



Kahramanmaraş Sütçü İmam University

Journal of Engineering Sciences



Geliş Tarihi : 12.10.2022
Kabul Tarihi : 21.12.2022

Received Date : 12.10.2022
Accepted Date : 21.12.2022

3-APTMS TAKVİYELİ KİTOSAN-POLİVİNİL ALKOL HARMAN FİLMLEİNİN FİZİKSEL VE ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTELERİ

PHYSICAL AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF 3-APTMS REINFORCED CHITOSAN-POLYVINYL ALCOHOL BLEND FILMS

Nedim GÜRLER^{1*} (ORCID: 0000-0001-5637-8262)

Ferit Can YAZDIÇ² (ORCID: 0000-0002-2762-3027)

¹Munzur Üniversitesi, Tunceli Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Tunceli, Türkiye
²Munzur Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Tunceli, Türkiye

*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Nedim GÜRLER, nedimgurles@munzur.edu.tr

ÖZET

Bu çalışmada kitosan (KT) ve polivinil alkol (PA) karışımına %0, %0.5, %1 ve %2 oranlarında 3-(aminopropil) trimetoksi silan (3-APTMS) ilave edilerek dökme metoduyla filmler hazırlanmıştır. Hazırlanan filmlerin FTIR, SEM, su buharı geçirgenliği, çözünürlük, opaklık ve renk özellikleri incelenmiştir. KT/PA, KT/PA-0.5, KT/PA-1 ve KT/PA-2 filmlerinin su buharı geçirgenliği sırasıyla $3.82 \times 10^{-6} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, $3.14 \times 10^{-6} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, $2.08 \times 10^{-6} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ ve $1.59 \times 10^{-6} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ olarak gerçekleşti. Filmleri su içinde çözünürlüğü azaldı. Artan 3-APTMS içeriği ile filmler daha opak oldu ve UV ışık bariyer özellik gösterdi. Renk özellikleri ise a^* değeri artarken b^* değeri ise azalarak filmler sarımsı-yeşil oldu. Ayrıca filmlerin Gram negatif (*E. coli*) ve gram pozitif (*S. aureus subsp. aureus*) bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirildi. Elde edilen KT/PA tek başına *S. aureus subsp. aureus* (ATCC 25923) ve *E. coli* (ATCC 25922) ye karşı herhangi bir antimikrobiyal aktiviteyi göstermedi. Dikkat çeken nokta KT/PA'ya eklenen %2 3-APTMS antibakteriyel aktivitenin standart olarak kullanılan ampisilin ile aynı olmasıdır.

Anahtar Kelimeler: Kitosan, polivinil alkol, antibakteriyel, modifikasyon, opaklık

ABSTRACT

In this study, films were prepared by casting method by adding 3-(aminopropyl) trimethoxy silane (3-APTMS) at 0%, 0.5%, 1% and 2% ratios to the mixture of chitosan (KT) and polyvinyl alcohol (PA). FTIR, SEM, water vapour permeability, solubility, opacity, and colour properties of the prepared films were examined. The water vapor permeability of KT/PA, KT/PA-0.5, KT/PA-1 and KT/PA-2 films are $3.82 \times 10^{-6} \text{ gm}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, $3.14 \times 10^{-6} \text{ gm}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, $2.08 \times 10^{-6} \text{ gm}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ and $1.59 \times 10^{-6} \text{ gm}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, respectively. The films have decreased solubility in water. With increasing 3-APTMS content, the films became more opaque and showed UV light barrier properties. On the other hand, the a^* value increased and the b^* value decreased, making the films yellowish-green. In addition, the antimicrobial activities of the films against Gram-negative (*E. coli*) and gram-positive (*S. aureus subsp. aureus*) bacteria were evaluated. KT/PA alone did not show any antimicrobial activity against *S. aureus subsp. aureus* (ATCC 25923) and *E. coli* (ATCC 25922). The remarkable point is that the 2% 3-APTMS antibacterial activity added to KT/PA is the same as that of standard ampicillin.

Keywords: Chitosan, polyvinyl alcohol, antibacterial, modification, opacity

GİRİŞ

Piyasada bulunan aktif ambalajların çoğu, sentetik geleneksel polimerlerden üretilmiştir. Petrokimya bazlı ambalaj malzemelerinin kullanımından sonra çevresel kirlilik ve katı atıkların neden olduğu tüketici sağlığı ve çevre endişeleri, biyolojik olarak parçalanabilen doğal polimerlere dayalı ambalaj malzemelerine ilgi çekmiştir (Ren vd. 2017; Gürler vd. 2020b). Günümüzde, proteinler ve polisakkaritler gibi yenilenebilir ham maddelerden biyolojik olarak parçalanabilen yeni malzemelerin hazırlanması ile ilgili çalışmalar giderek artmaktadır. Doğal biyopolimerlerden türetilen nanokompozitler, onları içeren filmlerin yanı sıra biyobozunur özelliklere sahiptir; bu nedenle, sistemin tamamı çevre dostudur (González vd. 2019; Gürler, 2020a). Şu anda, nihai gıda ürünlerinin kalitesini garanti altına almak için fonksiyonel ambalajların geliştirilmesine çok dikkat edilmiştir. Sonuç olarak, aktif paketlemenin, oksijeni temizleme, nemi emme ve antimikrobialeri salma gibi çeşitli stratejilerle gıda raf ömrünü uzatması önerilmiştir. Bu tür paketleme, gıdaları pasif olarak çevresel kontaminasyonlara karşı koruyan geleneksel paketlemenin eksikliklerini önleyebilir (Qin vd. 2020).

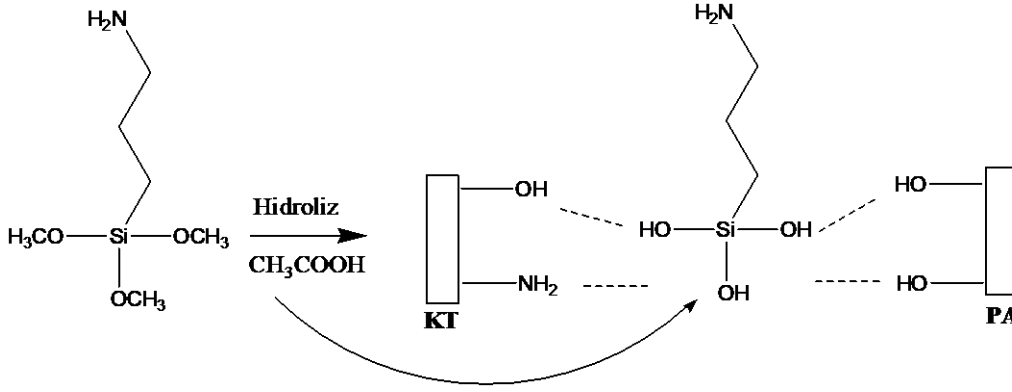
Biyopolimerler biyolojik olarak parçalanabilir ve bol miktarda bulunmaktadır. Denizin selülozu olarak adlandırılan kitin gibi bir biyopolimer yengeçler, karidesler, ıstakozlar vb. gibi kabukluların dış iskeletinde bulunur. Biyo uyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir ve mekanik olarak güçlü olmasının yanı sıra, kitosan üzerindeki amin grupları onu hemostatik, antibakteriyel, antifungal, antikolesteremik ve mukoadesif hale getirir (Ravishankar vd. 2020).

