

KİTİN İLE GÜÇLENDİRİLEN ELEKTROEĞRİLMİŞ NANOLİFLERİN AKTİF AMBALAJ MALZEMESİ OLARAK KULLANILABİLİRLİĞİNİN İNCELENMESİ

Mine Karabulut, Elif Atay, Aylin Altan*

Mersin Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Mersin, Türkiye

Geliş / Received: 29.05.2019; Kabul / Accepted: 05.11.2019; Online baskı / Published online: 27.11.2019

Karabulut, M., Atay, E., Altan, A. (2019). Kitin ile güçlendirilen elektroğrılmış nanoliflerin aktif ambalaj malzemesi olarak kullanılabilirliğinin incelenmesi. *GIDA* (2019) 44 (6) 1237-1252 doi: 10.15237/gida.GD19086.

Karabulut, M., Atay, E., Altan, A. (2019). Kitin ile güçlendirilen elektroğrılmış nanoliflerin aktif ambalaj malzemesi olarak kullanılabilirliğinin incelenmesi. GIDA (2019) 44 (6) 1237-1252 doi: 10.15237/gida.GD19086.

ÖZ

Elektroğirme, yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahip farklı boyutlarda liflerin üretimi için yenilikçi bir yöntemdir. Bu çalışmanın amacı, nane uçucu yağı yüklü ve kitin lifleri/kitin mikro kristalleri ile güçlendirilmiş zein bazlı nanobiyokompozit malzemelerin elektroğirme yöntemi ile üretilmesidir. Üretilen nanobiyokompozitlerin yüzey morfolojisi, mekanik özellikleri ve antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Polimer çözeltisine kitin liflerinin eklenmesi ile ortalama lif çapı artmıştır. Kitin mikro kristalleri içeren malzemelerin mekanik özelliklerinin, kitin lifi içeren malzemelere göre daha zayıf mekanik özelliklere sahip olduğu bulunmuştur. Kitin lifleri ve nane uçucu yağı içeren malzemeler test mikroorganizmaları üzerinde berrak zon oluşturmamıştır. Fakat kitin mikro kristalleri ile birlikte nane uçucu yağı içeren malzemeler, *Staphylococcus aureus* üzerinde *Escherichia coli*'den daha etkili olmuştur. Üretilen nanobiyokompozit malzemelerin potansiyel aktif ambalajlama sistemlerinin geliştirilmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Elektroğirme, nanobiyokompozit, nane uçucu yağı, kitin lifleri, kitin mikro kristalleri.

INVESTIGATION OF ELECTROSPUN NANOFIBERS STRENGTHENED WITH CHITIN AS ACTIVE PACKAGING MATERIAL

ABSTRACT

Electrospinning is an innovative method for the production of fibers with different sizes having a high surface area/volume ratio. The aim of this study was to produce zein based nanobiocomposite active packaging materials loaded with mint essential oil and strengthened by chitin fibers/chitin microcrystals using electrospinning. Surface morphologies, mechanical properties and antimicrobial activities of the produced nanobiocomposites were determined. The average fiber diameter increased with the addition of chitin fibers into polymer solution. It was found that the mechanical properties of materials containing chitin microcrystals were weaker than the materials containing chitin fibers. The composite materials containing chitin fibers and mint essential oil did not form a clear zone on the test microorganisms. However, materials containing chitin microcrystals with mint essential oil were more effective on *Staphylococcus aureus* than *Escherichia coli*. It is considered that nanobiocomposites produced can be used in the development of potential active packaging systems.

Keywords: Electrospinning, nanobiocomposite, mint essential oil, chitin fibers, chitin microcrystals.

* Yazışmalardan sorumlu yazar/Corresponding author:

✉ aaltan@mersin.edu.tr,

☎ (+90) 324 361 0001 /17195

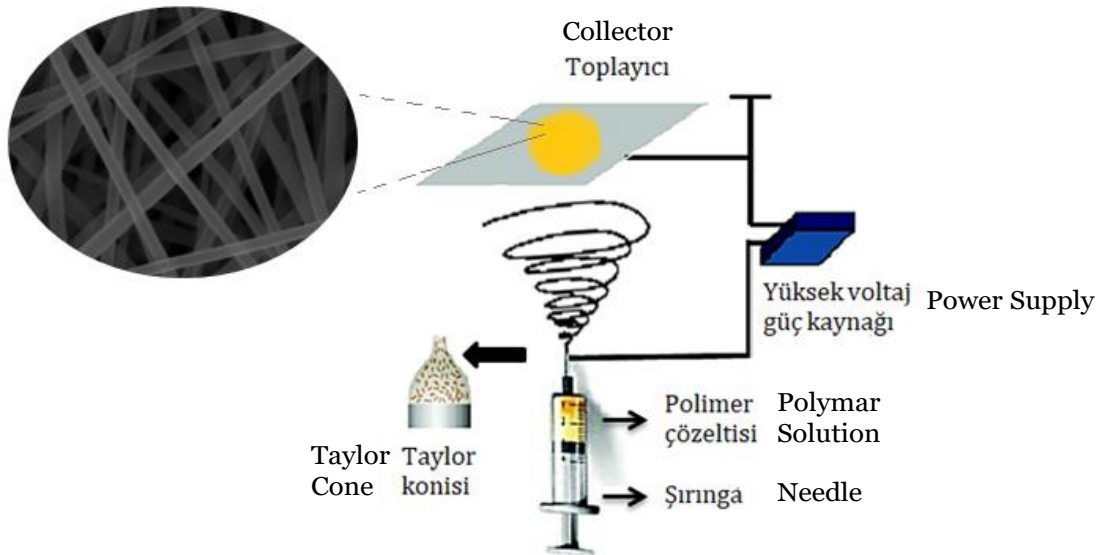
☎ (+90) 324 361 0032

GİRİŞ

Son yıllarda malzeme bilimi ve teknolojisinin gelişmesi, sürekli değişen tüketici taleplerine yanıt olarak gıda ambalajlama sistemlerini de etkilemiştir. Gıda maddelerinin üretiminden tüketimine kadar ürün koşullarının izlenmesi, gıda ambalajlama sistemlerinde nanoteknolojinin kullanımının gelişmesini sağlamıştır (Pereira de Abreu vd., 2012). Nanoteknoloji, malzemenin yapısını moleküler seviyede yeniden tasarlama ve birçok fonksiyonu bir arada bulunduran ambalaj malzemelerini üretme fırsatı sunmaktadır. Gıda ambalajlanmasında nanoteknoloji, nanokompozit ambalaj malzemelerinin üretilmesi ile akıllı ve aktif ambalaj malzemelerinin geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Nanokompozit ambalaj malzemeleri, biyolojik olarak parçalanabilir olduklarından geleneksel petro-kimyasal türevli ambalajlara karşı umut verici bir alternatiftir. Akıllı paketleme sistemleri, nakliye ve depolama esnasında ambalajlı gıdanın durumunu izlemek ve hakkında bilgi sağlamaya yönelik karakterize edilmişlerdir. Aktif paketleme sistemleri ise gıdaların raf ömrünü uzatmak için kullanılan, aynı zamanda tüketiciye taze ve güvenli şekilde yüksek kaliteli ürünler sunmayı hedefleyen, paketin geleneksel işlevinin ötesine geçtiği bir uygulamadır (Pereira de Abreu vd., 2012; Realini ve Marcos,

2014). Aktif paketleme uygulamaları, oksijen yakalayıcılar, nem düzenleyiciler, karbondioksit düzenleyiciler, etilen yakalayıcılar ve antimikrobiyal paketleme sistemlerinden oluşmaktadır (Vermeiren vd., 1999). Son zamanlarda, aktif ambalajlama için nanoliflerin kullanımına olan ilgi artmaktadır.

Gıda endüstrisi de dâhil olmak üzere birçok alanda kullanılan nanoliflerin üretimi için geliştirilen farklı yöntemler bulunmaktadır. Fakat bu yöntemler genellikle mekanik kuvvetleri temel alan, kurulumu zor ve pahalı sistemlerden oluşmaktadır. Elektroğirme yönteminde ise diğer lif üretim yöntemlerinden farklı olarak elektrik alan kuvvetlerinin etkisiyle polimerlerden lif oluşumu sağlanmaktadır. Elektroğirme, bir polimer çözeltisini yüksek elektrik alanına maruz bırakarak ultra ince liflerin oluşumunda kullanılan fiziksel bir işlemdir (Torres-Giner, 2011). Birçok alanda kullanım potansiyeli olan elektroğirme, nanometre çapında ve geniş bir yüzey alanına sahip lif üretmek için en etkili, avantajlı, uygulaması kolay, ucuz ve hızlı bir yöntemdir. Bu sistem genel olarak; bir yüksek gerilim güç kaynağı, ayarlanabilir bir şırınga pompası, şırınga, iğne ve bir toplayıcı plakadan meydana gelir. Elektroğirme sistemi Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Elektroğirme düzeneği
Figure 1. Electrospinning system

Elektroçirime tekniği, gıda ambalajlarında kullanılan aktif ara katman üretimi için potansiyel oluşturan bir yöntemdir. Geleneksel döküm yöntemine kıyasla nano ve mikro lifler ultra-ince çaplarına bağlı olarak çok büyük bir yüzey/hacim oranına sahiptirler (Schmatz vd., 2019; Torres-Giner, 2011). Nanolifler, elektroçirime prosesi ile bir fazın diğerleri içerisinde dağılmış halde bulunduğu üç boyutlu yapılar olan nanokompozitlere dönüştürülebilirler. Nanobiyokompozitler, biyolojik olarak parçalanabilen ve yenilenebilir doğal kaynaklardan elde edilen nanokompozitlerdir. Dođal biyopolimerlerden biri olan zein; mısırdan elde edilen α -Y-, β - ve δ - zeinin karışımı olan bir mısır proteindir. Zein, film oluşturma özelliği, yüksek termal direnci ve iyi oksijen ve aroma bariyer özellikleri nedeniyle potansiyel ambalaj malzemelerinin geliştirilmesinde kullanılabilir. Ancak biyopolimerlerden elde edilen filmlerin, zayıf mekanik ve bariyer özelliklerinden dolayı ambalaj materyali olarak kullanımlarının sınırlı olduğu bildirilmektedir (Junkasem vd., 2006).

