T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOĞAL DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜLER İLE PROPOLİS EKSTRAKSİYONU VE EKSTRAKTIN İN SİTU ANTİFUNGAL ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Ufuk ALPAT

DOKTORA TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Danışman

Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

Mart, 2024

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOĞAL DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜLER İLE PROPOLİS EKSTRAKSİYONU VE EKSTRAKTIN İN SİTU ANTİFUNGAL ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Ufuk ALPAT tarafından hazırlanan tez çalışması 08/03/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Sibel SİLİCİ
Erciyes Üniversitesi _____

Doç. Dr. Salih KARASU, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Mustafa YAMAN, Üye
İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üy. Fatih BOZKURT, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Doğal Derin Ötektik Çözücüler ile Propolis Ekstraksiyonu ve Ekstraktın İn Situ Antifungal Etkisinin İncelenmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Ufuk ALPAT

İmza

Beni yetiştiren Annem ve Babam'a,

Sevgili Eşim Burçin Alpat'a

ve gözbebeklerim Onur ve Efe'ye

TEŞEKKÜR

Bu heyecan verici doktora yolculuğuma geç bir yaşta başladım, dolayısıyla çevremdeki insanların bana olan manevi destekleri bu dönemde benim için çok önemli oldu. Bu nedenle, hocalarıma, dostlarıma ve aileme teşekkür etmek ve minnettarlığımı dile getirmek istiyorum.

Öncelikle, doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, tezimin her aşamasında bana yardımcı olan danışmanım Sayın Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ'a, tez çalışmam boyunca bilgi ve birikimlerinden yararlandığım Yıldız Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünün değerli hocalarına, tez çalışmam boyunca öneri ve olumlu eleştirileri ile beni yönlendiren Tez İzleme Komitesi üyeleri Sayın Doç. Dr. Salih KARASU ve Sayın Doç. Dr. Mustafa YAMAN'a teşekkür etmek istiyorum.

Akademik hayatımla ve doktora tezimle ilgili fikirleri ve önerileriyle beni destekleyen, değerli bilim insanı Prof. Dr. Sibel Silici'ye, tez çalışmamda tecrübeleri ve önerileriyle destek olan Balparmak Ar-Ge Merkezi çalışanları Özge ERDEM ve İlknur COŞKUN'a, antimikrobiyal aktivite analizleri konusunda bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren Balparmak Ar-Ge Merkezi çalışanları Özlem YILMAZ ve Tuğçe DAŞTAN'a ve manevi desteklerini hissettiğim tüm Balparmak Ar-Ge Merkezi çalışanlarına şükranlarımı sunarım.

Lisansüstü çalışmalarıma koşulsuz destek veren Balparmak Ar-Ge Merkezi Yöneticisi Sayın Dr. Emel DAMARLI'ya, Altıparmak Gıda Yönetim Kurulu Başkan Yardımcısı Sayın Özgür ALTIPARMAK'a ve Altıparmak Gıda Yönetim Kurulu Başkanı Sayın Özen ALTIPARMAK'a desteklerinden ötürü sonsuz şükranlarımı iletmek isterim.

Laboratuvarda tek başıma çalıştığım uzun saatler boyunca bana eşlik eden "Burda Olan Burda Kalır" programının yapımcıları Sayın Zafer ALGÖZ ve Can YILMAZ'a, aynı şekilde uzun saatler kendilerini dinlediğim "O Tarz mı?" programının yapımcıları Bengi APAK, İsmail TÜRKÜSEV, Can BONOMO ve Can TEMİZ'e farkında olmadan verdikleri desteklerden ötürü çok teşekkür ederim.

Ayrıca hayatım boyunca bana destek olan Annem Ayla ALPAT'a, her yaptığım işte hala elini omzumda hissettiğim rahmetli Babam Teoman ALPAT'a, biricik ablam Arzu Merve AYDIN'a kendi uzak, ancak sevgisi yakın ağabeyim Emre ALPAT'a ve kardeşim Ömer SERTEL'e özel olarak teşekkür ederim.

Son olarak, bu zorlu süreçte beni destekleyen en önemli kişilere, doktora eğitimim ve bu tez çalışmasının düşünce aşamasından nihai aşamasına kadar bana sonsuz destek ve sabır gösteren sevgili eşim Burçin ALPAT'a ve can parelerim, evlatlarım Efe ve Onur ALPAT'a sonsuz sevgilerimle teşekkür ederim.

Ufuk ALPAT

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ **xiii**

TABLO LİSTESİ **xvi**

ÖZET **xviii**

ABSTRACT **xx**

1 GİRİŞ **1**

1.1 Literatür Özeti 1

1.1.1 Propolis…… .. ……..1

1.1.2 Propolisin Tarihçesi……...2

1.1.3 Propolisin Kimyasal Bileşimi……5

1.1.4 Propolisin Fenolik İçeriği……..8

1.1.5 Propolisin Fiziksel Özellikleri…….12

1.1.6 Propolisin Antioksidan Aktivitesi…….13

1.1.7 Propolisin Antimikrobiyal Aktivitesi……...20

1.1.8 Propolisin Gıda Endüstrisinde Kullanımı……26

1.1.9 Doğal Derin Ötektik Çözücüler……...33

1.1.10 Doğal Derin Ötektik Çözücü Kavramının Geçmişi……..34

1.1.11 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Gıda, İlaç ve Kozmetik Alanında Kullanımı…….36

1.1.12 Propolis Ekstraksiyonunda Doğal Derin Ötektik Çözücü Uygulamaları……...……39

1.2 Tezin Amacı 47

1.3 Hipotez 47

2 MATERYAL VE YÖNTEMLER **49**

2.1 Materyal 49

2.1.1 Propolis Numunesi…..……..49

2.1.2 Doğal Derin Ötektik Çözücü İçerikleri…….. …….....49

2.2 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Özellikleri 50

2.2.1 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Oluşturulması....……...…….50

2.2.2 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Stabilitelerinin Belirlenmesi.....54

2.2.3 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin pH'larının Belirlenmesi....…….55

2.2.4 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Polaritelerinin Belirlenmesi.....55

2.2.5 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Yoğunluklarının Belirlenmesi...56

2.2.6 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Viskozitelerinin Belirlenmesi....56

2.2.7 Farklı Fenolik Bileşiklerin Doğal Derin Ötektik Çözücülerde Çözünürlüklerinin Belirlenmesi...…….....57

2.3 Ham Propolisin Kalite Kontrol Analizleri 58

2.3.1 Propolis Örneğinin Balzam Miktarının Tayini Yöntemi.....58

2.3.2 Propolis Örneğinin Balmumu Miktarının Tayini Yöntemi.....58

2.3.3 Propolis Örneğinin Kül Miktarının Tayini Yöntemi....……59

2.3.4 Propolis Örneğinin Nem ve Uçucu Bileşik Miktarının Tayini Yöntemi..... ……. ….. …….. …… …… …… …….. …….59

2.3.5 Propolis Örneğinin Toplam Fenolik İçeriğinin Tayini Yöntemi.....60

2.3.6 Propolis Örneğinin Toplam Flavonoid İçeriğinin Tayini Yöntemi. 61

2.3.7 Propolis Örneğinin Toplam Antioksidan Kapasite Tayini Yöntemi62

2.4 Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyon Optimizasyonu 63

2.5 Optimum Koşullarda Hazırlanan Propolis Ekstraktlarının Biyoaktif Özelliklerinin Belirlenmesi 65

2.5.1 Optimum Koşullarda Hazırlanan Propolis Ekstraktlarının Toplam Fenolik, Toplam Flavonoid İçerik ve Antioksidan Kapasiteleri Tayini Yöntemleri..... … …….. …….. ……. …..66

2.5.2 Optimum Koşullarda Hazırlanan Propolis Ekstraktlarının Fenolik Profilinin Tayini Yöntemi..... 66

2.6 Optimum Koşullarda Hazırlanan Propolis Ekstraktlarının Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi 67

2.6.1 Optimum Koşullarda Hazırlanan Propolis Ekstraktlarının Minimum İnhibisyon ve Bakterisidal/Fungisidal Konsantrasyonları..... 67

2.6.2 Optimum Koşullarda Hazırlanan Propolis Ekstraktlarının Disk Difüzyon Analizleri 71

2.7 Propolis Ekstraktı Eklenmiş Keklerin Hazırlanması ve İn Situ Antifungal Etkinin İncelenmesi.....73

3 SONUÇLAR VE TARTIŞMA 76

3.1 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Bazı Fizikokimyasal Özellikleri 76

3.1.1 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Stabiliteleri…...……...76

3.1.2 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin pH'ları…….……..…….....77

3.1.3 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Yoğunlukları....……78

3.1.4 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Viskoziteleri.....…….....78

3.2 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Çözücü Özellikleri 80

3.2.1 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Polariteleri…… ……..... ..... .80

3.2.2 Farklı Fenolik Bileşiklerin Doğal Derin Ötektik Çözücülerde Çözünürlükleri…….....83

3.3 Ham Propolisin Kalite Özellikleri.....84

3.4 Ham Propolisten Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonunun Optimizasyonu 88

3.4.1 Toplam Fenolik İçerik Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirilmesi..... …… …….. …… …… ……..89

3.4.2 Toplam Flavonoid İçerik Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirilmesi……. …… …….. ……108

3.5 Optimum Koşullarda Hazırlanan Propolis Ekstraktlarının Biyoaktif Özellikleri.....129

3.6 Optimum Koşullarda Hazırlanan Propolis Ekstraktlarının Antimikrobiyal Özellikleri.....134

3.6.1 Optimum Koşullarda Hazırlanan Propolis Ekstraktlarının Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları..... .... … ….... ..... .134

3.6.2 Optimum Koşullarda Hazırlanan Propolis Ekstraktlarının Disk Difüzyon Analizleri …… …… …… ……...136

3.7 Propolis Ekstraktı İlavesiyle Hazırlanan Keklerin Antifungal Dayanımı 140

4 SONUÇ VE ÖNERİLER 146

KAYNAKÇA 149

A EKLER 186

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR 205

SİMGE LİSTESİ

L	Açıklık Koordinatı
w	Ağırlık
w/v	Ağırlık/Hacim
α	Alfa
Al	Alüminyum
Sb	Antimon
Cu	Bakır
cP	Centipoise
Hg	Cıva
Zn	Çinko
dk	Dakika
mL/dk	Dakika/Mililitre
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
Fe	Demir
pKa	Denge Sabiti
g	Gram
$g.cm^{-3}$	Gram/Santimetre Küp
Ag	Gümüş
v	Hacim
v/v	Hacim/Hacim
Ca	Kalsiyum
K	Kelvin
a	Kırmızı/Yeşil Koordinatı
kV	Kilo Volt
$kcal.mol^{-1}$	Kilokalori/Mol
La	Lantan
L	Litre
L/sa	Litre/Saat
Mg	Magnezyum
λmax	Maksimum Dalgaboyu
Mn	Manganez
µg	Mikrogram

µL	Mikrolitre
µM	Mikromolarite
mbar	Milibar
mg	Miligram
mg/kg	Miligram/Kilogram
mg/L	Miligram/Litre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mPa.s	Milipascal.Saniye
mS/cm	Milisiemens/Santimetre
kob/mL	Koloni Oluşturan Birim/Mililitre
M	Molarite
nm	Nanometre
p	Olasılık Oranı
y	Ölçülen Yanıt
K	Potasyum
β	Regresyon Katsayıları
°C	Santigrat Derece
b	Sarı/Mavi Koordinatı
EC50	Serbest Radikalin %50'sini Ortadan Kaldıran Konsantrasyon
Cs	Sezyum
Si	Silikon
Na	Sodyum
V	Vanadyum
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

AB	Avrupa Birliği
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ABTS	2,2'-Azino-Bis (3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid)
Adj.	Düzeltilmiş
ANOVA	Varyans Analizi
Ant.	Antibiyotik
CAPE	Kafeik Asit Fenetil Ester
CIELAB	Uluslararası Aydınlatma Komisyonu Renk Uzayı
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
COVID-19	Koronavirüs Hastalığı 2019
CUPRAC	Bakır İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç
DES	Derin Ötektik Çözücü (Deep Eutectic Solvent)
DIS	Uluslararası Standart Taslağı
DPPH	2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil
DÜ	Doğal Ürünler
ENR	Molar Geçiş Enerjisi
ESI-MS/MS	Elektro Sprey İyonizasyon Tandem Kütle Spektrometresi
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
GC-FID	Gaz Kromatografisi Alev İyonizasyon Dedektörü
GC-MS	Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi
HBA	Hidrojen Bağı Alıcı
HBD	Hidrojen Bağı Verici
HCA	Hiyerarşik Kümeleme Analizleri
HeLa	Henrietta Lacks (Hücre Hattı)
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPTLC	Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
ISO	Uluslararası Standardizasyon Örgütü
KE	Kersetin Eşdeğeri
KPNP	Kitosan-Propolis Nanopartikülleri
LC	Sıvı Kromatografisi
LCMS	Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi

LC-MS/MS	Sıvı Kromatografisi Tandem Kütle Spektrometresi
M.Ö.	Milattan Önce
Maks.	Maksimum
MBK	Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
MCF-7	Michigan Kanser Vakfı-7 (Hücre Hattı)
MFK	Minimum Fungisidal Konsantrasyon
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
Min.	Minimum
MRM	Çoklu Reaksiyon İzleme
MRSA	Metisiline Dirençli S. Aureus
MS	Kütle Spektrometresi
MSSA	Metisiline Duyarlı S. Aureus
NADES	Doğal Derin Ötektik Çözücü (Natural Deep Eutectic Solvent)
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
ORAC	Oksijen Radikal Absorbsiyon Kapasitesi
OSA	Oktenil Süksinik Anhidrit
ÖB	Ötektik Bileşen
PCA	Temel Bileşen Analizi
PDA	Foto Diyot Dizisi
Pred.	Öngörülen
PRESS	Tahmin Hatasının Kareleri Toplamı
RZ	Alıkonma Zamanı
SF	Seyreltme Faktörü
SSCB	Sovyet Sosyalist Cumhuriyetler Birliği
T0	Başlangıç Değeri
T24	24. Saatteki Değer
TEAC	Troloks Eşdeğer Antioksidan Kapasite
TFİ	Toplam Flavonoid İçerik
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
TPİ	Toplam Fenolik İçerik
UPLC	Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi
UV-vis	Ultraviyole-Görünür Alan
YGC	Yeast Extract Glucose Chloramphenicol
YYM	Yanıt Yüzey Metodolojisi

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 Kovan kenarında izolasyon malzemesi olarak kullanılan propolis (Vasyl Kosolovskyi, 2018) 2
Şekil 1.2 Ötekik çözücüyü oluşturan bileşenlerin faz diyagramı (Liu vd., 2018, s. 680)) 34
Şekil 2.1 Çalışmada kullanılan öğütülmüş homojen propolis numunesi 49
Şekil 2.2 Solvatokromik bir bileşik olan nil kırmızısı molekülü 55
Şekil 2.3 Yüksek viskoziteli doğal derin ötektik çözücülerin viskozite ölçüm düzeneği 56
Şekil 2.4 Thoma lamı ile sayılan *Penicillium* sporlarının görüntüsü 69
Şekil 2.5 *A. niger* ile inoküle edilmiş NADES 62 ve NADES 76 ile hazırlanan propolis ekstraktlarının T0 görüntüsü 70
Şekil 2.6 Interscience marka Scan 1200 model koloni sayıcı 72
Şekil 2.7 1 kg toplam ağırlığa göre hazırlanan kek hamuru 73
Şekil 2.8 Steril kabin içinde soğumaya bırakılmış kekler 74
Şekil 2.9 *Penicillium* spp. ile inoküle edilmiş %5 propolis ekstraktı içeren kek dilimi 75
Şekil 3.1. Bazı doğal derin ötektik çözücülerin stabilite süresi sonundaki görünümleri……..……76
Şekil 3.2 Seçilen doğal derin ötektik çözücülerin stabilite süresi sonundaki görünümleri 90
Şekil 3.3 Kalibrasyon standardı gallik asit için kalibrasyon grafiği 91
Şekil 3.4 NADES 57 folin ciocalteu reaktifi karışımı santrifüj öncesi/sonrası görünümü 92
Şekil 3.5 NADES 76 için toplam fenolik içerik değerine sıcaklık, süre ve ultrason genliği değerlerinin katkısını gösteren kontur grafikleri 101
Şekil 3.6 NADES 76 için toplam fenolik içeriğine sıcaklık, ultrason genliği ve süre değerlerinin katkısını gösteren yanıt yüzey grafikleri 102
Şekil 3.7 NADES 62 için toplam fenolik içerik değerine sıcaklık, süre ve ultrason genliği değerlerinin katkısını gösteren kontur grafikleri 102
Şekil 3.8 NADES 62 için toplam fenolik içeriğine sıcaklık, ultrason genliği ve süre değerlerinin katkısını gösteren yanıt yüzey grafikleri 103
Şekil 3.9 NADES 58 için toplam fenolik içerik değerine sıcaklık, süre ve ultrason genliği değerlerinin katkısını gösteren kontur grafikleri 103
Şekil 3.10 NADES 58 için toplam fenolik içeriğine sıcaklık, ultrason genliği ve süre değerlerinin katkısını gösteren yanıt yüzey grafikleri 104
Şekil 3.11 Saf su için toplam fenolik içerik değerine sıcaklık, süre ve ultrason genliği değerlerinin katkısını gösteren kontur grafikleri 104
Şekil 3.12 Saf su için toplam fenolik içeriğine sıcaklık, ultrason genliği ve süre değerlerinin katkısını gösteren yanıt yüzey grafikleri 105
Şekil 3.13 %80 Etanol için toplam fenolik içerik değerine sıcaklık, süre ve ultrason genliği değerlerinin katkısını gösteren kontur grafikleri 105

Şekil 3.14 %80 Etanol için toplam fenolik içeriğine sıcaklık, ultrason genliği ve süre değerlerinin katkısını gösteren yanıt yüzey grafikleri 106
Şekil 3.15. NADES 76 için deneysel ile tahminlenen değerlerin ilişkisi 107
Şekil 3.16. NADES 62 için deneysel ile tahminlenen değerlerin ilişkisi 107
Şekil 3.17. NADES 58 için deneysel ile tahminlenen değerlerin ilişkisi 107
Şekil 3.18. Saf su için deneysel ile tahminlenen değerlerin ilişkisi 108
Şekil 3.19. %80 Etanol için deneysel ile tahminlenen değerlerin ilişkisi 108
Şekil 3.20 Kalibrasyon standardı kersetin için kalibrasyon grafiği 109
Şekil 3.21 NADES 57 için toplam flavonoid içerik değerine sıcaklık, süre ve ultrason genliği değerlerinin katkısını gösteren kontur grafikleri 119
Şekil 3.22 NADES 57 için toplam flavonoid içeriğine sıcaklık, ultrason genliği ve süre değerlerinin katkısını gösteren yanıt yüzey grafikleri 119
Şekil 3.23 NADES 58 için toplam flavonoid içerik değerine sıcaklık, süre ve ultrason genliği değerlerinin katkısını gösteren kontur grafikleri 120
Şekil 3.24 NADES 58 için toplam flavonoid içeriğine sıcaklık, ultrason genliği ve süre değerlerinin katkısını gösteren yanıt yüzey grafikleri 120
Şekil 3.25 NADES 62 için toplam flavonoid içerik değerine sıcaklık, süre ve ultrason genliği değerlerinin katkısını gösteren kontur grafikleri 121
Şekil 3.26 NADES 62 için toplam flavonoid içeriğine sıcaklık, ultrason genliği ve süre değerlerinin katkısını gösteren yanıt yüzey grafikleri 121
Şekil 3.27 NADES 76 için toplam flavonoid içerik değerine sıcaklık, süre ve ultrason genliği değerlerinin katkısını gösteren kontur grafikleri 122
Şekil 3.28 NADES 76 için toplam flavonoid içeriğine sıcaklık, ultrason genliği ve süre değerlerinin katkısını gösteren yanıt yüzey grafikleri 122
Şekil 3.29 Saf su için toplam flavonoid içerik değerine sıcaklık, süre ve ultrason genliği değerlerinin katkısını gösteren kontur grafikleri 123
Şekil 3.30 Saf su için toplam flavonoid içeriğine sıcaklık, ultrason genliği ve süre değerlerinin katkısını gösteren yanıt yüzey grafikleri 123
Şekil 3.31 %80 Etanol için toplam flavonoid içerik değerine sıcaklık, süre ve ultrason genliği değerlerinin katkısını gösteren kontur grafikleri 124
Şekil 3.32 %80 Etanol için toplam flavonoid içeriğine sıcaklık, ultrason genliği ve süre değerlerinin katkısını gösteren yanıt yüzey grafikleri 124
Şekil 3.33. NADES 57 için deneysel ile tahminlenen değerlerin ilişkisi 125
Şekil 3.34. NADES 58 için deneysel ile tahminlenen değerlerin ilişkisi 125
Şekil 3.35. NADES 62 için deneysel ile tahminlenen değerlerin ilişkisi 126
Şekil 3.36. NADES 76 için deneysel ile tahminlenen değerlerin ilişkisi 126
Şekil 3.37. Saf su için deneysel ile tahminlenen değerlerin ilişkisi 126
Şekil 3.38. %80 Etanol için deneysel ile tahminlenen değerlerin ilişkisi 127
Şekil 3.39 NADES 62 propolis ekstraktı fenolik profili kromatogramı 133
Şekil 3.40 *A. niger* ile 48 saat inkübe edilmiş %80 Etanol ve Ultra Saf Su ile hazırlanan propolis ekstraktlarının T48 görüntüsü 134
Şekil 3.41 *A. niger* ile 48 saat inkübe edilmiş NADES 62 ve NADES 76 ile hazırlanan propolis ekstraktlarının T48 görüntüsü 135
Şekil 3.42 NADES 62 ve %80 etanol ile hazırlanan propolis ekstraktlarının *Penicillium* spp. üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları 138

Şekil 3.43 NADES 62 ve %80 etanol ile hazırlanan propolis ekstraktlarının *Salmonella* spp. üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları 139
Şekil 3.44 NADES 62 ile hazırlanan kör çözücünün *Penicillium* spp. ve *Salmonella* spp. üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları 139
Şekil 3.45 %2,5 NADES 62 ile hazırlanan propolis ekstraktı eklenmiş ve Aspergillus niger ile inoküle edilen kek örneğinin 45. gün küf gelişimi 141
Şekil 3.46 %5,0 NADES 62 ile hazırlanan propolis ekstraktı eklenmiş ve *Penicillium* spp. ile inoküle edilen kek örneğinin 45. gün küf gelişimi 142
Şekil 3.47 NADES 62 içermeyen keklerin görüntüsü 144
Şekil 3.48 %2,5 NADES 62 içeren keklerin görüntüsü 144
Şekil 3.49 %20 NADES 62 içeren keklerin görüntüsü. 145

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1 En yaygın propolis türleri: bitki orijinleri ve ana bileşenleri (Bogdanov & Bankova, 2017). 7
Tablo 2.1 Doğal derin ötektik çözücülerin bileşenleri ve hazırlama yöntemleri..... 51
Tablo 2.2 HPLC sisteminde kullanılan akış gradyanı..... 57
Tablo 2.3 Nihai propolis konsantrasyonu (µg/ml) ve her bir tüpteki hacimler (µL)..... 63
Tablo 2.4 Bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve gerçek seviyeleri 64
Tablo 2.5 Küp tasarımı, merkez ve eksenel noktalar..... 64
Tablo 2.6 Fenolik profili analizi için kullanılan HPLC gradyan değerleri..... 67
Tablo 2.7 Çalışmada kullanılacak kek hamuruna eklenecek propolis ekstraktı miktarları..... 74
Tablo 3.1 NADES'ler kullanılarak ekstrakte edilecek propolisin kalite analizi....85
Tablo 3.2 Ultrasonik uygulama süresinin TFİ ve TPİ değerlerine etkisi..... 88
Tablo 3.3 Ekstraksiyon çalışmalarında kullanılan doğal derin ötektik çözücüler .... ……. 89
Tablo 3.4 Ekstraksiyon çalışmalarındaki bağımsız değişkenler..... 90
Tablo 3.5 Kalibrasyon standardı gallik asit için kalibrasyon verileri..... 91
Tablo 3.6 NADES 76 için toplam fenolik içerik ANOVA tablosu..... 93
Tablo 3.7 NADES 62 için toplam fenolik içerik ANOVA tablosu..... …… 94
Tablo 3.8 NADES 58 için toplam fenolik içerik ANOVA tablosu.... …… .95
Tablo 3.9 Saf su için toplam fenolik içerik ANOVA tablosu.... …… .96
Tablo 3.10 %80 Etanol için toplam fenolik içerik ANOVA tablosu..... …… ..97
Tablo 3.11 Çözücüler için toplam fenolik içerik model özeti tablosu.....……99
Tablo 3.12 Regresyon analizi sonucunda elde edilen kuadratik modeller……..... 100
Tablo 3.13 Toplam fenolik içerik optimizasyon çözümleri..... ……...…. … 101
Tablo 3.14 Kalibrasyon standardı kersetin için kalibrasyon verileri 109
Tablo 3.15 NADES 57 için toplam flavonoid içerik ANOVA tablosu .....…..... 110
Tablo 3.16 NADES 58 için toplam flavonoid içerik ANOVA tablosu.....…..... 111
Tablo 3.17 NADES 62 için toplam flavonoid içerik ANOVA tablosu.....…..… 112
Tablo 3.18 NADES 76 için toplam flavonoid içerik ANOVA tablosu..... 113
Tablo 3.19 Saf su için toplam flavonoid içerik ANOVA tablosu.....……...… 114
Tablo 3.20 %80 Etanol için toplam flavonoid içerik ANOVA tablosu..... 115
Tablo 3.21 Çözücüler için toplam flavonoid içerik model özeti tablosu..... ….. 116
Tablo 3.22 Regresyon analizi sonucunda elde edilen kuadratik modeller..... … 116
Tablo 3.23 Toplam flavonoid içerik optimizasyon çözümleri..... …….. …….. 118
Tablo 3.24 Optimum koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyonların toplam fenolik, toplam flavonoid içerikleri ve antiradikal süpürme aktivitesi için tahmini ve gerçek analiz sonuçları ..... …….. ……. ……. ….. 129
Tablo 3.25 Optimum koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyonların fenolik profil analizi sonuçları (µg/mL)..... …… ……... 131

Tablo 3.26 Propolis ekstraktlarının minimum inhibisyon konsantrasyonları (w/v) ……..…….. …….. …….. ….. 135
Tablo 3.27 Propolis ekstraktlarının minimum bakterisidal/fungisidal konsantrasyonları (w/v).....…… …….. ……. ...… 136
Tablo 3.28 Propolis ekstraktlarının disk difüzyon testi inhibisyon zon ölçüleri (mm)..... ……..... ...…… 137
Tablo 3.29 Keklerde ekstrakt yüzdesine göre elde edilen küf inhibisyon yüzdeleri....…….. …… …….. …….. ……... 141

ÖZET

Doğal Derin Ötektik Çözücüler ile Propolis Ekstraksiyonu ve Ekstraktın İn Situ Antifungal Etkisinin İncelenmesi

Ufuk ALPAT

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

Bu çalışmanın amacı öncelikle propolisten fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için doğal derin ötektik çözücülerin (Natural Deep Eutectic Solvents) kullanım potansiyelini incelenmek ve merkezi kompozit tasarım kullanarak ekstraksiyon sürecini optimize etmektir.

Bu amaçla NADES'ler 109 farklı bileşimde hazırlanmış, stabiliteleri, fizikokimyasal özellikleri ve fenolik bileşikleri çözme kabiliyetleri açısından analiz edilmiştir. Analiz edilen NADES'lerden etanolle yapılan ekstraksiyona en yakın sonuçlar veren dördü ekstraksiyon işlemi için değerlendirilmiştir.

Dört NADES arasında, NADES 62 (betain, malik asit ve prolin 1:1:1, %15 su) 80°C, 135 dakika ve %100 ultrason genliğinde en yüksek ekstraksiyon verimini sergilemiştir. NADES'ler için maksimum toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri sırasıyla 5284,2 mg GAE/L ve 1531,2 mg KE/L olarak tespit edilmiştir.

Ultra saf su ile hazırlanan propolis ekstraktları hiçbir mikroorganizma için inhibisyon sağlamazken, NADES'lerle hazırlanan tüm propolis ekstraktları test edilen bakteriler (*Salmonella* spp.*, Staphylococcus aureus*) için %80 etanol ile hazırlanan propolis ekstraktlarından daha iyi antibakteriyel aktivite göstermiştir, ancak bu etkinin büyük bir kısmının çözücüden kaynaklandığı anlaşılmaktadır.

Antifungal özellikler açısından, NADES 58 ve NADES 62 *Aspergillus niger, Aspergillus oryzae* ve *Penicillium* spp.'ye karşı en güçlü inhibisyon zonlarına sahip olmuştur. Propolisle muamele edilmemiş NADES 62'nin herhangi bir küf için inhibisyon zonu oluşturmadığı gözlenmiştir; bu nedenle küf inhibisyonunun tamamen ilgili çözücülerden elde edilen propolisin aktif bileşenlerinden kaynaklandığı belirlenmiştir.

En yüksek antifungal etkiye ve en yüksek toplam fenolik içeriğe sahip olan NADES 62 ile hazırlanan propolis ekstraktı, model bir gıdada farklı oranlarda antifungal ajan olarak kullanılmıştır. *Penicillium* spp. ile inoküle edilmiş keklerde (model gıda) %2,5 oranında kullanıldığında antifungal ajan içermeyen keklere oranla %100 daha başarılı antifungal etki gösterdiği tespit edilmiştir. *Aspergillus niger* için ise bu oran %7,5 olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak bu çalışmada doğal derin ötektik çözücüler ile hazırlanan propolis ekstraklarının gıda ürünlerinde etkili antifungal ajanlar olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Propolis ekstraksiyonu, optimizasyon, doğal derin ötektik çözücüler, in situ antifungal etki.

ABSTRACT

Propolis Extraction with Natural Deep Eutectic Solvents and Investigation of the In Situ Antifungal Effect of the Extract

Ufuk ALPAT

Department of Food Engineering

Doctor of Philosophy Thesis

Advisor: Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

The aim of this study was primarily to investigate the potential of using Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) for the extraction of phenolic compounds from propolis and to optimize the extraction process using a central composite design.

For this purpose, NADESs were prepared in 109 different compositions and analyzed for their stability, physicochemical properties and ability to solubilize phenolic compounds. Four of the analyzed NADESs, which gave the closest results to ethanol extraction, were evaluated for the extraction process.

Among the four NADESs, NADES 62 (betaine, malic acid and proline 1:1:1, 15% water) exhibited the highest extraction yield at 80°C, 135 minutes and 100% ultrasound amplitude. The maximum total phenolic and total flavonoid contents for NADESs were 5284.2 mg GAE/L and 1531.2 mg QE/L, respectively.

While propolis extracts prepared with ultrapure water showed no inhibition for any microorganism, all propolis extracts prepared with NADESs showed better antibacterial activity for the tested bacteria (*Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*) than propolis extracts prepared with 80% ethanol, but most of this effect seems to be due to the solvent.

In terms of antifungal properties, NADES 58 and NADES 62 had the strongest zones of inhibition against *Aspergillus niger, Aspergillus oryzae* and *Penicillium* spp. It was observed that NADES 62 not treated with propolis did not form inhibition zones for any mold; therefore, the mold inhibition was entirely due to the active components of propolis obtained from the respective solvents.

Propolis extract prepared with NADES 62, which has the highest antifungal effect and the highest total phenolic content, was used as an antifungal agent in different ratios in a model food. When used at 2.5% in cakes inoculated with *Penicillium* spp. (model food), it was found to show 100% more successful antifungal effect than cakes without antifungal agent. For *Aspergillus niger*, this rate was found to be 7.5%.

As a result, it was concluded that propolis extracts prepared with natural deep eutectic solvents can be used as effective antifungal agents in food products.

Keywords: Propolis extraction, optimization, natural deep eutectic solvents, in situ antifungal effect.

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

1.1.1 Propolis

Propolis, işçi bal arıları tarafından toplanan bitki salgıları ve bitkilerin üzerindeki yaralardan çıkan bitki sızıntıları ile arıların mandibular ve mum bezlerinin salgılarının birleşmesiyle oluşan, kovan içerisinde farklı amaçlarla kullanılan yapışkan, kokusu ve rengi elde edildiği floraya göre değişken olan reçineli bir maddedir (Mizrahi & Lensky, 1997; Kutluca vd., 2008).

Arıların farklı bitkilerden, ılıman iklim bölgelerinde özellikle kara kavaktan (*Populus nigra*), propolis topladıkları bilinmektedir. Büyük bir propolis üreticisi olan Brezilya'da, ana propolis türü, *Baccharis*'ten başlıca *Baccharis dracunculifolia*'dan elde edilen yeşil propolis'tir. Ayrıca kaynağı *Dalbergia* olan kırmızı propolisde Güney ve Orta Amerika'da üretilmektedir. Akdeniz tipi propolisin kaynağı (*Cuprassaceae*) Servigiller'dir. Ayrıca daha kısıtlı üretim alanı bulunan *Macaranga tamarius* türü kaynaklı pasifik propolisi ile *Clusia* bitki türünden kaynaklanan Clusia tipi propoliste bulunmaktadır (Bogdanov & Bankova, 2017).

Propolis kovanda, genellikle kovan girişindeki alanda ve petek çerçevelerinin kenarları boyunca görülebilir. Bazı bilim insanları bu daha büyük birikintilerin, çatlakları veya açıklıkları doldurmak için taşınmadan önce veya kovanın herhangi bir yerinde kullanım için daha ince, daha sıvı bir forma dönüştürülmesinden önce bir tür depolama alanı olarak kullandıklarına inanmaktadır (Fearnley, 2001). Şekil 1.1'de, kovan kenarında izolasyon malzemesi olarak kullanılan propolis görülmektedir.

Propolis kovandan toplandığı ham hali ile yüksek mum içeriği nedeniyle tüketilemez, çözücülerle ekstraksiyon yoluyla saflaştırılmalıdır. Bu işlem biyolojik olarak aktif olmayan materyali uzaklaştırmalı ve fenolik fraksiyonu korumalıdır (Ahangari vd. 2018). Geleneksel olarak, ham propolisin saflaştırılması, polifenolik

bileşenler bakımından zengin olan balmumundan arındırılmış propolis ekstraktlarının elde edilmesi için farklı çözücüler kullanılarak ıslatma, çalkalama, geri akış veya soxhlet yöntemi ile ekstraksiyonu yoluyla gerçekleştirilir (Pietta vd., 2002).



Şekil 1.1 Kovan kenarında izolasyon malzemesi olarak kullanılan propolis (Vasyl Kosolovskyi, 2018)

Genelde etil alkol, propolis ekstraktları hazırlamak için en sık kullanılan çözücüdür, ancak etil alkol çoğunlukta olacak şekilde hazırlanan, su- etil alkol karışımları (%70-95 etil alkol) ile gerçekleştirilen ekstraksiyon, daha yüksek miktarda fenolik madde içeren, balmumundan ari tentürler elde edilmesini sağlayabilir (Park vd. 1998). Literatürde propolisin ekstraksiyonunda saf su, hekzan, aseton, metanol veya kloroform da çözücü olarak kullanılmıştır (Bankova vd., 1992; Park vd., 1998; Pereira vd., 2000; Pietta vd., 2002; Negri vd., 2003; Cao vd., 2004; Sağdıç vd., 2020).

1.1.2 Propolisin Tarihçesi

Propolis kelimesi Yunanca “pro” ön ve “polis” şehir, kelimelerinin birleşiminden oluşmaktadır. “Şehrin önü” anlamı, propolisin arı kolonisi için koruyucu rolünü çok iyi tanımlamaktadır (Rojczyk vd., 2020). Propolis, Türkçemizde olduğu gibi başka bazı dillerde de yapıştırıcı (zamk, tutkal) anlamına gelen kelimelerle anılır. Bu propolisin arı kovanındaki açıklıkları kapamadaki rolünü de açıklar (Fearnley, 2001).

Propolis ilk çağlardan beri insanlar tarafından çeşitli amaçlarla kullanılmıştır: yapıştırıcı olarak ve çatlakları kapatmak için; ahşap ve diğer yüzeyleri korumak için

ve özellikle antimikrobiyal özellikleri nedeniyle tıp alanında kullanılagelmiştir. Antik Dünya'da hasat için hangi yöntemlerin kullanıldığı bilinmemekle birlikte Yunanistan ve Roma'daki yazarların propolise aşina olduğu bilinmektedir (Mizrahi & Lensky, 1997). Yunan filozofu Aristoteles, kitabı "*Historia animalium*"da, muhtemelen propolis olan "*mitys"* adı verilen bir maddeden, çürükler ve iltihaplı yaralar için bir tedavi olarak bahsetmektedir (Fearnley, 2001). Romalı akademisyen ve yazar Marcus Terentius Varro, propolisin hekimler tarafından lapa yapımında kullanıldığından ve bu nedenle Via Sacra'da baldan bile daha yüksek bir fiyatı olduğundan bahsetmektedir (Mizrahi & Lensky, 1997).

Mısır'da bulunan Ebers tıp papirüsünde (M.Ö. 1550 civarı) bahsedilen 'siyah balmumunun' propolis olabileceği düşünülmektedir. Asis, İbranice tzori sözcüğünün propolis için kullanılan eski bir kelime olduğunu düşünmüştür. Bu kelime İbranice kutsal metinlerde altı kez geçmektedir ve genellikle merhem veya balzam olarak çevrilmiştir (Mizrahi & Lensky, 1997).

Yunanlılar propolisi "polyanthus" adını verdikleri enfes bir parfümün ana maddesi olarak kullanmışlardır. Bu parfümü propolis, (olibanum olarak da bilinen) buhur, *styrax* cinsi ağaçların reçineleri ve bazı aromatik bitkileri bir araya getirerek oluşturdukları bilinmektedir (Fearnley, 2001).

Romalı bilgin Plinius (M.S. 23-79) propolisin söğüt, kavak, karaağaç, kamış ve diğer bitkiler gibi farklı ağaçların tomurcuklarından kaynaklandığını öne sürmüştür. 35 ciltlik kitabı "Doğa Tarihi"nde propolisin kovanda yapı malzemesi olarak kullanılışını ve tıbbi özelliklerini de anlatmıştır. Plinius bahsi geçen kitabında propolisin kullanımı ile ilgili;

> "Günümüz hekimleri propolisi ilaç olarak kullanmaktadır, çünkü arı iğnelerini ve deriye gömülü tüm maddeleri çıkarır, şişliği azaltır, sertleşmeleri yumuşatır, sinirlerdeki ağrıyı yatıştırır ve iyileşmeleri umutsuz görünen yaraları iyileştirir."

şeklinde belirtmiştir (Fearnley, 2001).

İslam dünyasında da propolisin bilindiği anlaşılmaktadır. Tıp alimi İbn-i Sina ünlü kitabı "El-Kanun fi't-Tıb"da iki farklı balmumu türünden bahseder: temiz balmumu ve siyah balmumu, ikincisi muhtemelen propolistir ve kitapta; "güçlü kokusuyla hapşırtır" ve "cıvataların ve kazıkların sivri uçlarını yok etme özelliğine sahiptir. Ayrıca nadiren temizler ve ıslatır." denilmektedir (Hegazi, 2000; Fearnley, 2001).

Gürcü halk tıbbında bazı hastalıkları tedavi etmek için propolisli merhemlerin kullanıldığı, yeni doğan bebeğin göbek deliğine propolisli bir parça koyma geleneği ve ayrıca çocukların oyuncaklarının propolisle ovalanması gibi geleneksel kullanımlardan bahsedilmektedir (Hegazi, 2000).

Propolis, Güney Afrika'daki Boer savaşı ve İkinci Dünya Savaşı sırasında doktorlar tarafından yara iyileşmesinde etkili bir şekilde kullanılmıştır. 1969'dan itibaren o dönemki adıyla SSCB'deki Ortodoks hekimliğinde propolisin %30'luk alkollü çözeltisinin kullanımı kabul edilmiştir (Hegazi, 2000).

Avrupa'da bitkisel literatürde adı geçmektedir. John Gerard'ın ünlü "Bitkilerin Tarihi" kitabında, kavak ağacı tomurcuklarından hazırlanan "*Populeon"* adı verilen şifalı merhemlerin kullanımına atıfta bulunulmaktadır (Gerard, 1633). Nicholas Culpepper'ın ünlü "*Complete Herbal*" (1653) adlı eserinde "Kavak Ağacı" başlığı altında kavak ağacı tomurcuklarından elde edilen merhemlerin vücudun pek çok yerindeki tüm hararet ve iltihaplar için tek başına iyi geldiği ve yaraların hararetini soğuttuğu belirtilmektedir (Culpeper, 1653). Thomas Green'in "Universal Herbal" kitabında *Populus nigra* (kara kavak ağacı) başlığı altında;

> "Genç yaprakları sert ve ağrılı şişlikler için mükemmel bir ilaç malzemesidir. Hem bu hem de beyaz kavağın tomurcukları ilkbaharda çok hoş kokar ve parmaklar arasında bastırıldığında balzamik reçineli bir madde verir, bu madde ispirto ile ekstrakte edildiğinde "*storaks*" gibi kokar. Bu tentürden et suyunda bir dirhem iç ülserlere ve yangılara uygulanır ve bağırsak yangılarından kaynaklanan inatçı akıntıları giderdiği söylenir."

şeklinde yazmaktadır (Green, 1824). Propolis'in içeriği ile ilgili çalışmalardan önce kavak türüne özgü bileşiklerin tespiti ve saflaştırılması ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Piccard (1864) yaptığı bir çalışma sırasında, kromojenler olarak adlandırdığı sınıfa ait doğrudan bitkisel kaynaklı bir madde olan krisin'i keşfetmiştir. Bu bileşiği, kavak yaprağı tomurcuklarından elde edebildiğini ve öncelikle Amerikan kavak türü olan *Populus monolifera*'da, daha sonra ise *Populus nigra* ve *Popoulus pyramidalis*'in yaprak tomurcuklarında eşit miktarda bulduğunu belirtmiştir.

Propolisin ana kullanım alanı tıp olmasına rağmen, yüzey kaplamalarında kullanıldığına dair birkaç referans dışında, keman ailesi enstrümanları için vernik olarak da büyük ilgi gördüğü ve bazı çevrelerde böyle bir verniğin keman yapımının altın dönemi olan 1550-1750 yılları arasında ustalar tarafından kullanıldığına dair

inanış görülmektedir. O dönemde, özellikle de Kuzey İtalya'nın Cremona kentinde yapılan enstrümanların üstün tonunun büyük ölçüde vernikten kaynaklandığına dair yaygın bir görüş vardır ve Hill kardeşler tarafından Antonio Stradivari üzerine yazılan kitapta bu etkiden bahsedilmektedir (Jolly, 1978).

Yirminci yüzyılın başlarında propolisin arı poleninin sindirim ürünü olduğuna dair bir hipotez yaygın olmasına karşın Alman bilim adamı Rösch 1927 yılında yaptığı titiz çalışmalar sonucunda, Plinius'un propolisin bitki tomurcuklarından kaynaklandığı yönündeki hipotezini doğrulamıştır (Kuropatnicki vd., 2013). Rus araştırmacı Popravko ve Fransız araştırmacı Lavie, 1970'lerin sonunda huş ve kavak tomurcuklarından elde ettikleri reçineler ile propolisin bileşimini karşılaştırarak bu teoriyi kanıtlamıştır (Bankova vd., 2006).

1.1.3 Propolisin Kimyasal Bileşimi

Propolisin kompleks kimyasal bileşimi, kovanın etrafındaki bitki florası ve toplama zamanına bağlı olarak değişir (Marcucci, 1995; Bankova vd., 2000, 2005). Ayrıca, bu karışımın bileşimini etkileyen faktörler arasında arı türleri, farklı reçine ve bitki seçimleri, coğrafi bölgedeki bitki türlerinin özgüllüğü ve bitki çeşitliliği de bulunmaktadır (Silici vd., 2005; Silici & Kutluca 2005; Trusheva vd., 2011; Bankova vd., 2014; Kongkiatpaiboon vd., 2016). Örneğin, Avrupa, Güney Amerika ve Asya'dan elde edilen propolis örnekleri, coğrafi kökenlerinden kaynaklanan farklılıklar dolayısıyla değişik kimyasal yapıya sahip olabilirler (Ahn vd., 2007).

Propolis, çeşitli araştırmalarda rapor edildiği üzere uçucu organik bileşenler, flavonoid aglikonlar, fenolik asitler ve esterler, fenolik aldehitler, alkoller ve ketonlar, seskiterpenler, kinonlar, kumarinler, steroidler ve aminoasitler gibi çeşitli bileşikleri içermektedir (Bankova vd., 2000; Marcucci vd., 2001; Ahn vd., 2007).

Marcucci'ye göre, propolis, bitki özlerinin toplanması, arı metabolizması ve propolis oluşumu sırasında ortaya çıkan diğer organik maddelerin birleşiminden oluşur. Mum, reçine, balzam, aromatik ve eterik yağlar, polenler ve diğer organik maddeleri içerir (Marcucci, 1995). Propolis'in, genellikle yüzde 50 reçine ve balzam, yüzde 30 balmumu, yüzde 10 esansiyel ve aromatik yağlar, yüzde 5 polen ve yüzde 5 diğer organik bileşiklerden oluştuğu yönünde genel bir kanı vardır (Tagliacollo & Orsi, 2011). Ancak, propolisin genel bileşenlerinin içeriğine ilişkin bu görüşün kökeni, propolis kimyası hakkında çok az şey bilindiği bir döneme

dayanmaktadır. Bu konuda Salatino ve Salatino'nun 2021 yılında yayınladıkları bilimsel notta, bu kanının yanıltıcı olduğu ve arıcılıkta resmi olarak belirlenen sınırların çok dışındaki verilerden oluştuğundan bahsedilmektedir. Bu eski verileri oluşturmak için kullanılan ayrıntılı prosedürler bilinmediğinden, bunların dikkate alınmaması gerektiği ve propolisin genel bileşimi hakkındaki verilerin bundan böyle doğrulanmamış veriler yerine gerçek verilerle destekleneceğinin umulduğu belirtilmiştir (Salatino & Salatino, 2021).

Propolis, üretildiği coğrafi bölgelere bağlı olarak da farklılık gösterebilir. Örneğin, Yarfani vd. (2010) yaptıkları bir çalışmada, Kuzey ve Güney İran'dan elde edilen propolis örneklerinin gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) kullanılarak belirlenen ana bileşiklerinin fenolik asitler, şekerler, kafeik asit, oleik asit gibi alifatik ve aromatik asitler ve düşük miktarda seskiterpen ve triterpenler olduğu ortaya konmuştur. Ana bileşenleri benzer olmakla beraber, iki farklı bölgeden gelen propolis örneklerinde bulunan bileşiklerin, seskiterpen ve triterpenler gibi farklı olduğu tespit edilmiştir (Yarfani vd., 2010).

Popova vd. (2011), Malta menşeili propolisin bileşenlerini inceledikleri bir çalışmada, tipik Akdeniz kimyasal profilini taşıyan propolisin, diterpen bileşikleri bakımından zengin olduğunu keşfetmişlerdir. Çalışmada 17 örnekte 32 farklı diterpen belirlenmiş ve bunların 22'sinin incelenen her örnekte mevcut olduğunu ifade etmişlerdir. Propolis örneklerinin şeker ve şeker türevleri bakımından da zengin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, yeni propolis bileşikleri olarak nitelendirilen benzoik asit esterleri ve hidroksibenzoik asitlerinin daukan diterpen esterleri de tespit edilmiştir. Alifatik hidroksiasitler, aromatik ve yağ asitleri, triterpenler gibi Malta propolisinde tanımlanan diğer bileşenler de bulunmuştur. Bazı örneklerde ise tipik kavak flavonoidleri (krisin, pinosembrin kalkon) ve kavak kafeik asit esterleri (kafeik asit fenetil ester) tespit edilmiştir (Popova vd., 2011).

Hindistan'dan toplanan propolisin hidroalkolik ekstraktının kimyasal bileşiminin ve biyoaktif potansiyelinin analiz edildiği bir çalışmada, propolis örnekleri GC-MS, yüksek performans ince tabaka kromatografisi (HPTLC) ve yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemleri kullanılarak analiz edilmiş ve in vitro antioksidan, antikolinesteraz ve sitotoksisite testleri yapılmıştır. Sonuçlar, propolis örneklerinin yağ asitleri (örneğin 9-oktadekenoik asit, dekanoik asit, 9,12-hekzadekanoik asit), alkoller (örneğin 1-tetradekanol, oktadekanol, 1-

dotrikontanol, 2,3-epoksi-5,8-hektadekadien-1-ol), kersetin, siklopentadien gibi bileşikler içerdiğini göstermiştir (Thirugnanasampandan vd., 2012).

Bankova vd. (2000) yaptıkları bir çalışmaya göre Makedonya ve Küba kökenli propolis, kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), manganez (Mn), potasyum (K), sodyum (Na), demir (Fe), çinko (Zn) ve bakır (Cu) gibi mineral elementleri içermektedir. Bununla birlikte, propolisin B1, B2, B6, C, D, E vitaminleri, gümüş (Ag), sezyum (Cs), cıva (Hg), lantan (La), antimon (Sb), alüminyum (Al), vanadyum (V) ve silikon (Si) mineral elementlerini de içerdiği Marcucci (1995) tarafından bildirilmiştir.

En yaygın propolis türleri ve bu türlere özgü bitki orijinleri ile ana bileşenleri Tablo 1.1'de özet olarak verilmiştir (Bogdanov & Bankova, 2017).

Tablo 1.1 En yaygın propolis türleri: bitki orijinleri ve ana bileşenleri (Bogdanov & Bankova, 2017).

Tipi	**Coğrafi Orijin**	**Bitki Kaynağı**	**Ana Bileşenler**
Poplar	Avrupa, Kuzey Amerika, Tropik Asya, Yeni Zelanda	*Populus* spp. genellikle *P. nigra* L. ve *P. tremula*	Flavonlar, flavanonlar, sinamik asitler ve bunların esterleri
Yeşil	Brezilya	*Baccharis* spp., *B. dracunculifolia*	Prenile p-kumarik asitler, diterpenik asitler
Huş	Rusya	*Betula verrucosa*	Flavonlar ve flavonoller
Kırmızı	Küba, Brezilya, Meksika	*Dalbergia* spp.	İzoflavonoidler (izoflavanlar,
Akdeniz	Sicilya, Yunanistan, Girit, Malta	*Cupressaceae*	Diterpenler (özellikle labdan tipindekiler)
Clusia	Küba, Venezuela	*Clusia* spp.	Poliprenillenmiş benzofenonlar
Pasifik	Okinawa, Tayvan, Endonezya	*Macaranga tanarius*	C-prenil-flavanonlar

Ilıman bölgelerde üretilen propolisler esas olarak flavonoidler ve sinnamik asit yan ürünleri gibi fenoliklerden oluşur. Bu bileşiklerin yanı sıra tropikal propolis, diterpenler, lignanlar ve diğer bazı prenile bileşikler açısından zengindir (Bouzahouane vd., 2021).

Chi vd. (2020) yaptığı bir çalışmada analiz edilen propolis numunelerinde başlıca monoterpenler, fenol alkoller, seskiterpenoidler, asit esterler, aldoketonlar ve hidrokarbonlardan oluşan yaklaşık 406 bileşik tanımlanmıştır.

de Oliveira vd. (2021) yaptığı daha güncel bir çalışmada da gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ve gaz kromatografisi alev iyonizasyon dedektörü (GC-FID) ile analiz edilen farklı propolis numunelerinin uçucu bileşiklerinin kimyasal bileşimi incelenmiş ve 87 farklı uçucu bileşik tespit edilmiştir. Bununla birlikte, bu çalışmada, baskın sınıflar seskiterpen hidrokarbonlar (%80,6-89,2), ardından oksijenlenmiş monoterpenler (%3,6-8,4) olarak görülmüştür. Fenil propanoidlerin ise Brezilya'da üretilmiş kırmızı propoliste baskın sınıf olduğu ve bunu hidrokarbon seskiterpenlerin izlediği bulunmuştur.

1.1.4 Propolisin Fenolik İçeriği

Arıların propolis üretimi, kovanın çevresinde bulunan bitki örtüsü ile sıkı bir ilişki içindedir. Bu, coğrafi ve iklimsel faktörlerin, bal arısı türlerinin, botanik çeşitliliğin ve coğrafi konumun bir sonucudur. Propolisin biyoaktivitesindeki çeşitlilik, fenolik bileşenlerin farklılıkları ile ilişkilidir (Moreno vd., 2000; Silici & Kutluca, 2005; Ahn vd., 2007). Ilıman bölgelerde üretilen propolis, genellikle kavak tipi olarak anılır. Temel olarak, flavonoid aglikonları, aromatik asitler ve esterler içerir (Bankova vd., 2000). Tropikal bölgelerden gelen propolis ise prenilenmiş p-kumarik asit türevleri, flavonoidler, benzofenonlar, lignanlar ve terpenler gibi farklı fenolik bileşenler içerir (Popova vd., 2009). Flavonoid açısından oldukça zengin olan propolis, yaklaşık 38 farklı yapıda flavonoide sahiptir ve bu, arı ürünleri arasında en zengin polifenol içeriğe sahip olduğu anlamına gelmektedir (Suver, 2008; Haroun, 2006).

Propolis örneklerinin fenolik profilinin araştırılması için literatürde spektrofotometri, ince tabaka kromatografisi, gaz kromatografisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, kapiler elektroforez vb. dahil olmak üzere farklı analitik teknikler kullanılmıştır (Santos-Buelga & González-Paramás 2017).

Propolisin polifenolik fraksiyonu, diğer bileşenlere göre çok daha etkili terapötik özelliklere sahiptir (Erdoğan vd., 2011). Ekstraksiyon etkinliği, büyük ölçüde kullanılan yönteme bağlıdır ve en yaygın kullanılan yöntem etanol, metanol veya su ile yapılan katı-sıvı ekstraksiyonudur. Ayrıca, bitkisel yağlar gibi diğer bazı sıvılar da propolis ekstraksiyonunda kullanılabilir (Finger vd., 2013). Ancak, fraksiyonlama amacıyla en yaygın kullanılan yöntem, propolisin etanol ile ekstraksiyonudur (Marcucci, 1995; Tagliacollo & Orsi, 2011). Propolisin etanol ekstraksiyonu, fenolik asitler ve flavonoid kaynakları açısından en zengin içeriğe sahiptir (Watanabe vd., 2011). Propolisin etanol ekstraktları, antioksidan kapsül, boğaz spreyi, diş macunu ve kozmetik ürünler gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılır (Coneac vd., 2008; Sarıkaya vd., 2009).

Propoliste bulunan flavonoid grupları arasında en önemlilerinden biri flavononlardır ve 40'tan fazla farklı bileşik türü tanımlanmıştır. Bu bileşikler özellikle kavak tipi propolislerde, ılıman bölgelerde yaygın olarak bulunmaktadır. Avrupa, Çin, tropikal olmayan Asya ve Kuzey Amerika'da ise pinosembrin, pinostrobin, naringenin, sakuranetin, izosakuranetin ve likiritigenin en yaygın flavanon bileşikleri olarak rapor edilmiştir (Popravko vd. 1969, Greenaway vd. 1991, Marcucci 1995, Bankova vd. 2000, Shi vd. 2012, De Groot vd. 2014, Ristivojević vd. 2015a).

Propoliste flavanonlardan daha az yaygın olmalarına rağmen, flavonlar ve flavonoller de bol miktarda bulunurlar. Bu bileşikler arasında akasetin, apigenin, krisin, tektokrisin, galangin, izalpinin, kersetin ve kampferol gibi tipik örnekler yer alırken, daha nadir olarak fisetin veya pektolinarigenin bulunabilir. Kampferid ve luteolin ise sırasıyla Brezilya yeşil propolisi (De Groot vd. 2014) ve Çin propolisi (Ristivojević vd. 2015a) gibi belirli türlerde bulunur.

Avrupa propolisinde izoflavonların ve izodihidroflavonların varlığı nadirdir, ancak bu ailenin bileşikleri (örneğin, daidzein, formononetin, ksenognosin B, vestiton ve kalikosin) kırmızı Brezilya ve kırmızı Küba propolisinde bulunmuştur. Paraiba'nın güney sahilinde elde edilen Brezilya kırmızı propolis örneğinin kapsamlı incelenmesi, izoflavonoidler, flavonoidler, neoflavonoidler, kalkonlar ve lignanlar dahil olmak üzere 43 bileşiğin izole edilmesini sağlamıştır. Küba kırmızı propolisinde bulunan tüm bileşikler Brezilya kırmızı propolisi örneğinde de tespit edilmiş ve Küba kırmızı propolisinin ana bileşenleri (medikarpin, vestitol,

likiritigenin, izolikiritigenin, formononetin ve biyokanin A) Brezilya'nın diğer bölgelerinde üretilen kırmızı propolis örneklerinde de gözlemlenmiştir (Piccinelli vd. 2011).

Propolisteki fenolik asitler esas olarak hidroksibenzoik asitlerden (gallik, gentisik, protokateşik, salisilik ve vanilik asitler) ve hidroksisinnamik asitlerden (p-kumarik, kafeik ve ferulik asitler) oluşur. Serbest formlarına ek olarak, fenolik asitler genellikle benzil-, metilbutenil-, feniletil- ve sinnamil-esterler olarak bulunur ve kafeik asit fenetil ester (CAPE) ılıman iklim propolisinin ana bileşenidir (Marcucci 1995; Huang vd. 2014; Ristivojević vd. 2015a; Ristivojević vd. 2015b). Hidroksisinnamik asit türevleri ayrıca Brezilya'da (Marcucci vd. 2001; Salatino vd. 2005) ve Avustralya propolisinde (Abu-Mellal vd. 2012) bulunmuştur.

Stilbenler bitkilerde çok yaygın olmasa da farklı coğrafi kökenlerden propolis örnekleri ile gerçekleştirilmiş birkaç yayında bu bileşik sınıfının tanımlandığı görülmektedir (Petrova vd. 2010; Inui vd. 2012).

Literatürde propoliste lignanların varlığının tanımlandığı birkaç çalışma bulunmaktadır, özellikle Kanarya Adası (Bankova vd. 1998), Şili (Valcic vd. 1998), Kenya (Petrova vd. 2010) ve Brezilya (Li vd. 2008) gibi tropik bölgelerden toplanan örneklerde tanımlanmıştır.

Propolisin biyolojik etkinliği, flavonoidlerin mevcudiyeti ile bağlantılıdır. Biyokimyasal etkileri; biyolojik polimerlere bağlanma, ağır metal iyonlarına tutunma, elektron transferini hızlandırma ve serbest radikalleri temizleme yeteneği, olarak dört kategoride sınıflandırılabilir (Coneac vd., 2008).

Pinosembrin, propoliste en yüksek miktarda bulunan flavonoiddir. Bununla birlikte pinobanksin ve krisin de, propolisin belirgin bileşenleridir (Jaganathan & Mandal, 2009). Propoliste bulunan diğer bazı flavonoidler arasında galangin, kamferol, kersetin, tektokrisin, akasetin ve apigenin bulunmaktadır (Jaganathan & Mandal, 2009; Suver, 2008). Propolis, kafeik asit, benzoik asit, hidroksisinnamik asit, sinnamik asit, kumarik asit, fumarik asit, vanilik asit, hidroksibenzoik asit ve salisilik asit gibi çeşitli fenolik asitler içermektedir. Antimikrobiyal aktiviteye sahip olan flavonoidler ise pinosembrin, galangin, pinobanksin, p-kumarik asit ve kafeik asittir (Coneac vd., 2008; Ahn vd., 2007; Kumazawa vd., 2004; Marcucci vd., 2001). Türkiye'de 2006 yılında gerçekleştirilen bir çalışmaya göre, Hatay ilinden

elde edilen propolis numunesinde 180'ten fazla bileşik tespit edilmiştir. Propolisin genellikle polifenolleri içerdiği ve ana polifenollerin, flavonoidler sınıfından olmasının yanı sıra fenolik asitler ve esterler, fenolik aldehitler, ketonların da bulunduğu tespit edilmiştir (Basim vd., 2006).

2009 yılında Türkiye'de gerçekleştirilen ve Türk kestane balı ve kestane propolisinin antioksidan aktiviteleri ve fenolik asit içeriklerinin incelendiği bir çalışmada, kestane propolisinin kestane balına oranla daha yüksek antioksidan aktiviteye ve fenolik asit içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir (Sarıkaya vd., 2009).

Ayrıca, Türk propolisinin fenolik içeriği ve bileşimi hakkında da çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Erdoğan vd. (2011), Anadolu'nun farklı bölgelerinden; Bingöl, Rize, Tekirdağ ve Van'dan toplanan Türk kavak tipi propolis örneklerinden basınçlı sıvı ekstraksiyonu ile fenolik bileşikleri ekstrakte etmiş ve ekstraktların antiradikal kapasitelerini, toplam fenolik içeriklerini ve bireysel fenolik bileşiklerini değerlendirmek için bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışmanın sonuçları, tüm örneklerde görülen başlıca fenolik bileşiklerin gallokateşin, kateşin, epikateşin gallat, kafeik asit, klorojenik asit ve mirisetin olduğunu göstermiştir (Erdogan vd., 2011). Aliyazıcıoğlu vd. (2013), gerçekleştirdiği daha detaylı bir çalışmada Türkiye'nin farklı bölgelerinden on farklı kavak tipi propolis örneğinin fenolik bileşikleri ve biyolojik aktiviteleri, HPLC yöntemi ile araştırılmış ve on yedi farklı fenolik bileşen tespit edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, kersetin, benzoik asit, kafeik asit, ferulik asit ve kumarik asit tüm propolis örneklerinde yüksek miktarlarda bulunurken, vanilik asit, klorojenik asit, epikateşin, rutin, sirinjik asit ve o-kumarik asit çok az miktarlarda bulunmuştur (Aliyazıcıoğlu vd., 2013).

Gülçin vd. (2010) propolisin liyofilize sulu ekstraktındaki birçok bileşiği yüksek performanslı sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile belirlemişlerdir. Bu çalışmada en yüksek miktarda belirlenen bileşikler, ferulik asit, kafeik asit, ellajik asit, kersetin, p-kumarik asit ve p-hidroksibenzoik asit olmuştur. Ayrıca propolisteki tipik flavonoidler olan pinostrobin, krisin, pinosembrin, pinobanksin ve galangin'in propolisin etanolik ekstraktında oldukça yüksek miktarda bulunduğu da tespit edilmiştir.

Propolisten fenolik bileşiklerin eldesinde farklı ekstraksiyon yöntemleri uygulanmaktadır. Bu yöntemlerin birbiri ile karşılaştırılması doğru yöntemin seçilmesi için önem teşkil etmektedir. Bu amaçla Oroian vd. (2020) yaptıkları bir çalışmada propolisten fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için çeşitli teknikler karşılaştırılmıştır. Çift maserasyon, çift mikrodalga işlemi ve çift ultrason destekli ekstraksiyon olarak üç farklı yöntem çalışılmıştır, ekstraksiyon yöntemlerinin tümünde %70 etanol kullanılmıştır. Ultrasonik destekli ekstraksiyonun, mikrodalga ve maserasyon yöntemlerine göre daha yüksek ekstraksiyon verimi sağladığı için en etkili yöntem olduğu tespit edilmiştir. Genel olarak, çalışmada ultrasonikasyonun propolisten biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu için en uygun yöntem olduğu sonucuna varılmış ve ürünler üretildiği yılın propolis bileşimi üzerinde etkili olduğu vurgulanmıştır (Oroian vd., 2020a). Aynı araştırmacı grubu, etanol kullanarak propolisten biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu için ultrason destekli bir yöntemi optimize etmek için de çalışmışlardır. Box-Behnken tasarımının kullanıldığı deneyler aracılığıyla dört değişken (ultrasonik genlik, etanol konsantrasyonu, sıcaklık ve zaman) optimize edilmiştir. İdeal koşullar %100 ultrasonik genlik, %70 etanol konsantrasyonu, 58°C ve 30 dakika olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında, ekstraksiyon verimi 459,92 mg GAE/g toplam fenolik içerik, 220,62 mg KE/g toplam flavonoid içeriği ve %1,95 balzam içeriği olmuştur. Sonuçlar, ultrason destekli ekstraksiyonun propolisten biyoaktif bileşiklerin elde edilmesinde etkili olduğunu göstermiştir (Oroian vd., 2020b).

1.1.5 Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolisin rengi, dokusu ve kokusu büyük ölçüde değişiklik göstermektedir. Literatürde ham propolisin rengi açık sarımsı-kahverengi, yeşil, kırmızı, kırmızımsı-kahverengi, kahverengimsi sarı, koyu yeşilimsi-kahverengi ve koyu kahverengi olarak tespit edilmiştir. Propolisin dokusu, bitki kökenine, mum içeriğine ve büyük ölçüde sıcaklığa bağlıdır, düşük sıcaklıkta sert ve yüksek sıcaklıkta yumuşak olma eğilimindedir (Ali vd., 2012; Anjum vd., 2019). Propolis, ılımlı sıcaklıklarda tutulduğu zaman yumuşak ve şekil verilebilir hale gelir, ancak dondurulduğunda kırılgan hale gelir (Fearnley, 2001). Yapı olarak, mumsu, sert mumsu ve sert olarak üç ana gruba ayrılabilir. Propolisin kokusu büyük ölçüde toplandığı alandaki bitki örtüsünden etkilenmektedir ve literatürde propolis

aromatik reçinemsi, çok aromatik reçinemsi ve hafif aromatik olarak tanımlanmıştır (Ali vd., 2012).

