

**T.C
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ARI ÜRÜNLERİNİN GIDA AMBALAJLAMADA POTANSİYEL
KULLANIMININ İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEDANUR AŞAN

GIDA GÜVENLİĞİ ANABİLİM DALI

**TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi DILHUN KERİMAN ARSERİM UÇAR**

BİNGÖL-2023



T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ARI ÜRÜNLERİNİN GIDA AMBALAJLAMADA POTANSİYEL
KULLANIMININ İNCELENMESİ**

Dr. Öğr. Üyesi Dilhun Keriman ARSERİM UÇAR danışmanlığında, Sedanur AŞAN tarafından hazırlanan bu çalışma 13/09/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Güvenliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ramazan SOLMAZ *İmza* :

Üye : Doç. Dr. Özgür TARHAN *İmza* :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Dilhun Keriman ARSERİM UÇAR *İmza* :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun/...../..... tarih ve/.....
nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zafer ŞİAR
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP ve TÜBİTAK 1002-B projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: BAP-FBE.2023.001, TÜBİTAK 123O602

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

ÖNSÖZ

Uzun ve sabır gerektiren bir yolculuk olan tez çalışma sürecimdeki çok değerli katkıları, paylaştığı bilgi birikimi, göstermiş olduğu sonsuz sabır, hoşgörü ve anlayıştan dolayı değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Dılhun Keriman ARSERİM UÇAR'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin deneysel çalışmalarında laboratuvarında desteğini esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi İnan DURSUN, Öğr. Gör. Ali SİNAN ve ASE ekstraksiyonu için sağladığı destekten dolayı Dr. Öğr. Üyesi Veysel SÜZERER ve Diyetisyen Fırat AYUS'a teşekkürlerimi sunarım. Parçacık boyutu analizleri için bana destek olan Dr. Elif ÇAVDAROĞLU'na değerli katkılarından dolayı teşekkür ederim. SEM analizleri için desteğini esirgemeyen Öğr. Gör. Dr.Serhat KOÇYİĞİT'e teşekkür ederim.

Bingöl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (Proje No: BAP-FBE-2023.001) ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), TÜBİTAK-ARDEB 1002-B Acil Destek Modülü'ne (Proje No: TÜBİTAK-1230602) desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi her türlü desteklerini esirgemeyen ve beni destekleyen sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Sedanur AŞAN

Bingöl 2023

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Gıda Ambalajlama	1
1.2. Gıda Ambalajlamada Potansiyel Nanofiber Uygulamaları.....	3
1.3. Gıda Ambalajlamada Pullulan	5
1.4. Nanopartikül Sentezi.....	6
1.5. Gümüş Nanopartikül Sentezi	7
1.6. Gıda Ambalajlamada Nanopartikül Uygulamaları.....	9
1.7. Arı Ürünleri/Propolis	11
1.8. Hızlandırılmış Solvent Ekstraksiyonu ASE.....	12
1.9. DeneY Tasarımı/ Yanıt Yüzey Yöntemi.....	12
2. KAYNAK ÖZETLERİ	14
2.1. Propolis Gümüş Nanopartiküller.....	14
2.2. Gıda Ambalajlamada Pullulan	16
2.3. Bu Tez Çalışmasının Özgünlüğü, Kapsamı ve Hedefleri	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1. Materyal	21
3.2. Propolis Sulu Ekstraktının Hazırlanması	21
3.3. Gümüş Nanopartiküllerin Üretimi ve Optimizasyonu	22
3.4. Sulu Propolis Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	23

3.5. Sulu Propolis Ekstraktı Gümüş Nanopartiküllerin Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	24
3.6. ASE Propolis Ekstraktının Hazırlanması	25
3.7. ASE Propolis Ekstraktı ile Gümüş Nanopartiküllerin Üretilmesi ve Karakterizasyonu	25
3.8. Gümüş Nanopartikül/Propolis/AgNP Elektroskopun Nanofiber Filmlerin Üretimi	25
3.9. Pullulan Elektroskopun Nanofiber Filmlerin Karakterizasyonu	27
3.10. Pullulan Elektroskopun Nanofiber Filmlerin Antimikrobiyal Özellikleri	27
3.11. İstatistiksel Değerlendirme ve Optimizasyon	27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	28
4.1. Sulu Propolis Ekstraktı ile Gümüş Nanopartiküllerin Optimizasyonu	28
4.1.1. Optimize Şartlarda Üretilen AgNP ve Propolis Ekstraktlarının UV-VIS Spektrum Analizleri	32
4.1.2. Optimize Şartlarda Üretilen AgNP'lerin ve Propolis Ekstraktlarının SEM, TEM ve EDX Analizleri Ekstraktının SEM, TEM ve EDX Analizleri.....	34
4.1.3. Optimize Şartlarda Üretilen AgNP'lerin ve Propolis Ekstraktlarının FTIR Spektrumu Analizleri.....	36
4.1.4. Optimize Şartlarda Üretilen AgNP ve Propolis Ekstraktlarının TGA Analizleri.....	37
4.1.5 Optimize Şartlarda Üretilen AgNP'lerin XRD Analizleri.....	38
4.1.6.Optimize Şartlarda Üretilen AgNP'lerin DLS Analizleri.....	39
4.1.7. AgNP'ler ve Propolis Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları.....	41
4.2. ASE ile Ekstrakte Edilmiş Propolis Gümüş Nanopartikül/Propolis Katkılı Elektroskopun Nanofiber Filmlerin Üretimi ve Karakterizasyonu	43
4.2.1. ASE ile Ekstrakte Edilmiş Propolis Gümüş Nanopartikül/Propolis Katkılı Elektroskopun Nanofiber Filmlerin SEM Analizleri	43
4.2.2.ASE ile Ekstrakte Edilmiş Propolis Gümüş Nanopartikül/Propolis Katkılı Elektroskopun Nanofiber Filmlerin FTIR Analizleri.....	44
4.2.3. ASE ile Ekstrakte Edilmiş Propolis Gümüş Nanopartikül/Propolis	

Katkılı Elektrospun Nanofiber Filmlerin TGA Analizleri	46
4.2.4. ASE ile Ekstrakte Edilmiş Propolis Gümüş Nanopartikül/Propolis	
Katkılı Elektrospun Nanofiber Filmlerin XRD Analizleri	47
4.2.5. ASE ile Ekstrakte Edilmiş Propolis Gümüş Nanopartikül/Propolis	
Katkılı Elektrospun Nanofiber Filmlerin Antibakteriyel Analizleri	49
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ.....	64

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

°C	:Santigrat Derece
%	:Yüzde
dk	:Dakika
mg	:Miligram
g	:Gram
N	:Normal
mM	:Milimolar
SP	:Sulu Propolis
Ag	:Gümüş
AgNP	:Gümüş Nanopartikül
SP-AgNP	:Sulu Propolis Gümüş Nanopartikül
ASEP	:Hızlandırılmış Solvent Ekstarksiyonu İle Propolis
ASE-AgNP	:Hızlandırılmış Solvent Ekstarksiyonu İle Gümüş Nanopartikül
PCF	:Elektrospun Pullulan Kontrol Nanofiber Film
PAgNPF	:Elektrospun Pullulan AgNP Nanofiber Film
PPF	:Elektrospun Pullulan Propolis Nanofiber Film
PAgNP-PF	:Elektrospun Pullulan AgNP/Propolis Nanofiber Film
PKF	:Elektrospun Pullulan çok Katmanlı Nanofiber Film
PULL	:Pullulan
ENF	:Elektrospun Nanofiber Film
AgNO ₃	:Gümüş Nitrat
RSM	:Yanıt Yüzey Yöntemi
FCCCD	:Merkezli Merkezi Kompozit Tasarım
CCD	:Merkezi Kompozit Dizayn
BBD	:Box-Behnken Tasarımı
SEM	:Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	:Geçirimli Elektron Mikroskobu
FTIR	:Fourier Transform Infrared Spektroskopisi

XRD	:X-ışınları Kırınım
MİK	:Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
TSB	:Tryptik Soy Broth
MHB	:Mueller Hinton Agar

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Bu tez çalışmasında kullanılan elektrospin cihazı	9
Şekil 3.1.	Gümüş partikül sentezi.....	22
Şekil 3.2	Sulu gümüş nanopartikül optimizasyonu.....	23
Şekil 3.3.	Çalışmada kullanılan ASE ekstraksiyon cihazı	25
Şekil 3.4.	Gümüş nanopartikül/propolis/AgNP elektrospin nanofiber film üretimi	26
Şekil 4.1.	Gümüş nitrat konsantrasyonlarının (mM) ve farklı pH'lardaki sulu propolis ekstratlarının sulu propolis AgNP'lerin zeta potansiyel değeri üzerine etkisinin yanıt yüzey grafiği	31
Şekil 4.2.	Farklı süre ultrasonik ses dalgaları uygulamalarının ve farklı pH'lardaki sulu propolis ekstratlarının sulu propolis AgNP'lerin zeta potansiyel değeri üzerine etkisinin yanıt yüzey grafiği	31
Şekil 4.3.	Optimum şartlarda sulu propolis ekstraktı ile üretilmiş AgNP'lerin Uv-vis absorpsiyon spektrumları.....	32
Şekil 4.4.	Optimum şartlarda ASE propolis ekstraktı ile üretilmiş AgNP'lerin UV-vis. absorpsiyon spektrumları.....	33
Şekil 4.5.	Optimum şartlarda sulu propolis ekstraktı ile üretilmiş AgNP'lerin a) 100 000x b) 400 000X büyütmede SEM görüntüleri ve c) SEM-EXD grafiği.....	35
Şekil 4.6.	SP-AgNP'lerin a) 200 nm ve b) 100 nm' de TEM görüntüleri	35
Şekil 4.7.	Optimum şartlarda ASE-AgNP'lerin a) 100 000x b)200 000b büyütmede SEM görüntüleri.....	36
Şekil 4.8.	Optimize şartlarda üretilen SP-AgNP'lerin ve sulu propolis (SP) ekstraktının FTIR spektrumu.....	37
Şekil 4.9.	Optimize şartlarda üretilen SP-AgNP'lerin ve sulu propolis (SP) ekstraktının termogravimetrik analiz ağırlık kaybı grafikleri.....	38

Şekil 4.10.	Optimum şartlarda üretilen SP-AgNP'lerin X-ışını kırınımı (XRD) analizi.....	39
Şekil 4.11.	Optimum şartlarda sulu propolis ekstraktı ile üretilmiş SP-AgNP'lerin parçacık boyutu	40
Şekil 4.12..	Optimum şartlarda ASE propolis ekstraktı ile üretilmiş ASE-AgNP'lerin parçacık boyutu	40
Şekil 4.13.	A) Pullulan AgNP film (PAgNPF), B) Pullulan AgNP-propolis film (PAgNP-PF), C) Pullulan propolis film (PPF) D) Pullulan kontrol film (PCF)	44
Şekil 4.14.	Pullulan elektrospun nanofiber filmlerin FTIR spektrumu.....	46
Şekil 4.15.	ASE AgNP, ASEP, TW ve toz haldeki pullulan polimerinin FTIRspektrumu.....	46
Şekil 4.16.	Optimize şartlarda üretilen ASEAgNP'lerin ve nanofiberlerin TGA analizi.....	47
Şekil 4.17.	Optimize şartlarda üretilen ASEAgNP'lerin ve nanofiberlerin XRD analizi	48
Şekil 4.18	Optimize şartlarda üretilen ASE-AgNP'lerin X-ışını kırınımı (XRD) analizi	49

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1.	Pulluan ile yapılan aktif ambalaj çalışmaları	6
Tablo 1.2.	Gıdalar için yaygın olarak kullanılan metalik nanopartiküller	9
Tablo 3.1.	Box-Behnken deney tasarımı şartları	22
Tablo 3.2.	Elektrospun nanofiber filmler ve kodları	26
Tablo 4.1.	BBD Dizayn optimizasyon tablosu	29
Tablo 4.2.	SP-AgNP'lerinin ve sulu propolis ekstraktının MİK değerleri.....	42
Tablo 4.3.	ASE-PAgNP'lerinin ve ASE propolis ekstraktının MİK değerleri.....	42
Tablo 4.4.	Elektrospun nanofiber filmlerin antibakteriyel analizleri	50

ARI ÜRÜNLERİNİN GIDA AMBALAJLAMADA POTANSİYEL KULLANIMININ İNCELENMESİ

ÖZET

Tüketicilerin kaliteli ve güvenli gıda farkındalığındaki artış gıdaların kalitesinin korunması için akıllı ve aktif gıda ambalajlama sistemlerinin gelişmesine neden olmuştur. Ambalaj, birçok gıda ürününün kalitesini, güvenliğini ve raf ömrünü belirlemede kritik rol oynamaktadır. Metal ve metal nanopartiküller aktif ambalajlamada son yıllarda antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerinden dolayı kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, aktif gıda ambalajlama sistemleri için gümüş nanopartiküller ve propolis içeren çok katmalı elektrospun nanofiber filmler ile yeni bir konsept geliştirmektir.

Bu çalışma 2 bölümden oluşmaktadır, çalışmanın birinci bölümünde sulu propolis ekstraktı kullanılarak yeşil sentez yöntemi ile gümüş nanopartiküllerin (AgNP) üretim koşulları Box-Behnken Design (BBD) deney tasarımı ile optimize edilmiştir. Sulu propolis ekstraktı kullanılarak optimize edilen şartlarda hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu (ASE) ekstraktı ile gümüş nanopartiküller üretilmiştir. Üretilen gümüş nanopartiküller taramalı elektron mikroskopu (SEM), geçirimli elektron mikroskopu (TEM), X-ışınları difraksiyon analizi (XRD), termogravimetrik analiz (TGA) ve Fourier transform infrared (FTIR) spektroskopisi kullanılarak karakterize edilmiştir. Karakterizasyon sonuçlarına göre her iki ekstrakt ile gümüş nanopartiküller (AgNP) başarılı bir şekilde üretilmiştir. Antimikrobiyal özellikte, kristal yapıda ve termal kararlılığı yüksek nanometre boyutlarında AgNP'ler üretilmiştir. Bu çalışmanın ikinci bölümünde ise, aktif gıda ambalaj uygulamaları için ASE-AgNP ve ASE propolis içeren pullulan tabanlı nanofiber yapıda çok katmanlı elektrospun nanofiber film geliştirilmiştir.

Nanofiber filmlerin karakterizasyon çalışmalarına göre nanofiber yapıdaki, ASE-AgNP ve ASE propolis ekstraktı enkapsüle edilmiş elektrospun nanofiberlerin termal kararlılığının ASE-AgNP ve ASE propolis ekstraktlarından daha yüksek olduğu görülmüştür. Antimikrobiyal özellikte geliştirilen elektrospun pullulan AgNP nanofiber film (PAgNPF) test edilen Gram (-) bakterileri, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *P.aurogenes* ve Gram (+) bakterileri, *B. cereus*, *S. aureus*, *L. innocua* karşı antimikrobiyal etkinlik göstermiştir. Elektrospun pullulan propolis nanofiber film (PPF), elektrospun pullulan AgNP /propolis nanofiber film (PAgNP-PF), elektrospun pullulan çok katmanlı nanofiber filmler (PKF) ise sadece Gram (+) bakterileri, *B. cereus*, *S. aureus*, *L. innocua* karşı antimikrobiyal etkinlik göstermiştir. Bu çalışmada, AgNP, AgNP/propolis ve propolis ekstraktı içeren pullulan bazlı elektrospun nanofiber filmler geliştirilmiştir. Geliştirilen bu filmlerin, gıda güvenliği uygulamalarına yönelik yenilikçi bir gıda ambalajı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Propolis, pullulan, gümüş nanopartikül, yeşil sentez, gıda ambalajı

INVESTIGATION OF THE POTENTIAL USE OF BEE PRODUCTS IN FOOD PACKAGING

ABSTRACT

Consumer demands for safe and high-quality food products result in the development of intelligent and active packaging concepts to increase food quality and safety. Packaging plays a critical role in maintaining and protecting food safety and quality. Metal and metal nanoparticles have recently been used in active packaging due to their antimicrobial and antioxidant properties. This study aims to develop a new concept for active food packaging systems as multilayer electrospun nanofiber films containing silver nanoparticles and propolis.

This study consists of two parts. In the first part of this study, the production conditions of silver nanoparticles (AgNP) by green synthesis method using aqueous propolis extract were optimized by Box-Behnken Design (BBD). Aqueous propolis extract experimental design optimized conditions were used to produce ASE-AgNPs. The produced silver nanoparticles were characterized by scanning electron microscope (SEM), transmission electron microscope (TEM), X-ray diffraction analysis (XRD), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), and thermogravimetric analysis (TGA).

According to the characterization results, silver nanoparticles (AgNPs) were successfully developed with both propolis extracts. AgNPs were produced with antimicrobial properties, crystal structure, and high thermal stability in nanometer sizes. In the second part of this study, ASE-AgNP and ASE propolis containing pullulan-based multilayered electrospun nanofiber films were developed for active food packaging applications. Regarding the nanofiber characterization studies, the thermal stability of the ASE-AgNP and ASE propolis containing pullulan films was higher than that of the pure ASE-AgNP and ASE propolis extracts. The electrospun nanofiber films containing ASE-silver nanoparticle (PAgNP) exhibited antibacterial activity against Gram (-) bacteria, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *P.aurogenes*, and Gram (+) bacteria, *B. cereus*, *S. aureus*, *L. innocua*. Electrospun pullulan propolis nanofiber film (PPF), electrospun pullulan ASE-AgNP/propolis nanofiber film (PAgNP-PF), and electrospun pullulan multilayer nanofiber films (PKF) showed antibacterial activity only against Gram (+) bacteria, including *B. cereus*, *S. aureus*, and *L. innocua*. In this study, multilayer pullulan-based electrospun nanofiber films containing AgNPs and propolis extract were developed via electrospinning method. These developed films have the potential to be used for innovative food packaging systems for food safety applications.

Keywords: Propolis, pullulan, silver nanoparticle, green synthesis, food packaging

1. GİRİŞ

Günümüzde değişen yaşam koşulları tüketicilerin minimum düzeyde işlenmiş, kolayca hazırlanabilen ve yenmeye hazır taze gıda ürünlerine olan talebi artırmıştır (Kowsalya et al. 2019). Artan dünya nüfusu ve kentleşme ile birlikte sağlıklı ve besleyici gıdaya olan talep ile birlikte gıda güvenliği de çok önem kazanmıştır (Agarwal et al. 2023). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi'nin raporuna göre her yıl gıda kaynaklı hastalıklar nedeni ile birçok insanın hastalandığını veya hastalığın ölümlere neden olduğu rapor edilmiştir (CDC, 2023).

Tüketicilerin organik ve güvenli/kaliteli gıdalara olan taleplerinin artması gıda muhafaza için yeni teknolojilerin uygulanmasına yol açmıştır. Gıda ambalajlama, gıda tedarik zincirinin kritik bir parçası olup, gıdanın hazırlanması, taşınması, depolanması gibi tüm tedarik zinciri boyunca gıdayı fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal bozunmalara karşı üretimden tüketime kadar, gıda kalitesi ve güvenliği için birçok avantaj sağlamaktadır (Bahrami et al. 2020; Yildirim et al. 2018).

1.1. Gıda Ambalajlama

Geleneksel ambalajların koruyucu rolü pasif olup, gıdayı çevreleyen atmosfer ve dış çevre arasında bir bariyer görevi görüp, gıda ürünü içindeki reaksiyonları aktif olarak kontrol etme özelliğine sahip değildir (Khaneghah et al. 2018; Yildirim et al. 2018). Aktif ambalajlama, doğal veya sentetik antimikrobiyal/antioksidan ajanlar içeren gıda ambalajları olup gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatmak için tasarlanmış yenilikçi ambalajlardır (Khaneghah et al. 2018; Roy Priyadarshi, and Rhim, 2021).

Gıdalar işleme, dağıtım ve taşıma sırasında fiziksel, kimyasal ve biyolojik kirlenme, oksidasyon, nem değişimi ve fiziksel hasara karşı korunmalıdır. Gıda ambalajının en temel görevi gıdayı bir bariyer olarak dış etkenlerden korumaktır (Pal et al. 2019). Gıdaların bozulması önlemek ve kalitesi korumak için cam, kağıt ve biyolojik olarak parçalanabilen geleneksel ambalajlar kullanılmaktadır (Agarwal et al. 2023).

Ambalaj malzemeleri olarak literatürde gıda ambalaj sistemlerinin geliştirilmesinde çoğunlukla polisakkaritler ve protein kaynaklı doğal malzemeler kullanılmıştır. Hayvansal kaynaklı polisakkarit olan kitosan gibi, bitkisel kaynaklı; nişasta, sodyum aljinat, karragenan, selüloz ve türevleri, pektin ve agar gibi ve ayrıca mikrobiyal polisakkaritler; ksantan sakızı, pullulan, guar sakızı ve akasya sakızı gibi polimer kullanılmıştır (Grzebieniarz et al. 2023).

Aktif paketlenme ile, ambalaj malzemesine eklenen aktif maddelerin gıdayı UV, oksijen, etilen veya mikrobiyolojik kontaminasyondan korunması amaçlanmıştır. Aktif ambalajlama sistemleri, istenmeyen nem, karbondioksit, oksijen, etilen ve diğer maddeler gibi süpürme sistemleri (emici) ve karbondioksit, antimikrobiyal ve antioksidan gibi bileşiklerin ambalaj sistemlerine salındığı aktif salınım sistemlerinden oluşmaktadır (Yildirim et al. 2018; Nikolic et al. 2021).

Birçok sektörde olduğu gibi, gıda endüstrisinde de nanoteknoloji, gıda güvenliği, gıda işleme, gıda ambalajlama ve fonksiyonel gıdalar gibi alanlarda yenilikçi çözümler vaat eden bir teknolojidir (Arserim-Ucar, 2020; Mohammad et al. 2022). Nanoteknolojinin gıda ambalajlama, akıllı ambalajlama yüzeyleri için nanokaplama, antimikrobiyal nanopartikül ve nanokapsül içeren aktif gıda ambalajlama uygulamaları ile gıda ürününün kalitesini ve güvenliğini artırması özellikle gıdaların duyuşal ve kimyasal özelliklerini etkilemeden raf ömrünü uzatan yenilikçi gıda ambalajlarının gelişmesine neden olmuştur (Bajpai et al. 2018).

Gıda ambalajlamadaki yenilikçi uygulamaların birçoğu nanoteknolojik yapıların geliştirilmesine dayanmaktadır. Mikro yapılar en az bir boyut 0,1 μm ile 100 μm arasında Ulusal Nanoteknoloji Girişimi'ne (National Nanotechnology Initiative) göre nanoyapılar ise 1 nm - 100 nm arasındaki boyutlar olarak tanımlanmıştır (Messner et al. 2010; Tamjidi et al. 2013). Nanoyapıların benzersiz özellikleri sayesinde gıda ambalaj malzemesinin performansını, yapısını ve işlevselliğini iyileştirdiği bildirilmektedir (Roy et al. 2021).

