



**AKILLI AMBALAJLAMADA KULLANILMASI
İÇİN *Rosa pimpinellifoli* L. ANTOSİYANİNLERİ
İÇEREN JELATİN BAZLI KOLORİMETRİK
GÖSTERGE GELİŞTİRİLMESİ**

Meltem ÖZER

Veterinerlik Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Ana Bilim Dalı

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Alper BARAN**

Yüksek Lisans Tezi-2026



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

**AKILLI AMBALAJLAMADA KULLANILMASI İÇİN *Rosa
pimpinellifoli* L. ANTOSİYANİNLERİ İÇEREN JELATİN
BAZLI KOLORİMETRİK GÖSTERGE GELİŞTİRİLMESİ**

Meltem ÖZER

**Veterinerlik Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Ana Bilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Alper BARAN**

**ERZURUM
2026**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Yenilebilir Film Teknolojilerinde Güncel Yaklaşımlar	4
2.2. Jelatin Tabanlı Film Matrislerinin Özellikleri ve Uygulama Alanları.....	5
2.3. Doğal Göstergeler ve Antosiyanin Bazlı Akıllı Filmler	7
2.4. Balık Etinde Bozulma Mekanizmaları ve Kalite Göstergeleri.....	9
2.5. Antosiyaninlerin Oksidatif Stres Üzerine Etkileri ve Zebra Balığı (<i>Danio rerio</i>) Modeli	10
3. MATERYAL VE METOT	12
3.1. Materyal	12
3.1.1. Jelatin	12
3.1.2. Gliserol ve Sorbitol	12
3.1.2. Etil Alkol.....	12
3.1.3. (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (DPPH) ve 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazol-6- sülfonik asit) (ABTS).....	12
3.1.4. Folin-Ciocalteu Reaktifi	12
3.1.5. Plate Count Agar (PCA)	12

3.1.6. Mueller Hinton Agar (MHA).....	13
3.1.7. 2,2'-Azobis(2-amidinopropan) Dihidroklorür (AAPH)	13
3.1.8. CM-H ₂ DCFDA	13
3.2. Metot	13
3.2.1. <i>Rosa pimpinellifolia</i> L. (Kara kuşburnu)' den Antosiyanin Ekstraksiyonu.....	13
3.2.2. Toplam Monomerik Antosiyanin İçeriğinin Belirlenmesi.....	14
3.2.3. <i>Rosa pimpinellifolia</i> L. (Kara kuşburnu)'nin Fenolik Bileşenlerinin UHPLC-ESI-MS/MS Analizi	15
3.2.4. <i>Rosa pimpinellifolia</i> L. (Kara kuşburnu)'nin Zebra Balığı (<i>Danio rerio</i>) Larvalarında In Vivo Toksisite ve Oksidatif Stres Çalışmaları	16
3.2.4.1. Zebra Balığı Yetiştiriciliği ve Oksidatif Stresin Oluşturulması.....	16
3.2.4.2. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Belirlenmesi	17
3.2.4.3. Apoptik Hücrelerin Belirlenmesi.....	17
3.2.4.4. Morfolojik ve Fizyolojik Ölçümler.....	18
3.2.4.5. Lokomotor Aktivite ve Tigmotaksis Analizleri	18
3.2.5. Akıllı Biyobozunur Filmlerin Hazırlanması	19
3.2.6. Akıllı Biyobozunur Filmlerin Karakterizasyonu	20
3.2.6.1. Filmlerin Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi	20
3.2.6.2. Filmlerin Antioksidan Aktivite Tayini	20
3.2.6.3. Filmlerin Kalınlığının Ölçülmesi.....	21
3.2.6.4. Filmlerin Nem İçeriğinin Belirlenmesi	21
3.2.6.5. Filmlerin Su Çözünürlüğünün (WS) Belirlenmesi	22
3.2.6.6. Filmlerin Su Geçirgenliğinin Ölçülmesi.....	22
3.2.6.7. Filmlerin Mekanik Özelliklerin Belirlenmesi.....	23
3.2.6.8. Filmlerin Renk ve Opaklık Ölçümleri	23

3.2.6.9. Filmlerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Görüntülenmesi	24
3.2.6.10. Filmlerin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTR) İle Yapısal Analizi	24
3.2.6.11. Film Bileşimlerinin X-Işını Kırınım Paterni (XRD).....	24
3.2.6.12. Filmlerin Antimikrobiyal Aktivite Analizi	24
3.2.7. Akıllı Ambalajın Gıda Uygulamaları.....	25
3.2.7.1. pH İndikatör Özelliği ve Duyarlılık Testi	25
3.2.7.2. Balık eti Örneklerinde Tazelik Göstergesi Uygulaması	25
Balık etlerinin Fiziksel, Kimyasal ve Mikrobiyolojik Analizleri	26
3.3. İstatistiksel Analiz.....	26
4. BULGULAR.....	28
4.1. <i>Rosa pimpinellifolia</i> L. Özellikleri	28
4.2. Zebra balığı (<i>Danio rerio</i>) In Vivo Toksisite ve Oksidatif Stres Değerlendirmeleri... ..	29
4.2.1. Oksidatif Stres Modeli Altında Gözlenen Değişimler	29
4.2.2. Morfometrik ve Fizyolojik Parametreler	32
4.2.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Apoptotik Hücre Dağılımı.....	33
4.2.4. Lokomotor Aktivite ve Tigmotaksis Davranışı	35
4.3. Akıllı Biyobozunur Filmlerin Fizikokimyasal, Mekanik ve Yapısal Özellikleri	36
4.4. Akıllı Ambalajın Gıda Uygulamalarındaki Performansı	44
4.4.1. pH İndikatör Özelliği ve Duyarlılık.....	44
4.4.2. Balık Eti Örneklerinde Tazelik Göstergesi Uygulamasının Fiziksel, Kimyasal ve Mikrobiyolojik Kalite Parametreleri Üzerine Etkisi.....	48
5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	68

KAYNAKLAR	69
EKLER	85
EK-1. Etik Bildirim ve İntihal Beyan Formu.....	85
EK-2. Etik Kurul Onay Formu	86



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve tamamlanması sürecinde bilgi, deneyim ve rehberliğiyle bana yol gösteren, her aşamada desteğini hissettiren danışmanım Doç. Dr. Alper BARAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte akademik bilgi ve deneyimleriyle katkı sağlayan Veteriner Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Ana Bilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma; çalışmam süresince akademik destekleri ve katkılarıyla yanımda olan Dr. Öğr. Üyesi Ekrem SULUKAN'a; araştırma sürecinde bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak katkı sağlayan Doktora Öğrencisi Meryem KANKAYNAR hocama; tez süreci boyunca desteğini ve motivasyonunu her zaman hissettiren Dr. Şeyda TACER TANAS'a ve değerli çalışma arkadaşım Elvina JAHANGİRLİ'ye en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesini maddi olarak destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (BAP, Proje ID: 15387) katkılarından dolayı teşekkür ederim. Ayrıca, çalışma süresince sağladığı burs desteği nedeniyle Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkür ederim.

Tez süreci boyunca yanımda olan, desteğini ve motivasyonunu esirgemeyen değerli arkadaşlarım Kader, Semanur, Fatma ve diğer tüm arkadaşlarıma; eğitim hayatım boyunca ve bu tez sürecinde maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiren aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Meltem ÖZER

ÖZET

Akıllı Ambalajlamada Kullanılması İçin *Rosa Pimpinellifoli* L. Antosiyaninleri İçeren Jelatin Bazlı Kolorimetrik Gösterge Geliştirilmesi

Amaç: Bu tez çalışmasında, jelatin ve antosiyanin ekstraksiyonu yapılmış kara kuşburnu (*Rosa pimpinellifolia* L.) özütü kullanılarak gıda ambalaj uygulamalarına yönelik pH'ya duyarlı akıllı yenilebilir filmler geliştirilmiştir. Filmlerin fiziksel, mekanik, yapısal ve antioksidan özellikleri farklı özüt konsantrasyonlarında değerlendirilmiş; gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) bozulma sürecine verdikleri tepkiler kalite parametreleri üzerinden incelenmiştir. Ayrıca, kara kuşburnu kaynaklı antosiyaninlerin AAPH ile indüklenen oksidatif stres koşullarında zebra balığı (*Danio rerio*) embriyoları üzerindeki biyolojik etkileri araştırılmıştır.

Materyal ve Metot: Jelatin bazlı yenilebilir filmler, farklı konsantrasyonlarda kara kuşburnu özütü kullanılarak hazırlanmıştır. Filmlerin kalınlık, renk, mekanik özellikler, suya karşı davranışları, su buharı geçirgenliği ve antioksidan aktiviteleri belirlenmiş; yapısal özellikler FTIR, XRD ve SEM analizleri ile incelenmiştir. Filmlerin pH duyarlılığı ve tazelik indikatörü potansiyeli, gökkuşağı alabalığı örneklerinde depolama süresince pH, toplam canlı bakteri sayısı (TVC) ve renk değişimleri ile değerlendirilmiştir. Biyolojik etki, toplam 450 zebra balığı larvası kullanılarak hayatta kalma, yumurtadan çıkma, morfometrik parametreler ve ROS analizleri ile değerlendirilmiş; deneyler üç biyolojik ve üç teknik tekrar şeklinde yürütülmüştür.

Bulgular: Kara kuşburnu özütü ilavesinin jelatin bazlı filmlerin renk özelliklerini, mekanik dayanımını ve antioksidan kapasitesini konsantrasyona bağlı olarak etkilediği belirlenmiştir. Özüt içeren filmlerin pH'ya duyarlı renk değişimleri gösterdiği ve balık örneklerinde depolama süresi boyunca bozulma ile ilişkili kalite parametrelerini yansıttığı gözlenmiştir. Zebra balığı embriyolarında AAPH uygulamasıyla indüklenen oksidatif stresin, kara kuşburnu özütü uygulamasıyla azaldığı; hayatta kalma oranları, morfometrik ölçümler ve ROS düzeyleri açısından iyileştirici etkiler ortaya koyduğu saptanmıştır.

Sonuç: Bu çalışma, doğal antosiyanin kaynaklarının hem gıda ambalaj teknolojileri hem de biyolojik uygulamalarda fonksiyonel kullanım potansiyelini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Akıllı ambalaj, antosiyanin, oksidatif stres, pH'ya duyarlı ambalaj, zebra balığı

ABSTRACT

Development of a Gelatin-Based Colorimetric Indicator Containing *Rosa pimpinellifolia* L. Anthocyanins for Intelligent Packaging Applications

Aim: In this thesis, pH-sensitive smart edible films were developed for food packaging applications using gelatin and anthocyanin-rich black rosehip (*Rosa pimpinellifolia* L.) extract. The physical, mechanical, structural, and antioxidant properties of the films were evaluated at different extract concentrations, and their responses to the spoilage process of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were investigated based on quality parameters. In addition, the biological effects of black rosehip-derived anthocyanins under AAPH-induced oxidative stress conditions were examined in zebrafish (*Danio rerio*) embryos.

Materials and Methods: Gelatin-based edible films were prepared with varying concentrations of black rosehip extract. Film thickness, color parameters, mechanical properties, water-related behaviors, water vapor permeability, and antioxidant activity were determined, while structural characteristics were analyzed using FTIR, XRD, and SEM techniques. The pH sensitivity and freshness indicator potential of the films were evaluated during the storage of rainbow trout samples by monitoring pH, total viable count (TVC), and color changes. Biological effects were assessed using a total of 450 zebrafish larvae through survival rate, hatching rate, morphometric measurements, and reactive oxygen species (ROS) analyses. All experiments were conducted with three biological and three technical replicates.

Results: The incorporation of black rosehip extract significantly affected the color properties, mechanical strength, and antioxidant capacity of gelatin-based films in a concentration-dependent manner. Extract-containing films exhibited distinct pH-sensitive color changes and successfully reflected spoilage-related quality parameters in fish samples during storage. In zebrafish embryos, oxidative stress induced by AAPH was markedly reduced following black rosehip extract treatment, resulting in improved survival rates, morphometric parameters, and decreased ROS levels.

Conclusion: This study demonstrates the functional potential of natural anthocyanin sources for applications in both food packaging technologies and biological systems.

Keywords: Anthocyanin, oxidative stress, pH-sensitive packaging, smart packaging, zebrafish

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAPH	2,2'-Azobis (2-amidinopropan) dihidroklorür
ABTS	2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
AO	Akridin Oranj (Acridine Orange)
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
BM	Vücut malformasyonları (Body malformations)
CBA	Eğri vücut eksen (Curved body axis)
CGE	Siyanidin-3-glukozit eşdeğeri
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
LC₅₀	%50 letal konsantrasyon
MC	Nem içeriği (Moisture content)
PE	Perikardiyal ödem
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
ROS	Reaktif oksijen türleri
RP	Rosa pimpinellifolia
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TPC	Toplam fenolik madde
TMAC	Toplam monomerik antosiyanin içeriği
TS	Çekme dayanımı (Tensile strength)
TAMB	Toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı
TS	Çekme dayanımı (Tensile strength)
XRD	X-ışını kırınımı
WVP	Su buharı geçirgenliği
YSE	Yumurta kesesi ödemi (Yolk sac edema)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No

Sayfa No

Şekil 4.1 AAPH'nin zebra balığı larvalarında oluşturduğu fizyolojik toksisite ve tedavi grubunun düzenleyici/iyileştirici etkisine ait görüntüler	30
Şekil 4.2. Zebra balığı larvalarında yumurtadan çıkış, hayatta kalma ve malformasyon oranları	31
Şekil 4.3. Kontrol, AAPH ve farklı RP dozlarına ait zebra balığı larvalarında boy, perikardiyal alan ve göz çapı ölçümleri	33
Şekil 4.4. Zebra balığı larvalarında ROS birikimi ve hücre ölümü (AO) sinyallerinin değerlendirilmesi.....	34
Şekil 4.5. AAPH kaynaklı oksidatif stres koşullarında RP tedavisinin zebra balığı larvalarının yüzme davranışı üzerine etkisi	35
Şekil 4.6. ABTS (A), Toplam monomerik antosiyanin (B), Toplam fenolik içerik (C) ve DPPH (D) analizlerine ait temsili mikropilaka görüntüleri. Harfler, ilgili analizleri ifade etmektedir.....	37
Şekil 4.7. Yenilebilir film örneklerine ait FTIR spektrumları	40
Şekil 4.8. Yenilebilir film örneklerine ait XRD spektrumları	42
Şekil 4.9. SEM görüntüleri: Kara kuşburnundan ekstre edilmiş antosiyanin içeren jelatin bazlı filmlerin yüzey morfolojisi (1.00 KX büyütme, ölçek çubuğu = 10 µm)	43
Şekil 4.10. %4, %8 ve %12 oranlarında hazırlanan yenilebilir filmlerin pH 1–13 aralığında çözeltilere batırılmasıyla gözlenen renk değişimleri	45
Şekil 4.11. Farklı pH değerlerinde hazırlanan özüt çözeltilerinin 300–700 nm aralığındaki absorban spektrumları	47
Şekil 4.12. Ekstraksiyonla elde edilen özütün pH 1–13 aralığında hazırlanan çözeltilerle karıştırılması sonucu oluşan renk değişimleri.....	48

Şekil 4.13. Balıketi örneklerinde depolama süresi boyunca pH, renk parametreleri (L^* , a^* , b^*), toplam renk farkı (ΔE) ve toplam canlı bakteri sayısı (CFU) arasındaki Spearman korelasyon katsayıları52



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 4.1. <i>Rosa pimpinellifolia</i> L. ekstresinde belirlenen fenolik bileşiklerin UHPLC-ESI-MS/MS analiz sonuçları ve miktarları (ng/ml).....	28
Tablo 4.2. Farklı özüt konsantrasyonlarına sahip jelatin bazlı yenilebilir filmlerin toplam fenolik içerikleri.....	36
Tablo 4.3. ABTS ve DPPH radikal süpürme aktiviteleri	37
Tablo 4.4. Farklı konsantrasyonlarda ekstrakt içeren jelatin bazlı filmlerinin kalınlığı, nem içeriği (MC), suda çözünürlüğü (WS), su buharı geçirgenliği (WVP) ve tensil gücü (TS).....	39
Tablo 4.5. Film örneklerinin ve pozitif kontrollerin inhibisyon zon çapları (mm).....	44
Tablo 4.6. Farklı konsantrasyon <i>R. Pimpinellifolia</i> içeren jelatin bazlı yenilebilir filmlerin renk parametreleri (<i>L</i> , <i>a</i> , <i>b</i> [*]) ve opaklık (A ₆₀₀ /mm) değerleri	45
Tablo 4.7. Farklı konsantrasyonlardaki (%4, %8 ve %12) yenilebilir filmlerin pH 1–13 aralığında renk değişim parametreleri (<i>L</i> , <i>a</i> [*] , <i>b</i> [*]).....	46

1. GİRİŞ

Sentetik plastiklerin küresel ölçekte yoğun şekilde üretilmesi ve kullanılması, bu materyallerin çevrede uzun süre parçalanmadan kalmaları nedeniyle çevresel sürdürülebilirlik açısından önemli tehdit oluşturmaktadır. Özellikle plastiklerin büyük bir kısmının ambalaj sektöründe kısa süreli kullanımlar için tercih edilmesi, bu alanda oluşan atık miktarını önemli ölçüde artırmaktadır. Bu durum, son yıllarda birçok araştırmacıyı, ambalaj sistemlerinde kullanılabilecek biyolojik olarak parçalanabilir ve çevreyle uyumlu alternatif malzemelerin geliştirilmesine yönlendirmiştir (Jafarzadeh ve ark., 2020). Bu bağlamda, yalnızca çevresel etkileri azaltmakla kalmayıp, aynı zamanda raf ömrünü uzatarak ve gıda kaynaklı hastalıkların önlenmesine katkı sağlayarak gıda güvenliğini destekleyen aktif ambalaj sistemlerinin geliştirilmesi de önem kazanmaktadır (Musso ve ark., 2019).

Polisakkaritler, proteinler ve lipitler gibi doğal polimerler, çevre dostu ambalajmalzemelerinin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Suderman ve ark., 2018). Proteinlerin film oluşturma kapasiteleri, onların yapısal ve kimyasal olarak sahip oldukları içsel (intrinsik) özelliklere bağlıdır. Bu özellikler; amino asit dizilimindeki yük dağılımı, polar ve apolar amino asitler arasındaki denge, moleküler boyut, izoelektrik nokta ve üç boyutlu konformasyon gibi faktörleri içermektedir. Film oluşumu, protein zincirleri arasındaki etkileşimlerle başlar ve bu zincirler arasında gelişen yapısal bağlanmalar, film matrisinin temelini oluşturur. Elde edilen protein bazlı filmler; elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri, kovalent bağlar ve disülfür köprüleri gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal bağlarla stabilize edilir. Bu bağlar, filmin mekanik dayanıklılığı ve bariyer özellikleri açısından kritik rol oynamaktadır.

Yenilebilir ve biyolojik olarak parçalanabilir film üretiminde yaygın olarak kullanılan materyallerden biri, bitkisel (soya, buğday glütini) veya hayvansal (süt, jelatin)

kökenli proteinlerdir. Bu proteinler, film oluşturma kapasiteleri ve fonksiyonel bileşenleri taşıyabilme özellikleri sayesinde özellikle aktif ambalaj uygulamalarında tercih edilmektedir. Jelatin; şeffaflığı, film oluşturma kapasitesi ve yüksek bariyer özellikleri sayesinde farmasötik, tıbbi ve endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Etxabide ve ark., 2017). Jelatin bazlı filmler, aktif paketleme sistemlerinde kullanılmak üzere çeşitli biyoaktif bileşenlerin taşıyıcısı olarak işlev görmektedir (Adilah ve ark., 2018).

Doğal ve sentetik pigmentler gibi aktif hassas bileşenlerin film matrisine eklenmesi, gıdanın tazeliği ve kalitesi hakkında görsel bilgi sağlayabilir. Bu özellik, özellikle gıdaların taşınması ve depolanması sürecinde önem taşımaktadır (Wang ve ark., 2023a). Meyveler, sebzeler, tahıllar ve kuruyemişler bu tür aktif bileşenlerin başlıca doğal kaynaklarıdır. Antosiyaninler ise polifenolik pigmentlerin en büyük alt grubunu oluşturan, yaygın şekilde kullanılan doğal bileşiklerdir. Oksidatif hasara karşı dirençleri, toksik olmamaları ve biyolojik olarak parçalanabilir yapıları sayesinde antosiyaninler, sentetik boyalara doğal bir alternatif olarak değerlendirilmektedir (Wang ve ark., 2023a).

Kara kuşburnu (*Rosa pimpinellifolia* L.), Rosaceae familyasına ait olup Avrupa, Asya, Orta Doğu ve Kuzey Amerika'nın geniş bölgelerinde doğal olarak yetişen bir bitki türüdür. Kuşburnu meyveleri; tokoferoller, fenolik bileşikler ve yağ asitleri gibi çeşitli biyoaktif bileşenler içermekte olup, gıda ve ilaç endüstrisinde değerlendirilmektedir (Kıralan ve Yıldırım, 2019). Özellikle kara kuşburnu; kaempferol, kuersetin, siyanidin türevleri (3-glukozit, 3,5-diglukozit), delfinidin 3-glukozit, pelargonidin 3-O-rutinosid, peonidin 3-O-glukozit gibi antosiyaninler ile fenolik ve organik asitler bakımından oldukça zengindir. Bu bileşenler, antioksidan, antikarsinojenik ve antimikrobiyal biyolojik aktiviteleriyle dikkat çekmektedir (Szołtysik ve ark., 2020). Kara kuşburnu, yerel halk tarafından grip, öksürük, stres, boğaz ağrısı ve zatürre gibi rahatsızlıkların

tedavisinde geleneksel olarak kullanılmakta; ayrıca çeşitli yemek ve içeceklerde de yer almaktadır (Pashazadeh ve ark., 2021). Biyoaktif içeriğinin çeşitliliği, siyah kuşburnunu yalnızca yüksek besin ve fonksiyonel değere sahip bir meyve değil, aynı zamanda ekonomik katma değeri yüksek gıda ürünleri için potansiyel bir hammadde konumuna getirmektedir (Szołtysik ve ark., 2020).

Zebra balığı (*Danio rerio*), dayanıklı yapısı, laboratuvar ortamında kolayca üretilmesi, dış döllenme ile üremesi ve kısa jenerasyon süresi gibi avantajları nedeniyle toksikoloji araştırmalarında sıkça tercih edilen model organizmalardan biridir (Sulukan ve ark., 2017a). Saydam yumurta ve embriyoları, gelişim evrelerinin mikroskopik düzeyde izlenmesini mümkün kılarken, bu canlıların kimyasal ve biyolojik ajanlara karşı yüksek hassasiyeti, çevresel toksisite çalışmalarında önemli bir test sistemi oluşturmaktadır. Bu çalışmada, ambalaj materyaline indikatör işlevi kazandırması hedeflenen kara kuşburnunun, AAPH kaynaklı toksisiteye karşı zebra balığı embriyoları üzerindeki etkileri değerlendirilecektir.

Bu tez çalışmasında, gıda ambalaj uygulamalarında kullanılmak üzere, jelatin ve antosiyanin açısından zengin konsantre kara kuşburnu özütü ile pH'ya duyarlı yenilebilir filmler geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Üretilen filmlerin fiziksel, mekanik, yapısal ve antioksidan özellikleri, farklı özüt konsantrasyonları ile değerlendirilerek; Gökkuşaağı alabalığındaki (*Oncorhynchus mykiss*) bozulma sürecine karşı gösterecekleri tepkiler belirli kalite parametreleri üzerinden analiz edilecektir. Ayrıca, kara kuşburnu kaynaklı antosiyaninlerin, AAPH ile indüklenen oksidatif stres koşulları altındaki zebra balığı embriyoları üzerindeki biyolojik etkileri de bu çalışmanın kapsamı dâhilinde incelenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yenilebilir Film Teknolojilerinde Güncel Yaklaşımlar

Yenilebilir filmler, genellikle 250 μm 'den daha ince olan ve gıdanın yüzeyine ya da bileşenleri arasına uygulanan biyopolimer esaslı ince tabakalardır. Bu filmler; nem, gaz ve yağ geçişini sınırlayarak mikroorganizmaların gelişimini engeller, mekanik etkilere karşı koruma sağlar. Bu şekilde ürünün görünümünü, kalitesini ve raf ömrünü iyileştirme konusunda fayda sağlarlar (Dinika ve ark., 2020). Bu tür filmlerin, uygun özelliklere sahip olması hem gıda güvenliğinin sağlanması hem de ambalajın işlevselliğinin artırılması açısından oldukça önemlidir. İlk olarak, kullanılan malzemelerde alerjenik, toksik ya da sindirilemeyen bileşenlerin bulunmaması gerekmektedir. Yapısal kararlılık göstermeleri; taşıma, depolama ve teşhir süreçlerinde meydana gelebilecek fiziksel hasarlara karşı dayanıklı olmaları arzulanır. Aynı zamanda gıdanın yüzeyine homojen bir şekilde yapışarak etkin bir koruyucu bariyer oluşturmalarıdır. Nem ve gaz geçirgenliği bakımından kontrollü bir yapı sunmaları, ürünün bozulma sürecini yavaşlatması açısından çok önemlidir. Bu kapsamda; su buharının geçişini dengelemeleri, aerobik ve anaerobik gazlara karşı yarı geçirgenlik özellik sağlamaları ve bu yolla oksidatif bozulmaları engellemeleri gerekir.

Duyusal kalite de göz önüne alınarak; tat, koku, renk ve besin değerlerini değiştirmeyecek biçimde tasarlanmalı, tüketici arzını azaltabilecek olumsuz etkilerden kaçınılmalıdır. Ayrıca, antioksidan ve antimikrobiyal bileşenler içerebileceği bilinen bu filmler, mikrobiyal büyümeyi sınırlandırarak gıdanın yüzeyinde sağlıklı bir ortam oluşturabilir. Ürünün estetik görünümünü olumlu etkilemeleri ve aroma, tat ya da renklendirici gibi çeşitli katkı maddeleriyle zenginleştirilebilmeleri de tercih edilen özelliklerdendir. Bu niteliklerin yanında, üretim süreçlerinin ekonomik, uygulanabilir ve

endüstriyel ölçekte basit olması da dikkate alınması gereken önemli kriterlerdendir (Akhtar ve ark., 2015).

2.2. Jelatin Tabanlı Film Matrislerinin Özellikleri ve Uygulama Alanları

Kolajen; hayvanların deri, kemik, kıkırdak, tendon ve damar gibi çeşitli bağ dokularında bulunan lifli bir proteindir. Bu proteinin, farklı doku ve organların yapısal bütünlüğünün korunmasında temel bir rol üstlendiği bilinmektedir (Li ve ark., 2009). Jelatin ise hayvansal kaynaklı kolajenin asidik veya alkali hidrolizi sonucunda, termal denatürasyon yoluyla elde edilmektedir (Cao, Wang, Hao ve ark., 2020). Kolajenin çözünmeyen yapısı, öncelikle asit veya alkali muamelesiyle çözünür hâle getirilir; bu işlem sırasında kolajenin doğal ve düzenli yapısı şişerek bozulur. Jelatine dönme süreci, ısı etkisiyle hidrojen ve kovalent bağların kırılması sonucu heliks-bobin geçişiyle ilerleyen bir ekstraksiyon aşamasını içerir (Ahmad ve ark., 2018).