Kitosan genellikle karides gibi kabukluların iskelet yapısını oluşturan kitinin alkali deasetasyonu ile elde edilen polikationik biyopolimerdir (Berger vd. 2004). Kitosan, bolluğu, düşük maliyeti, üretim ve modifikasyon kolaylığı ve toksik olmaması nedeniyle çevresel temizlik süreçleri için umut verici bir malzemedir (Bui vd. 2020; Siralermukul vd. 2021). Kitosanın pozitif yükü, farmakoloji, tıp, tarım, ambalajlama ve gıda teknolojisi gibi çok çeşitli endüstrilerde büyük potansiyele sahip olup sayısız ve benzersiz özellikler kazandırır. Kitosanın antimikrobiyal aktivitesi, çok çeşitli mikroorganizmalarda uygulanmıştır. Moleküler ağırlık ve kitosan konsantrasyonunun antibakteriyel aktivite üzerindeki etkisini göstermiştir (Prashanth vd. 2006; Hernandez-Lauzardo vd. 2008; Torğut & Gürler, 2022a). Ayrıca kitosan iyi bir biyoyuymuluğa sahiptir (Pan vd. 2020). Ambalajlama sistemine antibakteriyel bileşenlerin eklenmesi ürünleri bozulmaya karşı korumakta ve ürün raf ömrünü de uzatmaktadır (Irkin vd. 2015; Jafarzadeh vd. 2021).

Kitosan, doğal antibakteriyel özelliği nedeniyle genellikle antimikrobiyal hidrojellerde kullanılır. Kitosanın tek başına kullanımı, şişme sırasında hidrojinin mekanik gücünü sınırlar, bu nedenle polimer harmanlamının fizikokimyasal özellikleri iyileştirmek için kullanılabilirliğini öne sürdü (Khan vd. 2021). Kitosan ve polivinil alkol birbirleri ile uyumlu polimer malzemelerdir ve birbirleri ile homojen karışım oluşturabilirler (Ebrahimzadeh vd. 2021; Massarelli vd. 2021). Kitosanın bir zayıflığı, asidik çözeltilerdeki düşük kararlılığıdır; çözülür ve sorbat bağlama kabiliyetini kaybeder. Kitosanın asidik solüsyondaki stabilitesi güçlendirilebilir ve geliştirilebilir. Çapraz bağlama kitosan mekanik direncini, gözenek boyutunu, hidrofilitesini ve şişmenin önlenmesini artırabilir (Vakili vd. 2018).

PA (Polivinil Alkol), biyoyuymuluğu, toksik olmaması, kimyasal dayanıklılık, film oluşturma, suda çözünürlüğü ve iyi kimyasal ve termal stabilitesi nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. PA poli(vinil asetatın) hidrolizi ile üretilmektedir. PA kağıt kaplamalarda, yapıştırıcı olarak, ilaç taşıyıcı gibi bir çok endüstriyel uygulamada ve esnek ambalaj filmlerinin üretimi olarak birçok kullanım alanlarına sahiptir. PA çok sayıda hidroksil grubuna sahiptir. Bu tür karışımların özelliklerini daha da geliştirmek için çapraz bağlama ve dolgu maddelerin eklenmesi gibi bileşenler eklenebilir (Parida vd. 2011; Haydari vd. 2013; Lim vd. 2015; Sonker vd. 2018; Sedaghat vd. 2019; Boonsuk vd. 2020; Gürler vd. 2021b).

Çapraz bağlama, polisakkarit bazlı filmlerin performansını ve uygulanabilirliğini, özellikle suya duyarlılıkları söz konusu olduğunda geliştirmek için umut verici bir tekniktir (Wu vd. 2019). Kitosan genipin, glutaraldehit, tripolifosfat, etilen glikol, diglisidil eter ve diizosiyanat gibi birçok çapraz bağlayıcılar kullanılmıştır (Muzzarelli, 2009). Bu çalışmada kitosan/polivinil alkol karışımına kimyasal olarak çapraz bağlanmış 3-(aminopropil) trimetoksi silan (Şekil 1) ile hazırlanarak filmlerin ambalajlama malzemesi olarak kullanımını araştırmaktır. Bu amaçla filmlerin su buharı geçirgenliği, çözünürlük, opaklık, renk tayini ve filmlerin E. coli ve S. aureus subsp. aureus patojenlerine karşı sergilediği antibakteriyel özellikleri incelenmiştir.



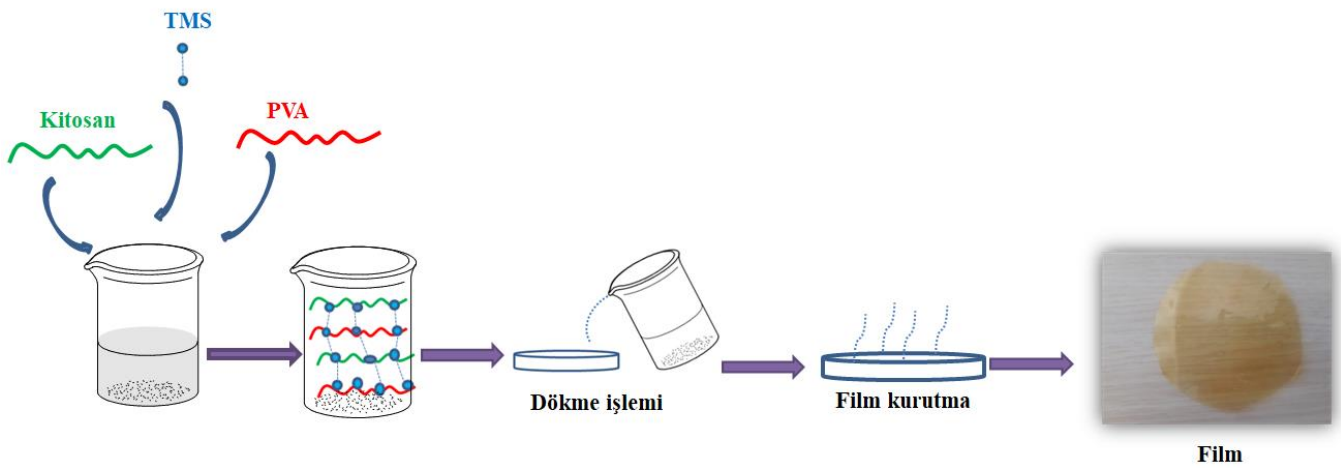
Şekil 1. Reaksiyon Şeması

MATERYAL ve YÖNTEM

Kitosan (KT), susuz kalsiyum klorür, asetik asit, sodyum klorür ve 3-(aminopropil) trimetoksi silan (3-APTMS) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Polivinil alkol (PA) ve gliserol Acros firmasından satın alınmıştır. Magnezyum nitrat hekza hidrat ise J.T Baker firmasından alınmıştır. Kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır. Çalışmada Millipore Direct-Q3 saf su cihazı kullanılmıştır.

