

**KİTOSAN BAZLI ETİL PİRÜVAT FİLMLEİN FİZİKOKİMYASAL,
ANTİOKSİDAN, ANTİMİKROBİYAL VE ANTİ-QUORUM SENSİNG
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Burcu Kaya, Nükhet Nilüfer Zorba*, Cengiz Caner

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği, Çanakkale, Türkiye

Geliş / Received: 02.08.2021; Kabul / Accepted: 18.10.2021; Online baskı / Published online: 17.11.2021

Kaya, B., Zorba, N.N., Caner, C. (2021). Kitosan bazlı etil pirüvat filmlerin fizikokimyasal, antioksidan, antimikrobiyal ve anti-quorum sensing özelliklerinin belirlenmesi. *GIDA* (2021) 46 (6) 1425-1439 doi: 10.15237/gida.GD21111.

Kaya, B., Zorba, N.N., Caner, C. (2021). Determination of physicochemical, antioxidant, antimicrobial and anti-quorum sensing properties of chitosan films incorporated with ethyl pyruvate films. *GIDA* (2021) 46 (6) 1425-1439 doi: 10.15237/gida.GD21111.

ÖZ

Bu çalışmada kitosan film formülasyonuna iki farklı (%1 ve %3) konsantrasyonda etil pirüvat ilave edilerek, çevre dostu bir ambalaj materyali geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda hazırlanan film örneklerinin nem, suda çözünürlük, görünür yoğunluk, renk, biyobozunurluk, kimyasallara karşı direnç özellikleri belirlenerek, filmlerin yüzey morfolojisi SEM, fonksiyonel grupları ise FTIR ile karakterize edilmiştir. Ayrıca film örneklerinin antimikrobiyal ve anti-quorum sensing aktivitesi disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Sonuç olarak formülasyona etil pirüvat eklenmesiyle kitosan filmin nem içeriği, görünür yoğunluğu, biyobozunurluğu ve antioksidan aktivitesi artmıştır. SEM görüntüleri incelendiğinde ise etil pirüvatın, kitosan filmlerde gözenekli yapı oluşumuna neden olduğu gözlemlenmiştir. Film örnekleri *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Alternaria arborescens*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium citrinum* ve *Penicillium expansum* suşlarına karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. Buna ek olarak tüm film örneklerinin anti-quorum sensing aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen verilere göre özellikle CS-EP1 filminin, doğa dostu alternatif gıda ambalajı olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Kitosan, etil pirüvat, SEM, FTIR, antimikrobiyal, anti-quorum sensing

**DETERMINATION OF PHYSICOCHEMICAL, ANTIOXIDANT,
ANTIMICROBIAL AND ANTIQUORUM SENSING PROPERTIES OF
CHITOSAN FILMS INCORPORATED WITH ETHYL PYRUVATE FILMS**

ABSTRACT

The aim of this study is to develop an environmentally friendly packaging material by adding ethyl pyruvate (EP) to the chitosan film (CS) formulation in two different concentrations (1% and 3%). Thus, the moisture, water solubility, apparent density, color, biodegradability, and chemical resistance

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: dnukhet@comu.edu.tr

☎: (+90) 286 218 0018 / 20053

☎: (+90) 286 218 0541

Burcu Kaya; ORCID no: 0000-0003-1755-7705

Nükhet Nilüfer Zorba; ORCID no: 0000-0001-6851-6474

Cengiz Caner; ORCID no: 0000-0002-8293-7301

of the films were determined, and the surface morphology was characterized by SEM and functional groups were characterized by FTIR. Additionally, the antimicrobial and anti-q_s activities of the films were determined by the disk diffusion method. The moisture, apparent density, biodegradability, and antioxidant activity of chitosan film were increased by adding EP. It was observed that EP caused porous structure in CS. Films showed antimicrobial effect against *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Alternaria arborescens*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium citrinum* and *Penicillium expansum*. It was determined that all films showed anti-q_s activity. Results showed that CS-EP1 film can be used as an alternative food packaging

Keywords: Chitosan, ethyl pyruvate, SEM, FTIR, antimicrobial, anti-quorum sensing

GİRİŞ

Günümüzde sürdürülebilirlik ve çevre güvenliğini sağlamak amacıyla artan talep, gıda ambalajlamada doğa dostu ambalaj materyali geliştirmeye yönelik çalışmaların hızla artmasına neden olmuştur (Avella vd., 2005; Othman, 2014). Kitosan yengeç, karides gibi deniz kabuklularından ekstrakte edilen bir polisakarittir (Nataraj vd., 2018). 2001 yılında ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından GRAS (Generally Recognized As Safe-genel olarak güvenli kabul edilir) olarak bildirilmiştir (Perinelli vd., 2018). Kitosanın toksik olmaması gıda, biyomedikal, kozmetik ve tarım gibi birçok farklı alanda kullanımına olanak sağlamıştır (Al-Naamani vd., 2017; Singh vd., 2019). Gıda endüstrisinde et ve meyve yüzeyindeki bozulmaların önlenmesi, su kaybının azaltılması ve meyve olgunlaşmasının geciktirilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Shankar ve Rhim, 2018). Ancak son dönemde yapılan çalışmalar, kitosanın polimer olarak gıda ambalajlamada kullanımına dikkat çekmektedir. Özellikle tek başına antimikrobiyal aktiviteye sahip olması, onu diğer polimerlerden öne çıkarmaktadır (Perdones vd., 2016; Zhang vd., 2017; Lee vd., 2018). Kitosanın antimikrobiyal etki mekanizması, yüzeyinde bulunan pozitif yükler ile mikroorganizmanın hücre zarında bulunan negatif yükler arasındaki etkileşim ile açıklanmaktadır. (Zhang vd., 2021; da Silva vd., 2017). Bu etkileşim, mikroorganizma hücre membranında hasara yol açarak, hücre sitoplazmasında yer alan iyon ve proteinlerin ekstrasellüler boşluğa geçmesine neden olmaktadır. Ardından oluşan ozmotik basınç ile hücre ölümü gerçekleşmektedir (Perinelli vd., 2018). Buna rağmen, yüksek suda çözünürlük ve

düşük UV engelleme özelliği gibi çeşitli dezavantajları, gıda ambalajlamada kullanımını sınırlandırmaktadır (Zhang vd., 2021). Bu nedenle araştırmacılar, kitosan bazlı polimerlerin, dezavantajlarını geliştirmeye yönelik çalışmalar yapmaktadır. Örneğin kitosan filmlere ilave edilen 2-fenil etanol, gallik asit, gümüş nanopartikül, mor mısır ekstraktı gibi çeşitli maddelerin, kitosan filmlerin termal, su buharı geçirgenliği, antioksidan ve antimikrobiyal özelliğini geliştirdiği bildirilmiştir (Jakubowska vd., 2020; Zarandona vd., 2020a; Zarandona vd., 2020b; Qin vd., 2019).

Etil pirüvat, pirüvatın stabil bir lipofilik ester türevidir ve günümüzde terapötik ajan olarak bilinmektedir (Ulloa vd., 2002; Tornuk ve Durak, 2015). Gıda endüstrisinde buhar fazında gıda kaynaklı patojenlere karşı taze ve işlenmiş yüzeylerdeki mikrobiyal yükü azaltmak amacıyla kullanılmaktadır (Bozkurt vd., 2016). ABD, Gıda ve İlaç Dairesi tarafından belirli koşullar altında GRAS sınıfında kabul edilmektedir (Cetin vd., 2019a). Etil pirüvatın mikroorganizmalar üzerindeki etki mekanizması tam olarak açıklanmamıştır. Ancak uçucu özellikte olması nedeniyle, bitki dokularında maskelenen patojenlere kolaylıkla ulaşabileceği bildirilmektedir (Wang vd., 2019).

