



Preparation and antibacterial applications of poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate membranes containing delphinidin-3-glucoside, hyaluronic acid and orange oil by electrospinning method

Emine Kutlu^{1*}, Beliz Duyar¹, Muhammad Asım Ali¹, Fatih Mehmet Emen¹, Derya Kılıç¹, Sudesh Kumar²

¹Department of Chemistry, Faculty of Arts and Sciences, Burdur Mehmet Akif Ersoy University, 15100 Burdur, Türkiye

²School of Biological Sciences, University Sains Malaysia, 11800 Penang, Malaysia

Highlights:

- Preparation of biodegradable PHBHH_x and PHBHH_x-M membranes by electrospinning method
- Structural characterization and thermal behavior of membranes
- Examining the antibacterial activities of membranes on different bacterial cultures

Keywords:

- Electrospinning
- Membranes
- Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)
- Delphinidin-3-glucoside
- Hyaluronic acid
- Orange oil

Article Info:

Research Article

Received: 21.11.2023

Accepted: 07.07.2024

DOI:

10.17341/gazimmfd.1393199

Correspondence:

Author: Emine Kutlu

e-mail:

emine1044@gmail.com

phone: +90 506 710 3080

Graphical/Tabular Abstract

In this study, biodegradable PHBHH_x and PHBHH_x-M membrane (containing hyaluronic acid, delphinidin-3-glycoside and orange oil) was prepared by electrospinning method. Schematic illustration of the PHBHH_x-M membrane synthesis and characterization is given in Figure A.

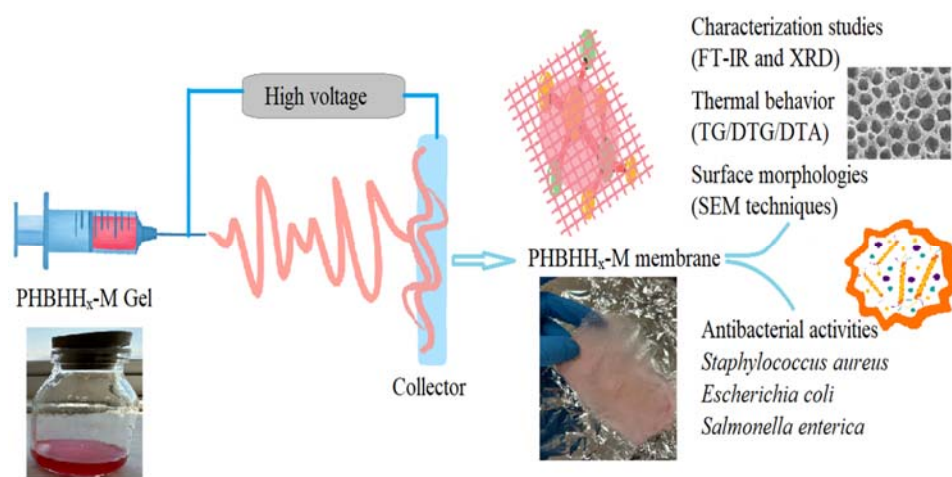


Figure A. Schematic illustration of the PHBHH_x-M membrane synthesis and characterization

Purpose:

Preparation of biodegradable Poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate (PHBHH_x) membrane and Poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate membrane (PHBHH_x-M) containing delphinidin-3-glucoside (anthocyanin), hyaluronic acid, orange oil using the electrospinning method.

Theory and Methods:

Biodegradable PHBHH_x and PHBHH_x-M membranes were prepared using the electrospinning method. FT-IR and XRD techniques were used in characterization studies. Thermal behavior with TG/DTG/DTA combined system; surface morphologies were examined by SEM. Their antibacterial activities on various bacteria have been investigated.

Results:

It was determined that the degradation of PHBHH_x and PHBHH_x-M membranes occurred in two steps and these membranes showed thermal stability up to 120°C and 130 °C, respectively. It was observed that PHBHH_x-M membrane had a significant increase in the number and diameter of pores compared to PHBHH_x membrane. While PHBHH_x-M membrane covers showed antibacterial effects against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* at lower concentrations than PHBHH_x membrane, their antibacterial effect on *Listeria monocytogenes* bacteria did not change.

Conclusion:

New PHBHH_x membranes loaded with different active ingredients can be prepared using PHBHH_x copolymer and can find application in various sectors.



Delphinidin-3-glikozid, hyaluronik asit ve portakal yağı içeren poli-3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksiheksaonat membranlarının elektroçirme yöntemi ile hazırlanması ve antibakteriyel uygulamaları

Emine Kutlu^{1*}, Beliz Duyar¹, Muhammad Asım Ali¹, Fatih Mehmet Emen¹, Derya Kılıç¹, Sudesh Kumar²

¹Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 15100, Burdur, Türkiye

²Biyolojik Bilimler Okulu, Sains Malezya Üniversitesi, 11800 Penang, Malezya

Ö N E Ç İ K A N L A R

- Biyolojik olarak parçalanabilen PHBHH_x ve PHBHH_x-M membranının elektroçirme yöntemi ile hazırlanması
- Membranların yapısal karakterizasyonun ve termal davranışları
- Membranların antibakteriyel etkinliklerinin farklı bakteri kültürleri üzerinde incelenmesi

Makale Bilgileri

Araştırma Makalesi

Geliş: 21.11.2023

Kabul: 07.07.2024

DOI:

10.17341/gazimmfd.1393199

Anahtar Kelimeler:

Elektroçirme, membranlar, poli(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksiheksanoat, delphinidin-3-glikozit delphinidin-3-glucoside, hyaluronik asit, portakal yağı

ÖZ

Bu çalışmada, biyolojik olarak parçalanabilen Poli-3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksiheksaonat (PHBHH_x) membranı ve delphinidin-3-glikozit (antosiyanın, pembe-mor), yüksek nem tutma kapasitesine sahip hyaluronik asit ile portakal yağı içeren Poli-3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksiheksaonat (PHBHH_x-M) membranları elektroçirme yöntemi kullanılarak hazırlandı. Membranların yapısal karakterizasyonları FT-IR ve XRD teknikleri kullanılarak gerçekleştirildi. Membranların termal davranışları TG/DTG/DTA kombine sistemiyle, yüzey morfolojileri ise SEM tekniği ile incelendi. Bu membranların antibakteriyel aktivitesi farklı bakteri kültürlerine (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*) karşı incelendi. Antibakteriyel çalışmaların sonuçlarına göre PHBHH_x membranının *Escherichia coli* üzerinde 12,5 mg/mL'de, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella enterica* üzerinde 6,25 mg/mL'de, *Listeria monocytogenes* bakterileri üzerinde ise 3,12 mg/mL'de etkin oldukları görülmektedir. PHBHH_x-M membranı ise *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, bakterileri üzerinde 1,56 mg/mL gibi düşük konsantrasyonda etki ederken, *Listeria monocytogenes* bakterileri üzerinde ise 3,12 mg/mL'de etkinlik göstermiştir. Polimere yapılan antosiyanın, hyaluronik asit ve portakal yağı katkılarının *Listeria monocytogenes* bakterileri hariç antibakteriyel etkinliği arttırdığı gözlenmiştir. Hazırlanan membranların yara örtüsü olarak sağlık alanında kullanılma potansiyeli vardır.