Nanopartiküller aktif ambalajlamada son yıllarda antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerinden dolayı kullanılmaktadır, ancak gıda ambalaj malzemesinin tasarlanmasında nanopartikülün boyutu, işlevselliği, yapısı ve yüzey alanı gibi özellikleri ayrıca kritik rol oynamaktadır (Arserim-Ucar and Çabuk, 2020).

Metal iyonları; gümüş, bakır, altın, platin ve metal oksitleri; titanyum dioksit, çinko oksit, magnezyum oksit antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerinden dolayı gıda ambalajlamada polimerik nanokompozitler ile aktif dolgu ajanı olarak kullanılan en yaygın nanomateryallerdir (Moura et al. 2012; Yildirim et al. 2018).

Özellikle gümüş nanopartiküller (AgNP'ler) anti-bakteriyel, anti-mantar, anti-maya ve anti-viral aktiviteye sahip ajanlar olarak teknolojik birçok alanda kullanım alanı buldukları gibi aktif gıda ambalajlamada da yer bulmuşlardır (Moura et al. 2012; Munteanu et al. 2014; Carbone et al. 2016; Vijayaram et al. 2023).

1.2. Gıda Ambalajlamada Potansiyel Nanofiber Uygulamaları

Gıda ambalajı, gıda üretim ve tüketimi açısından gıda ürününün önemli unsurlarından biridir (Alizadeh-Sani et al. 2020). Gıda kaynaklı hastalıklara karşı koruma, antimikrobiyal gıda ambalajlamasının gelişmesine neden olmuştur (Carbone et al. 2016). Antimikrobiyal özelliklere sahip gıda ambalajları, gıda ürünlerini kontamine edecek patojenik ve bozulma yapan mikroorganizmaların gelişimini önlemek ya da geciktirmek için geliştirilmişlerdir (Priyadarshi, Zohreh and Jong, (2022).

Antimikrobiyal ajanlar olarak yağlar, bitki ekstraktları, mikrobiyal yan ürünler, organik asitler ve tuzları, enzimler, bakteriosinler, oksijen ve gaz absorbe edici ajanlar, inorganik metaller olmak üzere birçok antimikrobiyal ajan kullanılmaktadır (Malhotra et al. 2015). Antimikrobiyal bileşiklerin doğrudan gıda ile karıştırılması yerine, ambalaj malzemelerine enkapsüle edilmesi veya ilave edilmesi, mikrobiyal kontaminasyonun ve bozulmanın başladığı gıda yüzeylerinde antimikrobiyal/antioksidan etki göstererek fonksiyonel bir etki sağlamaktadır (Amna et al. 2015).

Elektro-eğirme, mikro-nano ölçekli film ve fiberlerin üretimi için düşük maliyetli, çok yönlü bir teknik olup kısaca, polimer solüsyonu, şırınga, metalik iğne, metal toplayıcı ve güç kaynağından oluşan basit bir düzenekten oluşmaktadır (Arserim-Uçar and Çabuk, 2020).

Elektroeğirme tekniği, nanofiber yapıda filmler ve kompozit malzemeler üretmek için tek aşamalı, basit ve etkili bir yöntem olduğu için hem akademik hem de endüstriyel alanda bilim insanları arasında büyük ilgi uyandıran ve araştırma yapılan bir yöntem olmuştur (Islam and Yeum, 2013). Kompozit nanoyapılı fiber filmlerin yanı sıra tek katmanlı, iki katmanlı ve çok katmanlı nanofiber kaplamalar ve biyo ara katmanlara dayalı fonksiyonel gıda ambalajlama için farklı konseptler geliştirilmiştir (Fabra et al. 2013; Grzebieniarz et al. 2023). Literatürde yapılan bazı çalışmalar ise; termoplastik mısır nişastasası ve poli(3-hidroksibütirat) (PHB) selüloz nanokristalleri içeren elektrospun nanofiber ile çok katmanlı gıda ambalajı geliştirmiştir (Fabra et al. 2016). PHBV (3%HV) dış katman ve iç katman protein olarak zein ve peynir altısuyu ve polisakkarit olarak pullulan mikro nano yapılı elektrospun fiber katmanlı filmler geliştirilmiştir (Fabra et al. 2014).

Wen et al. (2016), çalışmasında elektrospinning yöntemi ile tarçın uçucu yağı enpasüle edilmiş β -siklodekstrin/poli(vinil alkol) nanofiberlerin *S. aureus* ve *E. coli* bakterine karşı antibakteriyel etki gösterdiğini saptamıştır. Antibakteriyel özellikteki fonksiyonel nanofiberlerin 6 gün boyunca 4 °C ve 21±2 °C'de depolanmış çileklerin kalitesini, kaplanmamış çileklere göre daha iyi korunduğu görülmüştür (Wen et al. 2016).

Kitosan nanopartikülleri içeren poli(vinil alkol) nanofiberlerin balık toplarında mikrobiyal ve kimyasal bozulmayı geciktirdiği görülmüştür. Bu çalışma sonuçları geliştirilen nanofiberlerin balık kalitesini korumak için yenilikçi bir uygulama olabileceğini göstermiştir (Ceylan et al. 2018).

Resveratrol enkapsüle edilmiş jelatin/zein antimikrobiyal aktiviteye sahip nanofiberler geliştirilmiştir (Li et al. 2020). Geliştirilen anofiberler ile ambalajlanan domuz eti 4 °C'de 12 gün depolanarak mikrobiyal ve toplam uçucu bazik azot analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre resveratrol içeren jelatin/zein nanofiberler kaplamalarının domuz etlerinin kalitesini korunması ve raf ömrününün uzatılmasında etkili olabileceği sonucuna varılmıştır (Li et al. 2020).

Eugenol enkapsüle edilmiş jelatin nanofiberlerin taze sığır etinin kalitesinin korunmasında ve raf ömrününün uzatılmasında etkili olabileceği, 4 °C'de 11 günlük depolama süresindeki mikrobiyolojik analiz (toplam mezofilik aerobik bakteri sayısı ve toplam psikrofilik bakteri sayısı) sonuçlarına göre görülmüştür (Yılmaz et al. 2022) .

Üzüm çekirdeği yağı enkapsüle edilmiş poli(vinil alkol) nanofiberlerin balık ve kaşar peynirinin depolama süresince kalitesinin korunmasında alternatif bir yaklaşım olabileceği, çalışmanın mikrobiyolojik ve kimyasal analiz sonuçların göre görülmüştür (Ceylan et al. 2021).

Karboksimetil kitosan/polioksietilen oksit nanofiberler oda sıcaklığında 6 gün boyunca depolanan çileklerin kontrol ürününe göre kalitesinin korunduğu gözlemlenmiştir. Geliştirilen karboksimetil kitosan/polioksietilen oksit nanofiberlerin taze meyve muhafazasında kullanılabilme potansiyelinin olduğu görülmüştür (Yue et al. 2018).

1.3. Gıda Ambalajlamada Pullulan

Pullulan *Aureobasidium pullulans* in fermantasyonu ile üretilen ticari olarak değerli, suda çözünebilen mikrobiyal bir polimer ve ticari olarak polimorfik bir yöntemle üretilen bir α -glukandır (Singh and Kennedy, 2008; Singh et al. 2023). Pullulan US-FDA tarafından GRAS (Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen) olarak sınıflandırılmış bir biyopolimerdir. GRAS statüsü, film oluşturma ve taşıyıcı ajan gibi ayırt edici özellikleri sayesinde endüstriyel kullanım için önemli bir polimerdir (Singh et al. 2023). Pullulan ve farklı polimerler pullulan ile birlikte kompozit elektrospon fiber filmler geliştirilmiştir. Celebioglu and Uyar, (2021) tarafından antioksidan özellikte eugenol- γ CD kompleksi içeren pullulan nanofiber film geliştirilmiştir.

Karanfil ektratu enkapsüle edilmiş pullulan ve peyniraltı suyu proteini ile üretilmiş antimikrobiyal ve antiosidan özellikteki nanofiberlerin gıda muhafaza amaçlı ambalaj ve kaplama materyali olarak kullanılma potansiyeli olduğu rapor edilmiştir (Zambak and Özkal, 2022). Literatürde pullulan polimeri ile üretilmiş çalışmalar Tablo 1.1’de özetlenmiştir.

Tablo 1.1. Pullulan ile yapılan aktif ambalaj çalışmaları

Biyopolimer/ Karışım	Aktif Ajan	Özellik	Gıda Uygulaması	Üretim Yöntemi	Referans
WPI/Pullulan	-	Kalite, raf ömrü	Çin kestanesi	Yenilebilir kaplama	(Gounga et al. 2008)
Pullulan/ Jelatin	Karvakol	Antioksidan, antibakteriyel aktivite	Balık Yağı	Elektrospinnig	(Ertan et al. 2023)
Kitosan/Pullulan	Öjenol	Antioksidan, antibakteriyel aktivite, raf ömrü	Et (domuz eti) muhafazası	Yenilebilir film (dökme yöntemi), kaplama	(Zeng et al. 2023)
Pullulan- karboksimetil kitosan/PEO	Nisin	Antibakteriyel aktivite, raf ömrü	Et (balık eti) muhafazası	Elektrospinning	(Duan et al. 2023)
Kitosan/Pullulan	Fisetin- AgNP	Antioksidan, antibakteriyel aktivite, raf ömrü	Taze meyve (Lichi meyvesi) raf ömrü	Yenilebilir film (dökme yöntemi), kaplama	(Qi et al. 2023)

1.4. Nanopartikül Sentezi

Biyolojik olarak parçalanabilen atık ve biyokütleden yararlanabilmenin bir yolu da yeşil sentez yolu ile nanopartikül oluşumu için ucuz ve sürdürülebilir hammadede olarak kullanmaktır (Aswathi et al. 2023). Nanopartiküller için fiziksel, kimyasal ve yeşil sentez olmak üzere üç farklı sentez yöntemi geliştirilmiştir. Fiziksel metotlar ile nanopartikül sentezinde pahalı ekipmanlar, yüksek sıcaklık ve yüksek basınç gerekmektedir. Kimyasal metotlar ile nanopartikül sentezinde ise çevreye ve canlılara ciddi zararlar verebilecek toksik kimyasallar kullanılmaktadır. Fiziksel ve kimyasal sentezin dezavantajlarından dolayı bu metotların yerini çevre-canlı dostu ve daha ucuz bir yöntem olan yeşil sentez almıştır. Nanopartiküllerin yeşil sentezi için bitkiler, bakteriler, mantarlar, algler gibi çeşitli doğal moleküller içeren biyolojik kaynaklar kullanılmaktadır (Kumar et al. 2021).

Nanopartikül sentezi için biyolojik kaynak olarak *Capsicum annuum* ekstrakt (Li et al. 2007), Afrika menekşesinin (*Saintpaulia*) yaprak özütü (Korkmaz, 2019), kırmızı ıspanak (*Amaranthus Tricolor*) yaprak özütü (Fatimah et al. Aftrid, 2019), karnabahar özü (*cauliflower* ekstraktı), propolis (Priyadarshini, 2018; Barbosa et al. 2019), polen (Khatami et al. 2017) ve polimer olarak pullulan (Ganduri et al. 2016) kullanılmıştır.

Metalik nanopartiküllerin sentezi için çevreye zarar vermeyen yeşil sentez yöntemleri geliştirilmiştir. Nanopartiküllerin boyutu, morfolojisi, stabilitesi ve özellikleri deney koşullarının optimizasyonu ile kontrol edilebilmektedir, bu yüzden nanopartikül sentezlenmesinde sentez deney tasarımının etkisi üretilecek son ürün özellikleri açısından çok önemli olduğu bildirilmiştir (Sharma et al. 2009). Metal; Ag, Au, Fe₃O₄, ZnO ve metal oksit nanopartiküller; TiO₂, MgO ve CuO insan hücrelerine karşı düşük toksisite ve antimikrobiyal özellikleri nedeni ile gıda ambalajlama çalışmalarında kullanılmıştır (Basavegowda, Mandal and Baek, 2020).

1.5. Gümüş Nanopartikül Sentezi

Gümüş nanaopartiküllerin (AgNP'ler) sentezinde hidrotermal yöntem, solvent ekstraksiyonu, sol-jel yöntemi, mikrodalga destekli nanopartikül sentezi, ıslak öğütme yöntemleri ve yeşil sentez yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır (Aswathi et al. 2023). Fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılarak üretilen metal nanopartiküllerin toksisite kaygısı, sağlık zararları ve çevre dostu olmamalarından dolayı bu yöntemlerin kullanımını sınırlandırmaktadır (Istiqola, 2020). Metal nanopartiküllerin ve oksitlerinin yeşil sentez metodu ile üretilmesi çevre dostu ve düşük toksisite değerlerinden dolayı geleneksel kimyasal yöntemlere alternatif olmaktadır (Nie, Zhao, Xu, 2023). Çevre dostu, güvenli, etkili ve düşük maliyetli olan yeşil sentez diye adlandırılan yöntemde bitki ekstraktları ve mikroorganizmalar (bakteri, algler, mantarlar vb) nanopartikül üretimi için indirgeyici ve stabilize edici ajanlar olarak kullanılmaktadır (Chandra et al. 2020; Nie, Zhao, Xu, 2023).

AgNP'lerin yeşil sentezi, çözücü ortamı, çevre ile dost indirgeyici ajan ve toksik olmayan maddelerin seçimi gibi üç önemli ana basamaktan oluşmaktadır. (Sharma et al. 2009). Yeşil sentez üretiminde muz kabuğu, hindistancevizi, yumurta, yer fıstığı, mango, soğan, nar, pirinç, demirhindibağ gibi birçok doğal kaynak atıkları nanopartikül üretiminde kullanılmıştır (Aswathi et al. 2023). Uygun gıdalar için uygun nanoparçacıkların ilave edilmesiyle mekaniksel, termal ve bariyer özellikleri daha güçlü olmaktadır. Kullanım alanları oldukça yaygın olan gümüş nanopartiküller antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinden dolayı gıda ambalajlarında nanokompozitler en yaygın dolgun materyali olarak kullanılan nanometeryallerdir (Zeng et al. 2023). AgNP bazlı antimikrobiyal ambalajlama, gıdaların raf ömrünü uzatmada ve patojen riskini azaltmada önemli bir rol oynayan, gelecek vaat eden bir aktif gıda ambalajlama şeklidir (Carbone et al. 2016).

Madhuca latifolia yağı kek estraktı kullanılarak üretilen gümüş nanopartiküllerin boyutlarının 2-30 nm arasında değiştiği, zeta potansiyel değerinin -30 mV olduğu 5 mg/L, 10 mg/L ve 20 mg/L konsantrasyonlarda elde edilen nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve *S.aureus*, *S.Faecalis*, *L.monocytogenes*, *E.coli* ve *S.Thyphimurium* bakterilerine karşı ise antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Biswal and Misra, 2020).

Yeşil sentez yöntemi ile *Nymphae odorata* bitki özütünün indirgeyici olarak kullanılarak üretilen AgNP'lerin boyutlarının 20 nm olduğu ve *E.coli* ve *S.aureus* bakterilerine karşı antibakteriyel özellik gösterdiği görülmüştür (Gudimalla et al. 2021). Farklı bir çalışmada Sabapathi et al. (2023), *Cassia auriculate* bitki ekstraktı ile kullanılarak üretilen AgNP'lerin küresel morfolojide, boyutlarının 54±2,8 nm olduğu saptanmıştır. Üretilen AgNP'ler *S.epidermis*, *P.aeruginosa*, *V.cholerae* ve *E.coli* bakterilerine karşı antibakteriyel etki ve 25, 50, 75, 100, 125 ve 150 µg/mL konsantrasyondaki AgNP'lerin antioksidan etki gösterdiği gözlemlenmiştir (Sabapathi et al. 2023).

AgNP'lerin toksisiteleri hakkında gıdada kullanılma beyanı AB ve ABD de kesin bir düzenleme bulunmamasıyla birlikte toksisite değeri gıdaya Ag⁺ iyonlarının geçiş limiti üzerinden değerlendirilmektedir (Carbone et al. 2016; Mackevica and Emil, 2016). AgNP'lerin toksik etkileri boyutlarına, şekillerine, yüzey yüklerine ve kaplamalarına göre farklılık gösterir (Waktole, 2023).

Tablo 1.2. Gıdalar için yaygın olarak kullanılan metalik nanopartiküller

Yaygın Metalik Nanopartiküller	Sembol
Altın	Au
Nikel	Ni
Çinko	Zn
Gümüş	Ag

Elektroegirme cihazı basit olarak üç bölümden oluşur: yüksek voltajlı bir güç kaynağı, bir şırınga pompası ve bir toplayıcıdan oluşmaktadır. Toplayıcı, hareket edebilen veya sabit olabilen çeşitli tiplerde olabilir (Ahmed et al. 2015; Hajikhani and Lin, 2022).



Şekil 1.1. Bu tez çalışmasında kullanılan elektrospin cihazı

1.6. Gıda Ambalajlamada Nanopartikül Uygulamaları

Metal ve metal oksit nanopartiküllerin kolay üretim yöntemleri, güvenli ve uygun maliyetli olması ve antimikrobiyal antioksidan özellik göstermeleri aktif ve akıllı gıda ambalajlamada nanomalzemler olarak kullanılmasında etkili olmuştur (Nikolic et al. 2021). Nanopartiküller gıdanın korunması, muhafazası ve raf ömrünün artırılmasında çok önemli rol oynamaktadırlar (Dos Santos, Ingle and Rai, 2020). Aktif ve akıllı gıda ambalajlamada metal ve metal oksit nanopartiküller antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri ile birlikte ambalaj mazemesinin mekanik, termal ve bariyer özelliklerini de iyileştirme özelliklerinden dolayı kullanılmaktadır (Nikolic et al. 2021; Batista et al. 2023).

Bakteriyostatik gümüş nanopartiküller ve CuO, ZnO, TiO₂, MgO ve Fe₃O₄ gibi inorganik oksitlenmiş nanopartiküllerin gıda kaynaklı patojenlere karşı etkili olmaları nanomalzeme tabanlı gıda ambalaj sistemlerine katılmasına neden olmuştur (Huang et al. 2018). Gıda teknolojisinde nanopartiküller, gümüş nanopartiküller ile geliştirilmiş filmler ve hidrojeller, bakır nanopartiküller ile üretilmiş yenilikçi gıda ambalajları, altın nanopartiküllerin sensör olarak kullanıldığı akıllı gıda paketleme sistemleri, hibrit metal polimer sistemleri ve biyonanokompozitlerin üretimi gibi çok farklı uygulamalar ile gıda muhafaza alanındaki avantajları son yıllarda büyük önem kazanmıştır (Dos Santos, Ingle and Rai, 2020).

Elektrospinning yöntemi ile üretilen zeytinyağı ve çinko oksit içeren hibrit pristine poliüretan nanofiberlerin *S. aureus* ve *S. typhimurium* karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği, geliştirilen nanofiberlerin et ve et ürünleri için ambalaj malzemesi olarak kullanılabilmesi öngörülmüştür (Amna et al. 2015). Altın, SnO₂ ve siyah mürver ekstraktı ile geliştirilen jelatin nanofiberlerin Hake balıklarının tazeliğinin kontrolü için akıllı ambalajlamada kullanılabilmesi görülmüştür (Cetinkaya et al. 2024). Gıda ambalaj uygulamaları için geliştirilen antibakteriyel ve antioksidan özellikteki selüloz, sodyum aljinat ve bakır oksit nanopartikülleri içeren filmlerin taze hasat edilmiş sarı dolmalık biberlerin raf ömrünü uzattığı görülmüştür (Saravanakumar et al. 2020).

Kowsalya et al. (2019) yaptığı çalışmada *Vitis vinifera*, *Carica papaya*, and *Citrullus lanatus* kullanılarak yeşil sentez yolu ile üretilen gümüş nanopartikül katkılı elektropun poly(vinil) alkol nanofiberler limon ve çileğin raf ömrünü uzatmak için kullanılmıştır. Yapılan çalışmada kaplanan ürünlerin 10 gün sonra bozulmadığı ve tazeliğini kabul edilebilir düzeyde koruduğu gözlemlenmiştir (Kowsalya et al. 2019). Marra et al. (2016), yaptığı çalışmada ise %5 çinko oksit (ZnO) içeren Polilaktik asit (PLA) filminin mekanik, CO₂ ve O₂ geçirgenlik özelliklerini iyileştirdiği ve *E.coli* bakterisine karşı antibakteriyel özellik gösterdiği bildirilmiştir. Yang et al. (2023) tarafından yapılan çalışmada ise aktif gıda ambalajlama için polivinil alkol (PVA) polimerine gümüş nanopartiküller katılmıştır. AgNP'lerin üretimi için sıvı faz kimyasal indirgeme metodu ve stabilizatör olarak kitosan polimeri kullanılmıştır. Bu çalışma sonuçları % 0,04 AgNP içeren PVA filmlerin çileklerin kalitesini depolama süresince kontrol örneklerine göre koruduğu göstermiştir (Yang et al. 2023).

Gümüş nanopartikül üretimi için *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus crustorum*, ve *Lactobacillus spicheri* bakterilerinin ürettiği bakteriosin kullanılmıştır. Bakteriyosin ile üretilmiş gümüş nanopartiküller selüloz kağıt kaplamasında kullanılmıştır. Gümüş nanopartikül içeren selüloz kağıt ile depolanmış domateslerin kalitesinin kontrol örnekler ile kıyaslandığında daha iyi ve raf ömrünün daha uzun olduğu kanıtlanmıştır (Sharma, Sharma and Kaushal, 2023).

1.7. Arı Ürünleri / Propolis

Propolis, bal arıları (*Apis mellifera L.*) tarafından kavak, palmye ve çam gibi çeşitli bitki sap ve köklerinden topladıkları reçinemsî bir maddedir (Anjum et al. 2019). Arılar kovanlarını yabancı maddelerden korumak için propolisi kullanmışlardır. Propolis %50 bitki reçineleri, %30 mumlar, %10 esansiyel yağlar, %5 polen ve %5 diğer maddelerden oluşmaktadır (Hossain et al. 2022). Propolisin antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser gibi biyokatif özellikleri propolisin yapısındaki biokatif bileşenden kaynaklanmaktadır. Ana bileşenler flavonlar, flavonoller, flavanon ve dihidroflavonoidler ile fenilpropanoid türevlerini içerir (Pobiega et al. 2019). Propolisin içeriği, arı ırkına, toplandığı bölgenin coğrafi konumuna, bitki çeşitliliğine, mevsime ve gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir (Arserim-Ucar et al. 2020; Hossain et al. 2022).

