

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hatice ağla PAN

ENKAPSÜLE D-LİMONEN İÇERİKLİ AKTİF KAĞIT ÜRETİMİ

GIDA MÜHENDİSLİğİ ANABİLİM DALI

ADANA-2022

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ENKAPSÜLE D-LİMONEN İÇERİKLİ AKTİF KAĞIT ÜRETİMİ

Hatice Çağla PAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

Bu Tez/.../2022 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Dr.Öğr. Üyesi Süleyman POLAT
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Asiye AKYILDIZ
ÜYE

.....
Doç. Dr. Mecit Halil ÖZTOP
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FLY-2021-13808

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ENKAPSÜLE D-LİMONEN İÇERİKLİ AKTİF KAĞIT ÜRETİMİ

Hatice Çağla PAN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Danışman : Dr. Öğr.Üyesi Süleyman POLAT
Yıl: 2022, Sayfa:128
Juri :Dr. Öğr.Üyesi Süleyman POLAT
:Prof. Dr. Asiye AKYILDIZ
:Doç. Dr. Mecit Halil ÖZTOP

Bu çalışmanın amacı, farklı yöntemlerle (lipozom ve siklodekstrin inklüzyon yöntemleri) D-Limonenin enkapsüle edilmesi, aktif özellik kazandırılan hutupak ve filtre kağıtların karakterizasyonu ve antimikrobiyal etkinliğinin ölçülmesidir. Kağıt örnekleri %75 konsantrasyonda hazırlanan limonen çözeltisi, kapsüllenmiş limonen içerikli lipozom çözeltisi, %25'lik HPβSD (2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin) ve βSD (beta-siklodekstrin) inklüzyon kompleksli çözeltilerle daldırma yöntemi kullanılarak birleştirilmiştir. Hazırlanan kağıt örnekleri 4°C ve 25°C'de depolanarak 1. 3. 5. 15. ve 30. günlerde kağıtta kalan D-Limonen miktarı ve kağıtların *Penicillium expansum* ve *Penicillium digitatum*'a karşı antifungal özelliği belirlenmiştir. Üretim yöntemlerinin kağıtların fiziksel özellikleri üzerine etkisi germe testi ve renk analizleri yapılarak belirlenmiştir. Kağıtlarda zaman içinde kalan limonen miktarı, βSD ile kaplı kağıtlarda daha yüksek bulunmuştur. βSD ile kaplı hutupak örneklerinde 30.gün sonunda kağıtlarda kalan limonen içeriği 22,08 µg/cm² iken, filtre kağıdı örneklerinde 47,31 µg/cm² olarak belirlenmiştir. Disk difüzyon yöntemine göre yapılan analizlerle, ilk 5 günlük depolama sırasında yalnızca HPβSD kaplamalı kağıtlar için antimikrobiyal etki görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: D-Limonen, Enkapsülasyon, Lipozom, β -siklodekstrin, 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin



ABSTRACT

MSc THESIS

ACTIVE PAPER PRODUCTION WITH ENCAPSULATED D-LIMONENE

Hatice Çağla PAN

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING

Supervisor :Asst. Prof. Dr. Süleyman POLAT
Year : 2022, Pages : 128
Jury :Asst. Prof. Dr. Süleyman POLAT
:Prof. Dr. Asiye AKYILDIZ
:Assoc. Dr. Mecit Halil ÖZTOP

The aims of this study are to encapsulate D-Limonene with liposome and cyclodextrin inclusion methods, to characterize active feature of their enriched hutupak and filter papers, and to measure their antimicrobial activity. In the assay enriched papers were coated according the dipping method. They are dipped in free limonene solution (75% v/v), in liposome solution of encapsulated limonene, and in 25% HP β SD (2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin) or β SD (beta-cyclodextrin) inclusion complex solutions. The paper samples were stored at 4 °C and 25 °C, and the amount of D-Limonene remaining in the papers on the 1st, 3rd, 5th, 15th and 30th days and the antifungal properties of the papers against *Penicillium expansum* and *Penicillium digitatum* were determined. The effects of the production methods on the physical properties of the papers were determined by tensile test and color analysis. The remaining limonene amount in the papers with time was found higher in the papers coated with β SD. The limonene content in the papers coated with β SD were found 22.08 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and 47.31 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for hutupak and filter paper sample respectively at the end of the 30th day. According to the disk diffusion analysis, an antimicrobial effect was seen only during the first 5 days of storage for the HP β SD coated papers

Keywords: D-Limonene, Encapsulation, Liposome, β -cyclodextrin, 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin



GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Bu çalışmada; özellikle bölgemizde yoğun üretimi olan turuncgil meyvelerinin hasat ile kullanım arasındaki geçen dönemde uğradıkları kayıpların minimize edilmesi amacıyla, küf çürüklüğüne neden olan *Penicillium expansum* ve *Penicillium digitatum* küflerine karşı doğal antimikrobiyal D-limonenin enkapsüle edilerek kağıt ambalaj materyaline uygulanması ve antifungal etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

D-Limonen; lipozom yöntemi ve siklodekstrinler ile enkapsüle edilmiş ve enkapsülasyon verimliliği belirlenmiştir. Daha sonra limonen hutupak ve filtre kağıtlarla birleştirilerek aktif özellik kazandırılmaya çalışılmış ve kağıtların fiziksel özelliklerindeki değişim germe testi, ağırlık ölçümü ve renk analizleri yapılarak belirlenmiştir. Kağıt örneklerinde kalan D-Limonen miktarı ve kağıdın zamana bağlı antifungal özelliğindeki değişim belirlenmiştir.

Çalışma kapsamında öncelikle limonenin hedef mikroorganizmalara karşı Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu bulunmuştur. Limonenin MİK değeri her iki küf türü içinde (*Penicillium expansum* ve *Penicillium digitatum*) 842 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Limonen lipozom yöntemi ve siklodekstrin inklüzyon kompleksi oluşturularak enkapsüle edilmiş, lipozom yönteminde soya lesitini kullanılarak ince film hidrasyon yöntemi kullanılmış, siklodekstrin inklüzyon kompleksinde ise; β -siklodekstrin ve 2-hidroksipropil-β-siklodekstrin kullanılarak yoğurma yöntemi ile inklüzyon kompleksi oluşturulmuştur.

Üretilen kapsüllerde tutulmuş olan limonen miktarıyla enkapsülasyon etkinliği ve mikrokapsüllerin yükleme kapasitesi sonuçları belirlenmiştir. Limonenin beta siklodekstrin (βSD) ile oluşturduğu inklüzyon komplekslerinin enkapsülasyon etkinliği ortalaması %82,1, yükleme kapasitesi ise %36,6 olarak hesaplanmıştır. 2-Hidroksipropil-beta-siklodekstrin (HPβSD) ile oluşturduğu

inklüzyon komplekslerinin enkapsülasyon etkinliği %99,03, yükleme kapasitesi ise %29,2 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar incelendiğinde; HP β SD ile oluşturulan inklüzyon kompleksinde enkapsülasyon etkinliği değerinin yüksek çıktığı, ancak yükleme kapasitesi değerinin ise, β SD ile oluşturulanlarda daha yüksek bir değere sahip olduğu belirlenmiştir. Limonenin, lipozom ile enkapsüle edilmesinde enkapsülasyon etkinliği değeri %33,0 yükleme kapasitesi değeri ise %22,6 olarak belirlenmiştir.

Daldırma yöntemiyle hutpak ve filtre kağıtları limonen (serbest veya enkapsüle halde) ile birleştirilmiş elde edilen kağıtların renk özelliklerindeki değişim incelenmiştir. ΔE^* değeri; hiç kaplama yapılmamış hutpak ve filtre kağıtlara göre değerlendirildiğinde; kaplama ile oldukça belirgin renk farklılığının oluşabileceği belirlenmiştir.

Hutpak esaslı kağıt örneklerinin limonen ile birleştirilmesinden sonra mekanik özelliklerindeki değişim, hiç kaplama yapılmamış kağıtlara göre değerlendirildiğinde; β SD ve HP β SD ile kaplanmış örneklerinin kalınlık değerlerinde artış olduğu belirlenmiştir. Örneklerin gerilme mukavemeti (GM) incelendiğinde lipozom çözeltisi ile kaplanmış kağıt örneğinin GM değeri (7,40 MPa), kontrol örneğine göre (22,95 MPa) istatistiksel olarak önemli ölçüde azalmıştır. HP β SD örneğinin GM değeri (23,75) ile kontrol örneğinin GM değeri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark oluşmadığı belirlenmiştir. Farklı şekillerde limonen ile birleştirilen hutpak kağıtların uzama miktarı (UM) değerleri incelendiğinde, örnekler arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar ($p>0.05$) olduğu belirlenmiştir. Filtre esaslı kağıt örneklerinin gerilme mukavemeti (GM) incelendiğinde lipozom çözeltisi ile kaplı kağıt örneğinin GM değeri (3,27 Mpa), kontrol örneğine göre (11,64 Mpa) istatistiksel olarak önemli ölçüde azalmıştır. Serbest limonen ile kaplı kağıt örneğinin GM değeri (10,22) ile kontrol örneğinin GM değerleri (11,64) arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($p>0.05$) olmadığı belirlenmiştir. Farklı şekillerde limonen ile birleştirilen filtre kağıdı esaslı örneklerin uzama miktarı (UM) değerleri arasında da istatistiksel açıdan önemli

farklılıklar ($p<0.05$) olduğu belirlenmiştir. Tüm örneklerin UM değerinde, kaplama yapılmayan filtre kağıtlara göre azalış tespit edilmiştir.

Aktif kağıtların 1. 3. 5. 7. 15. ve 30. günlerde kağıtta kalan D-Limonen miktarı incelendiğinde; hem 4 °C hemde 25 °C’de depolanan kağıtlarda en yüksek değerler, β SD ile kaplanmış olanlarda belirlenmiştir. Depolama sıcaklıkları göz önünde bulundurulduğunda 4°C’de depolanan kağıtlarda kalan limonen miktarının 25°C’deki depolamadaki kağıtlara göre genel olarak daha yüksek değerlerde olduğu belirlenmiştir. 4°C’de depolanan hutupak kağıtların 1.gün ve 30.gün limonen içerikleri; serbest limonenle kaplanan örneklerde 4,64-2,09 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, β SD ile kaplanmış hutupak kağıt örneklerinde; 90,77-22,08 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, HP β SD ile kaplanmış hutupak kağıt örneklerinde; 16,74-2,96 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, lipozom ile kaplanmış kağıt örneklerinde ise; 4,78-1,30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak belirlenmiştir. 4 °C’de depolanan filtre kağıtlarda ise; 1.gün ve 30. gün limonen içerikleri, serbest limonenle kaplanan örnek kağıtlarda; 6,38-1,45 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, β SD ile kaplanmış filtre kağıt örneklerinde örneklerinde; 132,73-69,53 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, HP β SD ile kaplanmış filtre örneklerinde; 16,42-6,26 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, lipozom ile kaplanmış örneklerinde ise; 4,26-1,31 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak belirlenmiştir. Filtre kağıtlarda ve hutupak kağıtlarda bulunan limonen içeriği kendi içinde mukayese edildiğinde ise; 1. günden 30. güne kadar yapılan analizlerde filtre kağıtlarda tutunumun daha yüksek olduğu görülmüştür. Hem 4 °C hemde 25 °C de depolama yapılan hutupak ve filtre kağıtların her ikisinde de 30 gün boyunca yapılan analizlerin her birinde en yüksek değerler β SD ile kaplanmış kağıtlarda gözlenmiştir.

D-limonen içerikli aktif filtre ve hutupak esaslı kağıtların *Penicillium expansum* ve *Penicillium digitatum*’a karşı oluşturdukları antimikrobiyal aktivite 1. 3. 5. 15. ve 30. günlerde kontrol edilmiştir. Disk difüzyon yöntemine göre yapılan analizlerde; zon çapı sadece HP β SD ile kaplanan kağıtlarda oluşmuş, 15. ve 30. günlerde herhangi bir zon çapı oluşmadığı belirlenmiştir.



TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim süresince çalışmalarımın her aşamasında bana her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen ve bu konuda çalışma olanağı sağlayan Sayın Hocam Dr. Öğr. Üyesi Süleyman POLAT'a, tezimin değerlendirilme aşamasında değerli fikirleri ile katkıda bulunan diğer jüri üyelerim Sayın Prof. Dr. Asiye AKYILDIZ ve Sayın Doç. Dr. Mecit Halil ÖZTOP'a ve analizlerim sırasında yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen Dr. Erdal AĞÇAM'a, Arş. Gör. Dr. Bilal AĞIRMAN'a, Ar. Gör. Abdullah ÖZONUR'a ve Arş. Gör. Gözde KONURAY'a ve diğer laboratuvar imkanlarını kullanmamı sağlayan Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyelerine, lisans ve lisansüstü öğrencilerine, teşekkürlerimi sunarım.

Bana her konuda destek olan, hayat arkadaşım Ahmet PAN'a, bana enerji ve yaşama sevinci veren canım oğlum Yiğit'e

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi çalışmamın da her aşamasında beni cesaretlendiren, bitirmem için canıgönülden çabalayan desteğini her daim hissettiğim başta canım babam Nihat Özdemir'e ve annem Sultan Özdemir'e minnettarlığımı sunarım.

Çalışmalarım süresince benden manevi desteklerini esirgemeyen iş arkadaşlarım Olcay Türken ve Tuba K. Özdemir'e teşekkürlerimi sunarım.

Başöğretmen, Büyük önder M. Kemal ATATÜRK başta olmak üzere benim önemli kararlar almamda imzası olan öğretmenim Ahmet Yakışıklı'ya ve tüm öğretmenlerime minnettarlığımı sunarım.



İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	II
ABSTRACT.....	IV
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	VI
TEŞEKKÜR.....	X
İÇİNDEKİLER	XII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XVI
ŞEKİLLER DİZİNİ	XVIII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR.....	XX
1.GİRİŞ	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	7
2.1. Gıda Ambalajlamada Kağıt Kullanımı	7
2.2. Kağıt Esaslı Aktif Ambalaj Uygulamaları.....	8
2.3. Esansiyel Yağlar.....	10
2.4. Limonen.....	16
2.4.1. Limonenin Kimyasal Yapısı	16
2.4.2. Limonenin Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitesi	18
2.4.3. Limonenin Antikanser ve İnsektisit Aktivitesi	19
2.4.4. Limonen Uçucu Yağının Gıda Endüstrisinde Kullanımı	20
2.5. Enkapsülasyon Teknolojisi.....	21
2.6. Lipozom Yöntemi ile Enkapsülasyon.....	23
2.6.1. Lipozomun Yapısı.....	23
2.6.2. Fosfolipit Çesitleri.....	25
2.6.3. Lipozomların Sınıflandırılması	26
2.6.4. Lipozomun Oluşturulması.....	28
2.6.5. Lipozomların Elde Edilme Yöntemleri.....	29
2.6.6. Lipozom Teknolojisinin Gıda Endüstrisinde Uygulama Alanları.....	31

2.7. Siklodekstrinin Yapısı ve Enkapsülasyonda Kullanımı	36
2.7.1. Siklodekstrin İnklüzyon Kompleksinin Gıda Endüstrisinde Uygulama Alanları	39
3. MATERYAL VE METOT	43
3. 1. Materyal.....	43
3. 2. Metod.....	44
3.2.1. D-Limonenin enkapsülasyonu	45
3.2.2. Enkapsülasyon Etkinliği Analizi.....	49
3.2.4. Kağıtlarda Yapılan Fiziksel Analizler.....	52
3.2.5. Kağıt Örneklerinde Depolama Süresince Yapılmış Analizler	54
3.2.6. İstatistiksel analiz.....	55
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	57
4.1. Limonenin MİK Bulguları.....	58
4.2. D-Limonen/Siklodekstrin İnklüzyon Komplekleri ve Lipozomla Enkapsülasyon Etkinliğine Ait Bulgular	62
4.3. D-Limonen İçerikli Aktif Kağıtların Fiziksel Özelliklerine Ait Bulgular	64
4.3.1. Renk Analizi	64
4.3.2. Kağıtların Mekanik Özelliklerine Ait Bulgular.....	68
4.3.3. FT-IR Spektrometresi.....	72
4.4. Kağıtta Kalan Limonen Miktarına Ait Bulgular.....	77
4.5. Antifungal Aktivite Değişimine ait Bulgular	84
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	93
ÖZGEÇMİŞ	119
EKLER.....	121
EK-1. Disk difüzyon sonuçlarının image j programı ile inceleme adım görüntüleri	123
EK-2. Filtre kağıtlarla hazırlanan aktif özellikteki kağıtların FTIR spektrumları	126

EK-3. Hutupak kağıtlarla hazırlanan aktif özellikteki kağıtların FTIR spektrumları	127
EK-4. Kaplama yapılmamış filtre kağıdı (F-K) ve %75'lik limonen çözeltisi ile kaplanmış filtre kağıdına (F-L) ait FTIR spektrumları	128





ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 2.1. Uçucu yağ içerikli biyopolimer esaslı film çalışmaları	12
Çizelge 2.2. Fosfodilkolin çeşitlerinin, pH=7'deki net yükleri ve katı halden sıvı forma geçiş sıcaklıkları	26
Çizelge 2.3. Vezikül çeşitleri ve çapları	28
Çizelge 2.4. Lipozomların elde edilme yöntemleri.....	29
Çizelge 3.1. Kullanılan siklodekstrinlerin Özellikleri.....	44
Çizelge 4.1. D-Limonenin Test Edilen Küfler Üzerinde MİK Sonuçları	59
Çizelge 4.2. Hutpak Kağıdı Esaslı Örneklerin Renk Değerleri	66
Çizelge 4.3. Filtre Kağıdı Esaslı Örneklerin Renk Değerleri.....	67
Çizelge 4.4. Hutpak Esaslı Kağıtların Mekanik Özellikleri.....	69
Çizelge 4.5. Filtre Kağıdı Esaslı Örneklerin Mekanik Özellikleri.....	70
Çizelge 4.6. Çalışmada kullanılan kağıt örneklerinin iki farklı mikroorganizmaya karşı oluşturdukları zon ölçümleri.....	85
Çizelge 4.7. D-Limonen içerikli HPBSD inklüzyon kompleksi ile oluşturulan filtre ve hupak kağıtların <i>Penicillium Expansum</i> ve <i>Penicillium Digitatum</i> 'a karşı oluşturdukları disk difüzyon sonuçlarının image j programı ile ölçülen sonuçları	88



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 2.1. Hutupak kağıt örnekleri	8
Şekil 2.2. Filtre kağıt örnekleri.....	8
Şekil 2.3. Limonenin kimyasal yapısı	18
Şekil 2.4. Mikrokapsül üretmek için üç geleneksel adımın şematik gösterimi	22
Şekil 2.5. Lipozomların sınıflandırılması ve yüzey uyarlaması.	24
Şekil 2.6. Fosfatidilkolin'in kimyasal yapısı.....	25
Şekil 2.7. Tek (Monolayer) Lipozom (a) ve Çok tabakalı (Multiplelayer) Lipozom(b)	27
Şekil 2.8. Küçük ve büyük tek katmanlı kesecikler ile çok katmanlı ve çoklu kesecikli lipozomların sematik görüntüsü.....	29
Şekil 2.10. Siklodekstrinlerin üç boyutlu yapıları	37
Şekil 2.11. a) β SD (beta-siklodekstrin, b) HP β SD (2-hidroksipropil-beta- siklodekstrin) kimyasal yapısı	39
Şekil 3.1. Lipozom üretim akış şeması	46
Şekil 3.2. Lipozom üretim akışı-.....	47
Şekil 3.3. Siklodekstrin üretim akış şeması.....	48
Şekil 3.4. Toz forma getirilmiş siklodekstrin inklüzyon kompleksi	49
Şekil 3.5. Hutupak ve filtre kağıtların çözeltilerle birleştirilmesi ve kurutulması	52
Şekil 3.6. Germe testi için kullanılan kağıt örnekleri.....	53
Şekil 4.1. D-limonen içerikli β SD ve HP β SD inklüzyon kompleklerine ait enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesi değerleri	62
Şekil 4.2. D-limonen içerikli lipozomların enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesi değerleri	64
Şekil 4.3. D-Limonene ait FT-IR spektrumları.....	73
Şekil 4.4. Kaplama yapılmamış filtre kağıdı (F-K) ve %75'lik limonen çözeltisi ile kaplanmış filtre kağıdına (F-L) ait FTIR spektrumları	74

Şekil 4.5. Hutupak kağıtlarla hazırlanan aktif özellikteki kağıtların FTIR spektrumları.....	75
Şekil 4.6. Filtre kağıtlarla hazırlanan aktif özellikteki kağıtların FTIR spektrumları.....	76
Şekil 4.7. 25oC’de bekletilen hutupak kağıdı esaslı aktif özellikteki kağıt örneklerinin limonen içerikleri	78
Şekil 4.8. 4 °C’de bekletilen hutupak kağıdı esaslı aktif özellikteki kağıt örneklerinin limonen içerikleri.....	79
Şekil 4.9. 25°C’de bekletilen filtre kağıdı esaslı aktif özellikteki kağıt örneklerinin limonen içerikleri.....	81
Şekil 4.10. 4°C’de bekletilen filtre kağıdı esaslı aktif özellikteki kağıt örneklerinin limonen içerikleri.....	81
Şekil 4.11. D-Limonen içerikli HPβSD inklüzyon kompleksi ile oluşturulan filtre ve hutupak kağıtların <i>penicillium expansum</i> ve <i>penicillium digitatum</i> ’a karşı oluşturdukları disk difüzyon sonuçları	87

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

β SD	: Beta siklodekstrin
HP β SD	: 2-Hidroksipropil-beta-siklodekstrin
GC-MS	: Gaz kromatografisi – Kütle spektrofotometre
GRAS	: Generally recognized as safe
FDA	: Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç Dairesi)
FT-IR	: Fourier Transform Infrared Spektroskopisi)
PC	: Fosfatidilkolin
PDA	: 10,12-Pentakosadiynoik Asit
T	: Kalınlık
GM	: Gerilme mukavemeti
UM	: Uzama miktarı
EM	: Kağıtların elastik modülü
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>L. monocytogenes</i>	: <i>Listeria monocytogenes</i>
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
MLV	: Multilamellar Veziküller
SUV	: Küçük Tek Lamelli Veziküller
LUV	: Büyük Tek Lamelli Veziküller
EE	: Enkapsülasyon etkinliği



1.GİRİŞ

Özellikle son yıllarda sentetik katkı maddelerinin potansiyel tehlikeleri nedeniyle tüketicilerin doğal bileşenlere olan artan talebi doğrultusunda; uçucu yağların iyi antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri, gıdaya aroma ve renk vermeleri sebebiyle, gıda sektöründe kullanımlarında artış görülmektedir. İçerdikleri uçucu bileşenlerin kolayca çevre koşullarından etkilenecek kaybolması ve etkisini uzun süre koruyamaması enkapsülasyon teknolojisinin gelişmesine olanak sunmuştur.

Enkapsülasyon teknolojisi ile çevresel şartlara ve işleme koşullarına karşı hassas gıda materyallerinin korunmasını sağlayarak raf ömrünü uzatmak, gıda bileşenlerinin sindirim sisteminin uygun noktasında salınımını sağlamak, gıda bileşenlerinin biyoyararlılığını arttırmak, az miktarlarda kullanım gerektiğinde homojen karışımların oluşturulmasını sağlamak, maddenin taşınması ve depolanmasını kolaylaştırmak, istenmeyen tat ve kokuyu maskelemek ve kaplanacak materyalin diğer bileşenlerle reaksiyona girmesini engellemek gibi faydalar sağlanmaktadır (Re, 1998; Shahidi ve Han 1993).

Gıda bileşenlerinin enkapsülasyonu için birçok yöntem mevcut olmakla birlikte; püskürterek kurutma, püskürtmeli dondurma ekstrüzyon, koaservasyon, dondurarak kurutma bunlardan bazılarıdır. Enkapsülasyon tekniklerinden lipozom ve siklodekstrin uygulamalarında komplekslerin uçucu ve hassas aroma bileşenlerinin korunmasında etkin olması, hidrofobik ve hidrofilik yapıları ve uygulanabilirliği bakımından kolay geliştirilebilir olmaları ve bu tekniklerin aktif kağıt ambalaj uygulamalarında sınırlı olması tercih sebebi olmuştur.

Tezde kullanılan, D-limonen; turunçgil kabuk yağında bulunan uçucu yağların büyük çoğunluğu olan monoterpenlerin ana bileşenidir. Monoterpenler tüm turunçgil kabuk yağlarında yüksek oranda bulunmasına rağmen, hammaddeye bağlı olarak miktarı değişebilmektedir. Limonen'in aktif formu D-Limonendir ve

tat vermek amacıyla yiyeceklere güvenle katılabilecek maddelerin listesinde bulunmaktadır (Sun, 2007).

Lipozomlar; hem hidrofobik hem de hidrofilik bileşiklerin kapsüle edilmesi amaçlı farmasötik, kisisel bakım, kimya ve gıda endüstrisinde kullanılan; yağ gibi non-polar fazların saklanması için ideal olan polar lipidlerden oluşan iki tabakalı küresel lipid kesecikleridir ve bu polar lipidlerin doğadaki başlıca kaynakları; yumurta, soya ve ayçiçek lesitini'dir. Gıda ve İlaç Dairesi'ne (FDA) göre; Genellikle Güvenli Kabul Edilen (GRAS) kategorisinde yer almaktadır (Laye ve ark., 2008). Lipozomların gıdalarda kullanımı sonucunda kapsüllenmiş maddenin stabilitesini arttırması ve bu maddenin bulunduğu ortamdaki diğer maddelerle etkilesimi nimumimize etmesi gibi faydaları bulunmaktadır. Diğer kapsülasyon maddelerine kıyasla oluşturma metotlarının basitliği, tamamen doğal bileşiklerden oluşturulması gibi özellikleri, lipozomları birçok enkapsülasyon sisteminden ayıran belirgin özelliklerdir.

Siklodekstrinler; GRAS listesinde yer alan nişasta türevleridir ve toksik değildirler. Moleküler düzeyde enkapsülasyonun sağlanabilmesi, siklodekstrinlerle kompleks oluşturma'nın en önemli avantajıdır. Böylece aroma konsantreleri, uçucu yağlar, oleorezinler gibi doğal veya sentetik birleşik (kompozit) sistemlerde moleküller arası etkileşim de engellenebilmekte çok bileşenli gıda sistemlerindeki her bir aroma bileşeni çok etkili bir şekilde korunabilmektedir (Szente ve Szejtli, 2004).

Kağıt ambalajlar; ucuz, bol ve sürdürülebilir hammaddelerden yapılmış olması, değişik özellikte ve kalitede üretilebilir ve birçok şekle sokulabilir olması, diğer malzemelerle kaplanabilir ya da çok katlı malzeme yapılarına girebilir olması, hafif, geniş bir sıcaklık aralığında kullanılabilir olması, inert özelliğe sahip olması, yaygın taşıma ambalajları olan karton kutu ve kolilere dönüştürülebilir olması çok önemli artı özelliklerindendir. Ayrıca; geriye kazanılmaya elverişli doğada kolayca yok edilebildiğinden çevre dostu olması endüstride yaygın kullanım alanı bulmasını sağlamıştır (Soroka, 1999).

Tez çalışmasında; kullanılan Hutpak Kâğıdı, 17-18 gr/m² ağırlığında, %100 selülozdan mamul, bir yüzü parlak, meyvelerin sarılıp muhafazasında kullanılmakta olup, özellikle narenciye ürünlerinde tercih edilmektedir. Hutpak kağıda alternatif olarak çalışılmış olan filtre kağıdı ise genellikle selülozdan yapılan yarı geçirgen bir kağıttır ve laboratuvarlarda vazgeçilmezdir. Kullanılan kağıt türüne göre hızlı, orta veya düşük hızda olabilen filtrasyon yöntemi ile katı veya yarı katı maddelerin ayrıştırılması amacıyla laboratuvarlarda fiziksel bariyer olarak kullanılır. Özellikle; bölgemizde narenciye üretimi son derece önemli bir tarımsal faaliyet olduğu ve yüksek ihracat kalemini oluşturduğu düşünüldüğünde depolama ve pazarlama aşamalarında kalitenin korunması ve raf ömrünün artırılması bölge üreticileri açısından oldukça önem arz etmektedir. Hasat edilen ürünlerin büyük bir bölümü üreticiler ve aracı-depocular tarafından çeşitli kimyasallar (difenil vb.) uygulanarak depolanmaktaydı. Ancak, yapılan düzenlemelerle kanserojen olduğu belirlenmiş olan difenilli kağıt, Avrupa Birliği'nde kullanımı yasaklanmış dolayısıyla ülkemizde de Avrupa Birliği direktiflerine uyum kapsamında yasaklanmıştır. Kullanımı yasak ve kanserojen olan difenilli kâğıttın uygulamadan kaldırılması, sektörde faaliyet gösteren firmalar için kaplama materyali kullanımı konusunda boşluk oluşturmakta alternatif ürünlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Tez çalışması kapsamında; kağıt ambalajlarda yasak olan kimyasallara alternatif olarak uygulanabilecek aktif kağıt üretimi üzerinde çalışılmıştır.

Türkiye'de 2019 yılında 4.301.415 ton turunçgil üretimi gerçekleşmiş olup, üretimin %90'ı Akdeniz, %9'u Ege Bölgesi'nden karşılanmaktadır. (TÜİK, 2020). Turunçgiller de diğer meyvelerde olduğu gibi bahçede, hasat sırasında ve hasat sonrasında pek çok fungal etmenin neden olduğu hastalıklara maruz kalmaktadır. Turunçgil meyvelerinin dahil olduğu taze meyve ve sebzeler gibi dayanıksız ürünlerin hasat ile kullanım arasındaki geçen dönemde uğradıkları kayıpların %50'lere ulaştığı bildirilmiştir (Waller ve ark. 2001). Hedef mikroorganizma olarak seçilen *Penicillium expansum* ve *Penicillium digitatum* küfleri; küf

çürüklüğüne neden olmakta, başta turunçgil meyveleri olmak üzere elma ve benzeri ürünlerde de kaliteyi ve depo ömrünü sınırlayan en önemli faktör olduğu literatürde de vurgulanmaktadır (Whiteside ve ark., 1989; Özbek ve Delen, 1995).

Mevcut literatür çalışmalarında; çevre koşullarına karşı kimyasal olarak stabil olmayan, D-Limonenin uçuculuğunun geciktirilmesi ile yapısının korunması amacıyla lipozom ve siklodekstrinin enkapsülasyon teknikleri ile uygulanabilirliği üzerine çalışmalar yapılmıştır. Ancak, D-Limonenin lipozom ve siklodektrin yöntemleriyle kapsüle edilmesiyle limonenin uçuculuğu geciktirilecek ve gerçekleştirilecek yavaş salınım ile birlikte limonenin antifungal etkisinden uzun süre faydalanabilmeyecektir. Ayrıca; her iki yöntemin aktif kağıt üretiminde kullanımıyla ilgili çalışmalarının sınırlı olması, iki yeni enkapsülasyon tekniğinin kıyaslanacak olması tez çalışmasının özgünlüğünü oluşturmaktadır.

Tez çalışması; antimikrobiyal etkiye sahip limonenin uçuculuğunun azaltılarak, çevre faktörlerine karşı stabilitesini korumak, istenilen oranlarda kontrollü şekilde salınımı gerçekleştirmek için daha verimli yararlanabilmek için, lipozom ve siklodektrin yöntemleri ile enkapsüle edilmesi, kağıt ambalajlarda uygulanması yönünde kurulmuştur.

Tezin amacı; gıda ambalajlanmasında kullanılan kağıt ambalajların kaplanmasında kullanılan kimyasallara alternatif olarak, doğal D-Limonenin kapsüle edilmesi, verimlilik ve salınım konusunda en uygun enkapsülasyon yönteminin kıyaslanarak belirlenmesi ve kağıtta antimikrobiyal etkisinin araştırılmasıdır. Bu amaçla;

- D-Limonenin lipozom ve siklodektrin yöntemleri ile enkapsüle edilmiş ve enkapsülasyon verimliliği belirlenmiştir.
- Hutpak kağıtları ve filtre kağıtları D-Limonen içerikli çözeltiler ile daldırma yöntemi ile birleştirilmiştir.

- Kağıdın fiziksel özelliklerinde oluşabilecek değişimler belirlenmiştir.
(Germe testi, Renk analizi)
- Kağıt örneklerinin depolama süresince aktif özelliklerindeki değişim;
- Kağıt örneklerinde kalan D-Limonen miktarı
- Kağıdın zamana bağlı antifungal özelliğindeki değişim belirlenmiştir.





2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Gıda Ambalajlamada Kağıt Kullanımı

Gıda sanayisinde yaygın ölçüde kullanılan kağıt esaslı ambalaj malzemelerinin ana hammaddesi, birincil odun selülozu ve ikincil atık kağıt elyaflardır. Kağıt üretim teknolojisi genel olarak; odun, yıllık bitki, atık kağıt gibi hammaddelerden kimyasal, yarı kimyasal ve mekaniksel yollarla olmakta ve bu sayede fiziksel özellikleri geliştirilmektedir. Kağıdın malzeme niteliklerinin tanımlanmasında kullanılan ölçülebilir özellikler; kağıdın cinsi, kalınlık veya gramajdır. Gramaj, standart çevre koşullarında (20°C sıcaklık ve %65 bağıl nem) kağıdın birim alanının ağırlığıdır ve genellikle g/m² birimi ile belirtilir.

Kağıtların kriterlerinin belirlenmesinde; optik özellikler (renk, parlaklık, matlık), dayanım özellikleri (gerilme gücü, çekme dayanımı, başlangıç yırtılma dayanımı, patlama dayanımı), geçirgenlik özellikleri (nem ve gaz) gibi özellikler etkili olmaktadır. Kağıt çeşitleri ve kağıt esaslı ambalajlar; Sargılık kağıtlar (Kraft, sülfite, parşömen, hutpak vb.), karton kutular, oluklu mukavva kutular, polistirenli kutular olarak sınıflandırılmaktadır (Üçüncü, 2007).

Kağıt ve karton malzemeler özellikle; restaurantlarda sıcak içecek ve yiyeceklerin ambalajlanmasında, sallama çay poşetlerinde kullanılan filtre kağıtlarında, fırın/pastane ürünlerinin ve kuru gıdaların ambalajlanmasındaki gibi çok farklı amaçlar için kullanılmaktadır. Ayrıca; un, şeker ve makarna gibi gıdaların ambalajında sebze, meyve ve yumurtaların taşınmasında da sıklıkla karşımıza çıkmaktadır.

Özellikle narenciye ürünlerinde sargı kağıt olarak kullanılan Hutbak (Foodpack) kağıtları; 18-32 gr/m² arasında beyaz ve renkli olarak üretimi yapılan, %100 selülozdan mamul ve geri dönüştürülebilir, bir yüzü parlak olup tam tutkallı kağıt çeşididir. Tüketime hazır gıdalarda, laminasyon ürünlerinde, hediyeelik eşyalarda, tekstil sanayisinin farklı alanlarında da kullanılmaktadır. Literatür incelendiğinde; hutpak kağıt ile yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.



Şekil 2.1. Hutpak kağıt örnekleri

Filtre kağıdı; genellikle selülozdan yapılan yarı geçirgen bir kağıttır. Kantitatif ve kantitatif rutin analizler için idealdirler ve laboratuvarlarda vazgeçilmezdir. Kullanılan kağıt türüne göre hızlı, orta veya düşük hızda olabilen filtrasyon yöntemi ile katı veya yarı katı maddelerin ayrıştırılması amacıyla laboratuvarlarda fiziksel bariyer olarak kullanılır.



Şekil 2.2. Filtre kağıt örnekleri

2.2. Kağıt Esaslı Aktif Ambalaj Uygulamaları

Gıda ambalajları, gıda güvenliğini artırmaya ve raf ömrünü uzatmaya yardımcı olarak, gıda ürünlerinin UV ışığı, oksijen, su buharı, basınç, ısı gibi çevresel faktörlerden korunmasında hayati bir rol oynamaktadır. Aktif paketlenme teknolojileri ile ekolojik sorunların çözümünde ve tüketici kabul edilebilirliğini artırmada olumlu etkileri nedeniyle daha yenilikçi yaklaşımlar üzerinde çalışılmaktadır.