Preparation and antibacterial applications of poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate membranes containing delphinidin-3-glucoside, hyaluronic acid and orange oil by electrospinning method

H I G H L I G H T S

- Preparation of biodegradable PHBHH_x and PHBHH_x-M membranes by electrospinning method
- Structural characterization and thermal behavior of membranes
- Examining the antibacterial activities of membranes on different bacterial cultures

Article Info

Research Article

Received: 21.11.2023

Accepted: 07.07.2024

DOI:

10.17341/gazimmfd.1393199

Keywords:

Electrospinning, membranes, poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate, delphinidin-3-glucoside, hyaluronic acid, orange oil

ABSTRACT

In this study, biodegradable Poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate (PHBHH_x) membrane and Poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate (PHBHH_x-M) membranes which contains delphinidin-3-glucoside (anthocyanin, pink-purple), hyaluronic acid and orange oil were prepared using the electrospinning method. The characterization studies were carried out via FT-IR and XRD techniques. Thermal behaviors of membranes were investigated via TG/DTG/DTA combined system, and their surface morphologies were examined with the SEM technique. The antibacterial activity of these membranes was studied against different bacterial cultures (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*). According to the antibacterial results, it is seen that PHBHH_x membrane is effective on *Escherichia coli* at 12.5 mg/mL, on *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* at 6.25 mg/mL, and on *Listeria monocytogenes* bacteria at 3.12 mg/mL. PHBHH_x-M membrane is effective on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* bacteria at a low concentration of 1.56 mg/mL, while it is effective on *Listeria monocytogenes* bacteria at 3.12 mg/mL. It has been observed that anthocyanin, hyaluronic acid and orange oil additives to the polymer increase the antibacterial activity, except for *Listeria monocytogenes* bacteria. The prepared membranes have potential to be used in the healthcare field.

*Sorumlu Yazar/Yazarlar / Corresponding Author/Authors : *emine1044@gmail.com, duyarb@hotmail.com, masimali6564@gmail.com, femeni106@gmail.com, klc.derya13@gmail.com, ksudesh@usm.my / Tel: +90 506 710 3080

1. Giriş (Introduction)

Polihidroksialkanoatlar (PHA'lar) petrol bazlı plastiklere alternatif olarak dünya genelinde büyük ilgi görmektedir. Bu polimerler bakteriler tarafından sentezlenebilir ve sentezinde karbon açısından zengin substratlardan (yağ, şeker vs. gibi) faydalanılır [1]. Poli(3-hidroksibutirat-co-3-hidroksiheksanoat)'lar (PHBHH_x'ler) PHA ailesinin bir üyesi olup biyolojik olarak parçalanabilirliği, toksik olmaması [2], poli(3-hidroksibutirat)'a kıyasla sahip olduğu gelişmiş termal kararlılık [3] ve mekanik dayanıklılıkları [4] nedeniyle araştırmacıların dikkatini çekmektedir. İki monomerin birleşiminden oluşan PHBHH_x kopolimerleri biyobozunur ve biyouyumlu olması nedeniyle sanayi ürünleri (pipet, çatal bıçak takımı, kaplar, gıda ambalajı, kahve kapsülleri vs. gibi), denizcilik (balıkçılık ürünleri), atık su arıtımı gibi alanlarda kullanım alanı bulmaktadır [2]. Bu özelliklerinin yanı sıra biyolojik olarak emilebilen bu kopolimer düz kas hücreleri, fibroblastlar, osteoblastlar ve kemik iliği hücreleri ile olan uyumları nedeniyle iskele malzemesi olarak kemik ve doku mühendisliğinde araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir [5–7]. PHBHH_x kopolimerlerinin fonksiyonelleştirilmesiyle elde edilen biyomalzemelerin hücre büyümesini desteklemesi [8], insan göbek kordonundan türetilen mezenkimal kök hücrelerinin çoğalmasını ve osteojenik farklılaşmayı geliştirmesi [9], esnek ve sistemik basınca dayanıklılığı gibi özellikleri literatürde mevcuttur. Ayrıca kanser tedavisinde ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilmesi rapor edilen bu kopolimerin özellikle elektroçizme tekniği ile elde edilen PHBHH_x mikro ve nanolifleri şeffaf ya da yarı saydam optik özelliklere sahip olabilir ve yara örtüsü ve cilt maskesi olarak sağlık ve kozmetik sektörlerinde [10] uygulanabilir.

Bitkilerin sekonder metabolitleri arasında yer alan antosiyaninler kimyasal açıdan flavan' a benzer flavonoidler olup yapısında 15 C içermektedir. Başlıca bilinen antosiyaninler Pelargonidin, Siyanidin, Delfinidin, Peonidin, Petunidin ve Malvidin olup yapısında bulunan R1 ve R2 fonksiyonel uç gruplarına göre farklı adlandırılır [11, 12]. Antosiyaninler üzüm, elma, yaban mersini, çilek, böğürtlen, ahududu, havuç, patlıcan, lahanaya, pancar ve soğan gibi renkli meyve ve sebzelerde bulunur. Geniş renk çeşitliliğine (turuncu, pembe, kırmızı, magenta, mor, mavi ve mavi-siyah gibi) sahip antosiyaninlerde bu renk çeşitliliği molekül yapısı, pH, sıcaklık ve ışık gibi parametrelere bağlı olarak değişir. Avrupa Birliği mevzuatına göre E163 ile kodlanan, FDA tarafından doğal renklendirici olarak onaylanan antosiyaninler, renk çeşitliliği ve sahip oldukları düşük toksisite nedeni ile kozmetik, gıda ve ilaç endüstrisinde kullanım alanı bulmaktadır [12]. Antienflamatuar ajan ve serbest radikal temizleyici, fitokimyasalların flavonoid grubunun bir parçası olan antosiyaninlerin güneşe maruz kalmanın neden olduğu cilt hasarını azalttığı bilinmektedir [13, 14].

Portakal yağı, sahip olduğu dengeli doymuş/doymamış yağ asitleri oranı (0,47) ve yüksek doymamış yağ asidi (linoleik ve linolenik) seviyeleri nedeniyle sağlıklı bir yağ kaynağı olarak kabul edilmektedir. Portakal yağında bulunan ve önemli bir uçucu bileşik olan D-limonen ile yapılan çalışmalar, portakal yağının antitümör, hepatoprotektif ve kemopreventif aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir [15]. Portakal yağında yüksek miktarda bulunan D-limonen, ciltte bulunan gözenekler üzerinde büzücü etki göstererek gözeneklerin görünümünü iyileştirirken, kirlilik, duman ve güneş ışınları gibi çevresel stres faktörlerinin neden olduğu hasarlardan da cildi korumaya yardımcı olur. Portakal yağı, yüksek antioksidan içeriği sayesinde yara iyileşmesini ve sağlıklı kolajen üretimini destekleyen ve serbest radikal hasarını en aza indirerek cilt yaşlanmasını yavaşlatmaya yardımcı olan besleyici aromaterapötik üründür. Ayrıca portakal yağı ciltte kan akışını artırma özelliğine sahiptir. Bu özelliği sayesinde cildin ihtiyacı olan temel besin maddelerinin cilde iletilmesini kolaylaştırır. Bu sayede cildin parlaklığını artırır, cilt berraklığını iyileştirir ve lekeleri azaltarak cilt tonunu eşitler [16]. Portakal esansiyel yağlarının anksiyete ve mide

bulantısı tedavilerinde etkili olduğu, diş kliniklerinde portakal ve lavanta esansiyel yağlarının solunmasının hastaların duygusal ruh halleri üzerindeki olumlu gösterdiği literatürde belirtilmektedir [15, 17]. Bu çalışmada, delphinidin-3-glikozit (antosiyenin, pembe-mor), yüksek nem tutma kapasitesine sahip hyaluronik asit ile portakal yağı içeren ve biyolojik olarak parçalanabilen Poli-3-hidroksibutirat-co-3-hidroksiheksanoat membranları elektroçizme yöntemi kullanılarak hazırlandı ve yapısal karakterizasyon çalışmalarında FT-IR ve XRD teknikleri kullanıldı. Membranların termal davranışları TG/DTG/DTA kombine sistemiyle, yüzey morfolojisi ise SEM tekniği ile incelendi. Ayrıca membranların *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica subsp. Enterica*, *Listeria monocytogenes* bakterileri üzerine antibakteriyel etkinlikleri araştırıldı.