Gıda endüstrisinde propolis, güçlü antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelere sahip polifenol bakımından zengin ekstrakt elde etmek için çeşitli klasik ve yenilikçi yöntemler ve bu yöntemler ile birlikte farklı solventler kullanılmaktadır. Propolis ekstraksiyon işlemleride genellikle maserasyon tekniği ile klasik ekstraksiyon yöntemi ile çözücü olarak su, etanol, metanol, gibi birçok çözücü kullanılmıştır (Nagai et al. 2003; Ahn et al. 2004; Basim and Musa, 2006). Maserasyon tekniğinin yanı sıra doğal derin ötektik çözücüler (NADES) (Funari et al. 2019), mikrodalga yardımı ile ekstraksiyon, ve yenilikçi işleme teknolojileri süper kritik CO₂ ekstraksiyonu (Fachria et al. 2017; De Zordi et al. 2014) ultrason destekli ekstraksiyon (Yuan et al. 2019), hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu (Charland et al. 2021a), gibi teknolojiler de kullanılmaktadır.

1.8. Hızlı Solvent Ekstraksiyon Yöntemi (ASE)

Propolis ekstraksiyonu için, hızlı solvent ekstraksiyon yöntemi (ASE) yenilikçi, çevre dostu, daha az solvent kullanılan ve sıcaklık, basınç kontrolü yapılabildiği için özellikle sıcaklığa duyarlı biyoaktif bileşenleri elde etmek için daha verimli, etkili ve daha hızlı uygun bir yöntem olduğu yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Monroy et al. 2017; Charland et al. 2021b; Hutnik, Phillips and Mojica, 2022). ASE tekniğinde oda sıcaklıklarında yüksek basınç uygulanarak gerçekleştirilebilmesi, sıcaklığın ekstraksiyon sırasında yükseldiği mikrodalga ve ultrason destekli uygulamalar ile kıyaslandığında büyük avantajı sağladığı birçok çalışmada rapor edilmiştir (Charland et al. 2021b).

Charland et al. (2021b), yaptıkları çalışmada maserasyon yöntemi, mikrodalga destekli, ultrason destekli ekstraksiyon ve hızlı solvent ekstraksiyon yöntemleri karşılaştırılmıştır. En yüksek antioksidan aktivite sırası ile, mikrodalga destekli, ultrason destekli ekstraksiyon, maserasyon yöntemi ve hızlı solvent ekstraksiyon yöntemi olduğu görülmüştür. En yüksek fenol içeriği mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminde en düşük ise maserasyon yöntemi ile elde edilmiştir (Charland et al. 2021b). Propolis ekstraksiyonu için ASE yönteminin kullanıldığı çalışmada ekstraksiyon için 40 °C, 50 °C ve 60°C sıcaklıkların kullanıldığı çalışmada sıcaklık 40°C'den 60°C'ye artırıldığında daha fazla fenolik bileşenin elde edildiği ve elde edilen ekstraktların daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği saptanmıştır (Hutnik, Phillips and Mojica, 2022).

1.9. Deneysel Tasarım/ Yanıt Yüzey Yöntemi

Yanıt yüzey yöntemi, deneysel tasarımların parametrelerinin optimizasyon çalışmaları için kullanılan istatistiksel bir yöntemdir (Koç and Kaymak-Ertekin, 2003). Yanıt yüzey yöntemi, AgNP'lerin optimizasyonu için birçok farklı araştırmacı tarafından kullanılmıştır (Chowdhury et al. 2016; Krupa et al. 2016; Jahan, Erci and Isildak, 2021).

Chowdhury et al. (2016) yaptığı çalışmada AgNP'lerin üretim parametrelerinin optimizasyonu için yüz merkezli merkezi kompozit tasarım (FCCCD)'a dayalı yanıt yüzey yöntemi (RSM) kullanılmıştır. Gümüş nitrat ve trisodyum sitrat konsantrasyonu ve karıştırma süresi değişken faktörler olarak kullanılmıştır. RSM sonuçlarına göre optimum nokta %1 trisodyum sitrat, 1 mM gümüş nitrat konsantrasyonu (AgNO_3) ve 15 dakika karıştırma süresi olarak bulunmuştur ve bu optimum şartlarda en yüksek AgNP verimi %26,26 olarak elde edilmiştir (Chowdhury et al. 2016).

Gümüş nanopartiküllerin optimizasyonu için proses parametreleri olan gümüş nitrat konsantrasyonu, inokulum miktarı, sıcaklık, zaman ve pH merkezi kompozit dizayn (CCD) kullanılarak çalışma yapılmıştır (İbrahim et al. 2021). Bu çalışmanın CCD sonuçlarına göre optimum nokta AgNO_3 konsantrasyonu 1mM, *B.cereus* inokulum miktarı 8,7 mL, sıcaklık 48,5, süre 69 saat ve pH 9 olarak belirlenmiştir. Optimum noktada üretilen AgNP'lerin antimikrobiyal ve antioksidan gösterdiği görülmüştür.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Propolis Gümüş Nanopartiküller

Keskin et al. (2022) yaptıkları çalışmada Bilecik ilinden topladıkları propolisi %70 glikol ile ekstrakte etmişlerdir. Propolis ekstraktı ve eşit hacimli 5 mm AgNO₃ reaksiyonu sonucu 425 nm'de maksimum absorbands vererek 67-75 nm boyutunda propolis gümüş nanopartiküller (AgNP'ler) üretilmiştir.

Beyaz propolis ekstraktı ile yapılan farklı bir çalışmada gümüş nanopartikül üretimi için Box-Behnken deney dizaynı kullanılarak üretilmiştir (Tosun ve Kaplan, 2022). Deney tasarımı sonucunda, AgNP'lerin üretimi için 10 mM AgNO₃ konsantrasyonu, propolis AgNO₃ oranı 0:3, mikrodalga gücü 150 watt ve 35 saniye optimize koşullar olarak belirlenmiştir. Optimize şartlarda üretilen beyaz propolis AgNP'lerin maksimum absorbands 420 nm'de, boyutu 108,2 nm ve zeta potansiyel değeri -22,3 mV olarak belirlenmiştir (Tosun and Kaplan, 2022).

Priyadarshini et al. (2018) Amerika'da ticari olarak satılan propolis tozunun sulu ekstraktı ile yeşil sentez yöntemi ile üretilen AgNP'ler maksimum absorbands değerini 420 nm'de göstermiştir. TEM analiz görüntüleri ile nanopartiküllerin küresel ve iyi dağılmış olduğu ve boyutların 100 nm den küçük olduğu gözlemlenmiştir. Gümüş varlığı EDX analiz ile doğrulanmıştır.

Kırmızı Brezilya propolisinin etanol ekstraktı ile optimum şartlarda üretilen AgNP'lerin maksimum absorbands değeri üretimden 30 dk sonra 412 nm ve 24 saat sonra 420, nm olarak ölçülmüştür. Partikül boyutu ölçümlerinin ise üretimden 30 dak sonra 109±0,81 nm ve 24 saat sonra 81±1,07 nm olarak değişim gösterdiği gözlemlenmiştir. Propolis AgNP'lerin *S. aureus*, *S. epidermidis*, ve *P. aeruginosa* ve *E. coli* bakterilerine karşı antibakteriyel etki, *Candida albicans* ve *Cryptococcus neoformans* küflerine karşı ise antifungal etki gösterdiği görülmüştür (Barbosa et al. 2019).

Suudi propolislerinin sulu ekstraktı ile üretilen AgNP'lerin maksimum absorbands değeri 437 nm de ölçülmüştür. AgNP'lerin oluşumu kimyasal ve fiziksel karakterizasyon testleri ile doğrulanmıştır. Üretilen AgNP'lerin antimikrobiyal etkinliği test edilmiştir. *L. monocitogenes*, *S. typhmuriium*, *E.coli*, bakterilerine karşı üretilen AgNP'lerin antibakteriyel etki gösterdiği fakat *A.solani*, *Helminthosporium sp.oxysporum* küflerine karşı AgNP'lerin anti-fungal etki göstermediği görülmüştür (Al-Fakeh et al. 2021).

Hindistanın Tamilnadu bölgesinden toplanan propolisler su-etanol karışımı ile ekstrakte edilmiştir. Etanol-su propolis ekstraktı ile üretilen AgNP'ler 413 nm de absorbands gösterirken, etanolik propolis ekstraktının 265 nm absorbands göstermiştir. Ekstraktlardaki polifenoller ve flavonoidlerin AgNP'lerin oluşumu üzerine etkili olduğu rapor edilmiştir. SEM sonuçlarına göre AgNP'lerin boyutları 66-84 nm arasında değişirken, dinamik ışık saçılım spektrumlarına göre (DLS) sentezlenen gümüş nanopartiküller ortalama 91 nm ve homojen yapıda olduğu tespit edilmiştir. Üretilen AgNP'lerin 549 insan akciğerine karşı önemli antikanser aktivite gösterdiği görülmüştür (Kothai and Jayanthi, 2015).

Hindistanın Khanpur, U.S. Nagar, Uttarakhand-263153 bölgesinden toplanan propolisler ile farklı pH değerlerinde AgNP'ler üretilmiştir. pH:10,62'deki propolis etanol ekstraktları ile üretilen AgNP'lerin plasmon piki 421 nm, ve pH: 8,05'de ise plasmon piki 438 nm olarak ölçülmüştür. Propolis sulu ekstraktının pH: 10,62'de plasmon piki ise 418 nm olarak rapor edilmiştir. Üretilen PAgNP'lerin TEM analizi ile ölçülen boyutlarının 50 nm altında olduğu görülmüştür (Roy et al. 2010).

Mısırın Alwahasat bölgesinden toplanan propolislerin sulu ekstraktı ile yeşil sentez yolu ile üretilen PAgNP'lerin üretimi için değişen ekstrakt konsantrasyonlarında, değişen pH değerlerinde (3-9), farklı sıcaklıklarda (25°C, 35°C, 45°C, 55°C, 65°C, 75°C, 85°C) ve farklı reaksiyon sürelerinde (2 dk - 14 dk) UV-Visible spektra plazma rezonan (SPR) değerleri 420 ile 458 nm arasında değiştiği görülmüştür. TEM ve XRD analizlerine göre elde edilen nanaopartiküllerin boyutları 9,43 nm ve 11,39 nm arasında değişirken zeta potansiyel değeri -8,8 mv olarak ölçülmüştür. PAgNP'lerin *S.aureus* ve *E.coli* bakterilerine karşı antibakteriyel etki gösterdiği rapor edilmiştir (Mohamed, El-Naggar and Khalil, 2022).

Irak propolislerinin sulu ekstraktı ile AgNP üretimi için yapılan çalışmada, (1mM) gümüş nitrat: propolis ekstraktın 9:1 oranındaki 24 saat sonraki reaksiyonu sonrası üretilen propolis gümüş nanopartiküllerin UV-VIS spektrofotometrede maksimum absorbansı 428 nm olarak ölçülmüştür. SEM analizleri sonucuna göre üretilen AgNP'ler küresel yapıda ve boyutlarının 13 nm - 45 nm arasında değiştiği görülmüştür (Taqi et al. 2020).

2.2. Gıda Ambalajlamada Pullulan

Pullulan, suda çözünebilen, toksik olmayan, birçok aktif bileşen için taşıyıcı olma özelliği olan ve film/lif oluşturabilen doğal bir biyopolimerdir (Mulla et al. 2023). Gasti et al. (2022), yaptığı çalışmada karanfil esansiyel yağı/ kitosan-çinko oksit nanopartiküller içeren biyo-nanokompozit kitosan/pullulan filmler (CPCZC) geliştirmiştir. Bu çalışmada karanfil esansiyel yağı kitosan-çinko oksit nanopartiküllere enkapsüle edilmiştir. Aktif gıda paketlenme amacıyla geliştirilen film antioksidan aktivite gösterirken aynı zamanda *P. aeruginosa*, *S. aureus*, ve *E. coli* bakterilerine karşı antibakteriyel etki göstermiştir. Pullulan bazlı biyo-nanokompozit filmler tavuk filetoalarının paketlenmesi ve soğutma sıcaklıklarında (8 ± 2 °C) saklanması için kullanılmıştır. CPCZC film, kitosan/pullulan film ile kaplanmış filetoalar ve kaplanmamış filetoaların pH değişiklikleri depolama sırasında izlenmiş ve gıdanın bozulduğunun bir göstergesi olarak kullanılmıştır. Paketlenmemiş tavuğun pH'ı, 2 günlük depolamadan sonra hızlı bir şekilde yükselmeye başlarken, paketlenmiş numuneler için pH, 5 günlük depolamaya kadar standart taze tavuk pH aralığında (5,8-6) kalmıştır. Geliştirilen antioksidan özellikteki filmin lipitlerin/proteinlerin oksidasyonunu önleyerek gıda bozulmasını geciktireceği sonucuna varılmıştır.

Khalaf et al. (2013), çinko oksit nanopartiküller, gümüş nanopartiküller, kekik ve biberiye yağı içeren pullulan bazlı filmlerin hindi şarküteri etinin raf stabilitesi üzerindeki etkisini araştırmıştır. *L.monocytogenes* ve *S. aureus* inoküle edilmiş hindi şarküteri etinin 14 günlük depolama süresi boyunca yapılan mikrobiyal değerlendirmeler, gümüş nanopartiküller ve kekik esansiyel yağı ile birleştirilmiş pullulan filmlerinin buzdolabı koşullarında hindi şarküteri etinin raf ömrünü uzatmada daha etkili olduğunu göstermiştir.

Timol (THY) içeren porfirin metal-organik çerçeve nanopartiküllerini (PCNNP'ler) içeren pullulan-polivinil alkol (PUL/PVA) kompozit nanofiber film (THY@PCN/PULL/PVA) geliştirilmiştir. Geliştirilen kompozit THY@PCN/PULL/PVA nanofiberler çok çabuk bozulabilen iki gıda olan üzümlerin ve çileklerin yüzeyine uygulanmıştır. Kontrol üzüm ve çilek örneklerinde 7 günlük depolamanın sonucunda bozunma görülürken, ışıklı ve ışıksız ortamda kompozit THY@PCN/PULL/PVA nanofiberler uygulanan meyvelerin depolama süresi boyunca herhangi bir küf/bakteri büyümesi olmadan kalitesinin korunduğu bildirilmiştir (Min et al. 2021).

Roy et al. (2021), et paketlenme uygulamalarında kullanılmak amacıyla çinko oksit (ZnO) nanopartikülleri ve propolis ekstraktı içeren pullulan/kitosan bazlı aktif özellik gösteren nanokompozit gıda ambalajı geliştirmiştir. ZnO nanopartiküller *Enoki* mantarlarından yeşil sentez yöntemi ile üretilmiştir. ZnO nanopartiküllerin ve propolis ekstraktının geliştirilen filmin şeffaflığı üzerinde olumsuz etkilere neden olmadan mekanik özelliklerini ve UV bariyeri özelliklerini önemli ölçüde geliştirmiştir. Propolis ekstraktı ile nanokompozit filmin antioksidan aktivitesini artırılırken, ZnO nanopartiküllerin ise filmin antimikrobiyal etkinliğini artırması sağlamıştır. Geliştirilen kompozit film domuz etinin ambalajlanmasında kullanılmıştır. Kompozit pullulan/kitosan/ZnOPs/propolis film ile sarılmış etlerin, paketlenmeyen etlerle kıyaslandığında peroksit değerinin ve toplam aerobik mikroorganizma sayısının, istatistiksel olarak önemli ölçüde azaldığı görülmüştür.

Rastali ve Chakkarakeli muzlarına kalsiyum klorür ve limon suyu eklenen pullulan bazlı yenilebilir kaplamanın uygulanmasının (Depolama koşulu: 25 ± 1 °C, 20 gün boyunca %70 bağıl nem) kalite parametrelerini koruyarak muzların kalitesinin korunduğu ve pullulan formülasyonlarıyla kaplanmış iki muz çeşidinin, raf ömrünü 20 güne kadar uzattığı görülmüştür (Ganduri, 2020).

Kumar et al. (2020), yaptığı çalışmada, nar kabuğu ekstraktı ile zenginleştirilmiş kitosan-pullulan kompozit yenilebilir kaplamanın hasat sonrası Liçi meyvesine uygulamasında, kontrol örnekleriyle karşılaştırıldığında, 18 günlük oda (23 ± 3 °C, RH- %40–45) ve soğuk (4 ± 3 °C, RH %90-%95) saklama koşulları süresi boyunca Liçi meyvesinin fizyokimyasal ve organoleptik kalitesinin korunmasında etkili olduğunu ortaya konmuştur.

Bir diğer çalışmada, galangal esansiyel yağı (GEO) içeren karboksimetil kitosan (CMCS)/pullulan bazlı aktif bir yenilebilir film geliştirilerek mango meyvesi üzerindeki koruyucu etkisi test edilmiştir. CMCS/Pul-8 %GEO (toplam kuru maddenin %8'i w/w) filmi, 25 ± 1 °C'de 15 günlük depolama süresince mango meyvelerin ağırlık kaybı, sertliği, titre edilebilir asitliği, çözünür katı madde özelliklerinin korunduğu bulgulanmıştır. Ayrıca, kontrol örneklerle karşılaştırıldığında, film ile kaplanmış mango meyvelerinin oda sıcaklığında raf ömürlerinin 9 güne kadar uzadığı raporlanmıştır. (Zhou et al. 2021).

Raf ömrü kısa olan kestane üzerine yapılan bir çalışmada, peynir altı suyu proteini izolatu-pullulan (WPI-Pul) yenilebilir kaplamanın taze kavrulmuş kestane (FRC) ve kavrulmuş dondurularak kurutulmuş kestane (RFDC) kalitesi ve raf ömrü üzerindeki etkisi 2 farklı depolama sıcaklığı (4°C ve 20°C) koşullarında incelenmiştir. WPI-Pull kaplaması düşük sıcaklıklardaki saklama koşullarında kavrulmuş olan kestanelerde ve kavrulmuş ve dondurularak kurutulmuş olan kestanelerde mikrobiyal üremeyi geçiktirdiği ve kalite açısından yüzey renk değişimini kontrolünde olduğu raporlanmıştır (Gounga et al. 2008).

Priyadarshi, et al. (2022), tarafından *Vitis vinifera* üzüm çekirdeği ekstraktı (GSE) içeren biyoaktif pektin/pullulan (PEC/PUL) film geliştirilmiştir. Geliştirilen filmin *E. coli* ve *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu yenilebilir film ile kaplanan ve 30 gün oda sıcaklığında saklanan kavrulmuş ve kavrulmamış yer fıstıklarının peroksit değerinin kaplanmamış yer fıstıklarına göre %75 daha az olduğu saptanmıştır.

2.3. Bu Tez Çalışmasının Özgünlüğü, Kapsamı ve Hedefleri

1) Gıda kaybı ve atıkları küresel bir sorundur. Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) raporlarına göre Dünyada üretilen gıdaların % 30-40'ı atık ve israf ediliyor. Gıda tedarik zinciri içerisinde sürdürülebilir uygun ambalajlama teknolojileri ile gıda kaybı ve israfı önlenebilir. Geliştirilecek olan aktif (antimikrobiyal/antioksidan) ambalaj sistemi gıda güvenliğini sağlayarak gıda kayıplarının azaltılmasına alternatif olabilecek, aynı zamanda plastik ambalaj atıklarına alternatif güvenilir, biyo-bozunur çevreye dost bir ambalaj olacağından atıkların önlenmesi konusunda da alternatif bir çözüm için farklı bir yaklaşım geliştirilmiş olacaktır.

2) Gıda ambalajlama sistemlerinde kullanılan doğal bileşenlerin çoğu Gram (+) bakterilerine karşı etkinlik gösterirken Gram (-) bakterilerine karşı etkili ajanların sınırlı olması literatürde bir boşluktur. Bu amaçla geliştirilecek olan gıda ambalajının hem gıdalarda mikrobiyal olarak bozunmalara yol açan bozulma yapan bakterilere ve patojen bakterilere karşı etkili bir gıda ambalaj sistemi tasarlanarak gıda güvenliğinin sağlanması amacıyla özgün olacağı düşünülmektedir.

3) Ayrıca literatüre çoklu tabakalı çift etkili Gram (+) ve Gram (-) bakterilerine karşı etkili çevre dostu, biyobozunur bir aktif ambalaj tasarlanarak, antimikrobiyal etkinlik sağlanarak literatürdeki eksikliğe katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

4) Yenilikçi ekstraksiyon yöntemi olan, hızlı solvent ekstraksiyon yöntemi (ASE) ile ekstrakte edilen propolisin gıda ambalaj sistemlerinde etkinliği ve uygulanabilirliği test edilmiş olacaktır. Böylece farklı ekstraksiyon tekniklerinin uygulama alanları spesifiklik kazanabilecektir.

5) Yeşil sentez yöntemi ile propolis kullanılarak üretilen gümüş nanopartiküller için optimum üretim koşulları belirleneceğinden, üretilen AgNP'ler, ve geliştirilen ekstraksiyon yöntemlerinin farklı kullanım alanlarında uygulanabilirliği, aynı zamanda Arı ve Arı ürünleri için PİLOT Üniversite seçilen Bingöl Üniversitesinin Bölgesel Kalkınma Odaklı Misyon Farklılaşması ve İhtisaslaşması Programı alanına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu tez çalışması öncelikle 2 bölümden oluşmaktadır;

- 1) Bu tez çalışmasının birinci bölümünde sulu propolis ekstraktı kullanılarak farklı sulu propolis ekstratlarının farklı pH, ve gümüş nitrat konsantrasyonlarında ve farklı ultrasonik süre uygulamalarında gümüş nanopartikül üretimi için optimum koşulların sulu propolis ekstraktı kullanılarak belirlenip karakterize edilmesi hedeflenmiştir.
- 2) Sulu propolis ekstraktı kullanılarak optimize edilen şartlarda yenilikçi bir ekstraksiyon yöntemi olan ASE propolis ekstraktı ve ASE propolis ekstraktı kullanılarak üretilen gümüş nanopartiküller (ASE-AgNP) ile gıda ambalajlı geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla doğal mikrobiyal bir ekzopolisakkarit olan pullulan polimeri kullanılarak 3 katmanlı; 1. katmanı ASE-AgNP, 2. Katmanı ASE-AgNP/ASE-Propolis ve 3. katmanı ise ASE-Propolis içeren nanofiber yapıda çok katmanlı pullulan bazlı, gıda güvenliğini iyileştirmek için antimikrobiyal özellikte aktif nanofiber yapılı gıda ambalajı geliştirmek hedeflenmiştir.