Falcão vd. (2013) yaptığı bir çalışmada Portekiz propolisini, fizikokimyasal özellikler, fenolik bileşim ve antioksidan aktivite açısından kapsamlı bir teste tabi tutulmuşlardır. Çalışmada, propolisin rengini değerlendirmek için CIELAB renk sisteminin kullanımı ilk kez düşünülmüş, hızlı ve güvenilir bir kalite tanıma yöntemi olarak potansiyeli vurgulanmıştır. Sonuçlar, incelenen altı bölgede iki farklı propolis türünün varlığını ortaya koymuştur: biri, ılıman bölgelerde yaygın olan kavak propolisi, fenolikler açısından zengin ve yüksek biyoaktivite sergilerken, daha koyu yeşil renge sahip olan diğer propolis tipi, daha düşük fenolik içeriğe ve genel biyoaktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Buna ek olarak, araştırma Portekiz propolisinin renginin kökenine bağlı olarak değiştiğini, kuzey, orta kıyı ve Azor bölgesinden gelen örneklerin daha açık turuncu tonlar, orta iç, güney ve Madeira örneklerinin daha koyu kahverengi veya yeşilimsi tonlar sergilediğini ortaya koymuştur. Bu renk farklılaşması coğrafi toplama alanlarıyla ilişkilendirilmiştir (Falcão vd., 2013).

Revilla vd. (2017) tarafından Şili ve İspanya'dan 53 propolis örneğinin fenolik bileşimi (toplam fenoller ve flavonoidler), troloks eşdeğer antioksidan kapasitesi (TEAC) ve 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme yöntemleri kullanılarak ölçülen antioksidan kapasitesi, rengi (L*a*b*) ve biyosit özelliklerinin incelendiği çalışmada bahsi geçen parametreler arasındaki korelasyon incelenmiş ve fenolik bileşim, antioksidan aktivite ve renk arasında önemli bir korelasyon olduğunu ortaya koymuştur. Propolisin rengi ne kadar sarı ve soluksa fenolik içeriğinin ve antioksidan kapasitesinin de o kadar düşük olduğu ortaya konmuştur (Revilla vd. 2017).

1.1.6 Propolisin Antioksidan Aktivitesi

Hava kirliliği, çevre kirliliği, stres ve sağlıksız beslenme hücrelerde serbest radikal oluşumunu artırmaktadır. Fonksiyonel gıdalar, antioksidan özellikleriyle kalp-damar hastalıkları ve kanser gibi bazı sağlık sorunlarının önlenmesinde kullanılmalarıyla ön plana çıkmıştır. Metabolizmada oksidasyona neden olan serbest radikaller, ozon, sigara, hava kirleticiler ve endüstriyel kimyasallar gibi dış etmenlerden kaynaklanmaktadır. Serbest radikallerin oksidasyonu ile oluşan

oksidatif stresin lipid peroksidasyonu, enzim deaktivasyonu ve yaşlanma ile sonuçlanabileceği belirtilmiştir. Bu nedenle, antioksidan aktiviteye sahip etkili doğal bileşiklerin araştırılması son yıllarda artmıştır. Propolis antioksidan bileşikler açısından çok zengindir; dolayısıyla antioksidan ve diğer çeşitli faydalı biyolojik aktivitelere sahiptir (Özkök & Silici, 2017).

Serbest radikaller, atomik veya moleküler orbitallerdeki bir atomda daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip olan atomlar veya moleküllerdir. Eşleşmemiş elektron(lar), radikallere reaktivite kazandırır. Bunlar düşük enerjili, kısa ömürlü ve küçüktürler, boyutları da hücre zarından geçişlerini kolaylaştırır (Jensen, 2003). Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri ve diğer serbest radikaller ile antioksidan sistem arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır. Bu durum, hücrelerde geri dönüşü olmayan hasara yol açabilir. Oksidatif stresin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri yoğun şekilde araştırılmıştır. Reaktif oksijen türleri ile metabolizma veya dış etkilerle oluşan antioksidan bileşiklerin dengesizliği, oksidatif strese neden olur. Fenolik fonksiyonlar içeren antioksidanlar, serbest radikal oluşumunu engeller ve oluşan radikalleri hücreden uzaklaştırarak zararı önler (Kahkönen vd., 1999).

Antioksidanlar, vücut hücreleri tarafından üretilebildiği gibi gıdalardan da alınabilir. E ve C vitaminleri, flavonoidler, karotenoidler ve polifenoller gibi doğal antioksidanlar, insan vücudunu zararlı serbest radikallerden korurlar (Bektaşoğlu, 2007). Propolisin antioksidan kapasitesi çeşitli biyolojik etkilerle ilişkilendirilmiş olup, özellikle içerdiği flavonoidler, serbest radikalleri temizleyerek hücreyi aşırı lipid peroksidasyonundan korur ve güçlü bir antioksidan etki gösterir (Kolankaya vd., 2002). Ayrıca, fenolik bileşiklerin, özellikle flavonoidlerin, propolisin biyolojik aktivitesinin temelini oluşturduğu ve antioksidan aktivitenin büyük bir kısmının radikal süpürme etkilerine dayandığı belirtilmektedir. Bununla birlikte, propolisin süperoksit anyonu oluşumunu engellediği ve karaciğerde sentezlenen glutatyonun tüketimini tersine çevirdiği de tespit edilmiştir (Kanbur vd., 2009).

Literatürde arı ürünlerinin antioksidan kapasitelerini belirlemek için kullanılmış farklı metotlar bulunmaktadır. Tek bir yöntem ile tüm antioksidan bileşenleri incelemek mümkün değildir; bu yöntemlerin her birinin kendine özgü avantajları ve dezavantajları mevcuttur (Capanoglu vd., 2008). Bu yöntemler, oluşan radikallere, reaksiyon süresine ve sonuçların belirlenme şekline bağlı olarak önemli ölçüde farklılık gösterir. ABTS (2,2'-azino-bis (3 etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)

ve DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemleri aynı temel prensiple çalışmalarına rağmen, belirli şartlar altında antioksidanlara verdikleri yanıtlar farklılık gösterir. Ayrıca radikal oluşumu ve farklı çözücü sistemlerindeki çözünürlükleri değişkenlik gösterir (Arnao, 2000; Apak vd., 2007). Antioksidan aktiviteyi belirlemek için en yaygın olarak kullanılan yöntemlerin genel ilkeleri, son uygulamaları, güçlü yönleri ve sınırlamaları Karadağ vd. (2009) tarafından incelenmiştir. Bu inceleme sonucunda antioksidan aktiviteyi doğru bir şekilde değerlendirmek için, antioksidan kapasite ölçecek birkaç farklı test yönteminin eş zamanlı olarak kullanılması tavsiye edilmektedir (Capanoglu vd., 2010).

Çeşitli çalışmalarda Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan propolis örneklerinin yüksek fenolik içeriklere ve antioksidan kapasitelere sahip olduğu belirlenmiştir (Aliyazıcıoglu vd., 2013; Erdoğan vd., 2011; Gülçin vd., 2010; Sarıkaya vd., 2009). Örneğin, Aliyazıcıoglu vd. (2013), 10 farklı propolis örneğini inceleyerek propolisin doğal bir antioksidan kaynağı olabileceğini doğrulamıştır. Erdoğan vd. (2011), Bingöl, Rize, Tekirdağ ve Van'dan alınan ve basınçlı sıvı ekstraksiyonu yöntemi ile ekstrakte edilen propolis örneklerinin yüksek antiradikal kapasiteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer şekilde, Gülçin vd. (2010), Erzurum ilinden elde edilen propolis örneklerinin liyofilize sulu ekstraktlarının etkili bir antioksidan olduğunu ortaya koymak için 7 ayrı analitik yöntem ile çalışmalar gerçekleştirmiştir. Sarıkaya vd. (2009), kestane balı ve kestane propolisi örneklerinin yüksek antioksidan aktivite sergilediğini ve propolis toplama prosedürünün aktivite üzerinde önemli bir etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmalar, Türkiye'deki propolis örneklerinin antioksidan potansiyelinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Farklı konsantrasyonlarda %70 ve %96 etanol ile ekstrakte edilen Polonya propolisinin kimyasal bileşimi ve antioksidan aktivitesinin incelendiği bir çalışmada %70 etanol ile hazırlanan ekstraktın daha yüksek fenolik bileşik seviyesine sahip olduğu ancak her iki ekstraktın da benzer seviyede güçlü antioksidan özelliklere sahip olduğu dolayısıyla etanol konsantrasyon etkisinin minimal olduğu tespit edilmiştir. Bulgular, propolis ekstraksiyonunda kullanılan etanol konsantrasyonunun fitoterapi ürünlerindeki kullanımını etkilemediğini göstermiştir (Wozniak, 2019).

Silci & Baysa (2020), kavak propolisini zeytinyağı ile ekstrakte ederek antioksidan, antiradikal ve antipiretik etkilerini incelemişlerdir. CAPE, dimetoksisinnamik asit, kafeik asit gibi ana fenolik bileşikleri tanımlanmıştır. Çalışmada propolis konsantrasyonu arttıkça, toplam fenolik içerik, antioksidan ve antiradikal aktivite de artmıştır. Bu çalışma, propolisin zeytinyağı ekstraktının, alkollü ekstraktların yerine geçerek antioksidan, antiradikal ve antipiretik faydalar sunabileceğini göstermiştir (Silici & Baysa, 2020).

Türk propolisinin ultrason destekli ekstraksiyonu ve özellikleriyle ilgili bir çalışmada, optimum proses parametreleri belirlenmiştir. Bu parametreler, farklı çözücüler için (etanol, dimetil sülfoksit, propilen glikol ve damıtılmış su) belirlenmiş olup ultrason destekli ekstraksiyonun toplam fenolik içerik, antioksidan aktivite ve ekstraktların fenolik bileşen içeriklerine katkısının anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Bakkaloglu vd. 2021).

Farklı propolis ekstraksiyon yöntemlerinin (ultrason destekli, Çin farmakope metodu ve süperkritik sıvı ekstraksiyonu gibi) karşılaştırıldığı bir çalışma, ultrason destekli ekstraksiyonun en yüksek fenolik bileşik içeriği ve antioksidan aktiviteye sahip propolis ekstraktının elde edildiğini göstermiştir. Bu nedenle, ultrason destekli yöntem, araştırmacılar tarafından yüksek verimi, kısa ekstraksiyon süresi ve güçlü antioksidan aktivitesi nedeniyle propolisten biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu için uygun bir seçenek olarak önerilmekte ve potansiyel olarak farmakope yönteminin yerini alması önerilmektedir (Yuan, 2019).

Ayrıca, Çin ve Kore'den alınan propolis örneklerinin antioksidan aktiviteleri üzerine yapılan çalışmalar, örneklerin genellikle yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ancak farklı bölgelerden elde edilen propolis örneklerinin, toplam fenolik ve flavonoid içerikleri ile antioksidan kapasiteleri açısından değişiklik gösterebileceğini ortaya koymuştur (Ahn vd., 2007; Shi vd., 2012; Choi vd., 2006). Hint propolisinin antioksidan aktivitesi üzerine yapılan bir çalışma, sulu ekstraktın etanol ekstraktına göre daha yüksek aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir, bu bilgi diğer ülkelerde var olan literatür ile çelişmektedir. Bu durumun sebebi propolis içeriğinin fenolik asit yönünden daha yoğun olması olabilir, bu da propolisin kökenine ve içeriğine göre sulu ekstraktın organik çözücülerin yerine kullanılabileceğini gösterir (Laskar vd., 2010). Thirugnanasampandan vd. (2012) yaptıkları çalışmada, Hint propolisinin antioksidan kapasitesini incelemiş ve

modifiye TiyoBarbitürik Asit Reaktif Türleri (TBARS) deneyi ile en yüksek antioksidan aktivite sonucunu elde etmişlerdir.

Başta Rusya, Kazakistan, Kırgızistan, Polonya, Ukrayna ve Slovakya'dan olmak üzere 19 farklı Avrasya propolis örneğinin profilinin çıkarıldığı bir çalışmada örneklerin DPPH, FRAP ve ORAC analizlerini kullanarak klasik antioksidan özellikleri değerlendirilmiş ve toplam fenolik ve flavonoid içerikleri ölçülmüştür. Propolis örnekleri, işaretleyici bileşiklere dayalı olarak kavak, titrek kavak-huş, titrek kavak-kavak ve titrek kavak-huş-kavak türleri olarak kategorize edilmiştir. Kavak, huş ağacı ve titrek kavak kökenlerine özgü işaretleyici bileşikler tanımlanmıştır. Sonuçlar, kavak propolis türlerinin aktivite bakımından çeşitlilik gösterdiğini, kavak-huş-kavak türlerinin ise genellikle yüksek DPPH ve FRAP aktivitesi sergilediğini ortaya koymuştur (Okinczyc, 2021).

Avrupa propolisinin antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi üzerine de birçok çalışma bulunmaktadır. Potkonjak vd. (2012) çalışmasında, Sırbistan piyasasında bulunan ticari propolis ekstraktlarının antioksidan aktivitesi belirlenmiştir. Propolis ekstraktlarında antioksidan aktivite ile toplam fenolik içeriği arasında korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Lagouri vd. (2014) Yunanistan'ın çeşitli bölgelerinden toplanan propolisin üç farklı çözücü (metanol, %80 metanol ve su) ile hazırlanan ekstraktlarındaki toplam fenolik içerikleri, toplam flavonoidleri ve başlıca fenolik bileşikleri belirlemek için çalışmışlardır. Propolis ekstraktlarının antioksidan özellikleri ABTS ve DPPH yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, coğrafi bölgeden bağımsız olarak metanol ve %80 metanol ile hazırlanan propolis ekstraktlarının sulu ekstraktlara göre daha yüksek radikal süpürücü ve indirgeyici aktiviteler gösterdiğini ortaya koymuştur. (Lagouri vd., 2014).

Kalogeropoulos vd. (2009) da Yunanistan'ın çeşitli bölgelerinden ve Kıbrıs Rum Kesimi'nden toplanan propolislerin etanolik ekstraktlarının antioksidan aktivitesini belirlemiştir. Yunan ve Kıbrıs Rum Kesimi propolislerinden elde edilen etil alkollü ekstraktların biyoaktif bileşikler açısından çok zengin olduğu ve yüksek antioksidan aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir. Çalışılan propolis ekstraktları, 0,33±0,03 ila 1,11±0,07 mmol Trolox eşdeğeri/g propolis etanolik ekstraktı arasında değişen DPPH radikallerini temizleme aktivitesi sergilemiştir. FRAP deneyi kullanılarak ölçülen propolis etanolik ekstraktlarının indirgeme gücü

değerleri 2,14±0,11 ile 3,35±0,27 mmol askorbik asit eşdeğeri/g propolis etanolik ekstraktı arasında değiştiği belirtilmiştir (Kalogeropoulos vd., 2009).

Moreira vd. (2008) gerçekleştirdikleri bir çalışmada Portekiz'in iki bölgesinden (Bornes ve Fundão) toplanan propolis örneklerinde toplam fenolik içerik ve antioksidan aktivite incelenmiştir. Bornes örneği Fundão'dan gelen örneğe göre oldukça yüksek aktivite göstermiş ve yazarlar bu yüksek aktivitenin Bornes bölgesinden gelen propolis örneğindeki farklı polen kompozisyonu ile ilişkili olabileceğini öne sürmüştür (Moreira vd., 2008). Fransa'da gerçekleştirilen bir çalışmada, iki yıl üst üste Fransa'nın farklı bölgelerinden toplanan kavak tipi propolis örneklerinin antioksidan aktiviteleri, toplam fenolik ve flavonoid içerikleri gözlemlenmiştir. 6 farklı çözücü sistemi (damıtılmış su, %95 etanol %70 etanol, metanol, diklorometan ve bunların karışımı halinde) kullanılarak ölçülen toplam fenolik içerikleri benzer aralıkta olmasına rağmen toplam flavonoid içerikleri birbirlerinden oldukça farklı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada DPPH yöntemi kullanılarak ölçülen antioksidan aktivitelerinde de birbirine yakın değerler gözlemlenmiştir (Boisard vd., 2014)

Brezilya'dan elde edilen kırmızı propolis, kavak tipi propolisten farklı fenolik bileşiklere ve antioksidan özelliklere sahip bir başka propolis türüdür ve literatürde Güney Amerika'dan, özellikle Brezilya ve Arjantin'den birçok çalışma bulunmaktadır (da Silva vd., 2006; Lima vd., 2009; Frozza vd., 2013).

da Silva vd. (2006) Brezilya propolis ekstraktlarını DPPH radikallerini temizleme yetenekleri açısından test etmişlerdir. Bu aktiviteler toplam fenolik ve flavonoid seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir. Bir grup ekstraktta toplam fenolik içerik ile ölçülen aktiviteler arasında güçlü bir doğrusal ilişki varken, diğer grupta bu ilişki daha zayıf tespit edilmiştir (da Silva vd., 2006).

Moreno vd. (2000) Arjantin'in farklı bölgelerinden elde edilen propolisin etanolik ekstraktlarının toplam flavonoid içeriğinin belirlenmiştir. Tüm örneklerin yüksek toplam flavonoid içerdiği ve %20,0±1.1 ve %67,5±1.5 aralığında (DPPH) serbest radikal süpürme aktivitesi gösterdiği gözlemlenmiştir (Moreno vd., 2000). Arjantin'de gerçekleştirilen bir çalışmada Arjantin'den toplanan propoliste toplam fenolik, toplam flavonoid ve serbest radikal süpürme kapasitesi rapor edilmiştir. Metanol ile hazırlanmış propolis ekstraktları için DPPH serbest radikal temizleme

aktivitesinin toplam fenolik içerik veya çalışmada incelenen bileşikler ile (7-hidroksi 8-metoksiflavanon, pinosembrin, pinobanksin, krisin, tektokrisin ve galangin) doğrudan bir ilişkisi bulunamamıştır, bu da propolis örneklerindeki serbest radikal aktivitesinin kaynağı hakkında daha fazla değerlendirme yapılması gerektiğini göstermektedir (Lima vd., 2009). Aynı sene yayınlanan başka bir çalışmada, Arjantin'deki 30 farklı yöreden elde edilen propolisin antiradikal ve antioksidan aktiviteleri incelenmiş ve değerleri toplam fenolik bileşik ve flavonoid seviyeleri ile ilişkilendirmiştir. Analiz edilen örnekler antioksidan ve antiradikal aktivitelerinde belirgin bir değişkenlik göstermiş, ancak bu değerler arasında ve ayrıca toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri arasında doğrusal ilişkiler bulunmuştur. (Chaillou & Nazareno, 2009). Kumazawa vd. (2010) Arjantin'in 4 ayrı bölgesinden elde edilen 17 propolis örneğinin radikal temizleme aktivitesini incelemişlerdir. Bir bölgeden (La pampa) toplanan propolis hariç, test edilen tüm Arjantin propolislerinin benzer radikal temizleme aktivitelerine, toplam fenolik ve flavonoid içeriklerine sahip olduğu belirlenmiştir. Örneklerin çoğu %50'nin üzerinde güçlü serbest radikal süpürme aktivitesi göstermiştir (Kumazawa vd., 2010).

Dört farklı ülkeden elde edilen propolis örnekleri ile gerçekleştirilen bir çalışmada elde edilen sonuçlar, toplandığı coğrafi bölgeye ve elde edildiği bitki kaynaklarına bağlı olarak propolis bileşimindeki değişkenliği ve kimyasal bileşim ile antioksidan aktivite arasındaki korelasyonu doğrulamıştır. Temel bileşen analizi (PCA) ve hiyerarşik kümeleme analizleri (HCA) sonuçları, Polonya propolisinin Romanya'nın farklı illerinden gelen propolislere benzer olduğunu, bu iki coğrafi orijinden gelen propolislerin Türkiye ve Uruguay'dan gelen propolis örnekleri ile tamamen ayrıştığını doğrulamıştır. Ayrıca çalışmada kullanılan propolis örneklerinin değerlendirilen fenolik bileşiklerinin antioksidan etkisinden sorumlu olduğu belirtilmiştir (Kurek-Górecka vd., 2022).

İncelenen literatüre göre, kıtaların farklı yerlerinden, hatta aynı ülkeden toplanan propolislerin toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri ve antioksidan kapasiteleri farklılık gösterebilmektedir. Ayrıca, aynı propolis örneğinin antioksidan kapasiteleri, ekstraksiyon yöntemleri ve antioksidan kapasite ölçüm yöntemlerindeki farklılığa göre de değişebilmektedir.

1.1.7 Propolisin Antimikrobiyal Aktivitesi

Propolisin antibakteriyel, antifungal ve antiviral özelliklerini kapsayan antimikrobiyal aktivitesi uzun zamandır bilinmektedir (Bankova vd., 2000; Agüero vd., 2011). Propolisin mikroorganizmalar üzerinde gösterdiği etki üzerine yapılmış çok sayıda çalışma vardır (Bankova vd., 2000; Kartal vd., 2003; Silici & Kaftanoğlu, 2003; Ozcan vd., 2004; Koç & Silici, 2008; Trusheva vd., 2011; Mihai vd., 2012; Silva vd., 2012 Kongkiatpaiboon vd., 2015).

Propolis, son yıllarda etkisi artan, antibiyotiklere karşı dirençli bakteriler nedeniyle antibakteriyel bir madde olarak popülaritesini artırmıştır. Propolis antibiyotiklerle birlikte kullanıldığında sinerjik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Bankova vd., 2016). Propolisin antibakteriyel aktivitesi, özellikle flavonoidler, fenolik asitler ve bunların esterleri olmak üzere fenolik bileşiklerin varlığına bağlanmıştır (Kujumgiev vd., 1999).

Grange ve Davey (1990), Fransa'nın Lyon kentinden temin ettikleri propolisin antibakteriyel özellikleri üzerine yaptıkları çalışmada, etanolik ekstraktını buharlaştırarak 1 ml'den 60 mg katı reçine materyali elde etmişler ve propolisin antibakteriyel etkisini minimum bakteri konsantrasyonu yöntemi ile değerlendirmişlerdir. İnceledikleri propolis örneğinin *Mycobacterium tuberculosis* de dahil olmak üzere birçok kok ve Gram pozitif basillere karşı antibakteriyel etkiye sahip olduğunu, Gram negatif basillere karşı ise sınırlı etkinliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmaya göre propolisin antimikrobiyal etkisi yüksek flavonoid konsantrasyonuyla ilişkilendirilmiştir.

Dığrak vd. (1995) Elâzığ ilinin çeşitli bölgelerinden elde ettikleri propolis örnekleri üzerinde yaptıkları çalışmada agar disk difüzyon yöntemi ile kullanmışlardır. Propolis ekstraktları 5 ila 100 µL aralığında disklere emdirilmiş ve antimikrobiyal aktiviteleri ölçülmüştür. Araştırmacılar propolis etanolik ekstraktında genel bir antimikrobiyal etki tespit edildiğini belirtmişlerdir. *Escherichia coli*'ye karşı inhibisyon zonu tespit edilmediğini, *Staphylococcus aureus*'a karşı ise 7 ila 20 mm arasında değişen inhibisyon zonu tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Propolis etanolik ekstraktının değişen dozlarının, *E. coli* hariç, çalışmada kullanılan tüm bakteri ve maya suşlarının gelişimini engellediğini bulmuşlardır.

Başka bir çalışmada, üretim mevsiminin propolisin antioksidan, antibakteriyel ve antitümöral aktivitelerini ve bu etkilere neden olan fenolik bileşiklerin sayısını etkilediği bildirilmiştir (Nunes vd. 2013; Kekecoglu vd. 2021). Nunes vd. (2013) Brezilya'dan toplanan propolislerin toplam fenolik ve antioksidan aktivite ile fenolik içeriklerinin farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir.

Propolisin bileşiminde bulunan farklı bileşik grupları farklı mekanizmaları tetikleyerek benzer özellikleri göstermektedir. Örneğin; izoflavonoidler, özellikle *Candida albicans*'a karşı aktiviteleri bakımından kırmızı propolisin önemli antimikrobiyal bileşenleridir (Trusheva vd., 2006). Kalkonlar, antibakteriyel ve antifungal dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelere sahip önemli bir doğal bileşik grubunu temsil etmektedir (Nowakowska vd., 2008).

Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilen propolislerin antibakteriyel özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada elde edilen sonuçlar, farklı illerden elde edilen ve çalışmaya dahil olan altı numunenin tamamının antibakteriyel aktivite gösterdiğini bununla birlikte, Yozgat, İzmir ve Kayseri'den gelen örneklerin (benzer fenolik ve flavonoid içeriğine sahip olanlar) en etkili olanlar olduğu belirtilmiştir. Çalışmada uygulanan kimyasal analizler, farklı örneklerde belirli bileşiklerin bulunduğu farklı profilleri ortaya koymuştur. Çalışma kapsamında yapılan TLC analizi, daha düşük antibakteriyel aktiviteye sahip örneklerin *Populus nigra* tomurcuk eksüdatında bulunmayan farklı maddeler içerdiğini ortaya koymuştur. Bu durum, *Populus nigra*'dan elde edilen propolis örneklerinin, karışık tip propolis örneklerine kıyasla daha üstün antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu sonucuna yol açabilir. Çalışma, fenolik bileşiklerin propolisin antibakteriyel etkilerindeki önemini vurgulamış ve *P. nigra*'yı mikroorganizmalara karşı kovan savunması için değerli bir propolis kaynağı olarak öne çıkarmıştır (Popova vd., 2005).

Bankova vd. (1999) Brezilya'nın üç farklı bölgesinden elde edilen iğnesiz arı propolisinden elde edilen esansiyel yağların antibakteriyel özelliklerini araştırmıştır. Kimyasal bileşimdeki farklılıklara rağmen, tüm esansiyel yağ örneklerinin *Staphylococcus aureus'a* karşı benzer inhibisyon çapı (8-10 mm) gösterdiğini bulmuşlardır. Ancak, önceki literatür iddialarının aksine, *Escherichia coli*'ye karşı herhangi bir aktivite gözlenmemiştir (Bankova vd., 1999). Kujumgiev vd. (1999) gerçekleştirdiği araştırmada %70 etanol ekstraksiyonu ve ardından dört

saat boyunca su buharı distilasyonu yöntemi ile ekstrakte edilen propolis numunesi kullanılmıştır. Çalışma, *Staphylococcus aureus'*a karşı etkinlikte bölgesel farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur; bir örnek için inhibisyon zonunun 28±1 mm, diğerleri için ise 11,2±0,3 ila 23±1,3 mm arasında değiştiği tespit edilmiştir. Tüm örnekler küflere ve Gram-pozitif bakterilere karşı etkinlik gösterirken, çoğu antiviral özellikler de sergilemiştir. Kimyasal bileşim farklılıklarına rağmen, farklı bölgelerden gelen propolis örnekleri benzer aktiviteler göstermiş, bu da öncelikle flavonoid ve fenolik asit esteri içeriklerine atfedilmiştir (Kujumgiev vd., 1999).

Bankova vd. (1999) araştırma sonuçlarına benzer şekilde Oliveira vd. (2010), Brezilya menşeili propolis örneklerinden elde edilen uçucu yağların, uçucu yağ profili ve antibakteriyel özelliklerine odaklanan bir çalışma yürütmüştür. *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel etkilerini agar disk difüzyon yöntemi ile değerlendirmişlerdir. Bulguları, propolis uçucu yağının hem *S. aureus* hem de *E. coli*'ye karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu çalışma *E. coli* için propolis esansiyel yağları açısından ilk antibakteriyel analiz sonuçlarını sağlamıştır. Araştırmacılar, ekstraksiyon yöntemlerindeki farklılıkların esansiyel yağ bileşenleri veya miktarlarını etkileyerek antibakteriyel aktiviteyi potansiyel olarak değiştirebileceğini öne sürmüşlerdir. Benzer şekilde Fernandes vd. (2015) kahverengi propolisten elde edilen esansiyel yağın antibakteriyel ve antifungal özelliklerini araştırmıştır. *Staphylococcus aureus*'a karşı gelişmiş aktiviteye sahip iki temel bileşen olan (E)-nerolidol ve spatulenolü izole etmişlerdir. Çalışma, propolis uçucu yağının mikroorganizmalara karşı doğal bir koruyucu olarak kullanımını önermiştir.

Üç farklı *Apis mellifera* bal arısı ırkının benzer kovanlarından toplanan propolis örneklerinin kimyasal içeriklerinin ve antibakteriyel aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada araştırmacılar, agar dilüsyon analizi sonucunda propolis örneklerinin etanolik ekstraktlarının *Staphylococcus aureus'*a karşı güçlü antibakteriyel özelliklere sahipken, *Escherichia coli*'ye karşı zayıf antimikrobiyal etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Aynı çalışmaya göre, *A. mellifera carnica* kovanlarından elde edilen propolis, *A. mellifera caucasica* ve *A. mellifera anatolica*'dan toplanan propolise göre daha düşük antibakteriyel aktiviteye sahip bulunmuştur. Ayrıca, *A. mellifera caucasica* propolis örneğinin diğer örneklere göre daha fazla antifungal ve antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Bunun nedeni, çeşitli

kimyasal bileşimlere ve bileşen konsantrasyonlarına sahip olmalarına atfedilmiştir (Silici & Kutluca 2005).

Ertürk vd. (2014), Türkiye'nin Ordu ilinden elde edilen propolis ekstraktlarının mikroorganizma türü, uygulanan doz ve ekstraksiyon çözücülerine bağlı olarak değişen oranlarda antimikrobiyal ve antifungal etkiler sergilediğini bulmuştur. Ekstraktlar arasında etanol, aseton, etil asetat ve metanol spesifik mikroorganizmalara karşı en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Dimetil sülfoksit ekstraktı zayıf aktivite gösterirken, su ekstraktı büyük ölçüde etkisiz kalmıştır. Gram negatif bakterilerden *E. coli* ve Gram pozitif bakterilerden *Streptococcus mutans* propolise karşı en duyarlı olanlar olarak tespit edilmiştir. *S. salivarius* ise en az duyarlılığı göstermiştir (Ertürk vd., 2014).

Silici ve Koç'un (2006) gerçekleştirdiği bir çalışmada, mayaların propolise karşı duyarlılığını test etmek için kullanılan üç farklı yöntem (disk difüzyon, agar dilüsyon ve broth mikrodilüsyon) karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma için ticari Itrakonazol diskleri kullanılmıştır. Broth mikrodilüsyon yöntemi hem propolis hem de Itrakonazol için düşük minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerleri göstermiştir. Mayalara karşı propolis için broth mikrodilüsyon ve agar dilüsyon yöntemleri %75 oranında uyumlu sonuçlar göstermiştir. Propolis için MİK ve inhibisyon zonu arasında anlamlı bir negatif korelasyon tespit edilmiştir. Genel olarak, çalışma agar dilüsyon ve disk difüzyon yöntemlerinin propolise karşı maya duyarlılığını test etmek için uygun alternatif yöntemler olduğunu göstermiştir (Silici & Koç, 2006).

Türk propolisinin etanolik ekstraktının pastörize edilmemiş meyve sularındaki (elma, portakal, beyaz üzüm ve mandalina) antifungal özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada, bozulmuş meyve sularında yaygın olarak bulunan altı farklı maya türü incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, meyve sularına değişen konsantrasyonlarda ilave edilen propolis ekstraktının bu bozulma sebebi mayalarının büyümesini etkili bir şekilde engellediğini göstermektedir. Propolis için MİK aralıkları her bir meyve suyu türü için belirlenmiş olup, propolis MİK aralıkları açısından pozitif kontrol olan sodyum benzoat ile karşılaştırıldığında daha yüksek antifungal aktivite sergilemiştir. Bu durum, propolisin maya bozulmasına karşı hassas olan bozulabilir gıdalar için değerli bir doğal koruyucu olabileceğini göstermektedir (Koç vd., 2007).

Temiz vd. (2013), yaptığı bir çalışmada Türkiye'nin farklı bölgelerinden temin edilen 10 propolis örneğinin *Penicillium aurantiogriseum* ve *Aspergillus versicolor*'a karşı antifungal etkileri incelenmiştir. Propolis etanol ekstraktının %1, %5 ve %10 konsantrasyonları kullanılmıştır ve %10 konsantrasyonun misel gelişimini tamamen engellediği tespit edilmiştir.

Başka bir çalışmada bal arısı ürünleri (bal, arı sütü, polen ve propolis) broth mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak çeşitli maya suşlarına karşı gösterdikleri büyüme inhibisyonu açısından incelenmiştir. Sonuçlar propolisin arı ürünleri içinde en yüksek antifungal aktiviteye sahip olduğunu, bunu sırasıyla polen, arı sütü ve balın izlediğini göstermiştir. Ayrıca çalışma, bal arısı ürünlerinin, özellikle de propolis ve polenin, yaygın bir antifungal ajan olan flukonazole dirençli bazı mantar türlerinin kontrolünde etkili olabileceğini öne sürmektedir (Koç vd., 2011).

Kavak tipi propolis ile farklı tip kavak ağacı tomurcuklarından (*P. nigra, P. alba, P. tremuloides*) elde edilen ekstraktların antimikrobiyal özelliklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada hazırlanan metanol ekstraktları çeşitli mikroorganizmalara karşı test edilmiş ve inhibisyon konsantrasyonları ortaya çıkarılmıştır. Propolisin "kavak" kaynaklı fenolik içeriğinin oldukça yüksek (%4,5) olduğu ve *P. nigra*'ya özgü bileşiklerin bulunduğu tespit edilmiştir. Çalışmanın sonuçları, bu ekstraktların patojenik mayalar da dahil olmak üzere geniş bir yelpazede klinik olarak önemli mikroorganizmalara karşı etkili olduğunu, ancak Gram-negatif bakterilere karşı etkili olmadığını göstermiştir. Ayrıca tüm tomurcuk eksüdalarının test edilen mikroorganizmalara karşı propolis örnekleri ile karşılaştırılabilir antimikrobiyal aktivite gösterdiği de tespit edilmiştir (Vardar-Ünlü vd., 2008).

Neves vd. (2016) Brezilya kırmızı propolisinin antimikrobiyal etkilerini %96 etanol ekstraksiyonu kullanarak incelemişlerdir. Ekstraktları ham toz ve sıvı-sıvı ekstrakt fraksiyonları da dahil olmak üzere çeşitli formlarda değerlendirmişlerdir. Etanolik ekstrakt test edilen tüm bakterilere karşı inhibitör etki göstermiş, hekzan ve asetat fraksiyonları da benzer özellikler sergilemiştir. Ek olarak, kırmızı propolisin işaretçi bileşiklerinden biri olan izoflavon formononetinin antimikrobiyal aktivite üzerinde kısmi etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Machado vd. (2016) süperkritik ve etanolik ekstraksiyon yöntemlerini kullanarak Brezilya'nın farklı bölgelerinden kırmızı, yeşil ve kahverengi propolislerin bileşimlerini değerlendirmiştir. Kimyasal çeşitliliğe rağmen, tüm propolis örneklerinin fenolik bileşiklerine atfedilen önemli derecede antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca aynı araştırmada, daha önce gerçekleştirilen farklı çalışmaların, propolisin antimikrobiyal aktivitesinin, esas olarak propoliste bulunan flavonoidler, fenolik asitler ve türevleri arasındaki karmaşık sinerjik etkilerden kaynaklandığına değinilmiştir. Cuesta-Rubio vd. (2017) Ekvador'un farklı bölgelerinden elde edilen propolislerin kimyasal profillerini araştırmıştır. Cotacachi bölgesinden elde edilen propolisten izole edilen flavonoidlerin hem antioksidan hem de antimikrobiyal aktivite sergilediğini ve gözlemlenen antiparazitik etkilerde rol oynadıklarını ortaya koymuşlardır. Neto vd. (2017) Brezilya kırmızı propolisinin mevsimsel değişimlerine bağlı antibakteriyel aktivitesini incelemiştir. Propolis örnekleri *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* suşlarına karşı etkinlik göstermiş ve performanslarında mevsimsel farklılıklar görülmüştür. Çalışma, etkili antibakteriyel uygulamalar için doğal ürünlerdeki mevsimsel değişimleri anlamanın önemini vurgulamıştır.

Ong vd. (2019) Malezya propolisinden elde edilen Kitosan-propolis nanopartiküllerine (KPNP) ve bunun *Staphylococcus epidermidis* üzerindeki etkisine odaklanmıştır. KPNP, bakteriyel canlılıkta önemli azalmalar göstermiş, gen ifadesini etkilemiş ve biyofilm oluşumunu etanol veya etil asetat ile ekstrakte edilmiş propolisten daha etkili bir şekilde bozmuştur. Antibiyotiklerle kombine edildiğinde KPNP'nin sinerjik bir etki göstererek gerekli antibiyotik dozunu dört kat azalttığını tespit etmişlerdir.

Mevcut literatüre göre, propolisin önemli antimikrobiyal, antifungal, antiviral ve antiprotozoal ajan olduğu sonucuna varılabilir. Farklı bal arısı ırkları, propolisin coğrafi konumu, kovan çevresindeki flora, çevre ve iklim koşulları gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak propolis ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesinde farklılıklar olabilir. Mevcut verilerin çoğu, propolisin Gram-pozitif bakteriler üzerinde Gram-negatif bakterilerden daha iyi bir antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu bildirmektedir. Flavonoid içeriği ile gözlenen antimikrobiyal etki arasında önemli bir etkileşim vardır. Literatüre göre, kafeik asit ve esterleri Türk propolisi örneklerinin antimikrobiyal aktivitesine başlıca katkı sağlayan maddeler

olarak kabul edilirken, pinobanksin, pinosembrin, krisin ve galangin Çin propolis örneklerindeki başlıca flavonoidler olarak kabul edilmiştir (Kartal vd., 2003; Yang vd., 2011). Bu nedenle, bireysel fenolik bileşiklerin miktarı ve çeşitliliği propolisin antimikrobiyal özellikleri üzerinde önemli bir etkiye sahiptir.

1.1.8 Propolisin Gıda Endüstrisinde Kullanımı

Antioksidan ve farmakolojik özellikleri sayesinde propolisin kullanımı geniş bir uygulama yelpazesiyle çeşitli araştırma alanlarında dikkat çekmiştir. Propolisin bir gıda bileşeni olarak kullanımı, tüketicilerin fonksiyonel gıdalara yönelik mevcut eğilimi nedeniyle her geçen yıl artmaktadır. Günümüzde tüketiciler, sağlıkları için fayda sağlayan, besleyici ve duyusal özelliklerini koruyan doğal kaynaklı maddelerle zenginleştirilmiş taze, minimum düzeyde işlenmiş gıdalar aramaktadır. Bu yeni trendler tüketici pazarını genişletmekte ve gıdalara propolis eklenmesi için yeni iş fırsatları yaratmaktadır. Şu anda, gıda endüstrisindeki kullanımı esas olarak mikrobiyal ve oksidatif ajanların etkilerini geciktirmeye yöneliktir ve yapay koruyucuların yerini almaktadır. Propolis, özellikle lipid otooksidasyonunun ürünlerin duyusal kalitesini düşürebileceği et ve balık ürünlerinde antioksidan olarak kullanılabileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır (Pobiega vd., 2019a). Propolisin antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri, lipid oksidasyonunun geciktirilmesindeki potansiyel etkisi dolayısıyla ürün stabilitesi ve raf ömrü üzerindeki olumlu etkisi sayesinde propolis gıda endüstrisi için ilgi çekici hale gelmiştir. Mendiola vd. (2010) göre, propolis doğal bir gıda katkı maddesi ve fonksiyonel bir gıda bileşeni olarak önemli potansiyele sahiptir.

Ancak, propolisin çoğunlukla alkolde çözünmüş halde piyasaya sunulması ve keskin bir tada ve aromaya sahip olması gibi bazı özellikleri nedeniyle gıdalarda hala sınırlı uygulama alanı bulmaktadır. Bu sorunları azaltabilecek alternatif bir yöntem olarak püskürtmeli kurutma önerilmektedir. İlaç ve gıda endüstrilerinin, ürünleri çevresel koşullardan korumak, ürünün raf ömrünü uzatmak, hoş olmayan tatları maskelemek ve uçucu bileşikleri kontrol altına almak adına bu tekniği kullandığı bildirilmektedir (Re, 1998; Soottitantawat vd., 2003; Re, 2006; Gharsallaoui vd., 2007 Favaro-Trindade vd., 2010).

Bruschi vd. (2003) jelatini dolgu maddesi olarak kullanıp püskürtmeli kurutma yöntemi ile propolis mikropartikülleri üretmiş ve bu yöntemle %41'lik kaplama

verimliliği elde etmişlerdir. Püskürterek kurutma tekniği propolisin antimikrobiyal özelliklerini korumuş ve bu da etanol içermeyen, etkileri güçlü veya propolise özgü hoş olmayan tadı taşımayan bir ara veya nihai propolis dozaj formu geliştirme umutları doğurmuştur. Bununla birlikte, jelatinin kullanımında jelatin kaynağı sağlık (sığır jelatini) ya da dini inanış (domuz jelatini) sebebiyle uygun görülmemektedir ve son yıllarda kullanımı azalmıştır. Bu nedenle, alternatif taşıyıcılara ihtiyaç duyulmaktadır.

da Silva vd. (2011) propolisi taşıyıcı madde olmadan püskürterek kurutmuş, ancak püskürterek kurutma işleminin düşük verimi, tozun fiziksel kararsızlığı ve tozun suda dağılabilirliğinin zamanla azalması nedeniyle elde edilen sonuçlar tatmin edici olmamıştır.

da Silva vd. (2013) başka bir çalışmasına göre, Arap zamkı ve oktenil süksinik anhidrit (OSA) ile modifiye nişasta, propolisin su içinde çözünmesini artırabilen emülsifiye edici özelliklere sahip alternatif taşıyıcı maddeler olarak kullanılabilmektedir. Bu taşıyıcılarla püskürterek kurutma yöntemiyle propolis ürünleri elde edilmiş ve bu ürünler toz, alkolsüz, suda çözünebilir ve raf ömrü uzun formda bulunmuştur. Bu yöntemle elde edilen propolislerin morfoloji, nem, su aktivitesi, suda çözünürlük, higroskopiklik, partikül boyutu, dağılım, hapsetme verimliliği, stabilite, izotermler ve antioksidan özellikleri belirlenmiştir. Bu teknik, propolisin antioksidan özelliklerini korumuş ve oda sıcaklığında depolama sırasında stabil olan, düşük higroskopikliğe sahip ve soğuk suda hızlıca çözünebilen bir toz formunda propolis elde edilmesini sağlamıştır. Araştırmacılar, bu teknolojinin propolisin antimikrobiyal etkilerini ve gıdalardaki antioksidan potansiyelini artırabileceğini öne sürmüşlerdir (da Silva vd., 2013).

Santos vd. (2020), doğal bir katkı maddesi olarak kırmızı propolis ekstraktının yoğurtta kullanımını değerlendirmiştir. Bu amaçla, ticari yoğurtta kullanılan katkı maddesi potasyum sorbatın yerine kırmızı propolis ekstraktı ile yoğurt üretilmiştir. Görünür viskozite, tekstür ve duyusal kabul ile ilgili analizler yapılmıştır. Örneklerin görünür viskozite ve tekstür ölçümleri kontrol ile benzerlik göstermiştir. Duyusal değerlendirme, kırmızı propolis ile üretilen örneklerinin hedonik ölçekte ortalama 9 puana ulaştığını göstermiştir; bu puan ticari yoğurt için de aynı tespit edilmiştir. Satın alma niyeti ile ilgili olarak, propolisli örnekler tüketicilerin %64,45'i tarafından seçilirken, ticari yoğurt için bu oran %68,89 olarak tespit

edilmiştir. Tat, doku, aroma ve kıvam için puanlar her iki örnek için de 8 ila 10 arasında bulunmuştur. Kırmızı propolis içeren yoğurdun Brezilya pazarında ticarileştirilmesi için potansiyeli olduğu sonucuna varılmıştır.

Aly ve Elewa (2007), propolis kullanarak Ras peynirinin olgunlaşma sürecinde *Aspergillus versicolor*'a karşı antifungal etkisini ve toksin (sterigmatosistin) biyosentezini incelemiş ve küf gelişimi ve toksin üretiminin en yüksek propolis konsantrasyonunda tamamen engellendiğini tespit etmiştir. Ayrıca, sterigmatosistin miktarının küf büyümesiyle doğru orantılı olduğu da gösterilmiştir. Propolisin, ekonomik ve sağlık kaygıları göz önünde bulundurularak peynir üretiminde önemli bir katkı sağlayabileceği belirtilmiştir. 2008 yılında yapılan bir çalışmada, propolis alt fraksiyonlarının pirinç depolamasında mikrobiyal yükü kontrol altına alabileceği ve oksidasyonu sınırladığını belirtmiştir. Alt fraksiyonlar sentetik adsorbanlara aşılanmış ve 6 aylık depolama süresince uçucu maddelerinin salınımı sağlanmıştır. Mutlak etanol ile hazırlanan propolis ekstraktının alt fraksiyonunun kullanıldığı pirinç örneklerinde depolama sıcaklığında 5°C'den 30°C'ye artış olmasına rağmen depolama süresince gözlemlenen oksidatif değişimlerde herhangi bir artış gözlemlenmediğini belirtmişlerdir. Bileşim analizi, mutlak etanol propolis ekstraktının alt fraksiyonunun kafeik asit ve kafeik asit fenetil ester içeriğinin yüksek olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, mutlak etanol propolis ekstraktındaki antioksidan bileşiklerin en güçlü antioksidan etkinliğine sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Gregory vd., 2008).

Alvarez vd. (2017) yaptıkları bir çalışmada propolis ekstraktı püskürtme, ultrason ve ısıl işlemin tek başına veya birlikte uygulanmasının, 5°C'de depolanan, çorba üretiminde kullanılacak taze kesilmiş farklı sebzelerin mikrobiyolojik, besinsel, fizikokimyasal ve duyusal kalitesi üzerindeki etkisini incelemiştir. Propolis ekstraktının kullanımı mikrobiyal büyümeyi hafifçe azaltmış, kahverengileşme ile ilgili enzimlerin aktivitesini engellemiş ve buzdolabında depolama sırasında kalite özelliklerini iyileştirmiştir. Ayrıca propolis ekstraktı, ürünün besin kalitesini koruyarak askorbik asit kayıplarını azaltmada etkili olmuştur. Isıl işlem başlangıçtaki mikrobiyal yükü büyük ölçüde azaltmış ve ayrıca karışık sebzelerdeki mikrobiyal büyümeyi azaltarak mikrobiyolojik raf ömrünü 5 güne uzatmıştır. Ayrıca, ısıl işlem kahverengileşme enzimlerini inaktive ederek görsel kaliteyi artırmış; ancak askorbik asit bozulması besin kalitesini olumsuz yönde etkilemiştir.

Bu arada, ultrason önemli derecede mikrobiyal inaktivasyona neden olmuş, esmerleşme enzim aktivitesini azaltmış ve ayrıca polifenoloksidaz enzimi üzerindeki inhibitör etkinin ultrason ile propolis ekstraktının birleştirilmesiyle arttırıldığı tespit edilmiştir (Alvarez vd., 2017).

Gıda muhafazasında, Vasilaki vd. (2019) portakallı alkolsüz içeceklerde propolis ekstraktının askorbik asit ile birleştirildiğinde antioksidan aktivite üzerinde sinerjik bir etkisi olduğunu tespit etmiştir. Araştırmacılar ayrıca propolis ekstraktı ilavesiyle üründe renk değişiklikleri tespit etmiştir. Cottica vd. (2015) sütlü içeceklerde konjuge linoleik asit ile eş zamanlı olarak propolis ekstraktı kullanımını araştırmıştır. Sütlü içeceklerin işlenmesi ve depolanması sırasında herhangi bir besin kaybı gözlenmediğinden, propolis ekstraktı kullanmanın ana avantajı, daha yüksek antioksidan kapasitesi ve aldehit üretimi ile ilişkili kötü kokuları azaltma kabiliyeti olduğu bildirilmiştir.

Propolisin bir gıda maddesine katılması; suda düşük çözünürlüğe sahip olması ve genellikle gıda kabul edilebilirliğini tehlikeye atacak seviyede sert ve hoş olmayan tadı ve kokusu nedeniyle duyusal özellikleri olumsuz yönde değiştirmesi gıda teknolojisinde büyük bir zorluktur. Buna ek olarak, propolisin istenen etkisi gıda işleme sırasında önemli ölçüde değişebilir. Propolisin antioksidan kapasitesi sadece bileşenlerinin her birinin antioksidan kapasitelerinin toplamı ile verilmez; aynı zamanda bileşiğin bulunduğu mikro çevreye de bağlıdır. Bileşikler birbirleriyle etkileşime girerek sinerjik veya inhibitör etkiler yaratabilir. Bu nedenle, propolis kullanımı bu sorunların üstesinden gelmek için teknolojik açıdan yaratıcı çözümler gerektirmektedir. Bu bağlamda, enkapsülasyon biyoaktif bileşikleri korumak için yararlı bir tekniktir ve propolis aromasını maskelemek ve antioksidan aktiviteyi korumak adına kullanılabilir. Püskürtmeli kurutma yaygın olarak kullanılan bir propolis kapsülleme tekniğidir. Andrade ve diğerleri (2018), Busch ve diğerleri (2017) ve Sturm ve diğerleri (2019) gibi birçok araştırmacı, spreyle kurutularak kapsüllenmiş propolisin özelliklerini incelemiştir. Araştırmacılar, işlem maltodekstrin, Arap zamkı veya inülin gibi başka bir madde varlığında gerçekleştirildiğinde daha iyi sonuçlar elde edildiği konusunda hemfikir olmuşlardır. Kunrath vd. (2017) İtalyan tipi salamlar üzerinde düşük seviyelerde (%0,05-%0,1) propolis tozu eklenmiş ve salamların duyusal özelliklerini değiştiren oksidatif sürecin engellendiğini tespit etmiştir. Jansen-Alves vd. (2019),

enkapsülasyon malzemesi olarak konsantre bezelye proteini kullanarak propolis ekstraktının mikropartiküllerini oluşturmayı ve bunların fiziksel, morfolojik ve termal özelliklerini değerlendirmeyi hedeflemiştir. Test edilen konsantrasyonlar (%2, %4 ve %6 ağırlık/hacim) arasında, %2 konsantre bezelye proteini içeren mikropartiküller en yüksek kapsülleme verimliliğini göstermiştir. Mikropartiküllerin benzer şekillere ancak farklı pürüzlülük ve boyutlara sahip olduğu ve saf propolis ekstraktına kıyasla daha iyi termal stabilite gösterdiği bulunmuştur. Çalışmada elde edilen mikropartiküller bir keke dahil edildiğinde, %2 konsantre bezelye proteini içeren formülasyon, pişirme sonrasında fenolik bileşik içeriğinde ve antioksidan aktivitede azalmaya yol açmıştır. Buna rağmen, propolis mikropartikülleri ile güçlendirilmiş kek, kontrol kekine benzer lezzet, koku, renk ve doku özelliklerini korumuştur.

Nori vd. (2011) çalışmalarında, propolis ekstraktını izole edilmiş soya proteini ve pektin kullanarak kompleks koaservasyon yöntemiyle kapsüllemişlerdir. Koaservasyon, pH değerleri ile kapsülleyici ve çekirdek konsantrasyonlarının fonksiyonu olarak incelenmiştir. Denenen iki farklı konsantrasyonda (2,5 ve 5,0 g/100 mL) pH 4'te elde edilen örnekler dondurularak kurutulmuş ve higroskopisite, kapsülleme verimliliği, partikül boyutu, morfoloji, termal davranış, depolama sürecinde fenolik ve flavonoidlerin stabilitesi, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteler açısından analiz edilmiştir. Araştırmacılar, propolis ekstraktının kompleks koaservasyon yöntemiyle kapsüllemenin mümkün olduğunu ve bunun sonucunda toz formunda, alkol içermeyen, stabil, antioksidan özelliklere sahip, *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivitesi olan ve gıdalarda, kontrollü salınım olanağı sunan bir ürün elde edilebileceğini öne sürmüşlerdir (Nori vd., 2011).

Ayrıca, propolis ekstraktı ile birlikte biyopolimer kaplamalar sinerjik etkiler sergileyebilmektedir (Pobiega vd., 2019a). Örneğin, Chang-Bravo vd. (2014) Küba kırmızı propolisinin antioksidan ekstraktları ile karragenan-nişasta filmleri geliştirmiştir. Yazarlar, propolis ekstraktlarının bu kaplamalara dahil edilmesinin filmlerin dinamik-mekanik davranışını etkilediğini, ancak kristalliklerinin korunduğunu bulmuşlardır. Ebadi vd. (2019) ile Mehdizadeh ve Langroodi (2019) sırasıyla propolisle zenginleştirilmiş kitosan kaplamanın soğutulmuş balık ve tavuk göğsünün raf ömrü üzerindeki etkisini incelemiştir. Her iki çalışmada da depolanan

ürünlerin fizikokimyasal ve mikrobiyolojik bozulmalarında azalma tespit edilmiştir. Propolisin kaplanmasında kullanılan malzemelerin sadece karbonhidrat bazlı filmlerle sınırlı olmadığını belirtmek gerekir. Nitekim Pires vd. (2019) yumurtaların raf ömrünü uzatmak için propolisli bir pirinç proteini kaplaması kullanmıştır. Shavisi vd. (2017) sığır kıymasını kaplamak için propolisli bir polilaktik asit filmi kullanmış ve kaplanmamış örneklerle kaplanmış örnekler arasında duyusal kalite açısından önemli bir fark bulunamamıştır.

Mascheroni vd. (2010), gıda uygulamalarında aktif bileşikleri verimli bir şekilde serbest bırakan ambalaj malzemelerine duyulan ihtiyacı vurgulamış ve bu konuyu ele almak için, antimikrobiyal ve antioksidan salınımı amaçlı polilaktik asit film içinde propolis içeren bir sistem geliştirmişlerdir. Filmin bileşimi, geçiş oranlarını artırmak için polietilen glikol ve kalsiyum bentonit gibi katkı maddeleri ile ayarlanmıştır. Çalışmada dört polifenolün su ve etanoldeki difüzivitesi ölçülmüş ve propolis polifenollerinin polilaktik asit matrisindeki düşük difüzivite değerlerinin baskın bir iç kütle transferi fenomenine yol açtığı bulunmuştur. Bu sistem, belirli aktif maddeleri gıdada verimli bir şekilde serbest bırakırken, diğerlerini polimer/gıda ara yüzünde hareket etmek üzere polimerde tuttuğu tespit edilmiştir.

Meyve koruma teknolojisinde propolisle zenginleştirilmiş kaplamaların kullanımından faydalanılmaktadır. Meyve yüzeyindeki propolis kaplama, sentetik ambalajlamayı azaltmaya yardımcı olabilmekte ve muhtemelen meyvenin iç atmosferini değiştirerek dokusunu daha uzun süre korumaktadır. Bu anlamda, Moreno vd. (2020) ahududu meyvelerinin raf ömrünü uzatmak için propolis içeren yenilebilir jelatin bazlı kaplamalar geliştirmiştir. Araştırmacılar, kaplamanın meyvenin başlıca küf patojenlerine karşı antifungal aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Ayrıca bu çalışma, uzun bir süre boyunca buzdolabı sıcaklıklarında depolanan ahududu meyvelerinde enfeksiyon insidansını azaltmak için kapsülleme işleminin etkinliğini de kanıtlamıştır.

Propolisin gıda sistemlerine dahil edilmesi için kullanılan en son teknolojiler düşünüldüğünde püskürtmeli kurutma ile birlikte kaplama ve filmlere dahil etmenin en sık kullanılan stratejiler olduğu görülmektedir. Bu teknikler oldukça basit, düşük maliyetli olurken püskürtmeli kurutma dikkate alındığında kullanımı kolay bir toz elde edilmesini sağlamaktadır. Sodyum aljinat ile kapsülleme de basit bir tekniktir

ancak elde edilen partikül boyutu gıda sisteminin dokusunu değiştirebileceğinden boyutları azaltılmalıdır (Re, 1998).

Bir gıdaya yeni bir bileşen eklendiğinde, insan sağlığına yönelik güvenlik etkileri göz önünde bulundurulmalıdır. Propolis yüzyıllardır kullanılmasına rağmen, diğer birçok doğal ürün gibi potansiyel bir alerjendir. Arıcılarda çok az sayıda kontakt dermatit vakası tanımlanmıştır ve çok az sayıda oral mukozit vakası propolis şekerleri veya pastillerinden kaynaklanmıştır (Pobiega vd., 2019a). Öte yandan, insanlar üzerinde yapılan bazı klinik çalışmalar, yetişkin bir kişi için 2,87 g/gün'e kadar olan dozlarda herhangi bir yan etki bildirmemiştir (Berretta vd., 2017). Muhtemelen propolis kullanımının güvenli olduğu aralığı belirlemek için daha fazla çalışma yapılmalıdır.

Gıda endüstrisi için propolis kullanımına ilişkin bazı sorunlar da vardır; Arıcılık özünde çok ürünlü bir faaliyettir, ancak bal üretimi arıcının asıl faaliyet alanıdır ve propolis üretimi genellikle marjinal bir yere sahiptir, bu da endüstriyel paketleyiciler ve dağıtıcılar için propolis tedarik zincirini etkileyen bir sorundur. Ancak son yıllarda Brezilya, Yeni Zelanda, Çin, Rusya ve Türkiye gibi ülkelerden üreticiler, propolisin endüstriyel ölçekte üretilmesini sağlayarak uygun bir tedarik ağı sağlamış ve arıcıları endüstri ile buluşturmuştur. Propolis tedarik zincirinin 2020 yılında COVID-19 karantinası nedeniyle bu ürünün üretiminin düşmesinden etkilendiğini belirtmek gerekir. Bununla birlikte, 2020 yılında küresel propolis pazarının 607,1 milyon ABD doları değerinde olduğu ve 2021-2026 döneminde yıllık %5,48'lik bir bileşik büyüme oranı tahmin edilmektedir (Mordor Inteligence, 2021). Bir başka konu da gıda endüstrisi için girdi olarak görev alacak ham propolisin kalitesidir ve hammaddede görülecek herhangi bir varyasyon ürün verimi, maliyetler, bulunabilirlik ve en önemlisi tüketicinin güvenliği üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olabilir. Propolisin arıcılar tarafından elde edilmesi, farklı kirletici maddelerin yanlışlıkla propolise karışabilmesi nedeniyle hammadde kalitesinde değişkenlik kaynağı oluşturabilecek incelik gerektiren bir iştir. Propolis ayrıca arıcılık uygulamalarından kaynaklanan antibiyotik kalıntılarından, pestisitlerden ve ağır metallerden arınmış olmalıdır. Bu nedenle, politikacılar ve kanun düzenleyici kurumlar ham propolis için bir kalite standardı oluşturmalıdır.

1.1.9 Doğal Derin Ötektik Çözücüler

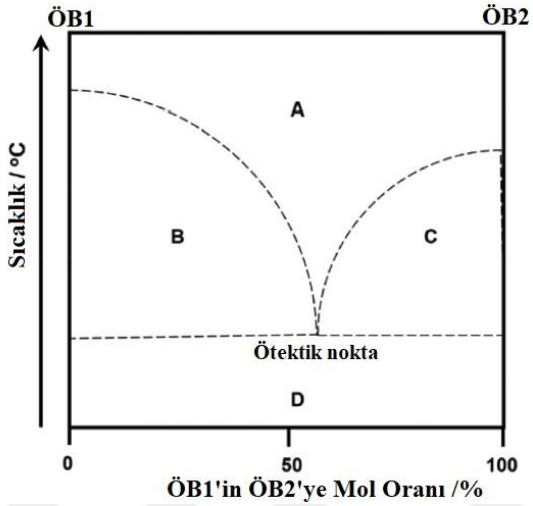
Gıda sanayinde çözücü olarak kullanılacak sıvılardan beklenen önemli özellikler vardır. Örneğin, çözücünün sıvı olarak kaldığı basınç ve sıcaklık aralığı kullanılacağı prosese uygun olmalı ve bu aralık ortam sıcaklığı ve ortam basıncını da kapsamalıdır. Kullanılacağı proses için yeterli miktarda ve gerekli saflıkta kolayca temin edilebilmeli ya da gerekli saflığa basit prosesler ile getirilebilmelidir. Ekonomik olmalıdır bu amaçla geri kazanılabilir ve bertarafı sırasında çevreye risk teşkil etmeyecek özellikte olmalıdır (Marcus, 2019).

Çözücü özelliklerinin işlem koşulları değiştirilerek ya da çeşitli yardımcı çözücüler eklenerek değiştirilebilir olması ayrıca istenen bir özelliktir. Çözücü olarak düşünülen kimyasallarda olmaması beklenen temel özellikler olarak viskozitenin proseste sorun çıkaracak seviyede olması, çevreye risk teşkil eden parametreler olarak uçuculuk, kolay alev alma ve toksisite sayılabilir (Marcus, 2019). Organik çözücülerin genel özellikleri, çözücü güçlerine destek olan özellikleri ve sulu ya da susuz karışım halindeki organik çözücülerin genel ve çözme yeteneği özellikleri çeşitli yayın ve kitaplarda özetlenmiştir (Marcus, 1998; Marcus, 2002; Marcus, 2017).

İnsanların çevre üzerindeki etkisine ilişkin farkındalığın artmasıyla alternatif bir proses olarak "yeşil ekstraksiyonu" gündeme gelmiştir. Yeşil ekstraksiyon ile ilgili talepler, hammadde, çözücü ve enerjinin optimum kullanımını sunan ekstraksiyon proseslerinin bulunması ve tasarımına dayanmaktadır. Ayrıca, 2010-2050 dönemi için AB çevre politikası ve mevzuatında ortaya konan önceliklerden biri, petrokimyasal çözücülerin ve uçucu organik bileşiklerin kullanımının azaltılmasıdır, çünkü bu çözücülerin çoğu yanıcı, uçucu ve genellikle zehirlidir. Bu sebeplerle, yeşil ekstraksiyonun geliştirilmesinde günden güne ilgi çeken araştırma alanı hem teknolojik hem de ekonomik talepleri karşılayacak yeni, çevre dostu ve ayarlanabilir çözücülerin tasarlanması olmuştur (Radosevic vd., 2016). Bu amaçla geleneksel toksik çözücülerin yerini alacak doğa dostu çözücülerin kullanımı yeşil kimyanın ana konuları arasındadır. Öncelikle iyonik sıvılar öne sürülmüş ancak biyouyumluluk, biyobozunurluk ve yüksek maliyet anlamında uygun olmadıkları görülmüştür (Gomez vd., 2018). 21. yüzyılın başında Abbott vd. (2003) tarafından derin ötektik sıvı kavramı ortaya atılmıştır (Abbott vd., 2003).

1.1.10 Doğal Derin Ötektik Çözücüler Kavramının Geçmişi

"Ötektik" terimi, Yunanca eu - “εy” “kolay” ve teksis – “τήξις” eriyen anlamlarındaki iki kelimenin birleşiminden türetilmiştir (Paiva vd., 2018). Genel anlamda, bir ötektik sistem, bileşenlerin belirli oranların sonucu olarak en düşük erime noktasına sahip karışımını temsil eder. Şekil 1.2'de gösterilen faz diyagramından da anlaşılacağı gibi, sıcaklık ve bileşen oranı ikili ötektik sistemde iki ana belirleyicidir (Liu vd. 2018).



Şekil 1.2 Ötekik çözücüyü oluşturan bileşenlerin faz diyagramı (Liu vd., 2018, s. 680))

İyonik sıvılar gibi kimyasal oluşumlardaki kovalent veya iyonik bağ ile karşılaştırıldığında, düşük termodinamik kararlılığa sahip bir ötektik karışım, geometriden ve kimyasal ortamdan etkilenme eğilimindedir ve tek tek bileşenlerine ayrışabilir (Okuniewski vd., 2016).

Bu termodinamik geçiş nedeniyle, ötektik bir durumun varlığı, doğal malzemelerde kolayca görülmez; bu, doğal ürün araştırmalarında neden nispeten az eğinilmiş bir konu olduğunu açıklayabilir. Aşağıdaki örneklerde de görüldüğü gibi ötektik olaylarla günlük hayatımızda da karşılaşılmaktadır. Klasik örnekler, ortam sıcaklığında oldukça viskoz şeker karışımlarını temsil eden bal ve şuruptur. Özellikle bal yüzlerce yıldır besin takviyeleri ve geleneksel tıbbi karışımlar için içerik olarak kullanılmıştır (Kuropatnicki vd., 2018; Eteraf-Oskouei & Najafi 2013). Bir başka öne çıkan örnek, ilaçları çözmek için bir araç olarak kullanılan ve ötektik bir sıvı oluşturabilen iki katı olan mentol ve kafurun karışımıdır (Tuntarawongsa & Phaechamud, 2012).