Jelatin; kokusuz, tatsız, renksiz ya da açık sarı renkte, yarı saydam ve biyolojik olarak parçalanabilir bir polipeptittir. Özellikle film oluşturma yeteneği ile ön plana çıkan doğal bir biyopolimerdir. Genellikle granül ya da toz formunda bulunabilir ve suyla etkileşime girdiğinde ise jel yapısı oluşturabilir. Düşük alerjen potansiyelinin bilinmesi sayesinde hem gıda sektörü hem de biyomedikal uygulamalarda güvenle kullanılabilir. Jelatinin moleküler yapısı; glisin, prolin ve hidroksprolin gibi amino asitlerden oluşur ve sahip olduğu bu yapı, onun güçlü jelleşme ve ve film oluşturma kabiliyetine olumlu etki eder (Nur Hanani ve ark., 2014).

Jelatin bazlı filmlerin yapısal ve işlevsel özelliklerinin, sadece içindeki hammaddelere değil, aynı zamanda üretim sürecinde uygulanan fiziksel ve kimyasal koşullara da bağlı olduğu bilinmektedir. Jelatin çözünürken ve film haline gelirken ortaya çıkan yoğunluk, kıvam ve sıcaklığa bağlı davranışlar film çözeltisinin kararlılığı ve son ürünün performansı üzerinde asli bir etkiye sahiptir. Bu tür reolojik parametreler; jelatinin

elde edildiği hayvanın türüne, moleküler ağırlığına, sıcaklık uygulamasına ve karıştırma hızına bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Hazırlanan çözeltinin viskozitesi, bu işlem parametrelerine bağlı olarak artıp azalabilir; bu husus, film tabakasının homojenliğini ve mekanik özelliklerini doğrudan şekillendirir (Aguirre-Alvarez ve ark., 2011).

Film yapısını etkileyen faktörler arasında sadece jelatinin yapısı değil; ekstraksiyon yöntemi (asit, alkali, enzimatik), üretim yöntemi (döküm, ekstrüzyon), kullanılan katkı maddeleri (antioksidanlar, çapraz bağlayıcılar vb.) ve plastikleştirici bileşenler de bulunur. Özellikle plastikleştiriciler, filmin esneklik ve mekanik dayanım düzeyini belirlemede önemli rol oynar. Örneğin; formülasyona gliserol gibi bir plastikleştirici eklendiğinde, filmin esnekliğinin arttığı görülürken çekme dayanımı belirli bir miktarda azalabilmektedir (Nazmi ve ark., 2017).

Üretim tekniği olarak en yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri olan döküm işlemi; jelatinin çözücü içinde çözülerek katkılarla birleştirilmesini ve bu karışımın düz yüzeylere dökölüp kurutulmasını esas alır. Bu şekilde; düşük üretim maliyeti, düzgün film kalınlığı, iyi optik şeffaflık ve mekanik/optik açıdan dengeli izotropik yönelim gibi çeşitli avantajlar sağlanmış olur. Film üretimi esnasında herhangi bir gerilme oluşmaması, ürünün yüzey homojenliğini artırmakta ve kalıntı gerilimden kaynaklı deformasyonları azaltmaktadır. Bununla birlikte, döküm yönteminin çeşitli sınırlamalar da taşıdığı bilinmektedir. Özellikle uzun süren kuruma evresinin, üretim kapasitesini düşürdüğü; bağlı nem ve ortam sıcaklığı gibi çevresel koşullara olan yüksek duyarlılık ise standart bir üretim çıktısı elde etmeyi zorlaştırdığı gözlemlenmiştir. Bunlara ilaveten, çözücü olarak su veya uçucu solventlerin tercih edilmesi hem kurutma sürecini karmaşıktırabilmekte hem de bazı üretim ortamlarında toksik solventlerle ilgili çevresel riskleri ortaya çıkarmaktadır (Jomlapeeratikul ve ark., 2014).

Döküm metodu genellikle laboratuvar ölçeğinde tercih edilirken, endüstriyel uygulamalarda ise ekstrüzyon yöntemi öne çıkmaktadır. Ekstrüzyon, granül veya toz hâlindeki polimerlerin bir ekstrüdere beslenerek eritilmesi ve kalıptan geçirilme yöntemi ile film hâline getirilmesi esasına dayanır. Bu yöntemde, çözücü kullanımına ihtiyaç duyulmaması, kısa işlem süresi ve düşük enerji tüketimi gibi avantajları sayesinde üretim verimliliğinin arttığı görülür. Ayrıca, işlem koşullarının iyi kontrol edilebilmesi çok katmanlı ve farklı kalınlıklara sahip filmlerin üretimini mümkün kılar. Ancak yüksek sıcaklık altında gerçekleştirilen bu işlem, özellikle jelatin gibi sıcaklığa duyarlı biyopolimerlerde yapısal bozulmalara, filmde gözenekli yapıların oluşmasına veya optik-mekanik özelliklerin zayıflaması gibi çeşitli olumsuz durumlara yol açabilir. Bunun yanı sıra, ekstrüzyon ekipmanlarının kurulumunun ve bakım süreçlerinin belirli bir yatırım maliyeti gerektirmesi, küçük ölçekli üretim ortamları için sınırlayıcı bir faktör olmaktadır (Suhag ve ark., 2020).

Sonuç olarak, jelatin tabanlı film sistemleri hem çevre dostu hem de çok yönlü olmaları sayesinde sürdürülebilir gıda ambalaj teknolojileri için büyük potansiyel oluşturmaktadır. Mekanik, optik ve bariyer özelliklerinin katkı maddeleri ve işlem parametreleri ile kolaylıkla yeniden yapılandırılabilir olması, onun alternatif ambalaj çözümleri için değerli bir biyopolimer olmasını sağlamaktadır.

2.3. Doğal Göstergeler ve Antosiyanin Bazlı Akıllı Filmler

Gıdaların tazeliğinin gerçek zamanlı, hasarsız bir biçimde izlenebilmesine yönelik çalışmalarda, doğal renklendirici bazlı gıda tazeliği göstergeleri umut veren sistemler olarak göze çarpmaktadır. Bu sistemlerin, çoğu zaman pH'ya duyarlı doğal renklendiriciler ile biyolojik olarak uyumlu taşıyıcı matrislerden oluştuğu bilinmektedir. Antosiyaninler, kurkumin, betalainler, şikonin, alizarin ve klorofil gibi doğal olduğu bilinen renklendiriciler, farklı pH koşullarında yapısal değişikliklere uğrayıp, belirgin

renk değişimleri sergileyebildikleri için pH indikatörü olarak çeşitli durumlarda kullanılabilmektedirler (Alizadeh-Sani ve ark., 2020; Ezati ve ark., 2021; He ve ark., 2022; Pourreza & Golmohammadi, 2015; Qin ve ark., 2020). Doğal renklendiricilerin sabitlenebilmesi amacıyla taşıyıcı matris olarak genellikle polisakkaritler, proteinler ve biyo-uyumlu sentetik polimerler tercih edilmektedir (Yu ve ark., 2024). Bu şekilde geliştirilen akıllı kolorimetrik göstergeler, gıdaların bozulma sürecindeki ortam pH'sında meydana gelen değişimlere bağlı olarak renk değiştirmesi esasıyla tazelik hakkında görsel bilgi sağlamaktadır.

Antosiyaninler; kırmızı, pembe, mor ve mavi renklerden sorumlu olan doğal bitkisel pigmentlerdir. Kimyasal olarak flavilyum katyon yapısına sahip polifenolik bileşikler olan ve bitkilerin ikincil metabolitleri arasında yer alan antosiyanin için, doğada 600'den fazla tür tanımlanmıştır. En yaygın antosiyanidinler; siyanidin, pelargonidin, delfinidin, petunidin, peonidin ve malvidindir. Antosiyaninler, çözeltinin pH değerinden etkilenecek flavilyum katyonu, kinonoidal baz ve halkasal yapı formları arasında dönüşüm gösterebilmekte ve buna bağlı olarak da farklı renkler sergileyebilmektedir (Cavalcanti ve ark., 2011; Li ve ark., 2017). Asidik koşullarda kırmızı, nötr koşullarda pembe ve bazik koşullarda ise mavi renkte görünürler.

pH'ya duyarlı antosiyanin bazlı akıllı ambalaj sistemleri, renk değişimiyle gıda tazeliğinin görsel olarak izlenmesine olanak sağlamaları nedeniyle ambalaj uygulamalarında önemli bir potansiyele sahiptir. Ancak antosiyaninlerin düşük termal stabilitesi, yüksek suda çözünürlükleri ve film matrislerinde bariyer ve mekanik özellikleri sınırlayabilmeleri, bu sistemlerin endüstriyel ölçekte kullanımını kısıtlayan başlıca sebeplerdir. Tüm bunlara bağlı olarak, antosiyanin bazlı akıllı filmlerin ölçeklenebilirliği ve performansının artırılması için iyileştirme çalışmalarına ihtiyaç vardır (Janseerat ve ark., 2024).

Bu çalışmada pH'ya duyarlı akıllı film sistemlerinde doğal renk ve biyoaktif bileşen kaynağı olarak kara kuşburnu özütü kullanılmıştır. Kara kuşburnu, antosiyaninler ve diğer fenolik bileşikler açısından zengin bir bitkidir ve bu özellikleri sayesinde akıllı ambalaj uygulamalarında potansiyel doğal renklendirici olarak değerlendirilebilmektedir (ÖZ ve ark., 2018). Bu kapsamda, kara kuşburnu özütünün jelatin bazlı pH duyarlı akıllı film sistemlerinde kullanımı ele alınmıştır.

2.4. Balık Etinde Bozulma Mekanizmaları ve Kalite Göstergeleri

Balık eti, hasat sonrasında çok hızlı bozulabilen bir gıda matrisi olup, bu durum raf ömrünün kısa olması ve gıda güvenliğinin korunmasının zorlaşması gibi önemli sorunlara yol açmaktadır. Hasat sonrası balık etinde otolitik enzimatik faaliyetler, oksidatif reaksiyonlar ve mikrobiyal gelişim eş zamanlı olarak ilerlemektedir. Balık etinin yaklaşık olarak %75–80 oranındaki yüksek nem içeriği, düşük bağ doku seviyesi, serbest amino asitler ve protein dışı azotlu bileşikler tarafından zengin yapısı ile nötre yakın pH değeri (6,0–7,0), bu bozulma süreçlerini hızlandıran en temel faktörlerdir. Bu koşullar, mikrobiyal çoğalmayı ve enzimatik aktiviteleri artırarak istenmeyen tat ve koku bileşiklerinin oluşumuna neden olmaktadır. Bu süreçlerin ilerleyişi, balık etinin duyuşal kalitesinde ve besin değerinde bozulmalara neden olarak tazelik düzeyinin hızla düşmesi ile sonuçlanmaktadır (Duarte ve ark., 2020; Ghaly ve ark., 2010; Odeyemi ve ark., 2020; Rathod ve ark., 2022; Y. Wang ve ark., 2025). Bu etkiler sonucunda balık ve balık ürünlerinde hızla tazelik kaybı yaşanmakta ve raf ömrü önemli derecede kısalmaktadır (Arashisar ve ark., 2004).

Bu nedenle, balık ve balık ürünlerinin raf ömrünü uzatmak için yapılan çalışmalarda doğal koruyucu kaplamalara antibakteriyel, antifungal ve antioksidan gibi çeşitli özelliklerin kazandırılması arzu edilmektedir. Bu tür fonksiyonel kaplamaların, mikrobiyal gelişimi ve oksidatif bozulmayı sınırlandırarak ürün kalitesinin korunmasına

katkı sağlamaları amaçlanmaktadır (Aref ve ark., 2022). Balık etindeki bozulma sürecinin izlenmesinde kullanılan kalite göstergeleri arasında yer alan pH değişimleri, tazelik kaybının değerlendirilmesinde önemli bir parametre olarak kabul edilmektedir. Bu bağlamda pH'ya duyarlı renk değişimi gösterebilen doğal indikatörler sayesinde, balık etindeki bozulma sürecine eşlik eden pH değişimlerinin görsel olarak izlenebilmesi mümkün olmakta ve bu durum akıllı ambalaj sistemlerine önemli bir avantaj kazandırmaktadır.

2.5. Antosiyaninlerin Oksidatif Stres Üzerine Etkileri ve Zebra Balığı (*Danio rerio*) Modeli

Zebra balığı, laboratuvar koşullarında kolay temin edilebilmesi, hızlı üreme kapasitesi, embriyo ve larvalarının saydam olması ve gelişim süreçlerinin kolay izlenebilmesi nedeniyle çeşitli toksisite ve oksidatif stres çalışmalarında yaygın olarak tercih edilen bir model organizmadır (Sökmen ve ark., 2020; Sulukan ve ark., 2017a, 2017b). Özellikle embriyolarının toksik ajanlara karşı duyarlı olması, biyolojik etkilerin kısa sürede değerlendirilmesi gibi bir avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle zebra balığı, doğal biyoaktif bileşiklerin antioksidan etkilerinin canlı bir model üzerinden incelenmesinde uygun bir sistem olarak öne çıkmaktadır.

AAPH, oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu ile ilişkili çalışmalarda sıklıkla kullanılan ve suda çözünebilen serbest radikal oluşturunucudur (Kim ve ark., 2014). AAPH ile indüklenen oksidatif stres modelleri, doğal antioksidan bileşiklerin koruyucu potansiyelinin değerlendirilmesine olanak tanımaktadır.

Antioksidan özellik kazandırılmış yenilebilir film sistemlerinde kullanılan biyoaktif bileşenlerin, balık etinde oksidatif bozulma hızını yavaşlatma potansiyeli önem taşımaktadır. Antosiyanin bakımından zengin doğal kaynaklar, serbest radikalleri baskılayıcı özellikleriyle bu sürece katkı sağlayabilmektedir. Oksidatif stres–antioksidan

etkileşimlerinin biyolojik düzeyde açıklanabilmesinde zebra balığı modeli yaygın olarak kullanılmaktadır ve bu yaklaşım antioksidan içerikli film sistemlerinin balık etinde bozulma sürecini yavaşlatma beklentisi için biyolojik kanıt oluşturmaktadır (Rathod ve ark., 2022).



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Jelatin

Yenilebilir filmin hazırlanmasında, film oluşturuu polimer madde olarak sığır jelatini kullanılmış olup, bu madde Piramit Isı Mühendislik İnşaat Turizm Sanayi ve Ticaret Ltd. Şti. (Türkiye) firmasından satın alınmıştır.

3.1.2. Gliserol ve Sorbitol

Film formülasyonunda plastifiyan olarak kullanılan gliserol, Honeywell (ABD); sorbitol ise Tito (Türkiye) firmalarından temin edilmiştir.

3.1.2. Etil Alkol

Kara kuşburnu ekstraksiyonunda ve sentetik antioksidanların hazırlanmasında çözücü olarak kullanılan etil alkol, Sigma-Aldrich (ABD) firmasından satın alınmıştır.

3.1.3. (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (DPPH) ve 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazol-6-sülfonik asit) (ABTS)

Filmlerin antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ve ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazol-6-sülfonik asit)) radikal süpürme yöntemlerinden yararlanılmıştır. Bu yöntemler, film matrisine farklı dozlarda eklenen kara kuşburnu ekstraktının serbest radikal giderme etkinliğini kantitatif olarak değerlendirmek amacıyla yapılmıştır.

3.1.4. Folin-Ciocalteu Reaktifi

Toplam fenolik madde tayininde kullanılmak üzere Folin–Ciocalteu reaktifi (Merck, Almanya) satın alınmıştır.

3.1.5. Plate Count Agar (PCA)

Farklı film formülasyonlarıyla paketlenen balık örneklerindeki mikrobiyal bozulmayı değerlendirmek amacıyla Plate Count Agar (PCA) besiyeri kullanılmıştır.

3.1.6. Mueller Hinton Agar (MHA)

Çalışmada, hazırlanan filmlerin mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal ve antifungal etkilerini belirlemek amacıyla Mueller-Hinton Agar (MHA) besiyeri kullanılmıştır.

3.1.7. 2,2'-Azobis(2-amidinopropan) Dihidroklörür (AAPH)

Zebra balığında oksidatif stres oluşturmak amacıyla kullanılan 2,2'-Azobis(2-amidinopropan) dihidroklörür (AAPH), Thermo Scientific (ABD) firmasından temin edilmiştir.

3.1.8. CM-H₂DCFDA

Reaktif Oksijen Türleri (ROS) analizi için Invitrogen firmasına ait CM-H₂DCFDA (5-klorometil-2',7'diklorodihidrofloresandiasetat asetil ester) floresan boyası kullanılmıştır. Bu boya, ROS tayini için C6827 referans kodu ile Thermo Fisher Scientific firmasından temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. *Rosa pimpinellifolia* L. (Kara kuşburnu)' den Antosiyanin Ekstraksiyonu

Kara kuşburnu örnekleri, 2025 yılı Temmuz ayında araştırmacı tarafından Erzurum ili, Köprüköy ilçesi sınırları içerisindeki doğal popülasyondan (39.9631° N enlem, 41.6803° E boylam; rakım ~1750 m) toplanmıştır. Toplandıktan sonra ayıklanıp -20 °C'de depolanmıştır. Ekstraksiyon öncesinde örnekler ev tipi öğütücü ile öğütülerek toz haline getirilmiş ve %50 (v/v) etanol içerisinde, oda sıcaklığında ve karanlık koşullarda 24 saat manyetik karıştırıcıda ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyonun ardından karışım, filtre kâğıdı kullanılarak süzölmüş; filtrat düşük basınç altında rotary evaporatör ile yoğunlaştırılarak etanol uzaklaştırılmıştır. Elde edilen yoğun ekstrakt, -20 °C'de bir

gece dondurulduktan sonra liyofilizatöre alınıp freeze-drying işlemine tabi tutulmuştur. Liyofilize edilen ekstrakt, hava ve ışık geçirmez kaplarda +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Toplam Monomerik Antosiyanin İçeriğinin Belirlenmesi

Toplam monomerik antosiyanin içeriğinin belirlenmesinde kullanılan bu yöntem, monomerik antosiyaninlerin pH 1.0’da çoğunlukla renkli oksinyum formunda, pH 4.5’te ise ağırlıklı olarak renksiz hemiketal formunda bulunmasına dayanmaktadır. Ortam pH değeri 1,0 ve 4,5’te ölçülen absorbansları arasındaki fark antosiyanin konsantrasyonu ile ilgilidir. pH değişimini sağlamak amacıyla kullanılan potasyum klorür (KCl) tampon çözeltisi (0.025 M, pH 1.0) ve sodyum asetat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) tampon çözeltisi (0.4 M, pH 4.5), aşağıda anlatıldığı şekliyle hazırlanmıştır.

Sodyum asetat tamponu (0.4 M, pH 4.5), 54.43 g sodyum asetat trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) tartılarak yaklaşık 960 mL distile su içerisinde çözündürülmüş ve pH değeri konsantre HCl kullanılarak 4.5’e ayarlanmıştır. Ardından, çözelti 1 litrelik balon jojeye aktarılmış ve distile su ile hacim 1 litreye tamamlanmıştır.

Diğer tampon çözelti olan potasyum klorür tamponu (0.025 M, pH 1.0) ise, 1.86 g KCl tartılarak yaklaşık 980 mL distile su ile karıştırılmış; pH değeri yine konsantre HCl kullanılarak 1.0’a ayarlandıktan sonra 1 litrelik balon jojeye aktararak distile su ile toplam hacim 1 litreye tamamlanmıştır.

Liyofilize edilmeden önce alınan sıvı ekstrakttan 100 µL alınıp üzerine 400 µL pH 1 (potasyum klorit 0,025 M) buffer konulmuştur. Aynı ekstrakttan 100 µL alınıp 400 µL pH 4,5 (sodyum asetat 0,4 M) buffer konulmuştur. Daha sonra saf suya karşı 512-700 nm’de absorbans değerleri okunmuştur.

$$A = (A_{512} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{512} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}$$

$$\text{TMA (mg/L)} = \frac{A * \text{MW} * \text{DF} * 1000}{\epsilon * l}$$

Bu formülde A, $(A_{512} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{512} - A_{700})_{pH\ 4.5}$ şeklinde hesaplanan absorbans farkını ifade eder. MW, baz alınan antosiyanin bileşiğinin moleküler ağırlığı olup, siyanidin-3-glukozid için 449.2 g/mol'dür. DF, uygulanan seyreltme faktörünü; siyanidin-3-glukozid için 26,900 L·mol⁻¹·cm⁻¹ olan molar absorptivite katsayısını; 1 ise spektrofotometre küvetinin 1 cm olan optik yol uzunluğunu ifade eder, t.y.; Moghadam ve ark., 2021)(Ulusoy & Tamer, 2019)

3.2.3. *Rosa pimpinellifolia* L. (Kara kuşburnu)'nin Fenolik Bileşenlerinin UHPLC-ESI-MS/MS Analizi

Kara kuşburnu'nin fenolik bileşenlerinin analizi için Kara kuşburnu meyvelerinden %50 (v/v) etanol çözeltisi kullanılarak ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstrakt, rotary evaporatör ile düşük basınç altında işlenerek etanol uzaklaştırılmış, ardından liyofilizatörde (freeze dryer) kurutularak toz formuna getirilmiştir. +4 °C'de saklanan liyofilize ekstraktan analiz için 1 gram alınmış ve 1 mL %99 metanol içerisinde çözündürülmüştür. UHPLC-ESI-MS/MS analizinde ekstrakt içeriğindeki fenolik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif tanımlanması hazırlanan çözelti ile yapılmıştır.

Fenolik bileşikler, bir Agilent 6460 üçlü dört kutuplu kütle spektrometresine (Palo Alto, ABD) bağlı bir Agilent 1290 UHPLC sistemi kullanılarak, Can ve arkadaşları tarafından açıklanan yöntemi izleyerek analiz edilmiştir (Can ve ark., 2024).romatografik ayırma işlemi Zorbax SB-C18 ters faz analitik kolon (4.6 × 100 mm, 3.5 µm partikül boyutu) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Mobil fazlar %0,1 formik asit içeren su (solvent A) ve %0,1 formik asit içeren asetonitrilden (solvent B) oluşuyordu. Gradyan elüsyonu şu şekilde uygulanmıştır (dk/%B): 0-4 dk, %5; 4-7 dk, %20; 7-14 dk, %90; 14-15 dk, %90; 15-15.1 dk, %5; ve 15.1-20 dk, %5. Kolon sıcaklığı 30 ° C'de tutulmuş ve akış hızı 0.4 mL / dak olarak ayarlanmıştır.

Kütle spektrometrik tespiti, çoklu reaksiyon izleme (MRM) modunda negatif elektrosprey iyonizasyonu (ESI-) kullanılarak yapılmıştır. Bileşiğe özgü öncü ve ürün iyon geçişleri (Q1 / Q3) her analit için optimize edilmiştir. Kaynak parametreleri aşağıdaki gibiydi: kurutma gazı sıcaklığı, 350 ° C; kurutma gazı akışı, 12 L / dak; nebulizör basıncı, 55 psi; kılıf gazı sıcaklığı, 250 ° C; kılıf gazı akışı, 5 L / dak ; ve kılcal voltaj, 3,5 kV. Veri toplama ve analizi Agilent MassHunter Workstation yazılımı (sürüm B07) kullanılarak yapılmıştır. Metot validasyonu Can ve ark. (2024) tarafından yapılan çalışma ile sağlanmıştır.

3.2.4. *Rosa pimpinellifolia* L. (Kara kuşburnu)'nin Zebra Balığı (*Danio rerio*) Larvalarında In Vivo Toksisite ve Oksidatif Stres Çalışmaları

3.2.4.1. Zebra Balığı Yetiştiriciliği ve Oksidatif Stresin Oluşturulması

Bu çalışmada, Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Su Ürünleri Deneysel Araştırma Birimi'nden temin edilen zebra balıklarının yumurtaları kullanılmıştır. Yumurtlama işlemi, 10 saat karanlık/14 saat aydınlık fotoperiyodunda gerçekleştirilmiştir. Toplanan yumurtalar, petri kaplarına alınarak 28,5 °C sıcaklığa ayarlanmış bir inkübatöre yerleştirilmiştir. Yumurtaların bulunduğu ortam suyu her gün aynı saatte değiştirilerek embriyonik gelişim, kuluçka başarısı, sağkalım oranı ve morfolojik anomali verileri düzenli olarak kayıt altına alınmıştır.

Oksidatif stresi indüklemek amacıyla, 10 mM AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropan) dihidroklorür) dozu kullanılmıştır. Kuşburnu ekstraktının antioksidan özelliğini belirlemek için liyofilize edilmiş kara kuşburnu ekstraktı %10, %20 ve %30 konsantrasyonlarına seyreltilmiştir. Zebra balığı embriyolarına, AAPH'ye maruz bırakılmadan 1 saat önce üç farklı doz ekstrakla muamele edilmiştir. Oksidatif stres, döllenme sonrası 8-9. saatte (saat post-fertilizasyon) AAPH'nin uygulanmasıyla oluşturulmuştur.

Kontrol grubu embriyoları, tüm süreç boyunca E3 solüsyonunda (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄, %0.01 metilen mavisi) tutulmuştur.

AAPH grubu ve kara kuşburnu uygulanan gruplar için ise E3 solüsyonu yerine saf su kullanılmıştır.

3.2.4.2. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Belirlenmesi

Yetişkin zebra balıklarından elde edilen yumurtaların 72. saatinde, reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyeleri CM-H2DCFDA (5-klorometil-2', 7' diklorodihidrofloresandiasetat asetil ester) indikatörü kullanılarak belirlenmiştir.

Bu amaçla, her deney grubundan 5 adet larva seçilerek 24 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına yerleştirilmiştir. Larvalar öncelikle üç kez saf su ile yıkanmıştır. Son yıkama sonrasında tüm su uzaklaştırılmış ve her grup için kuyucuklara 2 µg/mL konsantrasyonunda indikatör eklenmiştir. Plaklar, 28,5 °C'de ve karanlık ortamda 2 saat boyunca inkübe edilmiştir (Sökmen ve ark., 2020).

İnkübasyon süresinin sonunda larvalar tekrar üç kez saf su ile yıkanmış ve tüm su uzaklaştırılmıştır. Larvalar, %3'lük metil selüloz ile lam üzerine dizilerek flüoresan mikroskobu (Zeiss, Discovery V12, Germany) aracılığıyla görüntüleri alınmıştır.

Tüm işlemler üç tekrarlı olarak yürütülmüş ve her grup için toplam 15 larvadan elde edilen veriler analiz edilmiştir.

3.2.4.3. Apoptik Hücrelerin Belirlenmesi

Bu çalışmada, her deney grubundan 96. saatteki 15 larva kullanılarak apoptotik hücreler belirlenmiştir. Larvalar, 24 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına yerleştirilmiştir.