2. Materyal ve Yöntem (Material and Method)

2.1. Materyaller (Materials)

Poli-3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksiheksanoat (PHBHH_x) kopolimeri Prof. Dr. Sudesh KUMAR (Sains Üniversitesi-Malezya)'dan temin edilmiştir. Diklorometan (CH₂Cl₂), kloroform ve delphinidin 3-glukozit klorür (antosiyenin, Pembe-mor), hyaluronik asit Sigma Aldrich firmasından, portakal uçucu yağı ise Talya firmasından ticari olarak satın alınmıştır. Antibakteriyel çalışmalarda Mueller Hinton Broth II (OXOID) besiyeri, 96 Kuyucuklu steril mikropilaka (Corning costar 3599) ve Tryptic soy Broth (OXOID, Merck) kullanılmıştır.

Yapı aydınlatma çalışmalarında Shimadzu marka IR Affinity-1S model FT-IR cihazı kullanıldı. Ölçümler KBr pellet kullanılarak 4000-400 cm⁻¹ aralığında gerçekleştirildi. X-ışını toz kırınımı (XRD) analizlerinde Bruker AXS marka ve D8 Advance model cihaz kullanıldı. X-ışını kırınımı (XRD) çalışmaları, 40 kV'da Nikel filtre (0.2 mm'lik) ve bakır tüp (Cu-K_α) radyasyonu kullanılarak gerçekleştirildi. XRD verileri 0.02° tarama adımı ve 10° ≤ θ ≤ 90° açılarında kaydedildi. TG/DTA analizleri ise Seiko SII TG/DTA 7200 kullanılarak gerçekleştirildi. PHBHH_x ve PHBHH_x-M membranlarının yüzey morfolojisi, 10 kV'de JEOL JSM-7100-F mikroskopu kullanılarak alan emisyon taramalı elektron mikroskopu (FE-SEM) ile incelendi. Antibakteriyel çalışmalarda Epoch marka Biotek model 96 kuyucuklu plaka okuyucu kullanıldı.

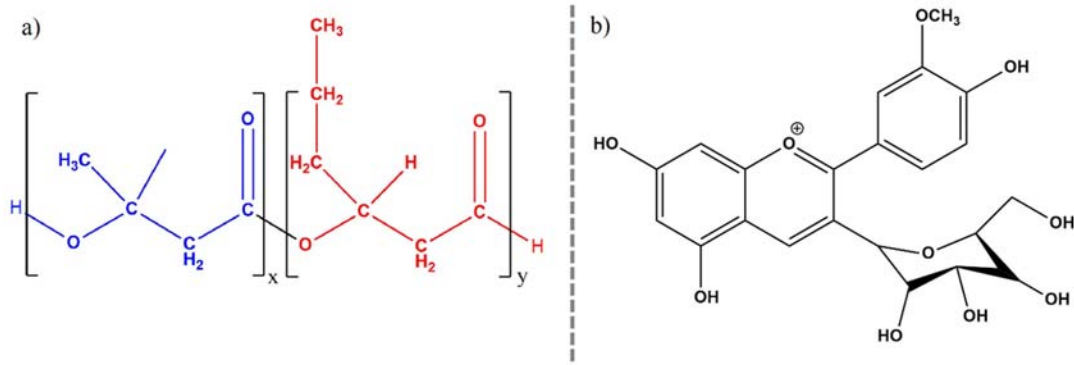
2.2. Yöntem (Method)

2.2.1. PHBHH_x ve PHBHH_x-M jellerinin hazırlanması (Preparation of PHBHH_x and PHBHH_x-M gels)

PHBHH_x ve PHBHH_x-M Jelleri literatüre uygun olarak hazırlanmıştır [18]. 1,2 gr PHBHH_x kopolimeri üzerine 4 mL kloroform ve 1 mL diklorometan eklenerek 298 K'de 2 saat karıştırılarak PHBHH_x jeli elde edildi. PHBHH_x-M jeli elde etmek amacıyla 1,2 gr PHBHH_x kopolimeri 5 mL çözücü içerisinde (4:1 oranında kloroform + diklorometan) 1 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Bu karışımın üzerine 500 µL delfinidin-3-glikozid çözeltisi (0,2 gr delphinidin 3-glukozit klorür + 500 µL H₂O), 100 µL hyaluronik asit çözeltisi (0,01 gr + 500 µL H₂O), 100 µL portakal yağı eklenerek 1 saat daha karıştırıldı. PHBHH_x kopolimerinin genel yapısı (a) ve Delfinidin-3-glikozit'in (b) yapısı Şekil 1'de verilmektedir. PHBHH_x ve PHBHH_x-M jellerinin görüntüsü ise Şekil 2'de verilmektedir.

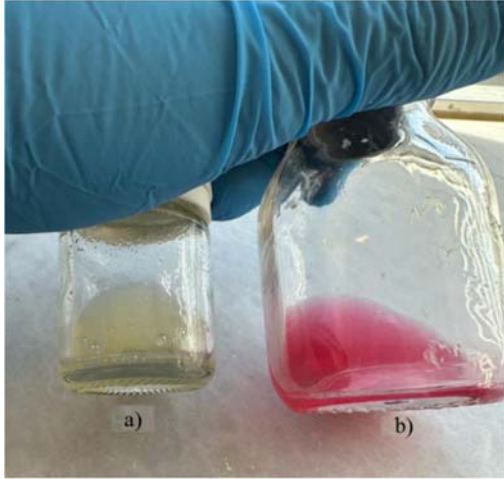
2.2.2. PHBHH_x ve PHBHH_x-M membranlarının elektroçizme yöntemiyle hazırlanması (Preparation of PHBHH_x and PHBHH_x-M membranes via electrospinning method)

PHBHH_x ve PHBHH_x-M membranlar oda sıcaklığında elektroçizme sistemi kullanılarak hazırlandı [19]. PHBHH_x ve PHBHH_x-M jelleri elektroçizme düzeneğine ayrı ayrı alınarak 1mL/dk akış hızında, 15 cm mesafede, 19 kV potansiyel uygulanarak toplayıcıda membranlar



Şekil 1. Poli-3-hidroksibutirat-co-3-hidroksiheksaonat (PHBHH_x) kopolimerinin (a) ve Delfinidin-3-glikozit'in (b) yapısı
(Structure of poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate (PHBHH_x) copolymer (a) and (b) Delphinidin-3-glycoside)

oluşturuldu [18, 20]. Elektroegirme düzeneği, PHBHH_x ve PHBHH_x-M membranlarının görüntüsü Şekil 3'de verilmektedir.



Şekil 2. (a) PHBHH_x ve (b) PHBHH_x-M jellerinin görüntüsü
(Image of (a) PHBHH_x and (b) PHBHH_x-M gels)

2.2.3. Antibakteriyel çalışmalar (Antibacterial studies)

Antimikrobiyal çalışmalar Minimum inhibisyon Konsantrasyonu (MİK) yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Mueller Hinton Broth II(MHBII) besiyeri kullanılarak PHBHH_x ve PHBHH_x-M membranları en az 8 farklı konsantrasyonda (0-50 mg/mL) besiyeri ile muamele edildi. Besiyeri 96 kuyucuklu düz tabanlı mikropalakaya aktarıldı. Besiyeri üzerine taze bakteri kültürleri fizyolojik tampon içerisinde 0,5 McFarland değerinde süspansiyon edilerek %10 oranında inoküle edildi. Mikroorganizmalar türe uygun optimum sıcaklık ve zamanda inkübe edildikten sonra mikropalaka okuyucusunda 600 nm dalga boyunda okunarak absorbans değerleri belirlendi. Elde edilen bu absorbans değerlerine göre MİK değerleri hesaplandı.