Film Hazırlama

Dökme tekniğiyle filmler başarı bir şekilde hazırlandı. Öncelikle 0.75 g kitosan %1 asetik asit çözeltisinde 4 saat boyunca çözülmüştür. 1.75 g polivinil alkol ise ayrı bir beherde 85 °C'de 2 saat çözüldü ve kitosan çözeltisine ilave edilerek karıştırıldı. Farklı oranlarda 3-APTMS (%0, %0.5, %1 ve %2) asetik asit ortamında hidrolize edilerek, son olarak polimer karışımına yavaş yavaş ilave edildi ve 85 °C'de 16 saat karıştırıldı. Hazırlanan son çözelti oda sıcaklığına ulaşana kadar soğutuldu ve petri kaplarına döküldü. 40 °C'de 3 gün kurutuldu ve daha sonra filmler petri kabından çıkarılmıştır. Filmler analize kadar %53 nem ortamında muhafaza edildi. Hazırlanan filme ait görseller Şekil 2'de gösterilmiştir. Hazırlanan filmler KT/PA, KT/PA-0.5, KT/PA-1 ve KT/PA-2 şeklinde belirtildi.



Şekil 2. Film Hazırlama Aşaması

FTIR Analizi

Numuneler için FTIR spektrumu Jasco 6700 marka ATR-FTIR cihazı ile yapıldı. Film numuneleri 400-4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında ve 32 tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Numuneler herhangi bir ön işleme tabi tutulmadan doğrudan numune tutucuya preslenerek ölçümler alınmıştır.

Morfolojik Analizi

Filmlerin yüzey morfolojisi için Hitachi SU3500 cihazı ile görüntüleri alındı. Analizden önce filmler 5×5 mm² şeklinde kesildi ve vakum ortamında altın püskürtülerek film yüzeyi kaplanmıştır. Daha sonra numune tutucuya yerleştirilerek SEM görüntüleri alındı. Bu işlemler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Çözünürlük

Filmlerin suda çözünürlük testi için öncelikle film numuneleri 2×2 cm² şeklinde kesildi. Filmler ilk önce 105 °C'de 24 saat kurutuldu ve daha sonra içerisinde silika jel bulunan desikatöre yerleştirildi. Sabit tartıma gelene kadar belirli periyotlarla tartım alındı ve bu ilk tartım olarak kaydedildi (Ç_i). Daha sonra filmler içinde 50 mL su bulunan beher içine bırakıldı ve rastgele 150 rpm de film numuneleri karıştırıldı. 24 saat sonunda film numuneleri çözeltisi süzülde ve süzütünden geriye kalan yine 105 °C'de 24 saat kurutuldu ve bu son tartım olarak belirlendi (Ç_s). Numunelerin çözünürlük değerleri eşitlik 1'e göre hesaplanmıştır. Denemeler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

$$\text{Çözünürlük} = \frac{C_i - C_s}{C_i} \quad (1)$$

Su Buharı Geçirgenliği

Film numunelerinin ASTM 1996'ya göre su buharı geçirgenliği belirlenmiştir. İçerisinde susuz kalsiyum klorür (%0 bağıl nem) ve etrafı parafinle sarılı film kaplı şişeler desikatöre bırakıldı. Desikatör içinde doymuş sodyum klorür ortamında %75 bağıl nem ortamına şişeler bırakıldı. Şişeler belirli periyodik aralıklarında tartım işlemi gerçekleştirildi. Şişelerin ağırlık değişiklikleri 24 saatte 6 farklı tartım alınarak kaydedildi. Su buharı geçirgenliği aşağıdaki eşitlik 2 kullanılarak hesaplanmıştır. Filmlerin su buharı geçirgenliği 3 tekrerrülü yapılmıştır.

$$\text{Su buharı geçirgenliği} = \frac{g \times d}{t \times A \times S(P_1 - P_2)} \quad (2)$$

Burada; g/t, zamana karşı absorplanan nem miktarını; d, film kalınlığını (mm); A film alanını; P1, %75 bağıl nem; P2, %0 bağıl nemi ve S(P1-P2) film boyunca geçen su buharı basıncını ifade eder.

Opaklık

Opaklık değerleri 600 nm'de bir Shimadzu UV-1800 spektrofotometre cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Referans olarak boş bir test hücresi kullanılmıştır. Filmler dikdörtgen bir parça şeklinde kesildi ve doğrudan spektrofotometre test hücresinin iç tarafına yerleştirildi. Spektrofotometrede filmlerin üç kez absorbansı alınarak ortalaması alınmıştır. Filmlerin opaklığı aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır. Burada x: film kalınlığını ifade etmektedir (mm).

$$\text{Opaklık} = \frac{\text{Absorbans}_{600}}{x} \quad (3)$$

Renk Özellikleri

Filmlerin renk özellikleri Konica Minolta Kromometre cihazı kullanılarak renk ölçütleri (L*, a* ve b*) belirlenmiştir. Filmlerin en az 5 farklı bölgesinden ölçümler alındı. L* parlaklığı, a* kırmızılığı/yeşilliği ve b* sarılığı/maviliği ifade etmektedir. Ayrıca toplam renk değişimi (ΔE) ve kroma değerleri aşağıdaki eşitliklere göre hesaplanmıştır. Kroma değeri ise rengin doygunluk derecesini gösterir ve rengin gücü ile orantılıdır.

$$\Delta E = \sqrt{L^{*2} + a^{*2} + b^{*2}} \quad (4)$$

$$\text{Kroma değeri} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (5)$$

Antibakteriyel Aktivite

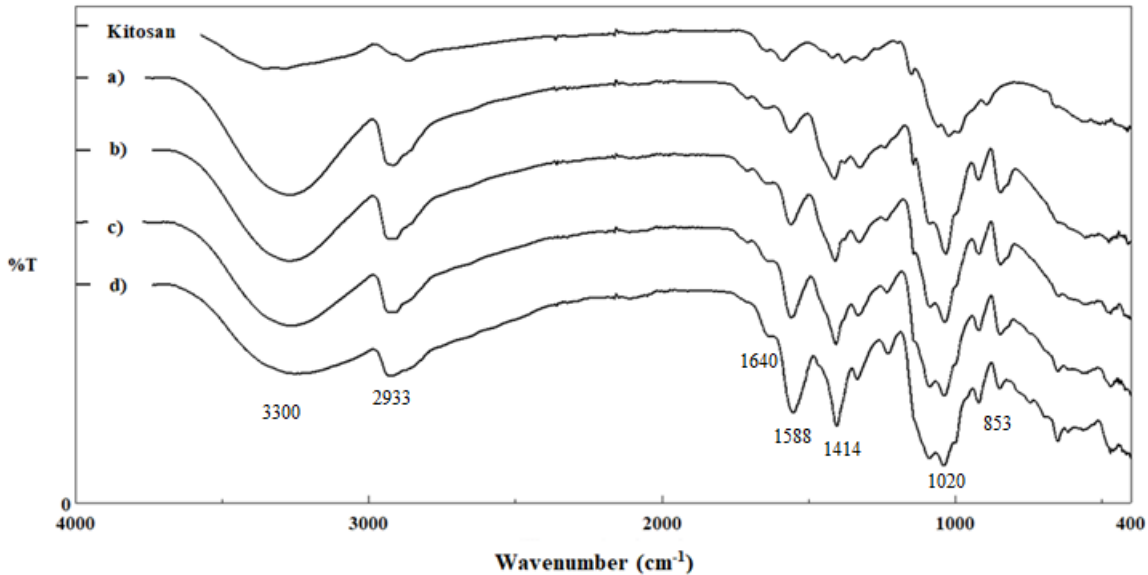
Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesinde agar kuyucuk difüzyon test yöntemi kullanılmıştır (Perez, 1990; Russo vd. 2012). Kimyasal ürünlerin antimikrobiyal aktivitesi ATCC (American Type Culture Collection) suşları olan *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC 25923) ve *Escherichia coli* (ATCC 25922) kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla gecelik kültürden 0.5 McFarland bakteri solüsyonu hazırlanmış ve eküvyon çubuğu