Larvalar, PBS (Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi) ile 3-5 kez yıkanmıştır. Son yıkama sonrasında tüm PBS çekilerek larvalar, 28,5 °C'de ve karanlık ortamda 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir (Sulukan ve ark., 2017a).

İnkübasyonun ardından larvalar tekrar PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra %3'lük metil selüloz ile lam üzerine alınan larvaların görüntüleri, flüoresan mikroskobu (Zeiss, Discovery V12, Germany) aracılığıyla kaydedilmiştir.

Tüm işlemler üç tekrarlı olarak yürütülmüş ve her grup için elde edilen veriler analiz edilmiştir.

3.2.4.4. Morfolojik ve Fizyolojik Ölçümler

Bu çalışmada, her gruptan en az 20 larva aynı saat ve boyutta olacak şekilde seçilerek ışık mikroskobu altında fotoğraflanmıştır. Morfolojik parametrelerin analizi için, zebra balığı embriyo ve larvalarının incelenmesine olanak sağlayan Danioscope yazılımı kullanılmıştır. Göz çapı, vücut uzunluğu ve perikardiyal ödem gibi parametreler, 48., 72., 96. ve 120. saatlerde analiz edilmiştir. Aynı zamanda, döllenmeyi takiben 4. saatten itibaren embriyolar, 12, 24, 48, 96 ve 120. saatlerde düzenli olarak mikroskop altında incelenmiş ve gözlenen vücut anormallikleri fotoğraflanarak kayıt altına alınmıştır (Sulukan ve ark., 2017b).

3.2.4.5. Lokomotor Aktivite ve Tigmotaksis Analizleri

Zebra balığı larvalarının lokomotor aktivitesi ve tigmotaksis davranışları, 120 hpf'de (döllenme sonrası saat) 24 kuyucuklu plaka sistemi kullanılarak analiz edilmiştir. Çalışmada her bir deney grubu için 80 larva kullanılmış olup, her bir kuyuya bir larva yerleştirilmiştir.

Davranış analizleri DanioVision (Noldus) sisteminde gerçekleştirilmiş ve ölçüm süreci, aklimatizasyon süresi dâhil olmak üzere toplam 1 saat 20 dakika olacak şekilde planlanmıştır. Bu sürenin ilk 30 dakikası aklimatizasyon amacıyla ayrılmış, kalan sürede larvaların lokomotor aktiviteleri kaydedilmiştir. Elde edilen davranışsal veriler, EthoVision XT yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Lokomotor aktivite

değerlendirmesinde toplam kat edilen mesafe ve yüzme hızı (velocity) parametreleri dikkate alınmıştır (Kiziltan ve ark., 2022).

Tigmotaksis analizi, zebra balığı larvalarında stres ve anksiyete ile ilişkili mekânsal yüzme tercihlerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda her bir kuyu, merkez bölge (inner zone) ve çevresel bölge (outer zone) olmak üzere iki alana ayrılmıştır. Larvaların outer zone’da kat ettikleri mesafenin, toplam hareket mesafesine oranı tigmotaksis düzeyi olarak hesaplanmıştır. Outer zone’da geçirilen mesafenin artması, artmış stres ve anksiyete davranışı göstergesi olarak değerlendirilmiştir (Kankaynar ve ark., 2023).

3.2.5. Akıllı Biyobozunur Filmlerin Hazırlanması

Filmlerin hazırlanmasında kullanılan malzemelerin oransal olarak miktarları daha önce farklı konsantrasyonlarda denenerek en uygun formülasyon elde edilmiştir. Bu bağlamda filmlerin hazırlanmasında her deney grubu için 100 mL saf su içerisine %4 (w/v) oranında sığır jelatini eklenmiş ve karışım, 25 °C’de 35–40 dakika boyunca manyetik karıştırıcıya bırakılmıştır. Jelatin tamamen çözündükten sonra, plastikleştirici olarak jelatin kütlesine oranla %0,3 gliserol ve %0,15 sorbitol eklenmiş; karışım bu bileşenlerin homojen dağılması amacıyla 15 dakika daha manyetik karıştırıcıya bırakılmıştır. Bu aşamanın ardından, dört deney grubu oluşturulmuştur: kontrol grubuna herhangi bir ekstrakt ilavesi yapılmamış, diğer üç gruba ise sırasıyla jelatin kütlesine oranla 0.04 (Grup 1), 0.08 (Grup 2) ve 0.12 (Grup 3) katı kadar kara kuşburnu ekstraktı ilave edilmiştir. Ekstraktlar eklendikten sonra karışımlar, ekstraktın dağılımını sağlamak amacıyla 5 dakika süreyle yeniden karıştırılmış ve ardından her biri petri kabına 15 mL olacak şekilde dökülerek oda sıcaklığında 24 saat boyunca kurutulmuştur. Üç tekerrür olacak şekilde filmler üretilmiştir. Filmlerin özelliklerini belirlemek amacıyla, her biri üç biyolojik ve üç teknik tekrarlı olarak analizler yapılmıştır.

3.2.6. Akıllı Biyobozunur Filmlerin Karakterizasyonu

3.2.6.1. Filmlerin Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi

Yöntemin prensibi, fenolik bileşiklerin bazik ortamda Folin–Ciocalteu reaktifi (FCR) ile reaksiyona girerek reaktifi indirgemesi ve bu sırada kendisinin oksitlenmesidir. Oluşan indirgenmiş FCR'nin mavi renkli kompleks oluşturmasıyla birlikte, bu renk değişimi spektrofotometrik olarak ölçülür ve böylece örnekteki toplam fenolik madde miktarı hesaplanmış olur.

Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi amacıyla, her film grubundan 50 mg numune tartılmış ve 10 mL damıtılmış su içerisinde oda sıcaklığında 3 saat boyunca manyetik karıştırıcıya bırakılmıştır. Ekstraksiyonun ardından, elde edilen film özütünden 0,5 mL alınarak 2 mL %10 (v/v) Folin–Ciocalteu reaktifi ile karıştırılmış ve karışım karanlık ortamda 3 dakika inkübe edilmiştir. Ardından çözeltiliye 2,5 mL %7,5 (w/v) sodyum karbonat çözeltisi ilave edilmiş ve homojenize edilmiştir. Karışım, karanlık ortamda 2 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra, absorbans değeri 765 nm dalga boyunda bir spektrofotometre (Multiskan Sky, Thermo Fisher Scientific, Cambridge, ABD) ile ölçülmüştür. Toplam fenolik içerik, galik asit eşdeğeri (GAE) cinsinden hesaplanmıştır (Moghadam ve ark., 2021).

3.2.6.2. Filmlerin Antioksidan Aktivite Tayini

Filmlerin antioksidan kapasitesi, DPPH ve ABTS radikal süpürme yöntemleri ile değerlendirilmiş; ayrıca referans olarak sentetik antioksidanlar BHA (bütilenmiş hidroksi anisol) ve BHT (bütilenmiş hidroksi toluen) ile doğal bir antioksidan olan α - tokoferolün absorbans değerleri spektrofotometrik (Multiskan Sky, Thermo Fisher Scientific, Cambridge, ABD) olarak ölçülmüştür.

Film ekstraktını hazırlamak için, 4,5 mg film numunesi 4 mL deiyonize su içerisinde bekletilmiş ve elde edilen karışım manyetik karıştırıcıda homojen hâle

getirilmiştir. Çözünmemiş partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla karışım santrifüjlenmiştir. ABTS analizi için, ekstraktın üst fazından 2 mL alınarak ABTS çözeltisine eklenmiş ve karışım 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Absorbans ölçümleri 734 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. DPPH analizi için, film ekstraktı ile reaksiyona girmesi amacıyla 4 mL DPPH çözeltisi kullanılmış ve karışım 6 saat boyunca karanlıkta bekletildikten sonra absorbans ölçümleri 517 nm dalga boyunda yapılmıştır (Moghadam ve ark., 2021).

$$DPPH(\%) = 1 \frac{A^S}{A^C} \times 100$$

$$ABTS(\%) = \frac{A^C - A^S}{A^C} \times 100$$

Burada A_s ve A_c sırasıyla numunenin ve kontrolün absorbans değerlerini ifade etmektedir.

3.2.6.3. Filmlerin Kalınlığının Ölçülmesi

Aktif filmlerin kalınlığı (mm), elde taşınan bir mikrometre kullanılarak (CTN 5202–25, Türkiye) değerlendirilmiştir. Her bir gruptan rastgele seçilen 5 farklı örneğin 6 farklı noktasından ölçüm alınmış ve elde edilen değerlerin ortalaması hesaplanmıştır (Chen ve ark., 2022).

3.2.6.4. Filmlerin Nem İçeriğinin Belirlenmesi

Nem içeriğini belirlemek amacıyla, film numuneleri (1,5 cm × 3 cm boyutlarında) 110 °C sıcaklıktaki etüvde 24 saat kurutulmuştur. Numunelerin kurutma öncesi ve sonrası ağırlıkları kaydedilerek nem içeriği aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Y. Chen ve ark., 2022).

$$NEM \text{ İÇERİĞİ}(\%) = \frac{W_0 - W_i}{W_0}$$

Burada W_0 ve W_i sırasıyla filmin başlangıç ve kurutulmuş ağırlıklarını ifade etmektedir.

3.2.6.5. Filmlerin Su Çözünürlüğünün (WS) Belirlenmesi

Film örnekleri 2×2 cm boyutlarında kesilmiş, 105 °C’de 24 saat inkübatör de kurutulmuştur. Ardından örnekler, 20 ml damıtılmış su içeren beherlere yerleştirilerek 25 °C’de, ağzı kapalı şekilde, 24 saat bekletilmiştir. Bekleme süresinin ardından sudan çıkarılan örnekler, 105 °C’de 24 saat boyunca yeniden kurutulmuştur. Her bir aşamada ağırlıkları tartılıp not edilmiştir (Chen ve ark., 2022). Çözünürlük aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{ÇÖZÜNÜRLÜK}(\%) = \frac{M_i - M_f}{M_i}$$

Burada M_i filmlerin başlangıçtaki kuru ağırlığını, M_f ise filmlerin son kuru ağırlığını temsil etmektedir.

3.2.6.6. Filmlerin Su Geçirgenliğinin Ölçülmesi

Filmlerin su geçirgenliğinin ölçülmesi için, geniş ağızlı bir kap ($5 \times 10^{-3} \text{ m}^2$ alan) 40 mL distile su ile doldurulmuş ve su yüzeyi ile film arasında 50 mm’den daha az bir boşluk bırakılmıştır. Film numunesi iki conta arasına yerleştirilmiş ve sonra sıkıştırmak için vidalı kapak kapatılmıştır. Kaplar, üç gün boyunca her gün aynı saatte tartılmış ve elde edilen kütle değişimleri kullanılarak su buharı geçirgenliği aşağıdaki yer alan formüller kullanılarak % olarak hesaplanmıştır (Cazón ve ark., 2022).

$$WVTR \left(\frac{g}{s \cdot m^2} \right) = \frac{\Delta w}{\Delta t \cdot A}$$

$$\text{geçirgenlik} \left(\frac{g}{s \cdot m^2 \cdot Pa} \right) = \frac{WVTR}{\Delta P}$$

$$WVP \left(\frac{g}{s \cdot m \cdot Pa} \right) = \text{geçirgenlik} \cdot \text{kalınlık}$$

Burada $\Delta w / \Delta t$ (g / s), birim zaman başına hücrenin ağırlık kaybı olarak ölçülen ve kabın ağırlık kaybının zamana karşı en yakın 0.0001 g'a eğimi olarak hesaplanan akıdır; A (m^2), ağız kabı çapına göre belirlenen gerçek maruz kalan alandır ve ΔP (Pa), 30 ° C'de (19) 4245 Pa olarak hesaplanan su buharı basınç farkıdır ve kafa boşluğunda

tam bir su buharı doygunluğu varsayılmıştır. Her test üç tekrar halinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.7. Filmlerin Mekanik Özelliklerin Belirlenmesi

Çekme mukavemeti (TS), yenilebilir filmlerin mekanik özelliklerini belirlemek amacıyla bir tekstür analizörü (Stable Micro Systems, Godalming, İngiltere) kullanılarak ölçülmüştür. Testlerde kullanılacak film numuneleri, üretilen filmlerden kesilerek dikdörtgen biçimine (1,5 cm × 8 cm) getirilmiştir. Numuneler, 3 cm ölçüm uzunluğu ve 1,0 mm/sn çapraz kafa hızı ile uzatılmıştır. Ölçümler sonucunda elde edilen maksimum gerilme değerleri çekme mukavemeti (TS) olarak hesaplanmıştır (Moghadam ve ark., 2021).

3.2.6.8. Filmlerin Renk ve Opaklık Ölçümleri

L*, a* ve b* değerlerini ölçmek için, sırasıyla açıklık, kırmızılık ve sarılığı temsil eden üç renk parametresini değerlendirebilen bir kolorimetre (Konica Minolta CR-400, Osaka, Japonya) kullanılmıştır. Cihazın kalibrasyonu, standart bir beyaz plaka yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Her numunenin renk değeri, beş farklı rastgele noktadan alınan ölçümlerin ortalaması olarak ifade edilmiştir. Ayrıca, pH 1–13 aralığında filmlerde meydana gelen renk değişimi de aynı yöntemle ölçülmüştür.

Film numunelerinin opaklığını (ışık geçirgenliği) ölçmek amacıyla, filmler 1 cm × 4 cm boyutlarında kesilmiş ve spektrofotometre küvetinin iç kısmına yerleştirildikten sonra, 600 nm dalga boyunda absorbans değerleri boş küvete karşı okunmuştur (Moghadam ve ark., 2021). Opaklık aşağıda yer alan formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$OPAKLIK = \frac{A}{T}$$

Burada A , numunelerin 600 nm'deki absorbansını ve T ise film kalınlığını (mm) ifade etmektedir.

3.2.6.9. Filmlerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Görüntülenmesi

Hazırlanan dört farklı film örneğinin yüzey morfolojilerinin incelenebilmesi için, numuneler ince bir altın tabaka ile kaplanmıştır. Kaplanmış numuneler, 5 kV hızlandırma voltajında çalışan taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile analiz edilerek yüzey özellikleri değerlendirilmiştir.

3.2.6.10. Filmlerin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FITR) ile Yapısal Analizi

Tüm numunelerin Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektrumları, transmisyon modunda çalışan Frontier FT-IR spektrometresi kullanılarak, 400–4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında ölçülmüştür.

3.2.6.11. Film Bileşimlerinin X-Işını Kırınım Paterni (XRD)

Üretilen yenilebilir filmlerin kristal yapılarının incelenmesi amacıyla, Cu K α radyasyonu kullanılarak, 40 kV ve 30 mA'de çalışan, 5°–50° 2 θ aralığında X-ışını difraktometresi ile kırınım desenleri kaydedilmiştir (Moghadam ve ark., 2021).

3.2.6.12. Filmlerin Antimikrobiyal Aktivite Analizi

Hazırlanan kara kuşburnu ekstresi yüklü jelatin bazlı filmlerin mikrobiyal gelişimi durdurma kapasitesi, modifiye edilmiş Agar Disk Difüzyon yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. Çalışmada filmlerin antimikrobiyal spektrumunu belirlemek amacıyla Gram-pozitif bakteri *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), Gram-negatif bakteriler *Escherichia coli* (ATCC 25922) ve *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ile maya tipi bir fungus olan *Candida albicans* (ATCC 60913) suşları test paneline dahil edilmiştir. Deney öncesinde tüm mikroorganizmalar uygun sıvı besiyerlerinde aktive edilerek logaritmik büyüme fazında kullanılmıştır. Test aşamasında, 0.5 McFarland standardına göre ayarlanan taze mikrobiyal süspansiyonlar, steril eküvyonlar yardımıyla Mueller-

Hinton Agar (MHA) plaklarının yüzeyine homojen bir şekilde inoküle edilmiştir. Hazırlanan biyopolimerlerden steril koşullarda kesilen 6 mm çapındaki dairesel film diskleri, agar yüzeyine aseptik olarak yerleştirilmiştir. Çalışmada yöntemi doğrulamak ve kıyaslama yapabilmek adına üç farklı kontrol grubu kullanılmıştır: Jelatin matrisinin etkisini gözlemlemek için bitki ekstraktı içermeyen saf jelatin filmler (negatif kontrol); bakteriyel suşların duyarlılığını ölçmek için Gentamisin (10 µg) ve *C. albicans* için Flukonazol (25 µg) içeren standart diskler (pozitif kontroller) plaklara yerleştirilmiştir. Hazırlanan petri plakları, bakteriyel suşlar için 37°C’de 24 saat, *C. albicans* için ise 35°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süreci sonunda, film disklerinin çevresinde meydana gelen net inhibisyon zonları dijital kumpas ile milimetrik (mm) olarak ölçülmüş ve tüm deneyler üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

3.2.7. Akıllı Ambalajın Gıda Uygulamaları

3.2.7.1. pH İndikatör Özelliği ve Duyarlılık Testi

Film örnekleri; hazırlanmış olan asidik, nötr ve bazik tampon çözeltilerine daldırılarak pH duyarlılıkları test edilmiştir. Her bir film örneği, ilgili çözelti içerisinde 5 dakika bekletilmiş ve bu süre boyunca gerçekleşen renk değişimleri bir kamera aracılığıyla resmedilmiştir (Jamróz ve ark., 2019).

3.2.7.2. Balıketi Örneklerinde Tazelik Göstergesi Uygulaması

Balıketinin depolama süresince tazeliğinin izlenmesi amacıyla, Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Yetiştiriciliği Birimi’nden taze olarak temin edilen balıklar, kesim işlemi gerçekleştirildikten hemen sonra analizlerde kullanılmıştır. Her biri 30 g olacak şekilde hazırlanan balık örnekleri cam kaplara yerleştirilmiş, kapların etrafı hava ile temas etmeyecek şekilde sarılarak oksijen girişi engellenmiştir. Numuneler 4 °C’de buzdolabı koşullarında depolanmış ve depolama süresince 0., 1., 3., 5. ve 7. günlerde analizler gerçekleştirilmiştir. Tüm uygulamalar üç tekerrürlü olarak yürütülmüştür.

Depolama süresi boyunca akıllı filmlerde meydana gelen renk değişimleri belirlenen zaman noktalarında kaydedilmiştir.

Balıklerinin Fiziksel, Kimyasal ve Mikrobiyolojik Analizleri

Toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı (TAMB) analizi için, 10 g balık örneği 90 mL steril fizyolojik tuzlu su (%0,85 NaCl) ile seyreltilmiş ve 15 dakika boyunca ultrasonik homojenizatörde homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenattan steril fizyolojik tuzlu su kullanılarak on kat seri seyreltmeler hazırlanmış ve uygun seyreltmeler Plate Count Agar (PCA) besiyerine yayma plak yöntemi ile ekilmiştir. Plaklar 37 °C’de 24-48 saat inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda koloni oluşturan birimler sayılarak sonuçlar log CFU/g olarak ifade edilmiştir(Ekrami ve ark., 2022)

pH analizi için, 10 g balık örneği 90 mL damıtılmış su ile karıştırılmış ve 5 dakika boyunca 3000 rpm’de homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sonrası elde edilen süspansiyonun pH değeri, kalibre edilmiş pH metre kullanılarak ölçülmüştür.

Lipit oksidasyonunun belirlenmesi amacıyla TBARS analizi, depolama süresince 0., 1., 3., 5. ve 7. günlerde gerçekleştirilmiştir. TBARS değerleri, balık etinde lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ikincil oksidasyon ürünlerini yansıtacak şekilde değerlendirilmiştir(Li ve ark., 2013)

3.3. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizleri IBM SPSS Statistics 27.0 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel testler uygulanmadan önce, veri setlerinin varyans homojenliği Levene testi ile değerlendirilmiş ve parametrik test varsayımlarının sağlanıp sağlanmadığı kontrol edilmiştir.

Varyansların homojen olduğu durumlarda, gruplar arası karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) kullanılmış ve anlamlı farklılıkların hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek amacıyla Tukey post hoc testi uygulanmıştır.

Varyans homojenliğinin sağlanmadığı veri setlerinde ise çoklu karşılaştırmalar için Dunnett's T3 testi tercih edilmiştir.

Değişkenler arasındaki ilişkilerin belirlenmesi amacıyla Spearman korelasyon analizi uygulanmış ve istatistiksel anlamlılık düzeyi $p \leq 0,05$ ve $p \leq 0,01$ olarak kabul edilmiştir.

Lokomotor aktiviteye ait davranışsal parametreler (toplam hareket mesafesi ve yüzme hızı) EthoVision XT yazılımından elde edilen çıktılar üzerinden istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Morfolojik lmler Danioscope sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler istatistiksel analizlere dâhil edilmiştir.

AO ve ROS floresan yoğunlukları, dijital görüntüler üzerinden ImageJ yazılımı kullanılarak nicel olarak hesaplanmış ve elde edilen değerler gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (SS) olarak ifade edilmiş ve $p < 0,05$ değer i istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Bu bölümde kara kuşburnu ekstre ilavesiyle üretilen jelatin bazlı yenilebilir filmlerin; fiziksel, mekanik, yapısal ve antioksidan özelliklerine ilişkin bulgular sunulmaktadır. Üç farklı özüt konsantrasyonunun film özellikleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiş, elde edilen filmlerin pH'ya duyarlı renk değişimi ve fonksiyonel özellikleri analiz edilmiştir. Ayrıca, kara kuşburnu kaynaklı antosiyaninlerin AAPH ile indüklenen oksidatif stres koşulları altında zebra balığı embriyoları üzerindeki biyolojik etkilerine dair bulgulara da yer verilmiştir.

4.1. *Rosa pimpinellifolia* L. Özellikleri

Film yapısına eklenen özütün, toplam monomerik antosiyanin içeriği pH diferansiyel yöntemi kullanılarak siyanidin-3-glukozit eşdeğeri (CGE) cinsinden hesaplanmıştır. Ölçümler sonucunda özütün TMAC değeri 209.36 ± 8.29 mg CGE/L olarak belirlenmiştir.

Çalışma kapsamında *Rosa pimpinellifolia* L. örneğinin fenolik profilini belirlemek amacıyla LC-MS/MS analizi gerçekleştirilmiş ve 19 farklı fenolik bileşik kalitatif ve kantitatif olarak saptanmıştır (Tablo 4.1).

Analiz sonuçlarına göre, incelenen örnekte fumarik asit ($256.16 \mu\text{g/g}$) en yüksek konsantrasyonda bulunan ana bileşen olarak belirlenmiştir. Fumarik asidi takiben, numunenin ferulik asit ($6.07 \mu\text{g/g}$), gallik asit ($3.15 \mu\text{g/g}$) ve apigenin ($2.33 \mu\text{g/g}$) bakımından da zengin olduğu görülmüştür. Diğer taraftan, incelenen örnekte taksifolin ($2.03 \mu\text{g/g}$) ve kinik asit ($2.01 \mu\text{g/g}$) orta düzeyde bulunurken; siringik asit ($0.07 \mu\text{g/g}$) ve klorojenik asit ($0.01 \mu\text{g/g}$) en düşük konsantrasyonlarda saptanan bileşikler olmuştur. Antosiyanin grubundan ise peonidin-3-O-glukozit ($0.20 \mu\text{g/g}$), siyanidin-3-O-glukozit ($0.14 \mu\text{g/g}$) ve kerasiyanin klorür ($0.14 \mu\text{g/g}$) gibi bileşiklerin varlığı düşük miktarlarda da olsa tespit edilmiştir.

Tablo 4.1. *Rosa pimpinellifolia* L. ekstresinde belirlenen fenolik bileşiklerin UHPLC-ESI-MS/MS analiz sonuçları ve miktarları (µg/g)

Bileşik Grubu	Bileşik Adı	Konsantrasyon (µg/g)
Organik Asitler	Fumarik Asit	256.16
	Kinik Asit	2.01
Fenolik Asitler	Ferulik Asit	6.07
	Gallik Asit	3.15
	p-Kumarik Asit	1.28
	Kafeik Asit	0.90
	4-Hidroksibenzoik Asit	0.85
	Siringik Asit	0.07
	Klorojenik Asit	0.01
Flavonoidler	Apigenin	2.33
	Taksifolin	2.03
	Luteolin	1.36
	Mirisetin	1.08
	Hesperidin	0.67
	Naringenin	0.56
	Kuersetin	0.12
Antosiyaninler	Peonidin-3-O-Glukozit	0.20
	Siyanidin-3-O-Glukozit	0.14
	Kerasiyanin Klorür	0.14

Elde edilen bu veriler, kara kuşburnu özüt örneğinin güçlü bir fenolik kompozisyona sahip olduğunu ve özellikle organik asitler ve flavonoidler açısından önemli bir kaynak teşkil ettiğini göstermektedir.