Nanokompozitlerin geliştirilmesinde, uçucu yağlar ve bazı dolgu malzemelerinin kullanımı oldukça yaygındır (Antunes vd., 2017; Wen vd., 2016). Fakat kullanılan dolgu malzemelerinin çoğu inorganiktir. İnorganik dolgu malzemelerinin yerine yenilenebilir kaynaklardan elde edilen kıl kristalleri ve mikro kristaller de kullanılabilir. Bu malzemeler, düşük maliyetli, kolay bulunabilir, toksik olmayan ve yenilenebilir olmalarının yanı sıra iyi mekanik ve bariyer özelliklere sahip olmaları sebebiyle inorganik malzemelere iyi bir alternatif olabilirler. Güçlendirici dolgu malzemesi olarak bilinen kıl kristallerinin üretiminde kullanılan kitin, selülozdan sonra doğada en bol bulunan biyopolimerdir. Bu yapısal malzemenin büyük bir kısmı hayvanlarda, eklem bacaklıların dış iskeletlerinde (yengeçler, karidesler ve böcekler), bazı canlıların omurgalarında bulunmaktadır (Mincea vd., 2012). Dođal kaynaklardan elde edilen kitin ve türevleri yapı birimleri üzerinde reaktif bir amino grubu bulundurduğundan kimyasal reaksiyonlar ile modifiye edilmesi selüloz kaynaklı malzemelerden daha kolaydır (Zeng vd., 2012). Bol miktarda kitin içeren gıda sanayi

atıkları, mikro kristallerinin üretimi için önemli bir kaynaktır. Güçlendirici dolgu malzemesi üretiminde öncelikle demineralizasyon, deproteinizasyon ve renk giderim işlemleri ile kitin saflaştırıldıktan sonra asit hidrolizi, santrifüj ve liyofilizasyon aşamaları gerçekleştirilerek mikro kristaller elde edilebilir (Paillet vd., 2001). Jin ve diğerleri (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, selüloz nano kristalleri (NCW) ile güçlendirilmiş lignin bazlı kompozit membranların üretiminde elektroçirime yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen nanolifli yüzeylerin mekanik özellikleri incelenmiş ve NCW'lerin lignine eklenmesinin, saf lignine göre gerilme direncini arttırdığı belirlenmiştir. Bir diğer çalışmada ise zayıf mekanik özelliklere sahip olan poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) biyopolimerinin güçlendirilmesi amacıyla alüminyum oksit (Al_2O_3) kıl kristalleri kullanılmış ve elektroçirilmiş membranlar üretilmiştir. Elde edilen sonuçlar, Al_2O_3 kristalleri içeren membranların saf PCL'ye göre daha iyi mekanik özelliklere sahip olduğunu göstermektedir (Dong vd., 2012).

Nanobiyokompozitlerin fonksiyonelleştirilerek aktif ambalajların elde edilmesinde uçucu yağlar çok sık kullanılmaktadır. Uçucu yağlar damıtma veya preslemeyle, bitkilerin yaprak, meyve, kabuk ve kök kısımlarından elde edilen oda sıcaklığında sıvı, genellikle renksiz veya açık sarı renkli kompleks bileşiklerdir. Bu bileşiklerin antimikrobiyal özellikleriyle gıdalarda bozulma ve zehirlenmelere neden olan *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella spp.*, *Escherichia coli* gibi bakteriler, maya ve küfler üzerinde etkili olduğu bilinmektedir (Nostro vd., 2000; Sartoratto vd., 2004). Geçtiğimiz yıllarda Tang ve diğerleri (2019) tarafından yapılan bir çalışmada nane (PO) ve papatya uçucu yağı (CO) olmak üzere iki çeşit uçucu yağ içeren jelatin nanolifleri elektroçirime yöntemi kullanılarak üretilmiştir. Nanoliflerin *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel aktivitesi incelendiğinde, her iki yağın kombinasyonu ile elde edilen nanolifli yüzeylerin optimum aktivite sağladığı ve geliştirilen jelatin/PO/CO nanoliflerinin, yenilenebilir ambalajlama için yenilikçi bir çözüm olabileceği belirtilmiştir. Antunes ve diğerleri (2017) yaptıkları bir çalışmada antimikrobiyal ajan

olarak okaliptüs uçucu yağı (EEO) ve siklodekstrin (CD) kullanmış ve zein bazı elektroğirilmiş lifler üretmişlerdir. Üretilen antimikrobiyal kompozit membranların, gıda koruyucusu olarak kullanımının umut verici olduğu belirtilmiştir. Antimikrobiyal özelliklerinin yanı sıra uçucu yağlar sahip oldukları fonksiyonel gruplar sebebiyle ambalaj materyalinin mekanik ve termal özelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla da kullanılmaktadır. Ayrıca içerdikleri fonksiyonel gruplar sayesinde uçucu yağların, biyopolimer bazı membranlara plastikleştirici etki kazandırdığı ve bu sebeple daha esnek yapılı materyallerin geliştirilebileceği belirlenmiştir (Wen vd., 2016).

Bu çalışma kapsamında elektroğirme yöntemi kullanılarak nane uçucu yağı yüklü nanolifler elde edilmiştir. Nane uçucu yağı, *Menthaspecies* cinsi bitkilerden elde edilen ve gıda sanayi, tıp, eczacılık ve kozmetikte kullanılan önemli bir bileşendir. Ayrıca nane uçucu yağının benzersiz antimikrobiyal, antifungal, antioksidan anti-inflamatuar özelliklere de sahip olduğu bilinmektedir (Barrosa vd., 2015). Tüm bu etkilerinden dolayı uçucu yağlar gıda paketlenme sistemlerinde biyopolimerlerin yapısına dâhil edilerek aktif ambalaj materyali üretiminde kullanılabilirler.

Bu çalışmanın amacı, elektroğirme yöntemi kullanılarak nane uçucu yağı yüklü ve güçlendirici dolgu malzemesi olarak kitin lifleri ve kitin mikro kristallerine sahip nanoliflerin aktif ambalaj sistemlerinde kullanım potansiyelinin araştırılmasıdır. Bu kapsamda saf zein, zein-nane uçucu yağı, zein-kitin lifleri/kitin mikro kristalleri ve zein-nane uçucu yağı-kitin lifleri/kitin mikro kristalleri içeren elektroğirilmiş materyaller üretilmiştir. Üretilen materyallerin yüzey morfolojileri, kimyasal yapıları, mekanik ve antimikrobiyal özellikleri belirlenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Elektroğirilmiş membran yapıların üretiminde kullanılan zein (Z3625) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); glasiyal asetik asit ise Carlo Erba (Rodano, Italy) firmasından satın alınmıştır. Aktif materyal olarak kullanılan nane uçucu yağı (NUY),

Çakıroğlu firmasından (Çakıroğlu Uçucu Yağ San. Tic. Ltd. Şti., Mersin) temin edilmiştir. Kitin lifleri (KL) ve kitin mikro kristalleri (KMK) yerel bir pazardan temin edilen mavi yengeç atıklarının demineralizasyon, deproteinizasyon, asit hidrolizi, santrifüj ve liyofilizasyonu ile elde edilmiştir. Üretilen malzemelerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan *Escherichia coli* (ATCC 25922) ve *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) test mikroorganizma kültürleri, Mersin Üniversitesi Gıda Mühendisliği Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilmiştir.

Nane Uçucu Yağının Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi

Nane uçucu yağının *Escherichia coli* (ATCC 25922) ve *Staphylococcus aureus*'a (ATCC 25923) karşı antimikrobiyal aktivitesi agar disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Kültürleri aktifleştirmek için Triptik Soy Broth (TSB) besiyeri, agar disk difüzyon yönteminde ise Mueller Hinton Agar (MHA) besiyeri kullanılmıştır. Stok kültürden öze ile alınan koloniler TSB besiyerine aşılansın 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresinin sonunda kültür yoğunluğu spektrofotometre (Cary60UV-Vis, Agilent Technologies, Malezya) ile ölçülerek, McFarland 0.5 standardına göre 1×10^{-8} olacak şekilde ayarlanmıştır. Yoğunluğu ayarlanan kültürden 0.1 mL alınıp MHA besiyerine ekim yapılmıştır. Uçucu yağın antimikrobiyal aktivite testi için kullanılacak diskler steril Whatman kağıtlarından 6 mm çapa sahip olacak şekilde elde edilmiştir. Nane uçucu yağı 20 µL olacak şekilde steril disklere emdirilip petrilere yerleştirilmiştir. Petrilere, 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılıp inkübasyon sonunda inhibisyon zonları bir kumpas yardımıyla ölçülmüştür (Tiryakioğlu, 2004). Antimikrobiyal aktivite testinde her örnek 3 paralel olarak çalışılmıştır.