3. Sonuçlar ve Tartışmalar (Results and Discussions)

3.1. Yapısal Karakterizasyon Çalışmaları (Structural Characterization Studies)

3.1.1. FT-IR sonuçları (FT-IR results)

PHBHH_x ve PHBHH_x-M membranlarına ait FT-IR spektrumları Şekil 4'de verilmektedir. PHBHH_x kopolimerinin FT-IR spektrumunda 3450 cm⁻¹'de yayvan absorpsiyon bandı O-H gerilme titreşimlerine

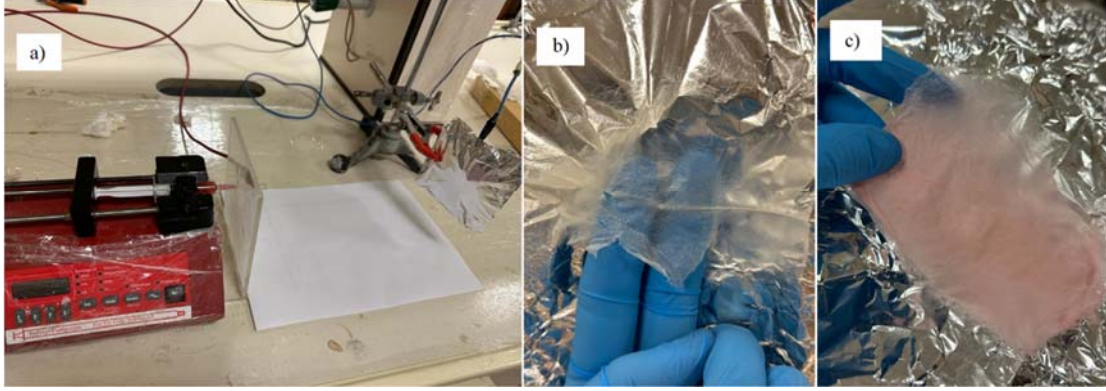
aittir. 2981-2883 cm⁻¹'de gözlenen bantlar ise kopolimerin yapısında bulunan alifatik C-H gruplarının (metil ve metilen) simetrik ve asimetric gerilme titreşimlerine aittir. 1734 cm⁻¹'de gözlenen keskin bant karbonil grubunun (C=O) simetrik gerilme titreşimine, 1290 cm⁻¹'de gözlenen yayıf bant ise C-O gerilme titreşimine atfedilir [21]. PHBHH_x kopolimerinin fonksiyonel grupları ile PHBHH_x-M'in içerisinde bulunan delfinidin-3-glikozit, hyaluronik asit ve portakal yağı (Askorbik asit, C vitamini)'in yapısındaki fonksiyonel gruplar benzer olduğundan PHBHH_x-M ve PHBHH_x membranlarının FT-IR spektrumları birbirine benzemektedir. PHBHH_x-M'in FTIR spektrumunda 3130-3670 cm⁻¹ aralığında ve 3437 cm⁻¹'de gözlenen yayvan band O-H gerilme titreşimlerine aittir. Bu aralıkta delfinidin-3-glikozit, hyaluronik asit ve portakal yağının (Askorbik asit, C vitamini) yapısındaki O-H gerilme titreşimlerine ait yayvan bantlar aromatik C-H ve N-H (hyaluronik asit yapısındaki) titreşim bantları ile örtüşmektedir. 2982-2870 cm⁻¹'de gözlenen bantlar alifatik C-H gruplarının simetrik ve asimetric gerilme titreşimlerine aittir ve pik şiddeti artmıştır. Pik şiddetinde gözlenen bu artış PHBHH_x-M'in içerisindeki artan Alifatik C-H gruplarından kaynaklanmaktadır. 1740 cm⁻¹'de gözlenen keskin bant karbonil grubunun (C=O) simetrik gerilme titreşimine, 1280 cm⁻¹'de gözlenen band ise C-O gerilme titreşimlerine aittir. 1458 cm⁻¹'deki gözlenen titreşim bandı aromatik C=C gerilme titreşimlerine atfedilir. 1380 cm⁻¹'de gözlenen band C-N gerilme titreşimine, 1224-1186 cm⁻¹'de gözlenen band ise düzlem içi C-H bükülme titreşimine aittir. Ayrıca 1099-981 cm⁻¹'de düzlem dışı C-H eğilme titreşimleri gözlenmektedir. C-H titreşimlerinin düzlem dışı bükülme titreşimleri ise 827 cm⁻¹ 'de görülmektedir [22, 23].

3.1.2. XRD sonuçları (XRD results)

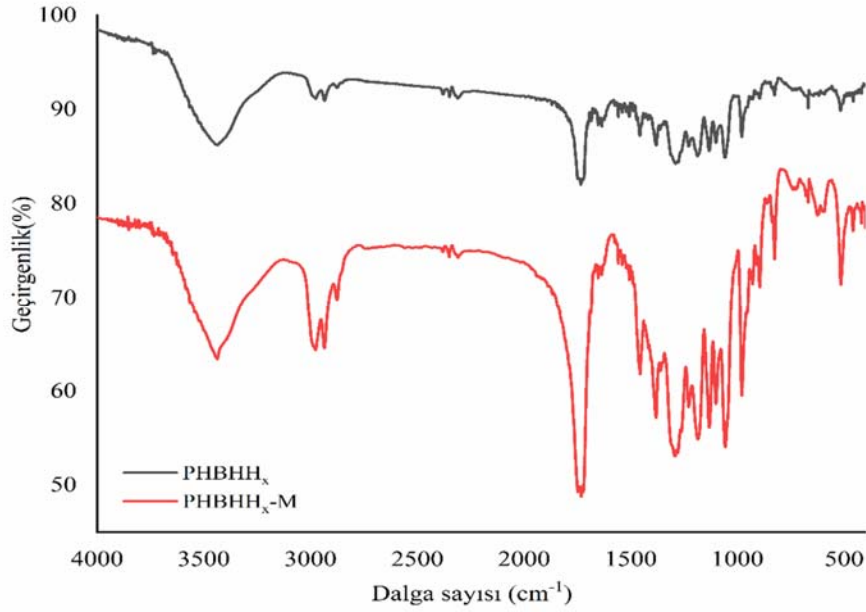
PHBHH_x ve PHBHH_x-M membranlarının XRD toz desenleri Şekil 5'de verilmektedir. PHBHH_x membranlarının XRD toz deseninde 2θ değerleri sırasıyla 13,5 (020); 17,1 (110); ve 25,6 (031) olan kırınım pikleri görülmektedir [21,24-27]. PHBHH_x membranına yapılan delfinidin-3-glikozit, hyaluronik asit ve portakal yağı katkıları XRD pik şiddetlerinde azalmaya neden olmuş, kristalinliği azaltmıştır. PHBHH_x membranında 20.17°'de gözlenen pik PHBHH_x-M membranında gözlenmemektedir. Ayrıca PHBHH_x membranında 30.44°'te gözlenen XRD pikinin de şiddetinde azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlar delfinidin-3-glikozit, hyaluronik asit, portakal yağı katkılarının PHBHH_x-M membranına başarıyla yüklendiğini göstermektedir.