Literatürdeki çalışmalar uçucu yağ veya fenolik bileşikler gibi çeşitli doğal bileşenlerin, elde edilen kitosan bazlı filmlerin antimikrobiyal, antioksidan ve fizikokimyasal özelliklerini geliştirdiğini bildirmiştir (Yadav vd., 2020). Ancak etil pirüvat içeren filmler üzerine yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bundan dolayı yapılan çalışmanın amacı, etil pirüvat içeren kitosan bazlı filmlerin

fizikokimyasal, antioksidan, antimikrobiyal ve anti-quorum sensing aktivitesi belirlenerek, petrol türevi ambalaj materyallerine alternatif bir gıda ambalaj materyali geliştirmektedir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Filmler %90 deasetilasyon derecesine ve 1.8×10^5 g/mol molekül ağırlığına sahip kitosan (Dungeness Enviromental, ABD), asetik asit (Sigma-Aldrich, ABD), gliserol (Sigma-Aldrich, ABD), Tween 80 (Merck, Almanya) ve etil pirüvat (Alfa aesar, ABD) kullanılarak hazırlanmıştır.

Filmlerin üretimi

Aday ve Caner (2010), tarafından uygulanan yöntem esas alınarak etil pirüvat filmleri %1.5 (w/v) kitosan çözeltisinde hazırlanmıştır. Etil pirüvat, kitosan film formülasyonuna iki farklı konsantrasyonda (%1 ve %3 w/w) eklenmiştir. Ayrıca uçuculuğu engellemek amacıyla etil pirüvatın, film formülasyonuna Tween 80 ile ilave edilerek hazırlanmıştır.

Filmlerin Fiziksel Özellikleri

Film kalınlığı

0.001 mm hassasiyete sahip elektronik dijital mikrometre (Dasqua, İtalya) kullanılarak filmlerin kalınlıkları belirlenmiştir.

Nem ve suda çözünürlük

5 mm çapında kesilen filmler tartılarak, 105 °C 'de 24 saat kurutulduktan sonra ikinci bir tartım alınmıştır. Denklemine göre film nem içeriği % olarak hesaplanmıştır (De Elguea-Culebras vd., 2019).

$$\% \text{ Nem içeriği} = \frac{M_o - M}{M_o} \quad (1)$$

* M_o ve M sırasıyla kurutma öncesi ve sonrası ağırlıktır.

Suda çözünürlük, filmlerin 1 saat damıtık suda tutulduktan sonra, çözünen filmin kuru maddesinin yüzdesi olarak belirlenmiştir. Rastgele seçilen 5 mm çapındaki film örneği, 24 saat boyunca 105 °C'de etüvde kurutulduktan sonra ilk ağırlığı belirlenmiştir. İlk ağırlığı belirlenen film örnekleri, damıtık su içeren beherde 25 °C'de 1

saat boyunca muhafaza edilmiştir. Beherden çıkarılan film örneği damıtık su ile hafifçe durulanmış ve ardından etüvde tekrar kurularak (105 °C, 24 saat) suda çözünmeyen kuru madde, aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır (De Elguea-Culebras vd., 2019).

$$\% \text{ Çözünürlük} = \frac{S_o - S}{S_o} \quad (2)$$

* S_o filmin başlangıçtaki ağırlığı, S filmin çözünmeyen kuru ağırlığıdır.

Görünür yoğunluk

Film görünür yoğunluğu, Lozano-Navarro vd. (2018) tarafından uygulanan yöntem referans alınarak belirlenmiştir. Dairesel olarak kesilen filmlerin ağırlıkları belirlendikten sonra çap ve kalınlık ölçümü yapılarak verilen formüle göre görünür yoğunluk hesaplanmıştır.

$$\rho = \frac{W}{\pi \cdot \frac{D^2}{4} \cdot H} \quad (3)$$

* D = Örnek çapı, H = Örnek kalınlığı, W = Örnek ağırlığı

Renk özellikleri

Filmlerin renk değerleri (L^* , a^* , b^*), Minolta CR-400 kalorimetresi (Minolta, Japonya) kullanılarak belirlenmiştir. Buna ek olarak belirlenen L^* , a^* , b^* değerlerine göre filmlere ait Hue°, TCD, WI ve YI değerleri verilen formüllere göre hesaplanmıştır (Ortiz-Duarte vd., 2019).

$$\text{Hue}^\circ = \tan^{-1} \frac{b^*}{a^*} \quad (4)$$

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (5)$$

$$\text{WI} = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (6)$$

$$\text{YI} = 142.86 \frac{b}{L} \quad (7)$$

Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Filmlerin yüzey morfolojileri Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (ÇOBİLTUM) 'nde bulunan JEOL marka taramalı elektron mikroskobu (JSM-7100F, Japan) ile belirlenmiştir. 8×10^1 mbar/Pa vakum ve 10 mA voltaj altında film örneklerine

altın-paladyum kaplama yapılmıştır. Kaplama yapılan örneklerin 5 kV voltajda görüntüleri kaydedilmiştir.

Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektrometresi (FTIR)

FTIR spektrumları Nicolet IS50 (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, ABD) ile belirlenmiştir. 16 cm⁻¹ çözünürlük ve 650-4000 cm⁻¹ arasındaki spektra aralığında çalışılmıştır.

Filmlerin biyobozunurluk ve kimyasala karşı direnç özellikleri

5 mm çapında kesilen film örnekleri biyobozunurluk için aktif çamur ve distile su, kimyasal direnç için 2 N hidroklorik asit (HCl), 2 N sodyum hidroksit (NaOH) ve %1 sodyum klorür (NaCl) içerisinde 2 ay boyunca muhafaza edilmiştir. Film örneklerinin biyobozunurluk ve kimyasal direnç özellikleri, muhafaza süresi boyunca her 10 günde bir tartım yapılarak % ağırlık kaybı olarak hesaplanmıştır (Swain vd., 2013).

Antioksidan aktivite

Filmlerin antioksidan özellikleri 2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yöntemi ile belirlenmiştir. Karanlık bir ortamda 10 mg film örneği, 1.0 mL DPPH (6×10⁵ M) çözeltisi içerisinde 3 saat tutulmuştur. Süre sonunda 517 nm'de spektroskopik ölçüm yapılmıştır. Denklem göre % inhibisyon hesaplanmıştır (Akyuz vd., 2018).

$$\% \text{ İnhibisyon} = \left(\frac{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}}{A_{\text{Kontrol}}} \right) \times 100 \quad (8)$$

*A_{kontrol} DPPH çözeltisinin absorbanansı A_{örnek} ise film+DPPH çözeltisinin absorbanansı ifade etmektedir.

Antimikrobiyal aktivite

Test mikroorganizmaları

Filmlerin antimikrobiyal etkisini belirlemek için Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarında bulunan *Staphylococcus aureus* ATCC-25923, *Salmonella* Typhimurium ATCC-14028, *Escherichia coli* 0157:H7 EDL-937, *Bacillus*

cereus NCTC-7464 ve *Candida albicans* ATCC-10231 suşları kullanılmıştır. *Aspergillus flavus* NRRL-21882, *Penicillium expansum* CECT-2280, *Penicillium citrinum* CECT-20822, *Penicillium digitatum* CECT-20795, *Alternaria arborescens* kültürleri ise Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Burhan Şen'den temin edilmiştir. Bakteri kültürleri Tryptic Soy Broth (Oxoid, İngiltere), küf kültürleri Potato Dextrose Agar (Difco, Fransa) ve maya kültürleri Sabouraud Dextrose Broth (Biolife, İtalya) besiyerinde geliştirildikten sonra 4 °C'de stoğa alınmıştır.