Sodyum amid ve potasyum amid'in (1:2, mol/mol) ötektik çökeltisi ilk olarak 1918'de amonyak çözeltisinde bir doğal olgu olarak gözlenmiştir. Kraus ve Cuy tarafından (Kraus & Cuy, 1923) bu ötektik fenomen, Şekil 1.2'de modellendiği gibi Sodyum amid ve potasyum amid karışımının bir erime noktası eğrisi oluşturularak incelenmiş ve Sodyum amid ve potasyum amid'in ötektik noktası 1:2 molar oranın altında 97°C olarak bulunmuştur. Kimyasal stabilitesi ve yüksek sıcaklıkta uçucu olmaması nedeniyle, ötektik sodyum amid ve potasyum amid karışımı ilk kez 1946'da organik sentez ortamı olarak kullanılmıştır (Bergstrom vd., 1946). O zamandan sonra, ötektik karışımlarla ilgili çalışmaların üssel büyümeye girmesi 30 yıldan uzun sürmüştür. Bir dizi ötektik ortam ve özellikleri ortaya çıkarılmıştır ve ilgili ötektik uygulamalarının miktarı artmaya devam etmektedir. Doğal Derin Ötektik Çözelti kavramına gelinen yoldaki önemli kilometre taşları olarak aşağıdaki çalışmalar sayılabilir:

a. Enzimler ve organik çözücüler arasındaki uyumluluk sorununun üstesinden gelmek ve reaksiyonları katalize etmek için organik çözücülere alternatif olarak ötektik ortam kullanılmıştır (Gill & Vulfson, 1993; Gill & Vulfson, 1994).
b. Ötektik fenomenler, sıcaklığın değiştirilmesiyle bir kristalin elde edilebildiği iki sıvı-katı faz diyagramı kullanılarak sistematik olarak ele alınmıştır, örn. bu ötektik özellik, saflaştırma çalışmalarında kullanılmıştır (Davey vd., 1995).
c. Lipofilik Doğal Ürünler (DÜ) ötektik bileşenler olarak kabul edilmiştir. Örneğin, ibuprofen ve 1,8-sineol, p-simen, D-limonen, mentol, menton veya timol gibi belirli terpenlerin bir karışımı, tıbbi bir ötektik karışım halinde geliştirilebilmiş ve bu ötektik karışımlar, transdermal (cilt yoluyla) ilaç dağıtım sistemlerine evirilmiştir (Stott vd., 1998).
d. Ekoloji dostu olması ve düşük toksisitesi nedeniyle, 2004 yılında bir grup ötektik karışımı tanımlamak için derin ötektik çözücü kavramı önerilmiştir (Abbott vd., 2004a). İyonik sıvılara alternatif adaylar olarak, derin ötektik çözücüler (DES'ler), daha evrensel olarak uygulanabilir bir yeşil ortam grubunu temsil etmektedir.

Doğal derin ötektik çözücüler, organik asitler, bazlar, amino asitler, şekerler, şeker alkolleri ve polialkoller gibi doğal bileşiklerin belirli molar oranlarda birleştirilmesiyle oluşan sıvılaşabilen karışımlardır (Choi vd., 2011; Wan Mahmood vd., 2019). (**NA**tural **D**eep **E**utectic **S**olvents: **NADES**) kavramı ilk

olarak 2011'de Choi vd. (2011) tarafından, canlı organizmalarda su ve lipidler dışında üçüncü bir sıvı ortamın varlığının gerekliliği hakkında yorumlar yaparak ortaya atılmıştır. Görüşlerine göre, NADES'ler, kuraklık gibi aşırı koşullarda yaşam için uzun süreli hayatta kalma durumuna giren organizmaların kurumasında, yeniden canlanan bitkiler ve likenlerdeki tohumların yanı sıra suda çözünmeyen bileşiklerin biyosentezi, suda çözünmeyen metabolitlerin taşınması ve depolanması için su ve lipidlere alternatif bir ortam olarak rol oynayabilmekteydi (Choi vd., 2011).

1.1.11 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Gıda, İlaç ve Kozmetik Alanında Kullanımı

Şimdiye kadar farklı araştırmacılar 150'den fazla NADES kombinasyonu önermiştir (Jhong vd., 2009; Dai vd., 2013a; Paradiso vd., 2016; Bakirtzi vd., 2017; Huang vd., 2017). Şekerler, şeker alkolleri, polialkoller, organik asitler, bazlar ve amino asitlerin NADES'ler için iyi bileşen adayları olduğu bildirilmiştir. Bileşenlerin doğal kökeni, NADES'lere sentetik iyonik sıvılar ve derin ötektik çözücüler karşısında büyük bir avantaj sağlar, çünkü daha az toksik ve daha çevre dostudurlar. NADES'lerle ilgili ilk yayınların peşi sıra, özellikle doğal bileşenlerin ekstraksiyonunda (Paradiso vd., 2016; Dai vd., 2013b; Dai vd., 2016; González vd., 2018; Vanda vd., 2018), enzimatik veya kimyasal reaksiyonlar için ortam olarak (Zhao vd., 2011; Khodaverdian vd., 2018; Yang vd., 2017; Durand vd., 2012), polisakkaritler ve ligninler gibi makromoleküllerin (Kumar vd., 2016) veya farmasötik amaçlar için suda çözünmeyen ilaçların (Wikene vd., 2015; Wikene vd., 2017; Shamseddin vd., 2017) çözündürülmesinde, kozmetik bileşenlerin geliştirilmesinde (Jeong vd., 2017) ve gıda uygulamalarında (Huang vd., 2018; Zahrina vd., 2018) aktif olarak uygulanmıştır. 2011 yılında ortaya çıkan ilk NADES makalesini takip eden beş yıl içerisinde, NADES'lere olan ilgiyi yansıtan bir çok bilimsel makale yayınlanmıştır; bu da onları umut verici yeşil çözücü türleri arasında göstermektedir.

NADES'ler genellikle doğal olarak tek tek bulunan bileşenlerin karışımıyla oluşturulur. Bu sayede düşük veya önemsiz düzeyde toksisite öngörülmekle birlikte bileşenlerin karışımının toksisitesinin gıda, ilaç ve kozmetik alanında kullanılmadan önce değerlendirilmesi önemlidir. Çeşitli kolin klorür bazlı

NADES'lerin in vitro toksisite, fitotoksisite ve atık suda biyolojik olarak parçalanabilirlik açısından incelendiği bir çalışmada sitotoksisite testleri, kolin klorür:glikoz ve kolin klorür:gliserol için düşük toksisite gösterirken, kolin klorür:oksalik asit için orta derecede sitotoksisite gözlenmiştir. Fitotoksisite testleri, test edilen NADES'lerin tohum çimlenmesi için toksik olmadığını göstermiştir (Radošević vd., 2015). Ayrıca, özel yapım NADES'lerin sitotoksisitesi iki insan hücre hattı (MCF-7 ve HeLa) kullanılarak in vitro deneylerle test edilmiş ve düşük sitotoksisite sergiledikleri belirlenmiştir. Bu da NADES'leri gıda, kozmetik ve ilaç endüstrisinde yeşil ekstraksiyon çözücüleri olarak potansiyel adaylar haline getirmiştir (Radošević vd., 2016).

NADES'lerin uygulamaları iyonik sıvılar veya derin ötektik çözücülerle aynı şekilde geliştirilmiştir. İlk olarak bitki sekonder metabolitlerinin ekstraksiyonunda ve ilaç ve gıda endüstrisinde kullanılmışlardır. Hidrojen bağı, NADES'lerin çözme gücünün temelini oluşturmaktadır (Zhang vd., 2012). Bu olgu göz önünde bulundurularak, NADES'lerin bir ekstraksiyon çözücüsü olarak özelliklerini araştırmak için başlangıç noktası olarak doğal ürünler arasından fenolik bileşikler seçilmiştir. 2013 yılında Dai vd., aspir (*Carthamus tinctorius* L.) bitkisinin çeşitli NADES kombinasyonları ile ekstraksiyonunu gerçekleştirmiş ve bunların verimlerini su ve etanol ile elde edilenlerle karşılaştırmıştır. Ekstraktlar HPLC, NMR ve LCMS ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, NADES'lerin kullanımında hem niceliksel hem de niteliksel avantajlar olduğunu göstermiştir. Sadece su ve etanol ile elde edilenlerden daha yüksek verim elde edilmekle kalmamış, aynı zamanda NADES'lerin hem polar hem de polar olmayan bileşiklerin ekstraksiyonunda daha etkili olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca, NADES'ler kartaminin stabilitesini de arttırmıştır (Dai vd. 2013b; Dai vd. 2014). Fenoliklerin çeşitli NADES'lerle ekstraksiyonu üzerine bir başka deney de Gonzalez vd. (2018) tarafından gerçekleştirilmiştir (González vd., 2018). Bu çalışmada vanilin, 14 farklı NADES kombinasyonu kullanılarak vanilya kabuğundan ekstrakte edilmiştir. Tüm NADES'lerin, bu tür ekstraksiyonlar için kullanılan geleneksel organik çözücülerden daha verimli olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca, bu çalışma sonucunda tatlandırma için uygun bir vanilya NADES çözeltisi de üretilebilmiştir.

NADES'ler analitik kimya alanında, özellikle elektrokimyasal tayinlerde de kullanılmıştır. Örneğin, glikoz, fruktoz, sitrik asit ve laktik asit bazlı farklı

NADES'ler çözücü olarak eklendiğinde kersetinin elektrokimyasal tespite duyarlılığının %380 daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu bulguyu rapor eden aynı grup, NADES'lerin analitik uygulamalar için olağanüstü avantajlara sahip doğal tasarım çözücüler olarak geliştirilmesini de gözden geçirmiştir (Gomez vd. 2016; Espino vd. 2016).

Choi vd. (2011) varsaydığı gibi, NADES'ler hücrelerde üçüncü bir sıvı faz (su ve lipidler dışında) olabilir ve önemli fizyolojik ve kimyasal roller oynayabilir. Bu roller enzimatik süreçlere katılımlarını da içerebilir (Choi vd., 2011; Dai vd., 2013a).

Kumar vd. (2016) pirinç samanı biyokütlesinin NADES'lerle ön muamelesini incelemiştir. Bu çalışmada bol miktarda lignoselülozik kalıntının ön muamelesi, selüloz ve hemiselüloz (holoselüloz) biyokütlesinden ligninin uzaklaştırılmasını ve böylece selülaz tarafından daha sonra parçalanmasının engellenmesini amaçlamıştır. Laktik asit-kolin klorürden (5:1) elde edilen NADES, yüksek kaliteli lignini (saflık>%90) holoselülozdan tek bir ekstraksiyon adımında ayırmıştır. Kantitatif analiz, toplam ligninin yaklaşık %60'ının pirinç samanından ekstrakte edilebildiğini göstermiştir. Bu biyokütlenin ardı sıra enzimatik hidrolizi hem FTIR hem de HPLC analizi ile değerlendirildiğinde %36,0'lık bir sakkarifikasyon verimliliği göstermiştir (Kumar vd., 2016).

NADES'lerin enzimatik süreçlerdeki diğer uygulamaları, substratların çözünürlüğünü artırma kapasitesinden yararlanmıştır. Bunun bir örneği, inorganik ve aromatik bileşiklerin, özellikle de fenoliklerin çok bakırlı proteinler olan lakkazlarla katalize edilmiş oksidasyonudur. Lakkazın substratları suda veya tamponlarda çok az çözünür ancak belirli NADES'lerde çok daha fazla çözünmektedir. Bu seçeneği araştırmak için, lakkaz aktivitesi ve stabilitesi betain ve kolin bazlı NADES'ler kullanılarak test edilmiştir. Sonuçlar, kolin bazlı NADES'lerin enzim aktivitesinde ani bir düşüşe neden olduğunu, betain bazlı NADES'lerin ise lakkaz aktivitesini ve stabilitesini geliştirdiğini göstermiştir. Bu NADES'ler arasında en yüksek lakkaz aktivitesi gliserol-betain (2:1) ile gözlenirken, sorbitol-betain-su (1:1:1) en yüksek stabiliteyi sağlamıştır. (Khodaverdian vd., 2018).

NADES'lerin, *Lysinibacillus fusiformis* tarafından katalizlenen izoöjenolün vaniline dönüşümünde bir yardımcı çözücü olarak kullanılabilirliği de araştırılmıştır. Vanilin dünyada en yaygın kullanılan aromadır ve talebinin doğal kaynaklardan ekstraksiyon ve kimyasal sentez ile karşılanması imkansızdır. Bunu çözmek için olası bir yaklaşım, izoöjenol'den vanilinin biyotransformasyonunda *L. fusiformis* gibi bir tam hücre katalizörünün kullanılmasıdır. Yardımcı çözücü olarak NADES kullanıldığında vanilin üretim verimi %142 oranında artmıştır. Yang vd. (2017), NADES'in tam hücre biyokatalizinde bir yardımcı çözücü olarak kullanılmasının faydalarının hücresel membran geçirgenliğindeki artıştan kaynaklanabileceğini öne sürmüşlerdir (Yang vd., 2017).

1.1.12 Propolis Ekstraksiyonunda Doğal Derin Ötektik Çözücü Uygulamaları

Yeşil kimyanın ilk ilgi alanı, biyoaktif doğal bileşiklerin ekstraksiyonunda yeni çözücülerin uygulanabilirliğinin araştırılması olmuştur. Son on yılda ise, doğal derin ötektik çözücüler yeşil kimyanın odağı olma yönündedir. NADES'lerin önemli avantajlarından biri kolaylıkla hazırlanabilmeleri, çeşitli kombinasyonlarının mümkün olması ve fizikokimyasal özelliklerinin "ayarlanabilir" olmasıdır (Fernandez vd., 2018). NADES'in, aktif maddelerin ekstraksiyonu için uygun polariteye sahip olması nedeniyle propolis ekstraksiyonunda kullanılabileceği gösterilmiştir. Ancak, bu çözücülerin yüksek viskozitesi nedeniyle ekstraksiyon sürelerini en aza indirmek için ultrason destekli ekstraksiyon kullanılmıştır. Farklı NADES kombinasyonları test edilmiş ve kavak tipi propolis için kolin klorür:L(+)-tartarik asit (Koutsoukos vd., 2019) ile sitrik asit:propilen glikol (Trusheva vd., 2019) kombinasyonlarının en etkili olan kombinasyonlar olduğu bulunmuştur. Brezilya yeşil propolisi için ise kolin klorür:propilen glikol veya kolin klorür:laktik asit kombinasyonları en uygun olanlar olarak tespit edilmiştir (Funari vd., 2019). Son zamanlarda, bazı araştırmacılar NADES bileşenlerinin çözeltideki biyoaktif bileşiklerin biyolojik aktivitesini artırabileceğini öne sürmüşlerdir (Murador vd., 2019). NADES'ler ile hazırlanmış propolis ekstraktı ile yapılan deneyler de bu iddiayı doğrulamıştır (Trusheva vd., 2019). Bu, doğrudan formülasyonlara eklenebilecek yüksek aktiviteli propolis ekstraktları elde ederek, viskoz ve düşük buhar basıncına sahip

NADES içinde çözülen maddelerin geri kazanılması ile ilgili zorluğu aşmanın kolay bir yolu olmuştur (Bankova vd., 2021).

Son 20 yılda özellikle biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda araştırma konusu haline gelen doğal derin ötektik çözücülerin propolis ekstraksiyonu alanında uygulanması ile ilgili öncül bir çalışmaya ilk kez Petkov vd. (2018) Sofya'da 2. Uluslararası Propolis Konferansı'nda sundukları çalışmada değinilmiştir. Çalışmada, günümüzde "yeşil" teknolojilerin geliştirilmesinin, çevreyi koruma ve insan müdahalesinin olumsuz etkilerini azaltma amacıyla kimya alanındaki önemli bir konu olduğu vurgulanmış ve NADES'lerin çeşitli avantajları olduğuna dikkat çekilmiştir. Kavak tipi propolis örneklerinden biyolojik olarak aktif bileşenlerin etkili bir şekilde ekstraksiyonu için hala en yaygın olarak kullanılan yönteminin %70 etanol ile ekstraksiyon olduğunu belirten Petkov vd. (2018), ancak alkol kullanımının bazı durumlarda kontrendike olduğuna dikkat çekmişlerdir. Bu nedenle, bu değerli biyolojik olarak aktif kompleksin ekstraksiyonu için çevre ve insan sağlığını koruyan alternatif yöntemlerin araştırılması gerektiğini vurgulamışlardır. NADES'lerin kullanımına dayalı yeni bir yaklaşımın, kavak tipi propolis örneklerinden biyolojik olarak aktif bileşenlerin etkili bir şekilde çıkarılmasını sağlamak olduğunu belirtmişlerdir.

Bu bağlamda yapılan ilk çalışmalardan birinde Funari vd. (2019) yeşil propolisin ekstraksiyonu için alternatif çözücüler üzerinde çalışmışlardır. Esansiyel amino asit L-lizin de dahil olmak üzere düşük toksisiteli kimyasallardan elde edilen on altı NADES, on iki ayrı NADES bileşeni ve NADES'lere benzer fiziksel-kimyasal özellikler gösteren bal incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, 50°C'deki bazı NADES'lerin potansiyel olarak piyasada sunulan hidroetanolik, propilen glikollü ve sulu yeşil propolis çözeltilerinin yerini alabileceğini, ekstraksiyon performansında herhangi bir kayıp olmayacağını ve metabolitlerin NADES'lerden ayrıştırılmasına gerek kalmadan tüketilebileceğini güçlü bir şekilde ortaya koymaktadır. Hem ekstraksiyon verimliliği hem de 17 ay boyunca stabilitesi göz önüne alındığında, kolin klorür:propilen glikol 1:2 ve kolin klorür:laktik asit:su 1:1:1, hidroetanolik ve propilen glikollü ekstraktların yerini almak için en iyi adaylar olarak ortaya çıkmıştır. Öte yandan, esansiyel amino asit L-lizin'in 50 °C'deki sulu çözeltisi, saf sudan çok daha iyi performans göstermiş ve böylece şu anda piyasada sunulan sulu propolis çözeltilerine potansiyel bir alternatif olarak

ortaya çıkmıştır. Propolis ekstraktları ile zenginleştirilmiş bal ürünleri ile ilgili olarak, çalışmanın sonuçları bunların NADES gibi davranan bal ile doğrudan ekstraksiyon yoluyla elde edilebileceğini göstermektedir (Funari vd., 2019).

Kapsül veya şeker gibi sıvı olmayan ekstraksiyon ürünleri için en iyi ekstraksiyon ortamı kolin klorür:propilen glikol 1:1 olarak tespit edilmiştir. Burada incelenen tüm NADES, bal ve konsantre çözeltiler diğer gıda preparatlarında etanole alternatif olarak denenebileceği ortaya konmuştur. Bunlar temel kolin ve L-lizin gibi yenilebilir bileşenlerden üretilmiştir. Dolayısıyla, bu NADES'lerin yalnızca ekstraksiyon ortamı olarak değil, formüle edilmiş ürünlerin bir parçası olarak da işlev görebileceği belirtilmektedir. Ayrıca, etanolik ekstraktların doğrudan tüketimi her zaman uygun olmayabilir. Son olarak, Chemat vd. (2012) tarafından tanımlanan yeşil ekstraksiyonun altı ilkesinin bu çalışmada en azından kısmi olarak ele alındığı belirtilebilir. Zira amino asitler ve şekerler gibi yenilenebilir bitki metabolitleri propolis ekstraksiyonu için alternatif çözücüler olarak kullanılmıştır (1. ve 2. ilke). Çözücünün (etanol) konsantre edilmesi ve ardından suda veya balda yeniden süspansiyon haline getirilmesi gibi enerji tüketen işlemlere duyulan ihtiyaç ortadan kaldırılmıştır (3. ve 5. ilke). Gıda ile uyumlu NADES bileşenleri nihai tüketici tarafından tüketilebildiğinden atık üretiminden kaçınılmıştır (4. ilke). Son olarak, sadece biyolojik olarak parçalanabilen ekstraktlar üretilmiştir (6. ilke) (Chemat vd., 2012; Funari vd., 2019).

Aynı yıl yayınlanan başka bir çalışmada, Koutsoukos vd. (2019), Yunan propolisinden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için potansiyel bir çözücü olarak kolin klorür ve L(+)-tartarik asit olmak üzere iki doğal üründen elde edilen bir doğal derin ötektik çözücüyü incelemişlerdir. Ekstraksiyon süresini en aza indirmek ve verimi en üst düzeye çıkarmak için NADES uygulaması ile birlikte yüksek enerji gerektiren tekniklerin kullanıldığı çalışmada ekstraksiyon koşulları ile elde edilen ekstraktlar arasındaki korelasyonu istatistiksel olarak araştırmak ve optimum koşulları bulmak için iki ve üç seviyeli deneysel tasarımlar uygulanmıştır. 2:1 kolin klorür:tartarik asit'ten oluşan NADES ekstraksiyon için daha çevreci bir alternatif çözücü olarak incelenmiştir. Bu çalışma, kolin klorür:tartarik asit'in kapsamlı karakterizasyonu ile farklı biyoaktif bileşik sınıflarının ekstraksiyonu için uygulanmasını birleştirmeyi başarmıştır. Çözücü olarak kolin klorür:tartarik asit ve yardımcı çözücü olarak da su kullanılarak polifenolleri hedefleyen ultrason destekli

ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyon iki ve üç seviyeli deneysel tasarım kullanılarak kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Sonuç olarak, Yunan kahverengi propolisi üzerinde çalışılmış ve özellikle ultrason destekli ekstraksiyon yönteminde toplam flavonoid içerik ve antioksidan kapasite açısından çok umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Bu, propolisin bir derin ötektik çözücü ile ekstraksiyonunun çalışıldığı ilk çalışmalardan biridir ve bu yöntemin en büyük avantajının, herhangi bir toksik atık üretmeden 30 dakikadan daha kısa sürede yüksek verimli ekstraktların elde edilmesi olduğu tespit edilmiştir (Koutsoukos vd., 2019).

Bu çalışmada, kavak propolisinden flavonoid aglikonlar, fenolik asitler ve bunların esterleri gibi biyoaktif maddelerin ekstraksiyonu için uygun polariteye sahip olduğu bilinen beş farklı doğal derin ötektik çözücü hazırlanmış ve test edilmiştir. Hazırlanmaları için iki yöntem kullanılmıştır. Oda sıcaklığında sıvı bileşen içeren 3 NADES, bileşenlerin karıştırılması ve ardından homojen bir sıvı oluşana kadar 50 ◦C'de hafif ısıtılmasıyla su banyosunda (300 rpm) karıştırılarak hazırlanmıştır. Tüm bileşenleri katı olan 2 NADES suda çözüldükten sonra vakum altında buharlaştırma yöntemiyle hazırlanmıştır.

Elde edilen NADES propolis ekstraktlarının kimyasal bileşiminin yanı sıra antimikrobiyal potansiyelleri de incelenmiştir. Antimikrobiyal duyarlılık testi için kullanılan mikroorganizmalar: *Staphylococcus aureus, Escherichia coli ve Candida albicans*'dır. Ultrason ekstraksiyonu uygulanmış ve ekstraksiyon verimi, ekstrakte edilen toplam fenoliklerin, toplam flavonların ve flavonollerin yüzdesi ölçülerek değerlendirilmiştir. Ekstraktların kalitatif bileşimi GC-MS analizi ile incelenmiştir. En iyi ekstraksiyon sonuçları sitrik asit:1,2-propandiol 1:4 kullanılarak elde edilmiştir, geleneksel olarak propolis ekstraksiyonu için kullanılan %70 etanol çözeltisinden sadece biraz daha düşük miktarda toplam flavon ve flavonol ekstrakte edilebilmiştir. GC-MS analizi, kavak tipi propolisin kimyasal belirteçleri olan pinosembrin, krisin, galangin, fenetil kafeat'ın, çalışılan tüm NADES ekstraktlarının ana bileşenleri olduğunu doğrulamıştır. Antimikrobiyal aktiviteleri geleneksel etanol ekstraktı ile aynı seviyede tespit edilmiş olup, en iyi sonuçlar sitrik asit:1,2-propandiol 1:4 ile elde edildiği görülmüştür. Bu çalışma NADES ile elde edilen propolis ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerinin ölçüldüğü ilk çalışma olma özelliği göstermiştir. Elde edilen sonuçlar, NADES'lerin kavak tipi

propolisin biyolojik olarak aktif bileşenlerinin ekstraksiyonu için çözücü olarak kullanılma potansiyelini ortaya koymuştur (Trusheva vd., 2019).

2022 yılında yayınlanan bir çalışmada, propolis, *Sideritis scardica* ve *Plantago major*'un sitrik asit:1,2-propandiol'ün 1:4 molar oranlı karışımından oluşturulan NADES ile hazırlanan ekstraktlarının potansiyel yaşlanma karşıtı etkileri araştırılmıştır. Araştırmada, vahşi tip ve erken yaşlanma özellikleri sergilediği bilinen üç kromatin mutantı dahil olmak üzere dört *Saccharomyces cerevisiae* maya türü kullanılmıştır. Sonuçlar, özellikle propolis ve *Sideritis scardica*'dan elde edilen NADES ekstraktlarının, hücresel büyümeyi, hücre döngüsünü iyileştirerek ve mutant hücrelerde strese duyarlı genleri etkileyerek yaşlanma karşıtı özellikler sergilediğini göstermiştir. Çalışmada ayrıca sitrik asit:1,2-propandiol 1:4 çözücüsünün beklenmedik bir şekilde hafif bir yaşlanma karşıtı etkiye sahip olduğu da bulunmuştur. Propolis ve *Sideritis scardica* gibi daha yüksek fenolik içeriğe sahip ekstraktlar, *Plantago major* ekstraktına kıyasla daha güçlü yaşlanma karşıtı etkiler gösterdiği tespit edilmiştir. Bulgular, fenolik içerikleri ve oksidatif stresin potansiyel indüksiyonu da dahil olmak üzere biyolojik etkileri göz önüne alındığında, NADES ekstraktlarının yaşlanma karşıtı olgularda altta yatan mekanizmaları ve potansiyel uygulamalarını anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu göstermiştir (Vasileva vd., 2022). Aynı yıl aynı bitkisel ekstraktlar (*Sideritis scardica* ve *Plantago major*) ve propolis ile yapılan başka bir ekstraksiyon çalışmasında 10 farklı NADES ile ekstraksiyon denenmiş ve ekstraktların toplam fenolik, toplam flavonoid içerikleri ile birlikte DPPH serbest radikaline karşı süpürme aktiviteleri ve FRAP yöntemiyle antioksidan kapasiteleri ölçülmüştür. NADES'lerin yüksek viskoziteleri nedeniyle, ekstraksiyon sürecini hızlandırmak amacıyla ultrason destekli ekstraksiyon kullanılmıştır. Genel olarak, NADES'lerin toplam fenoliklerin ekstraksiyonu için flavonoidlerin ekstraksiyonu ile kıyaslandığında daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Ekstrakte edilen flavonoidlerin yüzdesi tüm çözücüler için %70 etanol ile karşılaştırıldığında daha düşük olarak ölçülmüştür. Kolin klorür:1,2-propandiol:su 1:1:1; kolin klorür:1,2-propandiol 1:3 ve laktik asit:1,2-propandiol 1:1'den oluşan 3 NADES, %70 etanol çözeltisi ile karşılaştırıldığında daha yüksek miktarda fenolik ve hemen hemen aynı miktarda flavonoid ekstrakte edebilmiştir. Propolis bileşenlerinin farklı doğası ve özellikle flavonoid glikozitlerin ve diğer glikozillenmiş fenoliklerin eksikliği, bu

farklılıkların nedeni olarak gösterilmiştir. Kolin klorür:1,2-propandiol 1:3 ve laktik asit:1,2-propandiol 1:1 NADES'lerini içeren ekstraktlar, etanol ekstraktına benzer şekilde DPPH radikallerine karşı en aktif olan ekstraktlar olarak tespit edilmiştir. Ancak FRAP metodu açısından, NADES ekstraktlarının hiçbirisinin propolisin etanol ekstraktıyla karşılaştırılabilir bir kapasiteye sahip olmadığı tespit edilmiştir. Laktik Asit:1,2-propandiol 1:1 FRAP antioksidan kapasitesi en güçlü olan NADES olmakla birlikte %70 etanol çözeltisinden daha düşük aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Petkov vd., 2022).

Tzani vd. (2022), doğal derin ötektik çözücüler (NADES) kullanarak Yunan propolisinden biyoaktif bileşiklerin ultrason destekli ekstraksiyonunu araştırmış ve optimize etmiştir. Test edilen çözücüler arasında L-proline/D,L-laktik asit/su, toplam fenolik içerik ve ekstraktların antioksidan aktivitesi açısından optimum NADES olarak seçilmiştir. Ekstraksiyon süreci deneysel bir tasarım uygulanarak optimize edilmiş ve en önemli üç ekstraksiyon parametresinin çalışılan süreçteki etkisi araştırılmıştır. Ekstraksiyon süresi, çözücü-propolis oranı ve NADES-su çözücü sistemindeki su ve NADES miktarı optimizasyon süreci için parametreler olarak seçilmiştir. Nihai çözücü sistemindeki su miktarı önemli bir parametredir ve NADES'lerin viskoz yapısının bazı ekstraksiyon işlemlerini olumsuz etkilediği bilinmektedir. Uygun miktarda su ilavesi, böyle bir dezavantajın üstesinden gelmek için iyi bir tekniktir. Box-Behnken deney tasarımı ile optimize edilen bu çalışma, maksimum toplam fenolik içeriğe (TPİ) sahip bir ekstrakt elde etmek için optimum ekstraksiyon koşullarını (çalışılan sınırlar dahilinde) 31 dakika ekstraksiyon süresi, g propolis başına 22,57 g NADES ve %89,14 NADES/su olarak tespit etmiştir. Maksimum DPPH süpürme yeteneği açısından optimum koşullar 30 dakika ekstraksiyon süresi, g propolis başına 6,32 g çözücü ve %75,71 NADES/su olarak tespit etmiştir. Karşılaştırma amacıyla, ekstraksiyon çözücüsü olarak hidroetanolik bir çözeltide 24 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırma kullanılarak yapılan geleneksel bir ekstraksiyon da incelenmiştir. Ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen optimum NADES ekstraktı ve geleneksel ekstraksiyonla elde edilen ekstrakt, antioksidan aktiviteleri ve LC-MS/MS analizi kullanılarak fenolik profilleri açısından değerlendirilmiştir. Bu çalışma, ekstraksiyon çözücüsü olarak NADES'in iki çok önemli biyoaktif flavonoid olan naringenin ve apigenin miktarlarının daha yüksek olduğu ekstraktlar elde ettiğini göstermiştir. Optimum

NADES-propolis ekstraktı elde edildiği şekilde bir kozmetik kreme dahil edilmiş ve renk, aroma ve doku gibi organoleptik özellikleri değerlendirmek için duyusal analiz gerçekleştirilmiştir. Gerçek depolama koşulları, santrifüjleme, sonikasyon, donma-çözülme döngüleri gibi hızlandırılmış stabilite testlerinin kombinasyonu kullanılarak gerçekleştirilen stabilite tahminini doğrulamıştır. NADES-propolis ekstraktının tek başına ve kreme dahil edildikten sonraki antioksidan aktivitesi farklı in vitro yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar kremden salınan propolis ekstraktı için linoleik asit peroksidasyonunun en yüksek inhibisyonunun 2, 3 ve 4. saatlerde kaydedildiğini ortaya koymuştur (%91). Bu bulgulara göre, NADES-propolis ekstraktı içeren kozmetik kremin antioksidan aktivitesi zamana bağlı olduğu, 120 dakika sonra bile artış gösterdiği belirlenmiştir. Böylece, NADES-ekstraktlarının kullanımının, ekstrakte edilen biyoaktif bileşiklerin kreme kademeli olarak salınması nedeniyle uzun süreli antioksidan aktiviteye yol açtığı gösterilmiştir. NADES-propolis ekstraktının antioksidan aktivitesi ve TPİ içeriğinin yanı sıra kozmetik bir formülasyona başarılı bir şekilde dahil edilmesine ilişkin cesaret verici sonuçlar ışığında, NADES ekstraktının toksisitesini ve antimikrobiyal aktivitesini kapsamlı bir şekilde değerlendirmesi gerekliliğinin altı çizilmiştir. Ayrıca, NADES-propolis ekstraktının potansiyel uygulama yelpazesinin, yara iyileşmesi ve biyomedikal uygulamalar gibi alanlarda da genişletilmesinin düşünüldüğü vurgulanmıştır (Tzani vd., 2022).

2023 tarihli bir çalışmada (Contieri vd., 2023), Brezilya yeşil propolisi için ötektik çözücü bazlı bir yaklaşım kullanılarak başarılı bir şekilde yeni bir ekstraksiyon süreci geliştirmiştir. Test edilen 25 ötektik çözücü arasında, betain:sitrik asit 1:2 %50 su'dan oluşan NADES, optimum koşullarda maksimum 100 mg polifenol/g propolis ekstraksiyon verimi ile propolisteki fenolik bileşikleri seçici olarak ekstrakte etmek için en etkili çözücü olarak tespit edilmiştir. Bu yeni ekstraktın potansiyelinin değerlendirilmesi amacıyla antioksidan, antihipertansif, lipaz inhibisyonu ve *Staphylococcus aureus; Escherichia coli*; metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA); metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA); *Staphylococcus epidermidis* ve *Candida albicans*'a karşı antimikrobiyal aktivite açısından in vitro biyolojik testler yapılmıştır. Elde edilen ekstrakt yüksek biyolojik değere sahip olduğu ve çözücü olarak sudan daha iyi performans gösterdiği bildirilmiştir (Contieri vd., 2023).

Ekstrakttaki ötektik çözücünün varlığının da biyolojik deneyler üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur, bu da bu ötektik çözücünün nihai ekstraktta biyoaktif bir katkı maddesi olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ekstraksiyon işlemi basit ve yaygın olarak kullanılan teknikler kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir, bu da geliştirilen yöntemi, antioksidan, antihipertansif, antilipaz ve antimikrobiyal özelliklere sahip bir ekstrakt oluşturmak için yenilikçi ve umut verici bir yöntem haline getirmektedir. Propolis ötektik çözücü ekstraktı hem doğal hem de toksik olmayan bir içeriktedir, bu da bahsi geçen ekstraktın gelecekte gıda, kozmetik ve farmasötik uygulamalar için mükemmel bir seçenek olmasını sağlamaktadır. Bununla birlikte, ekstraktın in vivo etkinliğini, insanlar ve mikroorganizmalar üzerindeki etkilerini belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu düşünülmektedir. Genel olarak, rapor edilen süreç, çok sayıda potansiyel uygulamaya sahip yüksek kaliteli bir propolis ekstraktı geliştirilmesinde önemli bir adım olarak görülmektedir (Contieri vd., 2023).

Mergen-Duymaz vd. (2023) yaptıkları bir çalışmada %70 etanol, propilen glikol ve sulu L-arjinin çözeltisi ile hazırlanan propolis ekstraktlarının fenolik, antioksidan ve antibakteriyel aktivitelerini karşılaştırmıştır. Ayrıca bu ekstraktları in vitro simüle sindirim prosedürüne tabi tutmuşlar ve sindirilmiş ile sindirilmemiş örneklerin fenolik profillerini LC-MS/MS kullanarak belirlemişlerdir. Bağırsak aşamasına ulaşan veya dönüştürülen TPC miktarı propilen glikol ve sulu L-arjinin çözeltisi ile hazırlanan propolis ekstraktları için %70 etanole kıyasla daha yüksek tespit edilmiştir. Sulu L-arjinin çözeltisi ile hazırlanan propolis ekstraktları sindirilmiş örneklerde en yüksek antioksidan aktiviteyi göstermiştir. İncelenen tüm ekstraktlar *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı in vitro inhibitör aktivite göstermiştir. Özetle, yazarlar sulu L-arjinin çözeltisinin propolis ekstraksiyonu için etanol ve propilen glikole alternatif bir çözücü olarak kullanılabileceğini belirtmiştir.

Verilen örneklerden de anlaşıldığı üzere son zamanlarda özellikle NADES ve su bazlı ekstrakt hazırlama yöntemleri üzerine çalışmaların sayısı artmaktadır. Bal doğal bir ötektik çözücü olarak kabul edilebilir. Bu nedenle Kolaylı vd. (2023) su bazlı çözücü olarak bal-su karışımının propolis ekstraktının antioksidan etkinliği üzerine etkisini araştırmıştır. Çalışmanın ilk adım sonuçlarına bakıldığında, 1:20 bal:su karışımı kullanılarak elde edilen propolis ekstraktının antioksidan

aktivitesinde önemli bir artış gözlenmiştir. Ekstraksiyon koşulları iyileştirilerek daha yüksek antioksidan aktivite elde edilebileceği ancak belirlenen bal:su karışımında ekstrakte edilecek propolis miktarının da önemli olduğu bildirilmiştir. Yüksek propolis miktarı antioksidan aktiviteyi belli bir oranda arttırırken, belli bir noktadan sonra ekstraksiyon veriminde düşüş yaşandığı görülmektedir. Son olarak, etanolik propolisin uçurulmasından sonra, kalıntı bal:su ve etanol içinde ayrı ayrı çözüldüğünde aralarında antioksidan aktivite açısından önemli bir fark olmadığı görülmüştür. Fakat bal:su karışımı ile hazırlanan ekstrakt çalışmada öngörüldüğü kadar yüksek bir antioksidan aktivite sağlamamıştır (Kolayli vd., 2023). Elbette, farklı propolis türlerinden biyoaktif bileşikleri yeşil çözücü bazında elde etmenin en iyi yolunu bulmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Önemli bir arı ürünü olan propolisin diğer bir arı ürünü içinde çözündürülmesinin daha derinlemesine araştırılmayı gerektiren bir alan olduğu görülmektedir.

1.2 Tezin Amacı

Son yıllarda hem ülkemizde hem de Dünya genelindeki tüketicilerde doğal ürünlere ve yapay katkı maddesi içermeyen gıda ürünlerine gösterilen ilgide artış olmuştur. Gıda sektörü için koruyucu olarak kullanılma potansiyeli olan doğal ürünlerden birisi de propolistir. Bu nedenlerden dolayı antimikrobiyal özellikleri uygun ve aynı zamanda doğa dostu, biyobozunur ürünlerin geliştirilmesi ve gıda sanayinde uygulamaya alınması önemlidir.

Bu tez çalışmasında, propolisten doğal derin ötektik çözücüler kullanarak ekstrakste edilmiş, ekstraksiyon verimi ve kalitesi yüksek bir ekstrakt elde edip, bu elde edilen, biyoaktif özellikleri uygun ekstraktın bir gıda ürününde (kek) in situ antifungal etkisi incelenmesi amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Propolis ekstraksiyonunda Dünya'da ve ülkemizde genellikle organik çözücüler ve bu çözücülerin sulu karışımları kullanılmaktadır. Organik çözücülerin tüketimi hem insan sağlığı hem de çevre açısından sorun yaratmaktadır. Ayrıca bu çözücülerin kullanımı bazı ürünler özelinde propolis ekstraktlarının fonksiyonel gıda bileşeni olarak kullanımını da kısıtlayabilmektedir. Son yıllarda önemli bir araştırma konusu olan doğal derin ötektik çözücülerle gerçekleştirilecek propolis ekstraksiyonunun optimizasyonu çalışması sonunda ekstraksiyon verimi, kalitesi ve

antimikrobiyal aktivitesi yüksek bir ekstrakt elde edilebilir. Bu elde edilen ekstrakt gıda ürünlerinde antifungal ajan olarak kullanılabilir.

2
MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1 Materyal

2.1.1 Propolis Numunesi

Bu tez çalışmasında kullanılan ham propolis örneği iki ayrı arıcıdan alınmış ve kullanım öncesi derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Dondurucudan çıkarılan iki ayrı ham propolis örneği ısınmasına müsaade etmeden (ilk 10 dakika içinde) laboratuvar değirmeninde (Demsan-Brader) öğütülerek karıştırılmış ve çalışmada kullanılacak deney materyali (Şekil 2.1.) hazırlanmıştır. Hazırlanan homojen biçimde öğütülmüş propolis örneği farklı çözücülerle ekstraksiyon amacıyla kullanılıncaya kadar derin dondurucu da -18,0°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 2.1 Çalışmada kullanılan öğütülmüş homojen propolis numunesi

2.1.2 Doğal Derin Ötektik Çözücü İçerikleri

Bu çalışmada incelenen doğal derin ötektik çözücüleri (NADES'ler) hazırlamak için Tablo 2.1'de verilen farklı molar oranlarda yirmi bir farklı kimyasal bileşen kullanılmıştır. Kolin klorür, betain, kolin bitartarat ve prolin ECA Healthcare Inc. şirketinden (Şangay, Çin), sitrik asit ve malik asit RZBC (Juxian) Co. Ltd.

şirketinden (Şandong, Çin), maleik asit, ksilitol ve dekanoik asit Sigma-Aldrich'ten (Steinheim-Almanya), glikoz, fruktoz, sukroz, maltoz, sorbitol, propilen glikol ve laktik asit Merck KGaA'dan (Darmstadt-Almanya), dodekanoik asit, oktanoik asit, timol ve mentol Acros Organics'ten (Geel, Belçika) ve gliserol ise Fisher Chemicals'dan (Loughborough, İngiltere) satın alınmıştır.

2.2 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Özellikleri

2.2.1 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Oluşturulması

Doğal derin ötektik çözücülerin (NADES) hazırlanmasında Dai ve diğerlerinin (2013a) yayınında kullanılan iki farklı yöntem bazı modifikasyonlar uygulanarak kullanılmıştır. Bu yöntemlerden ilki ultrason ile ısıtma yöntemidir. Bu yöntem belirli miktarda su içeren NADES'ler elde etmek amacıyla kullanılmaktadır. Doğal derin ötektik çözücüyü oluşturacak bileşenler ağırlıkça belirli oranda (%30 ve %15) su ile karıştırılmış ve çözülene kadar (yaklaşık 30 ile 150 dakika arasında) 65 °C'de ultrasonik su banyosunda (Bandelin GmbH, DK1028 P, Berlin, Almanya) bekletilmiştir (Dai vd., 2013a).

Diğer yöntem vakum altında buharlaştırma yöntemidir. Bu yöntem için, doğal derin ötektik çözücüyü oluşturacak bileşenler ağırlıkça belirli oran (%30) su ile karıştırılmış ve çözünene kadar 65 °C'de ultrasonik su banyosunda bekletilmiştir. Ardından vakumlu etüvde 75 °C'de 0,1 mbar vakum altında çözücü içindeki su uzaklaştırılmıştır. Elde edilen sıvılar, sabit bir ağırlığa ulaşana kadar silika jel içeren bir desikatörde bekletilmiştir (Dai vd., 2013a).

Ultrason destekli ısıtma yöntemi ile yapılan ilk çalışmanın (%30 su içerikli) ardından hazırlanan çözeltiler stabiliteleri açısından incelenmiştir. Bu çözeltilerden bazıları berrak bir sıvı oluşturmamış, bazıları ise kısa sürede (ilk beş gün içinde) berrak bir sıvı formunu kaybetmiştir. Ultrason destekli ısıtma yöntemi ile yapılan ikinci çalışma için (%15 su içerikli) bu çalışmada berrak bir sıvı oluşturmamış ve kısa sürede berrak bir sıvı formunu kaybetmiş olan karışımlar kullanılmamıştır.

Aynı şekilde vakum altında buharlaştırma yöntemi için de ultrason destekli ısıtma yöntemi ile yapılan ilk çalışmada başarılı NADES oluşturmayan karışımlar işleme alınmamıştır. Doğası gereği oda sıcaklığında sıvı olan bileşenleri içeren karışımlar doğrudan su eklemesi yapılmaksızın ultrason ile ısıtma yöntemi ile hazırlanmıştır.

Tablo 2.1 Doğal derin ötektik çözücülerin bileşenleri ve hazırlama yöntemleri

#	Bileşen No 1	Bileşen No 2	Bileşen No 3	Mol Oranı	Su oranı (w/w)	Hazırlama Yöntemi
1	Kolin klorür	Malik asit		1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
2	Kolin klorür	Sitrik asit		1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
3	Kolin klorür	Gliserol		1:1	%0	Ultrason ile ısıtma
4	Kolin klorür	Glikoz		5:2	%30	Ultrason ile ısıtma
5	Kolin klorür	Fruktoz		5:2	%30	Ultrason ile ısıtma
6	Kolin klorür	Sakkaroz		1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
7	Kolin klorür	Prolin	Malik	1:1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
8	Kolin klorür	Ksilitol	Malik	1:1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
9	Kolin klorür	Prolin	Maleik	1:1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
10	Kolin klorür	Maleik asit		1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
11	Kolin klorür	Laktik asit		1:3	%0	Ultrason ile ısıtma
12	Kolin	Glikoz		1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
13	Betain	Sakkaroz		2:1	%30	Ultrason ile ısıtma
14	Betain	Malik asit		1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
15	Betain	Sakkaroz	Prolin	1:1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
16	Betain	Sakkaroz	Prolin	5:2:2	%30	Ultrason ile ısıtma
17	Betain	Glikoz	Prolin	1:1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
18	Betain	Malik asit	Glikoz	1:1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
19	Betain	Malik asit	Prolin	1:1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
20	Betain	Maleik asit	Glikoz	1:1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
21	Betain	Maleik asit	Prolin	1:1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
22	Betain	Sitrik asit		1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
23	Malik asit	Sakkaroz		1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
24	Malik asit	Sorbitol		1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
25	Malik asit	Glikoz	Fruktoz	1:1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
26	Malik asit	Glikoz	Glisero	1:1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
27	Malik asit	Sakkaroz	Glisero	1:1:2	%30	Ultrason ile ısıtma
28	Sitrik asit	Fruktoz		1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
29	Sitrik asit	Sakkaroz		1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
30	Sitrik asit	Maltoz		2:1	%30	Ultrason ile ısıtma
31	Prolin	Sakkaroz		2:1	%30	Ultrason ile ısıtma
32	Prolin	Sakkaroz		3:1	%30	Ultrason ile ısıtma

Tablo 2.1 Doğal derin ötektik çözücülerin bileşenleri ve hazırlama yöntemleri (devamı)

#	Bileşen No 1	Bileşen No 2	Bileşen No 3	Mol Oranı	Su oranı (w/w)	Hazırlama Yöntemi
33	Prolin	Sorbitol		1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
34	Prolin	Glikoz		1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
35	Prolin	Glikoz		5:1	%30	Ultrason ile ısıtma
36	Prolin	Malik asit		1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
37	Prolin	Maleik asit		1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
38	Prolin	Sitrik asit		1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
39	Prolin	Sitrik asit		2:1	%30	Ultrason ile ısıtma
40	Glikoz	Sitrik asit		1:1	%30	Ultrason ile ısıtma
41	Dekanoik asit	Timol		1:1	%0	Ultrason ile ısıtma
42	Dekanoik asit	Timol		1:2	%0	Ultrason ile ısıtma
43	Dekanoik asit	Mentol		1:1	%0	Ultrason ile ısıtma
44	Dekanoik asit	Mentol		1:2	%0	Ultrason ile ısıtma
45	Dodekanoik	Timol		1:1	%0	Ultrason ile ısıtma
46	Dodekanoik	Timol		1:2	%0	Ultrason ile ısıtma
47	Dodekanoik	Mentol		1:1	%0	Ultrason ile ısıtma
48	Dodekanoik	Mentol		1:2	%0	Ultrason ile ısıtma
49	Oktanoik asit	Timol		1:1	%0	Ultrason ile ısıtma
50	Oktanoik asit	Timol		1:2	%0	Ultrason ile ısıtma
51	Oktanoik asit	Mentol		1:1	%0	Ultrason ile ısıtma
52	Oktanoik asit	Mentol		1:2	%0	Ultrason ile ısıtma
53	Kolin klorür	Malik asit		1:1	%15	Ultrason ile ısıtma
54	Kolin klorür	Sitrik asit		1:1	%15	Ultrason ile ısıtma
55	Kolin klorür	Prolin	Malik	1:1:1	%15	Ultrason ile ısıtma
56	Kolin	Glikoz		1:1	%15	Ultrason ile ısıtma
57	Kolin klorür	Ksilitol	Malik	1:1:1	%15	Ultrason ile ısıtma
58	Betain	Malik asit		1:1	%15	Ultrason ile ısıtma
59	Malik asit	Glikoz	Fruktoz	1:1:1	%15	Ultrason ile ısıtma
60	Betain	Glikoz	Prolin	1:1:1	%15	Ultrason ile ısıtma
61	Betain	Malik asit	Glikoz	1:1:1	%15	Ultrason ile ısıtma
62	Betain	Malik asit	Prolin	1:1:1	%15	Ultrason ile ısıtma

Tablo 2.1 Doğal derin ötektik çözücülerin bileşenleri ve hazırlama yöntemleri (devamı)

#	Bileşen No 1	Bileşen No 2	Bileşen No 3	Mol Oranı	Su oranı (w/w)	Hazırlama Yöntemi
63	Betain	Maleik asit	Glikoz	1:1:1	%15	Ultrason ile ısıtma
64	Betain	Maleik asit	Prolin	1:1:1	%15	Ultrason ile ısıtma
65	Betain	Sitrik asit		1:1	%15	Ultrason ile ısıtma
66	Malik asit	Sakkaroz		1:1	%15	Ultrason ile ısıtma
67	Malik asit	Sorbitol		1:1	%15	Ultrason ile ısıtma
68	Sitrik asit	Fruktoz		1:1	%15	Ultrason ile ısıtma
69	Sitrik asit	Sakkaroz		1:1	%15	Ultrason ile ısıtma
70	Sitrik asit	Maltoz		2:1	%15	Ultrason ile ısıtma
71	Prolin	Glikoz		1:1	%15	Ultrason ile ısıtma
72	Glikoz	Sitrik asit		1:1	%15	Ultrason ile ısıtma
73	Prolin	Sorbitol		1:1	%15	Ultrason ile ısıtma
74	Prolin	Maleik asit		1:1	%15	Ultrason ile ısıtma
75	Prolin	Sitrik asit		1:1	%15	Ultrason ile ısıtma
76	Prolin	Sitrik asit		2:1	%15	Ultrason ile ısıtma
77	Kolin klorür	Malik asit		1:1	-	Vakum altında buharlaştırma
78	Kolin klorür	Sitrik asit		1:1	-	Vakum altında buharlaştırma
79	Kolin klorür	Prolin	Malik asit	1:1:1	-	Vakum altında buharlaştırma
80	Kolin bitartarat	Glikoz		1:1	-	Vakum altında buharlaştırma
81	Kolin klorür	Ksilitol	Malik asit	1:1:1	-	Vakum altında buharlaştırma
82	Betain	Malik asit		1:1	-	Vakum altında buharlaştırma
83	Malik asit	Glikoz	Fruktoz	1:1:1	-	Vakum altında buharlaştırma
84	Betain	Glikoz	Prolin	1:1:1	-	Vakum altında buharlaştırma
85	Betain	Malik asit	Glikoz	1:1:1	-	Vakum altında buharlaştırma
86	Betain	Malik asit	Prolin	1:1:1	-	Vakum altında buharlaştırma
87	Betain	Maleik asit	Glikoz	1:1:1	-	Vakum altında buharlaştırma
88	Betain	Maleik asit	Prolin	1:1:1	-	Vakum altında buharlaştırma

Tablo 2.1 Doğal derin ötektik çözücülerin bileşenleri ve hazırlama yöntemleri (devamı)

#	Bileşen No 1	Bileşen No 2	Bileşen No 3	Mol Oranı	Su oranı (w/w)	Hazırlama Yöntemi
89	Betain	Sitrik asit		1:1	-	Vakum altında buharlaştırma
90	Malik asit	Sakkaroz		1:1	-	Vakum altında buharlaştırma
91	Malik asit	Sorbitol		1:1	-	Vakum altında buharlaştırma
92	Sitrik asit	Fruktoz		1:1	-	Vakum altında buharlaştırma
93	Sitrik asit	Sakkaroz		1:1	-	Vakum altında buharlaştırma
94	Sitrik asit	Maltoz		2:1	-	Vakum altında buharlaştırma
95	Prolin	Glikoz		1:1	-	Vakum altında buharlaştırma
96	Glikoz	Sitrik asit		1:1	-	Vakum altında buharlaştırma
97	Prolin	Sorbitol		1:1	-	Vakum altında buharlaştırma
98	Prolin	Maleik asit		1:1	-	Vakum altında buharlaştırma
99	Prolin	Sitrik asit		1:1	-	Vakum altında buharlaştırma
100	Prolin	Sitrik asit		2:1	-	Vakum altında buharlaştırma
101	Kolin klorür	Propilen glikol		1:1	%15	Ultrason ile ısıtma
102	Kolin klorür	Propilen glikol		1:2	%0	Ultrason ile ısıtma
103	Kolin klorür	Laktik asit		1:2	%0	Ultrason ile ısıtma
104	Kolin	Propilen glikol		1:1	%15	Ultrason ile ısıtma
105	Kolin	Propilen glikol		1:2	%15	Ultrason ile ısıtma
106	Kolin	Laktik asit		1:2	%15	Ultrason ile ısıtma
107	Betain	Laktik asit		1:2	%15	Ultrason ile ısıtma
108	Betain	Propilen glikol		1:1	%15	Ultrason ile ısıtma
109	Betain	Propilen glikol		1:2	%0	Ultrason ile ısıtma

2.2.2 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Stabilitelerinin Belirlenmesi

Bu tez çalışmasında öncelikle farklı yöntemler ile oluşturulan doğal derin ötektik çözücülerin (NADES'lerin) stabiliteleri belirlenmiştir. Bunun için çözeltiler hazırlandıktan sonra 5 gün boyunca oda sıcaklığında formları görsel olarak kontrol edilmiştir.

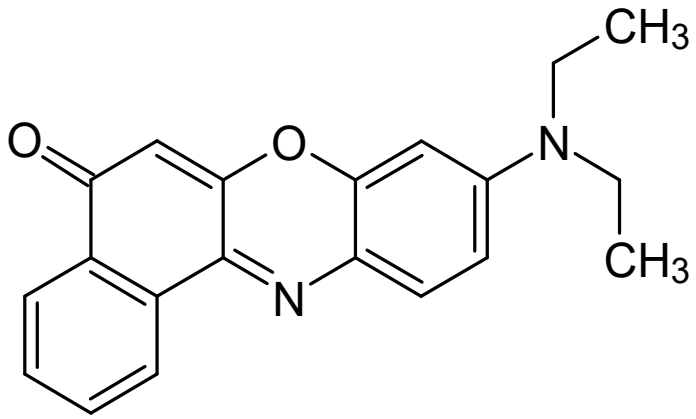
2.2.3 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin pH'larının Belirlenmesi

Doğal derin ötektik çözücülerin pH'larının belirlenmesinde Skulcova vd. (2018) yayınındaki yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. pH değeri ölçülecek her bir çözücü 0,5 mol/litre konsantrasyonda deiyonize su ile seyreltilmiş ve pH değerleri bir dijital pH metre (Metrohm, İsviçre) kullanılarak belirlenmiştir. Cam elektrot, ekipman için belirlenen pH 4,0 ve pH 7,0 tampon çözeltileri ile kalibre edilmiştir (Sekharan vd., 2021). pH değerleri, elektrot doğal derin ötektik çözeltilerine daldırılarak belirlenmiş, okuma sabit hale gelene kadar bir süre beklenmiş ve ardından okumalar not edilmiştir.

2.2.4 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Polaritelerinin Belirlenmesi

Doğal derin ötektik çözücülerin polaritelerinin belirlenmesinde Ogihara vd. (2004) yayınındaki yöntemden faydalanılmıştır. Bunun için solvatokromik bir bileşik olan nil kırmızısı (Şekil 2.2) (Acros Organics, Belçika) her bir doğal derin ötektik çözelti içinde 0,01 ile 0,1 M arasında olacak şekilde çözündürülmüş ve oluşan çözeltinin bir UV-vis spektrofotometre (Thermo Scientific Genesys 150, ABD) ile absorpsiyon spektrumları, oda sıcaklığında ölçülmüştür. Bu ölçümlerden maksimum dalga boyları (λmax) belirlenmiş ve (2.1) eşitliği yardımıyla molar geçiş enerjisi ENR'yi hesaplamak için kullanılmıştır. Polarite analizi üç tekrar halinde yapılmış ve ortalama değerler hesaplanmıştır. Bu formülde ENR kcal.mol^{-1} ve λmax nm cinsindendir.

$$\boldsymbol{ENR = \frac{28591}{\lambda max}} \qquad (2.1)$$



Şekil 2.2 Solvatokromik bir bileşik olan nil kırmızısı molekülü

2.2.5 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Yoğunluklarının Belirlenmesi

Doğal derin ötektik çözücülerin (NADES) yoğunluklarının belirlenmesinde Craveiro vd. (2016) yayınındaki yöntem kullanılmıştır. Yoğunluk değeri ölçülecek her bir NADES kalibre edilmiş 5 ml hacimde balon jojelere doldurulmuş ve 23°C'de ağırlık ölçümü yapılmıştır. (2.2) eşitliği yardımıyla yoğunlukları hesaplamış ve kayıt altına alınmıştır. Yoğunluk analizi üç tekrar halinde yapılmış ve ortalama değerler hesaplanmıştır. Yoğunluk ölçümlerine stabil olmayan ve çok yüksek viskozite gösteren çözücüler alınmamıştır.

$$\textbf{Yoğunlukk } (\boldsymbol{\rho s}) = \frac{\boldsymbol{ms}}{\boldsymbol{Vs}} \qquad (2.2)$$

ms= 5 ml çözücünün gram cinsinden kütlesi

Vs= 5 ml (tartımı yapılan balon jojenin nominal hacmi)

2.2.6 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Viskozitelerinin Belirlenmesi

Doğal derin ötektik çözücülerin viskoziteleri bir reometre (DVNext, Brookfield, Middleboro-ABD) ile çözeltinin beklenen viskozite değerine göre SC4-21 ve SC4-29 olmak üzere iki faklı tip spindle kullanılarak 20°C'de ölçülmüştür (Sekharan vd., 2021).



Şekil 2.3 Yüksek viskoziteli doğal derin ötektik çözücülerin viskozite ölçüm düzeneği

Çalışmalar süresince stabilitelerini koruyan %15 su içerikli doğal derin ötektik çözücülerin ve viskoziteleri oda sıcaklığında cihazın ölçüm aralığının (maksimum 1.000.000 cP) dışında kalan çözeltilerden yalnızca bir tanesinin (99 numaralı NADES) viskozite ölçümü 80°C'de alınmıştır (Şekil 2.3).

2.2.7 Farklı Fenolik Bileşiklerin Doğal Derin Ötektik Çözücülerde Çözünürlüklerinin Belirlenmesi

Farklı fenolik bileşiklerin doğal derin ötektik çözücülerde çözünürlüklerinin belirlenmesi amacıyla stabil ve viskozitesi uygun seviyede olan 44 çözücü 4 farklı yapıdaki fenolik bileşik ile doygun hale getirilip doygunluk konsantrasyonları ölçülmüştür. Bu amaçla Dai vd. (2013a) yayınındaki yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Doğal derin ötektik çözücüler, 10 ml'lik santrifüj tüplerinde test edilecek bileşikler ile doyurulması amacıyla, 40°C'de 1 saat boyunca ultrasonik banyoda (Bandelin GmbH, DK1028 P, Berlin, Almanya) %100 genlikte tutulmuş ardından çözeltileri içeren tüpler 20°C'de 7500 rpm'de 10 dakika santrifüj (Heraus/Thermo Scientific, ABD) edilmiştir. Santrifüj tüplerinin üst fazları 20/80 deiyonize su/etanol çözeltisi ile 10 kat seyreltilmiştir. Seyreltme işleminin ardından ikinci bir santrifüj işlemi uygulanmış ve çözeltilerin üst fazları şırınga ucu filtrelerden süzülerek 2 mL viallere doldurulmuştur. Rutin için 360 nm, kersetin için 370 nm, sinnamik asit için 272 nm, vanilin için 280 nm dalga boyunda Foto Diyot Dizisi (PDA) dedektörü ile donatılmış bir yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) (Waters-Milford/ABD) cihazı ile analiz edilmiştir. HPLC sisteminde mobil faz A %0,1 formik asit içeren deiyonize su ve mobil faz B %0,1 formik asit içeren asetonitril Tablo 2.2'de verilen gradyan akış ile kullanılmıştır.

Tablo 2.2 HPLC sisteminde kullanılan akış gradyanı

Süre (dk)	Akış (mL/dk)	% Mobil Faz A	% Mobil Faz B
0,0	0,300	90,0	10,0
1,0	0,300	90,0	10,0
10,0	0,300	40,0	60,0
11,0	0,300	90,0	10,0
15,0	0,300	90,0	10,0

2.3 Ham Propolisin Kalite Kontrol Analizleri

Ekstraksiyon optimizasyonu çalışmalarında kullanılan homojenize halde öğütülmüş ham propolis materyali öncelikle tüm kalite parametreleri açısından ISO/DIS 24381 arı propolisinin-teknik özellikleri dokümanında yer alan analitik metotlara göre analiz edilmiş ve aynı dokümanda var olan limitlere göre uygunluğu kontrol edilmiştir (Uluslararası Standardizasyon Örgütü, 2023).

2.3.1 Propolis Örneğinin Balzam Miktarının Tayini Yöntemi

Propolis numunelerinin balzam miktarı tayininde ISO/DIS 24381 arı propolisinin-teknik özellikleri dokümanında yer alan yöntem kullanılmıştır. Bu amaçla 1 g propolis numunesi (m_1) 100 mL'lik bir behere tartılmış ve 30 mL %80 etanol ile 50°C'de, 3 saat boyunca ışıktan korunarak çalkalanmıştır. Ardından elde edilen karışım kantitatif filtre kağıdından süzülmüş ve bu işlem filtredeki kalıntı ile iki kez daha tekrarlanarak tüm ekstraktları 100 ml'lik volümetrik balon jojede birleştirilmiş ve %80 etanol ile hacme tamamlanmıştır. Bu ekstraksiyon işlemi üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve kurtulmuş ekstraktın değerlendirilmesi için, sabit tartıma getirilmiş bir saat camına (m_2), her bir ekstraksiyon çözeltisinden 2 mL (3 x 2) mL eklenmiştir. Ardından 105 °C'ye ayarlanmış bir etüvde 90 dakika boyunca sabit tartıma (m_3) gelinceye kadar kurutulmuştur (Uluslararası Standardizasyon Örgütü, 2023). Numunedeki balzam içeriği (kuru madde olarak), kütle yüzdesi cinsinden 2.3'te verilen denkleme dayalı olarak hesaplanmış ve kayıt altına alınmıştır.

$$\textbf{Balsam}\ (\%) = \frac{\boldsymbol{m_3 - m_2}}{\boldsymbol{m_1}} \times \frac{\mathbf{50}}{\mathbf{3}} \times \mathbf{100} \qquad (2.3)$$

Bu formülde yer alan, (m_1) propolis örneğinin g cinsinden ortalama kütlesidir, (m_2) saat camının g cinsinden kütlesidir, (m_3) kuru ekstraktı içeren saat camının g cinsinden kütlesidir. (50/3) ise seyreltme faktörüdür.

2.3.2 Propolis Örneğinin Balmumu Miktarının Tayini Yöntemi

Propolis numunelerinin balmumu miktarı tayininde ISO/DIS 24381 arı propolisinin-teknik özellikleri dokümanında yer alan yöntem kullanılmıştır. Bu amaçla 2 g propolis numunesi (w_1) selüloz kartuş içine tartılmış ve soxhlet aparatında 6 saat boyunca petrol eteri ile işlem öncesinde sabit tartıma getirilmiş bir

balona (w_2) ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ekstrakttaki petrol eteri döner buharlaştırıcıda (50 °C'de) vakum altında uçurulmuştur. Balonda kalan kısım bir desikatörde sabit tartıma gelene kadar (w_3) soğumaya bırakılmıştır. Numunedeki balmumu içeriği, kütle yüzdesi cinsinden 2.4'te verilen denkleme dayalı olarak hesaplamış ve kayıt altına alınmıştır (Uluslararası Standardizasyon Örgütü, 2023).

$$\textbf{Balmumu}\ (\%) = \frac{\boldsymbol{w_3 - w_2}}{\boldsymbol{w_1}} \times \mathbf{100} \tag{2.4}$$

Bu formülde yer alan, (w_1) propolis örneğinin g cinsinden ortalama kütlesidir, (w_2) sabit tartıma getirilen boş balonun g cinsinden kütlesidir, (w_3) uçurma işlemi sonunda sabit tartıma getirilen ekstraktı içeren balonun g cinsinden kütlesidir.

2.3.3 Propolis Örneğinin Kül Miktarının Tayini Yöntemi

Propolis numunelerinin kül miktarı tayininde ISO/DIS 24381 arı propolisinin-teknik özellikleri dokümanında yer alan yöntem kullanılmıştır. Bu amaçla 2 g propolis numunesi (w_5) önceden sabit tartıma getirilmiş porselen krozeye (w_4) tartılmış ve porselen kroze ile birlikte 300 °C'deki kül fırınında dumansız hale gelinceye kadar yakılmış ardından 3 saat boyunca 600 °C'de kül fırınında kül elde edilene kadar yakılmıştır. Küllenmiş numuneyi içeren desikatörde sabit tartıma gelinceye kadar soğutulan kroze tartılmış (w_6) ve bu değerler numunedeki kül içeriğini, kütle yüzdesi cinsinden 2.5'te verilen denkleme dayalı olarak hesaplamak için kullanılmış ve değerleri kayıt altına alınmıştır. Bu yakma işlemi üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve ortalama değerler hesaplanmıştır (Uluslararası Standardizasyon Örgütü, 2023).

$$\textbf{Kül içeriği}\ (\%) = \frac{\boldsymbol{w_6 - w_4}}{\boldsymbol{w_5}} \times \mathbf{100} \tag{2.5}$$

Bu formülde yer alan, (w_4) porselen krozenin g cinsinden kütlesidir, (w_5) propolis örneğinin g cinsinden kütlesidir, (w_6) yakma işlemi sonrası kül içeren porselen krozenin g cinsinden kütlesidir.