Aktif ambalajlama sentetik katkı maddeleri içerebilmesine rağmen, aktif gıda paketlenme için biyolojik olarak parçalanabilen malzemelerde uçucu yağlar gibi biyoaktif bileşiklerin kullanımına artan bir ilgi vardır. Kağıt ambalaj uygulamaları biyolojik olarak parçalanabilir ve yenilenebilir olduğundan çevresel açıdan güvenlidir (Khwalidia ve ark., 2010; Singh ve ark., 2017).

Literatürde aktif kağıt ambalaj üretimi üzerine yapılmış sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (López-Gómez ve ark., 2020; Akbaş, 2017). Bu çalışmalarda daha çok tarçın, kekik uçucu yağları kullanılmıştır. Literatürde aktif kâğıtların depolama stabilitesini belirlemeye yönelik ve D-Limonen içerikli aktif kağıt üretimi üzerine bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Akbaş (2017), tarçın yağıyla kaplanmış aktif kağıt tabakaların tasarımı isimli çalışmada; Üç kaplama tekniği, daldırarak, ultrasonik (80 kHz and 100% güçte) ve vakum altında (50 kPa) kaplama ile tarçın yağını kâğıtlarla birleştirmişlerdir. Üç farklı konsantrasyonda (2%, 4% ve 6% (v:v)) hazırlanan tarçın yağı-etanol solüsyonu, kaplama ortamı olarak kullanılmıştır. Farklı metod ve tarçın yağı konsantrasyonu kullanılarak hazırlanan kâğıtlarda, sinamaldehit içeriğini belirlemek için, GC-MS analizleri yapılmıştır. Buna ek olarak, üretilen aktif tabakaları değerlendirmek için toplam fenolik madde miktarı, antioksidan aktivite, *Aspergillus niger* ve *Penicillium expansum* a karşı olan antimikrobiyel aktivite analizleri yapılmıştır. Bu çalışmada, sinamaldehit miktarı ile *Aspergillus niger* ve *Penicillium expansum* 'a karşı olan antimikrobiyel etki arasında yüksek şekilde korelasyon olduğu bulunmuştur. Tüm kaplama teknikleri, kağıt matrikse tarçın yağı geçişi açısından başarılı olmuştur fakat yapılan çoğu analizde ultrasonik kaplamanın diğer tekniklerden önde olduğu belirlenmiştir.

Rodriguez ve ark. (2007), gıdalarla temas etmesi amaçlanan kağıt ambalaj malzemeleri için parafin bazlı "aktif kaplamalarda"; karanfil, tarçın, kekik, sinamaldehit ile zenginleştirilmiş doğal uçucu yağların antimikrobiyal etkisini değerlendirmişlerdir. Yapılan analizlerde; tarçınlı parafin kaplaması, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* mikroorganizmalarını tamamen inhibe ettiği ve hem

Penicillium nalgiovense hem de *Penicillium roqueforti*'ye karşı önemli etkinlik sağladığı görülmüştür. Buna karşılık, test edilen gram-pozitif bakteriler de (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus*) hiçbir inhibisyon gözlenmezken gram-negatif bakterilere karşı inhibe edici aktivite gösteren tek aktif kaplamanın, zenginleştirilmiş tarçın esansiyel yağı olduğunu bildirmişlerdir.

Rodriguez ve ark. (2008), tarçın uçucu yağının katı balmumu parafin ile bir aktif kaplama olarak birleştirilmesine dayanan çalışmada yeni bir aktif kağıt ambalaj geliştirmişlerdir. Aktif kağıdın antifungal aktivitesi in vitro koşullarda *Rhizopusstolonifer*'e karşı test edilmiş sonuçların, aktif kaplama formülasyonundaki uçucu yağ miktarı ağırlıkça % 6 olduğu zaman *R. stolonifer*'in büyümesini tamamen engellediğini göstermiştir. Daha sonra aktif kağıt, farklı saklama süreleri kullanılarak dilimlenmiş ekmek üzerinde denenmiş, 3 günlük depolamadan sonra tarçın esansiyel yağı ile neredeyse tam inhibisyon elde edilmiştir. Katı faz mikro ekstraksiyonu ile kalitatif analiz ve dilimlenmiş ekmekte sinnamaldehit tayini de gerçekleştirilmiş ve küfün engellenmesi ile ekmeğin içindeki sinnamaldehit miktarı arasındaki güçlü uyuşmayı doğrulamıştır.

2.3. Esansiyel Yağlar

Orta çağlardan beri uçucu yağlar; ilaç, sıhhi, kozmetik, tarım ve gıda endüstrilerinde bakterisidal, virüsidal, fungisidal, antiparazitik, insektisidal, tıbbi ve kozmetik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Uçucu yağlar,, çoğunlukla aromatik bitkilerden damıtılarak, terpenler ve terpenoidler, fenolden türetilmiş aromatik bileşenler ve alifatik bileşenler gibi çeşitli uçucu moleküller içerirler (Bakkalı ve ark., 2008).

Uçucu yağlar; sıvı, uçucu, berrak ve nadiren renkli, yağda ve genellikle sudan daha düşük yoğunlukta organik çözücülerde çözünür. Uçucu yağları elde etmek için; distilasyon ve ekstraksiyon yöntemleri uygulanmakta olup; su distilasyonu (HD), süperkritik sıvı ekstraksiyonu (SFE), mikrodalga ekstraksiyonu

(MWE) ve katı-faz mikroekstraksiyonu (SPME) gibi yöntemler son yıllarda uygulanan yöntemlerdir. Uçucu yağların bakterisidal ve fungisidal özelliklerinden dolayı, ekolojik dengeyi korumak için sentetik kimyasal ürünlere alternatif olarak farmasötik ve gıda kullanımları giderek daha yaygın hale gelmektedir (Attokaran, 2017; Burt, 2004; Zhao ve ark., 2019).

Uçucu yağlar, doğada halihazırda gözlemlenen özellikleri nedeniyle, parfümlerde ve makyaj ürünlerinde, sıhhi ürünlerde, dişçilikte, tarımda, gıda koruyucu ve katkı maddesi olarak ve doğal ilaçlar olarak kullanılmaktadır. Örneğin, D-Limonen, geranil asetat veya d-karvon, parfümlerde, kremlerde, sabunlarda, yiyecekler için aroma katkı maddeleri olarak, ev temizlik ürünleri için koku olarak ve endüstriyel çözücüler olarak kullanılır (Silva ve ark., 2003).

Uçucu yağlar, aromatik bitkilerin çeşitli kısımlarından elde edilen uçucu sıvılardır ve aroma bileşiklerine göre tanımlanabilirler. Bu biyoaktif bileşikler, gıda kaynaklı patojenlerin büyümesini önleme ve gıda ürünlerini koruma yetenekleri nedeniyle aktif paketlenme için uygundur. Uçucu yağların aktif gıda ambalajlarına yönelik mevcut uygulamaları meyve, sebze, balık ürünleri, et ürünleri, süt ve süt ürünleri, ekmek ve unlu mamuller gibi farklı gıda gruplarına uygulanan film ve kaplama formundaki kullanımlarını içerir. Uçucu yağ bileşenlerinin yapısal düzenlemesi, nihai ambalaj malzemesi mikro yapısı üzerinde bir etkiye sahiptir (Sharma ve ark. 2021). Uçucu yağlar;

- Türüne ve konsantrasyonuna bağlı olarak malzemelerin çekme, bariyer ve optik (renk, parlaklık ve şeffaflık) özelliklerini artırabilir.
- Oksijen tutucu olarak hareket etme yeteneklerinden dolayı ambalaj malzemelerinin antioksidan aktivitesini artırır ve aktif maddelerin kaplanmış gıda ürünlerine difüzyonuna izin verir.
- Yüksek miktarda biyoaktif bileşik içerdiğinden, ambalaj malzemesinin antibakteriyel özelliklerini iyileştirir ve bu da gıdaları patojenik bakterilerden korur.

Uçucu yağların biyolojik olarak parçalanabilen malzemelerde katkı maddesi olarak kullanılabilmesi için Avrupa Komisyonu tarafından tescil ettirilmesi gerekmektedir (Sharma ve ark. 2021). Uçucu yağlar kullanılarak yapılan aktif özellikteki yenilebilir film çalışmalarına ilişkin veriler Çizelge 2.1’de verilmiştir. Çizelge incelediğinde; uçucu yağların farklı biyopolimerlerde kullanımları sonucunda elde edilen kazanımlar verilmiştir. Ayrıca antimikrobiyal ve antioksidan etkilerin uçucu yağ türüne göre değiştiği görülmektedir.

Çizelge 2.1. Uçucu yağ içerikli biyopolimer esaslı film çalışmaları (Sharma ve ark., 2021)

Uçucu yağ	Biyopolimer	Önemli Bulgular	Referans
<i>Kekik yağı, Limon otu yağı ve adaçayı yağı</i>	<i>Sodyum Aljinat</i>	• <i>En güçlü antimikrobiyal aktivite gösteren yağın kekik yağı olduğu belirlenmiştir.</i> • <i>Esansiyel yağlar ve polisakkaritler içeren nano emülsiyonların yenilebilir film oluşturmak için kullanılabileceği belirlenmiştir.</i>	Acevedo-Fani ve ark. (2015)
<i>Öjenol</i>	<i>Kitosan pektin nişastası</i>	• <i>Filmin fonksiyonel özelliklerini, antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerini geliştirdiği belirlenmiştir..</i>	Zheng ve ark. (2019)
<i>Tarçın yağı</i>	<i>Kitosan sakızı arap yenilebilir film</i>	• <i>Filmlerin su bariyeri özelliklerini geliştirilmiştir.</i> • <i>Büyük ölçüde geliştirilmiş antioksidan etkinliği sağlanmıştır.</i>	Xu ve ark. (2019)

Kekik yağı	Soya proteini	<i>E. coli</i> ve <i>S. aureus</i>'a karşı güçlü antibakteriyel aktivite görülmüştür. - Daha iyi mekanik özellikler gösterdiği ve su buharı bariyeri olduğu görülmüştür.	Dos Santos Paglione ve ark. (2019)
Biberiye yağı, nane yağı	Kitosan pektin ve nişasta polimeri	- Azaltılmış çekme mukavemeti ve su bariyeri özellikleri gösterdiği görülmüştür. - Geliştirilmiş esneklik sağlanmıştır. <i>B. subtilis</i>, <i>E. coli</i> ve <i>L.monocytogenes</i>'e karşı inhibisyon bölgesi en az %40 artmıştır.	Akhter, Masoodi, Wani ve Aksine (2019)
Karanfil Yağı	Narenciye pektini	- Geliştirilmiş ısı stabilitesi sağlanmıştır. <i>S. aureus</i> ve <i>L.monocytogenes</i>'e karşı antimikrobiyal etkinlik görülmüştür.	Nisar ve ark. (2018)
Zencefil esansiyel yağı	Jelatin bazlı film	Geliştirilmiş antioksidan aktivite gözlenmiştir, ancak antibakteriyel aktivite gözlenmemiştir.	Alexandre, Lourenço, Bittante, Moraes ve Amaral Sobral (2016)
Kekik esansiyel yağı	β siklodekstrin (s-CD) ϵ -polilislin nanopartiküller, jelatin	Tavuk üzerinde <i>C. jejuni</i> karşı mükemmel antimikrobiyal aktivite sergilemiştir.	Lin ve ark. (2018)

<i>Karanfil esansiyel yağı</i>	<i>Polilaktik asit ve poli(bütilen)adipat-ko-tereftalat)</i>	<i>Karanfil yağı %80 UV engelleme özelliği sergilemiştir.</i> <i>S. aureus'un 6,5 log CFU/MI 'dan 0 log CFU/mL'a azaltılarak tamamen öldürülmesi gözlenmiştir.</i>	Sharma ve ark.(2020a)
<i>Biberiye esansiyel yağı</i>	<i>Nişasta-karboksi metil selüloz</i>	<i>S. aureus'a karşı inhibitör etkiler arttı, daha yüksek su buharı geçirgenliği gözlenmiştir.</i>	Mohsenabadi ve ark. (2018)
<i>Tarçın esansiyel yağı</i>	<i>Polilaktik asit ve poli(bütilen) adipat-ko-tereftalat)</i>	<i>Ağırlıkça %10 tarçın yağı - PLA-PBAT film UV engelleme özelliğinde %80 artış gözlenmiştir.</i> <i>E. coli biyofilmini %89,82 oranında inhibe etmiştir.</i> <i>S. aureus büyümesini 4,26 log CFU/ml azaltmıştır.</i>	Sharma ve ark. (2020b)
<i>Biberiye yağı, Mersin yağı ve Kekik yağı</i>	<i>Polilaktik asit (PLA)</i>	<i>%1,5 ticari kekik yağı ve %5 doğal mersin yağı Aspergillus niger sp. karşı antifungal aktiviteyi önemli ölçüde arttırmıştır.</i>	Yahyaoui ve ark. (2016)

Aromatik bitkiler ve bunlardan elde edilen esansiyel yağlar, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yüzyıllardan beri halk arasında hastalıkların tedavisi amacıyla ve gıda ürünlerinde koruyucu ve lezzet verici olarak kullanılmaktadır. Gelişen teknolojiye paralel olarak kullanımı gittikçe artmış bulunan sentetik katkı maddelerinin sağlık üzerinde birçok yan etkilerinin ortaya konmuş olması ve

mikroorganizmaların sentetik antimikrobiyallere karşı direnç oluşturmaları gibi nedenler, tıbbi ve aromatik bitkilerin ve bunlardan elde edilen esansiyel yağların ve ekstraktların kullanımını tekrar ön plana çıkarmış ve bu ürünlerin gıdalarda, hayvan yemlerinde ve organik tarım uygulamalarında kullanımının geliştirilmesiyle ilgili çalışmaları hızlandırmıştır.

Bitki esansiyel yağlarının antibakteriyel, antifungal, antiviral, antioksidatif ve antimutajenik etkilerine yönelik elde edilen araştırma sonuçları genel olarak pozitif yöndedir. Bu nedenle bitkisel uçucu yağ ve ekstrakt kullanımının etkili çözüm yollarından biri olabileceği kabul edilmektedir. Bitki esansiyel yağlarının çoğunda mutajenik etkinin görülmemesi, bu yağların birçok sentetik gıda katkı maddesinin yerine kullanılabilecek potansiyel bir kaynak olduğunu göstermektedir (Germinara ve ark, 2017; Hassoun ve Emir, 2017; Kalagatur ve ark, 2018; Pateiro ve ark., 2018).

Son yıllarda uçucu yağlar, diğer sektörlerde artan kullanımıyla birlikte gıda sektöründe de aroma vermek, gıdanın kalitesini arttırmak, oksidasyon ve mikrobiyel aktivite sonucunda oluşabilecek bozulmaları minimize etmek amacıyla kullanılmaktadır. Hava, ışık, nem ve yüksek sıcaklıkta kimyasal olarak stabil olmayan uçucu yağlar, oldukça hızlı bozulmaya uğrarlar. Esansiyel yağlar, gıda ambalajına dahil edildiğinde antioksidan ve antimikrobiyal özelliğinde artış sağlama, UV bariyeri özelliği oluşturma gibi sayısız öneme sahiptir. Ancak, aynı zamanda birkaç sınırlaması vardır. Uçucu yağın aktif ajan olarak kullanılmasının dezavantajları, düşük çözünürlüğü, yüksek uçuculuğu, güçlü aroması ve gıdaların organoleptik özelliklerini olumsuz etkileme olasılığıdır. Ayrıca uçucu yağlar zayıf çözünürlüğe, ısı ve ışık hassasiyetine ve yüksek uçuculuğa sahiptir. Bunlar nedeniyle, uçucu yağın ambalajdan malzemesinden kaybı hızlı olabilmektedir. Uçucu yağların uçuculuğunu azaltmak için nano emülsifikasyon ve enkapsülasyon teknolojilerinden faydalanılmaktadır (Sharma ve ark. 2021).

Uçucu yağın gıda ambalajındaki bir diğer önemli dezavantajı, gıdaların organoleptik özelliklerini olumsuz etkileme olasılığıdır. Üründeki uçucu yağ

seviyesi yüksekse, kabul edilebilir organoleptik seviyesini aşabilir ve bu da gıda ürününün doğal tadının değişmesine neden olabilmektedir (Ribeiro ve ark., 2017).

Bu sorunlara çözüm olarak geliştirilen mikroenkapsülasyon teknolojisi ile uçucu yağların uygun özellikteki katmanlar aracılığıyla kaplanarak uçuculuklarının geciktirilmesi sağlanmakta ve bu sayede içerdiği bileşenlerin korunması, sıvı gıda formunun kuru toz formlara dönüştürülmesi, raf ömrünün uzatılması, işleme, depolama ve taşıma süreçlerinde karşılaşılabilecek olası problemlerin azaltılması sağlanmaktadır (Jackson ve ark., 1991).

Depolama süreleri boyunca, bozulmaya neden olan mikroorganizmalara ve lipid oksidasyonuna karşı çok hassas olan çeşitli gıdaların olması piyasada yüksek kayıplara yol açmaktadır. Ayrıca, sağlıklı ve güvenli gıda ürünlerine yönelik sürekli artan tüketici talebi, araştırmacıları, gıdaların kalite ve güvenliğini birlikte besin değerlerini ve duyuşal özelliklerini koruyarak geliştirmek için daha doğal alternatif yaklaşımlar bulmaya yöneltmiştir. Uçucu yağların, Avrupa Komisyonu (EC) ve FDA tarafından katkı maddesi olarak onaylandığından, artık sentetik koruyucular yerine gıda ürünlerinin üzerinde kullanılmaları için çalışmalar artmaktadır. Ayrıca, biyoaktif özellikleri nedeniyle aktif ambalajlarda katkı maddesi olarak kullanılan uçucu yağlara artan bir ilgi vardır. Bu çalışmalarda esansiyel yağlarının ambalaj malzemeleriyle bileşmesi sağlanarak taze ürünlerde biyojenik aminlerin gelişiminin kontrol altına alınması ve antimikrobiyal özellikte ambalaj malzemesigeliştirilmesi üzerine patent başvuruları yapılmaktadır (Ribeiro ve ark., 2017).

2.4. Limonen

2.4.1. Limonenin Kimyasal Yapısı

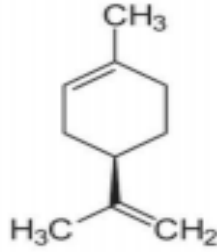
Turunçgil kabuk yağında bulunan uçucu yağların büyük çoğunluğu terpenlerden (monoterpen, sesquiterpen) oluşmakta olup, bu monoterpenler, turunçgil yağlarının ana bileşenlerini oluştururlar. Bu monoterpenlerin ana bileşeni ise *limonen* olmasına rağmen içinde bulunan oksitlenmiş terpen türevi ve

miktarındaki farklılıktan dolayı her turuncgil yağının kokusu ve aroması farklıdır. Örneğin portakal kabuk yağında *limonen* içeriği %90'dan fazla iken, limon kabuk yağında *limonen* içeriğinin % 65 civarında olduğu bildirilmektedir (Ruberto, 2002). Limonen (p-menta-1,8-dien) portakal, mandalina, limon ve greyfurt gibi narenciye meyvelerinden elde edilen yağın ana maddesidir. Limonen'in aktif formu D-Limonendir (Bacanlı ve ark., 2017).

Limonen (CAS-No. 138-86-3), D- veya L-enantiyomerlerin bir karışımı olarak doğal olarak oluşan siklik bir monoterpendir. D-Limonen (CAS-No. 5989-27-5) hoş portakal veya turuncgil benzeri kokusuyla bilinirken, L-limonen (CAS-No. 5989-54-8) genellikle hoş olmayan terebentin benzeri bir kokuya sahip olduğu belirtilmiştir. Oda sıcaklığında limonen renksiz bir sıvı oluşturur. Limonen; 136,24 g / mol moleküler ağırlığa sahiptir, yüksek derecede lipofiliktir (logPOW = 4,57) ve sonuç olarak suda çok az çözünür (25 ° C'de 13,8 mg / L).Limonenin kimyasal yapısı Şekil 2.3'te verilmiştir. FDA'a göre; GRAS kategorisinde yer almaktadır (FDA, 2017).

In vivo ve in vitro çalışmalarda D-Limonen'in antimikrobiyal, antioksidan, antienflamatuar, anti-stres ve muhtemel hastalık önleyici özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir (Roberto ve ark. 2010).

Feng ve ark., (2017), çalışmasında; uçucu yağların çeşitli gıda kaynaklı patojenlere karşı etkili antimikrobiyal ajan olduklarını ancak, kendine özgü tat ve kokularından dolayı gıda muhafaza alanındaki uygulamalarının sınırlı kaldığını belirtmişlerdir. Nitekim D-Limonenin uçucu yağ olması ve uçucu bileşenlerin kolayca çevre koşullarından etkilenecek buharlaşmasının geciktirmek için mikroenkapsülasyon teknolojilerinden yararlanılmaktadır. Mikroenkapsülasyon uçucu yağlara bir kalkan oluşturarak stabilitesinin korunması, raf ömrünün artması, kontrollü salınımının sağlanması, tat ve kokunun maskelenmesi, taşınma kolaylığı, besinsel kaybının azaltılması gibi birçok avantaj sağlayabilmektedir.



Şekil 2.3. Limonenin kimyasal yapısı

2.4.2. Limonenin Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitesi

Limonenin antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili en eski araştırmalar 1950'lerin başlarına kadar uzanmaktadır ve o zamandan beri tartışılmaktadır. Dabbah ve ark.,(1970) yapmış olduğu çalışmada; portakal, limon, greyfurt ve mandalina meyvelerinden D-Limonen ile uçucu yağlarının inhibitör etkisini kıyaslayarak, limonenin antimikrobiyal özelliklerini araştırmış; saf limonenin bu meyvelerde bulunan diğer uçucu yağlara kıyasla antimikrobiyal etkisinin oldukça etkili olduğunu bulmuştur. Winniczuk ve Parish (1997), çalışmalarında; düşük saflıkta D-Limonenin (% 66) tüm mayaların ve gram-pozitif bakteri büyümesini inhibe ederken, gram-negatif bakteri türlerine karşı etkinlikten yoksun olduğunu gözlemlemiştir.

Dorman ve Deans (2000), çalışmalarında; limonenin antimikrobiyal aktivitesini taramışlar ve geniş bir mikroorganizma yelpazesine karşı orta düzeyde aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Bugüne kadarki çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda; önemli miktarda antimikrobiyal elde etmek için nispeten yüksek D-Limonen konsantrasyonlarına gereksinim duyulduğunu belirlemişlerdir.

Literatür incelendiğinde; Limonenin maya ve küfler üzerine antimikrobiyel etkisini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalarda, etkinin mikroorganizma türüne bağlı olarak değişebileceği vurgulanmıştır (Zahi ve ark, 2015; Marianna ve ark, 2011; Umagiliyagea ve ark. 2016).

D-Limonenin güçlü antioksidan özelliklere sahip olduğu ve organizmaları oksidatif hasardan koruduğu ve serbest radikalleri bertaraf ettiği tespit edilmiştir

(Maróstica ve ark., 2009; Martínez ve ark., 2017; Sarjono ve ark., 2019). Ayrıca D-Limonenin lipit peroksidasyonu azalttığı, antioksidan enzim aktivitelerini (SOD, CAT, GPx, GST) arttırdığı belirlenmiştir (Tang ve ark., 2019).

Özellikle son yıllarda sentetik katkı maddelerinin potansiyel tehlikeleri nedeniyle tüketicilerin doğal bileşenlere olan artan talebi doğrultusunda gıdalarda koruyucu olarak kullanılan kimyasallara karşı bir alternatif olabileceği belirtilmiştir. Limonen esansiyel yağının antimikrobiyal ve antioksidatif etkilerine yönelik elde edilen araştırma sonuçları genel olarak pozitif yönde olup, birçok sentetik gıda katkı maddesinin yerine kullanılabilecek potansiyel bir kaynak olduğunu göstermektedir.

2.4.3. Limonenin Antikanser ve İnsektisit Aktivitesi

Limonen, çeşitli kanser türlerine karşı kemopreventif özellikleri nedeniyle araştırılmış olup; limonenin saf formda veya portakal kabuğu yağının (>% 90 D-Limonen) bir bileşeni olarak uygulanması, meme, deri, akciğer ve ön mide kanserlerinin gelişimini inhibe ettiği görülmüştür (Elson ve ark., 1998; Haag ve ark., 1992). Uçucu yağlar ve bileşenleri, zengin bir biyoaktif kimyasal kaynağı oldukları için depolanmış ürünlerin korunması açısından; tarım ilaçları olan sert pestisitlere karşı çekici bir alternatif olarak giderek daha fazla kabul edilmektedir (Shaaya, 1997). Limonen, böcek öldürücü özellikleri olduğu bilinen birçok siklik monoterpen arasındadır. Daldırma yöntemini kullanarak, ortama % 50 limonen ile müdahale edildiğinde su sümbülü bitinde % 73'lük bir ölüm oranı olduğunu belirlemiştir (Haag, 1986).

Yapılan bir çalışmada; fümigasyon yoluyla limonene maruz bırakılan pirinç bitlerinde 19 ppm'lik bir LC₅₀ değerine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Ancak, bu bileşiğin bir sindirim testi kullanılarak hamamböcekleri üzerinde çok az etkiye sahip olduğu veya hiç olmadığı bulunmuştur (Karr ve Coats, 1992). Sonraki çalışmalarda limonenin hem *Rhyzopertha dominica* hem de *Tribolium castaneum* için öldürücü olduğu bulunmuştur (Prates ve ark., 1998).

2.4.4. Limonen Uçucu Yağının Gıda Endüstrisinde Kullanımı

D-Limonen içeren aktif ambalaj uygulamaları mevcut olup; gerek yenilebilir kaplamalara ilave edilerek gıdalara uygulanabilmekte gerekse polimerlere (sentetik veya biyopolimerlere) ilave edilerek aktif özellik kazandırılmaktadır.

Dhitala ve ark. (2018), çalışmasında; çileklerinin raf ömrünün uzatılmasında ve kalite parametrelerinin korunmasında etkinliğini belirlemek için yenilebilir kaplama malzemesi olarak limonen lipozomlarını ince film dehidrasyon yöntemi kullanılarak hazırlamıştır. Toplam maya ve küf sayımları, tepe boşluğu atmosfer analizi, pH, titrasyon asitlikği, toplam antosiyanin içeriği ve toplam fenolik madde analizleri yapılmıştır. 4°C depolamada 14 gün boyunca meyve kalitesinin korunduğu görülmüş olup, çileklerin daha düşük solunum hızına sahip olduğu ve depolama boyunca daha yüksek toplam antosiyanin içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. Böylece enkapsüle limonen lipozomlarının, çilek meyvelerinin raf ömrünü uzatmak ve kalitesini korumak için faydalı olduğu bulunmuş, lipozomlarının çileklerin hasat sonrası kalitesini korumada etkili olabileceği kanıtlanmıştır.

Arrieta ve ark. (2013), gıda ambalajı uygulamalarında PLA-limonen karışımının karakterizasyonu adlı çalışmasında; limonenin PLA(Polilaktik asit)'e ilavesi, ile PLA filmlerinin mekanik özellikleri üzerindeki etkisi kopma uzamasında bir artış ve elastik modülde bir azalma şeklinde belirlenmiştir. Filmlerin plastikleşme özelliğinde gelişme gözlemlenmiş, oksijene karşı bariyer özelliklerinin ise azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, gıda ile temas eden malzemeler için esnek filmler elde etmek için doğal bir PLA plastikleştirici olarak limonenin kullanılmasının ve hatta aktif paketlenme sistemlerinde aktif bileşik olarak test edilmesinin fizibilitesini göstermiştir. Petro-polimerlere umut verici alternatif olarak geliştirilen biyobozunur filmlere limonen ilavesiyle; filmlerde doğal plastikleştirici görevi görerek esneklik kazandırmış, mekanik özelliklerini iyileştirmiştir.

Maleki ve ark. (2018), yapmış olduğu çalışma sonucunda; MAP (Modifiye Atmosferde Paketleme) ile kombinasyon halinde kitosan-limonen kaplamanın, salatalıkta ağırlık kaybı, sertlik, renk, pH, organoleptik özellikler gibi meyve kalitesi özelliklerini koruyarak ürünün hasat sonrası ömrünü uzatabileceğini ve mantar büyümesinin baskılanmasıyla çürümeyi azaltabileceğini belirlemişlerdir. Yapılan kaplamayla yarı geçirgen bariyer özellik sağlanmış ve bu sayede daha düşük ağırlık kaybına neden olan solunum hızı ve su kaybı olduğu tespit edilmiştir.

2.5. Enkapsülasyon Teknolojisi

Enkapsülasyon; bir maddenin veya karışımın başka bir madde veya sistem ile kaplanması veya hapsedilmesi olarak tanımlanmaktadır. Enkapsülasyon 3 farklı boyutta yapılabilir; nanoenkapsülasyon (200 nm=0.2 µm'den küçük), mikroenkapsülasyon (0.2-5000 µm) ve makroenkapsülasyon (5000 µm'den büyük) olarak sınıflandırılabilir. Enkapsülasyon teknolojisiyle; gıda sektöründe genellikle, sıvı damlacıkların, katı partiküllerin veya gaz bileşenlerinin gıda saflığında kaplama materyalleri ile kaplanması ile; gıdaların raf ömrünü artırılması, besin değerinin artırılması, olgunlaşma süresinin kısaltılması, gıdaların doğallığının korunması ve fonksiyonel özelliklerinin geliştirilmesi ile hedef bölgede etki göstermesi gibi faydalar sağlanmaktadır (Madene ve ark., 2006).

Enkapsülasyonla gıda maddesinin stabilizasyonu sağlanırken, enkapsüle edilen maddenin yavaş salımı da gerçekleştirilebilir (Gökmen ve ark, 2012). Gıda ürünleri içerisinde çoğunlukla katı ve sıvı yağlar, aroma bileşenleri, vitaminler, mineraller, renk bileşenleri ve enzimler mikroenkapsule edilmektedir. Bitki özü bileşiklerinin çeşitli endüstriyel uygulamalarında bazı sınırlamaların olması, ürünlerin fizikokimyasal özelliklerini, biyolojik aktivitelerini, raf ömrünü iyileştirmesi, ve etkinliğini optimize edilmesi açısından enkapsülasyon teknolojisi son yıllarda gelişmektedir (Cristina ve ark., 2021).

Mikroenkapsülasyon teknikleri üç ana kategoride sınıflandırılabilir: ekstrüzyon, emülsiyon ve dehidrasyon (Cassani ve ark, 2020). Yöntem seçimi,

nihai ürün özelliklerine göre belirlenmekte olup; genel kapsül boyutu, kullanılan kapsülleme teknolojilerine göre değişir. Kapsülleme işlemi genellikle üç aşamada gerçekleştirilir. Mikrokapsül üretmek için üç geleneksel adımın şematik gösterimi Şekil 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.4. Mikrokapsül üretmek için üç geleneksel adımın şematik gösterimi (Sarao ve Arora, 2017)

İlk aşamada, biyoaktif bileşenin bir katı (aglomerasyon veya adsorpsiyon) veya sıvı (çözünme veya dağılma) matrisine dahil edilmesi bulunurken, ikinci aşamada, katı matris çözeltisi durumunda sıvı matris dağıtılır veya püskürtülür. Üçüncü aşama, sistemin fiziksel (buharlaştırma, katılaşma ve kaynaşma), kimyasal (polimerizasyon) veya fizikokimyasal (jelleşme) süreç yoluyla stabilizasyonuna karşılık gelir. Ayrıca bu mikropartiküller, lipozomlar, moleküler inklüzyon, koaservasyon veya birlikte kristalizasyon kullanılarak da elde edilebilir (Sarao ve Arora, 2017). Genellikle gıda endüstrisinde kullanılan

geleneksel mikrokapsülleme teknolojileri, sprey kurutma, ekstrüzyon, koaservasyon ve emülsiyonlar gibi belirli fiziksel-kimyasal işlemlerle sınırlıdır. Çalışmamızda uygulamış olduğumuz iki enkapsülasyon yöntemi ayrıntılı anlatılmıştır.

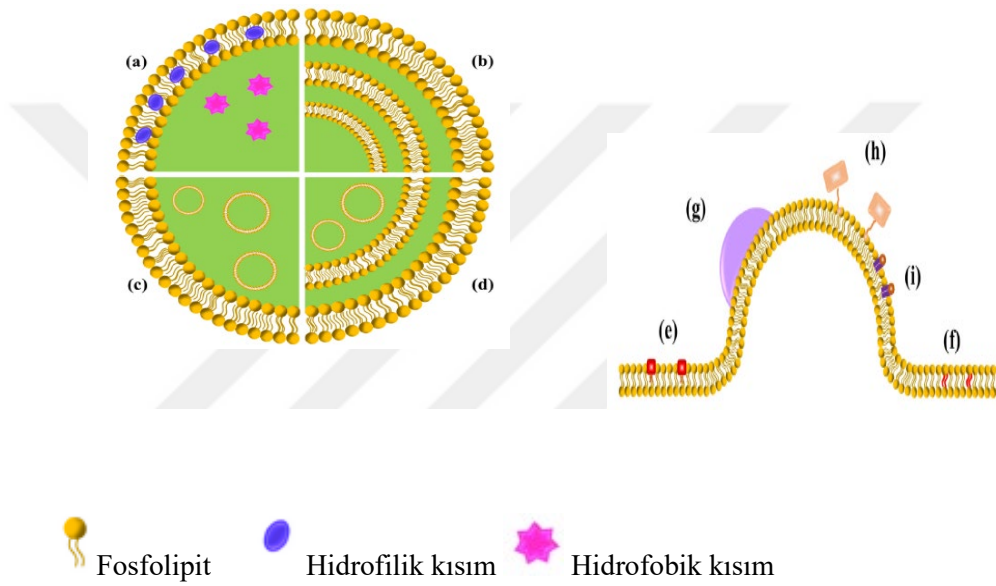
2.6. Lipozom Yöntemi ile Enkapsülasyon

2.6.1. Lipozomun Yapısı

Lipozomlar lipit tabaka ve sulu faz olmak üzere iki bölümden oluşurlar ve çapı 20 nm'den 20 µm'ye kadar değişen boyutlarda olabilirler (Taylor ve Morris, 1995). Yunancada yağ anlamına gelen “Lipos” ve vücut anlamına gelen “Soma” kelimelerinden “Lipozom” kavramı türetilmiştir. Lipozom, ilk defa Alec D. Bangham tarafından 1961 yılında sentetik olarak yapılmıştır (Maherani ve ark., 2011). 1965 yılında tanımlanan kapalı lipit çift tabakası, 1967 yılında lipozom adını almıştır.

Fosfolipid moleküllerinin bir ucu suda çözünür diğer ucu suda çözünmez olduğundan su ile karıştırıldığında küre oluşturduğu gözlemlenmiştir. Lipozomların temel yapıları hücre membranı yapısına çok benzediğinden, in vitro araştırmalarda uzun yıllardır model membran olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca, lipozomlar ilaç taşıyıcı sistemi olarak da kullanılabilmeleri nedeniyle son yıllarda üzerinde çok çalışılan ve araştırmaların ilgi odağı konumunda yer almaktadırlar. Lipozomlar biyouygunluğa sahip materyaller olmaları, suda çözünebilen aktif bileşenleri hidrofilik olan merkezinde tutundurabilmeleri, suda çözünemeyen hidrofobik bileşenleri ise membranında tutundurabilmeleri, yan etkileri olmadan çevresel etkilere dayanıklı olması, biyoaktif bileşenlerin hücre içine ve hatta hücredeki bölmelere kadar ulaştırılmasını sağlayan yegane seçenek olması ve boyutlarının çeşitli işlemlerle istenen hale getirilebilmeleri gibi kabul gören biyolojik aktivitelere sahiptirler (Maja ve ark, 2020; Mozafari, ve ark, 2008; Torchilin, 2005).

Şekil 2.5'te görüldüğü gibi; lipozomlar hem hidrofilik polar hem de hidrofobik apolar boşluklar içermekte üç boyutlu dış görünüşü bir topu andırmaktadır. Bu sayede suda çözünebilir maddeleri polar boşluklarında, yağda çözünebilir maddeleri ise hidrofobik boşluklarında kapsülleyerek bunlar için bir taşıyıcı vazifesi görürler (Liu ve ark., 2020).