Antibakteriyel etkinin disk difüzyon testi ile belirlenmesi

Bakteri kültürleri Tryptic Soy Broth besiyerinde 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek 0.5 McFarland (1×10⁸ kob/ml) bulanıklığına ayarlanmıştır. 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanan kültürler, Muller Hinton Agar (MHA) besiyerine 100 µL inoküle edilmiştir. 5 mm çapında kesilen disk şeklindeki film örnekleri, besiyeri üzerine yerleştirilerek 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan inhibisyon zonları ölçülerek değerlendirilmiştir (Seydim ve Sarıkuş, 2006; Rhim vd., 2006).

Antifungal etkinin disk difüzyon testi ile belirlenmesi

Küf kültürleri Potato Dextrose Agar (PDA) besiyerinde 25 °C'de 14 gün inkübe edilerek %0.1 Tween 80 içeren %0.1 pepton içinde süspansiyon edilmiştir. Maya kültürleri ise Sabouraud Dextrose agar besiyerinde 30 °C'de 5 gün inkübe edilmiştir. Ardından küfler spektrofotometre kullanılarak 530 nm'de %68-82 T'ye karşılık gelen 10⁶ spor/mL konsantrasyona ayarlanmıştır (Pfaller ve Messel, 2000). Mayalar ise 2 MacFarland (10⁶ kob/mL) konsantrasyona ayarlanarak hazırlanan süspansiyonlardan, PDA besiyerine 100 µL inoküle edilmiştir. Ardından 5 mm çapındaki disk şeklindeki filmler, besiyeri üzerine yerleştirilerek ve 25 °C'de 7 gün inkübe edilmiştir (Ignatova vd., 2006). İnkübasyon sonunda oluşan inhibisyon zonları değerlendirilmiştir.

Anti-quorum sensing aktivite**Test Mikroorganizması**

Chromobacterium violaceum CV026 ve *Pseudomonas aeruginosa* (PAO-1) kanamisin içeren Luria-Bertani (LB) besiyerinde 30 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

Disk difüzyon testi

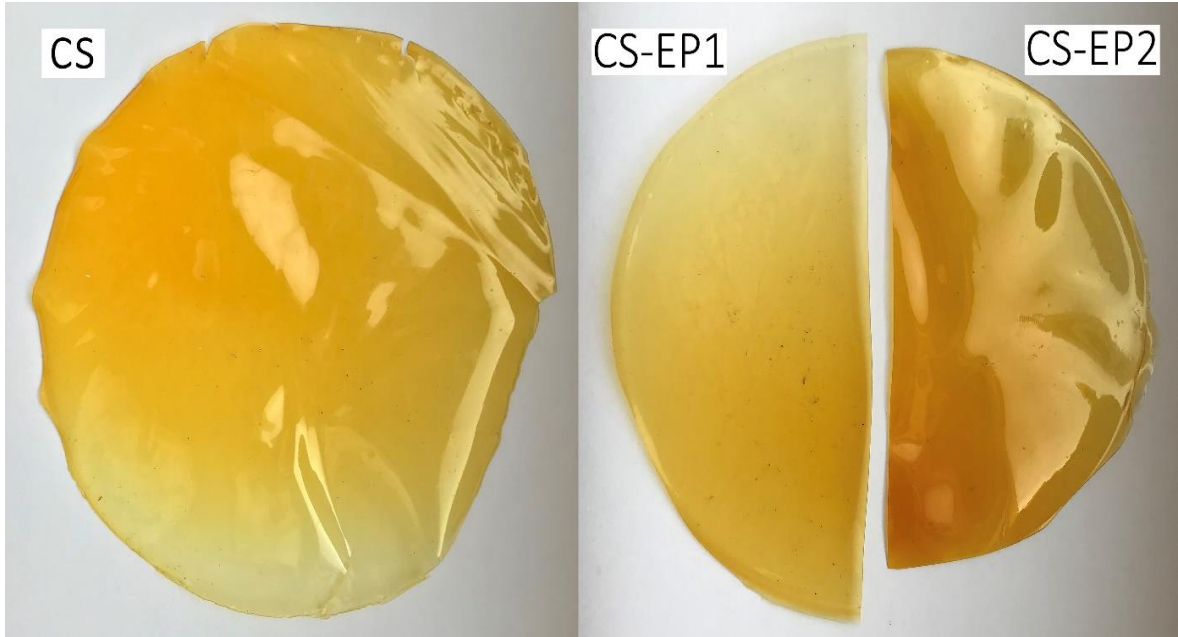
Filmlerin anti-quorum sensing aktivitesi disk difüzyon testi ile belirlenmiştir. 0.5 McFarland konsantrasyona ayarlanan test kültürleri %0.8 agar ve 20 µL C6-HSL içeren LB besiyerine inoküle edilmiştir. 5 mm disk şeklinde kesilen film örnekleri besiyeri üzerine yerleştirilmiş ve 30 °C'de 24 saat inkübasyon sonunda oluşan inhibisyon zonları ölçülmüştür (Akyuz et al., 2018).

İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler SPSS 23.0 (SPSS Inc., Chiago, IL, USA) programı ile gerçekleştirilmiştir. Filmler arasındaki istatistiksel farklılıklar ANOVA varyans analizi ile belirlenerek karşılaştırmalar Duncan testi kullanılarak yapılmıştır. $P < 0.05$ istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA
Filmlerin fiziksel özellikleri

Hazırlanan filmlerin görüntüleri Şekil 1'de verilmiştir. %1 etil pirüvat/kitosan (CS-EP1) ve %3 etil pirüvat/kitosan (CS-EP2) içeren filmlerin kalınlık değerinin, kontrol (CS) filmin kalınlık değeri ile farklılık gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 1). Ancak bu farklılıkların istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($P > 0.05$). Film kalınlığının farklı olması, polisakkarit matriks ile etil pirüvat arasındaki interaksyondan kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür (Lian vd., 2020).



Şekil 1. Film görüntüleri

Figure 1. Images of films

Çizelge 1. Filmlere ait kalınlık, nem, suda çözünürlük ve görünür yoğunluk değerleri,
 Table 1. Film thickness, humidity, water solubility and visible density of films.

Film	Kalınlık (mm) <i>Thickness</i>	Nem (%) <i>Humidity</i>	Suda Çözünürlük (%) <i>Water solubility</i>	Görünür Yoğunluk (g/cm ³) <i>Apparent density</i>
CS	0.233±0.069	22.79±0.61b	23.21±0.00a	0.5088±0.0330
CS-EP1	0.191±0.059	24.98±0.80a	21.25±0.35a	0.5885±0.0220
CS-EP2	0.312±0.063	14.85±0.71c	18.38±0.74b	0.6448±0.0894

*CS: Kitosan, CS-EP1: %1 Etil pirüvat, CS-EP2: %3 Etil pirüvat

*Aynı sütun üzerinde belirtilen farklı harfler istatistiksel açıdan ortalamalar arasındaki farklılığı ifade etmektedir ($P < 0.05$).

%1 etil pirüvat, kitosan filmin nem içeriğini önemli düzeyde arttırmıştır ($P < 0.05$). Ancak kitosan ve CS-EP1 filmlerinin suda çözünürlük değerleri incelendiğinde, anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($P > 0.05$). Buna ek olarak %3 etil pirüvat, kitosan filmin nem içeriği ve suda çözünürlüğünde önemli düzeyde azalmaya neden olmuştur ($P < 0.05$) (Çizelge 1). Filmlerin suda çözünürlüğü, su varlığında filmin suya karşı gösterdiği direncin göstergesidir ve gıda ambalajı için önemli bir parametre olarak kabul edilmektedir (Ghaderi vd., 2019). Buna göre film formülasyonuna eklenen %3 etil pirüvatın, kitosan filmin suda çözünürlüğünü geliştirdiği belirlenmiştir.