2.3.4 Propolis Örneğinin Nem ve Uçucu Bileşik Miktarının Tayini Yöntemi

Propolis numunelerinin nem ve uçucu bileşik miktarı tayininde ISO/DIS 24381 arı propolisinin-teknik özellikleri dokümanında yer alan yöntem kullanılmıştır. Bu amaçla 2 g propolis numunesi (m_i) sabit tartıma getirilmiş cam krozeye (m_c)

tartılmış ve cam kroze ile birlikte 105 °C'de etüvde sabit tartıma gelinceye kadar tutulmuştur. Sabit tartıma gelince kroze ile birlikte tartımı (m_f) alınmıştır (Uluslararası Standardizasyon Örgütü, 2023). Numunedeki nem ve uçucu bileşik miktarı, kütle yüzdesi cinsinden 2.6'da verilen denkleme dayalı olarak hesaplamış ve kayıt altına alınmıştır. Bu işlem üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve ortalama olarak raporlanmıştır.

$$\textbf{Nem ve uçucu bileşik miktarı}\ (\%) = \mathbf{100} - \frac{\boldsymbol{m_f - m_c}}{\boldsymbol{m_i}} \times \mathbf{100} \qquad (2.6)$$

Bu formülde yer alan, (m_i) propolis örneğinin g cinsinden başlangıç ortalama kütlesidir, (m_c) boş krozenin g cinsinden kütlesidir, (m_f) kurutma işleminden sonra ulaşılan sabit tartım değeridir.

2.3.5 Propolis Örneğinin Toplam Fenolik İçeriğinin Tayini Yöntemi

Bu çalışmada propolis numunelerinin toplam fenolik içeriğinin ölçülmesi amacıyla Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, doğal numunelerdeki toplam fenolik içeriğin ölçümü için dolaylı bir yöntemdir. Fenolik bileşiklere özgü olmayıp tüm indirgeyici bileşikler için geçerli olsa da propolis ekstraktlarında kullanıldığında, amino asitler ve indirgeyici şekerler gibi diğer indirgeyici girişimlerin varlığının minimum olması nedeniyle fenolik içeriğin temsili bir miktarını belirlemek için hızlı ve güvenilir bir prosedürdür (Büyüktuncel, 2013; Okan vd., 2013; Uluslararası Standardizasyon Örgütü, 2023). Propolis örneğinin toplam fenolik içeriği, kalibrasyon standardı gallik asit kullanılarak ham propolisin yüzdesi cinsinden ifade edilmiştir.

Propolis numunesi **2.3.1 propolis örneğinin balzam miktarının tayini** yönteminde tarif edildiği şekilde ve üç tekrarlı olarak ekstrakte edilmiştir. Ardından her bir ekstrakttan 0,5 mL alınarak toplam 1,5 mL propolis ekstrakt çözeltisi elde edilmiş, bu çözelti 10 mL hacimli balon jojede %80 etanol ile hacme tamamlanmıştır. Elde edilen bu çalışma çözeltisi toplam fenolik içerik tayini için kullanılmıştır. Bir santrifüj tüpünde, çalışma çözeltisinden 0,2 mL, 1,5 mL su ve 0,4 mL Folin-Ciocalteu reaktifi ile karıştırıldıktan sonra bu karışıma 0,6 mL %20 sodyum karbonat çözeltisi (~pH 12,0) eklenmiştir ve elde edilen çözelti 2,3 mL deiyonize su eklenerek 5 ml hacme tamamlanmıştır. Çalışma çözeltisi yerine 0,2 mL %80'lik etanol kullanarak numunelerle aynı koşullarda kör numune de

hazırlanmıştır. Bu işlemlerin hemen sonrasında bu karışım oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika bekletilmiş ardından 760 nm'de absorbansı bir UV-Vis spektrofotmetre (Thermo Scientific Genesys 150- ABD) kullanılarak ölçülmüştür.

Kantifikasyon için beş noktada 1,0 µg/mL; 2,0 µg/mL; 4,0 µg/mL; 6,0 µg/mL; 8,0 µg/mL konsantrasyonlarda numunelerle aynı prosedür uygulanarak bir gallik asit kalibrasyon eğrisi hazırlanmış ve toplam fenolik içeriğini (gallik asit cinsinden) hesaplayacak denklemi elde etmek için doğrusal regresyon uygulanmıştır (r^2>0,990). Gallik asit cinsinden toplam fenolik içerik miktarı 2.7'de verilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\textbf{Toplam fenolik içerik miktarı}\ (\%) = \frac{\boldsymbol{c}}{\boldsymbol{M \times S_V \times 40}} \times \mathbf{100} \qquad (2.7)$$

Bu formülde yer alan, (c) kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanan numune çözeltisindeki gallik asit cinsinden toplam fenolik içeriğin µg/mL cinsinden konsantrasyonudur, (M) ekstraksiyonda kullanılan ham propolisin (üç tekrar için) g cinsinden ortalama kütlesidir, (S_V), çalışma çözeltisini hazırlamak için kullanılan örnek ekstraktının hacmidir (1,5 mL).

2.3.6 Propolis Örneğinin Toplam Flavonoid İçeriğinin Tayini Yöntemi

Bu çalışmada propolis numunelerinin toplam flavonoid içeriğinin ölçülmesi amacıyla alüminyum klorür tabanlı yöntem kullanılmıştır. Propolis örneğinin toplam flavonoid içeriği, kalibrasyon standardı kersetin kullanılarak ham propolisin yüzdesi cinsinden ifade edilmiştir.

Propolis numunesi **2.3.1 propolis örneğinin balzam miktarının tayini** yönteminde tarif edildiği şekilde ve üç tekrarlı olarak ekstrakte edilmiştir. Ardından her bir ekstrakttan 0,5 mL alınarak toplam 1,5 mL propolis ekstrakt çözeltisi elde edilmiş, bu çözelti 10 mL hacimli balon jojede %80 etanol ile hacme tamamlanmıştır. Elde edilen bu çalışma çözeltisi toplam flavonoid içerik tayini için kullanılmıştır. Bir santrifüj tüpünde, çalışma çözeltisinden 0,2 mL, 3 mL metanol ve 0,1 mL alüminyum klorür ile karıştırıldıktan sonra elde edilen çözelti 1,7 mL metanol eklenerek 5 mL hacme tamamlanmıştır. Çalışma çözeltisi yerine 0,2 mL %80'lik etanol kullanarak numunelerle aynı koşullarda kör numune de hazırlanmıştır. Bu işlemlerin hemen sonrasında bu karışım oda sıcaklığında ve

karanlıkta 30 dakika bekletilmiş ardından 425 nm'de absorbansı bir UV-Vis spektrofotmetre (Thermo Scientific Genesys 150- ABD) kullanılarak ölçülmüştür.

Kantifikasyon için beş noktada 1,0 µg/mL; 3,0 µg/mL; 5,0 µg/mL; 7,0 µg/mL; 9,0 µg/mL konsantrasyonlarda numunelerle aynı prosedür uygulanarak bir kersetin kalibrasyon eğrisi hazırlanmış ve toplam flavonoid içeriğini (kersetin cinsinden) hesaplayacak denklemi elde etmek için doğrusal regresyon uygulanmıştır (r^2>0,990). Kersetin cinsinden toplam flavonoid içerik miktarı 2.8'de verilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\textbf{Toplam flavonoid içerik miktarı}\ (\%) = \frac{\boldsymbol{c_s}}{\boldsymbol{m_1 \times S_V \times 40}} \times \mathbf{100} \qquad (2.8)$$

Bu formülde yer alan, (c_s) kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanan numune çözeltisindeki kersetin cinsinden toplam flavonoid içeriğin µg/mL cinsinden konsantrasyonudur, (m_1) ekstraksiyonda kullanılan ham propolisin (üç tekrar için) g cinsinden ortalama kütlesidir, (S_V), çalışma çözeltisini hazırlamak için kullanılan örnek ekstraktının hacmidir (1,5 mL).

2.3.7 Propolis Örneğinin Toplam Antioksidan Kapasite Tayini Yöntemi

Antioksidan kapasite tayini yönteminin prensibi, DPPH- radikali ile elektron veren bir madde arasındaki redoks reaksiyonuna dayanmaktadır. DPPH- eşleşmemiş bir elektrona sahip olduğu durumda mor renktedir. Propolis polifenolleri elektron vericidir, elektron alırken, DPPH- radikali, artan propolis polifenol konsantrasyonları ile menekşeden çok açık pembeye dönüşür. Renkteki azalma 517 nm'de izlenerek, bir DPPH-renk değişimi eğrisi oluşturulmuş ve doğrusal regresyon kullanılarak EC50 (serbest radikalin %50'sini ortadan kaldıran konsantrasyon) hesaplanmıştır.

Propolis numunesi **2.3.1 propolis örneğinin balzam miktarının tayini** yönteminde tarif edildiği şekilde ve üç tekrarlı olarak ekstrakte edilmiştir. Her bir ekstrakt çözeltisinden aynı hacimde birleştirerek bir çalışma çözeltisi hazırlanmış ve 100 kat seyreltilmiştir. Bu işlem için her bir ekstrakt çözeltisinden 0,5 mL alınmış ve %80 etanol ile 150 mL'ye seyreltilmiştir.

0'dan 8'e kadar numaralandırılmış dokuz test tüpü hazırlanmış ve Tablo 2.3'e göre her tüpe %80 etanol ve seyreltilmiş propolis çözeltisi eklenmiştir. "Sıfır" numaralı tüp kontrol amaçlı, propolis içermeyen %100 60 µM DPPH çözeltisi ile

doldurulmuştur. İlk tüpe 60 µM DPPH çözeltisinin tabloda beliritlen hacmi eklenmiş ve kronometre başlatılmıştır.

Tablo 2.3 Nihai propolis konsantrasyonu (µg/mL) ve her bir tüpteki hacimler (µL)

Tüp no	Propolis konsantrasyonu	%80 etanol	Propolis çözeltisi	DPPH çalışma çözeltisi (60µM)
0	0	1000	0	1000
1	2	960	40	1000
2	4	920	80	1000
3	6	880	120	1000
4	8	840	160	1000
5	10	800	200	1000
6	12	760	240	1000
7	14	720	280	1000
8	16	680	320	1000

Tablo 2.3'e göre her 1 dakikada bir sırayla diğer tüplere 60 µM DPPH çözeltisi eklenmiştir. Tüm tüplere çözeltiler eklendikten sonra karanlık bir yere konulmuş ve ara ara çalkalanmıştır. İlk tüpe DPPH eklenmesinden 30 dakika sonra spektrofotometrede 517 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Bu değerlerden bir eğri çizilerek ve doğrusal regresyon kullanılarak EC50 (µg/mL cinsinden) hesaplanmıştır. Eğrinin oluşturulması için her bir tüpte kalan DPPH yüzdesi 2.9'da yer alan formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\textbf{Kalan DPPH yüzdesi}, (\%) = \frac{\boldsymbol{A_1}}{\boldsymbol{A_0}} \times \mathbf{100} \qquad (2.9)$$

Bu formülde yer alan, (A_0) 0 numaralı propolis içermeyen tüpte kaydedilen absorbans değeridir. (A_1) bahsi geçen tüp numarasının absorbansıdır.

2.4 Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyon Optimizasyonu

Propolisten biyoaktif bileşenlerin doğal derin ötektik çözücüler ile ultrasonik destekli ekstraksiyonu için en uygun koşullar, yanıt yüzey metodolojisi (YYM) kullanılarak belirlenmiştir (α = 1,682). Bu amaçla optimizasyon biri bağımlı değişken olarak toplam fenolik içerik değeri (mg GAE/L) diğeri de toplam

flavonoid içeriği (mg KE/L) kullanılarak toplamda iki sefer gerçekleştirilmiştir. Faktörler ve yanıtlar arasındaki ilişkinin ikinci dereceden bir denklemle açıklanacağı varsayılarak "Merkezi Kompozit Tasarım" seçilmiştir.

Değişkenlerin en verimli seviyelerini tespit etmek için üç faktörlü ve beş seviyeli merkezi kompozit tasarım kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan merkezi kompozit tasarım üç veri noktası seti içermektedir: iki seviyeli faktöriyel tasarımdan noktalar, eksenel veya yıldız noktaları ve merkez noktaları. Üç bağımsız değişken sıcaklık (°C), zaman (dk) ve ultrason genliği (%) olarak seçilmiş ve her biri -α, -1, 0, +1 ve +α olarak kodlanan beş seviyede test edilmiştir. Tasarım gerekliliklerini karşılamak için α değeri 1.68179 olarak seçilmiştir. Seçilen bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve gerçek seviyeleri Tablo 2.4'te verilmiştir. Merkezi bileşik tasarım matrisi, saf hata kareler toplamını tahmin etmek için toplam 20 deneye ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Bu deneyler 8 küp noktası, 6 merkez noktası ve 6 eksenel nokta içermektedir. 500 µg ham propolis, her bir NADES'ten 5 mL ile ayrı ayrı karıştırılmış ve tasarım noktalarına göre ekstrakte edilmiştir.

Tablo 2.4 Bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve gerçek seviyeleri

Bağımsız Değişkenler	Kodlanmış Sembol	Kodlanmış Seviyeler				
		-1,68179	-1	0	1	1,68179
Süre (dk)	X_1	20	40	80	110	135
Sıcaklık (°C)	X_2	20	30	55	70	80
Ultrason Genliği (%)	X_3	0	20	50	80	100

Her bir parametrenin ana etkilerinin ve etkileşimlerinin önemini belirlemek için ANOVA kullanılmıştır. İstatistiksel sonuçlar, p-değeri <0.05 olduğunda anlamlı kabul edilmiştir. Küp tasarımı, merkez ve eksenel noktalar Tablo 2.5'te belirtilmiştir. Bu çalışmada, deneyleri tasarlamak, deneysel verileri analiz etmek ve yanıt yüzeyi grafikleri oluşturmak için Minitab V 21.1.1 istatistik yazılımı (2022) kullanılmıştır (Minitab LLC, 2022).

Tablo 2.5 Küp tasarımı, merkez ve eksenel noktalar

No	Bloklar	Süre (dk)	Sıcaklık (°C)	Ultrason Genliği (%)
1	1	80	55	50
2	1	20	30	80
3	1	20	30	20
4	1	40	70	20

Tablo 2.5 Küp tasarımı, merkez ve eksenel noktalar (devamı)

No	Bloklar	Süre (dk)	Sıcaklık (°C)	Ultrason Genliği (%)
5	1	80	55	50
6	1	40	70	80
7	1	110	70	20
8	1	80	55	50
9	1	80	30	80
10	1	80	55	50
11	1	110	70	80
12	1	80	30	20
13	2	80	55	100
14	2	20	55	50
15	2	80	80	50
16	2	80	55	0
17	2	80	55	50
18	2	50	20	50
19	2	135	55	50
20	2	80	55	50

Sonuç olarak, üç bağımsız değişken içeren sistemler için Eşitlik (2.10) ile temsil edilebilen ampirik bir model elde edilmiştir:

$$y = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 C + \beta_{11} A^2 + \beta_{22} B^2 + \beta_{33} C^2 + \beta_{12} AB + \beta_{13} AC + \beta_{23} BC \quad (2.10)$$

Denklem, ölçülen yanıt (y) ve kodlanan bağımsız değişkenlerle (A, B ve C) ilişkilendirilen kesişim terimi (β0) ve doğrusal (β1, β2, β3), ikinci dereceden (β11, β22, β33) ve etkileşim (β12, β13, β23) katsayıları gibi çeşitli terimler içermektedir. Regresyon modelinin performansı üç ölçüt kullanılarak değerlendirilmiştir: belirleme katsayısı (R^2), öngörülen belirleme katsayısı (Pred. R^2) ve düzeltilmiş belirleme katsayısı (Adj. R^2). Modelin istatistiksel anlamlılığı Fischer'in F-testi kullanılarak belirlenmiştir. Bağımlı değişken ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi görselleştirmek için üç boyutlu grafikler ve bunlara karşılık gelen kontur grafikleri oluşturulmuştur (Ghosh vd. 2012).

2.5 Optimum Koşullarda Hazırlanan Propolis Ekstraktlarının Biyoaktif Özelliklerinin Belirlenmesi

Yanıt yüzey metodolojisi kullanılarak tespit edilen optimum koşullarda, daha önce tespit edilen 4 farklı NADES kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyonlardan elde edilen propolis ekstraktlarının toplam fenolik, toplam flavonoid içerikleri, antioksidan (radikal süpürme) kapasiteleri ile fenolik profilleri belirlenmiştir.

2.5.1 Optimum Koşullarda Hazırlanan Propolis Ekstraktlarının Toplam Fenolik, Toplam Flavonoid İçerik ve Antioksidan Kapasiteleri Tayini Yöntemleri

Yanıt yüzey metodolojisi deneysel tasarımı kullanılarak belirlenen optimum koşullara göre ekstraksiyonun ardından, propolis sıvı ekstraktları %80 etanol çözeltisi ile 10 kat seyreltilmiştir. Elde edilen çözeltiler toplam fenolik içerik ve toplam flavonoid içerik analizi için kullanılmıştır. Ekstrakt yerine seyreltilmiş ilgili çözücüyü içeren bir kör numune de her analiz için ayrıca analiz edilmiştir. Toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri ve antioksidan kapasite analizleri sırasıyla 2.3.5, 2.3.6 ve 2.3.7 bölümlerinde açıklanan prosedürlere göre yapılmıştır. Ancak toplam fenolik ve toplam flavonoid içerik sonuçları propolis sıvı ekstraktlarında sırasıyla mg GAE/L ve mg KE/L olarak verilmiştir. Her iki analiz için de absorbans seviyeleri 1,000'dan yüksek olan numuneler, absorbansın kabul edilebilir aralıkta olması için seyreltilmiştir.

2.5.2 Optimum Koşullarda Hazırlanan Propolis Ekstraktlarının Fenolik Profilinin Tayini Yöntemi

Propolis sıvı ekstraktlarının fenolik profil analizi için, yanıt yüzeyi metodolojisi kullanılarak belirlenen optimum koşullarda, 3 g propolis örneğine seçilen NADES'lerden ve geleneksel çözücüler olarak ultra saf su ve %80 etanol'den 30 mL eklenerek ekstrakte edilmiştir. Fenolik profil analizi için Güzelmeriç vd. (2023) tarafından yayınlanan LC-MS/MS yöntemi kullanılmıştır. Kullanılan analitik sistem bir UPLC pompası, bir kolon ısıtıcısı, bir otomatik örnekleyici ve ESI iyon kaynağı ile donatılmış bir tandem kütle spektrometresinden oluşmaktadır. Analizler için her numuneden 5 µL Waters® marka bir CORTECS T3 1,6 µm, 2,1 × 150 mm, C18 kolona enjekte edilmiştir. Mobil faz olarak A hattında %0,01 asetik asit içeren ultra saf su ve B hattında %0,01 asetik asit içeren asetonitril/metanol (80:20, v/v) karışımı Tablo 2.6'da verilen mobil faz akış gradyeni ile kullanılmıştır. Kolon ısıtıcısı ve otomatik örnekleyici tepsisi analiz için sırasıyla 30°C ve 10°C'de tutulmuştur.

Her bir bileşiği hedeflemek ve kantitatif olarak analiz etmek için kullanılan çoklu reaksiyon izleme (MRM) geçişleri ve ilgili alıkonma süreleri, MS-giriş ve çarpışma voltajları Tablo A3'te listelenmiştir.

Tablo 2.6 Fenolik profili analizi için kullanılan UPLC gradyan değerleri

Süre	M. Faz A	M. Faz B	Akış
00:00	%98,0	%2,0	0,25 mL/dk
01:30	%98,0	%2,0	0,25 mL/dk
35:00	%45,0	%55,0	0,25 mL/dk
37:00	%5,0	%95,0	0,25 mL/dk
37:01	%98,0	%2,0	0,25 mL/dk
40:00	%98,0	%2,0	0,25 mL/dk

ESI-MS/MS sistemi için aşağıdaki parametreler ayarlanmıştır: iyon kaynağı ve çözücünün uzaklaştırma sıcaklıkları sırasıyla 150°C ve 450°C olarak ayarlanırken kapiler voltaj 2 kV olarak ayarlanmıştır. Çözücü uzaklaştırılma ve akış yönüne ters gaz akışları sırasıyla 850 L/sa ve 50 L/sa olarak ayarlanmıştır. Optimum çoklu reaksiyon izleme (MRM) geçiş parametreleri için öncü ve fragman iyonları, MS-giriş ve çarpışma voltajları ve alıkonma süreleri, her bir fenolik bileşiğin standart çözeltiler olarak LC-MS/MS sistemine ayrı ayrı enjekte edilmesiyle belirlenmiştir. Doğrusal kalibrasyon eğrileri, bileşiklerin miktarını belirlemek için her bir fenolik bileşiğin 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0 ve 2,0 mg/L konsantrasyonlarında çözelti içinde karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. LC-MS/MS verileri Waters® Mass-Lynx yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.

2.6 Optimum Koşullarda Hazırlanan Propolis Ekstraktlarının Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada yanıt yüzey metodolojisi kullanılarak tespit edilen optimum koşullarda daha önce tespit edilen 4 farklı NADES kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyonlardan elde edilen propolis ekstraktlarının minimum inhibisyon ve bakterisidal/fungisidal konsantrasyonları tespit edilmiş ve disk difüzyon analizleri gerçekleştirilmiştir.

2.6.1 Optimum Koşullarda Hazırlanan Propolis Ekstraktlarının Minimum İnhibisyon ve Bakterisidal/Fungisidal Konsantrasyonları

Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK), in vitro koşullar altında tanımlanan, bir mikroorganizmanın belirli bir süre içinde gözle görülen büyümesini engelleyen

bir antimikrobiyal ajanın mg/L veya % cinsinden en düşük konsantrasyonunu ifade eder. Minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK), başlangıçtaki canlı bakterilerin azalmasını sağlayan en düşük konsantrasyondur. Yani başlangıç bakteri konsantrasyonunu %99,9'unu azaltan konsantrasyondur (Andrews, 2001; Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021). Funguslar için benzer konsantrasyon minimum fungisidal konsantrasyon (MFK) olarak adlandırılır.

Minimum inhibisyon konsantrasyonu ve minimum bakterisidal/fungisidal konsantrasyonunun tespiti için broth mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Broth dilüsyonu, kademeli olarak (genellikle geometrik olarak) artan konsantrasyonlarda antimikrobiyal solüsyon ve aynı hacimlerde broth içeren kapların bilinen sayıda bakteri ile inoküle edildiği bir tekniktir. Broth mikrodilüsyon, broth dilüsyon testinin kuyu başına 500 µL'den daha düşük kapasiteli mikrodilüsyon plakalarındaki performansını ifade eder. Katyon destekli (magnezyum klorür ve kalsiyum klorür içeren) Mueller-Hinton broth, broth dilüsyon yöntemleri için uluslararası alanda en yaygın kullanılan besiyeridir. Çabuk üremeyen patojenlerin çoğunun iyi üremesine izin verir ve genellikle antagonist oranı düşüktür. CLSI standardının (CLSI, 2015) gerekliliklerini karşılayan Mueller-Hinton broth referans besiyeri olarak kabul edilir. Küf suşları için ise Sabouroud Broth en çok tercih edilen besiyeridir.

İnokulumun standardizasyonu, doğru ve tekrarlanabilir duyarlılık testleri için hayati önem taşımaktadır. İnokulum, bir broth besiyerinin seyreltilmesi veya bir agar besiyerinden bir gecelik kolonilerin broth içinde emülsifiye edilmesiyle hazırlanabilir. Her iki yöntemde de, atipik bir varyantın seçilmesinden kaçınmak için agar üzerindeki saf kültürden dört veya beş koloni seçilir (CLSI, 2015).

Bu çalışmada broth kültür yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde bakteriler için bir öze ile 3-5 adet koloni alınmış ve alınan koloniler Mueller-Hinton broth'a aktarılmıştır. Broth, üreme miktarı 0,5 McFarland standardına eşit veya daha yüksek bir bulanıklığa ulaşana kadar 35°C'de inkübe edilmiştir. Kültür, McFarland 0,5 standardına eşdeğer bir bulanıklık vermesi için steril broth ile ayarlanmıştır. Bu ayarlama 625 nm dalga boyuna ayarlanmış bir spektrofotometrede 1 cm'lik bir spektrofotometre küveti kullanılarak absorbansın 0,08-0,10 civarına fotometrik olarak ayarlanması ile yapılmıştır. Bu şekilde hazırlanan inokulum, 5×10^5 kob/mL

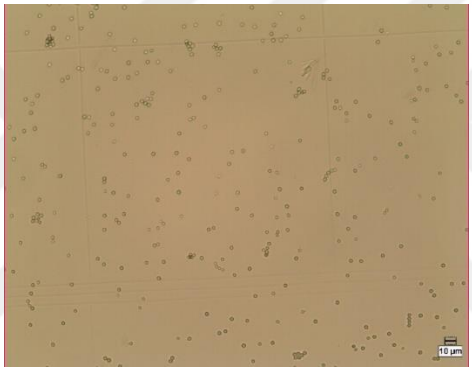
nihai organizma yoğunluğunu verecek şekilde broth ile seyreltilmiştir (CLSI, 2015).

Küf spor süspansiyonlarının hazırlanması için 5 günlük katı besiyerindeki taze kolonilerden Sabouroud Broth içerisine bir miktar koloni alınmış ve çalkalanmıştır. Thoma lamı üzerinde sayımı yapılarak (Şekil 2.4) yoğunluğu 1×10^4 kob/mL olarak ayarlanmıştır. Thoma lamındaki sayım sonucu 2.10'da verilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$\textbf{Küf sporu yoğunluğu, (kob/mL)} = \boldsymbol{A} \times \boldsymbol{SF} \times \mathbf{10.000} \qquad (2.10)$$

A: 16 karede sayılan spor adedi

SF: Seyreltme faktörü

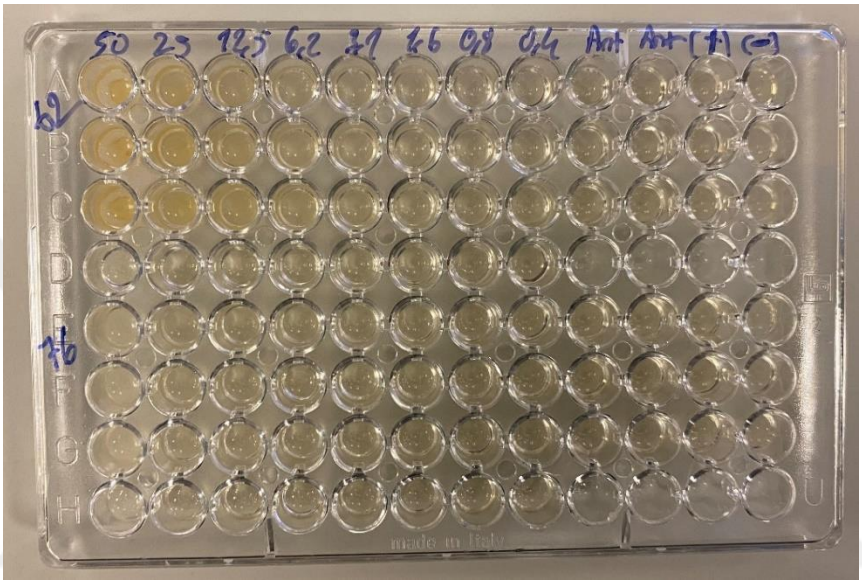


Şekil 2.4 Thoma lamı ile sayılan *Penicillium* sporlarının görüntüsü

Mikrodilüsyon yöntemi 96 kuyucuklu U tabanlı mikroplakalarda uygulanmış ve her bir numune 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Tüm kuyucuklara bakteriler için 100 µL katyon ayarlı Mueller Hinton Broth, küfler için 100 µL Sabouroud Broth ilave edilmiştir. Test için kullanılacak NADES ve geleneksel çözeltiler %50 (w/v) başlangıç konsantrasyonu olarak hazırlanmış ve ilk kuyucuğa 100 µL konulmuştur. İlk kuyucukta bulunan 200 µL'lik besiyeri-çözelti karışımının kuyucuk içinde pipetleme yapılarak homojen edilmesinden sonra 100 µL alınarak ikinci kuyucuğa aktarılmış ve bu şekildeki sırasıyla seyreltme işlemi ½ dilüsyonlar olacak şekilde 8. kuyucuğa kadar devam edilmiştir. En son kuyucuktan 100 µL dışarı atılarak tüm kuyucuklar aynı hacme getirilmiştir. 10. ve 11. kuyucuklara bakteriler için 10 µg/mL tetrasiklin çözeltisinden 10 µL, küfler içinse kuyucukta 2000 mg/kg'a denk gelecek potasyum sorbat eklenmiştir. 11. kuyucuk pozitif kontrol kuyucuğu ve 12. kuyucuk sterilite kuyucuğu (negatif kontrol) olarak kullanılmıştır. Çözeltiler için kuyucuklarda nihai başlangıç konsantrasyonu %25 olarak hesaplanmış ve ½

dilüsyonlarla sırasıyla %12,5, %6,3, %3,1, %1,6, %0,8, %0,4 (w/v) olacak şekilde ilave edilmiştir.

En son olarak sterilite kuyucuğu (negatif kontrol) hariç her bir kuyucuğa uygun aralıkta yoğunluğu ayarlanmış mikroorganizma içeren broth 1/20 seyreltildikten sonra 10 µL olarak eklenmiştir. Sulandırma sonrası 10 µL son hacmi 0.1 ml çözelti/broth karışımı içeren kuyucuğa inoküle edildiğinde her kuyucukta bakteri yoğunluğu 5 x 10^5 kob/mL olarak hesaplanmıştır.



Şekil 2.5 *A. niger* ile inoküle edilmiş NADES 62 ve NADES 76 ile hazırlanan propolis ekstraktlarının T0 görüntüsü

İnoküle edilmiş mikroplakaların, bir mikroplaka okuyucu spektrofotometre ile (ELx80, BioTek, Amerika Birleşik Devletleri) bakteriler için 630 nm'de küfler içinse 490 nm'de inkübasyon öncesi absorbansları okunmuş ve kaydedilmiştir.

Optimum koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda elde edilen propolis çözeltileri ile gerçekleştirilen MİK ve MBK/MFK tespiti amaçlı inokülasyonların ardından ilk okumaların yapıldığı mikroplakalardan biri (NADES 62, NADES 76) örnek olarak şekil 2.5'te verilmiştir.

Ardından inokule edilmiş mikroplakalar bakteriler için 35 °C'de 18±2 saat, küfler için için 25°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından, bakteriler için 630 nm'de, küfler için 490 nm'de son absorbansları ölçülmüştür. Süre sonunda görünür üremeyi tamamen inhibe eden (üreme görülmeyen) en düşük konsantrasyon minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) olarak belirlenmiştir.

Mikrodilüsyon yöntemi için; her kuyucuktaki büyüme miktarı, pozitif üreme kontrol kuyucuğundaki büyüme ile karşılaştırılmıştır. Bunun için mikroplaka okuyucu spektrofotometrede öncelikle mikroorganizma türüne göre 490 ya da 630 nm'de ilk okunan absorbans değeri (T0), 24 saat sonra (T24) okunan absorbans değerinden çıkarılmıştır. Pozitif kontrol kuyucuğunda okunan absorbans değeri %100'lük büyüme olarak belirlenmiştir. Üreme inhibisyon yüzdesi 2.11'de verilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$\textbf{İnhibisyon}, (\%) = \frac{\textbf{ABS(pozitif kontrol)} - \textbf{ABS (test)}}{\textbf{ABS(pozitif kontrol)}} \times \mathbf{100} \qquad (2.11)$$

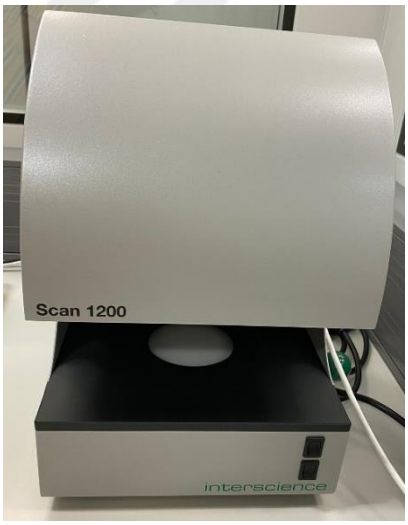
Pozitif kontrol ile kıyaslandığında %80 veya daha fazla azalmanın olduğu konsantrasyon MİK olarak belirlenmiştir. Büyüme görülmeyen, yani absorbans değerlerinde %99'dan fazla oranda azalmanın olduğu konsantrasyon ise MBK/MFK olarak belirlenmiştir.

2.6.2 Optimum Koşullarda Hazırlanan Propolis Ekstraktlarının Disk Difüzyon Analizleri

Disk difüzyon yöntemi, kâğıt disklere emdirilen antimikrobiyal ajanın, duyarlılığı araştırılacak mikroorganizmanın inoküle edildiği besiyerine difüze olması temeline dayanmaktadır. İnkübasyon sonucu oluşan zonlar duyarlılığı göstermektedir. Agar bazlı disk difüzyon yöntemi basitliği ve düşük maliyeti nedeniyle antimikrobiyal aktivite tespiti için uygun ve tercih edilen bir yöntemdir. İncelenecek antimikrobiyal ajanı çözelti halinde içeren disklerin kullanımına dayanır, belirli bir inkübasyon süresinin sonunda rezervuarın etrafındaki berrak bölgenin çapı (inhibisyon çapı) ölçülür. Genel olarak filtre kağıdı diskleri, yüzeye yerleştirilmiş paslanmaz çelik silindirler veya besiyerine açılmış delikler test edilecek çözeltilerin rezervuarı olarak kullanılabilir. Tek bir mikroorganizmaya karşı bir petride birden fazla konsantrasyon ya da farklı çözeltinin test edilmesine imkân vermesi ve küçük örnek hacimlerinin kullanılması bu metoda özel avantajlardır. İnhibisyon zonlarının büyüklüğü antimikrobiyal aktif test materyalinin buharlaşmasından, disk boyutundan, diske verilen bileşik miktarından, disk tarafından adsorpsiyondan, agar tipinden, agar-agar içeriğinden, pH'dan, agar hacminden ve kullanılan mikrobiyal suşlardan etkilenebilir (CLSI, 2015; EUCAST, 2023).

Bu çalışmada bakterilerde disk difüzyon analizi için Mueller-Hinton agar, küflerde disk difüzyon analizi için Sabouraud Dekstroz agar kullanılmıştır. Her iki agar da üreticinin ambalaj üzerinde belirttiği konsantrasyonda saf su için çözülmüş ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan agar 45-50 °C'ye soğutulduktan sonra steril bir ortamda, steril petri kaplarına besiyerinin kalınlığı 4 mm ± 0.5 mm olacak şekilde (yaklaşık 20mL) dökülmüştür. Bu petriler ilgili disk difüzyon analizi için kullanılana kadar (azami 5 gün) buzdolabında saklanmıştır.

Uygun yoğunluklarda süspansiyonları hazırlanan bakteri *Salmonella* spp. önceden hazırlanmış olan Mueller Hilton agara 100 µL yayılmış ve agarın absorbe etmesi için 15 dakika beklenmiştir. Küfler için Sabouroud agara hazırlanan küf süspansiyonlarından 50 µL yayılmıştır. Ardından çözeltilerin denenecek olan konsantrasyonları için (%50, %25 ve %12,5) agara 9 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Bakteriler için petrinin bir köşesi 10 mg Gentamisin içeren diskin konulması için kuyucuk açılmadan bırakılmıştır. Küfler içinse dördüncü köşeye 2.000 mg/kg konsantrasyonda potasyum sorbat eklenmesi amacıyla 9 mm çapında kuyucuk açılmıştır.



Şekil 2.6 Interscience marka Scan 1200 model koloni sayıcı

Hazırlanan çözeltilerden her bir kuyucuğa 100 µL eklenmiş ve bakteri inoküle edilen petriler 35,0 °C'de 18 saat, Küf inoküle edilen petriler ise 25,0 'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır ve süre sonunda oluşan inhibisyon zonları bir koloni sayıcı (Scan 1200, Interscience, Fransa) (Şekil 2.6) kullanılarak ölçülmüştür (CLSI, 2015).

2.7 Propolis Ekstraktı ile Hazırlanan Keklerin Hazırlanması ve İn Situ Antifungal Etkinin İncelenmesi

Optimum koşullarda elde edilen propolis ekstraktının in-situ antifungal aktivitesinin ölçümü için model gıda olarak vanilyalı sade kek seçilmiştir. Kekler, homojen çoklu deneme yapılmasının kolaylığı ve petri kabına uygun şekilde olması sebebiyle muffin tipinde hazırlanmıştır.

Muffinler Soumya vd. (2016) tarafından tarif edilen yönteme göre hazırlanmıştır. 1 kg ağırlığındaki kek hamurunda 312 g buğday unu (%31,2), 206 g yumurta (%20,6), 179 g toz şeker (%17,9), 156 g ayçiçek yağı (%15,6), 128 g tam yağlı süt (%12,8), 14 g kabartma tozu (%1,4) ve 5 gram vanilya (%0,5) kullanılmıştır. Hazırlanan kek hamurunun görünümü Şekil 2.7'de verilmiştir (Topkaya, 2017).



Şekil 2.7 1 kg toplam ağırlığa göre hazırlanan kek hamuru

Önce yumurta ve şeker mikserde (KitchenAid, ABD) beyaz bir karışım oluşturuncaya kadar 10. devirde (en üst devir) çırpılmış ardından kalan malzemeler düzgün bir şekilde karışıma eklenmiş ve 6. devirde 5 dakika daha karıştırılmaya devam edilmiştir. Hazırlanan bu ana kek hamuruna NADES 62 ile hazırlanmış propolis ekstraktı Tablo 2.7'de belirtilen oranlarda karıştırılmış ve elde edilen hamurlar (40 g) tek kullanımlık muffin kaplarına dökülerek önceden 180 °C'ye ısıtılmış fırında (Siemens, Almanya) fan modunda 18 dakika pişirilmiştir.

Tablo 2.7 Çalışmada kullanılacak kek hamuruna eklenecek propolis ekstraktı miktarları

Bileşenler	**(%)**	**(%)**	**(%)**	**(%)**	**(%)**	**(%)**	**(%)**
Kek No	0	1	2	3	4	5	6
Hamur	100,0	97,5	95,0	92,5	90,0	85,0	80,0
NADES 62	0,0	2,5	5,0	7,5	10,0	15,0	20,0

Ardından fırından çıkarılan muffinler steril kabinde (Thermo, Almanya) oda sıcaklığına kadar soğutulmuş (Şekil 2.8) ve her bir denemeden steril kabin içinde steril bir bıçak ile yaklaşık 10 mm yüksekliğinde parçalar kesilmiş, kesilen parçalar aseptik olarak tek kullanımlık steril petri kaplarına aktarılmıştır.



Şekil 2.8 Steril kabin içinde soğumaya bırakılmış kekler

Her bir petri kabına deney sonuna kadar (45 gün) petri kapları içindeki su aktivitelerini sabit tutmak için 50/50 su/gliserol (v/v) çözeltisine batırılmış steril hidrofilik pamuk konulmuştur. Daha sonra her bir kek dilimi, bir öze kullanılarak öncesinde YGC (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol) agar'da geliştirilmiş *Aspergilus niger* ve *Penicillium* spp. ile ayrı ayrı inoküle edilmiştir (Şekil 2.9). Petriler, 25 °C'de 45 gün boyunca inkübatör içinde inkübasyona bırakılmıştır

(Binder, Almanya). Petriler inkübasyon sırasında oksijen alışverişine izin vermek ve çevreyle nem alışverişini önlemek için Parafilm® ile kapatılmıştır. Tüm kek dilimleri küf gelişimi açısından günlük olarak kontrol edilmiştir. Tüm bu deneyler üç kopya halinde yürütülmüştür (Morassi vd., 2018).



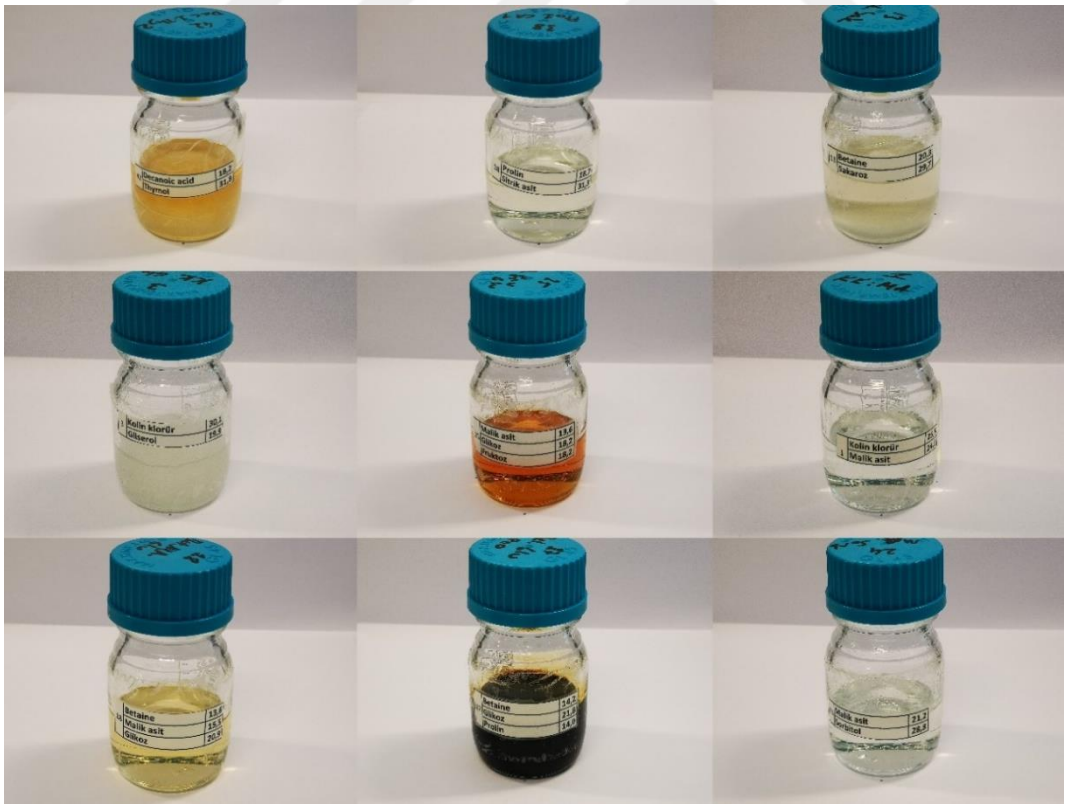
Şekil 2.9 *Penicillium* spp. ile inoküle edilmiş %5 propolis ekstraktı içeren kek dilimi

3
SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Bazı Fizikokimyasal Özellikleri

3.1.1 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Stabiliteleri

Tablo 2.1'de verilen molar oranlarda ve aynı tabloda belirtilen yöntemler ile oluşturulan doğal derin ötektik çözücülerin stabilitelerinin belirlenmesi için ilgili çözücüler hazırlandıktan sonra 5 gün boyunca oda sıcaklığında formları görsel olarak kontrol edilmiştir. Beşinci gün sonunda bazı NADES'lerin görünümler Şekil 3.1'de verilmiştir. Bu görünümlerden bazıları beşinci gün olmadan berrak sıvı görünümü oluşmadığı ya da çabuk kaybolduğu için daha erken kaydedilmiştir. Tüm çözücülerin stabilite testi süresi sonundaki görünümleri Tablo A1'de yazılı olarak sunulmuştur.



Şekil 3.1 Bazı doğal derin ötektik çözücülerin stabilite süresi sonundaki görünümleri

3.1.2 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin pH'ları

Sörensen'e (1968) göre pH kavramı, suyun ayrışma sabiti ile ilişkili olarak (18°C'de $0{,}72x10^{-14}$) tanımlanmıştır. Bu sabit, hidrojen iyonu ve hidroksil iyonu konsantrasyonlarının çarpımının, su molekülünün konsantrasyonuna oranıdır. Sörensen "Hidrojen iyonu üssü" olarak ifade ettiği ve pH olarak simgelediği bu değeri, çözeltinin hidrojen iyonlarına dayalı normallik faktörünün karşıt değerinin Briggs logaritması olarak açıklamaktadır (Sörensen, 1968).

NADES'lerin pH'ı, ötektik çözücü ile hedef çözünenler arasındaki moleküler etkileşimleri güçlü bir şekilde etkilediği için ekstraksiyon verimliliğini etkileyen kilit faktörlerden biri olarak bilinir (Xu vd., 2019). Ekstraksiyona tabi tutulan biyoaktif bileşenlerin yük durumunu ve dolayısıyla ekstraksiyon performansını etkileyebilir (Nakhle vd., 2021). DES sistemlerinin pH'ı temel olarak hidrojen bağı donörü ve hidrojen bağı alıcısının asitliği ve bazikliği ile karakterize edilir.

Sıcaklık arttıkça, DES'lerin pH'ı hidrojen bağı donörlerine bağlı olması nedeniyle doğrusal olarak düşmektedir (Skulcova vd., 2018). Bu sebeple pH, ekstraksiyon sırasında uygulanacak sıcaklığın ekstraksiyon verimine etki etmesini sağlayan parametrelerden biridir.

Zhao vd. (2015) yaptığı bir çalışmada amin bazlı DES'ler, doğal kaynaklardan flavonoidlerin ekstraksiyonu sırasında şeker bazlı DES'lerden daha etkili bulunmuştur. Panic vd. (2021) yaptığı bir çalışmada da incelenen iki NADES (glikoz:gliserol ve glikoz:etilen glikol) portakal kabuğu atıklarının değerlendirilmesi sırasında protein ekstraksiyonu için en yüksek potansiyeli göstermiştir, bu etkinin sebebi olarak nötr pH aralığında (pH>6) olmaları gösterilmiştir.

Yüksek derecede polar moleküller, ekstraksiyon verimliliğini geliştirmek için asidik bir çözeltiye ihtiyaç duyar. Bu nedenle, organik asit bazlı DES'ler veya NADES'ler Nakhle vd. (2021) tarafından en iyi tercih olarak görülmüştür. Bu durum, Radosevic vd. (2016) yaptıkları bir çalışmada, organik asit bazlı doğal derin ötektik çözücülerin antosiyanin için en iyi ekstraksiyon sonuçlarını göstermesi ile gözlemlenirken, şeker bazlı doğal derin ötektik çözücülerin ise diğer fenolik bileşikler için daha iyi bir çözücü olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada hazırlanan NADES'lerden stabil olarak görülenlerin pH analizleri üç tekrarlı gerçekleştirilmiş, sonuçları ortalama olarak kaydedilmiştir. NADES'lerin 1,77 ile 5,29 arasında değişen pH değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Beklendiği gibi kısa zincirli asitler içeren NADES'lerin pH değerlerinin daha düşük (1,77 ile 2,89 arasında) olduğu görülmüştür. Uzun zincirli yağ asitleri içeren NADES'ler ile bileşen olarak prolin içerdiği halde ikincil bileşen olarak kısa zincirli asitleri içermeyen NADES'lerin ise daha yüksek pH değerlerine (3,81 ile 5,29 arasında) sahip olduğu tespit edilmiştir. Optimizasyon çalışması için seçilen 4 NADES'in pH değerlerinin de 2,19 ± 0,137 ile 2,88 ± 0,087 arasında olduğu tespit edilmiştir. Stabil olan tüm NADES'lere ait pH değerleri Tablo A2'de verilmiştir.

3.1.3 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Yoğunlukları

DES'lerin çoğu sudan daha yüksek yoğunluğa sahiptir (Omar & Sadeghi, 2022). Derin ötektik çözücülerin 1,041 ile 1,63 $g.cm^{-3}$ arasında değişen yoğunluk değerlerindeki farklılık, moleküler organizasyonlarıyla açıklanabilmektedir (Zhang vd. 2012). Florindo vd. (2014) tarafından gösterildiği üzere sıcaklık arttıkça derin ötektik çözücünün yoğunluğu doğrusal olarak azalmaktadır. Derin ötektik çözücü bileşenlerinin molar oranı da yoğunluk değerlerini büyük ölçüde etkilemektedir. Genel bir kural olarak, bileşimde katyon ne kadar fazlaysa elde edilen DES'in yoğunluğu da o kadar düşük olmaktadır (Al-Wahaibi vd. 2019). Diasit DES'lerin yoğunluğu zincir uzunluklarının artmasıyla azalmaktadır (oksalik > malonik > glutarik) (Florindo vd., 2014). Bu çalışmada tespit edilen yoğunluk değerlerinde de sadece uzun zincirli yağ asitleri içeren NADES'lerin yoğunlukları 1,0 $g.cm^{-3}$'ten düşük olarak bulunmuştur. Analiz edilen NADES'lerin yoğunluklarının 0,9084 ile 1,4154 $g.cm^{-3}$ arasında değiştiği ve optimizasyon çalışması için seçilen 4 NADES'in yoğunluklarının da 1,2829 ± 0,00372 ile 1,36 ± 0,00134 arasında olduğu tespit edilmiştir tespit edilmiştir. Analize uygun olan 42 çözücünün yoğunlukları Tablo A2'de verilmiştir.

3.1.4 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Viskoziteleri

DES taşınım özelliği, DES'lerin önemli fiziksel özelliklerinden olan viskozite ile ilgilidir (Omar & Sadeghi, 2020). Literatürde bugüne kadar çalışmış DES'lerin büyük çoğunluğu oda sıcaklığında viskoz sıvılardır. Literatürde ilk çalışılan NADES olan kolin klorür:üre (1:2 molar oran) NADES'in viskozitesi 298,15 K'de 750 mPa.s olarak ölçülmüşken, şeker bazlı HBD'ler içeren NADES'lerin, örneğin, 323,15 K'de 1:1 mol oranında kolin klorür:glikoz için 34.400 mPa.s ve metalik bileşiklere sahip DES'lerin, örneğin 1:2 mol oranında kolin klorür:çinko klorür için 298,15 K'de 85.000 mPa.s, olarak son derece yüksek viskozitelere sahip olduğu tespit edilmiştir (Maugeri & de Maria 2012; Abbott vd., 2004b). DES'lerin

viskoziteleri temel olarak HBA'ların ve HBD'lerin kimyasal yapısı, molar kütleleri, sıcaklıkları ve molar oranlarından etkilenmektedir. Küçük hacimli sıvı DES'lerdeki yüksek viskozite ve zayıf iyonik hareketlilik, esas olarak, DES bileşenlerinin hidrojen bağı donörü ve hidrojen bağı alıcısı arasındaki van der Waals ve elektrostatik kuvvetler gibi diğer etkileşimlerle birlikte geniş bir hidrojen bağı ağının varlığından kaynaklanmaktadır (Zhang vd., 2012; Kalhor & Ghandi, 2019; Gullon vd., 2020). Sıcaklığın DES'lerin viskoziteleri üzerindeki etkisi, HBA'lar ve HBD'ler arasındaki hidrojen bağı ağındaki ayrışma nedeniyle çok önemlidir. Kolin klorür ve gliserol bazlı DES'lerin viskozitesi, hidrojen bağı ağının kısmen kırılması nedeniyle organik tuz çözeltisinin eklenmesiyle gliserol viskozitesinden daha da düşük seviyelere düşer (Abbott vd., 2011; Omar & Sadeghi, 2022). DES'lerin yüksek viskoziteli (> 100 Cp) (Zhang vd., 2012) doğası, ekstraksiyon sürecindeki ana sınırlayıcı faktörlerden biri olarak bilinmektedir ve bu da yeni ortaya çıkan bu çözücülerin endüstriyel uygulanabilirliğini daha da sınırlamaktadır (Kalhor & Ghandi, 2019; Zainal-Abidin vd., 2017; Habibollahi vd., 2019). Çeşitli araştırmacılar tarafından belirtildiği üzere NADES'lerin viskozitesi, ekstraksiyon sıcaklığındaki artışın yanı sıra su ilavesiyle de azalmaktadır (Liu vd., 2018; Zdanowicz vd., 2018). Çeşitli literatür çalışmaları (Dai vd., 2016; Huang vd., 2017; Guo vd., 2019) DES'lerin viskozitesi ile biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyon verimi arasında ters bir ilişki olduğunu bildirmiştir. Daha yüksek ekstraksiyon süresi ve daha yüksek ekstraksiyon sıcaklığına (80 °C) bağlı olarak daha düşük viskozite elde edilmesi, elma posası ve çeşitli NADES'ler arasındaki etkileşimi kolaylaştırabilmiştir. Örneğin, kolin klorür:laktik asit, kolin klorür:oksalik asit ve kolin klorür:üre gibi denenen NADES'lerin viskozitesi kütle transfer işlemi sırasında önemli bir rol oynamıştır. NADES fraksiyonunun 80 °C ekstraksiyon sıcaklığında verimliliğinin gözle görülür şekilde artmasının kısmen çözeltinin viskozitesinin düşmesinden kaynaklandığı belirtilmiştir (Chen & Lahaye, 2021). 80 °C ekstraksiyon sıcaklığı ve 2,5 saat ekstraksiyon süresi, *Averrhoa bilimbi*'den pektinin DES'ler, yani kolin klorür:sitrik asit, kullanılarak uzaklaştırılması sırasında optimum koşullar olarak tespit edilmiştir (Shafie vd., 2019). Çeşitli NADES'lerin yüksek viskoziteleri (40°C ekstraksiyon sıcaklığında kolin klorür:laktik asit için = 107,6 mPa.s ve kolin klorür:üre için = 522,0 mPa.s) kütle transferi sürecini, yani hücre duvarı matrisinden çözücü maddeye pektinin aktarılmasını uzun bir süre boyunca geciktirmiştir (Chen & Lahaye, 2021).

Greyfurt kabuklarından polifenollerin ötektik çözücülerle ekstraksiyonu sırasında, düşük konsantrasyonlardaki (%10-15) su moleküllerinin, yüksek DES viskozitesi nedeniyle ekstraksiyon verimliliğini düşürdüğü tespit edilmiştir (El Kantar vd., 2019). Ayrıca, daha yüksek su konsantrasyonları (%40-75), hidrojen bağı etkileşimlerini etkileyerek hedef bileşikler ve DES arasındaki etkileşimleri de kontrol edebildiği bildirilmektedir (Garcia vd., 2015). Portakal kabuğu atıklarının glikoz:fruktoz:sakkaroz karışımından oluşan NADES kullanılarak yeniden değerlendirilmesi sırasındaki zayıf ekstraksiyon verimliliğinin, kabuklardan çözücüye zayıf kütle aktarım hızına neden olan yüksek çözücü viskozitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Dai vd., 2016; Mitar vd., 2019; Panic vd., 2021). Glikoz:fruktoz:sakkaroz NADES'inin viskoz yapısı, su içeriğinin artırılmasıyla değiştirilmiş ve bu da test edilen diğer NADES'ler gibi ekstraksiyon verimliliğinin artmasıyla sonuçlanmıştır (Mitar vd., 2019).

Bu çalışmada incelenen NADES'lerin viskozitelerinin 12,5 ± 0,00 ile 2426,7 ± 5,77 cP arasında değiştiği tespit edilmiştir. %30 su içeren NADES'ler ile bileşen olarak uzun zincirli yağ asitlerini içeren NADES'lerin daha düşük viskoziteye sahip olduğu belirlenmiştir. Su içerikleri tamamen uzaklaştırılmış NADES'lerin viskozite değerleri ölçülememiş bu NADES'lerden sadece bir tanesinin viskozitesi 80°C'de ölçülmüş ve 296.666,7 ± 22.546,3 cP olarak tespit edilmiştir. Bu seviyede viskoz sıvıların ekstraksiyon amacıyla kullanımı mümkün olmayacağı için su içerikleri tamamen uzaklaştırılmış NADES'ler optimizasyon çalışmaları dışında tutulmuştur. Optimizasyon çalışması için seçilen 4 NADES'in viskozitelerinin 294,5 ile 2426,7 arasında olduğu tespit edilmiştir. Hazırlanan çözücülerin viskozite değerleri Tablo A2'de verilmiştir.

3.2 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Çözücü Özellikleri

Doğal derin ötektik çözücülerin çözücü özelliklerinden, polariteleri ve farklı fenolik bileşikleri çözebilme kabiliyetleri incelenmiştir.

3.2.1 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Polaritelerinin Belirlenmesi

Solvatokromik problar, prob molekülü ilgili çözücü ile etkileşime girdiğinde UV-vis absorbans spektrumunun kayması yoluyla bir polarite ölçüsü sağlar. Polarite, floresan bazlı problar söz konusu olduğunda floresan emisyon maksimumları aracılığıyla ölçülür. Absorbans bazlı yöntemler olarak, betain boya ölçeği, Kamlet-Taft parametreleri ve nil kırmızısı polarite ölçeği bilinmektedir ve DES yapısal

modifikasyonlarının genel çözücü polaritesi üzerindeki etkisini incelemek için yaygın olarak kullanılmıştır (Abbott vd., 2011; Dai vd. 2013a). Polarite ölçümü için floresan bazlı problar kullanılarak daha az sayıda çalışma yapılmıştır (Pandey vd., 2014; Vandenelzen & Hopkins 2019).

Nil kırmızısı, polar çözücülerde batokromik bir kayma ve polar olmayan çözücülerde betain boya 30'un tersine hipokromik bir kayma sergiler (Deye vd., 1990). Yüksek ENR değerleri (nil kırmızısı probu ile ölçülen) bileşiklerin daha düşük polarite gösterdiğini, düşük ENR değerleri ise nil kırmızısı polarite skalasında bileşiklerin daha yüksek polarite gösterdiğini ifade eder. Betain boya 30 zwitteriyonik bir moleküldür ve asidik ortamda protonlanır, bu da bu gibi durumlarda çözünen çözücü etkileşimlerini ölçememesine neden olur. Fotokimyasal kararlılık, çok çeşitli çözücülerde yüksek çözünürlük ve düşük baziklik gibi fizikokimyasal özellikler, Nil kırmızısını DES'lerin polaritesini ölçmek için uygun bir prob haline getirmektedir.

NADES'lerin polaritesini anlamak, çözündürme yeteneklerini ve biyomoleküllerle etkileşimlerini şekillendirmek için gereklidir. Dai vd.(2013a), yüzden fazla NADES'in hazırlanmasını ve özelliklerini kapsamlı bir şekilde incelemişlerdir. Bu NADES'lerin polaritesini ölçmek için Nil kırmızısı kullanılmış ve organik asit HBD'lere sahip olan bileşiklerin en polar bileşikler olduğu bulunmuştur. Örneğin, malik asit:kolin klorür:su (1:1:2) için ENR değeri 44,81 kcal.mol^{-1} olarak bulunmuştur. Bu çalışmada hazırlanan 1 ve 53 numaralı NADES'ler kolin klorür ve malik asit ile oluşturulmuştur ve sırasıyla %30 ve %15 su içeriğine sahiptir. Her iki NADES için de hesaplanan polarite değerleri 47,9 ± 0,01 olarak bulunmuştur. Artan su miktarı çözeltilerin polaritelerini suyun polaritesine (48,21 kcal.mol^{-1}) yaklaştırmıştır. Dai vd. (2013a) yayınında amino asit ve saf şeker bazlı NADES'lerin polariteleri de (48,05-48,3 kcal.mol^{-1}) suyun polaritesine (48,21 kcal.mol^{-1}) benzer olarak hesaplanmıştır. Şeker ve polialkol bazlı NADES'lerin daha az polar olduğu ve polaritelerinin metanolünkine (51,89 kcal mol^{-1}) benzer olduğu bulunmuştur.

Mulia vd. (2017) HBA olarak kolin klorürü, 1,2-propandiol, gliserol ve malik asit ile karıştırarak hazırladıkları üç farklı NADES'i incelemiştir. Polariteyi ölçmek için Nil kırmızısı kullanılmış ve şu sıra gözlenmiştir: malik asit > gliserol > 1,2-propandiol. Huang vd. (2017), Tatar karabuğday kabuğundan rutin ekstraksiyonunu incelemek için birkaç DES kullanmıştır. Nil kırmızısı ile karakterize edilen tüm

NADES'lerin benzer polaritelere (49,81-50,91) sahip olduğu ve metanolünkine (51.80) yakın olduğu görülmüştür. Trusheva vd. (2019), propolisin ekstraksiyonu için NADES'leri kullanmış ve polaritelerinin 49,25-49,34 arasında değiştiğini tespit etmişlerdir.

Kolin klorür HBA'nın, organik asit bazlı HBD'lerle birlikte (47,73-48,30), kolin klorür HBA'nın şeker bazlı HBD'lerle kombinasyonuna (49,72-50,69) kıyasla daha yüksek polaritelere sahip olduğu görülmüştür. Glikoz HBA'nın tartarik asit ve sitrik asit HBD'leri ile kombinasyonu sırasıyla 47,73 ve 47,81'lik bir polarite ile sonuçlanmıştır. Biraz daha yüksek polarite (daha düşük ENR değeri), tartarik asidin (2,98), sitrik aside (3,14) kıyasla daha düşük pKa değerine sahip olmasına bağlanabilir (Craveiro vd., 2016). Sonuçların çarpıtılmasını önlemek için DES'leri karakterize ederken su içeriğini kontrol etmek önemlidir. Kolin klorür:ksiloz (2:1) NADES'in ENR'si, su içeriği ağırlıkça %2,2'den ağırlıkça %7,74'e çıkarıldığında 50,78'den 49,72'ye düşmüştür (polaritede artış), özetle su eklenmesi NADES'in polaritesini suyun polaritesine yakınlaştırmıştır. (Craveiro vd., 2016). Gabriele vd. (2019), Kolin Klorür HBA ile glikol bazlı HBD'leri karıştırarak elde ettikleri çeşitli NADES'lerin polaritelerini ölçmüştür. Kolin klorür HBA ile dietilen glikol HBD içeren NADES'lerin ENR polaritelerinin (50,80), kolin klorür HBA ile karıştırılmış polietilen glikol 200 HBD içeren NADES'lere (51,17) kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada doğal derin ötektik çözücülerin polaritelerinin belirlenmesinde Ogihara vd. (2004) yayınındaki yöntemden faydalanılmıştır. Çalışmalar sırasında NADES'ler dışında konvensiyonel çözücüler (ultra saf su, gliserol, propilen glikol, etanol, metanol, kloroform, asetonitril, etil asetat, dietil eter, hekzan ve ultra saf su ile etanolün %80 ve %70 (v/v) olmak üzere iki karışımı) için de aynı yöntem kullanılarak polarite değerleri hesaplanmış ve tespit edilen değerlerin literatür verisi ile uyumlu olduğu gözlenmiştir (Deye vd., 1990).

Çalışmada incelenen NADES'lerin polarite değerlerinin (ENR) 47,6 ile 53,6 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Bu aralık konvansiyonel çözücülerden saf su, gliserol, %70 etanol, propilen glikol, %80 etanol, etanol, metanol, kloroform ve asetonitril'in polaritesini de içine alan oldukça geniş bir aralıktır. Optimizasyon çalışması için seçilen dört adet NADES'in polarite değerleri 47,9 ile 49,5 aralığında tespit edilmiştir. Bu değerler konvensiyonel çözücülerden gliserol'ün (49,13) etrafındaki değerlerdir. Saf su (48,33) ile %70 etanol çözeltisi (50,60) arasında yer

almaktadır. Hazırlanan stabil tüm çözücülerin polarite değerleri Tablo A2'de verilmiştir.

3.2.2 Farklı Fenolik Bileşiklerin Doğal Derin Ötektik Çözücülerde Çözünürlüklerinin Belirlenmesi

NADES'lerin farklı polariteleri göz önüne alındığında, organizmalarda suya alternatif bir ortam olarak hareket etmeleri, suda çözünmeyen metabolitleri veya makromolekülleri çözmeleri mümkündür. Özellikle, birçok bitki ikincil metaboliti suda hiç çözünmez, ancak bitkilerde sentezlenir, depolanır ve taşınır (Dai vd., 2013a).

Derin ötektik çözücünün polaritesi, diğer çözücülerle veya numune çözeltisiyle karışabilmesi ve hedef bileşenlere yönelik çözünürleştirme verimliliği açısından önemli bir parametredir (Dai vd., 2013a; Dai vd., 2013b). Derin ötektik çözücülerin ilaçlar, farmasötik bileşenler, metal oksitler, karbondioksit ve kurşun, cıva ve kadmiyum gibi elementel türler dahil olmak üzere polar ve zayıf polar bileşikler için iyi çözünürleştirme özelliklerine sahip olduğu bilinmektedir. (Aroso vd., 2016). Ayrıca, derin ötektik çözücüler, geleneksel çözücülere kıyasla daha iyi çözünürleştirme etkisi ve dolayısıyla daha iyi ekstrakte edilebilirlik sağlamıştır (Fernandez vd. 2018).