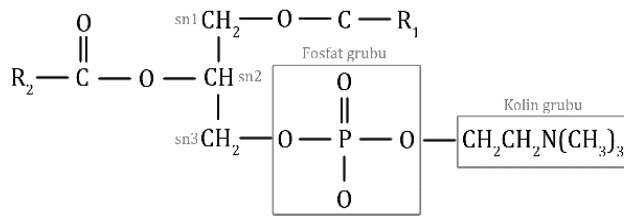
Şekil 2.5. Lipozomların sınıflandırılması ve yüzey uyarlaması. (Liu ve ark., 2020)
 (a) tek katmanlı kesecik, hidrofilik moleküller su fazında tutulur ve hidrofobik moleküller fosfolipid çift katmanlarına dahil edilir; (b) çok katmanlı kesecik; (c) multiveziküler vezikül; (d) çok katmanlı multiveziküler vezikül; (e) kafa fosfolipidin modifikasyonu; (f) fosfolipidin yağ asitleri modifikasyonu; (g) iskele; (h) aşılama; (i) sıkıştırma

Lipozomlar içerisinde enkapsüle edilen biyoaktif ajanlar midede sindirimden korunabilmekte ve bağırsaklarda biyoaktivite ve biyoyararlılık sağlayabilecek şekilde gastrointestinal sistemde önemli oranda absorbe edilebilmektedir (Jafari ve ark., 2008). Enkapsülasyonda kullanılan lipozomlar tadın stabilize edilmesinde ve depolama stabilitesinin artırılmasında etkili

olmaktadır. Lipozomlar sağlığa olumlu etkileri olan bileşenleri sistem içine alarak ve bunları kapsüle ederek gıdaların biyolojik yararlılıklarını ve dolayısıyla besinsel özelliklerini artırmaktadırlar (Kailasapathy, 2002; Kim ve ark., 2008).

2.6.2. Fosfolipit Çesitleri

Lipitler, yağ ve vakslar gibi yaşayan organizmalarda meydana gelen bir grup kimyasal bileşiklerdir ve sudaki çözünürlükleri oldukça düşüktür. Fosfolipitler ise, fosfat grubu içeren bir tür özel lipit olarak tanımlanmaktadır. Fosfolipitler lipozomların ve hücre zarının yapıtaşlarıdır. Lipitler genellikle hidrofob ve apolar bir yapıya sahiptirler. Bu nedenle su ile karışmazlar. Fakat, fosfolipitlerin fosfat grubu hidrofil ve polar yapıya sahip olduğundan, bunlar suyla karıştırılabilmektedir. Lipozomların elde edilmesi için en çok kullanılan doğal fosfolipitler; Fosfatidilkolin, Fosfatidilserin, Fosfatidiletanolamin, Kolesterol, Stingomiyelin ve Fosfatidilinositol iken, sentetik fosfolipitler; Distearoylfosfatidilkolin (DSPC), Dipalmitoylfosfatidilkolin (DPPC), Dimyristoylfosfatidilkolin (DMPC), Dilaurylfosfatidilkolin (DLPC), Distearoylfosfatidiletanolamin (DSPE) bunlardan bazılarıdır. (Liu ve ark., 2020; Maja ve ark., 2020) Fosfolipitlerden en çok kullanılanı fosfatidilkolindir (PC) ve bu lipit lesitin olarak da bilinmektedir. Fosfatidilkolin'in kimyasal yapısı Şekil 2.6'da verilmiştir.



Şekil 2.6. Fosfatidilkolin'in kimyasal yapısı (Kırtıl ve Öztop, 2014)

Fosfolipitler doğal yumurta ve soya lesitini de dahil olmak üzere geniş bir pH aralığında negatif yüklü olmaktadır. Pozitif veya nötr lipozomlar elde etmek için fosfatidiletanolamin gibi pozitif yüklü lipidler kullanılmalıdır veya negatif yüklü lipidler tercih edilip, elektrostatik depozisyon ile pozitif yüklü bir polimer kaplaması yapılmalıdır ve kitosan bu amaçla yaygın kullanılır. Sentetik fosfolipitlerden Dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC) yüksek geçiş sıcaklığına sahip olduğu için stabilitesini yüksek sıcaklıklarda daha çok koruyabilir, bu açıdan PC'ye göre daha avantajlıdır ve daha çok tercih edilmektedir (Koynova ve ark., 1998). Fosfodilkolin çeşitlerinin, pH=7'deki net yükleri ve katı halden sıvı forma geçiş sıcaklıkları Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Fosfatidilkolin çeşitlerinin, pH=7'deki net yükleri ve katı halden sıvı forma geçiş sıcaklıkları (Yurdakul,2007)

Lipit Adı	Kısaltması	Net Yüğü	Tc Değeri
<i>Distearoilfosfatidilkolin</i>	<i>(DSPC)</i>	0	58
<i>Dipalmitoilfosfatidilkolin</i>	<i>(DPPC)</i>	0	41
<i>Dimiristoilfosfatidilkolin</i>	<i>(DMPC)</i>	0	23
<i>Dilaurilfosfatidilkolin</i>	<i>(DLPC)</i>	0	0
<i>Dimiristoilfosfatidiletanolamin</i>	<i>(DMPE)</i>	0	48
<i>Yumurta Fosfatidilkolini</i>	<i>Egg PC</i>	0	-5'den -15'e
<i>Soya Fosfatidilkolini</i>	<i>Soy PC</i>	0	20'den -30'a

2.6.3. Lipozomların Sınıflandırılması

Fosfolipitler suya eklendiklerinde, hidrofilik bölgeleri suya doğru yönelirken, hidrofobik bölgeleri sudan uzaklaşarak vezikül şeklini alırlar. Burada, moleküller arası etkileşimler, hidrofilik etkileşimler (kutup baş grupları ve su molekülleri arasında) gerçekleşir. Çift tabakalı lipozom yapısının oluşmasını fosfolipitler ile su fazı arasındaki hidrojen bağı (su molekülleri ve baş grupları /

fosfatlar/karbonil arasında) ve Van der Waals etkileşimleri (hidrokarbon zincirleri arasında) arasındaki hassas bir denge ile düzenlenir (Shishir ve ark., 2019).

Hazırlama yöntemlerinin farklılıklarından dolayı, çok tabakalı (Multilamellar Veziküller, MLV) ve küçük tek tabakalı (Küçük Tek Lamelli Veziküller, SUV) ile büyük tek tabakalı (Büyük Tek Lamelli Veziküller (LUV) lipozomlar (Şekil 2.7) oluşturulur. Oluşturulan katmanların sayısı hazırlama tekniğine bağlıdır; hazırlama yönteminden doğrudan etkilendikleri için bunlar tek veya çok katmanlı veziküller olarak belirlenirler ve bu nedenle amaca yönelik en uygun yöntem seçilmelidir (Taylor ve ark., 2005).



Şekil 2.7. Tek (Monolayer) Lipozom (a) ve Çok tabakalı (Multiplelayer) Lipozom(b) (Yurdakul,2007)

Çaplarına ve elde edilen katman sayısına bağlı olarak, literatürde Çizelge 2.3'te belirtildiği üzere sınıflandırma yapılmıştır. Nanolipozomlar film oluşturma işleminde sonikasyon yöntemi ile büyük çok tabakalı veziküller (MLV) büyük tek tabakalı (LUV) veya küçük tek tabakalı (SUV) veziküllere küçültülebilirler.

Çizelge 2.3. Vezikül çeşitleri ve çapları (Kulkarni ve ark., 2018; Shah ve ark.,2020)

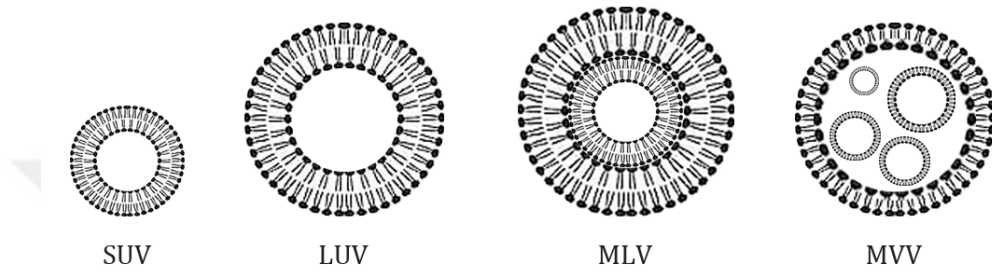
Vezikül Tipi	Vezikül Çapı
<i>Küçük tek lamelli veziküller</i>	<i>(SUV'lar, 20-100 nm),</i>
<i>Büyük tek lamelli veziküller</i>	<i>(LUV'ler> 100 nm),</i>
<i>Multilamellar veziküller</i>	<i>(MLV'ler,> 500 nm),</i>
<i>Dev tek lamelli veziküller</i>	<i>(GUV'ler,> 1000 nm),</i>
<i>Oligolamellar veziküller</i>	<i>(OLV'ler, 100-1000 nm)</i>
<i>Multivesicular lipozomlar</i>	<i>(MVV'ler,> 1000 nm)</i>

2.6.4. Lipozomun Oluşturulması

Çok tabakalı lipozomlar, ilk olarak Bangham tarafından ortaya atılan ince film lipit kurutma yöntemi ve hidrasyon metodu esasına dayanır. İnce lipit tabakası, lipitlerin organik bir çözücünde çözülüp, çözücünün evaporatörde belirli bir basınç altında uçurulması ile elde edilmekte ve elde edilen lipit tabaka, sulu faz ile vorteks veya elle karıştırma ile hidrate edilerek MLV'leri oluşturmaktadır. MLV'ler depolama stabilitesi açısından avantajlı olup, düşük enerji ile yüksek enkapsülasyon verimine sahip lipozomlar oluşturulmaktadır. Bu lipozomlar çok sınırlı bir fonksiyona sahiptirler ve genellikle yaygın olarak gıda ürünlerinde bulunan ticari lesitinden yapırlar (Lasch ve ark., 2003).

Kuru lipit film hidrasyonu ile elde edilen heterojen ve büyük çok tabakalı lipozomların büyüklüğü ve tabakaların özelliklerini değiştirmede, ultrasonikasyon ve yüksek basınç homojenizasyonu gibi yöntemler uygulanmaktadır. MLV'ler gibi düşük enerji ile yüksek enkapsülasyon verimine sahip lipozomlar oluşturulabilmektedir. Ayrıca yapılan bir çalışmadan LUV'ların SUV'lara göre depolama stabilitesinin daha çok olduğu, daha geniş bir sıcaklık aralığında faz dönüşümünü tamamladıkları belirtilmektedir. MLV'lerin ve LUV'ların membran ekstrüzyonu, uç sonikatör veya ultrasonik banyo, diyaliz, yüksek basınç homojenizasyonu ile boyutlarının küçültülmesi sonucu oluşmaktadır. Küçük tek tabakalı lipozomlar yüksek homojeniteye sahip olması ve bundan dolayı

polidispersite indeksi 0'a daha yakın olması sebebiyle, berrak bir çözelti oluşturulabilmektedir (Yaman,2019). Küçük ve büyük tek katmanlı kesecikler ile çok katmanlı ve çoklu kesecikli lipozomların sematik görüntüsü Şekil 2.8'te verilmiştir.



Şekil 2.8. Küçük ve büyük tek katmanlı kesecikler ile çok katmanlı ve çoklu kesecikli lipozomların sematik görüntüsü (Kırtıl ve Öztop, 2014).

2.6.5. Lipozomların Elde Edilme Yöntemleri

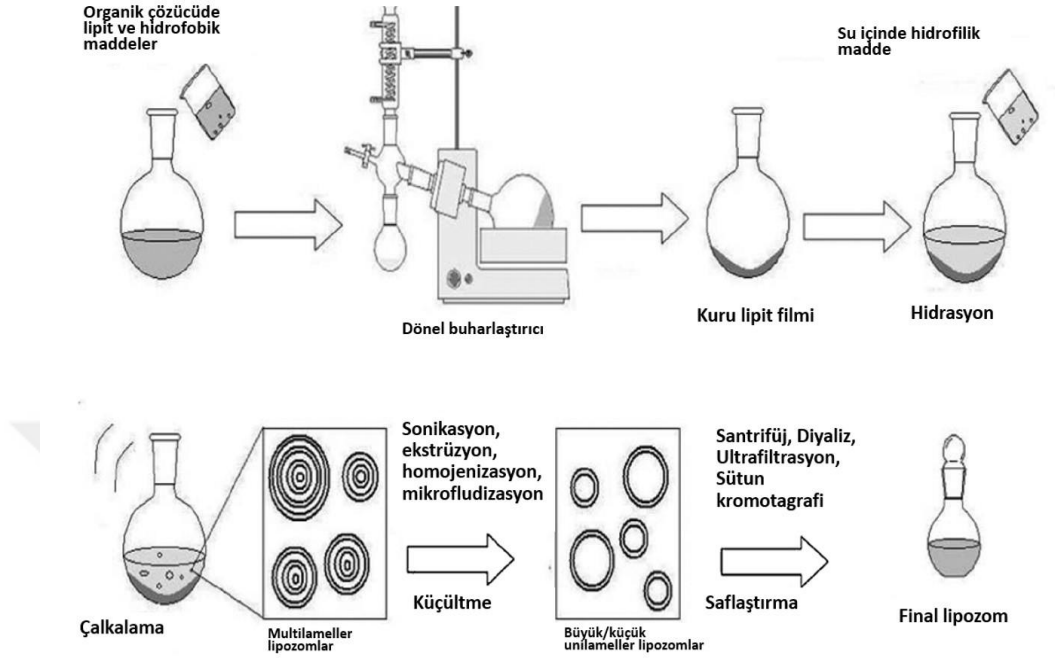
Mekanik metodlara; Yüksek şiddetli ultrasonikasyon, Yüksek basınç homojenizasyonu, Ekstrüzyon homojenizasyonu yöntemleri; Mekanik olmayan metotlara ise; Ters faz buharlaşması, Dondurarak kurutma-Tekrar sulandırma yöntemleri örnek verilebilir (Shishir ve ark., 2019). Lipozomların üretiminde en eski ve yaygın kullanılan yöntem Bangham metodu olarak da bilinen ince film hidrasyonu olup, temelde fosfolipidlerin organik çözgünde çözülerek, sonrasında çözgen ayrıştırılıp kalan ince film tabakasının hidratlanmak suretiyle kendiliğinden lipozom veziküllerinin oluşturulmasına esasına dayanır (Esposto ve ark., 2021).

Temel prensip, MLV'lerin SUV'lara (küçük tek lamelli veziküller) veya LUV'lere (büyük tek lamelli veziküller) dönüştürülmesidir. Lipozom büyüklüğünü azaltmak ve multilameller yapıyı küçültmek için ekstrüzyon, homojenizasyon veya sonikasyon gibi işlemlere ve elde edilen lipozomu saflaştırmak için de santifüj, ultrafiltrasyon veya diyaliz gibi yöntemlere gereksinim vardır (El Asbahani ve ark., 2015). Lipozomların elde edilme yöntemleri Çizelge 2.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. Lipozomların elde edilme yöntemleri (Jesorka ve Orwar, 2008)

MLV		SUV	LUV
İnce film hidrasyon yöntemi	⇒	-Sonikasyon -Ekstrüzyon -Yüksek Basınç Homojenizasyonu -Deterjan diyaliz -Ters evaporasyon -Isıtma yöntemi	-Dondurma-eritme -Dehidrasyon-rehidrasyon -Diyaliz -Ters evaporasyon

İnce film yöntemi, boyutu birkaç mikrometreye kadar olan çok katmanlı veziküller (MLV) oluşturmak için kullanılır. Lipozom bileşimine girecek fosfolipitler ve uçucu yağlar gibi organik çözücülerde (kloroform, metanol) çözündürülür. Organik çözücünün basınç altında dönerek buharlaştırılmasından sonra şişenin dibinde istiflenmiş çift tabakalardan oluşan ince bir fosfolipid film elde edilir. Bu kuru film, MLV'nin kendiliğinden oluşumuna izin veren, çalkalama altında sulu bir faz ile hidratlanır. Ancak bu yöntem, heterojen boyut dağılımı ve katmanlılık ile büyük veziküller verir (Patil ve Jadhav, 2014). Homojen ve küçültülmüş boyutta lipozom süspansiyonu elde etmek için farklı yaklaşımlar kullanılmaktadır. İnce film hidrasyon yöntemi Şekil 2.9.'da gösterilmiştir.



Şekil 2.9. İnce film hidrasyon yöntemi (El Asbahani ve ark., 2015).

Çalışmada; ince film hidrasyon yöntemi ile çok katmanlı veziküller (MLV) oluşturulmuş, sonikasyon yöntemleri ile boyut küçültme işlemleri gerçekleştirilmiş, diyaliz yöntemi ile saflaştırma gerçekleştirilmiştir.

2.6.6. Lipozom Teknolojisinin Gıda Endüstrisinde Uygulama Alanları

Fonksiyonel bileşenlerin lipozomlar içine hapsedilmesinin, kapsüllenen maddenin stabilitesini artırdığı, ortamla etkileşimini ortadan kaldırdığı, böylece normalde bozulmasına neden olacak ortamlarda daha uzun süre aktivitesini koruyabildiğini çalışmalarla kanıtlanmıştır. Lipozomların gıda alanındaki başlıca uygulamaları, gıda bileşenlerini veya katkı maddelerini kapsüllemek, besin bileşenlerinin biyoyararlanımını artırmak, tatların salınımını kontrol etmek ve raf ömrünü uzatmak gibi amaçlarla uygulanmaktadır (Liu ve ark., 2020).

2.6.6.1. Süt Ürünleri

Günümüzde; süt ve süt ürünlerinde enkapsülasyon teknolojisi yaygın çalışılmakta birlikte lipozomla enkapsülasyon teknolojisi uygulamasında da birçok çalışma yapılmıştır. Bu uygulamaların en yaygın amacı, antimikrobiyal peptit aktivitesinin artırılması üzerine olmaktadır. Bakteriyosinler tarafından üretilen çoğu antimikrobiyal peptidler; *Lactobacillus sakei subsp.* (Malheiros, ve ark., 2016), nisin (Laridi ve ark., 2003) ve BLS P34 (bakteriyosin benzeri maddeler P34) (Malheiros, ve ark., 2012b) zayıf stabiliteye sahiptirler ve antimikrobiyallerin gıda bileşimleri ile etkileşimleri nedeniyle gıda matriksindeki antimikrobiyal aktivitelerini kaybetmişlerdir. Antimikrobiyal peptitlerde lipozom kullanımı, stabilitelerini korumak ve raf ömrünü uzatmak için gıda bozulmasını kontrol etmek için yararlı olduğu belirlenmiştir.

Laridi ve ark. (2003), lipozomal çift tabakaya kolesterol ilavesinin, lipozomal membranda kolesterolsüz olana kıyasla, gıda matrislerinde nisin stabilitesini, etkinliğini ve dağılımını, süt fermentasyon sürecini bozmadan artırabildiğini bildirmiştir. Ayrıca, iki veya daha fazla antimikrobiyalın lipozomlara kapsüllenmesinin süt ürünlerinde sinerjik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir.

Pinilla ve ark. (2016), fosfatidilkolin nanolipozomlarında nisin ve sarımsak özünü birlikte kapsüllemeye ince film hidrasyon yöntemini kullanmıştır. Yapılan çalışmada; süütün tamamında, serbest nisin veya sarımsak özü ile karşılaştırıldığında hem serbest hem de lipozomlarla verilen nisin-sarımsak özütü, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis* ve *Listeria monocytogenes* büyümesine karşı 1-4 log CFU/mL farkla sonuçlandığını belirlemişlerdir. Kontrol ile karşılaştırıldığında, bakteri sayısı gram pozitif ve negatif bakteriler nisin ilave edildikten sonra sırasıyla 5-6 log CFU/ mL ve 3-4 log CFU / mL azaldığı görülmüştür.

1980'lerin başında peynirin olgunlaşmasını hızlandırmak ve proteinaz ilavesinden kaynaklanan lezzet kusurlarından kaçınmak için lipozomlar peynir üretiminde uygulanmıştır. (Law ve King, 1985). Peynirdeki en çok kullanılan

lipozom uygulaması, peynirin olgunlaşmasını desteklemek için enzimlerin kapsüllenmesidir. Lipozomlarla kapsüllenmiş enzimle cheddar peyniri olgunlaşması hızlandırılmış ve bunun ekonomiye katkısı, diğer yaygın olarak uygulanan yöntemlere göre yaklaşık 100 kat fazla olmuştur. (Kirby ve ark., 1987) .

Kheadr ve ark., (2003), enzim kokteyllerini, bakteriyel proteaz ve lipaz karışımını yakalamak için aşırı derecede negatif yüklü bir pro-lipozom kullanmıştır. Sonuçlar incelendiğinde; lipozomal enkapsülasyon yöntemiyle; acı, ekşimiş veya doku kusurları oluşturmada nispeten kısa sürede (2-3 ay) yüksek lezzet yoğunluğuna sahip cheddar peyniri üretme olasılığını göstermiştir. Dahası, aşırı derecede negatif yüklü lipozom kullanımı, stabiliteyi artırabileceği ve peynir fermantasyonunu hızlandırabileceği düşünülmektedir.

Yoğurtta; beslenme kalitesini iyileştirmek amacıyla yoğurttaki fenolik maddelerin ve fonksiyonel yağ asitlerinin içeriğini artırmak için; domates meyve özü (El-Said ve ark., 2018) ve balık yağı (Ghorbanzade ve ark.,2017), vişne özü (Akgün ve ark., 2020) içeren bitki ve hayvanlardan ekstrakte edilen fenolik bileşikler ve Omega-3 yağ asitleri lipozomlarda kapsüllemek için uygulanmıştır.

El-Said ve ark., (2018), yoğurdun içeriğine domates özü tozunu (DEP) kapsüllemek için lipozom teknolojisini kullanmışlardır. DEP yüklü lipozomların yoğurttaki fenolik bileşiklerin stabilitesini artırmasına rağmen, eklenen DEP yüklü lipozomların artmasıyla; yapışkanlık ve çiğneme değerlerinin azaldığını bulmuşlardır. Sonunda, yoğurda % 5 DEP yüklü lipozom eklenmesinin, yoğurdun fonksiyonel özelliklerini önemli ölçüde değiştirmeden daha yüksek antioksidan aktivite sağlayabileceği sonucuna varmışlardır.

Marsanasco ve ark., (2016), çalışmasında; C ve E vitamini lipozom yöntemiyle kapsüllemişler ve ardından bunları çikolatalı süte eklemişlerdir. Lipozomal iki tabakalı bir stabilizatör olarak stearik asit veya kalsiyum stearat eklemişlerdir. Stearik asit kaplı lipozom eklenen çikolatalı sütün duyu özellikleri pastörizasyondan sonra değişmediğini ve çikolatalı süte ilave edilmiş kalsiyum stearat kaplı lipozomlara kıyasla daha yüksek kabul edilebilirlik gösterdiğini tespit

etmişlerdir. Sonuçlar, vitaminleri içine alan stearik asit kaplı Çok Katmanlı Veziküller (MLV)'lerin, kabul edilebilir duyuşal özellikleri ve sütlü içeceklerde yüksek oranda C ve E vitamini tutma kabiliyetleri nedeniyle gıda katkı maddeleri olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

2.6.6.2. Et Ürünleri

Bakteriyel kontaminasyon, domuz eti bozulmasının başlıca nedenlerinden biridir. Domuz eti, kirli suyla temas yoluyla veya et işleme sürecinde *Escherichia coli* tarafından kolayca kirlenebilir. Bununla birlikte, antibakteriyel maddeler *E. coli* bakteriyofajlarına kararsızdır. Lin ve ark. (2018), çalışmasında; stabilitesini daha da artırmak için lipozomların yüzeyinde emilen poli-L-lizin ile yeni bakteriyofaj lipozomları elde etmişlerdir. Domuz etinde *E. coli* üzerinde beklenen antibakteriyel etki, domuz etinin kalitesi üzerinde herhangi bir etki olmaksızın poli-L-lizin kaplı bakteriyofaj lipozomları ile muamele edildikten sonra elde edilmiştir.

Domuz etinde hem oksidasyonu hem de bakteriyel kontaminasyonu aynı anda kontrol etmek için Wu ve ark. (2019), domuz eti paketlemek için defne esansiyel yağları ve gümüş nanopartikül yüklü lipozomlar (Lip-LEO-AgNP'ler) hazırlamıştır. Defne esansiyel yağları, hem antimikrobiyal hem de antioksidan özelliklere sahip olması ve lipid çözünürlüğü nedeniyle lipozomun fosfolipid çift tabakasına gömülmüştür. Antimikrobiyal özelliği olan gümüş nanopartikülleri, lipozomun hidrofilik çekirdeğinde hapsedilmiştir. Yapılan analizler sonucu, Lip-LEO-AgNP'lerin umut verici serbest radikal temizleme kapasitesine sahip olduğunu göstermiş ve gram-pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteleri, gram-negatif bakterilere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeninin, gram pozitif bakterilerin ve gram negatif bakterilerin hücre duvarı yapılarının önemli ölçüde farklı olmasından dolayı, bu iki bakteritürünün duyarlılığında fark yaratabileceği üzerinde durulmuştur. (Siripatrawan ve Vitchayakitti, 2016).

2.6.6.3. Diğer Gıda Ürünleri

Lipozom, sulu gıdalar içinde vitaminlerin dağılımı için yararlı bir araç olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmada; C vitamini ve tokoferol yüklü Çok Katmanlı Veziküller (MLV)'lerin hazırlanmış ve portakal suyuna eklenmiştir. MLV'lerin portakal suyunu pastörize ettikten sonra bile güvenilir termal yapısal stabilite gösterdiğini bulmuşlardır. Mandarin suyundaki lipit peroksidasyonu ve mikrobiyal popülasyonların 90 günlük depolama boyunca C vitamini yüklü lipozomlar eklendikten sonra belirgin bir şekilde azaldığını belirlemişlerdir. Lipozomal sistemin; C vitamininin salınımını sürdürmesine olanak sağladığı ve böylece etkili bir şekilde portakal suyunun besin değerini artırarak raf ömrünü uzattığını belirlemişlerdir (Liu ve ark.,2017; Marsanasco ve ark., 2011).

Gültekin-Özgüven ve ark., (2016), çalışmalarında; bitter çikolatanın endüstriyel üretimi sırasında antosiyanin içeriğini yüksek sıcaklık pH'ta muhafaza etmek için, karadut atığı ekstraktını kapsüllemek için kuru kitosan kaplı lipozom ile enkapsülasyon yöntemini çalışmışlardır. Kitosan kaplı lipozomlardaki antosiyanin kaybı, çikolata üretimi sırasında serbest antosiyanin ekstraktına kıyasla daha az olduğunu, lipozomal yüzeydeki anyonik lipozomların ve kitosan modifikasyonunun, antosiyaninlerle güçlendirilmiş çikolatanın in vitro biyo-erişilebilirliğini önemli ölçüde artırdığını bulmuşlardır.

Karanfil yağı, *Staphylococcus aureus*'a karşı olumlu antimikrobiyal aktiviteye sahipken, düşük kimyasal stabilite sergilemektedir. Cui ve ark (2015), çalışmalarında; karanfil yağını kapsüllemek için lipozomları kullanmışlar ve ardından onları tofu haline getirmişlerdir. Kaydedilen veriler 24 saat sonra *S. aureus* popülasyonunun % 99.87 azaldığını göstermiş, bu da karanfil yağının lipozom yöntemiyle enkapsülasyonu *S. aureus* inhibisyonu üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu ve tofunun raf ömrünü uzatabileceğini göstermiştir. Benzer bir uygulama, köftelerde *L. monocytogenes*'e karşı hedeflenen koruyucu için kullanılmıştır (Lin ve ark. 2016).

Betanin, sağlığa yararlı etkileri olan kırmızı bir gıda pigmentidir. Amjadi ve ark. (2018), betanin yüklü nanolipozom içeren sakızlı şekerlerin betanin içeriği ve antioksidan aktivitesinin, serbest betanin içeren numunelerin içerdiğinden iki katı olduğunu belirlemişlerdir. Sakızlı şekerler arasında duyuusal özelliklerde betanin yüklü nanolipozomlar ile serbest betanin içerikli şekerler arasında hiçbir fark olmadığını bulmuşlardır. Nanolipozomlarda negatif yüklü fosfolipidlerle betaninin hidrojen bağına ve elektrostatik adsorpsiyonuna katkıda bulunabileceği sonucuna varmışlardır.

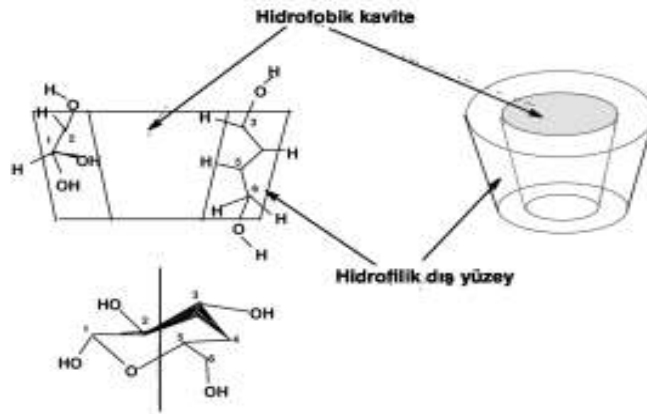
Umagiliyaga ve ark. (2017), yapmış olduğu çalışma sonucunda; gıda kaynaklı hastalıklara neden olan bakteriler (*Escherichia coli* ve *Listeria monocytogenes*) ve meyve çürümmesine neden olan mantarlara (*Botrytis cinerea* ve *Penicillium*) karşı D-Limonen içeren lipozomların antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. D-Limonen içeren lipozom enkapsülasyon yöntemiyle, yaban mersininin raf ömrü ve gıda güvenliğini çerçevesinde değerlendirilmiştir. Çalışmada yaban mersini üzerindeki lipozom kaplamaların 4°C depolamada 9 haftaya kadar mikrobiyel koruma sağladığı görülmüş olup, kontrol grubunda 5 kat daha fazla çürüme gözlenmiştir.

2.7. Siklodekstrinin Yapısı ve Enkapsülasyonda Kullanımı

Siklodekstrinler (CD), nişastanın pek çok mikroorganizma tarafından (örneğin; *Bacillus macerans*) üretilen transglikozilaz enzimi tarafından parçalanması sonucu endüstriyel olarak üretilmektedir (Shao ve ark., 1996). Siklodekstrinler, geometrik olarak 3 boyutlu konik silindir biçimindedir ve Şekil 2.10'da gösterilmiştir. Kavite denen iç kısımları hidrofobik, dış yüzeyleri ise hidrofilik özellik gösterir. Bu yapısal özellikleri nedeni ile çok çeşitli katı, sıvı ve gazlarla konakçı-konuk tipinde inklüzyon kompleksi oluşturarak konuk molekülün fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirmektedirler (Starnes,1990).

C6 karbon atomunun C2 ve C3 hidroksil gruplarına göre rotasyon yapabilmesinden ötürü siklodekstrin boşluğu sona doğru daralmaktadır. Boşluk

boyutu, kompleks oluşturmada hangi siklodekstrinin kullanılacağına ana belirleyicisidir. Bütün hidroksil grupları bu halkanın alt ve üst kısmına yerleşmiş durumdadır ve siklodekstrin moleküllerinin boşluğu sekonder C-H bağları nedeniyle hidrofob karaktere sahiptir (Buschmann ve ark.,1998)



Şekil 2.10. Siklodekstrinlerin üç boyutlu yapıları (Zhang ve ark.,1999)

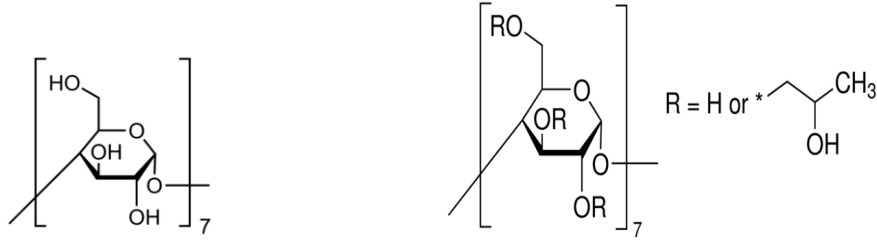
Siklodekstrinlerin ile kompleks oluşumunda çözünürlüğü az olan bileşiklerin sudaki çözünürlüğünü arttırılmakta, gıda bileşenlerinin doğru yerde ve doğru zamanda salınımı sağlanarak gıda üreticileri için maliyet verimliliği iyileştirilebilmektedir. Gıda maddelerinin çevresel faktörlere karşı korunmasıyla birlikte istenmeyen koku ve tatların maskelenmesi ve raf ömürlerinin uzaması sağlanmaktadır (Mourtzinou ve ark., 2008).

Siklodekstrinler, genellikle sırasıyla α -, β - veya γ -siklodekstrinler olarak adlandırılan 6, 7 veya 8 glukopiranoz biriminden oluşan siklik oligosakkaritlerdir. Bu bileşikler, onları doğal kompleks yapıcı maddeler yapan sert halka şekilli yapılara sahiptir (Szejtli, 1998)

β SD'nin suda çözünürlüğü düşük olduğu için üretim sırasında kolayca çöktürülüp ortamdan ayrılmaktadır. Bu nedenle β SD, en ucuz, en çok bulunan ve kullanılan SD'dir (Desai ve Park 2005; Akçakoca ve Atav 2006; Avcı ve Dönmez 2010; Gökmen ve ark 2012).

Doğal siklodekstrinlerin çözünürlüğü çok zayıftır. 1960'ların sonlarında, 2, 3 ve 6 hidroksil bölgelerindeki kimyasal ikamelerin çözünürlüğü büyük ölçüde artıracağı keşfedilmiştir. Kimyasal olarak modifiye edilmiş siklodekstrinlerin çoğu, suda %50 konsantrasyona ulaşabilir. Doğal siklodekstrinler, özellikle β SD'nin sudaki çözünürlüğünün iyileştirilmesi amacıyla, kimyasal olarak çeşitli fonksiyonel gruplarla modifiye edilmişlerdir (Metillenmiş SD'ler, hidroksipropillenmiş SD'ler, sülfobütillenmiş SD'ler). Çalışmada; β SD (beta-siklodekstrin ve HP β SD (2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin) kullanılmıştır ve kimyasal yapıları Şekil 2.11'de gösterilmiştir. SD'lerin kimyasal modifikasyonları ile çözünürlüklerinin artırılmasının yanında ışık ve oksijene dayanıklılığı da arttırılmakta ve enkapsüle edilen molekülün kimyasal aktivitesinin kontrolüne yardımcı olmaktadır (Loftsson, 2010).

Pasta (Paste) kompleksleşmesi: Bu yöntem sulu hamur kompleksleşmesinin bir varyasyonudur. Pasta oluşturmak için, havan kullanılarak (veya büyük ölçekli üretimde yoğurma makinesi kullanılarak) siklodekstrin ile karıştırılmış olan az miktarda su eklenmektedir. Gereken süre misafir molekülün yapısına bağlıdır. Elde edilen kompleks direkt kurutulabilir veya az bir suyla yıkanır ve ardından filtrasyon veya santrifuj işlemine tabi tutulabilir. Pastalar bazen ince toz yerine sert bir kütle oluşturacak şekilde kurumaktadır. Bu durum enkapsüle edilen moleküle ve pastada kullanılan su miktarına bağlıdır. Genellikle bu sert kütleler kurutulur ve kompleksin toz formunu elde etmek için öğütülür (Teixeira ve ark., 2013).



Şekil 2.11. a) β SD (beta-siklodekstrin, b) HP β SD (2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin) kimyasal yapısı

2.7.1. Siklodekstrin İnküzyon Kompleksinin Gıda Endüstrisinde Uygulama Alanları

Siklodekstrin inküzyon kompleksleri elde etmek için farklı teknikler derinlemesine araştırılmış olup; birlikte çöktürme, yoğurma (macun), püskürtmeyle kurutma ve dondurarak kurutma, son yıllarda en çok kullanılan teknikler olmuştur. (Kfoury ve ark, 2016; Zhu ve ark, 2019). Bununla birlikte, bu tekniklerin verimliliği karşılaştırılmış ve sonunda inküzyon oluşumu ve kurutma olan iki aşamalı bir süreç olarak birleştirilmiş ve siklodekstrin verimlilik oranları % 70 ila % 80'e ulaşılmıştır. Siklodekstrin inküzyon kompleksleri elde ederken kullanılan parametrelerin sıcaklık, pH, karıştırma hızı ve süresi, çözücülerin türü ve oranları kurutma adımında süre ve sıcaklık gibi faktörler değerlendirilmiş ve kompleks eldesinde siklodekstrinin yapısının en önemli faktör olduğu belirtilmiştir. (Ho, ve ark, 2017; Lobo ve ark, 2018; Ma ve ark., 2018; Ozdemir ve ark, 2018).