Görünür yoğunluk filmlerin gözeneklilik ve filtrasyon kapasitesi hakkında bilgi vermektedir (Lozano-Novarro vd., 2018). İstatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmamasına rağmen etil pirüvat

filmlerin, her iki konsantrasyonu görünür yoğunluğu arttırmıştır ($P > 0.05$) (Çizelge 1).

Renk, gıdanın görünümünü ve tüketici tercihini doğrudan etkileyen önemli bir parametredir (Ghaderi vd., 2019). Kitosan film örneklerine etil pirüvat eklenmesi, filmlerin L* (parlaklık) değerinde önemli düzeyde artışa yol açmıştır ($P < 0.05$) (Çizelge 2). Benzer şekilde parlaklık ve sarı-mavilik değerlerinin matematiksel olarak bir arada veren WI ve ton açısını ifade eden Hue° değerlerinde önemli düzeyde artış saptanmıştır ($P < 0.05$). Renk farklılıklarını veren TCD değeri ve ürün bozulmasını ifade eden sarılık indeksi (YI) değeri ise %1 etil pirüvat eklenmesiyle önemli düzeyde azalmıştır ($P < 0.05$). Kitosanın sarı rengi, tekrarlayan 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose birimlerinden kaynaklanmaktadır (Salari vd., 2021). YI değerindeki azalma, etil pirüvat ve kitosan arasındaki interaksyonun glukopronaz halkalarını etkilendiğini göstermektedir.

Çizelge 2. Filmlere ait renk değerleri
 Table 2. Color value of films

Film	L*	a*	b*	Hue°	TCD (ΔE)	WI	YI
CS	79.22±1.64b	0.56±0.06a	26.19±0.90a	88.48±0.27b	37.81±0.26b	58.36±0.45b	64.83±0.96a
CS-EP1	81.42±0.43a	-0.03±0.01ab	23.08±0.53b	89.77±0.20a	36.24±0.36a	70.74±0.82a	40.27±0.90c
CS-EP2	81.32±0.00a	-0.36±0.01b	28.32±0.71a	89.09±0.29a	37.49±0.45b	64.19±3.98a	50.93±0.29b

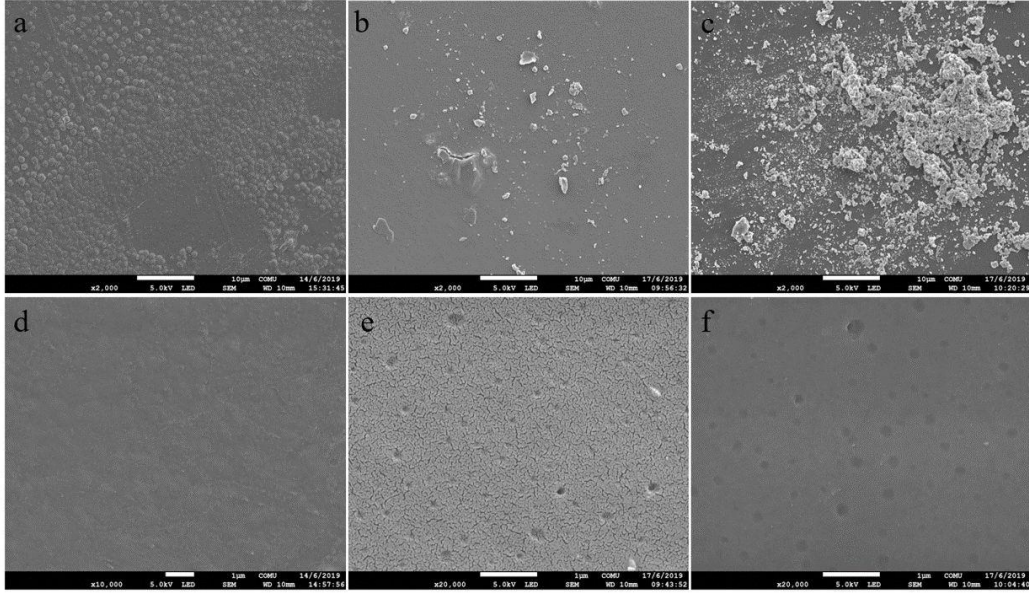
*Aynı sütun üzerinde belirtilen farklı harfler istatistiksel açıdan ortalamalar arasındaki farklılığı ifade etmektedir ($P < 0.05$).

*CS: Kitosan, CS-EP1: %1 Etil pirüvat, CS-EP2: %3 Etil pirüvat

SEM

CS, CS-EP1 ve CS-EP2 filmlerinin yüzey morfolojileri SEM ile incelenmiştir (Şekil 2). CS film örneğinde, homojen ve pürüzsüz bir yapı oluşmuştur. Ancak etil pirüvat konsantrasyonu arttıkça bazı noktalarda kitosan agregasyonunun meydana geldiği ve CS-EP1 ve CS-EP2 film örneklerinde 0.15-0.53 μm boyutlarında

gözeneklerin varlığı gözlemlenmiştir. Buna ek olarak CS-EP1 yüzeyinde çatlamların olduğu, CS-EP2 yüzeyinde ise çatlamların olmadığı saptanmıştır. Saricaoglu vd. (2018), gözenekli yapı oluşumunun filmlerin su buharı geçirgenliği ile ilişkili olduğunu ve gözenekli yapının geçirgenliği arttırdığını bildirmiştir.



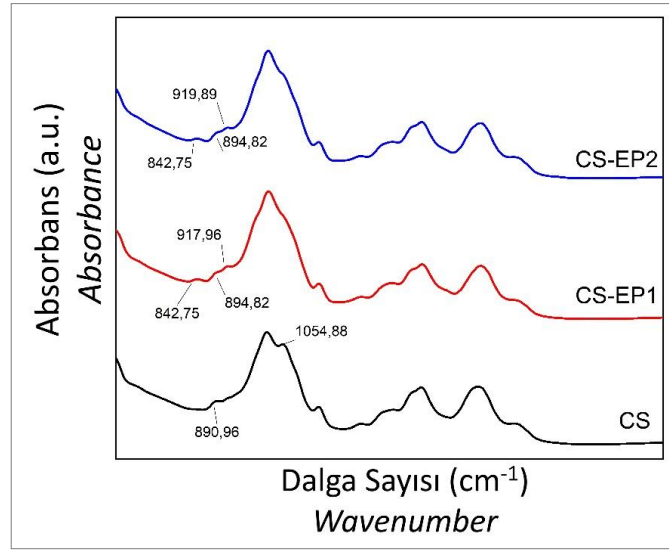
Şekil 2. Filmlere ait SEM görüntüleri a, d) CS (2000X, 10000X); b,e) CS-EP1 (2000X, 20000X); c, f) CS-EP2 (2000X, 20000X)