Bu özellikler, en azından kısmen, "benzer, benzeri çözer" teorisi ile rasyonelleştirilebilir, böylece polarite açısından uygun derin ötektik çözücünün seçimine yardımcı olabilir. Hedef analitlerle derin ötektik çözücüler arasındaki özgün etkileşimler, bu analitleri karmaşık matrislerden seçici olarak ayırmayı mümkün kılmaktadır (Fernandez vd. 2018). Kolin klorür:gliserol derin ötektik çözücüsünde de gözlemlendiği gibi, çözücünün hidrojen bağı vericisi görevi gören molekülündeki asitliğin azalması nedeniyle sıcaklık artışının genellikle derin ötektik çözücünün polaritesinde bir azalmaya yol açtığı belirtilmelidir. Kolin klorür oranı ile elde edilen derin ötektik çözücünün polaritesi arasında doğrusal bir korelasyon olduğunun da altı çizilmiştir (Tang vd. 2014).

Dai vd. (2013a), NADES'lerin çözünürleştirme kapasitesini keşfetmek için bir model deney gerçekleştirilmiştir. Bunun için, suda çözünmeyen veya az çözünen doğal kaynaklı bileşiklerin dört farklı NADES içindeki çözünürlükleri ölçülmüş ve sudaki çözünürlükleriyle karşılaştırılmıştır. Bahsi geçen çalışmada çözünürlükleri araştırılan bileşiklerden üç adedi bu çalışmada da incelenmiş (rutin, kersetin, sinnamik asit) fenolik bileşiklerdir. Sonuçlar, test edilen bileşiklerin çoğunun

çözünürlüğünün 1,2-propanediol:kolin klorür:su'da en yüksek seviyelerde olduğunu göstermiştir ki bu durum bahsi geçen NADES'in en düşük polariteye sahip olduğu düşünüldüğünde anlamlıdır. Bu bileşiklerin çözünürlüğünün NADES'lerde, suya kıyasla 988 ile 417.375 kat artması dikkat çekicidir. Aynı çalışmada bir sonraki adım olarak, su içeriğinin bir NADES'in (glikoz:kolin klorür:su) çözünürleştirme kapasitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu durumda, NADES'e az miktarda su eklenmesinin çözünürleştirme kapasitesini artırabildiği ve optimum su içeriğinin çözünürlüğü istenen bileşiğe bağlı olarak değişmekte olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar suyun NADES'lerin optimizasyonunda önemli bir faktör olduğunu göstermektedir. Ayrıca, aynı çalışmada NADES içindeki bileşiklerin çözünürlüğünün sıcaklıktan çok fazla etkilendiği de tespit edilmiştir. Sıcaklık 40 °C'tan 50 °C'a yükseldiğinde kersetin çözünürlüğünün glikoz:kolin klorür:su'da 2,3 kat,1,2-Propanediol:kolin klorür:su'da ise 1,65 kat artığı hesaplanmıştır (Dai vd., 2013a).

Bu çalışmada incelenen farklı kimyasal yapılara sahip seçilmiş fenolik bileşiklerin (fenolik asit olarak sinnamik asit, flavonol glikozit olarak rutin, flavonol olarak kersetin ve fenolik aldehit olarak vanilin) NADES'lerdeki çözünürlüğü de Tablo A2'de verilmiştir. Propolis ekstraksiyonu düşünüldüğünde, çözücünün her tür fenolik bileşiği çözebilmesi önemlidir. Bu nedenle propolis ekstraksiyon çalışmalarında kullanılmak üzere incelenen NADES'lerde tüm fenolik bileşikleri belirli bir seviyede çözebilme özelliği aranmıştır. Analiz edilen 42 NADES'ten sadece 11 tanesi kersetin bileşiği için çözünürlük göstermiş, diğerleri kersetini hiç çözememiştir. Bu 11 NADES'ten kersetin çözünürlüğü en yüksek olan 4 tanesi optimizasyon çalışmaları için seçilmiştir.

3.3 Ham Propolisin Kalite Özellikleri

Propolis'in doğal derin ötektik çözücüler ile ekstraksiyonunun yanıt yüzey metodolojisi ile optimizasyonu çalışmalarına geçmeden önce, ekstraksiyon çalışmalarında kullanılacak propolisin fizikokimyasal içeriği ve biyoaktif özellikleri analiz edilmiştir.

Bu amaçla, doğrudan arıcıdan alınan propolis örneği önce -18 °C'de 24 saat bekletilmiş ve ardından laboratuvar tipi bir değirmende (Demsan-Brader) toz haline getirilmiştir. Daha sonra, ISO/DIS 24381 arı propolisinin-teknik özellikleri dokümanında tanımlanan analiz yöntemleri kullanılarak balzam (etanol ekstraktı),

kurutma kaybı, kül içeriği, balmumu içeriği (petrol eteri ekstraktı), toplam fenolik içerik, toplam flavonoid içerik ve antioksidan kapasite (DPPH) analizleri gerçekleştirilmiştir (Uluslararası Standardizasyon Örgütü, 2023).

Tüm deneyler üç tekrarlı olarak yapılmış ve ortalama olarak Tablo 3.1'de sunulmuştur. Tüm sonuçlar Uluslararası Standardizasyon Örgütü tarafından aynı belgede belirlenmiş limitlerle karşılaştırılmıştır (Uluslararası Standardizasyon Örgütü, 2023). Elde edilen sonuçlar, çalışmada kullanılmak üzere seçilen propolisin ISO/DIS 24381 arı propolisinin-teknik özellikleri dokümanında tanımlı asgari gerekliliklerinin çok üzerinde bir ürün olduğunu göstermiştir (Uluslararası Standardizasyon Örgütü, 2023). Sonuçlar, çalışmada kullanılan propolisin gerekli minimum balzam içeriğinin iki katından fazlasına ve gerekli minimum toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriğinin neredeyse 1,5 katına sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, analiz edilen propolis numunesi bu sonuçlarla tutarlı olarak daha düşük balmumu içeriği ve kurutma kaybı değerleri göstermiştir.

Tablo 3.1 NADES'ler kullanılarak ekstrakte edilecek propolisin kalite analizi

Parametre	Sonuç	ISO limit
Balzam (etanol ekstraktı) (%)	66,7 ± 0,96	Min. %30,0
Balmumu (Petrol eteri ekstraktı) (%)	42,2 ± 2,08	Maks. %65,0
Kül içeriği (%)	1,1 ± 0,13	Maks. %5,0
Kurutma kaybı (%)	4,5 ± 0,39	Maks. %10,0
Toplam fenolik içerik (% GAE)	14,6 ± 1,07	Min. %10,0
Toplam flavonoid içeriği (% KE)	4,3 ± 0,43	Min. %3,0
Antioksidan Kapasite (DPPH) (µg/mL)	10,9 ± 1,17	Maks. 25,0

Popova vd. (2005) yayınladığı bir çalışmada Türkiye'nin 6 farklı bölgesinden toplanmış 6 propolis numunesinin toplam fenolik içeriği ve toplam flavonoid içeriği incelenmiş ve sırasıyla %19,6 ± 9,6 ve %4,9 ± 3,6 sonuçları bulunmuştur. Tespit edilen en düşük ve en yüksek sonuçlar, toplam fenolik içerik için sırasıyla %8,2 ve %30,4, toplam flavonoid içerik için sırasıyla %1,5 ve %9,6 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada tespit edilen sonuçlar ilgili yayın ile uyumludur (Popova vd., 2005). Ancak Popova vd. (2005) yayınında bu çalışmadakinden farklı bileşikler standart olarak kullanılmıştır. Toplam fenolik içerik için pinosembrin ve galangin'in 2:1

oranlı karışımı ve toplam flavonoid içerik için ise galangin standart olarak kullanılmıştır. Dolayısıyla bu veriler doğrudan kıyaslamak uygun olmayacaktır.

Daha güncel tarihli başka bir çalışmada Fas'ın iki ayrı bölgesinden gelen propolis numunelerinin kurutma kaybı, balmumu ve kül içerikleri incelenmiştir. Ayrıca aynı numunelerin toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri de araştırılmıştır (Aboulghazi vd., 2022a).

Numunelerin kurutma kaybı sonuçları %1,09 ± 0,05 ile %2,00 ± 0,09, kül içerikleri %1,79 ± 0.19 ile %1,84 ± 0,11 ve balmumu içerikleri de %21,8 ± 0,50 ile %28,9 ± 0,20 arasında tespit edilmiştir. Numunelerin fizikokimyasal sonuçları bu çalışmada kullanılan propolis numunesine oranla daha iyi olduğu görülmektedir. Ancak bu durum propolisin biyoaktif özelliklerinden sorumlu olan fenolik bileşiklerle ilgili analiz sonuçlarına tam olarak yansımamıştır. Aynı çalışmada gerçekleştirilen toplam fenolik içerik analizlerinde numunelerin sonuçları 11,7 ± 0,2 ile 19,5 ± 0,2 (%GAE) arasında yer almıştır. Toplam flavonoid içeriği sonuçları ise 1,7 ± 0,1 ile 2,5 ± 0,1 (%KE) arasında tespit edilmiş olup bu sonuçlar ISO/DIS 24381 arı propolisinin-teknik özellikleri dokümanına göre uygun olmadığı görülmüştür (Aboulghazi vd., 2022a; Uluslararası Standardizasyon Örgütü, 2023).

Dias vd. (2012) Portekiz'de üretilen propolis numunelerini incelediği çalışmada, propolisin kül içerikleri ve iletkenlikleri analiz edilmiş ve sonuçlar sırasıyla %1,6 ± 0,02 ile %2,2 ± 0,08 ve 1,2 ± 0,1 ile 2,4 ± 0,3 mS/cm arasında tespit edilmiştir. Kül içeriği sonuçları iletkenlik için elde edilenlerden farklı bir eğilim gösterdiğinden, bu iletkenlik sonuçlarının numunelerin mineral bileşimi ile açıklanamayacağına vurgu yapılmıştır. Aynı numunelerin nem içeriklerinin %3,4 ± 0,2 ile %5,4 ± 0,4 arasında değiştiği belirtilmiştir. Bu sonuçlar, çalışmada gerçekleştirilen duyusal analizde atıfta bulunulan propolis kıvamının numunenin nemiyle doğrudan ilişkili olmadığı sonucuna varılmasına yol açmıştır (Dias vd., 2012).

Dias vd. (2012) yaptığı çalışmada bulunan kül içerikleri, Bonvehi vd. (1994) yaptığı çalışmada Çin propolisi için rapor edilen sonuçlar ile uyumlu bulunmuştur. Bu çalışmada bulunan kül içeriklerinin her iki çalışmada incelenen Çin ve Portekiz propolislerinde görülen değerlerden daha iyi olduğu görülmektedir. Portekiz propolisinin nem değerleri, Bonvehi vd. (1994) yaptığı çalışmada Uruguay ve Çin propolisi için elde edilen değerlerden biraz daha üstün olduğu görülmüştür. Bu çalışmadaki nem değerleri ise Portekiz propolisi için tespit edilen aralıkla

uyumludur (Bonvehi vd., 1994; Dias vd., 2012). Balmumu miktarı numuneler arasında oldukça farklı bulunmuştur. Negri vd. (1998) göre, propolis balmumunun bileşimi petek balmumuna benzerdir, bu da propolis balmumlarının bitkilerden kaynaklanmaktan ziyade arılar tarafından salgılandığını göstermektedir. Sonuçlar, kütle yüzdesi olarak, %4,8 ± 0,4 ile %16,0 ± 2,1 arasında değişmektedir. Bulunan maksimum balmumu içeriği 15 g/100 g olduğundan, bu veriler literatürde bildirilenlerle uyumludur (Silva vd., 2012). Bonvehi vd. (1994) yaptığı çalışmada Brezilya, Uruguay ve Çin propolisi için elde edilen değerler sırasıyla %15,6, %2,5 ± 0,1 ve %21,6 ± 6,8 olarak tespit edilmiştir. Uruguay propolis numunelerinin toz formunda ve Brezilya ile Çin propolislerinin ham halde olduğu belirtilmiştir. Bu da Uruguay'dan gelen numunelerin ön bir ekstraksiyondan geçmiş olabileceğini düşündürmektedir (Bonvehi vd., 1994; Dias vd., 2012).

Propolisteki toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriği, ürünün kalitesini ve biyolojik potansiyelini değerlendirmek için önemli parametrelerdir (Moreira vd., 2008). Propolisin spesifik fenolik bileşimi, kovan çevresinde bulunan bitkilerin yanı sıra arıların bulunduğu bölgenin coğrafi ve iklimsel özelliklerine de son derece bağlıdır (Bankova vd., 2000). Dai vd. (2013a) yaptığı çalışmada elde edilen toplam fenolik içerik ve toplam flavonoid içerik sonuçlarının, numuneler arasında menşe bölgelerine uygun olarak farklılıklar gösterdiği belirtilmiştir. Portekiz'in soğuk bölgelerinden elde edilen örneklerin, toplam fenolik içerik ve toplam flavonoid içerik sonuçlarının (sırasıyla en düşük %23,0 ± 2,0 ve en düşük %9,5 ± 2,0) sıcak bölgelerinden elde edilen örneklerin sonuçlarının en az iki katı seviyelerinde olduğu bildirilmiştir.

Bununla birlikte bu çalışmada elde edilen toplam fenolik ve flavonoid miktarı literatürde bildirilen diğer çalışmalarla da uyumludur. Choi vd. (2006) tarafından Kore propolisinde elde edilen fenolik bileşiklerin içeriği %12.0 ile %21.2 arasında değişmektedir (Choi vd., 2006). Silva vd. (2012) toplam fenolik içerik için %8,7 ile %27,7 arasında ve toplam flavonoid içeriği için %2,5 ile %14,2 arasında değerler raporlamıştır (Silva vd., 2012).

Falcao vd. (2013) yaptıkları bir çalışmada Portekiz'in farklı bölgelerinden alınmış 40 adet propolis numunesinin antioksidan kapasitesi, DPPH radikal süpürme aktivitesi analizi yoluyla ölçülmüş ve kırk numunenin sonucu 24,7 ± 18,8 µg/mL olarak bulunmuştur. Tespit edilen en düşük ve en yüksek sonuçlar sırasıyla 8,0 ± 0,0 ile 93,0 ± 4,0 µg/mL olarak görülmüştür.

Bu çalışmada kullanılan propolisin balmumu içeriği değeri incelenen tüm çalışmalarda yer alan değerlerden daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Buna rağmen toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri literatür verilerine eşit ya da daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca bu çalışmada elde edilen antioksidan kapasitesi, DPPH radikal süpürme aktivitesi değeri 10,9 ± 1,17 µg/mL kullanılan propolis örneğin oldukça yüksek kalitede bir propolis olduğunu göstermektedir.

3.4 Ham Propolisten Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonunun Optimizasyonu

Propolis ekstraksiyonunun yanıt yüzey metodolojisi ile optimizasyonu çalışmalarına geçmeden önce ultrasonik uygulamanın süresi ile ilgili deneme adedini optimum seviyede tutmak için 45°C'de %50 ultrason genliği seviyesinde 5 dakika ile 90 dakika arasında 6 ayrı noktada ekstraksiyon çalışması yapılmış ve toplam fenolik içerikleri (TPİ) ile toplam flavonoid içerikleri (TFİ) ISO/DIS 24381 arı propolisinin-teknik özellikleri dokümanında tanımlanan analiz yöntemleri kullanılarak ölçülmüş ve istatistiksel olarak analiz edilmiştir (Uluslararası Standardizasyon Örgütü, 2023). Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak Tablo 3.2'de verilmiştir. Tablo 3.2'de aynı harfi paylaşmayan ortalamalar istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı tespit edilmiştir.

Tablo 3.2 Ultrasonik uygulama süresinin TFİ ve TPİ değerlerine etkisi

Süre	Toplam Fenolik İçerik	Toplam Flavonoid İçerik*
5 dk	$11,0 \pm 0,49^{ab}$	$4,1 \pm 0,25^{ab}$
10 dk	$11,2 \pm 0,65^{ab}$	$4,0 \pm 0,20^{ab}$
20 dk	$12,1 \pm 0,62^{a}$	$4,4 \pm 0,24^{a}$
30 dk	$10,1 \pm 0,34^{b}$	$3,8 \pm 0,22^{b}$
60 dk	$10,6 \pm 1,03^{ab}$	$3,9 \pm 0,16^{b}$
90 dk	$10,5 \pm 0,39^{ab}$	$3,7 \pm 0,07^{b}$

* Sütunda aynı harfi paylaşmayan ortalamalar istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p < 0.05$)

Bu ön çalışmada çözücü olarak %80 etil alkol %20 saf su karışımı kullanılmıştır. Bu çözücü için istatistiksel analizden çıkan sonuç tek başına sürenin değişikliğinin etkisinin olmadığı muhakkak ultrason genliği ve uygulama sıcaklığının da optimizasyon çalışmasında incelenmesi gerektiğini göstermiştir.

3.4.1 Toplam Fenolik İçerik Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirilmesi

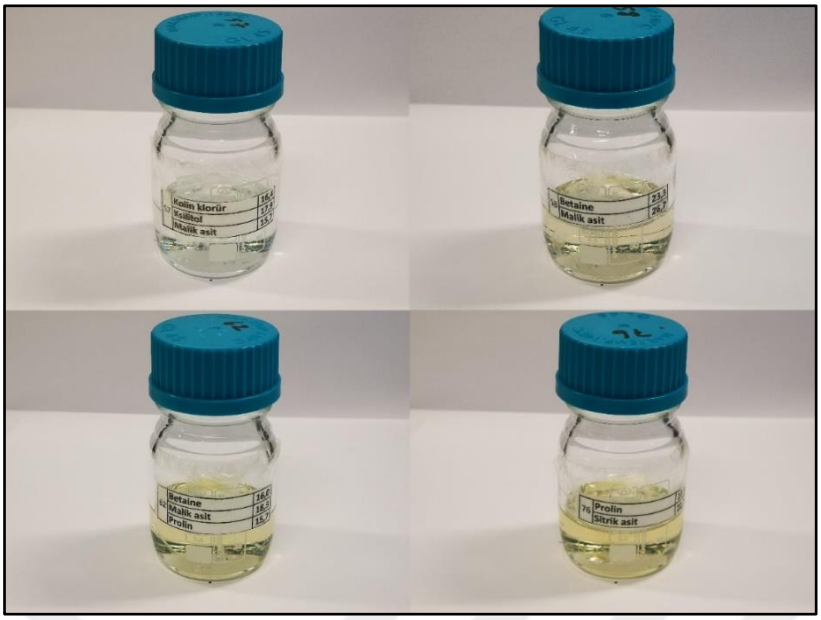
Ham propolisten fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunun optimizasyonu için fizikokimyasal ve çözücü özellikleri incelenen doğal derin ötektik çözücüler ile yanıt yüzey metodolojisi kullanılarak ekstraksiyon çalışmaları yapılmıştır. Çalışmalarda kullanılmak üzere belirlenen doğal derin ötektik çözücülerin fizikokimyasal ve çözücü özellik analizlerine ait sonuçlar Tablo 3.3'te verilmiştir. Seçilen çözücülerin dördü de %15 (w/w) su içeren çözücülerdir. Bu çözücüleri oluşturan bileşenler ve mol oranları sırasıyla, 57 numaralı NADES (kolin klorür : ksilitol : malik asit 1:1:1), 58 numaralı NADES (betain : malik asit 1:1), 62 numaralı NADES (betain : malik asit : prolin 1:1:1), 76 numaralı NADES (prolin : sitrik asit 2:1) şeklindedir.

Tablo 3.3 Ekstraksiyon çalışmalarında kullanılan doğal derin ötektik çözücüler

	57	**58**	**62**	**76**
Polarite (EN_R)	47,9 ± 0,1	49,1 ± 0,0	49,5 ± 0,0	48,5 ± 0,0
pH	2,19 ± 0,14	2,66 ± 0,08	2,88 ± 0,09	2,74 ± 0,11
Yoğunluk ($g.cm^{-3}$)	1,28 ± 0,00	1,29 ± 0,00	1,29 ± 0,00	1,36 ± 0,00
Vanilin (mg/ml)	2,3±0,6	2,2±0,9	1,8±0,8	3,1±0,3
Rutin (mg/ml)	2,3±0,2	2,9±0,3	2,3±0,2	3,1±0,2
Sinamik Asit (mg/ml)	7,7±0,4	8,2±0,5	7,8±0,4	9,4±0,5
Kuersetin (mg/ml)	1,8±0,1	1,7±0,2	1,5±0,2	2,1±0,2
Viskozite (cP)	294,5 + 10,7	1046,7 + 25,9	2426,7 + 5,8	238,3 + 3,4*

*Viskozite değeri 80 °C'de ölçülmüştür

Bu çözücülerin tamamı ultrason ile ısıtma yöntemi ile hazırlanmış ve çalışmalar süresince stabilitelerini korumuşlardır. Bu çözücülerin stabilite çalışmaları bitimindeki görünümleri Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2 Seçilen doğal derin ötektik çözücülerin stabilite süresi sonundaki görünümleri

Propolis ekstraksiyonu optimizasyon çalışmasında bağımsız değişkenler sıcaklık, süre ve ultrason genliği olarak seçilmiştir, bağımlı değişken toplam fenolik içerik ve toplam flavonoid içerik olarak alınmıştır. Optimizasyon verilerinin değerlendirilmesi aşamasında aynı bağımsız değişkenler ile iki ayrı optimizasyon hesaplaması gerçekleştirilmiştir. Propolis ekstraksiyonunun optimizasyonu çalışmasında kullanılan bağımsız değişkenlerin seviyeleri Tablo 3.4'te verilmiştir. Optimizasyonda bir yanıt yüzey yöntemi olan merkezi kompozit tasarım kullanılmıştır. Çalışmada deneme deseni için belirlenen sıcaklık değerlerinde en yüksek uygulama noktası çalışmada kullanılacak olan ultrasonik banyonun çıkabileceği en üst sıcaklık olan 80° C olarak seçilmiştir. Kullanılacak olan ultrasonik banyoda soğutma opsiyonu olmaması sebebiyle oda sıcaklığının altındaki sıcaklıkta çalışma yapılamamış ve en düşük çalışma noktası 20 °C olarak seçilmiştir.

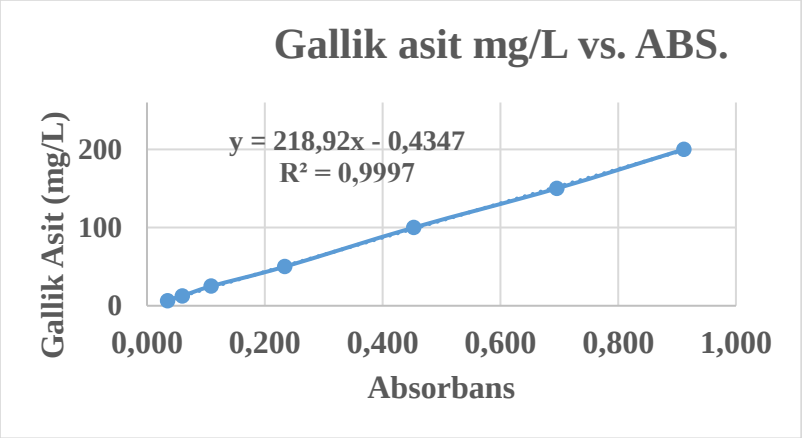
Tablo 3.4 Ekstraksiyon çalışmalarındaki bağımsız değişkenler

Bağımsız	Kodlanmış	Kodlanmış Seviyeler				
Değişkenler	Sembol	-1,68179	-1	0	1	1,68179
Süre (dk)	X_1	20	40	80	110	135
Sıcaklık (°C)	X_2	20	30	55	70	80
Ultrason Genliği (%)	X_3	50	20	50	80	100

Toplam fenolik içerik analizleri ISO/DIS 24381 arı propolisinin-teknik özellikleri dokümanında tanımlanan analiz yöntemleri kullanılarak ölçülmüştür (Uluslararası Standardizasyon Örgütü, 2023). Toplam fenolik içerik analizinde standart olarak kullanılan gallik asit için kalibrasyon verileri Tablo 3.5'te ve kalibrasyon eğrisi Şekil 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.5 Kalibrasyon standardı gallik asit için kalibrasyon verileri

ABS	Nihai Konsantrason (mg/L)
0,035	6,25
0,060	12,5
0,109	25
0,234	50
0,453	100
0,696	150
0,912	200

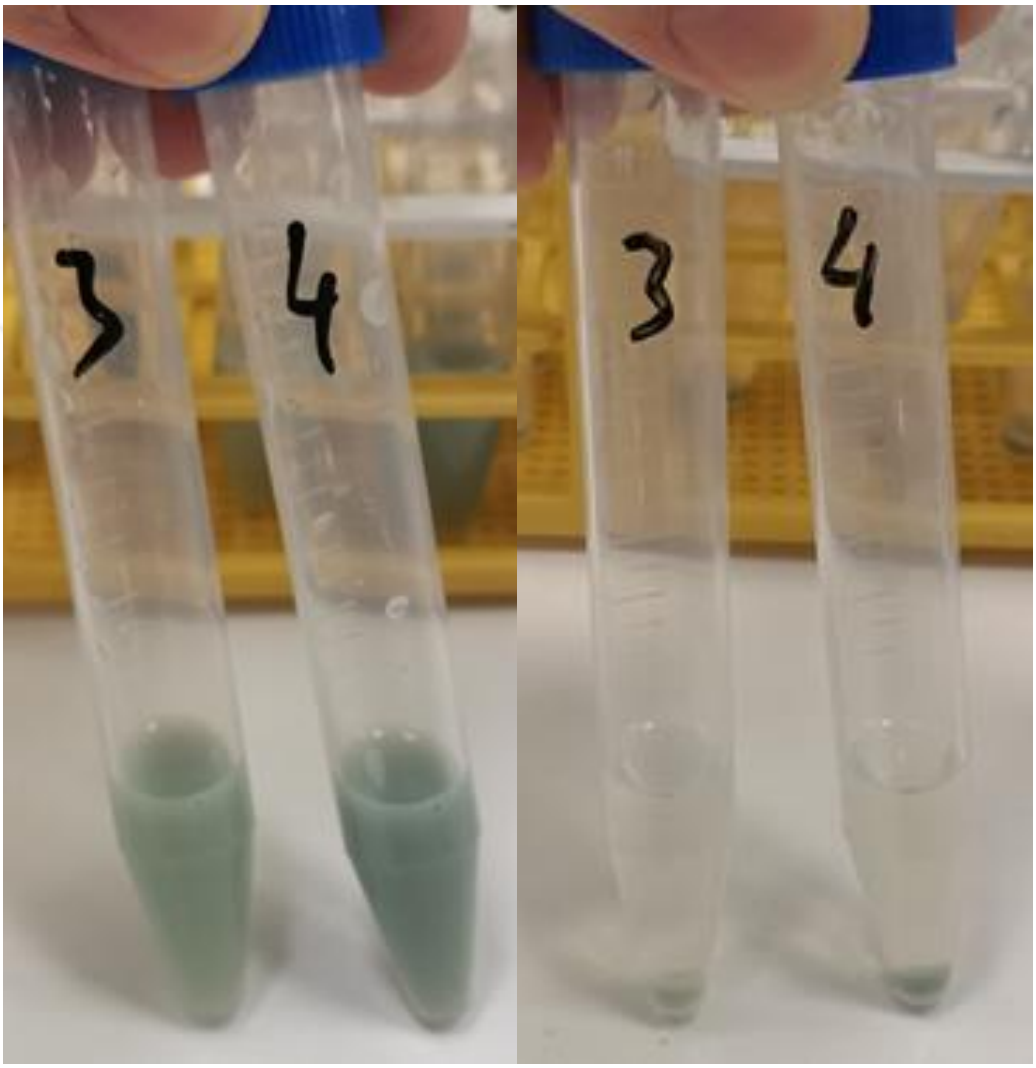


Şekil 3.3 Kalibrasyon standardı gallik asit için kalibrasyon grafiği

Minitab V 21.1.1 istatistik yazılımı kullanılarak merkezi kompozit tasarıma uygun şekilde belirlenen her bir deneme adımı ve bu adımlarda her bir NADES ve konvensiyonel referans çözücüler olarak seçilen saf su ve %80 etil alkol çözeltileri ile gerçekleştirilmiş ekstraksiyonlardan elde edilen toplam fenolik içerik değerleri ve aynı yazılım kullanılarak elde edilen ampirik model uygulanarak tahminlenen "tahmini toplam fenolik içerik" değerleri Tablo A4 ile Tablo A8 arasındaki tablolarda verilmiştir (Minitab LLC, 2022).

Bu çalışmada optimizasyon denemesi için seçilen doğal derin ötektik çözücülerden 57 numaralı çözücü (Kolin Klorür:Ksilitol:Malik asit 1:1:1 15% w/w su karışımı)

toplam fenolik içerik analizinde Folin Ciocalteu reaktifi ile çökelti oluşturduğu için elde edilen çözelti herhangi bir absorbans değeri vermemiştir. Bu sebeple herhangi bir sonuç hesaplanamamıştır. NADES 57 ile Folin Ciocalteu reaktifi karışımının santrifüj öncesi görünümü ile santrifüj sonrası oluşan çökeltiye ait görünüm Şekil 3.4'te gösterilmiştir.



Şekil 3.4 NADES 57 folin ciocalteu reaktifi karışımı santrifüj öncesi/sonrası görünümü

Minitab V 21.1.1 istatistik yazılımı kullanılarak belirlenen bağımsız değişken seviyelerine uygun şekilde gerçekleştirilen ekstraksiyonlarla ham propolis numunesinden ekstrakte edilen toplam fenolik içerik değerleri yine aynı istatistik yazılımı kullanılarak istatistiksel değerlendirmeye tabii tutulmuştur. Elde edilen ANOVA sonuçları Tablo 3.6 ile Tablo 3.10 arasındaki tablolarda verilmiştir (Minitab LLC,2022).

Tablo 3.6 NADES 76 için toplam fenolik içerik ANOVA tablosu

Kaynak	**DF**	**Seq SS**	**Katkı**	**Adj SS**	**Adj MS**	**F-Değ.**	**P-Değ.**
Model	10	6267164	0,9736	6267164	626716	180,56	0,000
Sabit	1	906381	0,1408	566690	566690	163,27	0,000
Birinci derece	3	4854467	0,7541	3969852	1323284	381,24	0,000
Süre	1	2088175	0,3244	800956	800956	230,76	0,000
Sıcaklık	1	1168509	0,1815	1096853	1096853	316,01	0,000
Genlik	1	1597783	0,2482	1281711	1281711	369,27	0,000
İkinci derece	3	316117	0,0491	330655	110218	31,75	0,000
Süre * Süre	1	45814	0,0071	10049	10049	2,90	0,095
Sıcaklık * Sıcaklık	1	220791	0,0343	244765	244765	70,52	0,000
Genlik * Genlik	1	49513	0,0077	53158	53158	15,32	0,000
Etkileşim	3	190199	0,0295	190199	63400	18,27	0,000
Süre * Sıcaklık	1	15588	0,0024	15588	15588	4,49	0,039
Süre * Genlik	1	63894	0,0099	11069	11069	3,19	0,080
Sıcaklık * Genlik	1	110717	0,0172	110717	110717	31,90	0,000
Hata	49	170077	0,0264	170077	3471		
Uyum Eksikliği	5	26633	0,0041	26633	5327	1,63	0,171
Saf Hata	44	143444	0,0223	143444	3260		
Toplam	59	6437241	1				

Tablo 3.7 NADES 62 için toplam fenolik içerik ANOVA tablosu

Kaynak	**DF**	**Seq SS**	**Katkı**	**Adj SS**	**Adj MS**	**F-Değ.**	**P-Değ.**
Model	10	44884701	0,653	44884701	4488470	9,21	0,000
Sabit	1	2666363	0,039	1239103	1239103	2,54	0,117
Birinci derece	3	39297848	0,571	28664389	9554796	19,60	0,000
Süre	1	13258776	0,193	3859705	3859705	7,92	0,007
Sıcaklık	1	21766656	0,317	15575477	15575477	31,95	0,000
Genlik	1	4272416	0,062	2332722	2332722	4,78	0,034
İkinci derece	3	2435637	0,035	2685274	895091	1,84	0,153
Süre * Süre	1	691624	0,010	789540	789540	1,62	0,209
Sıcaklık * Sıcaklık	1	49774	0,001	5825	5825	0,01	0,913
Genlik * Genlik	1	1694238	0,025	1588097	1588097	3,26	0,077
Etkileşim	3	484854	0,007	484854	161618	0,33	0,803
Süre * Sıcaklık	1	312242	0,005	312242	312242	0,64	0,427
Süre * Genlik	1	106886	0,002	41232	41232	0,08	0,772
Sıcaklık * Genlik	1	65725	0,001	65725	65725	0,13	0,715
Hata	49	23889452	0,347	23889452	487540		
Uyum Eksikliği	5	3827437	0,056	3827437	765487	1,68	0,160
Saf Hata	44	20062015	0,292	20062015	455955		
Toplam	59	68774153	1,000				

Tablo 3.8 NADES 58 için toplam fenolik içerik ANOVA tablosu

Kaynak	**DF**	**Seq SS**	**Katkı**	**Adj SS**	**Adj MS**	**F-Değ.**	**P-Değ.**
Model	10	8972938	0,980	8972938	897294	235,37	0,000
Sabit	1	709068	0,077	1051993	1051993	275,95	0,000
Birinci derece	3	6597021	0,720	3747949	1249316	327,71	0,000
Süre	1	3536466	0,386	1507880	1507880	395,54	0,000
Sıcaklık	1	2104412	0,230	748371	748371	196,31	0,000
Genlik	1	956142	0,104	585859	585859	153,68	0,000
İkinci derece	3	907568	0,099	1557962	519321	136,23	0,000
Süre * Süre	1	134712	0,015	633863	633863	166,27	0,000
Sıcaklık * Sıcaklık	1	398264	0,044	881359	881359	231,19	0,000
Genlik * Genlik	1	374593	0,041	449305	449305	117,86	0,000
Etkileşim	3	759281	0,083	759281	253094	66,39	0,000
Süre * Sıcaklık	1	756384	0,083	756384	756384	198,41	0,000
Süre * Genlik	1	2343	0,000	2887	2887	0,76	0,388
Sıcaklık * Genlik	1	554	0,000	554	554	0,15	0,705
Hata	49	186799	0,020	186799	3812		
Uyum Eksikliği	5	39140	0,004	39140	7828	2,33	0,058
Saf Hata	44	147659	0,016	147659	3356		
Toplam	59	9159737	1,000				

Tablo 3.9 Saf su için toplam fenolik içerik ANOVA tablosu

Kaynak	**DF**	**Seq SS**	**Katkı**	**Adj SS**	**Adj MS**	**F-Değ.**	**P-Değ.**
Model	10	1584024	0,984	1584024	158402	308,14	0,000
Sabit	1	85058	0,053	32838	32838	63,88	0,000
Birinci derece	3	1213203	0,754	674843	224948	437,59	0,000
Süre	1	459995	0,286	1661	1661	3,23	0,078
Sıcaklık	1	705629	0,439	594670	594670	1156,81	0,000
Genlik	1	47579	0,030	866	866	1,68	0,200
İkinci derece	3	196363	0,122	129859	43286	84,21	0,000
Süre * Süre	1	137443	0,085	103584	103584	201,50	0,000
Sıcaklık * Sıcaklık	1	58860	0,037	47733	47733	92,85	0,000
Genlik * Genlik	1	60	0,000	40	40	0,08	0,781
Etkileşim	3	89400	0,056	89400	29800	57,97	0,000
Süre * Sıcaklık	1	405	0,000	405	405	0,79	0,379
Süre * Genlik	1	79257	0,049	49216	49216	95,74	0,000
Sıcaklık * Genlik	1	9738	0,006	9738	9738	18,94	0,000
Hata	49	25189	0,016	25189	514		
Uyum Eksikliği	5	2742	0,002	2742	548	1,07	0,387
Saf Hata	44	22447	0,014	22447	510		
Toplam	59	1609212	1,000				

Tablo 3.10 %80 Etanol için toplam fenolik içerik ANOVA tablosu

Kaynak	**DF**	**Seq SS**	**Katkı**	**Adj SS**	**Adj MS**	**F-Değ.**	**P-Değ.**
Model	10	142883250	0,988	142883250	14288325	408,05	0,000
Sabit	1	3334735	0,023	3815604	3815604	108,97	0,000
Birinci derece	3	51012935	0,353	22394583	7464861	213,18	0,000
Süre	1	815	0,000	382842	382842	10,93	0,002
Sıcaklık	1	10760986	0,074	4200879	4200879	119,97	0,000
Genlik	1	40251134	0,278	16547971	16547971	472,58	0,000
İkinci derece	3	61985220	0,429	61114957	20371652	581,78	0,000
Süre * Süre	1	5344789	0,037	10186785	10186785	290,92	0,000
Sıcaklık * Sıcaklık	1	11883232	0,082	16142550	16142550	461,00	0,000
Genlik * Genlik	1	44757199	0,310	45650891	45650891	1303,7	0,000
Etkileşim	3	26550360	0,184	26550360	8850120	252,74	0,000
Süre * Sıcaklık	1	1435284	0,010	1435284	1435284	40,99	0,000
Süre * Genlik	1	7895309	0,055	991966	991966	28,33	0,000
Sıcaklık * Genlik	1	17219767	0,119	17219767	17219767	491,77	0,000
Hata	49	1715796	0,012	1715796	35016		
Uyum Eksikliği	5	328593	0,002	328593	65719	2,08	0,085
Saf Hata	44	1387203	0,010	1387203	31527		
Toplam	59	144599046	1,000				

ANOVA tablosundaki katkı değeri, her bir kaynağın yanıttaki toplam varyasyona yaptığı katkının yüzdesini göstermektedir. Yüzdenin yüksek olması, kaynağın yanıt değişkenindeki varyasyonun daha fazlasını açıkladığını göstermektedir. Yanıt yüzeyi modeli için katkı yüzdesi, R^2 değeri ile aynıdır. Modelin yanıttaki varyasyonu açıklayıp açıklamadığını belirlemek için, sıfır hipotezini değerlendirmek üzere modelin p-değeri önem düzeyi ile karşılaştırılır. Model için sıfır hipotezi, modelin yanıttaki varyasyonların hiçbirini açıklamamasıdır. Bu çalışmada 0,05'lik bir anlamlılık düzeyi ile çalışılmıştır, p-değerinin anlamlılık düzeyi olan 0,05'den küçük veya ona eşit olması, modelin yanıttaki değişimi açıkladığı sonucunu gösterir. Aksi durumda modelin yanıttaki değişimi açıkladığı sonucuna varmak için yeterli kanıt olmadığına karar verilir.

Modelin yanıt ile parametreler arasındaki ilişkiyi doğru bir şekilde belirtip belirtmediğini belirlemek amacıyla, uyum eksikliği testinin p değeri anlamlılık düzeyi ile karşılaştırılmıştır. Uyum eksikliği testi için sıfır hipotezi, modelin yanıt ile parametreler arasındaki ilişkiyi doğru bir şekilde belirttiğidir. Uyum eksikliği testi için p-değerinin 0,05'in altında olması null hipotezini reddedeceği için modelin yanıt ile parametreler arasındaki ilişkiyi doğru bir şekilde belirtmediği sonucuna varılır.

R^2, model tarafından açıklanan yanıttaki varyasyon yüzdesidir. Modelin verilere ne kadar iyi uyduğunu belirlemek için R^2 kullanılır. R^2 değeri ne kadar yüksek olursa, model verilere o kadar iyi uymaktadır. Düzeltilmiş R^2 (Adj. R^2) model tarafından açıklanan yanıttaki varyasyonun, gözlem sayısına ve modeldeki parametre sayısına göre ayarlanması ile hesaplanmaktadır. Öngörülen R^2 (Pred. R^2), sistematik olarak veri setinden her bir gözlemi tek tek çıkarmaya, regresyon denklemini tahmin etmeye ve modelin çıkarılan gözlemi ne kadar iyi tahmin ettiğini belirlemeye eşdeğer bir formülle hesaplanır. R^2 ve düzeltilmiş R^2 değerlerinin birbirlerine yakın olması modellerin istatistiksel olarak önemsiz terimleri içermediğini göstermektedir (Myers & Montgomery, 1995; Minitab LLC, 2022).

Elde edilen optimizasyon modellerin değerlendirmesine ilişkin özet veriler Tablo 3.11'de verilmiştir. Her bir ekstraksiyon çözücüsü için ayrı ayrı olmak üzere regresyon analizi sonucunda elde edilen toplam fenolik içerik değerini işaret eden kuadratik modeller ise değişkenler cinsinden Tablo 3.12'de verilmiştir.

Tablo 3.11 Çözücüler için toplam fenolik içerik model özeti tablosu

Çözücü	S	R^2	Adj. R^2	Pred. R^2	PRESS
NADES 76	58,915	97,36%	96,82%	96,10%	251374
NADES 62	698,24	65,26%	58,17%	48,09%	35703589
NADES 58	61,743	97,96%	97,54%	96,74%	299025
Saf Su	22,673	98,43%	98,12%	97,63%	38062,5
%80 Etanol	187,13	98,81%	98,57%	98,18%	2638281

NADES 76 için regresyon katsayısının (R^2) 0,974 olduğu ve modelin hesaplanan p-değeri 0,171 ile uyum eksikliği göstermediği tespit edilmiş, regresyon katsayısı da %95 güven aralığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. (Adj. R^2) (0,968) ve (Pred. R^2) (0,961) değerleri birbirleri ile uyumludur. Modeli süre, sıcaklık ve genlik terimleri birinci dereceden %75,4 oranında açıklamaktadır. İkinci derece terimlerden süre*süre ve etkileşim terimlerinden süre*genlik terimleri hariç tüm terimlerin modele katkısı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

NADES 62 için regresyon katsayısının (R^2) 0,653 olduğu ve modelin hesaplanan p-değeri 0,160 ile uyum eksikliği göstermediği tespit edilmiş, regresyon katsayısı da %95 güven aralığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. (Adj. R^2) (0,582) ve (Pred. R^2) (0,481) değerleri birbirlerinden diğer modellere göre daha farklı bulunmuştur. Modeli süre, sıcaklık ve genlik terimleri birinci dereceden %57,1 oranında açıklamaktadır. İkinci derece terimler ve etkileşim terimlerinin modele katkısı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

NADES 58 için regresyon katsayısının (R^2) 0,980 olduğu ve modelin hesaplanan p-değeri 0,058 ile uyum eksikliği göstermediği tespit edilmiş, regresyon katsayısı da %95 güven aralığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. (Adj. R^2) (0,968) ve (Pred. R^2) (0,961) değerleri birbirleri ile uyumludur. Modeli süre, sıcaklık ve genlik terimleri birinci dereceden %72,0 oranında açıklamaktadır. Etkileşim terimlerinden süre*genlik ve sıcaklık*genlik terimleri hariç tüm terimlerin modele katkısı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Ultra Saf Su için regresyon katsayısının (R^2) 0,984 olduğu ve modelin hesaplanan p-değeri 0,387 ile uyum eksikliği göstermediği tespit edilmiş, regresyon katsayısı da %95 güven aralığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. (Adj. R^2) (0,982) ve (Pred R^2) (0,976) değerleri birbirleri ile uyumludur. Modeli birinci derece

terimlerden sıcaklık, ikinci derece terimlerden süre*süre ve sıcaklık*sıcaklık etkileşim terimlerinden süre*genlik ve sıcaklık*genlik terimleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde açıklamaktadır. Kalan tüm terimlerin modele katkısı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

%80 Etil Alkol için regresyon katsayısının (R^2) 0,988 olduğu ve modelin hesaplanan p-değeri 0,085 ile uyum eksikliği göstermediği tespit edilmiş, regresyon katsayısı da %95 güven aralığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. (Adj. R^2) (0,986) ve (Pred. R^2) (0,982) değerleri birbirleri ile uyumludur. Modeli birinci derece, ikinci derece ve etkileşim terimlerinin tamamı istatistiksel olarak anlamlı şekilde açıklamaktadır. Modele en büyük katkıyı genlik teriminin birinci ve ikinci derece terimleri göstermiştir.

Tablo 3.12 Regresyon analizi sonucunda elde edilen kuadratik modeller

Çözücü	**Önerilen Model**
NADES 76	TPİ= $177,1+10,24*X_1-7,27*X_2+10,43*X_3-0,01275*X_1^2+0,2558*X_2^2+0,0395*X_3^2-0,0447*X_1X_2-0,0212*X_1X_3-0,1211*X_2X_3$
NADES 62	TPİ= $270+11,7*X_1+19,2*X_2-18,5*X_3-0,1130*X_1^2+0,039*X_2^2+0,216*X_3^2+0,200*X_1X_2+0,041*X_1X_3+0,093*X_2X_3$
NADES 58	TPİ= $-1084+1,78*X_1+41,67*X_2+16,30*X_3-0,10125*X_1^2+0,4855*X_2^2-0,1150*X_3^2+0,3117*X_1X_2+0,0108*X_1X_3-0,0086*X_2X_3$
Ultra Saf Su	TPİ= $504-6,426*X_1-6,07*X_2-3,946*X_3+0,04093*X_1^2+0,1130*X_2^2+0,00108*X_3^2+0,00721*X_1X_2+0,04461*X_1X_3+0,03592*X_2X_3$
%80 Etil Alkol	TPİ= $13981-33,05*X_1-281,44*X_2-175,29*X_3+0,4059*X_1^2+2,0777*X_2^2+1,1588*X_3^2-0,4294*X_1X_2+0,2003*X_1X_3+1,5104*X_2X_3$

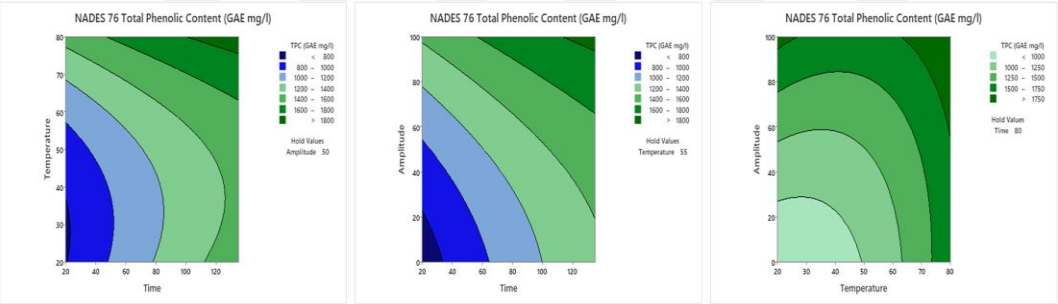
İstatistiksel değerlendirmelerin yapıldığı Minitab V 21.1.1 yazılımının yanıt yüzey metodolojisi kullanılarak geliştirilen ve Tablo 3.12'de verilen modeller için oluşturduğu toplam fenolik içerik optimizasyon çözümleri Tablo 3.13'te verilmiştir. Bu tabloda tüm çözücülerde maksimum toplam fenolik içerik değerine ulaşılabilmesi için önerilen sıcaklık değeri çalışmalarda kullanılan en üst sıcaklık değeri olan 80 °C ve tüm çözücüler için önerilen süre denemelerde kullanılan en uzun süre olan 135 dakika olarak bulunmuştur. Maksimum toplam fenolik içerik

değerine ulaşılabilmesi için önerilen ultrason genlik değerinin NADES 58 hariç diğer tüm çözücüler için %100 olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 3.13 Toplam fenolik içerik optimizasyon çözümleri

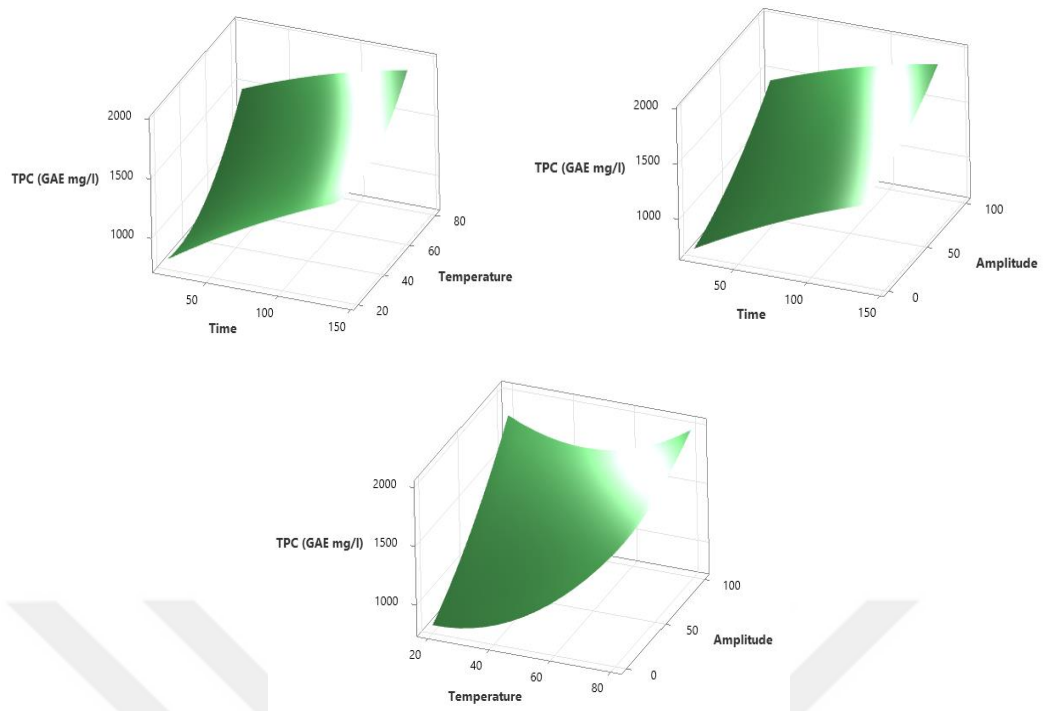
Çözücü	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Genlik (%)	TPİ (mg GAE/L)
NADES 76	80,0	135,0	100,0	2083,8
NADES 62	80,0	135,0	100,0	5344,3
NADES 58	80,0	135,0	74,7	1537,9
Ultrasaf Su	80,0	135,0	100,0	1203,4
%80 Etilalkol	80,0	135,0	100,0	11907,6

Her bir çözücü için çalışmada kullanılan bağımsız değişkenlerin (süre, sıcaklık ve ultrason genliği) toplam fenolik içeriğine nasıl etki ettiğini gösteren kontur grafikleri ve yanıt yüzey grafikleri çizilmiştir.

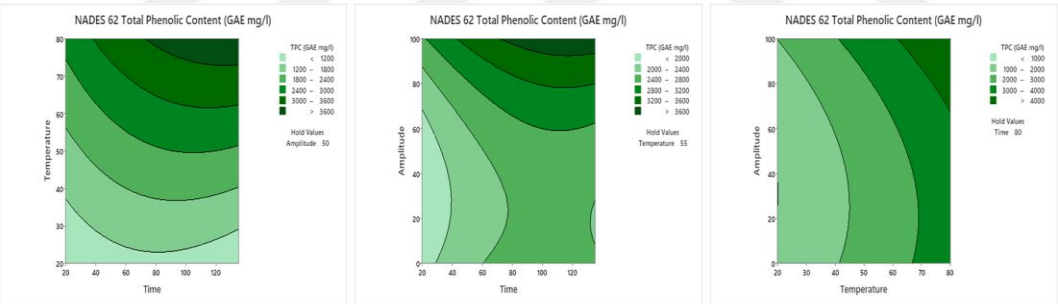


Şekil 3.5 NADES 76 için toplam fenolik içerik değerine sıcaklık, süre ve ultrason genliği değerlerinin katkısını gösteren kontur grafikleri

İstatistiksel değerlendirmelerin yapıldığı Minitab V 21.1.1 yazılımının yanıt yüzey metodolojisi kullanılarak geliştirdiği ve Tablo 3.12'de verilen model, Tablo 3.6'da verilen ANOVA tablosu, Şekil 3.5'te verilen kontur grafikleri ve Şekil 3.6'da verilen yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde, NADES 76 ile gerçekleştirilen propolis ekstraksiyonlarından elde edilen ekstraktların toplam fenolik içeriklerinin, süre ve ultrason genliği değerlerinde oluşan değişimlerden pozitif yönlü lineer olarak etkilendiği ve sıcaklık değişiminden ise pozitif yönlü ikinci dereceden etkilendiği görülmektedir.



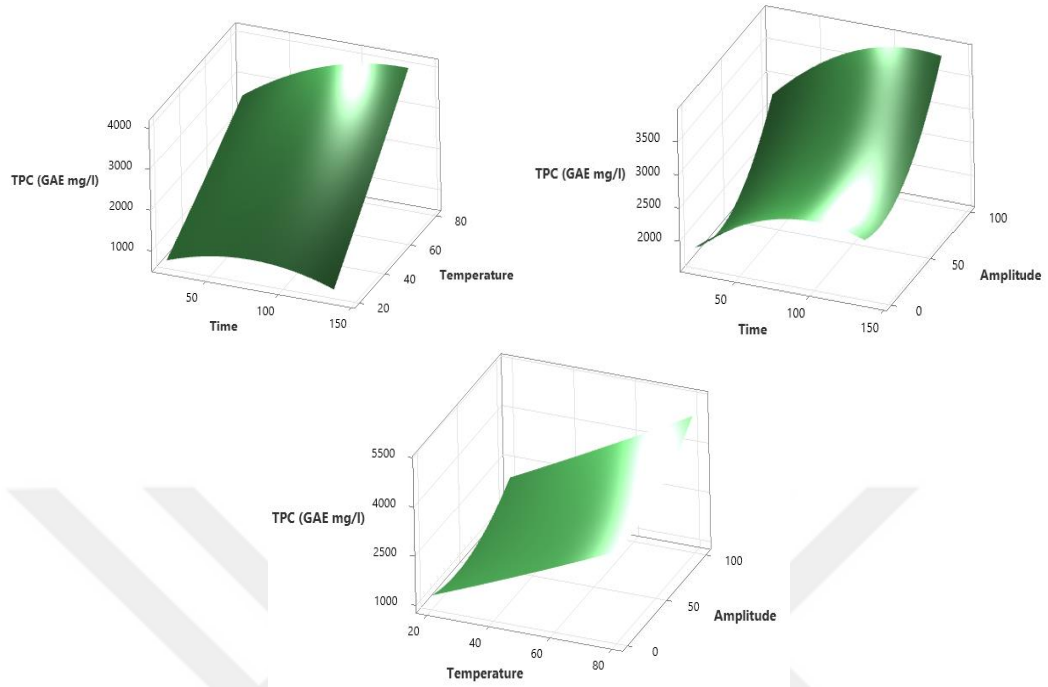
Şekil 3.6 NADES 76 için toplam fenolik içeriğine sıcaklık, ultrason genliği ve süre değerlerinin katkısını gösteren yanıt yüzey grafikleri



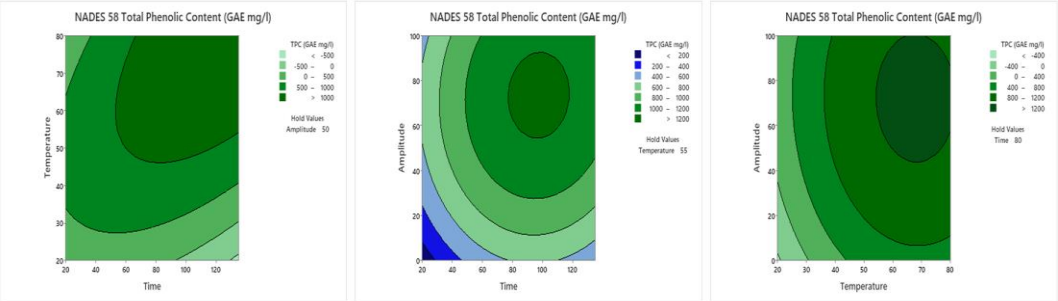
Şekil 3.7 NADES 62 için toplam fenolik içerik değerine sıcaklık, süre ve ultrason genliği değerlerinin katkısını gösteren kontur grafikleri

Tablo 3.12'de verilen model, Tablo 3.7'de verilen ANOVA tablosu, Şekil 3.7'de verilen kontur grafikleri ve Şekil 3.8'de verilen yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde, NADES 62 ile gerçekleştirilen propolis ekstraksiyonlarından elde edilen ekstraktların toplam fenolik içeriklerinin, sıcaklık değerinde oluşan değişimlerden pozitif yönlü lineer olarak etkilendiği ultrason genliği değeri düşük ve yüksek değerler aldığında toplam fenolik içerik değeri maksimum değerine ulaşacak şekilde yanıt üzerinde etkili olduğu ayrıca sürenin pozitif yönlü değişiminin toplam fenolik içerik değerini pozitif yönlü etkilediği tespit edilmiştir.

Ancak sürenin çok uzamasının toplam fenolik içerik değerine olan marjinal etkisi düşük olmuş ve toplam fenolik içeriğinin doygunluğa ulaştığı görülmüştür.



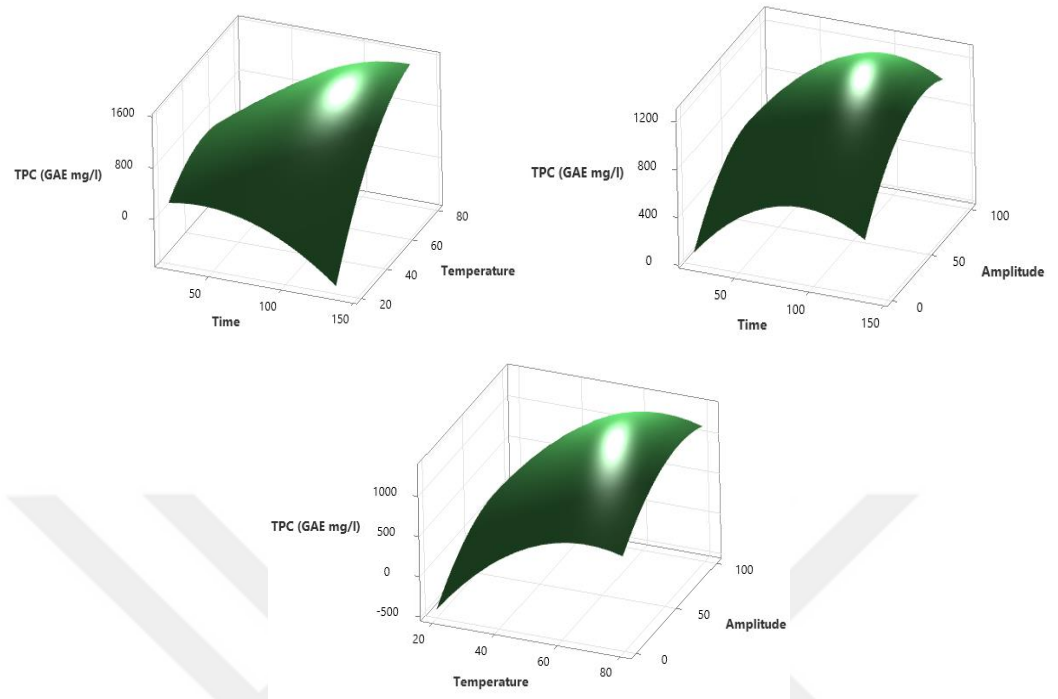
Şekil 3.8 NADES 62 için toplam fenolik içeriğine sıcaklık, ultrason genliği ve süre değerlerinin katkısını gösteren yanıt yüzey grafikleri



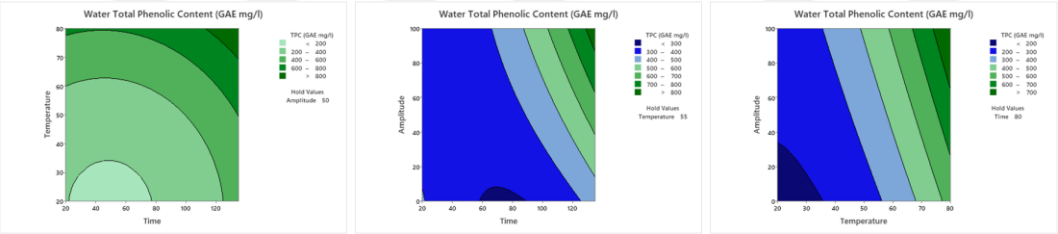
Şekil 3.9 NADES 58 için toplam fenolik içerik değerine sıcaklık, süre ve ultrason genliği değerlerinin katkısını gösteren kontur grafikleri

Tablo 3.12'de verilen model, Tablo 3.8'de verilen ANOVA tablosu, Şekil 3.9'da verilen kontur grafikleri ve Şekil 3.10'da verilen yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde, NADES 58 ile gerçekleştirilen propolis ekstraksiyonlarından elde edilen ekstraktların toplam fenolik içeriklerinin, sıcaklık değerinde oluşan değişimlerden pozitif yönlü lineer olarak etkilendiği, ultrason genliği değeri düşük ve yüksek değerler aldığında toplam fenolik içerik değeri minimum değerine ulaşacak şekilde yanıt üzerinde etkili olduğu ayrıca sürenin pozitif yönlü değişiminin toplam fenolik içerik değerini pozitif yönlü etkilediği tespit edilmiştir.

Ancak sürenin çok uzamasının toplam fenolik içerik değerine olan marjinal etkisi düşük olmuş ve toplam fenolik içeriğinin doygunluğa ulaştığı görülmüştür.

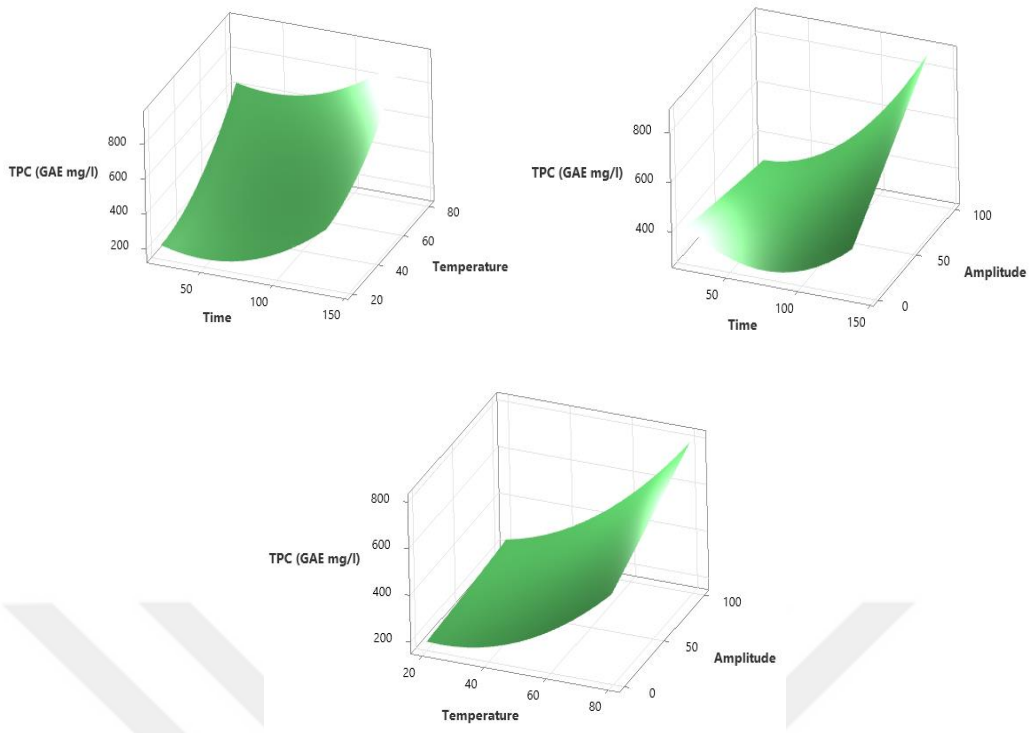


Şekil 3.10 NADES 58 için toplam fenolik içeriğine sıcaklık**,** ultrason genliği ve süre değerlerinin katkısını gösteren yanıt yüzey grafikleri

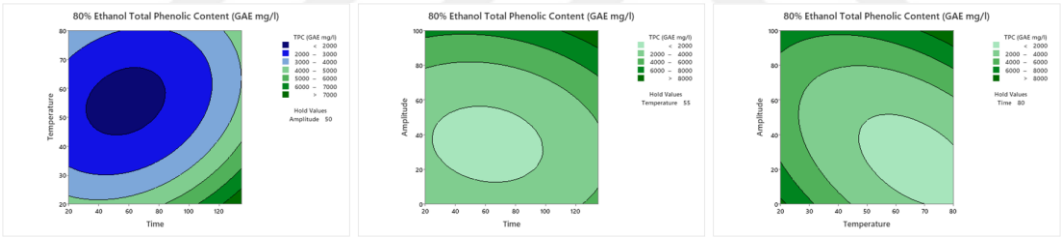


Şekil 3.11 Saf su için toplam fenolik içerik değerine sıcaklık, süre ve ultrason genliği değerlerinin katkısını gösteren kontur grafikleri

Tablo 3.12'de verilen model, Tablo 3.9'da verilen ANOVA tablosu, Şekil 3.11'de verilen kontur grafikleri ve Şekil 3.12'de verilen yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde, Saf su ile gerçekleştirilen propolis ekstraksiyonlarından elde edilen ekstraktların toplam fenolik içeriklerinin, sıcaklık ve süre değerinde oluşan değişimlerden pozitif yönlü kuadratik olarak etkilendiği ve ultrason genliği değerinin etkisinin ise pozitif yönlü lineer olduğu görülmüştür.

