bu alana yönelmiştir.

EN 14995 standartına göre, biyobozunur polimerler, belli kompostlama koşullarında (sıcaklık, nem ve mikroorganizma türü) ve belli sürede, mikrobiyal aktivite sonucu tamamen karbondioksit kadar parçalanabilen polimerik materyallerdir. Biyopolimerler, kullanım ömrü sonunda doğaya bırakıldıklarında petrol kökenli polimerlere göre daha kısa sürede parçalanarak ekolojik döngüye (C, N vs doğal döngüsüne) hızlıca katılabilmektedirler[1]. Biyopolimerler ortamda oksijen mevcutsa, aerobik şartlarda Eşitlik 1’de sunulduğu gibi bozunur ve karbondioksit kadar parçalanabilirler [2-4].



Biyopolimerlerin gazlara, suya, tuzlara, minerallere ve artık biyokütleyle dönüştürülmesi işlemine mineralizasyon denir. Tüm biyobozunur malzemeler tüketildiğinde ve tüm karbon karbondioksit dönüştürüldüğünde mineralizasyon tamamlanır [5]. Biyopolimerlerin biyolojik bozunma sürecinde çevreye herhangi bir zehirli veya zararlı madde salınımı yoktur [6,7]. Bu iki temel kriterden hareketle, polimerlerin biyobozunur nitelikte olup olmadığını tespit etmek için, bozunma sonucu açığa çıkan metabolit miktarının ve bozunma süresinin tespit edilmesi gerektiği ifade edilmektedir [8].

Biyobozunur özellik gösteren, yenilenebilir nitelikteki polimerlerik mamüllerin üretiminde genellikle bitkisel atıklardan kazanılan makromoleküller monomer olarak kullanılmakta ve bu sayede polimerik mamül üretim maliyetleri düşürülebilmektedir [5]. Ancak polimerik mamul üretiminde monomer olarak kullanılan (selüloz, hemiselüloz, nişasta vb) makromoleküller, mikroorganizmaların temel besin maddesi içerisinde olduğundan, biyo-esaslı polimerik mamüller, kullanım alanına da bağlı olarak, mikrobiyal kontaminasyona oldukça açık hale gelmektedir. Bu durum, biyo-esaslı polimerik mamullerin kullanım ömrü içerisindeki en önemli dezavantajlarından biridir. Çünkü, mikrobiyal kontaminasyon tıbbi cihazlar, ilaçlar, hijyen uygulamaları başta olmak üzere, su saflaştırma sistemleri, tekstil ürünleri ve gıda ambalaj materyalleri gibi sektörlerde de ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Söz edilen sektörlerde yaygın olarak kullanılan polimerik malzemelerin antimikrobiyal özellik göstermesi istenmektedir. Bu amaçla, polimerik mamul üretim sürecinde kimyasal antimikrobiyal ajanlar yapıya ilave edilmektedir. Ancak gıda sektöründe, gıda ile temasta bulunan polimerik film ve kaplamaların üretiminde canlı sağlığı üzerinde olumsuz etkiler oluşturabilecek kimyasal antimikrobiyal ajanların kullanılmasına birtakım sınırlamalar getirilmiştir. Bunun sonucunda, antimikrobiyal özellik kazandırılmak istenen ambalaj malzemelerinin üretiminde doğal antimikrobiyal özellik gösteren ajanların kullanımına yönelik araştırmalar başlamıştır [9-11]. Bu kapsamda, anason, fesleğen, kişniş ve kekik gibi esansiyel yağların kitosan filmleri üzerinde [12], üzüm çekirdeği özütünün polietilen (PE) filmler üzerinde [13], mercanköşkü ve kekik esansiyel yağlarının soya proteini esaslı yenilebilir filmler üzerinde [14], antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Ayrıca Pastor vd., (2011)[15] ve Erol, (2012)[16] tarafından gerçekleştirilen başka çalışmalarda ise propolisin antimikrobiyal etkinliği incelenmiştir. Yürütülen çalışmalarda, polimerik ambalajların yapısına katılan ajanların ürünün üretiminden tüketimine kadarki süreçte oluşabilecek mikrobiyal aktiviteleri engellemesi hedeflenmiştir [17]. Yapılan çalışmalarda denenen doğal antimikrobiyal ajanların ancak belirli bir konsantrasyonun üzerinde kullanılmaları durumunda antimikrobiyal aktivite gösterdikleri, yüksek miktarlarda kullanılmaları durumunda ise gıdaların kendine özgü tadını ve rengini etkiledikleri ortaya konulmuştur [18]. Bu ikilemin önüne geçilebilmesi, doğal kökenli en etkin antimikrobiyal ajanların tespit edilebilmesi ve optimum kullanım dozlarının belirlenmesi için çalışmaların daha detaylı olarak sürdürülmesi gerektiği vurgulanmıştır.

Bu amaçla, bu çalışmada daha önce hemiselüloz bazlı polimerik film ya da mamuller üzerindeki antimikrobiyal etkisi ortaya konulmamış bazı uçucu bitkisel yağların antimikrobiyal etkinliği

karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Ayrıca, polimerik yapıya ilave edilen bu bitkisel uçucu yağların polimerin biyobozunma hızı üzerine etkileri de araştırılmış ve yorumlanmaya çalışılmıştır.

Yapılan çalışmada; nane, biberiye, kekik, karanfil, ısırgan, lavanta, çam terebenti, sarımsak ve ardıç olmak üzere dokuz farklı bitkisel uçucu yağın polimerik mamül üzerindeki antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Böylece elde edilen hemiselüloz esaslı, uçucu yağ katkılı polimerik jel filmlerin *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal etkinlikleri agar (disk) difüzyon metodu ile araştırılmıştır. Bitkisel uçucu yağların, biyobozunma hızları üzerine etkisi ise toprak florası içerisine gömme testleri yapılarak tespit edilmiştir. Jel filmlerin zamana bağlı olarak meydana gelen ağırlık kayıpları belirlenmiş, biyolojik bozunma davranışları Coats Redfern Metodu kullanılarak irdelenmiştir. Bozunmayı en iyi temsil eden teorik model eşitliği regresyon analizi ve ANOVA tablosu ile saptanmış ve bozunma hızı en uygun model eşitliği dikkate alınarak hesaplanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Polimerik jel filmlerin sentezlenmesi

Hemiselüloz esaslı polimerik jel filmler, atık çay posasından kimyasal ön işlem süreçleri ile izole edilerek kazanılan hemiselüloz kullanılarak, serbest radikalik polimerizasyon mekanizmasına göre çözelti ortamında sentezlendi. Filmlerin üretimi ise çözelti dökme metoduna göre gerçekleştirildi.

Polimerik filme çevresel uyarıcılara cevap verebilme özelliği katabilmek amacı ile AAm (akrilamid) komonomeri, fiziksel dayanımını arttırmak amacı ile kitosan katkı maddesi ilave edildi. Jel filmlere antimikrobiyal özellik katmak için ise nane, biberiye, kekik, karanfil, ısırgan, lavanta, çam terebenti, sarımsak ve ardıç bitkisel uçucu yağları eklendi. Polimerik filmin çözünmesini önlemek, ağ yapılı polimerik matris oluşturmak için metilen bis akrilamid (BIS) çapraz bağlayıcısı kullanıldı. Hızlandırıcı kullanılmayan film üretim sürecinde, başlatıcı olarak amonyum persülfat kullanıldı. Tablo 1'de çalışmada kullanılan kimyasallar ve özellikleri sunulmuştur.