Figure 2. SEM images of films

FTIR

FTIR ile CS, CS-EP1 ve CS-EP2 filmlerin fonksiyonel grupları belirlenmiştir (Şekil 3). Tüm film örneklerinde benzer pik deseni belirlenmiştir. Çalışmada kitosana ait amid pikleri 1642.68 cm^{-1} (C=O gerilme, amid I), 1549.29 cm^{-1} (N-H bükme, amid II) ve 1251.61 cm^{-1} (C-N gerilme, amid III) tespit edilmiştir (Menazea ve Ahmed, 2020; Yadav vd., 2020; Chang vd., 2019). Buna ek olarak 1027.63 cm^{-1} (C-O gerilmesi) ve 2933.33 cm^{-1} (C-H simetrik gerilme) pikleri belirlenmiştir (Wang vd., 2016; Fernandes Queiroz vd., 2015). Chang vd. (2019), $3421.28\text{--}3418.60\text{ cm}^{-1}$ piklerinin hidroksil grubuna ait olduğunu bildirmiştir. Bundan dolayı $3007.75\text{--}3597.99\text{ cm}^{-1}$ arasındaki geniş pikin hidroksil grubuna ait olduğu

belirlenmiştir. Ayrıca kitosan matriksinin glukopiranoz halkasına özgü absorpsiyon pikleri 1054.88 ve 890.96 cm^{-1} (C-O-C, anti-simetrik gerilme) tespit edilmiştir (Oh vd., 2019; Shankar ve Rhim, 2018; Fernandes Queiroz, 2015). 1054.88 cm^{-1} (C-O-C, anti-simetrik gerilme) absorpsiyon piki CS-EP1 ve CS-EP2 filmlerinde saptanamamıştır. Bu durum, kitosan ve etil pirüvat arasındaki interaksyonun göstergesidir. Ayrıca CS-EP1 ve CS-EP2 filmlerinde, kontrol gruptan farklı olarak 917.96 ve 919.89 cm^{-1} dalga boyunda, etil pirüvatın yapısında yer alan oxo-propionik asit etil ester köprüsünün düzlem içi deformasyonundan kaynaklanan pikler olabileceği belirlenmiştir (Beaula and James, 2014).

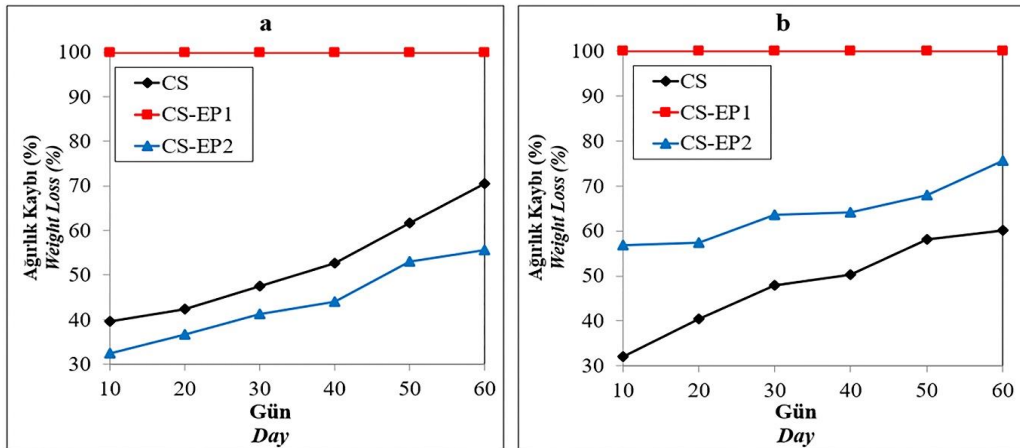


Şekil 3. Filmlere ait FTIR spektrumları
Figure 3. FTIR spectra of the films

Filmlerin biyobozunurluk ve kimyasallara karşı direnç özellikleri

Filmlerin biyolojik parçalanabilme özelliği, termal direnç ve gaz geçirgenliği ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir (Swain vd., 2013). Biyolojik parçalanabilirliğin zayıf olması, filmlerin belirtilen özelliklerinin zayıf olduğunun göstergesi kabul edilebilir. CS-EP1 filmi ilk 10 gün içinde aktif çamur ve distile suda tamamen kaybolmuştur. CS-

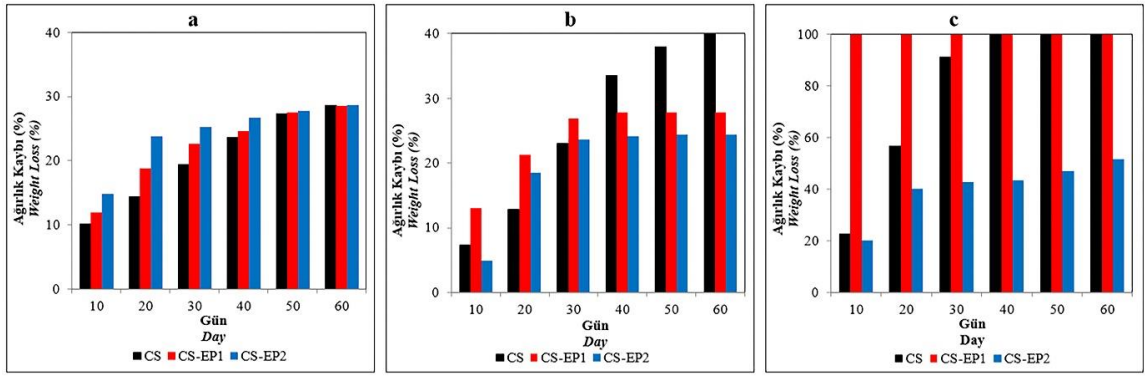
EP2 ise, CS filme göre aktif çamurda daha az, distile suda daha yüksek parçalanma özelliği göstermiştir (Şekil 4). Buna göre kitosan film içerisine ilave edilen etil pirüvatın, kitosan filmin termal direnç ve gaz geçirgenliğini arttırdığı söylenebilir. CS-EP1 ve CS-EP2 filmlerinin SEM görüntülerinde tespit edilen gözenekler bunu desteklemektedir.



Şekil 4. (a) damıtılmış su ve (b) aktif çamurdaki filmlerin zamana bağlı ağırlık kaybı (%)
Figure 4. The weight loss (%) of films due to treatment of (a) distilled water and (b) activated sludge at different interval of time.

Filmlerin etil pirüvat içeriği arttıkça hidroklorik asit çözeltisindeki çözünürlüğü artmıştır (Şekil 5). Buna karşın filmlerin, etil pirüvat konsantrasyonu arttıkça NaOH çözeltisi içerisindeki film çözünürlüğü azalmıştır. %1 NaCl çözeltisinde ise CS-EP1 filmi ilk 10 gün, CS filmi 40 günde tamamen yok olmuştur. Ancak CS-EP2 filmi, 60 günde %51.6 ağırlık kaybına uğramıştır. Tuzlar

polimer yapı içerisindeki hidrofobik olarak ikame edilmiş bölgelerin kümelenmesine neden olmaktadır (Zhang vd., 2013). Bu neden ile tuzların, polimer hidrasyon kılıfındaki su molekülleri ile rekabet ederek, polimer-su etkileşimlerini modüle ettiği ve CS-EP2 filminin çözünürlüğünü azaltmış olabileceği düşünülmüştür.



Şekil 5. Filmlerin (a) 2 N HCl, (b) 2 N NaOH ve (c) 1% NaCl içerisinde zaman bağlı ağırlık kaybı (%)
 Figure 5. The weight loss (%) of films due to treatment of (a) 2 N HCl, (b) 2 N NaOH and (c) 1% NaCl at different interval of time.

Antioksidan aktivite

Antioksidan aktivite, lipit oksidasyonunu geciktirerek gıdanın muhafaza süresinin uzamasına yardımcı olan önemli bir parametredir (Çoban ve Patır, 2010). Çalışmada CS, CS-EP1 ve CS-EP2 filmlerinin inhibisyon değerleri sırasıyla 20.81 ± 0.82 , 35.69 ± 0.39 , 22.15 ± 0.55 olarak tespit edilmiştir. Kitosan film formülasyonuna eklenen etil pirüvat, antioksidan aktiviteyi artmıştır. Bu artışın CS-EP1 filmi için istatistiksel açıdan önemli ($P < 0.05$) olduğu, CS-EP2 filmi için ise önemli olmadığı belirlenmiştir ($P > 0.05$). Benzer şekilde Akyuz vd. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, kitosan filmin antioksidan özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir. Fink (2007) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, pirüvatın serbest radikal süpürücü aktivitesine sahip olduğunu bildirilmiştir. Bu durum CS-EP1 ve CS-EP2 filmlerin antioksidan özelliğini neden arttırdığını açıklamaktadır. Ayrıca CS-EP1 filminin antioksidan aktivitesinin, CS-EP2'den daha yüksek olmasının nedeni, CS-EP1 filminin

analiz çözeltisi içerisindeki çözünürlüğünün yüksek olmasından kaynaklı olduğu düşünülmüştür.