4.2. Zebra balığı (*Danio rerio*) In Vivo Toksisite ve Oksidatif Stres

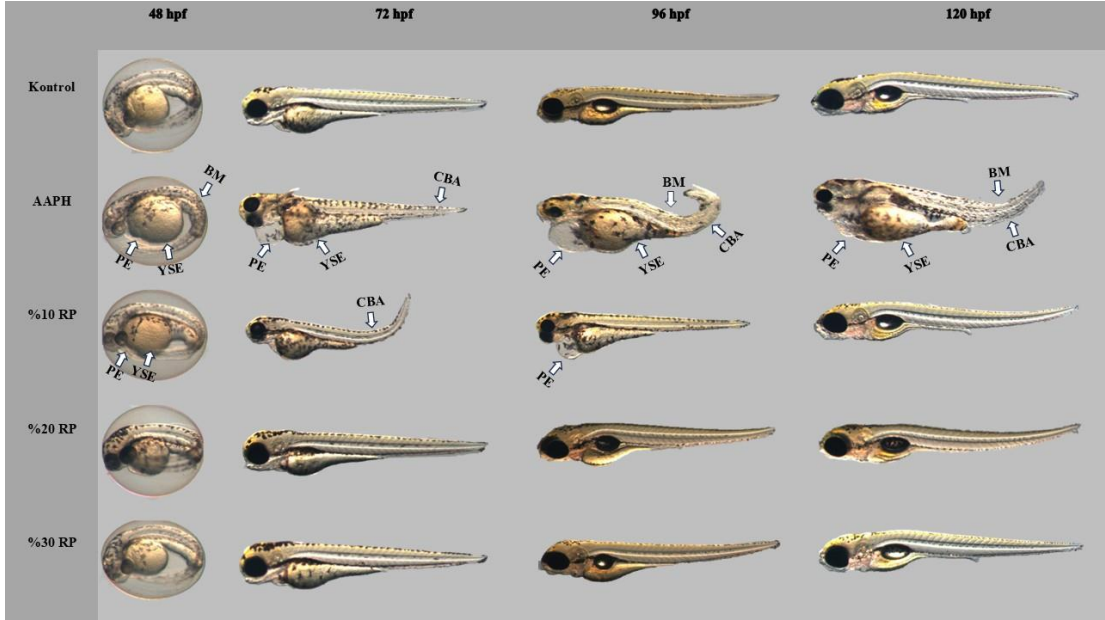
Değerlendirmeleri

4.2.1. Oksidatif Stres Modeli Altında Gözlenen Değişimler

RP'nin antioksidan etkinliğini belirlemek amacıyla AAPH kullanılarak zebra balığı embriyolarında oksidatif stres modeli oluşturulmuştur. AAPH'nin LC₅₀ değeri 20 mM olarak belirlendiğinden toksisite oluşturmak için deneylerde 10 mM AAPH dozu kullanılmıştır. Yapılan ön çalışmalar sonucunda *Rosa pimpinellifolia* L. (RP)'nin LC₅₀

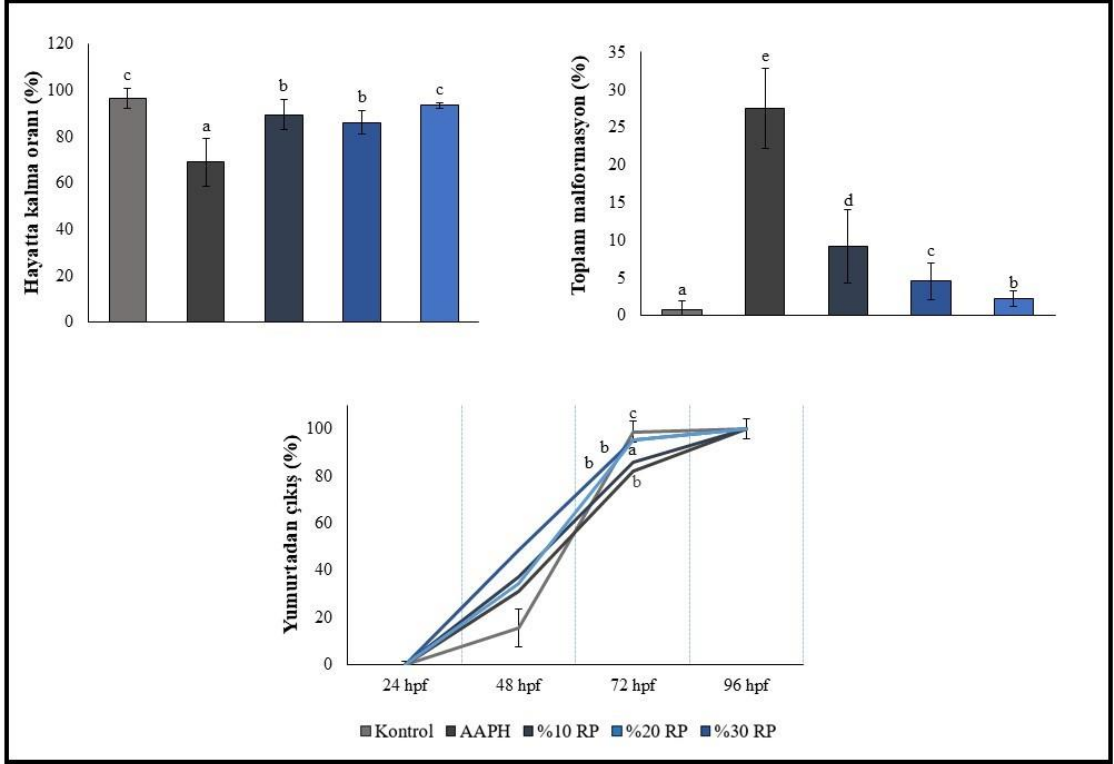
değeri %60 olarak saptanmış ve bu doğrultuda deney grupları %10, %20 ve %30 RP olacak şekilde planlanarak çalışma tasarlanmıştır.

AAPH, zebra balığı embriyolarında perikardiyal ödem, yumurta kesesi ödemi eğri vücut eksenini ve çeşitli vücut malformasyonları gibi belirgin fizyolojik anormalliklere neden olmaktadır (Şekil 4.1). Maruziyetten 16–18 saat önce uygulanan kara kuşburnu ekstraktları arasında özellikle %20 ve %30 dozlarının bu anormalliklerin oluşumunu belirgin şekilde engellediği ve oksidatif stres kaynaklı kimyasal etkiye karşı güçlü bir koruyucu rol üstlendiği görülmüştür.



Şekil 4.2.11 AAPH'nin zebra balığı larvalarında oluşturduğu fizyolojik toksisite ve tedavi grubunun düzenleyici/iyileştirici etkisine ait görüntüler

%10'luk dozda koruyucu etkinin daha sınırlı olduğu, bazı embriyolarda hafif düzeyde anormalliklerin devam ettiği belirlenmiştir. Fizyolojik görüntülerin genel değerlendirmesinde, %20 ve %30 ekstre uygulanan grupların morfolojilerinin kontrol grubuna oldukça benzer bir görünüm sergilediği ve AAPH kaynaklı toksisiteye karşı belirgin koruyucu etki sağladığı gözlenmiştir.



Şekil 4.2.1.2. Zebra balığı larvalarında yumurtadan çıkış, hayatta kalma ve malformasyon oranları

Hayatta kalma oranı Şekil 4.2.de gösterilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla AAPH grubunda hayatta kalma oranı %29 azalmış olup bu durum oksidatif stresin başarıyla oluşturulduğunu ve koruyucu etkisi incelenen RP'nin etkisinin net bir şekilde değerlendirilebileceğini göstermektedir. Üç farklı RP grubunda hayatta kalma oranı yalnızca yaklaşık %3 oranında azalmıştır; %30 RP grubunda ise hayatta kalma oranı kontrol grubuyla aralarında anlamlı fark bulunamamıştır. Bu sonuçlar, tüm RP dozlarında antioksidan etkinin gözlemlendiğini ve özellikle %30 RP dozunun AAPH'ye karşı koruyucu etkisinin kontrol düzeyine yakın olduğunu göstermektedir.

AAPH grubunda anomali oranı %28 olarak belirlenmiştir. En yüksek antioksidan dozu olan %30 RP, anomali oranını %98 oranında azaltmıştır. Antioksidan doz düzeyinin artmasına paralel olarak anomali oranlarında benzer biçimde azalmalar görülmüştür. %30

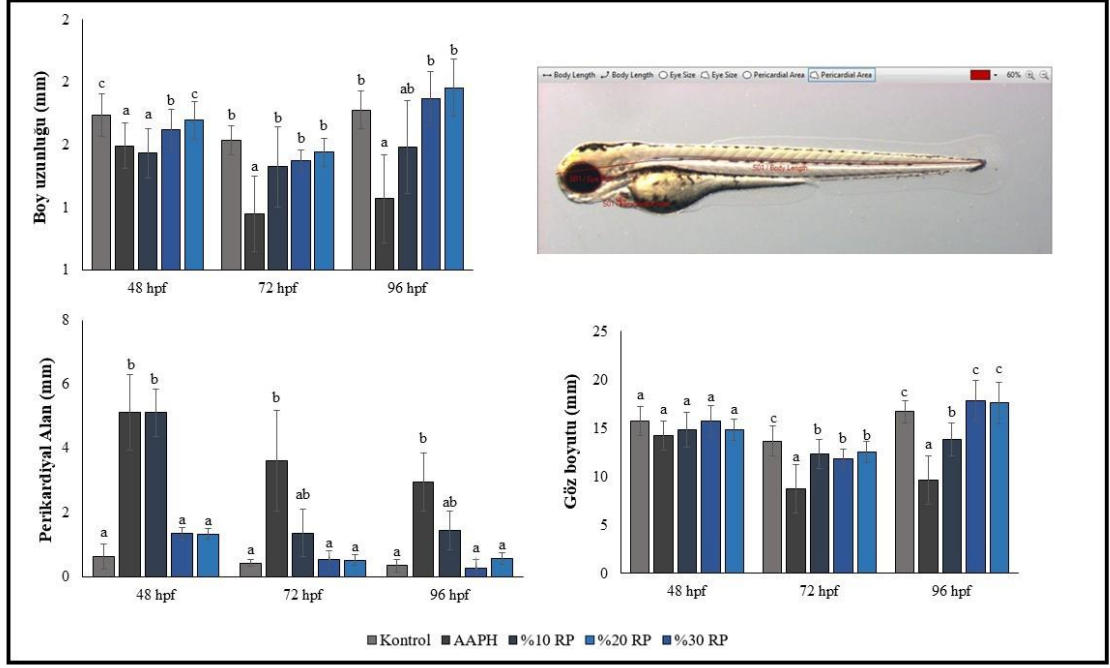
RP grubunun kontrol grubuna yakın sonuçlar vermesi, RP'nin koruyucu antioksidan etkisinin başarılı olduğunu göstermektedir.

AAPH grubunda yumurtadan çıkış oranı açısından 48 hpf'de tüm gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ancak 72 hpf'de AAPH grubunda tüm dozlarda anlamlı düzeyde farklılık ortaya çıkmıştır. Ayrıca AAPH grubunda yumurtadan çıkma oranı kontrol grubuna kıyasla %16 azalmıştır. RP dozları değerlendirildiğinde, %10 RP grubu kontrol grubuna oldukça yakın sonuçlar verirken, %20 ve %30 RP gruplarının kontrolle yakın sonuçlar verdiği belirlenmiştir. AAPH grubundaki diğer grupların aksine tekrarlayan deneyler boyunca 96 hpf'ye kadar koryondan çıkamayan ve gelişimini tamamlayamayan larvalar gözlenmiştir. 96 hpf'de elde edilen sonuçlar, 48 hpf'de gözlenen bulgularla benzerdir.

4.2.2. Morfometrik ve Fizyolojik Parametreler

48, 72 ve 96 hpf dönemlerinde larvaların boy, göz çapı ve perikardiyal alan ölçümleri alınmış ve ölçümler DanioScope yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda elde edilen sonuçlar Şekil 4.3'te verilmiştir. Boy uzunluğu karşılaştırıldığında, her üç dönemde de AAPH grubunda kontrol ve koruyucu gruplara göre anlamlı düzeyde azalma görülmüştür. Buna karşılık, %30 RP uygulanan grupta tüm dönemlerde kontrol ile benzer boy uzunlukları elde edilmiştir. Ayrıca 48 hpf'de %10 RP grubunun AAPH grubuyla benzer boy değerleri gösterdiği, ancak sonraki dönemlerde iyileştirici ve koruyucu etkinin belirginleştiği görülmüştür.

Perikardiyel alan ölçümlerinde, AAPH grubunda tüm dönemlerde (48, 72 ve 96 hpf) diğer gruplara kıyasla anlamlı artış göstermiştir. %10 RP grubunda 72 ve 96 hpf dönemlerinde kısmi iyileştirici etki gözlenirken, %20 ve %30 RP uygulanan grupların sonuçlarının kontrol grubuna oldukça yakın ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur.



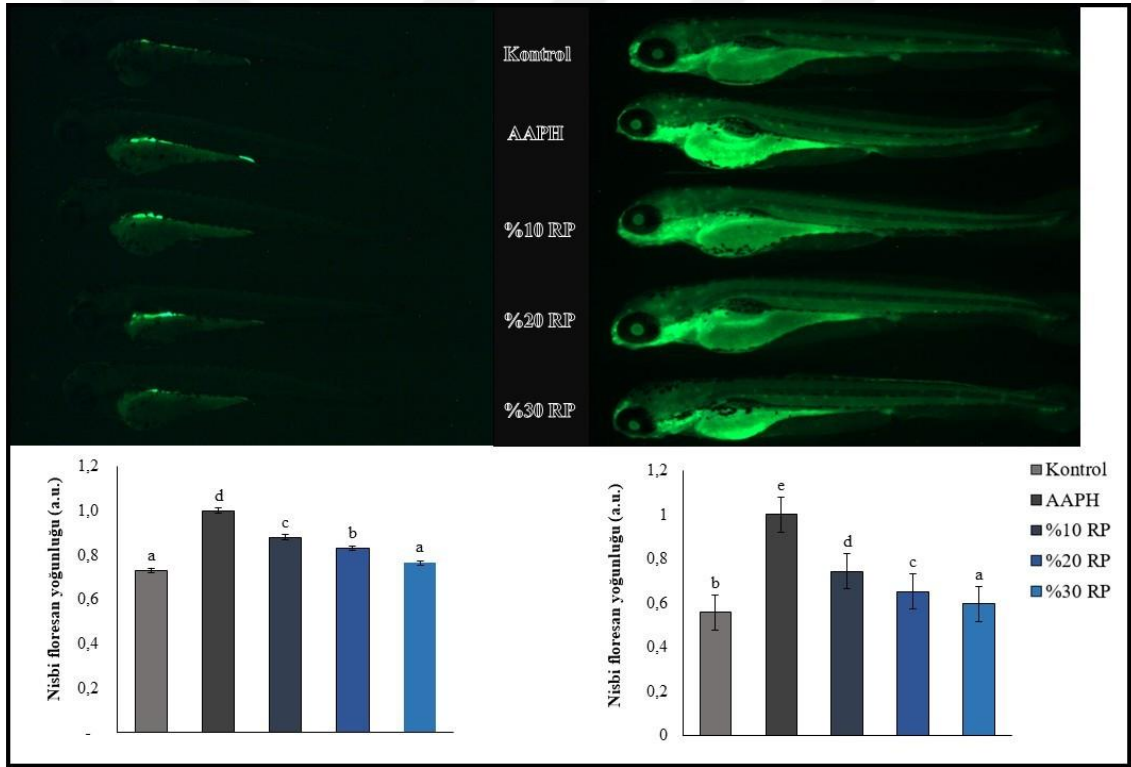
Şekil 4.2.23. Kontrol, AAPH ve farklı RP dozlarına ait zebra balığı larvalarında boy, perikardiyal alan ve göz çapı ölçümleri

48 hpf'de göz çapı açısından gruplar arasında anlamlı fark görülmemiştir. Ancak 72 ve 96 hpf dönemlerinde AAPH grubunda göz çapının artış göstermediği, yani gelişiminin ilerlemediği belirlenmiştir. Buna karşılık, RP'nin üç farklı dozunda göz çapında doza bağlı ritmik artış gözlenmiş ve elde edilen değerlerin kontrol grubuna yakın olduğu tespit edilmiştir.

4.2.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Apoptotik Hücre Dağılımı

Mevcut araştırmada ROS tespiti için CM-H₂DCFDA, hücre ölümünü belirlemek için ise Akridin Oranj (AO) boyası kullanılarak larvalara ait floresan görüntüler çekilmiştir. Ardından, elde edilen görüntülerin yoğunlukları ImageJ yazılımı ile analiz edilmiştir. Yapılan analizlere ait sonuçlar Şekil 4.4'te sunulmuştur. Çalışmanın temel amacı, oksidatif stresi başarılı bir şekilde oluşturmak olduğu için hem görüntüler hem de istatistiksel veriler doğrultusunda AAPH grubunda ROS düzeylerinin kontrol grubuna göre %43 oranında arttığı ve temel amacı doğrultuğunu göstermektedir. Antioksidan etkiyi

değerlendirmek amacıyla uygulanan RP'nin üç farklı dozunun, artan doza paralel olarak ROS oluşumunu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı görülmüştür. Özellikle %30 RP grubunun kontrol grubu ile benzer sonuçlar vermesi, bu dozun ROS oluşumunu etkin bir şekilde baskıladığını göstermektedir. ROS, hücresel hasara neden olarak hücre ölümünü tetiklemektedir. AAPH grubunda kontrol grubuna göre hücre ölümünün %80 oranında arttığı belirlenmiş olup, bu artış yükselen ROS düzeyleri ile uyumludur. Elde edilen floresan görüntüleri ve istatistiksel ölçümler, ROS birikimi ile hücre ölümü arasındaki ilişkiyi açık şekilde doğrulamaktadır.

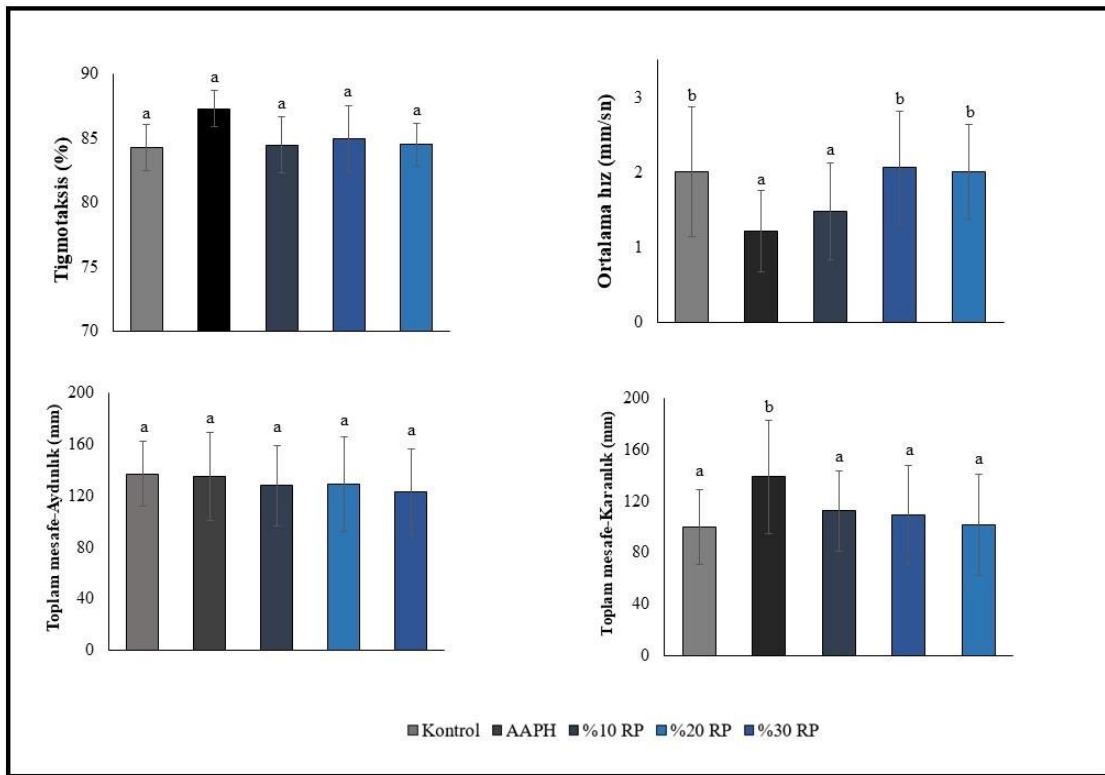


Şekil 4.2.3 Zebra balığı larvalarında ROS birikimi ve hücre ölümü (AO) sinyallerinin değerlendirilmesi: mikroskopik görüntüler ve kalitatif analizler

Antioksidan etkinin değerlendirildiği RP gruplarında ise doz arttıkça hücre ölüm oranının periyodik olarak azaldığı gözlenmiştir.

4.2.4. Lokomotor Aktivite ve Tigmotaksis Davranışı

AAPH uygulaması zebra balığı larvalarında lokomotor aktivite parametrelerinde değişikliklere neden olmuştur. Tigmotaksis oranları incelendiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p > 0.05$). Ortalama hız değerleri AAPH grubunda kontrol grubuna kıyasla azalma göstermiştir. RP uygulanan gruplarda ise ortalama hız değerlerinin kontrol grubuna yakınlığı ve özellikle %20 ve %30 RP gruplarında AAPH'ye bağlı azalmanın baskılandığı belirlenmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. AAPH kaynaklı oksidatif stres koşullarında RP tedavisinin zebra balığı larvalarının yüzme davranışı üzerine etkisi

Aydınlık fazda kat edilen toplam mesafe bakımından gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Buna karşın karanlık fazda kat edilen toplam mesafe AAPH grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artmıştır ($p < 0.05$). RP uygulaması, bu artışı doz bağımlı şekilde azaltmış ve %10, %20 ve %30 RP gruplarında

toplam mesafe değerlerinin kontrol grubuna benzer seviyelere gerilediği tespit edilmiştir.

4.3. Akıllı Biyobozunur Filmlerin Fizikokimyasal, Mekanik ve Yapısal Özellikleri

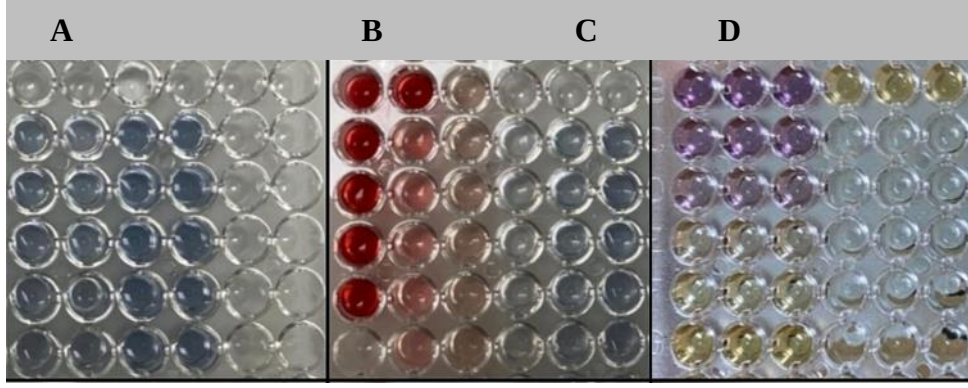
Mevcut çalışmamızda fenolik madde miktarı Folin–Ciocalteu yöntemi ile belirlenmiştir. Yenilebilir filmlere ilave edilen kara kuşburnu ekstresi miktarı arttıkça toplam fenolik içerikte de doğru orantılı bir artış gözlenmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Farklı özüt konsantrasyonlarına sahip jelatin bazlı yenilebilir filmlerin toplam fenolik içerikleri

Grup	Toplam Fenolik Madde ($\mu\text{g GAE/mg}$)
Kontrol	3.49 ± 0.06^d
%4 R	5.67 ± 0.09^c
%8 R	6.75 ± 0.13^b
%12 R	9.90 ± 0.17^a

Not: Kontrol, *Rosa pimpinellifolia* özütü içermeyen jelatin bazlı filmi; %4 R, %8 R ve %12 R ise jelatin bazlı filmlere sırasıyla %4, %8 ve %12 (w/w) oranlarında eklenen *Rosa pimpinellifolia* özütünü içeren film gruplarını ifade etmektedir.

Toplam fenolik madde miktarına ilişkin bulguların ardından filmlerin antioksidan kapasiteleri de değerlendirilmiştir. Bu kapsamda üç farklı özüt konsantrasyonuna sahip filmler ile kontrol filmi karşılaştırılmış; ayrıca sentetik antioksidanlar olan BHA, BHT ve E vitamini de referans olarak analizlere dâhil edilmiştir (Şeki 4.6). Filmlerin ve referansların antioksidan kapasiteleri ABTS ve DPPH radikal süpürme testleri kullanılarak ölçülmüş, elde edilen bulgular Tablo 4.3'te sunulmuştur.



Şekil 4.3. ABTS (A), Toplam monomerik antosiyanin (B), Toplam fenolik içerik (C) ve DPPH (D) analizlerine ait temsili mikropilaka görüntüleri. Harfler, ilgili analizleri ifade etmektedir.

Tablo 4.3. ABTS ve DPPH radikal süpürme aktiviteleri

Grup	ABTS (%)	DPPH (%)
Kontrol	35.08 ± 2.47 ^c	32.19 ± 2.01 ^e
%4 R	56.63 ± 1.67 ^d	48.98 ± 1.39 ^d
%8 R	73.38 ± 3.56 ^c	72.35 ± 0.78 ^b
%12 R	87.71 ± 4.09 ^b	80.19 ± 1.02 ^a
BHT	70.08 ± 3.22 ^c	58.99 ± 1.43 ^c
BHA	97.95 ± 3.56 ^a	59.15 ± 2.11 ^c
E Vitamini	85.22 ± 3.24 ^a	56.46 ± 3.28 ^c

BHA: Bütillenmiş hidroksianisol; BHT: Bütillenmiş hidroksitoluen; E Vitamini: α-tokoferol. Kontrol, *Rosa pimpinellifolia* özütü içermeyen jelatin bazlı filmi; %4 R, %8 R ve %12 R ise jelatin bazlı filmlere sırasıyla %4, %8 ve %12 (w/w) oranlarında eklenen *Rosa pimpinellifolia* özütünü içeren film gruplarını ifade etmektedir.

ABTS testine göre, %12 R (%87.71 ± 4.09) ve E vitamini (%85.22 ± 3.24) en yüksek antioksidan aktiviteye sahip gruplar olarak belirlenmiştir. BHA (%97.95 ± 3.56) ise pozitif kontrol olarak en yüksek değeri göstermiştir. %8 R (%73.38 ± 3.56), BHT

(%70.08 $\pm$ 3.22) ve %4 R (%56.63 $\pm$ 1.67) grupları orta düzeyde antioksidan aktivite sergilemiştir, kontrol grubu ise en düşük aktiviteye sahip grup olarak belirlenmiştir (%35.08 $\pm$ 2.47).

DPPH testinde, %12 R (%80.19 $\pm$ 1.02) en yüksek radikal giderme kapasitesine sahip grup olarak saptanmıştır. %8 R (%72.35 $\pm$ 0.78) grubunun, BHT (%58.99 $\pm$ 1.43), BHA (%59.15 $\pm$ 2.11) ve E vitamini (%56.46 $\pm$ 3.28) gruplarına kıyasla daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir. %4 R (%48.98 $\pm$ 1.39) ve kontrol (%32.19 $\pm$ 2.01) grupları ise en düşük DPPH aktivitesini göstermiştir.

Yenilebilir filmlerin kalınlığı ekstre miktarı arttıkça doğrusal olarak artış göstermiştir. En yüksek film kalınlığı %8 R (0.174 $\pm$ 0.010^b mm) ve %12 R (0.172 $\pm$ 0.007^b mm) gruplarında ölçülmüş olup, kontrol grubuna (0.165 $\pm$ 0.006^a mm) göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p <0.05) (Tablo 4.3.3).

Nem içeriği, kontrol grubunda %18.00 $\pm$ 2.12 iken, ekstre içeren filmlerde daha düşük değerler elde edilmiştir. %4 R (%15.65 $\pm$ 1.10), %8 R (%15.93 $\pm$ 1.69) ve %12 R (%15.21 $\pm$ 0.93) gruplarında nem içeriği benzer olup, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır (p <0.05) (Tablo 4.4).

Suda çözünürlük (WS), ekstre ilavesiyle birlikte azalma eğilimi göstermiştir. Kontrol grubunda 47.74 $\pm$ 0.61c % iken, %4 R grubunda 46.17 $\pm$ 0.53ab % değerine düşmüş ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p <0.05). %8 R (44.60 $\pm$ 1.93^a %) ve %12 R (44.10 $\pm$ 0.91^a %) gruplarında çözünürlük değerleri kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuş, %8 ve %12 R grupları arasında ise anlamlı bir farklılık belirlenmiştir (Tablo 4.4).

Su buharı geçirgenliği değerleri incelendiğinde, ekstre oranı arttıkça geçirgenliğin de yükseldiği belirlenmiştir. Kontrol grubunda 6.05 $\pm$ 0.07^a olan WVP değeri, %4 R

grubunda $6.34 \pm 0.13b$, %8 R grubunda $6.45 \pm 0.08b$ ve %12 R grubunda $6.78 \pm 0.06c$ olarak ölçülmüş, bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo 4.4).