Hemiselüloz esaslı jel filmleri hazırlamak için çay posasından izole edilerek kazanılan hemiselülozun, %10'luk NaOH çözeltisi içerisinde katı sıvı oranı 1/10 (w/v) olacak şekilde, 55-60 °C'de 120 dk. süre ile 800 rpm karıştırma hızında karıştırılarak çözündürüldü. Tam çözünme sağlandıktan sonra oda sıcaklığına kadar soğutulan çözeltiye, 800 rpm karıştırma eşliğinde Tablo 1'de ifade edilen oranda sırası ile komonomer (AAm) ve çapraz bağlayıcı (BIS) ilave edildi. Tam karışma sağlandıktan sonra yapıya karışım oranı dikkate alınarak hesaplanan miktarda %2'lik asetik asit çözeltisinde çözündürülecek hazırlanmış katkı maddesi (kitosan) ilave edildi. Son olarak, hesaplanan miktarda redoks başlatıcısı (APS) eklendi ve bitkisel uçucu yağ esansları (nane, biberiye, kekik vb) ilave edilip karışım jelleşme süreci başlamadan hızlıca petri kaplarına döküldü. Üretilen polimerik filmlerin kalınlığını belirli bir aralıkta tutmak, yani standart kalınlıkta film üretimi gerçekleştirmek için 90x15'lik petri kapları kullanılmıştır.

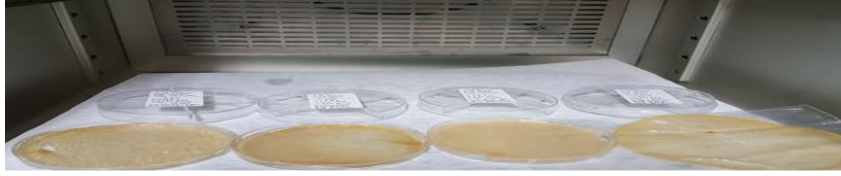
Tablo 1. İncelenen polimerizasyon parametreleri ve aralıkları

Kullanım amacı	Kimyasal	Aralık Oranları
Monomer	Hemiselüloz	KM/HC(w/w):0.25/1
Komonomer	AAm (akrilamid)	
Çapraz bağlayıcı	Metilen bisakrilamid (BIS)	ÇB/HC (w%): 0.5
Başlatıcı türü	Amonyum persülfat (PPS)	BŞ/HC (w%): 0.5
Katkı maddesi	Kitosan	Kitosan/HC(w/w):0.05/1
Doğal antimikrobiyal madde (bitkisel uçucu yağ)	Nane, Biberiye Kekik, Karanfil Isırgan, Lavanta Çam terebenti Sarımsak, Ardıç	AM/HC(v/w ml/g): 0.1/1
KM: Komonomer, HC: Hemiselüloz, ÇB: Çapraz bağlayıcı, BŞ: Başlatıcı, AM: Antimikrobiyal bitkisel uçucu yağ		

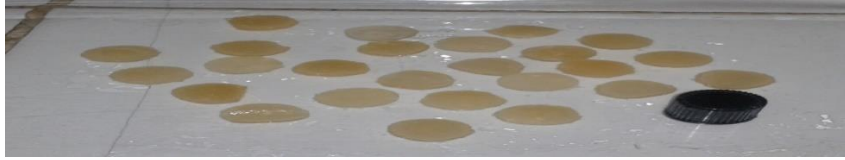
Dökümü gerçekleştirilen jel solüsyonun, 60 °C’de 24 saat etüvde tam olarak jelleşmesi sağlandı. Jelleşme süreci tamamlanan filmler, saf su ile yıkanarak yapısındaki reaksiyona katılmayan bileşenler/safsızlıklar tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi sonrası polimerik filmler aynı şartlarda tekrar kurutuldu. Antimikrobiyal analiz ve biyobozunma testinde kullanılmak üzere, jel filmlerden eşit çapta diskler kesildi. Tüm filmler aynı şartlarda üretildi ve analiz sürecine kadar desikatör içerisinde muhafaza edildi. Üretim sürecine ilişkin görseller Şekil 1, 2 ve 3’de sunulmuştur.



Şekil 1. Sentezlenen jel filmlerin yıkama süreci



Şekil 2. Sentezlenen jel filmlerin kurutma süreci



Şekil 3. Sentezlenen jel filmlerin analiz süreçleri için eşit çaplarda hazırlanması süreci

2.2. Antimikrobiyal analiz

Doğal antimikrobiyal etkisi olduğu çeşitli çalışmalarda ifade edilen dokuz farklı bitkisel uçucu yağ (nane, biberiye, kekik, karanfil, ısırgan, lavanta, çam terebenti, sarımsak, ardıç) kullanılarak hazırlanan hemiselüloz bazlı jel filmlerin antimikrobiyal etkisi agar (disk) difüzyon yöntemi ile gerçekleştirildi. Antimikrobiyal analiz için *E coli* stok kültürü kullanıldı. Analiz iki paralel olacak şekilde yürütüldü.

Yayma tekniği [14, 19, 20] ile gerçekleştirilen analizde, mevcut stok kültürlerden, alınan *E coli* mikroorganizmasının Nutrient Broth besiyerine inoküle edildi. Duyarlılık testi için inokülüm miktarları, McFarland 0.5 standart değerine ulaşıncaya kadar, 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. Yoğunluğu ayarlanmış kültürlerden (106 kob/ml), 0.5 mL alınarak, kültürün steril swab yardımıyla, Nutrient Agar besiyerine ekimleri gerçekleştirildi. Yüzey ekimi yapılmış agar plağı üzerine, nane, biberiye, kekik, lavanta vb. uçucu yağı içeren hemiselüloz bazlı filmlerden kesilen eşit çapa sahip disk şeklindeki (dairesel) filmler yerleştirildi. Petriler 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonucunda, filmlerin etrafında oluşan berrak zon çapı yani üremenin inhibe edildiği bölgeleri saptamak için petri kaplarının fotoğrafları çekildi. MATLAB programının R2017 sürümünün görüntü analiz teknikleri kullanılarak antimikrobiyal uçucu yağ içeren jel filmlerin antimikrobiyal etkinlikleri karşılaştırmalı olarak ortaya konuldu. Antimikrobiyal analiz sonucunda, elde edilen fotoğrafların görüntü analizinde kullanılan MATLAB program kodu aşağıda sunulmuştur.