Kitin Lifleri ve Kitin Mikro Kristallerinin Hazırlanması

Saf kitinden kitin lifleri (KL) ve kitin mikro kristalleri (KMK), iki farklı yöntem kullanılarak elde edilmiştir. Kitin pulcuklarının 3 N HCl çözeltisi içerisindeki oranı 1 g/30 mL olarak belirlenmiştir. Hazırlanan çözelti kaynamakta iken

90 dakika boyunca güçlü bir şekilde karıştırılmıştır. Asit hidrolizi tamamlandıktan sonra süspansiyon santrifüj (1390 x g, 15 dk) edilmiştir. Santrifüj işlemi üç kez tekrarlanmıştır. Ardından süspansiyon tüm kalıntıların giderilmesi için pH=4 olana kadar saf su ile diyaliz edilip liyofilizatörde (Cryodos 50, TELSTAR, Spain) kurutulmuş kitin lifleri elde edilmiştir (Zhang vd., 2004). Kitin mikro kristalleri ise kitin pulcuklarının 3 N HCl çözeltisi içerisinde 104°C'de 6 saat boyunca güçlü bir şekilde karıştırılarak hidroliz edilmesiyle hazırlanmıştır. Kitinin HCl çözeltisi içerisindeki oranı kitin lifleri üretimde olduğu gibi 1 g/30 mL olarak belirlenmiştir. Asit hidrolizinden sonra elde edilen süspansiyon hemen saf su ile seyreltilip santrifüj (10397 x g, 15 dk) edilerek kitinin katı kısmının ayrılması sağlanmıştır. Santrifüj işlemi üç kez

tekrarlanmıştır. Daha sonra süspansiyon içerisindeki hidroklorik asit kalıntısının giderilmesi için süspansiyon oda sıcaklığında saf su içerisinde pH=6 olana kadar diyaliz edilmiştir. Süspansiyon 5 dakika ultrasonik cihazı (Kudos, SK1200H, China) ile homojen hale getirildikten sonra dondurarak kurutma yöntemiyle liyofilizatörde kurutulmuştur (Paillet vd., 2001).

Deney Tasarımı

Elektroçizme prosesinde kullanılan zein çözeltisi, NUY, KL ve KMK konsantrasyonları sırasıyla %36 (a/h), %13.4 (a/a) ve %5 (a/a) olarak belirlenmiştir. Saf zein, zein-NUY, zein-KL/zein-KMK ve zein-KL-NUY/zein-KMK-NUY içeren çözeltiler elektroçizme cihazında proses edilmiştir. Deney tasarımı detaylı olarak Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Deney tasarımı
Table 1. Experimental design

Deney Run	Zein çözeltisi Zein solution	NUY MEO	KL CF	KMK CM
1	+			
2	+	+		
3	+		+	
4	+	+	+	
5	+			+
6	+	+		+

NUY:Nane uçucu yağı; KL:Kitin lifleri; KMK:Kitin mikro kristalleri; MEO:Mint essential oil; CF:Chitin fibers; CM:Chitin microcrystals.

Çözeltilerin Hazırlanması

Öncelikle saf zein çözeltisi (%36, a/h) asetik asit içerisinde hazırlanmıştır. Elektroçizme prosesinde kullanılan zein çözeltisine, zein ağırlığı üzerinden %13.4 (a/a) oranında NUY eklenmiştir. Deney tasarımına göre (Çizelge 1) nane uçucu yağı içeren zein çözeltisine, zein ağırlığı üzerinden %5 (a/a) oranında KL ya da KMK ilave edilmiştir. Saf zein, zein-NUY, zein-KL, zein-KL-NUY; paralelinde saf zein, zein-NUY, zein-KMK ve zein-KMK-NUY içeren çözeltiler hazırlanmıştır.

Yöntem

Elektroçizme Yöntemi

Elektroçizme işlemi, Çizelge 1'de verilen deney tasarımına göre hazırlanan çözeltiler kullanılarak

dikey çalışma prensibine göre tasarlanmış olan elektroçizme cihazı (NE 100, Inovenso, Türkiye) ile gerçekleştirilmiştir. Elektroçizme cihazı şırınga pompası (NE-300, New EraPump Systems Inc., USA), toplayıcı ve güç kaynağından oluşmaktadır. Uygulanan voltaj 25 kV, akış hızı 1 mL/sa ve besleme ünitesi ile toplayıcı arasındaki mesafe ise 13.5 cm olarak sabit tutulmuştur. Üretilen elektroçizilmiş membran yapılar alüminyum folyo üzerine toplanmıştır. Elektroçizme işlemi oda koşullarında gerçekleştirilmiştir.

Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM)

Elektroçizme tekniği ile üretilen nanolifli yüzeylerin morfolojisinin incelenmesi ve nanolif

çaplarının tespit edilmesi için taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) (Supra 55, Zeiss, Germany) kullanılmıştır. Alınan her bir görüntüde 100 farklı ölçüm yapılarak ortalama çap bulunmuştur.

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre Analizi (FTIR)

Nane uçucu yağının kitin mikro kristalleri ile güçlendirilmiş zein biyopolimerlerine eklenmesiyle elde edilen elektroğirilmiş malzemelerde zein-uçucu yağ ve kitin mikro kristalleri arasında meydana gelen etkileşimler FTIR spektrofotometresi (FTIR/FIR/NIR SpectrometerFrontier, ATR, Perkin Elmer, UK) kullanılarak belirlenmiştir. Örneklerin FTIR spektrumları $4000-400\text{ cm}^{-1}$ aralığında 4 cm^{-1} spektral çözünürlüğü ile elde edilmiştir.

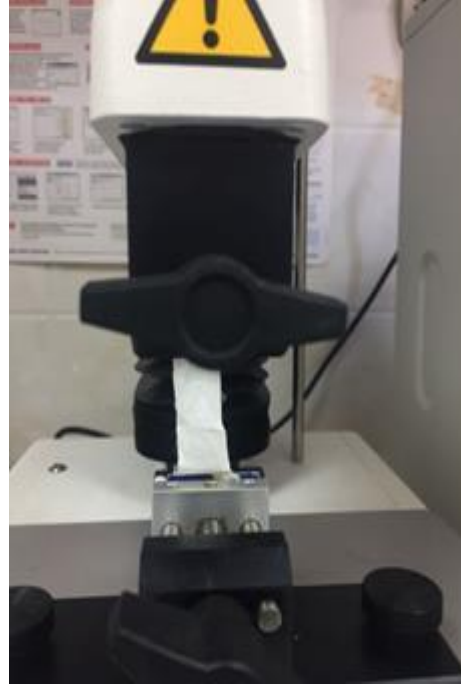
Mekanik Özelliklerin Belirlenmesi

Kitin lifleri/kitin mikro kristalleri ile güçlendirilmiş zein/nane uçucu yağı nanobiyokompozitlerinin mekanik özellikleri TA.XT2i Tekstür Analiz cihazı (Stable Micro Systems, Surrey, England) ile belirlenmiştir. Elektroğirme yöntemi ile üretilen yapıların uzunluğu 5 cm, genişlikleri ise 1.5 cm olacak şekilde kalıp kullanılarak kesilmiştir. Örneklerin kalınlıkları rastgele üç noktada dijital mikrometre (Mitutoyo, Japan) ile ölçülmüştür. Kesilen örnekler mandal şeklindeki A/TG probunun arasına yerleştirilerek 0.5 mm/s test hızı uygulanarak kopma anında örneğe uygulanan maksimum kuvvet ve kopma anındaki uzama miktarı ölçülmüştür (Şekil 2). Gerilme direnci nanoliflerin yüzey alanları esas alınarak hesaplanıp MPa cinsinden ifade edilmiştir. Uzama miktarı (%) ise örneğin kopma anındaki yüzde uzama miktarı olarak tanımlanmıştır (Zivanovic vd., 2007). Her bir örnek için en az üç paralel ölçüm yapılmıştır.

Kitin Lifleri/Kitin Mikro Kristalleri ile Güçlendirilmiş Zein/Nane Uçucu Yağı Nanobiyokompozit Yapıların Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Disk şeklinde ve 6 mm çapında kesilmiş olan numuneler ekim yapılmış MHA besiyeri plağı üzerine yerleştirilerek 37°C 'de 24 saat

inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra inhibisyonun olduğu berrak zonun çapı ölçülmüştür (Kara vd., 2016). Her bir örnek için üç paralel ölçüm yapılmıştır.