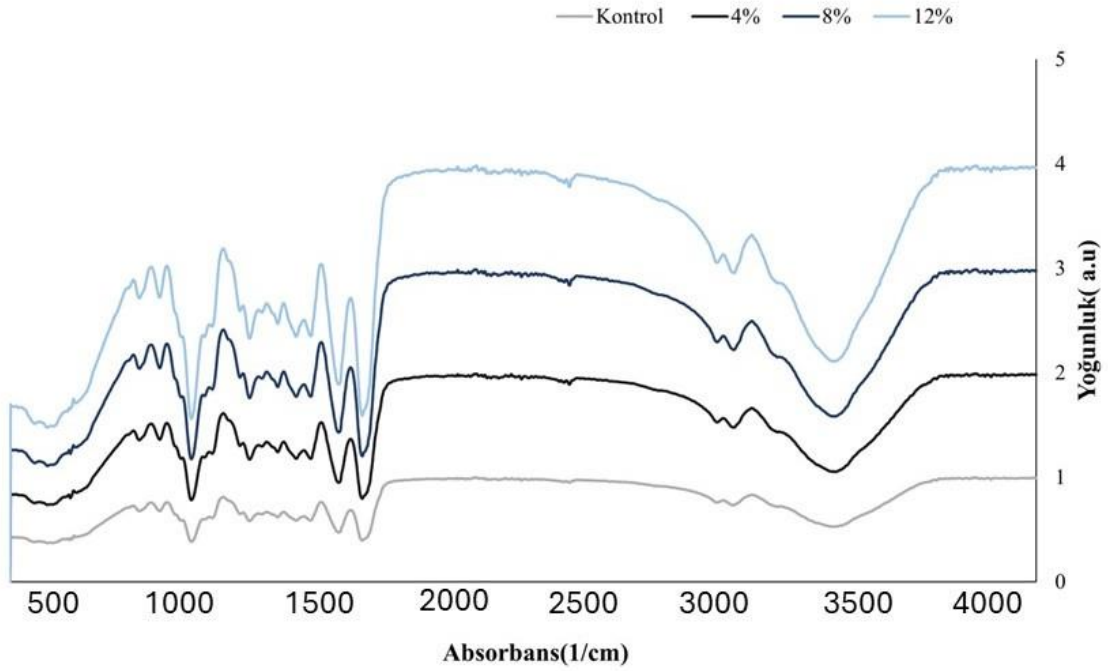
Çekme dayanımı (TS) değerleri incelendiğinde kontrol grubunda $0.171 \pm 0.015a$ MPa ölçülmüştür. %4 R grubunda elde edilen TS değeri ($0.176 \pm 0.015a$ MPa) kontrolle aynı istatistiksel grupta yer almakta olup anlamlı bir farklılık göstermemektedir ($p > 0.05$). Buna karşılık, %8 R ($0.130 \pm 0.017b$ MPa) ve %12 R ($0.131 \pm 0.011b$ MPa) gruplarında TS değerleri kontrol grubuna kıyasla belirgin biçimde düşmüş ve istatistiksel olarak daha düşük bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo 4.4).

Tablo 4.3. Farklı konsantrasyonlarda ekstrakt içeren jelatin bazlı filmlerinin kalınlığı, nem içeriği (MC), suda çözünürlüğü (WS), su buharı geçirgenliği (WVP) ve tensil gücü (TS)

Gruplar	Kalınlık(mm)	MC (%)	WS (%)	WVP	TS (MPa)
Kontrol	0.165 ± 0.006^a	18.00 ± 2.12^a	47.74 ± 0.61^c	6.05 ± 0.07^a	0.171 ± 0.015^a
%4 R	0.167 ± 0.006^a	15.65 ± 1.10^b	46.17 ± 0.53^{ab}	6.34 ± 0.13^b	0.176 ± 0.015^a
%8 R	0.174 ± 0.010^b	15.93 ± 1.69^b	44.60 ± 1.93^a	6.45 ± 0.08^b	0.130 ± 0.017^b
%12 R	0.172 ± 0.007^b	15.21 ± 0.93^b	44.10 ± 0.91^a	6.78 ± 0.06^c	0.131 ± 0.011^b

Not: Kontrol, *Rosa pimpinellifolia* özütü içermeyen jelatin bazlı filmi; %4 R, %8 R ve %12 R ise jelatin bazlı filmlere sırasıyla %4, %8 ve %12 (w/w) oranlarında eklenen *Rosa pimpinellifolia* özütünü içeren film gruplarını ifade etmektedir.

Antosiyanin eklenmiş jelatin bazlı yenilebilir filmlerin fonksiyonel grup bileşimlerini ve kimyasal yapısındaki değişimleri belirlemek amacıyla Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen spektrum sonuçları Şekil 4.7’de sunulmuştur.



Şekil 4.3. Yenilebilir film örneklerine ait FTIR spektrumları

Analiz sonuçlarına göre tüm örneklerde 500–4000 cm^{-1} aralığında karakteristik bantlar tespit edilmiştir. Kontrol filminde gözlenen piklerin şiddeti düşük ve daha az belirgin iken, antosiyanin oranının artmasıyla birlikte spektrumda hem yeni pik oluşumları hem de mevcut piklerin yoğunluğunda artış saptanmıştır. Bu durum, antosiyaninlerin jelatin matrisi ile etkileşerek kimyasal yapıyı değiştirdiğini göstermektedir.

FTIR spektrumunda $\sim 3285\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$ aralığında gözlenen geniş ve güçlü pik, –OH gruplarına ait hidrojen bağlarının varlığını ve antosiyanin ile jelatin arasındaki hidrojen bağı etkileşimlerinin güçlendiğini göstermektedir. $\sim 2924\text{--}2940\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki zayıf pikler alifatik C–H gerilme titreşimlerine, $\sim 1630\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ civarındaki güçlü pik ise protein yapısındaki Amid I (C=O gerilmesi) bandına karşılık gelmektedir. Bununla birlikte, $\sim 1530\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$ bandı Amid II (N–H bükülmesi ve C–N

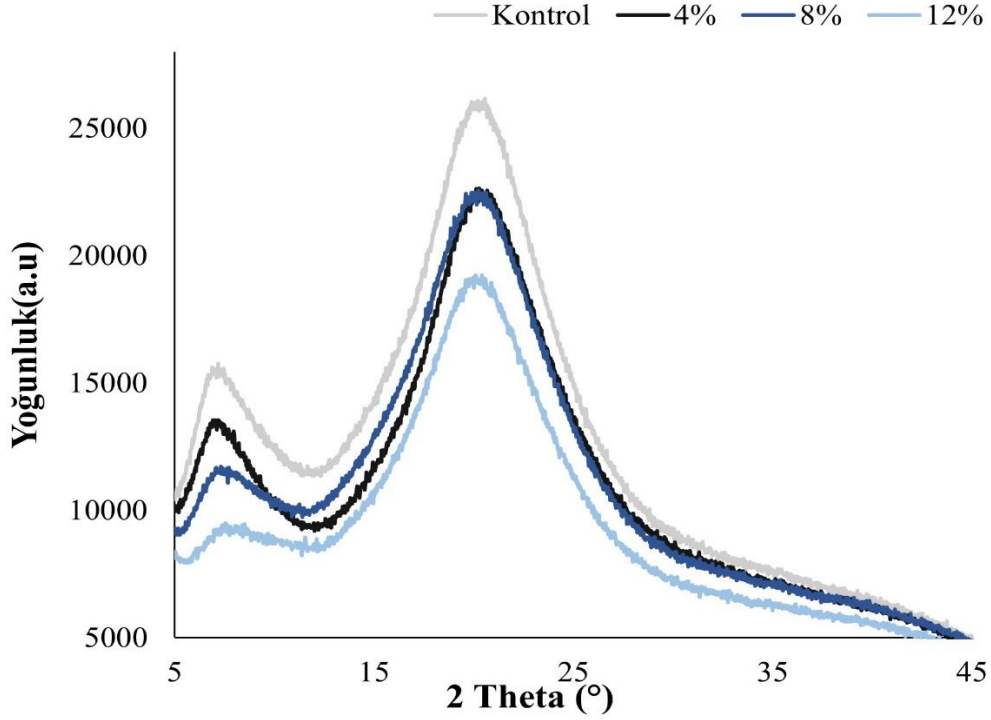
gerilmesi) titreşimlerini temsil ederken, bu bölgede antosiyanin konsantrasyonunun artışı ile pik yoğunluğunda artış gözlenmiştir.

Ayrıca $\sim 1230\text{--}1245\text{ cm}^{-1}$ civarında belirlenen pik Amid III (C–N ve N–H titreşimleri) ile ilişkilendirilmiştir. Bu bandın antosiyanin ilavesiyle daha belirgin hâle gelmesi, polifenolik bileşiklerin jelatin zincirleriyle etkileşimini ve moleküller arası bağ oluşumunu desteklemektedir.

Film formülasyonunda plastikleştirici olarak kullanılan gliserolün hidroksil gruplarına atfedilen yaklaşık 1040 cm^{-1} bölgesinde keskin bir pik gözlemlenmiştir. Bu pik, gliserolün film matrisine entegre olduğunu ve hidroksil gruplarının film yapısında aktif rol oynadığını doğrulamaktadır. Bunun yanında $\sim 1400\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$ aralığında görülen pikler –CH bükülme titreşimlerini temsil etmekte ve film yapısının esnekliğine katkı sağlamaktadır.

Genel olarak FTIR analizleri, antosiyanin eklenmesinin jelatin bazlı filmlerin kimyasal yapısında önemli değişikliklere neden olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle –OH, C=O ve C–N gruplarına ait bantların şiddet ve konumlarındaki değişimler, jelatin ile antosiyanin arasında yeni hidrojen bağları ve etkileşimlerin oluştuğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, antosiyanin ilavesinin film yapısında moleküler düzeyde bağ oluşumunu artırarak yapısal stabilite ve fonksiyonel özellikleri geliştirdiğini desteklemektedir.

Şekil 4.8’de antosiyanin özütü ilavesiyle farklı oranlarda hazırlanan jelatin bazlı yenilebilir film örneklerinin XRD desenleri gösterilmiştir. Tüm film örneklerinde yaklaşık $2\theta = 20^\circ$ civarında geniş bantlı bir tepe gözlenmiş olup, bu durum jelatin yapısının yarı amorf karakterini temsil etmektedir. Antosiyanin özütü ilavesiyle bu tepenin konumunda belirgin bir değişim gözlenmemiş, ancak pik şiddetinde azalma meydana gelmiştir.



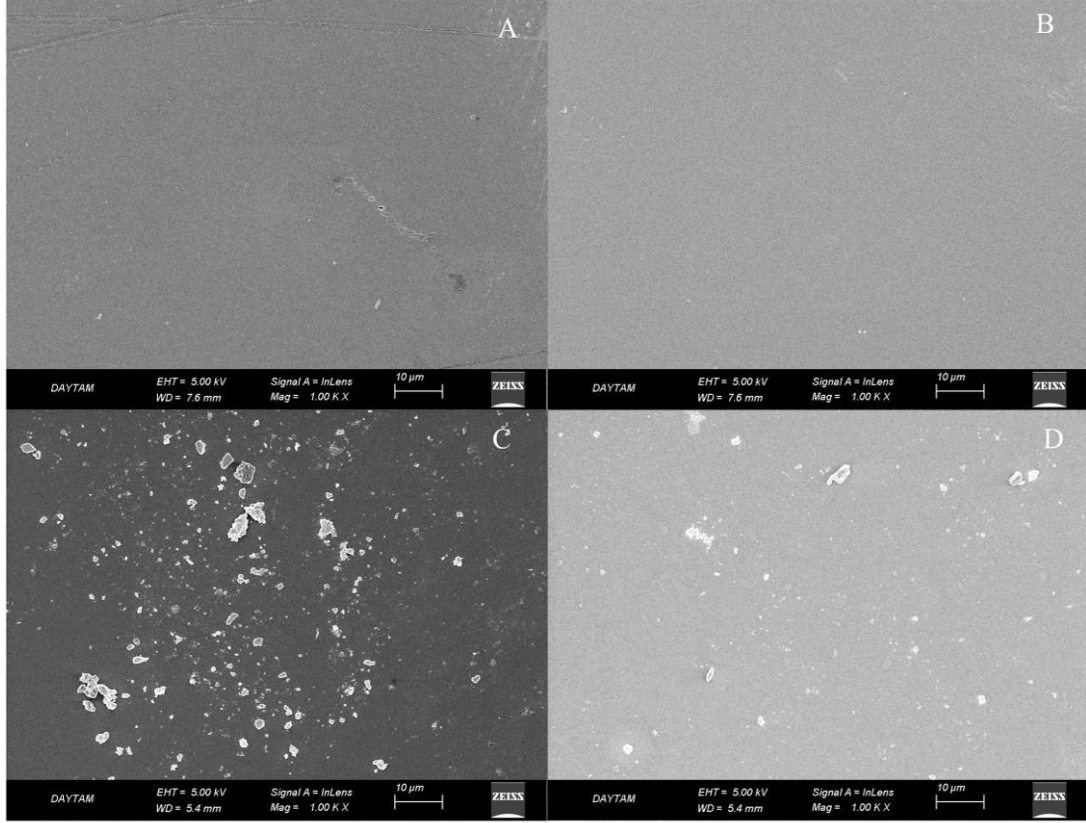
Şekil 4.3 Yenilebilir film örneklerine ait XRD spektrumları

Kara kuşburnundan ekstre edilmiş antosiyenin içeren jelatin bazlı filmlerin yüzey morfolojisi Şekil 4.3.3'te gösterilmiştir. Şekil 4.9 (A)'da görüldüğü gibi, kontrol grubuna ait film yüzeyi düzgün, kompakt ve düzenli bir yapı sergilemiştir.

%4 oranında antosiyenin içeren film (Şekil 4.9 (B)), kontrol grubuna yakın homojen ve pürüzsüz bir yüzey yapısı göstermiştir. Bu grupta yüzeyde yalnızca hafif düzeyde pürüzlülük gözlenmiş, genel yapı bütünlüğü korunmuştur. Bu durum, düşük miktarda antosiyenin ilavesinin jelatin matriksinde belirgin bir bozulmaya yol açmadığını göstermektedir.

%8 oranında antosiyenin içeren film (Şekil 4.9 (C)) yüzeyde daha belirgin düzensizlikler, küçük partikül birikimleri ve mikro düzeyde çatlak oluşumlarıyla karakterize edilmiştir. %12 antosiyenin içeren film (Şekil 4.9 (D)) ise en belirgin yüzey pürüzlülüğünü göstermiştir; yüzeyde yoğun tanecik birikimi, ayrışmalar ve mikro-çatlak yapılar izlenmiştir.

Genel olarak, düşük oranda antosiyanin ilavesi (%4) film yapısında belirgin bir bozulma oluşturmamış ve yüzey morfolojisi kontrol grubuna yakın kalmıştır. Ancak antosiyanin oranının artmasıyla birlikte yüzey homojenliğinde azalma ve düzensizliklerde artış gözlenmiştir.



Şekil 4.3. SEM görüntüleri: Kara kuşburnundan ekstre edilmiş antosiyanin içeren jelatin bazlı filmlerin yüzey morfolojisi (1.00 KX büyütme, ölçek çubuğu = 10 µm)

A: Kontrol (antosiyaninsiz jelatin film), B: %4 antosiyanin içeren film, C: %8 antosiyanin içeren film, D: %12 antosiyanin içeren film

Yapılan mikrobiyolojik analizler sonucunda, hazırlanan aktif filmlerin test edilen bakteriyel suşlar üzerinde herhangi bir inhibisyon meydana getirmediği, buna karşın *C. albicans* üzerinde 14 mm çapında bir inhibisyon zonu oluşturduğu saptanmıştır. (Tablo 4.5).

Tablo 4.3. Film örneklerinin ve pozitif kontrollerin inhibisyon zon çapları (mm)

Mikroorganizma	Saf Jelatin Film (Negatif Kontrol)	Kuşburnu Yüklü Film	Pozitif Kontrol (Antibiyotik/Antifungal)
<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	0	0	31 ± 0.5 (Gentamisin)
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	0	0	33 ± 0.4 (Gentamisin)
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	0	0	24 ± 0.8 (Gentamisin)
<i>C. albicans</i> (ATCC 60913)	0	14 ± 0.7	31 ± 0.5 (Flukonazol)

4.4. Akıllı Ambalajın Gıda Uygulamalarındaki Performansı

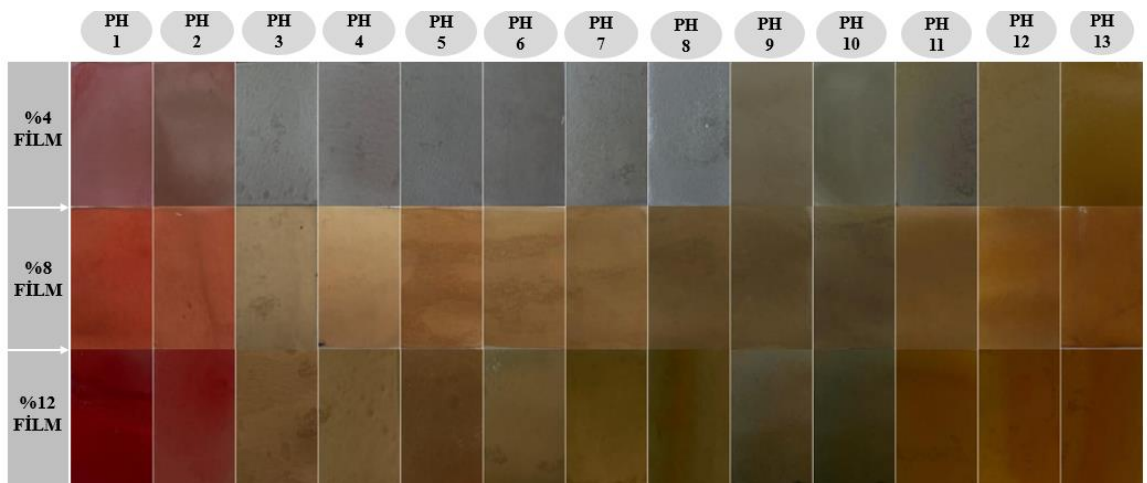
4.4.1. pH İndikatör Özelliği ve Duyarlılık

Yenilebilir filmlerin görünümü, renk parametreleri (L , a , b^*) ve ışık geçirgenliği ile ilişkilidir. Tablo 4.6’da gösterildiği gibi, film oluşturuç çözeltiye farklı miktarlarda kara kuşburnu antosiyanin özütü eklenmesi, a^* ve b^* değerlerini artırmış ve filmlerin opaklığını yükseltmiştir. Bu değişim, bitkilerde kırmızı, mor ve mavi renklerden sorumlu antosiyanin miktarındaki artışla doğru orantılıdır. Kontrol filmine kıyasla, özüt ilavesi yapılan filmlerde L değeri anlamlı şekilde azalmış ve gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermiştir ($p < 0.05$).

Tablo 4.6. Farklı konsantrasyon *R. Pimpinellifolia* içeren jelatin bazlı yenilebilir filmlerin renk parametreleri (L^* , a^* , b^*) ve opaklık (A_{600}/mm) değerleri

Grup	L^*	a^*	b^*	Opaklık (A_{600}/mm)	
Kontrol	90.96 ± 0.13^a	-1.04 ± 0.04^d	7.91 ± 0.40^d	0.699 ± 0.085^d	
%4 R	83.59 ± 1.50^b	3.08 ± 0.06^c	14.51 ± 0.03^c	1.003 ± 0.075^c	
%8 R	73.82 ± 0.08^c	6.79 ± 0.20^b	22.03 ± 0.31^b	1.200 ± 0.079^b	
%12 R	66.65 ± 0.64^d	11.94 ± 0.90^a	28.39 ± 3.08^a	1.433 ± 0.080^a	

Antosiyanin içeriğine bağlı olarak gözlemlenen bu renk değişimlerinin yanı sıra, farklı pH koşullarında hem özüt hem de filmlerin renk değişimi de ölçülmüş ve değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme, antosiyaninlerin pH'a duyarlı renk özelliklerini ve filmlerin görsel stabilitesini daha iyi anlamamıza olanak sağlamaktadır.



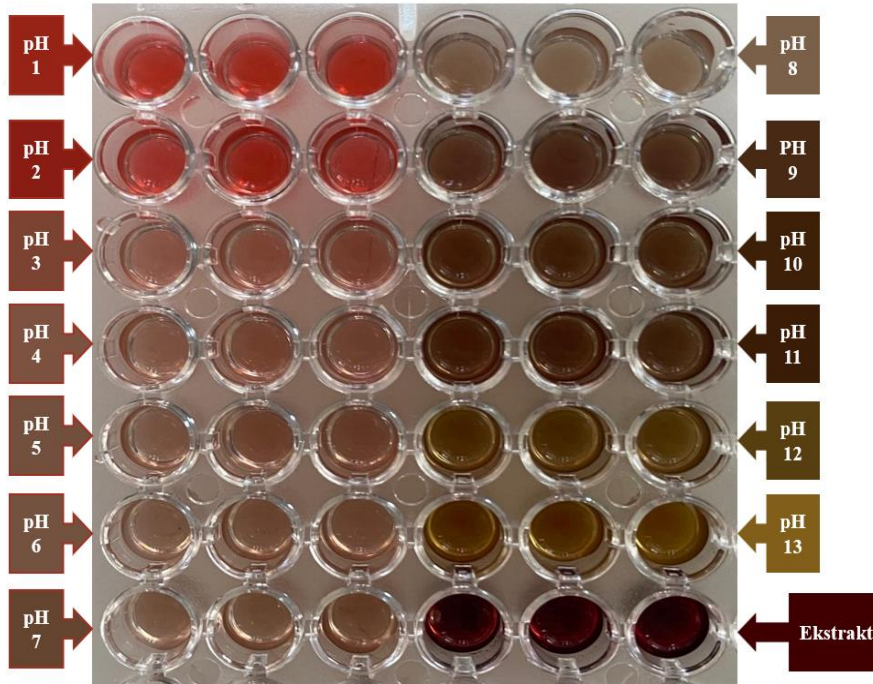
Şekil 4.10. %4, %8 ve %12 oranlarında hazırlanan yenilebilir filmlerin pH 1–13 aralığında çözeltilere batırılmasıyla gözlenen renk değişimleri

Hazırlanan %4, %8 ve %12 oranlarındaki yenilebilir filmler pH 1–13 aralığında farklı çözeltilere batırılarak 10 dakika bekletilip renk değişimleri resmedilip Şekil 4.10’da sunulmuştur. Görsel olarak kaydedilen renk değişimleri aynı zamanda renk ölçüm cihazı ile L*, a* ve b* parametreleri üzerinden değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, düşük pH değerlerinde filmlerin kırmızı tonlarına yöneldiği (a* değerinde artış), bazık koşullarda ise sarı-kahverengi tonların belirginleştiği (b* değerinde artış) gözlemlenmiştir. Özellikle %12 oranında hazırlanan filmlerde pH değişimine bağlı olarak en belirgin renk farklılıkları kaydedilmiş, bu durum yüksek antosiyanin konsantrasyonunun renk dönüşümünü daha net hale getirdiğini göstermiştir (Tablo 4.7).

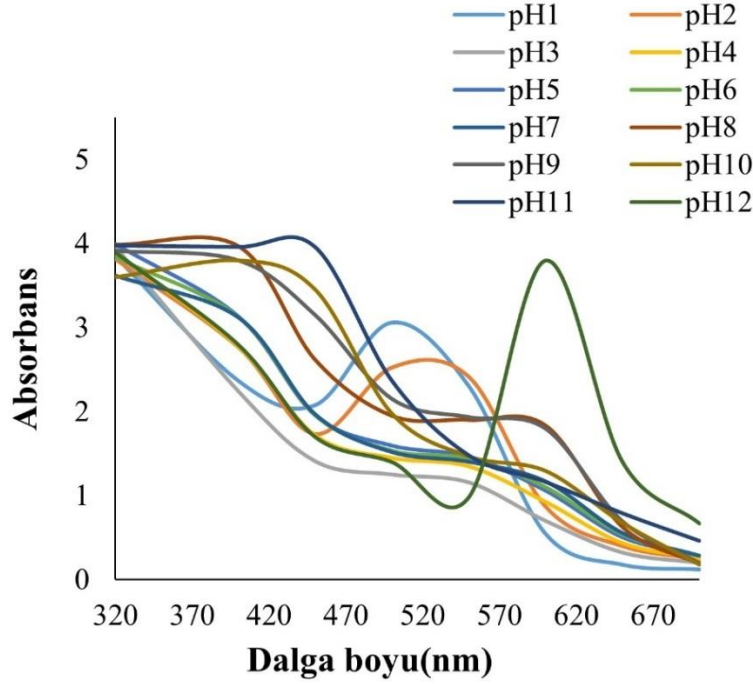
Tablo 4.7. Farklı konsantrasyonlardaki (%4, %8 ve %12) yenilebilir filmlerin pH 1–13 aralığında renk değişim parametreleri (L, a*, b*)

	4%			8%			12%		
	L	a*	b*	L	a*	b*	L	a*	b*
Film	83.02	3.14	14.51	73.9	6.53	21.87	67.33	10.69	24.86
pH1	77.92	13.34	12.43	59.33	27.78	16.12	48.13	37.82	16.1
pH2	73.51	8.15	16.74	73.19	11.25	19.46	58.34	14.49	20.14
pH3	81	5.53	14.2	65.98	11.11	19.78	57.26	13.77	20.75
pH4	78.8	5.25	14.79	61.85	13.33	22.66	60.21	11.65	21.3
pH5	76.24	5.05	15.44	62.09	9.76	21.07	61.27	12.47	19.95
pH6	75.09	5.01	16.85	66.75	9.62	20.53	57.06	10.07	21.95
pH7	74.91	4.8	16.9	62.24	7.92	18.6	58.02	7.38	19.91
pH8	71.19	3	16.23	67.84	6.41	23.19	52.98	7.77	22.12
pH9	74.04	2.69	16.86	62.98	5.13	20.73	51.18	7.81	23.11
pH10	74.16	3.36	19.63	64.16	5.71	23.67	49.58	9.4	24.17
pH11	73.3	5.67	23.97	59.14	11.01	29.62	51.25	17.03	29.09
pH12	67.28	11.68	36.57	60.74	15.23	35.98	47.81	22.45	32.85
pH13	67.89	13	44.13	45.25	22.66	28.09	45.27	23.27	25.93

Ekstraksiyonla elde edilen özüt, pH 1–13 aralığındaki tampon çözeltilerle 1:7 oranında karıştırılmış ve bu karışımların oluşturduğu renk değişimleri Şekil 4.11’de görsel olarak sunulmuştur. Hazırlanan örneklerin spektrofotometrik analizleri 300–700 nm dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiş olup, her pH çözeltisine ait absorbans spektrumları Şekil 4.12’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, düşük pH değerlerinde (pH 1–4) maksimum absorpsiyon 320–400 nm aralığında yoğunlaşırken, pH 8–11 aralığında absorbans değerlerinde belirgin bir artış gözlenmiştir. Yüksek pH (>11) koşullarında ise özellikle 600 nm civarında yeni bir pik oluşumu dikkat çekmiş, bu durum antosiyanin yapısındaki pH artışına bağlı yapısal dönüşümle ilişkilendirilmiştir. Bu değişimler, özütün pH’ya duyarlı renk indikatörü olarak potansiyelini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.11. Farklı pH değerlerinde hazırlanan özüt çözeltilerinin 300–700 nm aralığındaki absorbans spektrumları



Şekil 4.12. Ekstraksiyonla elde edilen özütün pH 1–13 aralığında hazırlanan çözeltilerle karıştırılması sonucu oluşan renk değişimleri

4.4.2. Balık Eti Örneklerinde Tazelik Göstergesi Uygulamasının Fiziksel, Kimyasal ve Mikrobiyolojik Kalite Parametreleri Üzerine Etkisi

Balık eti örneklerinde depolama süresi boyunca pH, renk parametreleri (L^* , a^* , b^*), toplam renk farkı (ΔE) ve toplam canlı bakteri sayısı (CFU) arasındaki ilişkiler Spearman korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.4.2).