Matlab Program kodu:

```

clc
clear all
ilkresim = imread('rnumune_no_2.jpg');
imshow(ilkresim);
I = rgb2gray(ilkresim);
figure, imshow(I);
K=ilkresim;
for i=1:2988
for j=1:5312
    if (K(i,j,1) < 170 && K(i,j,2) < 170 && K(i,j,3)< 170)
        K(i,j,1)=0;
        K(i,j,2)=0;
        K(i,j,3)=0;
    else
        K(i,j,1)=255;
        K(i,j,2)=255;
        K(i,j,3)=255;
    end
end
end
figure, imshow(K)
T=im2bw(K);
figure, imshow(T)

```

2.3. Biyobozunurluk testi

Hazırlanan polimerik jel filmlerin yapısına ilave edilen antimikrobiyal özellik gösterdiği bilinen uçucu yağların biyobozunma hızı üzerine etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla, biyobozunma testleri yapıldı. Geleneksel bir yöntem olan ve pek çok çalışmada da kullanılan toprağa gömme testi, atıkların gerçek bertaraf koşullarına benzer olması nedeniyle, çeşitli mikroorganizma popülasyonlarının dahil olduğu enzimatik testle karşılaştırıldığında daha etkili bir yöntemdir [21, 23].

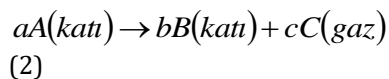
Bu amaçla farklı bölgelerden (Elazığ il sınırları içerisinde) temin edilen toprak örnekleri homojen hale getirildi ve nem içeriği tayin edildi. Polimerik film örneklerinin toprağa oranı ağırlıkça %1.0-0.5 olacak şekilde gömme testleri gerçekleştirildi. Tüm polimerik jel film örnekleri ayrı ayrı plastik kaplar içerisinde aynı derinliğe gömüldü. Gömme işlemi sonrasında plastik kaplar inkübatör içerisinde yerleştirildi ve ortam sıcaklığı 30°C±5°C olacak şekilde sabit tutuldu. Biyobozunurluk testleri boyunca toprağın nem içeriği su ilavesi ile ölçülen ilk nem (doğal nem) değerinde sabit tutulmaya çalışıldı. Belirli periyotlarda jel film örnekleri topraklar içerisinde çıkarılıp su ile yıkandıktan sonra ıslak havlu ile kurutulup tartıldı. Ağırlık azalmaları zamana bağlı olarak kaydedildi. Analiz iki paralel olacak şekilde yürütüldü ve sonuçların ortalaması alınarak kinetik hesaplama yapıldı.

Polimerik filmlerin bozunma hızları, zamana bağlı ağırlık azalması verilerinin kinetik analizi yapılarak ortaya konulmaya çalışıldı. Coats Redfern metodu kullanılarak gerçekleştirilen kinetik analizde, 20 farklı teorik bozunma model eşitliği dikkate alınarak, biyolojik bozunma sürecini en iyi temsil eden bozunma model eşitlikler belirlendi. Hesaplamalar için Excel programının veri çözümleme eklentisi içerisindeki Regresyon analizi kullanıldı. En uygun model eşitliğin hangisi olduğu kararı, regresyon analizi ile elde edilen R² katsayısı ve ANOVA tablosu anlamlılık katsayısının eş zamanlı değerlendirilmesi ile belirlendi. Tespit edilen en uygun teorik model eşitlikleri dikkate alınarak bozunma hızları hesaplandı.

2.4. Coats Redfern Metodu

Farklı şartlarda elde edilen polimerik jel filmlerin bozunma hızları, deneysel olarak elde edilen zamana bağlı bozunma verilerinin, integral çözünmeyi esas alan **Coats Redfern** metodu [24] ile belirlendi.

Bu metoda göre katı bir maddenin bozunması, aşağıda verilen (2) nolu genel reaksiyon ile ifade edilir.



Katı maddenin bozunma hızı ise, Eşitlik 3 kullanılarak hesaplanabilir.

$$\frac{d\alpha}{dt} = k(T)f(\alpha) \quad (3)$$

Burada α dönüşüm kesri ($\alpha = \frac{m_i - m_t}{m_i - m_s}$), t zaman, k(T) hız sabiti ve f(α) katı faz teorik bozunma model

eşitliğidir. α dönüşüm kesrinde yer alan, m_i : filmin başlangıçtaki kütlesini; m_t : herhangi bir t anındaki filmin kütlesini ve m_s ise ön görülen bozunma süresi sonunda filmin kütlesini ifade etmektedir. Eşitlik 3 düzenlenirse;

$$g(\alpha) = \int \frac{d\alpha}{f(\alpha)} = k(T)t + C \quad (4)$$

elde edilir. t'ye karşı g(α) değerleri grafiğe geçirdiğinde elde edilen doğru denklemlerinden integral sabiti, C ve hız sabiti, k(T) belirlenir. Her bir "katı faz dönüşüm teorik modeli" için t'ye karşı g(α) değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilen doğruların regresyon katsayıları dikkate alınarak, biyolojik bozunma sürecini en iyi temsil eden teorik bozunma modelinin hangi modeller olduğuna karar verilir. Çalışma kapsamında kullanılan katı hal bozunma teorik model eşitlikleri ve integre edilmiş formları Tablo 2'de görülmektedir. İlgili tabloda toplam 20 adet "Katı faz dönüşüm modeli" yer almaktadır.

Tablo 2. Katı faz dönüşüm teorik modelleri [25, 26]

Model	f(α)	g(α)
*Kimyasal kinetik F(0), *Power Law (P1), *Bir boyutlu etkileşim Geometrisi (R1)	1	α
*Kimyasal Kinetik F(1/2), *Etkileşim Geometrisi Silindirik sistemde (R2)	$(1 - \alpha)^{1/2}$	$[1 - (1 - \alpha)^{1/2}]$
*Kimyasal Kinetik F(2/3), *Etkileşim Geometrisi Küresel sistemde (R3)	$(1 - \alpha)^{2/3}$	$[1 - (1 - \alpha)^{1/3}]$
*Kimyasal Kinetik F(1) *Avrami-Erofeev eşitliği (A1, n=1)	$(1 - \alpha)$	$-\ln(1 - \alpha)$
Kimyasal Kinetik F(2)	$(1 - \alpha)^2$	$(1 - \alpha)^{-1} - 1$
Kimyasal Kinetik F(3)	$(1 - \alpha)^3$	$[(1 - \alpha)^{-2} - 1] / 2$
Power law (P2)	$2\alpha^{1/2}$	$\alpha^{1/2}$
Power law (P3)	$3\alpha^{2/3}$	$\alpha^{1/3}$
Power law (P4)	$4\alpha^{3/4}$	$\alpha^{1/4}$
Avrami-Erofeev eşitliği (A2, n=2)	$2 \times (1 - \alpha) \times (-\ln(1 - \alpha))^{1/2}$	$[-\ln(1 - \alpha)]^{1/2}$
Avrami-Erofeev eşitliği (A3, n=3)	$3 \times (1 - \alpha) \times (-\ln(1 - \alpha))^{2/3}$	$[-\ln(1 - \alpha)]^{1/3}$
Avrami-Erofeev eşitliği (A4, n=4)	$4 \times (1 - \alpha) \times (-\ln(1 - \alpha))^{3/4}$	$[-\ln(1 - \alpha)]^{1/4}$
Parabolic law (D1)	$1/2\alpha$	α^2
Holt-Cutler-Wadsworth/Valensi eşitliği (D2)	$1/[-\ln(1 - \alpha)]$	$[(1 - \alpha) \ln(1 - \alpha)] + \alpha$
Jander eşitliği (D3)	$3 \times (1 - \alpha)^{2/3} / 2 \times [1 - (1 - \alpha)^{1/3}]$	$[1 - (1 - \alpha)^{1/3}]^2$
Ginstling- Brounshtein eşitliği (D4)	$3/2 \times [(1 - \alpha)^{1/3} / 1 - (1 - \alpha)^{1/3}]$	$1 - (2\alpha/3) - (1 - \alpha)^{2/3}$