Şekil 2. Mekanik özelliklerin belirlenmesinde kullanılan tekstür analiz probu
Figure 2. Texture analysis probe used for the determination of mechanical properties

SONUÇ VE TARTIŞMA

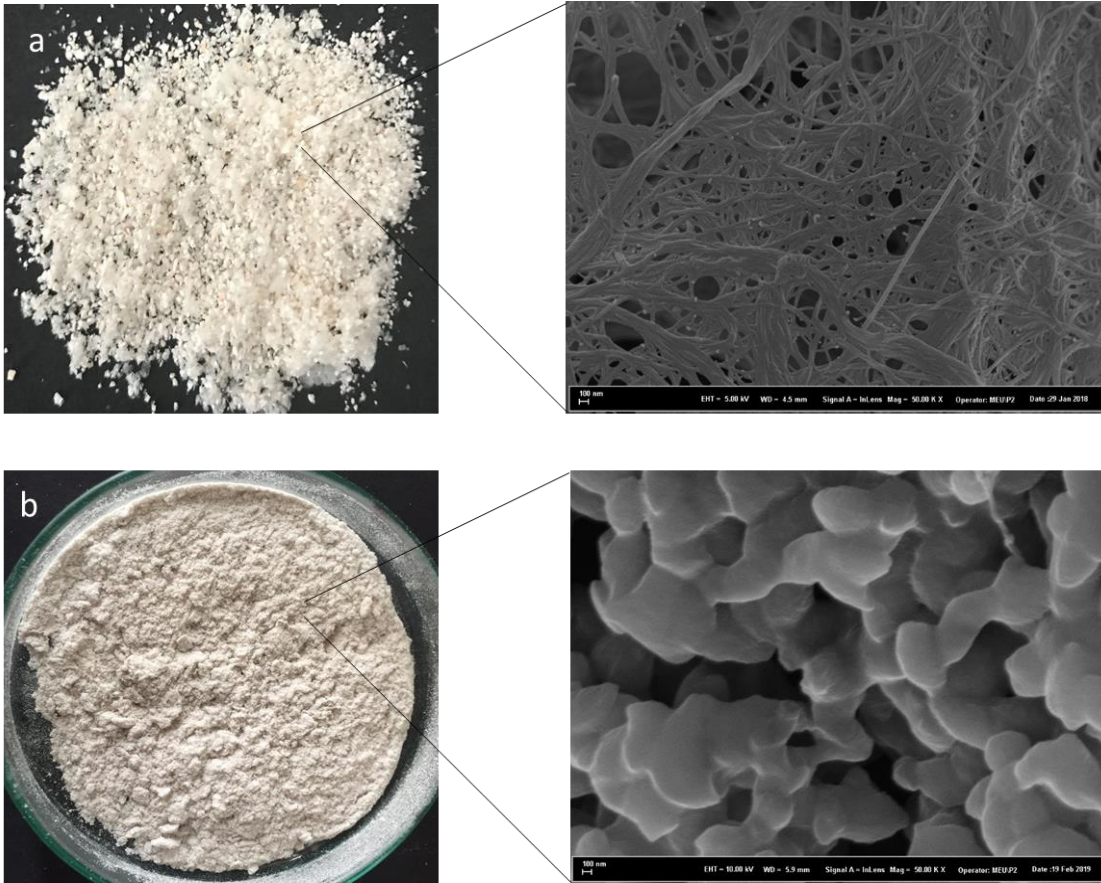
Morfolojik Analiz

Nanobiyokompozit yapıları nanoliflerin düzgün bir çap dağılımı göstermesi ve boncuklu yapıların oluşmaması, elde edilen lifli yüzeylerin mekanik ve bariyer özellikleri ile aktif bileşenin salımı açısından önemlidir. Zein proteininden elde edilen yapıları kitin lifleri ile kitin mikro kristalleri ilave edilmiş ve bunların nanobiyokompozit yapılarının morfolojik özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir. Kitin lifleri ve kitin mikro kristallerinin morfolojisi Şekil 3'te verilmiştir.

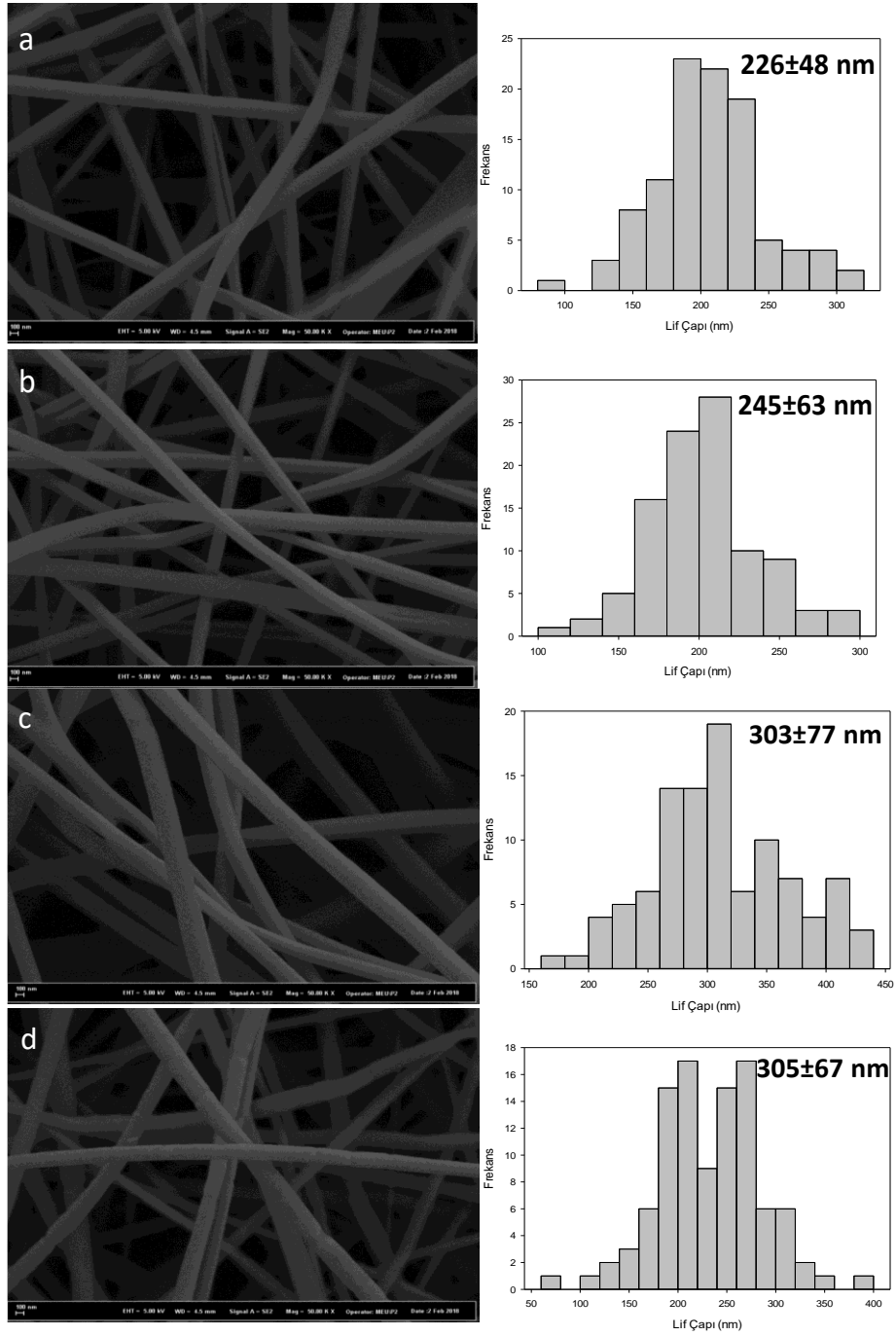
Üretilen nanobiyokompozit yapıları liflerin FE-SEM görüntüleri ve lif çaplarının dağılımı Şekil 4 ve Şekil 5'te gösterilmiştir. Hem kitin lifleri hem de kitin mikro kristallerinden elde edilen nanobiyokompozit yapılarının morfolojileri düzgün ve homojen dağılmıştır. Histogram grafiklerine

bakıldığında lif çaplarının çoğunluğunun ortalama 200 nm civarında yoğunlaştığı ve düzenli bir dağılım gösterdiği görülmektedir. Üretilen liflerin ortalama çapları 79 ile 440 nm aralığında değişmektedir. Saf zein çözeltisi ve bu çözeltiliye nane uçucu yağının eklenmesiyle elde edilen nanoliflerin ortalama çapları arasında belirgin bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$). Bununla beraber kitin mikro kristallerinden elde edilen nanobiyokompozit yapıların lif çaplarının, kitin liflerinden elde edilen nanobiyokompozit yapıların lif çaplarına göre azalma gösterdiği belirlenmiştir. Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı ($p>0.05$) bulunmamıştır. Bununla birlikte lif çaplarındaki azalmanın kitin mikro kristallerinin iyonik iletkenliklerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Kitin mikro kristalleri çözücü içerisinde dağıtıldığında yüksek iyonik iletkenliğe yol açan amino grupları ortaya çıkar ve elektroğirme işlemi sırasında polimer jetinin yük