Antimikrobiyal aktivite

CS, CS-EP1 ve CS-EP2 filmleri, test edilen tüm mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki göstermiştir (Çizelge 3). Film formülasyonuna eklenen %1 etil pirüvat, filmlerin *E. coli* O157:H7, *B. cereus* ve *S. aureus* suşlarına karşı gösterdiği antibakteriyel etkiyi önemli düzeyde arttırmıştır ($P < 0.05$). En yüksek antibakteriyel etkiyi CS-EP1 filmi göstermiştir. Etil pirüvat konsantrasyonu arttıkça antibakteriyel etki azalmıştır. Benzer şekilde %1 etil pirüvatın, CS filmin *A. arborescens*, *A. flavus*, *P. digitatum*, *P. citrinum* ve *P. expansum* suşlarına karşı gösterdiği antifungal etkiyi önemli düzeyde arttırdığı belirlenmiştir ($P < 0.05$). Ayrıca film formülasyonunda, etil pirüvat konsantrasyonu arttıkça antimikrobiyal etkinin önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir ($P < 0.05$). Bu durum Goy ve Assis (2014) tarafından yapılan

çalışmada da belirlenmiş, araştırmacılar bunu film çözeltisinin konsantrasyonunun artmasının, çözücünün ortamdaki uzaklaştırılması sırasında polimer zincirindeki fonksiyonel gruplar arasında çapraz bağlanmaya, hidrojen ve kovalent bağların oluşmasına neden olmasına ve aktif yapıdaki işlevsel grupların çevre ile etkileşimi

kısıtlanmasına bağlamışlardır. Sonuç olarak, kitosanın yüzeyinde bulunan pozitif yüklü alanlar azalmakta yani bakteri hücre duvarına bağlanması için ortamda daha az yüklü alanlar kalmakta ve bu da antibakteriyel etkinin azalmasına neden olmaktadır (da Silva vd., 2017, Perinelli vd., 2018, Zhang vd., 2021).

Çizelge 3. Filmlerin antimikrobiyal aktivitesi
Table 3. Antimicrobial activity of films

Mikroorganizma <i>Microorganism</i>	İnhibisyon çapı (mm) <i>Inhibition diameter</i>		
	CS	CS-EP1	CS-EP2
<i>E. coli</i> O157:H7 EDL 937	6.55±0.17b	8.53±0.20a	6.86±0.14b
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	7.51±0.06	7.31±0.56	7.75±0.15
<i>B. cereus</i> NCTC 7464	6.56±0.47b	9.23±0.02a	6.65±0.25b
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	7.18±0.08b	7.88±0.21a	7.20±0.02ab
<i>A. arborescens</i>	10.37±0.10b	12.17±0.06a	5.36±0.36c
<i>A. flavus</i> NRRL 21882	7.36±0.25b	13.81±0.35a	6.97±0.41b
<i>P. digitatum</i> CECT 20795	10.56±0.48a	13.76±0.58a	8.26±0.23b
<i>P. citrinum</i> CECT 20822	11.70±0.50b	14.09±0.38a	10.71±0.16b
<i>P. expansum</i> CECT 2280	9.46±0.37b	14.99±1.08a	10.09±0.31b
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	6.91±0.00b	11.62±0.62a	9.56±0.64a

*Aynı satır üzerinde belirtilen farklı harfler istatistiksel açıdan ortalamalar arasındaki farklılığı ifade etmektedir ($P < 0.05$).

Antimikrobiyal test sonuçlarına göre, filmlerin maya ve küflere karşı bakterilere oranla daha etkili olduğu saptanmıştır. Literatürde etil pirüvat ve kitosanın birlikte kullanımı ile ortaya çıkan antimikrobiyal aktivite hakkında bir çalışma yoktur. Ancak yapılan çalışmalarda kitosan filminin *E. coli*, *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *B. cereus*, *Aspergillus flavus*, *A. alternata* *Alternaria solani* suşlarına karşı antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilmiştir (Zhang vd., 2009; Kaur vd., 2012; Younes vd., 2014; Peng ve Li, 2014; Youssef vd. 2015; Hu vd., 2016; Akyuz vd., 2018). Ayrıca etil pirüvatın *S. aureus*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes* suşlarına karşı antimikrobiyal etki gösterdiği ve çeşitli gıda gruplarında fungal yükü azalttığına dair birçok çalışma bulunmaktadır (Cetin vd., 2019a; Cetin vd., 2019b; Wang vd., 2019; Bozkurt vd., 2016; Tornuk ve Durak, 2015). Literatürde verilen

sonuçlar bu çalışmadaki sonuçları desteklemektedir.

Anti-quorum sensing aktivite

Quorum sensing, birçok bakteri türünde biyofilm oluşumunun ana kaynağı olarak bilinmektedir. Anti-quorum sensing bileşikler ise, quorum sensing sistemine müdahale ederek bakteriyel patojeniteyi zayıflatan bileşikler olarak tanımlanmaktadır (Ilk vd., 2017). Filmlerin anti-quorum sensing aktivitesi, *Chromobacterium violaceum* CV026 ve *Pseudomonas aeruginosa* (PAO-1) suşlarına karşı pigment inhibisyon bölgesi oluşumuna göre değerlendirilmiştir. Buna göre *Chromobacterium violaceum* CV026 suşuna karşı CS (8.66±0.03 mm) ve CS-EP1 (8.65±0.79 mm) benzer inhibisyonu gösterirken, CS-EP2 daha düşük inhibisyon göstermiştir. *Pseudomonas*

aeruginosa PAO-1 suşuna karşı en yüksek inhibisyon ise CS-EP1 (6.70 ± 0.01 mm) filminde tespit edilmiştir. *Chromobacterium violaceum* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının Gram negatif olması, lipofilik ester olan yüksek konsantrasyondaki etil pirüvatın hücre zarına girişini zorlaştırdığı (Wang vd., 2021) ve konsantrasyon artışına bağlı olarak anti-quorum sensing etkinin azalmasına yol açtığı düşünülmüştür. Koc vd. (2020) tarafından kitosan filmin, *Chromobacterium violaceum* CV026 suşunun violasecin üretimine karşı inhibisyonu 9.10 ± 1.00 mm olarak saptanmıştır. Badawy vd. (2020), Namasivayam vd. (2020) ise, kitosanın, *Pseudomonas aeruginosa* PAO-1 suşunun pyocyanin üretimini azalttığını bildirmiştir. Etil pirüvat ilavesinin anti-qs aktiviteye katkısı olmadığı, kitosan filminin anti-qs etkisinin literatür ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

SONUÇ

Bu çalışmada iki farklı konsantrasyonda etil pirüvat içeren kitosan bazlı film hazırlanmıştır. Hazırlanan film örneklerinin nem, suda çözünürlük, görünür yoğunluk, renk, biyobozunurluk, kimyasallara karşı direnç özellikleri gibi fizikokimyasal özellikleri belirlenmiştir. SEM, FTIR ile film yapısı incelenmiştir. Ayrıca film örneklerinin antioksidan, antimikrobiyal ve anti-quorum sensing aktivitesi tespit edilmiştir. Biyolojik olarak etkili filmin CS-EP1 olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, özellikle antimikrobiyal aktivitesinden dolayı CS-EP1 filminin özellikle antifungal etkisinden dolayı küf ve maya bozulmalarına hassas gıdalarda aktif ambalaj olarak kullanımı yanı sıra petrol türevi materyaller yerine alternatif ambalaj malzemesi üretmek için kullanılabilirliği belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yapılan çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje numarası: FYL-2018-1373). Ayrıca FTIR analizlerinde cihazının kullanımı için Doç. Dr. Hüseyin AYVAZ'a, küf kültürlerinin temini için