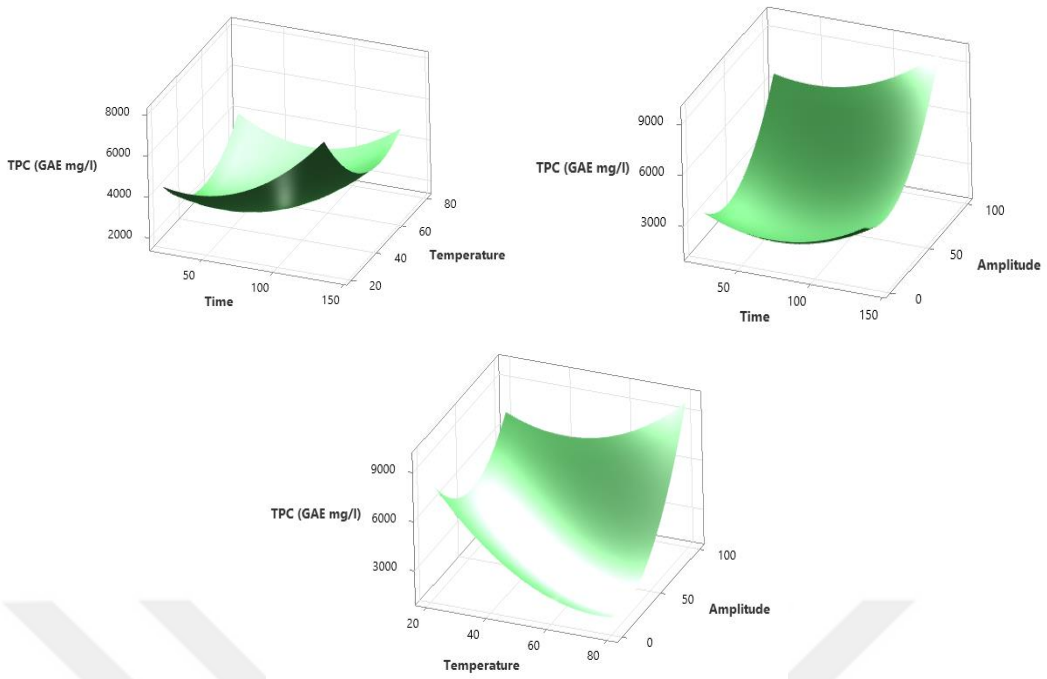


Şekil 3.12 Saf su için toplam fenolik içeriğine sıcaklık**,** ultrason genliği ve süre değerlerinin katkısını gösteren yanıt yüzey grafikleri



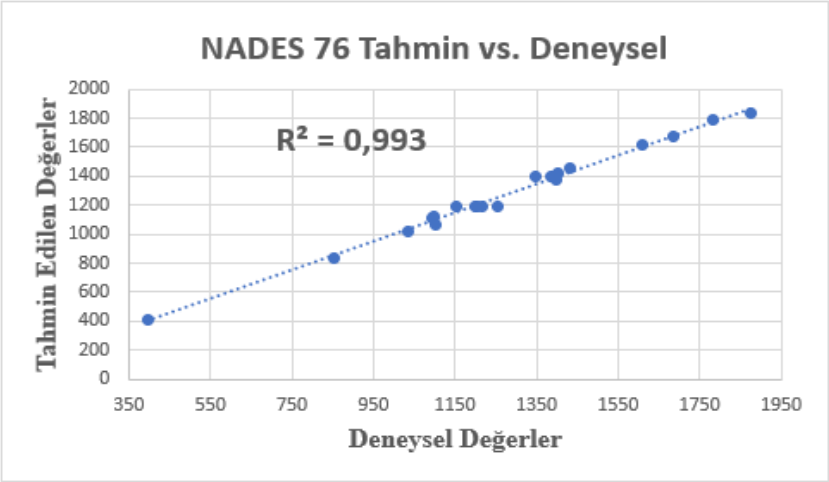
Şekil 3.13 %80 Etanol için toplam fenolik içerik değerine sıcaklık, süre ve ultrason genliği değerlerinin katkısını gösteren kontur grafikleri

Tablo 3.12'de verilen model, Tablo 3.10'da verilen ANOVA tablosu, Şekil 3.13'de verilen kontur grafikleri ve Şekil 3.14'te verilen yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde, %80 etanol ile gerçekleştirilen propolis ekstraksiyonlarından elde edilen ekstraktların toplam fenolik içerikleri, sıcaklık ve süre parametreleri düşük ve yüksek değerler aldığında toplam fenolik içerik değeri maksimum değerine ulaşacak şekilde yanıt üzerinde etkili olduğu ve toplam fenolik içerik değerinin ultrason genliği parametresinden ise pozitif yönlü kuadratik olarak etkilendiği tespit edilmiştir.

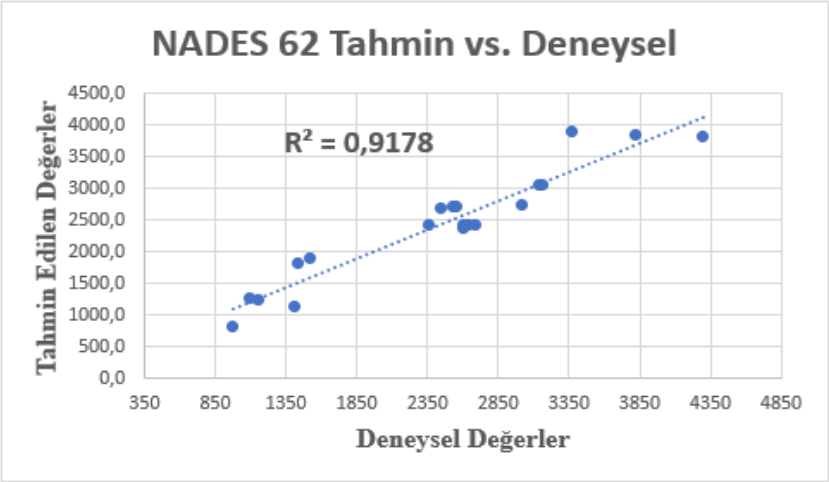


Şekil 3.14 %80 Etanol için toplam fenolik içeriğine sıcaklık, ultrason genliği ve süre değerlerinin katkısını gösteren yanıt yüzey grafikleri

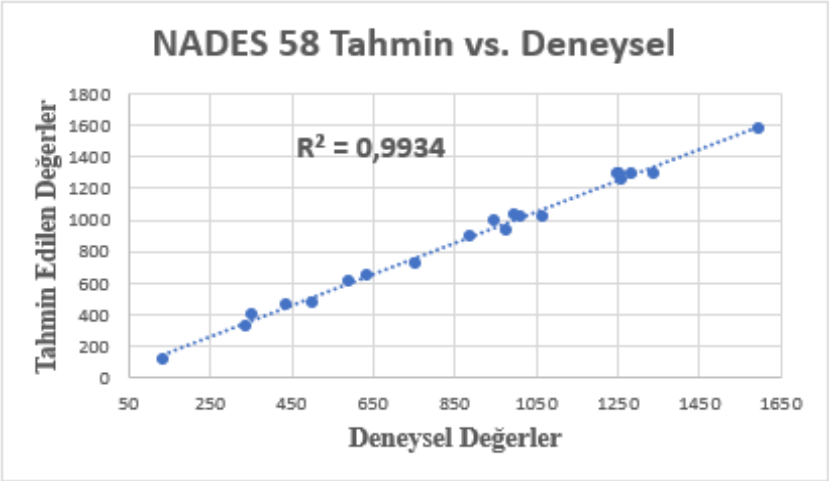
İstatistiksel değerlendirmelerin yapıldığı Minitab V 21.1.1 yazılımının yanıt yüzey metodolojisi kullanılarak her bir deneme noktası için tahminlenen toplam fenolik içerik değerleri ile o noktalarda elde edilen gerçek toplam fenolik içerik değerlerinden oluşturulan grafikler NADES 76, NADES 62, NADES 58, saf su ve %80 etanol için sırasıyla Şekil 3.15, Şekil 3.16, Şekil 3.17, Şekil 3.18 ve Şekil 3.19'da verilmiştir. Bu grafikler incelendiğinde, tüm çözücü türleri için deneysel değerler ile tahmin edilen değerler arasında iyi bir korelasyon olduğunu görülmektedir. Elde edilen R^2 değerleri sırasıyla 0,993; 0,918; 0,993; 0,998 ve 0,997 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar varyans analizi sonuçları ile de paralellik göstermektedir.



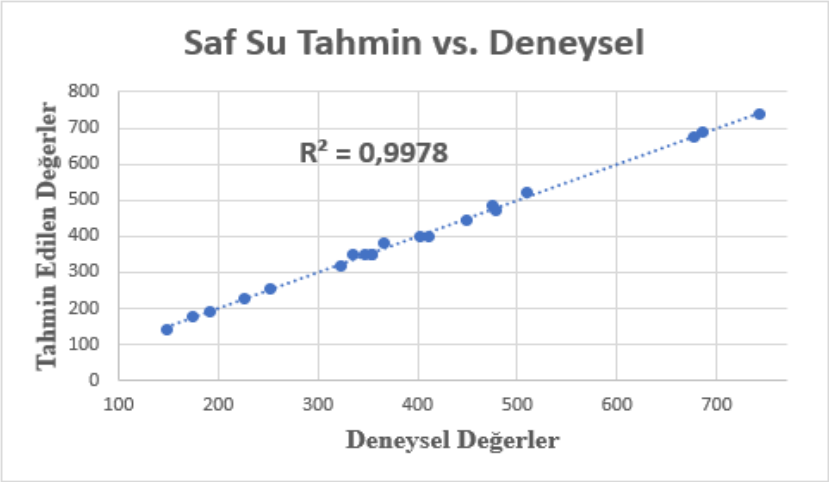
Şekil 3.15. NADES 76 için deneysel ile tahminlenen değerlerin ilişkisi



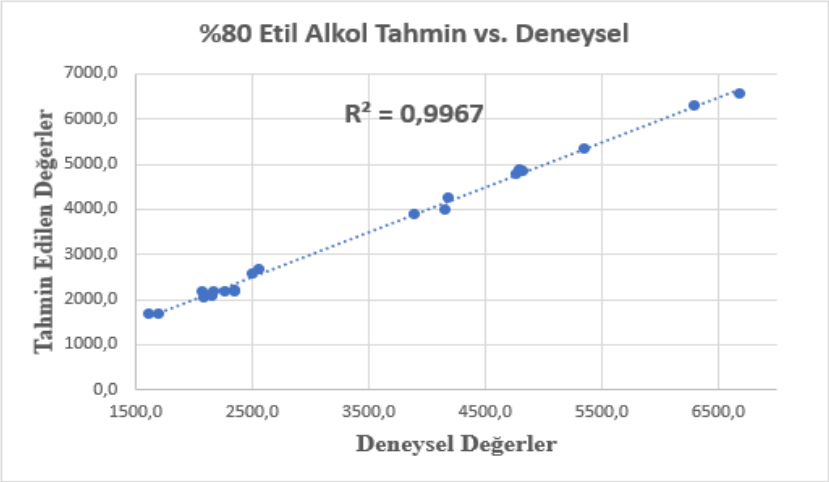
Şekil 3.16. NADES 62 için deneysel ile tahminlenen değerlerin ilişkisi



Şekil 3.17. NADES 58 için deneysel ile tahminlenen değerlerin ilişkisi



Şekil 3.18. Saf su için deneysel ile tahminlenen değerlerin ilişkisi



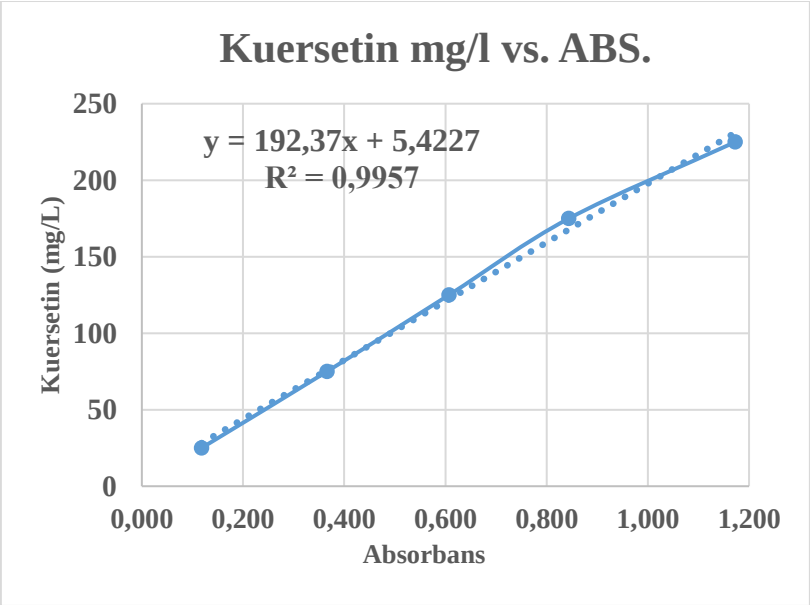
Şekil 3.19. %80 Etanol için deneysel ile tahminlenen değerlerin ilişkisi

3.4.2 Toplam Flavonoid İçerik Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirilmesi

Toplam fenolik içerik değerine göre gerçekleştirilen optimizasyon çalışmasının ardından bağımsız değişkenler olarak sıcaklık, süre ve ultrason genliği ve bağımlı değişken olarak toplam flavonoid içerik değerlerinin alındığı bir optimizasyon çalışması daha gerçekleştirilmiştir. Propolis ekstraksiyonunun optimizasyonu çalışmasında kullanılan bağımsız değişkenlerin seviyeleri Tablo 3.4'te verilmiştir. Toplam flavonoid içerik analizleri ISO/DIS 24381 arı propolisinin-teknik özellikleri dokümanında tanımlanan analiz yöntemleri kullanılarak ölçülmüştür (Uluslararası Standardizasyon Örgütü, 2023). Toplam flavonoid içerik analizinde standart olarak kullanılan kersetin için kalibrasyon verileri Tablo 3.14'de ve kalibrasyon eğrisi Şekil 3.20'de verilmiştir.

Tablo 3.14 Kalibrasyon standardı kersetin için kalibrasyon verileri

ABS	Nihai Konsantrason (mg/L)
0,118	25
0,366	75
0,607	125
0,844	175
1,173	225



Şekil 3.20 Kalibrasyon standardı kersetin için kalibrasyon grafiği

Minitab V 21.1.1 istatistik yazılımı kullanılarak merkezi kompozit tasarıma uygun şekilde belirlenen her bir deneme adımı ve bu adımlarda her bir NADES ve konvensiyonel referans çözücüler olarak seçilen saf su ve %80 etil alkol çözeltileri ile gerçekleştirilmiş ekstraksiyonlardan elde edilen toplam flavonoid içerik değerleri ile aynı yazılım kullanılarak elde edilen ampirik model uygulanarak tahminlenen "tahmini toplam flavonoid içerik" değerleri Tablo A9. ile Tablo A14. arasındaki tablolarda verilmiştir (Minitab LLC, 2022).

Minitab V 21.1.1 istatistik yazılımı kullanılarak belirlenen bağımsız değişken seviyelerine uygun şekilde gerçekleştirilen ekstraksiyonlarla ham propolis numunesinden ekstrakte edilen toplam flavonoid içerik değerleri yine aynı istatistik yazılımı kullanılarak istatistiksel değerlendirmeye tabii tutulmuştur. Elde edilen ANOVA sonuçları Tablo 3.15 ile Tablo 3.20 arasındaki tablolarda verilmiştir (Minitab LLC, 2022).

Tablo 3.15 NADES 57 için toplam flavonoid içerik ANOVA tablosu

Kaynak	**DF**	**Seq SS**	**Katkı**	**Adj SS**	**Adj MS**	**F-Değeri**	**P-Değeri**
Model	10	957735	78,88%	957735	95774	18,3	0,000
Sabit	1	59205	4,88%	28142	28142	5,38	0,025
Birinci derece	3	479869	39,52%	258247	86082	16,45	0,000
Süre	1	462971	38,13%	200622	200622	38,34	0,000
Sıcaklık	1	4354	0,36%	14582	14582	2,79	0,101
Genlik	1	12544	1,03%	57472	57472	10,98	0,002
İkinci derece	3	322251	26,54%	325558	108519	20,74	0,000
Süre * Süre	1	338	0,03%	4376	4376	0,84	0,365
Sıcaklık * Sıcaklık	1	115734	9,53%	138334	138334	26,44	0,000
Genlik * Genlik	1	206179	16,98%	210390	210390	40,21	0,000
Etkileşim	3	96410	7,94%	96410	32137	6,14	0,001
Süre * Sıcaklık	1	6857	0,56%	6857	6857	1,31	0,258
Süre * Genlik	1	79777	6,57%	49561	49561	9,47	0,003
Sıcaklık * Genlik	1	9776	0,81%	9776	9776	1,87	0,178
Hata	49	256377	21,12%	256377	5232		
Uyum Eksikliği	5	29399	2,42%	29399	5880	1,14	0,354
Saf Hata	44	226978	18,69%	226978	5159		
Toplam	59	1214112	100,00%				

Tablo 3.16 NADES 58 için toplam flavonoid içerik ANOVA tablosu

Kaynak	**DF**	**Seq SS**	**Katkı**	**Adj SS**	**Adj MS**	**F-Değeri**	**P-Değeri**
Model	10	45593,5	90,74%	45593,5	4559,3	48,04	0,000
Sabit	1	6891,5	13,72%	4050,6	4050,6	42,68	0,000
Birinci derece	3	15379,6	30,61%	4428,6	1476,2	15,55	0,000
Süre	1	10534,1	20,97%	3278,3	3278,3	34,54	0,000
Sıcaklık	1	2285,9	4,55%	163,8	163,8	1,73	0,195
Genlik	1	2559,6	5,09%	1056,6	1056,6	11,13	0,002
İkinci derece	3	17894,6	35,62%	22718,5	7572,8	79,79	0,000
Süre * Süre	1	13822,8	27,51%	17303,4	17303,4	182,31	0,000
Sıcaklık * Sıcaklık	1	20,3	0,04%	325,4	325,4	3,43	0,07
Genlik * Genlik	1	4051,5	8,06%	3440,4	3440,4	36,25	0,000
Etkileşim	3	5427,8	10,80%	5427,8	1809,3	19,06	0,000
Süre * Sıcaklık	1	4983,3	9,92%	4983,3	4983,3	52,51	0,000
Süre * Genlik	1	166,3	0,33%	30	30	0,32	0,576
Sıcaklık * Genlik	1	278,2	0,55%	278,2	278,2	2,93	0,093
Hata	49	4650,6	9,26%	4650,6	94,9		
Uyum Eksikliği	5	361,7	0,72%	361,7	72,3	0,74	0,596
Saf Hata	44	4288,9	8,54%	4288,9	97,5		
Toplam	59	50244	100,00%				

Tablo 3.17 NADES 62 için toplam flavonoid içerik ANOVA tablosu

Kaynak	**DF**	**Seq SS**	**Katkı**	**Adj SS**	**Adj MS**	**F-Değeri**	**P-Değeri**
Model	10	591160	92,45%	591160	59116	59,99	0,000
Sabit	1	42767	6,69%	21614	21614,2	21,93	0,000
Birinci derece	3	501059	78,36%	162291	54097	54,89	0,000
Süre	1	198551	31,05%	32782	32781,5	33,26	0,000
Sıcaklık	1	241705	37,80%	56266	56266,2	57,1	0,000
Genlik	1	60803	9,51%	20094	20093,9	20,39	0,000
İkinci derece	3	38393	6,00%	36279	12093,1	12,27	0,000
Süre * Süre	1	3806	0,60%	4974	4974,2	5,05	0,029
Sıcaklık* Sıcaklık	1	19376	3,03%	12936	12935,9	13,13	0,001
Genlik * Genlik	1	15211	2,38%	14115	14115,5	14,32	0,000
Etkileşim	3	8941	1,40%	8941	2980,2	3,02	0,038
Süre * Sıcaklık	1	3799	0,59%	3799	3799,5	3,86	0,055
Süre * Genlik	1	2099	0,33%	443	443,3	0,45	0,506
Sıcaklık * Genlik	1	3042	0,48%	3042	3042,1	3,09	0,085
Hata	49	48288	7,55%	48288	985,5		
Uyum Eksikliği	5	6350	0,99%	6350	1270	1,33	0,268
Saf Hata	44	41939	6,56%	41939	953,1		
Toplam	59	639448	100,00%				

Tablo 3.18 NADES 76 için toplam flavonoid içerik ANOVA tablosu

Kaynak	**DF**	**Seq SS**	**Katkı**	**Adj SS**	**Adj MS**	**F-Değeri**	**P-Değeri**
Model	10	56017,6	82,95%	56017,6	5601,8	23,84	0,000
Sabit	1	3419,4	5,06%	2690,2	2690,2	11,45	0,001
Birinci derece	3	37919,4	56,15%	17846,3	5948,8	25,32	0,000
Süre	1	7937	11,75%	8821,3	8821,3	37,54	0,000
Sıcaklık	1	5022	7,44%	1256,2	1256,2	5,35	0,025
Genlik	1	24960,4	36,96%	3113,8	3113,8	13,25	0,001
İkinci derece	3	4616	6,84%	5594,3	1864,8	7,94	0,000
Süre * Süre	1	1326,1	1,96%	3520	3520	14,98	0,000
Sıcaklık * Sıcaklık	1	2730,4	4,04%	696,3	696,3	2,96	0,091
Genlik * Genlik	1	559,5	0,83%	368,2	368,2	1,57	0,217
Etkileşim	3	10062,8	14,90%	10062,8	3354,3	14,28	0,000
Süre * Sıcaklık	1	4127,5	6,11%	4127,5	4127,5	17,57	0,000
Süre * Genlik	1	5814,5	8,61%	4375,4	4375,4	18,62	0,000
Sıcaklık * Genlik	1	120,8	0,18%	120,8	120,8	0,51	0,477
Hata	49	11512,7	17,05%	11512,7	235		
Uyum Eksikliği	5	897,5	1,33%	897,5	179,5	0,74	0,595
Saf Hata	44	10615,3	15,72%	10615,3	241,3		
Toplam	59	6437241	1				

Tablo 3.19 Saf su için toplam flavonoid içerik ANOVA tablosu

Kaynak	DF	Seq SS	Katkı	Adj SS	Adj MS	F-Değeri	P-Değeri
Model	10	1340,53	94,11%	1340,53	134,053	78,24	0,000
Sabit	1	922,56	64,76%	792,70	792,695	462,63	0,000
Birinci derece	3	143,84	10,10%	81,92	27,307	15,94	0,000
Süre	1	141,02	9,90%	12,66	12,662	7,39	0,009
Sıcaklık	1	2,81	0,20%	16,04	16,044	9,36	0,004
Genlik	1	0,02	0,00%	61,03	61,030	35,62	0,000
İkinci derece	3	137,00	9,62%	169,68	56,559	33,01	0,000
Süre * Süre	1	97,96	6,88%	121,09	121,086	70,67	0,000
Sıcaklık * Sıcaklık	1	6,04	0,42%	16,40	16,397	9,57	0,003
Genlik * Genlik	1	33,00	2,32%	28,50	28,496	16,63	0,000
Etkileşim	3	137,13	9,63%	137,13	45,710	26,68	0,000
Süre * Sıcaklık	1	32,68	2,29%	32,68	32,681	19,07	0,000
Süre * Genlik	1	65,51	4,60%	97,46	97,457	56,88	0,000
Sıcaklık * Genlik	1	38,94	2,73%	38,94	38,943	22,73	0,000
Hata	49	83,96	5,89%	83,96	1,713		
Uyum Eksikliği	5	15,28	1,07%	15,28	3,055	1,96	0,104
Saf Hata	44	68,68	4,82%	68,68	1,561		
Toplam	59	1424,49	100,00%				

Tablo 3.20 %80 Etanol için toplam flavonoid içerik ANOVA tablosu

Kaynak	**DF**	**Seq SS**	**Katkı**	**Adj SS**	**Adj MS**	**F-Değeri**	**P-Değeri**
Model	10	5934128	99,93%	5934128	593413	7366,11	0,000
Sabit	1	46831	0,79%	49011	49011	608,38	0,000
Birinci derece	3	2082631	35,07%	2165049	721683	8958,34	0,000
Süre	1	295	0,00%	5267	5267	65,38	0,000
Sıcaklık	1	275499	4,64%	489992	489992	6082,33	0,000
Genlik	1	1806837	30,43%	1631373	1631373	20250,4	0,000
İkinci derece	3	2535498	42,70%	2372042	790681	9814,82	0,000
Süre * Süre	1	81784	1,38%	170648	170648	2118,27	0,000
Sıcaklık * Sıcaklık	1	783341	13,19%	860145	860145	10677,0	0,000
Genlik * Genlik	1	1670373	28,13%	1678186	1678186	20831,5	0,000
Etkileşim	3	1269167	21,37%	1269167	423056	5251,44	0,000
Süre * Sıcaklık	1	7814	0,13%	7814	7814	96,99	0,000
Süre * Genlik	1	263868	4,44%	8036	8036	99,75	0,000
Sıcaklık * Genlik	1	997486	16,80%	997486	997486	12381,9	0,000
Hata	49	3947	0,07%	3947	81		
Uyum Eksikliği	5	239	0,00%	239	48	0,57	0,725
Saf Hata	44	3708	0,06%	3708	84		
Toplam	59	5938075	100,00%				

Elde edilen optimizasyon modellerinin değerlendirmesine ilişkin özet veriler Tablo 3.21'de verilmiştir. Her bir ekstraksiyon çözücüsü için ayrı ayrı olmak üzere regresyon analizi sonucunda elde edilen toplam flavonoid içerik değerini işaret eden kuadratik modeller ise değişkenler cinsinden Tablo 3.22'de verilmiştir.

Tablo 3.21 Çözücüler için toplam flavonoid içerik model özeti tablosu

Çözücü	S	R^2(%)	Adj. R^2 (%)	Pred. R^2 (%)	PRESS
NADES 57	72,3338	78,88	74,57	67,84	390443
NADES 58	9,74217	90,74	88,86	84,48	7800,21
NADES 62	31,3923	92,45	90,91	88,77	71822,1
NADES 76	15,3282	82,95	79,47	72,89	18308,9
Saf Su	1,30898	94,11	92,90	91,24	124,775
80 Etanol	8,97552	99,93	99,92	99,89	6515,41

Tablo 3.22 Regresyon analizi sonucunda elde edilen kuadratik modeller

Çözücü	Önerilen Model
NADES 57	TFİ= $-527{,}0+4{,}43*X_1+18{,}39*X_2+13{,}44*X_3-0{,}00841*X_1^2-0{,}1923*X_2^2-0{,}0787*X_3^2+0{,}0297*X_1X_2-0{,}0448*X_1X_3-0{,}036*X_2X_3$
NADES 58	TFİ= $28{,}0-0{,}499*X_1-0{,}061*X_2+0{,}878*X_3+0{,}01673*X_1^2+0{,}00933*X_2^2-0{,}01006*X_3^2-0{,}0253*X_1X_2+0{,}0011*X_1X_3+0{,}00607*X_2X_3$
NADES 62	TFİ= $150{,}6+1{,}141*X_1-3{,}95*X_2-2{,}089*X_3-0{,}00897*X_1^2+0{,}0588*X_2^2+0{,}02038*X_3^2+0{,}0221*X_1X_2+0{,}00423*X_1X_3+0{,}0201*X_2X_3$
NADES 76	TFİ= $151{,}9-0541*X_1-2{,}355*X_2-0{,}638*X_3-0{,}00754*X_1^2+0{,}01365*X_2^2-0{,}00329*X_3^2+0{,}02302*X_1X_2+0{,}0133*X_1X_3-0{,}004*X_2X_3$
Ultra Saf Su	TFİ= $12{,}78+0{,}0714*X_1-0{,}2074*X_2+0{,}1123*X_3+0{,}001399*X_1^2+0{,}002094*X_2^2-0{,}000916*X_3^2-0{,}002049*X_1*X_2-0{,}001985*X_1*X_3+0{,}002271*X_2*X_3$
%80 Etil Alkol	TFİ= $2913{,}7-4{,}626*X_1-67{,}937*X_2-35{,}369*X_3+0{,}05253*X_1^2+0{,}47961*X_2^2+0{,}22219*X_3^2-0{,}03168*X_1*X_2+0{,}01803*X_1*X_3+0{,}36352*X_2*X_3$

NADES 57 için regresyon katsayısının (R^2) 0,789 olduğu ve modelin hesaplanan p-değeri 0,356 ile uyum eksikliği göstermediği tespit edilmiş, regresyon katsayısı da 95 güven aralığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. (Adj. R^2) (0,746) ve (Pred. R^2) (0,678) değerleri birbirleri ile uyumludur. Modeli süre ve ultrason genliği terimleri birinci dereceden %39,2 oranında açıklamaktadır. Birinci derece sıcaklık terimi, ikinci derece terimlerden süre*süre ve etkileşim terimlerinden süre*sıcaklık ve sıcaklık *ultrason genliği terimleri hariç tüm terimlerin modele katkısı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

NADES 58 için regresyon katsayısının (R^2) 0,907 olduğu ve modelin hesaplanan p-değeri 0,582 ile uyum eksikliği göstermediği tespit edilmiş, regresyon katsayısı da 95 güven aralığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. (Adj. R^2) (0,889) ve (Pred. R^2) (0,845) değerleri birbirleri ile uyumludur. Modeli süre ve ultrason genliği terimleri birinci dereceden %26,1 oranında açıklamaktadır. Birinci derece sıcaklık terimi, ikinci derece terimlerden sıcaklık*sıcaklık ve etkileşim terimlerinden süre*ultrason genliği ve sıcaklık * ultrason genliği terimleri hariç tüm terimlerin modele katkısı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

NADES 62 için regresyon katsayısının (R^2) 0,925 olduğu ve modelin hesaplanan p-değeri 0,295 ile uyum eksikliği göstermediği tespit edilmiş, regresyon katsayısı da 95 güven aralığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. (Adj. R^2) (0,909) ve (Pred. R^2) (0,888) değerleri birbirlerinden diğer modellere göre daha farklı bulunmuştur. Modeli süre, sıcaklık ve ultrason genliği terimleri birinci dereceden %78,4 oranında açıklamaktadır. İkinci derece terimlerin modele katkısı %6,0 olarak tespit edilmiştir. Etkileşim terimlerinin modele katkısı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

NADES 76 için regresyon katsayısının (R^2) 0,830 olduğu ve modelin hesaplanan p-değeri 0,598 ile uyum eksikliği göstermediği tespit edilmiş, regresyon katsayısı da 95 güven aralığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. (Adj. R^2) (0,795) ve (Pred. R^2) (0,729) değerleri birbirleri ile uyumludur. Modeli süre, sıcaklık ve ultrason genliği terimleri birinci dereceden %56,2 oranında açıklamaktadır. İkinci derece terimlerden sıcaklık*sıcaklık ve ultrason genliği*ultrason genliği ile etkileşim terimlerinden sıcaklık*ultrason genliği terimleri hariç tüm terimlerin modele katkısı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Ultra Saf Su için regresyon katsayısının (R^2) 0,941 olduğu ve modelin hesaplanan p-değeri 0,104 ile uyum eksikliği göstermediği tespit edilmiş, regresyon katsayısı

da 95 güven aralığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. (Adj. R^2) (0,929) ve (Pred R^2) (0,912) değerleri birbirleri ile uyumludur. Ultra saf su ile hazırlanan propolis sıvı ekstraktlarının flavonoid içeriği için, istatistiksel analiz modelin uyum eksikliğine sahip olmadığını, ancak modele en büyük katkının katsayıdan geldiğini göstermiştir; bu da propolis ultra saf su ile ekstrakte edildiğinde değişkenlerin toplam flavonoid içeriği üzerinde neredeyse hiçbir etkisi olmadığı anlamına gelmektedir.

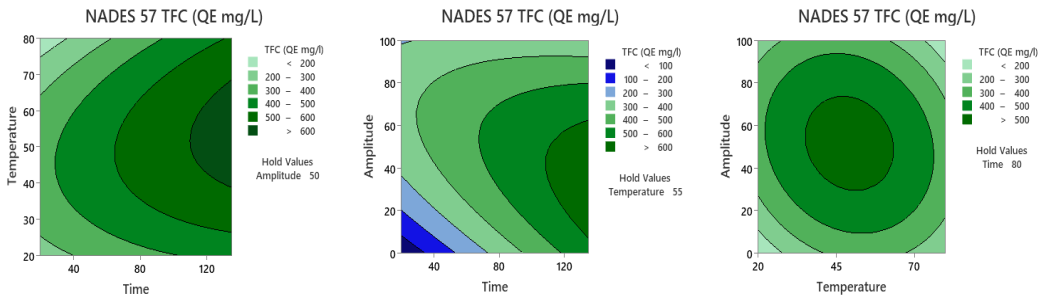
%80 Etil Alkol için regresyon katsayısının (R^2) 0,999 olduğu ve modelin hesaplanan p-değeri 0,725 ile uyum eksikliği göstermediği tespit edilmiş, regresyon katsayısı da 95 güven aralığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. (Adj. R^2) (0,992) ve (Pred. R^2) (0,999) değerleri birbirleri ile uyumludur. Modeli birinci derece, ikinci derece ve etkileşim terimlerinin tamamı istatistiksel olarak anlamlı şekilde açıklamaktadır. Modele en büyük katkıyı genlik teriminin birinci ve ikinci derece terimleri göstermiştir.

İstatistiksel değerlendirmelerin yapıldığı Minitab V 21.1.1 yazılımının yanıt yüzey metodolojisi kullanılarak geliştirilen ve Tablo 3.22'de verilen modeller için oluşturduğu toplam flavonoid içerik optimizasyon parametreleri Tablo 3.23'te verilmiştir. Bu tabloda tüm çözücülerde maksimum toplam flavonoid içerik değerine ulaşılabilmesi için önerilen süre çalışmalarda kullanılan en üst değer olan 135 dakika olarak bulunmuştur.

Tablo 3.23 Toplam flavonoid içerik optimizasyon çözümleri

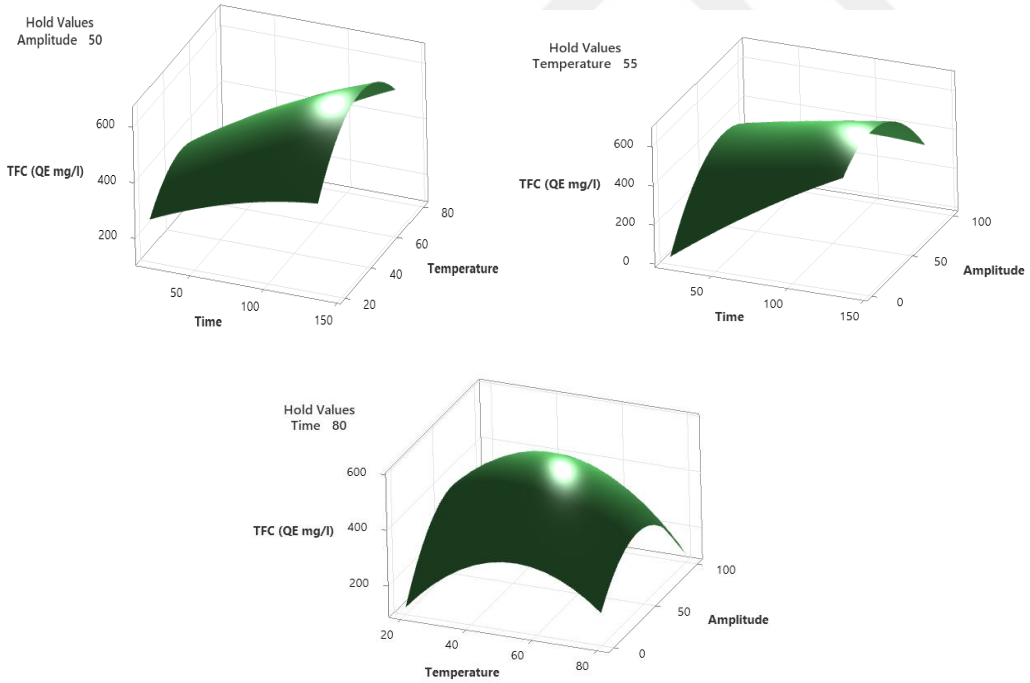
Çözücü	**Sıcaklık (°C)**	**Süre (dk)**	**Genlik (%)**	**TFİ (mg KE/L)**
NADES 57	55,2	135,0	34,3	661,5
NADES 58	20,0	135,0	56,6	232,5
NADES 62	80,0	135,0	100,0	652,8
NADES 76	80,0	135,0	100,0	269,6
Ultrasaf Su	20,0	135,0	0,0	39,1
%80 Etilalkol	80,0	135,0	100,0	2375,5

Her bir çözücü için çalışmada kullanılan bağımsız değişkenlerin (süre, sıcaklık ve ultrason genliği) toplam flavonoid içeriğine nasıl etki ettiğini gösteren kontur grafikleri ve yanıt yüzey grafikleri çizilmiştir.

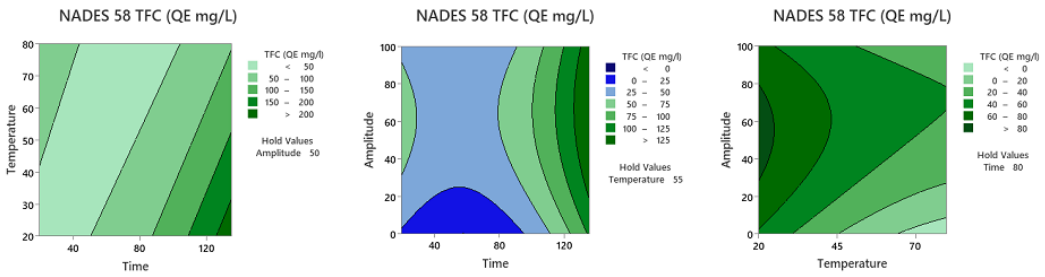


Şekil 3.21 NADES 57 için toplam flavonoid içerik değerine sıcaklık, süre ve ultrason genliği değerlerinin katkısını gösteren kontur grafikleri

İstatistiksel değerlendirmelerin yapıldığı Minitab V 21.1.1 yazılımının yanıt yüzey metodolojisi kullanılarak geliştirdiği ve Tablo 3.22'de verilen model, Tablo 3.15'te verilen ANOVA tablosu, Şekil 3.21'de verilen kontur grafikleri ve Şekil 3.22'te verilen yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde, NADES 57 ile gerçekleştirilen propolis ekstraksiyonlarından elde edilen ekstraktların toplam flavonoid içeriklerinin, süre değerlerinde oluşan değişimlerden pozitif yönlü lineer olarak etkilendiği ve ultrason genliği ile sıcaklık değişiminden ise bu değerler uç değerleri aldığında minimize olacak şekilde etkilendiği görülmektedir.

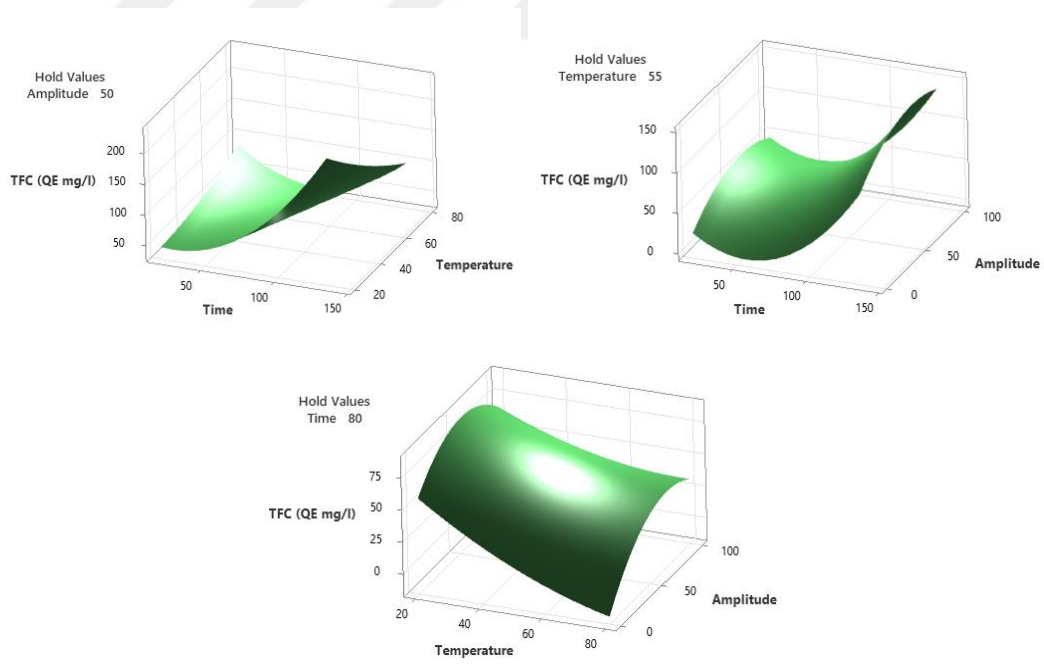


Şekil 3.22 NADES 57 için toplam flavonoid içeriğine sıcaklık, ultrason genliği ve süre değerlerinin katkısını gösteren yanıt yüzey grafikleri

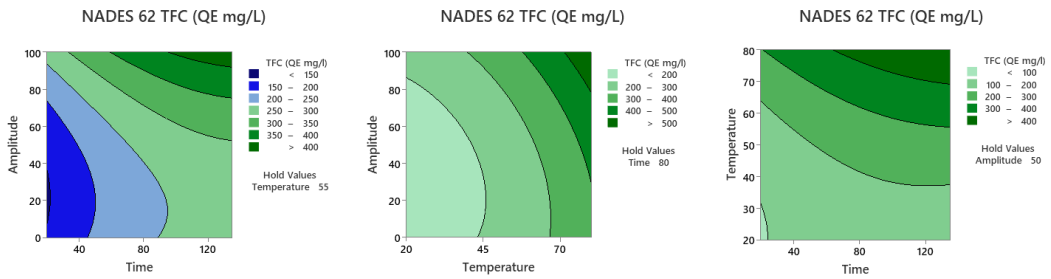


Şekil 3.23 NADES 58 için toplam flavonoid içerik değerine sıcaklık, süre ve ultrason genliği değerlerinin katkısını gösteren kontur grafikleri

Tablo 3.22'de verilen model, Tablo 3.16'da verilen ANOVA tablosu, Şekil 3.23'te verilen kontur grafikleri ve Şekil 3.24'te verilen yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde, NADES 58 ile gerçekleştirilen propolis ekstraksiyonlarından elde edilen ekstraktların toplam flavonoid içeriklerinin, sıcaklık değerinde oluşan değişimlerden negatif yönlü lineer olarak etkilendiği ultrason genliği değeri düşük ve yüksek değerler aldığında toplam flavonoid içerik değeri minimum değerine ulaşacak şekilde yanıt üzerinde etkili olduğu ayrıca sürenin pozitif yönlü değişiminin toplam flavonoid içerik değerini pozitif yönlü etkilediği tespit edilmiştir.

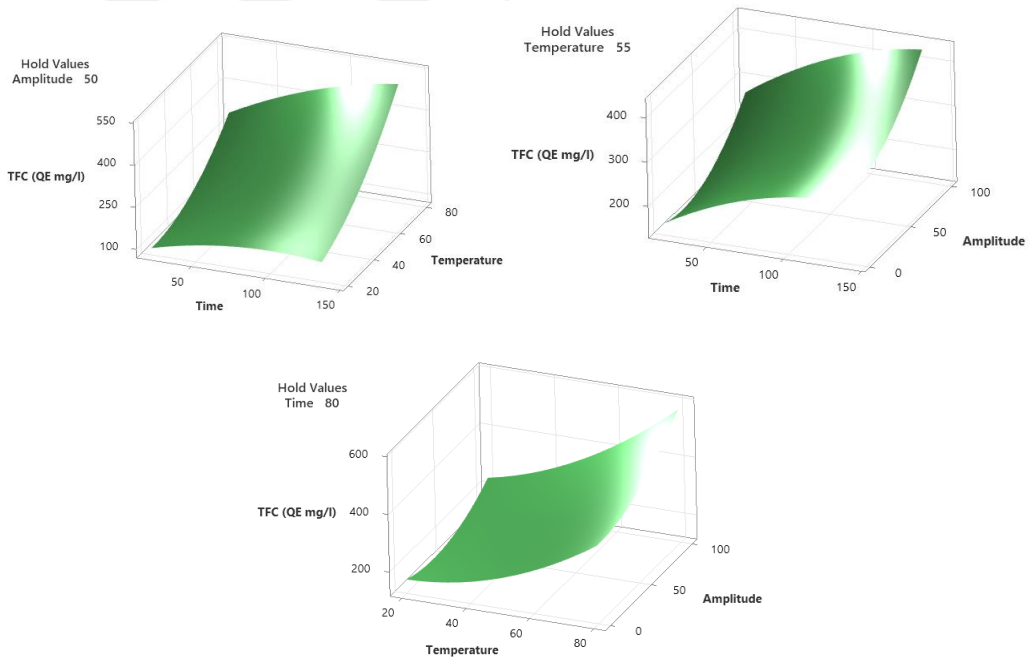


Şekil 3.24 NADES 58 için toplam flavonoid içeriğine sıcaklık, ultrason genliği ve süre değerlerinin katkısını gösteren yanıt yüzey grafikleri

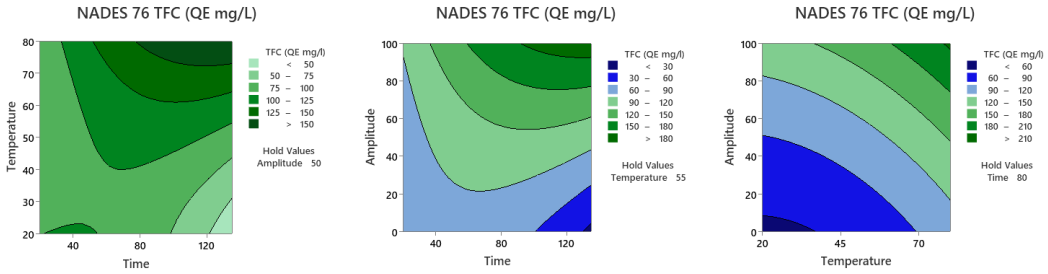


Şekil 3.25 NADES 62 için toplam flavonoid içerik değerine sıcaklık, süre ve ultrason genliği değerlerinin katkısını gösteren kontur grafikleri

Tablo 3.22'de verilen model, Tablo 3.17'de verilen ANOVA tablosu, Şekil 3.25'te verilen kontur grafikleri ve Şekil 3.26'da verilen yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde, NADES 62 ile gerçekleştirilen propolis ekstraksiyonlarından elde edilen ekstraktların toplam flavonoid içeriklerinin, sıcaklık ve ultrason genliği değerlerinde oluşan değişimlerden pozitif yönlü lineer olarak etkilendiği, ayrıca sürenin pozitif yönlü değişiminin toplam flavonoid içerik değerini düşük bir eğim ile ancak pozitif yönlü etkilediği tespit edilmiştir. Sürenin çok uzamasının toplam flavonoid içerik değerine olan marjinal etkisi düşük olmuş ve toplam flavonoid içeriğinin doygunluğa ulaştığı görülmüştür.

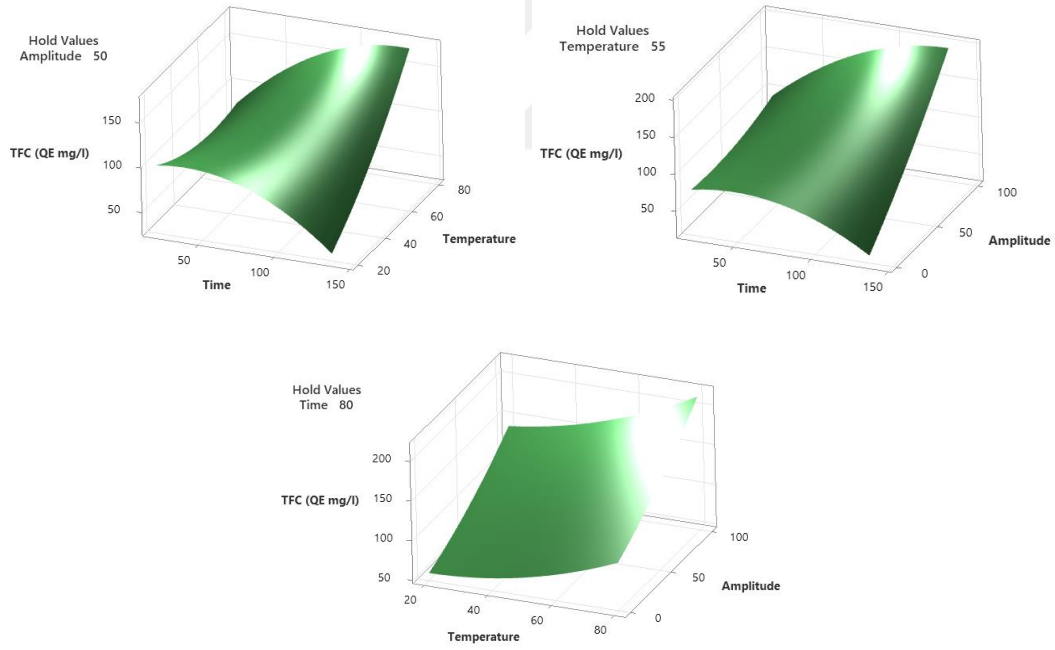


Şekil 3.26 NADES 62 için toplam flavonoid içeriğine sıcaklık, ultrason genliği ve süre değerlerinin katkısını gösteren yanıt yüzey grafikleri

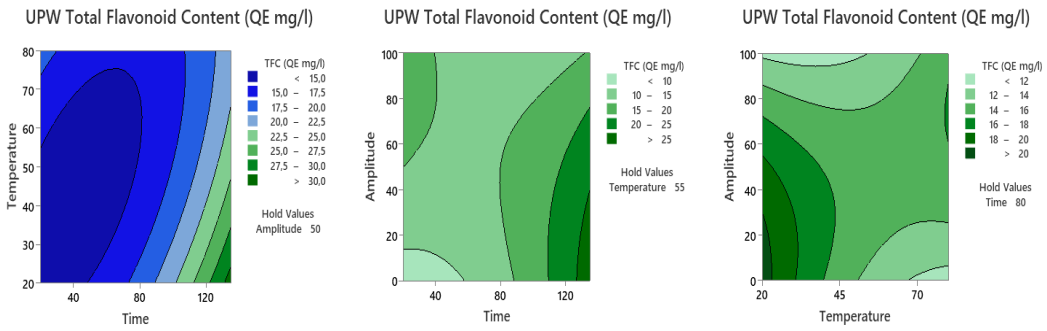


Şekil 3.27 NADES 76 için toplam flavonoid içerik değerine sıcaklık, süre ve ultrason genliği değerlerinin katkısını gösteren kontur grafikleri

Tablo 3.22'de verilen model, Tablo 3.18'de verilen ANOVA tablosu, Şekil 3.27'de verilen kontur grafikleri ve Şekil 3.28'de verilen yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde, NADES 76 ile gerçekleştirilen propolis ekstraksiyonlarından elde edilen ekstraktların toplam flavonoid içeriklerinin, sıcaklık ve ultrason genliği değerlerinde oluşan değişimlerden pozitif yönlü lineer olarak etkilendiği, ayrıca sürenin pozitif yönlü değişiminin toplam flavonoid içerik değerini negatif yönlü etkilediği tespit edilmiştir.

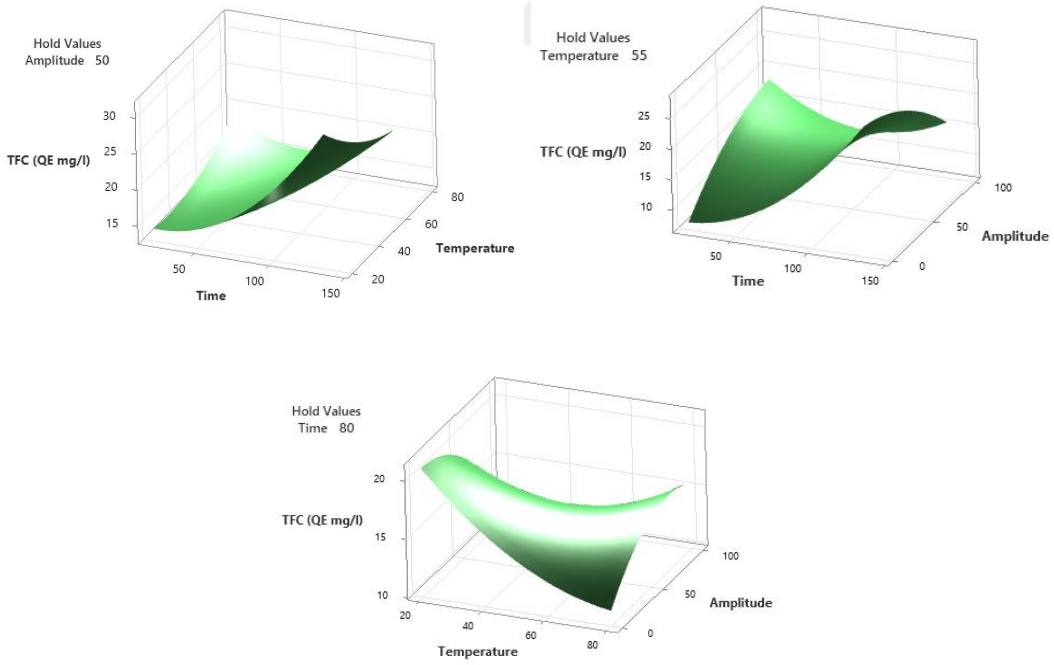


Şekil 3.28 NADES 76 için toplam flavonoid içeriğine sıcaklık, ultrason genliği ve süre değerlerinin katkısını gösteren yanıt yüzey grafikleri

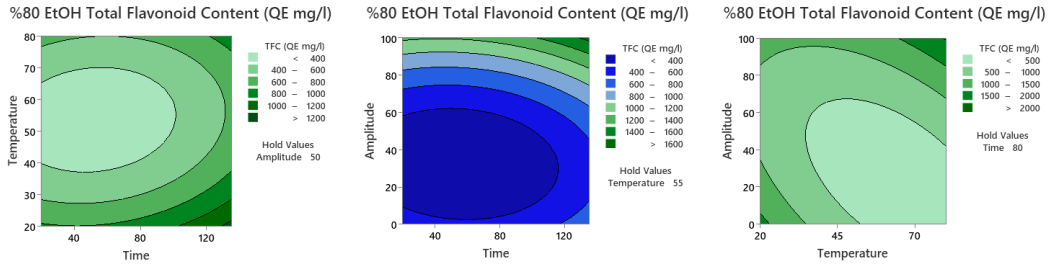


Şekil 3.29 Saf su için toplam flavonoid içerik değerine sıcaklık, süre ve ultrason genliği değerlerinin katkısını gösteren kontur grafikleri

Tablo 3.22'de verilen model, Tablo 3.19'da verilen ANOVA tablosu, Şekil 3.29'da verilen kontur grafikleri ve Şekil 3.30'da verilen yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde, Saf su ile gerçekleştirilen propolis ekstraksiyonlarından elde edilen ekstraktların toplam flavonoid içeriklerinin, süre değerinde oluşan değişimlerden pozitif yönlü kuadratik olarak etkilendiği ve ultrason genliği değeri düşük ve yüksek değerler aldığında toplam flavonoid içerik değeri maksimum değerine ulaşacak şekilde yanıt üzerinde etkili olduğu, sıcaklık değerinin etkisinin ise negatif yönlü lineer olduğu görülmüştür.

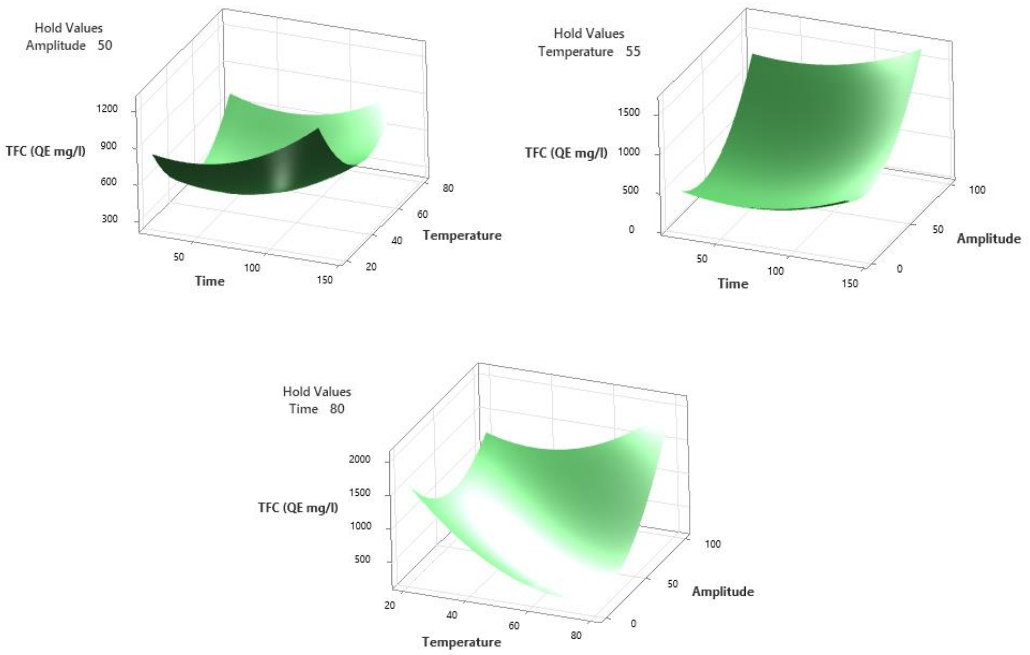


Şekil 3.30 Saf su için toplam flavonoid içeriğine sıcaklık, ultrason genliği ve süre değerlerinin katkısını gösteren yanıt yüzey grafikleri



Şekil 3.31 %80 Etanol için toplam flavonoid içerik değerine sıcaklık, süre ve ultrason genliği değerlerinin katkısını gösteren kontur grafikleri

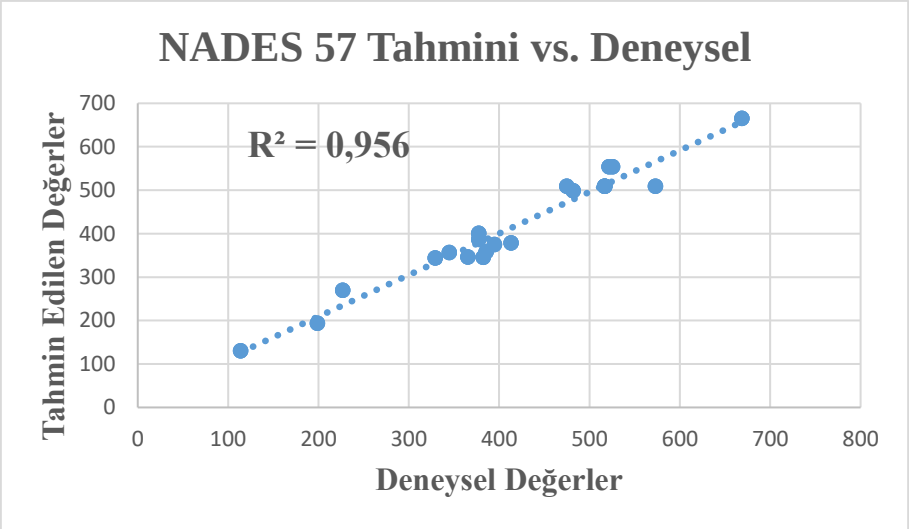
Tablo 3.22'de verilen model, Tablo 3.20'de verilen ANOVA tablosu, Şekil 3.31'de verilen kontur grafikleri ve Şekil 3.32'de verilen yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde, %80 etanol ile gerçekleştirilen propolis ekstraksiyonlarından elde edilen ekstraktların toplam flavonoid içerikleri, sıcaklık değeri düşük ve yüksek değerler aldığında toplam flavonoid içerik değeri maksimum değerine ulaşacak şekilde yanıt üzerinde etkili olduğu ve toplam flavonoid içerik değerinin ultrason genliği parametresinden ise pozitif yönlü lineer olarak etkilendiği tespit edilmiştir. Süre değerinin ise yanıt üzerinde düşük eğimli ancak pozitif yönlü lineer etkisinin olduğu görülmüştür.



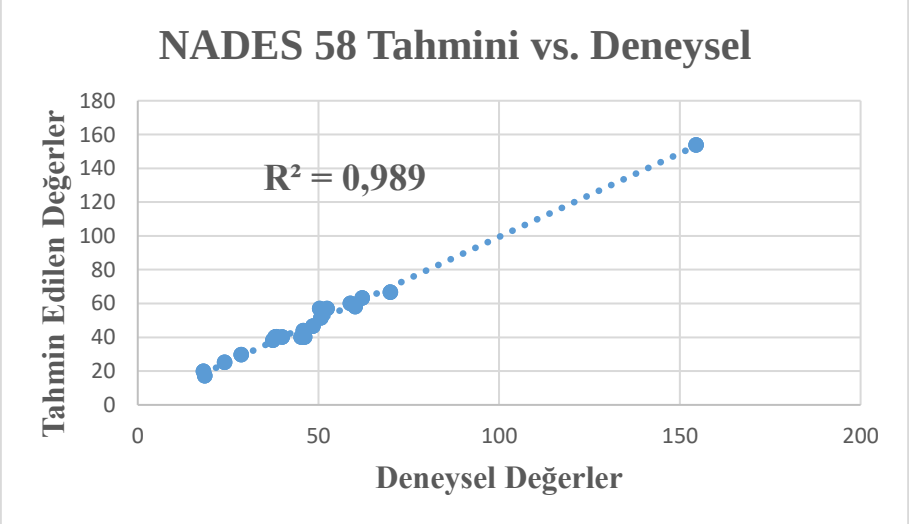
Şekil 3.32 %80 Etanol için toplam flavonoid içeriğine sıcaklık, ultrason genliği ve süre değerlerinin katkısını gösteren yanıt yüzey grafikleri

İstatistiksel değerlendirmelerin yapıldığı Minitab V 21.1.1 yazılımının yanıt yüzey metodolojisi kullanılarak her bir deneme noktası için tahminlenen toplam flavonoid

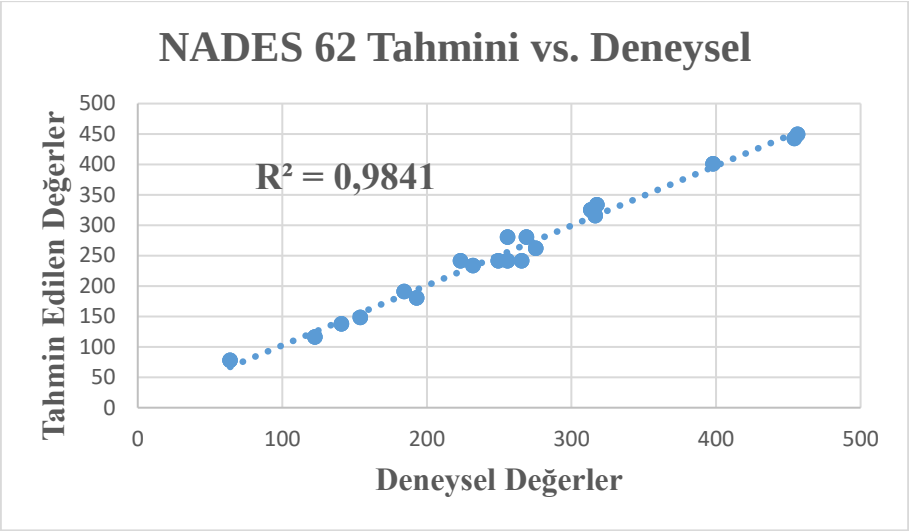
içerik değerleri ile o noktalarda elde edilen gerçek toplam flavonoid içerik değerlerinden oluşturulan grafikler NADES 57, NADES 58, NADES 62, NADES 76, saf su ve 80 etanol için sırasıyla Şekil 3.33, Şekil 3.34, Şekil 3.35, Şekil 3.36, Şekil 3.37 ve Şekil 3.38'de verilmiştir. Bu grafikler incelendiğinde, tüm çözücü türleri için deneysel değerler ile tahmin edilen değerler arasında iyi bir korelasyon olduğunu görülmektedir. Elde edilen R^2 değerleri sırasıyla 0,956; 0,989; 0,984; 0,971; 0,981 ve 0,999 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar varyans analizi sonuçları ile de paralellik göstermektedir.