ile agarlı petrilere yayma ekim yapılmıştır (EUCAST, 2019). Bakteri suşları için Muller Hinton agar (MHA) kullanılmıştır. MHA petrilere oyuk açmak için steril mantar delici (6 mm çap) kullanılmış ve her kuyuya 10 µL kimyasal ürün (KT/PA, KT/PA-0.5, KT/PA-1 ve KT/PA-2) ilave edilmiştir. Daha sonrasında aerobik koşullar altında 37°C ± 1°C'de 24 saat süreyle inkübe edilerek, bakteriyel büyümenin inhibisyonu mm (n = 3) olarak ölçülmüştür. Test edilen organizmaların duyarlılığını kontrol etmek için pozitif kontrol olarak Ampisilin-10 µg kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite, her bir kuyunun etrafındaki temiz bölgenin boyutu ölçülerek değerlendirilmiştir (Balouiri vd. 2016). Tüm testler üç kopya halinde yapılmış; sonuçlar ortalama ± ortalamanın standart hataları olarak ifade edilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

FTIR Spektroskopisi

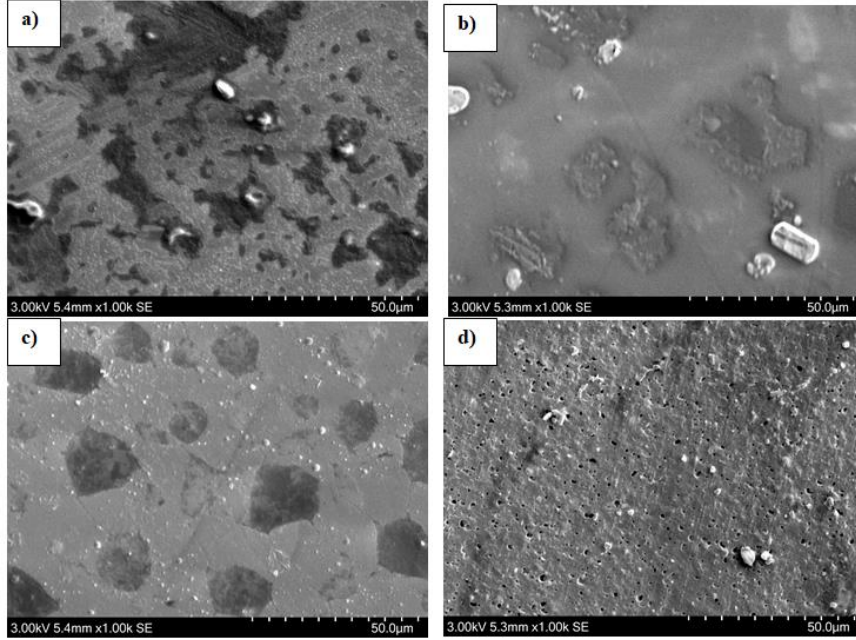
Saf kitosan ve filmlere ait FTIR spektrumları Şekil 3'de gösterilmiştir. FTIR spektroskopisi kitosan ile polivinil alkol arasındaki etkileşimi ve 3-aminopropil trimetoksi silanın filmlere dahil edilmesi sonucu görülen değişiklikleri belirlemek için çalışılmıştır. Saf kitosan için ana karakteristik bantlar 890, 1020 ve 1150 cm⁻¹'de kitosanın sakkarit (C-O-C) yapılarına atıfta bulunulabilir. Saf kitosan için 1588 cm⁻¹ NH eğilme pikine aittir (Pinzon vd. 2018). 3300 cm⁻¹, 1640 cm⁻¹ ve 1588 cm⁻¹ karakteristik amino bantları sırasıyla hidroksil grup (-OH) gerilmesi, amid I ve amid II bantlarına göstermektedir (Torğüt vd. 2022b). 2933 cm⁻¹'de görülen bant metilen grubuna (CH₂) karşılık gelen asimmetrik gerilme titreşimidir. Yaklaşık olarak 1100-1050 cm⁻¹'deki bant, PA omurgasında bulunan asetil gruplarının C-O gerilmesine ve yaklaşık 1760 cm⁻¹ ile C=O gerilmesine karşılık gelir. KT/PA karışımlarının spektrumları için, 3360 cm⁻¹ civarında bir azalma gözlemlendi ve pik şiddeti 3272 cm⁻¹'ye doğru kaydı. Bu, kitosan'ın ikincil bir amin (-NH) ile PA'nın bir hidroksil grubu (-OH) gerilme titreşimi arasındaki çapraz bağlayıcıdan kaynaklı olabilir. 1376 cm⁻¹ ve 1414 cm⁻¹'deki keskin tepe noktaları CH₃ simetrik deformasyon pikine aittir (Bonilla vd. 2014; Hajji vd. 2016). 1328 cm⁻¹'de gözlemlenen zayıf gerilme titreşimi, C-O-H eğilme titreşimidir (Kasai vd. 2019). 3-APTMS katkılı filmlerde 1145 cm⁻¹ ve 853 cm⁻¹'de Si-O-Si ve Si-C gerilmelerinden kaynaklanan pikler, KT/PA pikleri ile örtüşmektedir (Gürler vd. 2021a).



