

**FARKLI *PRUNELLA* L. TÜRLERİNDEN ELDE EDİLEN
EKSTRAKTLAR İLE KİTOSAN TEMELLİ
YENİLEBİLİR FİLM ELDESİ, KARAKTERİZASYONU
VE ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

İlker ERKEN



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI *PRUNELLA L.* TÜRLERİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLAR İLE
KİTOSAN TEMELLİ YENİLEBİLİR FİLM ELDESİ, KARAKTERİZASYONU
VE ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

İlker ERKEN
0000-0002-6328-2477

Prof. Dr. Saliha ŞAHİN
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA – 2020
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

İlker ERKEN tarafından hazırlanan “FARKLI *PRUNELLA* L. TÜRLERİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLAR İLE KİTOSAN TEMELLİ YENİLEBİLİR FİLM ELDESİ, KARAKTERİZASYONU VE ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Saliha ŞAHİN

Başkan : Prof. Dr. Saliha ŞAHİN
0000-0003-2887-5688
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi,
Kimya Anabilim Dalı
İmza

Üye : Doç. Dr. Elif Tümay ÖZER
0000-0002-5225-0146
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi,
Kimya Anabilim Dalı
İmza

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Adnan Fatih DAĞDELEN
0000-0002-6777-273X
Bursa Teknik Üniversitesi,
Mühendislik Ve Doğa Bilimleri Fakültesi,
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN
Enstitü Müdürü

.././....

B.U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

24/07/2020

İlker ERKEN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI *PRUNELLA* L. TÜRLERİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLAR İLE
KİTOSAN TEMELLİ YENİLEBİLİR FİLM ELDESİ, KARAKTERİZASYONU VE
ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

İlker ERKEN

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Saliha ŞAHİN

Bu çalışmada *Prunella* L. türleri olan *Prunella grandiflora* (PG), *Prunella laciniata* (PL), *Prunella orientalis* (PO) ve *Prunella vulgaris* (PV) ekstraktları yardımıyla hazırlanan kitosan bazlı yenilebilir ve biyobozunur filmlerin üretimi, karakterizasyonu, antioksidan kapasitesi ve antibakteriyel aktivitesi incelenmiştir. Ekstraksiyon için *Prunella* bitkileri %70 (v/v) etanol çözeltisine konularak karıştırıcıda ekstrakte edildi. Filmlerin üretimi için, 1 mL, 5 mL ve 10 mL ekstraktlar, %1 (v/v) glasiyel asetik asit çözeltisi içeren % 1 (w/) kitosan çözeltisi ile karıştırıldı ve gliserol ilave edildikten sonra, çözeltiler kurumaya bırakıldı. Filmlerin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri (çözünürlük, su buharı geçirgenliği, şişme oranı, nem oranı, kalınlık, SEM analizi) belirlenmiş olup, her biri literatürle uyumlu bulunmuştur. HPLC-DAD ile filmlerde fenolik bileşikler (rosmarinik asit, kateşik asit, kafeik asit, rutin ve klorojenik asit) kantitatif olarak tayin edilmiştir. ABTS yöntemi, *Prunella* ekstraktları içeren filmlerin, ekstrakt olmayan filmlerden daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğunu göstermiştir. Filmlerde artan ekstrakt miktarı ile toplam fenolik içerik ve antioksidan özellik artmıştır. Antibakteriyel aktivite sonuçları, bakteri üremesini önleyen ve bunları minimum ekstrakt miktarı ile öldüren 1.0 mL ile 5.0 mL arasında optimum bir ekstrakt miktarının olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, antioksidan kapasite, biyobozunur film, gıda paketleme, kitosan film.

2020, ix + 64 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

CHITOSAN BASED EDIBLE FILM OBTAINED WITH EXTRACTS OBTAINED FROM DIFFERENT *PRUNELLA* L. SPECIES, CHARACTERIZATION AND THEIR ANTIOXIDANT PROPERTIES

İlker ERKEN

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Saliha ŞAHİN

Production, characterization, antioxidant capacity and antibacterial activity of chitosan-based edible and biodegradable films, prepared with the help of the extracts of *Prunella* L. species those are *Prunella grandiflora* (PG), *Prunella laciniata* (PL), *Prunella orientalis* (PO) and *Prunella vulgaris* (PV), were examined in this study. As an extraction, *Prunella* plants were put into 70% ethanol solution and left for extraction to happen in agitator. For the production of films, 1 mL, 5 mL and 10 mL of extracts were mixed with 1% (w/v) chitosan solution incorporating 1% (v/v) glacial acetic acid solution and after the addition of glycerol, solutions were waited to dry and form the films. Some of the physical and chemical properties of the films (solubility, water vapor permeability, swelling ratio, moisture ratio, thickness, SEM analysis) were determined and each one of them was consistent with the literature. HPLC-DAD had proved that the phenolic compounds (rosmarinik acid, catequic acid, caffeic acid, rutin and chlorogenic acid) exist in the films; and ABTS method showed that the films containing *Prunella* extracts have higher antioxidant activities than the films without extract. With the increasing extract amount in the films, total phenolic content and antioxidant property increased. Antibacterial activity results showed that there is an optimum extract amount between 1.0 mL and 5.0 mL that prevents bacteria reproductivity and kills them with mininum extract amount.

Keywords: Antibacterial activity, antioxidant capacity, biodegradable film, chitosan film, food packaging.

2020, ix + 64 pages.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bana her zaman güler yüzlü ve samimi davranan, benden umudunu hiç kesmeyen, öğrencisi olmaktan onur duyduğum saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Saliha ŞAHİN'e,

Her zaman yanımda olan ve kalan ömrümde de yanımda olacağına inandığım, çalışma süresince bütün zorlukları benimle birlikte göğüsleyen hayat arkadaşım sevgili eşim Fatma ERKEN'e,

Laboratuvar ortamında birlikte çalıştığımız, bana her zaman samimi davranan ve yardım eden değerli arkadaşım Büşra KARKAR'a

Bana her zaman inanan maddi ve manevi destek olan ve zor zamanlarımda gözüm kapalı güvенеbileceğim canım kardeşim Sena ERKEN'e, sevgili annem Meltem ERKEN'e ve sevgili babam Ramazan ERKEN'e,

Öneri ve yardımlarını benden hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocalarım Doç.Dr. ELİF TÜMAY ÖZER'e, Prof. Dr. Belgin İZGİ'ye ve Dr. Önder AYBASTIER'e

Teşekkürlerimi sunarım.

İlker ERKEN
24/07/2020

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Ambalajlar.....	3
2.2. Biyobozunur Malzemeler.....	4
2.3. Aktif Paketleme	5
2.4. Yenilebilir Filmler ve Katkı Maddeleri	6
2.5. Kitosan	7
2.6. <i>Prunella L.</i>	11
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	13
3.1. Materyal	13
3.1.1. <i>Prunella L.</i> Türleri.....	13
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	16
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Aletler	16
3.1.4. Çalışmada Hazırlanmış Olan Çözeltiler.....	17
3.2. Yöntem.....	18
3.2.1. Bitkilerin Ekstraksiyonu	18
3.2.2. Kitosan Filmlerin Hazırlanması	19
3.2.3. Antioksidan Kapasite Tayini.....	19
3.2.4. Toplam Fenolik Madde Tayini	20
3.2.5. Çözünürlük.....	20
3.2.7. Şişme Oranı.....	21
3.2.8. Nem Oranı.....	21
3.2.9. Kalınlık Ölçümü.....	22
3.2.10. Fenolik Maddelerin HPLC-DAD ile Tayini	22
3.2.11. FT-IR analizi	22
3.2.12. SEM analizi.....	22
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	24
4.1. ABTS Yöntemi ile Antioksidan Kapasite Tayini	25
4.2. Folin-Ciocalteu Yöntemi ile Toplam Fenolik Madde Tayini	26
4.3. Çözünürlük.....	28
4.4. Su Buharı Geçirgenliği.....	29
4.5. Şişme Oranı	30
4.6. Nem İçeriği.....	31
4.7. Kalınlık.....	32
4.8. SEM Sonuçları	33
4.9. <i>Prunella L.</i> Türlerinde Bulunan Fenolik Maddelerin Tayini.....	38
4.10. FT-IR sonuçları	43
4.11. Antibakteriyel aktivite sonuçları	45
5. SONUÇ	48

KAYNAKLAR	50
EKLER.....	56
EK 1. <i>Prunella</i> türlerinin 1 mL, 5 mL, ve 10 mL ekstraktları ile hazırlanmış filmlerin ve rosmarinik asidin FTIR spektrumları (spektrumların altındaki filmleri temsil eden kısaltmalar tezin kısaltmalar kısmında belirtilmiştir)	56
EK 2.ANOVA istatistiksel analiz sonuçları (a-l arası örnekler arasındaki farklı gruplandırmayı, A-C arası da yöntemler arası farklı gruplandırmayı temsil etmektedir, P<0,05) 63	
ÖZGEÇMİŞ	64

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
A	Absorbans
dk	Dakika
sn	Saniye
C	Derişim
R ²	Korelasyon katsayısı
L	Litre
mL	Mililitre
m	Metre
µm	Mikrometre
km	Kilometre
µm	Mikrometre
g	Gram
mg	Miligram
°C	Santigrat derece
Pa	Pascal
(w/w, %)	100 g kütlerdeki çözeltiliye kütlece yüzde
(w/v, %)	100 mL hacimdeki çözeltiliye kütlece yüzde
(v/v, %)	100 mL hacimdeki çözeltiliye hacimce yüzde
>>	ölçülemeyecek kayda alınmayacak kadar büyük

Kısaltmalar	Açıklama
DAD	Diyot Dizinli Dedektör
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
UV-VIS	Ultraviyole-Görünür bölge
FTIR	Fourier Transformation Infrared (Fourier transformlu kızılötesi)
SEM	Scanning Electron Microscopy (Taramalı Elektron Mikroskobu)
TE	Trolox Equivalent (Troloks eşdeğeri)
wvp	Water Vapor Permeability (Su buharı geçirgenliği)
PV1	1,0 mL <i>Prunella vulgaris</i> ekstraktı katılmış film
PV5	5,0 mL <i>Prunella vulgaris</i> ekstraktı katılmış film
GE	Galic acid Equivalent (Gallik asit eşdeğeri)
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ASTM	American Society for Testing Materials
ATCC	American Type Culture Collection
HIV	Human Immunodeficiency Virus
PG1	1,0 mL <i>Prunella grandiflora</i> ekstraktı katılmış film
PG5	5,0 mL <i>Prunella grandiflora</i> ekstraktı katılmış film
PG10	10 mL <i>Prunella grandiflora</i> ekstraktı katılmış film
PL1	1,0 mL <i>Prunella laciniata</i> ekstraktı katılmış film
PL5	5,0 mL <i>Prunella laciniata</i> ekstraktı katılmış film
PL10	10 mL <i>Prunella laciniata</i> ekstraktı katılmış film

PO1	1,0 mL <i>Prunella orientalis</i> ekstraktı katılmış film
PO5	5,0 mL <i>Prunella orientalis</i> ekstraktı katılmış film
PO10	10 mL <i>Prunella orientalis</i> ekstraktı katılmış film
PV1	1,0 mL <i>Prunella vulgaris</i> ekstraktı katılmış film
PV5	5,0 mL <i>Prunella vulgaris</i> ekstraktı katılmış film
PV10	10 mL <i>Prunella vulgaris</i> ekstraktı katılmış film
TEAK	Troloks eşdeğer antioksidan kapasite

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Kitin ve kitosanın moleküler formülü (Harish Prashanth ve Tharanathan 2007)	8
Şekil 3.1. <i>Prunella vulgaris</i> L. (Şahin 2011)	13
Şekil 3.2. <i>Prunella laciniata</i> (L.) L. (Şahin 2011)	14
Şekil 3.3. <i>Prunella orientalis</i> Bornm. (Şahin 2011)	14
Şekil 3.4. <i>Prunella grandiflora</i> L. (Şahin 2011)	15
Şekil 3.5. <i>Prunella</i> türlerinin ekstraksiyonu	18
Şekil 3.6. Kitosan- <i>Prunella</i> filmlerin hazırlanışı	19
Şekil 4.1. <i>Prunella grandiflora</i> (PG), <i>Prunella laciniata</i> (PL), <i>Prunella orientalis</i> (PO), <i>Prunella vulgaris</i> (PV) ekstraktlarından 1 mL, 5 mL ve 10 mL eklenmiş kitosan film ve eklenmemiş (kör/blind) film örneklerinin fotoğrafları.....	24
Şekil 4.2. <i>Prunella</i> L. türlerinin 280nm dalgaboyundaki (1) protokatekuik asit (t _r :11,8 dk), (2) klorojenik asit (t _r :15,8 dk) , (3) kafeik asit (t _r :20,2 dk), (4) rutin (t _r :22,3 dk) ve (5) rosmarinik asit (t _r :25,4) piklerini gösteren kromatogram.....	39
Şekil 4.3. A: Kafeik asit, B: Klorojenik asit (Tomac ve Šeruga 2016).....	40
Şekil 4.4. Rutin molekülü (Gullón ve ark. 2017).....	41
Şekil 4.5. Rosmarinik asit (Gil ve ark. 2013).....	41
Şekil 4.6. Protokatekuik asit	42
Şekil 4.7. Film örneklerinin FTIR spektrum pikleri	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler	16
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan aletler.....	16
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan aletler (devam)	17
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan hazırlanmış çözeltiler	17
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan hazırlanmış çözeltiler (devam).....	18
Çizelge 3.4. HPLC-DAD için analiz çalışma koşulları.....	22
Çizelge 4.1. ABTS yöntemi için kalibrasyon bilgileri.....	25
Çizelge 4.2. Film örneklerinin antioksidan kapasite değerleri.....	25
Çizelge 4.3. Folin-Ciocalteu yöntemi için kalibrasyon bilgileri	27
Çizelge 4.4. Film örneklerinin toplam fenolik madde değerleri	27
Çizelge 4.5. Film örneklerinin suda çözünürlük değerleri.....	28
Çizelge 4.6. Film örneklerinin su buharı geçirgenlikleri	29
Çizelge 4.7. Film örneklerinin yüzde şişme oranları	31
Çizelge 4.8. Film örneklerinin yüzde nem oranları.....	32
Çizelge 4.9. Film örneklerinin kalınlık değerleri	33
Çizelge 4.10. Kitosan filmlerin eklenen ekstrakt hacmine göre değişen SEM görüntüleri	34
Çizelge 4.10. Kitosan filmlerin eklenen ekstrakt hacmine göre değişen SEM görüntüleri (devam)	35
Çizelge 4.10. Kitosan filmlerin eklenen ekstrakt hacmine göre değişen SEM görüntüleri (devam)	36
Çizelge 4.10. Kitosan filmlerin eklenen ekstrakt hacmine göre değişen SEM görüntüleri (devam)	37
Çizelge 4.10. Kitosan filmlerin eklenen ekstrakt hacmine göre değişen SEM görüntüleri (devam)	38
Çizelge 4.11. Standart fenolik maddeler için HPLC-DAD kalibrasyon grafikleri	38
Çizelge 4.12. <i>Prunella</i> L. türlerinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları (mg/g örnek)	39
Çizelge 4.13. Standart fenolik maddeler için TEAK (troloks eşdeğer antioksidan kapasite) değerleri (Işık ve ark. 2013).....	43
Çizelge 4.14. <i>Escherichia coli</i> bakterisinin 1/100 ve 1/1000 seyreltme oranında kontrol, kitosan film, PG10 (10 mL <i>Prunella grandiflora</i> ekstraktı eklenmiş film) ve kontrol, PG1 (1,0 mL <i>Prunella grandiflora</i> ekstraktı eklenmiş film) ve PG5 (5,0 mL <i>Prunella grandiflora</i> ekstraktı eklenmiş film) örneklerinin üzerinde 24 saat içindeki çoğalan hücre sayısı (Burada kontrol-1, kitosan film, PG-10 aynı zamanda, kontrol-2, PG5, PG1 farklı zamanda yapıldığı için iki tane kontrol grubu bulunmaktadır)	45
Çizelge 4.15. <i>Escherichia coli</i> ve <i>Staphylococcus aerus</i> bakterisinin 1/100 ve 1/1000 seyreltme oranında kontrol, kitosan film, PG1 (1,0 mL <i>Prunella grandiflora</i> ekstraktı eklenmiş film), PO1 (1,0 mL <i>Prunella orientalis</i> ekstraktı eklenmiş film), PL1 (1,0 mL <i>Prunella laciniata</i> ekstraktı eklenmiş film) ve PV1 (1,0 mL <i>Prunella vulgaris</i> ekstraktı eklenmiş film) örneklerinin üzerinde 24 saat içindeki çoğalan bakteri sayısı.	46

1. GİRİŞ

Gıda ürünlerinin çeşitliliklerinin ve kalitelerinin artmasıyla beraber tüketicilerin tercihlerinde seçici davranışları da artmaktadır ve bu seçiciliği kalitelerin sağlık ve fiyat dengesine göre yapmakta oldukları bir gerçektir. Satın alınan ürünlerin sağlıklı olmasına ve hijyenik şartlarda üretilmiş olup olmamasına dikkat edilmektedir. Güvenli gıda, fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri itibarıyla tüketime uygun ve besin değerini kaybetmemiş gıda maddesi olarak tanımlanmaktadır. Güvenli gıda hem ülke açısından, hem de küresel boyutta diğer ülke üretici ve tüketicileri için sosyal, ekonomik ve çevresel önem taşımaktadır. Güvenli gıdaların tercih edilme etkenlerine baktığımızda ürünlerin ambalajları, gıdaların tüketiciler tarafından tercih edilmesinde önemli bir parametre olarak karşımıza çıkmaktadır. Ambalaj teknolojisindeki gelişmelere paralel olarak çok farklı özelliklere sahip çeşitli ambalaj materyalleri kullanılmaya başlanmıştır. Gıda endüstrisinde cam, kağıt, karton, mukavva, alüminyum, çeşitli plastikler ambalaj materyali olarak kullanılabilir. Bu materyallerin hepsi sahip oldukları özellikler doğrultusunda az veya çok oranda gıdaya kimyasal madde geçişine (migrasyon) neden olmaktadır.

Uzun yıllar boyunca, özellikle plastik ambalaj ve paketlerde, çevreye zarar vermeden toprakta dönüşebilen polimerler, maliyetinden ve özel üretim tekniklerine ihtiyaç duyulmasından ötürü kullanılmamıştır. Buna bağlı olarak da son zamanlarda, özellikle sivil toplum kuruluşlarının ciddi mücadelesiyle geri dönüşümlü ambalaj üretimi her alanda teşvik edilmektedir.

Doğada uzun yıllar yok olmayan polietilen ve polipropilen yerine bakteri, mantar ve algler gibi mikro-organizmaların enzimatik hareketleri ile çözünebilen, geri dönüşümlü polimerlerin kullanılması biyobozunur paketleme teknolojisinin yaygınlaşmasını ve tüketicilerin tercihlerinde önemli yer edinmeye başlamasını sağlamıştır. Günümüzde, yenilenebilir, biyoparçalanabilir, biyoyumlu ve doğa dostu plastiklerin bakterilerde sentezi ve polimer kimyasındaki uygulamaları sonucu biyoplastiklere olan ilgi her geçen gün artmaktadır ve bu konuyla ilgili daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Yenilebilir bir biyopolimer olan kitosan, selülozla birlikte doğada en çok bulunan biyopolimerlerden birisi olarak bilinmektedir. Doğal polisakkarit olan kitinin kısmi deasetilasyonu ile elde edilmektedir. Biyobozunur, biyoyumlu ve non-toksik özelliklere sahip kitosanın tıp, ilaç, kozmetik, tarım, kağıt, tekstil ve gıda sanayi gibi çeşitli alanlarda kullanımı bulunmaktadır. Kitosan nem adsorbe etme, çöktürme, film oluşturma, antimikrobiyal etki, enzim immobilizasyonu gibi birçok fonksiyonlara sahiptir. Kitosan bitkisel diyet liflere benzer şekilde sindirim enzimleri tarafından hidrolize edilememektedir, bağırsak hareketlerini ve bağırsak mikroflorasını destekleyici, sindirim faaliyetlerini düzenleyici etki göstermektedir. Bu sayede kan kolesterol seviyesinin düzenlenmesi, kan basıncının düşürülmesi ve karaciğer fonksiyonlarının düzenlenmesine yardımcı olmaktadır. Kitosan anti bakteriyel özelliğe sahip olup bu etki kitosanın molekül ağırlığına ve bakteri türüne göre değişmektedir. Bununla birlikte kitosan özellikle gram pozitif bakterilere karşı daha fazla anti bakteriyel özellik göstermektedir.

Bu tez kapsamında farklı *Prunella* L. türlerinden [*Prunella grandiflora* (PG), *Prunella laciniata* (PL), *Prunella orientalis* (PO) ve *Prunella vulgaris* (PV)] elde edilen ekstraktlar ile kitosan temelli yenilebilir film eldesi, karakterizasyonu ve antioksidan özelliklerinin belirlenmesi yapılmıştır. Elde edilen filmlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri literatürle uyumlu bulunmuş olup filmlerin gıda ambalaj sanayi için hedef bir ürün olabileceği sonucuna varılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Ambalajlar

Günümüzde ambalaj, bir iletişim aracı olarak ürünün önemli boyutunu oluşturmaktadır. Doğru yerde doğru zamanda yapılan optimum şartlarda yapılan bir ambalajlama şekli, satışları ve karlılığı önemli ölçüde artırırken kötü bir ambalajlama da iyi bir ürünün başarısına ciddi bir engel oluşturabilir. Ürünlerin kaliteleri, raf ömürleri ve güvenlikleri anlamında ambalajın tarifini yapmak istersek ambalaj ürünün hava, ısı, ışık, kimyasal etki, mikroorganizma ve darbe gibi çevresel etkilerden korunmasını sağlayan sargı ya da kaplardır.