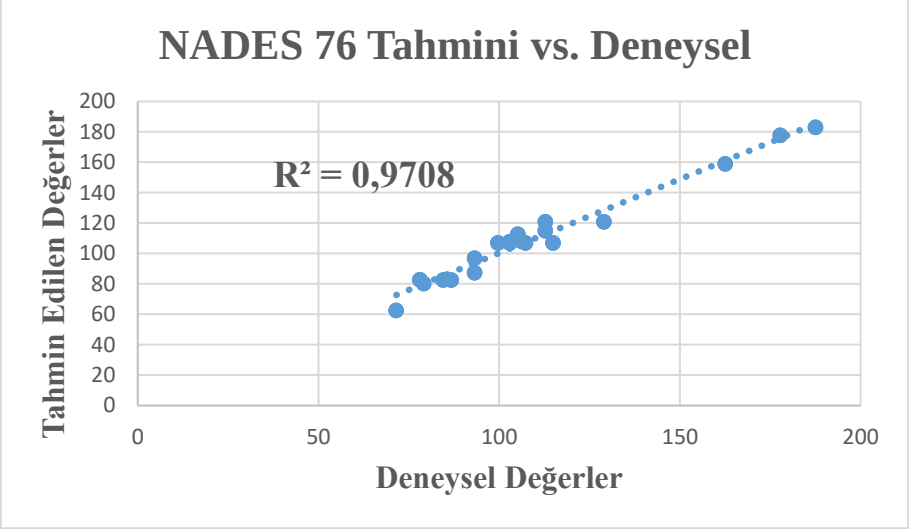
Şekil 3.33. NADES 57 için deneysel ile tahminlenen değerlerin ilişkisi



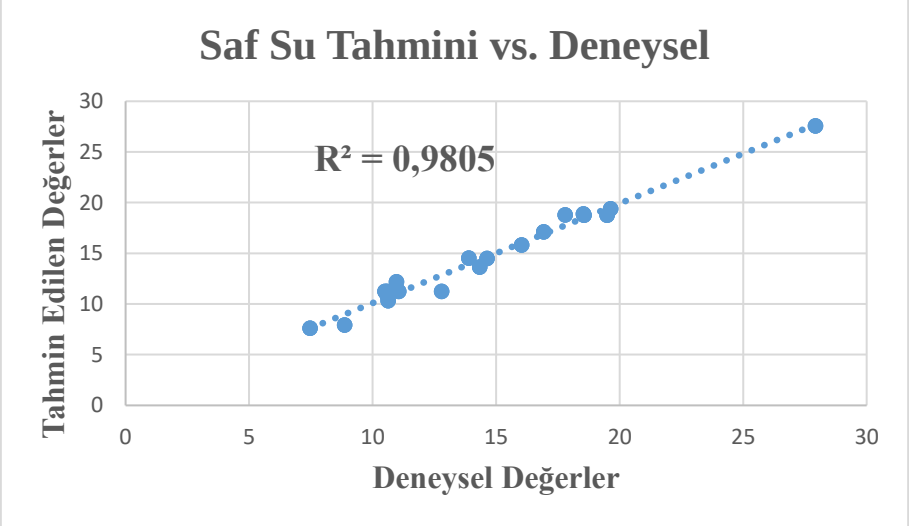
Şekil 3.34. NADES 58 için deneysel ile tahminlenen değerlerin ilişkisi



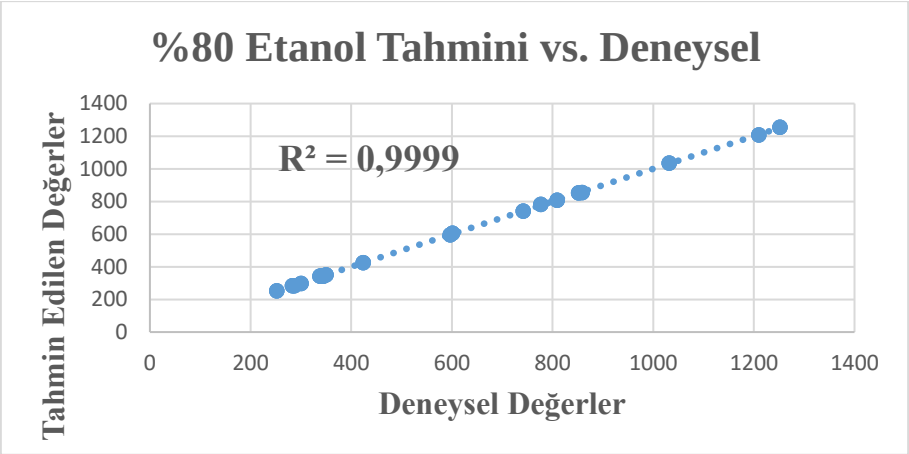
Şekil 3.35. NADES 62 için deneysel ile tahminlenen değerlerin ilişkisi



Şekil 3.36. NADES 76 için deneysel ile tahminlenen değerlerin ilişkisi



Şekil 3.37. Saf su için deneysel ile tahminlenen değerlerin ilişkisi



Şekil 3.38. %80 Etanol için deneysel ile tahminlenen değerlerin ilişkisi

Son yıllarda propolisten fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunun optimizasyonu konusunda yapılmış çok sayıda yayın bulunmaktadır. Bu yayınların birçoğunda çözücü olarak etanol, su ve farklı oranlarda etanol/su karışımları kullanılmıştır (Kim vd., 2009; Margeretha vd., 2012; Oldoni vd., 2015; Mokhtar vd., 2019; Pobiega vd., 2019b; Cavalaro vd., 2020; Oroian vd., 2020a; Yusof vd., 2021; Gürgen vd., 2021; Hagar vd., 2021; Santini vd., 2021; Aboulghazi vd., 2022b; Ibrahim & Alqurashi, 2022; Mahdavi-Roshan vd., 2022; Yıldırım vd., 2022; Çakır & Güzel, 2023; Nichitoi vd., 2023; Yazkan & Ertop, 2024). Bazı bilim insanları bu çözücülerin yanında farklı çözücüleri de incelemiştir (Bakkaloğlu vd., 2021; Şengul & Ufuk, 2023). Aynı dönemde doğal derin ötektik çözücüler ile propolis ekstraksiyonu konusunda çalışmalar yapılmış (Petkov vd., 2018; Koutsoukos vd., 2019; Trusheva vd., 2019; Bankova vd., 2021; Petkov vd., 2022; Vasileva vd., 2022) ancak bu çalışmaların optimizasyonuna ilişkin olanlarının sayısı oldukça kısıtlı kalmıştır (Funari vd., 2019; Tzani vd., 2022; Contieri vd., 2023).

Yukarıdaki paragrafta bahsi geçen çalışmalarda ekstraksiyon amacıyla farklı teknikler denenmiştir. Denemelerde kullanılan teknikler, en basit tekniklerden (sıvıda bekletme, maserasyon, fasılalı çalkalama), düşük teknoloji gerektirenlere (geri soğutma, sokslet) ve gelişmiş teknoloji kullanımını içerenlere (ultrason destekli, mikrodalga destekli) uzanmaktadır. Basit tekniklerin kullanıldığı çalışmalarda ekstraksiyon için denemelerde uygulanan süreler 7 güne kadar uzamıştır (Mokhtar vd., 2019; Pobiega vd., 2019b). Düşük teknoloji gerektiren tekniklerin kullanıldığı çalışmalarda ekstraksiyon için denemelerde uygulanan süreler 140 dakikaları bulmuştur (Margeretha vd., 2012; Yazkan & Ertop, 2024).

Gelişmiş teknolojilerin kullanılmasıyla daha kısa süreler elde edilmiştir. Oroian vd. (2020b), Yusof vd. (2021) ile Çakır & Güzel (2023) çalışmalarda ultrason uygulamasının ultrasonik banyoda yapılmasıyla etanol ve etanol/su karşımı kullanılarak yapılan optimizasyon çalışmalarında optimum ekstraksiyon süreleri sırasıyla 23, 30 ve 32 dakika olarak tespit edilmiştir. Doğrudan ultrason uygulamasıyla bu süre 2,95 dakikaya düşmüştür (Bakkaloğlu vd., 2021). Mikrodalga destekli ekstraksiyon uygulamasında optimizasyon çalışması farklı yanıtlara göre gerçekleştirilmiştir. Bu yanıtlardan toplam fenolik içerik açısından optimum süre 25 saniye, toplam flavonoid içerik açısından 10 saniye ve antioksidan aktivite açısından 15 saniye olarak tespit edilmiştir (Yıldırım, 2022). Bu çalışmalar yüksek teknoloji içeren ekstraksiyon tekniklerinin, ekstraksiyon süresini oldukça kısaltığını göstermektedir.

Etanol ve etanol/su karışımları çözücü olarak kullanıldığında uygulanması gereken ekstraksiyon sürelerinin, viskoziteleri bu çözücülere oranla oldukça yüksek olan NADES'ler ile yapılacak ekstraksiyon çalışmalarına oranla daha kısa olacağı öngörülmektedir (Funari vd., 2019; Contieri vd., 2023). Ancak NADES ile gerçekleştirilen ve ultrason probunun doğrudan ekstraksiyon çözücüsüne daldırıldığı bazı uygulamalarda ekstraksiyon süresinin (20 dakika) diğer uygulamalara oranla daha kısa olduğu görülmüştür (Tzani vd., 2022).

Ekstraksiyon sürelerindeki farklılık düşünüldüğünde NADES'ler ile gerçekleştirilen ekstraksiyon çalışmalarında uygulanması gereken sıcaklıkların da diğer konvensiyonel çözücülerle gerçekleştirilen çalışmalardan daha yüksek olacağını öngörülebilir bir durumdur. Konvensiyonel çözücülerle yapılan çalışmalarda 4 °C (Ibrahim & Alqurashi, 2022) ve oda sıcaklığı seviyelerinde (Kim vd., 2009; Mokhtar vd., 2019; Gürgen vd., 2021; Yıldırım, 2022; Nichitoi vd., 2023; Yazkan & Ertop, 2024) çalışmalar hem maserasyon hem de ultrason destekli uygulamalarda denenmiştir. NADES'ler ile uygulanan sıcaklıklar görece daha yüksek olmuştur. Ötektik çözücüyü oluşturan bileşenlerden birinin oda sıcaklığında sıvı olduğu durumlar ile (50 °C) (Funari vd. 2019), ötektik çözücüye eklenen suyun oranının %50 olduğu durumlarda kullanılan sıcaklıklar (55 °C) (Contieri, 2023) bile konvansiyonel çözücülere oranla yüksek olmuştur. Bu çalışmada tespit edilen optimum ötektik çözücü gibi düşük oranda su içeren (%15) ve ötektik çözücüyü oluşturan bileşenlerin (betain, prolin ve malik asit) tamamının oda sıcaklığında katı

olduğu durumlarda optimum ekstraksiyon sıcaklığın daha yüksek olacağı yapılan optimizasyon çalışmaları ile ortaya konulmuştur.

Funari vd. (2019) yaptığı çalışmada 1:1 molar oranlı kolin klorür: propilen glikolden oluşan ötektik çözücü, %70 etanol/su'dan daha iyi sonuçlar vermiştir. Ancak literatürde propilen glikolün sağlık zararları ve kullanımının kısıtlı olması gerektiği ile ilgili yapılan yayınlar göz önüne alındığında bu çözücüye daha dikkatli yaklaşılması gerektiği düşünülmektedir (Karadağ vd. 2022).

3.5 Optimum Koşullarda Hazırlanan Propolis Ekstraktlarının Biyoaktif Özellikleri

Yanıt yüzeyi metodolojisi kullanılarak belirlenen optimum koşullarda, 3 g propolis örneğine seçilen dört NADES'den ve geleneksel çözücüler olarak saf su ve %80 etanolden 30 mL eklenerek ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu ekstraksiyonlar sonucu elde edilen propolis sıvı ekstraktları toplam fenolik içerik, toplam flavonoid içerik, antiradikal süpürme aktivitesi ve LC-MS/MS ile fenolik profili analizine tabi tutulmuştur. Toplam fenolik içerik, toplam flavonoid içerik, antiradikal süpürme aktivitesi analizleri için öngörülen ve gerçekleşen değerler Tablo 3.24'te listelenmiştir.

Tablo 3.24 Optimum koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyonların toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri ve antiradikal süpürme aktivitesi için tahmini ve gerçek analiz sonuçları[1]

Çözücü	TPİ[2]	Tahmini TPİ	TFİ[3]	Tahmini TFİ	DPPH EC (uL)
%80 Etanol	9970,0±226,0^{a}	11907,6	2180,7±71,8^{a}	2375,5	0,12±0,00^{g}
NADES62	5284,2±128,0^{b}	5344,3	1316,5±47,6^{c}	652,8	0,45±0,06^{fg}
NADES57	-	-	1531,2±101,0^{b}	661,5	1,35±0,25^{ef}
NADES76	1479,0±626,0^{c}	2083,8	283,4±116,6^{d}	269,6	1,80±0,54^{de}
NADES58[4]	1287,0±270,0^{c}	1537,9	-	-	2,86±0,75^{d}
NADES58[5]	-	-	230,0±32,2^{d}	232,5	13,37±0,10^{c}
Saf su[4]	514,1±10,3^{d}	1203,4	-	-	39,84±2,70^{b}
Saf su[5]	-	-	15,8±0,3^{e}	39,1	61,65±1,63^{a}

[1] Her sütun için aynı harfi paylaşmayan ortalamalar istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p < 0.05$).
[2] TPİ için birim mgGAE/L
[3] TFİ için birim mgKE/L
[4] TPİ koşullarına göre optimum
[5] TFİ koşullarına göre optimum

NADES'ler en yüksek fenolik ekstrakt verimlerine göre incelendiğinde, NADES 62 en yüksek fenolik ekstraksiyon verimine sahip çözücü olarak tespit edilmiştir. Geleneksel çözücülerle karşılaştırıldığında NADES 62, ultra saf sudan 5,78 kat daha yüksek ekstraksiyon verimi göstermiştir. Ayrıca, NADES 62 ile %80 etanol ekstraksiyon veriminin yaklaşık %65'i oranında bir ekstraksiyon verimi sağlanmıştır. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde NADES 62, geleneksel çözücülere etkili bir alternatif çözücü olarak düşünülebilir. NADES 62, diğer NADES'lerden NADES 58 ve NADES 76'ya kıyasla yaklaşık 2,5 kattan daha fazla ekstraksiyon verimi göstermiştir. Bu durum, NADES 62'nin hidrojen bağı alıcısı olarak betain ve prolin içermesi ile açıklanabilir. Prolin bileşiğinin fenolik bileşiklerle yaptığı hem hidrojen bağı hem de hidrofobik etkileşimi sayesinde NADES 62'nin daha yüksek fenolik bileşen ekstraksiyon verimi gösterdiği düşünülmektedir (Poncet-Legrand vd. 2006).

Sıvı ekstraktların fenolik profil analiz sonuçları Tablo 3.25'te listelenmiştir. Bu çalışmada kullanılan propolisin fenolik profili, Değirmencioğlu vd. (2019) ve Güzelmeriç vd. (2021) tarafından yapılan çalışmaların bulgularına dayanarak, esas olarak *Populus nigra* (kara kavak) ve ikincil olarak *Populus tremula* (Avrasya kavağı) kaynaklı olduğunu ortaya koymaktadır. Çalışılan propolis örneği, *Populus nigra* L.'den gelen parmak izi fenolik bileşiklerini (apigenin, kersetin, krisin, kafeik asit, naringenin, CAPE, pinobanksin, galangin ve pinosembrin) yüksek konsantrasyonlarda ve *Populus tremula*'dan kaynaklanan iki işaretçi bileşik olan Lasiocarpin B ve Lasiocarpin C'yi daha düşük konsantrasyonlarda içermekte olduğu ortaya konulmuştur. NADES62 ile ekstrakte edilen propolis sıvı ekstraktının fenolik profil analizinin toplam iyon kromatogramının bir kısmı Şekil 3.39'da gösterilmiştir.

Tablo 3.25 Optimum koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyonların fenolik profil analiz sonuçları (µg/mL)[6]

	%80 Etanol	NADES 57	NADES 58[7]	NADES 58[8]	NADES 62	NADES 76	Saf su[7]	Saf su[8]
4-Hidroksibenzoik Asit	4,55±0,38^{a}	2,67±0,28^{b}	0,00±0,00^{d}	1,19±0,20^{c}	1,65±0,28^{c}	0,00±0,00^{d}	2,10±0,09^{b}	2,25±0,07^{b}
Transsinnamik Asit	125,04±13,49^{a}	48,09±6,25^{b,c}	3,18±1,42^{e}	28,58±5,2^{c,d}	67,69±12,27^{b}	18,77±6,35^{d,e}	11,89±0,87^{d,e}	21,73±2,79^{d,e}
Protokateşuik Asit	1,13±1,07^{d}	3,55±1,38^{c}	0,15±0,25^{d}	3,85±0,83^{b,c}	6,15±0,59^{a}	0,00±0,00^{d}	5,32±0,7^{a,b,c}	5,84±0,61^{a,b}
p-Kumarik Asit	145,9±18,8^{a}	92,56±8,67^{b}	2,65±0,97^{d}	49,07±8,89^{c}	92,85±5,74^{b}	28,68±6,73^{c}	25,41±1,92^{c}	38,47±1,47^{c,d}
m-Kumarik Asit	2,42±0,71^{a}	1,72±0,27^{a,b}	0,00±0,00^{c}	0,11±0,06^{c}	1,68±0,33^{a,b}	0,02±0,03^{c}	1,09±0,09^{b,c}	0,96±0,84^{b,c}
Vanilik Asit	0,00±0,00^{b}	1,3±0,05^{a}	0,00±0,00^{b}	0,12±0,21^{b}	0,68±0,34^{a}	0,00±0,00^{b}	0,93±0,09^{a}	1,31±0,00^{a}
Kafeik Asit	135,07±16,37^{a}	86,78±8,49^{b}	2,63±1,02^{e}	46,30±8,69^{c}	87,13±5,34^{b}	27,76±5,99^{c,d}	22,5±1,79^{d,e}	34,08±1,12^{c,d}
Ferulik Asit	122,5±26,7^{a}	81,87±10,83^{b}	1,471,01^{d}	39,94±8,53^{c}	86,16±3,48^{b}	26,13±7,68^{c,d}	20,35±1,51^{c}	40,22±1,71^{c,d}
3,4 Dimetoksi Sinnamik	270,61±12,99^{a}	83,60±12,02^{c}	4,06±0,64^{f}	43,45±8,06^{d}	130,10±10,58^{b}	35,99±11,31^{d,e}	13,30±0,77^{e,f}	27,67±2,47^{d,e,f}
Krisin	318,7±41,8^{a}	66,53±7,71^{c}	10,97±2,56^{d,e}	58,87±6,57^{c,d}	149,8±18,1^{b}	61,7±18,2^{c}	1,14±0,02^{e}	1,37±0,25^{e}
Pinosembrin	520,2±61,7^{a}	174,72±17,29^{b,c}	22,66±4,92^{d}	121,22±12,59^{c}	247,4±23,6^{b}	102,1±22,7^{c}	4,36±0,32^{d}	9,20±0,43^{d}
Apigenin	79,61±7,15^{a}	25,13±3,38^{c}	0,66±0,54^{e}	13,84±2,04^{d}	40,77±4,02^{b}	12,08±3,47^{d}	0,21±0,03^{e}	1,12±0,02^{e}

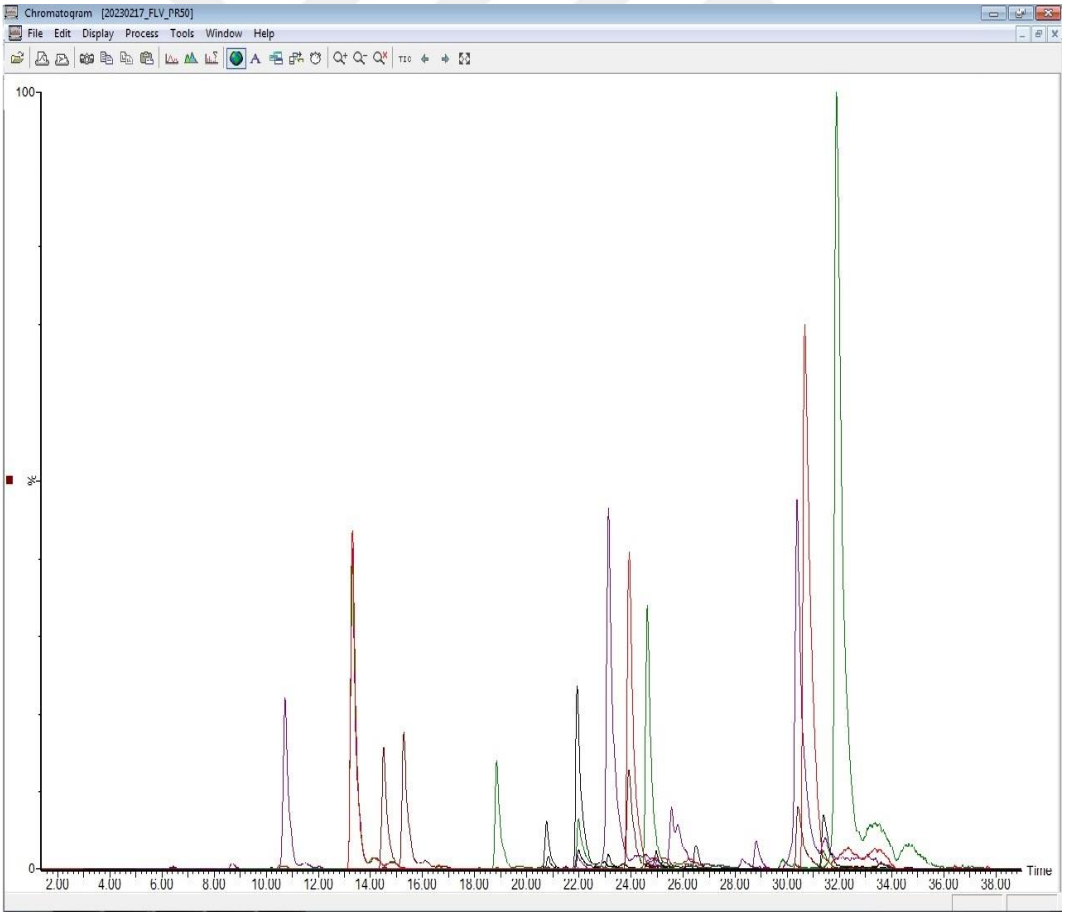
[6] Her satır için aynı harfi paylaşmayan ortalamalar istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p < 0.05$).
[7] TFC koşullarına göre optimum
[8] TPC koşullarına göre optimum

Tablo 3.25 Optimum koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyonların fenolik profil analiz sonuçları (devamı) (µg/mL)[9]

	%80 Etanol	NADES 57	NADES 58[10]	NADES 58[11]	NADES 62	NADES 76	Saf su[7]	Saf su[8]
Genistein	7,84±1,78^{a}	2,05±0,54^{b,c}	0,00±0,00^{d}	0,84±0,15^{c,d}	3,79±0,48^{b}	0,6±0,37^{c,d}	0,00±0,00^{d}	0,11±0,01^{c,d}
Galangin	340,9±34,7^{a}	110,59±12,81^{c}	14,01±2,47^{d}	89,56±10,44^{c}	201,98±10,21^{b}	79,1±23,8^{c}	0,07±0,05^{d}	2,41±0,26^{d}
Naringenin	57,61±4,07^{a}	25,72±4,27^{c}	0,34±0,3^{f}	13,85±1,82^{d}	33,83±3,49^{b}	11,55±3,41^{d,e}	1,69±0,13^{f}	3,67±0,2^{e,f}
Pinobanksin	358,5±43,0^{a}	167,4±17,7^{b}	10,08±2,38^{d}	91,54±11,81^{c}	222,6±22,1^{b}	85,2±22,3^{c}	12,64±1,04^{d}	25,79±1,66^{d}
CAPE[12]	258,2±12,8^{a}	72,39±10,0^{c}	7,17±1,7^{d}	48,38±7,03^{c}	134,1±19,2^{b}	43,72±12,83^{c}	0,03±0,04^{d}	2,81±0,09^{d}
Kamferol	178,5±18,5^{a}	80,72±14,78^{b}	1,77±0,62^{d,e}	45±10,29^{c}	106,26±8,71^{b}	29,6±8,92^{c,d}	0,13±0,1^{e}	3,55±0,19^{d,e}
Kersetin	55,76±11,28^{a}	29,79±5,69^{b}	0,85±0,56^{d}	19,4±4,04^{b,c}	46,7±4,77^{a}	13,64±4,3^{c,d}	0,10±0,07^{d}	3,98±0,21^{d}
İzoramnetin	49,13±9,77^{a}	18,57±2,75^{c}	0,34±0,43^{e}	11,23±1,11^{c,d}	29,39±2,57^{b}	8,67±2,18^{c,d,e}	0,04±0,01^{e}	0,73±0,08^{d,e}
3-O-Metil kersetin	191,02±15,9^{a}	84,48±12,55^{c}	2,36±1,15^{f}	45,39±12,05^{d}	119,82±8,82^{b}	32,27±8,67^{d,e}	9,75±0,39^{e,f}	2,22±0,41^{f}
Lasyokarpin B	24,95±1,73^{a}	3,78±0,66^{c}	0,19±0,06^{d}	1,93±0,60^{c,d}	12,42±1,35^{b}	1,52±0,47^{c,d}	0,00±0,00^{d}	0,12±0,02^{d}
Lasyokarpin C	102,19±13,25^{a}	20,9±4,49^{c}	0,00±0,00^{d}	10,58±3,96^{c,d}	62,14±7,46^{b}	7,03±2,93^{c,d}	0,00±0,00^{d}	2,79±0,11^{d}

[9] Her satır için aynı harfi paylaşmayan ortalamalar istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p < 0.05$).
[10] TFC koşullarına göre optimum
[11] TPC koşullarına göre optimum
[12] Kafeik asit fenetil ester

Fenolik profili analizi sonuçları incelendiğinde propolis ekstraksiyonunda en sıklıkla kullanılan konvansiyonel çözücü olan %80 etanol ile NADES 62, NADES 57 kullanılarak hazırlanan ekstraktların fenolik profilinin aynı yapıda olduğu görülmektedir. Üç çözücü de fenolik asitlerin yanında flavonoidleri ve fenolik asit esterlerini çözebilmiştir. Buna karşın NADES 58, NADES 76 ve Saf su ile hazırlanan ekstraktların fenolik profilleri, bu çözücülerin fenolik asitleri düşük miktarlarda bile olsa çözebilmelerine karşın flavonoidlerin çözünürlüklerinde herhangi bir katkı sağlayamadıklarını göstermiştir. LC/MSMS kullanılarak miktar tayini yapılan fenolik bileşiklerin tespit edilen konsantrasyonları karşılaştırıldığında, NADES 62 ile hazırlanan propolis ekstraktının fenolik içerik miktarı %80 etanol ile hazırlanan ekstraktın ortalamada %56,3'ü kadar olduğu tespit edilmiştir. NADES 57 ile hazırlanan propolis ekstraktı için bu değer %38,4'te kalmıştır.



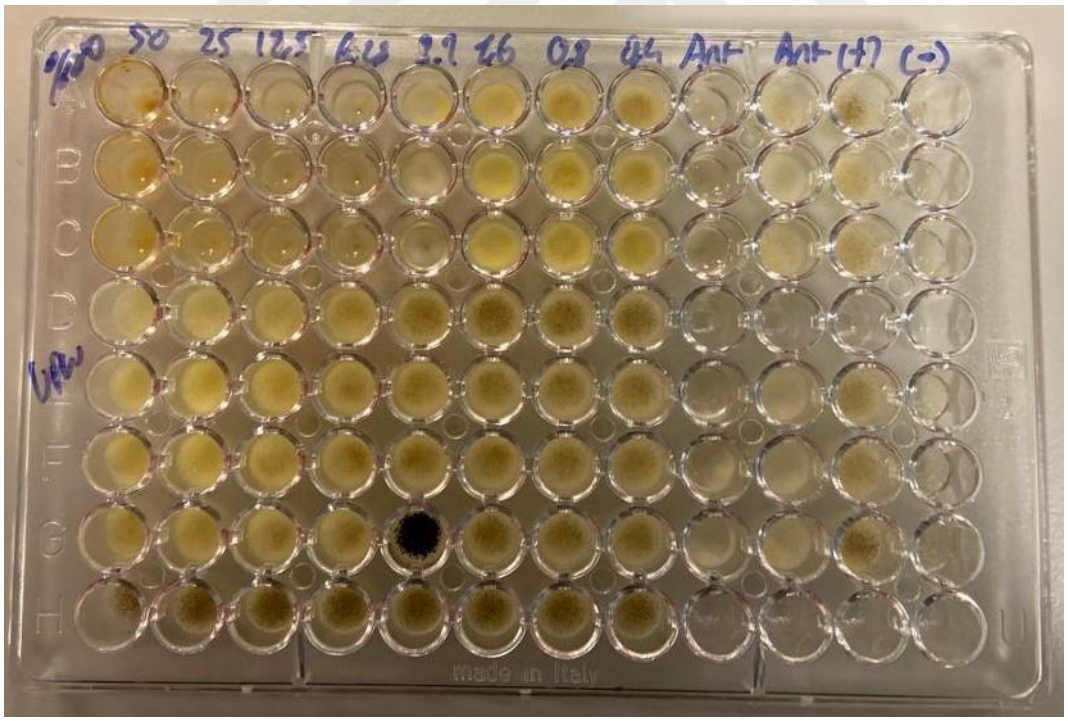
Şekil 3.39 NADES 62 propolis ekstraktı fenolik profili kromatogramı

3.6 Optimum Koşullarda Hazırlanan Propolis Ekstraktlarının Antimikrobiyal Özellikleri

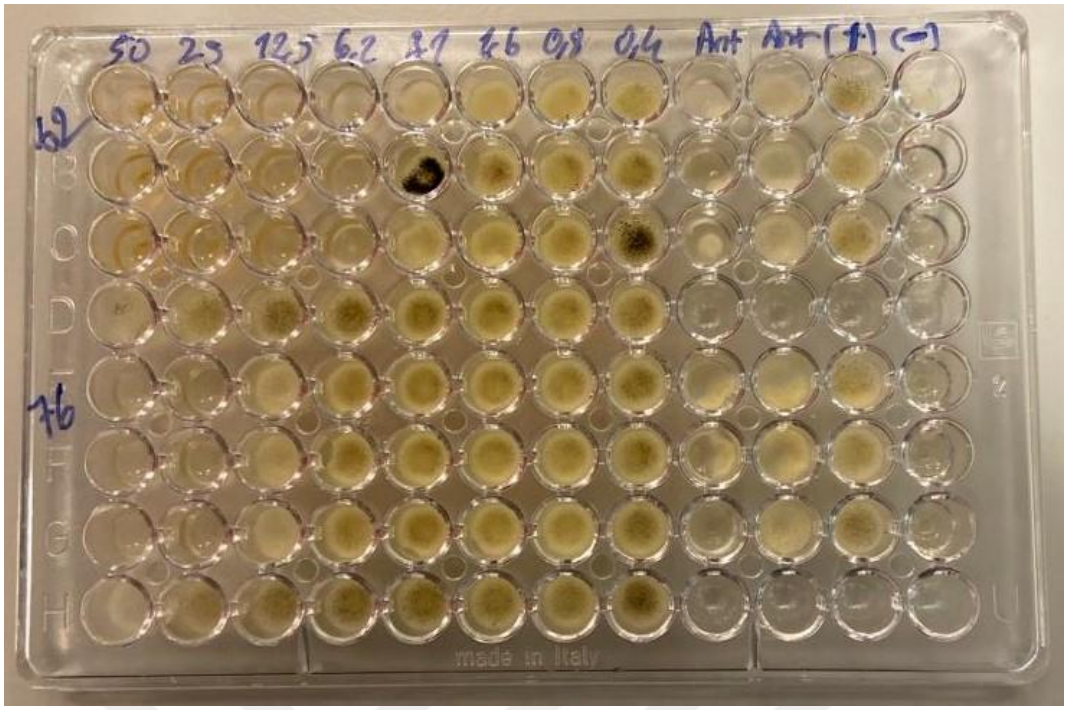
3.6.1 Optimum Koşullarda Hazırlanan Propolis Ekstraktlarının Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları

Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ve minimum bakterisidal/fungisidal konsantrasyon (MBK/MFK) analizleri ile propolis ekstraktlarının antimikrobiyal etkilerinin incelenmesi için kullanılacak küf ve bakteriler (*Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Penicillium* spp., *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella* spp.) Yıldız Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölüm laboratuvarından temin edilmiştir.

NADES 62, NADES 76, %80 Etanol ve Ultra Saf Su ile optimum koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda elde edilen propolis ekstraktlarının MİK ve MBK/MFK seviyelerinin tespiti amaçlı inkübasyonlarının ardından son okumaların yapıldığı mikroplakalara örnek olarak *Aspergillus niger* ile inoküle edilmiş plakalar Şekil 3.40 ile Şekil 3.41'de verilmiştir.



Şekil 3.40 *A. niger* ile 48 saat inkübe edilmiş %80 Etanol ve Ultra Saf Su ile hazırlanan propolis ekstraktlarının T48 görüntüsü



Şekil 3.41 *A. niger* ile 48 saat inkübe edilmiş NADES 62 ve NADES 76 ile hazırlanan propolis ekstraktlarının T48 görüntüsü

Propolis ekstraktlarının antimikrobiyal aktivite sonuçları MİK ve MBK/MFK için sırasıyla Tablo 3.26 ve Tablo 3.27'de verilmiştir. MİK ve MBK/MFK değerlerinin hesaplanmasında kullanılan yüzde inhibisyon değerleri Tablo A15 ile Tablo A19 arasındaki tablolarda verilmiştir.

Tablo 3.26 Propolis ekstraktlarının minimum inhibisyon konsantrasyonları (w/v)

	***Salmonella* spp.**	***Staphylococcus Aereus***	***Aspergillus niger***	***Aspergillus oryzae***	***Penicllium* spp.**
NADES 57	%1,6	%0,8	%3,2	%1,6	%0,4
NADES 58	%0,8	%0,4	%3,2	%1,6	%0,4
NADES 62	%0,8	%0,4	%1,6	%0,8	%0,2
NADES 76	%0,8	%0,8	%6,3	%1,6	%0,4
Saf su	-	%6,3	-	-	%25,0
%80 Etanol	%3,1	%0,4	%0,8	%0,8	%0,2

Tablo 3.27 Propolis ekstraktlarının minimum bakterisidal/fungisidal konsantrasyonları (w/v)

	***Salmonella* spp.**	***Staphylococcus Aereus***	***Aspergillus niger***	***Aspergillus oryzae***	***Penicllium* spp.**
NADES 57	-	-	%6,3	%6,3	%1,6
NADES 58	%6,3	%0,8	%6,3	%6,3	%1,6
NADES 62	%6,3	%12,5	%1,6	%3,1	%0,8
NADES 76	%0,8	-	%6,3	%6,3	%1,6
Saf su	-	-	-	-	-
%80 Etanol	%6,3	%12,5	%0,8	%1,6	%0,4

3.6.2 Optimum Koşullarda Hazırlanan Propolis Ekstraktlarının Disk Difüzyon Analizleri

Her bir çözelti (NADES 57, NADES 58, NADES 62, NADES 76, Ultra Saf Su ve %80 Etanol) için bir bakteri (*Salmonella* spp.) ve üç küf (*Aspergillus niger, Aspergillus oryzae* ve *Penicillium* spp.) ile 3 tekrarlı gerçekleştirilen disk difüzyon çalışmalarında elde edilen inhibisyon zonları Tablo 3.28'de özetlenmiştir. Ayrıca Scan1200® yazılımından alınan *Penicillium* spp.'ye karşı NADES 62 ve %80 etanol ile oluşturulmuş propolis ekstraktlarının oluşturduğu inhibisyon zonları ile ilgili görüntüler Şekil 3.42'de verilmiştir (Le Page, 2016).

NADES'ler ile hazırlanmış olan propolis ekstraktlarının tamamı bakteriler için %80 etanol ile hazırlanmış olan propolis ekstraktlarından daha iyi antibakteriyel etki göstermiştir. Bu etkinin propolis ekstraktından kaynaklanan kısmını netleştirmek için fenolik bileşikçe en zengin olduğu daha önceki çalışmalarda tespit edilen NADES62 çözeltisi propolis ekstrakte edilmemiş hali ile (kör olarak) disk difüzyon analizine tabii tutulmuş ve bakteriler için propolis ekstraksiyonu sonucunda elde edilen NADES 62'ye benzer etki gösterdiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla antibakteriyel etkinin büyük çoğunluğu çözücüden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Wikene vd. (2017) yaptığı çalışmada da belirtildiği üzere NADES'ler bakteriler üzerinde gösterdiği antimikrobiyal etkileri, küf ve mayalar için gösterememektedir. Antimikrobiyal etkileri çalışılan küfler için %50 (w/v) konsantrasyonda NADES

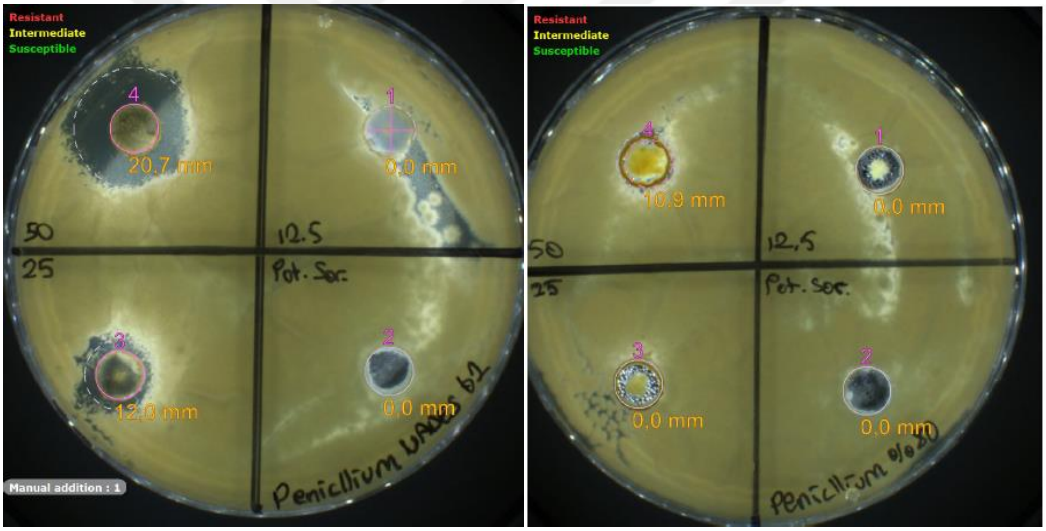
58 ve NADES 62 en yüksek zonları oluşturmuştur. Bu değerler %80 etanol için çok daha düşük tespit edilmiştir. NADES 62 ile gerçekleştirilen kör çalışmasında bu çözücünün hiçbir küf için inhibisyon zonu oluşturmadığı görüldüğünden, küf inhibisyonunun tamamı, ilgili çözücülerde elde dilen propolis aktif bileşenlerinin etkisi olarak değerlendirilmiştir. *Salmonella* spp.'ye karşı NADES 62 ve %80 etanol ile oluşturulmuş propolis ekstraktlarının oluşturduğu inhibisyon zonları ile ilgili görüntüler Şekil 3.43'te verilmiştir. NADES 62 ile gerçekleştirilen kör çözücü inhibisyon zonları tespit çalışmalarının görüntüleri *Penicillium* spp. ve *Salmonella* spp. için Şekil 3.44'te verilmiştir.

Tablo 3.28. Propolis ekstraktlarının disk difüzyon testi inhibisyon zon ölçüleri (mm)

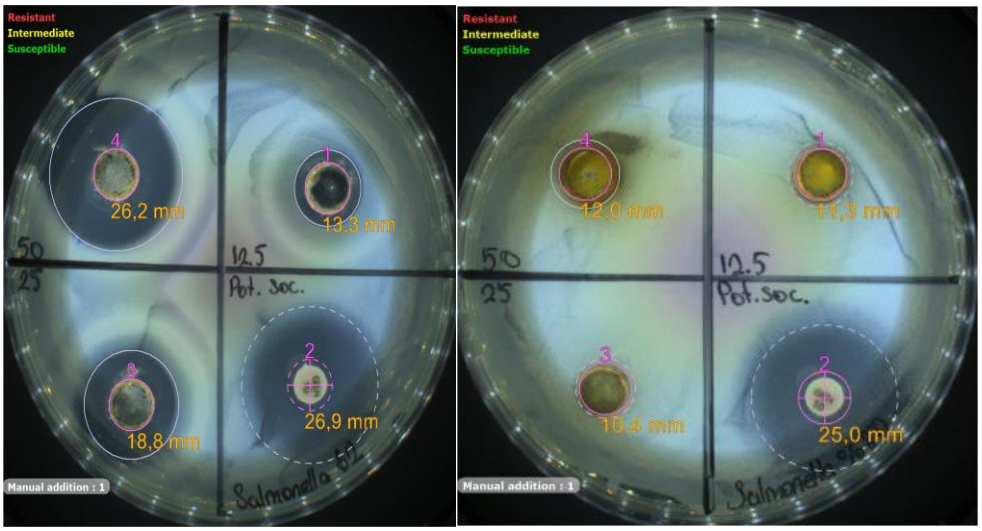
Çözücü	**Kons.**	***Salmonella* spp.**	***A. Niger***	***A. Oryzae***	***Penicillium* spp.**
NADES 57	12,5%	$13,7 \pm 4,7^{e}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{d}$
	25,0%	$13,5 \pm 0,6^{e}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{d}$
	50,0%	$23,3 \pm 0,6^{c}$	$12,3 \pm 1,3^{a}$	$10,9 \pm 0,8^{a}$	$15,1 \pm 0,7^{abc}$
-	Ant.	$26,3 \pm 0,6^{abc}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{d}$
NADES 58	12,5%	$17,2 \pm 4,5^{d}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{d}$
	25,0%	$24,6 \pm 0,2^{bc}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$11,2 \pm 0,8^{c}$
	50,0%	$29,1 \pm 1,1^{a}$	$11,8 \pm 1,2^{ab}$	$11 \pm 0,6^{a}$	$19,5 \pm 0,9^{a}$
-	Ant.	$26,9 \pm 0,3^{ab}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{d}$
NADES 62	12,5%	$13 \pm 0,3^{ef}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{d}$
	25,0%	$18,4 \pm 0,5^{d}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$11,9 \pm 0,7^{c}$
	50,0%	$26,1 \pm 0,3^{abc}$	$11,8 \pm 0,8^{ab}$	$12,5 \pm 0,7^{a}$	$19,7 \pm 1,2^{a}$
-	Ant.	$26,7 \pm 0,3^{ab}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{d}$
NADES 76	12,5%	$12,9 \pm 0,1^{ef}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{d}$
	25,0%	$18,4 \pm 2,3^{d}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{d}$
	50,0%	$25 \pm 1,5^{bc}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$5,3 \pm 6,2^{b}$	$17,7 \pm 1^{ab}$
-	Ant.	$26,6 \pm 0,3^{abc}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{d}$
USS	12,5%	0 ± 0^{g}	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{d}$
	25,0%	0 ± 0^{g}	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{d}$
	50,0%	0 ± 0^{g}	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{d}$
-	Ant.	$28,9 \pm 0,8^{a}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{d}$

Tablo 3.28. Propolis ekstraktlarının disk difüzyon testi inhibisyon zon ölçüleri (mm) (devamı)

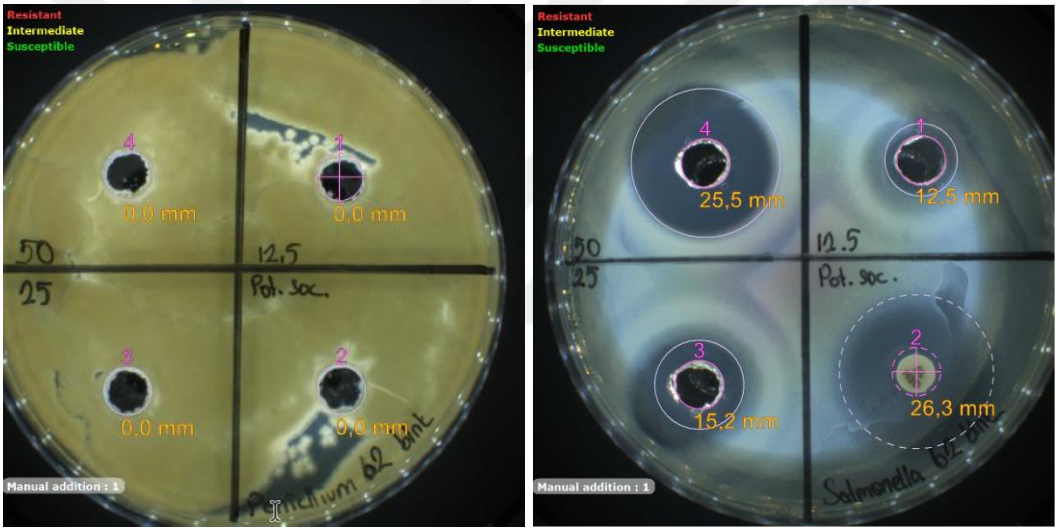
Çözücü	Kons.	*Salmonella* spp.	*A. Niger*	*A. Oryzae*	*Penicillium* spp.
%80 Etanol	12,5%	$10,1 \pm 0,3^{f}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{d}$
	25,0%	$10,7 \pm 0,6^{ef}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$10,2 \pm 7,3^{c}$
	50,0%	$12,2 \pm 0,2^{ef}$	$8,8 \pm 5,9^{b}$	$2,6 \pm 5,2^{bc}$	$12,4 \pm 2,2^{bc}$
-	Ant.	$25,4 \pm 0,4^{bc}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{d}$
NADES 62 Kör	12,5%	$12,4 \pm 0,2^{ef}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{d}$
	25,0%	$20,3 \pm 4,5^{cd}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{d}$
	50,0%	$24,8 \pm 0,9^{bc}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{d}$
-	Ant.	$25,9 \pm 2,3^{abc}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{c}$	$0,0 \pm 0,0^{d}$



Şekil 3.42 NADES 62 ve %80 etanol ile hazırlanan propolis ekstraktlarının *Penicillium* spp. üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları



Şekil 3.43 NADES 62 ve %80 etanol ile hazırlanan propolis ekstraktlarının *Salmonella* spp. üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları



Şekil 3.44 NADES 62 ile hazırlanan kör çözücünün *Penicillium* spp. ve *Salmonella* spp. üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları

Propolisin antimikrobiyal özellikleri üzerine yapılmış çok sayıda bilimsel çalışma vardır. Kompleks ve değişken bileşimi ve buna bağlı geniş aktivite spektrumu nedeniyle propolisin antimikrobiyal özellikleri üzerine çalışmalar yapılmaya da devam edilmektedir. Propolisin 600'den fazla bakteri üzerindeki etkisi üzerine yapılan çalışmaların sonuçlarının analiz edildiği bir derleme çalışmasında propolisin Gram-pozitif bakterilere karşı Gram-negatif bakterilerden daha fazla aktivite gösterdiği gösterilmiştir. Ayrıca, dünyanın farklı bölgelerinden elde edilen propolis örneklerinin antimikrobiyal aktiviteleri karşılaştırılmış sonuç olarak, Orta Doğu'dan gelen propolislerin hem Gram-pozitif (*Staphylococcus aureus*) hem de Gram-negatif (*Escherichia coli*) bakterilere karşı yüksek aktivitesi olduğu

belirtilmiştir. Eş zamanlı olarak, en düşük aktivitenin Almanya, İrlanda ve Kore'den gelen propolis örneklerinde elde edildiği gösterilmiştir (Przybylek & Karpinski, 2019).

Silici'nin 2020 yılında basılan kitabında propolisin antifungal aktivitesine değinilmiştir (Silici, 2020). Bu kitapta hem tıp alanında hem de gıda alanında çeşitli küf ve mayalara karşı propolisin antifungal etkisinin tespit edildiği bildirilmektedir. Çalışmalara konu olmuş türler arasında *Candida, Trichosporon, Paracoccidioides, Aspergillus, Alternaria, Fusarium, Melonis, Penicillium* antifungal aktivite çalışmalarına en sık konu olmuş türlerdir. Dias vd. (2012) yaptığı bir çalışmada propolisin antimikrobiyal aktivitesinin fizikokimyasal bileşimi ile doğrudan ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Pubmed veri tabanında 2022 yılında Ozarowski vd. (2022) tarafından yapılan bir incelemede "propolis" anahtar kelimesi ile 3885 yayın bulunduğu ve bu yayınların yaklaşık %63'ünün son 10 yıl içinde yapıldığı tespit edilmiştir. Aynı veri tabanında son 10 yılda yapılmış yayınlarda antimikrobiyal aktivitenin incelendiği 1072 yayının, 161 adedinin antifungal aktiviteyi incelediği belirtilmiştir (Ozarowski vd., 2022). Bu 161 yayının 122 adedinde propolisin *Candida* spp.'ye karşı olan aktivitesi incelenmiştir. Özellikle MFK değerleri olan yayınların incelendiği derlemede, *Candida* türleri için MFK değerlerinin 64 µg/mL ile 8 mg/mL arasında değiştiği belirtilmiştir. Bu çalışmada incelenen küf türlerinden *Aspergillus niger* ve *Penicillium* spp. için aynı çalışmada MFK değerleri sırasıyla 7,5 mg/mL ve 5,0 mg/mL olarak bildirilmiştir (Ozarowski vd., 2022). Bu çalışmada model bir gıdaya eklenmek üzere seçilen NADES 62 ile hazırlanan propolis ekstraktının MFK değerleri *Aspergillus niger* ve *Penicillium* spp. için sırasıyla 1,6 mg/mL ve 0,8 mg/mL olarak tespit edilmiştir.

3.7 Propolis Ekstraktı İlavesiyle Hazırlanan Keklerin Antifungal Dayanımı

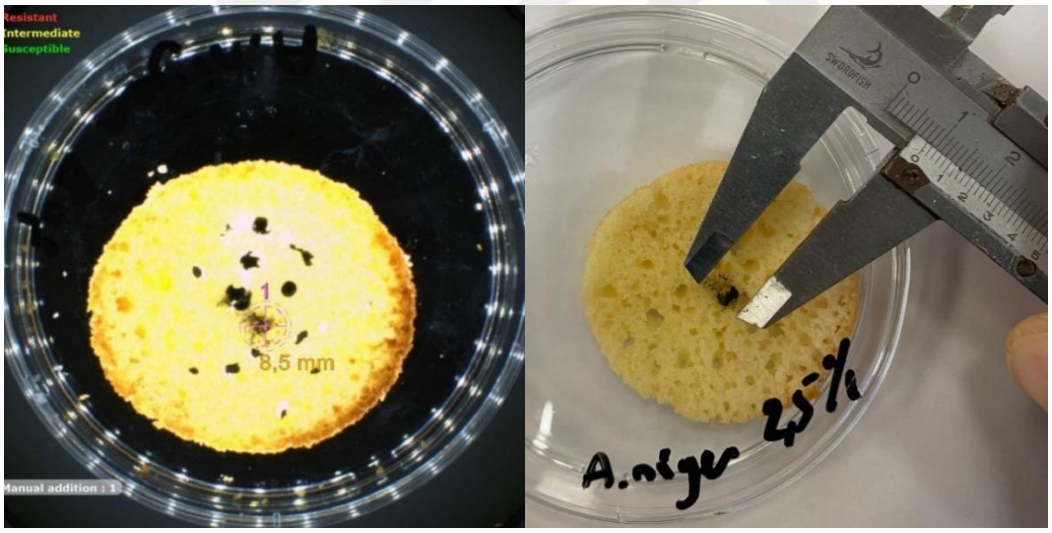
İstatistiksel olarak belirlenen optimum koşullarda NADES 62 ile ekstraksiyon sonucu elde edilen propolis ekstraktının belirli oranlarda karıştırıldığı kek örnekleri, steril bir kabinde yaklaşık 10 mm kalınlığında kesildikten sonra steril petrilere konulmuş ve ardından steril bir öze yardımıyla ayrı ayrı *Aspergillus niger* ve *Penicillium* spp. ile yaklaşık 4 mm çapında inoküle edilmiştir. İnoküle edilen kek örnekleri inkübatörde (Binder, Almanya) 25 °C'de 45 günlük inkübasyona

bırakılmış ve süre sonunda küf gelişimleri koloni sayıcı (Scan 1200, Interscience, Fransa) kullanılarak ölçülmüştür.

Keklerin delikli yapısı ve petriyi tam kaplayamamaları nedeniyle koloni sayıcı kullanılarak yapılan ölçümler eş zamanlı olarak kumpas kullanılarak da teyit edilmiştir. Kullanılan kumpasın okunabilirliği 1 mm olduğu için değerler okunabilirliği 0,1 mm olan koloni sayıcıdan alınmış ve kumpas sadece teyit amaçlı kullanılmıştır. Kek örneklerindeki küf inhibisyonu yüzdesi 3.1'de yer alan formüle göre hesaplanmıştır.

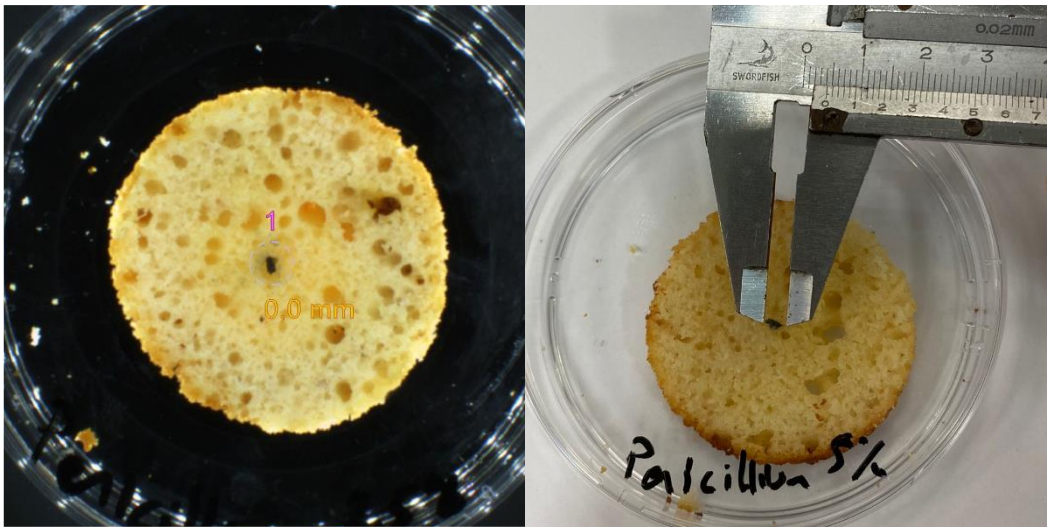
$$\textbf{İnhibisyon}, (\%) = \frac{(\textbf{Küf çapı sade kek} - \textbf{4mm}[13]) - (\textbf{Küf çapı numune} - \textbf{4mm})}{\textbf{Küf çapı sade kek} - \textbf{4mm}} \times \textbf{100} \qquad (3.1)$$

Kek örneklerindeki küflerin gelişimine ilişkin koloni sayıcı ile alınan ve kumpas ile yapılan doğrulama ölçümlerine ait görüntülerden birer örnek *Aspergillus niger* ile inoküle kek örneği için Şekil 3.45'de ve *Penicillium* spp. ile inoküle kek örneği için Şekil 3.46'da verilmiştir.



Şekil 3.45 %2,5 NADES 62 ile hazırlanan propolis ekstraktı eklenmiş ve Aspergillus niger ile inoküle edilen kek örneğinin 45. gün küf gelişimi

[13] Öze ile inoküle edilen küf genişliği



Şekil 3.46 %5,0 NADES 62 ile hazırlanan propolis ekstraktı eklenmiş ve *Penicillium* spp. ile inoküle edilen kek örneğinin 45. gün küf gelişimi

Yapılan üç tekrarlı çalışmaların sonuçları ortalama olarak *Aspergillus niger* ve *Penicillium* spp. için Tablo 3.29'da verilmiştir. Küf inhibisyonu oranları Minitab V 21.1.1 istatistik yazılımı (2022) (Minitab LLC, 2022) ile tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) kullanılarak %95 güven aralığında ($p < 0,05$) istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 3.29. Keklerde ekstrakt yüzdesine göre elde edilen küf inhibisyon yüzdeleri

	Yüzde inhibisyon (*Aspergillus niger*)	**Yüzde inhibisyon (*Penicillium* spp.)**
Sade Kek	%0,0 ± 0,0^{b}	%0,0 ± 0,0^{b}
%2,5 NADES 62 + Sade Kek	%8,4 ± 3,6 ^{b}	%100,0 ± 0,0^{a}
%5 NADES 62 + Sade Kek	%26,6 ± 6,4 ^{b}	%100,0 ± 0,0^{a}
%7,5 NADES 62 + Sade Kek	%100,0 ± 0,0 ^{a}	%100,0 ± 0,0^{a}
%10 NADES 62 + Sade Kek	%74,8 ± 43,6 ^{a}	%100,0 ± 0,0^{a}
%15 NADES 62 + Sade Kek	%100,0 ± 0,0 ^{a}	%100,0 ± 0,0^{a}
%20 NADES 62 + Sade Kek	%100,0 ± 0,0 ^{a}	%100,0 ± 0,0^{a}

Aspergillus niger ile inoküle edilen keklerde propolis ekstraktı eklenmemiş kek örneği ile %2,5 ve %5 propolis ekstraktı eklenmiş keklerin antifungal dayanımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. %7,5 ve üstünde propolis ekstraktı eklenmiş hamur ile hazırlanan keklerde küf gelişimi tamamen inhibe edilmiştir.

Penicillium spp. ile inoküle edilen küflerde propolis ekstraktı eklenmemiş kek örneği ile propolis ekstraktı eklenmiş tüm keklerin antifungal dayanımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. %2,5 ve üstünde propolis ekstraktı eklenmiş hamur ile hazırlanan keklerde küf gelişimi tamamen inhibe edilmiştir.

Literatürde propolis ekstraktlarının gıda ürünlerinde antibakteriyel (Sağdıç vd. 2007) ve antifungal (Koç vd., 2007; Moreno vd., 2020; Ibrahim & Alqurashi, 2022; Mahdavi-Roshan, 2022) ajan olarak kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır.
Pobiega vd. (2019a), hazırladığı bir derleme çalışmasında gıda üretiminde propolis ekstraktlarının, düşük balmumu içeriği ve yüksek biyoaktif bileşik içeriği nedeniyle öncelikle etanol veya etanol/su ile hazırlanan ekstraktların kullanıldığına vurgu yapılmıştır. Propolis ekstraktlarının ilavesinin, depolama sırasında gıdaların mikrobiyal dayanıklılığını ve kalitesini artırdığı, bunun dışında propolisin, özellikle et ve balık ürünlerinde antioksidan olarak kullanılabildiği ve depolama sırasında meyve ve meyve sularının antioksidatif özelliklerini koruyabildiği belirtilmiştir (Pobiega vd., 2019a).

Ayrıca, gıdaların fiziksel ve kimyasal özelliklerine de katkıda bulunduğu, böylece depolama sırasında gıdanın kalitesini koruduğu bildirilmiştir. Aynı derlemede propolisin dezavantajının ise eklendiği gıdaların duyusal özelliklerini olumsuz yönde değiştirebilen tadı ve aroması olduğunun altı çizilmiştir (Pobiega vd., 2019a).

Morassi vd. (2018) yaptığı bir çalışmada kek üretim zincirinde bulunan küf türlerinin tespiti yapılmış ve bu küf türlerinin depolama süresince farklı kek formülasyonları açısından büyüme potansiyelleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda endüstriyel keklerde en sık karşılaşılan küflerin sırasıyla *Aspergillus flavus* (28.15%), *Penicillium citrinum* (18.45%), *Penicillium paxilli* (14.56%), ve *Aspergillus niger* (6.8%) olduğu tespit edilmiştir. Farklı antifungal ajanlar ile hazırlanan formülasyonlar 45 günlük depolama sürecinde küf gelişimi açısından incelenmiş ve çalışmada incelenen 12 küf türünden sadece *Penicillium glabrum* ve *Penicillium citrinum* antifungal ajan içermeyen keklerde sırasıyla 19. ve 44. günlerde misel oluşturmuştur. *Penicillium* spp.'nin NADES 62 ile hazırlanan propolis ekstraktı kullanılan keklerde hiç gelişim gösterememiş, ve bahsi geçen çalışmadaki gibi sadece antifungal ajan içermeyen keklerde kısmi gelişim gösterebilmiş olması da bu çalışmada elde edilen veriyi desteklemektedir (Morassi vd., 2018).

NADES 62 eklenmesi ile hazırlanan keklerde derin ötektik çözücünün içeriğinin neden olduğu duyusal olarak olumsuz durumlar gözlemlenmiştir. Bu sebeple hazırlanan keklerde derin ötektik çözücülerin kullanım miktarının da sınırlandırılması gerektiği görülmüştür. Propolis ekstraksiyonunda kullanılan NADES 62 pH değeri 2,88 olan asidik bir çözücüdür, bu çözücünün miktarı yükseldikçe hamurun pH değeri de değişmiş, bu durum kabartma tozunun etkinliğini azaltmış ve keklerin hacmi azalmıştır.

Aynı zamanda yüksek oranda aminoasit (prolin) de içeren çözücü sebebiyle, düşük pH, indirgen şeker varlığı ile sıcaklık sonucu oluşan maillard reaksiyonu ile duyusal olarak kabul edilemez seviyede esmerleşmiş ürünler ortaya çıktığı görülmüştür. NADES içermeyen, %2,5 içeren ve %20 içeren keklerin görüntüsü sırasıyla Şekil 3.47, Şekil 3.48 ve Şekil 3.49'da verilmiştir.



Şekil 3.47 NADES 62 içermeyen keklerin görüntüsü



Şekil 3.48 %2,5 NADES 62 içeren keklerin görüntüsü



Şekil 3.49 %20 NADES 62 içeren keklerin görüntüsü**.**

4
SONUÇ

Arı tutkalı olarak da bilinen propolis, bal arıları tarafından ağaçların tomurcuklardan ve diğer botanik kaynaklardan toplanarak üretilen reçinemsi bir maddedir. Tipik olarak propolis, flavonoidler, fenolik asitler ve bunların esterleri gibi polifenolleri yüksek miktarda içerir. Propolis antibakteriyel, antifungal, anti-enflamatuvar ve antiviral etkileri de dahil olmak üzere birçok özelliği sebebiyle artan bir kullanım alanı bulmaktadır. Propolisin bu etkileri gösterebilmesi için ekstraksiyon işlemine tabii tutulması ve içeriğindeki biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyon çözücüsüne alınması gerekmektedir. Geleneksel propolis ekstraksiyon yöntemleri, çevre ve/veya insan sağlığı için tehlikeli olabilen etanol, metanol ve propilen glikol gibi çözücülerin kullanımını içerir. Son yıllarda, doğal derin ötektik çözücüler (NADES'ler), doğal kaynaklardan biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu için geleneksel çözücülere çevreci ve sağlıklı alternatif çözücüler olarak ortaya çıkmıştır.

Çalışmada propolisten fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için alternatif yeşil çözücüler olarak NADES'lerin uygulanabilirliği incelenmiştir. Bu amaçla öncelikle farklı bileşenler ile oluşturulan 109 adet NADES'in fizikokimyasal (pH, yoğunluk, viskozite, stabilite) ve çözücü özellikleri (polarite, fenolik bileşik çözme kabiliyetleri) incelenmiş ve propolisten fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için optimizasyon çalışmalarında kullanılacak 4 farklı NADES kompozisyonu seçilmiştir. NADES'lerin geleneksel çözücülere oranla daha yüksek viskoziteli sıvılar olması sebebiyle ekstraksiyon işlemini kolaylaştırmak amacıyla sıcaklık ve ultrason uygulaması kullanılmıştır. Kimyasal proseslerin optimizasyonunda yaygın olarak kullanılan bir istatistiksel deneysel tasarım yöntemi olan merkezi kompozit tasarım kullanılarak propolisten fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu sıcaklık, ultrason genliği ve zaman gibi farklı parametreler açısından optimize edilmiştir. Optimizasyon için yanıt olarak toplam fenolik içerik ve toplam flavonoid içerik değerleri ayrı ayrı kullanılmıştır.

Toplam fenolik içerik miktarı Folin-Ciocalteu yöntemi ile tayin edilmiştir. Toplam flavonoid içerik miktarı alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. Optimum koşullarda elde edilen propolis ekstraktlarının fenolik bileşen karakterizasyonu LC-MS/MS sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Propolisin biyoaktif bileşenlerinin önemli bir özelliği olan antioksidan aktivitenin tayininde ise DPPH serbest radikali süpürme yöntemi kullanılmıştır.

Propolis, içeriğinde bulunan biyoaktif bileşenler nedeniyle antimikrobiyal özelliklere sahiptir. Bu etkinin tayini amacıyla optimum koşullarda elde edilen propolis ekstraktları minimum inhibisyon konsantrasyonu, minimum bakterisidal konsantrasyonu, minimum fungisidal konsantrasyonu ve disk difüzyon analizlerine tabii tutulmuştur. Antimikrobiyal aktivite analizlerinde Yıldız Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölüm laboratuvarından temin edilen *Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Penicillium* spp., *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella* spp. mikroorganizma olarak kullanılmıştır.

Seçilen NADES'ler ile gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen optimum koşulların (Sıcaklık (80 °C), süre (135 dakika) ve ultrason genliği (%100)) çoğu çözücü için aynı olduğu tespit edilmiştir. Belirlenen optimum koşullarda tekrar gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda elde edilen en yüksek toplam fenolik içerik sırasıyla %80 etil alkol, NADES 62, NADES 76, ile gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda elde edilmiştir. En yüksek toplam flavonoid içerik sırasıyla %80 etil alkol, NADES 57 ve NADES 62 ile gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda elde edilmiştir. NADES 76, NADES 58 ve Saf suyun toplam fenolik ve toplam flavonoid açısından uygun çözücüler olmadığı gözlemlenmiştir.

Araştırma sonuçlarına göre, propolis ekstraktlarının antifungal etkisi, antibakteriyel etkisinden daha güçlü çıkmıştır. Ek olarak, propolis ekstraktlarının içerdiği fenolik bileşen miktarı arttıkça, mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkisinin de arttığı görülmüştür. Çalışmalar sırasında tespit edilen bir diğer olgu ise bazı çözücülerin de mikroorganizmalar üzerinden antimikrobiyal etki gösterdiğidir. NADES'ler ile hazırlanan propolis ekstraktlarının gösterdiği antibakteriyel etkinin büyük çoğunluğunun çözücülerden kaynaklandığı, ancak çözücülerin herhangi bir antifungal etki göstermediği dolayısıyla elde edilen tüm antifungal etkinin çözücü içinde ekstrakte edilmiş propolise özgü fenolik bileşiklerden kaynaklandığı gösterilmiştir.