3. Bulgular ve Tartışma

Agar (disk) difüzyon prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilen analizlere ait bazı görseller Şekil 4’de sunulmuştur. Farklı bitkisel uçucu yağları içeren hemiselüloz bazlı filmlerin *E. coli*’e karşı antimikrobiyal aktiviteleri, inkübasyon sonrasında Nutrient Agar plaklarında oluşan inhibisyon zon çaplarının ölçülmesiyle belirlenmiştir. Antimikrobiyal analiz sonucunda oluşan inhibisyon zon çapları (mm olarak), zon sonrası mikroorganizma üreme yoğunluklarını gösteren renk pikselleri, görüntü analizi sonucu elde edilen RGB (Red Green Blue) değeri olarak Tablo 3’de özetlenmiştir.

Tablo 3 irdelendiğinde, agar (disk) difüzyon testi sonucunda uçucu bitkisel yağ içermeyen yani kontrol örneği olarak kullanılan hemiselüloz filmde normal üremenin gerçekleştiği, bundan dolayı inhibisyon zonunun oluşmadığı, yani hiç antimikrobiyal etki göstermediği teyit edilmiştir. Diğer taraftan kontrol filminin üzerinde üremenin olduğu da gözlemlenmiştir. Çalışmada kullanılan biberiye, kekik, karanfil ve ısırgan uçucu yağı içeren polimerik filmlerin ise antimikrobiyal etki göstererek, üremenin hiç gerçekleşmediği bir inhibisyon zon bölgesi oluşturduğu belirlenmiş ve oluşan zon ölçüm değerleri Tablo 3’de sunulmuştur. En etkin antimikrobiyal etkiyi biberiye uçucu yağı kullanılarak hazırlanan jel filmin gösterdiği ortaya konulmuştur. Diğer bitkisel uçucu yağların ise üremenin gerçekleşmediği bir zon oluşturmadıkları, ancak üreme aktivitesini düşürdükleri görüntü analizi ile belirlenmiştir. Diğer bitkisel uçucu yağların üreme aktivitesinde düşüşe yol açtığı yorumu, üremenin tam gerçekleştiği yere oranla daha açık renkte olan (Renk açıklık bölgesi) bir bölgenin mevcudiyetine dayandırılmıştır. Üremenin tam gerçekleştiği bölge ile üreme aktivitesinin düşük olduğu bölgeler görüntü analizi ile elde edilen RGB değerleri ile saptanmıştır ve Tablo 3’de üreme hızının düştüğü bölge çapları sunulmuştur.

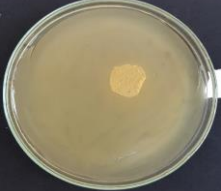
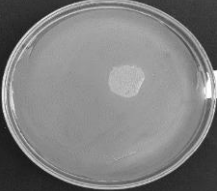








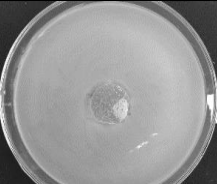
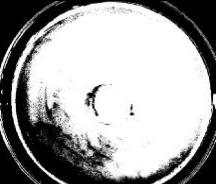
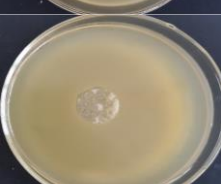
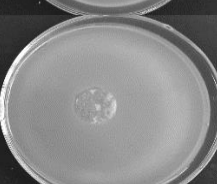
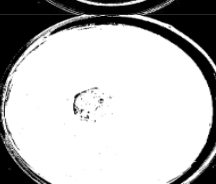
Elde edilen bulgular ve deneysel gözlemler, antimikrobiyal uçucu yağ içeren jel filmlerin antimikrobiyal etkisinin uçucu yağın *E. coli*’nin ekimi gerçekleştirilen agar üzerine difüzyonuna dayandığını göstermiştir. İnhibisyon zon çapının; diskteki antimikrobiyal maddenin miktarı, disk çapı, difüzyon yeteneği ve petri kutularındaki agarın kalınlığı gibi etmenlere bağlı olarak değiştiği, bu nedenle esansiyel yağların antimikrobiyal etkinliğinin kıyaslanması için agar (disk) difüzyon metodununun çok uygun bir metod olmadığı [27, 28] bilinse de, serbest uçucu yağlar ile çalışmamızda kullandığımız polimerik film yapısına tutuklanmış uçucu yağların antimikrobiyal etkisini kıyaslamak amacı ile literatür sunulan veriler ile kıyaslama yapmanın yararlı olduğunu düşünülmüştür.

Kekik uçucu yağının, *E. coli* üzerine antimikrobiyal etkisinin agar (disk) difüzyon metodu ile incelendiği Teixeira ve diğ., (2013)’in [29] çalışmasında inhibisyon zon çapı 47 mm, Fadli ve diğ., (2012) ‘in [30] çalışmasında ise zon çapının uçucu yağ konsantrasyonuna bağlı olarak 25-30 mm aralığında değiştiği sunulmuştur. Çalışmamızda ise, kekik uçucu yağı tutuklanmış polimerik jel filmlerin oluşturduğu inhibisyon zon çapı 4mm ile sınırlı kalmıştır. Bu kıyaslama, polimerik matriks içerisine tutuklanmış uçucu yağların literatürde sunulan serbest uçucu yağlar gibi davranmadığını ve uçucu yağların polimerik film içerisinden agar üzerine difüzyonunu sınırlandırdığını ortaya koymaktadır.


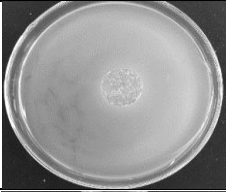

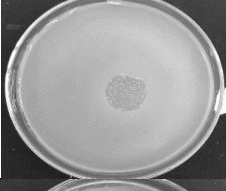
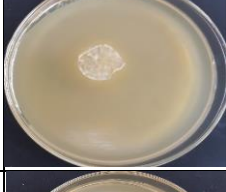
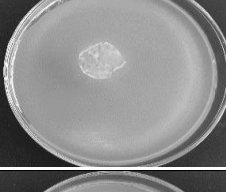
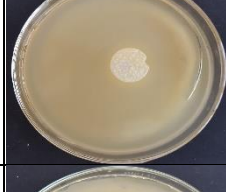
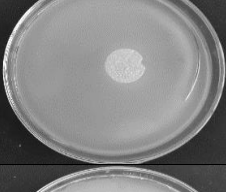




Şekil 4. Antimikrobiyal analiz sürecine ilişkin görseller
(Kullanılan uçucu yağlar; sterilizasyon; üretilen jel filmler; ekim ve inkübasyon süreçleri)