Siklodekstrinlerin konuk bileşiklere sağladığı; koku maskeleyme, suda çözünürlük artışı ve bileşiğin salınım davranışının sürekliliği gibi en çok istenen özellikler ve avantajlarla, siklodekstrin inküzyon kompleksi kullanımı gıda katkı maddesi olarak başlamış ve kullanılmaya devam etmektedir (Fenyvesi, ve ark, 2016; Uekaji ve Terao, 2019).

Son yıllarda; siklodekstrin inküzyon kompleksi farklı gıda maddelerinin kalitesini korumak için yenilebilir filmler elde etmek ve aktif özelliklere sahip

yiyecekleri kaplamak için kullanışlı olduğu belirtilmiştir (Szente ve Fenyvesi, 2018).

Günümüzde; fonksiyonel gıdalarla ilgili olarak, süt ürünleri ve et ürünlerinde bileşen olarak uygulanmıştır. Böylece; yapılan çalışmalarda, peynir, yoğurt ve süte eklenen siklodekstrin inklüzyon kompleksi oluşumu ile kateşinin acılığı maskelenmiştir. β SD-kateşin kompleksinin peynirdeki stabilitesini yükselttiğini ve in vitro sindirim sisteminde yoğurt ve sütte yüksek geri kazanım değerleri elde etmeye izin verdiğini bulmuşlardır (Ho ve ark 2019).

Zhao ve ark. (2019), çalışmalarında; siklodekstrin inklüzyon kompleksini batı tarzı jambon sucuğuna uygulamışlar, toplam bakteri inhibisyonu ve pH kontrolünü 25 °C'de 22 günlük depolama süresince gözlemlemişlerdir. Yuan ve ark (2019), çalışmasında; siklodekstrin inklüzyon kompleksinin soyulmuş bir elmaya uygulanmasıyla filmin gerilme mukavemetini ve termal stabilitesini arttırdığı ve oksidasyonunu, filmsiz elmalardan 3 saat daha fazla engellediği belirlenmiştir.

β SD'nin siklodekstrin inklüzyon kompleksi ile birleştirilmiş filmler, 4 °C'de yaklaşık 4 gün boyunca toplam bakteri sayısı, toplam uçucu bazik nitrojen ve pH açısından soğutulmuş paketlenmiş sığır etinin raf ömrünün uzamasını sağlamıştır. Öte yandan, farklı aktif gıda paketlenme formatları geliştirilmiştir. Örneğin B-siklodekstrin-bitki özütü kompleksleri karışımını içeren bir emülsiyonla kaplı bir karton kutu, domateslerin raf ömrünü (mikrobiyal ve fizikokimyasal parametrelerle ölçülen) 20 ila 24 gün arasında, (Buendía ve ark., 2019), taze biberleri ise 8°C'de 18 güne kadar raf ömrünü artırmak için tasarlanmıştır. (Buendía ve ark., 2020).

Yang ve ark (2019), leylak uçucu yağını siklodekstrin inklüzyon kompleksi oluşturmuş; dokuma olmayan bir poşet çantaya dahil ederek, şeftalide; mantar gelişiminin inhibe ettiğini ve fizikokimyasal kalitenin korunduğunu gözlemlemişlerdir. Da Rocha ve ark (2019), yapmış oldukları çalışmada ise; yıldız anason uçucu yağlarını siklodekstrin inklüzyon kompleksi oluşturarak plastic tepsi

tabanına yerleştirmişlerdir, 23°C'de 12 günden sonra *P. expansum* gelişimini engellenmesi sağlanmış elmanın raf ömrünü uzatan bir paket geliştirilmiştir.

Bhandari ve ark. (1998), çöktürme yöntemine göre uygulanan siklodekstrin ile enkapsülasyon yönteminde; 5 farklı limon yağı- betasiklodekstrin oranının inklüzyon verimine etkisini incelemiştir. Limon yağı:β-siklodekstrin kapsülasyonunda 6:94 oranında çalışıldığında maksimum değere ulaşılmış olduğu belirlenmiştir. Başka bir çalışmada 10 farklı limon yağı aroması farklı yoğurma sürelerinde (1, 2, 5, 10, 15, 20 ve 30 dakika) betasiklodekstrin ile enkapsüle edilmiş ve verimi incelenmiştir. Optimum yoğurma süresinin 15 dakika olduğu görülmüştür (Bhandari ve ark., 1999).

Özgün (2015), nane uçucu yağının siklodekstrinler ile mikroenkapsülasyonu konulu çalışmada; kaplama materyali olarak (HPβSD) kullanmış olup, yoğurma tekniği (Yağ ve kaplama materyali havan tokmağı ile 50 dakika boyunca yoğrulma işlemi) ile inklüzyon kompleksi elde edilmiştir. Mikrokapsüllerin bozulmaya başladığı sıcaklığın, nane uçucu yağı ve mentol standardının bozulmaya başladığı sıcaklıktan daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum HPβSD kavitesinde uçucu yağın korunduğunu kanıtlamaktadır. Yoğurma tekniğinin maliyeti düşük olan fiziksel bir yöntem olduğu, nane uçucu yağının yoğurma yöntemi ile başarılı bir şekilde enkapsüle edilebildiği görülmüştür.

Yapılan çalışmalarla; siklodekstrinlerin toksik olmayan özelliği ve ambalaj materyallerine kattığı artı özellikleri nedeniyle gıda ürünleriyle doğrudan temas konusunda sıkıntı oluşturmayacağından paketleme uygulamalarında rahatlıkla kullanılabilirliği konusu ön plana çıkarılmıştır.



3.MATERYAL VE METOT

3. 1. Materyal

Çalışmada kullanılan hutupak kâğıt örnekleri; Ünal Kâğıt Ve Plastik Ambalaj San. Tic. Ltd. Şti./ADANA firmasından, filtre kâğıt örnekleri Isotherm (80 g/m²) bölüm laboratuvarından temin edilmiştir. Hammaddeler; soya lesitini (Rotel Türkiye), β SD(Beta siklodekstrin) HP β SD (2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin), D-Limonen Sigma–Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan siklodekstrinlerin özellikleri Çizelge 3.1’de verilmiştir. Kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta kullanılmış olup, diasetilen, diklorometan, sodyum asetat trihidrat, Mueller Hinton Agar, diyaliz membran (Biotech grade cellulose ester dialysis membrane (MWCO 3500-5000 Dalton) Sigma–Aldrich (Almanya) veya Merck-Darmstadt (Almanya) firmalarından satın alınmıştır

Çalışmada; Potato Dekstroz Agar (TSA, MERCK No: 1.05458), Difco YM Broth (MHB, MERCK No: 1.10293.0500), Dilüsyon Sıvısı (Sodium Chloride), D-Limonen konsantrasyonlarının ayarlanmasında %10’luk Dimetil sülfoksit (DMSO) ve Tween20 çözeltisi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan; *Penicillium expansum* DSM62841 ve *Penicillium digitatum* DSM2750 küfleri Çukurova Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı stok kültüründen temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan siklodekstrinlerin özellikleri

	<i>HPβSD (2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin)</i>	<i>βSD (beta-siklodekstrin)</i>
<i>CAS- Number</i>	128446-35-5	7585-39-9
<i>EC- Number</i>	420-920-1	231-493-2
<i>Molekül ağırlığı(Da)</i>	1396	1134.99
<i>Sudaki çözünürlük %</i>	100%	1.5%
<i>Safılık</i>	≥98%	≥97 *

3. 2. Metod

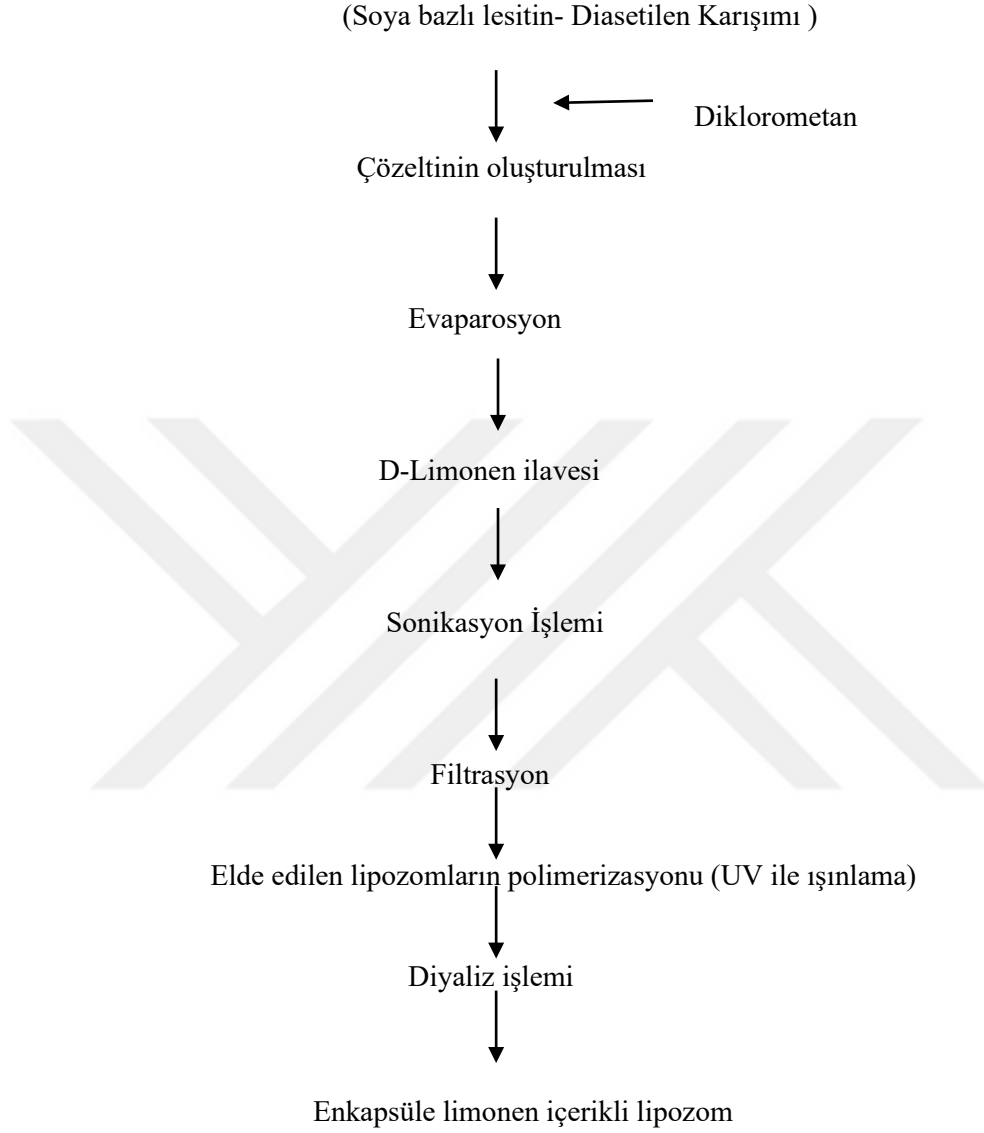
Çalışma; iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada; D-Limonen, farklı tekniklerle (lipozom yöntemi ve siklodekstrin inklüzyon kompleksi oluşturularak) enkapsüle edilmiştir. Kullanılan enkapsülayon yöntemlerinin verimliliği belirlenmiş ve literatür ile karşılaştırılmıştır. İkinci aşamada ise; üretilen enkapsüllerin %25’lik çözeltileri hazırlanmış, hutupak ve filtre kağıtlar ile birleştirilmiştir. Bu aşamada daldırma yöntemi uygulanmıştır. Örnekler test öncesinde 25°C’de, %50±3 bağıl nem ortamında 48 saat süresince şartlandırılmıştır. Diğer analizler yapılmadan önce; kâğıt örneklerinin kaplamadan dolayı fiziksel özelliklerindeki değişim analizlerle germe testi ve renk analizi yapılarak belirlenmiştir.

Üretilen aktif özellikli kağıtlardaki D-Limonen içeriği belirlenmiş ve zamana bağlı kağıtta kalan limonen içeriği kağıttan salınımı ve antifungal özelliklerindeki değişim tespit edilmiştir. Üretimler ve analizler; Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Laboratuvarları’nda ve Merkezi Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

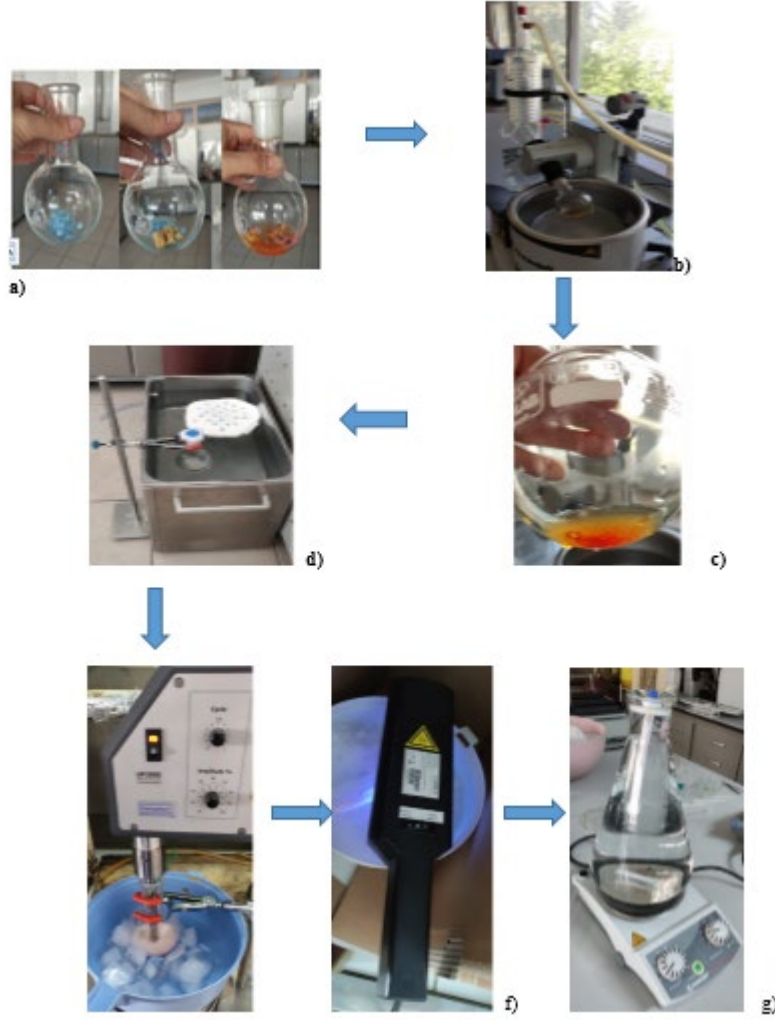
3.2.1. D-Limonenin enkapsülasyonu**3.2.1.1. Lipozom Yöntemi ile Enkapsülasyon Oluşturulması**

Lipozom yöntemi ile enkapsülasyon Dhital ve ark. (2018), tarafından belirtilen yöntem (ince film hidrasyon yöntemi) göre yapılmıştır. 2 g soya bazlı lesitin ve 0.5 g diasetilen (PDA; 10,12-Pentacosadiynoic asit balon cam şişede diklorometan içerisinde çözündürülmüştür.

Çözelti daha sonra çözücüyü buharlaştırmak ve iki tabakalı film oluşumunu desteklemek için 1 saat boyunca döner buharlaşmaya tabi tutulmuştur. Elde edilen film, bir vakum pompasına yerleştirilerek gece boyunca kurutulmuştur. Hazırlanan 50 µM (d:0,842 g/mL M:136.23 g/mol) D-Limonen ilavesi ve 20 mL su ilavesi ile film hidrasyonu gerçekleştirilmiştir. Ortaya çıkan çözelti daha sonra 20 dakika sonikasyona bırakılmıştır. Ardından çözelti sıcaklığı her dakika kontrol edilerek 15 dakika sonda (prop) sonikatörüne yerleştirilmiştir. (Hielscher UP200S model). Çözelti 0,45 µm mikrofiltreden filtre edilmiştir. Elde edilen lipozom solüsyonu 8 saat boyunca 4°C'de ışıktan uzakta tutulmuş ve süre sonunda 4°C'de, 254 nm'de UV ışığa (UVGL-58, Minerallight, Upland, CA) maruz bırakılarak polimerize edilmiştir. Polimerize lipozom çözeltisi, 48 saat boyunca her 4 saatte bir su değiştirilerek diyaliz (MWCO: 100.000) edilmiştir. Bu şekilde elde edilen lipozom çözeltisi toplanarak çalışmalar için 4°C'de saklanmıştır. Lipozom yöntemi ile üretilen enkapsülasyonları üretim akış şeması Şekil 3.1'de üretim akış görseli ise Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.



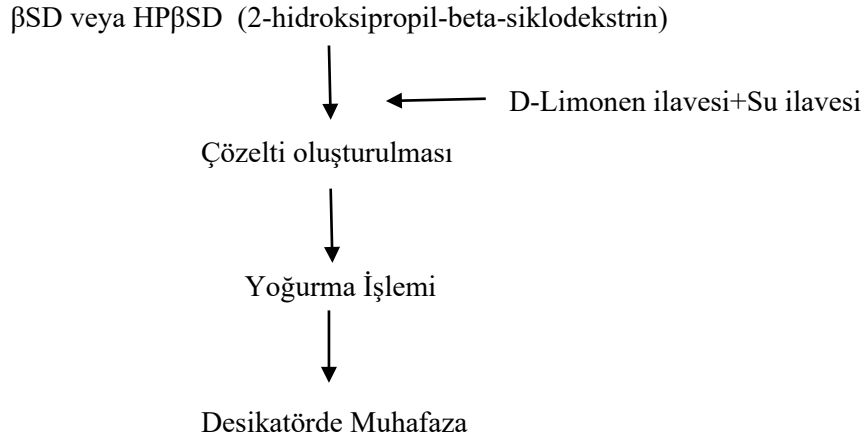
Şekil 3.1. Lipozom üretim akış şeması



Şekil 3.2. Lipozom üretim akışı- a) Soya bazlı lesitin- Diasetilen Karışımına diklorametan eklenmesi ve çözeltinin oluşturulması b) Evaporasyon c) İnce bir film haline gelmesi d-e) Sonikasyon İşlemi f) Elde edilen lipozomların polimerizasyonu (UV ile ışınlama) g) Diyaliz işlemi

3.2.1.2. Yoğurma Yöntemiyle Siklodekstrin İnküzyon Kompleksi Oluşturulması

Siklodekstrin ile enkapsülasyon yönteminde de; Bhandari ve ark., (1999), tarafından önerilen Yoğurma Yöntemi (Pasta Kompleksleşmesi) metoduyla siklodekstrin inküzyon kompleksi üretilmiştir. Bhandari ve ark., (1998), yapmış olduğu bir önceki çalışmada belirlemiş olduğu optimum oran (β -siklodekstrin-limon yağı) kullanılmıştır. D-Limonen, β SD veya HP β SD ile iki farklı inküzyon kompleksi olacak şekilde enkapsüle edilmiştir. Çalışmada; ağırlıkça %55 SD tartılmış sonra %7 limonen, %38 su ilave edilerek yoğurma işlemi için havana alınmıştır. Çalışmada; optimum karıştırma süresi 15 dk olarak belirlenmiştir. Elde edilen yoğun kıvamlı D-limonen- HP β SD veya D-limonen β SD inküzyon kompleksi vakumlu desikatöre alınmıştır. 48 saat sonra tamamen kuruyan ve sabit tartıma gelen partiküller tartıldıktan sonra 500 mikron elekten geçirilerek sızdırmaz kahverengi bir şişeye alınarak desikatörde muhafaza edilmiştir. Siklodekstrin yöntemi ile yapılan enkapsülasyon üretim akış şeması ve elde edilen enkapsüllerin görüntüsü sırasıyla Şekil 3.3'te ve Şekil 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.3. Siklodekstrin üretim akış şeması



Şekil 3.4. Toz forma getirilmiş siklodekstrin inklüzyon kompleksi

3.2.2. Enkapsülasyon Etkinliği Analizi

3.2.2.1 Siklodekstrin Üretimi Enkapsülasyon Etkinliği Analizi

Üretimini gerçekleştirdiğimiz limonen içerikli siklodekstrin kapsüllerin enkapsülasyon etkinliğini (EE) hesaplayabilmek için öncelikle mikrokapsüllerin toplam yağ içeriği(limonen içeriği) ve yüzey yağ(limonen içeriği) içerikleri bulunmuş ve aşağıdaki eşitliklerden yararlanılarak EE etkinliği ve yüzde yükleme kapasitesi değerleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Enkapsülasyon etkinliği} = \frac{\text{Toplam D – limonen içeriği} - \text{Yüzey D – limonen içeriği}}{\text{Toplam D – limonen içeriği}} * 100$$

$$\% \text{ Yükleme Kapasitesi} = \frac{\text{Enkapsüle edilmiş D – Limonen miktarı}}{\text{Başlangıçta eklenen D – limonen içeriği}} * 100$$

Kapsüllerdeki toplam limonen içeriğinin belirlenmesinde Barros Fernandes ve ark., (2016) tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. D-Limonen içerikli siklodekstrin kompleksi 0.5 g deney tüpüne tartılmış üzerine 45 °C’da 10 mL damıtık su ilave edilmiştir. Mikrokapsüller suda tamamen çözülünceye kadar vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Daha sonra örnekler ultrasonik banyoda 2 dk. boyunca sonikasyon işlemi uygulanmıştır (20 kHz, 160 W). Ardından mikrokapsül-su karışımı 50 mL’lik falkon tüpüne alınmış ve üzerine

10 mL hekzan ilave edilmiştir. Tüpler 1 dk. boyunca vortekste karıştırılmış ve 45 °C'da 150 rpm hızda 30 dk. boyunca çalkalamalı su banyosunda bekletilmiştir. 30 dk. sonra örnekler su banyosundan alınıp oda sıcaklığına soğutultu ve daha sonra 4 °C'de 6000 rpm hızda 5 dk. santrifüj (Hettich, Universal 320, Almanya) edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra üstteki hekzan fazı alınıp gerekli seyreltmeler yapılarak GC'ye enjekte edilmiş ve limonene ait kalibrasyon eğrisi kullanılarak miktarı hesaplanmıştır.

Gaz kromatografisi koşulları

Limonen miktarı alev iyonlaşma dedektörlü "Agilent 6890N" marka GC de CP-Wax 57CB (Varian) marka kapılar kolon (uzunluk 60 m, iç çap: 0.25 mm, film kalınlığı: 0.4 pm) ile gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı, 40°C'de 4 dakika beklemeden sonra dakikada 4°C artarak 102°C'ye ye daha sonra dakikada 2°C artarak 112 ve son olarak dakikada 15 °C artarak 200°C'ye çıkacak sıcaklıkta 5 dakika sabit kalacak şekilde programlanmıştır. Taşıyıcı faz olarak helyum (1.3 mL/dk akış hızı) kullanılmıştır.

Mikrokapsüllerin yüzey yağ içeriğinin belirlenmesi için Penbunditkul ve ark., (2012), tarafından kullanılan yöntem modifiye edilmiştir. 0.5 g mikrokapsül deney tüpüne tartılıp, üzerine 5 mL hekzan ilave edilip 3 dk. boyunca vorteks yardımıyla yaklaşık 2000 rpm hızda karıştırılmıştır. Karışım daha sonra filtre kağıdından (Whatman 40) süzölmüş, kalan kısım 10 mL hekzan ile yıkanmış ve GC'ye enjekte edilmiştir.

3.2.2.2. Lipozom Üretimi Enkapsülasyon Etkinliği Analizi

Limonen içerikli lipozom kapsüllerin enkapsülasyon etkinliğini (EE) hesaplayabilmek için öncelikle mikrokapsüllerin toplam yağ içeriği ve yüzey yağ içerikleri bulunup ve aynı eşitlikten yararlanılarak EE hesaplanmıştır.

Yüzey yağ içeriğinin belirlenmesinde Cui ve ark., (2015) tarafından geliştirilen yöntemler modifiye edilerek uygulanmıştır. Limonen içerikli lipozom çözeltisi 14000 rpm hızda 1 saat santrifüj (Hettich, Universal 320, Almanya)

edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra üstteki supernatant 4 mL hekzan ile çözülerek ve vorteklenmiştir. Santrifüjlendikten sonra, 45 µm filtreden geçirilerek GC'ye enjekte edilmiştir.

Kapsüllenmiş D-Limonen miktarını belirlemek için, süpernatant alındıktan sonra santrifüj tüplerinin altında kalan kısma etanol ileve edilmiş ve ultrasonik banyoda 3 saat 40 °C de bekletilmiştir. Daha sonra süspansiyon 15 dk 6000 rpm 'de santrifüjlendi ve mikrofiltreden geçirildikten sonra GC'ye enjekte edilmiştir.

3.2.3. D-Limonenin Daldırma Yöntemi ile Kağıtlarla Birleştirilmesi

Enkapsule edilmemiş D-Limonenin kağıtla birleştirilmesinde kullanılacak konsantrasyon değerini belirlemek için ön çalışma yapılmıştır. Bunun için limonen etil alkolde seyreltilmiş (%100, %75 ve %50'lik limonen konsantrasyonları hazırlanmış), ve kağıtlar limonen çözeltilerine daldırılmış, kağıtlarda kalan limonen miktarı ve kağıtların mikrobiyolojik olarak etkinliği incelenmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda %75 konsantrasyonda hazırlanan limonen kaplı kâğıtlarda en iyi etkinlik gözlenmiştir. Yalın halde (herhangi bir materyalle kaplanmamış olarak) temin edilen hutpak kağıtları ve filtre kağıtları yuvarlak delgeç ile 25 mm çapında daireler halinde kesilmiş ve bu daireler

a) %75'lik limonen çözeltisi

b) lipozom çözeltisi,

c) %25'lik (HPβSD) ve

d) %25'lik βSD inklüzyon kompleksi çözeltileri ile dört farklı örnek olacak şekilde daldırma yöntemine göre kaplanmıştır.

Kullanılan tüm araç gereçler otoklovda sterilize edilmiştir. Filtre kağıtları 5 dakika, hutpak kağıtlar ise hassas yapısından dolayı 3 dakika çalkalayıcı da tutularak homojen bir kaplama yapılmaya çalışılmış ve kağıt örnekleri steril kabin içerisinde 3 saat kurutulmuştur. Daha sonra; kâğıt örnekleri 4°C ve 25°C'de depolanarak analiz yapılncaya kadar bekletilmiştir. Hutpak ve filtre kağıtların çözeltilerle birleştirilme ve kurutulma işlemleri Şekil 3.5'te gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Hutpak ve filtre kağıtların çözeltilerle birleştirilmesi ve kurutulması

3.2.4. Kağıtlarda Yapılan Fiziksel Analizler

3.2.4.1. Germe Testi

Kağıdın mekanik özelliklerindeki değişim germe testi yapılarak ölçülmüştür. Mekanik özellikler için kaplanmamış olarak temin edilen hutpak kâğıtları ve filtre kâğıtları 8*2,5 cm olacak şekilde dikdörtgen şekilde kesilerek kaplama çözeltileri ile birleştirilmiştir.

Örnekler test öncesinde 25°C 'de, %50±3 bağıl nem ortamında 48 saat süresince şartlandırılmış ve hazırlanan kâğıt örneklerin kalınlıkları 5 farklı noktadan mikrometre (Fowler, Boston, ABD) kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümlerin ortalaması alınarak kâğıtların ortalama kalınlığı hesaplanmıştır. Hazırlanan örnekler Şekil 3.6.'da gösterilmiştir. Başlangıç uzunluğu 80 mm örnekler, çekme hızı 1mm/s olarak ayarlanarak kopana kadar gerdirilmiştir. Gerilme mukavemeti (GM) ve % uzama miktarı (%UM), ASTM standart metot D 882-91 'e göre tekstür analiz cihazı (TA-Xt plus, Stable Micro Systems, Surrey, İngiltere) kullanılarak belirlenmiştir (Cho ve ark., 2002).



Şekil 3.6. Germe testi için kullanılan kağıt örnekleri

3.2.4.2. Renk Analizi

Kağıtların renk değerleri beyaz kalibrasyon plakasının üzerine yerleştirilen kağıtlarda renk ölçüm cihazı (Minolta CR 400, Osaka, Japonya) ve CIA-Lab renk skalası kullanılarak yapılmıştır. Ölçümlerden önce cihaz $L=96.86$, $a=-0.07$ ve $b=1.98$ değerlerine sahip beyaz kalibrasyon plakası ile kalibre edilmiştir. Kaplama yapılmayan kağıt örneklerine göre toplam renk farkı (ΔE) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Kim ve ark, 2002).

$$\Delta E = [(L^*_{\text{kontrol}} - L^*_{\text{örnek}})^2 + (a^*_{\text{kontrol}} - a^*_{\text{örnek}})^2 + (b^*_{\text{kontrol}} - b^*_{\text{örnek}})^2]^{0.5}$$

Formüldeki “ L^*_{kontrol} , a^*_{kontrol} ve b^*_{kontrol} ” simgeleri hiç bir işlem uygulanmamış hutupak ve filtre kâğıtlarının L^* , a^* , b^* değerleri ve “ $L^*_{\text{örnek}}$, $a^*_{\text{örnek}}$ ve $b^*_{\text{örnek}}$ ” simgeleri ise kaplama yapılmış kağıt örneklerinin L^* , a^* , ve b^* değerlerini göstermektedir.

3.2.4.3. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spektroskopisi Analizi

Kağıtların yapısal bağ özelliklerinin belirlenmesi amacıyla FTIR-ATR spektrofotometresi (Jasco FT/IR-6800) ile çalışılmıştır. Örneklerin spektrumları $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ arasındaki dalgaboyunda ve 4 cm^{-1} çözünürlükte kaydedilmiştir.

Ölçüm sırasında örnekler arasındaki geçişlerde kristal yüzey etanol kullanılarak temizlenmiştir.

3.2.5. Kağıt Örneklerinde Depolama Süresince Yapılmış Analizler

Aktif özellikteki materyallerin etkinliğini zamanla koruması oldukça önemlidir. Bunun için kaplanmış kağıtların zamana bağlı olarak içerdiği D-limonen miktarı ve antifungal özelliklerindeki değişim aşağıda verilen analizler uygulanarak belirlenmiştir.

3.2.5.1. Kağıt Örneklerinde kalan D-Limonen Miktarının Belirlenmesi.

Limonen içeren kağıtların depolama sıcaklığına bağlı olarak içerdikleri limonen miktarındaki değişimi belirlemek için kağıt örnekleri 4 °C ve 25 °C’de bekletilmiş ve depolamanın 1. 3. 5. 7. 15. ve 30. günlerde kağıtta kalan limonen miktarları belirlenmiştir.

25 mm çapında daire şeklinde kesilen kağıt örneklerinden 2 adet alınmış ve teflon tüp içerine yerleştirilmiştir. Kağıt örnklerinin üzerine bir miktar su ilave edildikten sonra iyice karıştırılmış ve ultrasonik banyoda 10 dk. bekletilmiştir. Daha sonra tüp içerisine 2 mL hekzan ilave edilip tüpler parafilm ile sıkıca kapatılmış ve karıştırılmıştır. Tüm limonenin hekzan fazında toplanması için tüpler 45 °C’da 150 rpm hızda 30 dk. çalkalamalı su banyosunda (Memmert SV 1422) bekletilmiştir. Ardından oda sıcaklığına soğutulan tüpler, 4 °C’de 6000 rpm hızda 10 dk. santrifüj (Hettich, Universal 320, Almanya) edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra üstteki hekzan fazı filtre edilip GC’ye enjekte edilmiştir.

3.2.5.2. Limonenin Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Değerinin Belirlenmesi

D-Limonenin *Penicillium expansum* DSM62841 ve *Penicillum digitatum* DSM 2750’a karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu belirlemek için; sıvı besiyeri Makrodilasyon Testi Uygulaması yapılmıştır. Limonen çözeltisinin

hazırlanmasında; 4 mL DMSO-0.35 mL Tween 20 ve 4 mL limonen 100 mL'ye saf su ile tamamlandı ve limonenin homojen çözünmesi sağlanmıştır.

Difco YM Broth besiyerinde aktif maddenin 2 katlı dilusyonları yapılarak gittikçe azalan yoğunlukta olmak üzere limonen içeren dilusyonlar elde edilmiştir. Üzerine Thomo lamında sayılan *P. expansum* veya *P. digitatum* küflerinden 10^6 spor/mL olacak şekilde her tüpe eşit miktarda küf sporu inoküle edilmiştir. Bu tüpler 25°C'de inkübe edilmiştir. Tüplerdeki gelişme, 5 ve 6. günlerde bulanıklık olarak değerlendirilmiş, gelişmenin olmadığı son tüp MİK değeri olarak kabul edilmiştir.

3.2.5.3. Kâğıtların Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi

Limonenin belirlenmiş enkapsüle formları oluşturulup kâğıtlarla etkin birleştirme sağlandıktan sonra 25 °C ve 4 °C depolanmış kâğıtların; 1. 3. 5. 15. 30. günlerinde *Penicillium expansum* ve *Penicillium digitatum*'a karşı antifungal etkisi Akbaş (2017), tarafından belirtilen disk difüzyon yöntemine göre yapmıştır. Çalışmada; Potate Dextroz Agar kullanılmıştır. *P.expansum* ve *P.digitatum* küfleri seyreltme işlemi yapılarak ve Thomo lamında sayılak 10^6 spor/mL olacak şekilde petri kaplarına aktararak homojen şekilde öze ile yayılmıştır. Daha sonra petri kaplarının tam merkezine 25 mm çapında kesilmiş limonen içeren ve içermeyen kâğıt örnekleri, ekim yapılmış petrilere aseptik koşullarda yerleştirilmiştir. Daha sonra bu petrilere 25 ± 2 °C' de bekletilmiş ve sonrasında “engellenmiş bölge” çapı kumpas ve görüntü işleme tekniği ile ölçülmüştür.

3.2.6. İstatistiksel analiz

Elde edilen tüm sonuçlar ortalama olarak verilmiş ve SPSS Versiyon 20.0 (SPSS Inc., USA) istatistik paketiyle değerlendirilmiştir. Sonuçlar arasındaki farklar varyans analiziyle % 95 güven aralığında değerlendirilmiştir. Ayrıca mikrobiyolojik analizlerde petrilere “Image J” yazılımı kullanılarak morfolojik parametrelerin hesaplama yöntemi ilede oluşan boşluklar hesaplanmıştır.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada; D-Limonenin mikroorganizmalara karşı Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu bulunmuştur. Limonen, lipozom yöntemi ve siklodekstrin inklüzyon kompleksi oluşturularak enkapsüle edilmiştir. Lipozom yönteminde soya lesitini kullanılarak ince film hidrasyon yöntemi uygulanmış olup siklodekstrinler ile enkapsülasyonda ise; β -siklodekstrin (β SD) ve 2-hidroksipropil- β -siklodekstrin (HP β SD) kullanılarak yoğurma yöntemi ile inklüzyon kompleksi oluşturulmuştur. Elde edilen mikrokapsüllerin enkapsülasyon etkinlikleri ölçülmüştür. Daha sonra elde edilen kapsüller hutupak kağıt ve filtre kağıda emdirilerek, kağıdın fiziksel analizleri kağıtta kalan limonen miktarı ve kağıtların antifungal özellikleri belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen bulgular aşağıda verilmiş ve literatürdeki verilerle karşılaştırılarak tartışılmıştır.

Yapılan ön denemelerde;

β SD ve HP β SD inklüzyon komplekslerinin %8'lik sulu ve etanollü çözeltileri hazırlanmış elde edilen çözeltilerle kaplanan hutupak ve filtre kağıtları ile mikrobiyolojik aktivite analizi çalışılmış ancak herhangi bir antimikrobiyal aktivite gözlenmemiştir.