3.1.3. PHBHH_x ve PHBHH_x-M membranlarının termal analiz çalışmaları (Study of thermal analysis of PHBHH_x and PHBHH_x-M membranes)

Polimerlerin karakterizasyon çalışmalarında TGA ve DSC teknikleri yaygın olarak kullanılmaktadır [28]. PHBHH_x ve PHBHH_x-M



Şekil 3. (a) Elektroçğirme dzenegi ile (b) PHBHH_x ve (c) PHBHH_x-M membranlarının gçrüntüsü
(Image of a) electrospinning setup (b) PHBHH_x and (c) PHBHH_x-M membranes)



Şekil 4. PHBHH_x ve PHBHH_x-M membranlarının FTIR spektrumları (FT-IR spectra of PHBHH_x and PHBHH_x-M membranes)

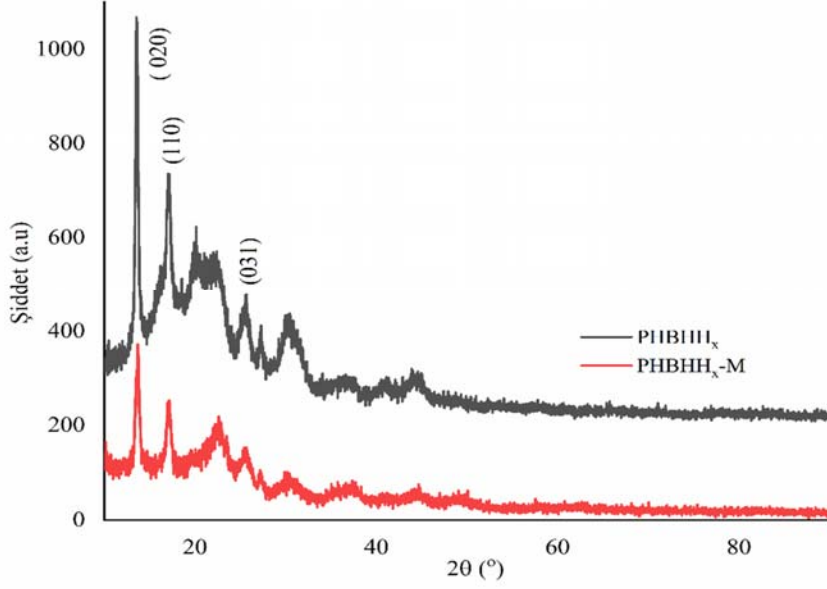
membranlarının termal analiz çalışmaları TG/DTG/DTA kombine sistemi ile 25-600°C sıcaklık aralığında gerçekteşirildi. PHBHH_x membranına ait TG/DTG/DTA eğrileri Şekil 6'da, PHBHH_x-M membranına TG/DTG/DTA eğrileri ise Şekil 7'de verilmektedir. PHBHH_x membranının TG eğrisinde 25-120°C sıcaklık aralığında ktle kaybı gözlenmemiştir. TG ve DTG eğrilerinde bozunmanın iki basamakta gerçekteştiği gçrölmektedir. Birinci bozunma basamağı 120-260°C aralığında %3,4 ktle kaybı ile, ikinci bozunma basamağı ise 260-310°C aralığında %91,79 ktle kaybı ile gerçekteşmiştir. DTA eğrisinde 120-150°C aralığında birinci bozunma basamağına karşılık gelen zayıf endotermik ve 250-315°C aralığında ikinci bozunma basamağına karşılık gelen ve minimum noktası 290°C olan endotermik şiddetli bir pik gözlenmektedir.

PHBHH_x-M membranının TG eğrisinde 25-130 °C sıcaklık aralığında ktle kaybı gözlenmemiştir. PHBHH_x-M membranının TG ve DTG eğrilerinde bozunmanın iki basamakta gerçekteştiği gçrölmektedir. Birinci bozunma basamağı 130-250°C aralığında %2,86'lık ktle kaybı ile, ikinci bozunma basamağı ise 250-302°C aralığında %95,97'lik ktle kaybı ile gerçekteşmektedir. DTA eğrisinde ise 123-152°C aralığında birinci bozunma basamağına karşılık gelen zayıf

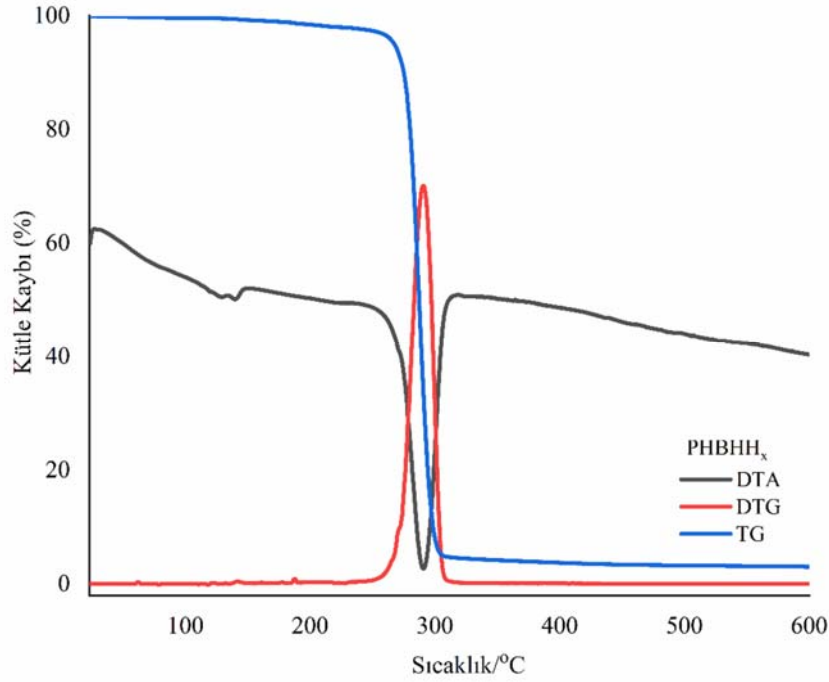
endotermik ve 245-310°C aralığında ikinci bozunma basamağına karşılık gelen ve minimum noktası 288°C olan şiddetli endotermik bir pik gözlenmektedir. Polimerin (PHBHH) ve elektroçğirme tekniği ile elde edilen PHBHH_x-M membranlarının yapısındaki değişimler (kristalin-amorf geçişleri vb.) TG'de ktle kayıplarında farklılığa ve DTA'da farklı termal etkilerin gözlenmesine veya termal etkinin gözlendiği sıcaklıkların kaymasına neden olabilir. Polimer ve membranın termal analiz sonuçları membran oluştuktan sonra ktle kaybında farklılığı göstermekle kalmamış aynı zamanda termal etkilerin gözlendiği sıcaklık değerlerinde de kaymaları gçstermiştir. Ktle kaybı farklılıklarını katkı bileşenlerinin membran içerisine başarıyla yüklenmesini gçstererek FT-IR sonuçlarını desteklemektedir.