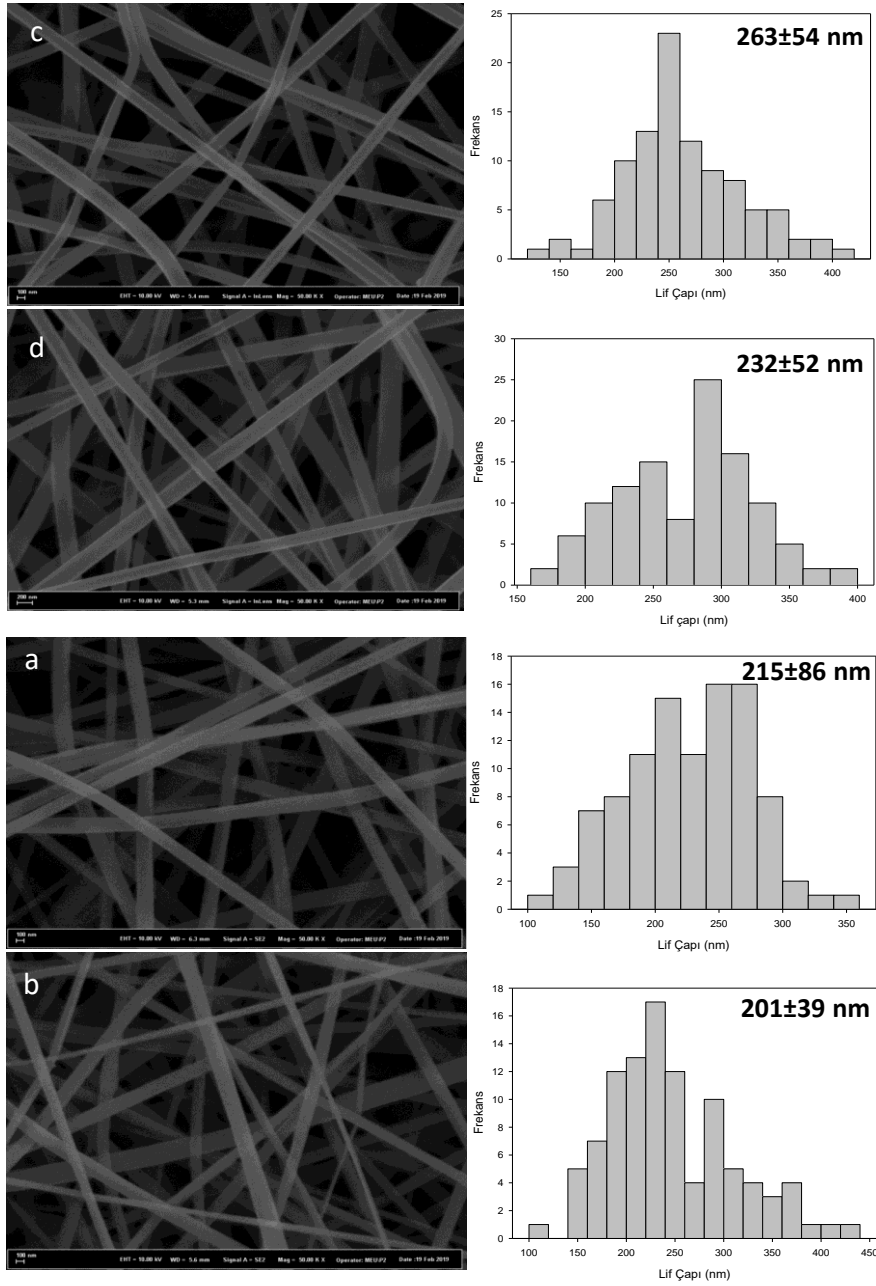
yoğunluğunu artırır. Bu nedenle, kitin mikro kristallerinin kitin liflerine kıyasla daha küçük çaplı liflerin üretimine sebep olduğu ancak mikro kristallerin miktarı artırıldığında ortalama lif çapının artırılabilceği düşünülmektedir (Wen vd., 2017). Benzer bir çalışmada poli(L-laktik asit) (PLLA) ve belirli oranlarda eklenen kitin kıl kristallerinden elektroğirme yöntemi ile elde edilen nanolifli yüzeylerin lif çapı dağılımı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre PLLA ve kitin kıl kristalleri içeren nanoliflerin, düzgün ve homojen lif çapı dağılımına sahip olduğu gözlenmiştir. Bu yapılar saf PLLA nanolifli yüzeyler ile karşılaştırıldığında, %2.5 ve %5 oranında kitin kıl kristalleri içeren nanobiyokompozitlerin lif morfolojisinde anlamlı bir farklılığın olmadığı, ancak kıl kristalleri içeriği %10 iken lif çaplarının arttığı görülmüştür (Liu vd., 2016).



Şekil 3. Kitin lifleri (KL), mikro kristalleri (KMK) ve FE-SEM görüntüleri a) KL, b) KMK
Figure 3. Chitin fibers (CF), microcrystals (CMC) and FE-SEM images a) CF, b) CMC



Şekil 4. Farklı zein çözeltilerinden elde edilen nanolifler ve kitin lifi içeren kompozit yapılarının FE-SEM görüntüleri a) saf zein, b) zein-NUY, c) zein-KL, d) zein-KL-NUY
Figure 4. FE-SEM images of nanofibers obtained from different zinnin solutions and their composite structures containing chitin fiber a) pure zinnin, b) zinnin-MEO, c) zinnin-CF, d) zinnin-CF-MEO



Şekil 5. Farklı zein çözeltilerinden elde edilen nanolifler ve kitin mikro kristalleri içeren kompozit yapılarının FE-SEM görüntüleri a) saf zein, b) zein-NUY, c) zein-KMK, d) zein-KMK-NUY
 Figure 5. FE-SEM images of nanofibers obtained from different zein solutions and their composite structures containing chitin microcrystals a) pure zein, b) zein-MEO, c) zein-CM, d) zein-CM-MEO

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre (FTIR)

Zein, zein-NUY, zein-KMK ve zein-NUY-KMK liflerinin FTIR spektrumları Şekil 6'da verilmiştir. Saf zein çözeltisinden elde edilen lifin FTIR spektrumunda protein bantları için spesifik olan Amit A, Amit I ve Amit II pikleri, 3300, 1651 ve 1537 cm^{-1} 'de belirlenmiştir. Amit A piki N-H gerilme titreşim, Amit I piki C=O gerilme, Amit II ise N-H bükülme ve C-N gerilme gruplarından meydana gelmektedir (Bancila vd., 2016). 2929 cm^{-1} 'de alifatik grup C-H gerilme titreşimi, 1447 cm^{-1} 'de ise CH_2 gerilme titreşimi bulunmuştur. Zein içeren diğer nanobiyokompozit yapılar da zeinin sahip olduğu spesifik piklere rastlanmıştır (Şekil 6b, 6c ve 6d). Nane uçucu yağı içeren nanobiyokompozit yapıların FTIR spektrumları Şekil 6b ve 6d'de verilmiştir. Nane uçucu yağının 3349 cm^{-1} 'deki absorpsiyon piki, içerisinde bulunan hidroksil (-OH) gruplarının gerilmesi nedeniyle oluşmaktadır. Bu pik nanobiyokompozit yapılarında zeinden kaynaklı 3300 cm^{-1} 'de oluşan pik ile birleşmektedir. C-H gerilme gruplarından dolayı meydana gelen 2927 cm^{-1} 'deki pik yapısı, zeinin 2929 cm^{-1} 'de oluşturduğu pik yapısı ile birlikte görüntülenmektedir. Nane uçucu yağındaki alken (C=C) yapısından kaynaklanan 1633 cm^{-1} 'de pikin, 1651 cm^{-1} 'deki zeinin Amit I pikiyle çakışarak keskinleştiği belirlenmiştir. 1537 cm^{-1} 'de nane uçucu yağından dolayı meydana gelen C=C gerilmesi, zeinin aynı noktada oluşturduğu Amit II pikiyle birleşmektedir. Nane uçucu yağının sahip olduğu aromatik halkalardan kaynaklanan piklerin nanobiyokompozit yapılar da 599 cm^{-1} 'den 700 cm^{-1} 'e kaydığı belirlenmiştir (Jain vd., 2016).

Kitin mikro kristallerinin FTIR spektrumu Şekil 6e'de gösterilmiştir. Kitinin Amit I (C=O) yapısı 1614 ve 1593 cm^{-1} 'de bölünmüş çift pikler şeklinde görülmüştür. N-H ve O-H gerilmeleri ise 3051 ve 2889 cm^{-1} 'de meydana gelmiştir. Amit II piki 1519 cm^{-1} 'de C-N-H germe titreşimi ve N-H bükme titreşimi kombinasyonu olarak görülmüştür. Bu sonuçlar literatürdeki kitin ile yapılan çalışmalar ile uyumludur. Liu ve diğerleri (2016) yaptıkları çalışmada kitindeki Amit I (C=O) pikini 1659 ve 1621 cm^{-1} 'de

belirlemişlerdir. Amit II yapısını ise keskin bir pik şeklinde 1560 cm^{-1} 'de gözlemlemişlerdir. Kitin mikrokristallerinin pikleri, nanobiyokompozit yapısının sahip olduğu zein polimerinin piklerinin şiddetini artırmıştır.