Şekil 3 Kitosan ve Kompozit Filmlerin FTIR Spektrumları a) KT/PA, b) KT/PA-%0.5, c) KT/PA-%1, d) KT/PA-%2

SEM Analizi

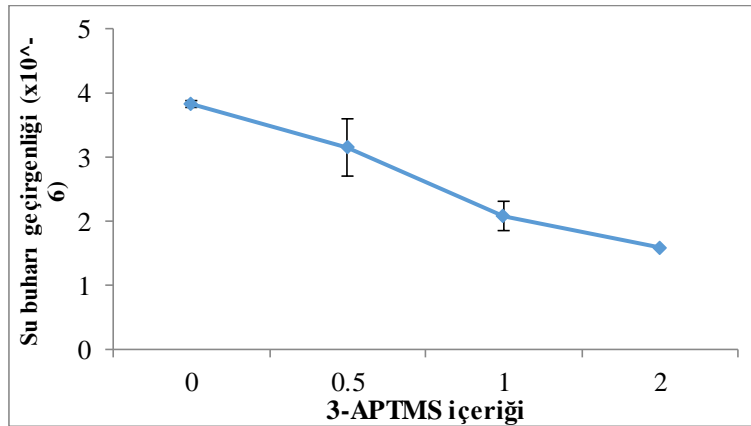
Film numunelerin yüzey morfolojisi SEM ile analiz edildi. Farklı oranlarda 3-APTMS ile hazırlanan KT/PA harman filmlerinin SEM görüntüleri Şekil 4'te gösterilmiştir. Film yüzeylerinde herhangi bir çatlak veya delik görülmemiştir. Bu KT/PA polimer karışımına 3-APTMS ilave edilmesi kompozitin birbirine uyumlu olması şeklinde açıklanabilir. Ancak 3-APTMS ilave edilen filmlerin yüzeyinde değişiklikler görüldü ve filmler pürüzlü hale geldi.



Şekil 4. Filmlerin SEM Görüntüleri a) KT/PA, b) KT/PA-0.5, c) KT/PA-1 ve d) KT/PA-2

Su Buharı Geçirgenliği

Gıda ambalaj filmleri, dış ortamdan mümkün olduğu kadar filme nemin girmesini önleme eğiliminde olmalıdır (Hiremani vd. 2022). 3-APTMS katkılı filmlerin su buharı geçirgenliği değerleri Şekil 5’de verilmiştir. Çapraz bağlayıcı içeren filmlerin su buharı geçirgenliği düşüktür ve artan çapraz bağlayıcı konsantrasyonuna göre su buharı geçirgenliğinde azalma gözlenmektedir. Kitosan ve polivinil alkol karışımı bünyelerinde OH gruplarına sahiptir. Su buharı geçirgenliğinin azalmasındaki etken 3-APTMS ilave edilmesiyle kitosan ve polivinil alkoldeki hidroksil grupları bağ yaparak hidroksil gruplarının azalmasıdır. Bu azalma ile su buharının diffüzyonu için daha kıvrımlı yol izlemesidir (Roy vd. 2021). Benzer durum daha önceki çalışmada da ifade edildi. Kitosan/jelatin/nişasta karışımına çapraz bağlayıcı olarak sodyum trifosfat ve kasiyum trifosfat ilave edildiğinde su buharı geçirgenliğinin düştüğünü belirtmişlerdir (Izadi-Vasafi vd. 2020).

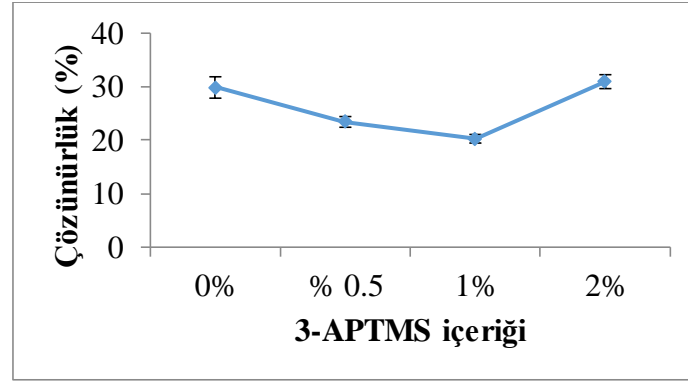


Şekil 5. 3-APTMS Katkılı ve Katkısız Filmlerin Su Buharı Geçirgenlikleri

Çözünürlük

Şekil 6’da filmlere ait çözünürlük değerleri gösterilmiştir. 3-APTMS katkılanılmamış filmlerde çözünürlük değeri %29.85 iken, kitosan/polivinil alkol karışımına %0.5 ve %1 oranında 3-APTMS ilave edilmiş filmlerde su içindeki çözünürlük değerleri sırasıyla %23 ve %20 dir. Çözünürlükteki azalma 3-APTMS ile modifiye edilmiş

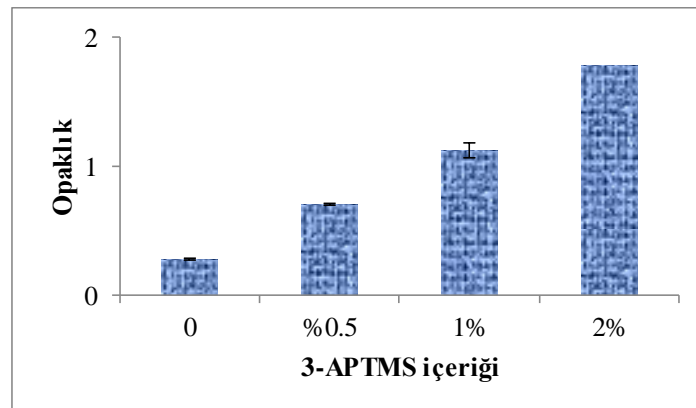
kitosan/polivinil alkol gruplarında hidrofilik OH grupları ile moleküler arası etkileşimden dolayı OH yoğunluğu azalmaktadır. Ayrıca, polimer bileşenlerindeki zincir hareketliliğinde ve polimer serbest hacimde bir azalma ile sonuçlanan güçlü bir çapraz bağlanma söz konusudur. Bu yüzden hidrofilik grupların azalmasıyla polimer- su etkileşimini de etkiler ve çözünürlükte azalmış olur. Benzer durum kitosan/nişasta polimer karışımına sitrik asit ilavesi ile su adsorpsiyonun azaldığını bildirdiler. (Peidayesh vd. 2020). Bir başka çalışmada ise Kitosan/polivinil alkol karışımına çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit ilave edilmesi meydana gelen polimerler arası zincir reaksiyonları tarafından oluşturulan, hidrofilik grupların esnekliği ve sayısı azaldı ve çapraz bağlanma meydana gelmiştir. Glutaraldehit polimer zincirleri arasında hareketliliği azalttığından suya karşı direnci de artmaktadır (Costa-Júnior vd. 2019). %2 oranında 3-APTMS ilave ile çözünürlük arttı. Bu artış 3-APTMS ile etkileşime giremeyen serbest hidrofilik OH grupları yüzünden olabilir.