Yapılan analiz sonucunda, CFU ile pH arasında çok güçlü ve pozitif yönlü bir korelasyon tespit edilmiştir ($r = 0.828$; $p < 0.01$). Bu bulgu, depolama süresi ilerledikçe mikrobiyal yük artışının pH artışı ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir.

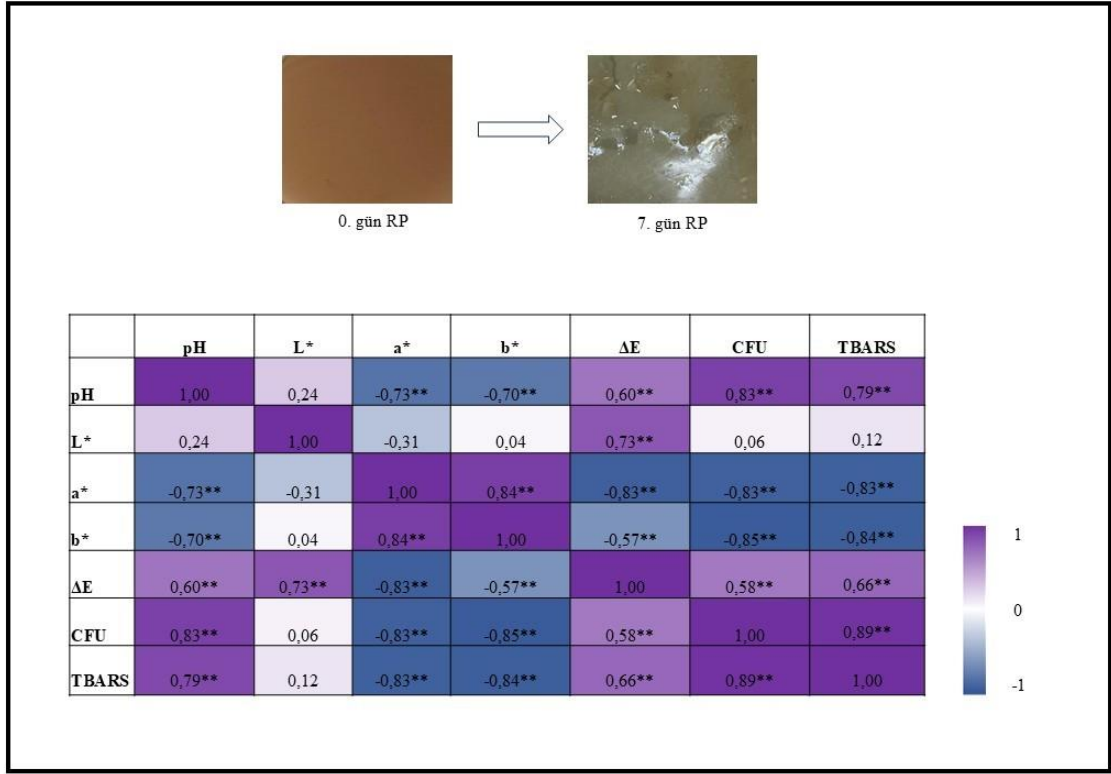
Ayrıca, CFU ile toplam renk farkı (ΔE) arasında da pozitif ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlenmiştir ($r = 0.583$; $p < 0.01$). Bu sonuç, balık etinde meydana gelen mikrobiyal bozulmanın renk değişimi ile yakından ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır.

Renk parametreleri incelendiğinde, CFU ile a^* ve b^* değerleri arasında güçlü ve negatif yönlü korelasyonlar** olduğu görülmüştür (sırasıyla $r = -0.83$ ve $r = -0.85$). Bu durum, depolama süresince balık etinin renk doygunluğunun ve sarılık/kızılılık tonlarının bozulma ile azaldığını göstermektedir. Öte yandan, CFU ile L^* değeri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($r = 0.06$).

pH ile renk parametreleri arasındaki ilişkiler değerlendirildiğinde, pH ile a^* ve b^* değerleri arasında güçlü negatif korelasyonlar ($r = -0.73$ ve $r = -0.70$), pH ile ΔE arasında ise pozitif yönlü orta-üst düzeyde bir ilişki ($r = 0.60$) olduğu belirlenmiştir.

TBARS değerleri ile pH arasında pozitif ve istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmıştır ($r = 0.79$, $p < 0.01$). Benzer şekilde, TBARS ile CFU arasında güçlü pozitif korelasyon belirlenmiştir ($r = 0.89$, $p < 0.01$). Buna karşılık, TBARS değerleri ile a^* ve b^* renk parametreleri arasında yüksek düzeyde negatif ve anlamlı korelasyonlar tespit edilmiştir (sırasıyla $r = -0.83$ ve $r = -0.84$; $p < 0.01$). TBARS ile L^* değeri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($r = 0.12$, $p > 0.05$). Ayrıca, TBARS ile toplam renk farkı (ΔE) arasında orta düzeyde pozitif ve anlamlı bir korelasyon belirlenmiştir ($r = 0.66$, $p < 0.01$).

Elde edilen bu bulgular, balık etinde mikrobiyal bozulmanın pH artışı ve renk değişimi ile eş zamanlı ilerlediğini ve renk değişiminin bozulmanın görsel ve ölçülebilir bir indikatörü olarak kullanılabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.13. Balıketi örneklerinde depolama süresi boyunca pH, renk parametreleri (L^* , a^* , b^*), toplam renk farkı (ΔE) ve toplam canlı bakteri sayısı (CFU) arasındaki Spearman korelasyon katsayıları. Renk skalası korelasyon katsayısının (r) yönünü ve şiddetini göstermektedir. ** $p < 0,01$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır.

5. TARTIŞMA

Günümüzde petrol türevi plastikler, gıda endüstrisinde en çok kullanılan ambalaj materyalleridir. Bunun sonucunda ortaya çıkan çevresel riskler ise yeni ve sürdürülebilir ambalaj materyallerine yönelimi hızlandırmıştır. Bu doğrultuda, çalışmada RP kullanılarak geliştirilen jelatin bazlı yenilebilir filmler hem çevre dostu özellikleri hem de doğal antioksidan kapasitesiyle konvansiyonel plastiklere karşı umut vadeden alternatifler sunmaktadır.

Araştırmamızda, RP'nın endemik bir tür olarak endüstriye kazandırılması hedeflenmiştir. Bitkinin halk hekimliğinde yaraların iyileşmesi, iltihaplanmanın azalması ve genel olarak “koruyucu ve terapötik” özellikleri için kullanılması, bu çalışmadaki bilimsel değerlendirmeler için önemli referans noktası oluşturmuştur.

Bitkisel kaynaklardan elde edilen antosiyanin miktarlarının kullanılan bitki türü, çözücü farklılığı, sıcaklık, ekstraksiyon süresi ve uygulanan teknik gibi birçok parametreye bağlı olarak geniş bir aralıkta değişebildiği bilinmektedir. Örneğin, *E. amoenum* özütünün %70 etanol ile ekstraksiyonu sonucunda TMAC değeri 367.48 ± 2.13 mg CGE/L olarak rapor edilmiştir (Moghadam ve ark., 2021). Kara aronya meyvesi posasında ultrason destekli ekstraksiyon (20 kHz, 14 μ m, 600 s) ve %50 etanol-su karışımı kullanılmasıyla 631 ± 13 mg CGE/L gibi yüksek TMAC düzeylerine ulaşıldığı bildirilmektedir (Halász & Csóka, 2018). Buna karşılık, kelebek bezelyesi kurutulmuş taç yapraklarının %40 metanolde 60 °C'de 12 saat ekstraksiyonu sonucunda TMAC değerinin 93.90 ± 10.85 mg/100 g düzeyinde olduğu rapor edilmiştir (Wang ve ark., 2023). Çalışmamızda ise RP özütünün %50 etanol ile konvansiyonel ekstraksiyon koşullarında elde edilen TMAC değeri 209.36 ± 8.29 mg CGE/L olarak belirlenmiştir. Literatürdeki değerler arasındaki bu geniş varyasyon; çözücü polaritesi, ekstraksiyon sıcaklığı ve süresi, ultrason gibi yardımcı tekniklerin kullanımı, bitkisel dokuların fenolik

yoğunluğu ve hücre matriksinin geçirgenliği gibi faktörlerden etkilemesinden kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla RP özütünün TMAC düzeyi, hem kullanılan bitki materyalinin kimyasal bileşimi hem de uygulanan ekstraksiyon koşullarının doğal bir sonucu olduğu değerlendirilmektedir.

Analiz sonuçları, liyofilize edilmiş Kara Kuşburnu meyvelerinin biyokimyasal açıdan oldukça zengin ve türüne özgü karakteristik bir fenolik profile sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Literatürde *Rosa* türleri için genellikle farklı organik asitlerin varlığı rapor edilse de bu çalışmada elde edilen 256.16 µg/g seviyesindeki fumarik asit konsantrasyonu literatür verileriyle kıyaslandığında oldukça dikkat çekicidir. Kara kuşburnunun farklı kısımlarının biyoaktivitesini inceleyen güncel çalışmalarda, meyvenin fitokimyasal içeriğinin bölgeye ve olgunluk aşamasına göre büyük değişim gösterebileceği vurgulanmaktadır (Findik ve ark., 2024). Meyvenin temel organik asit yapısını tamamlayan kinik asit ise 2.01 µg/g değeri ile türün karakteristik yapısını desteklemektedir. Kuşburnu türlerinde olgunluk dönemlerinin besinsel bileşenler üzerindeki etkisini inceleyen çalışmalar, hasat zamanının ve işleme yöntemlerinin bu asitlerin stabilitesi üzerinde belirleyici olduğunu göstermektedir (Rastilantie ve ark., 2010).

Fenolik asitler ve flavonoidler açısından bakıldığında, ferulik asit (6,07 µg/g) ve gallik asit (3.15 µg/g) varlığı, *Rosa pimpinellifolia*'nın bilinen güçlü antioksidan profilini pekiştirmektedir. Kara kuşburnu meyvelerinin kimyasal kompozisyonunu inceleyen temel araştırmalar, gallik asidin bu türün antioksidan kapasitesine en yüksek katkıyı sağlayan ana bileşenlerden biri olduğunu belirtmektedir (Kumar ve ark., 2009). Ayrıca, bu meyveden üretilen yan ürünlerde de yüksek fenolik madde miktarının korunduğu ve sağlık üzerinde olumlu etkileri olduğu rapor edilmiştir (Pashazadeh ve ark., 2021). Çalışmamızda tespit edilen apigenin (2.33 µg/g) ve taksifolin (2.03 µg/g) seviyeleri,

meyvenin fonksiyonel gıda potansiyelini desteklemektedir. Literatürde farklı kuşburnu türlerinin kimyasal profilleri kıyaslandığında, *R. pimpinellifolia*'nın gallik asit gibi bileşenlerce oldukça zengin olduğu ve yüksek toplam fenolik içeriğe sahip olduğu doğrulanmaktadır(Güven ve ark., 2022).

Meyveye karakteristik "kara" rengini veren antosiyanin profili, *Rosa pimpinellifolia*'nın yaygın kırmızı kuşburnu türlerinden taksonomik olarak ayrılmasında en önemli bilimsel kriterdir. Çalışmada saptanan peonidin-3-O-glukozit (0.20 µg/g) ve siyanidin-3-O-glukozit (0.14 µg/g) varlığı, liyofilize örneğin türüne özgü antosiyanin belirteçlerini başarıyla koruduğunu kanıtlamaktadır. Rosa türlerinin fenolik parmak izlerinin çıkarılmasında bu tür spesifik bileşiklerin tanımlanması, tür teşhisi ve kalite kontrolü açısından kritik öneme sahiptir(Pashazadeh ve ark., 2021). Bitkisel ikincil metabolitlerin biyosentezi üzerine yapılan güncel incelemeler, antosiyaninlerin hem meyvenin görsel kalitesi hem de biyolojik aktivitesi için elzem olduğunu göstermektedir (Guerriero ve ark., 2024). Sonuç olarak elde edilen zengin profil, incelenen örneğin literatürdeki diğer yabani kuşburnu türlerinden (Yang ve ark., 2020)hem antosiyanin çeşitliliği hem de baskın organik asit içeriği ile ayrıştığını göstermektedir.

AAPH, sulu ortamlarda parçalanarak yüksek miktarda reaktif oksijen türü (ROS) oluşturan bir azo bileşiği olup, lipid peroksidasyonunu tetikleyerek oksidatif hasara neden olmaktadır. Bu özelliği nedeniyle AAPH, fenolik bileşiklerin antioksidan etkilerinin değerlendirilmesinde oksidatif stres oluşturunca ajan olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda AAPH'nin zebra balığı embriyo modelinde oksidatif stresi güvenilir şekilde indüklediği ve bu modelin antioksidan bileşiklerin biyolojik etkilerinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanıldığı bildirilmektedir (Kang ve ark., 2013a; Kim ve ark., 2014a, 2014b).

Bizim çalışmamızda, AAPH zebra balığı embriyolarında oksidatif strese bağlı

gelişimsel toksisite oluştururken, RP uygulaması bu toksik etkiyi belirgin şekilde azaltmıştır; bu durum RP'nin AAPH kaynaklı oksidatif hasara karşı koruyucu etki gösterdiğini düşündürmektedir. Anomali oranının kontrol grubunda %0.7 iken AAPH grubunda %28'e yükselmesi, AAPH'nin gelişimsel bozuklukları yaklaşık 40 kat artırdığını ortaya koyarken, %30 RP uygulamasında bu oranın %2'ye düşmesi RP'nin toksisiteyi büyük ölçüde iyileştirdiğini göstermektedir. Buna paralel olarak, 72 hpf'de yumurtadan çıkış oranının AAPH grubunda %82.23'e gerilemesine karşın, %20 ve %30 RP gruplarında bu oranın sırasıyla %95.45 ve %95.41'e yükselmesi, RP'nin AAPH kaynaklı gelişimsel baskıyı önemli ölçüde hafiflettiğini desteklemektedir. Kuluçkadaki bu gecikme, bazı yumurtalarda gözlemlenen embriyoların koryonu kıramamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Ünal ve ark., 2023).

Yapılan bir çalışmada, AAPH'nin zebra balığı embriyolarında oksidatif stres oluşturarak hayatta kalma oranını azalttığı, embriyonik ve yumurta kesesi dokularında anormal büyümelere yol açtığı ve yumurtadan çıkışı geciktirdiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada, Phellodendrin uygulamasının AAPH'ye bağlı bu olumsuz gelişimsel etkileri belirgin şekilde hafiflettiği gösterilmiştir (Li ve ark., 2016).

Benzer bir araştırmada, AAPH uygulamasının zebra balığı embriyolarında hayatta kalma oranını belirgin şekilde düşürdüğü (~%60), AAPH ile florotanin uygulanmasının ise bu oranı %80–90'a yükselttiği bildirilmiştir (Kang ve ark., 2013b).

Zebra balığı embriyolarında gözlenen deformiteler ve belirgin yumurta kesesi büyümesinin, besin kesesi (yumurta sarısı) emilim sürecindeki gecikmelerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Zoupa & Machera, 2017). AAPH maruziyetinin vücut uzunluğu ve göz çapını azaltırken perikardiyal alanı artırması, oksidatif stresin zebra balığı larvalarında gelişimsel büyümeyi baskıladığını göstermektedir. RP uygulamasının özellikle %20 ve %30 konsantrasyonlarda bu morfometrik bozulmaları hafifletmesi,

AAPH kaynaklı gelişimsel toksisiteye karşı koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde yapılan bir çalışmada, AAPH'nin zebra balığı embriyolarının hayatta kalma oranını, vücut uzunluğunu ve besin emilim kapasitesini önemli ölçüde azalttığı, Sinensetin ilavesinin ise doza bağlı bir etkiyle iyileşme eğilimi gösterdiği bulunmuştur (Jin ve ark., 2025).

ROS'un aşırı üretimi veya birikimi, oksidatif stres ve inflamatuvar yanıtlarla doğrudan ilişkilidir (Ko ve ark., 2013). Oksidatif stres; obezite, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (Wang ve ark., 2018). Bu nedenle, toksik olmayan ve etkili ROS temizleyiciler, bu hastalıkların önlenmesi açısından umut vadeden adaylar olarak değerlendirilmektedir. Yapılan bir çalışmada, fukoidan kullanılarak AAPH ile indüklenen oksidatif stres modeli oluşturulmuş; AAPH maruziyetinin zebra balığı larvalarında ROS üretimini artırarak lipid peroksidasyonunu ve canlılık kaybını tetiklediği bildirilmiştir (Oh ve ark., 2020). Yapılan diğer bir çalışmada, Phellodendrinin zebra balığı embriyolarında AAPH ile indüklenen oksidatif stresi baskıladığı; ROS üretimini ve hücre ölümünü azaltarak hayatta kalma oranlarını iyileştirdiği bildirilmiştir (Li ve ark., 2016). Bu bulgularla uyumlu olarak, literatürde zebra balığı embriyoları ve larvalarında AAPH kullanılarak oluşturulan oksidatif stres modelinde, farklı bitkisel ve doğal bileşiklerin AAPH kaynaklı ROS üretimini ve hücre ölümünü baskılayarak hayatta kalma oranlarını artırdığı rapor edilmiştir (Dai ve ark., 2020; Hu ve ark., 2017; Lee ve ark., 2023; Oh ve ark., 2020; Shen ve ark., 2025). Bu tez kapsamında elde edilen sonuçlar da söz konusu çalışmalarla paralellik göstermekte olup, RP kaynaklı antosiyaninlerin AAPH kaynaklı oksidatif strese karşı koruyucu etki sergilediğini ortaya koymaktadır.

Gelişimsel nörotoksisite, erken gelişim döneminde sinir sisteminin çevresel kirleticilere yetişkin döneme kıyasla belirgin şekilde daha duyarlı olması nedeniyle kritik

bir endişe alanıdır. Bu bağlamda zebra balığı, memelilerle karşılaştırılabilir düzeyde korunmuş nörogelişimsel süreçlere ve davranışsal örüntülere sahip olması sayesinde nörodavranışsal çalışmalar için güçlü bir model organizma olarak öne çıkmaktadır (Legradi ve ark., 2014).

Zebra balığı larvalarında lokomotor aktivite, yüzme hızı (velocity) ve tigmotaksis parametreleri, merkezi sinir sisteminin stres yanıtını ve davranışsal adaptasyonu bütüncül olarak yansıtan önemli göstergelerdir (Basnet ve ark., 2019). Oksidatif stres koşullarında reaktif oksijen türlerinin artışı, nöronal sinyal iletimini ve motor kontrol mekanizmalarını etkileyerek hem hareketlilikte hem de yüzme hızında artışa yol açabilmekte; buna eşlik eden davranışsal düzensizlikler stres ve anksiyete benzeri yanıtlarla ilişkilendirilmektedir. Bu çalışmada AAPH maruziyeti altında gözlenen davranışsal profil, oksidatif stresin santral sinir sistemi üzerinde uyarıcı ve denge bozucu bir etki oluşturduğunu düşündürmektedir.

RP uygulamasının, AAPH kaynaklı bu nörodavranışsal değişimleri kısmen baskılaması, antosiyanin ve fenolik bileşiklerin nöroprotektif potansiyeliyle uyumludur. RP gruplarında lokomotor aktivite ve yüzme hızının kontrol grubuna daha yakın seyretmesi, oksidatif stresin motor sistem üzerindeki etkilerinin sınırlandırıldığını; tigmotaktik davranıştaki göreceli denge ise stres algısının azaltıldığını düşündürmektedir. Bu etki, RP'nin ROS düzeylerini baskılayarak nöronal membran bütünlüğünü ve nörotransmitter dengesini korumasıyla açıklanabilir.

Bununla birlikte, RP konsantrasyonları arasında doğrusal bir doz-yanıt ilişkisinin gözlenmemesi, bitkisel özütlerin nörodavranışsal etkilerinin konsantrasyona bağlı ancak lineer olmayan bir karakter sergileyebileceğini göstermektedir. Antioksidanların yüksek dozlarda fizyolojik adaptasyon mekanizmalarını tetikleyebileceği veya davranışsal yanıtları farklı biçimde modüle edebileceği daha önce bildirilmiştir (Brinza ve ark.,

2025). Dolayısıyla RP'nin nörodavranışsal etkilerinin değerlendirilmesinde optimal doz aralığının belirlenmesi önem taşımaktadır.

Genel olarak elde edilen bulgular, AAPH'nin zebra balığı larvalarında hiperaktivite, artmış yüzme hızı ve stres ilişkili davranışlara yol açtığını; RP uygulamasının ise uygun konsantrasyonlarda bu etkileri dengeleyerek nörodavranışsal homeostazın korunmasına katkı sağladığını ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada geliştirilen filmlerin antioksidan özellikleri; toplam fenolik madde içeriği (TPC), DPPH ve ABTS radikal süpürme analizleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Literatürde, antosiyanin özütü içeren yenilebilir filmlerde toplam fenolik madde içeriğinin (TPC) ekstrakt konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı bildirilmiştir. Örneğin, %10 antosiyanin özütü ilave edilen bir aktif filmde TPC değeri 11.47 mg GAE/g film olarak rapor edilirken, ekstraksız kontrol filmin 3.89 mg GAE/g düzeyinde olduğu belirtilmiştir (Moghadam ve ark., 2021). Bu bulgular, çalışmamızdaki verilerle büyük ölçüde uyumludur. Nitekim kontrol grubunda TPC 3.49 mg GAE/g olarak belirlenmiş; RP ilavesinin artırılmasıyla birlikte toplam fenolik madde içeriği %4 R, %8 R ve %12 R gruplarında sırasıyla 5.67; 6.75 ve 9.90 mg GAE/g değerlerine yükselmiştir. Dolayısıyla hem bu çalışma hem de literatür, özüt konsantrasyonunun artmasıyla film TPC'sinin anlamlı şekilde yükseldiğini göstermektedir.

RP ilavesiyle hazırlanan yenilebilir filmlerin antioksidan aktivite sonuçları, toplam fenolik madde içeriğindeki artışla uyumlu şekilde film dozları arasında paralel olarak artış göstermiştir. Fenolik bileşiklerin ve özellikle antosiyaninlerin H⁺ iyonu verme ve serbest elektron transferi kapasitesine sahip olmaları, radikal süpürme yeteneklerinin temelini oluşturmaktadır (Rambabu ve ark., 2019). Bu nedenle RP konsantrasyonunun yükselmesiyle hem DPPH hem ABTS radikal indirgeme kapasitesinin anlamlı biçimde artması beklenen bir sonuçtur. Çalışma bulguları, RP ilavesinin antioksidan kapasiteyi

doz bağımlı olarak artırdığını göstermiş; özellikle %12 R grubunun ABTS (%87.71) ve DPPH (%80.19) değerleri, BHT ve E vitaminini aşan ve BHA'ya oldukça yaklaşan düzeylere ulaşmıştır. Bu bulgu, RP'nin fenolik ve antosiyanin içeriğinin film matrisine güçlü antioksidan etki olarak yansıdığını desteklemektedir. Sonuçlarımız, Moghadam ve ark.'nın bulgularıyla benzerdir; bu araştırmada *Echium amoenum* antosiyaninleriyle zenginleştirilmiş mung fasulyesi protein filmlerinde DPPH ve ABTS aktivitelerinin özüt miktarına paralel olarak arttığı gösterilmiştir (Moghadam ve ark., 2021). Benzer şekilde, kırmızı lahana özütü kullanılarak hazırlanan filmlerde sulu ve etanollü ekstraktların antioksidan aktiviteye etkisini inceleyen Musso ve ark. ABTS radikal temizleme kapasitesinin her iki ekstraksiyon yöntemiyle de özüt eklenen filmlerde arttığını, ancak etanollü ekstrakt içeren filmlerin sulu ekstraktlı filmlere kıyasla belirgin derecede daha yüksek ABTS aktivitesi gösterdiğini bildirmiştir (Musso ve ark., 2019).

C. albicans, sağlıklı bireylerin mukozasında kommensal olarak bulunan, ancak konakçı mikroflorasının bozulması durumunda fırsatçı patojen hâline gelebilen bir mayadır. Klinik veriler, özellikle hastanede yatan bireylerde *Candida* kaynaklı enfeksiyonların yaygın ve yüksek mortalite ile ilişkili olduğunu, ayrıca antifungal ilaç direncinin giderek arttığını göstermektedir. Bu nedenle, yeni ve doğal antifungal stratejilere olan ihtiyaç artmaktadır. Literatürde fenolik bileşiklerin, *C. albicans*'ın patojenitesinde kritik rol oynayan maya-hif geçişini baskılayabildiği bildirilmektedir. Nitekim gallik ve ferulik asidin, *C. albicans* suşlarında (SC5314 ve A72) oksidatif fosforilasyonda yer alan enzim komplekslerinin aktivitesini inhibe ederek hif gelişimini %25–50 oranında azalttığı gösterilmiştir (Aldahash, 2018.). Bu mekanizma, fenolik bileşiklerin fungal virülansı doğrudan öldürücü olmadan baskılayabildiğini ortaya koymaktadır. Çalışmamızda kara kuşburnunda yüksek düzeylerde tespit edilen gallik ve ferulik asit varlığı ve *C. albicans*'a karşı gözlenen 1.9 cm inhibisyon zonu, söz konusu

literatür bulguları ile paralellik göstermekte olup, kara kuşburnun antifungal potansiyelinin fenolik bileşenler aracılığıyla gerçekleştiğini desteklemektedir(El-Nagar ve ark., 2020; Zheng ve ark., 2024). Pozitif kontrollerin (Gentamisin ve Flukonazol) literatür verileriyle uyumlu olarak yüksek çaplarda zonlar (24-33 mm) vermesi, test sisteminin doğruluğunu desteklemektedir.