3.1.4. PHBHH_x ve PHBHH_x-M membranlarının SEM analizi (SEM analysis of PHBHH_x and PHBHH_x-M membranes)

PHBHH_x ve PHBHH_x-M membranlarının yüzey morfolojisi SEM analizi ile incelendi. PHBHH_x membranlarının SEM gçrüntüleri yüzeyin pürüzlü olduğunu ve az sayıda gözenek içeren film yapısında olduğunu gçstermektedir. PHBHH_x-M membranlarının SEM



Şekil 5. PHBHH_x ve PHBHH_x-M membranlarının XRD toz desenleri (XRD powder patterns of PHBHH_x and PHBHH_x-M membranes)



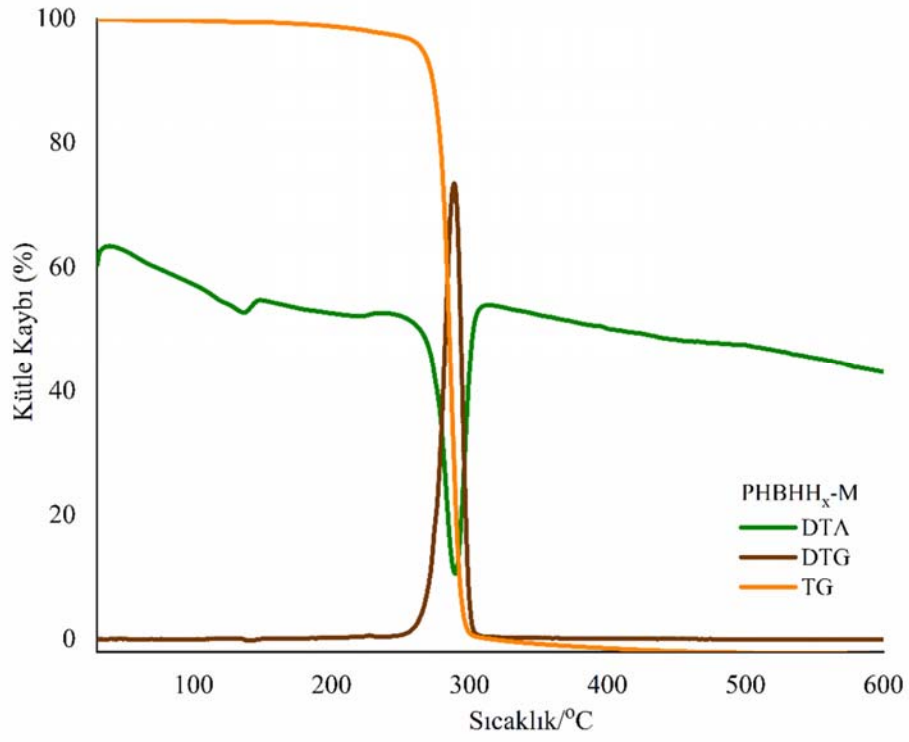
Şekil 6. PHBHH_x membranına ait TG/DTA/DTG eğrileri (TG/DTA/DTG curves of PHBHH_x membrane)

görüntülerinde ise yapıda lif ve gözenek oranının arttığı görülmektedir. PHBHH_x membranlarına ait SEM görüntüleri Şekil 8'de ve PHBHH_x-M membranlarına ait SEM görüntüleri ise Şekil 9'da verilmektedir.

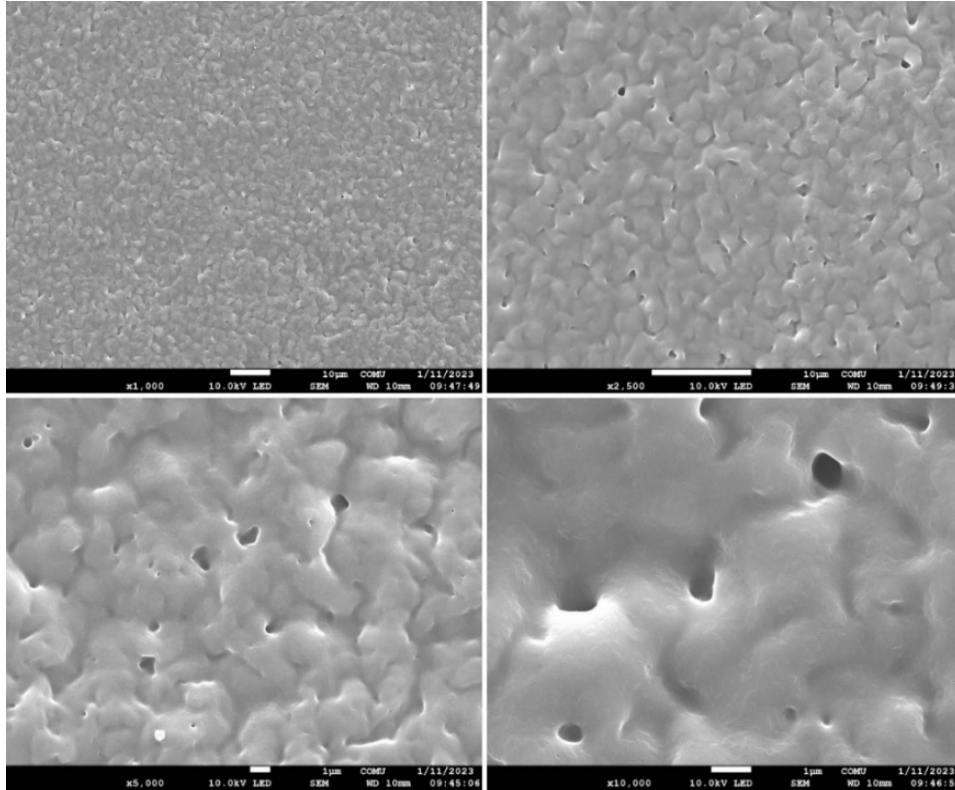
3.2. Antibakteriyel Sonuçları (Antibacterial Results)

PHBHH_x ve PHBHH_x-M membranlarının *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* bakterileri üzerinde oluşturdukları antibakteriyel etkinlikleri MİK yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. 8 farklı konsantrasyonda (0-50 mg/mL aralığında) hazırlanan PHBHH_x ve PHBHH_x-M

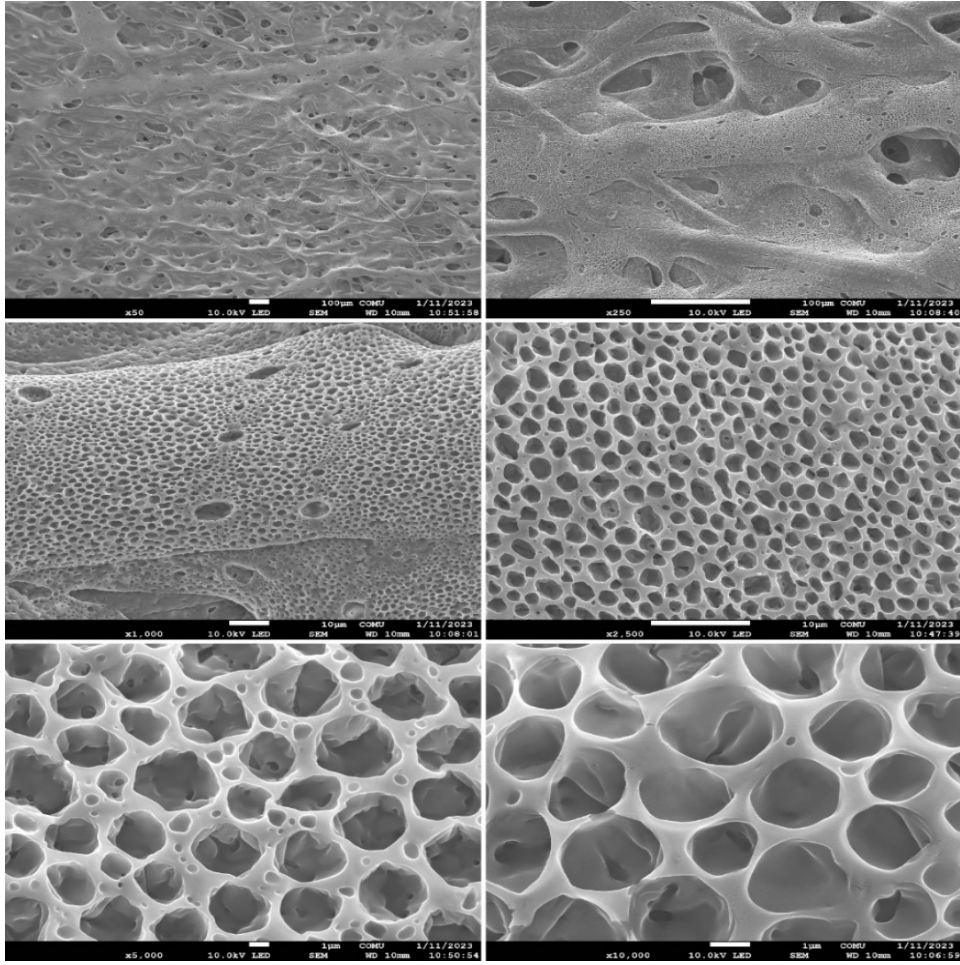
membranlarının 600 nm dalga boyunda absorpsiyon değerlerine karşı oluşturulan grafikler Şekil 10 ve Şekil 11'de gösterilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre PHBHH_x membranlarının *Escherichia coli* üzerinde 12,5 mg/mL'de, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella enterica* üzerinde 6,25 mg/mL'de, *Listeria monocytogenes* bakterileri üzerinde ise 3,12 mg/mL'de etkin oldukları görülmektedir. PHBHH_x-M membranları ise *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, bakterileri üzerinde 1,56 mg/mL gibi düşük konsantrasyonda, *Listeria monocytogenes* bakterileri üzerinde ise 3,12 mg/mL'de etkinlik göstermiştir. PHBHH_x ve PHBHH_x-M membranları için elde edilen MİK değerleri Tablo 1'de özetlenmektedir.



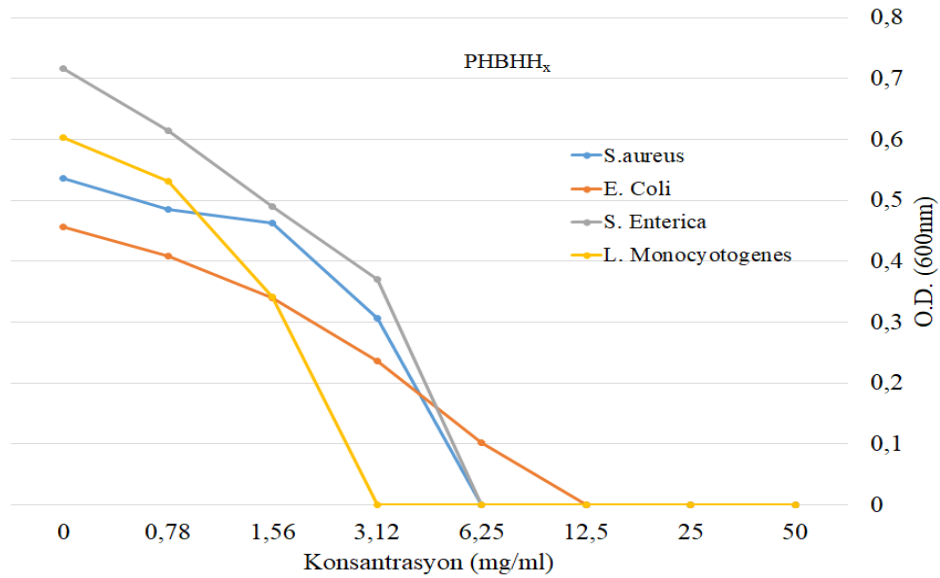
Şekil 7. PHBHH_x-M membranına ait TG/DTA/DTG eğrileri (TG/DTA/DTG curves of PHBHH_x-M membrane)



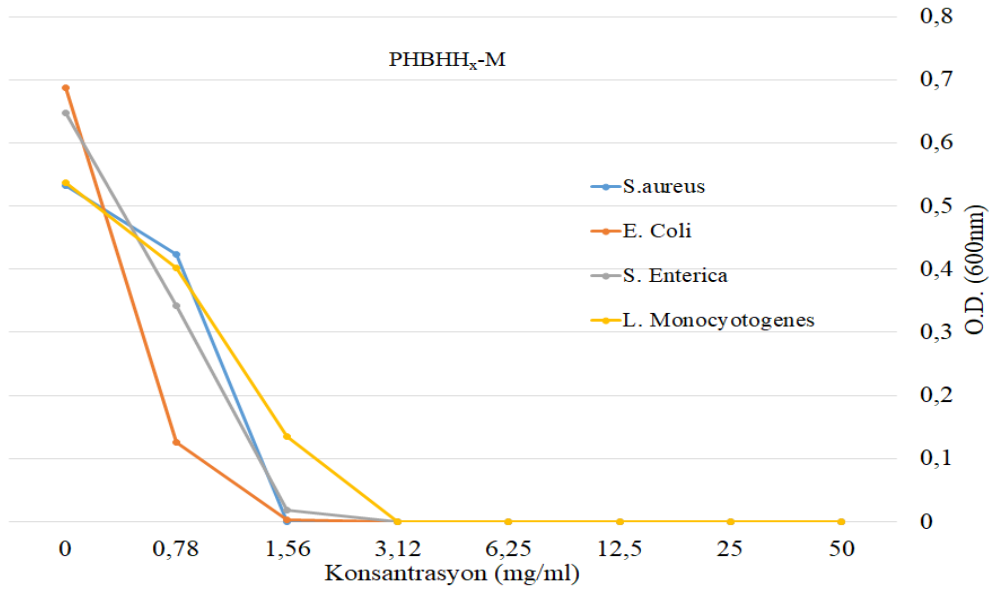
Şekil 8. PHBHH_x membranlarına ait SEM görüntüleri (SEM images of PHBHH_x membranes)



Şekil 9. PHBHH_x-M membranlarına ait SEM görüntüleri (SEM images of PHBHH_x-M membranes)



Şekil 10. PHBHH_x membranlarının antibakteriyel sonuçları (Antibacterial results of PHBHH_x membranes)

Şekil 11. PHBHH_x-M membranlarının antibakteriyel sonuçları (Antibacterial results of PHBHH_x-M membranes)Tablo 1. PHBHH_x ve PHBHH_x-M membranlarının MİK değerleri (MIC values of PHBHH_x and PHBHH_x-M membranes)

Mikrofiber Örtüler	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
	ATCC	ATCC	ATCC	RSKK
PHBHH _x	25923	35150	700408	472
PHBHH _x -M	6,25	12,5	6,25	3,12
PHBHH _x -M	1,56	1,56	1,56	3,12