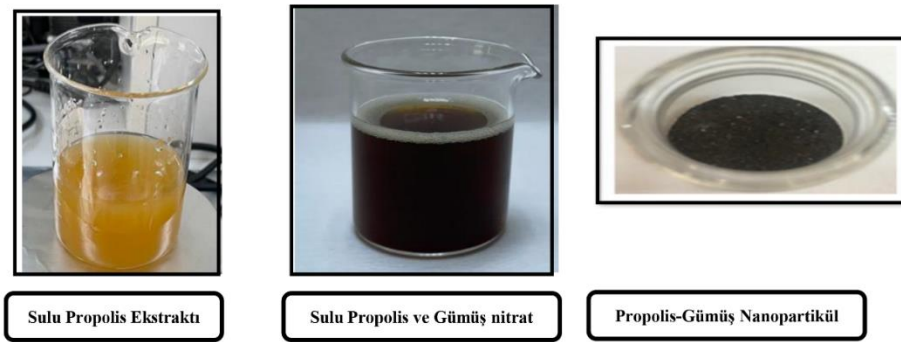
3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu tez kapsamında kullanılan pullulan Hayashibara Co. Ltd. (Tokyo, Japan) firmasından temin edilmiştir. Etanol (≥ 99.9 %HPLC) Isolab (İstanbul, Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Tryptone soy agar (TSA) ve Mueller Hinton Broth (MHB), Merck'ten (Darmstadt, Almanya) satın alınmıştır. Bu tez çalışmasında kullanılan propolis Bingöl'ün Karlıova ilçesinden, Bingöl İli Arı Yetiştiricileri Birliğinden 2022 yılının ilkbahar aylarında temin edilmiştir.

3.2. Propolis Sulu Ekstraktının Hazırlanması

Propolis örnekleri Bingöl İlinin Karlıova ilçesinden 2022 yılında temin edilmiştir. Temin edilen propolisler -20 °C'de depolanmıştır. Propolisler öğütücü (Emir Makine, Türkiye) yardımı ile öğütülerek homojen hale getirilmiştir. Homojen propolisler 1:10 (Propolis:Su) oranında su ile karıştırılarak su banyosunda 60 °C'de 1 dk bekletildikten sonra ultrasonik homojenizatörde (Bandelin, İsveç) %60 pulsede 5 dk homojen hale getirildikten sonra önce 2 defa kaba filtreden sonrada 2 defa ince filtreden süzöldükten sonra sulu propolis (SP) ekstraktı rotary evaporatörde (Buchi, İsveç) yoğunlaştırıldıktan sonra liyofilize edilerek elde edilmiştir (Priyadarshini et al. 2018). Elde edilen ekstraktlar analizlerde kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Gümüş partikül sentezi

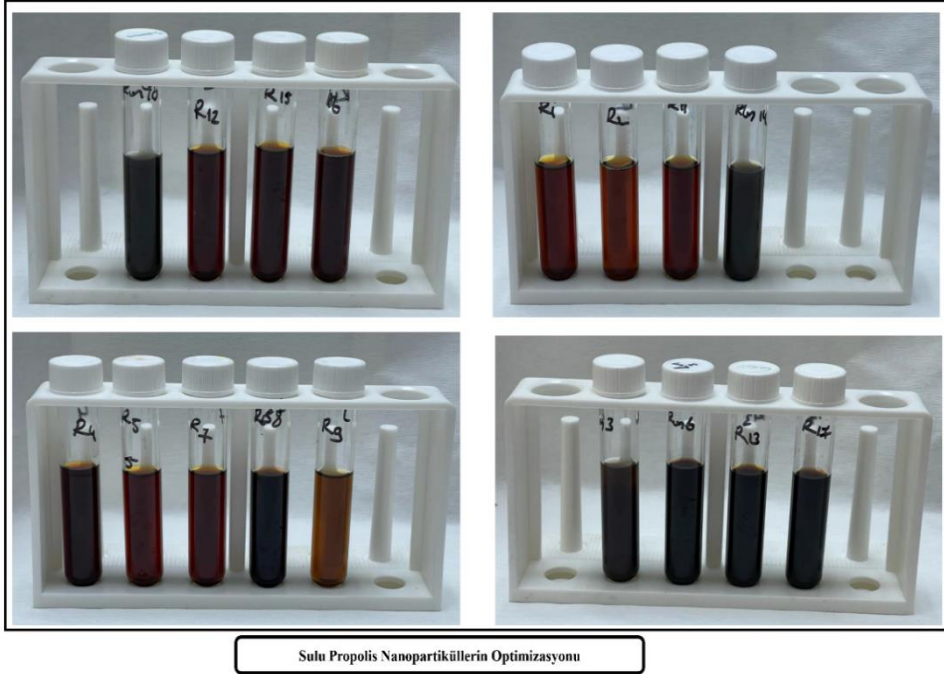
3.3. Gümüş Nanopartiküllerin Üretimi ve Optimizasyonu

Sulu propolis ekstraktı kullanılarak yeşil sentez yöntemi ile gümüş nanopartiküller (SP-AgNP'ler) üretilmiştir. SP-AgNP'lerin optimizasyonu için yanıt yüzey yöntemi (RSM) ile Box-Behnken design (BBD) deney tasarımı kullanılarak optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yeşil sentez prosesinin etkileyen, bağımsız değişkenler olan gümüş nitrat konsantrasyonu (1, 3 ve 5 mM), farklı sürelerde ultrasonik ses dalgaları uygulamaları (2 dk, 3 dk, ve 4 dk) ve farklı pH'lardaki (9, 10,5 ve 12) sulu propolis ekstratlarının gümüş nanopartiküllerin zeta potansiyel değeri üzerine etkisi incelenmiştir. Box-Behnken design tasarımı ile AgNP üretimi için optimize şartlar tespit edilmiştir. Box-Behnken tasarımı için kullanılan şartlar yoğun ön çalışmaları sonucu belirlenmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Box-Behnken deney tasarımı şartları

Faktör	Faktör ismi	Birimi	Minimum	Maximum
A	Propolis pH		9	12
B	Gümüş Nitrat Konsantrasyonu	mM	1	5
C	Ultrasonikasyon Uygulama Süresi	dak	2	4

Gümüş nanopartikül üretimi için, 2 gram liyofilize sulu propolis ekstraktı 100 ml deiyonize suda çözündürülüp önce kaba filtre sonra ince filtre kâğıdından geçirildikten sonra propolis çözeltilisinin pH'sı sırası ile 9, 10,5 ve 12'ye ayarlanmıştır. Daha sonra propolis çözeltilisi ve AgNO₃ oranı 1:3 olacak şekilde karıştırılıp, 60°C'de 30 dk 500 rpm de karıştırılarak elde edilmiştir. 30 dk karıştırma süresi sonunda Box-Behnken deney tasarımı şartlarına göre farklı sonikasyon (2 dk, 3 dk, ve 4 dk) sürelerinde %50 pulse da ultrasonik homojenizatör (Bandelin, Almanya) yardımı ile homojenize edilerek üretilmiştir. Üretilen nanopartiküller, santrifüj yardımı ile çöktürülüp steril su ile 2 defa yıkandıktan sonra 60 °C'de 24 saat etüvde kurutularak elde edilmiştir.



Şekil 3.2. Sulu gümüş nanopartikül optimizasyonu

3.4. Sulu Propolis Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Sulu propolis ekstraktı ile üretilen gümüş nanopartiküllerin yapısının karakterizasyonu için, UV/VIS spektrofotometrede (Jasco V-650, Japan) 200 ile 900 nm arasında (1 nm hassasiyete) tarama yapılarak gümüş nanopartiküller için maksimum absorbans değeri ölçülmüştür. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile ayrıca grid üzerinde dökülen örneklerin partikül boyutu detaylı olarak belirlenmiştir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM, JEOL, JSM 6515, Japonya) ile örnekler altın-paladyum karışımı ile kaplanarak

analiz edilmiştir, ayrıca SEM-EDX analizi ile de elemental haritalama yapılarak gümüş (Ag) değeri (%) olarak belirlenmiştir.

Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR, PerkinElmer LS-55, ABD) propolis ve AgNP fonksiyonel gruplarının etkileşimi $500-4000\text{ cm}^{-1}$ de 4 cm^{-1} de 32 tarama yapılarak incelenmiştir. X-ışınları kırınım (XRD, Philips X'Pert Pro) için 2θ değeri 5 ile 80 arasında metalik AgNP'lerin kristal izdüşümleri belirlenmiştir. AgNP'lerin Zeta potansiyel değeri ve parçacık boyutu analizleri NanoPlus-3, (Zeta/nano particulate analyzer, Micromeritics Instruments Corporation, ABD) cihazı yardımı ile 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Roy et al. 2010; Kothai and Jayanthi, 2015; Barbosa et al. 2019; Taqi et al. 2020; Al-Fakeh et al. 2021; Tosun and Kaplan 2022).

3.5. Sulu Propolis Gümüş Nanopartiküllerin Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının (MİK) Belirlenmesi

SP-AgNP'ler ve ASE-AgNP'lerin minimum inhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi için Gram (+); *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* NRRL-B-3711, ve Gram (-); *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* subsp enterica serovar *Typhimurium* ATCC 14028 bakterileri kullanılmıştır. AgNP'lerin antimikrobiyal etkinliği, triptik soy broth (TSB) (Merck, Almanya) ile aktive edilen bakteriler, MacFarland ile 0,5 ayarlanarak, Mueller Hinton Broth (MHB), (Merck, Almanya) ile Buyyon dilüsyon testi CLSI (2018) standartlarının önerdiği doğrultuda seri dilüsyonlar hazırlanmış ($2\text{ }\mu\text{g/mL}$ den $1024\text{ }\mu\text{g/mL}$) ve 96 oyuklu plaka kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Plakalar kapağı kapatılarak $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edilmiş ve minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değeri 2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride (TTC) kullanılarak belirlenmiştir (Barbosa et al. 2019; Kothai and Jayanthi, 2015).

3.6. ASE Propolis Ekstraktının Hazırlanması

ASE propolis ekstraktı hızlı solvent ekstraksiyon yöntemi (ASE) ile Charland et al. (2021) tarafından kullanılan metod modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Kısaca ASE cihazı (Şekil 3.3) (Thermo Dionex Ase-350, ABD) solvent olarak %70 etanol, statik mod, 1500 psi barda 60°C, 1 döngü (cycle) kullanılarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstraktlar analizlerde kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan ASE ekstraksiyon cihazı

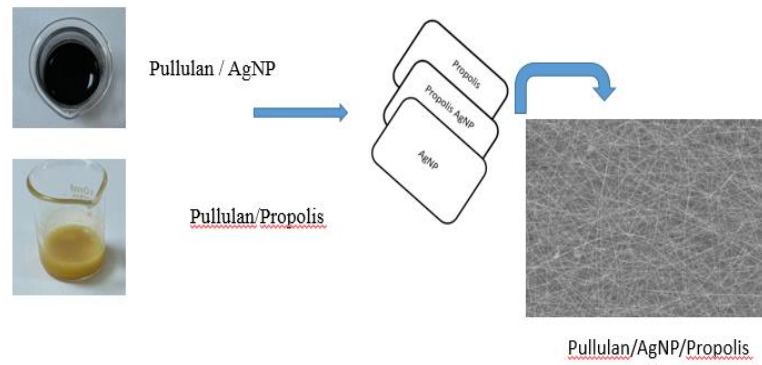
3.7. ASE Propolis Ekstraktı ile Gümüş Nanopartiküllerin Üretilmesi ve Karakterizasyonu

ASE propolis ekstraktı ile gümüş nanopartiküllerin hazırlanması, optimizasyonu ve karakterizasyonu Bölüm 3.4 ve 3.5 'te açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir.

3.8. Gümüş Nanopartikül/Propolis/AgNP Elektrospun Nanofiber Filmlerin Üretimi

Elektrospun nanofiber film (ENF) üretimi için Celebioglu and Uyar (2021) tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek nanofiber filmler üretilmiştir. Pullulan sulu çözeltisi ağırlıkça %20'lik pullulan (%20 w/v, ağırlık/hacim) ile hazırlanmıştır. ASE propolis %4 (w/v) ve ASE-AgNP'ler %2 (w/v) olacak şekilde pullulan polimer çözeltisine ilave edilerek elektrospun nanofiber filmler hazırlanmıştır. Çok katmanlı pullulan bazlı

elektrospun nanofiber filmlerin 1. Katmanı; pullulan ASE-AgNP içeren (PAgNPF) elektrospun nanofiber film, 2. Katmanı; pullulan/ASE-AgNP ve ASE propolis ekstraktı (PAgNP-PF) elektrospun nanofiber film ve 3.Katmanı ise sadece ASE propolis içeren (PPF) elektrospun nanofiber film solüsyonları hazırlanmıştır (Şekil 3.4.). Nanofiber üretimi için şırınga pompası, silindir toplayıcı ve güç kaynağından oluşan dikey elektrospun cihazı Optosense (Teknotıp, Ankara, Türkiye) kullanılmıştır. Nanofiber üretim koşulları; 22 kV voltaj, 12 cm toplayıcı ile iğne ucu arası uzaklık ve 0,5 mL/s besleme hızında nanofiberler toplanmıştır. Bu çalışmada üretilen nanofiberler ve kodları Tablo 3.2’de verilmiştir. Kontrol elektrospun nanofiber film olarak sadece pullulan kullanılmıştır (PCF) ve çok katmanlı elektrospun nanofiber film ise üç katmanlı içeren elektrospun nanofiber (PKF) filminden oluşmaktadır.



Şekil 3.4. Gümüş nanopartikül/propolis/AgNP elektrospun nanofiber filmlerin üretimi

Tablo 3.2. Elektrospun nanofiber filmler ve kodları

Elektrospun Nanofiber Film Kodları	Elektrospun Nanofiber Filmler
PAgNPF	Elektrospun pullulan AgNP nanofiber film
PAgNP-PF	Elektrospun pullulan AgNP /Propolis nanofiber film
PPF	Elektrospun pullulan propolis nanofiber film
PKF	Elektrospun pullulan katmanlı nanofiber film
PCF	Elektrospun pullulan kontrol nanofiber film

3.9. Pullulan Elektrospun Nanofiber Filmlerin Karakterizasyonu

Elektrospun nanofiber filmlerin karakterizasyonu Bölüm 3.4'te verilen yöntemler elektrospun nanofiber filmler için modifiye edilerek uygulanmıştır (Arserim-Uçar et al. 2021; Celebioglu and Uyar (2021).

3.10. Pullulan Elektrospun Nanofiber Filmlerin Antimikrobiyal Özellikleri

Geliştirilen PAgNPF, PAgNP-PF, PPF, PKF ve PCF elektrospun nanofiber filmlerin antimikrobiyal etkinliği Gram (+) bakteriler; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* NRRL-B-3711, *Listeria Innocua* ATCC 33090, ve Gram (-) bakteriler; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica subsp enterica serovar* Typhimurium ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 karşı test edilmiştir. Fiber filmlerin antimikrobiyal etkinliği (Qin et al. 2022) yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır. Kısaca, test bakterileri Muller Hilton agar yüzeyine inoküle edilerek geliştirilen filmlerin antimikrobiyal etkinliği, agar well difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Antibakteriyel etkinlik, inhibisyon zon çaplarının (mm) dijital kumpas ile ölçülmesi ile belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak sadece pullulan fiber filmler kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak ampicilin (10µg) ve gentamisin (10µg) kullanılmıştır.

3.11. İstatistiksel Değerlendirme ve Optimizasyon

Bu çalışmada istatistiksel analizler için Minitab 17 (Minitap, Inc.) ve Design-Expert 12 (Stat-Ease Inc.) istatistik programları kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bitki özütü yada biyolojik materyalin miktarı ve bileşimi, metal iyonu konsantrasyonu, reaksiyon sıcaklığı ve süresi ve reaksiyon karışımının pH'sı gibi faktörler üretilmek istenilen gümüş nanopartikülünün şekli, boyutu, morfolojisi ve kristal yapısı üzerine etki eden faktörlerdir (Kumar et al. 2021). Bu tez çalışmasının bu bölümünde gümüş nitrat (AgNO_3) ve propolis sulu çözeltilerinin oranı (3:1) ve reaksiyon sıcaklığı (60°C) sabit tutularak, bağımsız değişkenler olan gümüş nitrat konsantrasyonu, farklı sürelerdeki ultrasonik ses dalgaları uygulamaları ve farklı pH'lardaki sulu propolis ekstratlarının gümüş nanopartiküllerinin zeta potansiyel değeri üzerine etkisi incelenmiştir.

Fiber film üretimlerinde nanopartiküllerin çözeltilerdeki stabilitesi özellikle elektrospining süresince şırıngada çökme ve koloidal çözeltilerde homojen dağılması önemli olduğundan zeta potansiyel değeri optimize edilmiştir. Bu tez çalışmasının bu bölümünde, sulu propolis ekstraktı ile, bağımsız değişkenler olan farklı pH'lardaki sulu propolis ekstratları, gümüş nitrat konsantrasyonları ve farklı sürelerde ultrasonik ses dalgaları uygulamalarının gümüş nanopartikül (AgNP) üretimi için optimum üretim koşulları, sulu propolis ekstraktı kullanılarak belirlenip karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

4.1. Sulu Propolis Ekstraktı ile Gümüş Nanopartiküllerin Optimizasyonu

Sulu propolis ekstraktı kullanılarak bağımsız değişkenler olan; gümüş nitrat konsantrasyonu ve farklı sürelerde ultrasonik ses dalgaları uygulamaları ve farklı pH'lardaki sulu propolis ekstratları ve bağımlı değişken olan zeta potansiyel (ZP) değerleri Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. BBD Dizayn optimizasyon tablosu

Deney Sayısı	Bağımsız Değişkenler			Bağımlı Değişken
	A	B	C	Y ₁
	pH	AgNO ₃ Kon(mM)	Sonikasyon süresi(dak)	Zeta(mV)
1	9	5	3	-33,66±1,78
2	9	3	4	-5,83±1,40
3	12	1	3	-21,01±0,46
4	10,5	5	4	-9,76±2,69
5	10,5	3	3	-9,3±0,53
6	12	3	2	-8,37±1,18
7	10,5	3	3	-9,96±1,71
8	10,5	3	3	-9,17±0,90
9	10,5	1	4	-9,66±2,33
10	10,5	1	2	-10,98±0,55
11	9	3	2	-13,44±2,57
12	10,5	3	3	-12,64±2,80
13	12	5	3	-25,3±2,85
14	9	1	3	-13,38±1,40
15	10,5	5	2	-16,81±3,69
16	10,5	3	3	-12,7±0,82
17	12	3	4	-14,25±2,41

Gümüş nanopartiküllerin üretiminde proses parametlerinin önemli olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Barbosa et al. 2019; Priyadarshini et al. 2018). Bu çalışmada gümüş nitrat ve propolis sulu çözeltilerinin oranı (3:1) ve reaksiyon sıcaklığı 60°C sabit tutularak çalışma gerçekleştirilmiştir. Bağımsız değişkenler olan gümüş nitrat konsantrasyonu, farklı sürelerde ultrasonik ses dalgaları uygulamaları ve farklı pH'lardaki sulu propolis ekstratları ve bağımlı değişken olan zeta potansiyel değerlerinin analiz edildiği Box-Behnken modelinin ANOVA tablosu sonuçlarına göre; 20,63 Model F değeri (p -değeri 0,0003) ve 0,9637 R², 0,9169 R²adj., ve 14,50 C.V değerlerine göre seçilen modelin önemli olduğu görülmüştür.

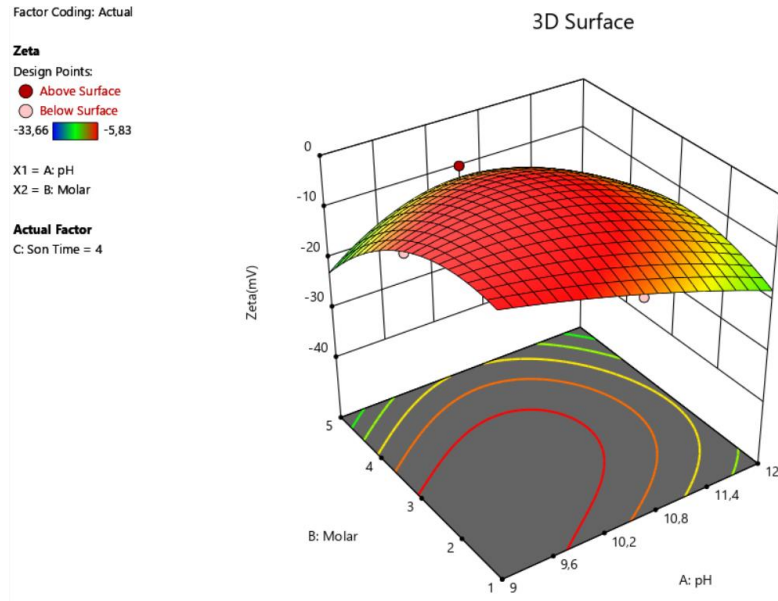
ANOVA tablosundaki model terimlerinin p değerinin 0.050'den küçük olduğu terimler anlamlı olarak kabul edilmektedir. ANOVA tablosu AB, AC, A², B², C², ve A²B ($p < 0,05$) terimlerinin anlamlı olduğunu göstermiştir.

Modelin denklemi;

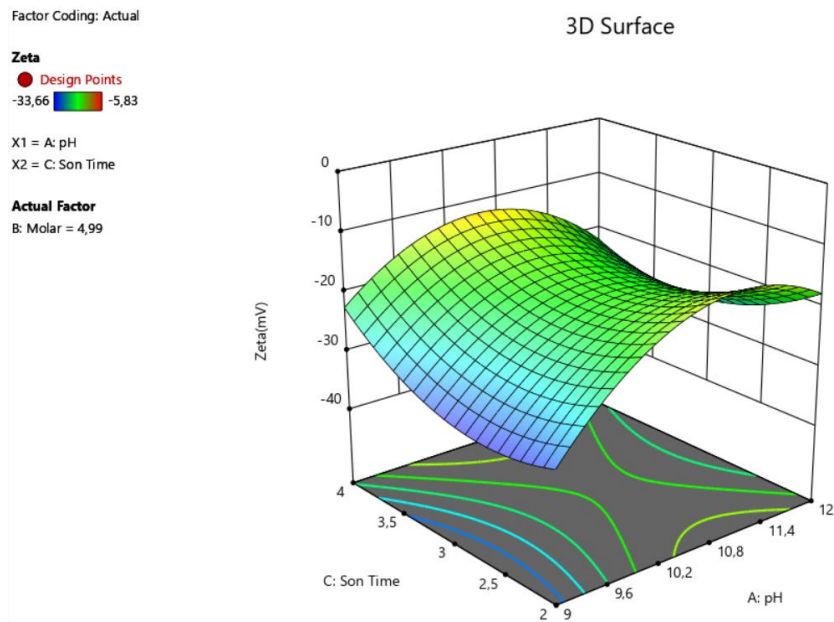
$$\begin{aligned} \text{Zeta (mV)} = & -10,75 - 0,3275 * A - 1,48 * B + 1,26 * C + 4,00 * AB - 3,37 * AC - 5,63 * A^2 - \\ & 6,96 * B^2 + 5,91 * C^2 - 4,66 * A^2 B \end{aligned} \quad (4.1)$$

Box-Behnken deneysel modelinin analiz sonuçlarına göre zeta potansiyel değerinin optimizasyonu için optimum koşulların verildiği rampa fonksiyon grafiklerine göre (arzu edilebilirlik 0,985), optimum zeta potansiyel değerine sahip gümüş nanopartiküller üretmek için optimum üretim parametreleri; sulu propolis pH=11,82, gümüş nitrat konsantrasyonunun 4,99 mM ve ultrasonik ses dalgaları uygulama süresi 4 dk olarak bulunmuştur. Box-Behnken deneysel tasarımın verdiği optimum noktalar deneysel olarak doğrulanıp, optimum noktada gümüş nanopartiküller üretilmiştir. Optimum noktada deneysel olarak üretilen SP-AgNP'lerin zeta potansiyel değeri $-16,99 \pm 0,63$ mV ile $-18,71 \pm 0,35$ mV arasında değiştiği görülmüştür. Partikül boyut değeri ise $64,2 \pm 0,55$ nm ile $65,03 \pm 0,45$ nm aralığında değiştiği görülmüştür (Şekil 4.11).