Ürünlerin korunması, performansının artırılması ve bilgi verme gibi işlevleri yerine getirmek dışında ambalajların başlıca görevlerini aşağıdaki gibi sıralayabiliriz;

- ✓ Fiziksel koruma, basınç, sıcaklık gibi hava koşulları veya bakteri, mantar gibi mikroorganizmalara karşı korumanın yanında darbe, kopma gibi fiziksel etkenlere karşı da sağlanan korumadır.
- ✓ Bariyer oluşturma, oksijen, su, buhar gibi raf ömrünü kısaltabilen etkenler için gıdaya uygun bir atmosfer oluşturmaya dayanan özelliktir.
- ✓ Bir araya getirme, ürünlerin daha kolay taşınmasını sağlamak adına birçok ürünü yanyana getirmek gibi özellik sağlayan bir işlevdir.
- ✓ Bilgi transferi, ürünün nasıl ve hangi şartlarda kullanılabileceği gibi bilgilerin dışında son kullanma tarihi, ürün bileşenleri gibi tüketiciye verilmesi zorunlu bilgileri de içeren işlevdir.
- ✓ Pazarlama, tüketicinin ürüne yönelmesi için dizayn, renk, kullanışta kolaylık yaratan özellikleri göz önüne çıkarmak gibi pazarlamaya yönelik bilgilere vurgu yapmaya dayanan işlevdir.
- ✓ Güvenlik, ürünün herhangi bir şekilde açılıp açılmadığı, otantik olup olmadığı, orijinallik garantisi ve geriye dönük üretimi ve tedarik zinciri, ambalajı üzerinden takip edilebilmesini sağlayan ve genelde bunun barkod gibi ürüne spesifik kodlarla yapılmasına dayanan işlevdir.

- ✓ Porsiyon kontrolü, ürünün ne kadarının kullanılabilceğine dair bilgiler ile birlikte bu kullanılacak miktara göre ürünün ayarlanmasıdır.

Bu çalışmada üretilen film ambalajlarının odağı gıda sektöründe kullanım olduğundan dolayı gıda ambalajlarına da değinmemiz gerekir. Gıda endüstrisinde ambalaj; kullanıldığı gıdaların ekonomik ve güvenilir biçimde tüketiciye ulaştırılmasını sağlayan, koruma ve dayanıklılık arttırımının yanı sıra ürünün tanıtılmasını da kolaylaştıran ve yükleme, boşaltma, stoklama açısından kullanım kolaylığı sağlayan bir malzemedir (Kılınç ve ark. 2017). Ambalaj teknolojisindeki gelişmelere paralel olarak çok farklı özelliklere sahip çeşitli ambalaj materyalleri kullanılmaya başlanmıştır. Gıda endüstrisinde cam, kağıt (karton, mukavva), metal (teneke, alüminyum) ve çeşitli plastikler ambalaj materyali olarak kullanılabilir. Bu materyallerin hepsi sahip oldukları özellikler doğrultusunda az veya çok oranda gıdaya kimyasal madde geçişine (migrasyon) neden olmaktadır. Akıllı ambalajlama sistemleri gıdanın raf ömrü boyunca iç ve dış durumunu gösterebilen diğer bir deyişle ürün kalitesi ile iletişim kurabilen ambalajlama sistemleridir.

1935/2004/EC yönetmeliği ve daha spesifik olan 450/2009/EC yönetmeliği ile birlikte Türk Gıda Kodeksi Gıda ile Temas Eden Madde ve Malzemeler Yönetmeliği 29.12.2018/28157 aktif ve akıllı ambalajların doğru kullanımı, güvenliği ve pazarlanmasına yönelik düzenlenen yönetmelikleri oluşturmaktadır (EC 2004, EC 2009, TGK 2018).

2.2. Biyobozunur Malzemeler

Biyobozunur film teknolojisinin gıda anlamında kullanılabilirliği çok büyük bir ölçüde biyobozunur polimer bilimine ve polimer malzeme bilimine dayanmaktadır. American Society for Testing Materials (ASTM) tarafından yapılan tanıma göre, biyobozunur polimerler, doğada bulunan bakteri, mantar, alg, maya ve diğer mikroorganizmaların etkisi ile çözünebilen polimerlere denir (Hazer 2011).

Gıda ambalajlamada en fazla kullanılan malzemelerden biri olan plastikler çoğunlukla petrol türevli malzemelerden üretilmekte ve bu malzemelerin çevre kirliliğine neden olduğu bilinmektedir (Davis ve Song 2006). Petrol ürünlerinin kullanımı sadece çevre kirliliği olarak dezavantaj yaratmamakta ayrıca fiyat olarak da dünya genelinde petrolün giderek azalmasından dolayı artış görülmektedir ve petrol ürünleri kullanımının azaltılması geleceğe dönük ekonomik olarak büyük önem taşımaktadır. 2015 yılında dünya genelinde 322 milyon ton plastik üretilmiştir ve bu plastiklerin sadece %1 lik kısmı biyobozunur plastiklerden oluşmaktadır (Gupta ve ark. 2019). Toplam plastik üretimi giderek artmakta ve 2018 yılında dünya çapında 360 milyon ton, Avrupa genelinde ise 62 milyon ton olarak belirlenmektedir. Ancak buna karşın üretilen biyobozunur plastiklerin yüzdesi yeteri kadar artmamaktadır ve bu durumun ilerleyen yıllarda oldukça ciddi sıkıntılar yaratacağı düşünülmektedir. Avrupa’da birçok ülkede 2019 itibari ile gerek yasa gerek ise kamu spotu yoluyla geri dönüşebilir ve biyobozunur malzemelerin kullanımı arttırılmaya çalışılmaktadır (Plastics Europe ve Conversio Market & Strategy GmbH 2019).

Gıda endüstrisinde en çok kullanılan biyobozunur malzemelerin başında nişasta, selüloz türevleri, polihidroksialkonatlar, polilaktik asit, poli- β -hidroksi bütirat, polikaprolakton, polivinilalkol ve kitosan gibi malzemeler bulunmaktadır. Bu çeşit doğal ve sentetik polimerler doğa ile buluştuğunda organizmalar tarafından zararsız ve çevre dostu küçük molekül olan karbondioksit ve suya dönüştürülmektedir. Bunun dışında yaygın olarak kullanılan polimerlere mangan stearat gibi pro oksidan inorganik katkı maddeleri karıştırılarak üretilen biyobozunur malzemelerin daha ileri oksidasyonla aldehit, keton, karboksilli asit gibi küçük moleküllere parçalandığı ve bu polimerlere biyobozunur özellik kattığı da bilinmektedir (Hazer 2011).

2.3. Aktif Paketleme

29.12.2011 tarihli ve 28157 üçüncü mükerrer sayılı Resmî Gazete’de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi yönetmeliği ve Türk Gıda Kodeksi Gıda ile Temas Eden Madde ve Malzemelere Dair Yönetmeliğine göre aktif madde veya malzeme bileşenleri şu şekilde tanımlanmıştır: gıdaya ya da gıdanın bulunduğu ortama salacak ya da ambalajlı gıdadan

veya gıdanın bulunduğu ortamdan maddeleri absorbe edecek şekilde tasarlanan, ambalajlı gıdanın raf ömrünü uzatması veya mevcut durumunu koruması ya da iyileştirmesi beklenen madde ve malzemedir. Aktif kelimesi ambalajın ürüne gelebilecek etkiye kimyasal tepki vermeye hazır olmasını temsil etmektedir. Reaksiyon vermeye hazır aktif ambalaj malzemeleri ambalajların üzerine, içine, yüzeyine veya belirli kısımlarına uygulanır ve ürünle temas edebilecek maddelerle etkileşime girerek ürünün raf ömrünü uzatır. Doğal antioksidanları içeren aktif antioksidan ambalajın kullanılması önemli avantajlar sunmaktadır. Pakete doğal bir antioksidan eklenmesi, plastikte sentetik antioksidan kullanma ihtiyacını azaltarak göç yoluyla potansiyel toksisite riskini azaltabilir. Bazı çalışmalar, polifenolik bileşiklerin, ambalaj içeriğinin korunmasında sentetik antioksidanların yerini alabileceğini kanıtlamıştır (Hurley ve ark. 2013, López-De-Dicastillo ve ark. 2010, Portugal Zegarra ve ark. 2018). Bitkilerde yaygın olarak bulunan karvakrol, timol veya sesamol gibi birçok fenolik bileşiğin, antioksidan aktivite dahil olmak üzere çoklu biyolojik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Hurley ve ark. 2013, Konsoula ve Liakopoulou-Kyriakides 2010, Şahin ve ark. 2011, Viuda-Martos ve ark. 2009). Bu çalışmada da fenolik maddelerin biyolojik etkilerinin film örneklerine geçirilmesi ve bu etkilerin ölçülmesi planlanmıştır. Gıda ambalajı için bir hidrofilik film kullanıldığında veya yüksek bağıl nem koşullarına maruz kaldığında, su molekülleri polimerik zincirler üzerine adsorbe edilir, film yapısı üzerinde plastikleştirici bir etki yapar ve termal, mekanik ve bariyer özelliklerinde değişikliklere neden olur. Plastikleşme, polimer zincirleri ve adsorbe edilmiş su molekülleri arasındaki etkileşimin derecesine bağlıdır. Plastikleştiriciler polimer zincirleri arasındaki etkileşim kuvvetlerini azaltır, moleküler mobilitiyi artırır, film esnekliğini artırır, gaz geçirgenliğini değiştirir (Kurek ve ark. 2014). Su molekülleri, yapısal matrisin moleküler hareketliliğini etkileyen hidrofilik malzemelerin evrensel plastikleştiricileri olarak kabul edilirler (Lukasik ve Ludescher 2006).

2.4. Yenilebilir Filmler ve Katkı Maddeleri

Antioksidan ve antimikrobiyal maddeler, emülsüfyerler, esmerleşmeyi önleyici ajanlar, aroma maddeleri, renklendiriciler ve diğer fonksiyonel maddeler gibi gıda katkılarının film örnekleriyle birleştirilerek kullanılabilirdiğinden bahsetmiştik ve bu tarz

malzemelerin yenilebilir filmlerde de kullanıldığını yapılan çalışmalar göstermiştir (Moratti ve Cabral 2017, Rechia ve ark. 2010).

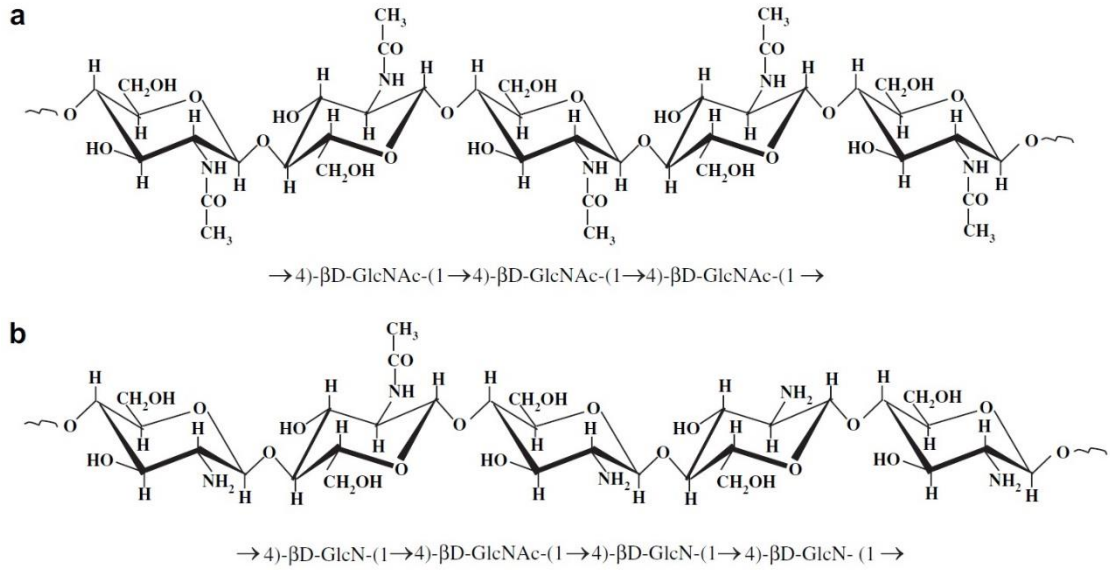
Su ve etanol, yenilebilir film ve kaplama üretiminde kullanılan en yaygın çözücülerdir. Ancak, film veya kaplama maddesi tarımsal bir proteinden üretilcekse, diğer organik çözücüler de kullanılabilir. Yenilebilir film çalışmalarında kullanılan çözücülerin zararlı olmaması ve homojen bir şekilde istenen maddeleri çözmesi önemlidir. Çünkü ambalajda meydana gelebilecek bir faz oluşumu veya maddelerin istenen oranda çözünmemesi ciddi sıkıntılara neden olabilir ve gıdayı koruması için üretilen ambalaj gıdaya daha çok zarar verebilir.

Yenilebilir filmleri oluşturmak için eklenen aktif paketleme katkı maddeleri ve çözücüler sonrasında film oluşturmak için kullanılan plastikleştirici malzemeler de önemlidir. Film ve kaplamalara mekanik özelliklerini geliştirmek amacıyla katılan düşük molekül ağırlıklı bileşiklere plastikleştirici adı verilmektedir. Plastikleştiricilerin görevi intermoleküler güçleri azaltmak, biyopolimer zincirlerinin hareketliliğini artırmak ve böylece filmin mekaniksel özelliklerini geliştirmektir (Ramziia ve ark. 2018). Yenilebilir film ve kaplama üretiminde filmin esneklik ve sağlamlığını geliştirmek amacıyla glukoz, fruktoz-glukoz şurupları ve sukroz gibi mono, di veya oligosakkaritler; gliserol, sorbitol, gliserol türevleri, polietilen glikoller gibi polioller; fosfolipitler ve yağ asitleri gibi lipit ve türevleri de plastikleştirici olarak kullanılmaktadır.

2.5. Kitosan

Kitosan bu çalışmada ambalajları modifiye etmek için kullanılan yenilebilir katkı maddesidir. Kitosan, glukozamin ve β - (1 \rightarrow 4) glikozidik bağlarla bağlanan N-asetil glukosamin birimlerinden oluşan, doğrusal ve emikristalin bir polisakkarit olan kitinin N-deasetillenmiş türevidir (Rinaudo 2006). Glukozamin ünitelerinin fraksiyonu % 50'den fazla olduğunda, polimere yaygın olarak kitosan denir ve glukozamin ünitelerinin sayısına deasetilasyon derecesi denir. Kitin ise N-asetil glukozamin birimlerinin % 50'den fazla olduğu ve asetamido grubu sayısının asetilasyon derecesi

olarak adlandırıldığı terimdir. Biyobozunur, biyoyumlu ve non-toksik özelliklere sahip kitosanın tıp, ilaç, kozmetik, tarım, kağıt, tekstil ve gıda sanayi gibi çeşitli alanlarda kullanımı bulunmaktadır. Nem adsorbe etme, çöktürme, film oluşturma, antimikrobiyal etki, enzim immobilizasyonu gibi birçok fonksiyonlara sahiptir. Kitosan, kristalli formunda pH 7'nin üzerindeki sulu çözelti içinde çözünmez. Bununla birlikte, seyreltik asitlerde (pH <6), glukozamin üzerindeki protonlu serbest amino grupları polimerik molekülün çözünürlüğünü kolaylaştırır (Madhally ve Matthew 1999). Asidik ortamda, polisakkarit bir polielektrolite dönüştürülür. Bir polielektrolit, pozitif veya negatif yüklü iyonlaşabilir gruplar taşıyan bir polimerdir. Çözündürme, $-NH_2$ grubunun d-glukozamin tekrar biriminin C-2 pozisyonunda protonlanması ile gerçekleşir. Bu nedenle bu çalışmada yapılan deneylerde hem yenilebilir katkı maddesi hem de kitosan için uygun bir çözücü olmasından dolayı etanol kullanılmıştır. Kitosan, yılda 10 gigatonun (1×10^{13}) üzerinde bulunabilirlik açısından selülozdan sonra en bol bulunan ikinci doğal biyopolimerdir (Harish Prashanth ve Tharanathan 2007).



Şekil. 2.1. Kitin ve kitosanın moleküler formülü (Harish Prashanth ve Tharanathan 2007)

Kitosan, işlem koşullarına ve kalan pigment seviyelerine bağlı olarak beyaz ila açık kırmızı katı bir tozdur. Fizyolojik fonksiyonları arasında kolesterolün düşürülmesi, yüksek tansiyonun düşürülmesi, yağ emiliminin engellenmesi ve bağırsak

mikroflorasının/ortamının iyileştirilmesi bulunmaktadır. Güvenilir olması nedeniyle gıda ve gıda katkı maddelerine uzun zamandır dahil edilmiştir (Zou ve ark. 2016).

Kitosanın kimyasal yapısı, kitosan içeren malzemelerin biyolojik ve mekanik özelliklerinin kapsamlı bir şekilde ayarlanmasını sağlayan kovalent ve iyonik modifikasyonlar için birçok olasılık sağlar. Bitki liflerinin aksine, kitosan, negatif yüklü yağlar, lipitler, proteinler, kolesterol, makromoleküller ve metal iyonları ile kimyasal olarak bağlanma yeteneği veren pozitif iyonik yüklere sahiptir. Kitosan ve basit aldehidlerin birleştirilmesi hidrojenasyon üzerine N-alkil kitosan üretir. Yoğun substituent varlığı, kitosan zincirleri arasındaki hidrojen bağlarını zayıflatır. Bu nedenle, N-alkil kitosan, alkil zincirlerinin hidrofobikliğine rağmen suda şişer. N-alkil kitosan, kitosanın film oluşturucu özelliğini korur (Vunain ve ark. 2017). Kitosandaki C-2 pozisyonlarındaki amino gruplarının varlığı, kitin ile karşılaştırıldığında onu çok yönlü hale getirir. Kitosanın bazı kimyasal ve biyolojik özellikleri (Madhally ve Matthew 1999) ayrıca açıklanmaktadır. Kitosan moleküllerinde $-OH$ ve $-NH_2$ grupları gibi bazı işlevlerin varlığı, diğer polimerler ve biyolojik moleküller ile etkileşim için bir temel sağlar. Aktif paket oluşumu sektöründe de kullanımının giderek artması bu kimyasal özelliklerinin yenilebilir film teknolojisine oldukça uygun olmasından kaynaklanmaktadır.

Kitosanın geniş uygulamalarına rağmen, kullanımı organik çözücüler hariç nötr veya yüksek pH'ta çoğu çözücüde zayıf çözünürlüğü ile sınırlıdır. Bunun nedeni, moleküller arası hidrojen bağı, H-atomu donörleri, katı fiziksel özellikler ve yüksek kırılma katsayısı nedeniyle düşük antioksidan molekül konsantrasyonudur (Aljawish ve ark. 2015). Bu kısıtlamayı gidermek için, kimyasal veya enzimatik yöntemlerle kitosan işlevselleşmesi üzerine araştırmalar yapılmıştır. Literatür araştırması kitosanın kimyasal modifikasyonlarının kapsamlı bir şekilde araştırıldığını ortaya koymaktadır. Kitosanı kimyasal olarak değiştirmenin birincil amacı nötr ve temel pH değerlerinde çözünebilir türevler sağlamaktır. Ek olarak, kimyasal modifikasyonlar hidrofobik, katyonik ve anyonik özellikleri, çeşitli fonksiyonel grupların ve ligandların kitosan omurgasına bağlanmasını kontrol eder. Kitosanın kimyasal modifikasyonu, kitosanda bulunan birincil hidroksil, ikincil hidroksil ve amino fonksiyonel gruplar gibi uygun fonksiyonel

gruplar nedeniyle mümkündür (Mourya ve Inamdar 2008). Bu çalışmada kullanılan ekstraktlarında içinde bulunan fenolik maddelerin kitosan filme bağlanılacağı düşünülmesi bu yüzdendir. Kitosanın kimyasal modifikasyonunun, elektrostatik yük ve polimer ağının geçirgenliği gibi fizikokimyasal özellikleri değiştirdiği bilinmektedir. Ancak kitosan polimer zincirinin temel omurgasını değiştirmeyecektir yani eklenmiş olan bir plastikleştirici madde kitosanın yapısını bozmazken fenolik maddelerle oluşturduğu bağa kaydadeğer bir etki etmeyecektir ki zaten antioksidanların aktif paketleme çalışmalarında en etkili modifikasyonlardan biri olması bu yüzdendir. Kimyasal modifikasyonun, filmlerin biyoyumluluğu ve mükemmel fizikokimyasal özellikler gibi yeni ve geliştirilmiş özellikler getirdiğini belirtmek gerekir. Kitosanın kimyasal modifikasyonu, kimyasal bağlantılar veya sentetik biyopolimerlerle harmanlama, farklı fiziksel veya kimyasal reaktiflerle çapraz bağlama, radyasyon, fotokimyasal, alkilleme reaksiyonları yoluyla plazma kaynaklı hidrofobikleştirme, mikro veya nanosferlerin biyoyumlu sentetik polimerlerle yüzey kaplaması ile gerçekleşir (D'Ayala ve ark. 2008).

Kitosanın ticari olarak kullanılması, dünyadaki çeşitli deniz organizmalarından toplu ve muntazam olarak tekrarlanabilir kitosanların hazırlanmasında zorluklar olduğundan önemli engellerle karşı karşıyadır. Kitosanın türevlendirilmesi ayrıca genel fiyat ve karakter tekdüzeliğindeki olası varyasyonları da arttırmaktadır (K. Mouryaa ve ark. 2010). Bu sınırlamalar, giderek artan uygulamalar, kitosan ve türevlerinin talebi ile sağlanacak araştırma ve teknolojik ilerlemelerle aşılabilir. Biyo-tıbbi alanlarda bir dizi kitosan türevi örneği kullanılmış olmasına rağmen, sadece birkaçı (örneğin, karboksimetillenmiş kitosanlar, trimetillenmiş kitosanlar ve polietilenglikollenmiş kitosanlar) iyi bilinen ve potansiyel olarak karakterize edilmiş bir uygulama profiline ulaşmıştır. Bu nedenle, kitosanın ve türevlerinin biyomedikal uygulamalardaki faydalarından tam olarak yararlanmak için henüz çok daha fazla araştırma yapılmamıştır.