Doç. Dr. Burhan ŞEN ve anti-quorum sensing kültürlerinin temini için Dr. Öğr. Üyesi Sedef İLK ve Arş. Gör. Kübra ERKAN TÜRKMEN teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

YAZAR KATKILARI

Söz konusu çalışma Burcu KAYA'nın Doç. Dr. Nükhet Nilüfer ZORBA danışmanlığında tamamladığı yüksek lisans çalışmasından üretilmiştir. Nükhet N ZORBA araştırmanın planlamasını, Burcu KAYA araştırma analizlerini gerçekleştirmiştir. Ayrıca Prof. Dr. Cengiz CANER filmlerin üretiminde yardımcı olmuş ve tez kapsamı dışında yapılan FTIR analizini değerlendirmiştir. Tüm yazarlar makale yazımına eşit katkıyı sağlamış ve makalenin son halini okuyarak onaylamıştır.

KAYNAKLAR

- Aday M. S., Caner C. (2010). Understanding the effects of various edible coatings on the storability of fresh cherry. *Packag. Technol. Sci.*, 441-456.
- Akyuz, L., Kaya, M., Muhtaba, M., İlk, S., Sargin, I., Salaberria, A. M., Islek, C. (2018). Supplementing capsaicin with chitosan-based films enhanced the anti-quorum sensing, antimicrobial, antioxidant, transparency, elasticity and hydrophobicity. *Int J Biol Macromol*, 115: 438-446.
- Al-Naamani, L., Dobretsov, S., Dutta, J., Burgess, J. G. (2017). Chitosan-zinc oxide nanocomposite coatings for the prevention of marine biofouling. *Chemosphere*, 168: 408-417.
- Avella M., De Vlieger J. J., Errico M. E., Fischer S., Vacca P., Volpe M. G. (2005). Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications. *Food Chem*, 93: 467-474.
- Badawy, M. S. E., Riad, O. K. M., Taher, F. A., Zaki, S. A. (2020). Chitosan and chitosan-zinc oxide nanocomposite inhibit expression of LasI and RhII genes and quorum sensing dependent

- virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Biol Macromol*, 149: 1109-1117.
- Beaula, T. J., James, C. (2014). FT IR, FT-Raman spectra and chemical computations of herbicide 2-phenoxy propionic acid—A DFT approach. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc*, 122: 661-669.
- Bozkurt F., Tornuk F., Toker O. S., Karasu S., Arici M., Durak M. Z., 2016. Effect of vaporized ethyl pyruvate as a novel preservation agent for control of postharvest quality and fungal damage of strawberry and cherry fruits. *Lebensm-Wiss Technol*, 65: 1044-1049.
- Cetin, B., Ucak Ozkaya, G., Uran, H., Durak, M. Z. (2019a). Determination of the effect of ethyl pyruvate on the surface contamination of sausage to *Listeria monocytogenes* by using Q-PCR assay. *J Saf Res*, 39(6): e12689.
- Cetin, B., Uran, H., Konak, M. (2019b). Effect of evaporated ethyl pyruvate on reducing *Salmonella* Enteritidis in raw chicken meat. *Braz J of Poultry Sci*, 21(2).
- Chang, A. K. T., Frias Jr, R. R., Alvarez, L. V., Bigol, U. G., Guzman, J. P. M. D. (2019). Comparative antibacterial activity of commercial chitosan and chitosan extracted from *Auricularia* sp. *Biocatal Agric Biotechnol*, 17: 189-195.
- Çoban Ö. E., Patır B. (2010). Antioksidan etkili bazı bitki ve baharatların gıdalarda kullanımı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5(2):7-19.
- da Silva, M. A., Iamanaka, B. T., Taniwaki, M. H., & Kieckbusch, T. G. (2013). Evaluation of the antimicrobial potential of alginate and alginate/chitosan films containing potassium sorbate and natamycin. *Packag Technol Sci*, 26(8): 479-492.
- De Elguea-Culebras G. O., Bourbon A. I., Costa M. J., Muñoz-Tebar N., Carmona M., Molina A., Vicente A. A. (2019). Optimization of a chitosan solution as potential carrier for the incorporation of *Santolina Chamaecyparissus* L. solid by-product in an edible vegetal coating on 'Manchego' Cheese. *Food Hydrocoll*, 89: 272-282.
- Fernandes Queiroz, M., Melo, K. R. T., Sabry, D. A., Sassaki, G. L., Rocha, H. A. O. (2015). Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation. *Mar drugs*, 13(1): 141-158.
- Fink, M. P. (2007). Ethyl pyruvate: a novel anti-inflammatory agent. *J Intern. Med*, 261(4): 349-362.
- Ghaderi, J., Hosseini, S. F., Keyvani, N., Gómez-Guillén, M. C. (2019). Polymer blending effects on the physicochemical and structural features of the chitosan/poly (vinyl alcohol)/fish gelatin ternary biodegradable films. *Food Hydrocoll*, 95: 122-132.
- Goy, R. C., & Assis, O. B. G. (2014). Antimicrobial analysis of films processed from chitosan and N, N, N-trimethylchitosan. *Braz J Chem Eng*, 31: 643-648.
- Hu D., Wang H., Wang L. (2016). Physical properties and antibacterial activity of quaternized chitosan/carboxymethyl cellulose blend films. *Lebensm-Wiss Technol*, 65: 398-405.
- Ignatova, M., Starbova, K., Markova, N., Manolova, N., Rashkov, I. (2006). Electrospun nano-fibre mats with antibacterial properties from quaternised chitosan and poly (vinyl alcohol). *Carbohydr Res*, 341(12): 2098-2107.
- Ilk, S., Sağlam, N., Özgen, M., Korkusuz, F. (2017). Chitosan nanoparticles enhances the anti-quorum sensing activity of kaempferol. *Int J Biol Macromol*, 94: 653-662.
- Jakubowska, E., Gierszewska, M., Nowaczyk, J., Olewnik-Kruszkowska, E. (2020). Physicochemical and storage properties of chitosan-based films plasticized with deep eutectic solvent. *Food Hydrocoll*, 108: 106007.
- Kaur P., Thakur R., Choudhary A. (2012). An in vitro study of the antifungal activity of silver/chitosan nanoformulations against important seed borne pathogens. *Int J Sci Res*, 1(7):83-86.
- Koc, B., Akyuz, L., Cakmak, Y. S., Sargin, I., Salaberria, A. M., Labidi, J., Kaya, M. (2020). Production and characterization of chitosan-fungal extract films. *Food Biosci*, 35: 100545.