Şekil 6. 3-APTMS Katkılandırılmış KT/PA Filmlerin Çözünürlük Özelliği

Opaklık

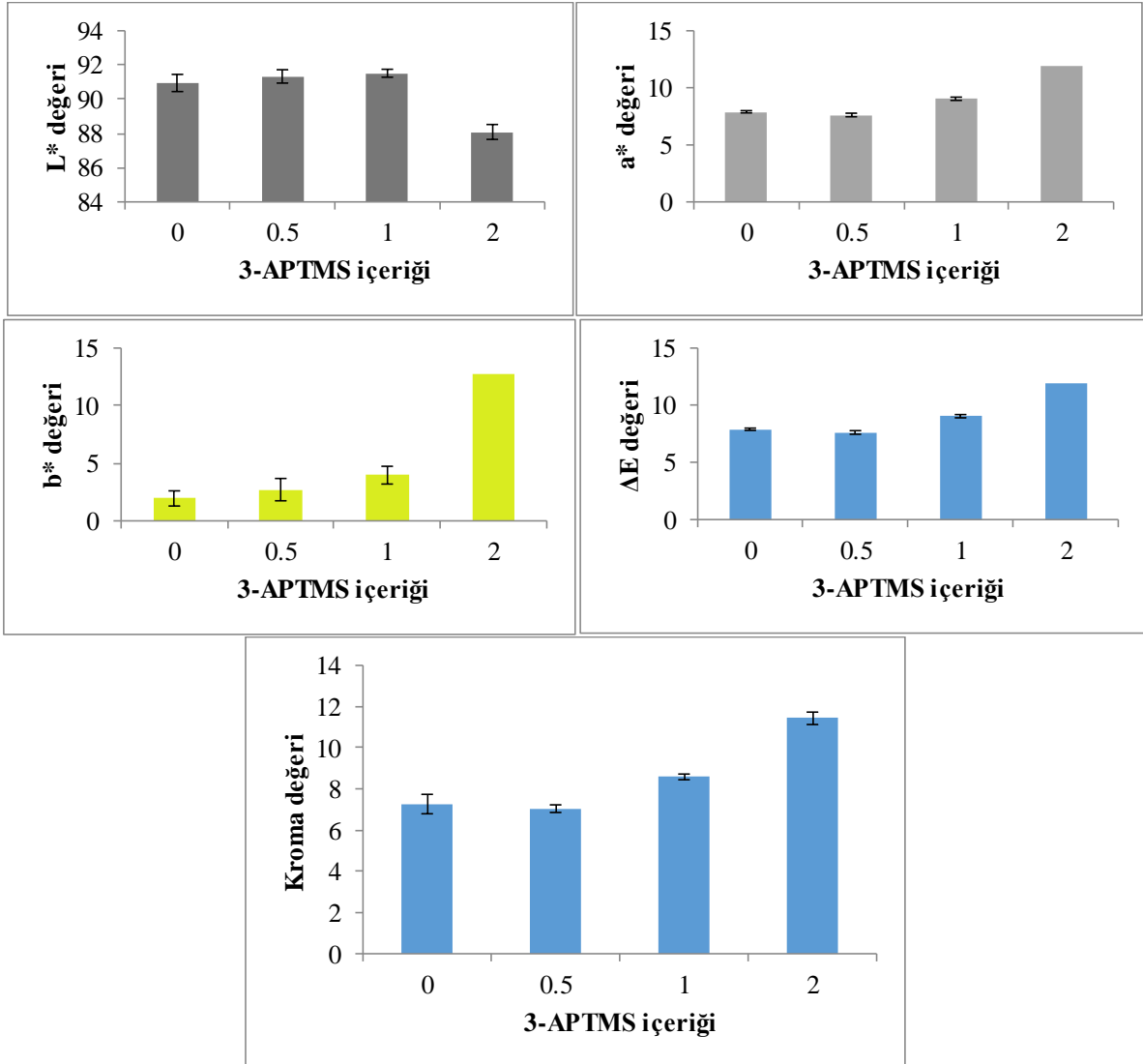
UV ışık bariyerine ve yeterli şeffaflığa sahip biyobozunur filmler, gıda ambalajlama uygulamalarında önemlidir. UV aralığındaki düşük geçirgenlik özelliğine sahip olan filmler iyi bir UV bariyer özellik sergileyebilir. Bu şekilde hazırlanan filmler UV ışığı bariyeri ile lipid oksidasyonunu önleyebilir. Lipid oksidasyonu, istenmeyen tatlar oluşturarak ürünlerin raf ömrünü azaltır. Bu nedenle UV ışığı bariyerine karşı gıda ambalaj malzemeleri oldukça önemlidir (Cazón vd. 2018). Filmlerin opaklık özellikleri Şekil 7'de gösterilmiştir. Kitosan/polivinil alkol karışımının 3-APTMS katkılandırılmış filmlere göre daha şeffaftır. Polimer karışımına 3-APTMS ilave edilmesiyle filmler daha opak olmaktadır ve artan 3-APTMS içeriğinde de opaklık özelliği artmaktadır. En yüksek UV ışık bariyeri %2 oranında 3-APTMS içeren filmdir. Bu durum 3-APTMS ilavesi ile filmlerin ışık geçirgenliğinin azaldığı ve sonuç olarak filmlerin daha opak olduğu görülmektedir. Bir diğer çalışmada KT/PA bazlı filmleri UV ışığı kaynaklı önlemek için mükemmel bir bariyer özelliğine sahip olduğu rapor edilmiştir (Hajji vd. 2016). Işık geçirgenliği en düşük film gıda ambalajlama sistemlerinde UV ışığının neden olduğu lipid oksidasyonunu önlemek için mükemmel bir bariyer haline getirebilir (Bonilla vd. 2014).



Şekil 7. Filmlere Ait Opaklık Özelliği

Renk Özelliği

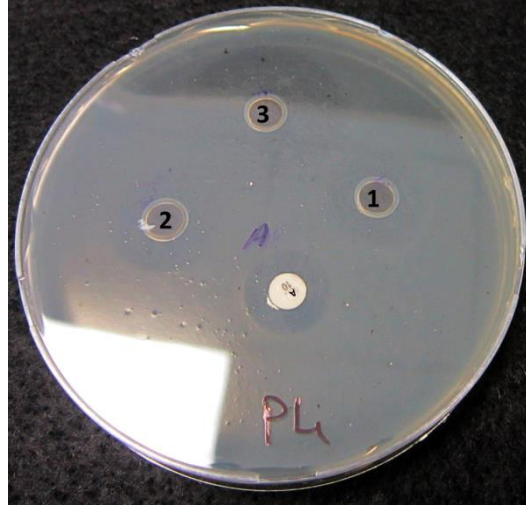
Film numunelerinin renk özellikleri Şekil 8’de gösterilmiştir. Ambalajın genel görünümü ve tüketici tarafından kabul görmesi açısından gıda ambalajında renk önemli bir parametrelerden biridir. Polisakkarit bazlı filmler normalde renksiz veya şeffaftır ve ambalaj içindeki bileşenlerin görülebilmesi için tercih edilirler (Kanatt vd. 2020). L^* , 0 (siyah, karanlık) ile 100 (beyaz, açıklık) arasındaki renk ölçütünü ifade etmektedir (Gürler ve Torğut 2022a). En düşük L^* değeri filmlerin daha koyu olduğu anlamına gelir. %2 oranında 3-APTMS içeriği ile çapraz bağlı filmin L^* değeri azalmış ve diğer filmlere göre daha siyah olmuştur. Benzer şekilde a^* değerinde de azalma görülmüştür. Çapraz bağlı oranı arttığında b^* değerindeki artış ile toplam renk farklılığında (ΔE) ve kroma değerinde artış gözlenmiştir ve filmler sarımsı-yeşil bir duruma gelmektedir



Şekil 8. Filmlere Ait ΔE , L^* , a^* b^* ve Kroma Değerleri

Antibakteriyel Özellik

Tablo 1’de 3-APTMS katkılı filmlere ait antibakteriyel etkileri gösterildi. KT/PA film numunesi kullanılan test bakterilerine karşı herhangi bir antibakteriyel aktivite göstermemiştir. Ancak 0.5 oranında eklenen KT/PA-0.5 filmi Gram negatif bir bakteri olan *E. coli*’ye karşı standart antibiyotik’in yarısı oranında bir aktivite sergilerken, %2 oranında eklendiğinde ampisilin’in etkililiğine ulaştığı belirlenmiştir (Şekil 9).