Tablo 3. Antimikrobiyal analiz sonuçları

Anti. Mik. Madde	Renkli Resim	Siyah Beyaz Resim		İnhibisyon Zon Çapı mm	İnhibisyon Zon pikseli RGB	Renk Açıklık Bölgesi (mm)	Açık Bölge Pikseli RGB	Temel Piksel RGB	Jel Pikseli RGB
Uçucu yağ içermeyen örnek				-	-	-	-	177x159x107	209x178x111
Biberiye				Sol: 2.46 Alt: 5.258 Sağ: 1.21 Üst: 1.33	136x110x75	Sol: 2.917 Alt: 1.804 Sağ: 4.049 Üst: 4.82	185x161x137	176x156x116	183x142x100
Kekik				Sol: 0.311 Alt: 1.153 Sağ: 0.498 Üst: 0.535	156x148x137	Sol: 3.273 Alt: 3.491 Sağ: 3.491 Üst: 4.021	193x184x175	189x175x146	173x157x134
Karanfil				Sol: 1.465 Alt: - Sağ: 1.221 Üst: -	136x125x107	Sol: 4.029 Alt: 3.1750 Sağ: 2.1981 Üst: 2.1981	177x160x132	172x156x132	186x168x111
Isırgan				Sol: 0.626 Alt: - Sağ: - Üst: 1.755	170x150x117	Sol: 1.5669 Alt: 1.2863 Sağ: 0.638 Üst: 1.7256	179x157x116	167x150x107	171x155x130

Tablo 3. Antimikrobiyal analiz sonuçları (Devam)

Anti. Mik. Madde	Renkli Resim	Siyah Beyaz Resim	İnhibisyon Zon Çapı mm	İnhibisyon Zon pikseli RGB	Renk Açıklık Bölgesi mm	Açık Bölge Pikseli RGB	Temel Piksel RGB	Jel Pikseli RGB
Lavanta			-	-	Sol: 2.7898 Alt:3.6388 Sağ:4.305 Üst:2.9717	204x193x171	174x170x141	230x203x195
Çam			-	-	Sol: 2.2283 Alt:2.8215 Sağ:3.3425 Üst:3.7139	212x194x156	187x172x139	186x175x156
Nane			-	-	Sol: 0.874 Alt:1.79 Sağ:1.274 Üst:4.837	186x164x127	181x164x134	209x200x191
Ardıç			-	-	Sol: 2.7809 Alt:2.407 Sağ: 3.2865 Üst:2.4017	186x169x127	173x155x117	213x201x189
Sarımsak			-	-	Sol: 3.2276 Alt: 1.7379 Sağ:2.9793 Üst:2.1103	212x193x151	195x177x139	222x206x180

Polimerik jel filmlerden uçucu bitkisel yağların agar üzerine etkin bir şekilde difüze olamamasının, jel filmlerin çapraz bağ yoğunluğunun yüksek olmasından ve uçucu bitkisel yağların hidrofobik özellik taşımasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Çapraz bağ yoğunluğunun yüksek olmasının, agarın bünyesindeki suyun ağ yapılı polimerik film içerisine nüfuzunu belirli ölçüde sınırlandırarak uçucu bitkisel yağların jel filmde agara difüze olmasını büyük ölçüde azalttığı şeklinde yorumlanmıştır. Propolis tutuklanmış PHB(polihidroksibütirat) filmleri ile yapılan antimikrobiyal çalışmada da çalışmamızda elde edilen sonuçlara benzer olarak bir difüzyon direnci olduğu ifade edilmiştir [31]. Yapılan çalışmalarda mikroorganizmanın gelişmesinin ve antimikrobiyal maddenin besini yerine difüzyonunun; agar kompozisyonu, filmin kimyasal yapısı ve film içerisindeki çapraz bağların oranından etkilendiği ortaya konulmuştur. Doğal antimikrobiyal ajanlarla, antimikrobiyal özellik kazandırılan filmlerin, antimikrobiyal etkisinin mikroorganizmanın gelişimi ve antimikrobiyal maddenin besini yerine difüzyon oranına bağlı olarak değişiklik gösterdiği ifade edilmiştir [19, 32].

Elde edilen sonuçlar ışığında, antimikrobiyal etkisi belirlenen uçucu yağların, antimikrobiyal etkinliğinin daha net olarak gözlemlenebilmesi ve yorumlanabilmesi için, jel filmlerin yapısına ilave edilen bitkisel uçucu yağ konsantrasyonlarının artırılması ya da çapraz bağ yoğunluğu düşük filmler ile çalışmanın tekrarlanması gerektiği sonucuna varılmıştır.

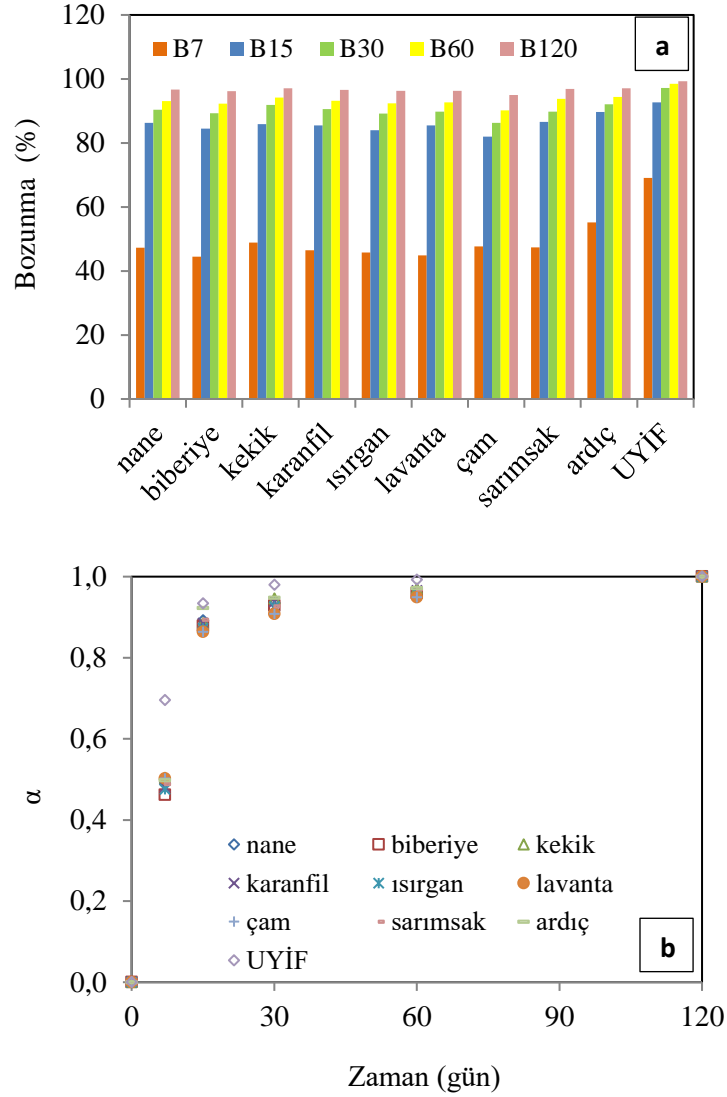
Biyobozunurluk testleri ve biyobozunma kinetiği

Polimerik malzemelerin bozulması, sadece polimer bilimi açısından değil, özellikle biyomedikal alan uygulamalarında çok önemlidir. Geleneksel ambalaj materyalleri ve biyomedikal malzemeler genellikle sentetik yapıya sahiptir. Sentetik polimerik mamuller ekonomik ve kullanışlı olmalarına karşın biyobozunur yapıya sahip olmadıkları için doğada uzun yıllar karbon döngüsüne katılmadan çevresel kirlilik unsuru olarak kalırlar. Bu sebeple son zamanlarda özellikle polimerik mamullerin yaygın olarak kullanıldığı sektörlerde, biyobozunur nitelikte polimerik ürünlerin üretimine yönelik çalışmalar yapılmaktadır [11, 18].

Bu çalışmada bitkisel uçucu yağların biyobozunma üzerine etkisinin anlaşılabilmesi ve bitkisel uçucu yağ katkılı polimerik jel filmlerin biyobozunma hızlarının kıyaslanabilmesi amacıyla, farklı bitkisel uçucu yağ içeren jel film örneklerinin toprak florası içerisine gömme testleri yapılmıştır. Zamana bağlı olarak jel filmlerin ağırlık kayıpları belirlenerek biyolojik bozunma yüzdeleri 7-15-30-60. ve 120. gün sonunda hesaplanmıştır. Farklı zamanlarda biyobozunma yüzdesinin antimikrobiyal uçucu yağ türü ile değişimi Şekil 5(a)'da, dönüşüm kesrinin zamanla değişimi ise Şekil 5(b)'de sunulmuştur.

Biyolojik olarak bozunabilen polimerlerin, bir yıl içinde doğal biyolojik döngüsünü tamamladığı, toksik olmayan suya veya karbondioksit'e ayrıştığı kabul edilmektedir [33]. Şekil 5(a) incelendiğinde farklı şartlarda üretilen polimerik filmlerin 60 günlük bozunma süresi sonunda toprak florasında, % 95-98 oranında bozunduğu yani, hemiselüloz esaslı jel filmlerin biyobozunur nitelikte olduğu kanıtlanmıştır. Şekil 5 (b)'den zaman ve dönüşüm arasındaki ilişkinin lineer olmadığı, bozunma hızının zamanla azaldığı, ilk 30 günlük süre içerisinde biyolojik bozunmanın büyük ölçüde tamamlandığı görülmektedir. Şekil 5(a-b) birlikte irdelendiğinde, antimikrobiyal uçucu yağ katkısının nihai bozunma yüzdesini kayda değer ölçüde değiştirmediği ancak, ilk 60 günlük biyolojik bozunma süreci için, dönüşüm kesrindeki artış trendini etkilediği görülmüştür. Dönüşüm kesrindeki artış trendi üzerinde en yüksek etkiye sahip olan antimikrobiyal uçucu yağın çam terebentini olduğu belirlenmiştir. Şekil 5'de sunulan grafikler dikkate alınarak yapılan yorumlar, Tablo 4'de sunulan kinetik bozunma hız verileri ile uygunluk göstermektedir.

Biyolojik parçalanma süresinin ya da başka bir yaklaşımla belirli bir süre zarfında ulaşılabilen bozunma kesrinin; polimerik mamulün kimyasal yapısına (fonksiyonel grup stabilitesi, reaktivite, hidrofilite ve denge şişme değeri vb), fizikokimyasal özelliklerine (moleküler ağırlık, gözeneklilik, kalınlık, esneklik ve morfoloji vb.) ve çevresel faktörlere (çevresel koşullar, mikrobiyal popülasyonun aktivitesi) bağlı olduğu bilinmekle [34, 35] birlikte, bu çalışma elde edilen sonuçların anlamlı ve özgün olduğunu daha nicel olarak ortaya koyabilmek açısından, literatürde sunulmuş biyopolimerlerlik filmlerin bozunma verileri ile kıyaslama yapılmasının faydalı olacağı düşünülmüştür.



Şekil 5. (a) Antimikrobiyal uçucu yağ türünün biyolojik bozunma üzerine etkisi (b) Dönüşüm kesrinin zamanla değişimi (U.Y.İ.F: uçucu yağ içermeyen film)

Poli(laktik asit) (PLA) ve polihidroksialkanoatlar (PHA) filmlerinin biyobozunma davranışının gömme testleri ile karşılaştırmalı olarak incelendiği bir çalışmada [36], PLA filmlerinin toprak gömme testleri sonucu bozunmasının beklenenden yavaş olduğu, 7 aylık süre sonunda bile PLA filmlerinin parçalanmasının tamamlanmadığı, biyobozunma sürecinin film kalınlığı ile doğrudan ilişkili olduğu sunulmuştur. PHA filmlerinin ise nisbeten daha yüksek biyolojik bozunmanın hızına sahip olduğu, toprak bünyesindeki mikroorganizmaların çevre sıcaklığından etkilenmeksizin PHA filminin yüzeyine kolayca saldırdığı ifade edilmiştir.

Modelli ve diğ. (1999) çalışmalarında [37], toz haline getirdikleri ($\geq 100\mu\text{m}$) poli (3-hidroksibutirat) (PHB) örneğinin, 65 günlük bozunma süresi sonunda % 90 oranında bozunduğunu ve biyolojik bozunma sürecinin birinci dereceden kinetiğe uyduğunu ortaya koymuşlardır.

Partikül büyüklüğünün biyobozunurluk üzerindeki rolünü daha fazla araştırmak için yürütülen başka bir çalışmada, polibütilen sebakat peletleri öğütülmüş ve böylece farklı yüzey alanlarına sahip (33, 89, 193 ve 824 cm^2/g) dört numune elde edilmiştir [2]. Farklı yüzey alanına sahip numuneler 138 gün boyunca toprakta biyodegradasyon açısından test edilmiştir. 138. gün sonunda 33 cm^2/g yüzey alanına sahip örnekler hariç, tüm örneklerin % 80 ila % 90 arasında bozunduğu, zamana bağlı bozunma

eğrisinin lineer olduğu, teorik maksimum biyodegradasyon hızının Lineweaver-Burk yaklaşımı (lineer regresyon) ile $k_{max} = 97\text{mg polimer/gün}$ olarak hesaplandığı sunulmuştur.

Laktik-Glukolik asit polimerlerinin (PLGA) biyodegradasyonunun incelendiği diğer bir çalışmada [38], biyobozunma hızının polimer bileşimi, polimer moleküler ağırlığı ve biyodegradasyon ortamının pH'ından etkilendiği bildirilmiştir. Yüksek moleküler ağırlığa sahip PLGA'ların, daha düşük moleküler ağırlığa sahip olanlardan daha hızlı bozunduğu ayrıca bazik ortam şartlarında, asidik ortama kıyasla PLGA'nın biyobozunmasının yavaşladığı ortaya koyulmuştur. Farklı kompozisyonlarda üretilen PLGA örneklerinin bozunma verilerinin birinci derece kinetiğe uyduğu ve hız sabiti değerlerinin, 0.02-0.1 gün⁻¹ aralığında olduğu sunulmuştur.

Zamana bağlı biyolojik bozunma verilerinin regresyon analizi ve elde edilen ANOVA tablosu sonucunda, diğer kinetik model eşitliklerine kıyasla, Kimyasal Kinetik F(2) Modeli için elde edilen regresyon katsayılarının daha yüksek olması sebebi ile, jel filmlerin bozunmasını temsil eden en iyi modelin Kimyasal Kinetik F(2) olduğuna karar verilmiştir. Bu nedenle Tablo 4'de yalnızca kimyasal kinetik F(2) model eşitliği dikkate alınarak hesaplanan regresyon katsayıları, doğru denklemleri, bozunma hız sabiti, ANOVA katsayıları ve standart hata değerleri sunulmuştur.

Tablo 4 incelendiğinde regresyon analizi sonucu, tespit edilen en uygun model eşitliklerin regresyon katsayılarının 0.97 ile 0.99 arasında olduğu görülmektedir. Basit regresyon çıktısındaki ANOVA tablosu bize regresyon modelimizin genel olarak anlamlı bulunup bulunmadığını gösterir. Burada F-değerine ($F >> 0$) ve p-değerine ($p < 0.001$) bakarak regresyon modelimizin anlamlı bulunduğunu söyleyebiliriz. Yani kimyasal kinetik F(2) model denklemleri kullanılarak, bozunma süresi ile zamana bağlı ağırlık azalması arasında anlamlı bir ilişki kurulabildiği anlaşılmıştır.

Tablo 4'de verilen bozunma hız sabitlerinin $k(T)$ değerleri dikkate alındığında, polimerik film yapısına katılan bitkisel uçucu yağların biyolojik bozunma hızını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. Antimikrobiyal uçucu yağ türlerinin tümünün, antimikrobiyal uçucu yağ içermeyen aynı bileşime sahip filmin bozunma hızına kıyasla, bozunma hızını yaklaşık 5 kat düşürdüğü saptanmıştır. Biyolojik bozunma hızı üzerinde en yüksek etkiye sahip olan antimikrobiyal uçucu yağlar çam, biberiye ve ısırganıdır.

Tablo 4. Regresyon analizi sonucu elde edilen biyolojik bozunma sürecini en iyi temsil eden model eşitlikleri, regresyon katsayıları, doğru denklemleri, ANOVA katsayıları.

Antimikrobiyal uçucu yağ türü	Model	Denklem	R ²	k(T)	Standart Hata	F	P (sig.)
Uçucu yağ içermeyen film (UYİF)	F(2)	2.1573t-10.316	0.9802	2.1573	8.434	148.19	0.00100
Nane	F(2)	0.4428t-0.0447	0.9802	0.4428	1.728	148.55	0.00100
Biberiye	F(2)	0.4037t-0.1390	0.9830	0.4037	1,461	172.97	0.00095
Kekik	F(2)	0.5681t-0.9428	0.9899	0.5681	1.580	292.79	0.00043
Karanfil	F(2)	0.4873t-0.5226	0.9884	0.4873	1.445	256.51	0.00052
Isırgan	F(2)	0.4051t-0.3085	0.9882	0.4051	1.217	250.74	0.00054
Lavanta	F(2)	0.4392t-0.2059	0.9835	0.4392	1.564	178.51	0.00090
Çam	F(2)	0.3173t-0.0911	0.9824	0.3173	1.165	167.91	0.00099
Sarımsak	F(2)	0.5257t-1.1348	0.9829	0.5257	1.908	171.97	0.00095
Ardıç	F(2)	0.5914t-0.0527	0.9744	0.5914	2.632	114.35	0.00074

4. Sonuç

Hemiselüloz esaslı polimerik jel filmlerin yapısına katılan bitkisel uçucu yağların, antimikrobiyal etkinliğini ve polimerik filmlerin biyobozunma hızı üzerine etkisini araştırmak amacı ile yürütülen çalışmada;

1. Polimerik jel film yapısına ilave edilen uçucu yağların antimikrobiyal etkinliğinin, uçucu yağın film bünyesinden agar üzerine difüzyonuna bağlı olduğu gözlemlenmiştir. Fazlar arası kütle transferinin, jel filmlerin çapraz bağ yoğunluğu ve uçucu yağların hidrofobik yapıya sahip olması nedeniyle sınırladığı tespit edilmiştir.
2. Biberiye, kekik, karanfil ve ısırgan uçucu yağlarını içeren jel filmlerin antimikrobiyal etkiye sahip oldukları yani *E-coli*'nin üremesi üzerinde belirgin bir inhibisyon etkisi oluşturdukları tespit edilmiştir. Polimerik filmlerin antimikrobiyal etkinliğini daha etkin yorumlamak için polimerik yapıya ilave edilen uçucu yağ konsantrasyonunun etkisinin de incelenmesinde yarar olacağı sonucuna varılmıştır.
3. Farklı şartlarda üretilen hemiselüloz esaslı jel filmlerin biyobozunur nitelik taşıdığı, 60 günlük süre sonunda toprak florasında, % 95-98 oranında bozunduğu tespit edilmiştir. Regrasyon analizi sonucu Kimyasal kinetik (F2) model eşitliğinin biyolojik bozunma sürecini temsil eden iyi model olduğu ortaya konulmuştur. Yapılan kinetik hesaplamalar sonucunda, antimikrobiyal uçucu yağ türlerinin, biyobozunma hızını yaklaşık 5 kat düşürdüğü, ancak 120. gün sonundaki nihai bozunma yüzdesini değiştirmedikleri sonucuna varılmıştır.

Teşekkür

Şeyda TAŞAR'ın doktora tezi olan bu makale, 2211-C Öncelikli Alanlar Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Ayrıca çalışma MF-16.11 Proje Numarası ile Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Destekleme Birimi tarafından doktora kapsamında desteklenmiştir.

Kaynakça

- [1]. Tezcan, G., "Biyoesaslı/Biyobozunur Polimerlerin Sentezi ve Film Oluşturma Özelliklerinin Araştırılması", Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara, 2011.
- [2]. Chinaglia, S., Tosin, M., Degli-Innocenti, F. "Biodegradation rate of biodegradable plastics at molecular level", *Polymer Degradation and Stability*, c. 147, ss. 237-244, 2018.
- [3]. Kyrikou J., Briassoulis D. "Biodegradation of Agricultural Plastic Films: A Critical Review". *J Polym Environ*. c. 15, ss. 125-150, 2007.
- [4]. Rudnik E., Briassoulis D., "Comparative Biodegradation in Soil Behaviour of two Biodegradable Polymers Based on Renewable Resources", *J Polym Environ*, c. 19, ss. 18-39, 2011.
- [5]. Chandra, R., "Biodegradable polymers", *Prog. Polym. Sci.*, c. 23, ss. 1273-1335, 1998.
- [6]. Dönmez, A.T., "Nanokompozit yapısındaki biyopolimerlerin sentezi ve uygulamaları", İstanbul Üniversitesi", Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Kimyasal Teknolojiler Bilim Dalı, İstanbul, 2017.
- [7]. Avella, M., Vlioger, J., Fischer, S., Vacca, P., "Biodegradable starch/clay nanocomposite for food packaging applications", *Food Chemistry*, c. 93, ss. 467-474, 2005.
- [8]. Dursun, S., Erkan, N., Yeşiltaş, M. "Doğal biyopolimer bazlı (biyobozunur) nanokompozit filmler ve su ürünlerindeki uygulamaları" *J. Fish. Sci.*, c. 4 (1), ss. 50-77, 2010.

- [9]. Cao-Hoang, L., Chaine, A., Gregorie, L., Wache, Y., "Potential of Nisin-İncorporated Sodium Caseinate Films to Control *Listeria* in Artificially Contaminated Cheese", *Food Microbiology*, c. 27, ss. 940-944, 2010.
- [10]. Ricardo, A., Villacrés, E., Flores, S.K., Gerschenson, L.N. "Biopolymeric antimicrobial films: Study of the influence of hydroxypropyl methylcellulose, tapioca starch and glycerol contents on physical properties", *Materials Science and Engineering: C*, c. 36, ss. 108-117, 2014.
- [11]. Ayana, B. "Antimikrobiyal Yenilebilir Filmlerin Üretimi ve Özelliklerinin Belirlenmesi", Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Mersin, 2007.
- [12]. Zivanovic, S., Chi, S., Draughon, A. F. "Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils", *Journal of Food Science*, c. 70(1), ss. 45-50, 2005.
- [13]. Junk-Uk, H., Young-Min, K., Dong-Sun, L., "Multilayered antimicrobial Polyethylene Films Applied to the Packaging of Ground Beef", *Packaging Technology and Science*, c. 15, ss. 55-62. 2001.
- [14]. Emiroğlu K. Z., Yemiş P. G., Çoşkun K. B., Candoğan, K. "Antimicrobial Activity of Soy Edible Films Incorporated with Tyhme and Oregano Essential Oils on Fresh Ground Beef Patties", *Meat Science*, c. 86, ss. 283-288, 2010.
- [15]. Pastor, C., Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A., González-Martínez, C. "Quality and Safety of Table Grapes Coated with Hydroxypropylmethylcellulose Edible Coatings Containing Propolis Extract", *Postharvest Biology and Technology*, c. 60, ss. 64-70, 2011.
- [16]. Erol E, "Doğal Antimikrobiyal Madde İçeren Biyobozunur Filmlerin Üretimi", Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Mersin, 2012.
- [17]. Cooksey, K. "Effectiveness of antimicrobial food packaging materials", *Food Add. and Cont.*, c. 22(10), ss. 980-987, 2005.
- [18]. Ayana, B., Turhan, N., "Gıda ambalajlamasında Antimikrobiyal Madde İçeren Yenilebilir Filmler/Kaplamalar ve Uygulamaları", *Gıda*, c. 2, ss. 151-158, 2010.
- [19]. Kalkan, S., Ünal, E., Erginkaya, Z., "Nisin ilave edilmiş metil selüloz filmlerin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi", *Journal of Food and Feed Science Technology*, c. 14, ss. 1-7, 2014.
- [20]. Kalkan, S., "Farklı antimikrobiyal maddeler içeren yenilebilir film kaplamaların macar salamında kullanım olanakları ve *Listeria innocuainaktivasyonu* üzerine etkileri", Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Adana, 2014.
- [21]. Hanafi I, Nor Fasihah Z., "The mechanical properties, water resistance and degradation behaviour of silica-filled sago starch/PVA plastic films" *Journal of Elastomers & Plastics*, c. 46(1), ss. 96-109, 2014.
- [22]. Ramaraj B, Poomalai P. "Development of potentially biodegradable polyamide-6 and polyvinyl alcohol blends: physico-mechanical properties, thermal properties, and soil test", *J Appl Polym Sci*, c. 98, ss. 2339-2346, 2005.
- [23]. Ooi ZX., Chan, KL., Ewe, CY., "Mathialagan Muniyadi, Yi Peng Teoh, Hanafi Ismail, Evaluation of Water Affinity and Soil Burial Degradation of Thermoplastic Film Derived from Oil Palm Ash-filled Polyvinyl Alcohol", *BioResources*, c. 21(2), s. 4111-4122, 2017.
- [24]. Coats, A.W., Redfern, J.P., "Kinetic Parameters From Thermogravimetric Data", *Nature*, c. 201, ss. 68-69, 1964.

- [25]. Nunez L, Fraga F, Nunez MR, Villanueva M. "Thermogravimetric Study of the Decomposition Process of the System BADGE (n=0)/1,2 DCH", *Polymer*, c. 41(12), ss. 4635-4641, 2000.
- [26]. Orfao, J.J.M., Martins, F.G., "Kinetic Analysis of thermogravimetric data obtained under linear temperature programming-a method based on calculations of the temperature integral by interpolation", *Thermochimica Acta*, c. 390, ss. 195-211, 2002.
- [27]. Deans, S.G., Simpson, E., Noble, R.C., MacPherson, A., Penzes, L., "Natural antioxidants from *Thymus vulgaris* (thyme) volatile oil: the beneficial effects upon mammalian lipid metabolism". *Acta Horticulturae*, c. 332, ss. 177- 182, 1993.
- [28]. Dorman, H. J. D., Deans, S. G., "Antimicrobial agents from plants, antibacterial activity of plant volatile oils". *Journal of Applied Microbiology*, c. 88, ss. 308-316, 2000.
- [29]. Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Saraiva, J.A., Nunes, M.L., "Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils". *Industrial Crops and Products*. c. 43, ss. 587- 595, 2013.
- [30]. Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezrioui, N. E., Pages, J. M., Hassan, L., "Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection - bacteria and their synergistic potential with antibiotics". *Phytomedicine*, c. 19, ss. 464-471, 2012.
- [31]. Clarissa Dos Santos Pires, A., Soares, N.F.F., Andrade, N.J., Silva, L.H.M., Camilloto, G.P., Bernardes, P.C., "Development and Evaluation of Active Packaging for Sliced Mozzarella Preservation", *Packaging Technology and Science*, c. 21, ss. 375-383, 2008.
- [32]. Kalkan S., Erginkaya Z., "Nisin İlave Edilmiş Peyniraltı Suyu Protein İzolatı Filmlerin Karakterizasyonu ve *Listeria innocua*' ya Karşı Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi", *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, c. 3(2), ss. 151-160. 2016.
- [33]. Van Der Zee M. Structure-Biodegradability Relationships of Polymeric Materials. 1, 1, 1997.
- [34]. Acemoglu M. "Chemistry of polymer biodegradation and implications on parenteral drug delivery", *Int J Pharm*. c. 277, ss. 133-139, 2004.
- [35]. Anderson J.M., Shive M.S. "Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres". *Adv Drug Deliv Rev*. c. 28(1), ss. 5-24, 1997.
- [36]. Grima S., Bellon-Maurel V., Feuilletoy P., Silvestre F. "Aerobic Biodegradation of Polymers in Solid-State Conditions: A Review of Environmental and Physicochemical Parameter Settings in Laboratory Simulation". *J Polymer Environ*. c. 8, ss. 183-195, 2002.
- [37]. Modelli A., Calcagno B., Scandola M., "Kinetics of aerobic polymer degradation in soil by means of the ASTM D 5988-96 standard method", *J. Environ. Polym. Degrad*. c. 7, ss. 109-116, 1999.
- [38]. Wu X. S., Wang N., "Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/ glycolic acid polymers. Part II: Biodegradation", *J.Biomater.Sci.PolymerEdn* ,c. 12, ss. 21-34, 2001