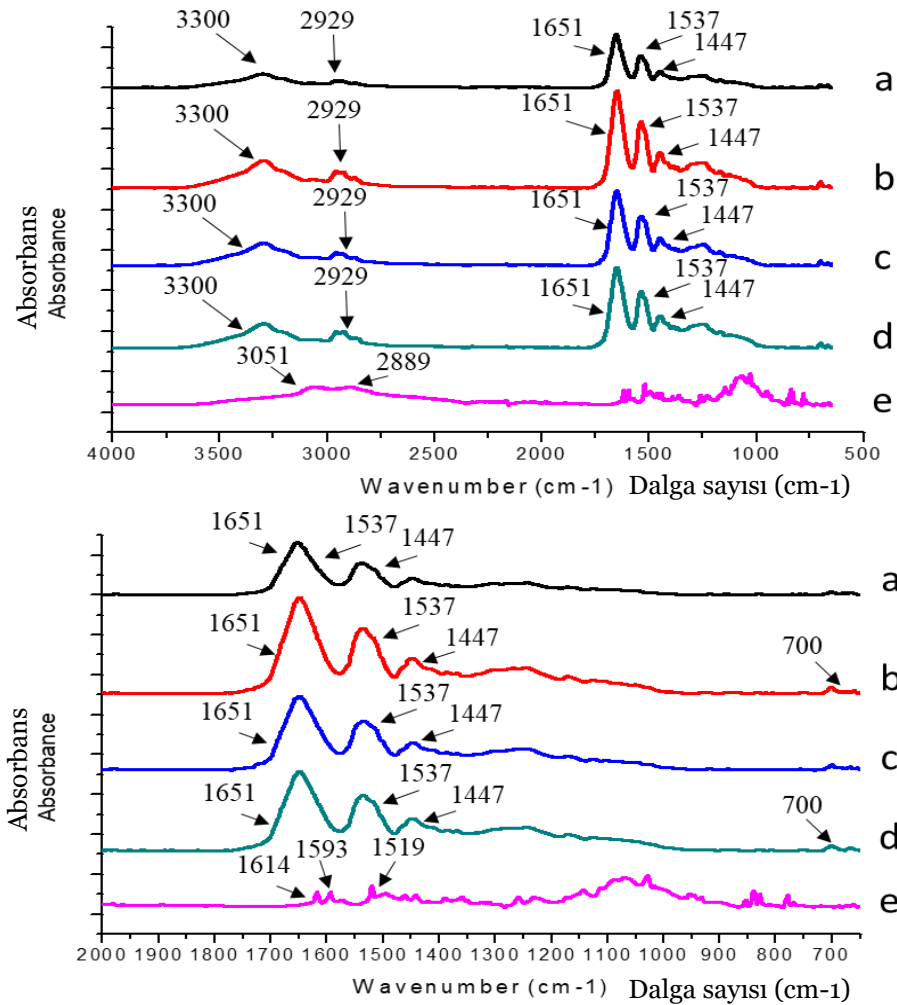
Mekanik Özellikler

Elde edilen nanobiyokompozit yapıları liflerin kalınlık, gerilme direnci ve uzama miktarı Çizelge 2'de gösterilmiştir. Nanobiyokompozit yapıları liflerin kalınlıkları 0.034±0.01 ile 0.101±0.03 mm arasında değişim göstermiştir. Saf zeinden elde edilen liflerin gerilme direnci 1.16±0.24 MPa ve uzama miktarı %5.01±1.12 olarak belirlenmiştir. Zein çözeltisine nane uçucu yağı eklenmesiyle elde edilen liflerin gerilme direnci 1.44±0.36 MPa ve uzama miktarı %6.65±1.64 olarak belirlenmiştir. Zein çözeltisine nane uçucu yağı ilave edilmesinin, nanobiyokompozit yapıları liflerin mekanik özelliklerini iyileştirdiği ve bu iyileştirmenin istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bulunan bir artışa neden olduğu bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada çay ağacı ve manuka uçucu yağlarının polilaktik asit bazlı elektroörgülmüş liflerin mekanik ve antibakteriyel özellikleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Kullanılan uçucu yağların uzama miktarı ve gerilme direncini 12 kata kadar arttığı sonucuna varılmıştır. Bu artışın nedeni uçucu yağ bileşiminde bulunan düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin polimer zincirlerinin hareketliliğini ve polimer serbest hacmini artırarak plastikleştirici etki göstermesidir (Zhang vd., 2017).

Zein çözeltisine kitin liflerinin eklenmesi ile elde edilen nanoliflerin gerilme direnci 1.35±0.33 MPa ve uzama miktarı %9.52±1.14 olarak belirlenmiştir. Kitin mikro kristallerinin eklenmesi ile elde edilen liflerin gerilme direnci 0.92±0.09 MPa ve uzama miktarı %6.33±0.56 olarak belirlenmiştir. Saf zeine kitin lifi ilavesinin, yapının gerilme direncini ve uzama miktarını artırdığı belirlenmiştir. Saf zeine kitin mikro kristali eklenmesi ise saf zeine göre gerilme direncini azaltırken, uzama miktarını artırmıştır. Bu değişim istatistiksel olarak anlamlı ($p>0.05$) bulunmamıştır. Bu azalmanın nanolifli yüzeyler içerisinde sürekli bir faz oluşturan kitin liflerine

karşın mikro kristallerin homojen olmayan aşırı birikimi ve topaklanma eğilimi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Nanolifli yüzeylerin üretiminde kullanılan %5'lik mikro kristal konsantrasyonunun optimize edilmesi ile mekanik özelliklerin geliştirilebileceği sonucuna varılmıştır. Benzer bir şekilde Yang ve arkadaşları (2019) tarafından yapılan bir çalışmada elektroegirme yöntemi kullanılarak polilaktik asit (PLA) ve polimer ağırlığı üzerinden farklı oranlarda (%0, %3, %5, %7, %10) selüloz nanolifleri (CNF)

içeren nanokompozitler üretilmiştir. Elde edilen nanolifli membranların mekanik özellikleri incelenmiş ve selüloz liflerinin biyopolimer çözeltilisine %3 oranında eklenmesi ile elde edilen nanoliflerin gerilme direncinin saf PLA'dan oluşan nanoliflere göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Öte yandan daha yüksek konsantrasyonlarda gerilme direncinin azalması selüloz liflerinin aşırı birikimine bağlı olarak topaklanma eğilimi göstermesine bağlanmıştır.



Şekil 6. Farklı zein çözeltilerinden elde edilen nanolifler ve kitin mikro kristalleri içeren kompozit yapıların FTIR spektrumları a) saf zein, b) zein-NUY, c) zein-KMK, d) zein-KMK-NUY, e) KMK
 Figure 6. FTIR spectra of nanofibers obtained from different zein solutions and their composite structures containing chitin microcrystals a) pure zein, b) zein-MEO, c) zein-CM, d) zein-CM-MEO, e) CM

Zein çözeltisine NUY ile birlikte kitin liflerinin eklenmesi ile elde edilen nanolifli yüzeylerin gerilme direnci 1.14 ± 0.20 MPa ve uzama miktarı 7.11 ± 0.21 olarak belirlenmiştir. Zein çözeltisine NUY ile birlikte kitin mikro kristallerinin eklenmesi ile elde edilen nanoliflerin gerilme direnci ise 0.63 ± 0.12 MPa ve uzama miktarı 5.77 ± 2.36 olarak belirlenmiştir. Nane uçucu yağı ile birlikte kitin lifi ve kitin mikro kristali eklenmesi, elektroğrılmış membran yapıların gerilme direncini saf zeine göre azaltmıştır. Gerilme direncindeki azalmanın nane uçucu yağına kitin mikro kristali eklendiğinde daha fazla olduğu belirlenmiştir. Elektroğrılmış membran

yapılara NUY ile birlikte KL veya KMK eklenmesi, liflerin uzama miktarını saf zeine göre artırmış fakat bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Saf zeine NUY ile birlikte kitin liflerinin eklenmesi kitin mikro kristallerinin ilavesine göre uzama miktarını daha fazla artırmıştır. Mekanik özellik açısından, nanobiyokompozit yapılara kitinin lif formunun ilave edilmesinin mikro kristal formunun ilave edilmesine göre daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçların, kitin mikro kristallerinin kitin liflerine göre daha yüksek sertlik ve kristallğe sahip olması ve nanolifli yüzeylerde süreksiz bir faz oluşturmaya bağlı olduğu düşünülmektedir (Yang vd., 2019).

Çizelge 2. Farklı zein çözeltilerinden elde edilen nanolifler ve kitin lifi/kitin mikro kristalleri içeren kompozit yapılarının mekanik özellikleri

Table 2. Mechanical properties of nanofibers obtained from different zein solutions and their composite structures containing chitin fiber/chitin microcrystals

Deney Run	Kalınlık (mm) Thickness (mm)	Gerilme direnci (MPa) Tensile strength (MPa)	Uzama Miktarı (%) Strain (%)
1	0.034 ± 0.01^a	1.16 ± 0.24^b	5.01 ± 1.12^a
2	0.036 ± 0.00^a	1.44 ± 0.36^c	6.65 ± 1.64^a
3	0.043 ± 0.00^a	$1.35 \pm 0.33^{b,c}$	9.52 ± 1.14^b
4	0.067 ± 0.01^{ab}	1.14 ± 0.20^b	$7.11 \pm 0.21^{a,b}$
5	0.098 ± 0.00^{bc}	$0.92 \pm 0.09^{a,b}$	6.33 ± 0.56^a
6	0.101 ± 0.03^c	0.63 ± 0.12^a	5.77 ± 2.36^a

Farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir ($p < 0.05$).