4. Sonuçlar (Conclusions)

Bu çalışmada, Elektroçirime yöntemi kullanılarak biyobozunur ve biyouyumlu PHBHH_x kopolimeri temelli membranları hazırlandı. PHBHH_x membranları ile delphinidin-3-glikozit, hyaluronik asit, portakal yağı katkıları ile elde edilen PHBHH_x-M membranları üretildi ve yapısal karakterizasyon çalışmalarında FT-IR ve XRD teknikleri kullanıldı. FT-IR ve XRD sonuçları PHBHH_x ve PHBHH_x-M membranları için beklenen yapıları doğrularken aynı zamanda delphinidin-3-glikozit, hyaluronik asit, portakal yağı katkılarının başarı ile membran yapısına yüklendiğini göstermektedir. PHBHH_x ve PHBHH_x-M membranlarının termal analiz çalışmaları TG/DTG/DTA kombine sistemi ile 25-600°C sıcaklık aralığında gerçekleştirildi. PHBHH_x ve PHBHH_x-M membranlarında bozunmanın iki basamakta gerçekleştiği ve bu membranların sırasıyla 120°C ve 130°C'ye kadar termal kararlılık gösterdiği belirlendi. PHBHH_x ve PHBHH_x-M membranlarının yüzey morfolojisi SEM analizi ile incelendi. PHBHH_x-M membranının PHBHH_x membranına kıyasla gözenek sayısı ve çapında belirgin artış olduğu görüldü. PHBHH_x-M membranının bu gözenekli yapısı, bu membranın ilaç taşıyıcı olarak kullanılmasına da olanak sağlayabilecektir. MİK yöntemi kullanılarak PHBHH_x ve PHBHH_x-M membranlarının *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* bakterileri üzerinde oluşturdukları antibakteriyel etkileri incelendi. Delphinidin-3-glikozit, hyaluronik asit, portakal yağı katkıları ile elde edilen PHBHH_x-M membranının PHBHH_x membranına göre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, bakterilerine karşı daha düşük konsantrasyonlarda antibakteriyel etki gösterirken *Listeria monocytogenes* bakterileri üzerinde antibakteriyel etkisi değişmemiştir. PHBHH_x kopolimeri kullanılarak farklı aktif bileşen yüklü yeni PHBHH_x membranları hazırlanabilir ve çeşitli sektörlerde (sağlık, ziraat, kozmetik vs.) uygulama alanı bulabilir.

Kaynaklar (References)

1. Vanheusden C., Vanminsel J., Reddy N., Fabrication of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) Fibers Using Centrifugal Fiber Spinning: Structure, Properties and Application Potential, *Polym.*, 15 (5), 1181, 2023.
2. Qiu Y., Fu J., Sun B., Ma X., Sustainable nanocomposite films based on SiO₂ and biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBH) for food packaging, *E-Polymers.*, 21 (1), 72–81, 2021.
3. Eraslan K., Aversa C., Nofar M., Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBH): Synthesis, properties, and applications - A review, *Eur Polym J.*, 167, 111044, 2022.
4. Bugnicourt E., Cinelli P., Lazzeri A., Alvarez V., Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging, *Express Polym Lett.*, 8 (11), 791–808, 2014.
5. Qu XH., Wu Q., Liang J., Zou B., Chen GQ., Effect of 3-hydroxyhexanoate content in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) on in vitro growth and differentiation of smooth muscle cells, *Biomaterials.*, 27 (15), 2944–2950, 2006.
6. Yu BY., Chen PY., Sun YM., Lee YT., Young TH., Response of Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs) to the Topographic Variation of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate) (PHBHHx) Films, *J Biomater Sci Polym Ed.*, 23 (1–4), 1–26, 2012.
7. Tang HJ., Neoh SZ., Sudesh K., A review on poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) [P(3HB-co-3HHx)] and genetic modifications that affect its production, *Front Bioeng Biotechnol.*, 10, 1057067, 2022.
8. Qu XH., Wu Q., Zhang KY., Chen GQ., In vivo studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) based polymers: Biodegradation and tissue reactions, *Biomaterials.*, 27 (19), 3540–3548, 2006.
9. Ang SL., Sivashankari R., Shaharuddin B., Potential Applications of Polyhydroxyalkanoates as a Biomaterial for the Aging Population, *Polym Degrad Stab.*, 181, 109371, 2020.
10. Chang HM., Wang ZH., Luo HN., Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)-based scaffolds for tissue engineering, *Brazilian J Med Biol Res.*, 47 (7), 533, 2014.

11. Delgado-Vargas F., Jiménez AR., Paredes-López O., Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains -Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability, *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 40 (3), 173–289, 2010.
12. Salihler K., Ülkemizde Yetişen *Vaccinium Myrtillus L.* (Yaban Mersini) Bitkisinin Yaprak Ve Meyvelerinin Gıda Ve Kozmetik Endüstrisi Tarafından Değerlendirilme Çalışmaları, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Bilim Enstitüsü., 2019.
13. Wang LS., Stoner GD., Anthocyanins and their role in cancer prevention, *Cancer Lett.*, 269 (2), 281, 2008.
14. Khoo HE., Azlan A., Tang ST., Lim SM., Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits, *Food Nutr Res.*, 61 (1), 2017.
15. Aydeniz-Guneser B., Cold pressed orange (*Citrus sinensis*) oil, *Cold Press Oils Green Technol Bioact Compd Funct Appl.*, 129–146, 2020.
16. All The Benefits And Uses of Orange Oil For Skin-Juicy Chemistry. Erişim Ekim 27, 2023. <https://juicychemistry.com/blogs/skincare-blog/all-the-benefits-and-uses-of-orange-oil-for-skin>
17. Lehrner J., Marwinski G., Lehr S., Jöhren P., Deecke L., Ambient odors of orange and lavender reduce anxiety and improve mood in a dental office, *Physiol Behav.*, 86 (1–2), 92–95, 2005.
18. Demirdogen RE., Yeşilkaynak T., Tishakova T., Emen FM., Antibacterial Cellulose Acetate Microfibers Containing Pyridine Derivative Complexes, *Chem. Chem. Technol.*, 15 (2), 217–225, 2021.
19. Gül A., Tiyek İ., Zor G., Yazici N., Production and characterization of Polyamide 6.6 based nanofiber membranes for filter applications by electrospinning method, *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 38 (3), 1321–1330, 2023.
20. Wagner A., Poursorkhabi V., Mohanty AK., Misra M., Analysis of porous electrospun fibers from poly(l-lactic acid)/poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) blends, *ACS Sustain Chem Eng.*, 2 (8), 1976–1982 2014.
21. Pulingam T., Appaturi JN., Gayathiri M., Sudesh K., TiO₂ loaded on glycidol functionalized poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) nanobiocomposite film for photocatalytic and antibacterial activities, *Int J Biol Macromol.*, 253 (P6), 127216, 2023.
22. Kutlu E., Emen FM., Yıldırım K., Novel thiourea derivatives against *Mycobacterium tuberculosis* : synthesis, characterization and molecular docking studies Novel thiourea derivatives against *Mycobacterium tuberculosis* : synthesis, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem.*, 1–10, 2023.
23. Yeşilkaynak T., Özkömeç FN., Çeşme M., Synthesis of new thiourea derivatives and metal complexes: Thermal behavior, biological evaluation, in silico ADMET profiling and molecular docking studies, *J Mol Struct.*, 1269, 133758, 2022.
24. Cai H., Qiu Z., Effect of comonomer content on the crystallization kinetics and morphology of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate), *Phys Chem Chem Phys.*, 11 (41), 9569–9577, 2009.
25. Hu Y., Zhang J., Sato H., Noda I., Ozaki Y., Multiple melting behavior of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) investigated by differential scanning calorimetry and infrared spectroscopy, *Polymer (Guildf.)*, 48 (16), 4777–4785, 2007.
26. Xu X., Li Y., Ma X., Li J., Synergistic reinforcing effect of nanomontmorillonite and cellulose nanocrystals on poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate), *Cellulose.*, 27 (11), 6249–6261, 2020.
27. Yan X., Zhou W., Ma X., Sun B., Fabrication and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) modified with nanomontmorillonite biocomposite, *E-Polymers.*, 21 (1), 38–46, 2021.
28. Çetin E.A., Tiyek İ., Production of Zinc Borate koped P(AN-VAc) nanofiber textile surfaces by electrospinning method and their thermal characterization, *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 36 (4), 1893–1908, 2021.