β SD ve HP β SD inklüzyon komplekslerinin %25'lik sulu ve etanollü çözeltileri hazırlanmış elde edilen çözeltilerle kaplanan hutupak ve filtre kağıtları ile mikrobiyolojik aktivite analizi çalışılmış, su ile hazırlanan çözeltilerle birleştirilen kağıtlarda antimikrobiyal aktivite gözlenmiştir. Çalışmaya kapsüllerin sulu çözeltileriyle hazırlanan hutupak ve filtre kağıtlarıyla devam edilmeye karar verilmiştir.

- Serbest haldeki limonenin kağıtlarla birleştirilmesinde kullanılacak konsantrasyon değerini belirlemek için; %100, %75, %50'lik limonen konsantrasyonu olacak şekilde etil alkol ile çözeltisi hazırlanmış, %75

konsantrasyonda hazırlanan limonen kaplı kağıtlarda mikrobiyolojik olarak en az gelişme gözlenmiştir.

- Lipozom üretiminde; üretim standardizasyonu sağlayabilmek için denemeler gerçekleştirilmiştir.
1. Özellikle ince film oluşumunda uygulanan vakum işleminin süresi ve gücü standardize edilmiştir.
 2. Prob sonikatörde; güç %60-80 uygulandığında lipozom solüsyonunda topaklanma görülmüştür ve solüsyon filtreden geçerken problem oluşmuştur. Aynı zamanda çözelti sonikasyondan sonra bir süre bekletildiğinde mikrofiltrede tıkanma oluştuğundan az miktarda çözelti geçebilmiştir. O yüzden prob sonikasyonda %100 güçte çalışılmış, ısınmaya karşı solüsyon sıcaklığı kontrol altına alınmış ve solüsyon soğumadan, sonikasyon işlemi biter bitmez mikrofiltreden geçirilmesi gerektiği gözlenmiştir.

4.1. Limonenin MİK Bulguları

Uçucu yağların antimikrobiyal etkileri yıllar boyunca çok sayıda mikroorganizmaya karşı çalışılmış, uçucu yağların veya bileşiminde bulunan kimyasal bileşiklerin etkilerini açıklamak için çeşitli mekanizmalar bildirilmiştir. Uçucu yağların ana etki şekli; gram pozitif ve gram negatif bakterilerin membran bütünlüğünün bozulmasına neden olmalarından kaynaklanmaktadır (Calsamiglia ve ark., 2007).

Uçucu yağlar lipofilik özelliklerinden dolayı hücre duvarı ve hücre zarından kolaylıkla geçebilmektedir. Uçucu yağların ve bileşenlerinin polisakkaritler, yağ asitleri ve fosfolipitler ile etkileşimleri, bakteriyel membranları daha geçirgen hale getirir, böylece iyonların ve hücre içi içeriğin kaybı hücre ölümüne yol açar. Uçucu yağların ve bileşenlerinin önemli bir özelliği hidrofobik yapıya sahip olmalarıdır. Bu özellikleri uçucu yağların bakteri hücre zarını ve

mitokondri lipitlerini ayırmasına izin vermesidir. Bu süreç bakteri hücresinin daha geçirgen olmasına neden olmaktadır (Burt, 2004; Saad ve ark., 2013).

Bununla birlikte; uçucu yağların fenolik yapısı da bakterilerin hücre zarını bozarak hücrenin fonksiyonel özelliklerini inhibe eder ve sonunda hücrenin içindeki içeriklerinin sızmasına neden olur. Etki mekanizmaları, fenolik bileşiklerin mikrobiyal hücre zarı geçirgenliğini değiştirebilme, sitoplazmik zarlara zarar verme, hücresel enerji (ATP) üretim sistemine müdahale etme ve proton pompası aktivite gücünü bozma kabiliyeti ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Diğer önemli etki mekanizmaları, sitoplazmik proteinlerin yapısının bozulması ve bakteriyel hücre ölümüne yol açan hücresel enzimlerin inaktivasyonunu içerir. (Bajpai ve ark., 2012).

Çalışmada ilk olarak; narenciye ve diğer meyvelerde depo çürüklüklerine neden olan *Penicillium expansum* ve *Penicillium digitatum* küfleri için kullanılan limonenin minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) belirlenmiştir ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir. Yapılan çalışmada negatif kontrol tüplerinde (küf eklenmemiş) herhangi bir üreme gözlenmemiştir. Pozitif kontrol (küf eklenmiş) olarak her küf için ayrı ayrı çalışılan test tüplerinin hepsinde üreme gözlenmiştir. D-Limonenin MİK değeri her iki küf türü içinde (*P. expansum* ve *P. digitatum*) 842 µg/mL olarak belirlenmiştir. Çalışılan daha düşük konsantrasyonlarda üreme inhibe edici etki gösteremediği saptanmıştır.

Çizelge 4.1. D-Limonenin test edilen küfler üzerindeki MİK sonuçları

D-Limonen Konsantrasyon Miktarı(µg/mL)	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol	Mikroorganizma Adı	
			<i>Penicillium Expansum</i>	<i>Penicillium Digitatum</i>
3370	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO
1685	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO
842	ÜG	ÜO	ÜO	ÜO
421	ÜG	ÜO	ÜG	ÜG
210	ÜG	ÜO	ÜG	ÜG

UG: Üreme görüldü; UO: Üreme olmadı.

Limonenin farklı maya suşları üzerine etkisinin incelendiği bir araştırmada (Uçan ve ark.,2008), limonenin denenen tüm maya suşlarında etkili olduğu, MİK değerlerinin ise maya türüne bağlı olarak 500-4000 µg/mL arasında değiştiği, en dirençli maya suşunun *R.glutinis* (4000 µg/mL); en hassas maya suşlarının ise *C.bolmii*, *P. Subpelliculose* NCYC 436, *K. apiculata*, *Maurivin*, *Lalvin*, *Fermirouge* (500 µg/mL) olduğu bildirilmiştir.

Dabbah ve ark.,(1970), D-limonenin inhibitör etkisinin portakal, limon, greyfurt ve mandalina meyvelerinden elde edilen uçucu yağlar ile karşılaştırmak üzere yapmış olduğu çalışmada; D-Limonen, (1 µL/mL) konsantrasyonda; *Salmonella senftenberg*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas* türlerinin büyümesini inhibe ettiğini belirlemiştir. Antimikrobiyal etkinlik sıralamasının D-limonen>limon yağı>mandarin yağı>portakal yağı>greyfurt yağı şeklinde olduğunu belirlemiştir.

Zahi ve ark. (2015), çalışmalarında; broth mikrodilüsyon yöntemiyle, limonenin hedef mikroorganizmalar *E. coli*, *S. aureus* ve *B. subtilis*'in üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği ve 1 µg/mL'lik bir konsantrasyonun, büyümelerini

engellemek için yeterli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, en etkili antimikrobiyal aktivite, 0,5 µg/mL MİK konsantrasyonu ile *S. cerevisiae* mikroorganizması üzerinde olduğu belirlenmiştir.

Liu ve ark. (2020), limon yağı ve limonenin, sıçanların diş çürüklerine indüklenen *Streptococcus sobrinus* üzerindeki inhibitör etkisi isimli çalışmalarında; limon yağı ve limonenin sıçanlarda çürük önleyici etkilerini incelemeyi ve karşılaştırmayı amaçlamışlar, minimal inhibitör konsantrasyonları disk difüzyon yöntemi kullanılarak ölçmüşlerdir. Limon yağı ve limonenin MİK değerleri sırasıyla 4500 ve 21000 µg/mL olarak belirlenmiştir. Limonen ve limon yağının, in vivo olarak bakteriyostatik bir şekilde benzer çürük önleyici yeteneklere sahip olduğunu bulmuşlardır.

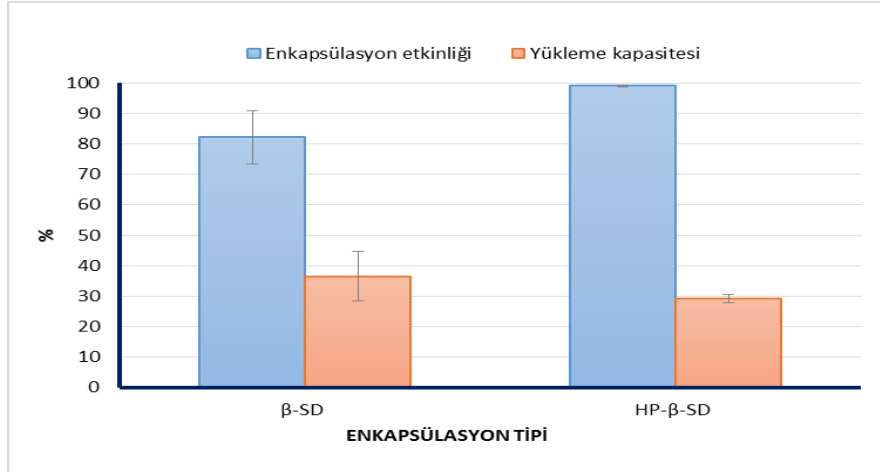
Salehi ve ark. (2021), limonen yüklü siklodekstrin inklüzyon kompleksi hazırlama, karakterizasyon ve antibakteriyel aktivite isimli çalışmalarında; D-Limonenin yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip doğal bir fenolik bileşik olduğunu ancak, düşük çözünürlük ve yüksek uçuculuğa sahip olmasından dolayı gıda ve ilaç endüstrilerindeki uygulamalarının sınırlı olduğunu, bu sınırlamaların üstesinden gelmek için β-siklodekstrin nano süngerlere (SD-NS) dahil ettiklerini belirtmişlerdir. Çalışmada; broth mikrodilüsyon yöntemi kullanılmış, D-limonenin hedef mikroorganizmalar *E. coli*, *Shigella flexneri*, *S. aureus* ve, *Enterococcus*, üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği ve (SD-NS) MİK değerleri sırasıyla 162, 81, 650, 650, µg/mL olarak belirlenmiştir.

Literatür incelendiğinde; D-limonenin *Penicillium* türü küfler üzerindeki antifungal etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak mevcut literatür incelendiğinde D-limonenin antibakteriyel etkisinin antifungal aktivitesinden daha yüksek olduğu, antimikrobiyal aktivitesinin mikroorganizma türüne ve saflığına göre değiştiği çalışmalara belirtilmiştir.

4.2. D-Limonen/Siklodekstrin İnküzyon Komplekleri ve Lipozomla Enkapsülasyon Etkinliğine Ait Bulgular

Tez çalışması kapsamında; β -Siklodekstrin veya 2-hidroksipropil- β -siklodekstrin kullanılarak D-limonen içerikli mikrokapsüller üretilmiştir. Üretilen mikrokapsüllerde tutulmuş olan D-Limonen miktarı analizlerle belirlenmiş enkapsülasyon etkinliği ve mikrokapsüllerin yükleme kapasitesi sonuçlarının ortalama değerleri hesaplanmıştır ve Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.

Limonenin β SD ile oluşturduğu inküzyon komplekslerinin enkapsülasyon etkinliği ortalaması %82,1 yükleme kapasitesi değeri ise ortalama %36,6 olarak belirlenmiştir. HP β SD ile oluşturduğu inküzyon komplekslerinin enkapsülasyon etkinliği ise %99,0 yükleme kapasitesi değeri ise %29,0 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde; HP β SD ile oluşturulan inküzyon kompleksinde enkapsülasyon etkinliği değerlerinin, β SD ile oluşturulanlardan daha yüksek olduğu, ancak yükleme kapasitesi değerlerinin daha düşük olduğu belirlenmiştir. İki farklı siklodekstrinin boşluk kısmı ile limonen arasındaki etkileşimin farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.1. D-limonen içerikli β SD ve HP β SD inküzyon komplekslerine ait enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesi değerleri

Bhandari ve ark. (1998), Limonenin, β SD ile enkapsülasyonu yoğurma yöntemine göre gerçekleştirilmiş, 15, 20 ve 30 dakika yoğurma sürelerinde, 15 dakikalık yoğurma süresinin en uygun yoğurma süresi olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, limonenin enkapsülasyon etkinliğini %97 olarak bulunmuştur.

Çetin (2014), tez çalışmasında; yoğurma tekniği uygulanarak karanfil uçucu yağı HP β SD ile enkapsüle edilmiştir. Çalışma sonucu elde edilen inklüzyon komplekslerinin enkapsülasyon etkinliği, %99 olarak bulunmuştur.

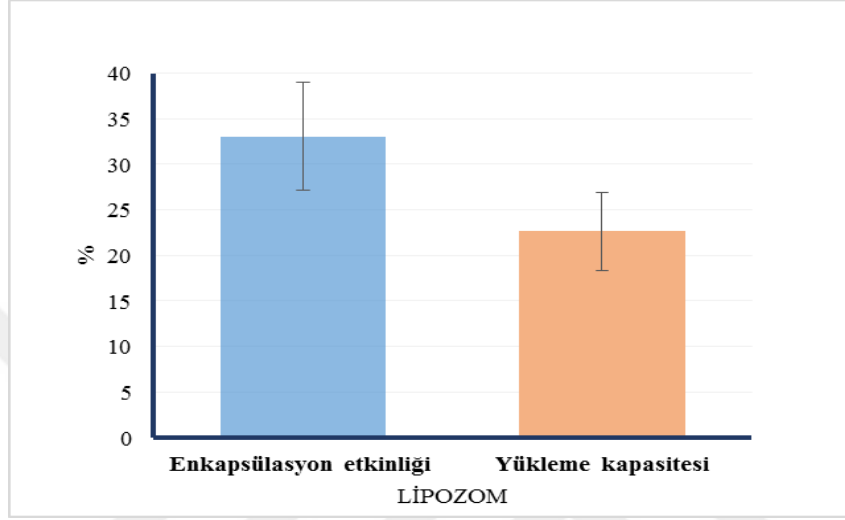
Özgün (2015), nane uçucu yağının siklodekstrinler ile mikroenkapsülasyonda; kaplama materyali olarak HP β SD kullanılmış olup, enkapsülasyon etkinliği %72.81 olarak bulunmuştur.

Herrera ve ark. (2019), uçucu yağların β SD ile oluşturulan inklüzyon komplekslerinin antifungal ve fizikokimyasal özellikleri isimli çalışmalarında; mikrokapsüllerin sinnamaldehit tutma etkinliği %91 iken, mikrokapsüllerin öjenol tutma etkinliği %66 olarak belirlenmiştir. Bu farklılıklar, aktif bileşikler ve β SD boşluğu arasındaki etkileşimin derecesi ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca; etkinliğin; kapsüllenecek maddenin tipi, fiziksel ve kimyasal özellikleri, madde-SD etkileşimleri gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişebileceği de belirtilmiştir.

D-Limonenin β SD ile oluşturulan inklüzyon komplekslerinde enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesi literatürle bulunan sonuçlarla benzerlik göstermektedir. D-Limonenin HP β SD ile oluşturulan inklüzyon komplekslerinde enkapsülasyon etkinliği ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Değişik kaplama malzemelerinin farklı tutma etkinliği gösterebileceği elde edilen sonuçlardan anlaşılmaktadır.

Literatürde; D-Limonenin lipozom ile enkapsülasyonu ile ilgili çalışmalar mevcut olmakla birlikte herhangi bir enkapsülasyon etkinliği hesaplaması yapılmamıştır (Dhitala ve ark., 2018; Umagiliyage ve ark., 2017; Joshi ve ark.,2021).. Limonen içerikli lipozom enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesine ait veriler Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

D-Limonenin, lipozom ile enkpsüle edilmesinde enkapsülasyon etkinliği ortalaması %33,0, yükleme kapasitesi ise %22,6 olarak olarak belirlenmiştir



Şekil 4.2. D-limonen içerikli lipozomların enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesi değerleri

Enkapsülasyon etkinliğinin düşük çıkmasının nedeni; lipozomun sıvı formda elde edilmesi ve partiküllerin santrifüj işlemi ile ayrılmasında yüksek hızlara çıkılamamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4.3. D-Limonen İçerikli Aktif Kağıtların Fiziksel Özelliklerine Ait Bulgular

4.3.1. Renk Analizi

Gıda ambalajının koruma, iletişim, içirme ve kullanım kolaylığı sağlama gibi temel dört fonksiyonu vardır. Ayrıca ürünün üzerinde bulunan ambalaj; oluşturduğu albeni sayesinde ürünün pazarlamasında da rol olarak sessiz bir satıcı rolü üstlenebilmektedir. Tez çalışması kapsamında; üretilen D-limonen içerikli kâğıtların renk değerleri belirlenmiş ve yalın haldeki kâğıtların renk değerleri ile karşılaştırılmıştır. Bu kapsamda;

a) %75 konsantrasyonda hazırlanan limonen çözeltisi b)lipozom çözeltisi, c) %25'lik HPβSD ve d)%25'lik βSD inklüzyon kompleksi çözeltileri ile dört farklı kağıt örneği olacak şekilde daldırma yöntemiyle kaplanan ve herhangi bir işlem uygulanmayan hutupak veya filtre kağıt örneklerinin renk değerlerindeki değişim (L^* , a^* , b^* ve ΔE) sırasıyla Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'te belirtilmiştir.

L^* renk değeri, rengi ölçülen nesnenin parlaklığı ve matlığı hakkında bilgi veren bir parametredir. L^* değeri, nesnenin sahip olduğu parlaklık miktarına bağlı olarak 0 ile 100 arasında bir değer alabilir. L değeri 0 olduğunda nesnenin aşırı mat veya siyah olduğu, 100 olduğunda ise aşırı parlak veya beyaz renge sahip olduğu anlaşılmaktadır. a^* değeri, rengi ölçülen nesnenin kırmızılığı ve yeşilliği hakkında bilgi veren bir renk parametresidir. a^* değeri pozitif (+) olduğunda kırmızılığı, negatif (-) olduğunda ise yeşilliği tanımlamaktadır. b^* değeri, rengi ölçülen nesnenin sarılığı ve maviliği hakkında bilgi veren bir renk parametresidir. b^* değeri pozitif (+) olduğunda sarılığı, negatif (-) olduğunda ise maviliği tanımlamaktadır. Kağıt örneklerinin renk farklılığını sayısal olarak ifade edebilmek için "toplam renk farkı değeri de (ΔE) hesaplanmıştır.

Hiç kaplama yapılmamış kontrol hutupak kağıtları **H-K**, Limonen kaplı kağıtlar **H-L**, %25'lik βSD inklüzyon kompleksli çözeltilerle kaplanan kağıtlar **H-βSD**, HPβSD inklüzyon kompleksli çözeltilerle kaplanan kağıtlar **H-HPβSD**, Lipozom çözeltisiyle kaplanan kağıtlar ise **H-Lp** olarak kodlanmıştır.

Çizelge 4.2. Hutpak kağıdı esaslı örneklerin renk değerleri

ÖRNEK	L*	a*	b*	ΔE
H-K	96,89 ±0,23 ^a	-1,57±0,27 ^d	2,15±0,20 ^a	0,00±0,00 ^e
H-L	90,49±0,80 ^c	-0,43±1,90 ^b	-3,23±0,12 ^d	8,41±0,11 ^b
H- βSD	93,37±0,58 ^b	-0,76±0,30 ^c	-1,58±0,30 ^c	5,20±0,56 ^d
H- HPβSD	89,19±0,76 ^d	0,06±0,15 ^a	-3,50±0,77 ^d	9,75±0,18 ^a
H-Lp	89,45±0,49 ^d	-0,78±0,54 ^c	-0,37±0,90 ^b	8,12±0,35 ^c

Aynı sütundaki farklı küçük harflere sahip örnekler arasındaki fark önemlidir ($p<0.05$). **H-K**: kontrol hutpak kağıtları; **H-L**; Limonen kaplı hutpak kağıtlar; **H-βSD** βSD : %25'lik βSD inklüzyon kompleksli çözeltilerle kaplanan kağıtlar; **H-HPβSD** : %25'lik HPβSD inklüzyon kompleksli çözeltilerle kaplanan kağıtlar; **H-Lp**: Lipozom çözeltisiyle kaplanan kağıtlar

Çizelge 4.2. incelendiğinde örneklerin L* değerleri arasında istatiki olarak önemli farklılık tespit edilmiştir. Genel anlamda enkapsüle limonen içeren çözeltilerle yapılan kaplama hutpak kağıtların L* değerini düşürdüğü, lipozom çözeltisiyle (89,45) ve HPβSD inklüzyon kompleksli çözeltilerle (89,19) kaplanan örneklerin L değerlerinin diğer yöntemlere göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Hutpak kağıdın kaplama ile a* değerlerinde artışlar olduğu belirlenmiştir. Nitekim, H-K örneğini a* değeri -1,57, H-L örneğinin -0,43, βSD örneğinin -0,76, H-HPβSD örneğinin 0,06 ve H-Lp örneğinin ise -0,78 olarak belirlenmiştir. Hutpak kağıtların kaplanması ile b* renk değerinde ise istatistiksel olarak önemli azalışlar tespit edilmiştir ($p<0.05$). HPβSD ve serbest halde limonen ile kaplanan örneklerde en düşük b* değerleri (sırasıyla -3.50, -3.23) ölçülmüştür. Toplam renk farklılığı değerleri incelendiğinde kaplamada kullanılan çözeltiliye bağlı olarak örnekler arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar olduğu belirlenmiştir. ΔE* değeri, orijinal renk değerlerinden renk farkını tanımlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır ve ΔE* değerinin 3.0 ile 6.0 arasında olması, renk farkının “iyi görülebilir”, 6.0 ile 12.0 arasında “çok iyi görülebilir” anlamına geldiği bildirilmektedir (Cserhalmi ve ark., 2006; Süfer ve Palazoğlu, 2019). ΔE* değeri;

hiç kaplama yapılmamış hutupak kağıtlara göre değerlendirildiğinde; renk farkının oldukça belirgin olduğu anlaşılmaktadır. β SD kullanılarak kaplanan kağıtlarda ΔE değerinin (5,20) diğer kaplanan kağıtlara göre istatistiksel olarak daha az olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).

Çizelge 4.3. Filtre kağıdı esaslı örneklerin renk değerleri

ÖRNEK	L^*	a^*	b^*	ΔE
F-K	100,57±0,20 ^a	-0,69±0,01 ^d	6,45±0,17 ^a	0,00±0,00 ^d
F-L	94,03±0,13 ^c	0,05±0,21 ^b	0,96±0,12 ^c	8,57±0,98 ^b
F-βSD	96,27±0,23 ^b	0,01±0,02 ^b	0,38±0,14 ^d	7,48±0,17 ^c
F- HPβSD	91,16±0,41 ^e	0,71±0,06 ^a	-0,21±0,12 ^e	11,61±0,37 ^a
F-Lp	92,34±0,34 ^d	-0,55±0,30 ^c	5,32±0,63 ^b	8,40±0,26 ^b

Aynı sütundaki farklı küçük harflere sahip örnekler arasındaki fark önemlidir ($p<0.05$). **F-K**: kontrol filtre kağıtları; **F-L**; Limonen kaplı filtre kağıtlar; **H β SD** : %25'lik β SD inklüzyon kompleksli çözeltilerle kaplanan kağıtlar; **H-HP β SD** : %25'lik HP β SD inklüzyon kompleksli çözeltilerle kaplanan filtre kağıtlar; **H-Lp**: Lipozom çözeltisiyle kaplanan filtre kağıtlar.

Çizelge 4.3 incelendiğinde filtre kağıdı esaslı örneklerin renk değerleri arasında istatiki olarak önemli farklılık tespit edilmiştir. Genel anlamda kaplama yöntemlerinin filtre kâğıtların L^* değerini düşürdüğü, F-HP β SD (91,16) ve F-L; (92,34) örneklerinin L değerlerinin diğer örneklerle göre daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Hutupak esaslı kâğıtlarda olduğu gibi kaplama işlemi filtre kağıdı esaslı örneklerin a^* değerlerinde artışlar, b^* renk değerinde ise istatistiksel olarak önemli azalışlar olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

ΔE^* değeri; hiç kaplama yapılmamış hutupak kağıtlara göre değerlendirildiğinde; renk farkının oldukça belirgin (çok iyi görülür) olduğu anlaşılmaktadır. HP β SD inklüzyon kompleksli çözeltilerle kaplanan kâğıtlarda ΔE değerinin (11,61), diğer çözeltilerle kaplanan kağıtların ΔE değerine göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Ayrıca; limonen

çözeltilisi ile kaplanan kağıtlar ve direk lipozom çözeltilisi ile kaplanmış filtre kağıtlar birbiriyle kıyaslandığında aralarında istatistiki açıdan fark olmadığı görülmüştür ($p>0.05$).

Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3 birlikte değerlendirildiğinde; hutpak ve filtre kağıt örneklerinde; kaplama yöntemlerinin kağıtların L değerini ve b* değerini düşürdüğü belirlenmiştir. ΔE^* değeri; hiç kaplama yapılmamış hutpak ve filtre kağıtlara göre değerlendirildiğinde; renk farkının oldukça belirgin olduğu anlaşılmaktadır. Kağıtların renk değerlerinde limonenin enkapsülasyonu ile oluşturulan lipozom ve siklodekstrin inklüzyon komplekslerinde kapsülasyonda kullanılan maddelerin fiziksel farklılıklarından kaynaklanan önemli değişiklikler meydana gelmiştir.

4.3.2. Kağıtların Mekanik Özelliklerine Ait Bulgular

Germe mukavemeti, malzemenin çekmeye karşı gösterdiği direnç olarak tanımlanmaktadır. Çekme deneyinde, cisim, bir süre uzadıktan sonra kopar ve koptuğu andaki direnç değeri çekme gerilmesini verir. Gerilme mukavemeti değeri malzemenin çekme etkisi altında tolere edebildiği maksimum stresi, kopma gerilmesi ise malzemenin koptuğu noktadaki stresi gösterir. Kağıtların birim uzama miktarı, toplam uzama miktarının kağıtların başlangıç uzunluğuna bölünmesi ile bulunur.

Kaplanan hutpak kağıtlara uygulanan çekme testi sonucu elde edilen kalınlık (T), gerilme mukavemeti (GM), kopma anındaki yüzde uzama miktarı (UM), ve elastik modülü (EM) ölçülmüş ve bu değerlere uygulanan Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Hutupak esaslı kağıtların mekanik özellikleri

Örnek	T (μm)	GM (Mpa)	UM (%)	EM (Mpa)
H-K	0,03±0,00 ^c	22,95±2,86 ^a	1,16±0,27 ^b	27,41±8,14 ^a
H-L	0,03±0,00 ^c	19,10±3,60 ^b	1,07±0,24 ^c	27,92±5,39 ^a
H-βSD	0,05±0,07 ^a	22,60±4,63 ^a	1,83±0,31 ^a	17,71±3,36 ^b
H- HPβSD	0,04±0,02 ^b	23,75±4,66 ^a	0,91±0,22 ^c	27,22±5,01 ^a
H-Lp	0,03±0,03 ^c	7,40±1,68 ^c	1,40±0,27 ^b	8,91±1,67 ^c

Aynı sütundaki farklı küçük harflere sahip örnekler arasındaki fark önemlidir ($p<0.05$) **H-K**: Hiç kaplama yapılmamış hutupak kağıtlar; **H-L**: %75 konsantrasyonda limonen çözeltisiyle kaplanan hutupak kağıtlar; **βSD** : βSD ile enkapsüle edilmiş çözeltiyle kaplanan hutupak kağıtlar; **H- HPβSD** :HPβSD ile enkapsüle edilmiş çözeltiyle kaplanan kağıtlar; **H-Lp**: Lipozom çözeltisiyle kaplanan kağıtları ifade etmektedir.

Hutupak esaslı kağıt örneklerinin limonen ile birleştirilmesinden sonra mekanik özelliklerindeki değişim, hiç kaplama yapılmamış kağıtlara göre değerlendirildiğinde; H-βSD ve H-HPβSD örneklerinin kalınlık değerlerinde artış olduğu belirlenmiştir. Bu kalınlık artışının siklodekstrinlerin yapısından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Örneklerin gerilme mukavemeti (GM) incelendiğinde H-Lp örneğinin GM değeri (7,40 Mpa), H-K (kontrol) örneğine göre (22,95 Mpa) istatistiksel olarak önemli ölçüde azalmıştır. H- HPβSD örneğinin GM değeri (23,75) ile kontrol örneğinin GM değeri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($p>0.05$) olmadığı belirlenmiştir.

Farklı şekillerde limonen ile birleştirilen kağıtların uzama miktarı (UM) değerleri incelendiğinde, örnekler arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar ($p>0.05$) olduğu görülmektedir. H-K örneğinin UM değeri %1,16, H-L'de %1,07, H-βSD %1,83, H-HPβSD 'de %0,91, H-Lp' de %1,40 değerleri ölçülmüştür. H-βSD örneğinin UM değeri, kaplama yapılmayan hutupak kağıtlara göre artış gösterirken, H-HPβSD örneğinde azalış tespit edilmiştir. H-K ve H-Lp örneklerinin UM değerleri arasında ise istatistiksel bir fark ($p>0.05$) olmadığı belirlenmiştir.

Örneklerin elastik modulu değeri de hesaplanmış ve birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Elastik modülü (EM) değerleri yönünden; H-K, H-L ve H-HPβSD örnekleri arasında istatistiki bir fark ($p>0.05$) olmadığı belirlenmiştir ve en yüksek değerler bu kağıtlarda gözlenmiştir. Hutupak esaslı kağıtların mekanik özelliklerindeki değişim genel olarak değerlendirildiğinde, HPβSD kullanılarak enkapsüle edilen limonen ile yapılan kaplamaların kağıtların gerilme mukavemetini arttırdığı ancak esnekliklerini azalttığı söylenebilir. Lipozom solüsyonu kullanılarak yapılan kaplamaların ise kağıtların kopmaya karşı dayanımlarını önemli ölçüde azalttığı söylenebilir.

Filtre kâğıdı esaslı örnekler uygulanan çekme testi sonucu elde edilen kalınlık, gerilme mukavemeti, kopma anındaki yüzde uzama miktarı, elastik modülü değerleri ve örnekler arasında uygulanan Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Filtre kâğıdı esaslı örneklerin mekanik özellikleri

Örnek	<i>T</i> (μm)	<i>GM</i> (Mpa)	<i>UM</i> (%)	<i>EM</i> (Mpa)
F-K	0,15±0,00 ^d	11,64±6,25 ^b	2,55±0,61 ^a	13,94±6,77 ^b
F-L	0,15±0,03 ^d	10,22±4,11 ^b	2,06±0,61 ^b	10,68±3,71 ^b
F-βSD	0,21±0,10 ^a	9,76±1,93 ^b	2,02±0,32 ^b	11,99±2,51 ^b
F- HPβSD	0,20±0,00 ^b	25,32±9,23 ^a	2,10±0,30 ^b	20,07±3,80 ^a
F-Lp	0,17±0,00 ^c	3,27±0,66 ^c	1,44±0,46 ^d	4,60±1,34 ^c

Aynı sütundaki farklı küçük harflere sahip örnekler arasındaki fark önemlidir ($p<0.05$) F-K: Hiç kaplama yapılmamış filtre kağıtlar; F-L: %75 konsantrasyonda limonen çözeltisiyle kaplanan filtre kağıtlar; F-βSD :βSD ile enkapsüle edilmiş çözeltilerle kaplanan hutpak kağıtlar; F- HPβSD :HPβSD ile enkapsüle edilmiş çözeltilerle kaplanan kağıtlar; F-Lp: Lipozom çözeltisiyle kaplanan kağıtları ifade etmektedir.

Filtre kâğıdı esaslı örneklerin mekanik özellikleri incelendiğinde, hutupak kâğıdı esaslı örneklerde olduğu gibi; filtre esaslı kâğıt örneklerinin limonen ile birleştirilmesinden sonra mekanik özelliklerindeki değişim, hiç kaplama yapılmamış kâğıtlara değerlendirildiğinde; F-βSD ve F-HPβSD örneklerinin kalınlık değerlerinde artış olduğu belirlenmiştir. Bu kalınlık artışının hutupak kâğıtlarda olduğu gibi siklodekstrinlerin yapısından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Örneklerin gerilme mukavemeti (GM) incelendiğinde F-Lp örneğinin GM değeri (3,27 Mpa), F-K (kontrol) örneğine göre (11,64 Mpa) istatistiksel olarak önemli ölçüde azalmıştır. F-L örneğinin GM değeri (10,22) ile kontrol örneğinin GM değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($p>0.05$) olmadığı belirlenmiştir.

Farklı şekillerde limonen ile birleştirilen kâğıtların uzama miktarı (UM) değerleri incelendiğinde, örnekler arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar ($p>0.05$) olduğu görülmektedir. F-K örneğinin UM değeri %2,55, F-L'de %2,06, F-βSD %2,02, F-HPβSD'de %2,10, F-Lp'de %1,44 değerleri ölçülmüştür. Bütün örneklerin UM değerinde, kaplama yapılmayan filtre kâğıtlara göre azalış tespit edilmiştir. Örneklerin elastik modülü değeri de hesaplanmış ve birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Elastik modülü (EM) değerleri yönünden; F-K, F-L ve F-HPβSD örnekleri arasında istatistiksel bir fark ($p>0.05$) olmadığı belirlenmiştir. En yüksek değer F-HPβSD kâğıtlarda gözlenmiştir. Filtre esaslı kâğıtların mekanik özelliklerindeki değişim genel olarak değerlendirildiğinde, HPβSD kullanılarak yapılan kaplamaların kâğıtların gerilme mukavemetini arttırdığı ancak esnekliklerini azalttığı söylenebilir. Lipozom solüsyonu kullanılarak yapılan kaplamaların ise kâğıtların kopmaya karşı dayanımlarını önemli ölçüde azalttığı söylenebilir.

Filtre ve hutupak kâğıtlar birlikte kıyaslandığında ise; gerilme mukavemeti (GM), ve elastik modülü (EM) farklı farklı enkapsülasyon çözeltisiyle kaplanan hutupak kâğıtlarda daha yüksek değerlerin elde edildiği, kopma anındaki yüzde

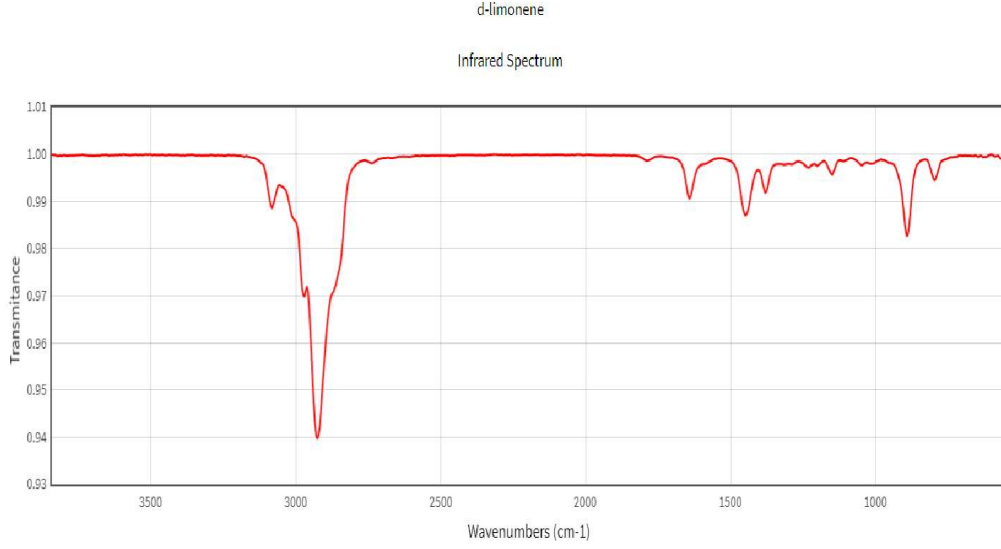
uzama miktarı (UM), ise filtre kağıtlarında daha yüksek değerler elde edildiği görülmüştür.

Mekanik testler sonucunda lipozom solüsyonu ile yapılan kaplamaların her iki kağıt türündede gerilme mukavemetini azalttığı, kaplamada HPβSD kullanımının ise gerilme mukavemeti değerini arttırdığı, dolayısı ile kağıdın kopmaya karşı gösterdiği direnci attırdığı belirlenmiştir.

4.3.3. FT-IR Spektrometresi

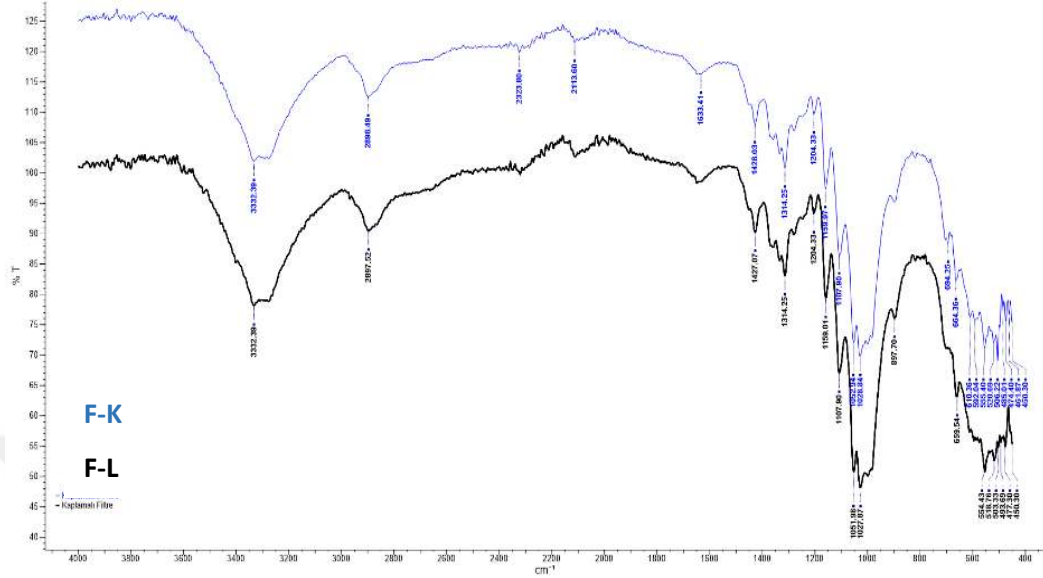
Hutpak ve filtre kağıtların yapısal bağ özelliklerini tanımlamak amacıyla IR spektrumları incelenmiştir. Yapısal analiz, kağıtların yapısındaki organik fonksiyonel grupların tanımlanmasını ve bu grupların etkileşimlerini içerir. Bu gruplar IR ışığına maruz kaldıklarında farklı gerilme ve bükülme titreşim frekanslarında karakteristik pikler şeklinde ortaya çıkar. Organik bileşiklerde, fonksiyonlu gruplar için belli gerilme ve eğilme titreşimleri vardır ve IR spektrumunda, fonksiyonlu gruplar için belirgin soğurma bandlarının görüldüğü 4000-1500 cm⁻¹ bölgesine fonksiyonlu grup bölgesi denir. Bu bölgede yer alan bantlar, özel atom gruplarının ve parmak izi bölgesi (1500-400 cm⁻¹) olarak iki bölgeye ayrılabilir. Bu nedenle gıda maddesinin bileşiminde ufak bir değişiklik parmak izi bölgesindeki absorpsiyon piklerinin önemli oranda değişmesine neden olmaktadır. Benzer şekilde bu bölgede iki ışık dizisinin çakışması, bu dizilerin aynı maddeye ait olduğuna işaret edebilmektedir

Parmak izi bölgesi küçük gruplardan çok molekülün temel bölgelerinin ve molekülü oluşturan atom iskeletinin izlenmesini sağladığından bu bölge, moleküle özgü molekül yapısından etkilendiğinden iskelet titreşim bölgesi de denir (Erdik, 2008). D-Limonene ait FT-IR spektrumları Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



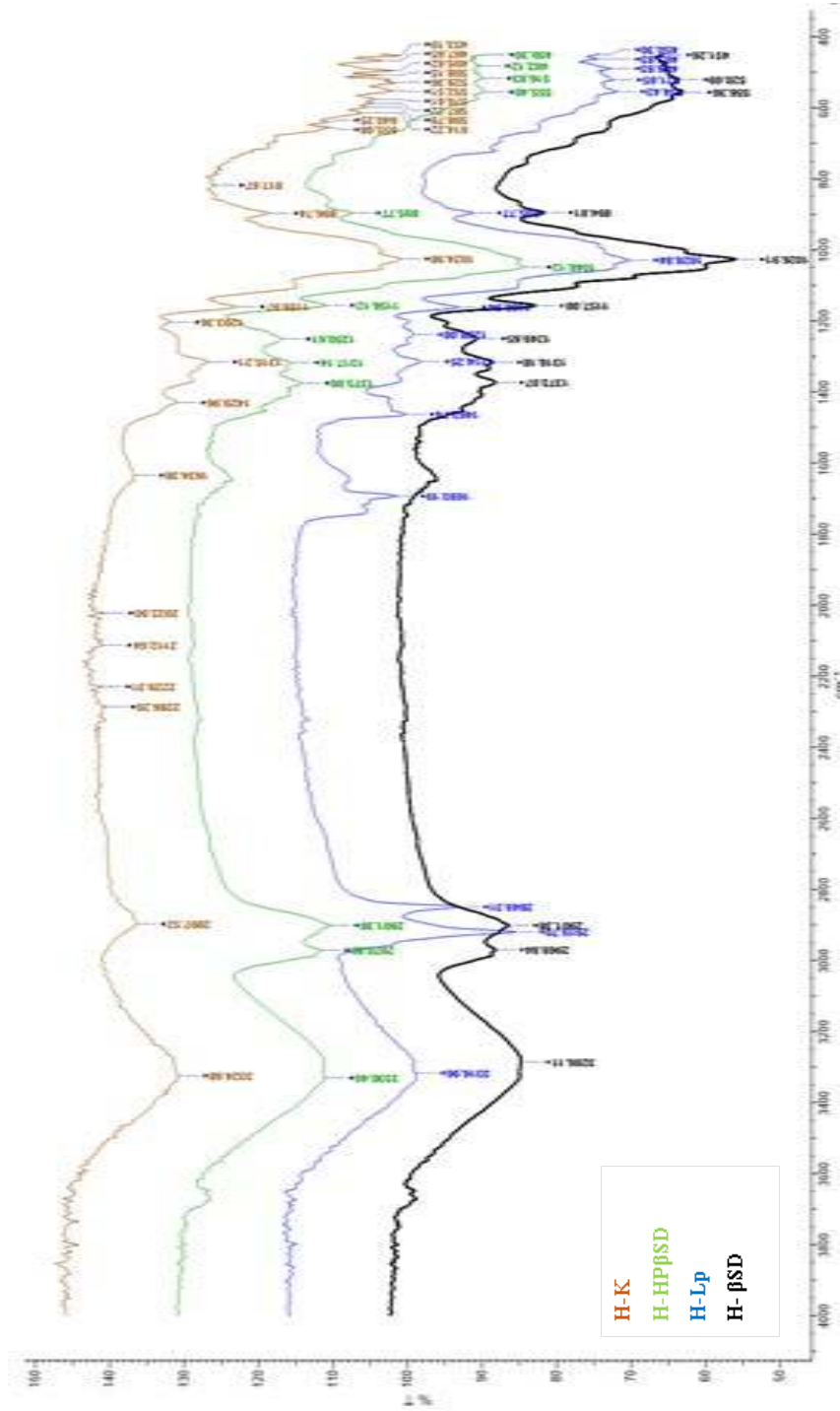
Şekil 4.3. D-Limonene ait FT-IR spektrumları

D-limonenin kimyasal yapısı incelendiğinde; formülü $C_{10}H_{16}$, karbon ve hidrojen atomları arasında tek ve çift bağlardan oluşmaktadır. 2920 cm^{-1} spektrumunda önemli pik görülmektedir ve bu güçlü tepe noktasını (CH_3 , CH_2 ve CH gruplarının gerilme titreşimi) temsil etmektedir. 1440 cm^{-1} 'de spektrum ise C-H bükme bandına karşılık gelmektedir. 888 cm^{-1} (bükülme titreşimi = C -H çift süstitüe çift bağ) ve 798 cm^{-1} (bükülme titreşimi = trisüstitüe çift bağların C-H) spektrumları ilgili bağları temsil etmektedir. (Khoshakhlagh ve ark., 2017). Kaplama yapılmamış filtre kağıdı (F-K) ve %75'lik limonen çözeltisi ile kaplanmış filtre kağıdına (F-L) ait FTIR spektrumları Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

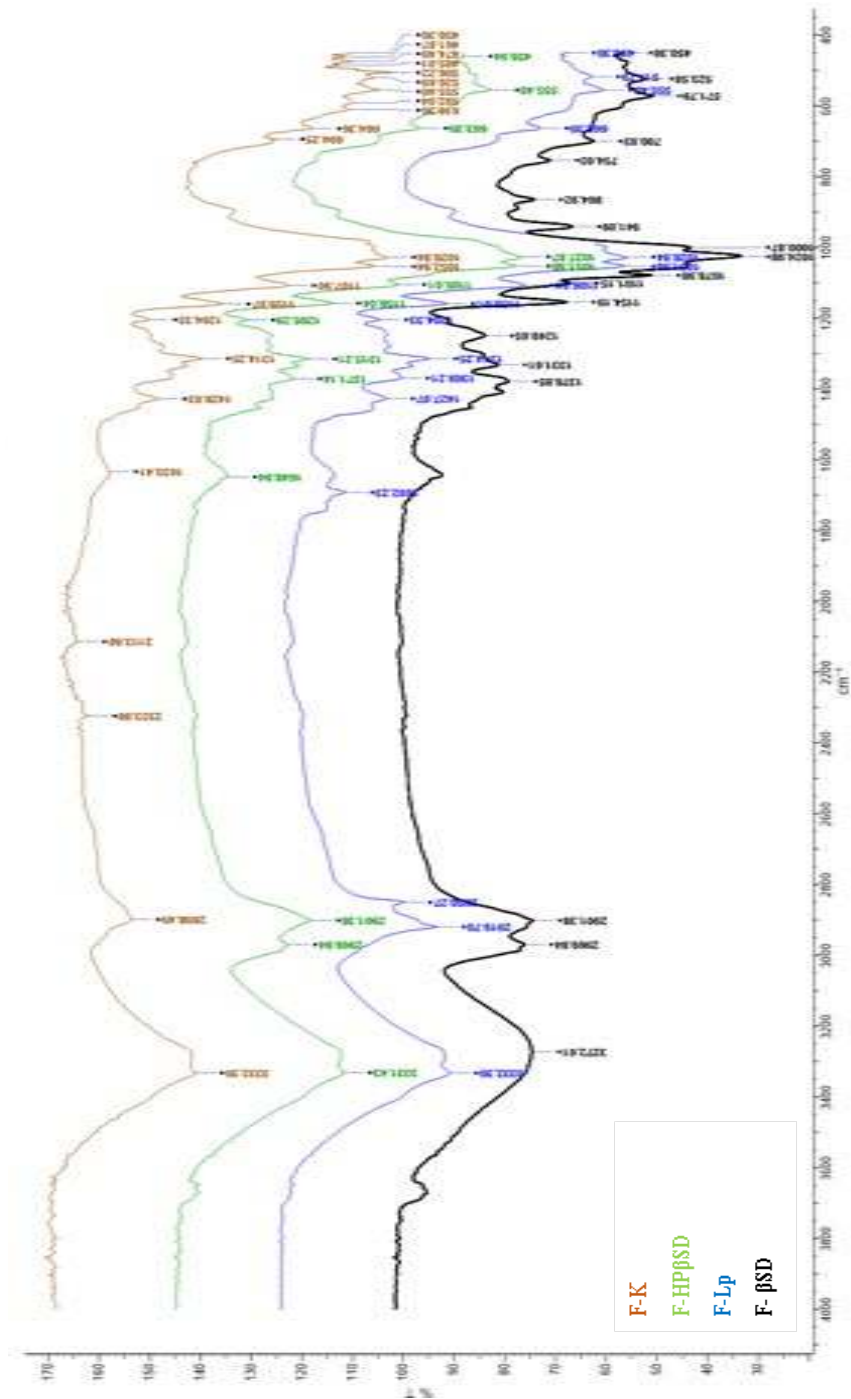


Şekil 4.4. Kaplama yapılmamış filtre kağıdı (F-K) ve %75'lik limonen çözeltisi ile kaplanmış filtre kağıdına (F-L) ait FTIR spektrumları

Şekilde görüldüğü üzere; F-K ve F-L örneklerine ait FT-IR spektrumları incelendiğinde; elde edilen piklerde önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Bu noktada; D-limonenin hızlı bir şekilde kağıttan uzaklaştığı ve nerdeyse kaplanmamış kağıtla aynı spektrumların elde edildiği görülmüştür. Kaplama yapılmamış hutupak kağıtlar (H-K) ve limonen kaplı hutupak kağıtlarda da ait FTIR spektrumlarında aynı durum gözlenmiştir. Hutupak esaslı ve filtre kağıdı esaslı örneklerin yapısal bağ analizleri FT-IR spektrometresi ile incelenmiş ve elde edilen spektrumlara ait sonuçlar sırasıyla Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da gösterilmiştir



Şekil 4.5: Hutpak kağıtlarla hazırlanan aktif özellikteki kağıtların FTIR spektrumları **H-K: Hiç kaplama yapılmamış hutpak kağıtlar; H-HPβSD: βSD ile enkapstüle edilmiş çözeltiyle kaplanan hutpak kağıtlar; H-HPβSD; HPβSD ile enkapstüle edilmiş çözeltiyle kaplanan kağıtlar; H-Lp: Lipozom çözeltisiyle kaplanan kağıtları ifade etmektedir.**



Şekil 4.6. Filtre kağıtlarla hazırlanan aktif özellikteki kağıtların FTIR spektrumları **F-K: Hiç kaplama yapılmamış filtre kağıtlar**; **F-βSD: βSD** ile enkapsüle edilmiş çözeltiyle kaplanan filtre kağıtlar; **F- HPβSD : HPβSD** ile enkapsüle edilmiş çözeltiyle kaplanan filtre kağıtlar; **F-Lp: Lipozom çözeltisiyle kaplanan filtre kağıtları** ifade etmektedir

Kağıtların kimyasal yapı özelliklerini belirlemek ve bileşenleri arasındaki etkileşimi ortaya koymak amacıyla yapılan FT-IR analizi sonuçlarına göre; D-limonenin farklı enkapsülasyon teknikleri kullanılarak kağıda ilavesi fonksiyonel gruplar üzerinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır.

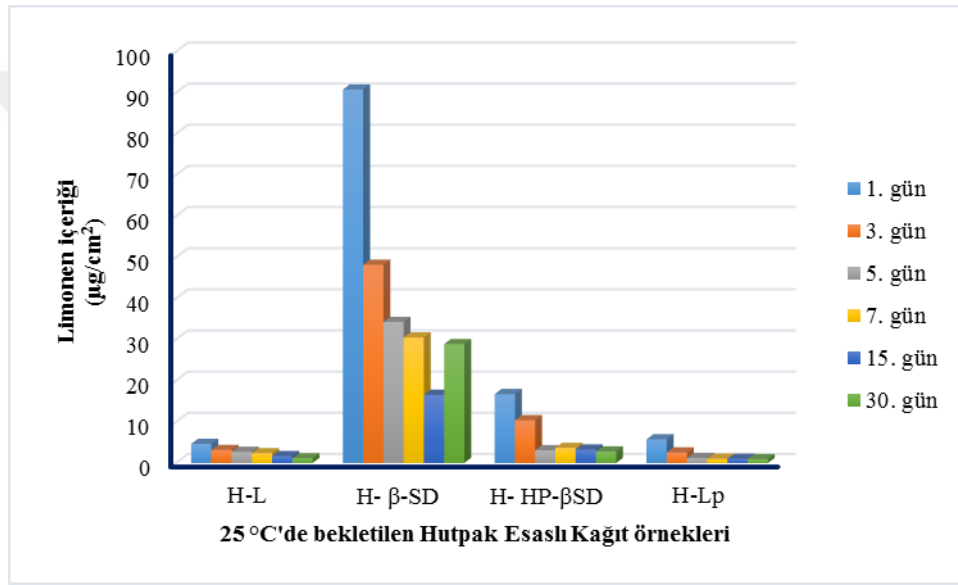
D-Limonenin FT-IR spektrumu Şekil 4.5. ve 4.6 birlikte incelendiğinde; hutupak ve filtre esaslı kağıtlarda benzer pik girişimi gözlenmiştir. Filtre ve hutupak kağıtların spektrumlarına bakıldığında β SD ve HP β SD ile kaplanan kağıtların spektrumları ile benzer özellikler çıkmıştır. Ancak pik yoğunlukları değerleri arasında farklılık görülmüştür. Ayrıca; β SD ile kaplanan kağıt örneklerinde 1772 cm^{-1} spektrum değeri siklodekstrin monomeri arasındaki karbonat bağlarını doğrulamaktadır (Lembo ve ark., 2013). HP β SD ile kaplanan kağıt örneklerinde 2969 cm^{-1} spektrum değeri C-H gerilmesini temsil ettiği düşünülmektedir. Elde edilen spektrumlar her ne kadar limonen varlığını göstermese de kaplamanın hangi yöntemle yapıldığı konusunda fikir vermektedir.

Lp ile kaplanan kağıtlarda 2919.70 cm^{-1} deki spektrum (CH_3 , CH_2 ve CH gruplarının gerilme titreşimi) serbest limonendeki FTIR spektrumunda da görülmüştür. Bu benzerlik D-limonenin varlığında oluşmuş olabilir. Ancak; lipozom üretiminde kullanılan diğer bileşenlerden de kaynaklı oluşabileceği düşünülmektedir.

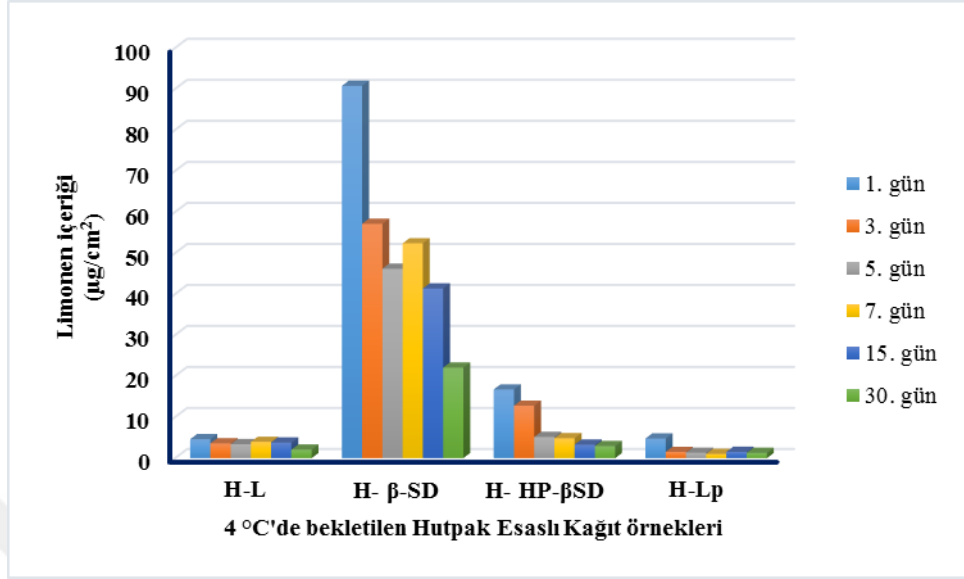
4.4. Kağıtta Kalan Limonen Miktarına Ait Bulgular

Mikrokapsüllerdeki çekirdek materyalin salımında kabuk materyalin özellikleri, mekanik kuvvet, sıcaklık değeri, zaman, pH, ozmotik basınç, enzimatik aktivite gibi çeşitli faktörler etkilidir (Sözer ve Kokini, 2012). Hazırlanılan, %75 konsantrasyonda limonen çözeltisi, kapsüllenmiş D-Limonen içerikli lipozom çözeltisi, %25'lik HP β SD ve β SD inklüzyon kompleksli çözeltilerle daldırma yöntemi kullanılarak birleştirilen aktif kâğıtların 1. 3. 5. 7. 15. ve 30. günlerde kâğıtta kalan D-Limonen miktarı incelendiğinde;

Alınan örnekler GC-FID de analiz edilmiş, kağıtta kalan limonen miktarları zamana bağlı ölçülmüş ve örneklerden elde edilen verilerden kağıt örneklerine ait grafik oluşturulmuştur. 25⁰C’de depolanan hutupak kâğıtlarla hazırlanan aktif özellikteki kâğıtların zamana bağlı limonen içeriğindeki değişim değerleri Şekil 4.7’da 4⁰C’de depolanan hutupak kâğıtlarla hazırlanan aktif özellikteki kâğıt örneklerinin zamana bağlı limonen içeriği değerleri Şekil 4.8’da gösterilmiştir.



Şekil 4.7. 25⁰C’de bekletilen hutupak kağıdı esaslı aktif özellikteki kağıt örneklerinin limonen içerikleri



Şekil 4.8. 4 °C’de bekletilen hutpak kağıdı esaslı aktif özellikteki kağıt örneklerinin limonen içerikleri

Şekil 4.7 ve Şekil 4.8 birlikte incelendiğinde; hem 4⁰C hemde 25⁰C’de depolanan hutpak kağıtlarla hazırlanan kağıtlarda en yüksek limonen içeriği değerleri, βSD kullanılarak kaplanmış kağıtlarda belirlenmiştir. Depolama sıcaklıkları göz önünde bulundurulduğunda 4⁰C’de depolanan kağıtlarda kalan limonen miktarının 25⁰C’deki depolamadaki kağıtlara göre genel anlamda daha yüksek değerlerde olduğu belirlenmiştir. 4⁰C’de depolanan 4 farklı çözeltiyle kaplanan hutpak kağıtlar incelendiğinde;

H-L örneklerinin limonen miktarı. 1.gün 4,64 µg/cm², 5.gün 3,77 µg/cm² olarak belirlenmiş, 30.gün ise 2,09 µg/cm² olarak tespit edilmiştir. 30.gün kağıtların limonen içeriğinde ilk günkü değerlere göre başlangıç limonen içeriğinin %55 nin uzaklaştığı belirlenmiştir.

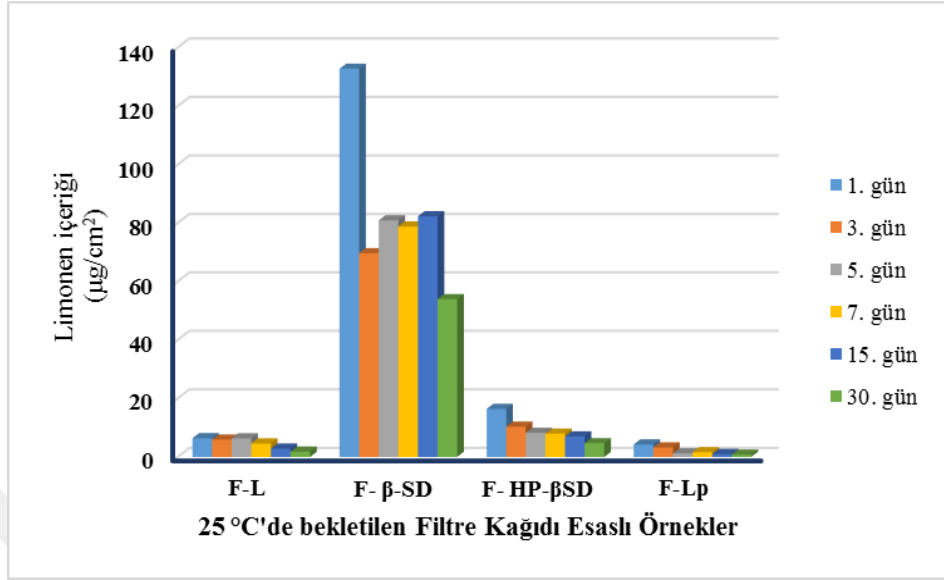
H-βSD örneklerinde 1.gün limonen miktarı ortalama 90,77 µg/cm² iken 5. gün bu değer 46,19 µg/cm² olarak belirlenmiş ve başlangıç limonen içeriğinin %50’sinin kağıttan uzaklaştığı belirlenmiştir. 30.gün sonunda da limonen içeriği

22,08 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak belirlenmiş ve bu kağıtlarda başlangıç limonen içeriğinin %25'nin korunduğu tespit edilmiştir.

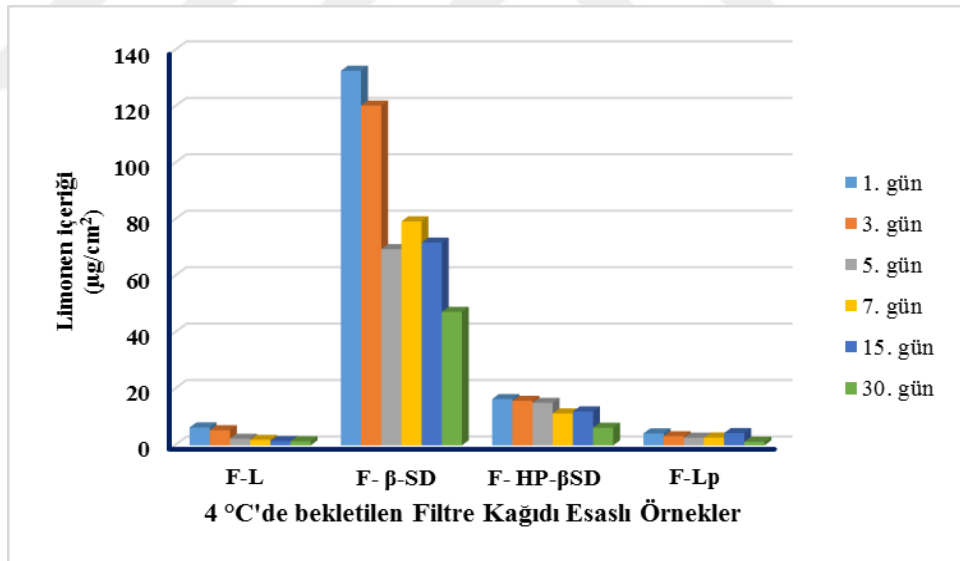
H-HP β SD örneklerinin limonen miktarı; 1.gün 16,74 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ iken 5. gün bu değer 5,17 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak belirlenmiş ve başlangıç limonen içeriğinin %70'inin kağıttan uzaklaştığı belirlenmiştir. 30.gün sonunda limonen içeriği 2,96 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak belirlenmiş ve 30.günde kağıtlarda başlangıç limonen içeriğinin %82'sinin uzaklaştığı belirlenmiştir. Bu kaybın büyük çoğunluğu ilk 5 gün de meydana gelmiştir.

H-Lp örneklerinin limonen miktarı; 1.gün 4,78 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ iken 5.gün bu değer 1,33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak belirlenmiş ve başlangıç limonen içeriğinin %72'sinin kağıttan uzaklaştığı belirlenmiştir. 30.gün sonunda da limonen içeriği 1,30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak belirlenmiş ve 30.günde kağıtlarda başlangıç limonen içeriğinin %73'ünün uzaklaştığı belirlenmiştir. Lipozom çözeltisiyle kaplanan kağıtlarda kalan limonen miktarının 5.günden 30. güne kadar kağıtta korunduğu belirlenmiştir.

25 $^{\circ}\text{C}$ 'de depolanan filtre kağıtlarla hazırlanan aktif özellikteki kağıtların zamana bağlı limonen içeriklerindeki değişim Şekil 4.9'da, 4 $^{\circ}\text{C}$ 'de depolanan filtre kağıtlarla hazırlanan aktif özellikteki kağıtların zamana bağlı limonen içeriği değerleri Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. 25°C’de bekletilen filtre kağıdı esaslı aktif özellikteki kağıt örneklerinin limonen içerikleri



Şekil 4.10. 4°C’de bekletilen filtre kağıdı esaslı aktif özellikteki kağıt örneklerinin limonen içerikleri

Şekil 4.9 ve Şekil 4.10 birlikte incelendiğinde; hem 4°C hemde 25°C’de depolanan filtre kağıtlarla hazırlanan kağıtlarda en yüksek limonen içeriği değerleri, βSD kullanılarak kaplanmış kağıtlarda belirlenmiştir.

Depolama sıcaklıkları göz önünde bulundurulduğunda 4°C’de depolanan bütün filtre kağıtlarda 3. 5. 15. ve 30. günlerde kalan limonen miktarının 25 °C’deki depolamadaki kağıtlara göre daha yüksek değerlerde olduğu belirlenmiştir. 4°C’de depolanan 4 farklı çözeltiyle kaplanan filtre kağıtlar incelendiğinde;

F-L örneklerinin limonen miktarı. 1.gün 6,38 µg/cm², 5.gün 2,37 µg/cm² olarak belirlenmiş, 30.gün ise 1,45 µg/cm² olarak tespit edilmiştir. 30.gün kağıtlardan başlangıç limonen içeriğinin %77 nin uzaklaştığı belirlenmiştir. Bu kaybın büyük çoğunluğu ilk 5 gün de meydana gelmiştir.

F-βSD örneklerinde 1.gün limonen miktarı ortalama 132,73 µg/cm² iken 5. gün bu değer 69,53 µg/cm² olarak belirlenmiş ve başlangıç limonen içeriğinin %48’sinin kağıttan uzaklaştığı belirlenmiştir. 30.gün sonunda da limonen içeriği 47,31 µg/cm² olarak belirlenmiş ve bu kağıtlarda başlangıç limonen içeriğinin %36’sının korunduğu tespit edilmiştir.

F-HPβSD örneklerinin limonen miktarı;1.gün 16,42 µg/cm² iken 5. gün bu değer 15,10 µg/cm² olarak belirlenmiş ve başlangıç limonen içeriğinin %8’inin kağıttan uzaklaştığı belirlenmiştir. 30.gün sonunda da limonen içeriği 6,26 µg/cm² olarak belirlenmiş ve 30. günde kağıtlarda başlangıç limonen içeriğinin %62’sinin uzaklaştığı belirlenmiştir.

F-Lp ile örneklerinin limonen miktarı;1.gün 4,26 µg/cm² iken 5. gün bu değer 2,71 µg/cm² olarak belirlenmiş ve başlangıç limonen içeriğinin %36’sinin kağıttan uzaklaştığı belirlenmiştir. 30.gün sonunda da limonen içeriği 1,31 µg/cm² olarak belirlenmiş ve 30.günde kağıtlarda başlangıç limonen içeriğinin %70’inin uzaklaştığı belirlenmiştir.

Filtre kâğıtlarda ve hutupak kâğıtlarda bulunan limonen içeriği kendi içinde mukayese edildiğinde ise; 1. günden 30. güne kadar yapılan analizlerde filtre kâğıtlarda tutunumun daha yüksek olduğu görülmüştür.

Hem 4°C hemde 25°C de depolama yapılan hutupak ve filtre kâğıtların her ikisinde de 30 gün boyunca yapılan analizlerin her birinde en yüksek değerler BSD ile kaplanmış kâğıtlarda gözlenmiştir. Ancak; şekiller incelendiğinde BSD ile kaplanmış kâğıtlarda lineer bir azalış olmadığı bazı günlerde artışlar olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeni ise; BSD 'nin suda çözünürlüğünün düşük olmasından dolayı, kâğıt üzerinde homojen bir kaplama sağlanamamasından kaynaklanmış olabilir.

F-Lp, H-Lp örneklerinde kalan limonen miktarı, F-L, H-L örneklerine göre kâğıtta daha az kalmıştır. F-Lp, H-Lp örneklerinde 30 gün boyunca kalan miktar diğer kaplamalara göre düşük çıksada bu süre zarfında stabil seyretmiştir.

Literatürde aktif kâğıt ambalaj üretimi üzerine yapılmış sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (López-Gómez ve ark. 2020; Akbaş, 2017). Bu çalışmalarda daha çok tarçın, kekik uçucu yağları kullanılmıştır. Akbaş (2017), tarçın yağıyla kaplanmış aktif kâğıt tabakaların tasarımı isimli çalışmada; Üç kaplama tekniği, daldırarak, ultrasonik (80 kHz and 100% güçte) ve vakum altında (50 kPa) kaplama tarçın yağı emdirilmesi için kullanılmıştır. Üç farklı konsantrasyonda (2%, 4% ve 6% (v:v)) hazırlanan tarçın yağı-etanol solüsyonu, kaplama ortamı olarak kullanılmıştır. Farklı metod ve tarçın yağı konsantrasyonu kullanılarak hazırlanan kâğıtlarda, sinamaldehit içeriğini belirlemek için, GC-MS analizleri yapılmıştır. Sinamaldehit içeriğinin 11.02 mg sinamaldehit/g kâğıt (%2'lik daldırma yöntemiyle) ile 41.96 mg sinamaldehit/g kâğıt (%6 'lık ultrason kaplamalı numune) arasında olduğu, belirlenmiştir.

Tez çalışmasında; hutupak kâğıtlarla hazırlanan aktif özellikteki kâğıtların ilk gün kâğıtta kalan D-limonen miktarı 1.66 mg/g kâğıt iken; filtre kâğıtlarla hazırlanan aktif özellikteki kâğıtların ilk gün kâğıtta kalan D-limonen miktarı 7.52 mg/g kâğıt bulunmuştur. Literatürde aktif kâğıtların depolama stabilitesini

belirlemeye yönelik D-Limonen içrikli aktif kâğıt üretimi üzerine bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

4°C ve 25 °C’de depolanan filtre ve hutupak kağıtlarda zamana bağılı olarak 4°C’de depolama boyunca kağıtlarda kalan limonen içeriğı daha yüksek değerlerde tespit edildiğinden, 4°C’de bekletilen kağıtlarla antimikrobiyal analizler yapılmıştır.

4.5. Antifungal Aktivite Değişimine ait Bulgular

Penicillium expansum ve *Penicillium digitatum* küfleri mavi ve yeşil renklerde oluşmakta, narenciye meyvelerinde hasat sonrası hastalıklara sebebiyet vermektedir. Literatürde; limonenin her iki küf ile ilgili antifungal etkisi üzerine bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak; Limonenin, yalnızca turunçgillerde yeşil küf çürümesine neden olan konakçıya özgü bir mantar olan *P. digitatum*'un inaktivasyonuna katkıda bulunduğı bildirilmiştir (Droby ve ark., 2008, Rodriguez ve ark.,2014).

Tez çalışması kapsamında H-L, F-L, H-Lp, F-Lp, H-HPβSD, F-HPβSD ve H-βSD, F-βSD kağıt örneklerinin 1, 3, 5, 15. ve 30.günlerde *P. expansum* ve *P. digitatum* küfleri üzerine gösterdiği antifungal etki disk difüzyon yöntemine göre incelenmiştir. Ancak yapılan görsel incelemelerde yalnızca F-HPβSD örneklerinde depolamanın 5. gününe kadar zon oluşumu olduğı gözlenmiştir. HPβSD kullanarak kaplanan kağıt örneklerinin iki farklı mikroorganizmaya karşı oluşturdukları zon ölçümleri Çizelge 4.6’da verilmiştir.

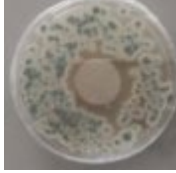
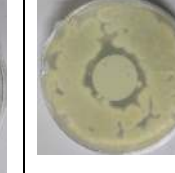
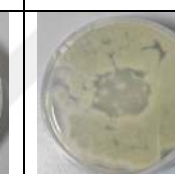
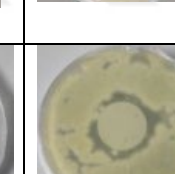
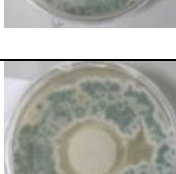
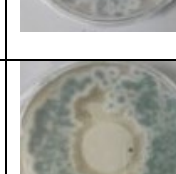
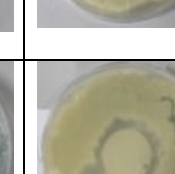
Çizelge 4.6. Çalışmada kullanılan kağıt örneklerinin iki farklı mikroorganizmaya karşı oluşturdıkları zon ölçümleri

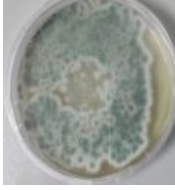
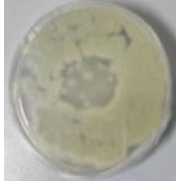
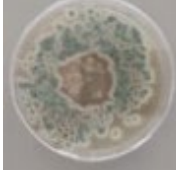
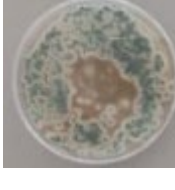
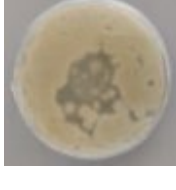
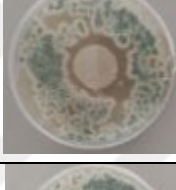
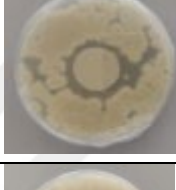
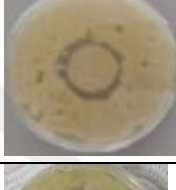
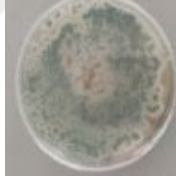
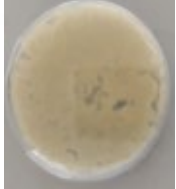
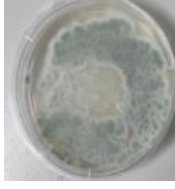
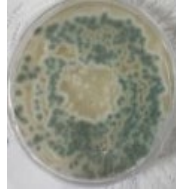
	1.gün(mm)		3. gün(mm)		5. gün(mm)	
	H- HPβSD	F- HPβSD	H- HPβSD	F- HPβSD	H- HPβSD	F- HPβSD
<i>Penicillium expansum</i>	5,56	6,07	2.11	4,47	x	5,07
	2,76	6,20	x	3,50	x	5,27
<i>Penicillium Digitatum</i>	6,46	7,75	3,39	4,93	x	5,60
	3,30	5,30	3,11	4,83	x	4,80

X: Zon ölçümü yapılamamıştır.