Şekil 9. Filmlerin *E. Coli*'ye Karşı Göstermiş Olduğu Antibakteriyel Özellikler. A: Ampisilin-10 µg, 1: KT/PA-0.5, 2: KT/PA-1, 3: KT/PA-2

KT/PA gram pozitif bir bakteri olan *S. aureus* subsp. *aureus*'a karşı herhangi bir antibakteriyel aktive göstermemiştir. Antibakteriyel aktivite, farklı hücre yüzeyi özelliklerinden dolayı Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler arasında farklılık gösteren karmaşık bir süreçtir (Atay, 2019). Farklı çalışmalarda, Gram-negatif bakterilere karşı, Gram-pozitif bakterilere göre daha güçlü antibakteriyel aktivite sergilediği gösterilmiştir (Chung vd. 2004).

Tablo 1. Filmlerin Antibakteriyel Etkileri

Mikroorganizmalar	KT/PA	KT/PA-0.5	KT/PA-1	KT/PA-2	Ampisilin (10)
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (ATCC 25923)	-	-	-	-	16,2±0,15
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	-	7,83±0,38	11,46±0,71	15,3±0,56	15,53±0,64

Ortalama±St Hata, - Antimikrobiyal aktivite yok (-)

SONUÇ

Kitosan/polvinil alkol karışımına farklı konsantrasyonlarda 3-APTMS ilave edilmesiyle filmler başarılı bir şekilde dökme metoduyla hazırlandı. Elde edilen filmlerin fiziksel ve antibakteriyel özellikleri incelendi. Artan 3-APTMS miktarı filmlerin çözünürlük ve su buharı difüzyonu azaldı. Filmler yüksek 3-APTMS içeriğiyle daha opak ve UV ışığı kaynaklı bozunmayı önlemek için iyi bir bariyer özelliği gösterdi. Numunelerin renk özelliği 3-APTMS oranına göre değişti. 3-APTMS oranının artmasıyla filmlerin b* skalasının artışı ile filmler daha sarımsı oldu. Filmler gram negatif bakteri *E. coli*'ye karşı mükemmel bir antibakteriyel özellik sergiledi. Sonuç olarak, KT/PA-2 filmler antibakteriyel ve lipid oksidasyonuna karşı duyarlı UV bariyer özellikli gıda ambalaj malzemesi olarak önerilebilir.

KAYNAKLAR

Atay, H. Y. (2019). Antibacterial activity of chitosan-based systems. *Functional chitosan*, 457.

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79.

- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., & Gurny, R. J. E. J. O. P. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 57(1), 19-34.
- Bonilla, J., Fortunati, E. L. E. N. A., Atarés, L., Chiralt, A., & Kenny, J. M. (2014). Physical, structural and antimicrobial properties of poly vinyl alcohol–chitosan biodegradable films. *Food Hydrocolloids*, 35, 463-470.
- Boonsuk, P., Sukolrat, A., Kaewtatip, K., Chantarak, S., Kellarakis, A., & Chaibundit, C. (2020). Modified cassava starch/poly (vinyl alcohol) blend films plasticized by glycerol: Structure and properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 137(26), 48848.
- Bui, T. H., Lee, W., Jeon, S. B., Kim, K. W., & Lee, Y. (2020). Enhanced Gold (III) adsorption using glutaraldehyde-crosslinked chitosan beads: Effect of crosslinking degree on adsorption selectivity, capacity, and mechanism. *Separation and Purification Technology*, 248, 116989.
- Cazón, P., Vázquez, M., & Velazquez, G. (2018). Composite films of regenerate cellulose with chitosan and polyvinyl alcohol: Evaluation of water adsorption, mechanical and optical properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 235-246.
- Chung YC, Su CC, Chen Y, Jia G, Wang JCG, Wu H, Lin JG (2004) Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin* 25, 932–936.
- Costa-Júnior, E. S., Barbosa-Stancioli, E. F., Mansur, A. A., Vasconcelos, W. L., & Mansur, H. S. (2009). Preparation and characterization of chitosan/poly (vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 76(3), 472-481.
- Ebrahimzadeh, S., Bari, M. R., Hamishehkar, H., Kafil, H. S., & Lim, L. T. (2021). Essential oils-loaded electrospun chitosan-poly (vinyl alcohol) nonwovens laminated on chitosan film as bilayer bioactive edible films. *Lwt*, 144, 111217.
- EUCAST (2019) Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing. Version 7.0 (January 2019).
- González, A., Gastelú, G., Barrera, G. N., Ribotta, P. D., & Igarzabal, C. I. Á. (2019). Preparation and characterization of soy protein films reinforced with cellulose nanofibers obtained from soybean by-products. *Food Hydrocolloids*, 89, 758-764.
- Gürler, N. (2020a). Sitrik Asit ile Modifiye Edilmiş Mısır Nişastası/Mikrokristalin Selüloz Filmlerin Fiziksel ve Mekanik Özellikleri. *Int. J. Pure Appl. Sci*, 6(2), 179-185.
- Gürler, N., & Torğut, G. (2022a). Physicomechanical, thermal and dielectric properties of eco-friendly starch-microcrystalline cellulose-clay nanocomposite films for food packaging and electrical applications. *Packaging Technology and Science*, 35(6), 473-483.
- Gürler, N., Paşa, S., & Temel, H. (2021a). Silane doped biodegradable starch-PLA bilayer films for food packaging applications: Mechanical, thermal, barrier and biodegradability properties. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 123, 261-271.
- Gürler, N., Paşa, S., Alma, M. H., & Temel, H. (2020b). The fabrication of bilayer polylactic acid films from cross-linked starch as eco-friendly biodegradable materials: synthesis, characterization, mechanical and physical properties. *European Polymer Journal*, 127, 109588.
- Gürler, N., Paşa, S., Erdoğan, Ö., & Cevik, O. (2021b). Physicochemical properties for food packaging and toxicity behaviors against healthy cells of environmentally friendly biocompatible starch/citric acid/polyvinyl alcohol biocomposite films. *Starch-Stärke*, 2100074.
- Hajji, S., Chaker, A., Jridi, M., Maalej, H., Jellouli, K., Boufi, S., & Nasri, M. (2016). Structural analysis, and antioxidant and antibacterial properties of chitosan-poly (vinyl alcohol) biodegradable films. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(15), 15310-15320.
- Hernandez-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velazquez-Del Valle, M. G., Méndez-Montealvo, M. G., Sánchez-Rivera, M. M., & Bello-Perez, L. A. (2008). Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. *Carbohydrate Polymers*, 73(4), 541-547.