- Lee, M. H., Kim, S. Y., Park, H. J. (2018). Effect of halloysite nanoclay on the physical, mechanical, and antioxidant properties of chitosan films incorporated with clove essential oil. *Food Hydrocoll*, 84: 58-67.
- Lian, H., Shi, J., Zhang, X., Peng, Y. (2020). Effect of the added polysaccharide on the release of thyme essential oil and structure properties of chitosan based film. *Food Packag*, 23: 100467.
- Lizárraga-Laborín, L. L., Quiroz-Castillo, J. M., Encinas-Encinas, J. C., Castillo-Ortega, M. M., Burruel-Ibarra, S. E., Romero-García, J., Rodríguez-Félix, D. E. (2018). Accelerated weathering study of extruded polyethylene/poly (lactic acid)/chitosan films. *Polym Degrad Stab*, 155: 43-51.
- Lozano-Navarro J.I., Diaz-Zavala N. P., Velasco-Santos C., Melo-Banda J. A., Parama- Gorcía U., Paraguay-Delgado F., Garcio- Alamila R., Martinez-Hernande A. L., Zapien- Castillo S. (2018). Chitosan-starch films with natural extracts: physical, chemical, morphological and thermal properties. *Materials*, 11(1): 120.
- Menazea, A. A., Eid, M. M., Ahmed, M. K. (2020). Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial activity of novel Chitosan/Tigecycline composite. *Int J Biol Macromol*, 147: 194-199.
- Namasivayam, S. K. R., Venkatachalam, G., Bharani, R. A. (2020). Immuno biocompatibility and anti-quorum sensing activities of chitosan-gum acacia gold nanocomposite (CS-GA-AuNC) against *Pseudomonas aeruginosa* drug-resistant pathogen. *Sustain Chem Pharm*, 17: 100300.
- Nataraj, D., Sakkara, S., Meghwal, M., Reddy, N. (2018). Crosslinked chitosan films with controllable properties for commercial applications. *Int J Biol Macromol*, 120: 1256-1264.
- Oh, J. W., Chun, S. C., Chandrasekaran, M. (2019). Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles and their broad-spectrum antifungal action compared to antibacterial activities against phytopathogens of tomato. *Agronomy*, 9(1): 21.
- Ortiz-Duarte G., Pérez-Cabrera L. E., Artés-Hernández F., Martínez-Hernández G. B. (2019). Ag-chitosan nanocomposites in edible coatings affect the quality of fresh-cut melon. *Postharvest Biol Tec*, 147: 174-184.
- Othman S. H. (2014). Bio-nanocomposite materials for food packaging applications: types of biopolymer and nano-sized filler. *Agric Agric Sci Procedia*, 2: 296-303.
- Peng Y., Li Y. (2014). Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. *Food Hydrocoll*, 36: 287-293.
- Perdones Á., Escriche I., Chiralt A., Vargas M. (2016). Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on volatile profile of strawberries during storage. *Food Chem*, 197: 979-986.
- Perinelli D. R., Fagioli L., Campana R., Lam J. K., Baffone W., Palmieri G. F., Bonacucina G. (2018). Chitosan-based nanosystems and their exploited antimicrobial activity. *Eur J Pharm Sci*, 117: 8-20.
- Pfaller, M. A., Messer, S. A., Boyken, L., Hollis, R. J., Diekema, D. J. (2003). In vitro susceptibility testing of filamentous fungi: Comparison of Etest and reference M38-A microdilution methods for determining posaconazole MICs. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 45(4): 241–244.
- Qin, Y., Liu, Y., Yuan, L., Yong, H., Liu, J. (2019). Preparation and characterization of antioxidant, antimicrobial and pH-sensitive films based on chitosan, silver nanoparticles and purple corn extract. *Food Hydrocoll*, 96: 102-111.
- Rhim J. W., Hong S. I., Park H. M., Ng, P. K. (2006). Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. *J Agric Food Chem*, 54(16): 5814-5822.
- Salari, M., Khiabani, M. S., Mokarram, R. R., Ghanbarzadeh, B., Kafil, H. S. (2021). Use of gamma irradiation technology for modification of bacterial cellulose nanocrystals/chitosan

- nanocomposite film. *Carbohydr Polym*, 253: 117144.
- Saricaoglu, F. T., Tural, S., Gul, O., Turhan, S. (2018). High pressure homogenization of mechanically deboned chicken meat protein suspensions to improve mechanical and barrier properties of edible films. *Food Hydrocoll*, 84: 135-145.
- Seydim, A. C., Sarikus, G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Res Int*, 39(5): 639-644.
- Shankar S., Rhim J. W. (2018). Preparation of sulfur nanoparticle-incorporated antimicrobial chitosan films. *Food Hydrocoll*, 82:116-123.
- Singh K., Mishra A., Sharma D., Singh K. (2019). Antiviral and antimicrobial potentiality of nano drugs. In *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems*, 343-356.
- Swain S. K., Dash S., Behera C., Kisku S. K., Behera L. (2013). Cellulose nanobiocomposites with reinforcement of boron nitride: study of thermal, oxygen barrier and chemical resistant properties. *Carbohydr Polym*, 95(2): 728-732.
- Tornuk F., Durak M. Z. (2015). A novel method for fresh-cut decontamination: efficiency of vaporized ethyl pyruvate in reducing *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157: H7 from fresh parsley. *J Food Process Preserv*, 39(6): 1518-1524.
- Ulloa L., Ochani M., Yang H., Tanovic M., Halperin D., Yang R., Tracey K. J. (2002). Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(19): 12351-12356.
- Wang, B., Sui, J., Yu, B., Yuan, C., Guo, L., Abd El-Aty, A. M., Cui, B. (2021). Physicochemical properties and antibacterial activity of corn starch-based films incorporated with *Zanthoxylum bungeanum* essential oil. *Carbohydr Polym*, 254: 117314.
- Wang, C., Niu, Y., Meng, Q., Zhang, L. (2019). Ethyl pyruvate (EP) suppressed post-harvest blue mold of sweet cherry fruit by inhibiting the growth of *Penicillium oxalicum*. *J Sci Food Agric*, 99(7): 3517-3524.
- Wang, X., Tang, R., Zhang, Y., Yu, Z., Qi, C. (2016). Preparation of a novel chitosan based biopolymer dye and application in wood dyeing. *Polymers*, 8(9): 338.
- Yadav, S., Mehrotra, G. K., Bhartiya, P., Singh, A., Dutta, P. K. (2020). Preparation, physicochemical and biological evaluation of quercetin based chitosan-gelatin film for food packaging. *Carbohydr Polym*, 227: 115348.
- Younes I., Sellimi S., Rinaudo M., Jellouli K., Nasri M. (2014). Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. *Int J Food Microbiol*, 185: 57-63.
- Youssef A. M., Abou-Yousef H., El-Sayed S. M., Kamel, S. (2015). Mechanical and antibacterial properties of novel high performance chitosan/nanocomposite films. *Int J Biol Macromol*, 76: 25-32.
- Zarandona, I., Barba, C., Guerrero, P., de la Caba, K., Maté, J. (2020a). Development of chitosan films containing β -cyclodextrin inclusion complex for controlled release of bioactives. *Food Hydrocoll*, 104: 105720.
- Zarandona, I., Puertas, A. I., Dueñas, M. T., Guerrero, P., de la Caba, K. (2020b). Assessment of active chitosan films incorporated with gallic acid. *Food Hydrocoll*, 101: 105486.
- Zhang B., Wang D. F., Li H. Y., Xu Y., Zhang L. (2009). Preparation and Properties of Chitosan-Soybean Trypsin Inhibitor Blend Film with Anti-*Aspergillus flavus* Activity. *Ind Cropsö Prod*, 29(2-3): 541-548.
- Zhang X., Xiao G., Wang Y., Zhao Y., Su H., Tan T. (2017). Preparation of chitosan-TiO₂ composite film with efficient antimicrobial activities under visible light for food packaging applications. *Carbohydr Polym*, 169: 101-107.
- Zhang, Q., Wu, Q., Lin, D., Yao, S. (2013). Effect and mechanism of sodium chloride on the

formation of chitosan–cellulose sulfate–tripolyphosphate crosslinked beads. *Soft Matter*, 9(43): 10354-10363.

Zhang, X., Zhang, Z., Wu, W., Yang, J., Yang, Q. (2021). Preparation and characterization of chitosan/Nano-ZnO composite film with

antimicrobial activity. *Bioprocess and Biosyst Eng*, 44(6): 1193-1199.