Çalışmanın son aşamasında toplam fenolik içerik ve in vitro antifungal etki açısından en uygun olduğu tespit edilen çözücü NADES 62 (betain, malik asit ve prolin 1:1:1, %15 su) ile optimum koşullarda gerçekleştirilen propolis ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstrakt bir gıda ürününde (vanilyalı kek) antifungal ajan olarak kullanılmış ve in situ antifungal etkisi incelenmiştir. Doğal içerikli antifungal ajanlar açısından düşük sayılabilecek seviyelerde %100'e kadar etkili olduğu tespit edilmiştir.

Gıda ürünlerinin raf ömrünün propolisin antimikrobiyal etkisi sayesinde doğal olarak uzatılabileceği gösterilmiştir. NADES'lerin, çeşitli sebepler ile etil alkol ya da propilen glikol içeren propolis ekstraktlarını kullanmayan kişilerin kullanabileceği çevreci ve doğal ekstraksiyon çözücüleri olduğu tespit edilmiştir. NADES'ler geleneksel çözücülere alternatif olmanın ötesinde daha yüksek antifungal etki göstermeleri sebebiyle birincil tercih haline de gelebilecektir. Ayrıca bu çalışma doğal derin ötektik çözücüler ile hazırlanan propolis ekstraktlarının vücutta emilimi ve insan sağlığına faydaları konusunda yapılacak yeni çalışmalara da katkı sağlayacaktır.

KAYNAKÇA

Abbott, A. P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D. L., & Rasheed, R. K. (2004a). Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. Journal of the American Chemical Society, 126(29), 9142–9147. https://doi.org/10.1021/ja048266j

Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., & Rasheed, R. (2004b). Ionic liquids based upon metal halide/substituted quaternary ammonium salt mixtures. Inorganic chemistry, 43(11), 3447–3452. https://doi.org/10.1021/ic049931s

Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., & Tambyrajah, V. (2003). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. Chemical communications (Cambridge, England), (1), 70–71. https://doi.org/10.1039/b210714g

Abbott, A. P., Harris, R. C., Ryder, K. S., D'Agostino, C., Gladden, L. F. & Mantle, M. D. (2011). Glycerol eutectics as sustainable solvent systems. Green Chemistry, 13(1), 82–90. http://dx.doi.org/10.1039/C0GC00395F

Aboulghazi, A., Touzani, S., Fadil, M., & Lyoussi, B. (2022a). Physicochemical characterization and in vitro evaluation of the antioxidant and anticandidal activities of Moroccan propolis. Veterinary world, 15(2), 341–349. https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.341-349

Aboulghazi, A., Bakour, M., Fadil, M. & Lyoussi, B. B. (2022b). Simultaneous Optimization of Extraction Yield, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Moroccan Propolis Extracts: Improvement of Ultrasound-Assisted Technique Using Response Surface Methodology. 10(297), 1-16. https://doi.org/10.3390/pr10020297

Abu-Mellal, A., Koolaji, N., Duke, R. K., Tran, V. H., & Duke, C. C. (2012). Prenylated cinnamate and stilbenes from Kangaroo Island propolis and their antioxidant activity. Phytochemistry, 77, 251–259. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.01.012

Agüero, M. B., Svetaz, L., Sánchez, M., Luna, L., Lima, B., López, M. L., Zacchino, S., Palermo, J., Wunderlin, D., Feresin, G. E., & Tapia, A. (2011). Argentinean Andean propolis associated with the medicinal plant Larrea nitida Cav.

(Zygophyllaceae). HPLC-MS and GC-MS characterization and antifungal activity. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, 49(9), 1970–1978. https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.05.008

Ahangari, Z., Naseri, M., & Vatandoost, F. (2018). Propolis: Chemical Composition and Its Applications in Endodontics. Iranian endodontic journal, 13(3), 285–292. https://doi.org/10.22037/iej.v13i3.20994

Ahn, M. R., Kumazawa, S., Hamasaka, T., Bang, K. S., & Nakayama, T. (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. Journal of agricultural and food chemistry, 52(24), 7286–7292. https://doi.org/10.1021/jf048726s

Ali, I. H., Daoud, A. S., & Shareef, A. Y. (2012). Physical properties and chemical analysis of Iraqi propolis. Tikrit Journal of Pure Science, 17(2), 26-31.

Aliyazıcıoglu, R., Sahin, H., Erturk, O., Ulusoy, E. & Kolayli, S. (2013). Properties of Phenolic Composition and Biological Activity of Propolis from Turkey, International Journal of Food Properties, 16(2), 277–287. https://doi.org/10.1080/10942912.2010.551312

Alvarez, M.V., Ponce, A.G., Goyeneche, R. & Moreira, M.R. (2017), Physical Treatments and Propolis Extract to Enhance Quality Attributes of Fresh-Cut Mixed Vegetables. Journal of Food Processing and Preservation, 41(5), 1-11. https://doi.org/10.1111/jfpp.13127

Al-Wahaibi, I., Al-Wahaibi, Y., Al-Hajri, R., Jibril, B., & Shuwa, S. (2019). The novel use of malonic acid-based deep eutectic solvents for enhancing heavy oil recovery. International Journal of Oil, Gas and Coal Technology, 20(1), 31-54. https://doi.org/10.1504/IJOGCT.2019.096493

Aly, S. A., & Elewa, N. A. (2007). The effect of Egyptian honeybee propolis on the growth of Aspergillus versicolor and sterigmatocystin biosynthesis in Ras cheese. The Journal of dairy research, 74(1), 74–78. https://doi.org/10.1017/S002202990600207X

Andrade, J. K. S., Denadai, M., Andrade, G. R. S., da Cunha Nascimento, C., Barbosa, P. F., Jesus, M. S., & Narain, N. (2018). Development and characterization

of microencapsules containing spray dried powder obtained from Brazilian brown, green and red propolis. Food research international (Ottawa, Ont.), 109, 278–287. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.048

Andrews J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 48 Suppl 1, 5–16. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5

Anjum, S. I., Ullah, A., Khan, K. A., Attaullah, M., Khan, H., Ali, H., Bashir, M. A., Tahir, M., Ansari, M. J., Ghramh, H. A., Adgaba, N., & Dash, C. K. (2019). Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. Saudi journal of biological sciences, 26(7), 1695–1703. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.08.013

Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Ozyürek, M., Celik, S. E., Bektaşoğlu, B., Berker, K. I., & Ozyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. Molecules (Basel, Switzerland), 12(7), 1496–1547. https://doi.org/10.3390/12071496

Arnao M. B., (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. Trends in Food Science & Technology, 11(11), 419-421. https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00027-9.

Aroso, I. M., Silva, J. C., Mano, F., Ferreira, A. S., Dionísio, M., Sá-Nogueira, I., Barreiros, S., Reis, R. L., Paiva, A., & Duarte, A. R. (2016). Dissolution enhancement of active pharmaceutical ingredients by therapeutic deep eutectic systems. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V, 98, 57–66. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.11.002

Bakirtzi, C., Triantafyllidou, K., Makris, D. P. (2016). Novel lactic acid-based natural deep eutectic solvents: Efficiency in the ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from common native Greek medicinal plants. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants 3 (3) 120-127 https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.03.003.

Bakkaloglu, Z., Arıcı, M., Karasu, S., (2021). Optimization of ultrasound-assisted extraction of turkish propolis and characterization of phenolic profile, antioxidant and antimicrobial activity. Food Sci. Technol (Campinas) 41 (3) https://doi.org/10.1590/fst.14520

Bankova V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. Journal of ethnopharmacology, 100(1-2), 114–117. https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.004

Bankova, V., Christov, R., Popova, S., Marcucci, M.C., Tsvetkovac, I., Kujumgiev, A. (1999). Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. Fitoterapia 70 190-193

Bankova, V., Christov, R. S., Tejera, A. D., (1998). Lignans and other constituents of propolis from the canary islands. Phytochemistry, 49 (5), 1411-1415, https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00108-3.

Bankova, V., de Castro, S. L., Marcucci, C. M. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie 31(1). https://doi.org/10.1051/apido:2000102

Bankova, V., Dyulgerov, A., Popov, S., Evstatieva, L., Kuleva, L., Pureb, O. and Zamjansan, Z. (1992). - Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. 23(1). Apidologie https://doi.org/10.1051/apido:19920109

Bankova, V., Popova, M., & Trusheva, B. (2006). Plant sources of propolis: an update from a chemist's point of view. Natural Product Communications, 1(11), https://doi.org/10.1177/1934578X0600101118.

Bankova, V., Popova, M., & Trusheva, B. (2014). Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. Chemistry Central Journal, 8(1), 1-8. https://doi.org/10.1186/1752-153X-8-28

Bankova, V., Popova, M., & Trusheva, B. (2016). New emerging fields of application of propolis. Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 35(1), 1-11. https://doi.org/10.20450/mjcce.2016.864

Bankova, V., Trusheva, B., & Popova, M. (2021). Propolis extraction methods: A review. Journal of apicultural research, 60(5), 734-743. https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1901426

Bankova, V., Christov3, R., Kujumgiev, A., Marcucci, M. C., & Popov, S. (1995). Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. Zeitschrift für Naturforschung C, 50(3-4), 167-172. https://doi.org/10.1515/znc-1995-3-402

Basim, E., Basim, H., & Özcan, M. (2006). Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. Journal of food engineering, 77(4), 992-996. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.08.027

Bektaşoğlu, B. (2007). Hidroksil radikal süpürülmesine dayalı antioksidan aktivite ölçümünde yeni bir yöntem geliştirilmesi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Bergstrom, F. W., Sturz, H. G., & Tracy, H. W. (1946). The use of the fused eutectic of sodium amide and potassium amide in organic syntheses. The Journal of Organic Chemistry, 11(3), 239-246. https://doi.org/10.1021/jo01173a005

Berretta, A. A., Arruda, C., Miguel, F. G., Baptista, N., Nascimento, A. P., Marquele-Oliveira, F., Hori, J. I., Barud, H. S., Damaso, B., Ramos, C., Ferreira R. & Bastos, J. K. (2017). Functional properties of Brazilian propolis: from chemical composition until the market. Book chapter in Superfood and functional food-an overview of their processing and utilization, 4(1), 74. http://dx.doi.org/10.5772/110001

Bogdanov, S., & Bankova, V. (2017). Propolis: Origin, Production, Composition; The Propolis Book, Chapter 1.

Boisard, S., Le Ray, A. M., Gatto, J., Aumond, M. C., Blanchard, P., Derbré, S., Flurin, C., & Richomme, P. (2014). Chemical composition, antioxidant and anti-AGEs activities of a French poplar type propolis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62(6), 1344-1351. https://doi.org/10.1021/jf4053397

Bonvehí, J. S., Coll, F. V., & Jordà, R. E. (1994). The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. Journal of the American Oil Chemists' Society, 71, 529-532. https://doi.org/10.1007/BF02540666

Bouzahouane, H., Ayari, A., Guehria, I., & Riah, O. (2021). The Propolis: Antimicrobial activity and chemical composition analysis: Properties of propolis. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 10(6), e3211-e3211. https://doi.org/10.15414/jmbfs.3211

Bruschi, M. L., Cardoso, M. L. C., Lucchesi, M. B., & Gremião, M. P. D. (2003). Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. International Journal of Pharmaceutics, 264(1-2), 45-55. https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00386-7

Busch, V. M., Pereyra-Gonzalez, A., Šegatin, N., Santagapita, P. R., Ulrih, N. P., & Buera, M. D. P. (2017). Propolis encapsulation by spray drying: Characterization and stability. LWT, 75, 227-235. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.055

Büyüktuncel, E. (2013). Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. Marmara Pharmaceutical Journal, 17(2), 93-103. https://doi.org/10.12991/mpj.22340

Cao, Y. H., Wang, Y., Yuan, Q. (2004). Analysis of Flavonoids and Phenolic Acid in Propolis by Capillary Electrophoresis. Chromatographia 59(1). https://doi.org/10.1365/s10337-003-0138-z

Capanoglu, E., Beekwilder, J., Boyacioglu, D., De Vos, R. C., & Hall, R. D. (2010). The effect of industrial food processing on potentially health-beneficial tomato antioxidants. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 50(10), 919-930. https://doi.org/10.1080/10408390903001503

Capanoglu, E., Beekwilder, J., Boyacioglu, D., Hall, R., & De Vos, R. (2008). Changes in antioxidant and metabolite profiles during production of tomato paste. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(3), 964-973. https://doi.org/10.1021/jf072990e

Cavalaro, R. I., Fabricio, L. F. D. F., & Vieira, T. M. F. D. S. (2020). Ultrasound-assisted extraction of antioxidants from Baccharis dracunculifolia and green propolis. Processes, 8(12), 1530. https://doi.org/10.3390/pr8121530

Chaillou, L. L., & Nazareno, M. A. (2009). Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. LWT-Food Science and Technology, 42(8), 1422-1427. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.03.002

Chang-Bravo, L., López-Córdoba, A., & Martino, M. (2014). Biopolymeric matrices made of carrageenan and corn starch for the antioxidant extracts delivery of Cuban red propolis and yerba mate. Reactive and Functional Polymers, 85, 11-19. https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2014.09.025

Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: Concept and principles. International journal of molecular sciences, 13(7), 8615-8627. https://doi.org/10.3390/ijms13078615

Chen, M., & Lahaye, M. (2021). Natural deep eutectic solvents pretreatment as an aid for pectin extraction from apple pomace. Food Hydrocolloids, 115, 106601. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106601

Chi, Y., Luo, L., Cui, M., Hao, Y., Liu, T., Huang, X., & Guo, X. (2020). Chemical composition and antioxidant activity of essential oil of Chinese propolis. Chemistry & biodiversity, 17(1), e1900489. https://doi.org/10.1002/cbdv.201900489

Choi, Y. H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I. W., Witkamp, G., & Verpoorte, R. (2011). Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology?. Plant physiology, 156(4), 1701-1705. https://doi.org/10.1104/pp.111.178426

Choi, Y. M., Noh, D. O., Cho, S. Y., Suh, H. J., Kim, K. M., & Kim, J. M. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. LWT-Food Science and Technology, 39(7), 756-761. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.05.015

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015

Coneac, G., Gafiţanu, E., Hădărugă, D. I., Hădărugă, N. G., Pînzaru, I. A., Bandur, G., Urşica, L., Păunescu, V., Murgu, P-ţa., Popa, T., & Gruia, A. (2008). Flavonoid contents of propolis from the west side of Romania and correlation with the antioxidant activity. Chem. Bull. Politehnica Univ.(Timisoara), 53, 56-60.

Contieri, L. S., Ribeiro, T. B., Sosa, F. H., Vaz, B. M., Pizani, R. S., Pintado, M., Ventura, S.P. M., de Souza Mesquita, L. M. & Rostagno, M. A. (2023). Unlocking the Full Potential of Green Propolis: A Novel Extraction Approach Using Eutectic

Solvents for Improved Phenolic Compound Recovery. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 11(36), 13470-13482. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.3c03812

Cottica, S. M., Sabik, H., Antoine, C., Fortin, J., Graveline, N., Visentainer, J. V., & Britten, M. (2015). Characterization of Canadian propolis fractions obtained from two-step sequential extraction. LWT-Food Science and Technology, 60(1), 609-614. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.045

Craveiro, R., Aroso, I., Flammia, V., Carvalho, T., Viciosa, M. T., Dionísio, M., Barreiros, S., Reis, R.L., Duarte, A.R.C., & Paiva, A. (2016). Properties and thermal behavior of natural deep eutectic solvents. Journal of Molecular Liquids, 215, 534-540. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.01.038

Cuesta-Rubio, O., Fernández, M. C., Hernández, I. M., Jaramillo, C. G. J., González, V. H., Porto, R. M. D. O., Delange, D.M., Fidalgo, L. M., Piccinelli, A. L., Campone, L.,& Rastrelli, L. (2017). Chemical profile and anti-leishmanial activity of three Ecuadorian propolis samples from Quito, Guayaquil and Cotacachi regions. Fitoterapia, 120, 177-183. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.06.016

Culpeper, N. (1653). The Complete Herbal. Londra

Çakır, B., & Güzel, N. (2023). Optimization of Propolis Extraction Under Thermosonication and Quantification of Bioactive Compounds by LC-MS/MS. Food Analytical Methods, 16(9), 1583-1595. https://doi.org/10.1007/s12161-023-02526-0

da Silva, F. C., da Fonseca, C. R., de Alencar, S. M., Thomazini, M., de Carvalho Balieiro, J. C., Pittia, P., & Favaro-Trindade, C. S. (2013). Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. Food and Bioproducts Processing, 91(1), 28-36. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.08.006

da Silva, F. C., Favaro-Trindade, C. S., de Alencar, S. M., Thomazini, M., & Balieiro, J. C. (2011). Physicochemical properties, antioxidant activity and stability of spray-dried propolis. Journal of ApiProduct and ApiMedical Science, 3(2), 94-100. https://doi.org/10.3896/IBRA.4.03.2.05

da Silva, J. F. M., de Souza, M. C., Matta, S. R., de Andrade, M. R., & Vidal, F. V. N. (2006). Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. Food Chemistry, 99(3), 431-435. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.055

Dai, Y., Rozema, E., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2016). Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from Catharanthus roseus with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. Journal of Chromatography A, 1434, 50-56. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.037

Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013a). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. Analytica chimica acta, 766, 61-68. https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019

Dai, Y., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2014). Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (Carthamus tinctorius). Food chemistry, 159, 116-121. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.155

Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013b). Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in Carthamus tinctorius L. Analytical chemistry, 85(13), 6272-6278. https://doi.org/10.1021/ac400432p

Davey, R. J., Garside, J., Hilton, A. M., McEwan, D., & Morrison, J. W. (1995). Purification of molecular mixtures below the eutectic by emulsion crystallization. Nature, 375(6533), 664-666. https://doi.org/10.1038/375664a0

De Groot, A. C., Popova, M. P., & Bankova, V. S. (2014). An update on the constituents of poplar-type propolis.

de Oliveira, M. S., Cruz, J. N., Ferreira, O. O., Pereira, D. S., Pereira, N. S., Oliveira, M. E. C., Venturieri, G.C., Guilhon, G.M.S.P., Filho, A. P. D. S., & Andrade, E. H. D. A. (2021). Chemical Composition of volatile compounds in apis mellifera propolis from the Northeast region of Pará State, Brazil. Molecules, 26(11), 3462. https://doi.org/10.3390/molecules26113462

Degirmencioglu, H., Guzelmeric, E., Yuksel, P. I., Kırmızıbekmez, H., Deniz, I., Yesilada, E. (2019). A New Type of Anatolian Propolis: Evaluation of Its Chemical Composition, Activity Profile and Botanical Origin. Chemistry & Biodiversity 16(12) 1612-1872 https://doi.org/10.1002/cbdv.201900492

Deye, J. F., Berger, T. A., & Anderson, A. G. (1990). Nile Red as a solvatochromic dye for measuring solvent strength in normal liquids and mixtures of normal liquids with supercritical and near critical fluids. Analytical chemistry, 62(6), 615-622. https://doi.org/10.1021/ac00205a015

Dığrak, M., Yılmaz, Ö., Çelik, S., & Yıldız, S. (1995). Propolisteki yağ asitleri ve antimikrobiyal etkisi üzerinde in vitro araştırmalar. Gıda, 20(4).

Dias, L. G., Pereira, A. P., & Estevinho, L. M. (2012). Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. Food and Chemical Toxicology, 50(12), 4246-4253. https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.056

Durand, E., Lecomte, J., Baréa, B., Piombo, G., Dubreucq, É., & Villeneuve, P. (2012). Evaluation of deep eutectic solvents as new media for Candida antarctica B lipase catalyzed reactions. Process biochemistry, 47(12), 2081-2089. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.07.027

Ebadi, Z., Khodanazary, A., Hosseini, S. M., & Zanguee, N. (2019). The shelf life extension of refrigerated Nemipterus japonicus fillets by chitosan coating incorporated with propolis extract. International Journal of Biological Macromolecules, 139, 94-102. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.204

El Kantar, S., Rajha, H. N., Boussetta, N., Vorobiev, E., Maroun, R. G., & Louka, N. (2019). Green extraction of polyphenols from grapefruit peels using high voltage electrical discharges, deep eutectic solvents and aqueous glycerol. Food Chemistry, 295, 165-171. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.111

Erdogan, S., Ates, B., Durmaz, G., Yilmaz, I., & Seckin, T. (2011). Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from Anatolia propolis and their radical scavenging capacities. Food and Chemical Toxicology, 49(7), 1592-1597. https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.04.006

Ertürk, Ö., Yavuz, C., & Sıralı, R. (2014). The antimicrobial activity of propolis from ordu province of Turkey. Mellifera, 14.

Espino, M., Fernández, M., Gomez, F. J., & Silva, M. F. (2016). Natural designer solvents for greening analytical chemistry. TrAC trends in analytical chemistry, 76, 126-136. https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.006

Eteraf-Oskouei, T., & Najafi, M. (2013). Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: a review. Iranian journal of basic medical sciences, 16(6), 731.

EUCAST, (2023). The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0, 2023.

Falcão, S. I., Freire, C., & Vilas-Boas, M. (2013). A proposal for physicochemical standards and antioxidant activity of Portuguese propolis. Journal of the American oil chemists' society, 90(11), 1729-1741. https://doi.org/10.1007/s11746-013-2324-y

Favaro-Trindade, C.S., Santana, A.S., Monterrey-Quintero, E.S., Trindade, M.A., Netto, F.M. (2010). The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. Food Hydrocolloids 24 (4) 336-340 https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.012.

Fearnley, J. (2001). Bee Propolis : Natural Healing from The Hive Group. Souvenir Press The Limited.

Fernandes, F. H., Guterres, Z. D. R., Violante, I. M., Lopes, T. F., Garcez, W. S., & Garcez, F. R. (2015). Evaluation of mutagenic and antimicrobial properties of brown propolis essential oil from the Brazilian Cerrado biome. Toxicology reports, 2, 1482-1488. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.11.007

Fernández, M., Espino, M., Gomez, F. J., & Silva, M. F. (2018). Novel approaches mediated by tailor-made green solvents for the extraction of phenolic compounds from agro-food industrial by-products. Food Chemistry, 239, 671-678. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.150

Finger, D., Machado, C. S., Torres, Y. R., Quináia, S. P., Thomaz, A. C. G., Gobbo, A. R., Monteiro, M. C., Ferreira, A. G., Sawaya, A. C. H. F., & Eberlin, M. N.

(2013). Antifungal bioassay-guided fractionation of an oil extract of propolis. Journal of Food Quality, 36(5), 291-301. https://doi.org/10.1111/jfq.12039

Florindo, C., Oliveira, F. S., Rebelo, L. P. N., Fernandes, A. M., & Marrucho, I. M. (2014). Insights into the synthesis and properties of deep eutectic solvents based on cholinium chloride and carboxylic acids. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2(10), 2416-2425. https://doi.org/10.1021/sc500439w

Frozza, C. O., Garcia, C. S. C., Gambato, G., de Souza, M. D. O., Salvador, M., Moura, S., Padilha, F. F., Seixas, F. K., Collares, T., Borsuk, S., Dellagostin, O. A., Henriques, J. A. P., & Roesch-Ely, M. (2013). Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. Food and chemical toxicology, 52, 137-142. https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.013

Funari, C. S., Sutton, A. T., Carneiro, R. L., Fraige, K., Cavalheiro, A. J., da Silva Bolzani, V., Hilder, E. F., & Arrua, R. D. (2019). Natural deep eutectic solvents and aqueous solutions as an alternative extraction media for propolis. Food Research International, 125, 108559. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108559

Gabriele, F., Chiarini, M., Germani, R., Tiecco, M., & Spreti, N. (2019). Effect of water addition on choline chloride/glycol deep eutectic solvents: Characterization of their structural and physicochemical properties. Journal of Molecular Liquids, 291, 111301. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111301

García, G., Aparicio, S., Ullah, R. & Atilhan, M. (2015). Deep Eutectic Solvents: Physicochemical Properties and Gas Separation Applications. Energy & Fuels 29 (4), 2616-2644 https://doi.org/10.1021/ef5028873

Gerard, J., Davyes, R., Johnson, T., Priest, R., Dodoens, R. & Katherine Golden Bitting Collection On Gastronomy. (1633) The herball: or, Generall historie of plantes. London, Printed by Adam Islip, Joice Norton and Richard Whitakers, anno. [Pdf] Retrieved from the Library of Congress, https://www.loc.gov/item/44028884/.

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. Food research international, 40(9), 1107-1121. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004

Ghosh, S., Chakraborty, R., & Raychaudhuri, U. (2012). Optimizing process conditions for palm (Borassus flabelliffer) wine fermentation using response surface methodology. International Food Research Journal, 19(4), 1633-1639.

Gill, I., & Vulfson, E. (1994). Enzymic catalysis in heterogeneous eutectic mixtures of substrates. Trends in biotechnology, 12(4), 118-122. https://doi.org/10.1016/0167-7799(94)90088-4

Gill, I., & Vulfson, E. N. (1993). Enzymic synthesis of short peptides in heterogeneous mixtures of substrates. Journal of the American Chemical Society, 115(8), 3348-3349. https://doi.org/10.1021/ja00061a051

Gomez, F. J. V., Espino, M., Fernandez, M., Raba, J., & Silva, M. F. (2016). Enhanced electrochemical detection of quercetin by natural deep eutectic solvents. Analytica Chimica Acta, 936, 91-96. https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.07.022

Gomez, F. J., Espino, M., Fernández, M. A., & Silva, M. F. (2018). A greener approach to prepare natural deep eutectic solvents. ChemistrySelect, 3(22), 6122-6125. https://doi.org/10.1002/slct.201800713

González, C. G., Mustafa, N. R., Wilson, E. G., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2018). Application of natural deep eutectic solvents for the “green” extraction of vanillin from vanilla pods. Flavour and Fragrance Journal, 33(1), 91-96. https://doi.org/10.1002/ffj.3425

Grange, J. M., & Davey, R. W. (1990). Antibacterial properties of propolis (bee glue). Journal of the Royal Society of Medicine, 83(3), 159-160. https://doi.org/10.1177/014107689008300310

Green, T. (1824). Universal herbal; or, Botanical, medical, and agricultural dictionary.

Greenaway, W., May, J., Scaysbrook, T., & Whatley, F. R. (1991). Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. Zeitschrift für Naturforschung C, 46(1-2), 111-121. https://doi.org/10.1515/znc-1991-1-218

Gregory, A. G., Toshitaka, U., Fumihiko, T., Daisuke, H. (2008). Effect of vapors from fractionated samples of propolis on microbial and oxidation damage of rice

during storage. Journal of Food Engineering 88 341-352 https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.02.019

Gullón, P., Gullón, B., Romaní, A., Rocchetti, G., & Lorenzo, J. M. (2020). Smart advanced solvents for bioactive compounds recovery from agri-food by-products: A review. Trends in Food Science & Technology, 101, 182-197. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.007

Guo, Z., Zhang, Q., You, T., Zhang, X., Xu, F., & Wu, Y. (2019). Short-time deep eutectic solvent pretreatment for enhanced enzymatic saccharification and lignin valorization. Green Chemistry, 21(11), 3099-3108. https://doi.org/10.1039/C9GC00704K

Gurgen, A., Serencam, H., Kara, Y., Can, Z., & Yıldız, S. (2021). Optimization of Extraction Parameters of Ethanol Extracts of Propolis Samples Using Artificial Neural Network and Moth-Flame Optimization Algorithm. Journal of Apicultural Science, 65(2), 229-241. https://doi.org/10.2478/jas-2021-0018

Guzelmeric, E., Sipahi, H., Özhan, Y., Hamitoğlu, M., Helvacıoğlu, S., Düz, G., Akyıldız, İ. E.,Kadıoğlu Yaman, B., Hazar, M., Aydın Dilsiz, S., Aydın, A., & Yesilada, E. (2023). Comprehensive estrogenic/anti-estrogenic, anticancer, mutagenic/anti-mutagenic, and genotoxic/anti-genotoxic activity studies on chemically characterized black poplar and Eurasian aspen propolis types. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 226, 115241. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115241

Gülçin, I., Bursal, E., Şehitoğlu, M. H., Bilsel, M., & Gören, A. C. (2010). Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. Food and Chemical Toxicology, 48(8-9), 2227-2238. https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.053

Habibollahi, M. H., Karimyan, K., Arfaeinia, H., Mirzaei, N., Safari, Y., Akramipour, R., Sharafi, H., & Fattahi, N. (2019). Extraction and determination of heavy metals in soil and vegetables irrigated with treated municipal wastewater using new mode of dispersive liquid–liquid microextraction based on the solidified deep eutectic solvent followed by GFAAS. Journal of the Science of Food and Agriculture, 99(2), 656-665. https://doi.org/10.1002/jsfa.9230

Hagar, A., Nurlisa, F., Abd Rani, N. F., Ibrahim, M., Ramli, N., Ahmed, I., Jalil, A., Jalil, M., Anuar, M. N. N. & Anuar, N. (2021). Optimization of extraction temperature and time on phenolic compounds and antioxidant activity of malaysian propolis trigona spp. Aqueous extract using response surface methodology. Malaysian Journal of Analytical Sciences. 25. 649-660.

Haroun, M. I. (2006). Türkiye'de üretilen bazı çiçek ve salgı ballarının fenolik asit ve flavonoid profilinin belirlenmesi. [Doctoral dissertation, Ankara University]. http://hdl.handle.net/20.500.12575/37033

Hegazi, A. G. (1998). Propolis an overview. J. Bee Informed, 5(5), 22-23. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125080

Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G. Q., & Hu, F. L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. Molecules, 19(12), 19610-19632. https://doi.org/10.3390/molecules191219610

Huang, Y., Feng, F., Chen, Z. G., Wu, T., & Wang, Z. H. (2018). Green and efficient removal of cadmium from rice flour using natural deep eutectic solvents. Food chemistry, 244, 260-265. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.060

Huang, Y., Feng, F., Jiang, J., Qiao, Y., Wu, T., Voglmeir, J., & Chen, Z. G. (2017). Green and efficient extraction of rutin from tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents. Food Chemistry, 221, 1400-1405. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.013

Ibrahim, M. E. E. D., & Alqurashi, R. M. (2022). Anti-fungal and antioxidant properties of propolis (bee glue) extracts. International Journal of Food Microbiology, 361, 109463. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109463

Inui, S., Shimamura, Y., Masuda, S., Shirafuji, K., Moli, R. T., & Kumazawa, S. (2012). A new prenylflavonoid isolated from propolis collected in the Solomon Islands. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 76(5), 1038-1040. https://doi.org/10.1271/bbb.120021

Jaganathan, S. K., & Mandal, M. (2009). Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review. BioMed Research International, 2009. https://doi.org/10.1155/2009/830616

Jansen-Alves, C., Krumreich, F. D., Zandoná, G. P., Gularte, M. A., Borges, C. D., & Zambiazi, R. C. (2019). Production of propolis extract microparticles with concentrated pea protein for application in food. Food and Bioprocess Technology, 12, 729-740. https://doi.org/10.1007/s11947-019-2246-2

Jensen, S. J. K. (2003). Oxidative stress and free radicals. Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, 666, 387-392. https://doi.org/10.1016/j.theochem.2003.08.037

Jeong, K. M., Ko, J., Zhao, J., Jin, Y., Han, S. Y., & Lee, J. (2017). Multi-functioning deep eutectic solvents as extraction and storage media for bioactive natural products that are readily applicable to cosmetic products. Journal of Cleaner Production, 151, 87-95. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.038

Jhong, H. R., Wong, D. S. H., Wan, C. C., Wang, Y. Y., & Wei, T. C. (2009). A novel deep eutectic solvent-based ionic liquid used as electrolyte for dye-sensitized solar cells. Electrochemistry Communications, 11(1), 209-211. https://doi.org/10.1016/j.elecom.2008.11.001

Jolly, V. G. (1978). Propolis varnish for violins. Bee World, 59(4), 158-161. https://doi.org/10.1080/0005772X.1978.11097715

Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. Journal of agricultural and food chemistry, 47(10), 3954-3962. https://doi.org/10.1021/jf990146l

Kalhor, P., & Ghandi, K. (2019). Deep eutectic solvents for pretreatment, extraction, and catalysis of biomass and food waste. Molecules, 24(22), 4012. https://doi.org/10.3390/molecules24224012

Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Troullidou, E., Mourtzinos, I., & Karathanos, V. T. (2009). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. Food chemistry, 116(2), 452-461. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.060

Kanbur, M., Eraslan, G., & Silici, S. (2009). Antioxidant effect of propolis against exposure to propetamphos in rats. Ecotoxicology and Environmental Safety, 72(3), 909-915. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.12.018

Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. Food analytical methods, 2, 41-60. https://doi.org/10.1007/s12161-008-9067-7

Karadağ, A., Sağdıç, O., & Karasu, S. (2022). Gıdalarda katkı maddesi ve çözücü olarak kullanılan propilen glikol üzerine değerlendirmeler. Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi, (35), 157-160. https://doi.org/10.31590/ejosat.1067052

Kartal, M., Yıldız, S., Kaya, S., Kurucu, S., & Topçu, G. (2003). Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. Journal of ethnopharmacology, 86(1), 69-73. https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00042-4

Kekeçoğlu, M., Keskin, M., Birinci, C., Birinci, E., & Kolayli, S. (2021). Effects of honey bee race and season on propolis composition. Journal of Agricultural Sciences, 27(3), 292-297. https://doi.org/10.15832/ankutbd.619996

Khodaverdian, S., Dabirmanesh, B., Heydari, A., Dashtban-Moghadam, E., Khajeh, K., & Ghazi, F. (2018). Activity, stability and structure of laccase in betaine based natural deep eutectic solvents. International journal of biological macromolecules, 107, 2574-2579. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.144

Kim, S. H., Kim, I. H., Kang, B. H., Lee, K. H., Lee, S. H., Lee, D. S., Cho, S. K., Hur, S. S., Kwon, T. K. & Lee, J. M. (2009). Optimization of ethanol extraction conditions from propolis (a bee product) using response surface methodology. Korean Journal of Food Preservation, 16(6), 908-914.

Koc, A. N., Silici, S., Mutlu-Sariguzel, F., & Sagdic, O. (2007). Antifungal activity of propolis in four different fruit juices. Food Technology and Biotechnology, 45(1), 57-61. https://hrcak.srce.hr/30437

Koç, A. N., Silici, S., Kasap, F., Hörmet-Öz, H. T., Mavus-Buldu, H., & Ercal, B. D. (2011). Antifungal activity of the honeybee products against Candida spp. and Trichosporon spp. Journal of medicinal food, 14(1-2), 128-134. https://doi.org/10.1089/jmf.2009.0296

Koç, N. A., & Silici, S. (2008). Comparative study of in vitro methods used to analyse the antifungal activity of propolis against Trichophyton rubrum and

Trichophyton mentagrophytes. Annals of microbiology, 58, 543-547. https://doi.org/10.1007/BF03175555

Kolankaya, D., Selmanoğlu, G., Sorkun, K., & Salih, B. (2002). Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. Food chemistry, 78(2), 213-217. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00400-9

Kolayli, S. (2023). The use of honey as a green solvent in the extraction of raw propolis. Turkish Journal of Analytical Chemistry, 5(1), 11-16. https://doi.org/10.51435/turkjac.1296351

Kongkiatpaiboon, S., Vongsak, B., Machana, S., Weerakul, T., & Pattarapanich, C. (2016). Simultaneous HPLC quantitative analysis of mangostin derivatives in Tetragonula pagdeni propolis extracts. Journal of King Saud University-Science, 28(2), 131-135. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2015.06.007

Koutsoukos, S., Tsiaka, T., Tzani, A., Zoumpoulakis, P., & Detsi, A. (2019). Choline chloride and tartaric acid, a Natural Deep Eutectic Solvent for the efficient extraction of phenolic and carotenoid compounds. Journal of Cleaner Production, 241, 118384. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118384

Kowalska-Krochmal, B., & Dudek-Wicher, R. (2021). The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. Pathogens, 10(2), 165. https://doi.org/10.3390/pathogens10020165

Kraus, C. A., & Cuy, E. J. (1923). Phase relatıons ın the system, sodıum amıde-potassıum amıde, as determıned from meltıng-poınt curves. Journal of the American Chemical Society, 45(3), 712-715. https://doi.org/10.1021/ja01656a022

Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., & Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. Journal of ethnopharmacology, 64(3), 235-240. https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00131-7

Kumar, A. K., Parikh, B. S., & Pravakar, M. (2016). Natural deep eutectic solvent mediated pretreatment of rice straw: bioanalytical characterization of lignin extract and enzymatic hydrolysis of pretreated biomass residue. Environmental science and pollution research, 23, 9265-9275. https://doi.org/10.1007/s11356-015-4780-4

Kumazawa, S., Ahn, M. R., Fujimoto, T., & Kato, M. (2010). Radical-scavenging activity and phenolic constituents of propolis from different regions of Argentina. Natural Product Research, 24(9), 804-812. https://doi.org/10.1080/14786410802615270

Kumazawa, S., Hamasaka, T., & Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. Food chemistry, 84(3), 329-339. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00216-4

Kunrath, C. A., Savoldi, D. C., Mileski, J. P. F., Novello, C. R., Alfaro, A. D. T., Marchi, J. F., & Tonial, I. B. (2017). Application and evaluation of propolis, the natural antioxidant in Italian-type salami. Brazilian Journal of Food Technology, 20. https://doi.org/10.1590/1981-6723.3516

Kurek-Górecka, A., Keskin, Ş., Bobis, O., Felitti, R., Górecki, M., Otręba, M., Stojko, J., Olczyk, P, Kolayli, S., & Rzepecka-Stojko, A. (2022). Comparison of the antioxidant activity of propolis samples from different geographical regions. Plants, 11(9), 1203. https://doi.org/10.3390/plants11091203

Kuropatnicki, A. K., Kłósek, M., & Kucharzewski, M. (2018). Honey as medicine: historical perspectives. Journal of Apicultural Research, 57(1), 113-118. https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1411182

Kuropatnicki, A. K., Szliszka, E., & Krol, W. (2013). Historical aspects of propolis research in modern times. Evidence-based complementary and alternative medicine, 2013. https://doi.org/10.1155/2013/964149

Kutluca, S., Genç, F., & Korkmaz, A. (2008). Propolis. Samsun Tarım İl Müdürlüğü Çiftçi Eğitimi ve Yayım Şubesi, Samsun, 57.

Lagouri, V., Prasianaki, D., & Krysta, F. (2014). Antioxidant properties and phenolic composition of Greek propolis extracts. International Journal of Food Properties, 17(3), 511-522. https://doi.org/10.1080/10942912.2012.654561

Laskar, R. A., Sk, I., Roy, N., & Begum, N. A. (2010). Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. Food Chemistry, 122(1), 233-237. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.068

Le Page, S., Dubourg, G., & Rolain, J. M. (2016). Evaluation of the Scan® 1200 as a rapid tool for reading antibiotic susceptibility testing by the disc diffusion

technique. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 71(12), 3424-3431. https://doi.org/10.1093/jac/dkw334

Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., & Kadota, S. (2008). Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 16(10), 5434-5440. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.04.016

Lima, B., Tapia, A., Luna, L., Fabani, M. P., Schmeda-Hirschmann, G., Podio, N. S., Wunderlin, D. A. & Feresin, G. E. (2009). Main flavonoids, DPPH activity, and metal content allow determination of the geographical origin of propolis from the province of San Juan (Argentina). Journal of agricultural and food chemistry, 57(7), 2691-2698. https://doi.org/10.1021/jf803866t

Liu, Y., Friesen, J. B., McAlpine, J. B., Lankin, D. C., Chen, S. N., & Pauli, G. F. (2018). Natural deep eutectic solvents: properties, applications, and perspectives. Journal of natural products, 81(3), 679-690. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00945

Machado, B. A. S., Silva, R. P. D., Barreto, G. D. A., Costa, S. S., Silva, D. F. D., Brandao, H. N., da Rocha, J. L. C., Dellagostin, O. A., Henriques, J. A. P., Umsza-Guez, M. A., & Padilha, F. F. (2016). Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. PloS one, 11(1), e0145954. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145954

Mahdavi-Roshan, M., Gheibi, S., & Pourfarzad, A. (2022). Effect of propolis extract as a natural preservative on quality and shelf life of marinated chicken breast (chicken Kebab). LWT, 155, 112942. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112942

Marcucci, M. C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie, 26(2), 83-99. https://doi.org/10.1051/apido:19950202

Marcucci, M. C., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C., Bankova, V. S., De Castro, S. L., Dantas, A. P., Valente, P.H.M. & Paulino, N. (2001). Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. Journal of ethnopharmacology, 74(2), 105-112. https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00326-3

Marcus, Y. (1998). The properties of solvents. (Wiley series in solution chemistry ; v. 4). John Wiley & Sons Ltd. https://api.semanticscholar.org/CorpusID:92244038

Marcus, Y. (2002). Solvent mixtures: properties and selective solvation. CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781482275834

Marcus, Y. (2017). Preferential solvation of drugs in binary solvent mixtures. Pharm. Anal. Acta, 8(1000537.10), 4172.

Marcus, Y. (2019). Deep Eutectic Solvents. Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-030-00608-2

Margeretha, I., Suniarti, D. F., Herda, E., & Mas'ud, Z. A. (2012). Optimization and comparative study of different extraction methods of biologically active components of Indonesian propolis Trigona spp. J. Nat. Prod, 5, 233-242.

Mascheroni, E., Guillard, V., Nalin, F., Mora, L., & Piergiovanni, L. (2010). Diffusivity of propolis compounds in Polylactic acid polymer for the development of anti-microbial packaging films. Journal of Food Engineering, 98(3), 294-301. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.12.028

Maugeri, Z., & de María, P. D. (2012). Novel choline-chloride-based deep-eutectic-solvents with renewable hydrogen bond donors: levulinic acid and sugar-based polyols. Rsc Advances, 2(2), 421-425. DOI: 10.1039/C1RA00630D

Mehdizadeh, T., & Langroodi, A. M. (2019). Chitosan coatings incorporated with propolis extract and Zataria multiflora Boiss oil for active packaging of chicken breast meat. International journal of biological macromolecules, 141, 401-409. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.267

Mendiola, J. A., Martin-Alvarez, P. J., Senorans, F. J., Reglero, G., Capodicasa, A., Nazzaro, F., Sada, A., Cifuentes, A. & Ibanez, E. (2010). Design of natural food antioxidant ingredients through a chemometric approach. Journal of agricultural and food chemistry, 58(2), 787-792. https://doi.org/10.1021/jf901951z

Mergen Duymaz, G., Duz, G., Ozkan, K., Karadag, A., Yilmaz, O., Karakus, A., Cengiz, O., Akyildiz, I. E., Basdogan, G., Damarlı, E. & Sagdic, O. (2024). The evaluation of L-arginine solution as a solvent for propolis extraction: The phenolic

profile, antioxidant, antibacterial activity, and in vitro bioaccessibility. Food Science & Nutrition. https://doi.org/10.1002/fsn3.3953

Mihai, C. M., Mărghitaş, L. A., Dezmirean, D. S., Chirilă, F., Moritz, R. F., & Schlüns, H. (2012). Interactions among flavonoids of propolis affect antibacterial activity against the honeybee pathogen Paenibacillus larvae. Journal of Invertebrate Pathology, 110(1), 68-72. https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.02.009

Minitab, LLC. (2022). Minitab. Retrieved from https://www.minitab.com

Mitar, A., Panić, M., Prlić Kardum, J., Halambek, J., Sander, A., Zagajski Kučan, K., Radojčić Redovniković I., & Radošević, K. (2019). Physicochemical properties, cytotoxicity, and antioxidative activity of natural deep eutectic solvents containing organic acid. Chemical and biochemical engineering quarterly, 33(1), 1-18. https://doi.org/10.15255/CABEQ.2018.1454

Mizrahi, A., & Lensky, Y. (Eds.). (1997). Bee products: properties, applications, and apitherapy. Springer Science & Business Media. DOI 10.1007/978-1-4757-9371-0

Mokhtar, S. U. (2019). Comparison of total phenolic and flavonoids contents in Malaysian propolis extract with two different extraction solvents. International Journal of Engineering Technology and Sciences, 6(2), 1-11. https://doi.org/10.15282/ijets.v6i2.2577

Morassi, L. L., Bernardi, A. O., Amaral, A. L., Chaves, R. D., Santos, J. L., Copetti, M. V., & Sant'Ana, A. S. (2018). Fungi in cake production chain: Occurrence and evaluation of growth potential in different cake formulations during storage. Food research international, 106, 141-148. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.075

Mordor Intelligence LLP. (2021, Nisan). Propolis Market - Growth,Trends, COVID-19 Impact, andForecasts (2021 - 2026) Report linker. https://www.reportlinker.com/p06067798/Propolis-Market-Growth-Trends-COVID-19-Impact-and-Forecasts.html?utm_source=GNW

Moreira, L., Dias, L. G., Pereira, J. A., & Estevinho, L. (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. Food and Chemical toxicology, 46(11), 3482-3485. https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.08.025

Moreno, M. A., Vallejo, A. M., Ballester, A. R., Zampini, C., Isla, M. I., López-Rubio, A., & Fabra, M. J. (2020). Antifungal edible coatings containing Argentinian propolis extract and their application in raspberries. Food Hydrocolloids, 107, 105973. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105973

Moreno, M. I. N., Isla, M. I., Sampietro, A. R., & Vattuone, M. A. (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. Journal of ethnopharmacology, 71(1-2), 109-114. https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00189-0

Mulia, K., Putri, S., Krisanti, E., & Nasruddin, N. (2017). Natural deep eutectic solvents (NADES) as green solvents for carbon dioxide capture. In AIP Conference Proceedings (Vol. 1823, No. 1). AIP Publishing. https://doi.org/10.1063/1.4978095

Murador, D. C., de Souza Mesquita, L. M., Vannuchi, N., Braga, A. R. C., & de Rosso, V. V. (2019). Bioavailability and biological effects of bioactive compounds extracted with natural deep eutectic solvents and ionic liquids: Advantages over conventional organic solvents. Current opinion in food science, 26, 25-34. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.03.002

Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2016). Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. John Wiley & Sons.

Nakhle, L., Kfoury, M., Mallard, I., Landy, D., & Greige-Gerges, H. (2021). Microextraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review. Environmental Chemistry Letters, 19, 3747-3759. https://doi.org/10.1007/s10311-021-01255-2

Negri, G., Marcucci, M. C., Salatino, A., & Salatino, M. L. F. (1998). Hydrocarbons and monoesters of propolis waxes from Brazil. Apidologie, 29(4), 305-314. https://doi.org/10.1051/apido:19980401

Negri, G., Salatino, M. L. F. & Salatino A. (2003) 'Green propolis': unreported constituents and a novel compound from chloroform extracts, Journal of Apicultural Research, 42(3), 39-41, http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2003.11101087

Neto, M. R., Tintino, S. R., da Silva, A. R. P., do Socorro Costa, M., Boligon, A. A., Matias, E. F., Balbino, V. Q., Menezes, I. R. A., & Coutinho, H. D. M. (2017). Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. Food and Chemical Toxicology, 107, 572-580. https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.052

Neves, M. V. M. D., Silva, T. M. S. D., Lima, E. D. O., Cunha, E. V. L. D., & Oliveira, E. D. J. (2016). Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against Candida sp. brazilian journal of microbiology, 47, 159-166. https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.009

Nichitoi, M. M., Josceanu, A. M., Isopescu, R. D., Isopencu, G. O., Geana, E. I., Ciucure, C. T., & Lavric, V. (2023). Do ultrasonic field effects upon the polyphenolics profile of propolis extracts improve their antioxidant and antimicrobial activity?. Ultrasonics Sonochemistry, 92, 106274. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106274

Nori, M. P., Favaro-Trindade, C. S., de Alencar, S. M., Thomazini, M., de Camargo Balieiro, J. C., & Castillo, C. J. C. (2011). Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. LWT-Food Science and Technology, 44(2), 429-435. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.09.010

Nowakowska, Z., Kędzia, B., & Schroeder, G. (2008). Synthesis, physicochemical properties and antimicrobial evaluation of new (E)-chalcones. European journal of medicinal chemistry, 43(4), 707-713. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.05.006

Nunes, L. C., Galindo, A. B., Lustosa, S. R., Brasileiro, M. T., Do Egito, A. A., Freitas, R. M., Randau, K. P. & Rolim Neto, P. J. (2013). Influence of seasonal variation on antioxidant and total phenol activity of red propolis extracts. Adv Studies Biol, 5, 119-133.

Ogihara, W., Aoyama, T., & Ohno, H. (2004). Polarity measurement for ionic liquids containing dissociable protons. Chemistry letters, 33(11), 1414-1415. https://doi.org/10.1246/cl.2004.1414

Okan, O. T., Varlıbaş, H., Mehmet, Ö. Z., & Deniz, İ. (2013). Antioksidan analiz yöntemleri ve doğu karadeniz bölgesinde antioksidan kaynağı olarak kullanılabilecek odun dışı bazı bitkisel ürünler. Kastamonu University Journal of Forestry Faculty, 13(1), 48-59.

Okińczyc, P., Widelski, J., Szperlik, J., Żuk, M., Mroczek, T., Skalicka-Woźniak, K., Sakipova, Z., Widelska, G. & Kuś, P. M. (2021). Impact of plant origin on eurasian propolis on phenolic profile and classical antioxidant activity. Biomolecules, 11(1), 68. https://doi.org/10.3390/biom11010068

Okuniewski, M., Paduszynski, K., & Domańska, U. (2016). Thermodynamic study of molecular interactions in eutectic mixtures containing camphene. The Journal of Physical Chemistry B, 120(50), 12928-12936. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.6b10034

Oliveira, A. P., França, H. S., Kuster, R. M., Teixeira L. A., Rocha L. M. (2010). Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis essential oil. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis 16 (1). https://doi.org/10.1590/S1678-91992010005000007

Oldoni, T. L. C., Oliveira, S. C., Andolfatto, S., Karling, M., Calegari, M. A., Sado, R. Y., Maia, F. M. C., Alencar, S. M. & Lima, V. A. (2015). Chemical characterization and optimization of the extraction process of bioactive compounds from propolis produced by selected bees Apis mellifera. Journal of the Brazilian Chemical Society, 26, 2054-2062. https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150186

Omar, K. A., & Sadeghi, R. (2020). Novel diglycolic acid-based deep eutectic solvents and their applications as a rust remover. Journal of Molecular Liquids, 312, 113380. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113380

Omar, K. A., & Sadeghi, R. (2022). Physicochemical properties of deep eutectic solvents: A review. Journal of Molecular Liquids, 360, 119524. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119524

Ong, T. H., Chitra, E., Ramamurthy, S., Ling, C. C. S., Ambu, S. P., & Davamani, F. (2019). Cationic chitosan-propolis nanoparticles alter the zeta potential of S. epidermidis, inhibit biofilm formation by modulating gene expression and exhibit synergism with antibiotics. PloS one, 14(2), e0213079. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213079

Oroian, M., Dranca, F., & Ursachi, F. (2020a). Comparative evaluation of maceration, microwave and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from propolis. Journal of food science and technology, 57, 70-78. https://doi.org/10.1007/s13197-019-04031-x

Oroian, M., Ursachi, F., & Dranca, F. (2020b). Influence of ultrasonic amplitude, temperature, time and solvent concentration on bioactive compounds extraction from propolis. Ultrasonics Sonochemistry, 64, 105021. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105021

Ożarowski, M., Karpiński, T. M., Alam, R., & Łochyńska, M. (2022). Antifungal properties of chemically defined propolis from various geographical regions. Microorganisms, 10(2), 364. https://doi.org/10.3390/microorganisms10020364

Ozcan, M., Sagdıc, O., & Ozkan, G. (2004). Antibacterial effects of Turkish pollen and propolis extracts at different concentrations. Archiv fur Lebensmittelhygiene, 55(2).

Özkök, D., & Silici, S. (2017). Antioxidant activities of honeybee products and their mixtures. Food science and biotechnology, 26, 201-206. https://doi.org/10.1007/s10068-017-0027-0

Paiva, A., Matias, A. A., & Duarte, A. R. C. (2018). How do we drive deep eutectic systems towards an industrial reality?. Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry, 11, 81-85. https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.05.010

Pandey, A., Rai, R., Pal, M., & Pandey, S. (2014). How polar are choline chloride-based deep eutectic solvents?. Physical Chemistry Chemical Physics, 16(4), 1559-1568. https://doi.org/10.1039/c3cp53456a

Panić, M., Andlar, M., Tišma, M., Rezić, T., Šibalić, D., Bubalo, M. C., & Redovniković, I. R. (2021). Natural deep eutectic solvent as a unique solvent for valorisation of orange peel waste by the integrated biorefinery approach. Waste Management, 120, 340-350. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.11.052

Paradiso, V. M., Clemente, A., Summo, C., Pasqualone, A., & Caponio, F. (2016). Towards green analysis of virgin olive oil phenolic compounds: Extraction by a natural deep eutectic solvent and direct spectrophotometric detection. Food chemistry, 212, 43-47. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.082

Park, Y. K., & Ikegaki, M. (1998). Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 62(11), 2230-2232. https://doi.org/10.1271/bbb.62.2230

Pereira, A. S., Norsell, M., Cardoso, J. N., Aquino Neto, F. R., & Ramos, M. F. (2000). Rapid screening of polar compounds in Brazilian propolis by high-temperature high-resolution gas chromatography-mass spectrometry. Journal of agricultural and food chemistry, 48(11), 5226–5230. https://doi.org/10.1021/jf000594p

Petkov, H., Trusheva, B., Krustanova, S., Grozdanova, T., Popova, M., Alipieva, K., & Bankova, V. (2022). Green Extraction of Antioxidants from Natural Sources with Natural Deep Eutectic Solvents. In Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences (Vol. 75, No. 8, pp. 1129-1137). https://doi.org/10.7546/CRABS.2022.08.05

Petkov, H., Trusheva, B., Popova, M., & Bankova, V. (2018). Application of natural deep eutectic solvents for green extraction of bioactive compounds from poplar propolis: a preliminary study. Journal of Apitherapy and Nature, 1(3), 76-76.

Petrova, A., Popova, M., Kuzmanova, C., Tsvetkova, I., Naydenski, H., Muli, E., & Bankova, V. (2010). New biologically active compounds from Kenyan propolis. Fitoterapia, 81(6), 509-514. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.01.007

Piccard, J. (1864). Ueber ein neues Chromogen aus dem Pflanzenreich. Journal für Praktische Chemie, 93(1), 369-373.

Piccinelli, A. L., Lotti, C., Campone, L., Cuesta-Rubio, O., Campo Fernandez, M., & Rastrelli, L. (2011). Cuban and Brazilian red propolis: Botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(12), 6484-6491. https://doi.org/10.1021/jf201280z

Pietta, P. G., Gardana, C., & Pietta, A. M. (2002). Analytical methods for quality control of propolis. Fitoterapia, 73, S7-S20. https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00186-7

Pires, P. G. D. S., Pires, P. D. D. S., Cardinal, K. M., Leuven, A. F. R., Kindlein, L., & Andretta, I. (2019). Effects of rice protein coatings combined or not with propolis on shelf life of eggs. Poultry science, 98(9), 4196-4203. https://doi.org/10.3382/ps/pez155

Pobiega, K., Kraśniewska, K., & Gniewosz, M. (2019a). Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality–A review. Trends in food science & technology, 83, 53-62. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.007

Pobiega, K., Kraśniewska, K., Derewiaka, D., & Gniewosz, M. (2019b). Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. Journal of food science and technology, 56(12), 5386-5395. https://doi.org/10.1007/s13197-019-04009-9

Poncet-Legrand, C., Edelmann, A., Putaux, J. L., Cartalade, D., Sarni-Manchado, P., & Vernhet, A. (2006). Poly (L-proline) interactions with flavan-3-ols units: Influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. Food Hydrocolloids, 20(5), 687-697. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.06.009

Popova, M. P., Chinou, I. B., Marekov, I. N., & Bankova, V. S. (2009). Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. Phytochemistry, 70(10), 1262-1271. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.025

Popova, M., Silici, S., Kaftanoglu, O., & Bankova, V. (2005). Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. Phytomedicine, 12(3), 221-228. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.09.007

Popova, M., Trusheva, B., Antonova, D., Cutajar, S., Mifsud, D., Farrugia, C., Tsvetkova, I., Najdenski, H. & Bankova, V. (2011). The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. Food Chemistry, 126(3), 1431-1435. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.130

Popravko, S. A., Gurevich, A. I., & Kolosov, M. N. (1969). Flavonoid components of propolis. Chemistry of Natural Compounds, 5(6), 397-401. https://doi.org/10.1007/BF00568574

Potkonjak, N. I., Veselinović, D. S., Novaković, M. M., Gorjanović, S. Ž., Pezo, L. L., & Sužnjević, D. Ž. (2012). Antioxidant activity of propolis extracts from Serbia: A polarographic approach. Food and Chemical Toxicology, 50(10), 3614-3618. https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.029

Przybyłek, I., & Karpiński, T. M. (2019). Antibacterial properties of propolis. Molecules, 24(11), 2047. https://doi.org/10.3390/molecules24112047

Radošević, K., Bubalo, M. C., Srček, V. G., Grgas, D., Dragičević, T. L., & Redovniković, I. R. (2015). Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. Ecotoxicology and environmental safety, 112, 46-53. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.034

Radošević, K., Ćurko, N., Srček, V. G., Bubalo, M. C., Tomašević, M., Ganić, K. K., & Redovniković, I. R. (2016). Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. Lwt, 73, 45-51. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.037

Ré, M. I. (1998). Microencapsulation by spray drying. Drying technology, 16(6), 1195-1236. https://doi.org/10.1080/07373939808917460

Ré, M. I. (2006). Formulating drug delivery systems by spray drying. Drying Technology, 24(4), 433-446. https://doi.org/10.1080/07373930600611877

Revilla, I., Vivar-Quintana, A. M., González-Martín, I., Escuredo, O., & Seijo, C. (2017). The potential of near infrared spectroscopy for determining the phenolic, antioxidant, color and bactericide characteristics of raw propolis. Microchemical Journal, 134, 211-217. https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.06.006

Ristivojević, P., Trifković, J., Andrić, F., & Milojković-Opsenica, D. (2015a). Poplar-type propolis: Chemical composition, botanical origin and biological activity. Natural product communications, 10(11), 1934578X1501001117. https://doi.org/10.1177/1934578X1501001117

Ristivojević, P., Trifković, J., Gašić, U., Andrić, F., Nedić, N., Tešić, Ž., & Milojković-Opsenica, D. (2015b). Ultrahigh-performance liquid chromatography and mass spectrometry (UHPLC–LTQ/Orbitrap/MS/MS) study of phenolic profile of Serbian poplar type propolis. Phytochemical analysis, 26(2), 127-136. https://doi.org/10.1002/pca.2544

Rojczyk, E., Klama-Baryła, A., Łabuś, W., Wilemska-Kucharzewska, K., & Kucharzewski, M. (2020). Historical and modern research on propolis and its application in wound healing and other fields of medicine and contributions by Polish studies. Journal of Ethnopharmacology, 262, 113159. https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113159

Sagdic, O., Silici, S., & Yetim, H. (2007). Fate of escherichia coli and E. coli O157: H7 in apple juice treated with propolis extract. Annals of microbiology, 57, 345-348. https://doi.org/10.1007/BF03175071

Sağdıç, O., Karasu, S., & Goktas, H. (2020). Piyasada satılan ticari propolis örneklerinin biyoaktif bileşenlerinin belirlenmesi. Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi, (19), 19-31. https://doi.org/10.31590/ejosat.734204

Salatino, A., & Salatino, M. L. F. (2021). Scientific note: Often quoted, but not factual data about propolis composition. Apidologie, 52, 312-314. https://doi.org/10.1007/s13592-020-00821-x

Salatino, A., Teixeira, É. W., & Negri, G. (2005). Origin and chemical variation of Brazilian propolis. Evidence-based complementary and alternative medicine, 2, 33-38. https://doi.org/10.1093/ecam/neh060

Santini, A. T., Silva, C. L., Galera, F. A., Santini, P. T., Martins, E. A. N., Ikegaki, M., & Ribeiro, I. S. (2021). Extraction method optimization and the seasonal effect in the biological activities and phenolic compounds of Brazilian green propolis. HOLOS, 7, 1-17. https://doi.org/10.15628/holos.2021.11316

Santos, M. S., Estevinho, L. M., de Carvalho, C. A. L., da Silva Conceição, A. L., & de Castro Almeida, R. C. (2020). Rheological and sensorial evaluation of yogurt incorporated with red propolis. Journal of food science and technology, 57, 1080-1089. https://doi.org/10.1007/s13197-019-04142-5

Santos-Buelga, C., & González-Paramás, A. M. (2017). Phenolic composition of propolis. Bee products-chemical and biological properties, 99-111. https://doi.org/10.1007/978-3-319-59689-1_5

Sarikaya, A. O., Ulusoy, E., Öztürk, N., Tuncel, M., & Kolayli, S. (2009). Antioxidant activity and phenolic acid constituents of chestnut (Castania sativa Mill.) honey and propolis. Journal of food biochemistry, 33(4), 470-481. https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2009.00231.x

Sekharan, T. R., Chandira, R. M., Rajesh, S., Tamilvanan, S., Vijayakumar, C., & Venkateswarlu, B. (2021). pH, viscosity of hydrophobic based natural deep eutectic solvents and the effect of curcumin solubility in it. Biointerface Res. Appl. Chem, 11(6), 14620-14633. https://doi.org/10.33263/BRIAC116.1462014633

Shafie, M. H., Yusof, R., & Gan, C. Y. (2019). Deep eutectic solvents (DES) mediated extraction of pectin from Averrhoa bilimbi: Optimization and characterization studies. Carbohydrate Polymers, 216, 303-311. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.007

Shamseddin, A., Crauste, C., Durand, E., Villeneuve, P., Dubois, G., Durand, T., Vercauteren, J. & Veas, F. (2017). Resveratrol formulated with a natural deep eutectic solvent inhibits active matrix metalloprotease-9 in hormetic conditions. European journal of lipid science and technology, 119(11), 1700171. https://doi.org/10.1002/ejlt.201700171

Shavisi, N., Khanjari, A., Basti, A. A., Misaghi, A., & Shahbazi, Y. (2017). Effect of PLA films containing propolis ethanolic extract, cellulose nanoparticle and Ziziphora clinopodioides essential oil on chemical, microbial and sensory properties of minced beef. Meat science, 124, 95-104. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.10.015

Shi, H., Yang, H., Zhang, X., & Yu, L. (2012). Identification and quantification of phytochemical composition and anti-inflammatory and radical scavenging properties of methanolic extracts of Chinese propolis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(50), 12403-12410. https://doi.org/10.1021/jf3042775

Silici, S. & Koc, A. N. (2006). Comparative study of in vitro methods to analyse the antifungal activity of propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. Letters in applied microbiology, 43(3), 318-324. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01949.x

Silici, S. (2020). Bilimsel gerçeklerle apiterapi. Akademisyen Kitabevi. https://doi.org/10.37609/akya.494

Silici, S., & Baysa, M. (2020). Antioxidant, antiradical and antipyretic effects of olive oil extract of propolis. Journal of Apicultural Research, 59(5), 883-889. https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1753916

Silici, S., & Kaftanoğlu, O. (2003). Antimicrobial analysis of propolis samples from different regions in Turkey. http://hdl.handle.net/11452/15808

Silici, S., & Kutluca, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. Journal of ethnopharmacology, 99(1), 69-73. https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.046

Silici, S., Koç, N. A., Ayangil, D., & Çankaya, S. (2005). Antifungal activities of propolis collected by different races of honeybees against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. Journal of pharmacological sciences, 99(1), 39-44. https://doi.org/10.1254/jphs.fpe05002x

Silva, J. C., Rodrigues, S., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2012). Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. Food and Chemical Toxicology, 50(5), 1790-1795. https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.097

Skulcova, A., Russ, A., Jablonsky, M., & Sima, J. (2018). The pH behavior of seventeen deep eutectic solvents. BioResources, 13(3), 5042-5051. https://doi.org/10.15376/biores.13.3.5042-5051

Soottitantawat, A., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M., & Linko, P. (2003). Microencapsulation by spray drying: influence of emulsion size on the retention of volatile compounds. Journal of food science, 68(7), 2256-2262. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05756.x

Soumya, C., Sudha, M. L., Vijaykrishnaraj, M., Negi, P. S., & Prabhasankar, P. (2017). Comparative study on batter, quality characteristics and storage stability of muffins using natural ingredients (preservatives) and synthetic preservatives. Journal of food processing and preservation, 41(6), e13242. https://doi.org/10.1111/jfpp.13242

Sörensen, S. P. L. (1968). Enzyme studies II. The measurement and meaning of hydrogen ion concentration in enzymatic processes. In Source Book in Chemistry, 1900–1950 (pp. 16-19). Harvard University Press. https://doi.org/10.4159/harvard.9780674366701.c12

Stott, P. W., Williams, A. C., & Barry, B. W. (1998). Transdermal delivery from eutectic systems: enhanced permeation of a model drug, ibuprofen. Journal of controlled release, 50(1-3), 297-308. https://doi.org/10.1016/S0168-3659(97)00153-3

Šturm, L., Črnivec, I. G. O., Istenič, K., