

**TARIMSAL ATIK VE NANO-YAPILI YARI-İLETKEN BAZLI,  
ANTİMİKROBİK, BİYOBOZUNUR FİLMLEİN ÜRETİLMESİ  
VE KARAKTERİZASYONU**

**Proje No: 107M450**

Prof. Dr. UFUK BAKIR  
Prof. Dr. GÜRKAN KARAKAŞ

HAZİRAN 2010  
ANKARA

## ÖNSÖZ

Yenilenebilir bir kaynak olmayan ve gün geçtikçe tükenen petrolden üretilen ürünler yerine yenilenebilir ve doğal kaynaklardan elde edilen çevre dostu ürünlerle ilgili çalışmalar son yılların en önemli araştırma konularından birisidir. Ülkemizde yüksek miktarlarda üretilen tarım ürünlerinin beraberinde getirdiği tarımsal atıklar, yüksek katma değerli çeşitli ürünlerin üretilmesinde yenilenebilir ham maddeler olarak kullanılabilir. Bu şekilde hem ekonomik değeri olmayan bu tür çeşitli atıklardan katma değeri yüksek ürünlerin elde edilmesi, hem de bu atıkların bertarafının yarattığı sıkıntının giderilmesi mümkündür. Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'nun (TÜBİTAK) verdiği destekle gerçekleşen söz konusu projede, tarımsal bir atık olan pamuk sapı kullanılarak biyobozunur plastik filmler elde edilmiş ve bu filmler titanyum dioksit kullanımı vasıtasıyla antimikrobik özelliğe sahip hale getirilmiştir.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	6
ABSTRACT .....	7
1.GİRİŞ .....	8
2.GENEL BİLGİLER.....	9
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	16
3.1. Pamuk ve Ayçiçeği Sapının Kimyasal Analizi .....	16
3.1.1. Selüloz Miktarının Tayini .....	16
3.1.2. Hemiselüloz Miktarının Tayini .....	16
3.1.3. Lignin Miktarının Tayini.....	16
3.2. Pamuk ve Ayçiçeği Sapı Ksilanının Monosakkarit ve Üronik Asit Analizi.....	17
3.2.1. Monosakkarit Analizi .....	17
3.2.2. Üronik Asit Analizi .....	17
3.3. Ksilanın Doğal Kaynaklardan Özütlenmesi .....	18
3.4. Antimikrobik Karakterizasyon .....	19
3.4.1. <i>Escherichia coli</i> ve <i>Staphylococcus aureus</i> .....	19
3.4.2. <i>Sachharomyces cerevisiae</i> .....	19
3.4.3. <i>Aspergillus niger</i> .....	19
3.5. Mekanik Karakterizasyon .....	20
3.6. Su Buharı Geçirme Hızı .....	20
3.7. Atomik Kuvvet Mikroskopisi.....	21
3.8. Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi .....	21
3.9. Biyobozunurluk Testleri.....	21
3.10. Renk Ölçümü.....	23
3.11. Işık Geçirgenliği .....	23
3.12. Oksijen Geçirgenliğinin Belirlenmesi .....	23
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA .....	24
4.1. Tarımsal Atıkların İçeriği.....	24
4.2 Plastikleştirici Cinsinin Film Oluşumu Üzerindeki Etkisi .....	26
4.2.1 Plastikleştirici Cinsinin Glüten Bazlı Filmler Üzerindeki Etkisi .....	26
4.2.2. Plastikleştirici Cinsinin Ksilan Bazlı Filmler Üzerindeki Etkisi.....	27
4.3. Filmlerin Antimikrobik Özellikleri .....	30
4.3.1. Sol-jel Solüsyonu ile Kaplanmış Filmlerin Özellikleri .....	30
4.3.2. Filmlere sol-gel solüsyonunun eklenmesi .....	39
4.3.3. Filmlere Toz Halde TiO <sub>2</sub> Eklenmesi .....	44
4.4. Filmlerin Antimikrobik Özellikleri Dışındaki Diğer Özellikleri .....	51
4.4.1. Filmlerin Mekanik Özellikleri.....	51
4.4.2. Filmlerin Su Buharı Geçirme Hızları .....	53
4.4.3. Filmlerin Yüzey Yapısı Özellikleri .....	54
4.4.4. Filmlerin Biyobozunurluk Özellikleri .....	55
4.4.5. Filmlerin Renk Özellikleri .....	56
4.4.6. Filmlerin Işık Geçirgenlikleri .....	58
4.4.7. Filmlerin Oksijen Geçirgenliği .....	59
4.5. Öneriler.....	59
REFERANSLAR .....	61
TÜBİTAK PROJE ÖZET BİLGİ FORMU .....	65

## TABLO ve ŞEKİL LİSTELERİ

### TABLolar

Tablo 4.1. Pamuk sapı ve ayçiçek sapının kimyasal içeriği .....	24
Tablo 4.2. Pamuk ve ayçiçeği sapı ksilanı monosakkarit kompozisyonu .....	25
Tablo 4.3. TiO <sub>2</sub> içeren ve içermeyen filmlerin mekanik özellikleri .....	52
Tablo 4.4. TiO <sub>2</sub> içeren ve içermeyen filmlerin su buharı geçirme hızları .....	53

### ŞEKİLLER

Şekil 3.1. Üronik asit tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu .....	18
Şekil 3.2. Biyobozunurluk testlerinde kullanılan sistem .....	22
Şekil 4.1. Plastikleştirici olarak gliserol (a), sorbitol (b) ve ksilitol (c) kullanılarak elde edilen buğday glütenu bazlı filmler .....	27
Şekil 4.2. Plastikleştirici olarak gliserol kullanılmasının huş ağacı ksilanı bazlı filmlere etkisi .....	28
Şekil 4.3. Plastikleştirici olarak ksilitol kullanılmasının huş ağacı ksilanı bazlı filmlere etkisi .....	28
Şekil 4.4. Plastikleştirici olarak sorbitol kullanılmasının huş ağacı ksilanı bazlı filmlere etkisi .....	29
Şekil 4.5. Plastikleştirici olarak ksilitol kullanılmasının pamuk sapı ksilanı bazlı filmlere etkisi .....	30
Şekil 4.6. Buğday glütenu bazlı filmlerin sol-jel solüsyonu ile 30 dakika kaplanmaları öncesi (a) ve sonrası (b) görünümüleri .....	31
Şekil 4.7. Pamuk sapı ksilanı bazlı filmin antimikrobik olarak kaplanmasının ardından aldığı görünüm .....	31
Şekil 4.8. Glüten bazlı filmlerin 30 dakika kaplanmaları sonucunda filmlerden 1 saat sonunda güneş ışığına özdeş ışık altında elde edilen koloni sayıları .....	33
Şekil 4.9. Nitrik asit yerine hidroklorik asit kullanılmış sol-jel ile 30 dakika kaplanmış gluten bazlı filmlerden 1 saat sonunda güneş ışığına özdeş ışık altında elde edilen koloni sayıları ..	34
Şekil 4.10. Ksilan bazlı filmlerin sol-jel solüsyonu ile kaplanmadan önce (a) ve 15 saniye kaplandıktan sonra (b) aldıkları görünüm .....	35
Şekil 4.11. Ksilan bazlı filmlerin 15 saniye kaplanmaları sonucunda filmlerden 1 saat sonunda güneş ışığına özdeş ışık altında elde edilen koloni sayıları .....	36
Şekil 4.12. Ksilan bazlı filmlerin 15 saniye kaplanmaları sonucunda filmlerden 1 saat sonunda güneş ışığına özdeş ışık altında elde edilen koloni sayıları .....	38
Şekil 4.13. Ksilan bazlı filmlerin 15 saniye kaplanmaları sonucunda filmlerden 20 dakika sonunda siyah ışık altında elde edilen koloni sayıları .....	39
Şekil 4.14. Film solüsyonuna sol-jel eklenmesiyle elde edilen ksilan bazlı film .....	40
Şekil 4.15. Film solüsyonuna sol-jel eklenmesiyle elde edilen ksilan bazlı filmlerden 1 saat sonunda güneş ışığına özdeş ışık altında elde edilen koloni sayıları .....	41
Şekil 4.16. Sol-jel içermeyen (a) ve sol-jel içeren (b) ksilan bazlı filmlerin elektron mikroskopunda 1000x büyütme oranındaki yüzey görünümüleri .....	42
Şekil 4.17. Sol-jel içermeyen ksilan bazlı filmin EDX analizi .....	43
Şekil 4.18. Sol-jel içeren filmin EDX analizi .....	43

Şekil 4.19. Toz halde titanyum dioksit eklenmesiyle elde edilen ksilan bazlı filmlerin üst (a) ve alt (b) taraflarının görünümü .....	44
Şekil 4.20. Toz halde titanyum dioksit içeren ksilan bazlı filmlerden siyah ışık altında 1 saat sonunda elde edilen koloni sayıları .....	45
Şekil 4.21. TiO <sub>2</sub> içermeyen (a) ve toz halde TiO <sub>2</sub> içeren ksilan bazlı filmlerin üst (b) ve alt (c) yüzeylerinin görünümü .....	47
Şekil 4.22. Toz halde %10 oranında TiO <sub>2</sub> içeren ve içermeyen ksilan bazlı filmlerin siyah ışık altında 1 saat sonundaki <i>E.coli</i> 'ye karşı antimikrobik etkisi .....	48
Şekil 4.23. Toz halde %10 oranında TiO <sub>2</sub> içeren ve içermeyen ksilan bazlı filmlerin <i>E.coli</i> 'ye karşı antimikrobik etkisi .....	49
Şekil 4.24. Farklı mikroorganizmaların fotokatalitik antimikrobiyel aktivite üstündeki etkisi .....	51
Şekil 4.25. TiO <sub>2</sub> içeren ve içermeyen filmlerin çekme dayanımı-sünme eğrileri .....	52
Şekil 4.26. TiO <sub>2</sub> içeren ve içermeyen filmlerin bulunduğu sistemdeki zamana karşı toplam net ağırlık artışı .....	53
Şekil 4.27. TiO <sub>2</sub> içeren filmlerin üst (a) ve alt (b) yüzeylerinin atomik kuvvet mikroskopundan elde edilen yüzey görünümleri ve yüzey morfolojileri .....	55
Şekil 4.28. Filmlerin zamana karşı biyobozunmaları .....	56
Şekil 4.29. TiO <sub>2</sub> içeren ve içermeyen filmlerin L* değerleri .....	57
Şekil 4.30. TiO <sub>2</sub> içeren ve içermeyen filmlerin a* değerler .....	57
Şekil 4.31. TiO <sub>2</sub> içeren ve içermeyen filmlerin b* değerleri .....	58
Şekil 4.32. TiO <sub>2</sub> içeren ve içermeyen filmlerin değişik dalga boylarındaki ışığa karşı geçirgenliği .....	59

## ÖZET

Pamuk sapından alkali özütleme yöntemiyle ksilan elde edilmiş ve bu biyopolimerin titanyum dioksit ile birlikte kullanılması sonucunda fotokatalitik aktiviteye sahip biyobozunur filmler elde edilmiştir. Elde edilen filmlerin *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Saccharomyces cerevisiae*'ye karşı sırasıyla %90, %77 ve %32 antimikrobik aktiviteye sahip oldukları, *Aspergillus niger* sporlarına karşı ise herhangi bir aktivite göstermedikleri belirlenmiştir. Filmlere TiO<sub>2</sub> eklenmesinin filmlerin mekanik özellikleri üstünde herhangi bir olumsuz etkiye neden olmadığı belirlenmiş, TiO<sub>2</sub> içeren filmlerin çekme dayanımı 11.4 MPa, sünmesi %15.2 ve elastik modülüs değeri ise 296.9 MPa olarak bulunmuştur. TiO<sub>2</sub> içeren filmlerin biyobozunma özelliklerinin TiO<sub>2</sub> içermeyen filmlerden farklı olmadığı ve TiO<sub>2</sub> içeren filmlerin 82 gün sonunda %70 oranında biyobozunmaya uğradığı belirlenmiştir. Yapılan yüzey karakterizasyonları sonucunda filmlere TiO<sub>2</sub> eklenmesinin yüzey alanını arttırdığı tespit edilmiştir. Filmlerin su buharı geçirme hızında TiO<sub>2</sub> eklenmesi sonucunda hafif bir artış gözlemlenmiş, TiO<sub>2</sub> içeren filmlerin su buharı geçirme hızı 40.72 g / m<sup>2</sup>.gün olarak belirlenmiştir. Yapılan oksijen geçirgenliği testlerinde ise TiO<sub>2</sub> içeren ve içermeyen filmlerin her ikisinin de oksijene karşı oldukça iyi bariyer özelliğine sahip oldukları bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Ksilan, biyobozunur, titanyum dioksit, antimikrobik, fotokataliz

## ABSTRACT

Biodegradable films with photocatalytic activity are obtained upon the utilization of xylan biopolymer, which is isolated from cotton stalks via alkaline extraction, together with titanium dioxide. The films demonstrate an antimicrobial activity of 90%, 77% and 32% to *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Saccharomyces cerevisiae*, respectively while no activity against *Aspergillus niger* spores is observed. Addition of TiO<sub>2</sub> to the films does not cause any adverse effects on the mechanical properties of the films where TiO<sub>2</sub> containing films have a tensile strength of 11.4 MPa, elongation at break of 15.2% and an elastic modulus of 296.9 MPa. The biodegradability of TiO<sub>2</sub> containing films are not different compared to that of native films where TiO<sub>2</sub> containing films demonstrate 70% biodegradability at the end of 82 days. The surface characterization of the films reveal that TiO<sub>2</sub> addition causes an increase in the surface area of the films. The water vapor transmission rates of the films increase slightly upon TiO<sub>2</sub> addition where the water vapor transmission rate of the films containing TiO<sub>2</sub> are found as 40.72 g/m<sup>2</sup>day. The oxygen permeability tests reveal that both native and TiO<sub>2</sub> containing films very good oxygen barrier properties.

Keywords: Xylan, biodegradable, titanium dioxide, anti-microbial, photocatalysis

## 1.GİRİŞ

Dünyada her yıl, tarımsal faaliyetler sonucunda yetiştirilen ürünlerin yanı sıra, çok büyük miktarlarda yan ürün ya da atık oluşmakta, genellikle bu atıkların, tarımsal alanlardan uzaklaştırılması gerekmekte ve uygun bir kullanım alanı bulunmadığı takdirde, ekonomik kayıplara ve çevre kirliliğine neden olmaktadır. Bilindiği gibi bitki hücre duvarı üç ana polimerden oluşmuştur; selüloz, hemiselüloz ve lignin. Özellikle selüloz ama bunun yanında lignin için de kullanım alanları daha kolay bulunabilirken, heterojen bir biyo-polimer olan hemiselüloz için kullanım alanı pek yoktur. Değişik polimerleri içinde barındıran hemiselülozun en önemli bileşeni ksilan olup, bu biyopolimer tarımsal atıklarda kuru ağırlığın %20-35'ini oluşturmaktadır. Dolayısıyla, tarımsal atıkların değerlendirilmesinde ksilan için kullanım alanları bulunması ekonomik açıdan önemli bir konudur. Ülkemizde yüksek miktarlar ve farklı türlerde pek çok tarımsal ürün üretilmesinden ve bu tarımsal ürünlerin atıkların çoğunlukla değerlendirilmediğinden ve bertarafları sıkıntı yarattığından bu konu daha da önemli hale gelmektedir.

Günümüzde, gıda paketlenme filmi yapımında geleneksel olarak kullanılan petrol türevi sentetik ve doğada bozunmayan polimer filmler yerine, bitkisel kökenli özellikle de tarımsal atıklardan ya da yan ürünlerinden elde edilen selüloz, nişasta, gluten gibi biyo-polimerlerin, kullanılabilmesi amacıyla yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle son yıllarda ticari olarak mısırdan elde edilen nişasta tabanlı plastik filmlerin üretiminde önemli artış olmuştur. Ancak gıdasal işlevi bulunan nişastanın son derece yüksek kullanım hacmi olan plastik film gibi ürünlerin üretiminde kullanılması uzun vadede nişastanın endüstriyel işlevinin gıdasal işlevi ile rekabet içine girmesine neden olacaktır. Bu nedenle bu tür plastik filmlerin gıdasal işlevi bulunmayan tarımsal atıklardan üretilebilmesi önem taşıyan bir konudur.

Son yıllarda, paketlerdeki gıda maddelerinin bozulmasının önlenmesi ve hijyenik bir ortam yaratılması açısından büyük önemi olan, anti mikrobik paketlenme filmleri üzerindeki çalışmalar da hız kazanmıştır. Anti mikrobik filmlerin hazırlanmasında da genel olarak, doğal ya da sentetik anti mikrobik maddeler filmler içine tutuklanmakta ya da yüzeyine bağlanmaktadır. Kullanılan anti mikrobik maddelerin bazıları toksik etkilere sahip olmakta, bu da hem çevre hem de insan sağlığı açısından problem oluşturmaktadır. Anti mikrobik yüzey geliştirmek için, genellikle cam, seramik gibi inorganik yüzeylere uygulanan bir başka



yöntem de, yarı iletken maddelerin foto katalitik oksidasyon özelliğinden faydalanmaktadır. Bu yöntemde, titanyum dioksit ( $TiO_2$ ), gibi nano-yapılı yarı iletkenler yüzeylere çok ince filmler halinde kaplanmakta ve yüzeyler ışık (gün ışığı ya da genel aydınlatma ışığı) gördüğünde foto katalitik bir mekanizma ile yüzeydeki mikroorganizmalar inaktive edilmektedir. Kaplama için kullanılan malzemelerin herhangi bir toksik etkisi ya da çevreye zararı yoktur. Dolayısıyla üretilen filmler ne çevre kirliliğine neden olmakta ne de insan sağlığına zarar vermektedir.

Yukarıda belirtilen noktalar göz önüne alınarak proje kapsamında tarımsal bir atık olan pamuk sapından ksilan elde edilmiş ve bu biyopolimerlerin  $TiO_2$  ile birlikte kullanılması sonucunda biyobozunur antimikrobik filmler elde edilmiştir.

## 2.GENEL BİLGİLER

Gıda paketlemede yaygın olarak kullanılan petrokimya kaynaklı plastikler doğada zor yok olarak çevreye zarar verdiği için bu alanda yenilenen kaynaklardan elde edilen biyobozunur filmlerin kullanılması son yıllarda önem kazanmıştır. Biyobozunur film üretiminde nişasta, pektin, gluten, selüloz gibi bitkisel polimerler kullanılmıştır. Bu çalışmalara örnek olarak;

Henglein vd. (1936) tarafından pektin film çalışmaları derivatize pektin ve polivalent katyonlar –kalsiyum gibi- üzerine yapılmıştır. Nişasta biyo-bozunur film üretiminde çok kullanılan hammaddedir. Wolff vd. (1951), amilozdan (dallanmamış nişastadan) film üretmiş ve filmlerin kimyasal direnci, fiziksel ve mekaniksel özelliklerine bakmışlardır. Kolay kırılır ve suya hassas olmalarına rağmen plastik filmlerinkine yakın fiziksel özelliklerde olduğu saptanmıştır (çekme dayanımı 60 MPa). Otey vd. (1987) belirli seviyede nişastaya termoplastik ekleyerek yüksek esneklikte ve kolay kırılmayan filmler elde etmişlerdir. Amilozun güçlü film oluşturmasının yanı sıra dallanmış amilopektinin filmlere zayıf mekaniksel özellikler verdiği (düşük çekme dayanımı gibi) saptanmıştır (Tharanathan vd., 2003). Bir protein olan buğday gluteninden de biyobozunur film elde edilmiştir. (Kayserilioğlu vd., 2003). Bu filmler pH 11’de gliserolle karıştırılarak farklı sıcaklık (20,50 ve 80° C) ve bağıl nemde (%35 ve 70) film özelliklerine bakılmıştır. Bağıl nem %35 olduğunda kurutma sıcaklığı artarken çekme dayanımı yükselmiş, bağıl nem %70 olduğunda ise çekme dayanımı sıcaklık artarken düşmüştür. Varsayımlı kaplama dayanımı (HCS) artan kurutma sıcaklığında ve %35 bağıl nemde artmıştır. %70 bağıl nemde ise en yüksek HCS değeri 50°C’de gözlenmiştir. Sonuç olarak, kurutma sıcaklığının ve bağıl nemin filmlerin mekanik ve fiziksel özelliklerini etkilediği saptanmıştır. Kayserilioğlu vd. (2003) tarafından yapılan başka bir çalışmada ksilan, biyobozunur gluten film oluşturulmasında katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Gluten/ksilan oranı, ksilan tipi, pH ve kurutma koşulları film özelliklerini değiştirmiştir. Gabrielli vd. (1998) tarafından yapılan çalışmada huş ağacından elde edilen ksilanın saf halinin film oluşturmadığı %10 ve üstü çitosanın bu filmlere katkı maddesi olarak kullanılmasının devamlı, dayanıklı film oluşturduğu gözlenmiştir.

Filmlerin anti mikrobik özellikte olması da özellikle gıda paketlemesi için önemli bir özelliktir. Bu özellik eklenen çeşitli anti mikrobik maddelerden elde edilebilir. Anti

mikrobik özellik için anti mikrobik madde doğrudan paketleme filmine eklenebilir ya da film katkı maddesini içeren materyalle kaplanabilir. Şimdiye kadar anti mikrobik gıda paketleme filmi üretiminde anti mikrobik molekül olarak çitosan, nisin, potasyum sorbat, imazalil, triklosan gibi maddelerin kullanımı literatürde verilmiştir.

Çitosan biyobozunur bir madde olup, filmlere anti mikrobik özellik kazandırmaktadır, çünkü çitosan katyonik bir polisakkarit olduğu için bakteri hücreesindeki negatif yüklü makro moleküllerle etkileşip, hücre membranındaki elektronegatif bölgeler için kalsiyumla yarışarak membran yapısını bozmaktadır. Böylece hücre içi materyalin dışarı sızmasına sebep olup bakterinin ölümüne sebep olmaktadır. Bu madde kabuklu deniz hayvanlarının kabuklarından, alkali ve asit solüsyonlarıyla defalarca yıkanarak ya da bazı fungus türlerinden elde edilmektedir. Çitosanın birçok bakteri ve mantarı inhibe ettiği gösterilmiştir.

Sebti vd. (2005), %0.1 (w/v) oranındaki çitosanın gıda paketlemesinde kullandığında, *Aspergillus niger*'i tamamen inhibe ettiğini saptamışlardır. Bégin vd. (1999), çitosanı hidroklorik, formik, asetik, laktik ve sitrik asitte çözerek anti mikrobik film üretmişlerdir. Laktik ve sitrik asitli filmler yumuşak ve elastik olup, hidroklorik, formik ve asetik asitli filmler sert ve kırılğan özellikte olmuşlardır. Outtara vd. (2000), asetik ya da propiyonik asiti çitosan matrixlerde çözerek, anti mikrobik filmler elde etmişlerdir. Laktik asit bakterileri bu filmlerde inhibe olmazken, *Enterobacteriaceae* ve *Serratia liquefaciens* büyümesi ya geciktirilmiş ya da tamamen engellenmiştir. Durango vd. (2006) tarafından tatlı patates nişastası (%4) ve gliserol (%2) film solüsyonlarına önceden asitik asitte çözünen çitosan %1, %3, %5 oranında eklenerek, çitosanın filmlere verdiği anti mikrobik karaktere *Salmonella enteritidis* üzerinde bakılmıştır. Çitosan oranı arttıkça mikrobik inhibisyonun arttığı gözlenmiştir. %5 çitosan içeren tatlı patates-gliserol filmlerin anti mikrobik özelliği sadece %1 çitosan içeren filmlerle aynı olduğu bulunmuştur. Moller vd. (2004), çitosan ve hidroksil propil metil selüloz filmlerin *Listeria monocytogenes* büyümesini tamamen engellediği göstermiştir. Kim vd. (2003), Poly(vinil alkol)/ N-(2-hidroksi) propil-3-trimetilanonyum çitosan klorit (HTCC) filmlerinin %1 ve daha fazla oranda HTCC içerenlerinde yüksek anti mikrobik etki gözlemişlerdir (Rhim vd., 2006). çitosan ve 4 tip nanopartikül kullanılarak hazırlanan (Na-MMT, Cloisite 30B, Nano-silver, Ag-Ion) çitosan bazlı nanokompozit filmlerden özellikle gümüşlülerde (Nano-silver) yüksek anti mikrobik aktivite görülmüştür. Bu sonuçlar da nanoteknolojiyi doğal biyopolimerli biyobozunur

paketlenme maddelerine aktarmayı önermektedir. Ayrıca nanokompozit filmlerde belli derecelerde nanopartikül interkalasyonu olması çekme dayanımını %7-16 oranında arttırıp, su buharı geçmesini %25-30 oranında azalttığı gözlenmiştir. Wang vd. (2006), çitosan/tabakalı silikat nanokompozitlerinden farklı oranlarda solüsyon hazırlandığında, çitosan/tabakalı silikat nanokompozitlerinin saf çitosandan daha güçlü anti mikrobik aktivitesi – özellikle gram-pozitif bakteri için- olduğu gösterilmiştir. Nanokompozitte silikat tabakalarının miktarı ve tabakaların birbirine uzaklığı arttıkça nanokompozitin Gram(+) bakteriye anti bakterik etkisi artmıştır. Nisin, *Lactococcus lactis* tarafından üretilen anti mikrobik doğal bir maddedir. Nisin Gram(+) bakteriler için etkili olup, gram-negatif inhibisyonunda etkili değildir. Li vd. (2006) tarafından *Amorphophallus rivieri* glikomannanının ve çitosanın farklı oranlarda [9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 glucomannan/çitosan (w/w)] filmleri elde edilmiştir. Bu filmler KC1, KC2, KC3, KC4, KC5, KC6, KC7, KC8 ve KC9 olarak kodlanmıştır. KC 2 ve sade çitosan filmlerine anti mikrobik madde olarak nisin eklenmiştir. Bu filmlerde *Escherichia coli*' ye karşı bir inibisyon zonu oluşmamış sadece bu bakterilerin büyümesinin engellendiği görülmüştür ama nisinli KC2 filmlerinin *S. aureus*, *L. monocytogenes* ve *Bacillus cereus*'a karşı anti mikrobik özellikte olduğu gösterilmiştir. Ayrıca filmlerin mekanik özelliklerine de bakılmıştır. KC2 filmlerinin maksimum çekme dayanımı olduğu gösterilmiştir ( $102.8 \pm 3.8$  MPa).