2.6. *Prunella L.*

İngilizcesi 'self heal' Türkçede ise 'yara otu' olarak bilinen bir bitki olan *Prunella L.*, 17. yüzyılda geleneksel Avrupa tıbbında boğaz ağrısını hafifletmek, ateşi azaltmak ve yara iyileşmesini hızlandırmak için kullanılan popüler bir bitkiydi. Çin'de halk tıbbında geleneksel bir ateş düşürücü ilaç olarak kullanılmıştır (Pinkas 1971). Daha yakın zamanlarda, bu bitki ağız ve boğazdaki yaraları tedavi etmek için sıcak su infüzyonu şeklinde ve herpetik keratitin klinik tedavisinde ham bir sulu ekstrakt olarak kullanılmıştır (Ortiz 2010). Bununla birlikte Avrupa'da, *P. vulgaris* şu anda bir tıbbi bitki olarak sınıflandırılmamaktadır. Bu çalışmada kullanılacak *Prunella* türleri ise *Prunella vulgaris*, *Prunella orientalis*, *Prunella laciniata* ve *Prunella grandiflora*dır. Fitokimyasal çalışmalar, *P. vulgaris*'in oleanolik, betulinik, ursolik, 2 α , 3 α -dihidroksiürler-12-en-28-oik ve 2 α , 3 α -ursolik asitler, triterpenoidler, flavonoidler, tanenler ve anyonik polisakkarit prunellini içerdiğini göstermiştir (Xia ve ark. 2015). Rosmarinik asidin bu bitkinin ana fenolik bileşeni olduğunu bulmuşlardır. *Prunella* özütü, polar (sulu) ve organik fraksiyonlara ayrılabilir. Polar fraksiyon biyolojik (esas olarak antiviral) aktivite açısından kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Bu fraksiyonun ana bileşeni olan prunellin, anti-HIV aktivitesi sergiler (Tabba ve ark. 1989).

1950'lerden beri Japonya'daki eski Sovyetler Birliği araştırmacıları ve Çin, *Prunella* bitkilerinin kimyasal bileşenleri üzerinde derinlemesine çalışmalar yapmıştır. Bugüne kadar, bu bitkilerden izole edilen bileşikler esas olarak triterpenoidleri ve bunların saponinlerini, fenolik asitleri, sterolleri ve glikozitlerini, flavonoidleri, organik asitleri, uçucu yağı ve sakkaritleri oluşturmaktadır (Touwaide ve Appetiti 2013). Geleneksel Çin tıbbi teorisi, *P. vulgaris*'in acı ve buruk bir tada sahip olduğunu ve doğada bir antifebril ve görme iyileştirme, detümesans ve yumru dağılımı gibi işlevleri olan bitki olduğunu iddia eder. Modern farmakolojik çalışmalar *Prunella* bitkilerinin antiviral, antibakteriyel, antienflamatuar, immüno-regülatör, anti-oksidatif, anti-tümör, antihipertansif ve hipoglisemik fonksiyonlara sahip olduğunu ortaya koymuştur (Vostálová ve ark. 2010).

Bu çalışmada kullanılan *Prunella* türlerinin filmlere katkı sağladığı özelliklerin temelinde en başta gelen maddelerden biri rosmarinik asittir. Rosmarinik asit eldesi için çeşitli ekstraksiyon yöntemleri uygulandığında hem lipofilik hem de hidrofilik fraksiyonlarda antioksidan maddelerin tespit edildiği çalışmalar mevcuttur (Andrade ve ark. 2018a, Laura ve ark. 2010, Nakatani 2000). Model membranlarda veya hücresel sistemlerde sentetik veya doğal olarak oluşan fenolik bileşikler kullanılarak yapılan çalışmalar, membran stabilize edici etkilere sahip lipofilik bileşikler tarafından membran peroksidatif hasarın önlenebileceğini göstermiştir. Rosmarinik asidin, serbest radikallerin neden olduğu peroksidatif hasara karşı koruyucu rolü, biyolojik aktivitelerinin altında yatan daha karmaşık ve zara bağlı bir mekanizma ile ilişkilendirilebilir ve bu konuda çalışmalar devam etmektedir (Ge ve ark. 2018, Katanić Stanković ve ark. 2020, Luo ve ark. 2020, Moreno ve ark. 2019).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada 4 farklı *Prunella* L. türü bitki örneklerinden modifiye edilmiş kitosan film örnekleri hazırlanmıştır. Bu filmlerin hazırlanmasında ve analizinde kullanılan malzemelerin isimleri, firma isimleri ve ürün kodları ve bitkilerin elde edildiği bölgeler aşağıdaki başlıklarda belirtilmiştir.

3.1.1. *Prunella* L. Türleri

Lamiaceae familyasında yer alan *Prunella* L. türleri (*Prunella vulgaris* L., *Prunella laciniata* (L.) L., *Prunella orientalis* Bornm., ve *Prunella grandiflora* L.) Prof.Dr. Hulusi Malyer ve arkadaşları tarafından 2009 yılında toplanmış ve halen laboratuvarında kurutulup buzdolabında -24°C’de saklanmıştır. Şekil 3.1. (*Prunella vulgaris* L.), 3.2. (*Prunella laciniata* (L.) L.), 3.3. (*Prunella orientalis* Bornm.) ve 3.4.’de (*Prunella grandiflora* L.) *Prunella* türlerinin fotoğrafları gösterilmiştir.



Şekil 3.1. *Prunella vulgaris* L. (Şahin 2011)



Şekil 3.2. *Prunella laciniata* (L.) L. (Şahin 2011)



Şekil 3.3. *Prunella orientalis* Bornm. (Şahin 2011)



Şekil 3.4. *Prunella grandiflora* L. (Şahin 2011)

Prunella laciniata (L.) L., *Prunella vulgaris* L., *Prunella orientalis* Bornm, *Prunella grandiflora* L. türleri Bursa, Balıkesir ve Antalya illerinden toplanmıştır. Toplanan türlerin lokaliteleri şöyledir:

Prunella vulgaris L. :B2 Bursa: Bursa-Keles, 41 km, 40° 01' 16'' N – 29° 07' 15'' E, 774 m, 01.05.2008, A. Tosunoğlu & H. Malyer.

Prunella laciniata L.: B2 Bursa: Çalı – İnegazi köyü, İnegazi kavşağına 200 m, 40° 08' 03'' K – 28° 52' 53'' D, 463 m, 13.05.2009, A. Tosunoğlu & H. Malyer.

Prunella orientalis Bornm.: C3 Antalya: Kemer, Kesmeboğazı – Ovacık, Ovacık köyü girişi, meşe dipleri-dere yatağı, 36° 39' 01'' K – 30° 25' 59'' D, 1116 m, 09.06.2009, A. Tosunoğlu & H. Malyer.

Prunella grandiflora (L.) Scholler : B1 Balıkesir: Edremit, Kazdağı (İda), Kartalçimeni-Karataş tepesi arası, c.1700 m, 24.07.2006, T. Dirmenci (3337) & F.Satıl (E). Edremit, Kazdağı, Kartalçimeni tepesinin kuzey batısı, 1750 m, 28.07.2007, T. Dirmenci (3473) & E. Akçiçek (K).

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Film oluşturmada ve oluşturulan filmlerin analizinde kullanılan kimyasal malzemeler Çizelge 3.1.' de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler

Madde	Firma	Ürün kodu
ABTS	Sigma-Aldrich	A1888
Asetik asit	Merck	100063
Bakır(II) sülfat	Sigma-Aldrich	451657
Etanol	Merck	100983
Folin-Ciocalteu reaktifi	Sigma-Aldrich	F9252
Gallik asit	Sigma-Aldrich	27645
Gliserol	Fluka	49767
Kitosan	Aldrich	419419
Metanol	Merck	106007
Potasyum peroksodisülfat	Sigma-Aldrich	216224
Sodyum hidroksit	Reidel-De Haen	06203
Sodyum karbonat	Sigma-Aldrich	0390V
Sodyum potasyum tartarat	Ensure	A0270088
Troloks	Sigma-Aldrich	238813
Rutin	Sigma	R5143
Rosmarinik asit	Aldrich	536954
Kafeik asit	Sigma	C0625
Klorojenik asit	Acros Organics	100240000
Protokatekuik asit	Supelco	08992

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Aletler

Çizelge 3.2.'de çalışma boyunca kullanılan aletler ve kullanım amaçları belirtilmektedir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan aletler

Alet	Firma-model	Amacı
FTIR	Thermoscientific, Nicolet 6700	Film örneklerinin yapısal analizi

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan aletler (devam)

Alet	Firma-model	Amacı
Hassas terazi	Radwag, AS/220/C/2	Kütle ölçümü
Saf su cihazı	Elga purelab	Saf su temini
Ultrasonik banyo	United, 2.8L	Film örneklerinin hazırlanması
UV-VIS spektrofometre	Cary 50 Conc, Varian	Film örneklerinin toplam fenolik madde ve antioksidan özelliklerinin belirlenmesi
Vortex Karıştırıcı	VM-10, Wisd	Film örneklerinin hazırlanması
HPLC-DAD	Agilent Technologies, 1200 series	Fenolik maddelerin kantitatif tayini
İnkübatör	Memmert, 100-800	Film örneklerinin kurutulması
Manyetik karıştırıcı	MS-MP8, Wisd	Çözelti hazırlama
SEM	Zeiss Evo 40	Film örneklerinin yapısal analizi

3.1.4. Çalışmada Hazırlanmış Olan Çözeltiler

Tez kapsamında hazırlanan çözeltilerin hazırlanışı ve kullanıldığı yöntem Çizelge 3.3.'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan hazırlanmış çözeltiler

Kullanılan yöntem	Çözelti	Hazırlanışı
Toplam fenolik madde	Lowry A	0,1 M NaOH çözeltisi içerisinde %2'lik Na_2CO_3 çözünmesiyle hazırlanmıştır.
	Lowry B	%1'lik $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ içerisinde %5'lik CuSO_4 çözünmesiyle hazırlanmıştır.
	Lowry C	Lowry A ve Lowry B çözeltileri 50:1 oranında karıştırılarak hazırlanmıştır.
	Folin-Ciocalteu çözeltisi	Folin-Ciocalteu reaktifinin distile su ile 1:3 oranında seyreltilmesi ile hazırlanmıştır.
	Gallik asit çözeltisi	0,1 g gallik asit metanol ile çözülerek hacmi balon jode 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

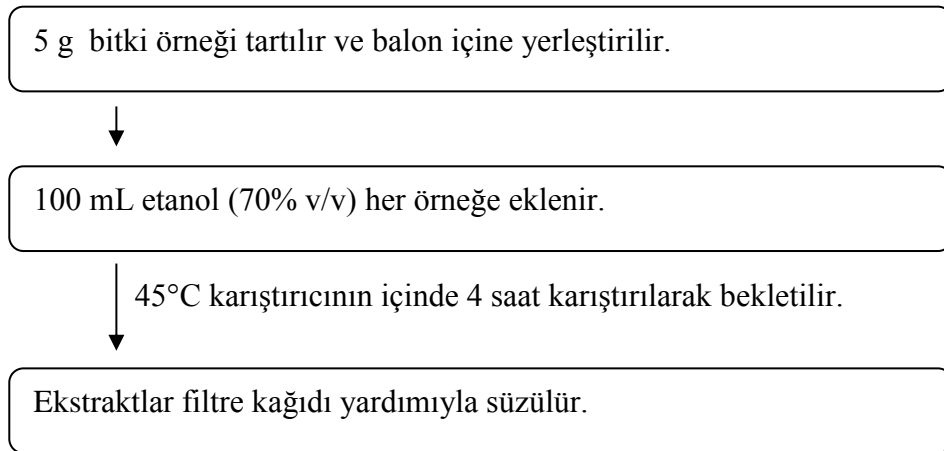
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan hazırlanmış çözeltiler (devam)

Kullanılan yöntem	Çözelti	Hazırlanışı
ABTS	ABTS radikali çözeltisi	2,45 mM $K_2S_2O_8$ su içinde çözülerek 7 mM ABTS eklenmiş ve 24 saat karanlık ortamda bekletilerek hazırlanmıştır.
	Troloks	0,1 g troloks metanol ile çözülerek hacmi balon jode 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Metanol ile 100 mL ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitkilerin Ekstraksiyonu

Bitki örnekleri (*Prunella vulgaris*, *Prunella laciniata*, *Prunella orientalis*, *Prunella grandiflora*) üç tekrarlı olacak şekilde Şekil 3.5.'deki yöntem izlenerek ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon için yapılan ön deneme analizlerinde çözücü olarak saf su denenmiştir. Ancak antioksidan kapasite değerleri düşük bulunmuştur. Literatür çalışmalarında fenolik maddelerin ekstraksiyonu için alkol-su karışımı yüksek oranda tercih edilmektedir (Şahin ve ark. 2019). Ayrıca fenolik maddeler yüksek sıcaklıkta bozunabildikleri için 45°C seçilmiştir.

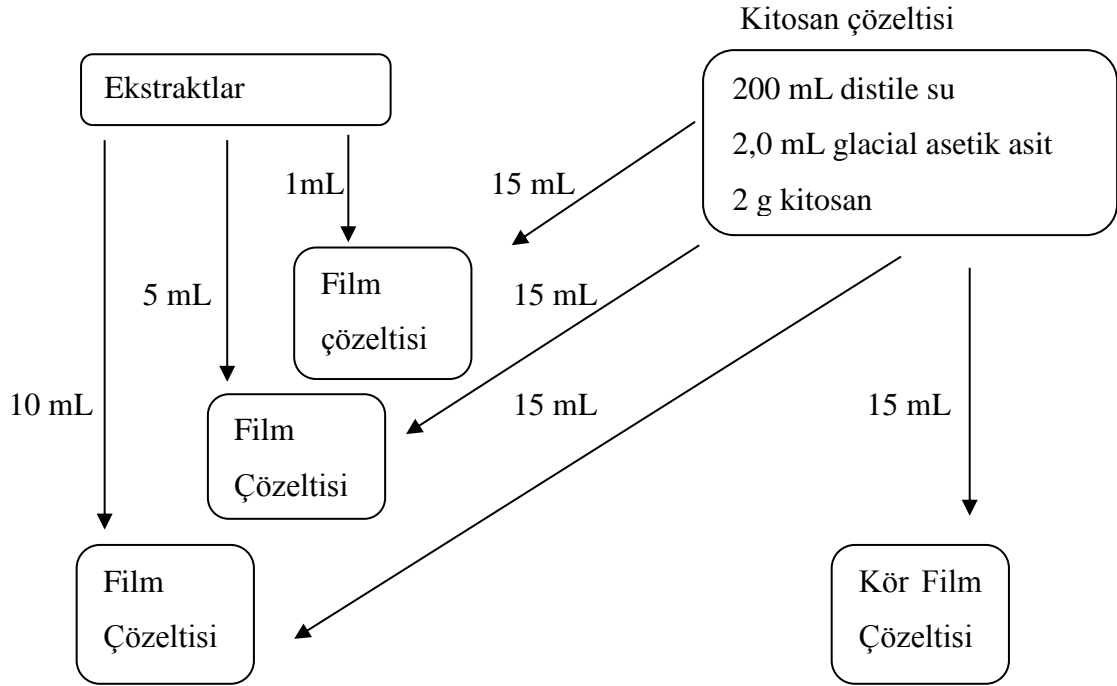


Şekil 3.5. *Prunella* türlerinin ekstraksiyonu

3.2.2. Kitosan Filmlerin Hazırlanması

Ekstraktlardan 25mL'lik beherlere 15 mL kitosan çözeltisi (Şekil 3.6.), ekstrakt ve 0,1 mL gliserol eklendikten sonra, 15 dk karıştırılıp petri kaplarına olabildiğince homojen kalınlık oluşturacak şekilde dökülür ve filmler inkübatörde 40°C'de kurumaya bırakılır. Petri kaplarında 72 saat kurumaya bırakılan filmler kaplardan spatul yardımıyla dikkatlice çıkarılır. Film hazırlama işleminde toplam hacim 25mL olacak şekilde filmler hazırlanır. Toplam hacim sabit olmak üzere; 1mL ekstrakt için behere 9 mL saf su, 5mL ekstrakt için 5 mL saf su eklenmiştir.

Spektroskopik analizlerin yapılması için film örneklerin 100 mg tartılıp 5 mL etanol içinde çözülür. Çözülen kısımdan (Film çözeltisi) alınan örnekler antioksidan kapasite ve toplam fenolik madde tayinleri yapılır.



Şekil 3.6. Kitosan-*Prunella* filmlerin hazırlanışı

3.2.3. Antioksidan Kapasite Tayini

Film örneklerinin antioksidan kapasite özelliklerini belirlemek için antioksidanların ABTS· radikal katyonlarını inhibe etmesi esasına dayanan ABTS yöntemi kullanılmıştır

(Şahin ve ark. 2012, Re ve ark. 1999). Bu yöntemde 0,2 mL film çözeltisi 3,8 mL etanol ile karıştırılır ve ardından 1,0 mL ABTS· eklenerek 6 dk beklenir ($A_{\text{örnek}}$). UV-VIS spektrofometrede 734 nm değerinde örneklerin absorbansları ölçülür. Daha sonra 4,0 mL etanol ile 1,0 mL ABTS· karıştırılıp 6 dk beklenir ($A_{\text{kör}}$). Örneklerin ve standart troluks çözeltilerinin de % inhibisyon değerleri eşitlik 3.1 deki formüle göre belirlenir.

$$\%inhibisyon = \frac{A_{\text{kör}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kör}}} \times 100 \quad (3.1)$$

Daha sonra troluks derişime göre %inhibisyon değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği çizilir. Çizilen grafiğe göre örneklerin antioksidan kapasite değerleri troluks eşdeğeri (TE) olarak belirlenmiştir.

3.2.4. Toplam Fenolik Madde Tayini

Film örneklerinin toplam fenolik madde tayini için Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılmıştır (Singleton ve ark. 1999, Şahin ve ark. 2015).

Bu yöntemde 0,2 mL film çözeltisi ve 1,8 mL distile su, 2,5 mL Lowry C çözeltisi içeren karışıma eklenerek iyice karıştırılır. Karıştırmanın ardından her çözeltiliye 0,25 mL Folin çözeltisi eklenerek tekrar iyice karıştırılır ve 30 dk karanlık ortamda oda sıcaklığında bekletilir. Daha sonra UV-VIS spektrofotometre kullanılarak 750 nm'de absorbans ölçümleri alınan örneklerin; kalibrasyon grafiği için gallik asidin artan derişimlerine sahip çözeltiler standart olarak kullanılmış ve fenolik madde miktarları gallik asit eşdeğeri (GE) olarak belirlenmiştir.

3.2.5. Çözünürlük

Filmlerin sudaki çözünürlüğünü hesaplamak için her film örneği önce tartılıp ayrı ayrı 5 mL suya konur. 24 saat beklenip kurutulur ve tekrar tartılır. Aynı işlem 90 saat ile tekrarlanır ve eşitlik 3.2. yardımıyla yüzde çözünürlük hesaplanır.

$$\%çözünürlük = \frac{\text{başlangıç kütlesi} - \text{son kütle}}{\text{başlangıç kütlesi}} \quad (3.2)$$

3.2.6. Su Buharı Geçirgenliği

Film örneklerinin içinden geçmesine izin verdiği su buharı miktarını ölçmek için filmler, içinde CaCl_2 bulunan tüplerin içine CaCl_2 ile temas etmeyecek şekilde yerleştirildi ve tüpler 24 saat beklemeye bırakıldı. Ardından filmler tartılarak kütle artışı hesaplandı ve su buharı geçirgenliği (wvp) eşitlik 3.3 e göre hesaplandı (Yong ve ark. 2019, Zhang ve ark. 2019).

$$wvp = \frac{W \times x}{t \times A \times \Delta P} \quad (3.3)$$

Kullanılan eşitlikte W kütle artışı (g) , x filmlerin kalınlığı (m) , t süre (sn) , A filmin alanı (m^2), ΔP (Pa) ise kısmi su buharı basıncıdır.

3.2.7. Şişme Oranı

Şişme oranı testi literatüre göre modifiye edilerek yapılmıştır (Mayachiew ve Devahastin 2010). Oda sıcaklığında bekletilmiş olan kitosan filmler tartılır ve deiyonize saf suya batırılır ve ıslatılır. Ardından hemen üstüne adsorbe ettiği fazlalık su filtre kağıdı ile alınır ve hemen ıslak film kütlesi belirlenir. Alınan tartımlar sonucu şişme, eşitlik 3.4.' e göre hesaplanır.

$$\text{şişme oranı} = \frac{\text{ıslak kütle} - \text{kuru kütle}}{\text{kuru kütle}} \times 100 \quad (3.4)$$

3.2.8. Nem Oranı

Nem içeriği (Rambabu ve ark. 2019) literatürdeki yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. Film örnekleri önce tartılmış, sonra 5 g susuz CaCl_2 eklenmiş tüplerin içerisine CaCl_2 ile temas etmeyecek şekilde filtre kağıtlarının yardımıyla yerleştirilmiştir. 7 gün boyunca nemsiz bir ortamda bekletilmiş ve tartımları alınmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda eşitlik 3.5 e göre filmlerin nem oranı hesaplanmıştır.

$$nem\ oranı = \frac{başlangıç\ kütlesi - kurutulmuş\ kütle}{başlangıç\ kütlesi} \times 100 \quad (3.5)$$

3.2.9. Kalınlık Ölçümü

Örnek içeren filmlerin ve kör örneğin kalınlığı, olabildiğince filmin genelini yansıtmaması için dört yanından bir mikrometre yardımıyla ölçülür ve bu dört yanın ortalamaları alınır.

3.2.10. Fenolik Maddelerin HPLC-DAD ile Tayini

Prunella ekstraktlarında bulunan fenolik maddelerin analizi HPLC-DAD cihazı ile yapılmıştır. HPLC-DAD için analiz çalışma koşulları Çizelge 3.4.'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. HPLC-DAD için analiz çalışma koşulları

Kolon	XBridge C18 (4.6×250mm, 3.5 µm, Waters)
Örnek hacmi ve akış hızı	10 µL, 0,5 mL/dk
Süre (dk)	Mobil faz (asetonitril ve %1'lik sulu formik asit)
0-10	%13 asetonitril, %87 %1'lik formik asit
10-20	%41,5 asetonitril, %58,5 %1'lik formik asit
20-25	%70 asetonitril, %30 %1'lik formik asit
25-35	%10 asetonitril, %90 %1'lik formik asit

3.2.11. FT-IR analizi

Kitosan filmlerin kimyasal yapısı için fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FT-IR) ile analiz Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde hizmet alımı şeklinde yapılmıştır.

3.2.12. SEM analizi

Film örneklerinin yüzey morfolojisi hakkında bilgi edinmek için SEM (Taramalı elektron mikroskobu) kullanılmıştır ve örnek hazırlama aşamasında filmler iletken bir yapıştırıcı aracılığıyla SEM örnek plakasına tutturulur. Filmlerin yüzeyi vakum altında

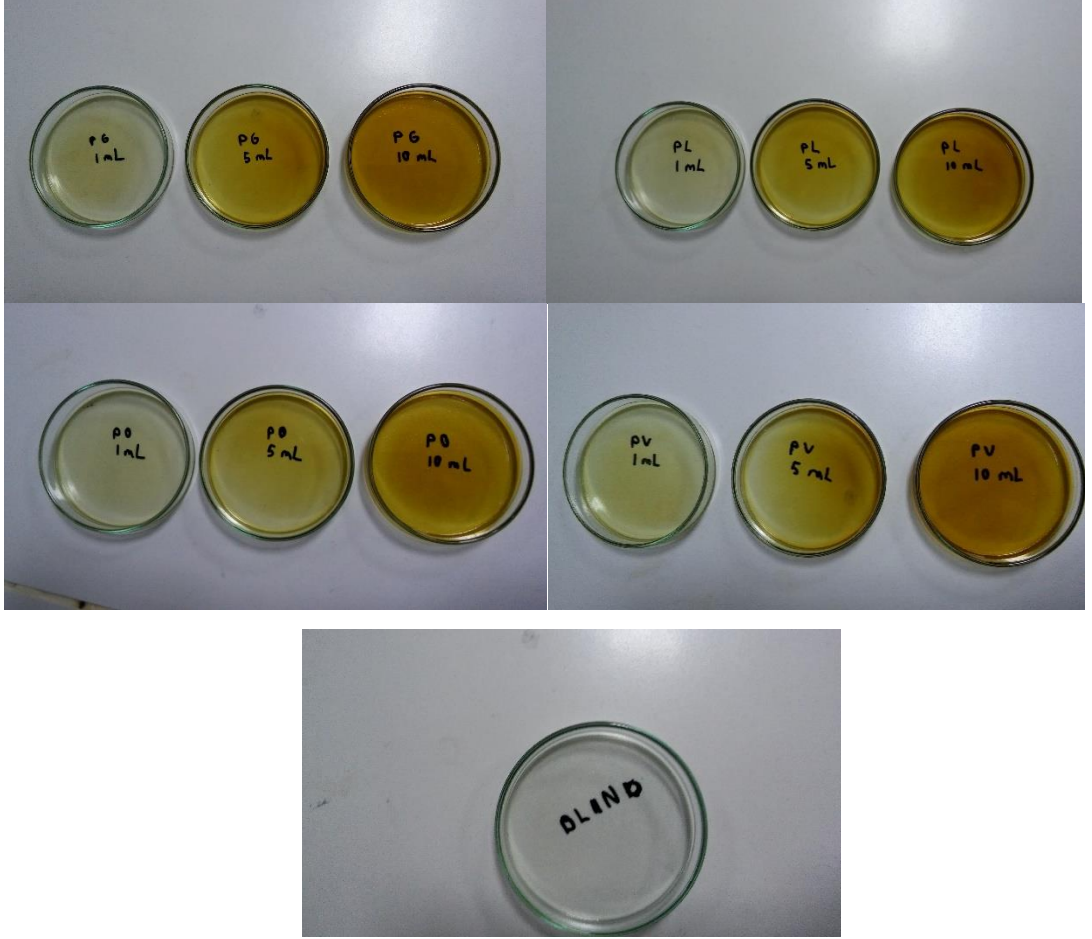
altın ile kaplanarak analiz edilir. SEM analizleri Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü'nde bulunan taramalı elektron mikroskobu ile hizmet alımı şeklinde yapılmıştır.

3.2.13. Antibakteriyal Aktivite Analizleri

Kitosan temelli *Prunella* ekstraktlı filmlerin antibakteriyal aktivite çalışmaları ASTM E2149- 01 (Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Immobilized Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions) yöntemine göre Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümün'de yapılmıştır. Antibakteriyal aktivite çalışmalarında gram negatif bakteri (*Escherichia coli* ATCC 35218) ve gram pozitif bakteri (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538) türleri kullanılmıştır. Filmlerden 0,1 g olacak şekilde keşilmiştir. Erlenlere bakteri çözeltileri (Başlangıçta *Escherichia coli* 1×10^5 cfu/mL, *Staphylococcus aureus* $2,5 \times 10^5$ cfu/mL derişimde eklenmiştir) eklendikten sonra 37°C'de 150 devir/dakika çalkalama hızında inkübe edildikten sonra belirli süre sonunda ortamda çoğalan bakteri sayısı ölçülmüştür.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Film oluşturma işleminin sonucunda petri kaplarında oluşan filmlerin görüntüleri şekil 4.1.' de verilmiştir.



Şekil 4.1. *Prunella grandiflora* (PG), *Prunella laciniata* (PL), *Prunella orientalis* (PO), *Prunella vulgaris* (PV) ekstraktlarından 1 mL, 5 mL ve 10 mL eklenmiş kitosan film ve eklenmemiş (kör/blind) film örneklerinin fotoğrafları

Şekil 4.1. de görüldüğü gibi ekstrakt miktarının artmasıyla filmlerin renkleri daha koyu bir hal almıştır. Ambalajın şeffaf olması ürünün görünmesi açısından genelde istenen bir özelliktir, çünkü müşterinin ürünü gözüyle görebilmesi güven açısından önemlidir. Ancak şeffaf olmayan bir ambalaj ışığı geçirmeyen bir ambalaj demektir ve olası bir ışığa hassas ürün paketlemesinde ambalajın opaklığının düşük olması ambalaj üreticileri için daha tercih edilebilir bir seçenektir (Riaz ve ark. 2018).

4.1. ABTS Yöntemi ile Antioksidan Kapasite Tayini

Tez kapsamında hazırlanan filmlerin antioksidan özelliklerinin belirlenmesi için ABTS yöntemi kullanılmıştır. Ancak filmlerin direkt olarak serbest radikallere karşı etkinliğini belirlemek ABTS yönteminde uygun olmayacağı için filmler çözücü ortamında bekletildi. Burada filmler için su ve etilalkol ortamı çözücü olarak seçildi. En çok fenolik madde salınımı alkol ortamında olduğu için çözücü olarak etanol kullanılmıştır. Alkol ortamında bekletildikten sonra ortama salınan fenolik maddelerin antioksidan özelliği belirlenerek filmlerin antioksidan özelliği de dolaylı olarak belirlenmiş oldu. ABTS yönteminde troloks standartlarıyla hazırlanan kalibrasyon grafiği değerleri (Çizelge 4.1.) kullanılarak hazırlanan filmlerin antioksidan kapasite değerleri mg troloks eşdeğeri (TE)/ g film olarak Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. ABTS yöntemi için kalibrasyon bilgileri

Yöntem	Derişim aralığı (mg/L)	Doğru denklemi	R ²
ABTS	0,2 – 1,0	y = 13,149x - 1,3563	0,9906

Çizelge 4.2. Film örneklerinin antioksidan kapasite değerleri

Bitki ekstraktı türü	Film içindeki ekstrakt hacmi (mL)	Antioksidan kapasite değeri (mg TE/g film)
<i>Prunella grandiflora</i>	1	0,70 ± 0,06
	5	5,09 ± 0,18
	10	10,76 ± 0,21
<i>Prunella laciniata</i>	1	0,61 ± 0,20
	5	3,22 ± 0,13
	10	6,51 ± 0,32
<i>Prunella orientalis</i>	1	0,51 ± 0,06
	5	1,52 ± 0,53
	10	2,55 ± 0,17
<i>Prunella vulgaris</i>	1	0,59 ± 0,06
	5	1,68 ± 0,10
	10	5,32 ± 0,04

Hazırlanan filmlerin antioksidan kapasite değerlerine bakıldığında *Prunella* ekstrakt hacmi artışına göre artan antioksidan kapasite değerleri, ekstrakt hacmi arttıkça ortamdaki antioksidan madde salınımı da artacağı için antioksidan kapasite değerleri de artmıştır. Ölçülen antioksidan kapasite miktarının etanol ile süspansiyon oluşturan film kütlesine bağlı olduğunu da unutmamak gerekir (Masek ve ark. 2018). Bitki örneklerini karşılaştırdığımızda en fazla antioksidan özellik gösteren bitkinin *Prunella grandiflora* olduğu görülmektedir. Bu durum *Prunella grandiflora* ile hazırlanan kitosan filminin alkol ortamında en fazla antioksidan madde salınımı yaptığını göstermektedir. Alkol içinde bu kadar antioksidan madde salınımı yapması modifiye edilmiş yüzeyin havadan veya temas yoluyla bulaşabilecek serbest radikallere karşı dayanıklı olması anlamına gelmektedir.

Bu çalışmada incelenmiş 5 fenolik madde türü olan rutin, klorojenik asit, kafeik asit, protokatekuik asit ve rosmarinik asit filmlere antioksidan özelliği vermiş maddelerdir (Andrade ve ark. 2018b, da Silveira ve ark. 2017, Şahin ve ark. 2011, Saykova ve ark. 2018). Mutlaka bu etkiyi arttıracak veya azaltacak başka maddeler de filmlerin yapısında mevcuttur. Ancak ABTS sonuçlarına göre bu etkenlerin filmlerin antioksidan özellik etki göstermesine engel olmadığı söylenebilir. Antioksidan özelliğini arttırabilecek etkenler bizim tespit etmediğimiz diğer fenolik bileşikler olabilirken antioksidan özelliğini azaltabilecek etkenlerin film yapımı esnasında çevreden gelebilecek girişim yapan maddeler olduğunu söyleyebiliriz. Sonuçlara göre en fazla antioksidan özellik gösteren filmin *Prunella grandiflora* içeren film örneği olduğu tespit edilmiştir.

4.2. Folin-Ciocalteu Yöntemi ile Toplam Fenolik Madde Tayini

Film örneklerindeki toplam fenol miktarı ölçülürken filmler etanol içerisinde bekletildi ve film üzerindeki aktif paketlenme (koruyucu) özelliği veren fenolik maddelerin etanol ortamına geçmesi sağlandı. Böylece çözelti içerisindeki toplam fenolik miktarı bize çözelti içerisindeki filmlerden ne kadar fenolik madde (antioksidan madde) salındığını gösterecektir. Folin-Ciocalteu yönteminde gallik asit standartlarıyla hazırlanan

kalibrasyon grafiği değerleri (Çizelge 4.3.) kullanılarak hazırlanan filmlerin toplam fenolik madde değerleri mg gallik asit eşdeğeri (GE)/ g film olarak çizelge 4.4.'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Folin-Ciocalteu yöntemi için kalibrasyon bilgileri

Yöntem	Derişim aralığı (mg/L)	Doğru denklemi	R ²
Folin-Ciocalteu	1,1-21,1	$y = 0,0689x - 0,0067$	0,9994

Çizelge 4.3.' deki kalibrasyon grafiği bilgileri kullanılarak elden edilen sonuçlarda filmlerin içine konan bitki ekstraktlarının miktarı arttıkça toplam fenolik madde miktarının da anlamlı bir şekilde arttığı görülmektedir (Çizelge 4.4.). Bu sonuçlara göre en fazla fenolik madde içeren film örneği *Prunella grandiflora*dır ve kalan sıralama ise en fazladan en aza göre *P. laciniata*, *P. vulgaris* ve *P. orientalis* şeklinde devam etmektedir. ABTS sonuçlarıyla karşılaştıracak olursak toplam fenolik maddenin filmlerin gösterdiği antioksidan kapasite ile doğrudan orantılı olduğu söylenebilir (Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. Film örneklerinin toplam fenolik madde değerleri

Bitki ekstraktı türü	Film içindeki ekstrakt hacmi (mL)	Toplam fenolik madde değeri (mg GE/g film)
<i>Prunella grandiflora</i>	1	1,46 ± 0,01
	5	2,71 ± 0,20
	10	6,66 ± 0,48
<i>Prunella laciniata</i>	1	1,15 ± 0,01
	5	1,19 ± 0,01
	10	2,92 ± 0,12
<i>Prunella orientalis</i>	1	0,11 ± 0,01
	5	0,88 ± 0,02
	10	1,16 ± 0,01
<i>Prunella vulgaris</i>	1	0,94 ± 0,01
	5	1,70 ± 0,03
	10	2,32 ± 0,20

Artan ekstrakt miktarı ile toplam fenolik maddenin artmış olması filmlerin antioksidatif özellik taşıdığını ve bu özelliğin ekstrakt miktarıyla doğru orantılı olduğunu gösterir (Şahin ve ark. 2019). Bu sonuçlara göre en fazla fenolik madde içeren film örneği *Prunella grandiflora* ekstraktları içeren filmlerdir. Genel olarak toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite sonuçları Microsoft Excel’de karşılaştırıldığında korelasyon katsayısı (R^2) 0,93 bulunmuştur. Bu da hem toplam fenolik madde hem de antioksidan kapasite değerlerinin birbirleriyle uyumlu olduğunu göstermektedir.

4.3. Çözünürlük

Sudaki çözünürlük, özellikle gıda alanında kullanılan filmlerde oldukça önemli bir özelliktir ve filmlerin suya direnci hakkında bize bilgi verir. Çizelge 4.5.’ de görüldüğü gibi içinde *Prunella* ekstraktı olmayan (kör) film daha az yüzdede çözünmüştür.

Çizelge 4.5. Film örneklerinin suda çözünürlük değerleri

Bitki ekstraktı türü	Film içindeki ekstrakt hacmi (mL)	24 saatte sudaki çözünürlük yüzdesi (w/w %)
Kör film	0	68,89±0,10
<i>Prunella grandiflora</i>	1	64,86±0,10
	5	62,04±1,92
	10	58,42±1,41
<i>Prunella laciniata</i>	1	63,43±1,30
	5	61,77±0,61
	10	55,19±3,15
<i>Prunella orientalis</i>	1	65,25±4,29
	5	57,25±2,95
	10	52,69±1,36
<i>Prunella vulgaris</i>	1	61,88±1,33
	5	54,37±3,78
	10	46,58±2,11

Bunun nedeni polifenoller, kitosan molekülleri ile potansiyel hidrojen bağlanması yoluyla etkileşimler kurabilir, bu da kitosanın hidrofilik grupları ile su molekülleri arasındaki etkileşimleri sınırlar. Bu nedenle, kitosarla bağlanan su molekülleri daha az hale gelir ve daha düşük su içeriği ve daha düşük çözünürlük ile sonuçlanır. (Riaz ve ark. 2018). Film örneklerinin suda belli bir çözünürlüğünün olması aktif paketleme açısından paketlenen malzemede koruma yaratması anlamına gelmektedir (López-De-Dicastillo ve ark. 2010).

4.4. Su Buharı Geçirgenliği

Su buharı geçirgenliği filmlerin ambalajlanan malzeme için su buharına karşı ne kadar koruyucu bariyer olabileceğini gösterir ve hazırlanan ambalajlarda su buharı geçirgenliğinin az olması istenir (Huang ve ark. 2019). Kitosanın hidrofilik yapısı ve filmlerin içindeki fenolik maddelerin hidrojen bağı oluşturması nedeniyle filmler su buharını yüzeyde tutma eğilimi gösterirler (Liu ve ark. 2017).

Çizelge 4.6. Film örneklerinin su buharı geçirgenlikleri

Bitki ekstraktı türü	Film içindeki ekstrakt hacmi (mL)	Su buharı geçirgenliği (x 10 ⁻⁸ g/m s kPa)
Kör film	0	5,75±0,23
<i>Prunella grandiflora</i>	1	4,16±0,01
	5	4,08±0,16
	10	3,21±0,25
<i>Prunella laciniata</i>	1	3,06±0,13
	5	2,79±0,23
	10	2,63±0,01
<i>Prunella orientalis</i>	1	4,47±0,37
	5	4,16±0,01
	10	1,58±0,01
<i>Prunella vulgaris</i>	1	1,97±0,01
	5	1,64±0,01
	10	1,42±0,01

Çizelge 4.6. incelendiğinde bitki ekstraktı içeren her film örneği hedeflendiği gibi su buharı geçirgenliğinde kör örneğe göre azalma oluşturmuştur. Ayrıca her bir film içerisine konan ekstrakt miktarının artması su buharında geçirgenliğin azalmasına sebep olmuştur. Bunun nedeni filmlerdeki hidrojen bağları ve yüksek hidrofilik özelliğin, CaCl_2 ile tepkimeye girmek isteyen suyun CaCl_2 ye ulaşmasını engellemesinden dolayıdır (Liu ve ark. 2017). Yüzeydeki su buharından tutulan nem kütlede artma meydana getirirken bu nemin buharlaşması da azalma meydana getirecektir ve bu iki durum da ekstrakt miktarlarının yüksek olduğu filmlerde daha fazla görülmektedir. Düşük ekstrakt miktarında su buharı CaCl_2 ile buluşabilirken ekstrakt miktarı arttıkça buluşma daha az olacaktır ve bu da tüpteki kütle değişiminde azalma, dolayısıyla su buharı geçirgenliğinde de azalma meydana getirecektir.

4.5. Şişme Oranı

Şişme oranı akıllı ambalaj teknolojisinde önemli bir role sahiptir çünkü ambalaja dışarıdan gelebilecek maddeler ambalaj üzerinde şekil değişikliğine neden olabilir, bu yüzden yüksek şişme oranı ambalajın raf ömrü açısından olumsuz bir etki yaratır (Huang ve ark. 2019). Çizelge 4.7.'de görüldüğü gibi kitosan filmlere ekstrakt eklenmesi durumunda artan ekstrakt miktarı film örneklerinin şişmesini azaltmıştır. Bunun nedeni, şişme davranışı filmlerin ağ mikro yapısında işgal edilen toplam su molekülleri ile yakından ilişkilidir. Kitosan hidrofilik özelliğe sahiptir ve su ile temasında düşük bir yüzey gerilimi yaratarak suyu üstünde tutmak ister ve bu özellik filmlerde de görülmektedir. Ancak filmlere eklenen ekstraktlar kitosanın bu hidrofilitesini düşürür çünkü yeni oluşturulan etkileşimler suyu emmek için bağlanma noktalarının azaltılmasına yol açacaktır. Fenolik bileşiklerle suda olduğundan daha güçlü moleküller arası bağ yapan kitosan, filmlerin şişme kapasitesini fenolik bileşiklerle yaptığı bağ sayısı ile ters orantılı olarak düşürür yani filmlere ne kadar fazla fenolik madde eklenirse şişme oranı o kadar düşer (Hari ve ark. 2018).

Çizelge 4.7. Film örneklerinin yüzde şişme oranları

Bitki ekstraktı türü	Film içindeki ekstrakt hacmi (mL)	Şişme oranı (%)
Kör film örneği	0	128,33±0,63
<i>Prunella grandiflora</i>	1	75,30±1,50
	5	68,55±0,06
	10	41,63±1,59
<i>Prunella laciniata</i>	1	57,29±1,37
	5	49,20±0,11
	10	43,48±1,27
<i>Prunella orientalis</i>	1	89,10±1,36
	5	62,88±2,04
	10	41,27±1,59
<i>Prunella vulgaris</i>	1	85,42±2,46
	5	59,59±3,39
	10	55,25±0,53

4.6. Nem İçeriği

Hidrokolloidler, yenilebilir ve biyolojik olarak bozunabilir filmler hazırlamak için en çok kullanılan biyopolimerlerdir. Bu bileşiklerin işlenmesi kolaydır ve filmler kabul edilebilir mekanik ve gaz bariyeri özelliklerine sahiptir. Ancak esas olarak hidrofilik özellikleri nedeniyle su buharını orta derecede geçirgenliğe sahiptirler (McHugh ve ark. 2009). Gıda ambalajı için bir hidrofilik film kullanıldığında veya yüksek bağıl nem koşullarına maruz kaldığında, su molekülleri polimerik zincirler üzerine adsorbe edilir, film yapısı üzerinde plastikleştirici bir etki yapar ve termal, mekanik ve bariyer özelliklerinde değişikliklere neden olur (Pittia ve Sacchetti 2008). Malzemenin nem içeriğindeki artış, su buharı moleküllerinin film boyunca taşınmasını teşvik ederek bariyer kapasitesini azaltır ve suyun ambalajın içine girmesini kolaylaştırır. Nem içeriğinin yüksek olması istenmeyen bir durumdur. Nem içeriği veya çevresel bağıl nemin etkisini bilmek, kitosan filmler ile gıdaların korunması için ambalaj malzemesi olarak kullanıldığında önemlidir (Aguirre-Loredo ve ark. 2016).

Çizelge 4.8. Film örneklerinin yüzde nem oranları

Bitki ekstraktı türü	Film içindeki ekstrakt hacmi (mL)	Nem oranı (%)
Kör film örneği	0	68,46 ± 2,31
<i>Prunella grandiflora</i>	1	47,38 ± 1,02
	5	37,56 ± 0,89
	10	30,86 ± 0,30
<i>Prunella laciniata</i>	1	57,03 ± 1,45
	5	39,67 ± 1,03
	10	23,08 ± 0,78
<i>Prunella orientalis</i>	1	47,95 ± 1,94
	5	31,58 ± 0,92
	10	25,10 ± 3,45
<i>Prunella vulgaris</i>	1	40,65 ± 1,53
	5	20,78 ± 0,40
	10	17,60 ± 1,83

Çizelge 4.8. incelendiğinde kitosan filmlere eklenen ekstrakt miktarı arttıkça nem oranının azaldığı görülmektedir. Bunun nedeni şişme ve su buharı geçirgenliğinde olduğu gibi hidrofiliteye sahip kitosan filmlerin artan ekstrakt miktarı ile hidrofilitenin azalmasıdır (Hari ve Nair 2016).

4.7. Kalınlık

Fiziksel özelliklerin en önemlilerinden biri olan kalınlık, filmlerin dış etkenlere karşı direnmesini sağlayan başlıca fiziksel özelliklerinden biridir. Çizelge 4.9.'da ölçülmüş olan kalınlık değerleri benzer çalışmalardan farklı olmamakla birlikte çoğu ambalaj standart ölçülerine de uygunluk sağlamaktadır (Kittikaiwan ve ark. 2007, Rambabu ve ark. 2019, Riaz ve ark. 2018, Uz ve Altinkaya 2011, Yong ve ark. 2019, Zhang ve ark. 2019).

Çizelge 4.9. Film örneklerinin kalınlık değerleri

Bitki ekstraktı türü	Film içindeki ekstrakt hacmi (mL)	Kalınlık (milimetre)
Kör film	0	0,37±0,02
<i>Prunella grandiflora</i>	1	0,19±0,01
	5	0,26±0,06
	10	0,16±0,02
<i>Prunella laciniata</i>	1	0,28±0,04
	5	0,22±0,05
	10	0,20±0,03
<i>Prunella orientalis</i>	1	0,19±0,03
	5	0,21±0,01
	10	0,15±0,02
<i>Prunella vulgaris</i>	1	0,19±0,03
	5	0,14±0,04
	10	0,21±0,02

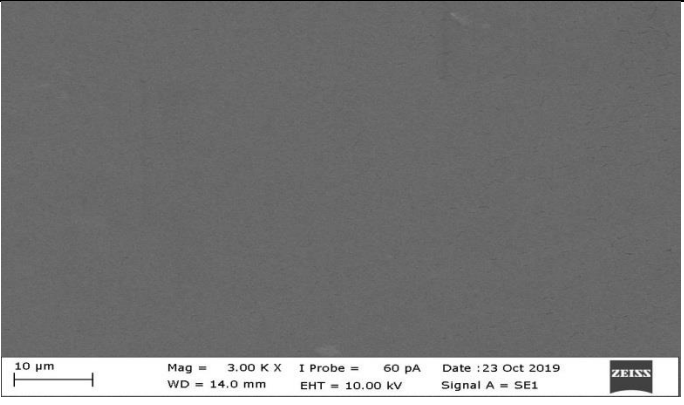
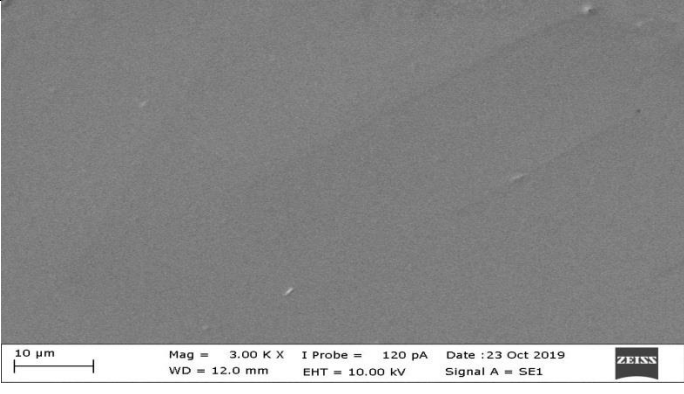
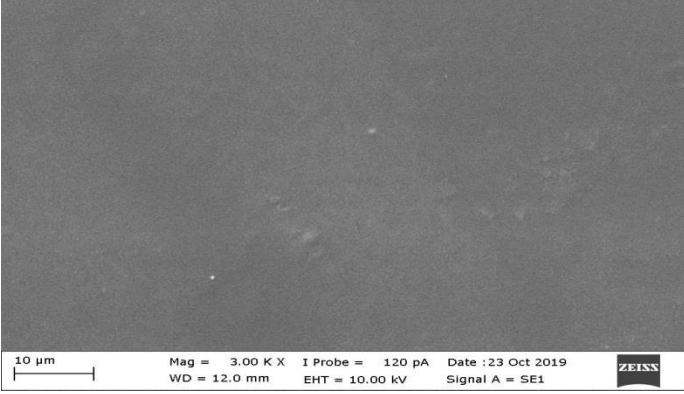
Kalınlık ölçümlerinde meydana gelen dalgalanmalar birkaç nedenden ötürü olabilir. Bunlardan birisi film oluşumu esnasında *Prunella* ekstraktlarının eklenmesiyle birlikte artan ekstrakt hacmi ile film numunelerinin alkol ve su içeriğinin artmasıdır ve bu, ekstrakt miktarı artarken daha ince film oluşumuna sebebiyet verir. Fakat eklenen ekstrakt miktarı beraberinde hem safsızlık getirerek hem de yeni hidrojen bağları oluşturarak katı içerik miktarını arttırır ve bu da kalınlıkta artma meydana getirir (Abugoch ve ark. 2011, Riaz ve ark. 2018). Bu iki etken birleşince bulduğumuz değerler dalgalanma yaratmıştır.

4.8. SEM Sonuçları

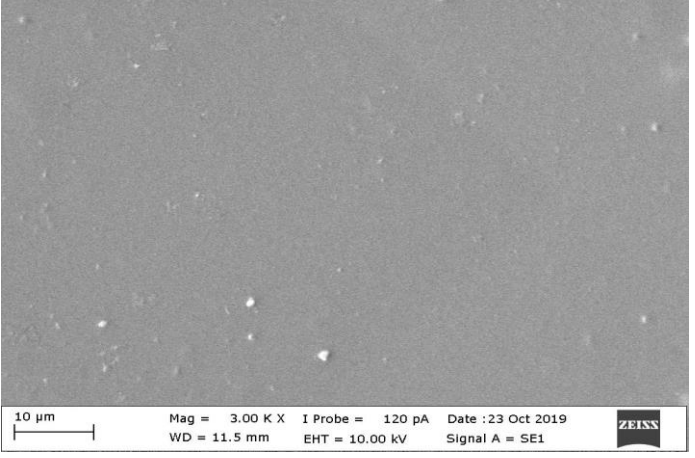
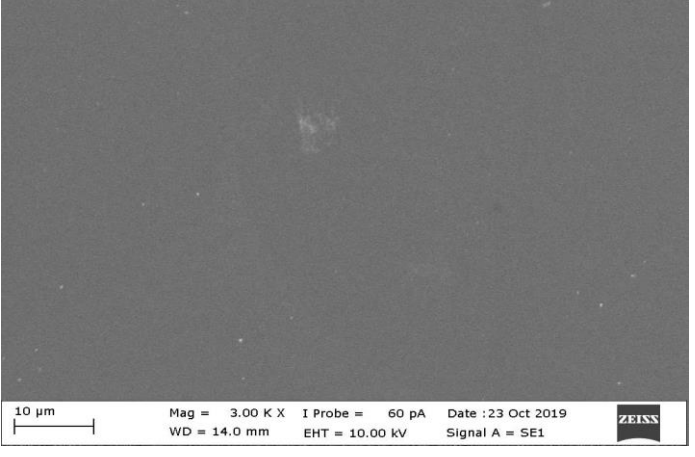
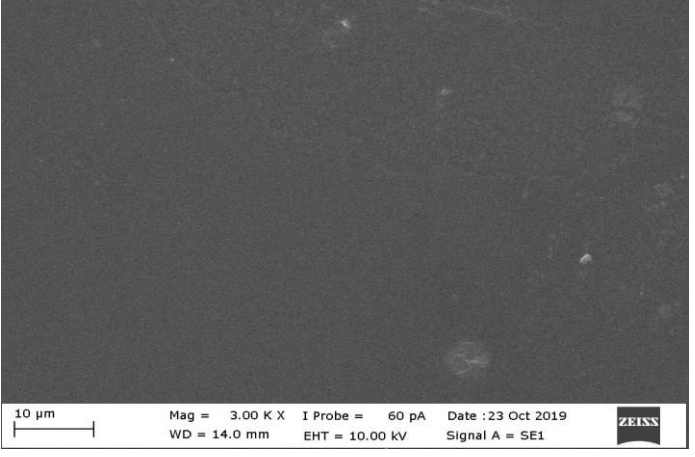
Kitosan filmlerin SEM görüntüleri Çizelge 4.10.'da verilmiştir. İçerisinde ekstrakt olmayan kitosan film daha düz, pürüzsüz bir görüntü verirken eklenen ekstraktlar görünümde daha pürüzlü ve baloncuklu görüntü yaratmıştır. Yer yer oluşan beyaz noktaların ve baloncuklu görüntülerin nedeni eklemekten sonra buharlaşan ve filmde

ayrılan su ve etanol molekülleridir. Ekstrakt eklenmiş kitosanın kör örneğe göre düşük hidrofilitesi nedeniyle yüzeylerde daha girintili çıkıntılı görüntüler oluşmuştur (Kaya ve ark. 2018).

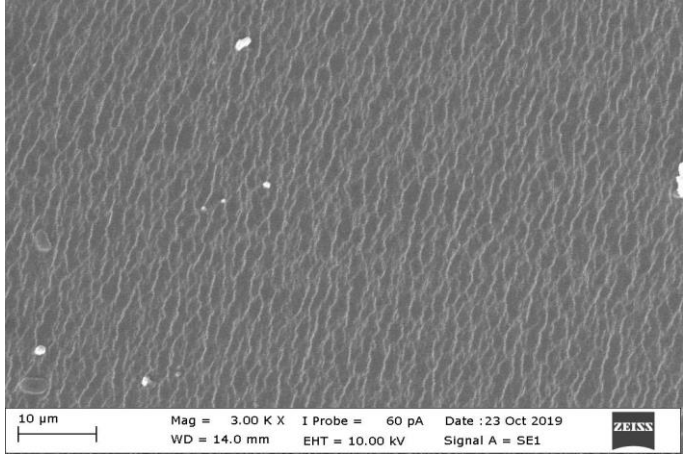
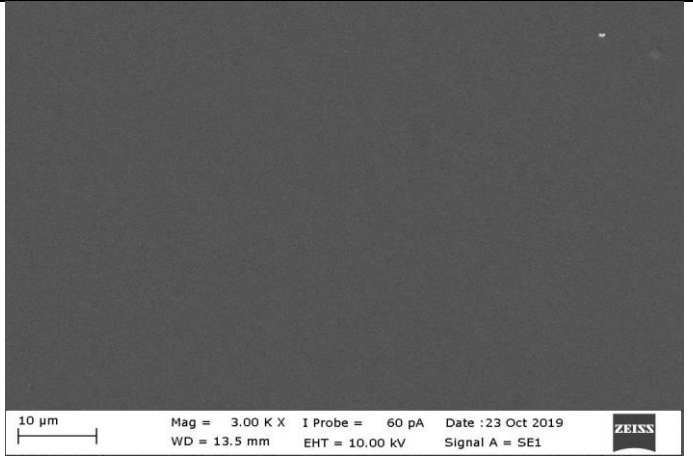
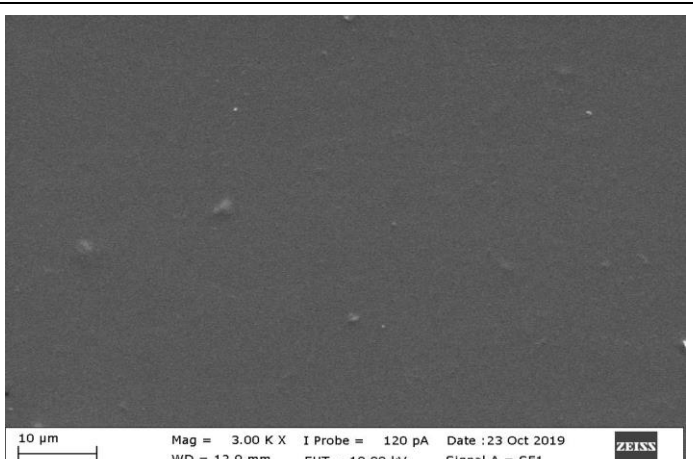
Çizelge 4.10. Kitosan filmlerin eklenen ekstrakt hacmine göre değişen SEM görüntüleri

Bitki ekstraktı türü	Film içindeki ekstrakt hacmi (mL)	SEM görüntüsü
Kör film	0	
<i>Prunella grandiflora</i>	1	
	5	

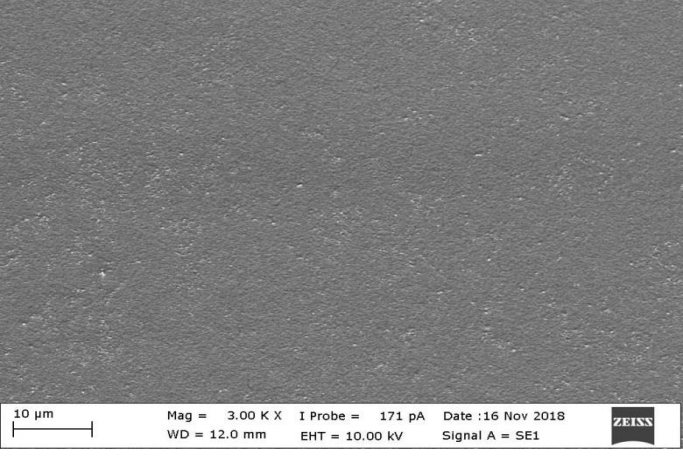


Çizelge 4.10. Kitosan filmlerin eklenen ekstrakt hacmine göre değişen SEM görüntüleri (devam)

Bitki ekstraktı türü	Film içindeki ekstrakt hacmi (mL)	SEM görüntüsü
<i>Prunella laciniata</i>	10	
	1	
	5	

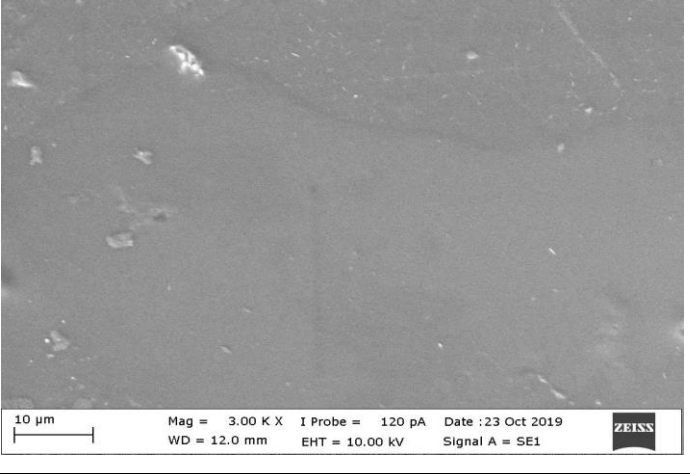
Çizelge 4.10. Kitosan filmlerin eklenen ekstrakt hacmine göre değişen SEM görüntüleri (devam)

Bitki ekstraktı türü	Film içindeki ekstrakt hacmi (mL)	SEM görüntüsü
	10	 <p>10 µm Mag = 3.00 K X I Probe = 60 pA Date : 23 Oct 2019 WD = 14.0 mm EHT = 10.00 kV Signal A = SE1 ZEISS</p>
<i>Prunella orientalis</i>	1	 <p>10 µm Mag = 3.00 K X I Probe = 60 pA Date : 23 Oct 2019 WD = 13.5 mm EHT = 10.00 kV Signal A = SE1 ZEISS</p>
	5	 <p>10 µm Mag = 3.00 K X I Probe = 120 pA Date : 23 Oct 2019 WD = 12.0 mm EHT = 10.00 kV Signal A = SE1 ZEISS</p>

Çizelge 4.10. Kitosan filmlerin eklenen ekstrakt hacmine göre değişen SEM görüntüleri (devam)

Bitki ekstraktı türü	Film içindeki ekstrakt hacmi (mL)	SEM görüntüsü
	10	
<i>Prunella vulgaris</i>	1	
	5	

Çizelge 4.10. Kitosan filmlerin eklenen ekstrakt hacmine göre değişen SEM görüntüleri (devam)

Bitki ekstraktı türü	Film içindeki ekstrakt hacmi (mL)	SEM görüntüsü
	10	

4.9. *Prunella L.* Türlerinde Bulunan Fenolik Maddelerin Tayini

HPLC-DAD cihazı için standart fenolik bileşikler ile kalibrasyon çözeltileri hazırlandı. 100 mg/L stok çözelti kullanılarak rutin, rosmarinik asit, kafeik asit, klorojenik asit ve protokatekuik asit standart fenolik bileşikler için 1, 3, 5, 8 ve 10 mg/L standart çözeltileri hazırlanmıştır. Bu standart fenolik maddeler için konsantrasyona karşılık pik alan değerleri ile kalibrasyon grafikleri çizilmiştir (Çizelge 4.11.).

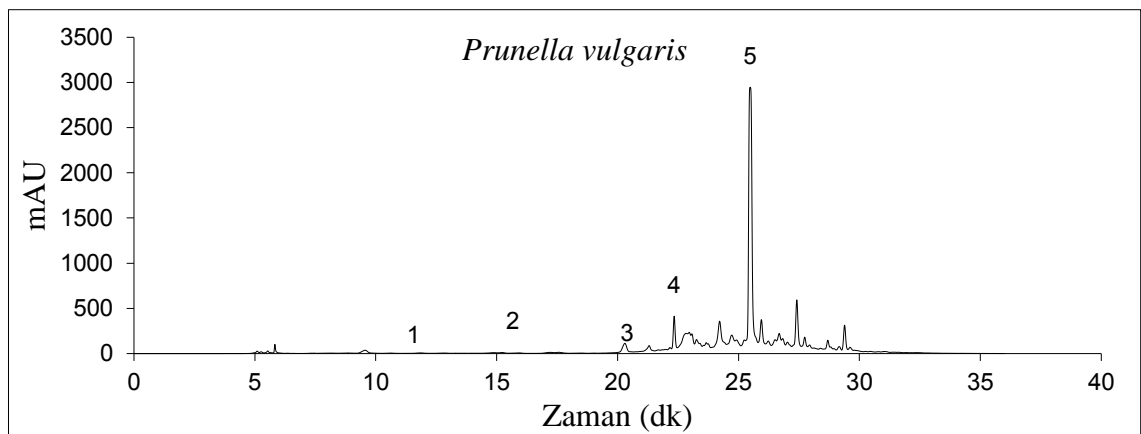
Çizelge 4.11. Standart fenolik maddeler için HPLC-DAD kalibrasyon grafikleri

Standart madde	Kalibrasyon grafiği	Regresyon katsayısı
Rutin	$y = 31,844x + 4,9045$	0,999
Rosmarinik asit	$y = 44,706x - 12,73$	0,993
Kafeik asit	$y = 108,59x - 30,17$	0,991
Klorojenik asit	$y = 45,045x - 22,882$	0,995
Protokatekuik asit	$y = 64,363x - 27,259$	0,996

HPLC-DAD cihazında dalgaboyu protokatekuik asit için 254 nm, rutin asit için 360 nm, diğer fenolik maddeler için 320 nm seçilmiştir.

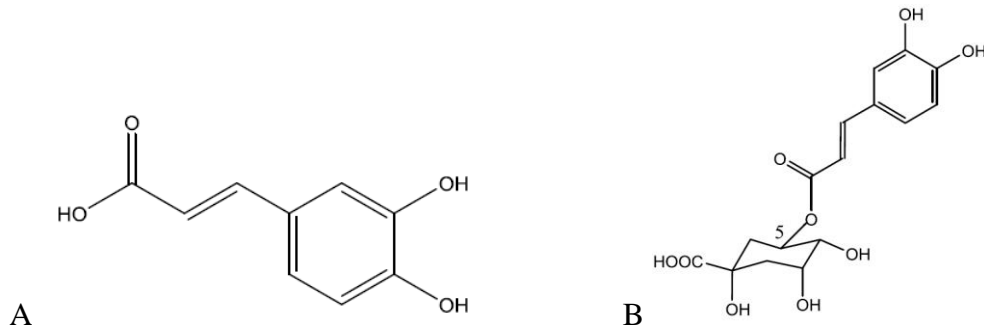
Çizelge 4.12. *Prunella* L. türlerinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları (mg/g örnek)

Fenolik maddeler	<i>Prunella grandiflora</i>	<i>Prunella laciniata</i>	<i>Prunella orientalis</i>	<i>Prunella vulgaris</i>
Rutin	6,9872± 0,0028	2,4797± 0,1189	1,6750± 0,1175	3,0139± 0,0057
Rosmarinik asit	14,6189± 0,0995	14,3585± 0,1489	11,8938± 0,0318	15,1606± 0,4078
Kafeik asit	0,4284± 0,0022	0,6865± 0,0897	0,4416± 0,0105	0,4550± 0,0644
Klorojenik asit	0,0716± 0,0103	0,1553± 0,0030	0,0655± 0,0004	0,1351± 0,0046
Protokatekuik asit	0,0634± 0,0008	0,0310± 0,0029	0,0305± 0,0002	0,0526± 0,0043
Toplam	22,1695± 0,1156	17,711± 0,3634	14,1064± 0,1604	18,8172± 0,4868



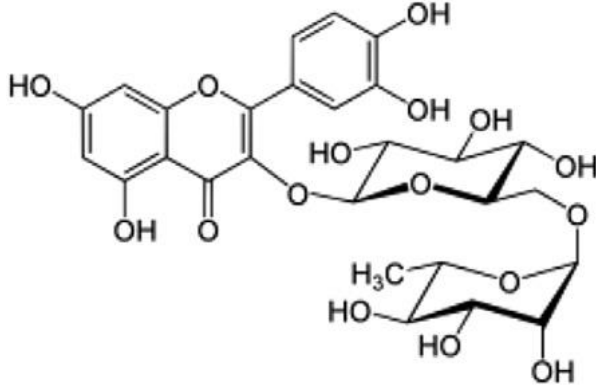
Şekil 4.2. *Prunella* L. türlerinin 280nm dalgaboyundaki (1) protokatekuik asit (t_r :11,8 dk), (2) klorojenik asit (t_r :15,8 dk) , (3) kafeik asit (t_r :20,2 dk), (4) rutin (t_r :22,3 dk) ve (5) rosmarinik asit (t_r :25,4) piklerini gösteren kromatogram

HPLC analizleri sonucu (Çizelge 4.12.) filmlerde kullanılan ekstraktların içinde antioksidan özellikleri bulunan rutin, klorojenik asit, kafeik asit, rosmarinik asit ve protokatekuk asit (Andrade ve ark. 2018b, da Silveira ve ark. 2017, Psotová ve ark. 2003, Şahin ve ark. 2011, Saykova ve ark. 2018) pikleri elde edilmiştir (Şekil 4.2.). Polifenollerin serbest radikal yakalama, metal şelasyon, enzimatik aktivitenin modülasyonu ve sinyal iletim yollarının değiştirilmesi gibi çeşitli biyolojik etkiler uygulayarak insan sağlığı için yararlı olduğu düşünülmektedir (Sato ve ark. 2011). Polifenoller esas olarak fenolik asitler ve flavonoidler olarak sınıflandırılır. Birincisinin ana sınıfı hidroksisinnamik asitlerdir ve klorojenik asit hidroksisinnamik asitlerin ana temsilcisidir. Kimyasal olarak klorojenik asit, kafeik asit ile kinik asit arasında oluşan bir esterdir. Klorojenik asit ve kafeik asit vinal hidroksil gruplarına sahiptir ve antimutajenik, kanserojen ve antioksidan aktivite sergilerler (Rice-Evans ve ark. 1996).



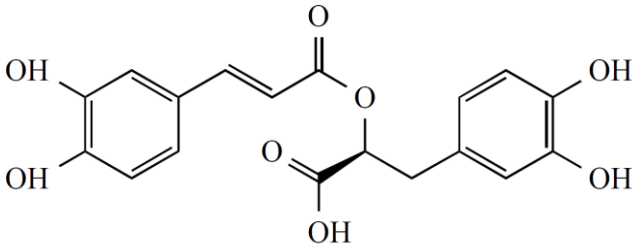
Şekil 4.3. A: Kafeik asit, B: Klorojenik asit (Tomac ve Šeruga 2016).

Rutin (quercetin-3-ramnosil glukozit), ilk olarak 19. yy karabuğdayda keşfedilmiş doğal bir flavonoiddir. Bizim kullandığımız *Prunella* türlerinin yanında sebze ve meyvelerde yaygın olarak bulunabilen düşük molekül ağırlıklı polifenolik bileşiktir (Yang ve ark. 2008). Ayrıca rutin, önemli bir doğal antioksidan olarak bilinen yeşil kuşkonmazdaki antioksidan aktivitenin önemli bir yüzdesini oluşturur (Tsushida ve ark. 1994). Rutin, P vitamini olarak bilinen bir tür flavonoid glikozittir ve yüksek radikal yakalayıcı aktivitesi ve antioksidan kapasitesinin sonuçları olan kan damarlarına bağlanan kılcal damarları güçlendirmenin yanı sıra antiplatelet (kandaki trombositleri azaltan), antiviral ve antihipertansif özelliklere sahiptir (Guo ve Liu 2007).



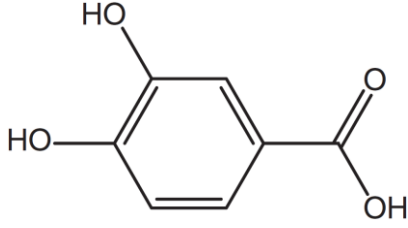
Şekil 4.4. Rutin molekülü (Gullón ve ark. 2017)

Rosmarinik asit (α -O-kafeoil-3,4-dihidroksifenilktik asit) esas olarak *Boraginaceae* türlerinde ve *Lamiaceae*'nin Nepetoideae alt familyasında bulunur ve genel olarak bu familyanın diğer türlerinde (*Prunella* gibi) de baskındır (Tepe 2008). Rosmarinik asit için çok sayıda biyolojik aktivite tarif edilmiştir. Başlıca aktiviteler antienflamatuar, antimutajen, antibakteriyel ve antiviraldır (Parnham ve Kesselring 1985).



Şekil 4.5. Rosmarinik asit (Gil ve ark. 2013)

Protokatekuik asit (3,4-dihidroksibenzoik asit) güçlü bir antioksidandır ve meyve/sebzelerde yaygın olarak bulunur (Tlili ve Sarikurkcu 2020). Protokatekuik asidin, serbest radikallerle ilişkili karsinogenez ve kardiyovasküler hastalıklarda önleyici etkileri olduğu bulunmuştur. Protokatekuik asit türevlerinin yapı-aktivitesi ile ilgili önemli noktalar, özellikle organik ve sulu ortamlardaki antioksidan aktivite ile ilgili olanlar, hala yeterince açıklanmamıştır (Reis ve ark. 2010).



Şekil 4.6. Protokatekuik asit

Şekil 4.2.'deki kromatogramlara göre film örneklerine en çok antioksidan etkisi veren flavonoidin rosmarinik asit olduğu söylenebilir ve rosmarinik asidin en fazla olduğu tür *Prunella vulgaris* olup ve bu genel olarak dünyadaki en yaygın *Prunella* türüdür (Şahin ve ark. 2011). En fazla rutin ve protokatekuik asit içeren tür *Prunella grandiflora*, en fazla kafeik asit içeren *Prunella laciniata*, en fazla klorojenik asit içeren tür yine *Prunella vulgaris*dir. Ekstraktlardaki toplam fenolik maddelerin aynı oranda filmlere geçmesi durumunda *P. grandiflora* en çok fenolik madde içermesi bakımından en fazla antioksidan özellik göstermesi gereken film örneğini oluşturmalıdır. *P. grandifloradan* sonra en çok fenolik madde içeren ekstraktlar sırasıyla *P. vulgaris*, *P. laciniata* ve *P. orientalis*'dir (çizelge 4.11.). Çizelge 4.2 deki ABTS sonuçlarına göre en fazla antioksidan özellik gösteren film örneği ve çizelge 4.4. deki Folin-ciocalteu metoduna göre en çok fenolik madde içeren film örneği 10 mL *P. grandiflora* ekstraktı katılmış film örneğidir ve kalan sıralama da *P. laciniata*, *P. vulgaris* ve *P. orientalis* şeklinde devam etmektedir. Folin-ciocalteu deneyinde alınan değerler (Çizelge 4.4.) ile HPLC de bakılan değerler (Çizelge 4.12.) karşılaştırıldığında *P. vulgaris* ekstraktında daha fazla toplam fenolik madde olmasına rağmen Folin-ciocalteu metoduyla filmlerde tespit edilen toplam fenolik madde değerlerinde *P. laciniata* içeren filmde daha çok fenolik madde tespit edilmiştir. Bu demektir ki *P. laciniata* ekstraktı filme *P. vulgaris*'den daha fazla fenolik madde geçmesine olanak sağlamıştır.

Prunella türlerinde antioksidan kapasite sağlayan etken maddenin rosmarinik asit olduğunu daha önce belirtmiştik ve bu etki çizelge 4.13. yardımıyla diğer fenolik maddelerle karşılaştırılabilir. TEAK değerleri bize maddelerin standart antioksidan kapasiteleri ile ilgili bilgi vermektedir ve çizelge 4.13. ye göre standart antioksidan kapasitesi en fazladan en aza doğru sırasıyla rutin, klorojenik asit, rosmarinik asit, kafeik asit ve protokatekuik asittir (Işık ve ark. 2013). Rutin ve klorojenik asidin daha

fazla antioksidan kapasitesi olmasına rağmen, rosmarinik asidin antioksidan kapasiteye daha fazla katkısının olması, incelenen *Prunella* türlerinde rosmarinik asidin diğerlerine oranla daha fazla miktarda olmasıdır (Çizelge 4.12.).

Çizelge 4.13. Standart fenolik maddeler için TEAK (troloks eşdeğer antioksidan kapasite) değerleri (Işık ve ark. 2013)

Standart madde	TEAK
Rutin	2,26
Klorojenik asit	2,15
Rosmarinik asit	1,71
Kafeik asit	1,55
Protokatekuik asit	0,97

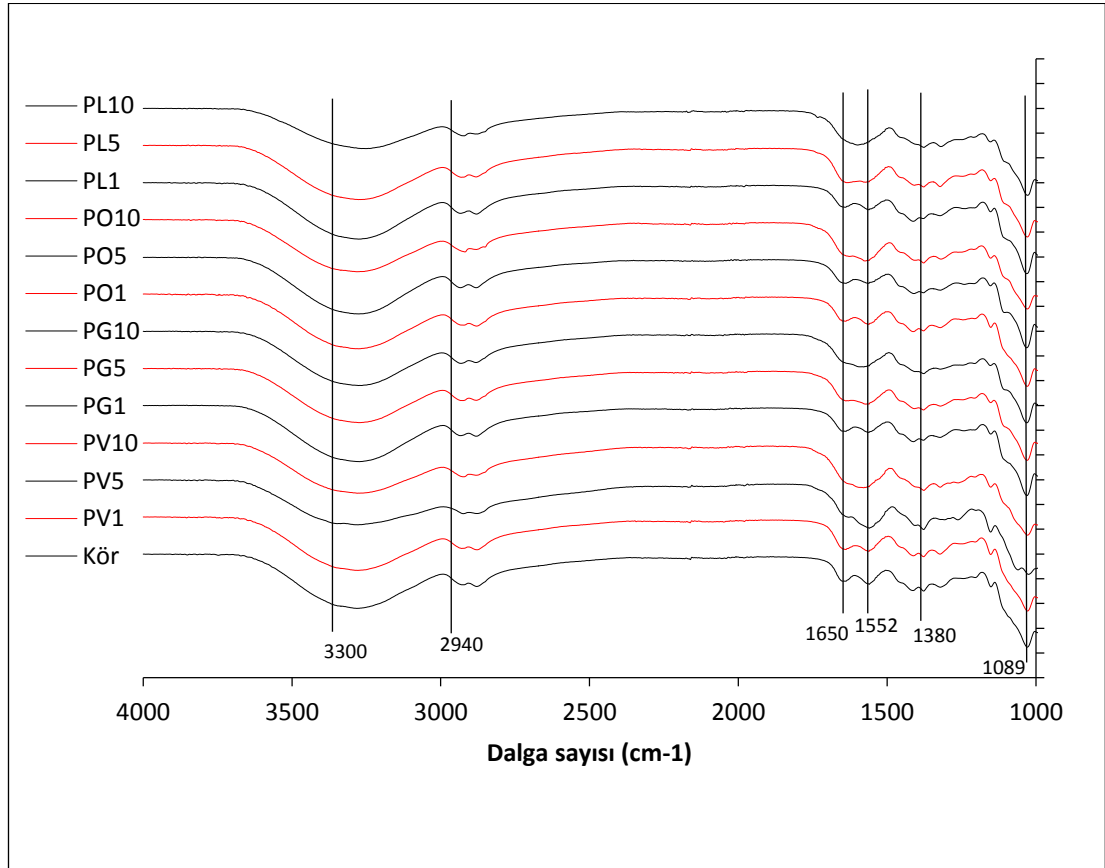
4.10. FT-IR sonuçları

FTIR, kitosan ambalaj filmi bileşenlerindeki çeşitli bileşenler arasındaki etkileşimi incelemek için kullanılabilir. Film oluşumundan sonra, film matrisinin etkisine bağlı olarak kitosan film spektrumunda bazı farklılıklar gözlemlendi. Bu farklılıkları karşılaştırmadan önce piklerden elde edilen fonksiyonel grupları belirleyecek olursak Şekil 4.7.'deki spektruma göre 3300 cm^{-1} dalga sayısındaki pik amid fonksiyonel grubunda bulunan N-H esneme piki ve 2940 cm^{-1} dalga sayısındaki pik ise yine amid grubundaki C-H esneme pikidir. Amid fonksiyonel grubunun majör pikleri olan 1650 cm^{-1} dalga sayısında C=O esneme 1552 cm^{-1} dalga sayısında N-H bükülme ve 1240 cm^{-1} dalga sayısındaki C-N ve N-H esneme bantlarının her film örneğinde bulunması kitosanın ekstraktlarla olan etkileşimi sonrasında yapı bütünlüğünü koruduğunu ve yenilebilir kitosan filmlere eklemiş olduğumuz ekstraktların konvansiyonel kitosan film yapısına zarar vermediğini göstermektedir (Ramziia ve ark. 2018).

Yenilebilir kitosan filmlerin belirleyici piklerinden diğeri ise O-H grubunun bağlı olmasıdır ki zaten mekanik özelliklerin film oluşumuna uygun olmasının ve bizim eklediğimiz ekstraktların film oluşumunda kullanılabilmesinin en önemli nedeni yapısal bütünlüğe çok büyük etki eden hidrojen bağlarıdır (Abugoch ve ark. 2011).

Amit, O-H bükülmesi, kitosan ve O-H titreşiminin piranoz yapısının iskelet titreşimleri ile ilişkili kitosan yenilebilir filmin ana karakteristik pikleri, sırasıyla 1660, 1592 ve 1380, 1089 ve 3359 cm^{-1} olarak belirtilmiştir (Abugoch ve ark. 2011).

Şekil 4.7. Film örneklerinin FTIR spektrum pikleri



Ekstrakt eklenmesi ile 3300-3500 cm^{-1} dalga sayısında gözlenebilen O-H esneme bantlarında az da olsa sinyal azalmasına rağmen kayda değer bir değişim olmadığının gözlenmesinin yanında ekstrakt miktarının artmasıyla 1650 cm^{-1} dalga sayısında gözlenen C=O esneme bandında ve 1552 cm^{-1} dalga sayısında gözlenen N-H bükülme piklerinde kayda değer bir çözünürlük azalması gözlenmiştir. Bunun nedeni eklenecek ekstraktlardaki fenolik maddelerde bulunan hidrojen bağlarının ve amit gruplarının farklı türdeki moleküllerin bir araya gelmesinden dolayı farklı olmasına rağmen birbirine yakın titreşim oluşturup FTIR spektrumuna yüksek oranda katkıda bulunmasıdır. Amit grubuna ve hidrojen bağı oluşumuna sahip farklı moleküllerin sayısı arttıkça birbiriyle hidrojen bağı etkileşiminde bulunan kitosan moleküllerinin sayısı

azalırken amit grubu sayısının artması amit belirleyici piklerde düzleşmeye sebep olur ve hidrojen bağı sinyallerinde azalmaya sebep olmuştur (Fan ve ark. 2014).

4.11. Antibakteriyel aktivite sonuçları

Antibakteriyel özellik hem ambalajlarda hem de tüketilen gıdalarda optimum miktarda olmak şartıyla her zaman arzu edilen bir özellik olmuştur ve tüketicinin tercihlerinde önemli bir etkidir.

Çizelge 4.14. *Escherichia coli* bakterisinin 1/100 ve 1/1000 seyreltme oranında kontrol, kitosan film, PG10 (10 mL *Prunella grandiflora* ekstraktı eklenmiş film) ve kontrol, PG1 (1,0 mL *Prunella grandiflora* ekstraktı eklenmiş film) ve PG5 (5,0 mL *Prunella grandiflora* ekstraktı eklenmiş film) örneklerinin üzerinde 24 saat içindeki çoğalan hücre sayısı (Burada kontrol-1, kitosan film, PG-10 aynı zamanda, kontrol-2, PG5, PG1 farklı zamanda yapıldığı için iki tane kontrol grubu bulunmaktadır)

<i>Escherichia coli</i>		Seyreltme		<i>Escherichia coli</i>		Seyreltme	
		100	1000			100	1000
Kontrol-1	0.saat	36	3	Kontrol-2	0.saat	2	3
	1.saat	31	3		1.saat	65	8
	3.saat	43	4		3.saat	65	9
	6.saat	35	3		6.saat	67	8
	24.saat	33	3		24.saat	85	7
Kitosan film	1.saat	13	1	PG5	1.saat	99	7
	3.saat	8	1		3.saat	72	8
	6.saat	24	2		6.saat	69	19
	24.saat	34	3		24.saat	>>	56
PG10	1.saat	30	3	PG1	1.saat	>>	>>
	3.saat	29	3		3.saat	38	5
	6.saat	130	23		6.saat	10	0
	24.saat	>>	38		24.saat	0	0

Ancak optimum şartlar her gıdada farklı olduğu gibi ambalajlarda da farklılık göstermektedir ancak ambalajların madde geçirgenliği (migrasyon) çok az olduğu için

ambalaj yüzeyinde antibakteriyel özellik ne kadar çok ise o kadar uygun olduğu söylenebilir (Tepe 2008).

Çizelge 4.15. *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aerus* bakterisinin 1/100 ve 1/1000 seyreltme oranında kontrol, kitosan film, PG1 (1,0 mL *Prunella grandiflora* ekstraktı eklenmiş film), PO1 (1,0 mL *Prunella orientalis* ekstraktı eklenmiş film), PL1 (1,0 mL *Prunella laciniata* ekstraktı eklenmiş film) ve PV1 (1,0 mL *Prunella vulgaris* ekstraktı eklenmiş film) örneklerinin üzerinde 24 saat içindeki çoğalan bakteri sayısı.

Bakteri türü		<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
		Seyreltme			
		100	1000	100	1000
Kontrol	0.saat	62	5	77	12
	1.saat	77	10	87	13
	3.saat	97	12	71	12
	6.saat	65	7	24	2
	24.saat	33	4	0	0
Kitosan film	1.saat	0	0	42	8
	3.saat	0	0	2	0
	6.saat	0	0	0	0
	24.saat	0	0	0	0
PG1	1.saat	0	0	0	0
	3.saat	0	0	0	0
	6.saat	0	0	0	0
	24.saat	0	0	0	0
PO1	1.saat	1	0	0	0
	3.saat	0	0	0	0
	6.saat	0	0	0	0
	24.saat	0	0	0	0
PL1	1.saat	0	0	0	0
	3.saat	0	0	0	0
	6.saat	0	0	0	0
	24.saat	0	0	1	0
PV1	1.saat	0	0	0	0
	3.saat	0	0	0	0
	6.saat	0	0	0	0
	24.saat	0	0	0	0

Çizelge 4.14.'teki verilere bakacak olursak kontrol grubunda çoğalmış olan *E.coli* bakterisinin kitosan film üzerinde bir süre boyunca çoğalamadığını yani içinde ekstrakt olmasa bile kitosanın bakterilerin sayısını azalttığını görüyoruz. Bunun nedeni kitosan filmde bulunan serbest amino gruplarının bakterilerin hücrelerine bağlanarak hücre içi bileşenlerin hücre dışına çıkmasını sağlaması ve böylelikle bakterinin yaşamını sürdürememesidir (Chung ve Chen 2008). Çizelge 4.14'e baktığımızda *Prunella grandiflora* ekstraktının miktarının artmasıyla 24 saat içinde canlı bakteri sayısının arttığı görülmektedir. Bunun nedeni filmlerde kullanılmış ekstraktların sayısının artmasıyla kitosanın bakterilerle etkileşiminin azalması ve bakterinin ekstraktları besin olarak kullanabilmeye başlamasındandır.

Ancak biyoaktif fenolik bileşiklerin mikrobiyal hücre zarının fizyolojik değişikliklerine neden olabileceği ve sonuçta bakteri ölümüyle sonuçlanabileceği bildirilmiştir (Kabir ve ark. 2014). Bu etkinin gerçekleştiğini 1.0 mL ekstrakt eklenmiş ekstraktlarda çizelge 4.15.'de görebilmekteyiz. 1.0 mL ekstraktın kullanılmasıyla kitosan film ve uygun miktardaki fenolik madde beraber yüksek antibakteriyel özellik göstermiştir.

Çizelge 4.14.'teki verilere bakarak 1,0 mL ile 5,0 mL arasında *E.coli* ve *S.aureus* bakterilerinin sayısının azalmasını sağlayan maksimum ekstrakt miktarı değeri olduğunu söyleyebiliriz.

4.12. İstatistiksel analiz sonuçları

Tez kapsamında yapılan antioksidan kapasite, toplam fenolik madde, çözünürlük, su buharı geçirgenliği, şişme oranı, nem oranı ve kalınlık ölçüm sonuçları için ortalama değerlere göre örnekler arası ve yöntemler arası yapılan ANOVA analizi (V17,Minitab Inc., State College, PA, USA) .sonuçlarına göre %95 ($P<0,05$) güven seviyesinde örnekler arası anlamlı farklılık bulunmuştur (Ek-2). Yöntemler arası ise oluşan benzer gruplandırmalar %95 güven seviyesinde Ek-2'de verilmiştir.

5. SONUÇ

Ambalajlar her geçen yıl ile birlikte özellikle gıda maddelerinde tüketicilerin tercihlerinde daha önemli bir rol oynamaktadır. Bu çalışmada yenilebilir ve biyobozunur kitosan filmlere *Prunella* bitki ekstraktlarıyla aktif özellikler kazandırmak amaçlanmıştır. *Prunella* türlerinin ekstraktlarının filmlere katılmasıyla hazırlanan bu çalışmada sonuç olarak elde edilen bilgilere bakacak olursak;

- Ekstraksiyon ile *Prunella grandiflora*, *Prunella laciniata*, *Prunella orientalis* ve *Prunella vulgaris* ekstraktlarını elde etmek için %70 lik etanol çözeltisi kullanmak film örneklerinde kullanılmak üzere bitkilerde bulunan fenolik maddelerin ekstraksiyonu için uygundur.
- Kitosan çözeltisini %1 (v/v)'lik glasiyel asetik asit çözeltisi içerisine %1(w/v) hazırlayarak oluşturmak ve plastikleştirici malzeme olarak gliserol kullanmak arzu edilen yenilebilir ve biyobozunur film oluşturmak için uygundur.
- Ekstrakte edilen örnekleri içeren filmler HPLC-DAD ile analiz edilmiştir. Yapılan bu çalışmada fenolik madde olarak rutin, klorojenik asit, kafeik asit, protokatekuik asit ve rosmarinik asit tayin edilmiştir ve kitosan film ile moleküller arası etkileşimde bulunduğu gözlenmiştir.
- ABTS yöntemi ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda kitosan filmlere eklenen *Prunella* bitki özlerinin artmasıyla antioksidan özellik artışı sağlanmıştır ve 12 film örneği içerisinde en fazla antioksidan özellik gösteren film örneği 10,76 (mg TE/g film) değeri ile 10 mL *Prunella grandiflora* ekstraktı eklenmiş olan film örneği olduğu belirlenmiştir.
- Folin-Ciocalteu yöntemi ile fenolik maddelerin eklenmesi filmlerdeki toplam fenolik maddenin artmasına böylelikle de fenolik maddelerin göstermiş olduğu birçok özelliği filmlerin de eklenen ekstrakt miktarı ile doğru orantılı olarak gösterdiği anlaşılmıştır. 12 film örneği içerisinde en fazla toplam fenolik madde tespit edilen film örneği 6,66 (mg GE/g film) değeri ile *Prunella grandiflora* olmuştur.
- Filmlere ekstrakt miktarının artması çözünürlükte, su buharı direncinde, şişme oranında, nem içeriğinde azalma meydana getirmiştir. Kalınlık ekstrakt miktarı

ile alakalı değilken SEM görüntüleri sonucunda da ekstrakt miktarının artmasının yüzeyde daha fazla prz oluşumuna sebep olduğu gözlenmiştir.

- Antibakteriyel aktivite incelemelerinin sonucunda eklenen ekstrakt miktarının artmasının bir noktaya kadar *E.coli* ve *S.aureus* bakterilerinin çoğalmasını durdurup öldürdüğü, sonrasında ise çoğalmasında pozitif etki yaptığı saptanmıştır. Bu kritik değer 1,0 mL ile 5.0 mL ekstrakt arasındadır.

Çalışmada 5 tane fenolik maddenin film örneklerinde yaptığı etki bahsedilmiştir ve farklı bitki ekstraktlarının, katkı maddelerinin, plastikleştiricilerin kullanıldığı daha fazla fiziksel veya kimyasal özelliğin incelendiği çalışmaların yapılması teknolojinin ilerlemesi ile birlikte bu tarz çalışmalarda önem kazanacaktır. Endüstrinin birçok alanında biyobozunur ve yenilebilir malzemelerin kullanımının artması bu çalışmanın oluşumunda büyük bir etken olmuştur.