Gerek H-HPβSD, gerekse F-HPβSD örneklerinin depolamanın 15. ve 30. günlerinde hedef mikroorganizmalara karşı bir zon oluşturmadığı görülmüştür. Filtre esaslı kağıt kaplamalarda kağıtta kalan limonen içeriği fazlalığı antifungal aktivite analizinde zon çapı büyüklüğü olarak tespit edilmiştir

Şekil 4.11.'de ise; zon çapı sadece HPβSD ile kaplanan kağıtlarda görüldüğünden D-limonen içerikli HPBSD inklüzyon kompleksi ile oluşturulan filtre ve hutupak kağıtların *Penicillium Expansum* ve *Penicillium Digitatum*'a karşı oluşturdıkları disk difüzyon sonuçları verilmiştir.

1.GÜN FİLTRE KAĞIDI	<i>Penicillium expansum</i>				
	<i>Penicillium Digitatum</i>				
1.GÜN HUTPAK KAĞIDI	<i>Penicillium expansum</i>				
	<i>Penicillium Digitatum</i>				
3.GÜN FİLTRE KAĞIDI	<i>Penicillium expansum</i>				
	<i>Penicillium Digitatum</i>				

3.GÜN HUTPAK KAĞIDI	<i>Penicillium expansum</i>				
	<i>Penicillium Digitatum</i>				
5.GÜN FİLTRE KAĞIDI	<i>Penicillium expansum</i>				
	<i>Penicillium Digitatum</i>				
5.GÜN HUTPAK KAĞIDI	<i>Penicillium expansum</i>				
	<i>Penicillium Digitatum</i>				

Şekil 4.11. D-Limonen içerikli HPβSD inklüzyon kompleksi ile oluşturulan filtre ve hutpak kağıtların *penicillium expansum* ve *penicillium digitatum* 'a karşı oluşturdukları disk difüzyon sonuçları

Ayrıca; uçucu yağların petrinin içinde etki gösterme alanı zon oluşturmaları ile sınırlı olmadığından etki gördüğümüz HPβSD ile kaplanan kağıtlarda “image j”

programı kullanılarak petrilerdeki morfolojik görüntüler programda işlenmiş ve oluşan boşlukların boyutu matematiksel olarak işlenmiştir. D-Limonen içerikli HPBSD inklüzyon kompleksi ile oluşturulan filtre ve hutupak kağıtların *Penicillium Expansum* ve *Penicillium Digitatum*'a karşı oluşturdukları disk difüzyon sonuçlarının image j programı ile ölçülen sonuçları Çizelge 4.7.'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. D-Limonen içerikli HPBSD inklüzyon kompleksi ile oluşturulan filtre ve hutupak kağıtların *Penicillium Expansum* ve *Penicillium Digitatum*'a karşı oluşturdukları disk difüzyon sonuçlarının image j programı ile ölçülen sonuçları

GÜN	F-HPBSD (mm ²)		H-HPBSD (mm ²)	
	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Penicillium Digitatum</i>	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Penicillium Digitatum</i>
1.	1.617,12	1.857,35	1171,41	1456,40
3.	1.354,17	1.682,08	1056,48	1268,90
5.	1.287,31	1.578,40	887,83	982,87
15.	456,26	675,24	326,59	365,86
30.	256,59	336,99	186,59	254,64

Çizelge 4.7 incelendiğinde 5. günden sonra petride bulunan küf oluşmamış boşlukların miktarının oldukça azaldığı görülmektedir. Filtre ve hutupak kağıtların bulunduğu petri kaplarında 15. ve 30. günde tamamiyle üreme gözlenmiştir.

Umagiliyaea ve ark. (2017), yapmış olduğu çalışma sonucunda; gıda kaynaklı hastalıklara neden olan bakteriler (*Escherichia coli* ve *Listeria monocytogenes*) ve meyve çürümesine neden olan mantarlara (*Botrytis cinerea* ve *Penicillium*) karşı D-Limonen içeren lipozomların antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. Yapılan çalışmada; 48 saat içinde *E. coli*'ye karşı 10 mM ve 50

mM konsantrasyonda limonenin sırasıyla 0.99 ve 1.6 kat azalma gösterdiği; *L. monocytogenes* için ise; 10 mM'de 1.6 ve 50 mM'de 3.4 katlık azalma olduğu gözlenmiştir. Gram pozitif bakteri *L. monocytogenes*, enkapsüle limonen içerikli lipozomlarına karşı daha yüksek duyarlılık göstermiştir. Lipozomlar, *P. chrysogenum* için 2,2 ve 2,8 logaritmik azalma sergilerken, *Botrytis cinerea* için 10 mM ve 50 mM'da sırasıyla 3,7 ve 4,6 logaritmik azalma gözlenmiştir. D-Limonen içeren lipozom enkapsülasyon yöntemiyle, yaban mersininin raf ömrü ve gıda güvenliği çerçevesinde değerlendirilmiştir. Çalışmada yaban mersini üzerindeki lipozom kaplamaların 4°C depolamada 9 haftaya kadar mikrobiyel koruma sağladığı görülmüş olup, kontrol grubunda 5 kat daha fazla çürüme gözlenmiştir.

Joshi ve ark. (2021), böğürtlenin raf ömrünün iyileştirilmesi için yenilebilir aljinat ve limonen-lipozom kaplamalarının kullanıldığı çalışmalarında; depolamanın 16. ve 20. günlerinde enkapsüle limonen içerikli lipozom ile muamele edilmiş meyveler, kaplanmamış meyvelere kıyasla düşük görünür küf oluşumuna sahipken, aljinat kaplı meyveler, yalnızca 16. gündeki kontrole kıyasla daha düşük görünür küf oluşumu göstermiştir. Limonen ve aljinat kaplama işlemleriyle kaplanan böğürtlenlerde görünür küf oluşumunda önemli bir fark gözlenmediği, maya ve küf sayılarının karşılaştırılması yapıldığında limonen içerikli lipozom ile muamele edilmiş meyvelerin depolamanın 1, 7 ve 12. günlerinde daha düşük küf sayılarına sahip olduğu bildirilmiştir (Umagiliyage ve ark., 2017).

Zahi ve ark., (2015), D-limonen içeren nano-emülsiyonlardan *E. coli*'yi inhibe etmek için 12,5 µg/mL gerekiyken, gram pozitif bakteri *Staphylococcus aureus* için 3,125 µg/mL gerektirmiştir. Sonuçlar, gram negatif bakteriye (*E. coli*) kıyasla *S. aureus* üzerinde daha büyük bir antibakteriyel etkiyi desteklemektedir. Yapılan araştırmalarda; limonene karşı gram pozitif ve gram negatif duyarlılık arasındaki farkın; bakteri zarlarının nispi geçirgenlik farklılıkları ve gram negatif bakterinin periplazmik boşluğunda bulunan hidrolitik enzimler tarafından biyoaktif bileşenlerin bozunmasından kayanabileceği belirtilmiştir (Seow ve ark., 2014).

Donsi ve ark. (2011), uçucu yağ özelliği gösteren bir terpen karışımını ve D-limoneni 300 MPa’da yüksek basınç homojenizatörü kullanarak nanoemülsiyon yöntemiyle enkapsüle etmiş ve farklı mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkisini incelemiştir. Hazırlanan nanoemülsiyonlar, *L. delbrueckii* inoküle edilmiş portakal ve armut suyu gibi meyve sularının da içine eklenmiş ve nanoemülsiyonların düşük konsantrasyonlarda (1 g/L), mikrobiyel çoğalmayı yavaşlattığını, yüksek konsantrasyonlarda (5 g/L) ise tamamen inaktivasyon sağladığını göstermiştir. Meyve sularında duyuusal anlamda ciddi bir değişiklik olmadığı da çalışmada belirtilmiştir.

Literatür incelendiğinde; limonenin hidroksipropil- β -siklodekstrin veya β -siklodekstrin ile enkapsüle edilmesi ve antimikrobiyal aktivitesinin araştırılması hususunda herhangi bir çalışma mevcut değildir. Ancak; farklı uçucu yağlarla oluşturulan inklüzyon komplekslerinde antimikrobiyal aktivite gözlenmiştir.

Hou ve ark.,(2021), HP β SD ve tarçın esansiyel nanoemülsiyon oluşumu, antibakteriyel aktivite, salım özelliği ve stabilitesi üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada; *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus*’a karşı HP β SD tarçın nanoemülsiyonlarının antimikrobiyal aktivitesinin artmasına katkıda bulunduğunu ve en iyi etkiyi HP β SD konsantrasyonu 30 g/L olduğunda gösterdiği belirlenmiştir. HP β SD yapısındaki boşluğunun tarçın uçucu yağının kaybını azaltmaya yardımcı olduğunu, böylece salınım süresini geciktirdiğini ve antibakteriyel etkiyi arttırdığı tespit edilmiştir.

Rakmai ve ark., (2018), yapmış olduğu çalışmada; guava yaprağı yağı HP β SD ile inklüzyon kompleksi oluşturulmuş ve antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Guava yaprağı yağında ana bileşenin limonen olduğunu (%53-58), *S. aureus* ve *E. Coli* için her ikisinde de MIC değeri 500 μ g/mL olduğu belirlenmiş, limonen monotерpenlerin membran akışkanlığını ve geçirgenliğini artıran membran yapıları yoluyla antimikrobiyal aktivitede etkin rol oynadığı belirlenmiştir. Guava yaprağı yağı ve HP β SD ile oluşturulan inklüzyon kompleksi

neticesinde; *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı antibakteriyel etkinin sırasıyla 4 kat ve 2 kat arttığı bildirilmiştir.

HPβSD ile oluşturulan inklüzyon komplekslerinin, kapsüllenmiş moleküllerin suda çözünürlüğünü artırabileceği ve böylece aktif bileşiklerin hücrelere daha iyi erişilebilirliği nedeniyle uçucu yağların daha düşük konsantrasyonlarda antimikrobiyal etkinliğini iyileştirebileceği bildirilmiştir (Hillveark.,2013).





5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Özellikle son yıllarda gıda ambalaj teknolojilerinde aktif ambalajlama konusunda çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Sentetik katkı maddelerinin potansiyel tehlikeleri, nedeniyle tüketicilerin doğal bileşenlere olan artan talebi, uluslararası pazarlarda yer alma isteği ve buna paralel hassas gıda materyallerinin korunmasını sağlayarak raf ömrünü uzatmak, gıda bileşenlerinin biyoyararlılığını arttırmak, maddenin taşınması ve depolanmasını kolaylaştırmak, istenmeyen tat ve kokuyu maskeleyerek gibi başlıklar yeni ambalajlama teknolojilerinin gelişmesine olanak sunmuştur.

Çalışmamızda; antimikrobiyal etkiye sahip D-limonenin uçuculuğunun azaltılarak, çevre faktörlerine karşı stabilitesini korumak, istenilen oranlarda kontrollü şekilde salımını gerçekleştirmek için daha verimli yararlanabilmek için, lipozom yöntemi ve siklodekstrin inklüzyon kompleksi oluşturularak enkapsüle edilmiş hutpak ve filtre kağıtlarla birleştirilmiştir. Çalışma kapsamında; D-Limonenin *Penicillium expansum* ve *Penicillium digitatum*'a karşı MİK değerinin 842 µg/mL olduğu belirlenmiştir.

Limonenin β SD ile oluşturduğu inklüzyon komplekslerinin enkapsülasyon etkinliği ortalaması %82,1, yükleme kapasitesi ise %36,6 olarak hesaplanmıştır. HP β SD ile oluşturduğu inklüzyon komplekslerinin enkapsülasyon etkinliği %99,0, yükleme kapasitesi ise %29,2 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar incelendiğinde; HP β SD ile oluşturduğu inklüzyon kompleksinde enkapsülasyon etkinliğinin ortalaması yüksek çıktığı, ancak yükleme kapasitesinin, β SD ile oluşturulan inklüzyon kompleksiyle kıyasla daha düşük bir değere sahip olduğu belirlenmiştir. D-Limonenin, lipozom ile enkapsüle edilmesinde enkapsülasyon etkinliği değeri %33,0 yükleme kapasitesi değeri ise %22,6 olarak belirlenmiştir.

Daldırma yöntemiyle hutupak ve filtre kağıtları limonen (yalın veya enkapsüle) ile birleştirilmiş elde edilen kağıtların renk özelliklerindeki değişim incelendiğinde; HPβSD inklüzyon kompleksi ile kaplanan kağıtlarda renk farklılığı değerinin diğer kaplama yöntemlerine göre daha büyük değerlere neden olduğu belirlenmiştir. Yine HPβSD inklüzyon kompleksi ile kaplanan kağıtların germe testi sonuçlarına göre; kaplama yapılmamış kağıtlara göre, gerilme mukavemeti değerlerinin artış gösterdiği ancak uzama değerlerinin azaldığı belirlenmiştir. βSD inklüzyon kompleksi ile kaplanan kağıtların germe mukavemeti değerlerinde kaplama yapılmamış kağıtlara göre önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Lipozom çözeltisiyle kaplanan kağıtların kopmaya karşı dayanımlarının önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir.

Aktif kağıtların 1. 3. 5. 7. 15. ve 30. günlerde kağıtta kalan D-Limonen miktarı incelendiğinde; hem 4°C hemde 25°C’de depolanan kağıtlarda en yüksek değerler, βSD ile kaplanmış olanlarda belirlenmiştir. Depolama sıcaklıkları göz önünde bulundurulduğunda 4 °C’de depolanan kağıtlarda kalan limonen miktarının 25 °C’deki depolamadaki kağıtlara göre genel olarak daha yüksek değerlerde olduğu belirlenmiştir. 4°C’de depolanan hutupak kağıtların 1.gün ve 30.gün limonen içerikleri, serbest limonenle kaplananlarda; 4,64 -2,09 µg/cm², H-βSD örneklerinde; 90,77-22,08 µg/cm², -HPβSD örneklerinde;16,74-2,96 µg/cm², H-Lp örneklerinde ise; 4,78-1,30 µg/cm² olarak belirlenmiştir. 4 °C’de depolanan filtre kağıtlarda ise; 1.gün ve 30. gün limonen içerikleri, serbest limonenle kaplananlarda; 6,38-1,45 µg/cm², H-βSD örneklerinde; 132,73 -69,53 µg/cm², HPβSD örneklerinde; 16,42-6,26 µg/cm², H-Lp örneklerinde ise; 4,26-1,31 µg/cm² olarak belirlenmiştir.

Tez çalışması sonucunda; D-Limonen içerikli aktif özellikte kağıt ambalajlar üretilmiştir. D-limonen içerikli aktif filtre ve hutupak kağıtların *Penicillium expansum* ve *Penicillium digitatum*’a karşı oluşturdukları antimikrobiyal aktivite 1. 3. 5. 15. ve 30. günlerde kontrol edilmiştir. Zon çapı

sadece HPβSD ile kaplanan kağıtlarda oluşmuştur. 5. güne kadar zon gözlenmiştir. 15. ve 30. günlerde herhangi bir zon çapı oluşmamıştır. Yalın halde limonen ile kaplanan kağıtlarda limonenin gerek hutpak gerekse filtre kağıtlarda hızlı bir şekilde uzaklaştığı ve antifungal etkisinin sınırlı kaldığı tespit edilmiştir.

Enkapsülasyon teknolojisinden yararlanarak yapılan üretimler sonucunda; limonen içeriğinin kağıtta uzun süre tutulabileceği belirlenmiştir. Lipozom yönteminde yapılan üretimlerde başlangıç limonen içeriği düşük olduğu için depolama süresince düşük limonen değerleri tespit edilmiş, kağıtların mekanik özelliklerinin zayıfladığı belirlenmiştir. βSD inklüzyon kompleksiyle yapılan kaplamalarda, kağıtların renk farklılığı ve mekanik özelliklerindeki değişim kontrol grubuna göre en az görülmüştür. Gerek hutpak gerekse filtre kağıtlarda en yüksek limonen içeriği değerleri tespit edilirken antifungal etkisi sınırlı kalmıştır. Her ne kadar βSD inklüzyon kompleksi ile oluşturulan aktif kağıtların limonen içerikleri fazla olsada; antifungal çalışmada (in vitro olarak yapılan disk difüzyon yöntemine göre) HPβSD ile kaplanan kağıtlarda yüksek etki görülmüştür. Bu durumu HPβSD'in suda çözünürlüğünün daha yüksek olması ve limonenin kolayca ortama bırakmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. HPβSD inklüzyon kompleksiyle yapılan kaplamalarda homojen ve pürüzsüz bir kaplama olması bu yöntemi diğerlerine göre ön plana çıkarmıştır.

Özellikle üretilen hutpak esaslı aktif kâğıtların meyve ve sebzelerin sarılarak muhafazasında mum ve parafin gibi kimyasallara alternatif olabileceği düşünülmektedir. Gelecek çalışmalarda; üretilen kâğıtların gerçek gıdalar üzerinde denenmesi önerilmektedir.



KAYNAKLAR

- Abbas, S., Da Wei, C., Hayat, K., Zhang, X. M. 2012. Ascorbic Acid: Microencapsulation Techniques and Trends-A Review. *Food Reviews International*, 4 (28), 343-374.
- Acar, J., 1986. Soğukta depolanan limonlardaki küfler üzerine radyasyon ve difenilli ambalaj kağıtlarının etkisi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Acevedo-Fani, A., Salvia-Trujillo, L., Rojas-Grau, M. A., & Martin-Belloso, O. 2015. Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. *Food Hydrocolloids*, 47, 168–177.
- Akbaş, D., 2017. Design Of Cinnamon Oil Coated Active Paper Sheets. Master of Science in Food Engineering Department, Middle East Technical University, 154.
- Akçakoca, P.E. ve Atav, R. 2006. Siklodekstrinlerin İnklüzyon Kompleksleri. *Tekstil ve Konfeksiyon Dergisi*
- Akgün, D., Gültekin-"Ozgüven, M., Yüce, A., Altın, G., Gibis, M., Weiss, J. 2020. Stirred-type yoghurt incorporated with sour cherry extract in chitosan-coated liposomes. *Food Hydrocolloids*, 101.
- Akhter, R., Masoodi, F. A., Wani, T. A., & Rather, S. A. 2019. Functional characterization of biopolymer based composite film: Incorporation of natural essential oils and antimicrobial agents. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137, 1245–1255.
- Alexandre, E. M. C., Lourenco, R. V., Bittante, A. M. Q. B., Moraes, I. C. F., & do Amaral Sobral, P. J. 2016. Gelatin-based films reinforced with montmorillonite and activated with nanoemulsion of ginger essential oil for food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*, 10, 87–96.

- Amjadi, S., Ghorbani, M., Hamishehkar, H., & Roufegarinejad, L. (2018). Improvement in the stability of betanin by liposomal nanocarriers: Its application in gummy candy as a food model. *Food Chemistry*, 256, 156–162.
- Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P., 2006. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4364–4370.
- Araujo, H.C., Lacerda, M.E.G., Lopes, D., Bizzo, H.R. and Kaplan, M.A.C. 2007. Studies On The Aroma Of Mate (*Ilex paraquariensis* St.Hil.) Using Headspace Solid-Phase Microextraction. *Phytochemical Analysis*. 18: 469-474.
- Arrieta, M.P., López J., Ferrándiz S., Peltzer M. A., 2013. Characterization of PLA-limonene blends for food packaging applications *Polymer Testing* 32:760–768.
- Attokaran, M. 2017. Methods of Extraction of Essential Oils. *Natural Food Flavors and Colorants* (pp. 26–30).
- Avcı, A., ve Dönmez, S., 2010. Siklodekstrinler ve Gıda Endüstrisinde Kullanımları. *Gıda Dergisi*, 35(4): 305-312.
- Bacanli, M., Anlar, Hg., Aydın S., Çal T., Ari N., Ündeğer Bucurgat Ü., Başaran Aa, Başaran N. 2017. D-Limonene Ameliorates Diabetes And Its Complications In Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Food Chem Toxicol.* 110:434- 442.
- Bajpai, VK., Baek, KH., Kang, SC.2012. Control of Salmonella in foods by using essential oils: a review. *Food Res Int* 45:722-34.
- Bakkalı, F., Averbek, S., Averbek, D., İdaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils-a review”. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 46-475.

- Beristain, C.I., Garcia, H.S., Carter, J. 2001. Spray dried encapsulation of cardamom (*Elettaria cardamomum*) essential oil with mesquite (*Prosopis juliflora*) Gum". Food Science and Technology, 34, 398-401.
- Bhandari, B., ve D'Arcy, B., 1998. Lemon oil to β - cyclodextrin Ratio Effect on the inclusion efficiency of β - cyclodextrin and the retention of oil volatiles in the complex. J. Agric. Food Chem. 46: 1494- 1499.
- Bhandari, B., ve D'Arcy, B., and Padukka I., 1999. Encapsulation of Lemon Oil by Paste Method Using α -Cyclodextrin: Encapsulation Efficiency and Profile of Oil Volatiles . J. Agric. Food Chem. 47:5194-5197
- Buendía- Moreno, L., Soto- Jover, S., Ros- Chumillas, M., Antolinos- L'opez, V., Navarro-Segura, L., S'anchez- Martínez, M. J., 2020. An innovative active cardboard box for bulk packaging of fresh bell pepper. Postharvest Biology and Technology, 164, 111171.
- Buendía-Moreno, L., Soto- Jover, S., Ros- Chumillas, M., Antolinos, V., Navarro-Segura, L., S'anchez-Martínez, M. J., 2019. Innovative cardboard active packaging with a coating including encapsulated essential oils to extend cherry tomato shelf life. LWT, 116, 108584.
- Burt, S., 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International Journal of Food Microbiology, 94(3), 223–253.
- Buschmann, H-J., Denter, U., Knittel, D., Schollmeyer, E. 1998. The Use of Cyclodextrins in Textile Processes-an overview, Journal of Textile Institute, Vol. 89-part1, No. 3, s. 554-561.
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L., Ferret, A. 2007. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. J Dairy Sci;90:2580-95.
- Cassani, L., Gomez-Zavaglia, A., & Simal-Gandara, J. 2020. Technological strategies ensuring the safe arrival of beneficial microorganisms to the gut:

From food processing and storage to their passage through the gastrointestinal tract. *Food Research International*, 129.

Çetin, H., 2014. Karanfil Uçucu Yağının Siklodekstrinler ile Mikroenkapsülasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

Chen, Y., Nie, X., Cui, X., Wu, W., Zhang, J., Wen, C., Lu, J. 2011. Direct colorimetric biosensors from polydiacetylenes. *Current Organic Chemistry*, 15(4), 518–533.

Cho, S. Y., Rhee, C., 2002. Sorption Characteristics of Soy Protein Films and Their Relation to Mechanical Properties, *Lebensm.-Wiss. Technology*, 35: 151–157.

Cristina M.S., Cristian P.V., Plinio C.L., Johana L.P. 2021 Encapsulation of plant extract compounds using cyclodextrin inclusion complexes, liposomes, electrospinning and their combinations for food purposes. *Trends in Food Science & Technology* 108 (2021) 177–186.

Cserhalmi, Z., Sass-Kiss, A., Toth-Markus, M., Lechner, N. 2006. Study of pulsed electric field treated citrus juices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7(1–2), 49– 54.

Cui, H., Zhao, C., & Lin, L. 2015. The specific antibacterial activity of liposome-encapsulated Clove oil and its application in tofu. *Food Control*, 56, 128–134.

Da Rocha Neto, A. C., Beaudry, R., Maraschin, M., Di Piero, R. M., Almenar, E. 2019. Double-bottom antimicrobial packaging for apple shelf-life extension. *Food Chemistry*, 279(1), 379–388.

Dabbah, R., Edwards, VM., Moats, WA. 1970. Antimicrobial action of some citrus fruit oils on selected food-borne bacteria. *Applied Microbiology*, 19, 27–31.

De Barros Fernandes, R.V., Borges, S.V., Silva, E.K., da Silva. Y.F., de Souza. H.J.B.,do Carmo, E.L., de Oliveira, C.R., Yoshida, M.I. and Botrel, D.A.

2016. Study of ultrasound-assisted emulsions on microencapsulation of ginger essential oil by spray drying. *Industrial Crops and Products*, 94, 413-423.
- Deans, S.G., Dorman, H.J.D., 2000. Antimicrobial Agents from Plants: Antibacterial Activity of Plant Volatile Oils, *J. Appl. Microbiol.*, 88, 308.
- Desai, K.G.H., and Park. H.J., 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, Vol. 23: 1361–1394.
- Dhitala R., Morab N.B., Watsona D.G., Kohlib P., Choudhary R. 2018. Efficacy of limonene nano coatings on post-harvest shelf life of strawberries. *LWT - Food Science and Technology*, 97: 124–134.
- Donsi, F., Annunziata, M., Sessa, M., Ferrari, G. 2011. "Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods", *Food Science and Technology*, 44, 1908-1914.
- Dorman, H.J., Deans, S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308–316.
- Dos Santos Paglione, I., Galindo, M. V., de Medeiros, J. A. S., Yamashita, F., Alvim, I. D., Ferreira Grosso, C. R., Shirai, M. A. 2019. Comparative study of the properties of soy protein concentrate films containing free and encapsulated oregano essential oil. *Food Packaging and Shelf Life*. 22.
- Droby, S. Eick, A., Macarasin, D. Cohen, L. Rafael, G. Stange, R. Role of citrus volatiles in host recognition, germination and growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* *Postharvest Biology and Technology*, 49 (2008), pp. 386-396.
- El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. A., Casabianca, H., ElMousadik, A., Hartmann, D., Jilale, A. Renaud, F., 2015. Essential oils: from extraction to encapsulation. *International journal of pharmaceutics*, 483 (1-2), 220-243.

- El-Said, M. M., El-Messery, T. M., & El-Din, H. M. 2018. The encapsulation of powdered doum extract in liposomes and its application in yoghurt. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 17, 235–245.
- Elson, CE., Maltzman, TH., Boston, JL., Tanner MA, Gould MN. 1988. Anti-carcinogenetic activity of D-Limonene during the initiation and promotion/progression stages of DMBA-induced rat mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis* (London), 9, 331-332.
- Erdik, E., 2008. *Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler*, Gazi Kitabevi, Ankara, 531.
- Esposto, B. S., Jauregi, P., Tapia-Blácido, D. R., & Martelli-Tosi, M. (2020). Liposomes vs. chitosomes: Encapsulating food bioactives. *Trends in Food Science & Technology*, 108, 40- 48
- FDA, 2017. US Food and Drug Administration, Fed. Regist. 74, 11476.
- Feng, K., Wen, P., Yang, H., Li, N., Lou, W. Y., Zong, M. H., Wu, H., 2017. Enhancement of the antimicrobial activity of cinnamon essential oil-loaded electrospun nanofilm by the incorporation of lysozyme. *RSC advances* , 7(3): 1572-1580.
- Fenyvesi, Vikmon, M., Szente, L. 2016. Cyclodextrins in food technology and human nutrition: Benefits and limitations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56 (12), 1981–2004
- Germinara, G.S., M.G. Di Stefano, L. De Acutis, S. Pati, S. Delfine, A. De Cristofaro. 2017. Bioactivities of *Lavandula angustifolia* essential oil against the stored grain pest *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera, Curculionidae) *Bulletin of Insectology*, 70 (1) 129-138.
- Ghorbanzade, T., Jafari, S. M., Akhavan, S., Hadavi, R. 2017. Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. *Food Chemistry*, 216, 146–152.

- Gökmen, S., Palamutoğlu, R., ve Sarıçoban, C. 2012. Gıda Endüstrisinde Enkapsülasyon Uygulamaları. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 7(1),: 36-50.
- Gönülşen, İ., 2013. Portakal Yağı İçeren Mikro Ve Moleküler Kapsüllerin Salım Davranışlarının İncelenmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.
- Gültekin-Özgüven, M., Karadağ, A., Duman, Ş., Özkal, B., Özçelik, B. 2016. Fortification of dark chocolate with spray dried black mulberry (*Morus nigra*) waste extract encapsulated in chitosan-coated liposomes and bioaccessability studies Food Chemistry, 201 pp. 205-212.
- GültekinÖzgüven,M., Karadağ, A., Ş. Duman., B, Özkal, B., Özçelik, Z. 2016. Fortification of dark chocolate with spray dried black mulberry (*Morus nigra*) waste extract encapsulated in chitosan-coated liposomes and bioaccessability studies Food Chemistry, 201 pp. 205-212.
- Haag, JD., Lindstrom, MJ., Gould, MN. 1992 Limonene induced regression of mammary carcinomas. Cancer Research, 52, 4021-4026.
- Haag, KH. 1986. Effects of herbicide application on mortality and dispersive behavior of the water hyacinth weevils, *Neochetina eichhorniae* and *Neochetina bruchi* (Coleoptera: Curculionidae). Environmental Entomology, 15, 1192-1198.
- Hajhashemi, V., Ghannadi, A., Sharif, B ., 2003. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. J. Ethnopharmacol. 89, 67–71.
- Hassoun, A., Emir Çoban, "Ö. (2017). Essential oils for antimicrobial and antioxidant applications in fish and other seafood products. Trends in Food Science and Technology, 68, 26-36.
- Herrera, A., J. Rodríguez, F., Bruna, J. E., Abarca, R. L., Galotto, M. J., Guarda, A., Mascayano, C., Yáñez, C. S., Padula M., Felipe, F. R. S. 2019. Antifungal and physicochemical properties of inclusion complexes based

- on β -cyclodextrin and essential oil derivatives. *Food Research International* 121 (2019) 127–135.
- Hill, L.E., Gomes, C., Taylor, T.M., 2013. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *LWT–Food Sci. Technol.* 51, 86–93.
- Ho, S., Thoo, Y. Y., Young, D. J., & Siow, L. F. 2017. Inclusion complexation of catechin by β -cyclodextrins: Characterization and storage stability.
- Hou, K., Xu, Y., Cen, K., Cheng, C., Feng, G.X., Tang, X. 2021. Nanoemulsion of cinnamon essential oil Co-emulsified with hydroxypropyl- β -cyclodextrin and Tween-80: Antibacterial activity, stability and slow release performance, *Food Bioscience*, Volume 43.
- Jackson, L.S., Lee, K., 1991. Microencapsulation and the Food Industry". *Food Science and Technology*, 24, 289-297.
- Jafari, S.M., Assadpoor, E., He, Y., Bhandari, B., 2008. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during drying. *Drying Technology* 26, (7): 816–835.
- Jamroz, E., Juszczak, L., & Kucharek, M. 2018. Investigation of the physical properties, antioxidant and antimicrobial activity of ternary potato starch-furcellaran-gelatin films incorporated with lavender essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 1094–1101.
- Jesorka, A., and Orwar, O. 2008. Liposomes: Technologies and Analytical Applications." *Annu. Rev. Anal. Chem.* 1: 801–832.
- Joshi, P., Becerra, N., Mora, A., Fisher, J., Lizarazo, A., Kohli, P., Choudhary R.. 2021. Use of edible alginate and limonene-liposome coatings for shelf-life improvement of blackberries *Journals & Books*.
- Kailasapathy, K., 2002. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current Issues in Intest Microbiology*, 3 (2): 39–48.

- Kalagatur, N. K., Mudili, V., Kamasani, J. R., & Siddaiah, C. 2018. Discrete and combined effects of Ylang-Ylang (*Cananga odorata*) essential oil and gamma irradiation on growth and mycotoxins production by *Fusarium graminearum* in maize. *Food Control*, 94, 276–283.
- Kamimura, J.A., Santos, E.H., Hill, L.E., Gomes, C.L. 2014. Antimicrobial and antioxidant activities of carvacrol microencapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Food Science and Technology*, 57: 701-709.
- Karr LL, Coats JR. 1992. Effects of four monoterpenoids on growth and reproduction of the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*, 85, 425-429.
- Keinan, E., Att, A., Amir, G., Bentur, L., Bibi, H., Shoseyov, D. 2005. Natural ozone scavenger prevents asthma in sensitized rats. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13, 557-562.
- Kfoury, M., Landy, D., Ruellan, S., Auezova, L., Greige-Gerges, H., & Fourmentin, S. 2016. Determination of formation constants and structural characterization of cyclodextrin inclusion complexes with two phenolic isomers: Carvacrol and thymol. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 12, 29–42.
- Kheadr, E. E., Vuillemand, J. C., El-Deeb, S. A. 2003. Impact of liposome-encapsulated enzyme cocktails on cheddar cheese ripening. *Food Research International*, 36, 241–252.
- Khoshakhlagh, K., Koocheki, A., Mohebbi, M., & Allafchian, A. (2017). Development and characterization of electrosprayed *Alyssum homolocarpum* seed gum nanoparticles for encapsulation of d-limonene. *Journal of Colloid and Interface Science*, 490, 562–575.
- Khoshtinat, K., Barzegar, M., Sahari, M. A., & Hamidi, Z. 2017. Encapsulation of Iranian garlic oil with β -cyclodextrin: Optimization and its characterization. *Journal of Agricultural Science and Technology A*, 19(1), 97–111.

- Khwalidia, K., Arab-Tehrany, E., & Desobry, S. 2010. Biopolymer Coatings on Paper Packaging Materials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(1), 82–91.
- Kim S., Cho S.Y., Kim S.H., Song O., Shin S., Cha D.S., Park H.J., 2008. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC43121. *LWT-Food Science Technology*, 41 (3): 493–500.
- Kirby, C. J., Brooker, B. E., & Law, B. A. 1987. Accelerated ripening of cheese using liposome-encapsulated enzyme. *International Journal of Food Science and Technology*, 22, 355–375.
- Kırtıl, E., Öztop M.H., 2014. Enkapsülasyon Maddesi Olarak Lipozom ve Gıdalarda Kullanımı: Yapısı, Karakterizasyonu, Üretimi ve Stabilitesi *Akademik Gıda*, 12(4): p. 41-57.
- Koynova, R., Caffrey, M. 1998. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochim Biophys Acta*, 1376(1): p. 91-145.
- Kulkarni, J. A., Darjuan, M. M., Mercer, J. E., Chen, S., Van Der Meel, R., Thewalt, J. L., 2018. On the formation and morphology of lipid nanoparticles containing ionizable cationic lipids and siRNA. *ACS Nano*, 12(5), 4787–4795.
- Laridi, R., Kheadr, E. E., Benech, R. O., Vuilleumard, J. C., Lacroix, C., & Fliss, I. 2003. Liposome encapsulated nisin Z: Optimization, stability and release during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 13, 325–336.
- Lasch, J., Weissig, V., Brandl, M. 2003; *Preparation of liposomes*, 2nd Ed., Oxford University Press, 3-29.
- Law, B. A., & King, J. S. 1985. Use of liposomes for proteinase addition to Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 52, 183–188.
- Laye, C., McClements, D.J., Weiss, J., 2008. Formation of biopolymer-coated liposomes by electrostatic deposition of chitosan. *Journal of Food Science*, 73(5): N7-N15.