- Heydari, M., Moheb, A., Ghiaci, M., & Masoomi, M. (2013). Effect of cross-linking time on the thermal and mechanical properties and pervaporation performance of poly (vinyl alcohol) membrane cross-linked with fumaric acid used for dehydration of isopropanol. *Journal of applied polymer science*, 128(3), 1640-1651.
- Hiremani, V. D., Goudar, N., Gasti, T., Khanapure, S., Vanjeri, V. N., Sataraddi, S., ... & Chougale, R. B. (2022). Exploration of multifunctional properties of piper betel leaves extract incorporated polyvinyl alcohol-oxidized maize starch blend films for active packaging applications. *Journal of Polymers and the Environment*, 30(4), 1314-1329.
- Irkin, R., & Esmer, O. K. (2015). Novel food packaging systems with natural antimicrobial agents. *Journal Of Food Science and Technology*, 52(10), 6095-6111.
- Izadi-Vasafi, H., Ghayoumi, F., Karbasizadeh-Esfahani, S., & Ghafghazi, M. (2020). Comparing the Effect of Sodium-Based and Calcium-Based Crosslinkers on the Swelling, Mechanical and Rheological Properties of Chitosan/Gelatin/Starch Films. *Journal of Macromolecular Science, Part B*, 59(5), 331-343.
- Jafarzadeh, S., Salehabadi, A., Nafchi, A. M., Oladzadabbasabadi, N., & Jafari, S. M. (2021). Cheese packaging by edible coatings and biodegradable nanocomposites; improvement in shelf life, physicochemical and sensory properties. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 218-231.
- Kanatt, S. R., & Makwana, S. H. (2020). Development of active, water-resistant carboxymethyl cellulose-poly vinyl alcohol-Aloe vera packaging film. *Carbohydrate Polymers*, 227, 115303.
- Kasai, D., Chougale, R., Masti, S., Chalannavar, R., Malabadi, R. B., Gani, R., & Gouripur, G. (2019). An investigation into the influence of filler Piper nigrum leaves extract on physicochemical and antimicrobial properties of chitosan/poly (vinyl alcohol) blend films. *Journal of Polymers and the Environment*, 27(3), 472-488.
- Khan, B. A., Khan, A., Khan, M. K., & Braga, V. A. (2021). Preparation and properties of High sheared Poly (Vinyl Alcohol)/Chitosan blended Hydrogels films with Lawsonia inermis extract as wound dressing. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 61, 102227.
- Lim, M., Kwon, H., Kim, D., Seo, J., Han, H., & Khan, S. B. (2015). Highly-enhanced water resistant and oxygen barrier properties of cross-linked poly (vinyl alcohol) hybrid films for packaging applications. *Progress in Organic Coatings*, 85, 68-75.
- Massarelli, E., Silva, D., Pimenta, A. F. R., Fernandes, A. I., Mata, J. L. G., Armês, H., ... & Serro, A. P. (2021). Polyvinyl alcohol/chitosan wound dressings loaded with antiseptics. *International Journal of Pharmaceutics*, 593, 120110.
- Muzzarelli, R. A. (2009). Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers*, 77(1), 1-9.
- Pan, C., Qian, J., Zhao, C., Yang, H., Zhao, X., & Guo, H. (2020). Study on the relationship between crosslinking degree and properties of TPP crosslinked chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 241, 116349.
- Parida, U. K., Nayak, A. K., Binhani, B. K., & Nayak, P. L. (2011). Synthesis and characterization of chitosan-polyvinyl alcohol blended with cloisite 30B for controlled release of the anticancer drug curcumin. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2(04), 414.
- Peidayesh, H., Ahmadi, Z., Khonakdar, H. A., Abdouss, M., & Chodák, I. (2020). Baked hydrogel from corn starch and chitosan blends cross-linked by citric acid: Preparation and properties. *Polymers for Advanced Technologies*, 31(6), 1256-1269.
- Perez, C. (1990). Antibiotic assay by agar-well diffusion method. *Acta Biol Med Exp*, 15, 113-115.
- Pinzon, M. I., Garcia, O. R., & Villa, C. C. (2018). The influence of Aloe vera gel incorporation on the physicochemical and mechanical properties of banana starch-chitosan edible films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(11), 4042-4049.
- Prashanth, K. V. H., & Tharanathan, R. N. (2006). Crosslinked chitosan—preparation and characterization. *Carbohydrate research*, 341(1), 169-173.
- Qin, Z., Jia, X., Liu, Q., Kong, B., & Wang, H. (2020). Enhancing physical properties of chitosan/pullulan electrospinning nanofibers via green crosslinking strategies. *Carbohydrate Polymers*, 247, 116734.

- Ravishankar, K., & Dhamodharan, R. (2020). Advances in chitosan-based hydrogels: Evolution from covalently crosslinked systems to ionotropically crosslinked superabsorbents. *Reactive and Functional Polymers*, 149, 104517.
- Ren, L., Yan, X., Zhou, J., Tong, J., & Su, X. (2017). Influence of chitosan concentration on mechanical and barrier properties of corn starch/chitosan films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 1636-1643.
- Roy, S., Zhai, L., Kim, H. C., Pham, D. H., Alrobei, H., & Kim, J. (2021). Tannic-acid-cross-linked and TiO₂-nanoparticle-reinforced chitosan-based nanocomposite film. *Polymers*, 13(2), 228.
- Russo D, Bonomo MG, Salzano G, Martelli G, Milella L. (2012). Nutraceutical properties of Citrus clementina juices. *Pharmacologyonline*. 1, 84–93.
- Sedaghat, E., Rostami, A. A., Ghaemy, M., & Rostami, A. (2019). Characterization, thermal degradation kinetics, and morphological properties of a graphene oxide/poly (vinyl alcohol)/starch nanocomposite. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 136(2), 759-769.
- Siralertmukul, K., Yuenyaw, N., Watcharamul, S., & Nuisin, R. (2021). Facile Fabrication of Chitosan/Starch Composite Films with Fumed Silica as an Additive. *Engineering Journal*, 25(9), 45-53.
- Sonker, A. K., Rathore, K., Nagarale, R. K., & Verma, V. (2018). Crosslinking of polyvinyl alcohol (PVA) and effect of crosslinker shape (aliphatic and aromatic) thereof. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(5), 1782-1794.
- Torğut, G., Yazdıç, F. C., & Gürler, N. (2022b). Synthesis, characterization, pH-sensitive swelling and antimicrobial activities of chitosan-graft-poly (hydroxyethyl methacrylate) hydrogel composites for biomedical applications. *Polymer Engineering & Science*, 62(8), 2552-2559.
- Vakili, M., Deng, S., Li, T., Wang, W., Wang, W., & Yu, G. (2018). Novel crosslinked chitosan for enhanced adsorption of hexavalent chromium in acidic solution. *Chemical Engineering Journal*, 347, 782-790.
- Wu, H., Lei, Y., Lu, J., Zhu, R., Xiao, D., Jiao, C., ... & Li, M. (2019). Effect of citric acid induced crosslinking on the structure and properties of potato starch/chitosan composite films. *Food Hydrocolloids*, 97, 105208.