Conte vd. (2007) aktif paketlenme filmine aktif bileşik lizozimi immobilize etmişlerdir. Çapraz bağlı polyvinil alkol filmi farklı oranlarda antimikrobik ve bağlayıcı maddelerle hazırlandığında anti mikrobik aktivitenin enzim miktarı arttıkça arttığını gözlemişlerdir. Kandemir vd. (2005) pullulan filmler hazırlayıp bunlara lizozim ya da lizozim-disodyum EDTA eklemişlerdir. Sadece lizozim içeren filmler *Lactobacillus plantarum*' u inhibe etmemiştir. EDTA ile karıştırıldığı zaman *E.coli*' ye karşı anti mikrobik filmler elde edilmiştir. Lizozim-çitosan kompozit filmlerinde lizozim çitosanın antimikrobiyel özellikliğini *E.coli* ve *Streptococcus faecalis*'e karşı çitosan matriksinden serbest kalarak arttırmıştır. (Park vd., 2004). Soya proteini ve mısır proteini biyobozunur filmlerinde nisin ya da lizozim anti mikrobik madde olarak kullanıldığında *L.plantarum*'u inhibe etmiştir. Ayrıca EDTA da inhibisyon etkisini arttırmıştır (Padgett vd., 1998).

Sodyum-alginat ve k-carrageenan filmlere anti mikrobik madde olarak lizozim, nisin, greyfurt ekstraktı (GFSE) ve EDTA konulduğunda, Na-alginat filmlerde k-carrageenan

filmlere göre daha geniş inhibisyon alanı görülmüştür. Ayrıca anti mikrobik madde olarak GFSE-EDTA her iki tip filmde en yüksek inhibisyonu göstermiştir. EDTA, GFSE'nin Gram(-) bakterilere karşı bakterisidal etkisini arttırmıştır. Sonuç olarak bu çalışma GFSE ya da GFSE/EDTA'nın özellikle Gram(-) bakterilere karşı anti mikrobik gıda paketlenmesinde kullanılabileceğini önermektedir. Ancak anti mikrobik madde içeren filmlerde çekme dayanımı, esneme gibi mekanik özellikler zayıflamıştır (Cha vd., 2002).

k-carrageenan kırmızı su yosununun yapısal polisakkaritidir ve genelde iyi film oluşturma özelliğindedir. Bu filmlere anti mikrobik madde olarak potasyum sorbat eklenip, bu anti mikrobik maddenin filmlerden difüzyonu incelenmiştir. Potasyum sorbatın serbest bırakılmasının pH'tan bağımsız olup sıcaklığın 40°C'den 5°C'ye düşürülmesinin difüzyon katsayısını düşürdüğü gözlenmiştir. Ayrıca potasyum sorbatlı k-carrageenanın gıda paketlenmesinde kullanıldığında gıdanın raf ömrünü uzattığı ya da gıda güvenirliliğini arttırdığı önerilmektedir (Choi vd., 2002). Zactiti vd. (2006) potasyum sorbatı yine anti mikrobik madde olarak kullanıp, biyobozunur sodyum alginat filmlerde geçirgenlik özelliklerini incelemişlerdir. Sorbat artışının filmin polimerik yapısını değiştirerek geçirgenliğini arttırmış olduğunu bulmuşlardır. Pranoto vd. (2005) sarımsak yağlı çitosanlı yenilebilir filmlerin anti mikrobik etkisi potasyum sorbat ve nisinle karşılaştırmıştır. Sarımsak yağının, potasyum sorbatın, nisinin *S.aureus*, *L. monocytogenes* ve *B. cereus*'a karşı anti mikrobik özellikte olduğu gösterilmiştir. Seydim vd. (2006), anti mikrobik maddeyi bırakan aktif yenilebilir filmleri gıda paketlenmesinde kullanma amacıyla anti mikrobik madde olarak protein izole (WPI) filmlere %1-4 (w/v) oranında yabani kekik, biberiye ve sarımsak özü yağlarını *E.coli*, *S. aureus*, *S.enteritidis*, *L.monocytogenes* ve *L. plantarum*' a karşı kullanmıştır. Kekik özü yağı (%2) içeren film bu bakterilere karşı en etkili olanıdır. Biberiye özü yağı anti mikrobik etki göstermeyip, sarımsak özü yağı %3, %4 düzeyindeyken inhibisyon etkisi göstermiştir.

Weng ve Hotchkiss (1992), imazalil adlı anti-fungal maddeyi polietilen filmde kullanarak peynir yüzeyinin bozulmasını azaltmışlardır. Triklosan inorganik anti mikrobik maddedir. Stiren-akrilat kopolimerini triklosan anti mikrobik tabaka olarak kaplamıştır. *Enterococcus faecalis*'ın büyümesi triklosan kaplamasıyla inhibe edilmiştir (Chung vd., 2003).

Antimikrobik yüzey oluşturmak için yüzeylerin  $TiO_2$ ,  $ZnO_2$  gibi nano-yapılı yarı iletkenlerle kaplanması alternatif bir yöntemdir. Böylece fotokatalitik olarak, anti mikrobik özellik yarıiletkenlerle kaplanan yüzeylere kazandırılabilir. Bu yöntemdeki mikrobik inaktivasyon mekanizması aşağıda açıklanmıştır:

Yarı iletken metal oksitlerin band açıklıklarından daha yüksek dalga boyundaki fotonları absorpsiyonu ve valens bandındaki elektronların iletim bandlarına taşınması sonucunda, atomun valens bandında bir elektron boşluğu oluşturdukları ve bu elektron boşluklarının yüzeye diffüzyonu ile yüzeydeki oksitlenebilir moleküllerin redoks reaksiyonu ile oksitlendikleri uzun süredir bilinmektedir. Bu noktada kuvvetli fotokatalitik oksidasyon özelliği, korozyona karşı dayanıklı olması, toksik olmaması, pahalı olmaması, hızlı reaksiyon göstermesi ve spesifik olmaması nedenleriyle, titanyumdioksit, yüzey kaplama malzemesi olarak potansiyel bir alternatif olarak sunulmuştur. Ortamda su buharı ve oksijenin bulunması, UVA ve UVB bölgesinin etkisiyle, yüzeyde (-OH) radikalleri oluşur ve bu radikaller mikroorganizmaları öldürür (Kühn vd., 2003).

Fotokatalitik inaktivasyon ilk kez Matsunga (2005) tarafından *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *E. coli*'nin tamamen platinyum yüklü titanyum dioksit ( $TiO_2$ ) tozuyla inaktive edilmesiyle görülmüştür. Işıklandırılmış  $TiO_2$ 'in hücre duvarını ayırdıktan sonra hücre membranına zarar verdiği ve böylece hücre içi moleküllerin dışarı sızarak bakteri ölümüne sebep verdiği AFM (Atomic Force Microscopy) ile gösterilmiştir (Lu vd., 2003). Erkan vd. (2006) tarafından  $TiO_2$ ,  $SnO_2$  yarıiletken maddeleriyle bunların palladyum ilave edilmiş ince filmlerinin fotokatalitik anti mikrobik özelliklerine *S.aureus*, *S.cerevisiae* ve *E.coli* üzerinde bakılmıştır.  $TiO_2$ 'in anti mikrobik aktivitesinin  $SnO_2$ 'den fazla olduğu, palladyumun ise her iki yarıiletkenin mikrobiyal inhibisyon özelliğine katkıda bulunduğu gözlenmiştir. En yüksek antimikrobiyal etki %1 PdO/  $TiO_2$  ile *E.coli*'ye karşı elde edilmiştir. 2 saatlik ışıkla, *E.coli* %98 oranında azalmıştır. Kikuchi vd. (1997) de *E.coli*'nin ışıklandırılmış  $TiO_2$  kaplı cam yüzeyde büyük ölçüde inhibe edildiğini göstermiştir. Diğer bir çalışmada  $TiO_2$ 'li yüzeyde fotokatalizle *E.coli* %99.9 oranında 1 saatte, *A.niger* sporları ise %90 oranında 72 saate öldürülmüştür. Ayrıca, hava, su temizlenmesinde, kişisel temizlik yüzeylerinde de, fotokatalitik özelliğin kullanılması önerilmiştir (Wolfrum vd., 2002). Sunada vd. (2003) ve Amézaga vd. (2002)  $TiO_2$ 'ye Cu ve Al'in eklenmesinin mikrobiyel inaktivasyona etkilerini araştırmışlardır. Sodyum hyaluronate ile titanyum yüzeyin

kaplanması, *S.aureus*'in özellikle medikal aletler gibi yüzeylere tutunmasını önemli ölçüde azaltmıştır. Bu yüzden osteosentez, ortopedi ve dişçilik gibi alanlarda bu tip kaplamaların kullanılabileceği önerilmektedir (Harris vd., 2004).  $TiO_2$ , apatitle kaplandığında ışıkla anti mikrobik aktivite göstermekte olup, bu apatit kaplı  $TiO_2$ 'in beton, seramik, metal, ahşap tekstil ve kağıda aktarılabileceği önerilmektedir (Nanomi vd., 2004).

Metallerden gümüş ve bakırın mikroorganizmalara zehirli etkisi olduğu bilindiğinden  $SnO_2$ 'li iplikli kumaşlar gümüş, bakır, platinyum, platinyum/rodyum ve altınla kaplanarak bu metallerin anti mikrobik özellikleri araştırıldığında bakırın bakteri ve mantara karşı çok etkili olduğu, gümüşün ise bakteriye mantardan daha etkili olduğu gösterilmiştir (Scholz vd., 2004).

Li vd. (2005) anti mikrobik aktiviteye sahip gümüş nitrat ve  $TiO_2$  nanopartikülleriyle yüz masklerini kaplamışlardır. 48 saat inkübasyonun sonunda *E.coli* ve *S.aureus* %100 inhibe olmuştur. Bu çalışmada nanopartikülleri koruyucu kıyafetleri kaplama amacıyla kullanılabileceği önerilmektedir.

Proje kapsamında ksilan biyopolimeri tarımsal bir atık olan pamuk sapından elde edilmiş ve  $TiO_2$  kullanılarak bu biyopolimerden fotokatalitik antimikrobiyel aktiviteye sahip biyobozunur filmler elde edilmiştir.

### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

#### **3.1. Pamuk ve Ayçiçeği Sapının Kimyasal Analizi**

##### **3.1.1. Selüloz Miktarının Tayini**

100 ml distile su 2 gram kurutulmuş ve öğütülmüş biyokütleye eklenir ve örnek inkübatörde (Nüve) 60°C de 16 saat boyunca bekletilmesinin ardından filtre edilerek sıvı kısım uzaklaştırılır. Katı kısım 17 ml %24 KOH ve 1% NaBH<sub>4</sub> içeren çözeltiliye eklenerek oda sıcaklığında 3 saat boyunca karıştırılır. İkinci bir filtrelemeden sonra elde selüloz kalıntı olarak elde edilir. 60 °C de 24 saat boyunca kurutulan selüloz miktarı tam kuru ağırlığa oranla % olarak bulunmuştur.

##### **3.1.2. Hemiselüloz Miktarının Tayini**

Hemiselüloz tayini için, 2 g öğütülmüş biyokütle tartılarak 100 ml litre distile su içerisinde 60 derecede 16 saat süre ile bekletilmiştir. Elde edilen karışım filtre edilmiş ve üstte kalan partiküller 17 ml %24 KOH ve %1 NaBH<sub>4</sub> içeren çözeltinin ilave edilmesinden sonra oda sıcaklığında 3 saat süreyle karıştırılarak özütlenmiştir. Süspansiyon filtre edilmiş ve sıvı kısım 5 ml %10 asetik asit içeren etanol çözeltisiyle karıştırılmıştır. Bunun ardından örnek 8300 × g'de 20 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonucu hemiselüloz kalıntı olarak elde edilmiştir. 60 derecede kurutulan hemiselüloz miktarı tam kuru ağırlığa oranla % olarak bulunmuştur.

##### **3.1.3. Lignin Miktarının Tayini**

Biyokütlerdeki lignin oranını tayin için “Klason lignini” yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde sülfürik asit karbonhidratları temizlediğinden aside dayanıklı lignin kalıntı olarak elde edilir. Lignin tayini için 1 gram biyokütle alınarak bir behere aktarılmış ve 15 ml. Soğuk (12-15 derece sıcaklıkta) %72'lik sülfürik asit içerisinde iki saat boyunca karıştırılarak bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda materyal yıkanarak 500 ml'lik erlene konulmuştur. 360 ml distile su ile asit konsantrasyonu %3 olacak şekilde seyreltilmiştir. Daha sonra bu karışım bir soğutucu altında dört saat süre ile kaynatılmıştır. Çözünmeyen maddeyi çökelttikten sonra ağırlığı 105 derecede sıcaklıkta porozitesi az olan (4 nolu) krozeden süzölmüş serbest asit



artıkları 500 ml sıcak su ile yıkanmıştır. Kroze 105 derece sıcaklıkta kurutulup desikatörde soğutulduktan sonra tartılmıştır. Sonuçlar tam kuru ağırlığa oranla % olarak bulunmuştur.

### **3.2. Pamuk ve Ayçiçeği Sapı Ksılanının Monosakkarit ve Üronik Asit Analizi**

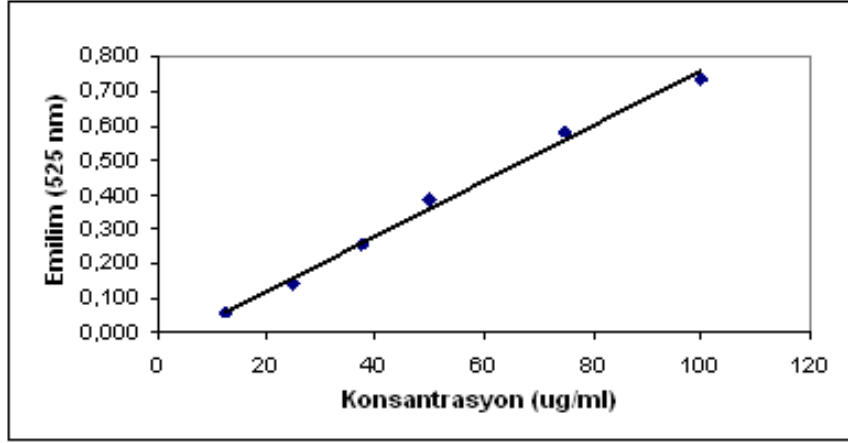
#### **3.2.1. Monosakkarit Analizi**

Biyokütleden özütlenen 0.3 gram ksılanın küçük test tüplerine konulmasının ardından üstüne 3 ml %72'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eklenmiştir. Örnekler tamamen ıslatılana kadar yaklaşık 1 dakika boyunca cam bir baget yardımıyla karıştırılmış ve ardından 30°C deki su banyosunda 2 saat boyunca bekletilmiştir. Bu süre içerisinde örnekler her 15 dakikada bir cam baget yardımıyla karıştırılmıştır. Tüplerin 100 ml'lik şişelere aktarılmasının ardından 77.55 gram distile su eklenmiş ve şişeler kaynamakta olan su içinde 2 saat boyunca bekletilmiştir. Bu işlemin ardından oda sıcaklığında soğutulan tüplerden 20 ml'lik örnekler alınarak 50 ml'lik şişelere aktarım yapılmış ve CaCO<sub>3</sub> eklenerek pH 5-6 civarına ayarlanmıştır. Son olarak örnek 0.2µm'lik filtreden geçirilmiş ve 3 ml'lik numuneler alınarak HPLC analizi sonucunda monosakkarit oranları belirlenmiştir. Ksiloz için HPX-42A (300 × 7.8mm, BIO-RAD Cat No: 125-0097) kolon 80°C sıcaklıkta ve mobil faz 0.6 ml/dakika akış hızındaki distile su olacak şekilde kullanılmıştır. Glikoz için ise MetaCarb 87C (300×7.8 mm, VARIAN, Cat No. A5200) kolon yine 80°C sıcaklıkta ve mobil faz 0.6 ml/dakika akış hızındaki distile su olacak şekilde kullanılmıştır (Ruiz ve Ehrman 1996).

#### **3.2.2. Üronik Asit Analizi**

5 mg biyokütleye 1 ml sülfürik asit eklenmesinin ardından karışım buz banyosunda 5 dakika karıştırılmıştır. 1 ml daha sülfürik asit eklenmesinin ve 5 dakika daha karıştırmanın ardından karışıma 0.5 ml su eklenmiş ve tekrar 5 dakika boyunca karıştırılmıştır. Bu işlemleri takiben karışım 10 ml'ye seyreltilmiş ve 2000 × g de oda sıcaklığında 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Sıvı fazdan 400 µl alınmış ve buna 40 µl 4M'lık sülfamik asit/potasyum sülfamat çözeltisi eklenerek pH 1.6'ya ayarlanmıştır. 2.4 ml 75mM'lık sodyum tetraborat/sülfürik asit çözeltisinin eklenmesinin ardından karışım 100 derecedeki su banyosunda 20 dakika boyunca bekletilmiş ve ardından buz banyosunda soğutulmuştur. Karışıma 80 µl m-hidroksidifenil çözeltisi eklenmesinden sonraki 10 dakika ile 1 saat arasında 525 nm dalga boyundaki emilim ölçülmüştür. Önceden hazırlanmış D-galacturonic asit standart eğrisi kullanılarak üronik asit

miktarı hesaplanmıştır. Üronik asit tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu Şekil 3.1 de verilmiştir. Elde edilen doğrunun denklemi, Emilim = (0.008)×(Konsantrasyon) - 0.0389 olarak hesaplanmış, R<sup>2</sup> değeri ise 0.9946 olarak bulunmuştur. Örneklerde okunan emilim değerlerinin elde edilen denklemde kullanılmasıyla üronik asit konsantrasyonları hesaplanmıştır (Melton ve Smith 2002). Bu işlem arabinoz, ksiloz, mannoz, galaktoz ve glukoz için ayrı ayrı yapılmıştır.



Şekil 3.1. Üronik asit tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu

### 3.3. Ksilanın Doğal Kaynaklardan Özütlenmesi

Ksilan özütlenmesi için Zilliox ve Debeire (1998) tarafından kullanılan yöntem benimsenmiştir. İlk olarak 100 ml distile su öncede öğütülmüş ve parça boyutu 2.5 mm ye getirilmiş 2 gr pamuk sapına eklenmiş ve örnek inkübatörde (Nüve) 60°C de 16 saat boyunca bekletildikten sonra filtre edilmiştir. Katı kısım 17 ml %24 KOH ve 1% NaBH<sub>4</sub> içeren çözeltiye eklenerek oda sıcaklığında 3 saat boyunca karıştırılmıştır. Bu işlemi takiben tekrar filtreleme işlemi gerçekleştirilmiş ve sıvı kısım alınarak 5 ml %10 asetik asit içeren etanol çözeltisiyle karıştırılmıştır. Bunun ardından karışım 8300 × g de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda katı kısmın alınıp 60°C de 24 saat boyunca kurutulması sonucu ksilan elde edilmiştir.

### **3.4. Antimikrobik Karakterizasyon**

#### **3.4.1. *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus***

Her iki mikroorganizma da LB besiyerinde ve 35°C de çalkalamalı bir inkübatörde (Infors Minitron) çoğaltılmış ve antimikrobik testlerde kullanılmıştır. Test sırasında ilk olarak mikroorganizmaları içeren besiyerden alınan 1 ml sıvı, 9 ml steril pepton çözeltisi içeren tüplere aktarılmıştır. Ardından 10 ml sıvı içeren bu tüpten 4 cm. çapında plastik petri kaplarında durmakta olan uygun boyutlarda kesilmiş film parçalarının üstüne 100µl aktarım yapılmıştır. Bu işlemin ardından filmler ışık altında ve karanlıkta belirlenen süreler boyunca antimikrobik etkinin oluşması için bekletilmişlerdir. Bakterilerin filmlerin üstünden alınıp agara yayılabilmeleri için ilk olarak 9.9 ml steril pepton çözeltisi içeren tüpler, içlerinde film parçaları bulunan 4 cm. çapında plastik petrilere boşaltılmış ve ardından petri içerisinde bulunan sıvıdan 100µl alınarak tekrardan 9.9 ml. steril peptone çözeltisi içeren tüpler vasıtasıyla gerekli seyreltmeler yapılarak agar üstüne yayılmıştır. Bu işlemler her bir grup için iki kere tekrarlandığından her bir film grubunun koloni sayısı bağlamında 2 paralel sonucu bulunmaktadır. LB agar üstüne yayılan bakteriler 35°C de 16 saat boyunca inkübatörde (Infors Minitron) bekletilmiş ve ardından oluşan koloniler sayılmıştır. Rapor edilen sonuçlar her iki paralelin ortalama koloni sayısı hesaplanarak belirlenmiştir.

#### **3.4.2. *Sachharomyces cerevisiae***

YPD besiyerinde 35°C de çalkalamalı inkübatörde çoğaltılan mikroorganizmalar E.coli ve S.aureus için kullanılan yöntemle filmlerin antimikrobik etkisine karşı test edilmiştir. Test süreci sonunda film yüzeyinden alınan mikroorganizmalar YPD agar üstüne yayılmış ve 35°C de 24 saat inkübasyonun ardından antimikrobik etki hesaplanmıştır.

#### **3.4.3. *Aspergillus niger***

A.niger spor oluşturan bir mikroorganizma olduğundan, antimikrobik test sırasında kullanılan diğer mikroorganizmalardan farklı olarak test öncesinde A.niger'in sporlanması beklenmiştir. Bunun nedeni bu aşamada filmlerin hücre yapılarına kıyasla daha dayanıklı olan spor yapılarına karşı gösterebileceği fotokatalitik antimikrobik etkinin gözlemlenebilmesidir. Bu işlem için PDA agara ekilen mikroorganizma 4 gün boyunca 35°C de inkübe edilmiştir.

Oluşan sporlar peptonlu suya transfer edilmiş ve homojenize edilmelerinin ardından diğer mikroorganizmalar için kullanılan yöntemle test edilmişlerdir.