Antimikrobiyal Aktivite

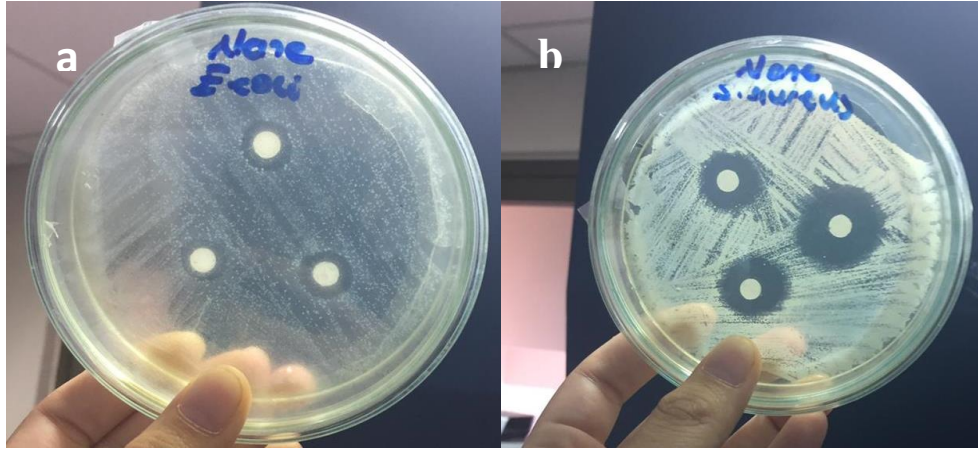
Nane uçucu yağının ve kitin lifleri/kitin mikro kristalleri ile güçlendirilmiş zein/NUY içeren nanobiyokompozit liflerin antimikrobiyal aktivitesi iki test mikroorganizması *E. coli* (Gram-negatif) ve *S. aureus* (Gram-pozitif) kullanılarak Agar Disk Difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bunlar hayati tehdit oluşturan fırsatçı mikroorganizmalar oldukları için, patojenite, direnç, bulaşıcı süreç incelemesi için model olarak kullanılan mikroorganizmalardır (Bachir Raho ve Benali, 2012). Nane uçucu yağının antimikrobiyal etkisinin sonuçları Şekil 7'de gösterilmiştir. NUY *S. aureus* üzerinde 22.0 ± 0.35 mm, *E. coli* üzerinde ise 11.3 ± 0.05 mm zon çapı oluşturmuştur. *E. coli* mikroorganizmasının nane uçucu yağına toleransının daha yüksek olduğu, nane uçucu

yağının *S. aureus* üzerinde daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Kitin lifleri/kitin mikro kristalleri ve NUY içeren ve içermeyen liflerin antimikrobiyal etkileri karşılaştırılmıştır. Zein-NUY-KL içeren nanobiyokompozit yapıların çevresinde berrak zon oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 8). Kitin mikro kristallerinden üretilen nanobiyokompozit yapılarda ise; kitin lifleri ile elde edilen nanobiyokompozit yapılara göre berrak zon çapı oluşumu görülmüştür (Şekil 9). Bu durum; kitinin morfolojisinin kristalleşmesiyle antimikrobiyal etkinin oluşmasını sağlayan nane uçucu yağının daha iyi enkapsüle edilmesinin sağlandığını ve antimikrobiyal özelliğe sahip nanobiyokompozit yapının elde edildiğini göstermiştir. Ortalama zon çapının değişimi Çizelge 3'de gösterilmiştir. Zein-

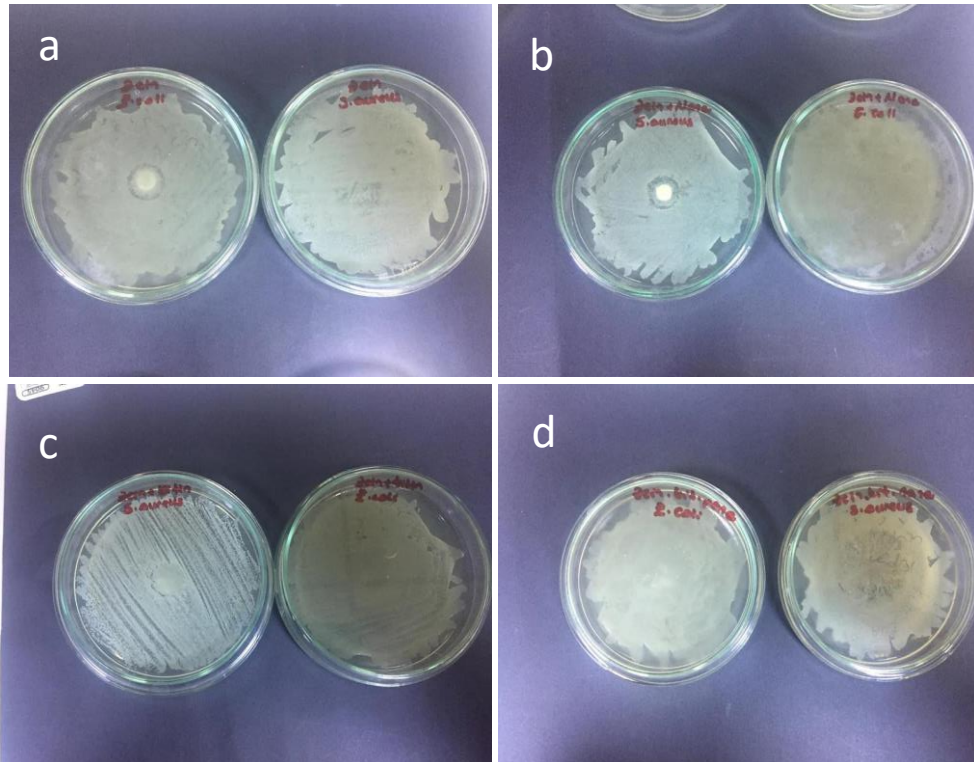
NUY-KMK içeren nanobiyokompozitlerin *S. aureus* üzerinde oluşturduğu zon çapı 14.5 mm iken, *E. coli* üzerinde oluşturduğu zon çapı 13.03 mm'dir. Nanobiyokompozit yapıların

antimikrobiyal özelliğinin, nane uçucu yağında olduğu gibi, *S. aureus* üzerinde daha etkili olduğu tespit edilmiştir (*E. coli* < *S. aureus*).



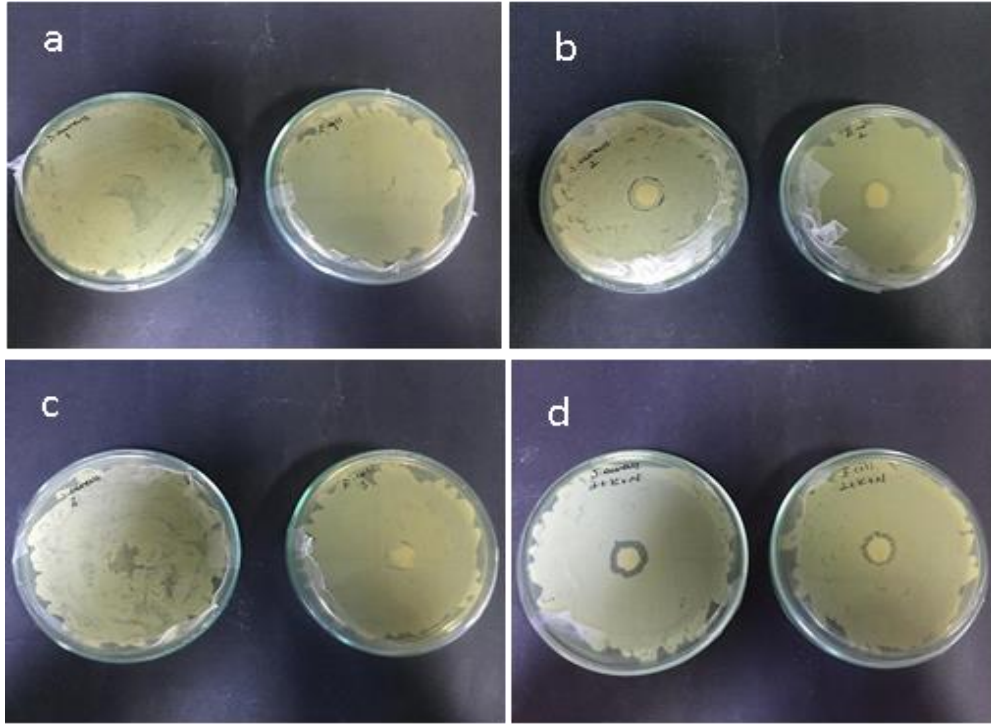
Şekil 7. Nane uçucu yağının (NUY) test mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi a) *E. coli*, b) *S. aureus*

Figure 7. Antimicrobial activity of mint essential oil (MEO) on test microorganisms a) *E. coli*, b) *S. aureus*



Şekil 8. Farklı zengin çözeltilerinden elde edilen nanolifler ve kitin lifi içeren kompozit yapılarının disk difüzyon testleri a) saf zengin, b) zengin-NUY, c) zengin-KL, d) zengin-KL-NUY

Figure 8. Disk diffusion tests of nanofibers obtained from different zengin solutions and their composite structures containing chitin fiber a) pure zengin, b) zengin-MEO, c) zengin-CF, d) zengin-CF-MEO



Şekil 9. Farklı zein çözeltilerinden elde edilen nanolifler ve kitin mikro kristalleri içeren kompozit yapınının disk difüzyon testleri a) saf zein, b) zein-NUY, c) zein-KMK, d) zein-KMK-NUY
 Figure 9. Disk diffusion tests of nanofibers obtained from different zein solutions and their composite structures containing chitin microcrystals a) pure zein, b) zein-MEO, c) zein-CM, d) zein-CM-MEO

Liakos ve diğerleri (2017) çalışmalarında esansiyel yağ içeren malzemelerin mikrobiyal bağlanma ve canlı oluşumu engellediğini belirtmişlerdir. Aynı grubun bir başka çalışmasında limon yağının selüloz asetat içerisinde enkapsüle edilmesiyle elde edilen nanopartiküllerin *S. aureus* mikroorganizması üzerinde antimikrobiyal etkisi olduğu belirlenmiştir (Liakos vd., 2016). Literatürdeki bir diğer çalışmada sodyum aljinat ile enkapsüle edilen esansiyel yağın *Candida albicans* mantarı üzerinde etkisinin *E. coli*'ye göre daha fazla olduğu ve film içerisindeki yağ miktarının artmasıyla oluşan zon çapının doğru orantılı olduğu belirlenmiştir (Liakos vd., 2014).

Yapılan bu çalışma sonucunda elektroçürme yöntemi kullanılarak nane uçucu yağı yüklü, kitin lifleri ve kitin mikro kristalleri ile güçlendirilmiş nanoliflerin morfolojileri, mekanik ve antimikrobiyal özellikleri belirlenmiştir. Nanoliflerin nane uçucu yağı sayesinde antimikrobiyal özellik kazandığı görülmüştür. Kitin lifleri ve kitin mikro kristallerinin ilave

edilmesinin nanoliflerin mekanik özelliklerini iyileştirdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, elde edilen nanobiyokompozit yapıların potansiyel aktif ambalaj sistemlerinde yenilikçi bir çözüm olabileceğini göstermektedir.

Çizelge 3. Farklı zein çözeltilerinden elde edilen nanolifler ve kitin lifi/kitin mikro kristalleri içeren kompozit yapınının antimikrobiyal aktiviteleri

Table 3. Antimicrobial activities of nanofibers obtained from different zein solutions and their composite structures containing chitin fiber/ chitin microcrystals

Deney Run	Zon çapı (mm) Zone diameter (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	14.50±0.01	13.03±0.01

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimince (BAP), 2018-1-TP2-2738 nolu proje ile desteklenmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan nane uçucu yağını temin eden Çakıroğlu Yağ (Çakıroğlu Uçucu Yağ San. Tic. Ltd. Şti., Mersin) firmasına ve mavi yengeç kabuklarını temin eden Mezitli Balık Pazarı'na teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Antunes, M.D., da Silva Dannenberg, G., Fiorentini, Â.M., Pinto, V.Z., Lim, L.T., da Rosa Zavareze, E., Dias, A.R.G. (2017). Antimicrobial electrospun ultrafine fibers from zein containing eucalyptus essential oil/cyclodextrin inclusion complex. *Int J Bio Macromolecules* 104:874-882.
- Bachir Raho, G., Benali, M. (2012). Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pac J Trop Biomed* 2(9):739-742.
- Bancila, S., Ciobanu, C-I., Murariu, M., Drochioiu, G. (2016). Ultrasound-assisted zein extraction and determination in some patented maize flours. *Rev Roum Chim* 61(10):725-731.
- Barrosa, A., Moraisa, S.M., Ferreira, P.A.T., Vicirab, I.G.P., Craveiroc, A.A., Fontenelled, R., Jane Menezesa, E., Silvaa, F., Sousa, H. (2015). Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. *Ind Crops Prod* 76:557-564.
- Dong, Z., Wu, Y., Wang, Q., Xie, C., Ren, Y., Clark, R. L. (2012). Reinforcement of electrospun membranes using nanoscale Al₂O₃ whiskers for improved tissue scaffolds. *J Biomed Mater Res* 100(4):903-910.
- Jain, P.K., Soni, A., Jain, P., Bhawsar, J. (2016). Phytochemical analysis of *Mentha spicata* plant extract using UV-VIS, FTIR and GC/MS technique. *J Chem Pharm Res* 8(2):1-6.
- Jin, X. Y., He, C. W., Liu, X. R., Yan, X. J., Yu, Q. Z. (2017). Effect of cellulose crystal content on the mechanical property of nano-crystal line cellulose/lignin composite fibrous film. *Key Eng Mater* 727:527-531.
- Junkasem, J., Rujiravanit, R., Supaphol, P. (2006). Fabrication of *α*-chitin whisker-reinforced poly(vinylalcohol) nanocomposite nanofibres by electrospinning. *Nanotechnol* 17:4519-4528.
- Kara, H., Xiao, H., Sarker, M., Jin, T., Sousa, A., Liu, C., Tomasulu, P.M. (2016). Antibacterial poly(lactic acid) (PLA) film grafted with electrospun PLA/allyl isothiocyanate fibers for food packaging. *J Appl Polym Sci* 10:1-8.
- Liakos, I., Abdellatif, M., Innocenti, C., Scarpellini, A., Carzino, R., Brunetti, V., Marras, S., Brescia, R., Drago, F., Pompa, P. (2016). Antimicrobial lemongrass essential oil-copper ferrite cellulose acetate nanocapsules. *Molecules* 21:520, doi:10.3390/molecules21040520.
- Liakos, I., Holban, A., Carzino, R., Lauciello, S., Grumezescu, A. (2017). Electrospun fiber pads of cellulose acetate and essential oils with antimicrobial activity. *Nanomater* 7:84, doi:10.3390/nano7040084.
- Liakos, I., Rizzello, L., Scurr, D., Pompa, P., Bayer, I., Athanassiou, A. (2014). All-natural composite wound dressing films of essential oils encapsulated in sodium alginate with antimicrobial properties. *Int J Pharm* 463:137-145, doi:10.1016/j.ijpharm.2013.10.046.
- Liu, H., Liu, W., Luo, B., Wen, W., Liu, M., Wang, X. (2016). Electrospun composite nanofiber membrane of poly(l-lactide) and surface grafted chitin whiskers: Fabrication, mechanical properties and cytocompatibility. *Carbohydr Polym* 147:216-225.
- Mincea, M., Negrulescu, A., Ostafe, V. (2012). Preparation, modification and applications of chitin nanowhiskers: A Rev *Adv Mater Sci* 30:225-242.
- Nostro, A., Germano, M.P., D'angelo, V., Marino, A., Cannatelli, M.A. (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lett Appl Microbiol* 30(5):79-84.
- Paillet, M., Dufresne, A. (2001). Chitin whisker reinforced thermoplastic nanocomposites. *Macromolecules* 34:6527-6530.

- Pereira de Abreu, D. A., J. M. Cruz, P. P. Losada. (2012). Active and intelligent packaging for the food industry. *Food Rev Int* 28:146–187.
- Realini, E.C., Marcos, B. (2014). Active and intelligent packaging systems for a modern society. *Meat Sci* 98:404-419.
- Sartoratto, A., Machado, A.L.M., Delarmelina, C., Figueria, G.M., Duarte, M.C.T., Rehder, V.L.G. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian J Microbiol* 35(4):275-280.
- Schmatz, D., Costa, J., Greque de Moraes, M. (2019). A novel nanocomposite for food packaging developed by electrospinning and electrospaying. *Food Packaging Shelf Life* 20-100314.
- Tang, Y., Zhou, Y., Lan, X., Huang, D., Luo, T., Ji, J., Wang, W. (2019). Electrospun gelatin nanofibers encapsulated with peppermint and chamomile essential oils as potential edible packaging. *J Agric Food Chem* 67(8):2227-2234.
- Tiryakioğlu, B. (2004). *Euphorbia seguieriana* bitkisinden hazırlanan özütlerin antibakteriyel etkilerinin incelenmesi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale, Türkiye.
- Torres-Giner, S. (2011). Chapter 5: Electrospun nanofibers for food packaging applications. *Multifunctional Nanoreinforced Polym Food Packaging*, Woodhead Publishing Limited, 108-125, doi.org/10.1533/9780857092786.1.108.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Beest, V.M., Kruijf, N., Debevere, J. (1999). Developments in the active packaging of foods. *Trends Food Sci Technol* 10(3):77-86.
- Wen, P., Zhu, D., Feng, K., Liu, F., Lou, W., Li, N., Zong, M., Wu, H. (2016). Fabrication of electrospun polylactic acid nanofilm incorporating cinnamon essential oil/ β -cyclodextrin inclusion complex for antimicrobial packaging. *Food Chem* 196:996-1004.
- Wen, Q., Lan, W., Zhang, R., Whang, S., Liu, Y. (2017). Development of poly(lactic acid)/chitosan fibers loaded with essential oil for antimicrobial applications. *Nanomaterials* 7: 194-207.
- Yang, Z., Li, X., Si, J., Cui, Z., Peng, K. (2019). Morphological, mechanical and thermal properties of poly(lactic acid)(PLA)/cellulose nanofibrils(CNF) composites nanofiber for tissue engineering. *J Wuban Univ Technol Mater Sci Ed* 34(1):207-215.
- Zeng, J.B., He, Y., Li, S., Wang, Y. (2012). Chitin whiskers: an overview. *Biomacromolecules* 13:1-11.
- Zhang, L., Yongshang, L., Weng, L. (2004). Morphology and properties of soy protein isolate thermoplastics reinforced with chitin whiskers. *Biomacromolecules* 5:1046-1051.
- Zhang, W., Huang, C., Kusmartseva, O., Thomas, N.L., Mele, E. (2017). Electrospinning of polylactic acid fibres containing tea tree and manuka oil. *Reactive Functional Polym* 117:106-111.
- Zivanovic, S., Li, J., Davidson, P.M., Ki, K. (2007). Physical, mechanical, and antibacterial properties of chitosan/PEO blend films. *Biomacromolecules* 47:1505-1510.