Farklı gümüş nitrat konsantrasyonu ve farklı pH'lardaki sulu propolis ekstratlarının sulu propolis AgNP'lerin zeta potansiyel değeri üzerine etkisinin yanıt yüzey grafiği Şekil.4.1'de, farklı süre ultrasonik ses dalgaları uygulamalarının ve farklı pH'lardaki sulu propolis ekstratlarının sulu propolis AgNP'ler üzerine etkisinin yanıt yüzey grafiği ise Şekil.4.2'de gösterilmiştir.



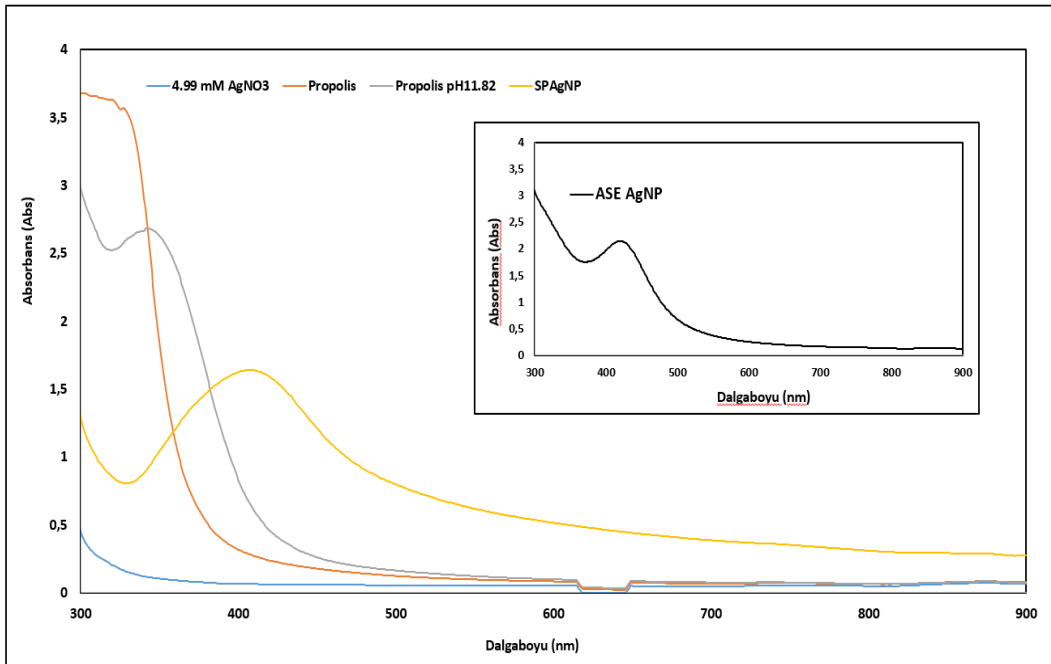
Şekil.4.1. Gümüş nitrat konsantrasyonlarının (mM) ve farklı pH'lardaki sulu propolis ekstratlarının sulu propolis AgNP'lerin zeta potansiyel değeri üzerine etkisinin yanıt yüzey grafiği



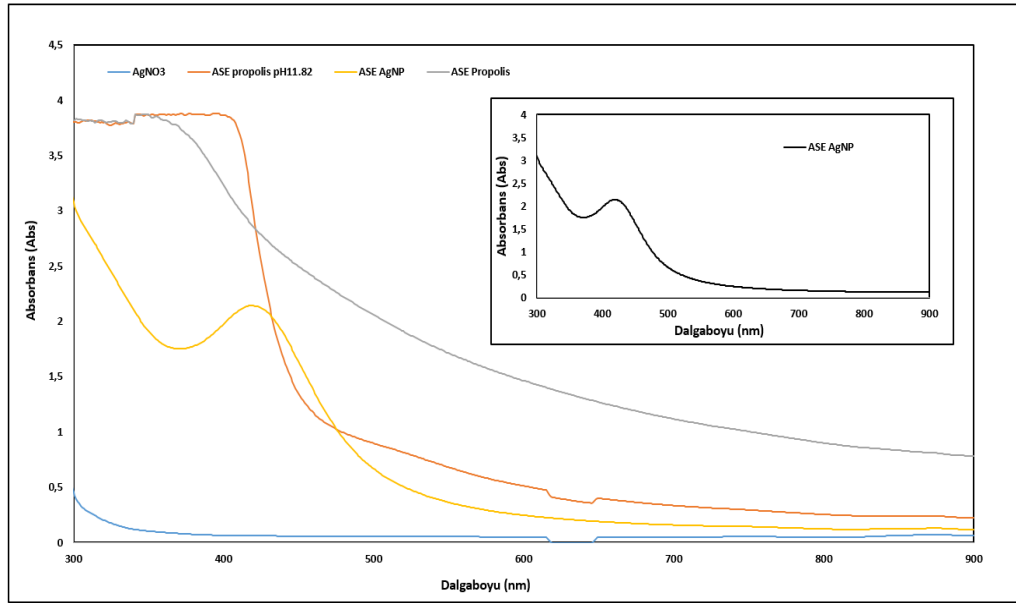
Şekil.4.2. Farklı süre ultrasonik ses dalgaları uygulamalarının ve farklı pH'lardaki sulu propolis ekstratlarının sulu propolis AgNP'lerin zeta potansiyel değeri üzerine etkisinin yanıt yüzey grafiği

4.1.1. Optimize Şartlarda Üretilen AgNP ve Propolis Ekstraktlarının UV-VIS Spektrum Analizleri

Sulu propolis ekstraktı kullanılarak optimize şartlarda üretilen SP-AgNP'lerin 200-900 nanometre aralığında maksimum absorpsiyon taraması UV/VIS spektrofotometre (Jasco V-650, Japan) kullanılarak belirlenmiştir. SP-AgNP'lerin 330 ile 500 nm arasında maksimum absorpsiyon piki 408 nm'de (Şekil 4.3), ASE-PAgNP'lerin 376 ile 463 nm arasında maksimum absorpsiyon piki ise 420 nm'de (Şekil 4.4) gözlemlenmiştir.



Şekil 4.3. Optimum şartlarda sulu propolis ekstraktı ile üretilmiş AgNP'lerin UV-vis absorpsiyon spektrumları



Şekil 4.4. Optimum şartlarda ASE propolis ekstraktı ile üretilmiş AgNP'lerin UV-vis. absorpsiyon spektrumları

Yeşil sentez yöntemini ile üretilen gümüş nanopartikül çalışmalarında AgNP'lerin 400-500 nm dalga boyu aralığında maksimum absorpsiyon piki verdiği görülmüştür (Kothai and Jayanthi 2015; Priyadarshini et al. 2018; Barbosa et al. 2019; Tosun and Kaplan 2022). Tosun and Kaplan (2022), beyaz propolis ile optimize şartlarda üretilen AgNP'lerin maksimum absorpsiyon değerini 420 nm olarak saptamışlardır. Amerikada ticari olarak satılan propolis tozunun sulu ekstraktı ile yeşil sentez yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada ise, üretilen AgNP'lerin maksimum absorpsiyon değeri 420 nm olarak tespit edilmiştir (Priyadarshini et al. 2018).

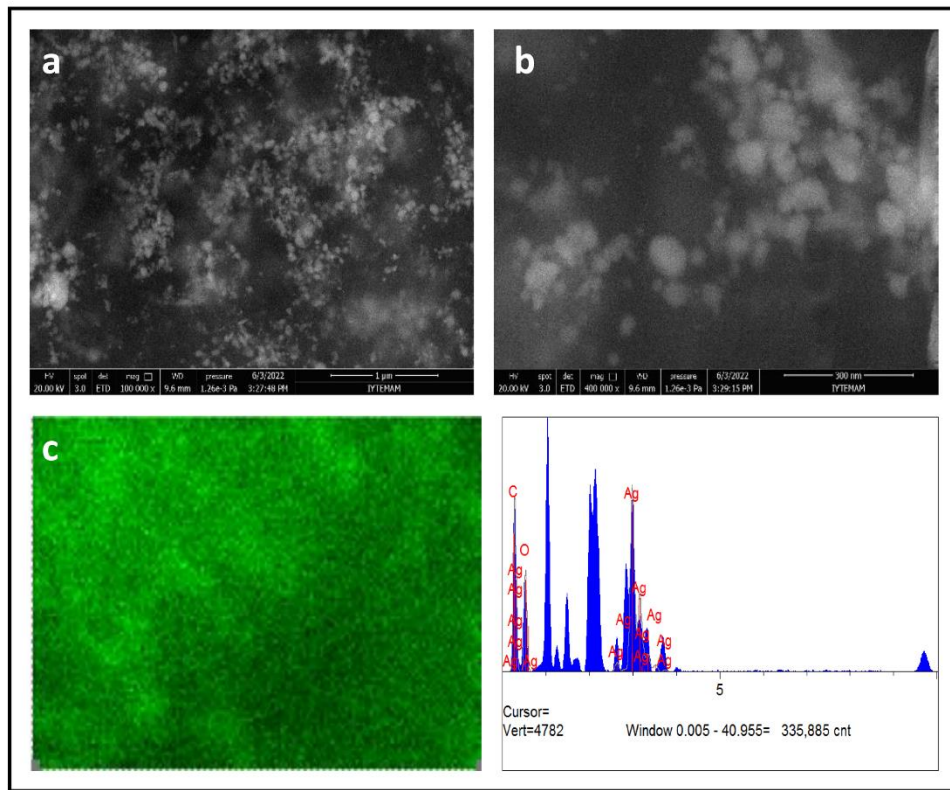
Kırmızı Brezilya propolisinin etanol ekstraktı ile optimum şartlarda üretilen AgNP'lerin maksimum absorpsiyon değeri AgNP üretim reaksiyonundan 30 dak sonra 412 nm ve 24 saat sonra ise 420 nm olarak rapor edilmiştir (Barbosa et al. 2019). Hindistanın Khanpur. U.S. Nagar. Uttarakhand-263153 bölgesinden toplanan propolislerin etanol ekstraktları ile AgNP'ler üretilmiştir (Roy et al. 2010). Bu çalışmada propolis ekstraktı pH değerlerinin (10.62, 8.05 ve 10.62) üretilen AgNP'lerin plasmon piki değerleri üzerine etkili olduğu gözlemlenmiştir.

Mısır'ın Alwihat bölgesinden toplanan propolislerin sulu ekstraktı ile yeşil sentez yolu ile üretilen PAgNP'lerin üretimi için değişen ekstrakt konsantrasyonlarında pH (3-9) ve sıcaklık (25°C 35°C 45°C 55°C 65°C 75°C 85°C) değerlerinde ayrıca değişen reaksiyon sürelerinde (2-14 dak) UV-VIS spektra plazma rezonan (SPR) değerlerinin 420 ile 458 nm arasında değiştiği rapor edilmiştir (Mohamed et al. 2022).

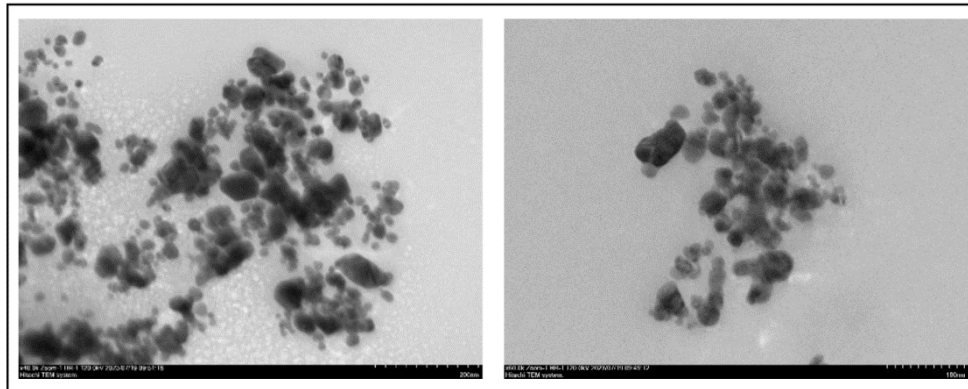
4.1.2. Optimize Şartlarda Üretilen AgNP'lerin ve Propolis Ekstraktlarının SEM, TEM ve EDX Analizleri

Sulu propolis ekstraksiyonu ile üretilen AgNP'lerin yüzey morfolojileri, şekilleri ve boyutları SEM analizi ile belirlenmiştir. Sulu propolis ekstraksiyonu ile üretilen SP-AgNP'lerin SEM analizi ile ölçülen ortalama boyutlarının $25,25 \pm 6,06$ nm olduğu görülmüştür. SP-AgNP'lerin SEM ve EDX grafiği Şekil 4.5'de verilmiştir. Ayrıca yapılan TEM analizi ile de yüzey morfolojisi ve ortalama boyutlar doğrulanmıştır (Şekil 4.6). ASE-AgNP'lerin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri Şekil 4.7'de verilmiştir. ASE-AgNP'lerin boyutlarının 50 nm'den küçük olduğu görülmüştür. Amerikada ticari olarak satılan propolis tozunun sulu ekstraktı ile yapılan çalışmada (Priyadarshini et al., 2018) yeşil sentez yöntemi kullanılarak üretilen AgNP'lerin TEM analizi sonuçlarına göre üretilen gümüş nanopartiküllerin küresel yapıda ve boyutlarının 100 nm den küçük olduğu bulunmuştur. Ayrıca gümüş varlığı EDX analiz ile de doğrulanmıştır (Priyadarshini et al. 2018).

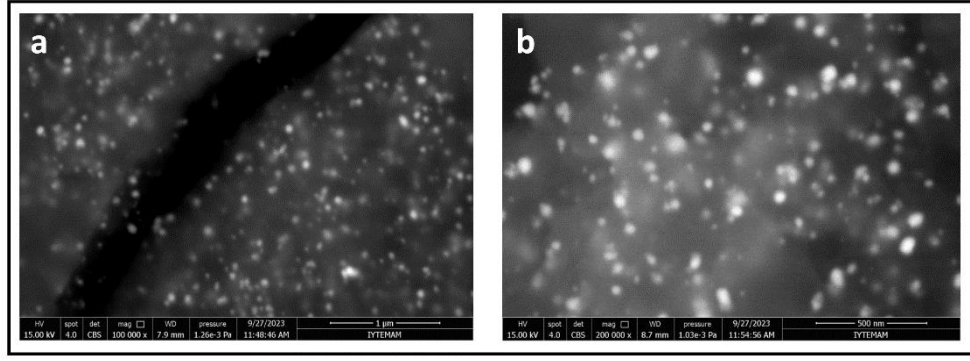
Kırmızı Brezilya propolisinin etanol ekstraktı ile üretilen AgNP'lerin küresel geometriye sahip olduğu TEM analizi ile doğrulanmıştır (Barbosa et al. 2019). Irak propolislerinin sulu ekstraktı ile üretilen AgNP'lerin SEM analizleri sonucuna göre küresel yapıda ve 13-45 nm arasında değişen boyutlarda olduğu görülmüştür (Taqi et al., 2020).



Şekil 4.5. Optimum şartlarda sulu propolis ekstraktı ile üretilmiş AgNP'lerin a) 100 000x b) 400 000X büyütmede SEM görüntüleri ve c) SEM-EDS grafiği



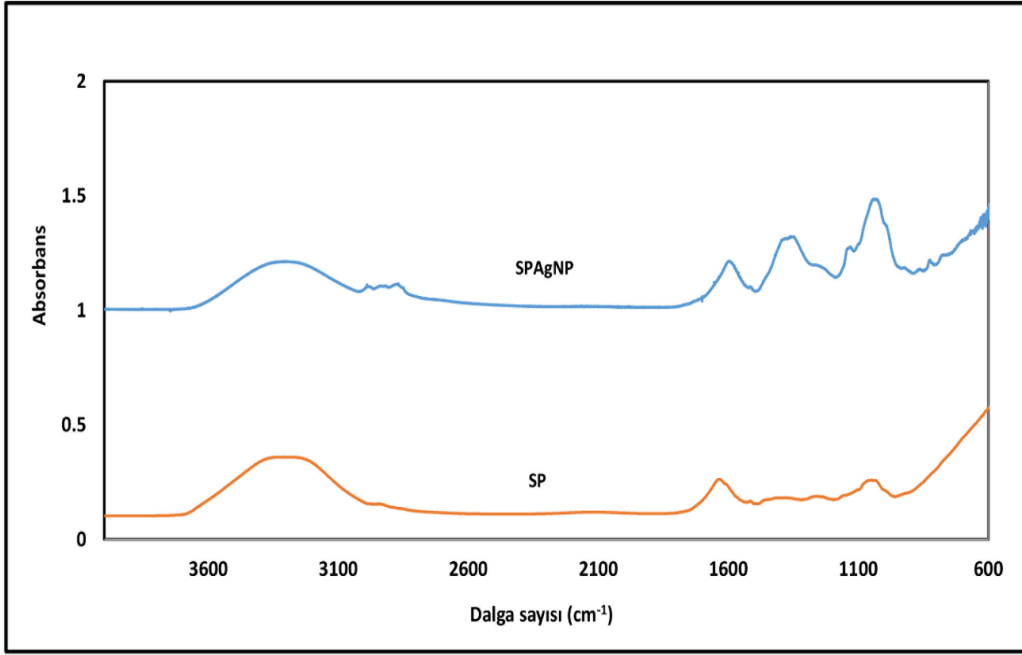
Şekil 4.6. SP-AgNP'lerin a) 200 nm ve b) 100 nm' de TEM görüntüleri



Şekil 4.7. Optimum şartlarda ASE-AgNP'lerin a) 100 000x b)200 000b büyütmede SEM görüntüleri

4.1.3. Optimize Şartlarda Üretilen AgNP'lerin ve Propolis Ekstraktlarının FTIR Spektrumu Analizleri

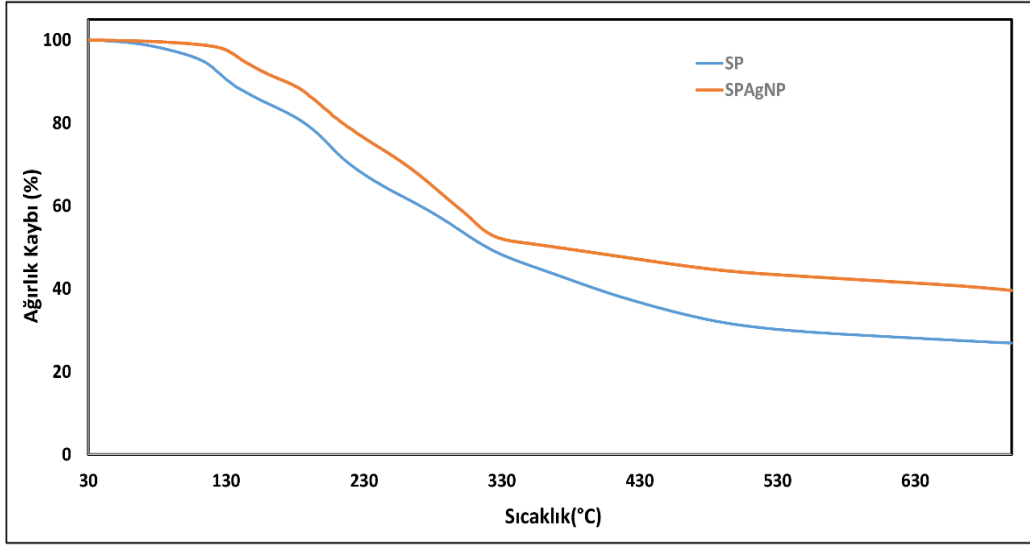
Optimize şartlarda üretilen SP-AgNP'lerin ve sulu propolis (SP) ekstraktının FTIR spektrumu Şekil 4.8'de verilmiştir. Propolis sulu ekstraktı, ve SP-AgNP'lerin 1719 ve 1100 cm^{-1} 'deki spektrumları karboksilik grubun varlığını göstermektedir. Sulu propolis ekstraktının FTIR bantlarının çoğu triterpenoidlerin, flavonoidlerin, furanoidlerin, şekerlerin, kumarinlerin, tanenlerin, asitleri ve fenollerin varlığını göstermektedir (Priyadarshini et al. 2018). Kırmızı Brezilya propolisinin etanol ekstraktı ile üretilen AgNP'lerin FTIR spektrumundaki 3419 cm^{-1} 'deki merkez bantların propolisin yapısındaki hidroksillere, 1637 cm^{-1} 'deki bantların karboksilleri ve karbonilleri, 1380 cm^{-1} , 1100 cm^{-1} 'deki bantların heterosiklik bileşiklerle ilgili (C-O-C) alkoloidlerde ve flavonların varlığını ve 831 cm^{-1} 'deki bantların glikozitlerin varlığını gösterdiği rapor edilmiştir. Propolis AgNP'lerinin FTIR spektrumunda ise 3454 cm^{-1} 'deki hidroksil bölgesinde bir bant yer değiştirmesi gözlemlenmiştir (Barbosa et al. 2019). Propolisin yapısındaki poliollerin gümüşün indirgenmesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. 1684 cm^{-1} 'deki geniş pikin doymamış karbonil grubundan kaynaklandığını ve bunun gümüş iyonlarını indirgediği düşünülmektedir (Roy et al. 2010).



Şekil 4.8. Optimize şartlarda üretilen SP-AgNP'lerin ve sulu propolis (SP) ekstraktının FTIR spektrumu

4.1.4. Optimize Şartlarda Üretilen AgNP'lerin ve Propolis Ekstraktlarının TGA Analizleri

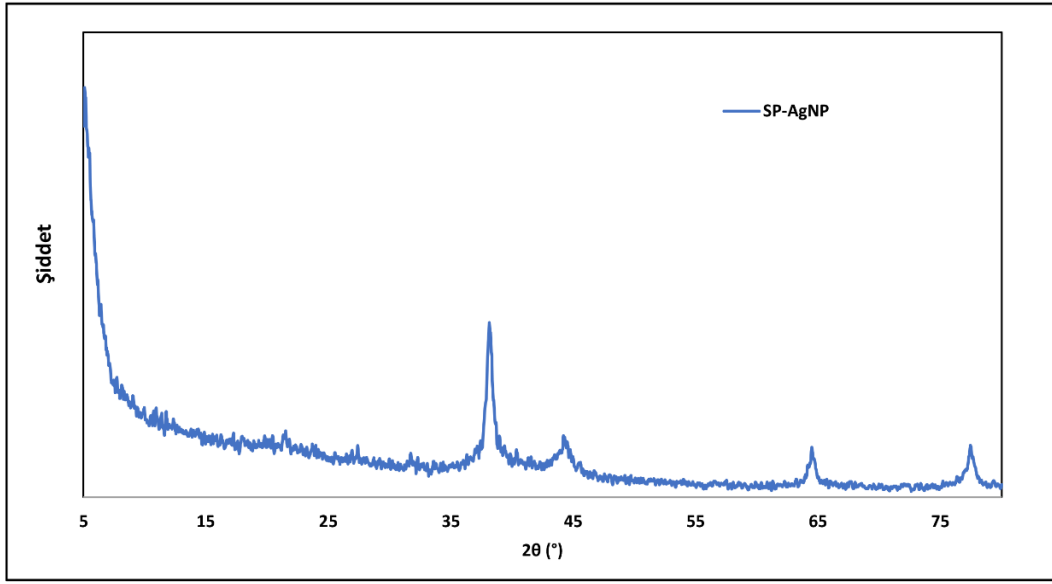
SP-AgNP'lerin ve sulu propolis (SP) ekstraktının termal kararlılıkları termogravimetrik analiz (TGA) ile test edilmiştir (Şekil 4.9.). Şekil 4.9'daki verilere göre üretilen SP-AgNP'lerin termal kararlılığı sulu propolis (SP) ekstraktlarından daha iyi olduğu görülmüştür. Kırmızı Brezilya propolisinin etanol ekstraktı ile üretilen AgNP'lerin TGA grafiğinde 80,10°C ve 107,80 °C'deki %15 ağırlık kaybı ve 274,89 ve 355,20 °C'deki yaklaşık %66 ağırlık kaybı olarak 2 tane termal degradasyona uğradığı gözlemlenmiştir (Barbosa et al. 2019).



Şekil 4.9. Optimize şartlarda üretilen SPAgNP'lerin ve sulu propolis (SP) ekstraktının termogravimetrik analiz ağırlık kaybı grafikleri

4.1.5 Optimize Şartlarda Üretilen AgNP'lerin XRD Analzileri

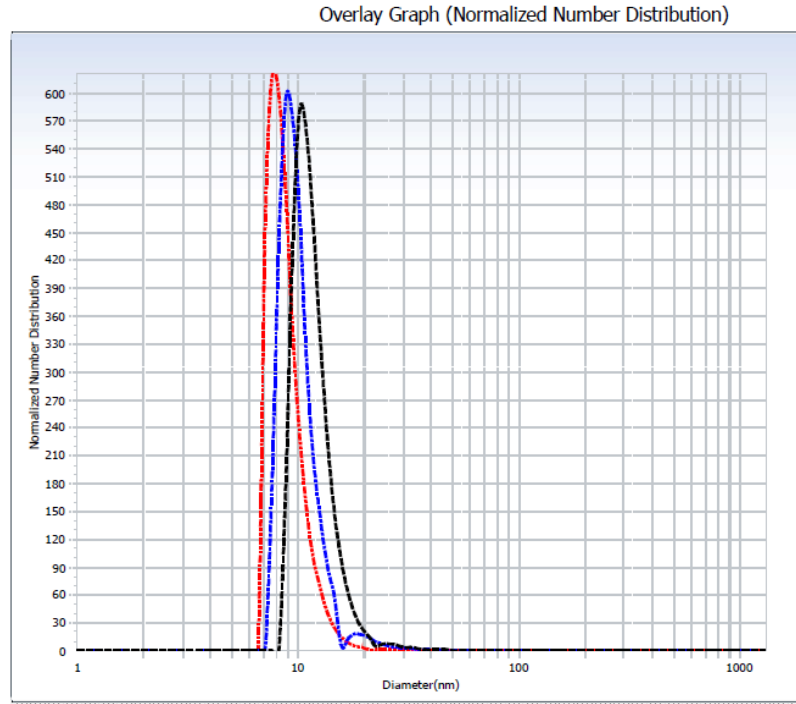
Sulu propolis ekstraktı ile üretilen SP-AgNP'lerin kristal yapısı X-ışını kırınımı yöntemi (XRD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.10). Şekil 4.10'de SP-AgNP'lerin $21,53^{\circ}/38,26^{\circ}/44,57^{\circ}/45,63^{\circ}/64,52^{\circ}$ ve $77,53^{\circ}$ 'de 2θ değerindeki kristal piklerinin literatürde yapılan çalışmalar ile uyumlu olduğu görülmüştür. Priyadarshini et al. (2018) çalışmasında Amerikada ticari olarak satılan propolis tozunun sulu ekstraktı ile yeşil sentez yöntemi ile üretilen AgNP'lerin XRD spektrumları olan $38^{\circ}/44,5^{\circ}/64,7^{\circ}$ ve $77,7^{\circ}$ deki Bragg pikleri (111), (200), (220) ve (311) yansımaları AgNP'lerin kübik yapıda olduğunu göstermektedir. Başka bir çalışmada kırmızı Brezilya propolisinin etanol ekstraktı ile üretilen AgNP'lerin kristal düzlemlerinin analizi XRD analizi ile yapılmıştır. $38,04^{\circ}/44,80^{\circ}/64,54^{\circ}/77,26^{\circ}$ ve $81,32^{\circ}$ de 2θ açılarının (111), (200), (220), (311), (222), metalik gümüşün kübük kristal yüz yapısının ana düzlemlerine %50,32 kristal yapı değeri ile karşılık geldiği görülmüştür (Barbosa et al. 2019).



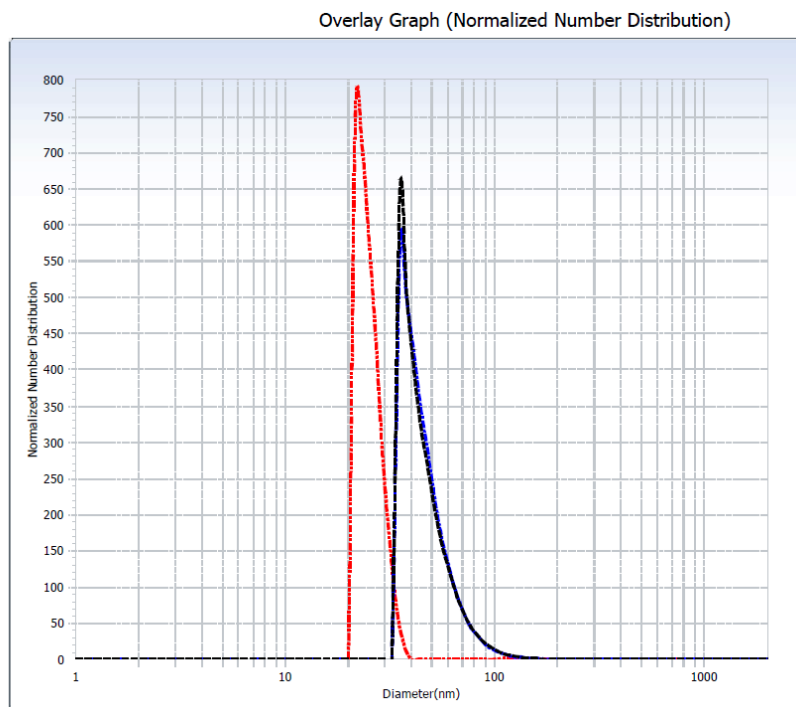
Şekil 4.10. Optimum şartlarda üretilen SP-AgNP'lerin X-ışını kırınımı (XRD) analizi

4.1.6. Optimize Şartlarda Üretilen AgNP'lerin DLS Analizleri

Box-Behnken tasarımı ile verilen deneyler ve optimize şartlarda üretilen SP-AgNP'lerin parçacık boyutu ölçüm grafiği Şekil 4.11'de, ASE-AgNP'lerin ise Şekil 4.12'de verilmiştir. Optimize şartlarda üretilen SP-AgNP'lerin parçacık boyutunun $64,2 \pm 0,55$ nm ile $65,03 \pm 0,45$ nm aralığında değiştiği görülmüştür. Zeta potansiyel değeri ise $-16,99 \pm 0,63$ mV ile $-18,71 \pm 0,35$ mV arasında değiştiği görülmüştür. Optimize şartlarda üretilen ASE-AgNP'lerin parçacık boyutunun $137,9 \pm 7,45$ nm ile $150,96 \pm 11,10$ nm arasında değiştiği zeta potansiyel değerinin ise $-48,81 \pm 1,16$ mV ile $-55,77 \pm 1,09$ mV arasında değiştiği görülmüştür. Sulu propolis gümüş nanopartiküllerinin üretildiği optimum koşullarda ASE propolis ekstraktı ile üretilen ASE-AgNP'lerinin parçacık boyununun SP-AgNP'lerinin parçacık boyutundan daha büyük olduğu ve ASE-AgNP'lerin zeta potansiyel değerinin ise daha yüksek olduğu ve görülmüştür. Bu sonuçlara göre ASE propolis ekstraktı ile optimum üretim şartlarında daha stabil AgNP'ler üretilmiştir.



Şekil 4.11. Optimum şartlarda sulu propolis ekstraktı ile üretilmiş SP-AgNP'lerin parçacık boyutu



Şekil 4.12. Optimum şartlarda ASE propolis ekstraktı ile üretilmiş ASE-AgNP'lerin parçacık boyutu

Tosun and Kaplan (2022), yaptıkları çalışmada optimize şartlarda ürettikleri beyaz propolis AgNP'lerin boyutlarını 108,2 nm ve zeta potansiyel değerini ise -22,3 mV olarak tespit etmişlerdir. Priyadarshini et al. (2018), yeşil sentez yöntemi kullanarak Amerikada ticari olarak satılan propolis tozunun sulu ekstraktı ile üretilen AgNP'lerin 0,165 polidispersite indeksinde parçacık boyutunu 113,6 nm olduğu rapor edilmiştir. Başka bir çalışmada Kırmızı Brezilya propolisinin etanol ekstraktı ile üretilen AgNP'lerin boyutlarının zamanla değişimini incelenmiştir. Dinamik ışık saçılım spektrumlarına göre (DLS) AgNP'lerin parçacık boyut değerleri üretimden 30 dk sonra $109 \pm 0,81$ nm, 1 saat sonra $116,2 \pm 1,78$ nm, 2 saat sonra $101,9 \pm 1,29$ nm, 3 saat sonra $98 \pm 1,07$ nm ve 24 saat sonra $81 \pm 1,07$ nm olarak ölçülmüştür. AgNP üretiminden sonraki sürenin parçacık boyutu üzerine etkili olduğu gözlemlenmiştir. 24 saat sonra UV-Vis spektrofotometre ile yapılan ölçümlerde nanopartiküllerin daha yüksek absorblanma özelliği gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu çalışma sonuçlarına göre saflaştırma işleminin ve gümüş nanopartiküllerin toz halde üretiminin 24 saat sonra yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır (Barbosa et al. 2019).

4.1.7. AgNP'ler ve Propolis Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Sulu ve ASE propolis ekstratlarının, SP-AgNP ve ASE-gNP'lerinin antimikrobiyal aktiviteleri, minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) Buyyon dilüsyon testi ile Gram (-) bakterileri, *E. coli*, *S. Typhimurium* ve Gram (+) bakterileri, *B. cereus*, *S. aureus* karşı belirlenmiştir. Sulu propolis ekstratlarının ve SP-AgNP'lerinin Gram (-) bakterilerinin Gram (+) bakterilerine göre daha direçli olduğu gözlemlenmiştir. *E. coli* suşu en dirençli Gram (-) bakteri olurken. *S. aureus* suşu en hassas Gram (+) bakteri olduğu gözlemlenmiştir. SP-AgNP'lerinin ve sulu propolis ekstratlarının minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) Tablo 4.2 ve ASE-PAgNP'lerin ve ASE propolis ekstraktının MİK değerleri ise Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. SP-AgNP'lerinin ve sulu propolis ekstraktının MİK değerleri

Mikroorganizmalar	MİK($\mu\text{g/mL}$)	
	Optimize SP-AgNP	Sulu Propolis
<i>S.aureus</i>	64	256
<i>B.cereus</i>	128	256
<i>E.coli</i>	512	1024
<i>S.Typhimurium</i>	256	1024

Tablo 4.3. ASE-PAgNP'lerinin ve ASE propolis ekstraktının MİK değerleri

Mikroorganizmalar	MİK($\mu\text{g/mL}$)	
	Optimize ASE-AgNP	ASE- propolis
<i>S.aureus</i>	64	64
<i>B.cereus</i>	32	32
<i>E.coli</i>	256	256
<i>S.Typhimurium</i>	256	512

Beyaz propolis kullanılarak üretilen AgNP'lerin MİK değerleri *S.aureus*; 25,1 $\mu\text{g/mL}$, *P.aeruginosa*; 26,2 $\mu\text{g/mL}$, *K.pneumoniae*; 18,2 $\mu\text{g/mL}$, *E.faecalis* ise 17,9 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenirken. *S.aureus*, *P.aeruginosa* ve *K.pneumoniae* için beyaz propolis ekstraktı için MİK değeri 250 $\mu\text{g/mL}$ ve *E.faecalis* için ise 500 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir (Tosun and Kaplan, 2022).

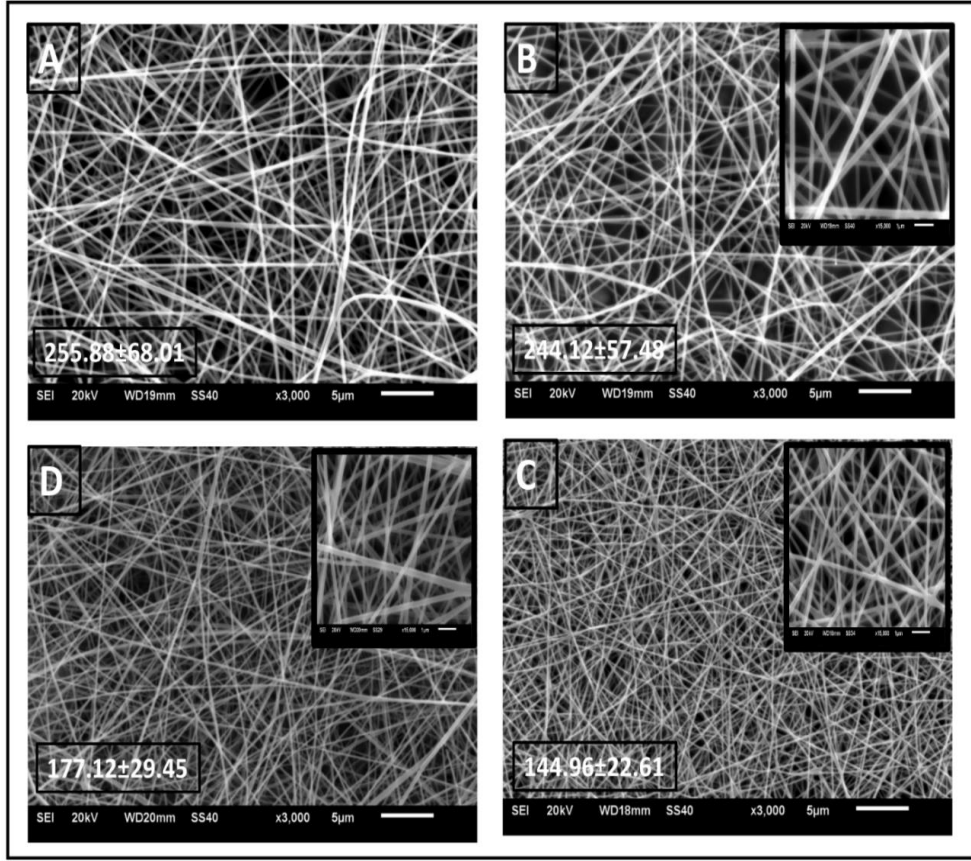
Kırmızı Brezilya propolisinin etanol ekstraktının ve AgNP'lerin MİK değerleri *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* ve *E. coli* için belirlenmiştir (Barbosa et al. 2019). Suudi propolislerinin sulu ekstraktı ve metanolik esktarktı ile üretilen AgNP'ler *L. monoctogenes*, *S. typhmurium*, *E.coli*, bakterilerine karşı antibakteriyel etki gösterdiği fakat *A.solani*, *Helminthosporium sp.F.oxysporum* küflerine karşı etkili olmadığı görülmüştür (Al-Fakeh et al. 2021).

4.2. ASE ile Ekstrakte Edilmiş Propolis Gümüş Nanopartikül/Propolis Katkılı Elektrospun Nanofiber Filmlerin Üretimi ve Karakterizasyonu

Bu tez çalışmasının ikinci bölümünde sulu propolis ekstraktı kullanılarak optimize edilen optimum şartlarda üretilen ASE propolis ekstraktı gümüş nanopartikülleri ve yenilikçi bir ekstraksiyon yöntemi olan ASE propolis ekstraktı ile aktif özellikte gıda ambalajı geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla doğal bir mikrobiyal ekzopolisakkarit olan pullulan polimeri kullanılarak 3 katmanlı; 1. katmanı ASE-AgNP, 2. Katmanı ASE-AgNP/ASE-Propolis ve 3. katmanı ASE-Propolis içeren nanofiber yapıda çok katmanlı pullulan bazlı gıda güvenliğini iyileştirmek için antimikrobiyal özellikte aktif nanofiber yapıları gıda ambalajı geliştirmek hedeflenmiştir.

4.2.1. ASE ile Ekstrakte Edilmiş Propolis Gümüş Nanopartikül/Propolis Katkılı Elektrospun Nanofiber Filmlerin SEM Analizleri

Hazırlanan spinning çözeltileri homojen fiber üretilmesi için spinning parametreleri olan polimer solüsyonu konsantrasyonu, voltaj, besleme hızı ve iğne ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe gibi spinning parametreleri optimize edilmiştir. Optimize şartlar olan 22 kV voltaj, 12 cm toplayıcı ile iğne ucu arası uzaklık ve 0,5 ml/s besleme hızında nanofiberler üretilmiştir. Üretilen fiber filmlerin SEM görüntüleri Şekil 4.13'te verilmiştir.



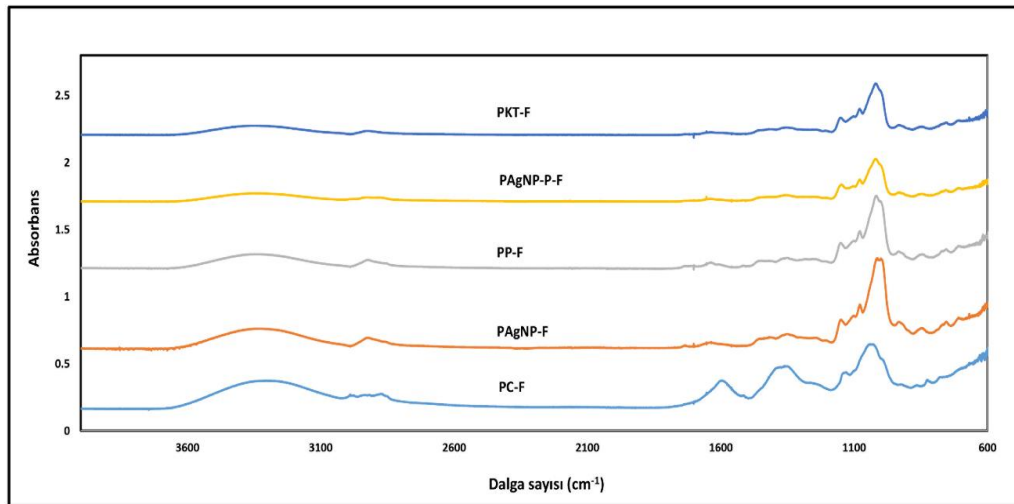
Şekil 4.13. A) Pullulan ASE-AgNP Film (PAgNPF), B) Pullulan ASE-AgNP-Popolis Film (PAgNP-PF), C) Pullulan Propolis Film (PPF) D) Pullulan Kontrol Film (PCF)

Şekil 4.13’de SEM sonuçlarında görüldüğü gibi homojen yapıda fiber filmler geliştirilmiştir. Geliştirilen fiber filmlerin çapları; elektrospun pullulan ASE-AgNP nanofiber film ($255,88 \pm 68,01$ nm), elektrospun pullulan ASE-AgNP-popolis nanofiber film ($244,12 \pm 57,48$ nm), elektrospun pullulan propolis nanofiber film ($144,96 \pm 22,61$ nm) ve elektrospun pullulan kontrol nanofiber film ($177,12 \pm 29,45$ nm) olarak ölçülmüştür. En düşük fiber çaplı filmin pullulan propolis fiber filmin olduğu, en yüksek fiber çapına sahip fiber filmin ise pullulan ASE-AgNP fiber film olduğu görülmüştür.

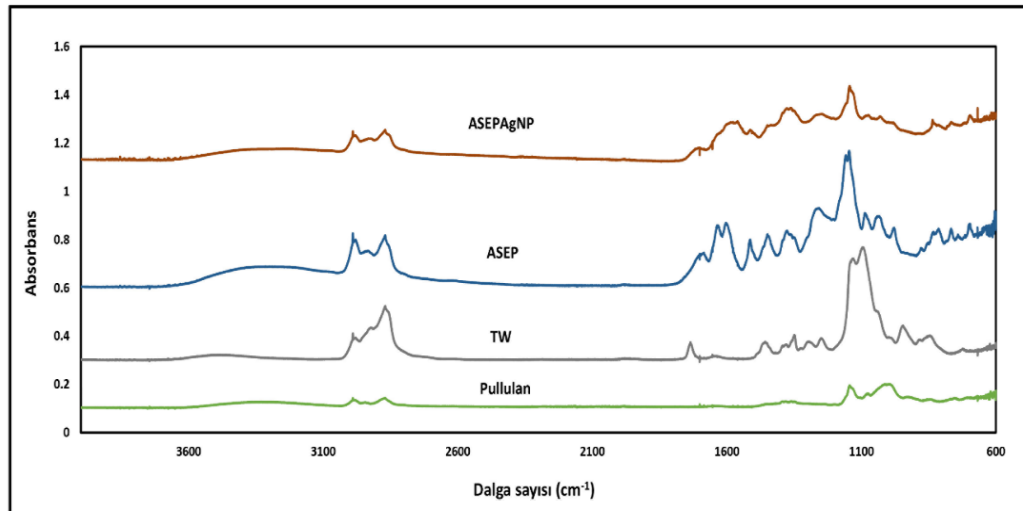
4.2.2. ASE ile Ekstrakte Edilmiş Propolis Gümüş Nanopartikül/Propolis Katkılı Elektrospun Nanofiber Filmlerin FTIR Analizleri

Propolis ve gümüş nanopartiküllerinin çeşitli fonksiyonel gruplarının varlığını ve pullulan fiber filmdeki yapısal değişiklikleri analiz FTIR kullanılarak incelenmiştir. Üretilen fiber filmlerin ve kullanılan propolis, ASE-AgNP'ler ve pullulan toz haldeki FTIR spektrumları sırası ile Şekil 4.14 ve Şekil 4.15.'de gösterilmiştir.

Pullulan kontrol filmin 3353,62/2922,61/1652,99/1419,70/1349,99/1152,39/1079,70/1020,56 ve 529,64 cm^{-1} dalga boylarında spektrumlar gösterdiği belirlenmiştir. Şekil 4.15 ASE-AgNP 'lerin 3227,27/2989,64/2869,83/1701,09/1654,19/1560,77/1513,13/1363,73/1250,42/1143,69/1030,89/834,87 ve 766,32 cm^{-1} dalga boylarında spektrumlar gösterdiği belirlenmiştir. Pullulan nanofiber 3313 cm^{-1} , 2925 cm^{-1} ve 1641 cm^{-1} de ki absorpsiyon pikleri sırası ile esneme $\nu(\text{O-H})$, $\nu(\text{C-H})$ esneme ve bükülme H-O-H değişimleri görülmektedir. 1200 cm^{-1} ve 1000 cm^{-1} esneme $\nu(\text{C-O})$ titreşimleri görülmektedir (Celebioglu and Uyar, 2021; Hsiung et al., 2023). Pullulan elektrospun nanofiber filmin yapısındaki 1150 cm^{-1} ile 1060 cm^{-1} (glikosidik köprülerin C-O-C gerilmesini ve 754 cm^{-1} (α -glikosidik bağın gerilmesi) pullulan polimerinin yapısal spektrumlarına ait olduğunu göstermektedir (Silva et al.,2018). Hidokarbon içeriğinde varyasyonlara ait absorplanan pikler 2916, 2848, 1461,730 ve 720 cm^{-1} ve propoliste bulunan bal mumundaki ester pikleri 1736 cm^{-1} , 1800 ile 600 cm^{-1} 'deki spektral varyasyonlar ise propolis yapısındaki fenoller, flavanodler ve esterlerin çeşitliliğinden kaynaklanmaktadır (Svečnjak et al. 2020).



Şekil 4.14. Pullulan elektrospun nanofiber filmlerin FTIR spektrumu

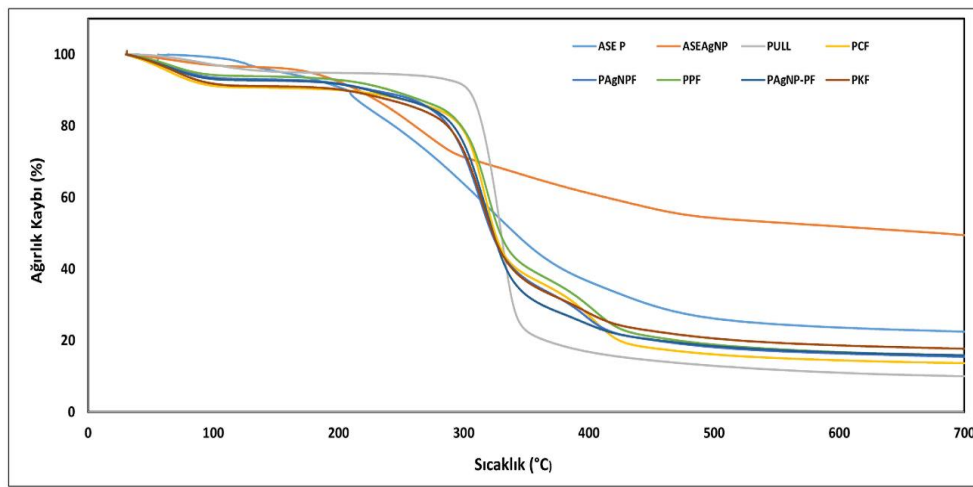


Şekil 4.15. ASEAgNP, ASEP, TW ve toz haldeki pullulan polimerinin FTIR spektrumu

4.2.3. ASE ile Ekstrakte Edilmiş Propolis Gümüş Nanopartikül/Propolis Katkılı Elektrospun Nanofiber Filmlerin TGA Analizleri

Geliştirilen fiber filmlerin termal özellikleri termogravimetrik analiz (TGA) ile belirlenmiştir. Üretilen fiber filmlerin TGA termogramları Şekil 4.16 'da gösterilmiştir. Toz pullulanın ağırlık kaybı yaklaşık olarak 100 °C ve 330°C 'de görülürken kontrol pullulan film, katmanlı film, propolis ve gümüş nanopartikül katkılı fiber filmlerde ise yaklaşık 74°C, 318°C ve 407 °C 'de ağırlık kaybı görülmüştür (Şekil 4.17.).

Celebioglu and Uyar (2021) pullulan tabanlı nanofiberler eugenol gamma silkodekstrin (γ CD) inklüzyon kompleksleri ile üretilen nanofiber filmlerde 2 ağırlık kaybı görülmüş olup, yaklaşık 130°C de suyun dehidrasyonundan ve 330°C de ise pullulan polimerinin bozulma sıcaklığından kaynaklandığı görülmüştür. Pullulan gamma silkodekstrin (γ CD) inklüzyon komplekslerinin eugenol'ün termal kararlılığını artırdığı rapor edilmiştir. Silva et al. (2018) yaptığı çalışmada lizozim enkapsüle edilmiş pullulan nanofiberlerin başlangıç 250 °C de ve maksimum ayrışma sıcaklıkları sırası ile 300 ve 800 °C de gözlemlenmiştir.

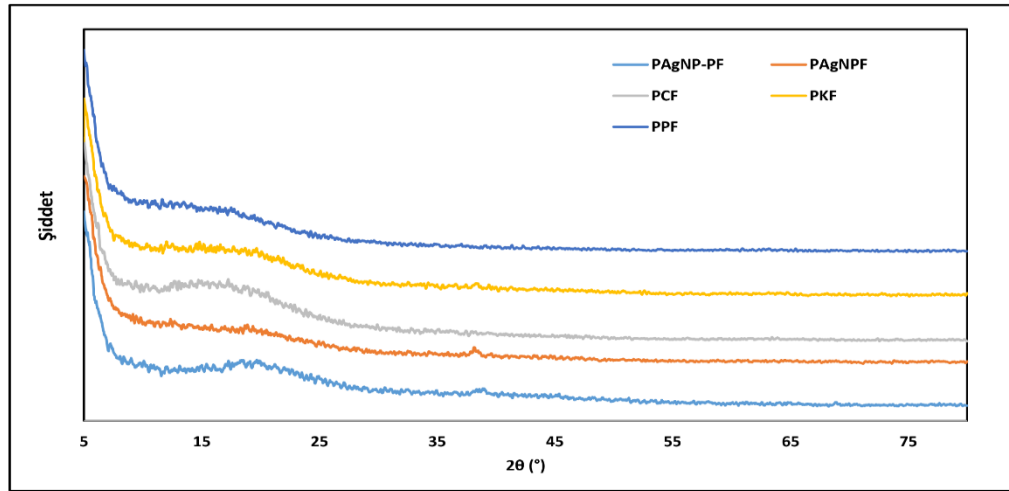


Şekil 4.16. Optimize şartlarda üretilen ASEAgNP'lerin ve Nanofiberlerin TGA analizi

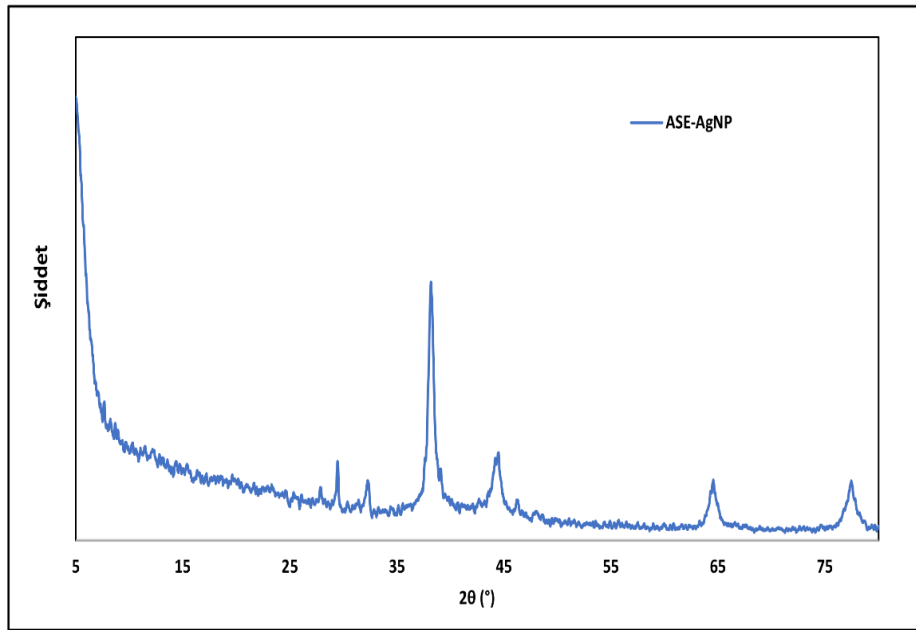
4.2.4. ASE ile Ekstrakte Edilmiş Propolis Gümüş Nanopartikül/Propolis Katkılı Elektrospun Nanofiber Filmlerin XRD Analizleri

Geliştirilen elektrospun nanofiber filmlerin kristal yapısının analizi X-ışını kırınım ölçümü ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.17'de optimize şartlarda üretilen ASE-AgNP'lerin elektrospun naofiber filmlerin XRD analizi sonuçları verilmiştir. ASE-AgNP'lere ait spesifik kristal düzlemler yaklaşık 27,76°, 29,52°, 32,40°, 38,2°, 44,55°, 46,39°, 64,65° ve 77,55° bulunmuştur (Şekil 4.18). ASE-AgNP'lerin kristal piklerinin literatürde yapılan çalışmalar ile uyumlu olduğu görülmüştür (Barbosa et al. 2019; Priyadarshini et al. 2018). Pullun kontrol filmin amorf yapıda olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir (Cebelioglu and Uyar, 2021).

PAgNP, PAgNP-PF ve PKF elektrospun fiber filmler gümüş nanopartiküllerin spesifik olan kristal piki olan $38,5^\circ$ içerirken, bu kristal pikinin şiddetinin PAgNP fiber filmde daha yüksek olduğu ve 3 katlı PKF filmde ise en düşük olduğu görülmüştür (Şekil 4.18). Islam et al. (2011) çalışmasında pullulan gümüş nanopartiküller ile geliştirdiği elektrospay nanopartiküllerin gümüş nanopartikül kristalleri ait $38,2^\circ$ ve $44,6^\circ$ pikleri içerdiği rapor edilmiştir. Cebelioglu and Uyar (2021), pullulan fiber filmlere enkapsüle olan eugenol-siklodekstrin kompleksinin kristal yapısını ve ekapsülasyonu XRD analizi ile belirlemiştir. Bailore et al. (2021), geliştirilen pullulan/piscean kolojen ve ZnO nanopartikül içeren kompozit filmde, amorf yapısından dolayı kristal pik içermeyen pullulan kompozit filmdeki $2\theta=16,1^\circ$ pikinin varlığının pullulan kolajen bağlanmasından ortaya çıktığını saptanmıştır.



Şekil 4.17. Optimize şartlarda üretilen ASEAgNP'lerin ve Nanofiberlerin XRD analizi



Şekil 4.18. Optimize şartlarda üretilen ASE-AgNP'lerin X-ışını kırınımı (XRD) analizi

4.2.5. ASE ile Ekstrakte Edilmiş Propolis Gümüş Nanopartikül/Propolis Katkılı Elektropsun Nanofiber Filmlerin Antibakteriyel Analizleri

Pullulan nanofiber filmlerin antimikrobiyal etkinliği Tablo 4.4' te gösterilmiştir. Gümüş nanopartikül içeren PAgNPF nanofiber filmi test edilen Gram (-) bakterileri; *E. coli*, *S. Typhimurium*, *P.aurogenes* ve Gram (+) bakterileri; *B. cereus*, *S. aureus*, *L. innocua* karşı antimikrobiyal etkinlik göstermiştir. PPF, PAgNP-PF, PKF nanofiber filmler ise sadece ve Gram (+) bakterilerine; *B. cereus*, *S. aureus*, *L. innocua* karşı antimikrobiyal etkinlik göstermiştir. *S. aureus* karşı en iyi PKF, *B. cereus* karşı PPF, PAgNP-PF ve PKF nanofiber filmler yaklaşık olarak aynı antimikrobiyal etkinliği göstermişlerdir. *L. innocua* karşı PPF ve PAgNP-PF nanofiber filmler yaklaşık olarak aynı antimikrobiyal etkinliği göstermişlerdir. ASE propolis ve ASE-PAgNP içermeyen pullulan kontrol nanofiber film (PCF) herhangi bir antibakteriyel etkinlik göstermemiştir.

Metalik nanopartiküller antimikrobiyal aktivite gösterdiklerinden gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatma potansiyeline sahip oldukları için son yıllarda aktif ve akıllı gıda ambalajlamada uygulama alanları artmıştır (Dos Santos and Rai, 2020; Roy et al. 2021). Min et al. (2021), taze gıdaların kaplanması için geliştirdiği timol ve porfirin metal-

organik çerçeve nanopartiküllerini (PCNNP'ler) içeren pullulan-polivinil alkol (PUL/PVA) kompozit nanofiber (THY@PCN/PULL/PVA) filmin ışıklı ve ışısız ortamda 7 gün depolanan üzümlerin ve çileklerin depolama sürecince kaplanmamış kontrol örnekler ile kıyaslandığında meyvelerin kalitesinin korunduğu görülmüştür. Roy et al. (2021), et paketleme uygulamalarında kullanılmak amacıyla antimikrobiyal ve antioksidan özellikte aktif ambalaj geliştirmek için çinko oksit (ZnO) nanopartikülleri ve propolis ekstraktı içeren pullulan/kitosan bazlı aktif özellik gösteren nanokompozit gıda ambalajı geliştirmiştir. Geliştirilen kompozit film domuz etinin ambalajlanmasında kullanılmıştır. Kompozit pullulan/kitosan/ZnOPs/propolis film ile kaplanmış etlerin, 8 günlük depolamanın sonucunda, paketlenmeyen etlerle kıyaslandığında peroksit değerinin ve toplam aerobik mikroorganizma sayısının, önemli ölçüde azaldığı rapor edilmiştir.

Tablo 4.4. Elektrospon nanofiber filmlerin antibakteriyel analizleri

Film	Mikroorganizmalar					
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. Innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>
	İnhibisyon zon çapı (mm)					
PAgNPF	11,73±0,16 ^c	10,89±0,15 ^b	9,43±0,30 ^c	10,26±0,21 ^a	9,74±0,27 ^a	9,23±0,08 ^a
PPF	12,90±0,15 ^b	14,99±0,08 ^a	13,4±0,21 ^a	-	-	-
PAgNP-PF	11,68±0,34 ^c	15,04±0,13 ^a	13,69±0,24 ^a	-	-	-
PKF	13,12±0,25 ^a	15,03±0,41 ^a	10,46±0,30 ^b	-	-	-
PCF	-	-	-	-	-	-
AMP	35,02±0,26	7,71±0,13	36,59±0,36	14,39±0,26	22,58±0,21	-
GEN	23,24±0,67	23,36±0,66	28,45±0,29	20,72±0,12	19,02±0,07	17,5±0,36

a.b.c.d: Aynı satırdaki farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir (p<0.05)

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında yeşil sentez yöntemi ile sulu propolis ekstraktı ile AgNP üretimi üzerine etkili faktörler deney tasarımı Box-Bhenken deney tasarımı kullanılarak optimize üretim koşulları araştırılmıştır. Optimize edilen şartlarda ASE propolis ekstraktı kullanılarak AgNP'ler üretilmiştir. ASE propolis ekstraktı ile üretilen AgNP'ler ve ASE propolis içeren pullulan bazlı çok katmanlı nanofiber yapıda film üretimi ve optimizasyon koşulları incelenmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen çalışma sonuçları aşağıda özetlenmiştir.

- 1) Öncelikle bu tez çalışması 2 bölümden oluşmaktadır. Tezin birinci bölümünde Box-Bhenken deney tasarımı kullanılarak sulu propolis ekstraktı ile AgNP'lerin üretimi üzerine etkili olan bağımsız değişkenlerin zeta potansiyel değeri üzerine etkisi incelenmiştir.
- 2) AgNP'lerin üretimi için optimize şartlar; pH: 11,82, AgNO₃ konsantrasyonu: 4,99 mM ve ultrasonik ses dalgaları uygulama süresi: 4 olarak bulunmuştur.
- 3) Sulu propolis gümüş nanopartiküller için optimize edilen noktada ASE propolis ekstraktı ile gümüş nanopartiküller üretilmiştir.
- 4) Karakterizasyon çalışmalarında nm boyutunda, termal kararlılığı yüksek, kristal yapıda ve antimikrobiyal aktiviteye sahip sulu ve ASE propolis ekstraktından AgNP'ler üretilmiştir.
- 5) Üretilen gümüş nanopartiküllerdeki gümüş varlığı SEM-EDX analizi ile doğrulanmıştır.
- 6) Optimize şartlarda üretilen ASE-AgNP ve ASE propolis ekstraktı kullanılarak pullulan bazlı çok katmanlı ve nanofiber yapıda, gıda güvenliliği alanında kullanılmak üzere gıda ambalajı geliştirilmiştir.

- 7) Doğal mikrobiyal bir ekzopolisakkarit olan pullulan polimeri kullanılarak 3 katmanlı; 1. katmanı ASE-AgNP, 2. Katmanı ASE-AgNP/ASE-Propolis ve 3. katmanı ASE-Propolis içeren nanofiber yapıda, çok katmanlı pullulan bazlı gıda güvenliğini iyileştirmek için antimikrobiyal özellikte nanofiber yapıları aktif gıda ambalajı geliştirilmiştir.
- 8) Geliştirilen gıda ambalajının karakterizasyon çalışmaları sonucunda nanofiber yapıda olduğu SEM, analizleri ile, yapısal değişimler FTIR, X-Ray ve TGA analizleri ile doğrulanmıştır.
- 9) Antimikrobiyal özellikte geliştirilen PAgNPF fiber filmi test edilen Gram (-) bakterileri; *E. coli*, *S. Typhimurium*, *P.aurogenes* ve Gram (+) bakterileri; *B. cereus*, *S. aureus*, *L. innocua* karşı etkinlik göstermiştir. PPF, PAgNP-PF, PKF elektrospun nanofiber filmler ise sadece ve Gram (+) bakterileri; *B. cereus*, *S. aureus* ve *L. innocua* karşı etkinlik göstermiştir.
- 10) Üretimi optimize edilen gümüş nanopartiküller yüksek antimikrobiyal özellikte olduğundan, gıdaların kalitesinin ve raf ömrünün uzatılması amacı ile farklı uygulamalarda kullanılma potansiyeline sahiptir olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

Agarwal, A., Shaida, B., Rastogi, M., and Bahadur, N. (2023). Food packaging materials with special reference to biopolymers properties and applications. *Chemistry Africa*, 6(1), 117–44.

Ahmed, F. E., Lalia, B. S., and Hashaikeh, R. (2015). A review on electrospinning for membrane fabrication: Challenges and applications. *Desalination*, 356, 15-30.

Ahn, M. R. (2004). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7286–92.

Alizadeh-Sani, M., Mohammadian, E., Rhim, J.-W., and Jafari, S. M. (2020). pH-sensivite (halochromic) smart packaging films based on natural food colorants for the monitoring of food quality. *Trends in Food Science and Technology*, 105, 93-144.

Al-Fakeh, M. S., Osman, S., Gassoumi, M., Rabhi, M., and Omer, M. (2021). Biosynthesis and characterization of Saudi propolis-mediated silver nanoparticles and their biological properties. *Open Physics*, 19(1), 753-757.

Amna, T., Yang, J., Ryu, K. S., and Hwang, I. H. (2015). Electrospun antimicrobial hybrid mats: innovative packaging material for meat and meat-products. *Journal of Food Science and Technology*, 52(7) 4600–4606.

Anjum, S. I., Ullah, A., Khan, K. A., Attaullah, M., Khan, H., Ali, H., ... and Dash, C. K. (2019). Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1695-1703.

Arserim-Uçar, D. K., Korel, F., Liu, L., and Yam, K. L. (2021). Characterization of bacterial cellulose nanocrystals: Effect of acid treatments and neutralization. *Food chemistry*, 336, 127597.

Arserim-Ucar, D. K., Gecibesler, I. H., Sudagidan, M., and Dursun, I. (2020). Determination of biological activity, lipophilic and volatile organic compounds of bingöl propolis isolates. *Turkish. Journal of Nature Science*, 9, 92–102.

Arserim-Uçar, D. K., and Çabuk, B. (2020). Emerging antibacterial and antifungal applications of nanomaterials on food products. *In Nanotoxicity*, 415-453, Amsterdam, Netherlands, Elsevier.

Aswathi, V. P., Meera, S., Ann Maria, C. G., and Nidhin, M. (2023). Green synthesis of nanoparticles from biodegradable waste extracts and their applications: A critical review. *Nanotechnology for Environmental Engineering*, 8(2), 377–97.

Bahrami, A., Delshadi, R., Assadpour, E., Jafari, S. M., and Williams, L. (2020). Antimicrobial- loaded nanocarriers for food packaging applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 278, 102140.

Bailore, N. N., Balladka, S. K., Doddapaneni, S. J. D., and Mudiyaru, M. S. (2021). Fabrication of environmentally compatible biopolymer films of Pullulan/Piscean collagen/ZnO nanocomposite and their antifungal activity. *Journal of Polymers and the Environment*, 29, 1192-1201.

Bajpai, V. K., Kamle, M., Shukla, S., Mahato, D. K., Chandra, P., Hwang, S. K., ... and Han, Y. K. (2018). Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety, and security. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(4), 1201–14.

Barbosa, V. T., Souza, J. K. C., Alvino, V., Meneghetti, M. R., Florez-Rodriguez, P. P., Moreira, R. E., ... and Dornekas, C. B. (2019). Biogenic synthesis of silver nanoparticles using Brazilian propolis. *Biotechnology Progress*, 35, e2888;1-9.

Basavegowda, N., Mandal, T. K., and Baek, K.H. (2020). Bimetallic and trimetallic nanoparticles for active food packaging applications: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 13(1), 30–44.

Basim, E., Basim, H., and Ozcan, M. (2006). Antibacterial activities of turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering*, 77(4), 992–96.

Batista, A. F . P., Rosa, L. C. M., Pizzo, J. S., Da Silva, A. F., Visentainer, J. V., ... and Mikcha, J. M. G. (2023). Biogenic silver nanoparticles and cinnamaldehyde as an effective sanitizer for fresh sweet grape tomatoes. *Journal of Food Science and Technology*, 60(9), 2477–85.

Biswal, A. K., and Misra, P. K. (2020). Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles for prospective application in food packaging and biomedical fields. *Materials Chemistry and Physics*, 250(4), 123014.

Carbone, M., Donia, D. T., Sabbatella, G., and Antiochia, R. (2016). Silver nanoparticles in polymeric matrices for fresh food packaging. *Journal of King Saud University - Science*, 28(4), 273-279.

Centers for Disease Control and Prevention (CDD), (2023). <https://www.cdc.gov/> (Erişim tarihi:08.11.2023).

Celebioglu, A., and Uyar, T. (2021). Electrohydrodynamic encapsulation of eugenol-cyclodextrin complexes in pullulan nanofibers. *Food Hydrocolloids*, 111(2), 106264.

Ceylan, Z. (2018). Use of Characterized chitosan nanoparticles integrated in poly(vinyl alcohol) nanofibers as an alternative nanoscale material for fish balls. *Journal of Food Safety*, 38(6), 1–5.

Ceylan, Z., Kutlu, N., Meral, R., Ekin, M. M., and Kose, Y. E. (2021). Protective effect of grape seed oil-loaded nanofibers: limitation of microbial growth and lipid oxidation in kashar cheese and fish meat samples. *Food Bioscience*, 42(3), 101076.

Cetinkaya, T., Bildik, F., Altay, F., and Ceylan, Z. (2024). Gelatin nanofibers with black elderberry, Au nanoparticles and SnO₂ as intelligent packaging layer used for monitoring freshness of Hake fish. *Food Chemistry*, 437, 137843.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; (CLSI). 2018. M100–S28.

Chandra, H., Kumari, P., Bontempi, E., and Yadav, S. (2020). Medicinal plants: Treasure trove for green synthesis of metallic nanoparticles and their biomedical applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24, 101518.

Charland, J. M., Deocarís, C. C., Micor, J. R. L., and Mojica, E. R. E. (2021b.) Potential and Performance of Accelerated Solvent Extraction (ASE) in Obtaining Bioactive Compounds from Bee Propolis: Comparison with Soaking , Ultrasonication , and Microwave-Assisted Methods. *Journal of Tropical Life Science*, 11(2), 187–92.

Chowdhury, S., Yusof, F., Faruk, M. O., and Sulaiman, N. (2016). Process optimization of silver nanoparticle synthesis using response surface methodology. *Procedia Engineering*, 148, 992–99.

De Zordi, N., Cortesi, A., Kikic, I., Moneghini, M., Solinas, D., Innocenti, G., ... and Dall'Acqua, S. (2014). The Supercritical carbon dioxide extraction of polyphenols from propolis : A central composite design approach. *The Journal of Supercritical Fluids*, 95, 491–98.

Dos Santos, C. A., Ingle, A. P., and Rai, M. (2020). The emerging role of metallic nanoparticles in food. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(6), 2373–83.

Duan, M., Sun, J., Yu, S., Zhi, Z., Pang, J., and Wu, C. (2023). Insights into electrospun pullulan-carboxymethyl Chitosan/PEO core-shell nanofibers loaded with nanogels for food antibacterial packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 233(4), 123433.

Ertan, K., Celebioglu, A., Chowdhury, R., Sumnu, G., Sahin, S., Altier, C., and Uyar, T. (2023). Carvacrol/Cyclodextrin inclusion complex loaded gelatin/pullulan nanofibers for active food packaging applications. *Food Hydrocolloids*, 142(9), 108864.

Fabra, M. J., Busolo, M. A., Lopez-Rubio, A., and Lagaron, J. M. (2013). Nanostructured biolayers in food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 31(5), 79–87.

Fabra, M. J., Lopez-Rubio, A., and Lagaron, J. M. (2014). On the use of different hydrocolloids as electrospun adhesive interlayers to enhance the barrier properties of polyhydroxyalkanoates of interest in fully renewable food packaging concepts. *Food Hydrocolloids*, 39(8), 77–84.

Fabra, M. J., Lopez-Rubio, A., and Ambrosio-Martin, J. (2016). Improving the barrier properties of thermoplastic corn starch-based films containing bacterial cellulose nanowhiskers by means of pha electrospun coatings of interest in food packaging. *Food Hydrocolloids Journal*, 61(12), 261–68.

Fachria, B. A., Sari, P., Yuwantib, S., and Subroto, E. (2020). Chemical engineering research and design experimental study and modeling on supercritical CO₂ extraction of Indonesian raw propolis using response surface method: influence of pressure, temperature and CO₂ mass flowrate on extraction yield. *Chemical Engineering Research and Design*, 153(6), 452–62.

Fatimah, I., and Afrid, Z. H. V. I. (2019). Characteristics and antibacterial activity of green synthesized silver nanoparticles using red spinach (*Amaranthus Tricolor L.*) leaf extract. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 72(1), 25-30.

Funari, C. S., Sutton, A. T., Carneiro, R. L., Fraige, K., Cavalheiro, A. J., da Silva Bolzani, V., ... and Arrua, R. D. (2019). Natural deep eutectic solvents and aqueous solutions as an alternative extraction media for propolis. *Food Research International*, 125(6), 108559.

Ganduri, V. S. R. (2020). Evaluation of pullulan-based edible active coating methods on Rastali and Chakkarakeli bananas and their shelf-life extension parameters studies. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(4), 1–11.

Gasti, T., Dixit, S., Hiremani, V. D., Chougale, R. B., Masti, S. P., Vootla, S. K., and Mudigoudra, B. S. (2022). Chitosan/Pullulan based films incorporated with clove essential oil loaded chitosan-zno hybrid nanoparticles for active food packaging. *Carbohydrate Polymers*, 277(10), 118866.

Gounga, M. E., Xu, S. Y., Wang, Z., and Yang, W. G. (2008). Effect of whey protein isolate-pullulan edible coatings on the quality and shelf life of freshly roasted and freeze-dried Chinese chestnut. *Journal of Food Science*, 73(4).

Grzebieniarczyk, W., Biswas, D., and Roy, S., and Jamroz, E. (2023). Advances in biopolymer-based multi-layer film preparations and food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*, 35(3),101033.

Gudimalla, A., Jose, J., Varghese, R. J., and Thomas, S. (2021). Green synthesis of silver nanoparticles using *Nymphae odorata* extract incorporated films and antimicrobial activity. *Journal of Polymers and the Environment*, 29(5), 1412–1423.

Hajikhani, M., and Lin, M. (2022). A review on designing nanofibers with high porous and rough surface via electrospinning technology for rapid detection of food quality and safety attributes. *Trends in Food Science and Technology*, 128(1),118-128.

Hossain, R., Quispe, C., Khan, R. A., Saikat, A. S. M., Ray, P., Ongalbek, D., ... and Cho, W. C. (2022). Propolis: An update on its chemistry and pharmacological applications. *Chinese Medicine*, 17(1), 1-60.

Hsiung, E., Celebioglu, A., Kilic, M. E., Durgun, E., and Uyar, T. (2023). Fast-Disintegrating Nanofibrous Web of Pullulan/Griseofulvin–Cyclodextrin Inclusion Complexes. *Molecular Pharmaceutics*, 20(5), 2624-2633.

Huang, Y., Mei, L., Chen, X., and Wang, Q. (2018). Recent developments in food packaging based on nanomaterials. *Nanomaterials*, 8(10), 1–29.

Hutnik, J., Phillips, J., and Mojica, E. R. E. 2022. Optimization of temperature condition in pressure liquid extraction of propolis samples. *Journal of Undergraduate Chemistry Research*, 21(2), 15.

Ibrahim, S., Ahmad, Z., Manzoor, M. Z., Mujahid, M., Faheem, Z., and Adnan, A. (2021). Optimization for biogenic microbial synthesis of silver nanoparticles through response surface methodology, characterization, and their antimicrobial , antioxidant , and catalytic potential. *Scientific Reports*, 12(6), 1–18.

Islam, M. S., Molla, M. A. I., Sarker, M., Karim, M. M., Masum, S. M., and Yeum, J. H. (2011). Fabrication of pullulan/silver nanoparticle composite nanospheres using electrospray technique for antibacterial applications. *International Journal of Basic & Applied Sciences*, 11(1), 36-40.

Islam, M. S., and Yeum, J. H. (2013). Electrospun pullulan/poly(vinyl alcohol)/silver hybrid nanofibers: Preparation and property characterization for antibacterial activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 436(5), 279-286.

Istiqola, A., & Syafiuddin, A. (2020). A Review of silver nanoparticles in food packaging technologies: regulation, methods, properties, migration, and future challenges. *Journal Of The Chinese Chemical Society*, 67(7), 1942–56.

Jahan, I., Erci, F., and Isildak, I. (2021). Rapid green synthesis of non - cytotoxic silver nanoparticles using aqueous extracts of 'Golden Delicious' apple pulp and cumin seeds with antibacterial and antioxidant activity. *SN Applied Sciences*, 3(1), 1–14.

Keskin, M., Kaya, G., and Keskin, S. (2022). Green synthesis and biochemical properties of propolis based silver nanoparticles. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 22(1), 59-67.

Khalaf, H., Sharoba, A., El-Tanahi, H., and Morsy, M. (2013). Stability of antimicrobial activity of pullulan edible films incorporated with nanoparticles and essential oils and their impact on Turkey Deli Meat Quality. *Journal of Food and Dairy Sciences*, 4(11), 557–73.

Khaneghah, A. M., Hashemi, S. M. B., and Limbo, S. (2018). Antimicrobial agents and packaging Systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. *Food and Bioproducts Processing*, 111(9), 1-19.

Khatami, M., Mortazavi, S. M., Kishani-Farahani, Z., Amini, A., Amini, E., and Heli, H. (2017). Biosynthesis of silver nanoparticles using pine pollen and evaluation of the antifungal efficiency. *Iranian Journal of Biotechnology*, 15(2), 95-101.

Koç, B., and Kaymak-Ertekin, F. (2003). Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda İşleme Uygulamalar, *Gıda*,35(1), 1–8.

Kothai, S., and Jayanthi, B. (2014). Anti cancer activity of silver nano particles bio-synthesized using stingless bee propolis (*Tetragonula iridipennis*) of Tamilnadu. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 4(40), 30-37.

Kowsalya, E., MosaChristas, K., Balashanmugam, P., and Rani, J. C. (2019). Biocompatible silver nanoparticles/poly(vinyl alcohol) electrospun nanofibers for potential antimicrobial food packaging applications. *Food Packaging and ShelfLife*, 21(9), 100379.

Krupa, A. N. D., Abigail, M. E. A., Santhosh, C., Grace, A. N., and Vimala, R. (2016). Optimization of process parameters for the microbial synthesis of silver nanoparticles using 3-Level Box–Behnken Design. *Ecological Engineering*, 87(2), 168–74.

Kumar, N., Neeraj, Pratibha, & Singla, M. (2020). Enhancement of storage life and quality maintenance of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit using chitosan: Pullulan blend antimicrobial edible coating. *International Journal of Fruit Science*, 20(sup3), S1662-S1680.

Kumar, N., Ojha, A., Upadhyay, A., Singh, R., and Kumar, S. (2021). Effect of active chitosan-pullulan composite edible coating enrich with pomegranate peel extract on the storage quality of green bell pepper. *Lwt*, 138(7), 110435.

Korkmaz, N. (2019). Antibacterial activity and biofilm property of silver nanoparticles synthesized by using saintpaulia aqueous leaf extract. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 7, 2225-2235.

Li, L., Wang, H., Chen, M., Jiang, S., Cheng, J., ... and Jiang, S. (2020). Gelatin/Zein fiber mats encapsulated with resveratrol: kinetics, antibacterial activity and application for pork preservation. *Food Hydrocolloids*, 101(4), 105577.

Li, S., Shen, Y., Xie, A., Yu, X., Qiu, L., Zhang, L., and Zhang, Q. (2007). Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annum L.* extract. *Green Chemistry*, 9(8), 852-885.

Mackevica, A., Olsson, M. E., and Hansen, S. F. (2016). Silver nanoparticle release from commercially available plastic food containers into food simulants. *Journal of Nanoparticle Research*, 18(1), 1–11.

Malhotra, B., Keshwani, A., and Kharkwal, H. (2015). Antimicrobial food packaging: Potential and pitfalls. *Frontiers in Microbiology*, 6(6), 1-9.

Marra, A., Silvestre, C., Duraccio, D., and Cimmino, S. (2016). Polylactic Acid / Zinc oxide biocomposite films for food packaging application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 88(7), 254–62.

Messner, M., Kurkov, S. V., Jansook, P., and Loftsson, T. (2010). Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 387(1-2), 199-208.

Min, T. (2021). Electrospun Pullulan/PVA nanofibers integrated with thymol-loaded porphyrin metal–organic framework for antibacterial food packaging. *Carbohydrate Polymers*, 270(7), 118391

Mohammad, Z. H., Ahmad, F., Ibrahim, S. A., and Zaidi, S. (2022). Application of nanotechnology in different aspects of the food industry. *Discover Food*.

Mohamed, S. O., El-Naggar, K., and Khalil, M. M. H. (2022). Green synthesis of silver nanoparticles using egyptian propolis extract and its antimicrobial activity. *Egyptian Journal of Chemistry*, 65(7), 453-464.

Monroy, Y. M. (2017). The journal of supercritical fluids brazilian green propolis extracts obtained by conventional processes and by processes at high pressure with supercritical carbon dioxide, ethanol and water. *The Journal of Supercritical Fluids*, 130(7), 189–97.

Moura, M. R., Mattoso, L. H. C., and Zucolotto, V. (2012). Development of cellulose-based bactericidal nanocomposites containing silver nanoparticles and their use as active food packaging. *Journal of Food Engineering*, 109(3), 520-524.

Mulla, M. Z., Hadis, R., Nazima, H., and Falsafi, S. R. (2023). Pullulan nanocomposites: effect of nanoparticles and essential oil reinforcement on its performance and food packaging applications. *Food and Humanity*, 1(7), 887–94.

Munteanu, B. S., Aytaç, Z., Pricope, G. M., Uyar, T., and Vasile, C. (2014). Polylactic acid (PLA)/Silver-NP/VitaminE bionanocomposite electrospun nanofibers with antibacterial and antioxidant activity. *Journal of nanoparticle research*, 16(10), 2643.

Nagai, T., Inoue, R., Inoue, H., and Suzuki, N. (2003). Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Food Chemistry*, 80(1), 29–33.

Nie, P., Zhao, Y., and Xu, H. (2023). Synthesis, applications, toxicity and toxicity mechanisms of silver nanoparticles: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 253, 114636.

Nikolic, M. V., Vasiljevic, Z. Z., Auger, S., and Vidic, J. (2021). Metal oxide nanoparticles for safe active and intelligent food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 116(6), 655–68.

Pal, M., Devrani, M., and Hadush, A. (2019). Recent developments in food packaging technologies. *Beverage Food World*, 46(1), 21-25.

Pobiega, K., Kraśniewska, K., Derewiaka, D., and Małgorzata, G. (2019). Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. *Journal of Food Science and Technology*, 56(12), 5386–95.

Priyadarshini, J. F., Sivakumari, K., Selvaraj, R., Ashok, K., Jayaprakash, P., and Rajesh, S. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles from propolis. *Res JLife Sci Bioinform Pharm Chem Sci*, 4(23), 23–36.

Priyadarshi, R., Zohreh, R., and Jong, W. R. (2022). Antioxidant Pectin/Pullulan Edible Coating Incorporated with *Vitis Vinifera* Grape Seed Extract for Extending the Shelf Life of Peanuts. *Postharvest Biology and Technology*, 183(8), 111740.

Qi, Z., Xie, P., Yang, C., Xue, X., Chen, H., Zhou, H., ... and Wang, C. (2023). Developing fisetin-agnps incorporated in reinforced chitosan/pullulan composite-film and its application of postharvest storage in Litchi fruit. *Food Chemistry*, 407(10), 135122.

Qin, Z., Zou, Y., Zhang, Y., Wang, P., and Zhang, H. (2022). Electrospun pullulan nanofiber loading zanthoxylum bungeanum essential oil/ β -cyclodextrin inclusion complexes for active packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 210, 465-474.

Roy, N., Mondal, S., Laskar, R. A., Basu, S., Mandal, D., and Begum, N. A. (2010). Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles by indian propolis and its constituents. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(1), 317–25.

Roy, S., Priyadarshi, R., and Rhim, J. W. (2021). Development of multifunctional pullulan/chitosan-based composite films reinforced with ZnO nanoparticles and propolis for meat packaging applications. *Foods*, 10(11), 2789.

Sabapathi, N., Ramalingam, S., Aruljothi, K. N., Lee, J., and Barathi, S. (2023). Characterization and therapeutic applications of biosynthesized silver nanoparticles using *Cassia auriculata* Flower Extract. *Plants*, 12(4), 707.

Saravanakumar, K., Sathiyaseelan, A., Mariadoss, A. V. A., Xiaowen, H., and Wang, M. H. (2020). Physical and bioactivities of biopolymeric films incorporated with cellulose, sodium alginate and copper oxide nanoparticles for food packaging application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153, 207–214.

Singh, R. S., Kaur, N., Singh, D., Purewal, S. S., and Kennedy, J. F. (2023) Pullulan in pharmaceutical and cosmeceutical formulations :A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 231(6), 123353.

Silva, N. H., Vilela, C., Almeida, A., Marrucho, I. M., and Freire, C. S. (2018). Pullulan-based nanocomposite films for functional food packaging: Exploiting lysozyme nanofibers as antibacterial and antioxidant reinforcing additives. *Food Hydrocolloids*, 77, 921-930.

Sharma, S., Sharma, N., and Kaushal, N. (2023). Utilization of novel bacteriocin synthesized silver nanoparticles (AgNPs) for their application in antimicrobial packaging for preservation of Tomato Fruit. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 7, 1072738.

Sharma, V. K., Yngard, R. A., and Lin, Y. (2009). Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, 145(1-2), 83-96.

Singh, R. S., Saini, G. K., and Kennedy, J. F. (2008). Pullulan:Microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 73 (4), 515–31.

Svečnjak, L., Marijanović, Z., Okińczyc, P., Marek Kuś, P., and Jerković, I. (2020). Mediterranean propolis from the adriatic sea islands as a source of natural antioxidants: Comprehensive chemical biodiversity determined by GC-MS, FTIR-ATR, UHPLC-DAD-QqTOF-MS, DPPH and FRAP assay. *Antioxidants*, 9(4), 337.

Tamjidi, F., Shahedi, M., Varshosaz, J., and Nasirpour, A. (2013). Nanostructured lipid carriers (NLC):A potential delivery System for bioactive food molecules. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 19, 29-43.

Taqi, Z. J., Abdul-Wahed, H. E., AL-Saadi, H. K., and Jabir, M. S. (2020). Potential activity of silver nanoparticles synthesized by Iraqi propolis on phagocytosis. *In AIP Conference Proceedings*, 2213(1)

Tosun, G. and Kaplan, N. Ö. (2022). Biosynthesis of silver nanoparticles using white propolis extract as a reduction agent and optimized by Box-Behnken Design. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 25(5), 933–45.

Vijayaram, S., Razafindralambo, H., Sun, Y. Z., Vasantharaj, S., Ghafarifarsani, H., Hoseinifar, S. H., and Raeeszadeh, M. (2023). Applications of green synthesized metal nanoparticles-A Review. *Biological Trace Element Research*, 1-27

Waktole, G. (2023). Toxicity and Molecular Mechanisms of actions of silver nanoparticles. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 14(3), 53–70.

Wen, P., Zhu, D. H., Wu, H., Zong, M. H., Jing, Y. R., and Han, S. Y. (2016). Encapsulation of cinnamon essential oil in electrospun nanofibrous film for active food packaging. *Food Control*, 59, 366–76.

Yang, D., Liu, Q., Gao, Y., Wan, S., Meng, F., Weng, W., and Zhang, Y. (2023). Food hydrocolloids characterization of silver nanoparticles loaded Chitosan /Polyvinyl alcohol antibacterial films for food packaging. *Food Hydrocolloids*, 136, 108305.

Yilmaz, M. T., Hassanein, W. S., Alkabaa, A. S., and Ceylan, Z. (2022). Electrospun eugenol-loaded gelatin nanofibers as bioactive packaging materials to preserve quality characteristics of beef. *Food Packaging and Shelf Life*, 34, 100968.

Yildirim, S., Röcker, B., Pettersen, M. K., Nilsen-Nygaard, J., Ayhan, Z., Rutkaite, R.,and Coma, V. (2018). Active packaging applications for food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(1), 165-199.

Yuan, Y., Zheng, S., Zeng, L., Deng, Z., Zhang, B., and Li, H. (2019). The phenolic compounds, metabolites, and antioxidant activity of propolis extracted by ultrasound-assisted method. *Journal of Food Science*, 84(12), 3850-3865.

Yue, T. T., Li, X., Wang, X. X., Yan, X., Yu, M., Ma, J. W., ... & Long, Y. Z. (2018). Electrospinning of carboxymethyl chitosan/polyoxyethylene oxide nanofibers for fruit fresh-keeping. *Nanoscale Research Letters*, 13,1-8.

Zambak, Ö., Özkal, A., and Özkal, S. G. (2022). Production of clove extract loaded pullulan and whey protein nanofibers as antioxidant and antibacterial agent. *Journal of Applied Polymer Science*, 139(46),e53141.

Zeng, Z., Yang, Y. J., Tu, Q., Jian, Y. Y., Xie, D. M., Bai, T., ... and Liu, A. P. (2023). Preparation and characterization of carboxymethyl chitosan/pullulan composite film incorporated with eugenol and its application in the preservation of chilled meat. *Meat Science*, 198, 109085.

Zeng, A., Yang, R., Tong, Y., and Zhao, W. (2023). Functional bacterial cellulose nanofibrils with silver nanoparticles and its antibacterial application.” *International Journal of Biological Macromolecules* 235(November 2022): 123739.

Zhou, W., He, Y., Liu, F., Liao, L., Huang, X., Li, R., ... and Li, J. (2021). Carboxymethyl Chitosan-Pullulan edible films enriched with galangal essential oil: Characterization and application in mango preservation. *Carbohydrate Polymers*, 256(12),117579