### **3.5. Mekanik Karakterizasyon**

Filmlerin mekanik karakterizasyonu için ODTÜ Merkezi Laboratuvarında bulunan mekanik test cihazı (Instron Model 3367) kullanılmıştır. Her bir film türü için iki ayrı filmden 3'er parça numune kesilmiş ve sonuçlar bu 6 parçanın test sonuçlarının ortalaması olarak rapor edilmiştir. Hazırlanan numuneler filmlerden 1 cm eninde ve 5 cm boyunda dikdörtgenler şeklinde kesilmiş ve kalınlıkları 1 µm hassasiyete sahip dijital bir mikrometre (Mahr Micromar 40 EXL) kullanılarak ölçülmüştür. Cihaz saniyede 20 veri alacak şekilde ayarlanmış, örnek çekme hızı ise 10mm/dakika olarak belirlenmiştir. Kullanılan mekanik test cihazının yazılımı (Instron Merlin) uygulanan kuvveti test edilen örneğin sisteme girilen enini ve kalınlığını baz alarak çekme dayanımına çevirebilmekte ve aynı anda yüzdesel uzamayı kaydedebilmektedir. Cihazın yazılımından alınan bu veriler çekme dayanımı-sünme eğrilerinin oluşturulmasında kullanılmıştır. Her numune için çekme dayanımı, test sırasında ulaşılan en yüksek çekme dayanımı değeri olarak, yüzdesel sünme değeri ise numunenin kopana dek gösterdiği deformasyon olarak hesaplanmıştır. Elastik modülüs, çekme dayanımı-sünme eğrisinin başlangıcındaki doğrusal bölgenin eğimi olarak hesaplanmıştır. Sertlik ise çekme dayanımı-sünme eğrisinin altında kalan alanın hesaplanmasıyla elde edilmiştir.

### **3.6. Su Buharı Geçirme Hızı**

Filmlerin su buharı geçirme hızlarının belirlenmesi için içi nem emici silika tanecikleri ile doldurulmuş, 3.1 cm çapında ağız genişliği olan cam şişeler kullanılmıştır. Filmler kullanılan şişelerin ağzına monte edildikten sonra iç ortamı 25°C ve %50 bağıl neme ayarlanmış olan iklimlendirme kabine (MMM Group Climacell) yerleştirilmiştir. Filmlerin üst ve alt yüzeylerindeki nem farklılığı silika taneciklerinin su buharını tutması nedeniyle sisteme ağırlık artışı olarak yansımaktadır. Filmlerin yerleştirildiği sistemler kabine yerleştirilmeden önce ve sonrasında belirli zaman aralıklarında tartılmış ve ortaya çıkan zamana karşı sistemlerdeki net ağırlık artışı grafiğinin doğrusal olan kesiminin eğimi baz alınarak bu eğimin filmlerin alanına bölünmesi ile filmlerin su buharı geçirme hızları hesaplanmıştır.

### **3.7. Atomik Kuvvet Mikroskobisi**

Filmlerin yüzey yapılarının karakterizasyonu için ODTÜ Kimya Mühendisliği Bölümü Çevre Katalizörleri Laboratuvarında bulunan atomik kuvvet mikroskobu (Nanosurf Easy Scan 2) kullanılmıştır. Analizler sırasında numunelerin  $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$  kesitindeki yüzeyleri taranmıştır.

### **3.8. Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi**

Taramalı elektron mikroskobu analizi için ODTÜ Merkezi Laboratuarda bulunan ve 1.2nm çözünürlüğe sahip bir cihaz (Quanta 400 F) kullanılmıştır. Analiz öncesinde örneğin düşük iletkenliğinden dolayı Au-Pd kaplama yapılmıştır. Analiz sırasında ilk olarak yüksek vakum altında inceleme yapılmaya çalışılmış ancak bu durumda örnekler elektron mikroskobundan zarar gördüğünden ve herhangi bir inceleme yapılamadan erimeye benzer bir tepki gösterdiklerinden düşük vakum altında çalışılmasında karar verilmiştir fakat bu durum beklenildiği üzere görüntülerin çözünürlüğünün düşmesine neden olmuştur. Düşük vakum altında çalışırken dahi yüksek enerji seviyelerinde ve yaklaşık 10000 kattan daha fazla büyütme oranlarında örneklerin yüksek vakum altında verdikleri tepkilere benzer tepkiler verdikleri gözlemlenmiştir. Bu nedenle örneklere çok fazla yaklaşılmadan 1000 kat büyütme oranında yüzey yapıları incelenmiş ayrıca filmlerin yüzeylerinde bulunan elementlerin oranları enerji yayımlı X ışını spektroskopisi (EDX) kullanılarak belirlenmiştir.

### **3.9. Biyobozunurluk Testleri**

Biyobozunurluk testleri için Chiellini ve Corti (2003) tarafından geliştirilen, plastiklerin biyobozunurluklarının değerlendirilmesi için uygulanan ASTM D5338 test standardına benzeyen ancak laboratuvar koşulları için daha uygun hale getirilmiş bir yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem karbon bazlı materyallerin biyobozunma süreci sırasında CO<sub>2</sub> gazı açığa çıkarmaları esasına dayanmaktadır. Test edilecek filmler ağzı kapalı 1.5 L hacmindeki cam haznelere tabanına yerleştirilmiş iki perlit tabakası arasında yer alan ve ODTÜ yerleşkesinden alınan toprak kısım içerisine gömülmüştür (Şekil 3.2). Cam haznelere yerleştirilmeden önce toprak karıştırılmış, içinde bulunan yaprak, taş gibi maddeler ayrıştırılmıştır. Piyasada bulunan ve pastörize edilmiş topraklar yerine toprağın doğal bir ortamdan alınarak kullanılmasının nedeni pastörize edilmiş topraklarda yeterli miktarda

mikroorganizma bulunmayacağı düşüncesidir, zira biyobozunmanın nedeni aslen mikroorganizmaların test edilen örneklerle olan etkileşimidir. Perlit kullanılmasıdaki amaç ise sadece topraktan da belli bir miktar CO<sub>2</sub> çıkışı olduğundan, toprak kaynaklı CO<sub>2</sub> çıkışını mümkün olduğu kadar azaltarak daha hassas ölçümler gerçekleştirebilmektir. Açığa çıkan CO<sub>2</sub> miktarının belirlenebilmesi için 0.05N KOH çözeltisi kullanılarak CO<sub>2</sub> bu çözelti içerisine emdirilmiş ve 1 haftalık süreçler dahilinde çözeltinin emdiği CO<sub>2</sub> miktarının belirlenebilmesi için KOH çözeltisi 0.1N HCl kullanılarak titre edilmiştir. Ancak titrasyon sırasında açığa çıkan karbonat ve hidrojen karbonatın tampon etkisi yaparak KOH çözeltisine eklenen HCl miktarında sapmalara neden olması ihtimaline karşı titrasyon öncesinde KOH çözeltisine 10 ml. 0.5N BaCl<sub>2</sub> çözeltisi eklenmiştir. Titrasyonlar sırasında indikatör olarak bazik ortamlarda pembe renk veren, asidik ortamlarda ise renksiz hale geçen fenol fitaleyn kullanılmıştır. Titrasyon sırasında pembe renk kaybolduğu anda kullanılan HCl miktarı not edilmiş ve bu değerler, ortaya çıkan CO<sub>2</sub> miktarının hesaplanmasında kullanılmıştır. Yüzesel biyobozunmanın hesaplanması sırasında ilk olarak filmlerdeki C miktarı polimerin tekrar eden ünitesi üstünde hesaplanmış ve değişik türdeki filmlerin yüzesel karbon miktarları bulunmuştur. Bu işlemin ardından %100 biyobozunmada teorik olarak her bir filmin içerdiği karbon miktarından açığa çıkabilecek maksimum CO<sub>2</sub> miktarı hesaplanmıştır. Hesaplanan bu CO<sub>2</sub> miktarı %100 biyobozunmaya denk gelmekte ve biyobozunma değerlerinin belirlenmesinde değişik türdeki filmler için %100 biyobozunmaya denk gelen CO<sub>2</sub> miktarı ile deney sırasında açığa çıkan ve titrasyon sonucunda hesaplanan CO<sub>2</sub> miktarı kıyaslanarak yüzesel biyobozunma olarak rapor edilmektedir. Testlerde her bir film türünden ayrı ayrı iki parça paralel olarak test edilmiştir.



Şekil 3.2 Biyobozunurluk testlerinde kullanılan sistem

### 3.10. Renk Ölçümü

Filmlerin renkleri renk okuyucusu vasıtasıyla (Minolta Color Reader CR-10) L\*, a\* ve b\* değerleri üzerinden belirlenmiştir. Ölçümler sırasında beyaz kağıt referans olarak kullanılmıştır. Elde edilen her 3 değer kendi içinde değerlendirilmiş ayrıca beyaz kağıt referans alınarak beyaza göre toplam renk değişimi ( $\Delta E$ ) aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır. Bu denklemde L\*, a\* ve b\* değerleri filmlerden elde edilen ölçüm değerlerini, L<sub>0</sub>, a<sub>0</sub> ve b<sub>0</sub> değerleri ise referans olarak kullanılan beyaz kağıttan elde edilen değerleri göstermektedir.

$$\Delta E = [(L^*-L_0)^2+(a^*-a_0)^2+[(b^*-b_0)^2]^{1/2}$$

### 3.11. Işık Geçirgenliğinin Belirlenmesi

Filmlerin ışık geçirgenliği UV-Vis spektrofotometrede (Thermo Evolution) 200 – 600 nm dalga boyu arasında tarama yapılarak yüzdesel geçirgenlik cinsinden elde edilmiştir.

### 3.12. Oksijen Geçirgenliğinin Belirlenmesi

Filmlerin oksijen geçirgenlikleri sabit hacim-değişken basınç tekniği kullanılarak belirlenmiştir (Şen vd., 2006). Bu sistem film tarafından bölünen hacmin alt ve üst kısmı arasında, geçirgenliği belirlenecek gaz tarafından bir basınç farkı yaratılması ve filmin üst kısmında kalan hacimdeki basınç artışının zamana karşı incelenmesi esasına dayanmaktadır. Bu bağlamda test edilecek film hücreye sabitlenmiş ve ilk olarak filmin alt kısmında kalan hacme 2 bar basınçta oksijen gazı verilmiştir. Filmin üst kısmında kalan hacimdeki basınç artışı zamana karşı bir basınç sensörü kullanılarak (BD Sensors, DMP331) belirlenmiştir.

## 4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

### 4.1. Tarımsal Atıkların İçeriği

Proje kapsamında temel olarak 2 doğal kaynaktan biyobozunur film üretimi yapılması planlanmıştır. Bu kaynaklardan ilki buğday gluteni diğeri ise bir hemiselüloz olan ksilandır. Ksilan bitkisel hücrelerin hücre duvarında bulunan bir polimer olduğu için, pamuk ve ayçiçeği sapı gibi tarımsal atıklarda ve orman atıklarında bulunmaktadır. Bu bağlamda araştırmalarımızda kullanılmak üzere laboratuvarımıza yeterli miktarda tarımsal atık getirilmiştir. Ksilan bu kaynaklardan ayrıştırılmakta olduğundan, bu kaynakların özütlenmeye uygun hale getirilmesi için önce kurutulmaları daha sonra ise çekilerek uygun bir boyuta indirgenmeleri gerekmektedir. Bahsedilen doğal kaynaklar 60°C de 24 saat boyunca kurutulmalarının ardından bölümümüzdeki öğütme cihazında (Bico B9766X/410) öğütülüp, elenerek ksilan izolasyonu için 2.5 mm. boyutunda parçacıklar haline getirilmiştir.

Tarımsal atıklardan pamuk ve ayçiçeği sapsarı gereç ve yöntem bölümünde detaylı biçimde anlatıldığı şekilde iki aşamalı bir kimyasal karakterizasyona tabi tutulmuşlardır. İlk olarak Tablo 4.1 de görüldüğü üzere atıkların içerisindeki ana bileşenlerin ağırlık bazında oranları belirlenmiştir. Bunun ardından ise bu atıklardan elde edilen ksilan içerdiği şekerlerin cinsleri ve oranları bağlamında karakterize edilmiştir (Tablo 4.2). Bu son analiz sayesinde ksilanın hangi tip olduğu konusunda fikir sahibi olunabilir. Bu önemli bir noktadır, zira Zhang vd. (2004) ve Gröndahl vd. (2004) yaptığı çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda ksilan tipinin filmlerin mekanik özelliklerinde etkili olduğu görülmektedir.

Tablo 4.1. Pamuk sapı ve ayçiçek sapının kimyasal içeriği

<b>Pamuk Sapı</b>	<b>%</b>	<b>Ayçiçek Sapı</b>	<b>%</b>
Kül	4	Kül	2
Ksilan	21	Ksilan	16
Selüloz	36	Selüloz	41
Lignin	28	Lignin	34
Diğer	11	Diğer	7



Tablo 4.2 incelendiğinde pamuk sapı ve ayçiçeği sapının içerdiği ksilanın türü hakkında bilgi sahibi olunabilir. Pamuk ve ayçiçeği atıklarındaki şekerlerin cinsi ve oranları göz önüne alındığında bu iki doğal atıkta bulunan ksilanın, ana zincirini oluşturan ksiloz dışında bulunan diğer iki madde glukoz ve üronik asit olduğundan, glükuronoksilan olarak nitelendirilebileceği ortaya çıkmaktadır.

Tablo 4.2. Pamuk ve ayçiçeği sapı ksilanı monosakkarit kompozisyonu

<b>Pamuk Sapı Ksilanı</b>	<b>%</b>	<b>Ayçiçek Sapı Ksilanı</b>	<b>%</b>
Arabinoz	0	Arabinoz	0
Ksiloz	84	Ksiloz	86
Mannoz	0	Mannoz	0
Galaktoz	0	Galaktoz	0
Glukoz	7	Glukoz	4
Üronik Asit	9	Üronik Asit	10

Pamuk ve ayçiçek sapı arasından, pamuk sapının film yapımında kullanılması hedeflenmiştir. Bunun iki temel nedeni bulunmaktadır. İlk olarak Devlet Planlama Teşkilatı'nın 2004 yılında yayınladığı yıllık rapora göre Türkiye dünyadaki yıllık yaklaşık 19.3 milyon tonluk pamuk üretiminin 0.7 milyon tonunu karşılamaktadır ve bu bağlamda Türkiye dünyadaki önemli pamuk üreticilerinden birisidir. Tekstil sektörünün daha da gelişerek büyümesi için, pamuk ekiminin artırılması düşünülmelidir. Bu nedenle ülkemizde yüksek miktarlarda üretilen bu bitkinin atığının katma değer içeren ürünlere dönüştürülmesi önem taşımaktadır. Pamuk bitkisinin film üretiminde tercih edilmesinin bir diğer nedeni ise hemiselüloz bazlı biyobozunur filmlerle ilgili literatür göz önünde bulundurulduğunda bu maddenin özgün olmasıdır, zira geçen sene yayınlanan makalemiz dışında (Göksu vd. 2007) pamuk sapından elde edilmiş ksilan bazlı biyobozunur film yapımını konu alan başka bir makale bulunmamaktadır.

## **4.2 Plastikleştirici Cinsinin Film Oluşumu Üzerindeki Etkisi**

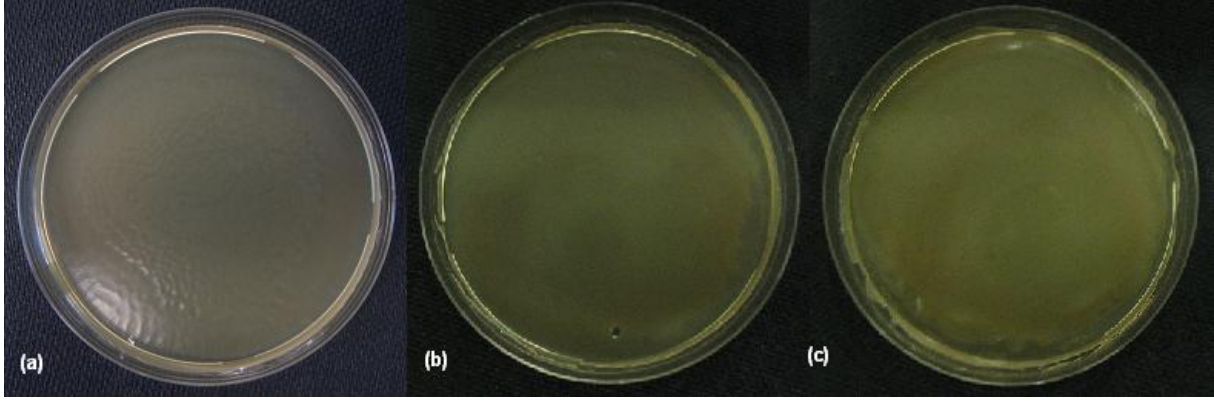
Proje kapsamında antimikrobik özelliklere sahip filmler hazırlanmadan önce ilk olarak doğal kaynaklardan oluşan filmler hazırlanması gerektiğinden glüten ve ksilan bazlı çeşitli filmler hazırlanmıştır. Bu aşamada en önemli nokta hangi koşullarda film oluşumunun gerçekleştiğinin belirlenmesidir.

### **4.2.1 Plastikleştirici Cinsinin Glüten Bazlı Filmler Üzerindeki Etkisi**

Bu proje kapsamında, glüten film yapımının ksilan filmlere göre daha kolay olduğu ve daha iyi özelliklerde filmler oluştuğu için, bir pozitif kontrol olarak kullanılması öngörülmüştür. Bu amaçla, laboratuvarımızda bulunan buğday glütenu (Kröner Stärke) daha ileri saflaştırma, izolasyon ya da benzeri diğer işlemlere gerek duyulmadan film yapımında kullanılmıştır. Bu maddeden değişik plastikleştiriciler kullanılarak çeşitli kompozisyonlarda filmler üretilmiştir.

Buğday glütenu bazlı biyobozunur filmlerin üretilmesi sırasında ilk olarak 10 gram buğday glütenu 2 gram gliserolle birlikte 88 ml suda oda sıcaklığında 30 dakika boyunca çözölmektedir. Bu esnada glütenu daha iyi çözölmelerini sağlamak amacıyla çözöltünün pH'ı NaOH kullanılarak 11'e getirilmektedir. Karıştırmanın ardından 20 gram sıvı çözöltü 9 cm. çapında plastik petrilere dökölmekte ve yaklaşık 3-4 günlük bir kuruma sürecinden sonra Şekil 4.1 de görölen biçimde filmler elde edilmektedir.

Laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalarda ksilan bazlı maddelere kıyasla buğday glütenu bütönlü filmler oluşturma bağlamında daha iyi bir madde olduğu gözlemlenmiştir. Her ne kadar plastikleştirici olarak gliserol kullanılmasıyla film elde edilebilir olsa dahi, ksilan bazlı filmlerde film oluşumu açısından daha iyi sonuç verdiği belirlenen ksilitölün ve ayrıca sorbitölün plastikleştirici olarak denenmesine karar verilmiştir. Gliserolle aynı oranda ksilitöl ya da sorbitöl kullanılması sonucu görönlüm olarak Şekil 4.1 de görölen filmler oluşmuştur.



Şekil 4.1 Plastikleştirici olarak gliserol (a), sorbitol (b) ve ksilitol (c) kullanılarak elde edilen buğday gluteni bazlı filmler

#### 4.2.2. Plastikleştirici Cinsinin Ksilan Bazlı Filmler Üzerindeki Etkisi

Bölüm 4.1 de belirtildiği üzere ksilan bazlı filmlerin yapılması için seçilen atık pamuk sapıdır. Ayrıca hem hemiselüloz bazlı filmlerle ilgili literatürde sık şekilde kullanılması, hem de saf olarak Sigma'dan temin edilmesi nedenleriyle huş ağacından elde edilmiş (birchwood) ksilanın da film yapımında kullanılmasına karar verilmiştir.

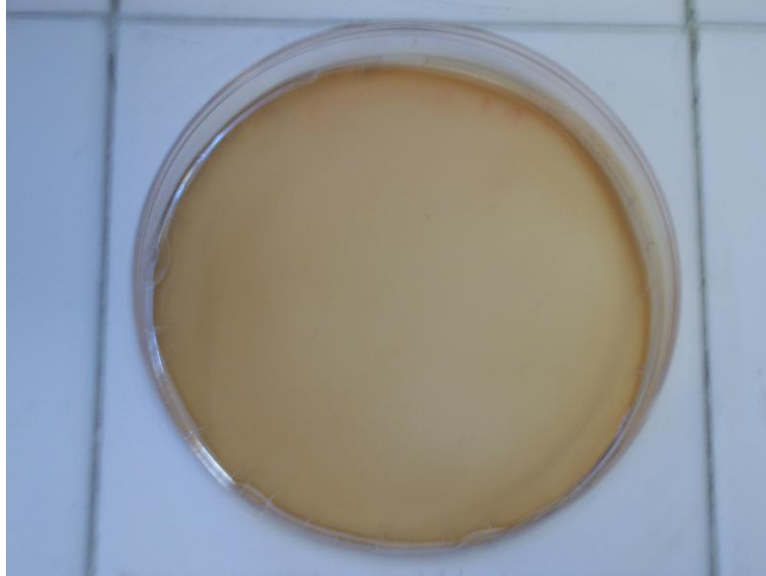
Ksilan bazlı filmlerin yapım yöntemi buğday gluteninden elde edilen filmlerin yapım yöntemi ile benzerlik göstermektedir. İki yöntem arasındaki temel farklılık ksilanın glutene oranla suda çözünmesi için daha uzun süre gerektirmesi ve ksilan bazlı filmlerin yapımı sırasında pH ayarlaması yapılmamasıdır. Laboratuvarımızda daha önceden yapılan çalışmalarda ksilanın buğday glutenine göre daha zor film oluşturan bir madde olduğu gözlemlenmiştir. Bu bağlamda daha önceden uygulanan ve gluten bazlı filmlerin yapımında da kullanılan ve 10 gram ksilan ve plastikleştirici olarak 2 gram gliserolün oda sıcaklığında 88 ml. suda yaklaşık 8 saat çözülmesi ve ardından 9 cm. çapında plastik petrilere dökülmesi yönteminde bazı değişikliklere gidilmiştir.

Bu değişiklikler bağlamında ilk olarak gliserol yerine plastikleştirici olarak sorbitol ve ksilitol kullanılmıştır. Huş ağacı ksilanı kullanılarak yapılan filmlerde bu maddedeki lignin düşük seviyede olduğu için plastikleştirici olarak gliserol kullanıldığında elde edilen filmlerde yer yer çatlaklar gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).



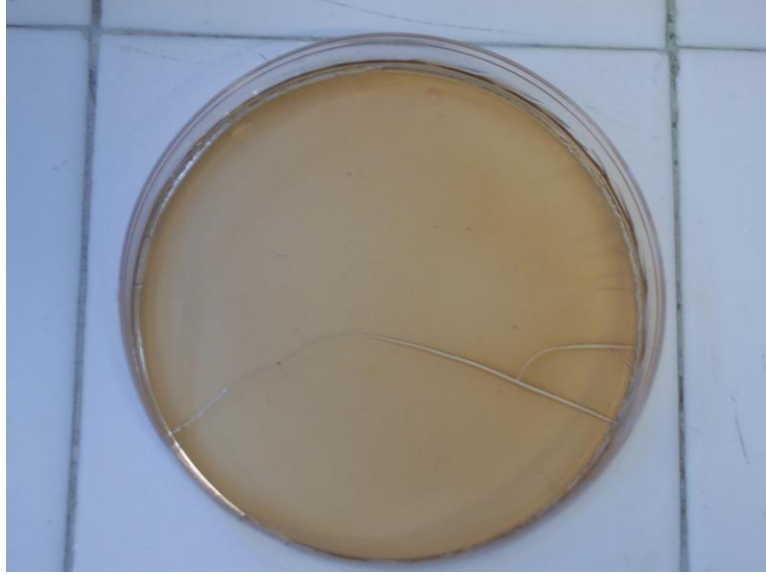
Şekil 4.2. Plastikleştirici olarak gliserol kullanılmasının huş ağacı ksilanı bazlı filmlere etkisi

Ancak yaptığımız çalışmalarda gliserol yerine ksilitol kullanıldığında huş ağacından elde edilmiş ksilanda oldukça düşük miktarlarda lignin bulunmasına rağmen film oluşumunun sağlandığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.3). Bu sonuç doğrultusunda ksilan bazlı filmlerde plastikleştirici olarak bundan sonra gliserol yerine ksilitol kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.3. Plastikleştirici olarak ksilitol kullanılmasının huş ağacı ksilanı bazlı filmlere etkisi

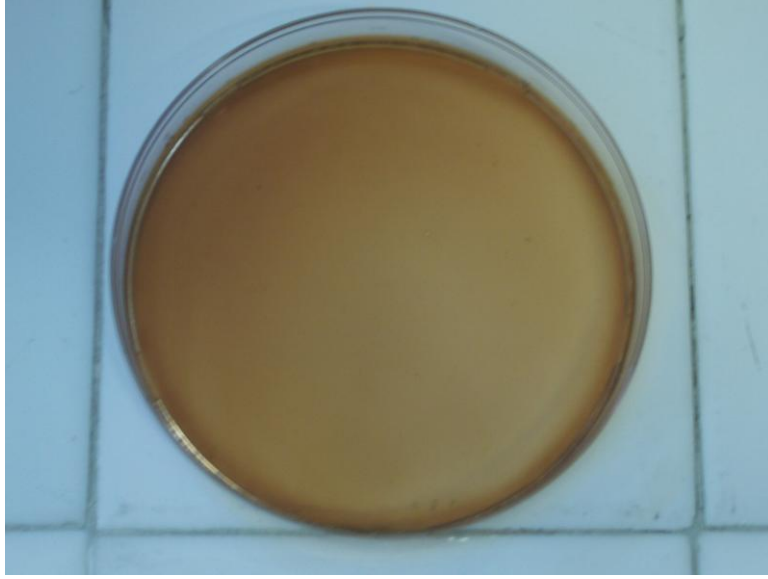
Plastikleştirici olarak sorbitolün kullanılmasının ise gliserole oranla film oluşumu iyileştirmesine rağmen yinede film yapısında çatlakların oluştuğu saptanmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Plastikleştirici olarak sorbitol kullanılmasının huş ağacı ksilani bazlı filmlere etkisi

Ksilan bazlı filmlerin üretilme yönteminde yapılan bir diğer değişiklik ise karıştırma sıcaklığının oda sıcaklığından 80°C ye yükseltilmesidir. Yüksek sıcaklık ksilanın suda daha iyi ve kolay şekilde çözülmesini sağlamaktadır. Ksilitol kullanımı ile birlikte bu değişikliğinde film oluşumunda etkisi olduğu düşünülmektedir.

Pamuk sapından elde edilmiş ksilana göre film elde etmenin daha zor olduğu huş ağacından elde edilmiş ksilan baz alınarak yapılan bu değişiklikler, pamuk sapından elde edilen ksilan kullanılarak yapılan filmlere de uygulanmıştır. Daha önce yayınlanan makalemizde de (Göksu vd. 2007) gösterildiği üzere pamuk sapından ksilanın izolasyonu sırasında belli miktarlarda ligninin ksilanla beraber bırakılması yani ligninin tümüyle uzaklaştırılmaması sonucu plastikleştirici ihtiyacı olmadan da bütün filmler elde edilmektedir. Ancak yine de bu filmlerin hazırlanışı sırasında ksilitol eklemek filmlerin daha iyi sünme değerlerine sahip olmasına neden olabilir. Bu nedenle pamuk sapından özütlenmiş ksilan, ksilitolle karıştırılmış ve beklenildiği üzere film oluşumu sorunsuz şekilde gerçekleşmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Plastikleştirici olarak ksilitol kullanılmasının pamuk sapı ksilanı bazlı filmlere etkisi

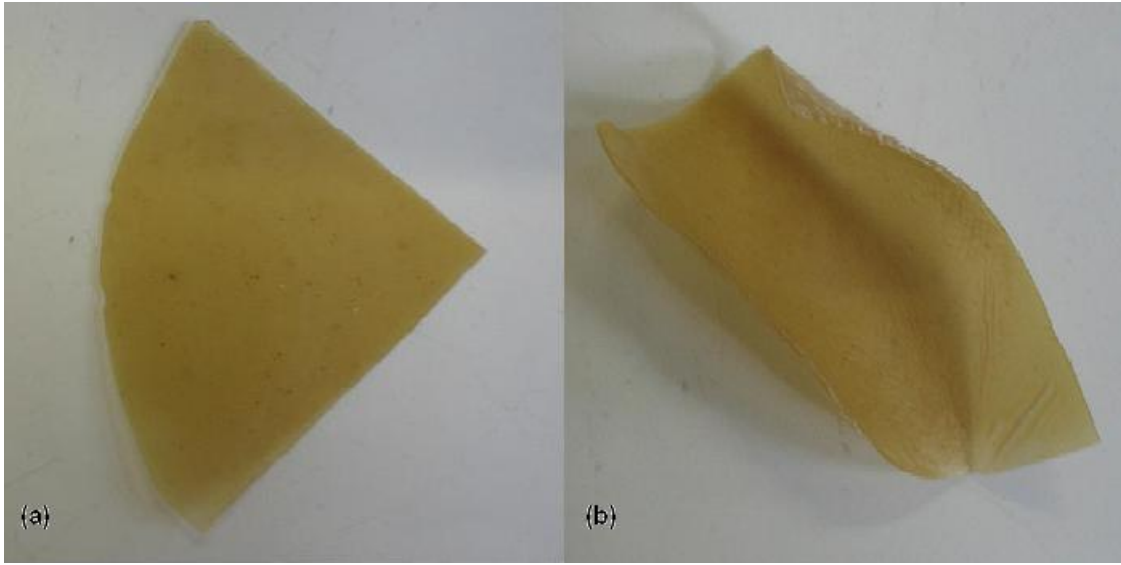
### 4.3. Filmlerin Antimikrobik Özellikleri

Projenin ana hedefi olan  $TiO_2$ -bazlı yarı-iletken antimikrobik ve biyobozunur filmler üretilmesi aşamasında 3 farklı yöntem izlenmiştir. Yukarıda açıklandığı şekilde elde edilen filmler ilk olarak sol-jel solüsyonu ile kaplanmıştır. Sol-jel ile kaplama yöntemi dışında film çözeltisi içerisine sol-jel solüsyonundan belli bir miktar eklenmesi ve son olarak film çözeltisi içerisine toz halde  $TiO_2$  eklenmesi denenmiştir.

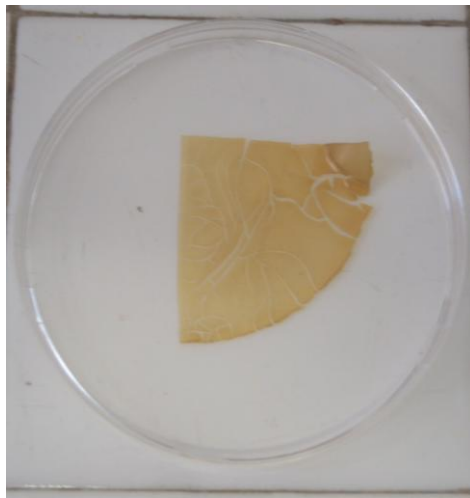
#### 4.3.1. Sol-jel Solüsyonu ile Kaplanmış Filmlerin Özellikleri

$TiO_2$ -bazlı antimikrobik etki, ışık altında titanyum dioksit nanoparçacıklarının üzerine gelen organik molekülleri (madde ya da mikroorganizma) okside ederek  $CO_2$  ve  $H_2O$ 'ya çevirmesine dayanır. Buğday glütenu ve ksilan bazlı filmlerin antimikrobik kaplamalarının yapılmasında ilk aşama yarı-iletken titanyum dioksit sol-jel çözeltisinin hazırlanmasıdır. Bu çözeltinin hazırlanmasında titanyum dioksitin, bu maddenin öncülü olan titanyum tetraisopropoksitten (TTIP) sentezlenmesi benimsenmiştir. Bu işlem için ilk olarak 2.5 ml. TTIP ve 0.5 ml. asetik asit 100 ml. suya eklenmiş, ardından 0.35 ml. nitrik asit bu karışıma ilave edilmiş ve karışım 80 derecede, geriye akışlı bir yoğunlaştırıcıda 30 dakika boyunca kaynatılmıştır. Bu işlemin ardından karışım manyetik bir karıştırıcıda 24 saat boyunca karıştırılmıştır. Biyobozunur filmlerin antimikrobik kaplamasının yapılması filmlerin bu

karişim içerisinde 30 dakika bekletilmesiyle sağlanmaktadır. Bu işlemi takiben oda sıcaklığında 1 gün kurutulan filmler, titanyum dioksit nano parçacıklarının kristalleşmesi için 60°C de 1 saat boyunca ısıya maruz bırakılmışlardır. Buğday glteni bazlı filmlerin bu şekilde kaplanmaları sonucunda kaplama öncesine göre plastik özelliklerini yitirdikleri, sert ve kırılgan hale geldikleri gözlemlenmiştir (şekil 4.6). Buğday glteni bazlı filmlerle aynı şekilde kaplanmış ksilan bazlı filmlerin ise kaplama sonucunda bütünlüklerini yitirdikleri ve film yapısında yoğun çatlaklar oluştuğu gözlemlenmiştir (şekil 4.7).



şekil 4.6. Buğday glteni bazlı filmlerin sol-jel solüsyonu ile 30 dakika kaplanmaları öncesi (a) ve sonrası (b) görünümleri



şekil 4.7. Pamuk sapı ksilanı bazlı filmin antimikrobik olarak kaplanmasının ardından aldığı görünüm

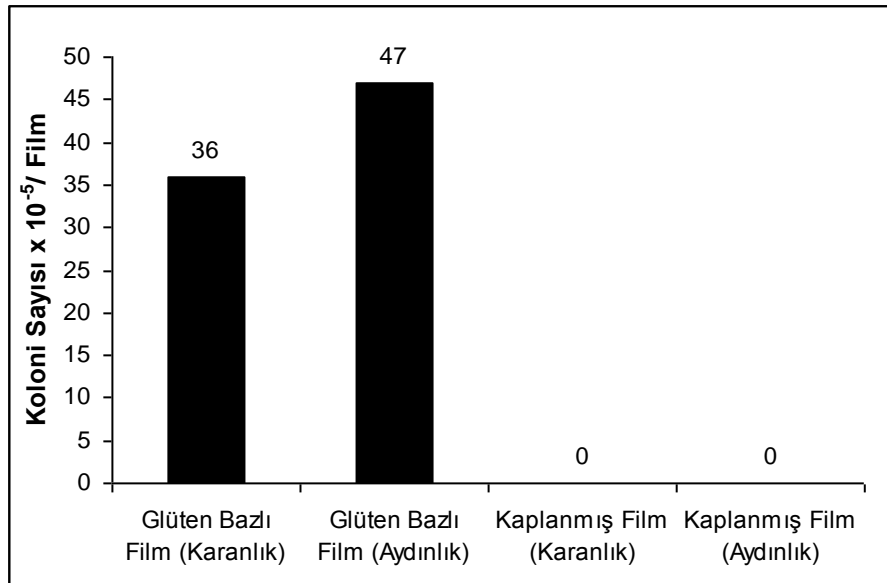
Buğday glütene bazlı filmlerin kaplama sonrasında gösterdikleri olumsuz niteliklere rağmen bu filmlerin antimikrobik testlerin yapılabilmesi için gerekli olan, bakterilerin fotokatalitik etkiye maruz bırakılabileceği bütün bir yüzey sağlamasından dolayı ilk olarak bu filmlerin antimikrobik etkileriyle ilgili testlerin yapılmasına karar verilmiştir. Bu noktadaki yaklaşım, ilk olarak biyobozunur malzemenin fotokatalitik etki vasıtasıyla antimikrobik hale getirilmesidir.

Antimikrobik karakterizasyon sürecinde en önemli noktalardan biri testlerin 4 değişik grup üstünde yapılması gerekliliğidir. Zira titanyum dioksitin ışıkla etkileşmesi sonucunda ortaya çıkan fotokatalitik etki dışında antimikrobik etkinin meydana gelebileceği diğer 2 kaynak daha bulunmaktadır. Bunlardan ilki sadece ışıktan kaynaklanan antimikrobik etkidir. Yüksek enerji ve şiddetteki ışık bakterilerin ölmesine neden olabilir. Bu durum kullanılan ışığın dalga boyu aralığı ve örneğe bulunduğu uzaklıkta örnek üstüne düşen ışığın şiddeti ile ilgilidir. Bu nedenle sadece ışık kaynaklı ölümlerin gözlemlenebilmesi açısından kaplanmamış filmlerin karanlık ve ışık altında test süreci sonunda barındırdıkları canlı mikroorganizmaların sayılması gerekmektedir. Bu iki verinin kıyaslanması fotokatalitik etkiden bağımsız olarak sadece ışık kaynaklı ölümlerin oranı hakkında bilgi verecektir. Titanyum dioksit parçacıklarının yarattığı fotokatalitik etki dışındaki bir diğer antimikrobik etki ise filmlerin kaplama sonrasında test süreci boyunca ışığa maruz kalmamış olmalarına rağmen sol-jelin test sırasında kullanılan bakteri türüne karşı neden olduğu fotokatalitik olmayan başka bir etki dolayısıyla olabilir. Bu etkiyi de gözlemleyebilmek açısından kaplanmış filmler test süreci boyunca karanlıkta bekletilmiş ve ardından bu filmler üstündeki canlı kalan mikroorganizmaların oluşturdukları kolonilerin karanlıkta bekletilen ve kaplanmamış filmlerden elde edilen koloni sayısı ile kıyaslanması sonucunda fotokatalitik etki dışındaki diğer etkiler dolayısıyla ölen bakteri oranının hesaplanmasında kullanılmıştır.

Yukarıda anlatılan kavramlar Şekil 4.8 de gösterilen sonuçların yorumlanması sırasında daha iyi anlaşılabilir. Antimikrobik test sırasında güneş ışığına özdeş dalga boylarında ışık veren, 300 W gücünde bir lamba kullanılmış (Osram Ultravitalux) ve bu şekilde normal gün ışığı koşullarının simülasyonunun yapılması düşünülmüştür. Test süresi 1 saat olarak belirlenmiş ve bu süre boyunca buğday glütene bazlı filmler sol-jel ile kaplanmış ve kaplanmamış olarak karanlıkta ve gün ışığına özdeş lamba altında bekletilmiştir. Elde edilen 4 sonuçtan ilk olarak kaplanmamış filmlerin ışık altında ve karanlıkta bekletilmeleri sonucu ortaya çıkan koloni



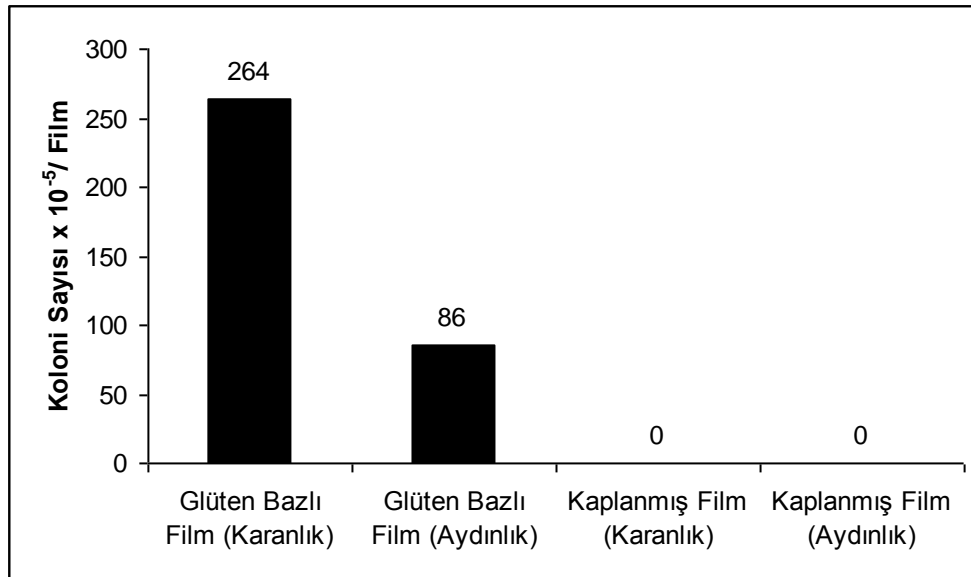
sayılarından ışığın bu test sırasında tek başına herhangi bir ölüme yol açmadığı gözlemlenmiştir. Aksine ışık altında bekletilen kaplanmamış filmlerden elde edilen koloni sayılarında karanlıkta bekletilenlere göre artış olmuştur. Her ikisi de karanlıkta bekletilen fakat biri kaplanmış diğeri ise kaplanmamış filmlerden elde edilen koloni sayılarının incelenmesi sonucunda ise bakterilerin kaplama sonrasında filmde oluşan, fotokatalitik etki dışında kalan başka bir etki nedeniyle öldükleri ortaya çıkmaktadır zira karanlıkta bekletilen kaplanmamış filmde elde edilen 36 koloni aynı koşullarda bekletilen sol-jel ile kaplanmış filmde 0 koloniye düşmüştür. Kaplanmış filmler karanlık koşullarda bu tarz bir etki yarattıklarından aynı filmlerin ışık altında bekletilmeleri sonucunda da koloni sayısının 0 çıkması beklenen bir durumdur. Fotokatalitik etkinin varlığının incelenebilmesi için ışık altında bekletilen kaplanmış filmlerden elde edilen koloni sayısının karanlıkta bekletilen kaplanmamış filmlerle ya da karanlıkta bekletilen kaplanmış filmlerle kıyaslanması gerekmektedir. Bunu yaparken ışıktan ve fotokatalitik etki dışında karanlıkta oluşan antimikrobik etkiden kaynaklanan ölümlerin dikkate alınması ve bu ölümler dışında kalan ölümlerin fotokatalitik etkiye atfedilmesi gerekir. Ancak Şekil 4.8 de görülebileceği üzere kaplanmış filmler karanlıkta koloni sayısını 0 a indirdiklerinden dolayı bu tarz bir incelemenin yapılması mümkün olmamıştır ve her ne kadar ışık altında bekletilen kaplanmış filmlerde ki koloni sayısı 0 olsa da, bakteri sayısındaki azalma fotokatalitik etkiye atfedilemez.



Şekil 4.8 Glüten bazlı filmlerin 30 dakika kaplanmaları sonucunda filmlerden 1 saat sonunda güneş ışığına özdeş ışık altında elde edilen koloni sayıları

Bu aşamada fotokatalitik etkinin incelenebilir olması için karanlıkta meydana gelen ölümlerin azaltılması gerekmektedir. Bu ölümlerin nedeninin filmin asidik pH'a sahip sol-jelin içinde beklemesi sonrasında bakteriler için uygunsuz olan düşük pH'lı bir ortama dönüşmesi olduğu öngörülmüştür. Bu nedenle filmlerin pH'ının bakteriler için daha uygun hale getirilmesi açısından sol-jel reçetesinde kullanılan nitrik asit yerine kaynama noktası daha düşük olan hidroklorik asidin kullanılması düşünülmüştür. Bunun nedeni filmlerin hem sol-jel solüsyonunda bekletildikten sonra oda sıcaklığında kurutulmaları sırasında, hem de titanyum dioksit parçacıklarının kristalleşmesi için 60°C'de bekletildikleri sırada hidroklorik asidin nitrik aside göre daha kolay filmlerden uzaklaşacağı düşüncesidir. Bu şekilde filmlerin pH'ının bakteriler için daha uygun bir hale geleceği ve bu sayede de kaplanmış filmlerin karanlıkta herhangi ciddi bir ölüm oranına neden olmayarak fotokatalitik etkinin incelenebilir hale geleceği düşünülmüştür.

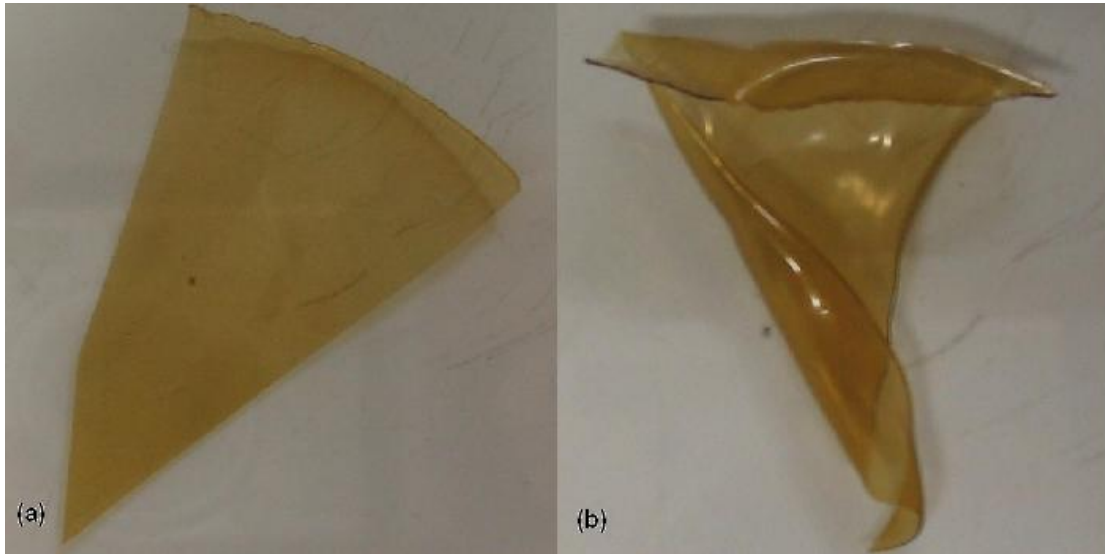
Bu öngörüler doğrultusunda nitrik asit yerine hidroklorik asit içeren sol-jel solüsyonuyla kaplanan filmlerden elde edilen antimikrobik test sonuçları Şekil 4.9 da gösterilmiştir. Bir önceki testte olduğu gibi bu sefer de sol-jel solüsyonuyla kaplanmış ve test süresince 1 saat boyunca karanlıkta bekletilmiş olan filminden elde edilen koloni sayısı 0 olmuştur. Bu nedenle aynı filmin ışığa maruz kalan parçasından da yine 0 koloni elde edilmiş ve fotokatalitik etkinin olup olmadığı hakkında herhangi bir gözlem yapılamamıştır.



Şekil 4.9 Nitrik asit yerine hidroklorik asit kullanılmış sol-jel ile 30 dakika kaplanmış glüten bazlı filmlerden 1 saat sonunda güneş ışığına özdeş ışık altında elde edilen koloni sayıları

Elde edilen bu sonuç üzerine bu sefer filmlerin sol-jel solüsyonundan gelen asitliklerinin azaltılması için sol-jel solüsyonu içinde bekleme sürelerinin düşürülmesine karar verilmiştir. Kaplama süresinin düşürülmesi aynı zamanda hem ksilan bazlı filmlerde oluşan çatlakların azalmasına ya da ortadan kaybolmasına neden olabileceği, hem de sol-jel solüsyonunun fotokatalitik antimikrobik etkisinin değişik bir zeminde denenmesine olanak sağlayacağı için kaplamanın ksilan bazlı filmler üzerinde denenmesine karar verilmiştir.

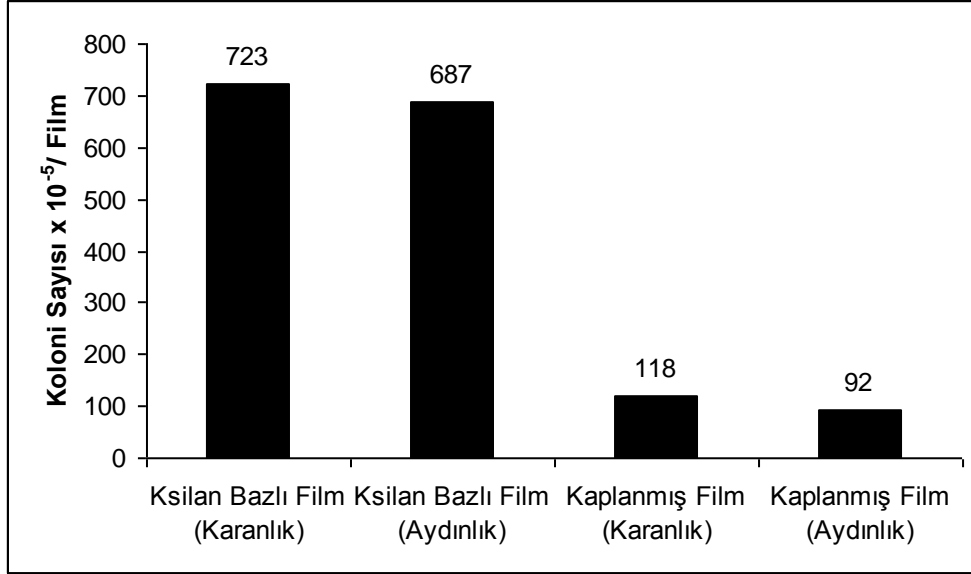
Ksilan bazlı filmler değişik sürelerde sol-jel solüsyonu içinde bekletilmiş ve yapılan denemeler sonucunda solüsyon içerisinde yaklaşık 15 saniye bekletilen filmlerin kuruma sonrasında bütünlüklerini yitirmedikleri ve yüzeylerinde çatlakların oluşmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.10). Bu nedenle sol-jel solüsyonu içinde bekleme süresi 15 saniyeye çekilerek kaplama ve antimikrobik test ile ilgili diğer tüm değişkenler aynı tutularak karakterizasyona devam edilmiştir.



Şekil 4.10 Ksilan bazlı filmlerin sol-jel solüsyonu ile kaplanmadan önce (a) ve 15 saniye kaplandıktan sonra (b) aldıkları görünüm

Yapılan bu son değişiklikler Şekil 4.11 de de görülebileceği üzere fotokatalitik etkinin incelenmesine uygun veriler elde edilmesine olanak vermiştir. Şekil 4.11 de ki sonuçlara göre her ikisi de karanlıkta bekletilen kaplanmış ve kaplanmamış filmlerden elde edilen koloni sayıları kıyaslandığında daha önceki testlerde olduğu gibi yine fotokatalitik etki dışında bir başka etkinin mikroorganizmaları öldürdüğü gözlemlenebilir. Fakat bu etki bu sefer

kaplanmış filmdeki koloni sayısını 0'a indirmemiş ve bu şekilde koloni sayılarını aynı filmin ışık altında bekletilen parçasıyla kıyaslama olanağı doğmuştur.



Şekil 4.11 Ksilan bazlı filmlerin 15 saniye kaplanmaları sonucunda filmlerden 1 saat sonunda güneş ışığına özdeş ışık altında elde edilen koloni sayıları

Fotokatalitik etkinin değerlendirilebilmesi için 2 farklı yaklaşım izlenebilir. Bu yaklaşımlar hangi iki grubun kıyaslanacağı ile ilgilidir. İlk olarak kaplanmış filmlerin ışık altında ve karanlıkta bekletilen parçalarından elde edilen koloni sayıları kıyaslandığında 118'den 92'ye düşen koloni sayısının yaklaşık %22 oranında bir ölüme karşılık geldiği ortaya çıkmaktadır. Ancak bu ölümün bir kısmı sadece ışık kaynaklıdır. Kaplanmamış filmlerin ışık altında ve karanlıkta bekletilen parçalarından elde edilen koloni sayıları sadece ışık kaynaklı ölüm hakkında bilgi vermektedir. 723 den 687 ye düşen koloni sayısı baz alındığında sadece ışık kaynaklı ölümün %5 civarında olduğu hesaplanmıştır. Bu oran daha önce %22 olarak hesaplanan ölüm oranının içinde yer almaktadır ve sadece fotokatalitik etkinin hesaplanabilmesi için %22 den çıkartılmalıdır. Bunun sonucunda bu örneklerde yaklaşık %17 oranında fotokatalitik antimikrobik etki olduğu sonucu elde edilebilir. Bu hesaplamada filmlerin asitliğinden kaynaklandığı düşünülen ölümler hesaba katılmamıştır çünkü fotokatalitik etkinin hesaplanması için kıyaslanan her iki filmde sol-jel solüsyonuyla kaplanmıştır ve pH'dan kaynaklanan etkinin her iki film üstünde bulunan bakterileri de aynı şekilde etkileyeceği varsayılmaktadır. Bir diğer deyişle her ikisi de kaplanmış bu iki filmin

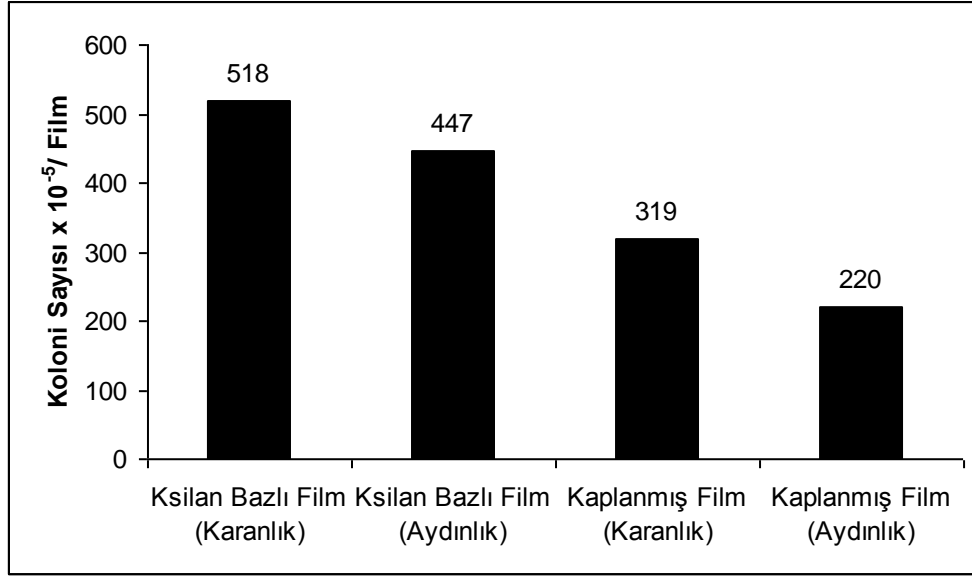
test edilmesi sırasındaki tek değişken ışıktır ve bu değişken de göz önüne alınarak neden olduğu ölüm toplam ölüm oranından çıkartılmıştır.

Fotokatalitik etkinin değerlendirilmesindeki ikinci yaklaşım ise her ikisi de ışık altında bekletilmiş biri kaplanmış diğeri ise kaplanmamış filmlerin kıyaslanmasıdır. Burada ise, her iki filmde ışık altında beklediğinden dolayı tek değişken filmlerin kaplama sonrasında değişen pH'larıdır. Bu nedenle ilk olarak bu iki film kıyaslanarak toplam ölümün hesaplanmasının ardından pH kaynaklı ölüm toplam ölümden çıkartılarak fotokatalitik etkini oranı bulunabilir. Işık altında bekletilen kaplanmış ve kaplanmamış filmler kıyaslandığında koloni sayısının 687 den 92 ye düştüğü ve bunun toplam %87 civarında ölüme denk geldiği görülebilir. Ancak bu toplam ölümün bir kısmı sadece pH kaynaklıdır. Karanlıkta bekletilen kaplanmış ve kaplanmamış filmlerdeki koloni sayısı 723 den 118 e düşmüştür ve bu da yaklaşık %84'lük bir ölüm oranına karşılık gelmektedir. Bu oranın toplam ölüm oranı olan %87'den çıkartılmasıyla sadece fotokatalitik olarak elde edilen antimikrobik etki %3 olarak hesaplanabilir.

Filmlerin sahip olduğu fotokatalitik antimikrobiyel etkinin hesaplanmasında her iki yaklaşımla bulunan fotokatalitik antimikrobik ölüm oranlarının aritmetik ortalamasının alınması benimsenmiştir. Bu bağlamda ilk yaklaşım ile %17, ikinci yaklaşım ile %3 olarak hesaplanan fotokatalitik antimikrobiyel etki, sol-jel solüsyonunda 15 saniye bekletilmiş ksilan bazlı filmler için 1 saat sonunda güneş ışığına özdeş dalga boylarında ışık veren lamba altında %10 olarak belirlenmiştir.

Yukarıda anlatılan şekilde hazırlanan sol-jel ile kaplanmış filmlerde belli miktarda antimikrobik etki görülmesi nedeniyle bu filmlerin tekrar hazırlanması ve fotokatalitik antimikrobiyel etkinin doğrulanması açısından iki test daha yapılmasına karar verilmiştir. Şekil 4.12 de görülen sonuçlar incelendiğinde koloni sayılarında bir önceki testle benzer azalmaların olduğu görülebilir. Işık kaynaklı ölüm oranı, kaplanmamış filmlerin kıyaslanması sonucunda, %14 olarak hesaplanmıştır. pH kaynaklı ölüm oranı ise karanlıkta bekletilen kaplanmış ve kaplanmamış filmlerin kıyaslanması sonucunda %38 olarak bulunmuştur. Kaplanmış filmler kıyaslanıp bulunan ölüm oranından ışık kaynaklı ölüm oranı çıkartıldığında fotokatalitik aktivite %17 olarak hesaplanabilir. Aydınlıkta bekletilen kaplanmış ve kaplanmamış filmler kıyaslanarak bulunan ölüm oranından pH kaynaklı ölüm oranı

çıkartıldığında ise fotokatalitik antimikrobiyel aktivite %13 olarak bulunmuştur. Bu iki değerin ortalaması alındığında fotokatalitik antimikrobiyel aktivite %15 olarak hesaplanmıştır. Bu değer ilk testte elde edilen fotokatalitik antimikrobiyel aktiviteye oldukça yakındır ve fotokatalitik aktiviteyi doğrular niteliktedir.

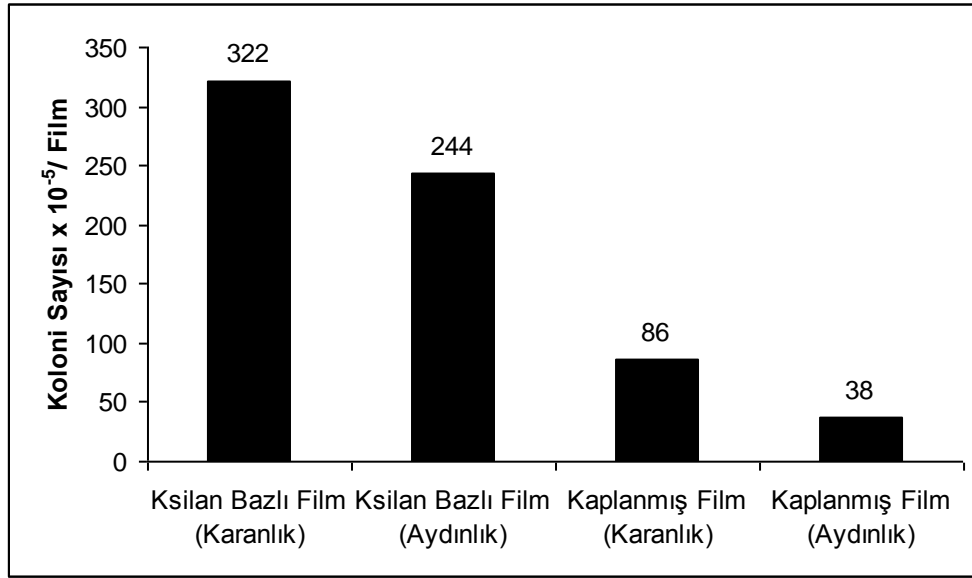


Şekil 4.12. Ksilan bazlı filmlerin 15 saniye kaplanmaları sonucunda filmlerden 1 saat sonunda güneş ışığına özdeş ışık altında elde edilen koloni sayıları

Fotokatalitik aktivitenin oraya çıkmasında en önemli faktörlerden biri kullanılan ışığın dalga boyudur ve bu durumu destekleyen çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Chawengkijwanich ve Hayata 2008, Kühn vd. 2003, Yew vd. 2006). Kullanılan ışığın dalga boyu düştükçe daha çok enerji vermekte ve bu enerji de titanyum dioksit parçacıklarının daha kolay şekilde radikaller oluşturmasına yol açmaktadır. Bu nedenle önceki 2 testte kullanılan filmlerin bu kez UV-A dalga boyunda çalışan ve 367 nm dalga boyunda en yüksek yoğunlukta ışık veren siyah ışık altında (General Electric Black Light 20 W) test edilmesi düşünülmüştür. Kullanılan bu yeni lambanın öncekinden daha düşük dalga boyunda ışık verdiği hesaba katılarak ve aynı zamanda pH'dan kaynaklanan ölümlerin mikroorganizmaların film yüzeyiyle temas etme süresinin azaltılmasıyla kısmen de olsa düşürülebileceği öngörülerek test süresi 1 saatten 20 dakikaya düşürülmüştür.

Şekil 4.13 de görülebilecek sonuçlar üzerinden, pH ve ışık kaynaklı ölümler daha önceki iki testte anlatıldığı biçimde hesaplanmış ve sırasıyla %73 ve %24 olarak bulunmuştur.

Kaplanmış filmler baz alınarak yapılan ve toplam ölümden pH ölümünün çıkartılmasıyla elde edilen fotokatalitik antimikrobiyel aktivite % 32, aydınlıkta bekletilen kaplanmış ve kaplanmamış filmler baz alınarak ve toplam ölümden ışık kaynaklı ölüm oranının çıkartılmasıyla elde edilen fotokatalitik antimikrobiyel aktivite ise % 11 olarak hesaplanmıştır. Bu iki değer ortalama alınarak bu test için ksilan bazlı filmlerin fotokatalitik antimikrobiyel aktivitesi %22 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.13. Ksilan bazlı filmlerin 15 saniye kaplanmaları sonucunda filmlerden 20 dakika sonra siyah ışık altında elde edilen koloni sayıları

15 saniye boyunca sol-jel solüsyonunda bekletilmiş ksilan bazlı filmlerden elde edilen bu 3 sonuç göz önüne alındığından bu filmlerin fotokatalitik aktivasyonunun güneş ışığına özdeş dalga boyunda ışık veren lamba altında 1 saat sonunda %10 ila %15 arasında değiştiği ve ortalama olarak %13 civarında olduğu, UV-A dalga boyunda ışık veren lamba altında ise 20 dakika sonunda %22 civarında olduğu ortaya çıkmaktadır.

#### 4.3.2. Filmlere sol-gel solüsyonunun eklenmesi

Ksilan bazlı filmlere yapılan kaplama sonrasında her ne kadar kaplama süresinin 15 saniyeye düşürülmesi filmlerin bütünümlerini korumasına ve çatlakların oluşmamasına neden olmuş olsa da filmlerin glüten bazlı filmlere benzer şekilde plastik özelliklerini kısmen yitirdikleri, daha sert ve kırılabilir hale geldikleri gözlemlenmiştir. Bu nedenle kaplama dışında iki farklı

alternatifin filmlere fotokatalitik antimikrobiyel aktivite kazandırılması için denenmesine karar verilmiştir. Bunlardan ilki filmlerin sol-jel solüsyonun içerisinde bekletilerek kaplanmaları yerine film solüsyonuna sol-jeli eklemek ve film solüsyonunun içindeki sol-jel ile birlikte kurumasını sağlamaktır. Bu yöntemlerin hem kaplamanın neden olduğu, filmin plastik özelliklerindeki gözle görülebilir bozulmanın giderilebileceği düşüncesi hem de kaplama ile elde edilen antimikrobik aktiviteden daha yüksek bir fotokatalitik aktivite elde etme olasılığı göz önünde bulundurularak denenmesine karar verilmiştir.

Ksilan bazlı filmler film solüsyonu içerisine her bir film için 5 ml. sol-jel eklenerek karıştırılmış ve bunun ardından daha önce olduğu gibi 9 cm. çapında petri kaplarına dökülerek kurutulmalarının ardından Şekil 4.14 de görülen biçimde filmler elde edilmiştir.

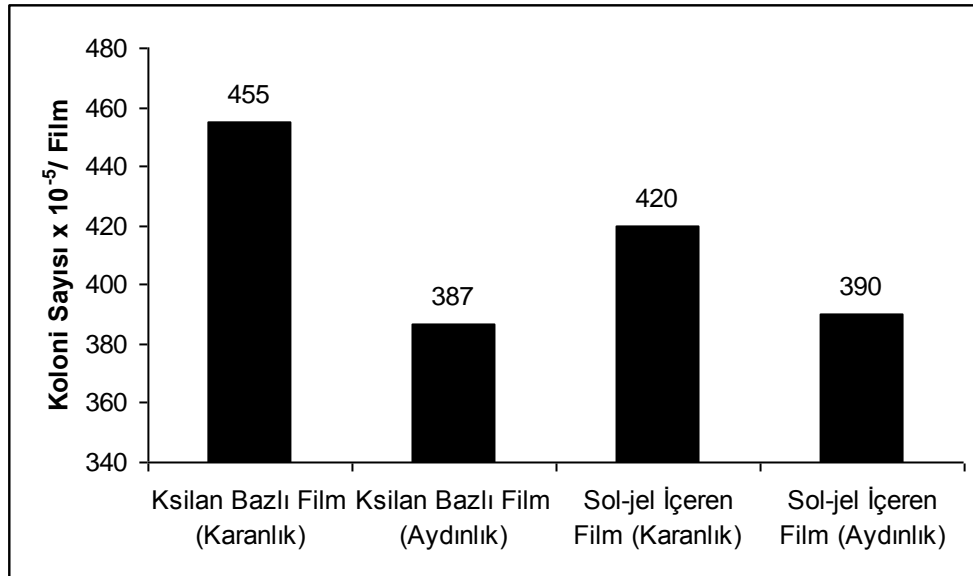


Şekil 4.14. Film solüsyonuna sol-jel eklenmesiyle elde edilen ksilan bazlı film

Sol-jel içeren ksilan bazlı filmlerin 1 saat boyunca güneş ışığına özdeş dalga boyunda ışık veren lamba altında bekletilmeleri sonucunda filmlerden elde edilen koloni sayıları sol-jel ile kaplanmış ksilan bazlı filmlerden elde edilen koloni sayılarından daha farklı bir görünüm göstermektedir (Şekil 4.15). Sol-jel içeren ve içermeyen filmler arasında koloni sayıları bağlamında ciddi bir fark bulunmazken aynı zamanda pH kaynaklı ölümlerde kaplanmış filmlerle yapılan karakterizasyonlara göre daha az olmuştur. Işık kaynaklı ölüm oranı sol-jel içermeyen filmlerden elde edilen koloni sayıları kıyaslanarak %15, pH kaynaklı ölüm oranı



ise karanlıkta bekletilen ve sol-jel içeren ve içermeyen filmlerin kıyaslanmasıyla %8 olarak hesaplanmıştır. Sol-jel içeren filmlerin karanlık ve aydınlıktaki koloni sayıları kıyaslandığında %7 oranında toplam ölüm olduğu gözlemlense bile, bu gruptaki değişken olan ışığın neden olduğu ölüm oranı bu orandan daha fazla olduğundan aslında fotokatalitik etkiye bağlı herhangi bir ölüm olmadığı ortaya çıkmaktadır. Fotokatalitik etkinin incelenmesindeki diğer kıyaslama olan ışığa maruz kalan, sol-jel içeren ve içermeyen filmlerden elde edilen koloni sayılarının kıyaslanmasıyla ise bu durumda herhangi bir ölüm olmadığı aksine koloni sayılarında çok az bir artış olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle sol-jelin film solüsyonuna eklenmesiyle elde edilen bu filmlerde fotokatalitik etkiye bağlı herhangi bir aktivasyondan söz etmek mümkün değildir. Bu durumun nedeninin, EDX kullanılarak yapılan taramalı elektron mikroskobu analizi sonrasında, film yüzeyindeki titanyum dioksit miktarının yetersiz olması dolayısıyla gerçekleştiği anlaşılmıştır. Taramalı elektron mikroskobu analizinin detayları raporun bir sonraki bölümünde verilmiştir.

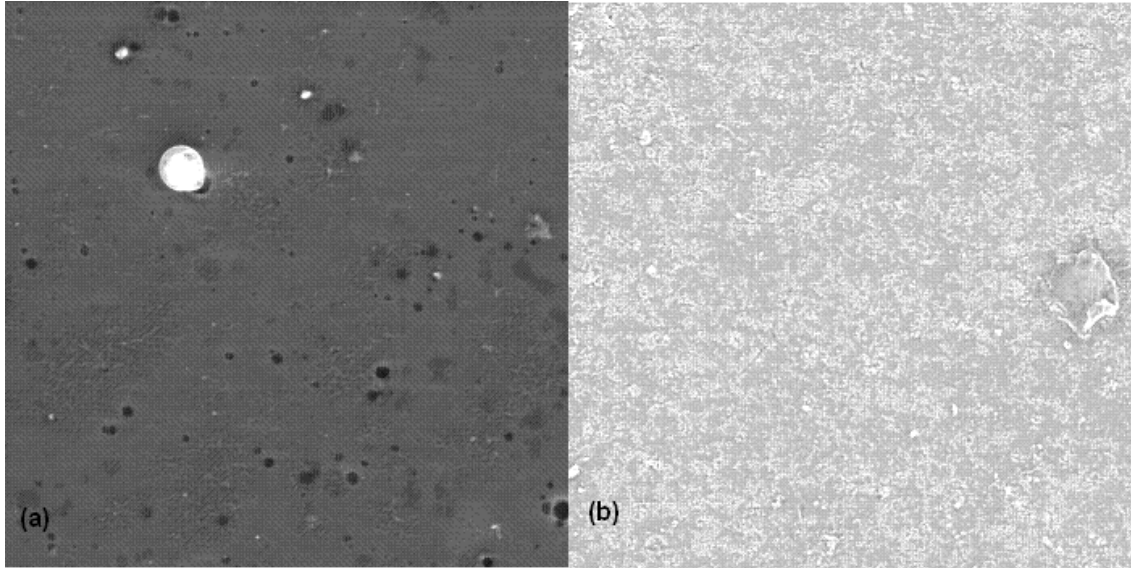


Şekil 4.15 Film solüsyonuna sol-jel eklenmesiyle elde edilen ksilan bazlı filmlerden 1 saat sonunda güneş ışığına özdeş ışık altında elde edilen koloni sayıları

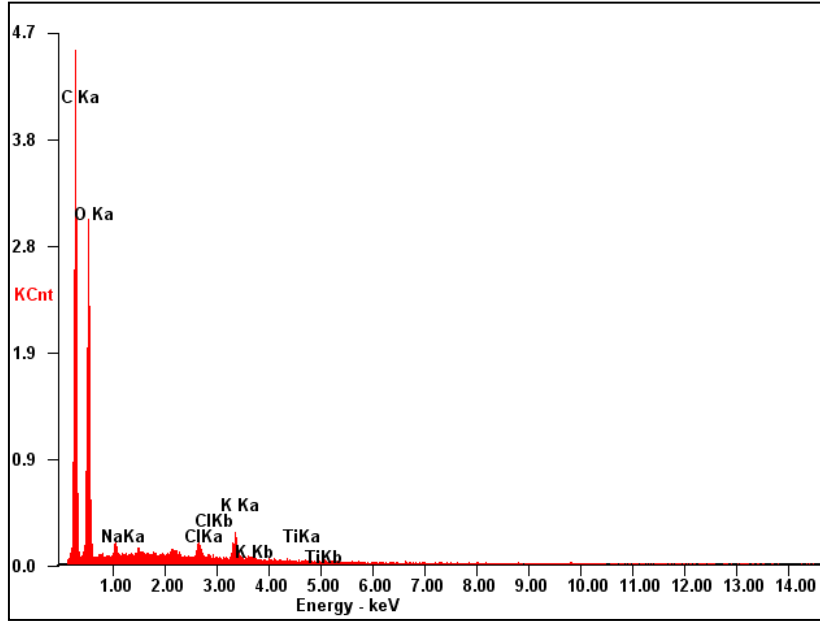
Ksilan bazlı filmlere fotokatalitik antimikrobiyel aktivite kazandırılması bağlamında denenen sol jel solüsyonunun film solüsyonuna eklenmesi yöntemi her hangi bir antimikrobik aktiviteye neden olmadığından bu durumun nedeninin daha iyi anlaşılabilmesi için bu şekilde elde edilen ksilan bazlı filmlere TiO<sub>2</sub> içermeyen filmlerle kıyaslamalı olarak taramalı elektron mikroskobu analizi yapılmıştır. Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkezi Laboratuvarında

yapılan bu analizde kullanılan elektron mikroskobuna bağlı ayrıca bir EDX (Enerji yayımlı X ışını spektroskopisi) ünitesi de bulunmaktadır. EDX analiz sırasında incelenen örneklerin yüzeylerindeki elementlerin atomik ve kütleli oranlarını verdiğinden EDX yardımıyla bu filmlerin yüzeylerinde bulunan titanyum elementinin oranı da incelenmiştir.

Şekil 4.16 da görülen sol-jel içeren ve içermeyen filmlerin yüzeylerinin EDX analizinin yapılması sonucunda sol-jel içeren ve içermeyen filmlerdeki titanyum elementinin oranı arasındaki farkın oldukça az olduğu fark edilmiştir. İlk olarak sol-jel içermeyen ksilan bazlı filmde elde edilen EDX sonuçları incelendiğinde titanyum elementinin yüzeydeki oranının kütleli olarak % 0.05, atomik olarak ise %0.01 olduğu görülmüştür (Şekil 4.17).

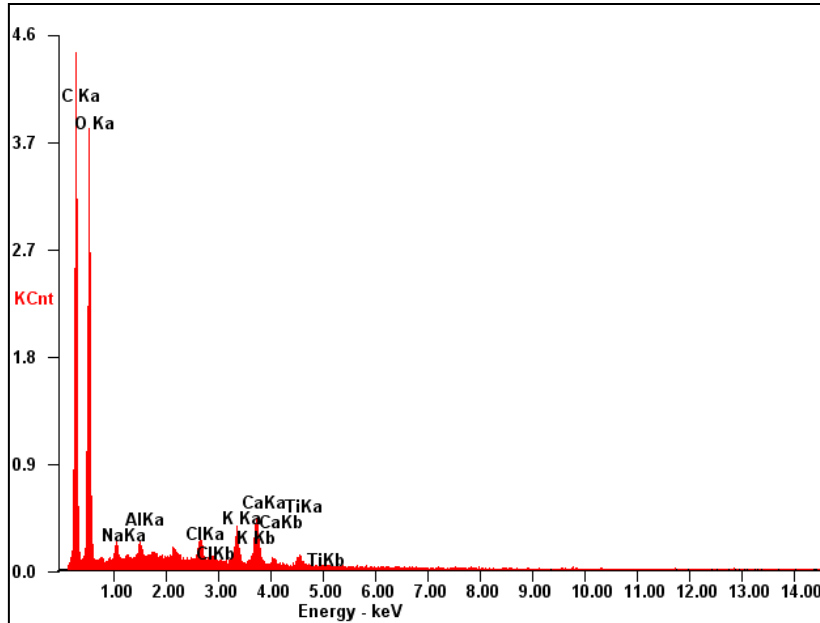


Şekil 4.16 Sol-jel içermeyen (a) ve sol-jel içeren (b) ksilan bazlı filmlerin elektron mikroskobunda 1000x büyütme oranındaki yüzey görünüşleri



Şekil 4.17 Sol-jel içermeyen ksilan bazlı filmin EDX analizi

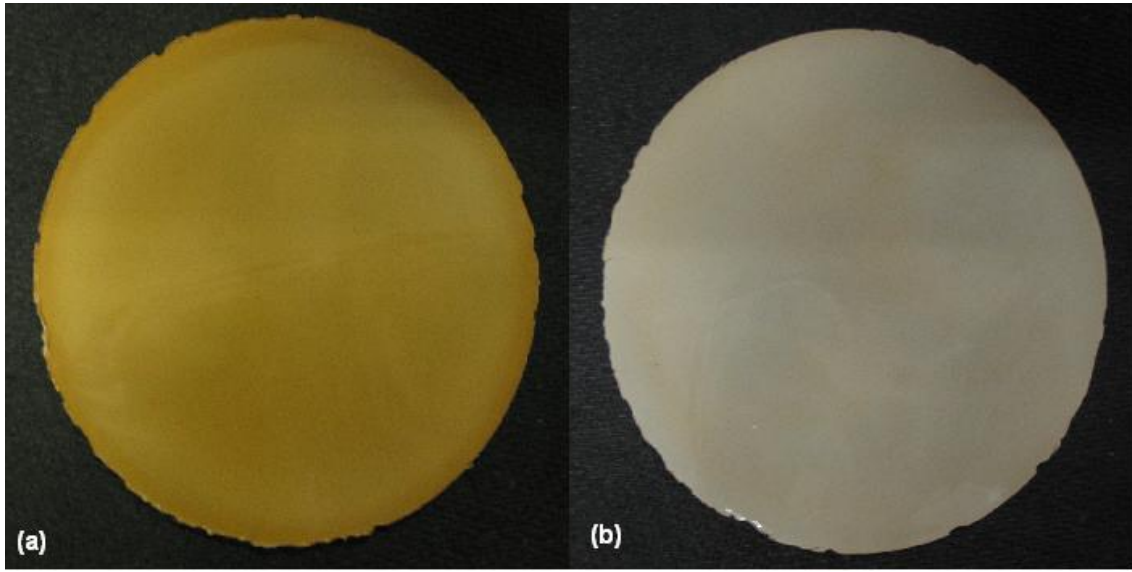
Sol jel içeren ksilan bazlı filmin EDX analizi sonucunda ise titanyum elementi oranı kütlelesel olarak % 0.79 atomik olarak ise %0.24 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 Sol-jel içeren filmin EDX analizi

### 4.3.3. Filmlere Toz Halde TiO<sub>2</sub> Eklenmesi

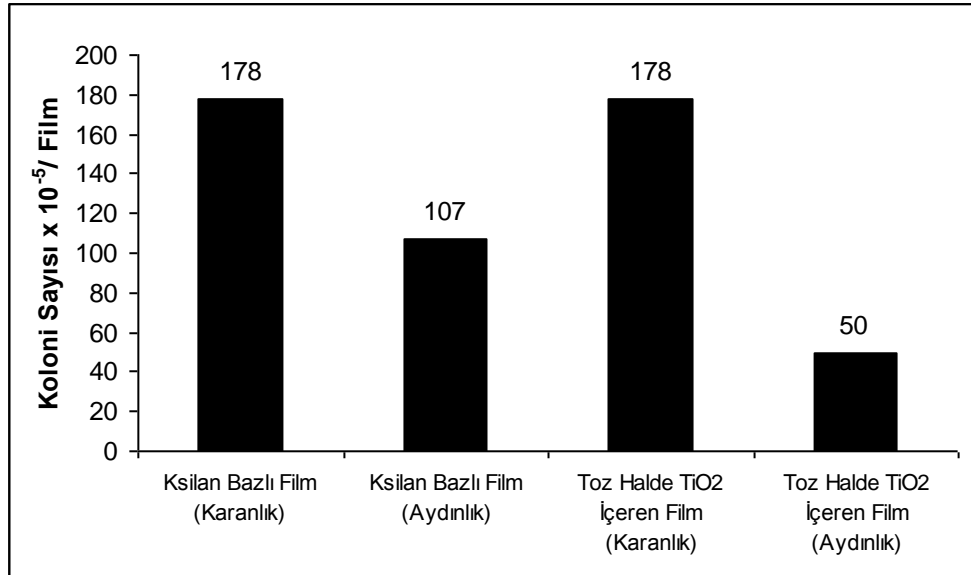
Biyobozunur filmlere fotokatalitik antimikrobiyel aktivite kazandırmanın bir diğer yolu olarak filmlere Sigma Chemical Company USA'dan temin edilen ve toz formunda olan titanyum dioksit eklenmesine karar verilmiştir. Bu bağlamda ksilan bazlı film solüsyonuna ilk aşamada 0.02 gram toz haldeki titanyum dioksit eklenmiş ve filmlerin kurumalarının ardından petri kabına temas eden alt yüzeyleri beyaz, üst yüzeyleri ise sarımtırak olan çift taraflı filmler elde edilmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Toz halde titanyum dioksit eklenmesiyle elde edilen ksilan bazlı filmlerin üst (a) ve alt (b) taraflarının görünümü

Bu filmlerin antimikrobik karakterizasyonları sırasında titanyum dioksitin daha yoğun olarak bulunduğu beyaz kısımları test edilmiştir. Bu kısım film solüsyonu kurumaya bırakıldığında alt tarafta kalan kısımdır. Sol-jel ile kaplanmış ksilan bazlı filmlerin siyah ışık ile yapılan antimikrobik karakterizasyonlarında 20 dakika sonunda güneş ışığına özdeş dalga boylarında ışık veren lamba kullanılarak 1 saat boyunca gözlemlenen etkiden daha yüksek fotokatalitik antimikrobik etki gözlemlendiği için bu test sırasında da siyah ışık kullanılmasına karar verilmiştir. Ancak pH kaynaklı herhangi bir ölüm beklenmediğinden dolayı test süresi daha önce kaplanmış filmlerin karakterizasyonu sırasında yapıldığı şekilde 1 saatin altına indirilmemiştir.

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde (Şekil 4.20), daha önceki karakterizasyonlardan en büyük farkın pH kaynaklı herhangi bir ölüm olmaması olduğu görülebilir. Bu beklenen bir durumdur zira toz haldeki titanyum dioksit, sol-jel de olduğu gibi beraberinde herhangi asidik bir durum yaratmamaktadır. Ancak test sırasında siyah ışık kullanılmasından ve bu ışığın verdiği düşük dalga boyundan dolayı ışık kaynaklı ölümlerde gün ışığına özdeş lamba kullanılan testlere kıyasla artış olmuş, ışık ölümü titanyum dioksit içermeyen, karanlıkta ve siyah ışık altında bekletilen örneklerden elde edilen koloni sayılarının kıyaslanması sonucu %40 olarak hesaplanmıştır. Bu oranın titanyum dioksit içeren, karanlıkta ve siyah ışık altında bekletilen filmlerden elde edilen koloni sayılarının kıyaslanmasıyla hesaplanan toplam ölüm oranı olan %72'den çıkartılmasıyla fotokatalitik antimikrobik etki %32 olarak bulunmuştur. Fotokatalitik etkinin incelenebileceği diğer grup olan, her ikisi de siyah ışık altında bekletilen titanyum dioksit içeren ve içermeyen örneklerin koloni sayılarının kıyaslanmasıyla ise toplam antimikrobik etki %53 olarak bulunmuştur ve bu etkinin tamamı fotokatalitik etkiye atfedilebilir zira belirtildiği gibi karanlıkta bekletilen örneklerin koloni sayılarında herhangi bir değişim olmamış ve pH'dan yada titanyum dioksitin karanlıkta mikroorganizmaya karşı neden olduğu herhangi bir etki gözlemlenmemiştir. Bu iki değer ortalamasının alınmasıyla siyah ışık altında ksilan bazlı filmlerin beyaz yüzeylerinin bir saat sonunda gösterdikleri fotokatalitik antimikrobik etki %43 olarak hesaplanmıştır.



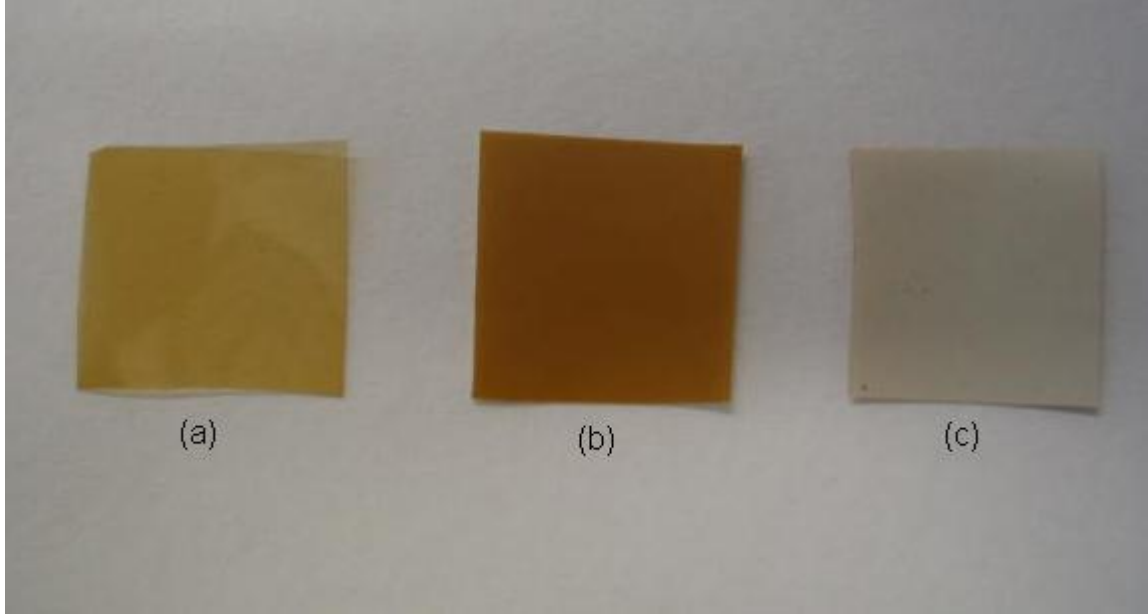
Şekil 4.20. Toz halde titanyum dioksit içeren ksilan bazlı filmlerden siyah ışık altında 1 saat sonunda elde edilen koloni sayıları

Şu ana kadar biyobozunur filmlere fotokatalitik antimikrobiyel aktivite kazandırılması için yapılan testler ve elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında en önemli konulardan birinin aslında test metodunun kendisi olduğu ortaya çıkmaktadır. Zira test sırasında gerçekleşen ışık kaynaklı ölümler ve özellikle kaplanmış filmlerde karanlıkta bekletilen örneklerde ortaya çıkan pH kaynaklı ölümler test sonuçları üstünde ciddi etkiye sahiptirler. Bu ölümler fotokatalitik etkinin hesaplanması sırasında kullanılan kıyaslamalı gruplardan elde edilen ölüm oranlarında çıkartıldığından aslında fotokataliz kaynaklı ölümlerin bir kısmını gölgeleme olasılıkları bulunmaktadır. Bu nedenle hesaplanan fotokatalitik antimikrobik aktiviteler aslında minimum fotokatalitik antimikrobik aktivite olarak da yorumlanabilir. Karakterizasyon sırasında ışık ve pH kaynaklı ölümlerin engellenmesinin daha gerçekçi ve daha iyi sonuçlar vereceği düşünülmektedir.

Bu aşamaya kadar uygulanan 3 yöntem içerisinde en iyi sonucu veren yöntemin filmlerin içine toz halde  $TiO_2$  eklenmesi olduğu ortaya çıkmaktadır. Diğer iki yönteme kıyasla daha yüksek fotokatalitik antimikrobiyel aktiviteye neden olması dışında bu yöntem, sol-jel ile kaplama metodunun aksine filmlerde yapısal bozulmaya ve fotokataliz kaynaklı antimikrobik aktiviteyi gölgeleyen pH kaynaklı ölümlere neden olmamaktadır. Ayrıca filmlere toz halde  $TiO_2$  eklenmesi, filmlerin sol-jel ile kaplanmasının tersine filmlerin yapımı sırasında herhangi bir ek aşamaya neden olmamaktadır ve bu durum filmlere toz halde  $TiO_2$  eklenmesi yönteminin en önemli avantajlarından birisidir. Bu nedenlerden dolayı bu aşamadan sonraki araştırmalarda toz halde  $TiO_2$  eklenmesi üstüne yoğunlaştırılmıştır. Ayrıca proje önerisinde belirtilen, glüten bazlı filmlerden yarı iletken bazlı antimikrobik biyobozunur filmlerin üretilmesi yerine, bu filmler gıdasal işlevi bulunan protein bazlı yapılar olduğundan ve projenin asıl amacı olan tarımsal atıklardan yarı iletken bazlı antimikrobik biyobozunur filmlerin üretilmesi aşamasından iyi sonuçlar elde edilmesi nedeniyle çalışmalar tarımsal atık bazlı ksilan filmler üstünde yoğunlaştırılmıştır.

Filmlerin içerdiği  $TiO_2$  miktarı fotokatalitik antimikrobik etki bağlamında en önemli parametrelerden birisidir. Toz halde  $TiO_2$  içeren filmlerdeki fotokatalitik aktivite her ne kadar diğer yöntemlere kıyasla daha yüksek olsa da, fotokatalitik aktivitenin daha yüksek hale getirilmesi açısından filmlerdeki  $TiO_2$  miktarının artırılmasına karar verilmiştir. Bu nedenle filmlerdeki  $TiO_2$  miktarı filmlere eklenen kuru madde bazında %10'a çıkartılmıştır. Film solüsyonuna toz halde  $TiO_2$  eklenmesi ve solüsyonun petri kaplarında kurutulmasının

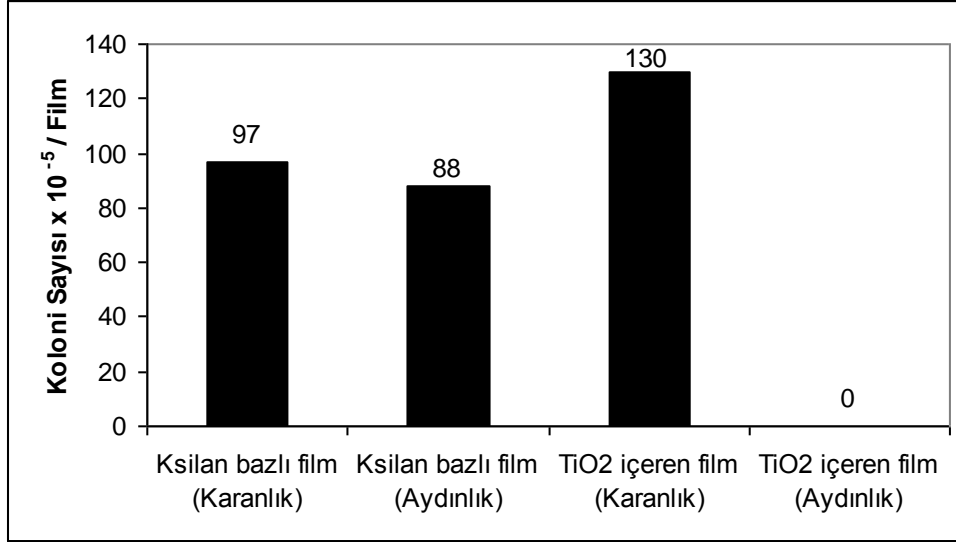
ardından daha önce olduğu gibi üst ve alt tarafları farklı renklerde olan ksilan bazlı filmler elde edilmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. TiO<sub>2</sub> içermeyen (a) ve toz halde TiO<sub>2</sub> içeren ksilan bazlı filmlerin üst (b) ve alt (c) yüzeylerinin görünümü

Elde edilen filmler TiO<sub>2</sub> içermeyen kontrolleriyle birlikte, yüzeylerine peptonlu su içerisinde *Escherichia coli* hücrelerinin yayılmasının ardından antimikrobik özellikleri açısından tepe ışığı 367 nm olan siyah ışık altında (General Electric Black Light 20 W) 1 saat bekletilerek karakterize edilmişlerdir. Filmlerden alınan sıvı örneklerin uygun seyreltme ardından LB agar üstüne yayılması ve 35°C de 16 saat süreyle bekletilmesinden sonra koloni sayıları belirlenmiş ve şekil 4.22 de görülen sonuçlar elde edilmiştir. Önceden de belirtildiği üzere filmlerin sahip olduğu fotokatalitik antimikrobik etkinin belirlenmesinde en önemli noktalardan birisi antimikrobik karakterizasyon yöntemidir. İşlem sırasında antimikrobik etki değerlendirilirken hem pH hem de ışık kaynaklı ölümlerin fotokataliz kaynaklı ölümleri gölgeleme ihtimali bulunmasından dolayı bu iki tip ölümün minimumda tutulması sadece fotokataliz kaynaklı ölümlerin incelenebilmesi açısından önemlidir. Bu nedenle toz halde titanyum dioksit içeren filmlerde ışık kaynaklı ölümleri azaltmak amacıyla antimikrobik karakterizasyon metodunda küçük bir değişikliğe gidilmiştir. Filmlerin yüzeyine mikroorganizmaların yayılmasının ardından filmler ışık altına koyulmadan önce karanlıkta 30 dakika boyunca bekletilmiş ve bu süreçte bakterilerin içinde bulunduğu sıvı film tarafından

emildiğinden bakterilerin ışığa direkt olarak maruz kalması engellenmeye çalışılmıştır. Şekil 4.22 deki sonuçlar göz önüne alındığında bu yaklaşımın ışık kaynaklı ölüm oranını azaltmada başarılı olduğu görülebilir.



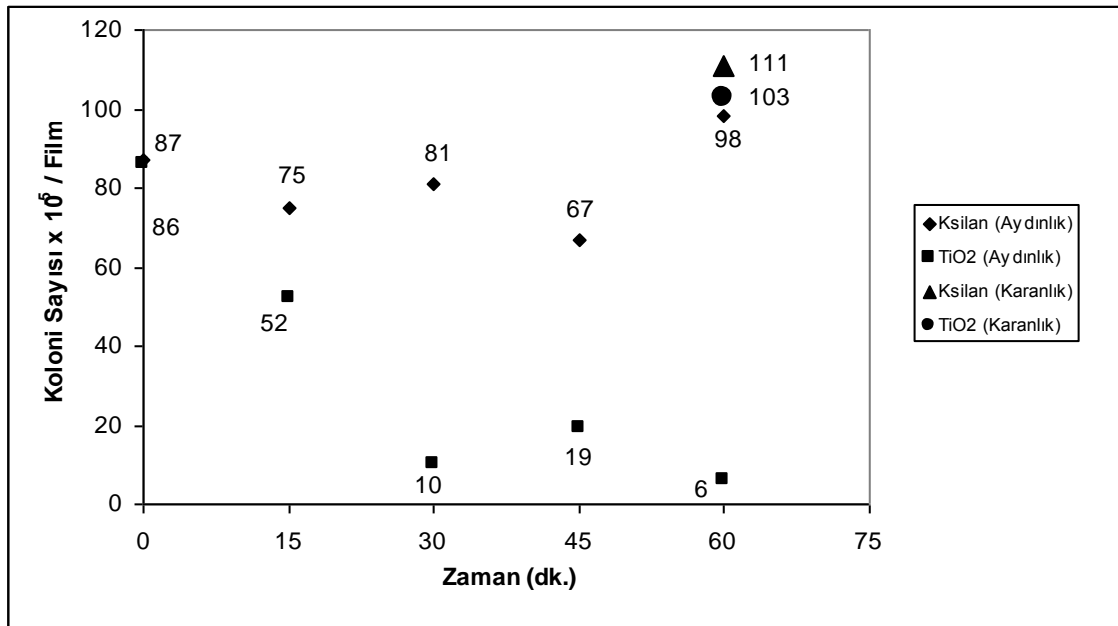
Şekil 4.22. Toz halde %10 oranında TiO<sub>2</sub> içeren ve içermeyen ksilan bazlı filmlerin siyah ışık altında 1 saat sonundaki *E.coli*'ye karşı antimikrobik etkisi

Şekil 4.22 deki sonuçlar incelendiğinde her ikisi de TiO<sub>2</sub> içermeyen karanlıkta ve ışık altında bekletilen filmlerden elde edilen koloni sayıları (sırasıyla 97 ve 88) kıyaslandığında ışık kaynaklı ölüm oranı %9.3 olarak hesaplanabilir. Bu oran daha önce siyah ışık altında yapılan antimikrobik karakterizasyonlar sırasında görülen ışık kaynaklı ölüm oranından çok daha düşüktür ve sonuçların daha sağlıklı şekilde yorumlanmasına olanak tanımaktadır. Karanlıkta bekletilen, TiO<sub>2</sub> içeren ve içermeyen filmler kıyaslandığında pH ya da karanlıkta oluşan herhangi diğer bir etki kaynaklı ölüm olmadığı görülmektedir. TiO<sub>2</sub> içeren ve ışık altında bekletilen filmde 1 saat sonunda bütün mikroorganizmaların inaktive olduğu görülmektedir. Her ikisi de ışık altında bekletilen, TiO<sub>2</sub> içeren ve içermeyen filmler kıyaslandığında, pH ya da diğer bir etkenden kaynaklanan ölüm oranı %0 olduğu için, fotokatalitik antimikrobik aktivite 1 saat sonunda %100 olarak hesaplanabilir. Her ikisi de TiO<sub>2</sub> içeren, karanlıkta ve ışık altında bekletilen filmlerden elde edilen koloni sayıları kıyaslandığında ise toplam ölüm %100 olarak hesaplanabilir ancak bu ölümün %9.3 lük bir kısmı yukarıda da belirtildiği üzere sadece ışık kaynaklı olduğundan bu kıyaslamadan elde edilen fotokatalitik antimikrobik etki %91.7 dir. Bu iki farklı grubun kıyaslanmasında elde edilen fotokatalitik antimikrobik etkinin



ortalaması alınarak toz halde %10 oranında TiO<sub>2</sub> içeren ve siyah ışık altında 1 saat boyunca bekletilen ksilan bazlı biyobozunur filmlerin fotokatalitik antimikrobik etkisi %96 olarak hesaplanmıştır.

Filmlerdeki TiO<sub>2</sub> miktarının artırılarak %10'a çıkartılması ve antimikrobik karakterizasyon metodunda yapılan değişikliklerle ışık kaynaklı ölümlerin azaltılmasının ardından elde edilen iyi sonucun hem tekrarlanabilirliğini görmek hem de fotokatalitik antimikrobik etkiyi daha detaylı bir şekilde incelemek amacıyla yukarıda açıklanan benzer şekilde ancak bu sefer zamana karşı başka bir antimikrobik karakterizasyon yapılmıştır. Zamana karşı yapılan antimikrobik karakterizasyonda filmlerin yüzeyinden 15 dakikada bir örnek alınmış ve örnekler agar üstüne yayılarak koloni sayımı yapılmıştır (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Toz halde %10 oranında TiO<sub>2</sub> içeren ve içermeyen ksilan bazlı filmlerin *E.coli*'ye karşı antimikrobik etkisi

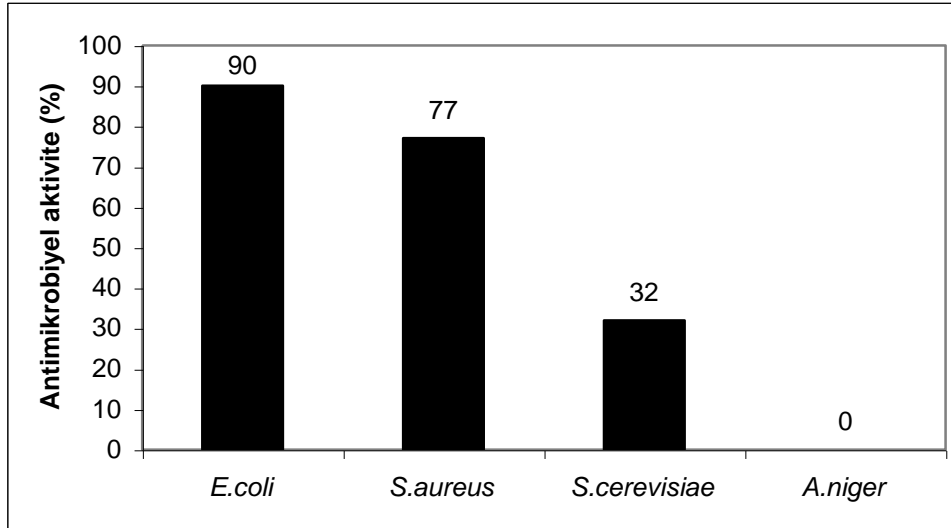
Zamana karşı yapılan bu karakterizasyonda en önemli noktalardan biri bakterilerin fotokatalitik antimikrobik etkiye maruz kalmalarını takiben ne kadar sürede önemli ölçüde inaktif olduklarını göstermesidir. Şekil 4.23 teki sonuçlar incelendiğinde TiO<sub>2</sub> içeren ve ışık altında bekletilen filmlerde özellikle 30. dakika sonunda bakterilerin çok önemli bir kısmının canlılıklarını kaybettikleri gözlemlenmektedir. 30 dakikadan sonra ise bakterilerin ölüm

oranlarında ciddi bir değişiklik yoktur. 60. dakika sonunda elde edilen koloni sayılarının kıyaslanması sonucunda ışık kaynaklı ölüm oranının %11.7, karanlıkta TiO<sub>2</sub> varlığı nedeniyle gerçekleşen ölüm oranının ise %7.2 olduğu hesaplanabilir. Işık altında bekletilen ve TiO<sub>2</sub> içeren ve içermeyen filmlerin kıyaslanmasıyla elde edilen toplam ölüm oranı olan %94 den karanlıkta TiO<sub>2</sub> varlığı nedeniyle gerçekleşen ölüm oranı çıkartıldığında bu grup için fotokataliz kaynaklı antimikrobik aktivite %87 olarak hesaplanabilir. TiO<sub>2</sub> içeren, karanlıkta ve ışık altında bekletilen filmlerin kıyaslanmasından elde edilen ölüm oranı da %94 olarak hesaplanabilir. Işık kaynaklı ölümlerin toplam ölümlerden çıkartılmasıyla ise bu grup için fotokataliz kaynaklı antimikrobik aktivite %82 olarak hesaplanmıştır. Bu değerlerin ortalaması alınarak bu deney seti için ksilan bazlı biyobozunur filmlerin fotokatalitik antimikrobik etkisi %84.5 olarak verilebilir.

Toz halde TiO<sub>2</sub> içeren filmlerin *E.coli*'ye karşı yüksek fotokatalitik antimikrobiyel aktivite gösterdiğinin belirlenmesinin ardından aynı filmlerin diğer mikroorganizmalara karşı gösterdiği antimikrobiyel aktivitenin belirlenmesine geçilmiştir. Diğer mikroorganizmaların seçiminde filmlerin farklı mikroorganizmalara karşı gösterdiği antimikrobiyel aktivitenin daha gerçekçi bir şekilde değerlendirilebilmesi açısından mikroorganizmaların değişik türlerden olmasına dikkat edilmiştir. Bu nedenle mikroorganizmalar gram (+) bir bakteri olan *Staphylococcus aureus*, bir maya olan *Saccharomyces cerevisiae* ve bir ipliksi küf olan *Aspergillus niger* sporları olarak belirlenmiştir. Her mikroorganizma ve sporlar yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde, filmlere üstüne yayılmadan önce uygun besi ortamında çoğaltılmıştır. Farklı mikroorganizma türlerine karşı elde edilen antimikrobik etkilerin birbirleriyle kıyaslanabilir olması açısından testler daha *E.coli* için en iyi sonuçların alındığı şartlarda birbirine özdeş koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.24 de gösterildiği üzere mikroorganizma türü fotokatalitik aktivite üstünde önemli farklılıklara neden olmaktadır. Önceden açıklanan şekilde hesaplanan fotokatalitik aktivite sonuçları göz önüne alındığında 4 mikroorganizma arasında en iyi sonucun *E.coli* için elde edildiği görülmektedir. *S.aureus* için elde edilen daha düşük aktivitenin nedeninin bu iki mikroorganizmanın hücre duvarlarındaki yapısal farklılık nedeniyle olduğu düşünülebilir zira hücre duvarı yapısı fotokatalitik antimikrobik aktivitenin seviyesi üstünde önemli etkiye sahiptir (Kuhn vd., 2003). *S.aureus* gibi Gram(+) bakteriler *E.coli* gibi Gram(-) bakterilere kıyasla daha kalın bir hücre duvarına sahiptirler ayrıca Gram(+) bakterilerin hücre duvarında

Gram(-) bakterilere kıyasla daha kalın bir peptidoglikan tabakası bulunmaktadır ki bu tabaka hücre duvarındaki en dayanıklı kısmı oluşturmaktadır. *S.cerevisiae*'nin fotokatalitik antimikrobiyel aktiviteye karşı hem *E.coli*'den hem de *S.aureus*'dan daha dayanıklı olmasının ise hem hücre duvarının  $\beta$ -D-glucan ve çitin içeren yapısı hem de bu hücrenin diğerlerinden farklı olarak ökaryotik olmasından kaynaklanan karmaşık hücre yapısı nedeniyle olduğu düşünülmektedir (Yiannikouris vd., 2005). Şekil 4.24 de görülebileceği üzere yapılan testler sonucunda filmlerin *A.niger* sporlarına karşı herhangi bir aktivite göstermediği belirlenmiştir. Bilindiği gibi mikrobik sporlar son derece zor çevre şartlarına ve çevresel koşul değişimlerine oldukça dayanıklıdır ve uzun süreler boyunca bu koşullara dayanabilir ve ardından hücre yapısını tekrar meydana getirebilirler (Abrashv vd., 2005). Bu sporların ne kadar dayanıklı oldukları bu deneylerde de gözlemlenmiştir. Işıқта bekletilen sporların canlı hücreye dönüşmelerinde hiçbir fark olmamıştır.



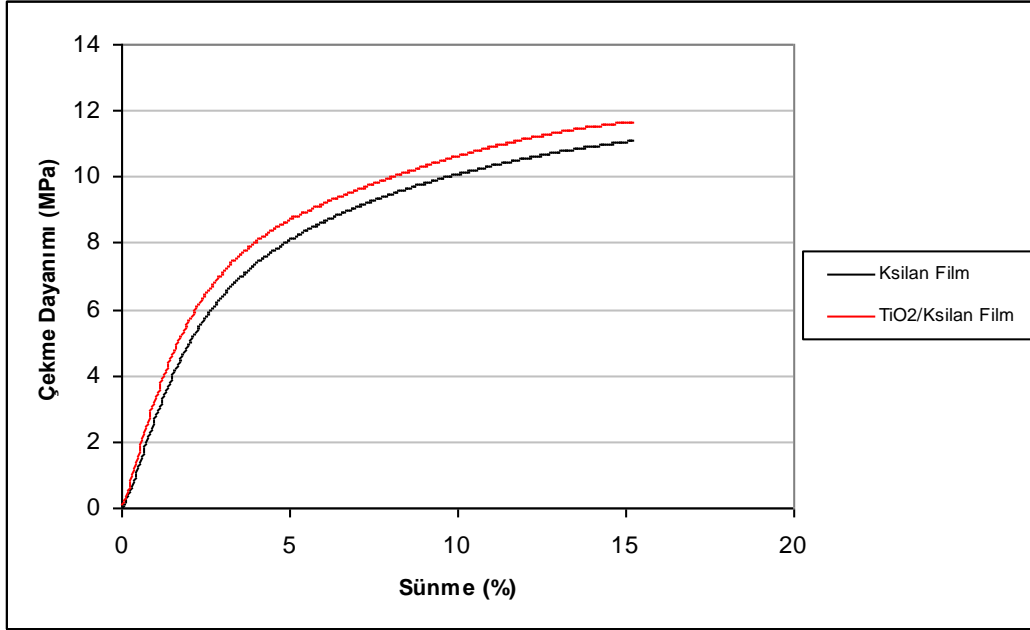
Şekil 4.24. Farklı mikroorganizmaların fotokatalitik antimikrobiyel aktivite üstündeki etkisi

#### 4.4. Filmlerin Antimikrobik Özellikleri Dışındaki Diğer Özellikleri

##### 4.4.1. Filmlerin Mekanik Özellikleri

%10 oranında  $TiO_2$  içeren ve içermeyen ksilan bazlı biyobozunur filmler,  $TiO_2$  varlığının filmlerin mekanik özellikleri üstündeki etkilerini incelemek amacıyla gereç ve yöntem bölümünde açıklandığı şekilde çekme dayanımı testine tabi tutulmuş ve mekanik özellikleri hesaplanmıştır. Test edilen örneklerden ortalamaya yakın değerler veren iki tanesi filmlerin

çekme kuvvetine verdiği tepki davranışının kıyaslanabilmesi açısından çekme dayanımı-sünme eğrisi grafiği olarak Şekil 4.25 de gösterilmiştir.



Şekil 4.25. TiO<sub>2</sub> içeren ve içermeyen filmlerin çekme dayanımı-sünme eğrileri

Şekil 4.25 incelendiğinde, filmlerin TiO<sub>2</sub> içermesinin çekme kuvvetine karşı verilen tepki biçiminde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gözlemlenebilir. TiO<sub>2</sub> içeren ve içermeyen filmlerin mekanik özellikleri Tablo 4.3 de verilmiştir.

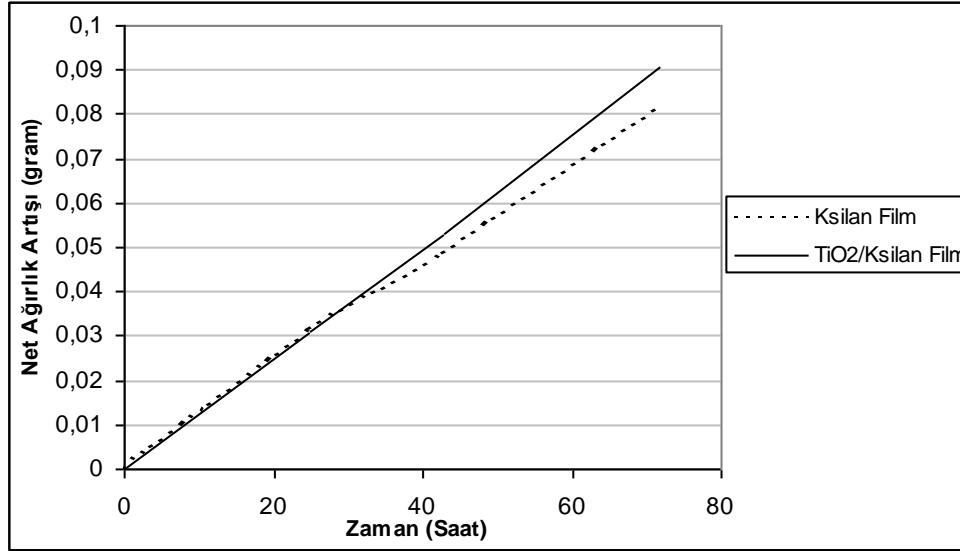
Tablo 4.3. TiO<sub>2</sub> içeren ve içermeyen filmlerin mekanik özellikleri

	Çekme Dayanımı (MPa)	Sünme (%)	Elastik Modülüs (MPa)	Sertlik (MJ/m <sup>3</sup> )
Ksilan Film	11.8 ± 0.5	15.1 ± 1.8	317.2 ± 40.0	1.3 ± 0.2
TiO <sub>2</sub> /Ksilan Film	11.4 ± 0.6	15.2 ± 1.3	296.9 ± 30.7	1.3 ± 0.1

Tablo 4.3 de ki sonuçlar incelendiğinde filmlere %10 oranında TiO<sub>2</sub> eklenmesinin filmlerin mekanik özellikleri bağlamında olumsuz sonuçlara neden olmadığı yorumu yapılabilir. Her ne kadar TiO<sub>2</sub> eklenmesi sonrasında çekme dayanımı ve elastik modülüs değerlerinde oldukça ufak çapta düşüşler olsa da iki tür filmin mekanik değerleri birbirlerine oldukça yakın durumdadır.

#### 4.4.2. Filmlerin Su Buharı Geçirme Hızları

TiO<sub>2</sub> içeren ve içermeyen filmler su buharı geçirme hızları bağlamında gereç ve yöntem bölümünde anlatıldığı şekilde karakterize edilmiştir. Kullanılan sistemdeki zamana karşı net ağırlık artışı Şekil 4.26 da gösterilmiştir.



Şekil 4.26. TiO<sub>2</sub> içeren ve içermeyen filmlerin bulunduğu sistemdeki zamana karşı toplam net ağırlık artışı

Şekil 4.26 incelendiğinde her iki sistemdeki su buharının silika granülleri tarafından emilmesinden kaynaklanan ağırlık artışının benzer hızda olduğu gözlemlenebilir. Filmlerin su buharı geçirme hızı Tablo 4.4 de gösterilmiştir.

Tablo 4.4. TiO<sub>2</sub> içeren ve içermeyen filmlerin su buharı geçirme hızları

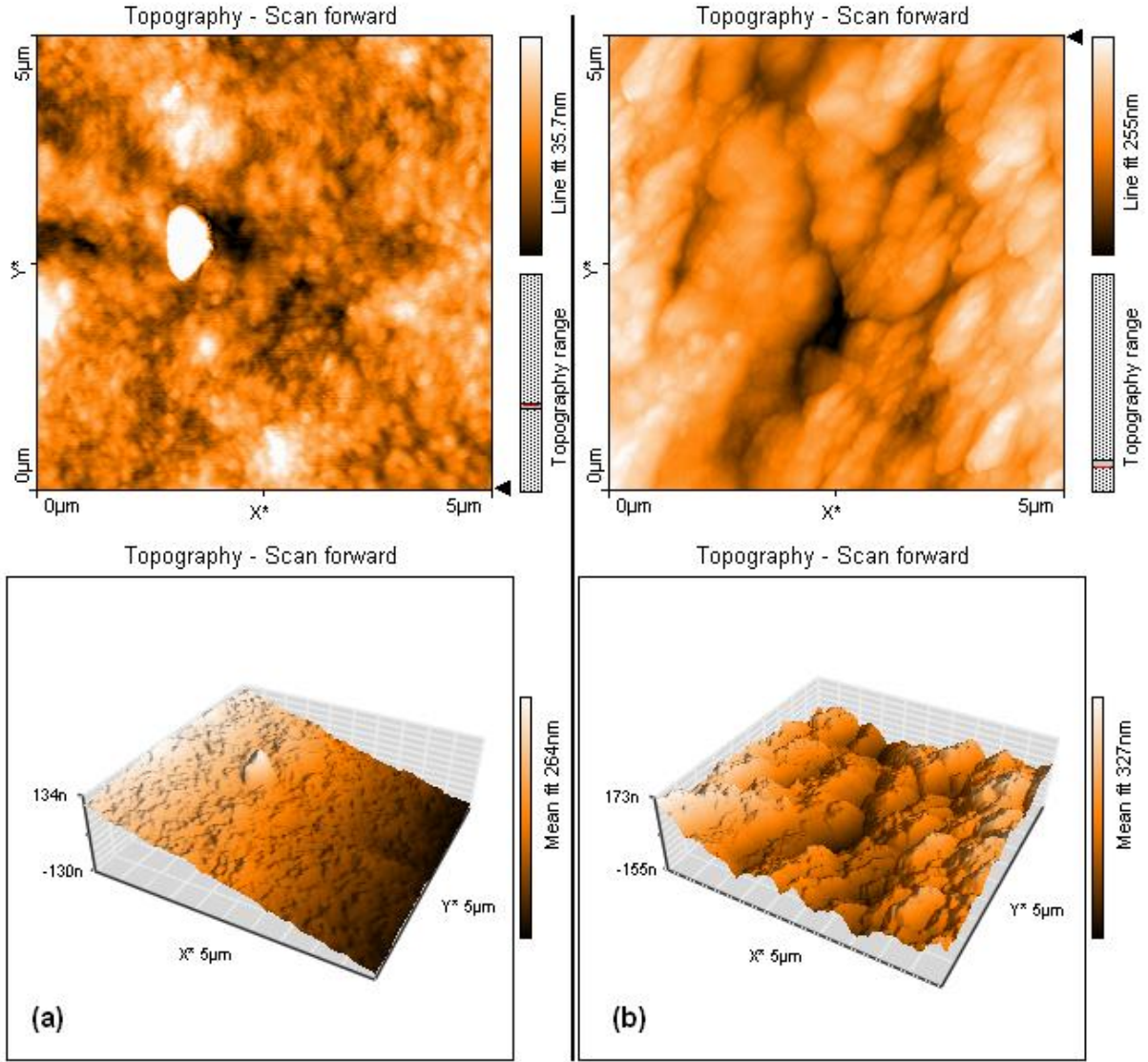
	Su Buharı Geçirme Hızı (gram/m <sup>2</sup> .gün)
Ksilan Film	34.52 ± 1.59
TiO <sub>2</sub> /Ksilan Film	40.72 ± 2.35

Tablo 4.4 deki sonuçlar incelendiğinde ksilan bazlı biyobozunur filmlere TiO<sub>2</sub> eklenmesinin su buharı geçirme hızında az miktarda bir artışa neden olduğu görülmektedir. Bu durum TiO<sub>2</sub>

parçacıklarının polimer yapısı arasına girerek filmlerdeki serbest hacmi kısmen arttırmasından ileri geliyor olabilir.

#### **4.4.3. Filmlerin Yüzey Yapısı Özellikleri**

TiO<sub>2</sub> içeren filmlerin farklı renklere sahip alt ve üst yüzeyleri atomik kuvvet mikroskopisi kullanılarak gereç ve yöntem bölümünde anlatıldığı şekilde karakterize edilmişlerdir. Atomik kuvvet mikroskobundan elde edilen sonuçlar hem cihazın verdiği yüzey görüntüsü hem de bu görüntülerin altında verilen yüzey morfolojisi olarak gösterilmiştir. Şekil 4.27 da görülen TiO<sub>2</sub> içeren filmlerin alt ve üst yüzey görüntüleri kıyaslandığında, filmlerin sarımsı renkli üst yüzeyini temsil eden (a) şeklindeki yüzey yapısının filmlerin alt kısmını temsil eden (b) şeklindeki yüzey yapısına kıyasla çok daha pürüzsüz olduğu görülebilir. Yüzey yapılarındaki bu farklılığın nedeninin filmin üst ve alt yüzeylerindeki renk farklılığından da öngörülebileceği üzere bu iki yüzey arasındaki TiO<sub>2</sub> miktarının farklılığından ileri geldiği düşünülmektedir. Şekil 4.27 de ki sonuçlarla ilgili yapılabilecek bir diğer yorum ise (b) şeklinde görülen daha pürüzlü yapının beraberinde (a) şeklindeki pürüzsüz yapıya kıyasla daha yüksek bir yüzey alanı sağladığıdır. Yüzey alanındaki artış aynı zamanda temas yüzeyinin de artışı anlamına geldiğinden ve bu da mikroorganizmalarla TiO<sub>2</sub> parçacıkları arasındaki etkileşimi arttıracığından dolayı bu durumun istenen bir özellik olduğu düşünülebilir.

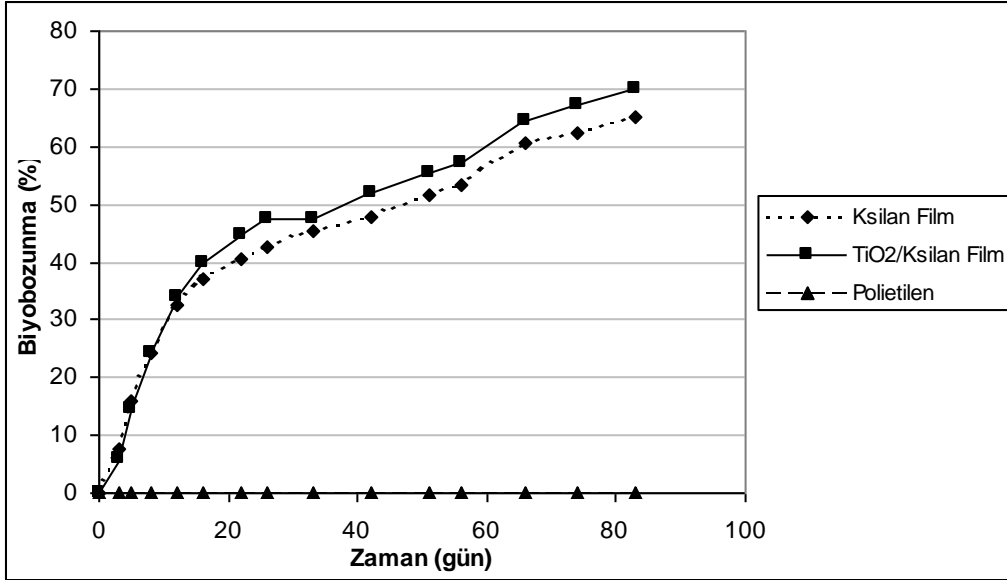


Şekil 4.27.  $TiO_2$  içeren filmlerin üst (a) ve alt (b) yüzelerinin atomik kuvvet mikroskopundan elde edilen yüzey görünümleri ve yüzey morfolojileri

#### 4.4.4. Filmlerin Biyobozunurluk Özellikleri

Filmlerin biyobozunurluklarının değerlendirilmesinde toprak içerisine yerleştirilen filmlerden açığa çıkan  $CO_2$  miktarı esas alınmış ve HCl titrasyonu ile bu miktar belirlenmiştir. Proje kapsamında testler ilk olarak 5L hacmindeki desikatörlerde yapılmış ancak daha sonra filmlerden açığa çıkan  $CO_2$  gazının KOH içeren sıvıya emilimini daha verimli hale getirmek için testlerin yapıldığı sistemlerin hacmi 1.5 litreye indirilmiştir. Hem negatif kontrol olması hem de sentetik polimerlerle kıyaslama yapılabilmesi açısından düşük yoğunluklu polietilen peletlerin de biyobozunurluk testleri gerçekleştirilmiştir.

Test sistemlerinde açığa çıkan CO<sub>2</sub> miktarı üzerinden, gereç ve yöntem bölümünde açıklandığı şekilde filmlerdeki C elementinin oranı ve film içermeyen topraktan açığa çıkan CO<sub>2</sub> miktarı göz önünde bulundurularak, filmlerin yüzdesel biyobozunmaları hesaplanmıştır (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. Filmlerin zamana karşı biyobozunmaları

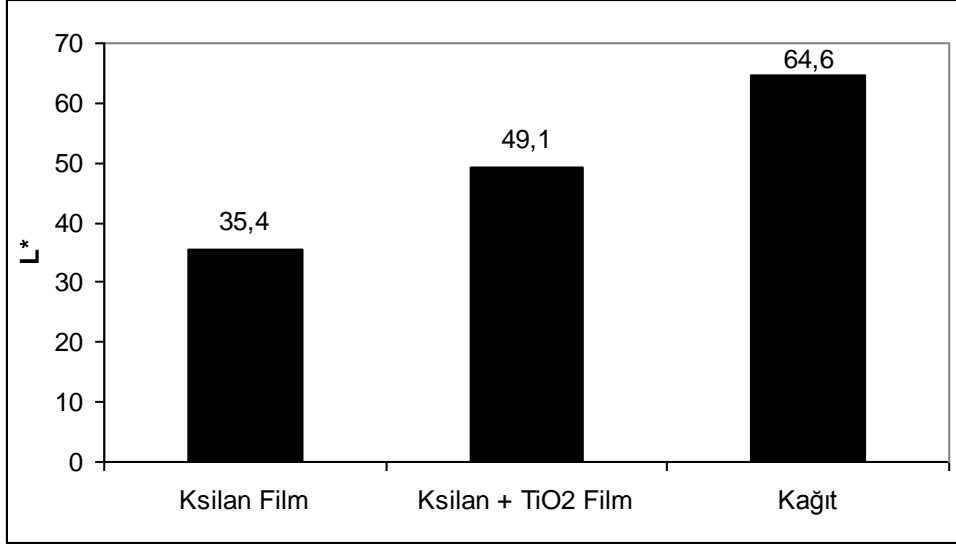
Şekil 4.28 deki sonuçlar incelendiğinde filmlerde TiO<sub>2</sub> bulunmasının filmlerin biyobozunurlukları üstünde herhangi olumsuz bir etkiye neden olmadığı hatta TiO<sub>2</sub> içeren filmlerin TiO<sub>2</sub> içermeyen filmlere oranla az bir farkla daha çok biyobozunmaya uğradığı görülebilir. Ksılan bazlı TiO<sub>2</sub> içeren ve içermeyen filmler 82 gün sonunda sırasıyla %70 ve %65 oranında biyobozunmaya uğrarken düşük yoğunluklu polietilen malzeme beklenildiği üzere herhangi bir biyobozunma göstermemiştir.

#### 4.4.5. Filmlerin Renk Özellikleri

TiO<sub>2</sub> içeren ve içermeyen filmlerin renk özellikleri referans olarak beyaz kağıda karşı gereç ve yöntem bölümünde anlatıldığı şekilde belirlenmiştir. Renk değerlerinin belirlenmesinde 3 değişken göz önüne alınmaktadır. Bu değişkenlerden ilki film renginin açıklığıyla ilgili bilgi veren L\* değeridir. Bu değer 0 ila 100 arasında değişebilen bir değerdir ve 0 siyaha 100 ise beyaza karşılık gelmektedir. Bu bağlamda şekil 4.29 da ki sonuçlar incelendiğinde TiO<sub>2</sub> içeren filmlerin TiO<sub>2</sub> içermeyen filmlere göre daha yüksek L\* değerine sahip olduğu

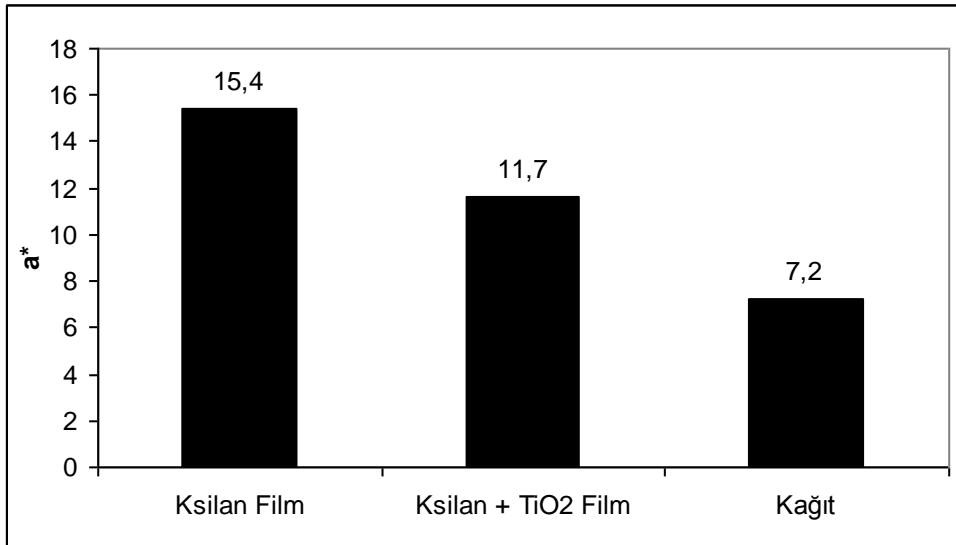


gölmektedir. Bu beklenen bir sonuçtur zira  $TiO_2$  beyaz renkli bir tozdur ve içine eklendiği filmlerde beyaz renkli bir tabaka yaratmaktadır.



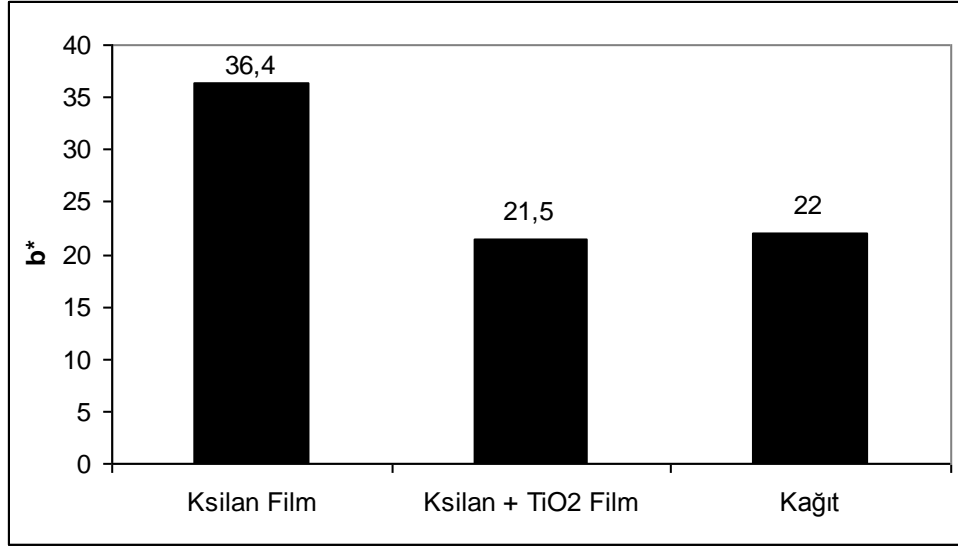
Şekil 4.29.  $TiO_2$  içeren ve içermeyen filmlerin  $L^*$  değerleri

Filmlerin renk özellikleriyle ilgili bir diğer değer ise  $a^*$  değeridir. Bu değer  $-60$  ila  $+60$  arasında değişebilir ve  $-60$  yeşile,  $+60$  ise kırmızıya karşılık gelmektedir. Şekil 4.30 da ki sonuçlar incelendiğinde ksilan filmin en yüksek  $a^*$  değerine sahip olduğu görülmektedir. Her iki tür filmin renklerinin de kahverengiye yakın tonlarda olması beklenildiği üzere sonuçların pozitif çıkmasına neden olmuştur.



Şekil 4.30.  $TiO_2$  içeren ve içermeyen filmlerin  $a^*$  değerler

Filmlerin renk özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan son değer  $b^*$  değeridir ve bu değer filmlerin sarılığı (+60) ve maviliği (-60) hakkında bilgi vermektedir. Şekil X'deki sonuçlar incelendiğinde filmlerde  $TiO_2$  bulunmamasının daha yüksek  $b^*$  değerine neden olduğu gözlemlenebilir.  $TiO_2$  içermeyen filmlerin sahip olduğu görece yüksek  $b^*$  değeri ksilan kaynaklı sarılığa atfedilebilir.



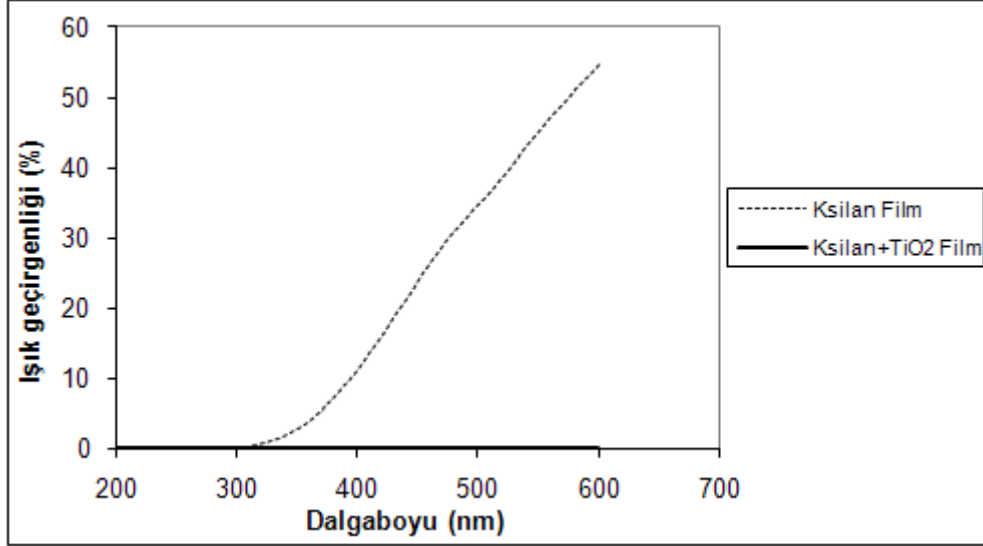
Şekil 4.31.  $TiO_2$  içeren ve içermeyen filmlerin  $b^*$  değerleri

Filmlerin renk özellikleri ayrıca gereç ve yöntem bölümünde verilen formül kullanılarak beyaza göre toplam renk değişimi ( $\Delta E$ ) bağlamında da hesaplanmıştır. Bu hesaplama sonucunda  $TiO_2$  içermeyen filmlerin  $\Delta E$  değeri 33.5 olarak hesaplanırken,  $TiO_2$  içeren filmlerin toplam renk değişimi değeri 16.1 olarak hesaplanmıştır.  $TiO_2$  içermeyen filmlerde titanyum dioksit kaynaklı bir beyazlaşma bulunmadığından bu filmlerin beyaz renge kıyasla toplam renk değişimlerinin  $TiO_2$  içeren filmlerden daha fazla olması beklenen bir sonuç olarak yorumlanabilir.

#### 4.4.6. Filmlerin Işık Geçirgenlikleri

Filmlerin değişik dalga boylarındaki ışığa karşı geçirgenlikleri Şekil 4.32 de verilmiştir. Burada filmlerin  $TiO_2$  içermesinin ışık geçirgenliğini ciddi şekilde düşürdüğü gözlemlenmektedir. 600 nm dalga boyunda  $TiO_2$  içeren film ışığı geçirmezken  $TiO_2$

içermeyen film ışığın %55'ini geçirmektedir. TiO<sub>2</sub> içermeyen film özellikle 300nm dalgaboyundan sonraki dalgaboylarında ışığı geçirmeye başlamaktadır.



Şekil 4.32. TiO<sub>2</sub> içeren ve içermeyen filmlerin değişik dalgaboylarındaki ışığa karşı geçirgenliği

#### 4.4.7. Filmlerin Oksijen Geçirgenlikleri

Filmlerin oksijen geçirgenliklerinin belirlenmesi için gereç ve yöntem bölümünde anlatıldığı üzere sabit hacim-değişken basınç tekniği kullanılmıştır. Zamana karşı yapılan ölçümlerde 48 saat sonunda filmlerin yerleştirildiği hücrenin üst kısmında kalan ve basınç değişiminin izlendiği hacimde her hangi bir basınç artışı gözlemlenmemiştir. Basınç değişimini izlemek için kullanılan basınç sensörünün hassasiyetinin 0.001 bar olduğu göz önüne alındığında TiO<sub>2</sub> içeren ve içermeyen filmlerin her ikisinin de oksijen karşı son derece iyi bariyer özelliğine sahip oldukları sonucuna varılabilir. Söz konusu filmler için bu özellikle istenen bir özelliktir zira düşük oksijen geçirgenliği çeşitli gıda paketlenmesi uygulamalarında gıdanın ömrünü uzatmak açısından önem taşımaktadır.

#### 4.5. Öneriler

Proje kapsamında temel amaç tarımsal atıkların değerlendirilmesi vasıtasıyla antimikrobik özelliklere sahip olan biyobozunur filmlerin üretilmesidir. Bu aşamada tarımsal atığın aslen hemiselüloz kısmı kullanılmıştır. Fakat tarımsal atıkların diğer kısımlarının kullanılmasıyla

biyobozunur plastik filmlere ek olarak başka ürünlerin üretilmesi de olanaklıdır. Bu ürünler tarımsal atıklardan elde edilen selülozun enzimatik hidroliz ile parçalanması sonucunda elde edilebilen glikoz ve ligninden çeşitli kimyasal işlemler sonucunda elde edilebilen yapışkanlar, polimer malzeme katkıları ya da çimento katkıları gibi ürünler olabilir. Bu tür bir çoklu ürün yaklaşımı hem birden çok ürünün tek bir tarımsal atıktan elde edilmesini sağlaması açısından, hem de işlemin ekonomik açıdan daha uygulanabilir hale gelmesi açısından önem taşımaktadır.

## REFERANSLAR

Abrashev R., Dolashka P., Christova R., Stenova L., Angelova M., Role of antioxidant enzymes in survival of conidiospores of *Aspergillus niger* 26 under conditions of temperature stress, *Journal of Applied Microbiology*, 99, 902–909, (2005).

Amézega P., Nevarez G.V., Orrantia E., Miki M., Photoinduced bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa* by TiO<sub>2</sub> based thin films, *FEMS Microbiology Letters*, 211, 183–188, (2002).

Bégin A., Calsteren M.R.V., Antimicrobial films produced from chitosan, *International Journal of Biological Macromolecules*, 26, 63–67, (1999).

Cha D. S., Choi J. H., Chinnan M. S., Park H. J., Antimicrobial Films Based on Na-alginate and k-carrageenan, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 35, 715–719, (2002).

Chawengkijwanich C., Hayata Y, Development of TiO<sub>2</sub> powder-coated food packaging film and its ability to inactivate *Escherichia coli* in vitro and in actual tests, *International Journal of Food Microbiology*, 123, 288 – 292, (2008).

Chiellini E., Corti A. A., Simple Method Suitable to test the ultimate biodegradability of environmentally degradable polymers, *Macromolecular Symposia*, 197, 381-395, (2003).

Choi J. H., Choi W.Y., Cha D.S., Chinnan M. J., Park H. J., Lee D. S., Park J.M., Diffusivity of potassium sorbate in k-carrageenan based antimicrobial film, *LWT*, 38, 417–423, (2005).

Chung D., Papadakis S.E., Yam K.L., Evaluation of a polymer coating containing triclosan as the antimicrobial layer for packaging materials, *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 165–169, (2003).

Conte A., Buonocore G.G., Sinigaglia M., Del Nobile M.A., Development of immobilized lysozyme based active film, *Journal of Food Engineering*, 78, 741-745, (2007).

Cooksey K., Feature: Antimicrobial food packaging materials, *Additives for Polymers* 2001, 6-10, (2001).

Durango A.M., Soares N.F.F., Benevides S., Teixeira J., Carvalho M., Wobeto C. Andrade N. J., Development and Evaluation of An Edible Antimicrobial Film Based on Yam Starch and Chitosan, *Packaging Technology And Science*, 19, 55–59, (2006).

Erkan A., Bakır U., Karakas G., Photocatalytic microbial inactivation over Pd doped SnO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> thin films, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 184, 313–321, (2006).

Gabrielli I., Gatenholm P., Preparation and properties of hydrogels based on hemicellulose, *Journal of Applied Polymer Science*, 69, 1661-1667, (1998).

Göksu E.I., Karamanlıoğlu M., Bakır U., Yılmaz L., Yılmaz U., Production and

Characterization of Films from Cotton Stalk Xylan, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 10685-10691, (2007).

Gröndahl M., Eriksson L., Gatenholm P., Material Properties of Plasticized Hardwood Xylans for Potential Application as Oxygen Barrier Films, *Biomacromolecules*, 5, 1528-1535, (2004).

Hansen N.M.L., Plackett D., Sustainable Films and Coatings from Hemicelluloses: A Review, *Biomacromolecules*, 9, 1493-1505, (2008).

Harris L.G., Richards R.G., Staphylococcus aureus adhesion to different treated titanium surfaces, *Journal of Materials in Medicine*, 15, 311-314, (2004).

Henglein, F. A., Schneider, G., (1936), Über die Veresterung von Pektinstoffen. Ber. d. chem. Ges. B 69: 309-324, cited in Fishman, M.L., Coffin, D.R., Biodegradable Films from Pectin/starch and Pectin/poly(vinyl Alcohol), *Polymer Biocatalysis and Biomaterials*, ed: Cheng H.N., Gross R., Acs Symposium Series, Vol: 900, American Chemical Society, Washington D.C., 119-140, (2005)

Kandemir N., Yemenicioğlu A., Mecitoğlu Ç., Elmaci Z. S., Arslanoğlu A., Göksungur Y., Baysal T., Antimicrobial Films from A. Pullulans Exopolysaccharides, *Food Technol. Biotechnol.*, 43, 343–350, (2005).

Kayserilioğlu B.Ş., Bakır U., Yılmaz L., Akkaş N., Drying temperature and relative humidity effects of wheat gluten film properties, *Journal of agricultural and food chemistry*, 51, 964-968, (2003).

Kayserilioğlu B.Ş., Bakır U., Yılmaz Y., Akkaş N., Use of xylan, an agricultural by-product, in wheat gluten based biodegradable films: mechanical, solubility and water vapor transfer rate properties, *Bioresource Technology*, 87, 239–246, (2003).

Kikuchi Y., Sunada K., Iyoda T., Hashimoto K., Fujishima A., Photocatalytic bactericidal effect of TiO<sub>2</sub> thin films: dynamic view of the active oxygen species responsible for the effect, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 106, 51-56, (1997).

Kim Y.H., Choi J.W., Lee E.Y., Preparation and characterization of the blends of poly(vinyl alcohol) and N-(2-hydroxy) propyl-3- trimethylanunonium chitosan kloride, *Polymer Korea*, 27, 405-412, (2003).

Kühn K, Chaberny I.F., Massholder K., Stickler M., Benz V.W., Sonntag H., Erdinger L., Disinfection of surfaces by photocatalytic oxidation with titanium dioxide and UVA light, *Chemosphere*, 53, 71-77, (2003).

Li B., Kennedy J.F., Peng J.L., Yie X., Xie B. J., Preparation and performance evaluation of glucomannan–chitosan–nisin ternary antimicrobial blend film, *Carbohydrate Polymers*, 65, 488–494, (2006).

Li Y., Leung P., Yao L., Song Q.W., Newton E., Antimicrobial effect of surgical masks coated with Nanoparticles, *Journal of Hospital Infection*, 62, 58–63, (2006).

- Lu Z., Lei Z., Zhang Z., Shi W., Xie Z., Xie H., Pang D., Shen P, Cell damage induced by photocatalysis of TiO<sub>2</sub> thin films, *Langmuir*, 19, 8765-8768, (2003).
- Matsunaga T., Tomoda R., Nakajima T., Wake H., Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders, *FEMS Microbiology Letters*, 29, 211–214, (1985).
- Melton L.D., Smith B.G., Determination of the uronic acid content of plant cell walls using a colorimetric assay. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Wiley, New York, (2002).
- Nonami T., Hase H., Funakoshi K., Apatite-coated titanium dioxide photocatalyst for air purification, *Catalysis Today*, 96, 113–118, (2004).
- Otey F. H., Westhoff R. P., Doane W.M., Starch-based blown films, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 26, 1659-1663, (1987).
- Ouattara B., Simard R. E., Piette G., Bégin A., Holley R.A., Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 139–148, (2000).
- Padgett T., Han I.Y., Dawson P.L., Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films, *Journal of Food Protection*, 61, 1330-1335, (1998).
- Park S.I., Daeschel M.A., Zhao Y., Functional properties of antimicrobial lysozyme-chitosan composite films, *Journal of Food Science*, 69, 215-221, (2004).
- Park S. K., Bae D.H., Antimicrobial properties of wheat gluten – chitosan composite film in intermediate-moisture food systems, *Food Science and Biotechnology*, 15, 133-137, (2006).
- Pranoto Y., Rakshit S.K., Salokhe V.M., Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin, *LWT- Food Science and Biotechnology*, 38, 859-865, (2005).
- Rhim J, Hong S, Park H., Perry K.W., Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5814-5822, (2006).
- Ruiz R., Ehrman T., Determination of carbohydrates in biomass by high performance liquid chromatography, *Laboratory Analytical Procedures*, No. 002 Golden, CO, Natural Renewable Research Laboratory, (1996).
- Scholz, J., Nocke G., Hollstein F., Weissbach, A, Investigations on fabrics coated with precious metals using the magnetron sputter technique with regard to their anti-microbial properties, *Surface & Coatings Technology*, 192, 252-256, (2004).
- Sebti I., Martial-Gros A., Carnet-Pantiez A., Grelier S., Coma V., Chitosan Polymer as Bioactive Coating and Film against *Aspergillus niger* Contamination, *Journal Of Food Science*, 70, 100-104, (2005).

Seydim A.C., Sarikus G., Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils, *Food Research International*, 39, 639-644, (2006).

Sunada K., Watanebe T., Hashimoto K., Bactericidal activity of copper deposited TiO<sub>2</sub> thin film under weak UV light illumination, *Environmental Science and Technology*, 37, 4785-4789, (2003).

Şen D., Kalıpçılar H., Yılmaz L., Gas Separation Performance of Polycarbonate Membranes Modified with Multifunctional Low- Molecular Weight Additives, *Separation Science and Technology*, 41, 1813-1828, (2006).

Tharanathan R.N., Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future, *Trends in Food Science and Technology*, 14, 71–78, (2003).

Wang X., Du Y., Yang J., Wang X., Shi X., Hu Y., Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan/layered silicate nanocomposites, *Polymer*, 47, 6738-6744, (2006).

Weng Y.M., Hotchkiss J.H., Inhibition of surface molds on cheese by polyethylene film containing the antimycotic imazalil, *Journal of Food Protection*, 55, 367–369, (1992).

Wolff I.A., Davis H.A., Cluskey J.E., Gusdruji L.J., Rist C.E., Preparation of films from amylose, *Ind. Eng. Chem.*, 43, 915-919, (1951).

Wolfrum E. J., Huang J., Blake D. M., Maness P., Huang Z., Fiest J., Photocatalytic oxidation of bacteria, bacterial and fungal spores, and model biofilm components to carbon dioxide on titanium dioxide-coated surfaces, *Environmental Science and Technology*, 36, 3412-3419, (2002).

Yiannikouris A., Francois J., Poughan L., Dussap C.G., Bertin G., Jeminet G., Joveny J.P., Alkali Extraction of  $\beta$ -d-Glucans from *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall and Study of Their Adsorptive Properties toward Zearalenone, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 3666–3673, (2004).

Yew S., Tang H., Sudesh K., Photocatalytic activity and biodegradation of polyhydroxybutyrate films containing titanium dioxide, *Polymer Degradation and Stability*, 91, 1800-1807, (2006).

Zactiti E.M., Kickbusch T.G., Potassium sorbate permeability in biodegradable alginate films: Effect of antimicrobial agent concentration and crosslinking degree, *Journal of Food Engineering*, 77, 462-467, (2006).

Zhang P., Whistler R.L., Mechanical Properties and Water Vapor Permeability of Thin Film from Corn Hull Arabinoxylan, *Journal of Applied Polymer Science*, 93, 2896-2902, (2004).

Zilliox C., Debeire P., Hydrolysis of Wheat Straw by a Thermostable Endoxylanase: Adsorption and Kinetic Studies, *Enzyme Microb. Technol.*, 22, 58-63, (1998).



## TÜBİTAK PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

<b>Proje No:</b> 107M450
<b>Proje Başlığı:</b> TARIMSAL ATIK VE NANO-YAPILI YARI-İLETKEN BAZLI, ANTİMİKROBİK, BİYOBOZUNUR FİMLERİN ÜRETİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Prof. Dr. UFUK BAKIR Prof. Dr. GÜRKAN KARAKAŞ (Danışman)
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> Orta Doğu Teknik Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü İnönü Bulvarı 06531 Ankara.
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b> Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), Tunus Caddesi No:80 06100 Kavaklıdere / Ankara
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b> 15 / 02 / 2008 – 15 / 04 / 2010
<b>Öz (en çok 70 kelime)</b> Pamuk sapından alkali ksilan izole edilmiş ve bu biyopolimerin titanyum dioksit (TiO <sub>2</sub> ) ile birlikte kullanılması sonucunda fotokatalitik antimikrobiyel aktiviteye sahip biyobozunur filmler elde edilmiştir. Filmlere TiO <sub>2</sub> eklenmesinin filmlerin mekanik özellikleri ve biyobozunma özellikleri üstünde olumsuz bir etkiye neden olmadığı belirlenmiştir. Filmlere TiO <sub>2</sub> eklenmesinin yüzey alanını arttırdığı tespit edilmiş, oksijen geçirgenliği testleri sonucunda ise TiO <sub>2</sub> içeren ve içermeyen filmlerin her ikisinin de oksijene karşı oldukça iyi bariyer özelliğine sahip oldukları bulunmuştur.
<b>Anahtar Kelimeler:</b> Ksilan, biyobozunur, titanyum dioksit, antimikrobik, fotokataliz
<b><a href="#">Fikri Ürün Bildirim Formu</a> Sunuldu mu?</b> Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
<b>Projeden Yapılan Yayınlar:</b> Ulusal ve uluslar arası patent başvurusu yapılmıştır. (Başvuru no: 2009-G-153603) Poster sunumu (18. Avrupa Biyokütle Konferansı, Fransa)