- Lee, J. Y., Garcia, C. V., Shin, G. H., Kim, J. T. 2019. Antibacterial and antioxidant properties of hydroxypropyl methylcellulose-based active composite films incorporating oregano essential oil nanoemulsions. *LWT*, 106: 164-171.
- Lembo, D., Swaminathan, S., Donalisio, M., Civra, A., Pastero, L., Aquilano, D., Vavia, P., Trotta, F., & Cavalli, R. 2013. Encapsulation of Acyclovir in new carboxylated cyclodextrin-based nanosponges improves the agent's antiviral efficacy. *International Journal of Pharmaceutics*, 443(1–2), 262–272.
- Lin, L., Zhang, X., Zhao, C., & Cui, H. 2016. Liposome containing nutmeg oil as the targeted preservative against *Listeria monocytogenes* in dumplings. *RSC Advances*, 6, 978–986.
- Lin, L., Zhu, Y., & Cui, H. 2018. Electrospun thyme essential oil/gelatin nanofibers for active packaging against *Campylobacter jejuni* in chicken. *Lwt*, 97(August), 711–718.
- Liu Y., Liu P., Wang L., Shi Y., Chen Jing., Wang H., Zhang X 2000. Inhibitory effects of citrus lemon oil and limonene on *Streptococcus sobrinus* – Induced dental caries in rats. *Archives of Oral Biology* 118 104851
- Liu, W., Hou, Y., Jin, Y., Wang, Y., Xu, X., Han, J. 2020. Research progress on liposomes: Application in food, digestion behavior and absorption mechanism *Trends in Food Science & Technology* 104 (2020) 177–189.
- Liu, W., Lu, J., Ye, A., Xu, Q., Tian, M., Kong, Y., 2018. Comparative performances of lactoferrin-loaded liposomes under in vitro adult and infant digestion models. *Food Chemistry*, 258, 366–373.
- Liu, W., Tian, M., Kong, Y., Lu, J., Li, N., & Han, J. 2017. Multilayered vitamin C nanoliposomes by self-assembly of alginate and chitosan: Long-term stability and feasibility application in Mandarin juice. *LWT-Food Science and Technology*, 75, 608–615.

- Lobo, F. A. T., Silva, V., Domingues, J., Rodrigues, S., Costa, V., Falcão, D., 2018. Inclusion complexes of yellow bell pepper pigments with β - cyclodextrin: Preparation, characterisation and application as food natural colorant. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,
- Loftsson, T., Brewster, ME. 2010. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62(11):1607- 1621.
- López-Gómez A., Ros-Chumillas M., Buendía-Moreno L., Navarro-Segura L., and Martínez-Hernández G.B., 2020. Active Cardboard Box with Smart Internal Lining Based on Encapsulated Essential Oils for Enhancing the Shelf Life of Fresh Mandarins. *Foods*, 9
- Ma, S., Zhao, Z., & Liu, P. 2018. Optimization of preparation process of β -cyclodextrin inclusion compound of clove essential oil and evaluation of heat stability and antioxidant activities in vitro. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12 (3), 2057–2067.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J. and Desobry, S. 2006. Flavourencapsulation and controlled release – a review. *Int. J. Food Sci. Tech*, (41): 1–21.
- Maherani, B., Arab-Tehrany, E., Mozafari, M. R., Gaiani, C., Linder, M., 2011. Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies. *Current Nanoscience*, 3 (7), 436-452.
- Maja, L., Zeljko, K., & Mateja, P. 2020. Sustainable technologies for liposome preparation. *The Journal of Supercritical Fluids*, 165, 104984.
- Maleki, G., Sedaghat N., Woltering E. J., Farhoodi M., Mohebbi M., 2018. Chitosan-limonene coating in combination with modified atmosphere packaging preserve postharvest quality of cucumber during storage. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12:1610–1621.
- Malheiros, P. D. S., Cuccovia, I. M., & Franco, B. D. 2016. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in vitro and in goat milk by liposomal nanovesicles

- containing bacteriocins produced by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a. Food Control, 63, 158–164.
- Malheiros, P. D. S., Santanna, V., Utpott, M., & Brandelli, A. 2012b. Antilisterial activity and stability of nanovesicle-encapsulated antimicrobial peptide P34 in milk. Food Control, 23, 42–47.
- Marianna, F.D., Mariarenata, A., Giovanna, S., Davidson, F., 2011. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. Food Science and Technology, 44:1908-1914.
- Maróstica Júnior, M. R., Pastore, G. M., SilvaGilberto R.C. Nowill F.A.,2009. Antioxidant potential of aroma compounds obtained by limonene biotransformation of orange essential oil. Food Chemistry, 116 :8–12.
- Marsanasco, M., Calabro, V., Piotrkowski, B., Chiaramoni, N. S., & Alonso, S. D. V. 2016. Fortification of chocolate milk with omega-3, omega-6, and vitamins E and C by using liposomes. European Journal of Lipid Science and Technology, 118, 1271–1281..
- Marsanasco, M., M´arquez, A. L., Wagner, J. R., Alonso, S. D. V., & Chiaramoni, N. S. 2011. Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. Food Research International, 44, 3039–3046.
- Marsanasco, M., Piotrkowski, B., Calabr’o, V., Alonso, S. D. V., & Chiaramoni, N. S. (2015). Bioactive constituents in liposomes incorporated in orange juice as new functional food: Thermal stability, rheological and organoleptic properties. Journal of Food Science & Technology, 52, 7828–7838. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1924-y>.
- Martínez, T. R., García-Rodríguez, Y.M., Ríos-Chávez, P., Saavedra-Molina A., López-Meza JE., Ochoa-Zarzosa A., 2017. Antioxidant activity of the essential oil and its major terpenes of *Satureja macrostema*.(Moc. and Sessé ex Benth.) Briq.. Phcog Mag 2017;13:S875-80.

- Masotti, V., Juteau, F., Bessie`re, J.M., Viano, J., 2003. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7115–7121.
- Mine, G.-"O., Ays,e, K., S,eyma, D., "Ozkal, B., & "Ozelik, B. 2016. Fortification of dark chocolate with spray dried black mulberry (*Morus nigra*) waste extract encapsulated in chitosan-coated liposomes and bioaccessability studies. *Food Chemistry*, 201, 205–212.
- Mohsenabadi, N., Rajaei, A., Tabatabaei, M., & Mohsenifar, A. 2018. Physical and antimicrobial properties of starch-carboxy methyl cellulose film containing rosemary essential oils encapsulated in chitosan nanogel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 112, 148–155.
- Mourtzinou I, Kalogeropoulou N, Papadakis SE, Konstantinou K, Karathanos VT. 2008. Encapsulation of nutraceutical monoterpenes in β -cyclodextrin and modified starch. *J Food Sci*, 73(1), 89-94.
- Mozafari, M. R., Johnson, C., Hatziantoniou, S., & Demetzos, C. 2008. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of Liposome Research*, 18, 309–327.
- Nisar, T., Wang, Z. C., Yang, X., Tian, Y., Iqbal, M., & Guo, Y. 2018. Characterization of citrus pectin films integrated with clove bud essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 670–680.
- Oommen, E., Hummel, A., Allmannsberger, L., Cuthbertson, D., Carette, S., Pagnoux, C., Monach, P. A. 2017. Biomolecular sensing with colorimetric vesicles. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 35(1), 98–101
- zbek, T., ve Delen, N., 1995. Turunçgil meyvelerinde *Penicillium* Trlerinin Oluşturduğu Depo rklklerine Karşı Savaşım Olanakları zerinde Araştırmalar Türkiye VII. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, 26-29 Adana, 220-224.

- Ozdemir, N., Pola, C. C., Teixeira, B. N., Hill, L. E., Bayrak, A., & Gomes, C. L. 2018. Preparation of black pepper oleoresin inclusion complexes based on beta-cyclodextrin for antioxidant and antimicrobial delivery applications using kneading and freeze drying methods: A comparative study. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 91, 439–445.
- Özgün, N., 2015. Nane Uçucu Yağının Siklodekstrinler ile Mikroenkapsülasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara
- Pateiro, M., Barba, F. J., Domínguez, R., Sant’Ana, A. S., Mousavi Khaneghah, A., Gavahian, M., 2018. Essential oils as natural additives to prevent oxidation reactions in meat and meat products: A review. *Food Research International*, 113, 156–166.
- Patil, Y. P., & Jadhav, S. 2014. Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 177, 8–18.
- Penbunditkul, P., Yoshii, H., Ruktanonchai, U., Charinpanitkul, T., Assabumrungrat, S., Soottitantawat, A. 2012. The loss of OSA- modified starch emulsifier property during the high-pressure homogeniser and encapsulation of multi-flavour bergamot oil by spray drying. *Int J Food Sci Technol*, 47(11), 2325-2333.
- Pinilla, C. M. B., & Brandelli, A. 2016. Antimicrobial activity of nanoliposomes co-encapsulating nisin and garlic extract against Gram-positive and Gram-negative bacteria in milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 36, 287–293.
- Prates HT, Santos JP, Waquil JM, Fabris JD, Alvieira AB, Foster JE. 1998 Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Stored Products Research*, 34, 243-249.

- Rakmai J., Cheirsilp B., Mejuto J.C., Simal-Gándara J., Torrado-Agrasar A. 2018. Antioxidant and antimicrobial properties of encapsulated guava leaf oil in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin *Industrial Crops and Products*, 111 (2018), pp. 219-225,
- Re, M.I., 1998. Microencapsulation by spray drying. *Dry Tech*, 16 (6): 1195-1236.
- Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., de Melo, N. R., & Sanches-Silva, A. 2017. Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. *Trends in Food Science and Technology*, 61, 132–140.
- Roberto D.I., Micucci P., Sebastian T., Graciela F., Anesini C. 2010. Antioxidant Activity Of Limonene On Normal Murine Lymphocytes: relation to H₂O₂ modulation and cell proliferation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 106(1):38-44.
- Rodriguez, A., Batlle, R., Nerin, C., 2007. The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging. Part II. *Progress in Organic Coatings*, 60 (2007) 33–38.
- Rodriguez, A., Batlle, R., Nerin, C., 2008. New Cinnamon-Based Active Paper Packaging against *Rhizopus stolonifer* Food Spoilage. *J. Agric. Food Chem*, 56: 6364–6369.
- Rodríguez, A., Shimada, T., Cervera, M., Alquézar, B., Gadea, J., Gómez-Cadenas, A. Terpene down-regulation triggers defense responses in transgenic orange leading to resistance against fungal pathogens *Plant Physiology*, 164 (2014), pp. 321-339.
- Rolseth, V., Djurhuus, R., Svardal, A.M. 2002. Additive toxicity of limonene and 50% oxygen and the role of glutathione in detoxification in human lung cells. *Toxicology*, 170 (1), 75-88.
- Ruberto, G., 2002. Analyses of Volatile Components of Citrus Essential Oils. IN: Jackson J.F. and Linkens H.F.(Editors), *Analyses of Taste and Aroma*, Springer

- Saad, NY., Muller, CD., Lobstein, A. 2013. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flav Frag J*;28:269-79
- Salehi, O., Sami M., Rezaei A. 2021. Limonene loaded cyclodextrin nanosponge: Preparation, characterization, antibacterial activity and controlled release. *Food Bioscience* 42 -101193
- Sarao, L. K., & Arora, M. 2017. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 344–371.
- Sarjono P.R., Ismiyarto., Ngadiwiyana., Prasetya N. B. A., Ulfa R., Ariestiani B., Kusuma A.B., Darmastuti N.E., Rohman J. 2019. Antioxidant activity from limonene encapsulated by Chitosan. *Materials Science and Engineering*, 509.
- Seow Y.X., Yeo C.R., Chung H.L., Yuk H.G. 2014. Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Food Sci. Nutr.*, 54 (5) . 625-644
- Shaaya E, Kostjukovski M, Eilberg J, Sukprakarn C. 1997. Plant oils as fumigant and contact insecticides for the control of stored product insects. *Journal of Stored Products Research*, 33, 7-15.
- Shah, S., Dhawan, V., Holm, R., Nagarsenker, M. S., & Perrie, Y. 2020. Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 154–155, 102–122.
- Shahidi F., Han XQ., 1993. Encapsulation of Food Ingredients. *Crit Rev Food Sci*, 33 (6): 501-547.
- Shao Y., Martel B., Morcellet M., Weltrowski M. 1996. Interactions between β -cyclodextrin and water-soluble dyes, *Canadian Textile Journal*, Vol. 113, No. 5, s.53-58
- Sharma, S., Barkauskaite, S., Duffy, B., Jaiswal, A. K., & Jaiswal, S. 2020b. Characterization and antimicrobial activity of biodegradable active packaging enriched with clove and thyme essential oil for food packaging application. *Foods*, 9(8), 1117.

- Sharma, S., Barkauskaite, S., Duffy, B., Jaiswal, S., & Jaiswal, A. K. 2021. Essential oils as additives in active food packaging. *Food Chemistry*, 343
- Sharma, S., Barkauskaite, S., Duffy, B., Jaiswal, S., & Jaiswal, A. K. 2020a. Development of essential oil incorporated active films based on biodegradable blends of poly (lactide) /poly (butylene adipate-co-terephthalate) for food packaging. *Journal of Packaging Technology and Research*. 235–245.
- Shishir, M. R. I., Karim, N., Gowd, V., Zheng, X., & Chen, W. 2019. Liposomal delivery of natural product: A promising approach in health research. *Trends in Food Science & Technology*, 85, 177–200.
- Silva, J., Abebe, W., Sousa, S.M., Duarte, V.G., Machado, M.I.L., Matos, F.J.A., 2003. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *J. Ethnopharmacol.* 89, 277–283.
- Singh, P., Wani, A. A., & Langowski, H.-C. 2017. Food packing materials testing & quality assurance. CRC Press. Retrieved from
- Siripatrawan, U., & Vitchayakitti, W. 2016. Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. *Food Hydrocolloids*, 61, 695–702.
- Soroka, W., 1999. Paper and paperboard. In: EmblemA, Emblem H, editors. *Fundamentals of packaging technology*. 2nd ed. Herndon, Va.: Inst. of Packaging Professionals. p 95– 112.
- Sözer, N., Kokini, J.L. 2012 *The Applications of Nanotechnology. Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*, Academic Press, Oxford, UK, , p. 145-170.
- Starnes RL. 1990. Industrial potential of cyclodextrin glycosyltransferases. *Cereal Food World*, 35(11), 1094- 1099.
- Süfer, Ö., & Palazoğlu, T. K. (2019). A study on hot-air drying of pomegranate. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 137(6), 1981– 1990.

- Sułkowski, W.W., et al., The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability. *Journal of Molecular Structure*, 2005. 744-747: p. 737- 747.
- Sun, J., 2007. D-Limonene safety and clinical applications . *Alternative Medicine Review*, 12(3)
- Szejtli, J., 1998. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chemical Reviews*, 98(5): 1743-1753.
- Szente, L., & Fenyvesi, E. 2018. Cyclodextrin-enabled polymer composites for packaging. *Molecules*, 23(7), 1556. <https://doi.org/10.3390/molecules23071556>
- Szente, L., and Szejtli, J., 2004. Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 15: 137-142.
- Tang XP., Guo., XH., Geng D., Weng LJ. 2019. D-Limonene Protects Pc12 Cells Against Corticosterone-Induced Neurotoxicity By Activating The Ampk Pathway. *Environ Toxicol Pharmacol*, 70:103-192.
- Taylor, K.M.G., Morris, R.M., 1995. Thermalanalysis of phase-transition behavior in liposomes. *Thermochimica Acta*, 248: 289-301.
- Taylor, T. M., Davidson, P. M., Bruce, B. D., & Weiss, J. 2005. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 587–605.
- Teixeira, B.N., Özdemir, N., Hill, L. E., and Gomes, C. L., 2013. Synthesis and Characterization of Nano-Encapsulated Black Pepper Oleoresin using Hydroxypropyl Beta-Cyclodextrin for Antioxidant and Antimicrobial Applications. *Journal of Food Science*, 78(12): 1913-1920.
- Torchilin, V.P., Weissig, V., 2005. *Liposomes A Practical Approach*. OUP Oxford –değişim.
- TÜİK, 2020. Tarımsal Ekonomi Ve Politika Geliştirme Enstitüsü

- Uçan, F. 2008 D-Limonenin Mayalar Üzerine Antifungal Etkisi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 44
- Üçüncü, M., Gıda Ambalajlama Teknolojisi. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir, 105-111s
- Uekaji, Y., & Terao, K. 2019. Bioavailability enhancement of hydrophobic nutraceuticals using γ -cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 93, 3–15.
- Umagiliyage, A.H.L., Choudhary, R., Becerra-Mora, N., Kohli P., Fisherc Derek J.V., Cáceres O.M., Chamorro L.M. 2017. Antimicrobial efficacy of liposomes containing D-Limonene and its effect on the storage life of blueberries. *Postharvest Biology and Technology*, 128 :130–137.
- Waller, J. M., Lenne, J. M., and Waller, S. J. 2001. *The Plant Pathologists' Pocketbook*, 3rd edn. Walling Ford, UK: CABI Publishing.
- Wei A, Shibamoto T. 2007. Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 1737-1742.
- Wen, P., Zhu, D. H., Feng, K., Liu, F. J., Lou, W. Y., Li, N., Wu, H. 2016. Fabrication of electrospun polylactic acid nanofilm incorporating cinnamon essential oil/ β -cyclodextrin inclusion complex for antimicrobial packaging. *Food Chemistry*, 196, 996–1004.
- Whiteside, J. O., Garnsey, S. M. and Timmer, L. W. 1989. *Compendium of Citrus Diseases*, The American Phytopathological Society, Minnesota.
- Winniczuk, PP., Parish, ME. 1997 Minimum inhibitory concentrations of antimicrobials against micro-organisms related to citrus juice. *Food Microbiology*, 14, 373-381.
- Wu, Z., Zhou, W., Pang, C., Deng, W., Xu, C., & Wang, X. 2019. Multifunctional chitosan-based coating with liposomes containing laurel essential oils and nanosilver for pork preservation. *Food Chemistry*, 295, 16–25.

- Xu, T., Gao, C. C., Feng, X., Yang, Y., Shen, X., & Tang, X., 2019. Structure, physical and antioxidant properties of chitosan-gum arabic edible films incorporated with cinnamon essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 230–236.
- Yahyaoui, M., Gordobil, O., Herrera Diaz, R., Abderrabba, M., & Labidi, J. 2016. Development of novel antimicrobial films based on poly(lactic acid) and essential oils. *Reactive and Functional Polymers*, 109, 1–8.
- Yaman, Ü., 2019. Intratümöral Uygulamaya Yönelik Nanolipozom Formülasyonlarının Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı Hacettepe Üniversitesi, Ankara
- Yang, W., Wang, L., Ban, Z., Yan, J., Lu, H., Zhang, X., et al. (2019). Efficient microencapsulation of Syringa essential oil; the valuable potential on quality maintenance and storage behavior of peach. *Food Hydrocolloids*, 95, 177–185.
- Yoon, B., Lee, S., & Kim, J.-M. 2009. Recent conceptual and technological advances in polydiacetylene-based supramolecular chemosensors. *Chemical Society Reviews*, 38(7), 1958.
- Yuan, L., Li, S., Zhou, W., Chen, Y., Zhang, B., & Guo, Y. 2019. Effect of morin-HP- β -CD inclusion complex on anti-ultraviolet and antioxidant properties of gelatin film. *Reactive and Functional Polymers*, 137, 140–146.
- Yurdakul, A., ve Atav, R. 2007. Lipozomların yapısı ve sınıflandırılması. *Ege Üniversitesi Dergipak/Tekstil ve Konfeksiyon* 17: 243-247.
- Zahi, M. R., Liang H., Yuan Q. 2015. Improving the antimicrobial activity of D-Limonene using a novel organogel-based nanoemulsion. *Food Control*, 50:554-559.
- Zhang, MQ., Rees, D. 1999. A review of recent applications of cyclodextrins for drug discovery. *Expert Opin Ther Pat*, 9(2), 1697-1717.

- Zhao, J., Zhao, G., & Liu, Y. 2019. Antibacterial activity of a hexahydro- β -acids/methyl- β -cyclodextrin inclusion complex against bacteria related to foodborne illness. *Journal of Food Safety*, 39(5).
- Zhao, L., Fan, H., Zhang, M., Chitrakar, B., Bhandari, B., & Wang, B. 2019. Edible flowers: Review of flower processing and extraction of bioactive compounds by novel technologies. *Food Research International*, 108660.
- Zheng, K., Xiao, S., Li, W., Wang, W., Chen, H., Yang, F., & Qin, C. 2019. Chitosan-acorn starch-eugenol edible film: Physico-chemical, barrier, antimicrobial, antioxidant and structural properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 344–352.
- Zhu, G., Zhu, G., & Xiao, Z. 2019. A review of the production of slow-release flavor by formation inclusion complex with cyclodextrins and their derivatives. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 95(1–2), 17–33.
- Zukerman, I., 1951 Effect of oxidized D-Limonene on microorganisms. *Nature*, 168, 517-518.

ÖZGEÇMİŞ

Hatice Çağla PAN, lisans eğitimini Gıda Mühendisliği alanında Ege Üniversitesinde 2011 yılında tamamlamıştır. 2020 yılı sonbahar döneminde Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde yüksek lisans çalışmasına başlamıştır. Profesyonel mesleki kariyerine 2012 yılında Catering şirketinde üretim sorumlusu olarak başlamış, sonrasında 2013 yılında Tarım ve Orman Bakanlığı'na Gıda Kontrol Görevlisi kadrosuyla atanmıştır. Halen Adana Tarım ve Orman Müdürlüğü'nde gıda denetim görevini yürütmektedir. Evli ve bir çocuk annesidir.

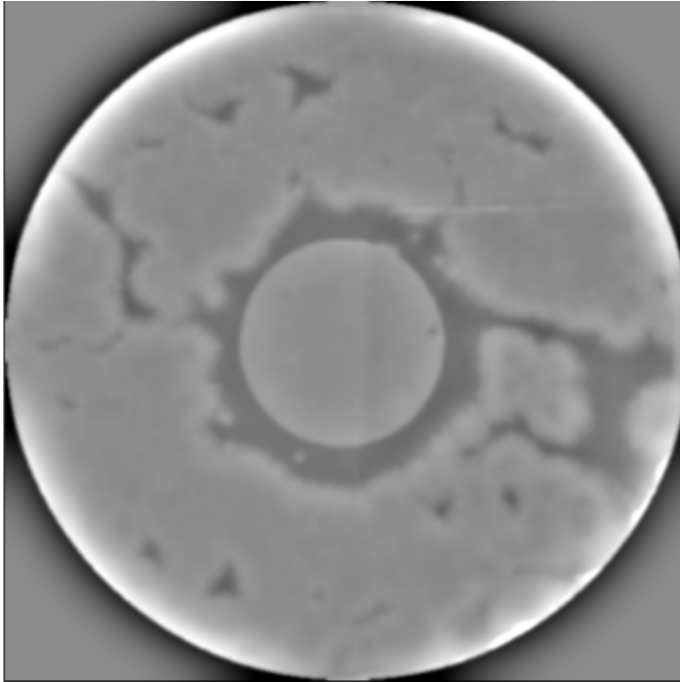
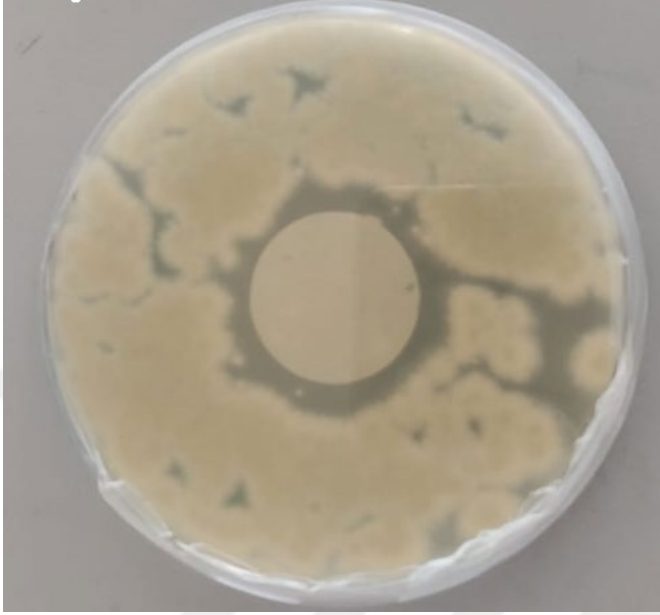




EKLER



EK-1. Disk difüzyon sonuçlarının image j programı ile inceleme adım görüntüleri



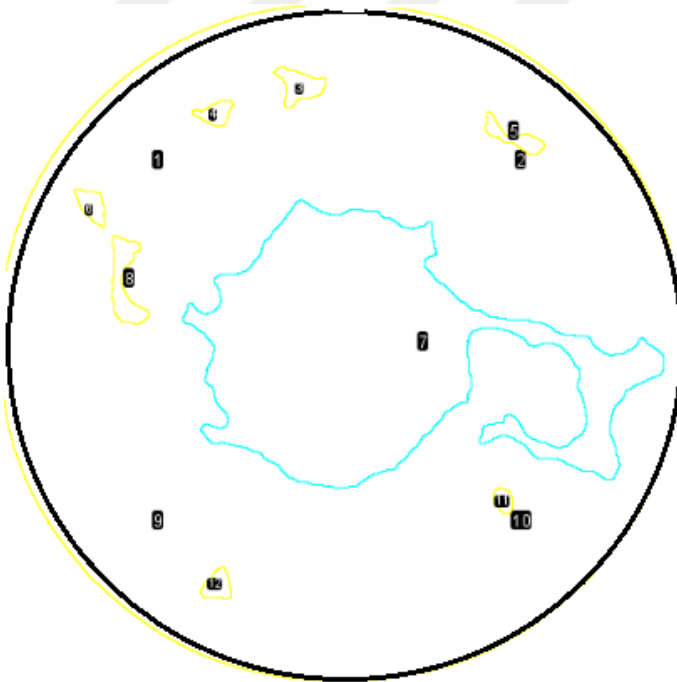
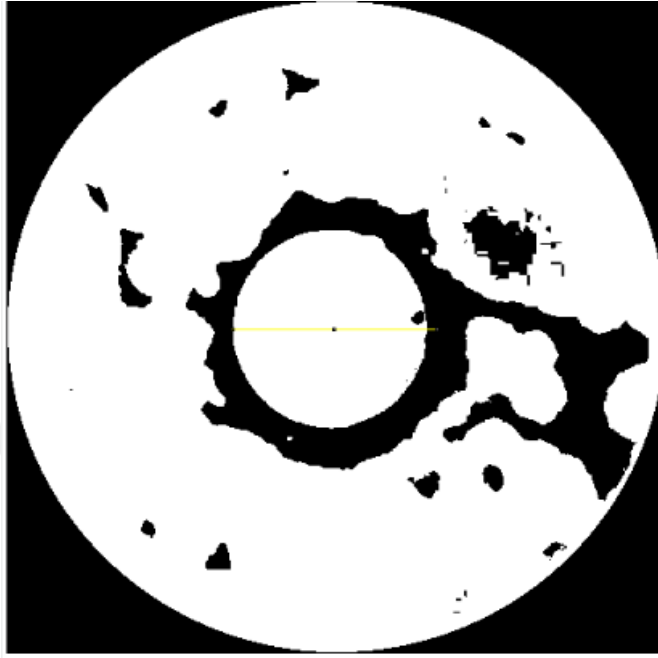
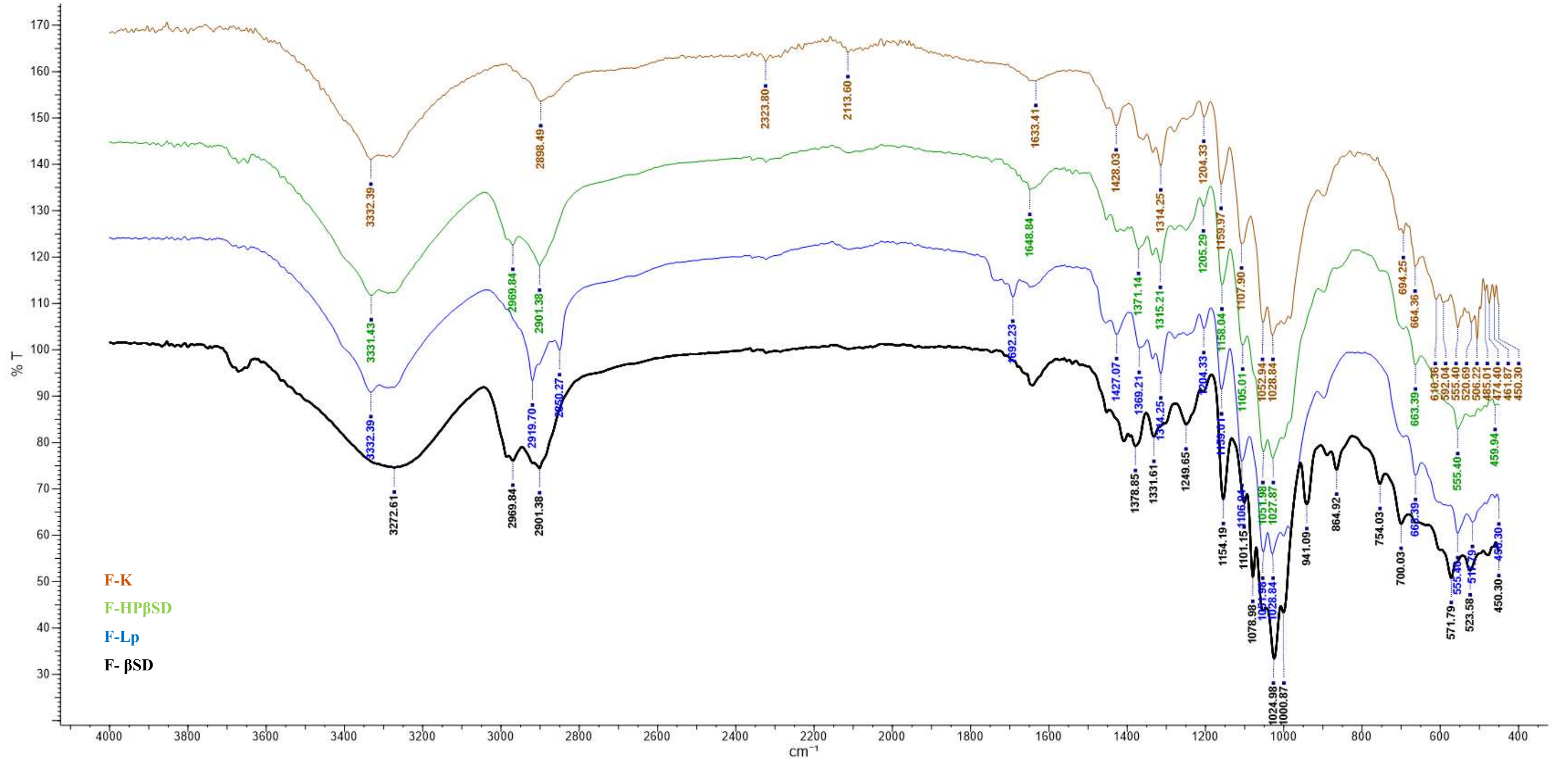
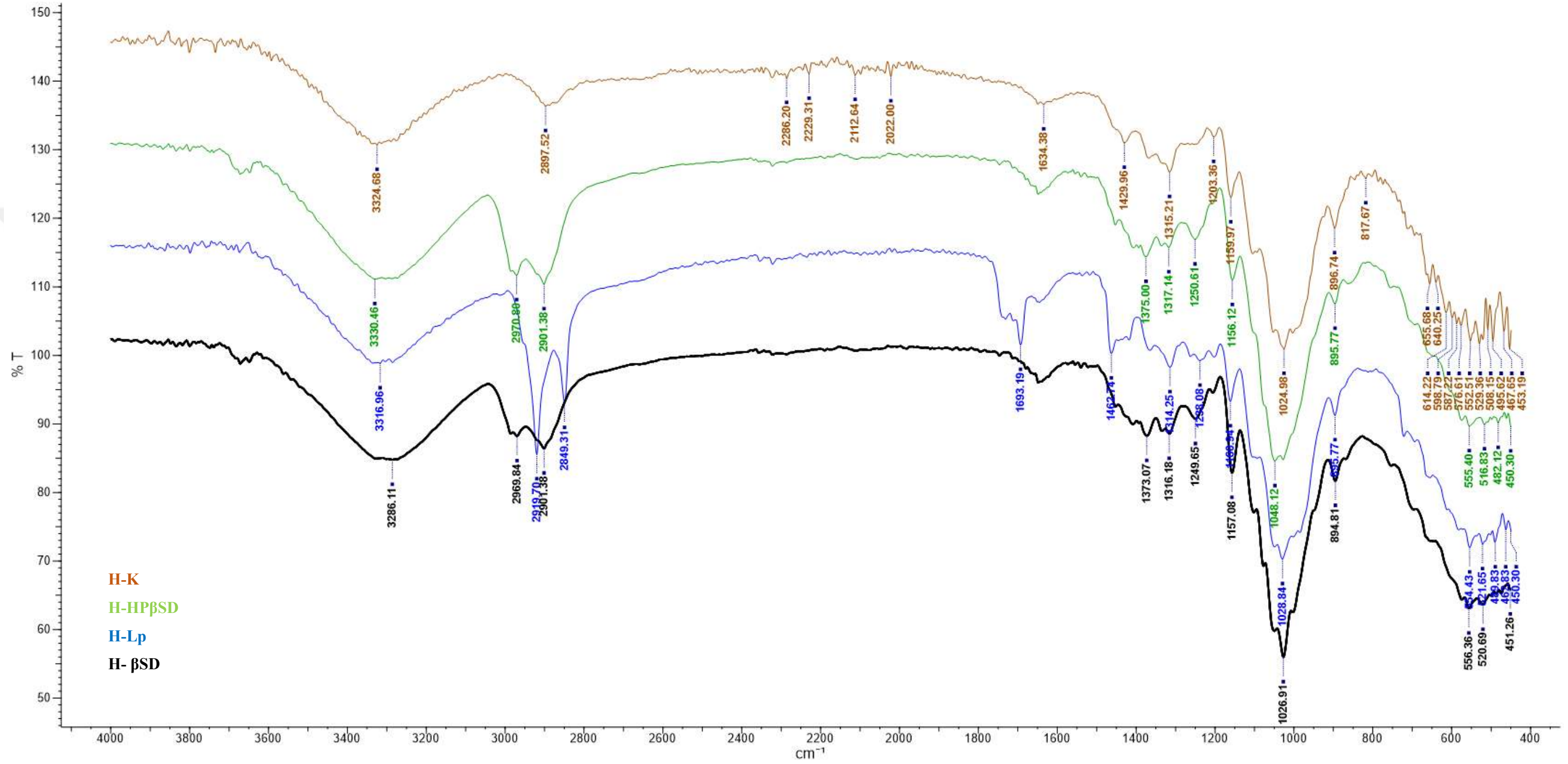


İmage J programında; görüntü inceleme adımları aşağıdaki gibi özetlenebilir. Görüntü formatı referans alınmadan “File” komutu altındaki “Open” ImageJ görüntü inceleme programı genel görünümü. komutu kullanılarak görüntü program içine taşınır. Daha sonra “Image” komutu içerisindeki “Type” komutu kullanılarak görüntü 8-Bit formata dönüştürür. Ayrıca referans ölçek değeri vermek için ise “Analyze” komutu altında “Set Scale” komutunu kullanmak gerekir. Görüntüye ait parçacık analizi yapmak için “Analyze” komutu altında “Analyze Particles ” komutunu kullanılır. Ancak bu işlem için her bir görüntüye ait referans ölçek(petri olduğu için mm) herhangi bir uzunluk biriminde verilmesi gerekir. Morfolojik görüntüdeki oluşumların hesaplanmak istenilen geometrik parametre değerleri tablosunu oluşturmak için “Analyze” komutu altında “Set Measurements” komutunun hesaplanmak istenen değerler seçilmelidir. Açık kodlu olup internetten ücretsiz olarak <http://rsb.info.nih.gov/ij/> adresinden hem indirilebilmekte hem de programın çalışma kılavuzuna ulaşılabilir.

EK-2. Filtre kağıtlarla hazırlanan aktif özellikteki kağıtların FTIR spektrumları



EK-3. Hütapak kağıtlarla hazırlanan aktif özellikteki kağıtların FTIR spektrumları



EK-4. Kaplama yapılmamış filtre kağıdı (F-K) ve %75'lik limonen çözeltisi ile kaplanmış filtre kağıdına (F-L) ait FTIR spektrumları