Benzer şekilde, Rashid ve ark. (2014), *Diospyros virginiana* meyvesinin metanol ekstraktının antifungal etkisinin antibakteriyel etkiye kıyasla daha belirgin olduğunu ve ekstraktın etkisinin izole edilen fenolik bileşiklere göre daha düşük kaldığını bildirmiştir (Rashed ve ark., 2014). Bu çalışmada RP içeren jelatin bazlı filmlerde disk difüzyon yönteminde antibakteriyel etkinin gözlenmemesi, filmdeki aktif bileşik miktarının düşük olması ve buna bağlı olarak agar ortamına geçen etkin dozun inhibisyon zonu oluşturmak için yetersiz kalması ile açıklanabilir. Buna karşın, mantarların fenolik bileşiklere bakterilere kıyasla daha duyarlı olabilmesi nedeniyle, antifungal etkinliğin belirgin olarak ortaya çıkması beklenen bir durumdur. Nitekim *Olea europaea* (zeytin) yaprağı fenoliklerince zengin ekstraktlarının disk difüzyon yönteminde çok sayıda mantar türüne karşı belirgin antifungal etki gösterdiği bildirilmiştir(Korukluoglu ve ark., 2008).

Filmlerin kalınlığı, antosiyanin ilavesinin en yüksek dozunda kontrol grubuna kıyasla %4 oranında artmış ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Kalınlıktaki bu yükseliş, biyoaktif moleküller olan antosiyaninler ile film matrisinde yer alan proteinler arasındaki etkileşimlere bağlanır. Bu tür etkileşimlerin hidrojen bağları oluşturarak yapı bütünlüğünü güçlendirdiği ve antosiyanin konsantrasyonu arttıkça daha fazla katı madde içeren, daha yoğun bir film ağı oluşturabileceğini düşündürmektedir. Buna ek olarak, film matrisindeki katı madde içeriğinin artması, kurutma aşamasında meydana gelen büzülme eğiliminin azalmasına katkıda bulunmuş ve bu durum MC'nin kontrolde %18 ,%12 RP de %15 olarak sonuçlanmıştır. Katı fazdaki artışın film yapısını

daha stabil ve kompakt hâle getirmesi, suyun filmde uzaklaştırılması sırasında oluşan hacim kaybını sınırlayarak nem tutma kapasitesini azaltmış görünmektedir. Bu bulgu, antosiyanin konsantrasyonundaki yükselişe bağlı olarak gözlenen kalınlık artışını da desteklemektedir ve film yapısının daha yoğun, daha az büzülen bir matrise dönüştüğünü göstermektedir. Benzer şekilde Rambabu ve ark. (Rambabu ve ark., 2019), mango yaprağı ekstraktı içeren kitosan filmlerinde ekstrakt konsantrasyonu arttıkça nem içeriğinin azaldığını ve filmlerin daha kalın yapı kazandığını bildirmiş; bu değişimi film matrisindeki katı fazın artması ve ekstrakt-polimer etkileşimlerinin yoğunlaşmasıyla açıklamıştır. Bu açıdan bakıldığında, RP içeren filmlerimizde gözlenen kalınlık artışı ve nem içeriğindeki düşüşün, literatürde bildirilen bu mekanizma ile uyumlu olduğu görülmektedir. Han Chen ve ark. tarafından yapılan böğürtlen antosiyaninleri ve çay polifenollerini ile yüklü kitosan-karboksimetil selüloz yenilebilir filmlerinin kalınlık ve MC sonuçları da aynı yönde ve sonuçlarımızı desteklemektedir (H. Chen ve ark., 2025).

Liwei Wang ve arkadaşları, *Dioscorea zingiberensis* nişastası ve antosiyanin kullanarak geliştirdikleri pH-duyarlı akıllı filmlerde, ekstrakt (BPE) ilavesinin film kalınlığını anlamlı şekilde artırdığını bildirmiştir. Bununla birlikte, MC değerinin BPE ilavesine rağmen anlamlı bir değişim göstermediğini, yalnızca hafif bir düşüş gözlemlendiğini bildirmiştir. Bu durumun, polifenollerin oluşturduğu hidrojen bağları nedeniyle filmdeki hidrofilik grupların erişilebilirliğinin azalmasına bağlı olduğu ifade edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise nem içeriğinin anlamlı düzeyde azalması, ekstraktın matriksle etkileşiminin daha güçlü olduğunu ve hidrofilik bölgelerin su tutma kapasitesini daha belirgin şekilde sınırladığını göstermektedir. Bu farklılık, kullanılan ekstraktın yapısal özellikleri, fenolik bileşik kompozisyonu veya film formülasyonundaki matriks yoğunluğu gibi parametrelerden kaynaklanmış olabilir (Wang ve ark., 2023).

WS, ambalaj filmlerinin su ile temas ettiğinde gösterdiği direnç düzeyini

belirlemede kullanılan bir ölçüttür (Alizadeh-Sani ve ark., 2021). Çalışmamızdaki WS sonuçlarına göre, saf jelatin filmi güçlü hidrofilik yapısı nedeniyle en yüksek WS değerini (%47.74) göstermiştir. RP antosiyaninli ekstrenin eklenmesiyle WS değeri istatistiksel olarak anlamlı biçimde azalmıştır ($p < 0.05$). Benzer şekilde, literatürde polifenol içeren özütlerin eklenmesiyle filmlerin WS değerlerinde belirgin düşüşler rapor edilmiştir. Bu durum, jelatin polimeri ile RP ekstraktındaki antosiyaninler arasında hidrojen bağlarının oluşmasına ve bunun sonucunda filmdeki hidroksil gruplarının bulunabilirliğinin azalmasına bağlanmaktadır. Hidroksil gruplarının sınırlanması, jelatin filminin hidrofilik karakterini zayıflatarak suya karşı direncini artırmıştır (Alizadeh-Sani ve ark., 2021; Gasti ve ark., 2021; Thivya ve ark., 2021). Ek olarak; K. Rambabu ve arkadaşları, mango yaprağı özütü eklenen kitosan filmlerinde polifenollerin polimer zincirleriyle güçlü etkileşim kurması sonucu suda çözünürlüğün (WS) belirgin şekilde azaldığını bildirmiştir (Rambabu ve ark., 2019).

Biyopolimer bazlı filmler genellikle nispeten yüksek WVP değerlerine sahip olduklarından, bu özellik sentetik plastik filmlerin yerine geçmelerinin önünde önemli engel oluşturmaktadır. Önerilen ambalaj filminde, su buharı geçirgenliğinin düşük olması ve film ile atmosfer arasındaki nem geçişinin en aza indirgenmesi istenir (Alizadeh-Sani ve ark., 2021). Literatürde, uygun fenolik katkı maddelerinin film yapısına eklenmesiyle gözenek boyutunun küçüldüğü ve/veya polimer ağının kıvrımlılığının arttığı; dolayısıyla su buharı difüzyonunun sınırlandığı bildirilmektedir (Amaregouda ve ark., 2022a). Ancak çalışmamızda RP antosiyaninli ekstrenin artan konsantrasyonlarda WVP değerlerini düşürmek yerine az ve anlamlı biçimde artırdığı görülmüştür. Bu bulgu, RP ekstraktının jelatin ağı içerisinde beklenen kompakt yapıyı oluşturmak yerine polimer zincirleri arasında daha geçirgen bir mikro yapı meydana getirdiğini düşündürmektedir. Dahası geliştirilmiş film örneklerinde özüt eklenmesiyle WVP’de gözlenen minimal artış,

antosiyeninlerin kısmi hidrofilik yapısı nedeniyle film matrisi boyunca su buharının daha kolay penetre olmasından kaynaklanıyor olabilir. Su buharının film matrisinin amorf bölgelerinden yayılma olasılığının daha yüksek olduğu, bu nedenle filmin kristalin derecesinin WVP'sini büyük ölçüde etkilediği bildirilmiştir (Moghadam ve ark., 2021; Yong ve ark., 2019). Daha öne yapılan, kitosan filmlerinin tatlı patates, mor ve siyah pirinç özütleriyle oluşturulan yenilebilir film çalışmalarda da WVP'nin arttığı rapor edilmiştir (Amaregouda ve ark., 2022b; Liang ve ark., 2019; Yong ve ark., 2019).

Mekanik özellikler, ambalaj filmlerinin gıda tedarik zincirinde bütünlüğünü ve sürdürülebilirliğini koruma kapasitesini belirleyen temel parametrelerdir (Mushtaq ve ark., 2018). Çalışmamızda RP ekstraktı ilavesiyle film kalınlığında artış ve MC değerlerinde düşüş gözlenirken, WVP'nin minimal düzeyde yükselmesi filmin daha amorf ve geçirgen bir mikro yapı kazandığından daha önce bahsetmiştik. Bu gevşek yapı, polimer zincirleri arasındaki düzenli etkileşimleri zayıflatmış ve özellikle yüksek ekstrakt seviyelerinde TS değerlerinin düşmesine yol açmıştır. Ayrıca özütün yüksek konsantrasyonlarda aglomerasyon eğilimi göstermesi, film ağının homojenliğini ve sıkılığını bozarak mekanik dayanım kaybını daha da artırmış olabilir. Dolayısıyla RP ekstraktı kompakt bir ağ yapısı oluşturmaktan ziyade amorf bölgeleri artırmış ve film dayanımını kısmen sınırlamıştır. Bununla birlikte, cihaz ölçümlerinde TS değerleri azalma gösterse de film örneklerinin elle yapılan fiziksel değerlendirmelerinde bu farkın pratik açıdan çok belirgin olmadığı gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, literatürde de bitkisel özüt veya fenolik bileşik içeren biyopolimer filmlerinde mekanik dayanımın (TS) azaldığı sıkça rapor edilmiştir (Liang ve ark., 2018; Liu ve ark., 2019; Yong ve ark., 2019).

FTIR analizi, RP ekstraktının yanı sıra film formülasyonunda yer alan gliserol ve sorbitolün jelatin matrisiyle etkileşim biçimini ve bu bileşenlerin film yapısında kimyasal

bir değişim oluşturup oluşturmadığını değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Jelatin filmlerinde plastikleştiricilere bağlı olarak 3200–3400 cm⁻¹ aralığında genişleyen –OH/–NH gerilme bandı gliserol ve sorbitolün –OH gruplarından kaynaklanan karakteristik bir özelliktir ve literatürde jelatin–gliserol/sorbitol filmleri için benzer şekilde rapor edilmiştir (Sancaklı ve ark., 2021). Bu çalışmada da kontrol filminde daha yayvan olan bu bant, RP ekstraktı eklenen filmlerde sivrilmiş ve yoğunlaşmıştır; bu durum plastikleştiricilere ek olarak RP ekstraktındaki fenolik –OH gruplarının da jelatin zincirleriyle hidrojen bağı etkileşimlerine girdiğini göstermektedir.

Protein yapısına özgü Amide I (1650–1700 cm⁻¹) ve Amide II (1500–1580 cm⁻¹) bantları tüm film örneklerinde konumlarını büyük ölçüde korumuş olup, gliserol ve sorbitol varlığında jelatin omurgasının karakteristik bantlarının değişmeden sürdüğü bildirilmiştir (Ma ve ark., 2012). Bu bantlarda kontrol, %4 RP ve %8 RP filmleri arasında belirgin bir absorbans farkı oluşmaması, RP ekstraktının düşük ve orta konsantrasyonlarda jelatin ikincil yapısı üzerinde anlamlı bir yapısal dönüşüme neden olmadığını göstermektedir. Yalnızca %12 RP filminde Amide I–II bantlarında hafif bir azalma gözlenmiş olup, bu durum yüksek ekstrakt seviyesinde protein ağında sınırlı bir düzensizlik oluşabileceğine işaret etmektedir.

C–O ve C–O–C titreşimlerinin yer aldığı 1000–1200 cm⁻¹ bölgesindeki küçük şiddet değişimleri, jelatin–gliserol–sorbitol–RP kompozit yapısının fiziksel etkileşimler yoluyla bütünleştiğini, ancak ekstrakt miktarı arttıkça matrisin daha amorf bir mikro yapı kazandığını düşündürmektedir (Yan ve ark., 2023). Genel olarak FTIR bulguları, gliserol ve sorbitol içeren jelatin filmlerine RP ekstraktı eklenmesinin jelatin temel iskeletini değiştirmediğini; değişimlerin çoğunlukla hidrojen bağlarının kuvveti ve zincirler arası fiziksel düzenlenme düzeyinde gerçekleştiğini ortaya koymaktadır (Sancaklı ve ark., 2021).

Jelatin filmlerine zeytinyağı eklendiğinde Amide I ve Amide II bantlarının korunmaya devam ettiği, dolayısıyla jelatin omurgasının kimyasal yapısının değişmediği Wen Ma ve arkadaşları tarafından da rapor edilmiştir (Ma ve ark., 2012) . Çalışmamızda RP ekstraktı içeren filmlerde bu bantların korunmuş olması, jelatin yapı iskeletinin stabil kaldığını ve ekstraktın matrise fiziksel etkileşimler yoluyla entegre olduğunu doğrulamaktadır.

XRD desenlerinde tüm filmlerde $2\theta = 20\text{--}22^\circ$ aralığında geniş bir amorf tepe (halo) gözlenmiş olup bu durum jelatin bazlı filmlerin karakteristik olarak kristal yapıda olmadığını göstermektedir (Liu ve ark., 2021). Jelatin ayrıca yaklaşık $2\theta = 8^\circ$ ’de belirgin bir tepe ve $2\theta = 20^\circ$ civarında geniş bir halo vermekte olup 8° ’deki tepe kolajenin üçlü sarmal kristal yapısına özgü olan yaklaşık 1,1 nm’lik periyodik düzeni temsil etmektedir (Qiao ve ark., 2017). RP ekstraktının artan oranlarda ilavesi pik şiddetinin azalmasına ve tepe genişliğinin artmasına yol açmış, bu da zincirler arası düzenin bozulduğunu ve filmlerin daha amorf bir morfoloji kazandığını ortaya koymuştur. Numunelerde keskin kristalin piklerin bulunmaması ise ekstraktın jelatin matrisi içerisinde yeni bir kristal faz oluşturmadan homojen şekilde dağıldığını desteklemektedir (Liu ve ark., 2021, 2025; Wang ve ark., 2022). Bu bulgu, FTIR analizinde gözlenen RP–jelatin etkileşimleriyle uyumlu olup RP’nin jelatin zincirleri arasına girerek düzenli paketlenmeyi azalttığını, böylece filmin daha amorf bir karakter kazanarak zincir hareketliliğinin arttığını göstermektedir. Bu yapısal geçiş, filmin kırılgenliğinin azalmasına ve elastikiyetinin artmasına katkı sağlamakta olup, RP eklenen filmlerde çekme dayanımı kontrol grubuna kıyasla daha düşük olsa da polimer ağındaki artmış esneklik nedeniyle bu durum film performansı açısından olumsuz bir özellik olarak değerlendirilmemektedir.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada jelatin–gliserol ve jelatin–sorbitol filmlerinin doğal olarak pürüzsüz ve homojen yüzey yapısı sergilediği bildirilmiştir

(Sancakli ve ark., 2021). Bu bulgu, çalışmamızdaki kontrol ve %4 RP filminde gözlenen düzgün yüzey morfolojisiyle uyumludur ve plastikleştiricilerin matrise sorunsuz entegre olduğunu göstermektedir. Buna karşın %8 ve %12 RP içeren filmlerde ortaya çıkan belirgin partikül birikimleri ve yüzey düzensizlikleri, yapısal bozulmanın plastikleştiricilerden değil artan RP konsantrasyonundan kaynaklandığını açıkça göstermektedir. RP'nin yüksek dozlarda matrise tam olarak karışmaması sonucu oluşan bu lokal faz ayrımı, mekanik dayanımdaki azalmayı da desteklemektedir. Benzer yapılan bir çalışmada, artan *Dioscorea zingiberensis* antosiyanini (BPE) ilavesinin yüzeyde homojen dağılım sağlarken kesitte pürüzlülüğü artırdığını ve katkının film matriksinde agregalar oluşturarak yerleştiğini göstermektedir (Wang ve ark., 2023).

Gıda ambalaj filmlerinin optik özellikleri, tüketici kabulünü ve ürünün ışığa karşı besin ve lezzet korumasını doğrudan etkiler (Rambabu ve ark., 2019; W. Zhang ve ark., 2016). Çalışmada gerçekleştirilen çok yönlü renk analizleri, RP ekstraktının film matrisine entegre edildiğinde renk stabilitesi ve pH duyarlılığı üzerinde belirgin etkiler oluşturduğunu göstermiştir. Film örneklerinden elde edilen L*, a* ve b* değerleri ile opaklık sonuçları, ekstrakt konsantrasyonunun artmasıyla renk yoğunluğunun güçlendiğini ve filmlerin daha koyu, daha opak bir görünüm kazandığını ortaya koymuştur (Chen ve ark., 2025; Moghadam ve ark., 2021). Bu durum antosiyaninlerin ışık geçirgenliğini azaltmasıyla açıklanabilir (Kan ve ark., 2019).

Ekstraktın farklı pH koşullarındaki spektrofotometrik değişimleri ise antosiyaninlerin beklenen pH duyarlılığını doğrulamış; bu davranış film yüzeyine uygulanan pH çözeltilerinde de benzer şekilde gözlenmiştir. RP ekstraktının farklı pH değerlerinde gösterdiği absorbans profilleri, antosiyanin içeren sistemlerde beklenen pH duyarlılığını yansıtmaktadır. Spektrogramda düşük pH değerlerinde 520–560 nm bölgesinde yüksek absorbansın korunması, kırmızı tonların baskın olduğu flavilyum

formunun stabil kaldığını göstermektedir. pH arttıkça bu bölgede absorbansın belirgin şekilde azalması ve eğrinin daha yayvan bir forma dönüşmesi, antosiyaninlerin kararsız ara formlar ve kahverengimsi renklerle ilişkili yapılar arasında geçiş yaptığını düşündürmektedir. Yüksek pH değerlerinde maksimum absorbansın 600 nm üzerine kayması ise sarımsı–yeşilimsi kalkon formunun baskınlaştığını göstermektedir. Bu bulgular, antosiyanin içeren biyopolimer filmlerin pH duyarlı akıllı ambalaj materyali olarak kullanılabileceğini bildiren önceki çalışmalarla uyumludur (Bakhshizadeh ve ark., 2023; Gasti ve ark., 2021; Liu ve ark., 2019; L. Wang ve ark., 2023; Zhang ve ark., 2019). Nitekim film–pH temas testlerinde kaydedilen L^* , a^* ve b^* değişimleri, antosiyaninin serbest hâlde gösterdiği pH kaynaklı renk dönüşümlerinin film yapısında da büyük ölçüde korunduğunu, dolayısıyla geliştirilen filmlerin çevresel pH değişimlerini etkin şekilde gösterebilen bir renk indikatörü olarak işlev gördüğünü desteklemektedir.

Balık eti, yüksek su içeriği, zengin protein yapısı ve doğal mikrobiyal florası nedeniyle diğer birçok gıdaya kıyasla çok hızlı bozulan bir üründür. Depolama sürecinde mikroorganizmaların hızla çoğalması, proteinlerin parçalanmasına ve ortama alkali karakter kazandıran bileşiklerin açığa çıkmasına neden olmakta; buna bağlı olarak ürün pH'sı kısa sürede yükselmekte ve duyusal kalite hızla düşmektedir. Bu nedenle balık ürünlerinde bozulmanın erken ve güvenilir şekilde izlenebilmesi hem gıda güvenliği hem de tüketici sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Ancak tüketiciler açısından ürünün bozulup bozulmadığını ambalaj açılmadan anlamak çoğu zaman mümkün değildir. Bu durum, ürünün kendi kendine durumunu gösterebilen akıllı ambalaj sistemlerine olan ihtiyacı artırmaktadır.

Bu çalışmada geliştirilen antosiyanin bazlı akıllı film, balık etinde mikrobiyal bozulma sırasında meydana gelen pH değişimine duyarlı olarak renk değiştirmiş ve bozulmanın görsel olarak izlenebilmesini mümkün kılmıştır. Elde edilen bulgular,

mikrobiyal yük artışı ile pH yükselmesi ve film renk parametreleri arasındaki güçlü ilişkiler sayesinde, geliştirilen sistemin balık etindeki bozulmayı etkin şekilde yansıttığını göstermektedir.

Bu yaklaşım, literatürde bildirilen benzer çalışmalarla genel olarak uyumludur. Nitekim Hematian ve ark. (2022), *Coleus scutellarioides* antosiyaninleri içeren jelatin bazlı filmler geliştirerek balık filetolarında depolama süresince belirgin bir renk değişimi oluştuğunu ve bu değişimin özellikle a* renk parametresi üzerinden bozulma ile yakından ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir (Hematian ve ark., 2023) . Her iki çalışmada da filmin parlaklık değişiminden ziyade renk tonu değişimi üzerinden yanıt vermesi, antosiyanin bazlı göstergelerin bozulmayı esas olarak kromatiklik parametreleri ile yansıttığını göstermektedir.

Benzer şekilde, *Dioscorea zingiberensis* nişastası ve antosiyanin içeren pH-duyarlı akıllı film ile yapılan bir çalışmada da , et ürünlerinde depolama süresi boyunca TVC ve pH değerlerinin arttığı ve buna paralel olarak filmin renginin belirgin şekilde değiştiği rapor edilmiştir. Araştırmacılar, mikrobiyal çoğalma ve ortamın alkalileşmesiyle birlikte filmin mor tonlardan mavi-yeşil tonlara döndüğünü ve bu renk değişiminin bozulmanın güvenilir bir göstergesi olduğunu belirtmişlerdir (Wang ve ark., 2023). Bu bulgular, mevcut çalışmada gözlenen mikrobiyal artış, pH yükselmesi ve film renk değişimi arasındaki ilişkiyi açıkça desteklemektedir.

Buna paralel olarak, Ranjbara ve ark., kırmızı pancar pigmenti içeren akıllı film ile tavuk filetosunda depolama süresince mikrobiyal yük ve pH'ın arttığını ve buna eşlik eden belirgin bir renk değişimi oluştuğunu bildirmiştir (Ranjbar ve ark., 2023).

Geliştirilen sistem elde edilen veriler, antosiyaninlerin geniş pH aralığında renk değiştirme bölümü ve çevre dostu biyopolimerlerle uyumu vurgulayan güncel literatür özellikleriyle tam bir paralellik sergilemektedir (Roy ve Rhim, 2021).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada kara kuşburnu antosiyanin özütü ile zenginleştirilen jelatin bazlı yenilebilir filmlerin yüksek fenolik ve antosiyanin içeriğine sahip olduğu, buna paralel olarak güçlü antioksidan aktivite sergilediği belirlenmiştir. Özellikle %12 R grubunun ABTS ve DPPH testlerinde sentetik antioksidanlarla karşılaştırılabilir düzeyde radikal süpürme kapasitesi göstermesi, özütün fonksiyonel etkinliğini desteklemektedir. Filmlerin pH'a duyarlı renk değişimi sergilemesi, akıllı ambalaj uygulamaları açısından önemli bir avantaj sağlamaktadır. Bununla birlikte, yüksek antosiyanin konsantrasyonlarında su buharı geçirgenliğinde artış ve mekanik dayanımda azalma gözlenmesi, film yapısının geliştirilmesine yönelik yeni formülasyon yaklaşımlarının gerekliliğine işaret etmektedir. Gelecek çalışmalarda jelatin bazlı filmlerin farklı biyopolimerlerle komplekslenmesiyle bu sınırlılıkların giderilebileceği öngörülmektedir. Öte yandan, RP'nin yüksek fenolik içeriği ve güçlü antioksidan kapasitesinin zebra balığı modelinde AAPH kaynaklı oksidatif toksisiteyi belirgin şekilde önlemesi, RP'nin yalnızca gıda ambalajı alanında değil, aynı zamanda endüstriyel uygulamalar ve ilaç geliştirme çalışmalarında terapötik ve önleyici bir bileşen olarak değerlendirilme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Aguirre-Alvarez, G., Pimentel-González, D. J., Campos-Montiel, R. G., Foster, T., & Hill, S. E. (2011). The effect of drying temperature on mechanical properties of pig skin gelatin films. *CYTA-Journal of Food*, 9(3), 243–249. <https://doi.org/10.1080/19476337.2010.523902>
- Akhtar, J., Omre, P. K., & Azad, Z. R. A. A. (2015.). Edible coating for preservation of perishable foods: a review. *Journal of Ready to Eat Food*. www.jakraya.com/journal/jref
- Aldahash, R. (2018). Effect of gallic and ferulic acids on oxidative phosphorylation on effect of gallic and ferulic acids on oxidative phosphorylation on *Candida albicans* (A72 and SC5314) during the yeast-to-hyphae (A72 and SC5314) during the yeast-to-hyphae transition transition. <https://digitalcommons.unl.edu/foodscidiss>
- Alizadeh-Sani, M., Mohammadian, E., Rhim, J. W., & Jafari, S. M. (2020). pH-sensitive (halochromic) smart packaging films based on natural food colorants for the monitoring of food quality and safety. *Trends in Food Science and Technology*, 105, 93–144. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.014>
- Alizadeh-Sani, M., Tavassoli, M., Mohammadian, E., Ehsani, A., Khaniki, G. J., Priyadarshi, R., & Rhim, J. W. (2021). pH-responsive color indicator films based on methylcellulose/chitosan nanofiber and barberry anthocyanins for real-time monitoring of meat freshness. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 741–750. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.231>
- Amaregouda, Y., Kamanna, K., & Gasti, T. (2022). Fabrication of intelligent/active films based on chitosan/polyvinyl alcohol matrices containing *Jacaranda cuspidifolia* anthocyanin for real-time monitoring of fish freshness. *International Journal of*

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.174>

Arashisar, Ş., Hisar, O., Kaya, M., & Yanik, T. (2004). Effects of modified atmosphere and vacuum packaging on microbiological and chemical properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 97(2), 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.024>

Aref, S., Habiba, R., Morsy, N., Abdel-Daim, M., & Zayet, F. (2022). Improvement of the shelf life of grey mullet (*Mugil cephalus*) fish steaks using edible coatings containing chitosan, nanochitosan, and clove oil during refrigerated storage. *Food Production, Processing and Nutrition*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s43014-022-00106-z>

Bakhshizadeh, M., Ayaseh, A., Hamishehkar, H., Samadi Kafil, H., Niknazar Moghaddam, T., Baghban Haghi, P., Tavassoli, M., Amjadi, S., & Lorenzo, J. M. (2023). Multifunctional performance of packaging system based on gelatin/alginate vera gel film containing of rosemary essential oil and common poppy anthocyanins. *Food Control*, 154. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110017>

Basnet, R. M., Zizioli, D., Taweedet, S., Finazzi, D., & Memo, M. (2019). Zebrafish larvae as a behavioral model in neuropharmacology. *Biomedicines*, 7(1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7010023>