KAYNAKLAR

- Abugoch, L. E., Tapia, C., Villamán, M. C., Yazdani-Pedram, M., Díaz-Dosque, M. 2011.** Characterization of quinoa protein–chitosan blend edible films. *Food Hydrocolloids*, 25(5): 879–886.
- Aguirre-Loredo, R. Y., Rodríguez-Hernández, A. I., Morales-Sánchez, E., Gómez-Aldapa, C. A., Velazquez, G. 2016.** Effect of equilibrium moisture content on barrier, mechanical and thermal properties of chitosan films. *Food Chemistry*, 196: 560–566.
- Aljawish, A., Chevalot, I., Jasniewski, J., Scher, J., Muniglia, L. 2015.** Enzymatic synthesis of chitosan derivatives and their potential applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 112: 25–39.
- Andrade, M. A., Ribeiro-Santos, R., Costa Bonito, M. C., Saraiva, M., Sanches-Silva, A. 2018a.** Characterization of rosemary and thyme extracts for incorporation into a whey protein based film. *Lwt*, 92(February): 497–508.
- Andrade, M. A., Ribeiro-Santos, R., Costa Bonito, M. C., Saraiva, M., Sanches-Silva, A. 2018b.** Characterization of rosemary and thyme extracts for incorporation into a whey protein based film. *Lwt*, 92(January): 497–508.
- Chung, Y. C., Chen, C. Y. 2008.** Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource Technology*, 99(8): 2806–2814.
- D’Ayala, G., Malinconico, M., Laurienzo, P. 2008.** Marine Derived Polysaccharides for Biomedical Applications: Chemical Modification Approaches. *Molecules*, 13(9): 2069–2106.
- da Silveira, T. F. F., Meinhart, A. D., de Souza, T. C. L., Cunha, E. C. E., de Moraes, M. R., Godoy, H. T. 2017.** Chlorogenic acids and flavonoid extraction during the preparation of yerba mate based beverages. *Food Research International*, 102(September): 348–354.
- Davis, G., Song, J. H. 2006.** Biodegradable packaging based on raw materials from crops and their impact on waste management. *Industrial Crops and Products*, 23(2): 147–161.
- EC 2004, EC 2009:** Regulation (EC) No 1935/2004 of the European Parliament and of the Council of 27 October 2004 on materials and articles intended to come into contact with food and repealing
- Fan, J. M., Ma, W., Liu, G. Q., Yin, S. W., Tang, C. H., Yang, X. Q. 2014.** Preparation and characterization of kidney bean protein isolate (KPI)-chitosan (CH) composite films prepared by ultrasonic pretreatment. *Food Hydrocolloids*, 36: 60–69.
- Ge, L., Zhu, M., Li, X., Xu, Y., Ma, X., Shi, R., Li, D., Mu, C. 2018.** Development of active rosmarinic acid-gelatin biodegradable films with antioxidant and long-term antibacterial activities. *Food Hydrocolloids*, 83(February): 308–316.
- Gil, E., Enache, T., Oliveira-Brett, A. 2013.** Redox Behaviour of Verbascoside and Rosmarinic Acid. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 16(2): 92–97.
- Gullón, B., Lú-Chau, T. A., Moreira, M. T., Lema, J. M., Eibes, G. 2017.** Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. *Trends in Food Science and Technology*, 67: 220–235.

- Guo, Z., Liu, W. 2007.** Biomimic from the superhydrophobic plant leaves in nature: Binary structure and unitary structure. *Plant Science*, 172(6): 1103–1112.
- Gupta, H., Kumar, H., Kumar, M., Gehlaut, A. K., Gaur, A., Sachan, S., Park, J.-W. 2019.** Synthesis of biodegradable films obtained from rice husk and sugarcane bagasse to be used as food packaging material. *Environmental Engineering Research*, 25(4): 506–514.
- Hari, N., Nair, A. J. 2016.** Development and characterization of chitosan-based antimicrobial films incorporated with streptomycin loaded starch nanoparticles. *New Horizons in Translational Medicine*, 3(1): 22–29.
- Hari, N., Francis, S., Rajendran Nair, A. G., Nair, A. J. 2018.** Synthesis, characterization and biological evaluation of chitosan film incorporated with β -Carotene loaded starch nanocrystals. *Food Packaging and Shelf Life*, 16(February): 69–76.
- Harish Prashanth, K. V., Tharanathan, R. N. 2007.** Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. *Trends in Food Science and Technology*, 18(3): 117–131.
- Hazer, B. 2011.** Biyobozunur Plastik Ambalaj Malzemeleri, “Çerçeve Çalışması”. , 3–4.
- Huang, S., Xiong, Y., Zou, Y., Dong, Q., Ding, F., Liu, X., Li, H. 2019.** A novel colorimetric indicator based on agar incorporated with *Arnebia euchroma* root extracts for monitoring fish freshness. *Food Hydrocolloids*, 90(December 2018): 198–205.
- Hurley, B. R. A., Ouzts, A., Fischer, J., Gomes, T. 2013.** Paper Presented At Iapri World Conference 2012 Effects of Private and Public Label Packaging on Consumer Purchase Patterns. *Packaging and Technology and Science*, 29(January): 399–412.
- Işik, E., Şahin, S., Demirn, C. 2013.** Development of a new chromium reducing antioxidant capacity (CHROMAC) assay for plants and fruits. *Talanta*, 111: 119–124.
- Kabir, F., Katayama, S., Tanji, N., Nakamura, S. 2014.** Antimicrobial effects of chlorogenic acid and related compounds. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 57(3): 359–365.
- Katanić Stanković, J. S., Srećković, N., Mišić, D., Gašić, U., Imbimbo, P., Monti, D. M., Mihailović, V. 2020.** Bioactivity, biocompatibility and phytochemical assessment of lilac sage, *Salvia verticillata* L. (Lamiaceae) - A plant rich in rosmarinic acid. *Industrial Crops and Products*, 143: 111932.
- Kaya, M., Ravikumar, P., Ilk, S., Mujtaba, M., Akyuz, L., Labidi, J., Salaberria, A. M., Cakmak, Y. S., Erkul, S. K. 2018.** Production and characterization of chitosan based edible films from *Berberis crataegina*'s fruit extract and seed oil. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 45(December 2017): 287–297.
- Kılınç, M., Tomar, O., Çağlar, A. 2017.** Biyobozunur Gıda Ambalaj Malzemeleri. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17(3): 988–996.
- Kittikaiwan, P., Powthongsook, S., Pavasant, P., Shotipruk, A. 2007.** Encapsulation of *Haematococcus pluvialis* using chitosan for astaxanthin stability enhancement. *Carbohydrate Polymers*, 70(4): 378–385.
- Konsoula, Z., Liakopoulou-Kyriakides, M. 2010.** Effect of endogenous antioxidants

- of sesame seeds and sesame oil to the thermal stability of edible vegetable oils. *LWT - Food Science and Technology*, 43(9): 1379–1386.
- K. Mouryaa, V., N. Inamdara, N., Tiwari, A. 2010.** Carboxymethyl Chitosan And Its Applications. *Advanced Materials Letters*, 1(1): 11–33.
- Kurek, M., Guinault, A., Voilley, A., Galić, K., Debeaufort, F. 2014.** Effect of relative humidity on carvacrol release and permeation properties of chitosan based films and coatings. *Food Chemistry*, 144: 9–17.
- Laura, P. F., Garzón, M. T., Vicente, M. 2010.** Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1): 161–171.
- Liu, J., Liu, S., Wu, Q., Gu, Y., Kan, J., Jin, C. 2017.** Effect of protocatechuic acid incorporation on the physical, mechanical, structural and antioxidant properties of chitosan film. *Food Hydrocolloids*, 73: 90–100.
- López-De-Dicastillo, C., Alonso, J. M., Catalá, R., Gavara, R., Hernández-Munoz, P. 2010.** Improving the antioxidant protection of packaged food by incorporating natural flavonoids into ethylene-vinyl alcohol copolymer (EVOH) films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(20): 10958–10964.
- Lukasik, K. V., Ludescher, R. D. 2006.** Molecular mobility in water and glycerol plasticized cold- and hot-cast gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 20(1): 96–105.
- Luo, C., Zou, L., Sun, H., Peng, J., Gao, C., Bao, L., Ji, R., Jin, Y., Sun, S. 2020.** A Review of the Anti-Inflammatory Effects of Rosmarinic Acid on Inflammatory Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 11:.
- Madihally, S. V., Matthew, H. W. T. 1999.** Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 20(12): 1133–1142.
- Masek, A., Latos, M., Piotrowska, M., Zaborski, M. 2018.** The potential of quercetin as an effective natural antioxidant and indicator for packaging materials. *Food Packaging and Shelf Life*, 16(September 2017): 51–58.
- Mayachiew, P., Devahastin, S. 2010.** Effects of drying methods and conditions on release characteristics of edible chitosan films enriched with Indian gooseberry extract. *Food Chemistry*, 118(3): 594–601.
- McHugh, T. H., Avena-Bustillos, R. J., Du, W.-X. 2009.** Extension of Shelf Life and Control of Human Pathogens in Produce by Antimicrobial Edible Films and Coatings. *Microbial Safety of Fresh Produce : Microbial Safety of Fresh Produce*, Oxford, UK, : Wiley-Blackwell: , 225–239.
- Moratti, S. C., Cabral, J. D. 2017.** Antibacterial properties of chitosan. *Chitosan Based Biomaterials Volume 1 : Chitosan Based Biomaterials Volume 1 (C. 1)*, Elsevier: , 31–44.
- Moreno, M. A., Orqueda, M. E., Gómez-Mascaraque, L. G., Isla, M. I., López-Rubio, A. 2019.** Crosslinked electrospun zein-based food packaging coatings containing bioactive chillo fruit extracts. *Food Hydrocolloids*, 95(May): 496–505.
- Mourya, V. K., Inamdar, N. N. 2008.** Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. *Reactive and Functional Polymers*, 68(6): 1013–1051.
- Nakatani, N. 2000.** Phenolic antioxidants from herbs and spices. *BioFactors*, 13(1–4): 141–146.
- Ortiz, R. 2010.** Molecular Plant Breeding. *Crop Science*, 50(5): 2196–2197.
- Parnham, M. J., Kesselring, K. 1985.** Rosmarinic acid. *Drugs of the Future*, 10(9): 756.

- Pinkas, L. 1971.** Food habits study. *Fishery Bulletin*, 152(5): 10.
- Pittia, P., Sacchetti, G. 2008.** Antiplasticization effect of water in amorphous foods. A review. *Food Chemistry*, 106(4): 1417–1427.
- Plastics Europe, G. M. R., Conversio Market & Strategy GmbH 2019.** Plastics - the Facts 2019. .
- Portugal Zegarra, M. del C. C., Santos, A. M. P., Silva, A. M. A. D., Melo, E. de A. 2018.** Chitosan films incorporated with antioxidant extract of acerola agroindustrial residue applied in chicken thigh. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(4): 1–12.
- Psotová, J., Kolář, M., Soušek, J., Švagera, Z., Vičar, J., Ulrichová, J. 2003.** Biological activities of *Prunella vulgaris* extract. *Phytotherapy Research*, 17(9): 1082–1087.
- Rambabu, K., Bharath, G., Banat, F., Show, P. L., Cocolletzi, H. H. 2019.** Mango leaf extract incorporated chitosan antioxidant film for active food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126: 1234–1243.
- Ramziia, S., Ma, H., Yao, Y., Wei, K., Huang, Y. 2018.** Enhanced antioxidant activity of fish gelatin–chitosan edible films incorporated with procyanidin. *Journal of Applied Polymer Science*, 135(10):.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999.** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 1231-1237.
- Rechia, L. M., de Jesus Morona, J. B., Zepon, K. M., Soldi, V., Kanis, L. A. 2010.** Mechanical properties and total hydroxycinnamic derivative release of starch/glycerol/*Melissa officinalis* extract films. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(3): 491–497.
- Reis, B., Martins, M., Barreto, B., Milhazes, N., Garrido, E. M., Silva, P., Garrido, J., Borges, F. 2010.** Structure–Property–Activity Relationship of Phenolic Acids and Derivatives. Protocatechuic Acid Alkyl Esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(11): 6986–6993.
- Riaz, A., Lei, S., Akhtar, H. M. S., Wan, P., Chen, D., Jabbar, S., Abid, M., Hashim, M. M., Zeng, X. 2018.** Preparation and characterization of chitosan-based antimicrobial active food packaging film incorporated with apple peel polyphenols. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114: 547–555.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. 1996.** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7): 933–956.
- Rinaudo, M. 2006.** Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 31(7): 603–632.
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., Iseki, K. 2011.** In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 403(1–2): 136–138.
- Saykova, I., Tylkowski, B., Popovici, C., Peev, G. 2018.** Extraction of phenolic and flavonoid compounds from solid wastes of grape seed oil production by cold pressing. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, 53(2): 177–190.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. 1999.** Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152-178.

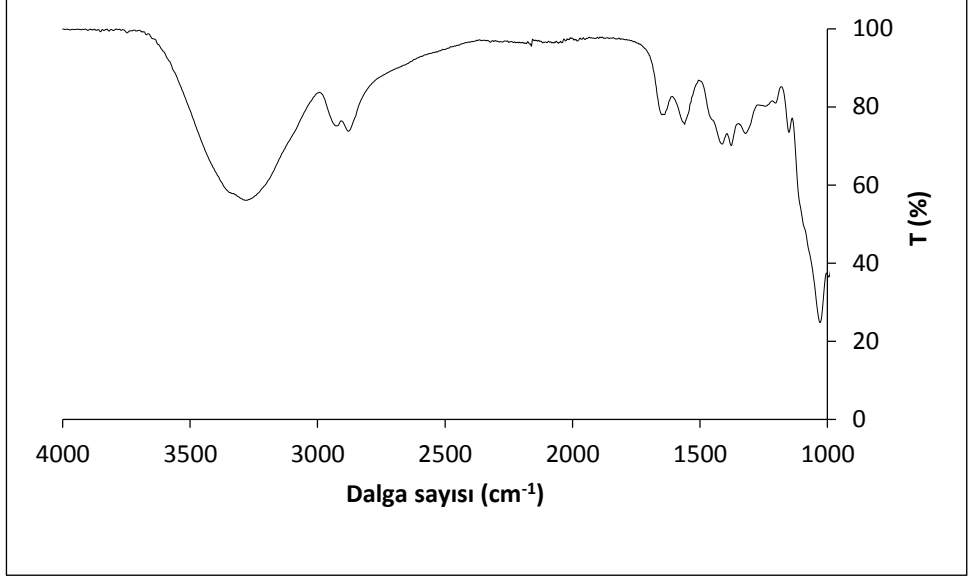
- Şahin, S. 2011.** Türkiye’de Yetişen *Prunella L.* Türlerinin Fenolik Bileşikleri Ve Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesinde Analitik Metotlar. *Doktora Tezi*, UÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Bursa.
- Şahin, S., Demir, C., Malyer, H. 2011.** Determination of phenolic compounds in *Prunella L.* by liquid chromatography-diode array detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55(5): 1227–1230.
- Şahin, S., Işık, E., Aybastier, Ö., Demir, C. 2012.** Orthogonal signal correction-based prediction of total antioxidant activity using partial least squares regression from chromatograms. *Journal of Chemometrics*, 26: 390–399.
- Şahin, S., Oran, S., Şahintürk, P., Demir, C., Öztürk, Ş. 2015.** Ramalina lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant and antimicrobial agents. *Journal of Food Biochemistry*, 39: 471-477.
- Şahin, S., Nasir, N. T. B. M., Erken, I., Çakmak, Z. E., Çakmak, T. 2019.** Antioxidant composite films with chitosan and carotenoid extract from *Chlorella vulgaris*: Optimization of ultrasonic-assisted extraction of carotenoids and surface characterization of chitosan films. *Materials Research Express*, 6(9).
- Tabba, H. D., Chang, R. S., Smith, K. M. 1989.** Isolation, purification, and partial characterization of prunellin, an anti-HIV component from aqueous extracts of *Prunella vulgaris*. *Antiviral Research*, 11(5–6): 263–273.
- Tepe, B. 2008.** Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher ex Bentham) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey. *Bioresource Technology*, 99(6): 1584–1588.
- TGK 2018.** Türk Gıda Kodeksi Gıda İle Temas Eden Madde Ve Malzemelere Dair Yönetmelik
- Tlili, N., Sarikurcu, C. 2020.** Bioactive compounds profile, enzyme inhibitory and antioxidant activities of water extracts from five selected medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 151: 112448.
- Tomac, I., Šeruga, M. 2016.** Electrochemical properties of chlorogenic acids and determination of their content in coffee using differential pulse voltammetry. *International Journal of Electrochemical Science*, 11(4): 2854–2876.
- Touwaide, A., Appetiti, E. 2013.** Knowledge of Eastern materia medica (Indian and Chinese) in pre-modern Mediterranean medical traditions: A study in comparative historical ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 148(2): 361–378.
- Tsushida, T., Suzuki, M., Kurogi, M. 1994.** Evaluation of Antioxidant Activity of Vegetable Extracts and Determination of Some Active Compounds. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 41(9): 611–618.
- Uz, M., Altinkaya, S. A. 2011.** Development of mono and multilayer antimicrobial food packaging materials for controlled release of potassium sorbate. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10): 2302–2309.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A. 2009.** Effect of adding citrus waste water, thyme and oregano essential oil on the chemical, physical and sensory characteristics of a bologna sausage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(4): 655–660.
- Vostálová, J., Zdařilová, A., Svobodová, A. 2010.** *Prunella vulgaris* extract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HaCaT keratinocytes. *Archives of Dermatological Research*, 302(3): 171–181.
- Vunain, E., Mishra, A. K., Mamba, B. B. 2017.** Fundamentals of chitosan for

biomedical applications. *Chitosan Based Biomaterials Volume 1 : Chitosan Based Biomaterials Volume 1* (C. 1), Elsevier: , 3–30.

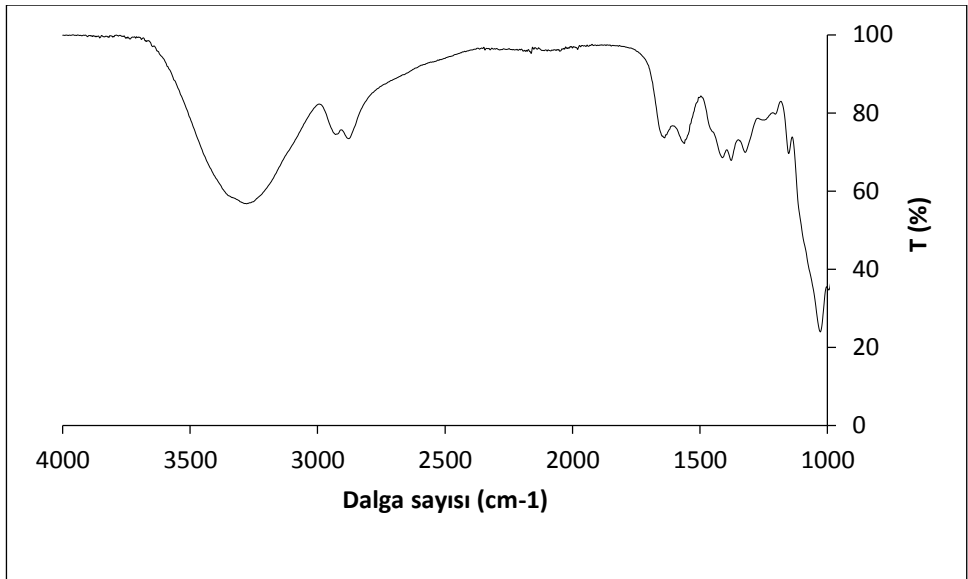
- Xia, B., Yan, D., Bai, Y., Xie, J., Cao, Y., Liao, D., Lin, L. 2015.** Determination of phenolic acids in *Prunella vulgaris* L.: A safe and green extraction method using alcohol-based deep eutectic solvents. *Analytical Methods*, 7(21): 9354–9364.
- Yang, J., Guo, J., Yuan, J. 2008.** In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT - Food Science and Technology*, 41(6): 1060–1066.
- Yong, H., Wang, X., Zhang, X., Liu, Y., Qin, Y., Liu, J. 2019.** Effects of anthocyanin-rich purple and black eggplant extracts on the physical, antioxidant and pH-sensitive properties of chitosan film. *Food Hydrocolloids*, 94(March): 93–104.
- Zhang, X., Liu, J., Qian, C., Kan, J., Jin, C. 2019.** Effect of grafting method on the physical property and antioxidant potential of chitosan film functionalized with gallic acid. *Food Hydrocolloids*, 89(September 2018): 1–10.
- Zou, P., Yang, X., Wang, J., Li, Y., Yu, H., Zhang, Y., Liu, G. 2016.** Advances in characterisation and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides. *Food Chemistry*, 190(12): 1174–1181.

EKLER

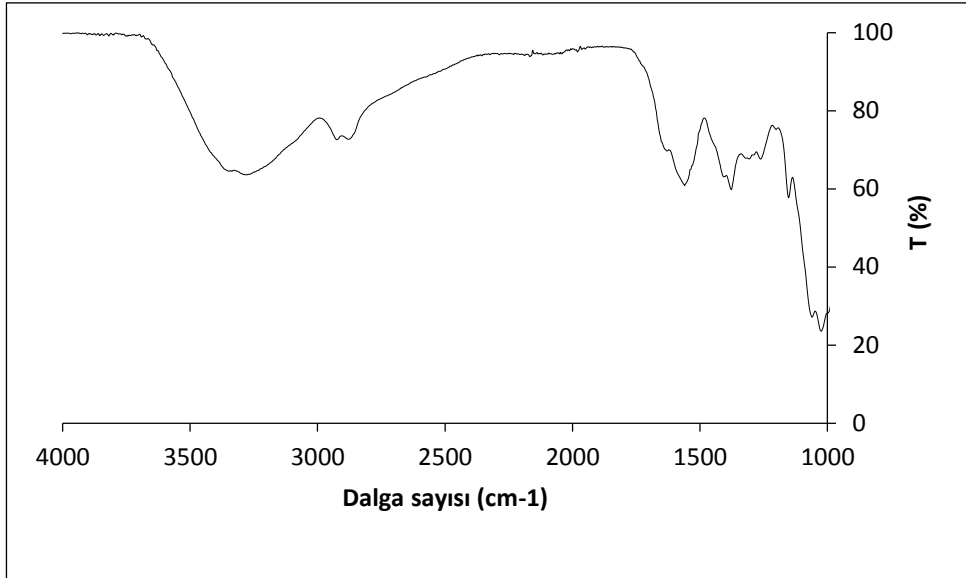
- EK 1.** *Prunella* türlerinin 1 mL, 5 mL, ve 10 mL ekstraktları ile hazırlanmış filmlerin ve rosmarinik asidin FTIR spektrumları (spektrumların altındaki filmleri temsil eden kısaltmalar tezin kısaltmalar kısmında belirtilmiştir)



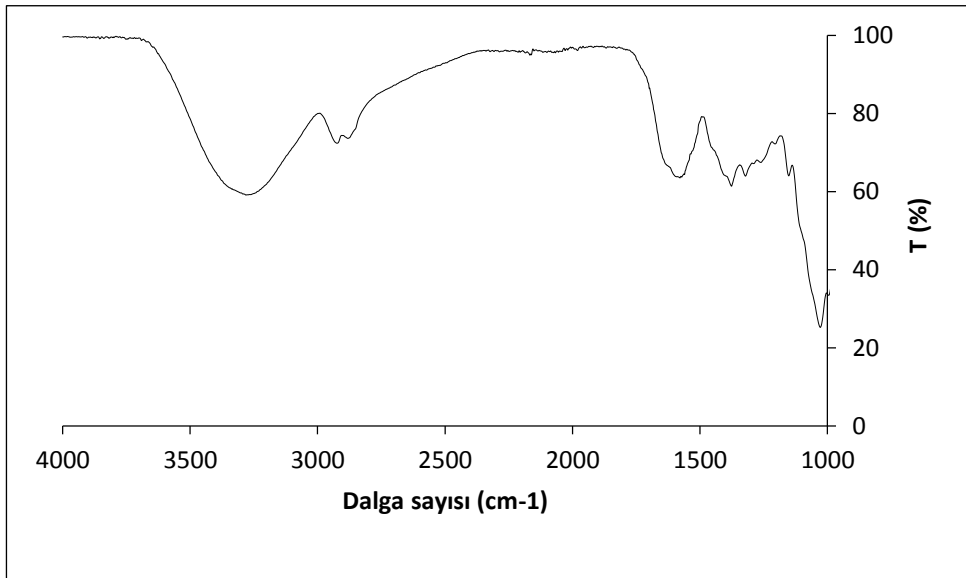
Kör numune



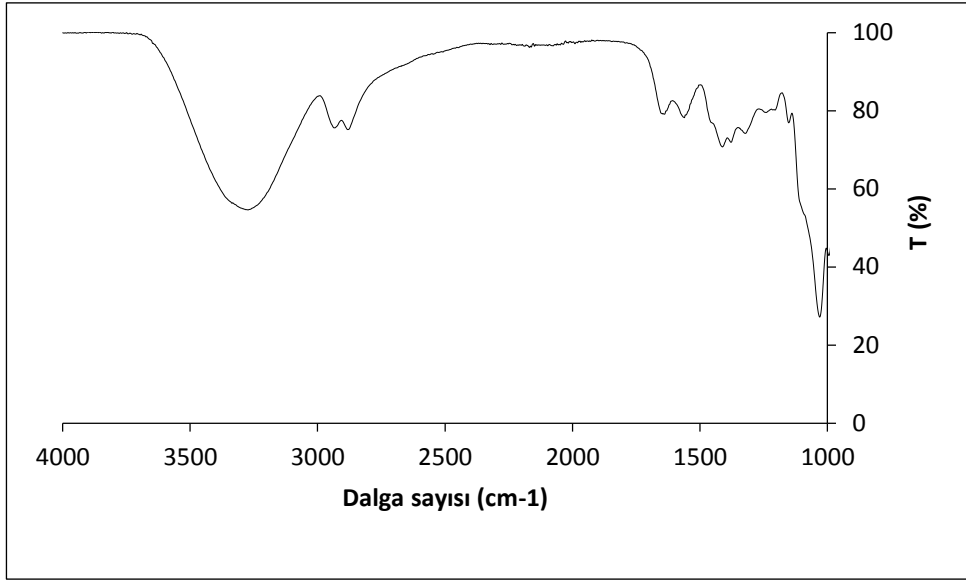
PV1



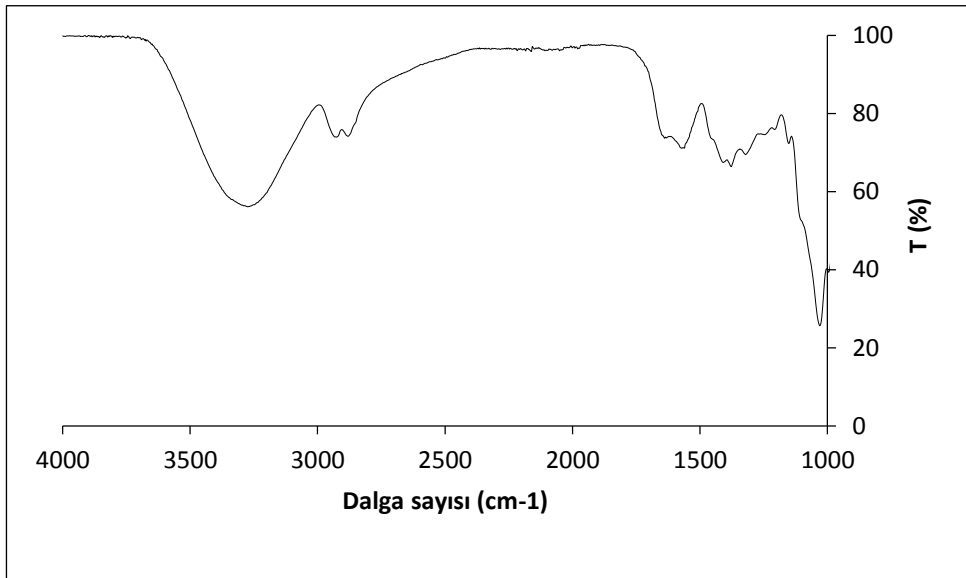
PV5



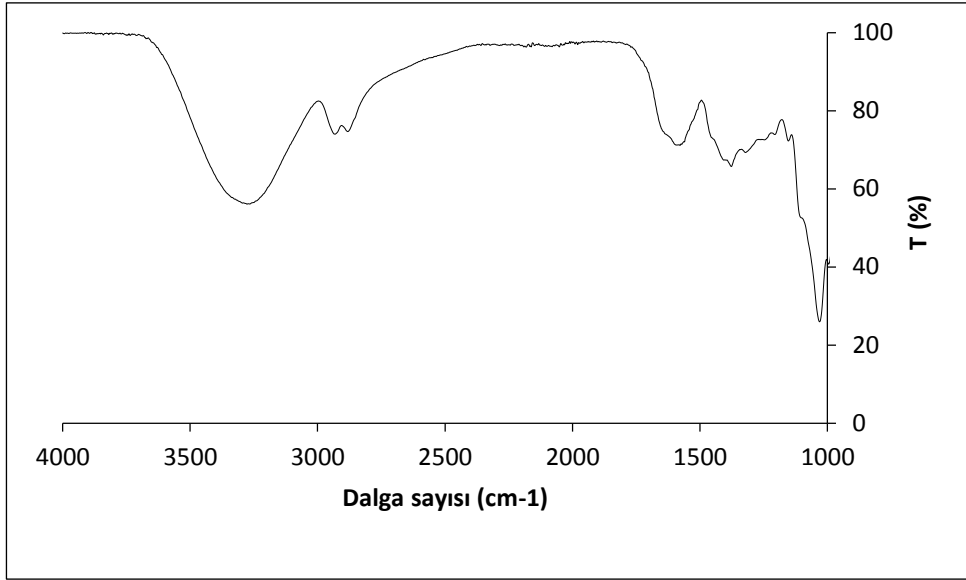
PV10



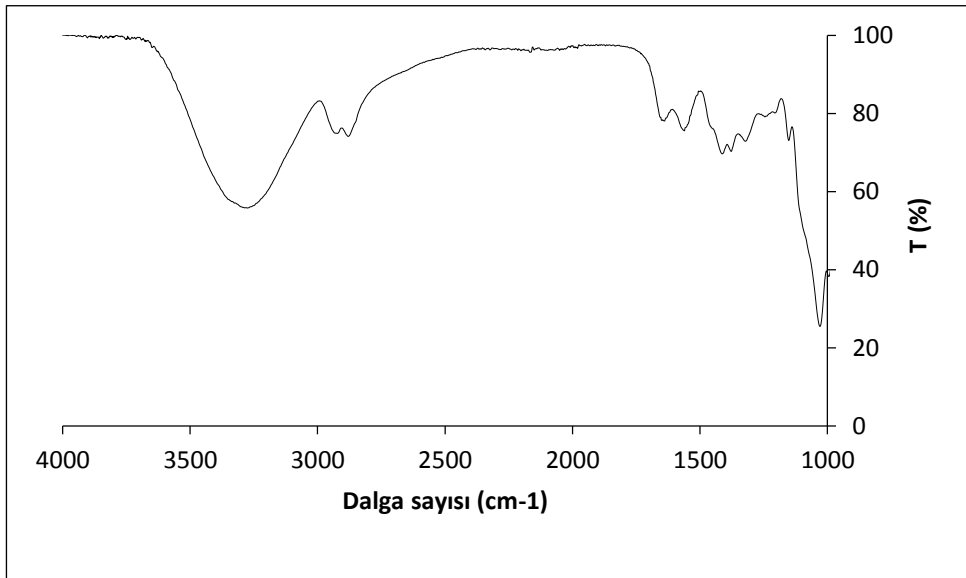
PG1



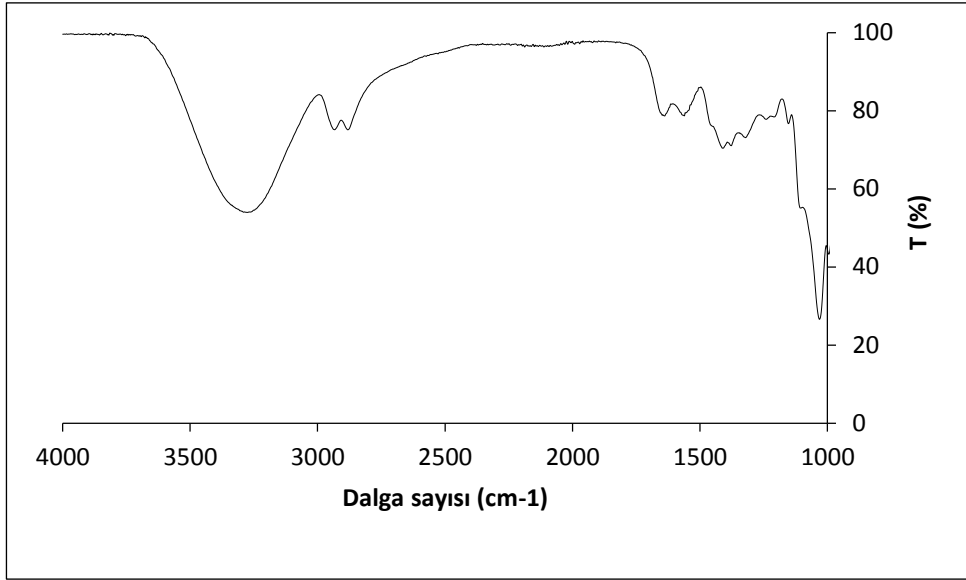
PG5



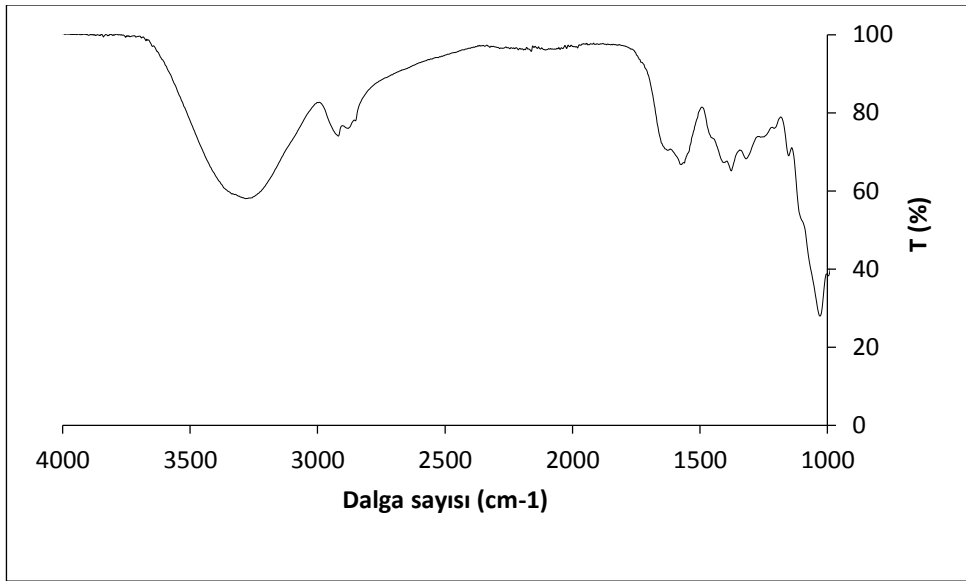
PG10



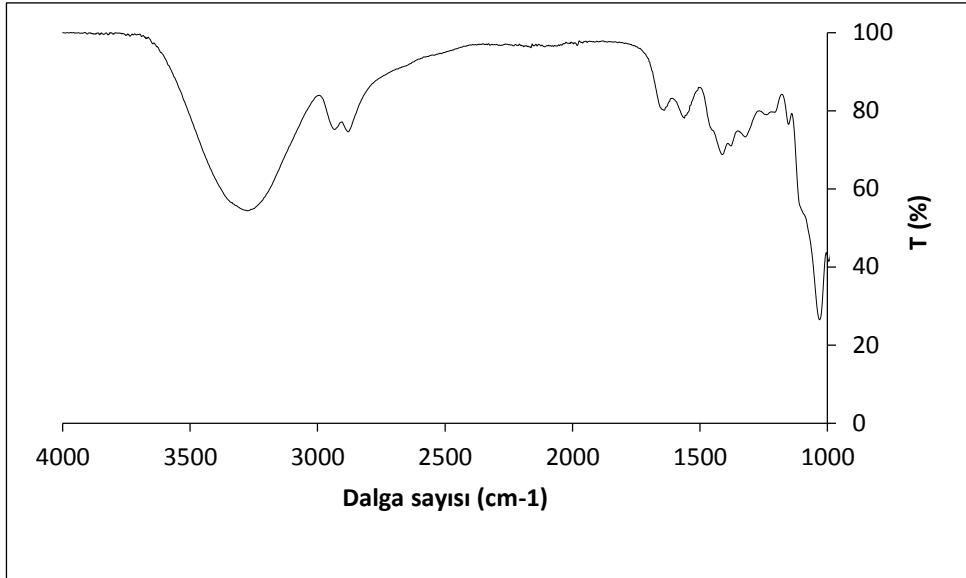
PO1



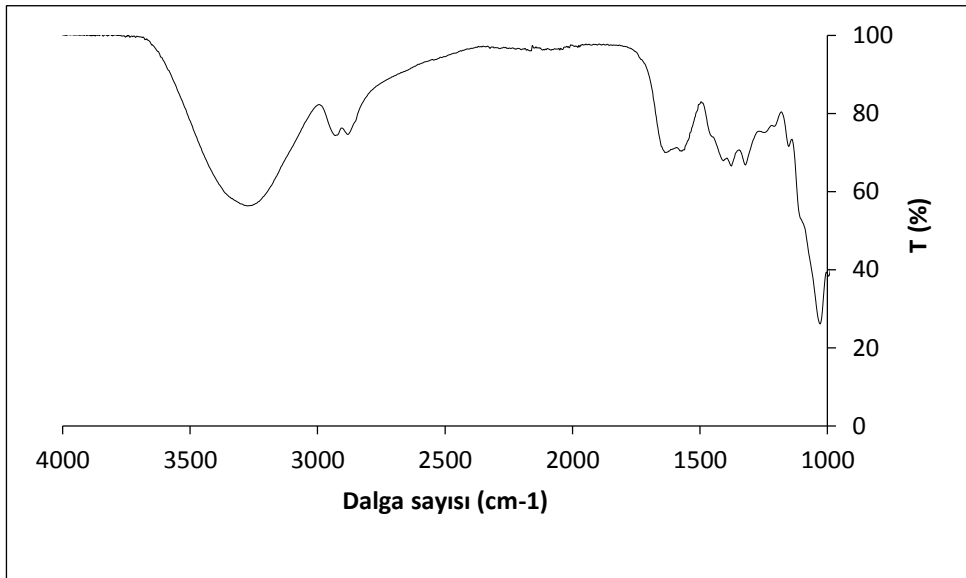
PO5



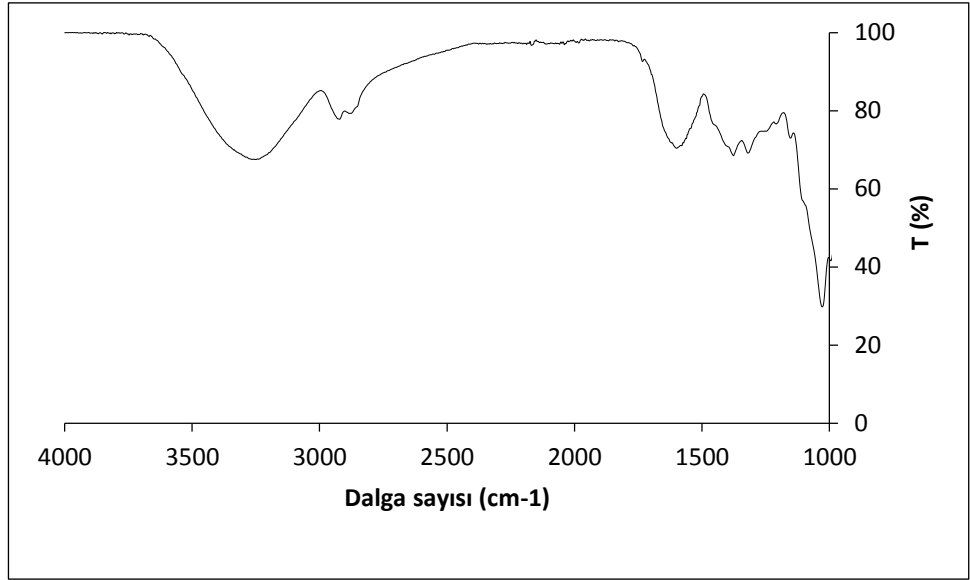
PO10



PL1



PL5



PL10

EK 2. ANOVA istatistiksel analiz sonuçları (a-l arası örnekler arasındaki farklı gruplandırmayı, A-C arası da yöntemler arası farklı gruplandırmayı temsil etmektedir, P<0,05)

Bitki ekstraktı türü	Film içindeki ekstrakt hacmi (mL)	Antioksidan kapasite (mg TE/g film)	Toplam fenolik madde (mg GE/g film)	Çözünürlük (w/w %)	Su buharı geçirgenliği (x 10⁻⁸ g/m s kPa)	Şişme oranı (%)	Nem oranı (%)	Kalınlık (milimetre)
<i>Prunella grandiflora</i>	1	0,7 ^{i,C}	1,46 ^{f,C}	64,86 ^{b,A}	4,16 ^{c,C}	75,30 ^{c,A}	47,38 ^{c,B}	0,19 ^{i,C}
	5	5,09 ^{d,C}	2,71 ^{c,C}	62,04 ^{d,A}	4,08 ^{d,C}	68,55 ^{d,A}	37,56 ^{f,B}	0,26 ^{b,C}
	10	10,76 ^{a,C}	6,66 ^{a,C}	58,42 ^{g,A}	3,21 ^{e,C}	41,63 ^{k,A}	30,86 ^{h,B}	0,16 ^{j,C}
<i>Prunella laciniata</i>	1	0,61 ^{j,C}	1,15 ^{i,C}	63,43 ^{c,A}	3,06 ^{f,C}	57,29 ^{g,A}	57,03 ^{a,B}	0,28 ^{a,C}
	5	3,22 ^{e,C}	1,19 ^{g,C}	61,77 ^{f,A}	2,79 ^{g,C}	49,20 ^{i,A}	39,67 ^{e,B}	0,22 ^{c,C}
	10	6,51 ^{b,C}	2,92 ^{b,C}	55,19 ^{i,A}	2,63 ^{h,C}	43,48 ^{j,A}	23,08 ^{l,B}	0,20 ^{f,C}
<i>Prunella orientalis</i>	1	0,51 ^{l,C}	0,11 ^{l,C}	65,25 ^{a,A}	4,47 ^{a,C}	89,10 ^{a,A}	47,95 ^{b,B}	0,19 ^{h,C}
	5	1,52 ^{h,C}	0,88 ^{k,C}	57,25 ^{h,A}	4,16 ^{b,C}	62,88 ^{e,A}	31,58 ^{g,B}	0,21 ^{e,C}
	10	2,55 ^{f,C}	1,16 ^{h,C}	52,69 ^{k,A}	1,58 ^{k,C}	41,27 ^{l,A}	25,10 ^{i,B}	0,15 ^{k,C}
<i>Prunella vulgaris</i>	1	0,59 ^{k,C}	0,94 ^{i,C}	61,88 ^{e,A}	1,97 ^{i,C}	85,42 ^{b,A}	40,65 ^{d,B}	0,19 ^{g,C}
	5	1,68 ^{g,C}	1,7 ^{e,C}	54,37 ^{j,A}	1,64 ^{l,C}	59,59 ^{l,A}	20,78 ^{k,B}	0,14 ^{l,C}
	10	5,32 ^{c,C}	2,32 ^{d,C}	46,58 ^{l,A}	1,42 ^{l,C}	55,25 ^{h,A}	17,60 ^{l,B}	0,21 ^{d,C}

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : İlker ERKEN
Doğum Yeri ve Tarihi : BURSA - 12/07/1989
Yabancı Dil : İngilizce - Japonca

Eğitim Durumu
Lise : Bursa Malcılar Lisesi
Lisans : İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü (Kimya- ing)
Yüksek Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen bilimleri enstitüsü, Kimya ana bilim dalı, Analitik kimya bilim dalı

İletişim (e-posta) : ilkererken1635@gmail.com

Yayınları : **Şahin S., Nasir N. T. M., Erken İ., Çakmak Z. E., Çakmak T. 2019** Antioxidant composite films with chitosan and carotenoid extract from *Chlorella vulgaris*: optimization of ultrasonic-assisted extraction of carotenoids and surface characterization of chitosan films. *Materials Research Express* 6(9):095404.