Brinza, I., Oresanya, I. O., Orhan, I. E., Gök, H. N., Hritcu, L., & Boianigiu, R. S. (2025). Mechanisms underlying the cognitive benefits of solanum macrocarpon leaf n-butanol extract: acetylcholinesterase inhibition and oxidative stress modulation. *Plants*, 14(21). <https://doi.org/10.3390/plants14213283>

- Can, H., Güven, L., Demirkaya Miloğlu, F., & Abd El-Aty, A. M. (2024). Development and validation of a UHPLC-ESI-MS/MS method for the simultaneous determination of organic acids and phenolic compounds in *Filipendula vulgaris*, *Polygonum divaricatum*, *Hypericum linarioides*, and *Rheum ribes*. *Microchemical Journal*, 201. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.110683>
- Cavalcanti, R. N., Santos, D. T., & Meireles, M. A. A. (2011). Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview. *Food Research International*, 44(2), 499–509. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.007>
- Cazón, P., Morales-Sanchez, E., Velazquez, G., & Vázquez, M. (2022). Measurement of the water vapor permeability of chitosan films: a laboratory experiment on food packaging materials. *Journal of Chemical Education*, 99(6), 2403-2408. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.2c00449>
- Chen, H., Meng, X., Zhang, F., Chen, J., Ding, X., Jian, T., Niu, G., Tong, B., Gai, Y., Zhao, H., Li, W., & Lü, H. (2025). Development of chitosan-carboxymethyl cellulose edible films loaded with blackberry anthocyanins and tea polyphenols and their application in beef preservation. *Food Hydrocolloids*, 164. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2025.111198>
- Chen, Y., Li, Y., Qin, S., Han, S., & Qi, H. (2022). Antimicrobial, UV blocking, water-resistant and degradable coatings and packaging films based on wheat gluten and lignocellulose for food preservation. *Composites Part B: Engineering*, 238. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2022.109868>
- Dai, Y. L., Kim, G. H., Kang, M. C., & Jeon, Y. J. (2020). Protective effects of extracts from six local strains of *Pyropia yezoensis* against oxidative damage in vitro and

- in zebrafish model. *Algae*, 35(2), 189–200.
<https://doi.org/10.4490/algae.2020.35.5.14>
- Dinika, I., Verma, D. K., Balia, R., Utama, G. L., & Patel, A. R. (2020). Potential of cheese whey bioactive proteins and peptides in the development of antimicrobial edible film composite: A review of recent trends. *Trends in Food Science and Technology*, 103, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.06.017>
- Duarte, A. M., Silva, F., Pinto, F. R., Barroso, S., & Gil, M. M. (2020). Quality assessment of chilled and frozen fish—Mini review. *Foods*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/foods9121739>
- Ekrami, M., Roshani-Dehlaghi, N., Ekrami, A., Shakouri, M., & Emam-Djomeh, Z. (2022). pH-Responsive color indicator of saffron (*crocus sativus* l.) anthocyanin-activated salep mucilage edible film for real-time monitoring of fish fillet freshness. *Chemistry (Switzerland)*, 4(4), 1360-1381. <https://doi.org/10.3390/chemistry4040089>
- El-Nagar, A., Elzaawely, A. A., Taha, N. A., & Nehela, Y. (2020). The antifungal activity of gallic acid and its derivatives against *alternaria solani*, the causal agent of tomato early blight. *Agronomy*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/agronomy10091402>
- Ezati, P., Bang, Y. J., & Rhim, J. W. (2021). Preparation of a shikonin-based pH-sensitive color indicator for monitoring the freshness of fish and pork. *Food Chemistry*, 337. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127995>
- Findik, B. T., Yildiz, H., Akdeniz, M., Yener, I., Yilmaz, M. A., Cakir, O., & Ertas, A. (2024). Phytochemical profile, enzyme inhibition, antioxidant, and antibacterial activity of *Rosa pimpinellifolia* L.: A comprehensive study to investigate the

- bioactivity of different parts (whole fruit, pulp, and seed part) of the fruit. *Food Chemistry*, 455. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139921>
- Gasti, T., Dixit, S., D'souza, O. J., Hiremani, V. D., Vootla, S. K., Masti, S. P., Chougale, R. B., & Malabadi, R. B. (2021). Smart biodegradable films based on chitosan/methylcellulose containing *Phyllanthus reticulatus* anthocyanin for monitoring the freshness of fish fillet. *International Journal of Biological Macromolecules*, 187, 451–461. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.128>
- Ghaly, A. E., Dave, D., Budge, S., & Brooks, M. S. (2010). Fish Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques: Review. *American Journal of Applied Sciences*, 7(7), 859–877.
- Güven, L., Özgen, U., Sevindik, H., Ağan, İ., Koca, M., Turan, İ., Demir, S., & Aliyazıcıoğlu, Y. (2022). Evaluation of LC-MS/MS Analysis and In Vitro Biological Activities of *Rosa pimpinellifolia* Root, Pseudo-fruit, and Seed extracts. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 5(3), 480-503. <https://doi.org/10.38001/ijlsb.1108547>
- Halász, K., & Csóka, L. (2018). Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) pomace extract immobilized in chitosan for colorimetric pH indicator film application. *Food Packaging and Shelf Life*, 16, 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.03.002>
- He, Y., Li, B., Du, J., Cao, S., Liu, M., Li, X., Ren, D., Wu, X., & Xu, D. (2022). Development of pH-responsive absorbent pad based on polyvinyl alcohol/agarose/anthocyanins for meat packaging and freshness indication. *International Journal of Biological Macromolecules*, 201, 203–215. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.171>
- Hematian, F., Baghaei, H., Mohammadi Nafchi, A., & Bolandi, M. (2023). Preparation and characterization of an intelligent film based on fish gelatin and *Coleus*

- scutellarioides anthocyanin to monitor the freshness of rainbow trout fish fillet. *Food Science and Nutrition*, 11(1), 379-389. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3068>
- Hematian, F., Baghaei, H., Mohammadi Nafchi, A., & Bolandi, M. (2023). Preparation and characterization of an intelligent film based on fish gelatin and *Coleus scutellarioides* anthocyanin to monitor the freshness of rainbow trout fish fillet. *Food Science and Nutrition*, 11(1), 379-389. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3068>
- Hu, Y. R., Ma, H., Zou, Z. Y., He, K., Xiao, Y. B., Wang, Y., Feng, M., Ye, X. L., & Li, X. G. (2017). Activation of Akt and JNK/Nrf2/NQO1 pathway contributes to the protective effect of coptisine against AAPH-induced oxidative stress. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 85, 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.biopHa.2016.11.031>
- Jamróz, E., Kulawik, P., Krzyściak, P., Talaga-Ćwiertnia, K., & Juszczak, L. (2019). Intelligent and active furcellaran-gelatin films containing green or pu-erh tea extracts: Characterization, antioxidant and antimicrobial potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 745–757. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.008>
- Janseerat, Kolekar, M., Reddy, C. S., Sharma, S., & Roy, S. (2024). Anthocyanin-based natural color induced intelligent food packaging sensor: a review. *Current Food Science and Technology Reports*, 2(2), 157–167. <https://doi.org/10.1007/s43555-024-00021-z>
- Jin, T., He, M., Li, N., He, Y., & He, F. (2025). Protective effects of sinensetin against oxidative stress damage induced by AAPH in the brain-gut. *Free Radical Research*, 59(5), 409–425. <https://doi.org/10.1080/10715762.2025.2514799>
- Jomlapeeratikul, P., Poomsa-Ad, N., Wiset, L., & Borompichaichartkul, C. (2014). The effects of drying temperatures and oil contents on properties of biodegradable film

from konjac flour. *Thai Society of Agricultural Engineering Journal Research Paper*, 2(2).

- Kan, J., Liu, J., Yong, H., Liu, Y., Qin, Y., & Liu, J. (2019). Development of active packaging based on chitosan-gelatin blend films functionalized with Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida*) fruit extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, 140, 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.155>
- Kang, M. C., Cha, S. H., Wijesinghe, W. A. J. P., Kang, S. M., Lee, S. H., Kim, E. A., Song, C. B., & Jeon, Y. J. (2013). Protective effect of marine algae pHlorotannins against AAPH-induced oxidative stress in zebrafish embryo. *Food Chemistry*, 138(2–3), 950–955. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.005>
- Kankaynar, M., Ceyhun, H. A., Baran, A., Sulukan, E., Yildirim, S., Bolat, İ., Toraman, E., Nadaroglu, H., Arslan, M., & Ceyhun, S. B. (2023). The anxiolytic and circadian regulatory effect of agarwood water extract and its effects on the next generation; zebrafish modelling. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 269. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109621>
- Kim, E. A., Lee, S. H., Ko, C. I., Cha, S. H., Kang, M. C., Kang, S. M., Ko, S. C., Lee, W. W., Ko, J. Y., Lee, J. H., Kang, N., Oh, J. Y., Ahn, G., Jee, Y. H., & Jeon, Y. J. (2014). Protective effect of fucoidan against AAPH-induced oxidative stress in zebrafish model. *Carbohydrate Polymers*, 102(1), 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.022>
- Kim, H.-S., Wang, L., Priyan, I., Fernando, S., Je, J.-G., Ko, S.-C., Kang, M. C., Jeong, & Lee, M., Yim, M.-J., Jeon, J., & Lee, D.-S. (2020). Antioxidant efficacy of (–)-loliolide isolated from *Sargassum horneri* against AAPH-induced oxidative

- damage in Vero cells and zebrafish models in vivo. *Journal of Applied Phycology*, 32, 3341–3348 <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02154-9>/Published
- Kiziltan, T., Baran, A., Kankaynar, M., Şenol, O., Sulukan, E., Yildirim, S., & Ceyhun, S. B. (2022). Effects of the food colorant carmoisine on zebrafish embryos at a wide range of concentrations. *Archives of Toxicology*, 96(4), 1089–1099. <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03240-2>
- Ko, S. C., Lee, M., Lee, J. H., Lee, S. H., Lim, Y., & Jeon, Y. J. (2013). Dieckol, a pHlorotannin isolated from a brown seaweed, *Ecklonia cava*, inhibits adipogenesis through AMP-activated protein kinase (AMPK) activation in 3T3-L1 preadipocytes. *Environmental Toxicology and PHarmacology*, 36(3), 1253–1260. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.10.011>
- Korukluoglu, M., Sahan, Y., & Yigit, A. (2008). Antifungal properties of olive leaf extracts and their phenolic compounds. *Journal of Food Safety*, 28(1), 76-87. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2007.00096.x>
- Kumar, N., Bhandari, P., Singh, B., & Bari, S. S. (2009). Antioxidant activity and ultra-performance LC-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for phenolics-based fingerprinting of Rose species: *Rosa damascena*, *Rosa bourboniana* and *Rosa brunonii*. *Food and Chemical Toxicology*, 47(2), 361-367. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.11.036>
- Lee, H. G., Nagahawatta, D. P., Yang, F., Jayawardhana, H. H. A. C. K., Liyanage, N. M., Lee, D. S., Lee, J. M., Yim, M. J., Ko, S. C., Kim, J. Y., An, H., Baek, K., Jeon, Y. J., & Kim, H. S. (2023). Antioxidant potential of hydrolysate-derived seahorse (*Hippocampus abdominalis*) peptide: Protective effects against AAPH-induced oxidative damage in vitro and in vivo. *Food Chemistry*, 407. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135130>

- Legradi, J., el Abdellaoui, N., van Pomeran, M., & Legler, J. (2014). Comparability of behavioural assays using zebrafish larvae to assess neurotoxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(21), 16277–16289. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3805-8>
- Li, D., Wang, P., Luo, Y., Zhao, M., & Chen, F. (2017). Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: Update from recent decade. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(8), 1729–1741. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1030064>
- Li, L., Huang, T., Tian, C., Xiao, Y., Kou, S., Zhou, X., Liu, S., Ye, X., & Li, X. (2016). The defensive effect of pHellodendrine against AAPH-induced oxidative stress through regulating the AKT/NF- κ B pathway in zebrafish embryos. *Life Sciences*, 157, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.05.032>
- Li, T., Li, J., Hu, W., & Li, X. (2013). Quality enhancement in refrigerated red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets using chitosan coatings containing natural preservatives. *Food Chemistry*, 138(2-3), 821-826. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.092>
- Liang, T., Sun, G., Cao, L., Li, J., & Wang, L. (2018). Rheological behavior of film-forming solutions and film properties from *Artemisia spHaerocepHala* Krasch. gum and purple onion peel extract. *Food Hydrocolloids*, 82, 124–134. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.055>
- Liang, T., Sun, G., Cao, L., Li, J., & Wang, L. (2019). A pH and NH₃ sensing intelligent film based on *Artemisia spHaerocepHala* Krasch. gum and red cabbage anthocyanins anchored by carboxymethyl cellulose sodium added as a host complex. *Food Hydrocolloids*, 87, 858–868. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.028>

- Liu, J., Song, Z., Wang, Y., Pei, Y., & Tang, K. (2025). Edible films based on fish gelatin and soluble soybean polysaccharide enriched with tea polyphenol for active food packaging. *Polymers*, 17(16). <https://doi.org/10.3390/polym17162174>
- Liu, J., Wang, H., Guo, M., Li, L., Chen, M., Jiang, S., Li, X., & Jiang, S. (2019). Extract from *Lycium ruthenicum* Murr. Incorporating κ -carrageenan colorimetric film with a wide pH-sensing range for food freshness monitoring. *Food Hydrocolloids*, 94, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.008>
- Liu, J., Zhang, L., Liu, C., Zheng, X., & Tang, K. (2021). Tuning structure and properties of gelatin edible films through pullulan dialdehyde crosslinking. *LWT*, 138. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110607>
- Ma, W., Tang, C. H., Yin, S. W., Yang, X. Q., Wang, Q., Liu, F., & Wei, Z. H. (2012). Characterization of gelatin-based edible films incorporated with olive oil. *Food Research International*, 49(1), 572–579. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.037>
- Moghadam, M., Salami, M., Mohammadian, M., & Emam-Djomeh, Z. (2021). Development and characterization of pH-sensitive and antioxidant edible films based on mung bean protein enriched with *Echium amoenum* anthocyanins. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(4), 2984–2994. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-00872-3>
- Mushtaq, M., Gani, A., Gani, A., Punoo, H. A., & Masoodi, F. A. (2018). Use of pomegranate peel extract incorporated zein film with improved properties for prolonged shelf life of fresh Himalayan cheese (Kalari/kradi). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 48, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.04.020>

- Musso, Y. S., Salgado, P. R., & Mauri, A. N. (2019). Smart gelatin films prepared using red cabbage (*Brassica oleracea* L.) extracts as solvent. *Food Hydrocolloids*, 89, 674–681. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.036>
- Nazmi, N. N., Isa, M. I. N., & Sarbon, N. M. (2017). Preparation and characterization of chicken skin gelatin/CMC composite film as compared to bovine gelatin film. *Food Bioscience*, 19, 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.07.002>
- Nur Hanani, Z. A., Roos, Y. H., & Kerry, J. P. (2014). Use and application of gelatin as potential biodegradable packaging materials for food products. *International Journal of Biological Macromolecules*, 71, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.04.027>
- Odeyemi, O. A., Alegbeleye, O. O., Strateva, M., & Stratev, D. (2020). Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2), 311–331. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12526>
- Oh, J. Y., Kim, E. A., Kang, S. I., Yang, H. W., Ryu, B., Wang, L., Lee, J. S., & Jeon, Y. J. (2020). Protective effects of fucoidan isolated from celluclast-assisted extract of undaria pinnatifida sporophylls against AAPH-induced oxidative stress in vitro and in vivo zebrafish model. *Molecules*, 25(10). <https://doi.org/10.3390/molecules25102361>
- Öz, M., Baltacı, C., & Deniz, İ. (2018). Gümüşhane yöresi kuşburnu (*Rosa canina* L.) ve siyah kuşburnu (*Rosa pimpinellifolia* L.) meyvelerinin c vitamini ve şeker analizleri. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. <https://doi.org/10.17714/gumusfenbil.327635>
- Pashazadeh, H., Özdemir, N., Zannou, O., & Koca, I. (2021). Antioxidant capacity, phytochemical compounds, and volatile compounds related to aromatic property

- of vinegar produced from black rosehip (*Rosa pimpinellifolia* L.) juice. *Food Bioscience*, 44. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101318>
- Pourreza, N., & Golmohammadi, H. (2015). Application of curcumin nanoparticles in a lab-on-paper device as a simple and green pH probe. *Talanta*, 131, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.063>
- Qiao, C., Ma, X., Zhang, J., & Yao, J. (2017). Molecular interactions in gelatin/chitosan composite films. *Food Chemistry*, 235, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.045>
- Qin, Y., Liu, Y., Zhang, X., & Liu, J. (2020). Development of active and intelligent packaging by incorporating betalains from red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel into starch/polyvinyl alcohol films. *Food Hydrocolloids*, 100. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105410>
- Rambabu, K., Bharath, G., Banat, F., Show, P. L., & Cocolletzi, H. H. (2019). Mango leaf extract incorporated chitosan antioxidant film for active food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 1234–1243. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.196>
- Ranjbar, M., Azizi Tabrizzad, M. H., Asadi, G., & Ahari, H. (2023). Investigating the microbial properties of sodium alginate/chitosan edible film containing red beetroot anthocyanin extract for smart packaging in chicken fillet as a pH indicator. *Heliyon*, 9(8). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18879>
- Rashed, K., Ćirić, A., Glamočlija, J., & Soković, M. (2014). Antibacterial and antifungal activities of methanol extract and phenolic compounds from *Diospyros virginiana* L. *Industrial Crops and Products*, 59, 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.021>

- Rastilantie, M.-, Türkben, C., Uylaşer, V., İncedayı, B., & Çelikkol, I. (2010). *www.world-food. Agriculture & Environment*, 8(1).
- Rathod, N. B., Nirmal, N. P., Pagarkar, A., Özogul, F., & Rocha, J. M. (2022). Antimicrobial impacts of microbial metabolites on the preservation of fish and fishery products: a review with current knowledge. *Microorganisms*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040773>
- Roy, S., & Rhim, J. W. (2021). Anthocyanin food colorant and its application in pH-responsive color change indicator films. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(14), 2297-2325. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1776211>
- Sancakli, A., Basaran, B., Arican, F., & Polat, O. (2021). Effects of bovine gelatin viscosity on gelatin-based edible film mechanical, physical and morphological properties. *Applied Sciences*, 3(1). <https://doi.org/10.1007/s42452-020-04076-0>
- Shen, H., Quan, H., Cai, Y., Lu, Y., Yu, P., Lan, X., & Guo, X. (2025). The potential regulation mechanism of lily extracts responds to AAPH induced oxidative stress in zebrafish. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 11. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2025.100290>
- Sökmen, T. Ö., Sulukan, E., Türkoğlu, M., Baran, A., Özkaraca, M., & Ceyhun, S. B. (2020). Polystyrene nanoplastics (20 nm) are able to bioaccumulate and cause oxidative DNA damages in the brain tissue of zebrafish embryo (Danio rerio). *NeuroToxicology*, 77, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.12.010>
- Suhag, R., Kumar, N., Petkoska, A. T., & Upadhyay, A. (2020). Film formation and deposition methods of edible coating on food products: A review. *Food Research International*, 136. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109582>
- Sulkan, E., Köktürk, M., Ceylan, H., Beydemir, Ş., Işık, M., Atamanalp, M., & Ceyhun, S. B. (2017). An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body

- malformations during embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 180, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.018>
- Thivya, P., Bhosale, Y. K., Anandakumar, S., Hema, V., & Sinija, V. R. (2021). Development of active packaging film from sodium alginate/carboxymethyl cellulose containing shallot waste extracts for anti-browning of fresh-cut produce. *International Journal of Biological Macromolecules*, 188, 790–799. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.039>
- Ulusoy, A., & Tamer, C. E. (2019). Determination of suitability of black carrot (*Daucus carota* L. spp. sativus var. atropurpureus Alef.) juice concentrate, cherry laurel (*Prunus laurocerasus*), blackthorn (*Prunus spinosa*) and red raspberry (*Rubus idaeus*) for kombucha beverage production. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(2), 1524-1536. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00068-w>
- Ünal, E., Sulukan, E., Şenol, O., Baran, A., Nadaroğlu, H., Kankaynar, M., Kızıltan, T., & Ceyhan, S. B. (2023). Antioxidant/protective effects of carob pod (*Ceratonia siliqua* L.) water extract against deltamethrin-induced oxidative stress/toxicity in zebrafish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 267. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109584>
- Wang, F., Wang, R., Pan, Y., Du, M., Zhao, Y., & Liu, H. (2022). Gelatin/chitosan films incorporated with curcumin based on photodynamic inactivation technology for antibacterial food packaging. *Polymers*, 14(8). <https://doi.org/10.3390/polym14081600>
- Wang, L., Lee, W. W., Yang, H. W., Ryu, B. M., Cui, Y. R., Lee, S. C., Lee, T. G., & Jeon, Y. J. (2018). Protective effect of water extract of citrus pomace against AAPH-induced oxidative stress in vitro in Vero cells and in vivo in zebrafish.

- Preventive Nutrition and Food Science*, 23(4), 301–308.
<https://doi.org/10.3746/pnf.2018.23.4.301>
- Wang, L., Yang, C., Deng, X., Peng, J., Zhou, J., Xia, G., Zhou, C., Shen, Y., & Yang, H. (2023). A pH-sensitive intelligent packaging film harnessing *Dioscorea zingiberensis* starch and anthocyanin for meat freshness monitoring. *International Journal of Biological Macromolecules*, 245.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125485>
- Wang, Y., Ju, J., Diao, Y., Zhao, F., & Yang, Q. (2025). The application of starch-based edible film in food preservation: a comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 65(14), 2731–2764.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2024.2349735>
- Yan, J., He, S., Chen, L., Chen, H., & Wang, W. (2023). Characterization, antioxidant and antibacterial activities of gelatin-chitosan edible coated films added with *Cyclocarya paliurus* flavonoids. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127664>
- Yang, Q. Q., Zhang, D., Farha, A. K., Yang, X., Li, H. Bin, Kong, K. W., Zhang, J. R., Chan, C. L., Lu, W. Y., Corke, H., & Gan, R. Y. (2020). Phytochemicals, essential oils, and bioactivities of an underutilized wild fruit Cili (*Rosa roxburghii*). *Industrial Crops and Products*, 143.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111928>
- Yong, H., Liu, J., Qin, Y., Bai, R., Zhang, X., & Liu, J. (2019). Antioxidant and pH-sensitive films developed by incorporating purple and black rice extracts into chitosan matrix. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137, 307–316. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.009>

- Yu, D., Cheng, S., Li, Y., Su, W., & Tan, M. (2024). Recent advances on natural colorants-based intelligent colorimetric food freshness indicators: fabrication, multifunctional applications and optimization strategies. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 64, Issue 33, pp. 12448–12472). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2252904>
- Zhang, J., Zou, X., Zhai, X., Huang, X. W., Jiang, C., & Holmes, M. (2019). Preparation of an intelligent pH film based on biodegradable polymers and roselle anthocyanins for monitoring pork freshness. *Food Chemistry*, 272, 306–312. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.041>
- Zhang, W., Chen, J., Chen, Y., Xia, W., Xiong, Y. L., & Wang, H. (2016). Enhanced physicochemical properties of chitosan/whey protein isolate composite film by sodium laurate-modified TiO₂ nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 138, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.031>
- Zheng, Y., Geng, Y., Hou, W., Li, Z., Cheng, C., Wang, X., & Yang, Y. (2024). Study on the Antifungal Activity of Gallic Acid and Its Azole Derivatives against *Fusarium graminearum*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 29(9). <https://doi.org/10.3390/molecules29091996>
- Zoupa, M., & Machera, K. (2017). Zebrafish as an alternative vertebrate model for investigating developmental toxicity—the triadimefon example. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4). <https://doi.org/10.3390/ijms18040817>

EKLER

EK-1. Etik Bildirim ve İntihal Beyan Formu

	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ Graduate School of Health Sciences	
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU¹		
Öğrencinin Adı ve Soyadı	Meltem ÖZER	
Öğrencinin Numarası		
Ana Bilim Dalı	Veterinerlik Gıda Hijyeni ve Teknolojisi	
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Yüksek Lisans	
Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.		
Bölümler	Benzerlik Oranı	Maksimum Benzerlik Oranları
I. Giriş	% 12	% 15
II. Genel Bilgiler	% 2	% 35
III. Materyal ve Metod	% 18	% 35
IV. Bulgular	% 8	% 15
V. Tartışma	% 0	% 20
Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.		
¹ Bu form, bilimsel çalışmada kullanılan bütün kaynakların doğru şekilde atfedilmesi için Ekler kısmına EK-1 olarak eklenmelidir.		

EK-2. Etik Kurul Onay Formu



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Sağlık Bilimleri Etik Kurulu Başkanlığı
Veteriner Fakültesi Birim Etik Kurulu



Sayı : E-83169208-000-2400318500
Konu : Birim Etik Kurul Kararı.

30.09.2024

DAĞITIM YERLERİNE

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı, Besin Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Alper BARAN yürütücülüğünde yapılacak olan "**Akıllı Ambalajlamada Kullanılması İçin Rosa Pimpinellifoli L Antosiyaninleri İçeren Jelatin Bazlı Kolorimetrik Gösterge Geliştirilmesi**" isimli bilimsel araştırma çalışması ile ilgili Veteriner Fakültesi Birim Etik Kurulunun 27.09.2024 tarihli toplantısında alınan 2024/29 sayılı Kararı ekte gönderilmiştir.

Gereğini bilgilerinize arz ve rica ederim.





T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
Birim Etik Kurul Kararı

Karar Sayısı : 2024/29

Karar Tarihi : 27/09/2024

Atatürk Üniversitesi Besin Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Alper BARAN'ın yürütücülüğünde, Veteriner Fakültesi Besin Gıda Hijyeni ve Teknolojisi laboratuvarında ve Su Ürünleri Fakültesi Dekanlığı, Su Ürünleri Deneyisel Araştırmalar Biriminde yapılacak olan "**Akıllı Ambalajlamada Kullanılması İçin Rosa Pimpinellifoli L Antosiyaninleri İçeren Jelatin Bazlı Kolorimetrik Gösterge Geliştirilmesi**" isimli bilimsel tez çalışması ile ilgili Veteriner Fakültesi Besin Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü Başkanlığı'nın 25.09.2024 tarihli ve E-36643897-199-2400312526 sayılı yazısı ve ekindeki Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Birim Etik Kurulu (AÜVFBEK) Başvuru Formu, Taahhütname belgeleri ve Hayvan Deneyleri Etik Kurulunun 28.07.2017 tarih ve 75296309-050.01.04-E-1700212431 sayılı yazısına ait belgeler Kurulumuz tarafından değerlendirilmiştir.

Yapılan değerlendirmede; adı geçen bilimsel çalışmanın yürütülmesinin, Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi ilkesine UYGUN olduğuna, Taahhütname hükümlerine göre, çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesine, alınan kararın Rektörlük Makamına (Hukuk Müşavirliğine) ve ilgili öğretim üyesine bildirilmesine, mevcut oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa ÇELİK (Başkan)

Prof. Dr. Mustafa ÇELİK

Prof. Dr. Mustafa ÇELİK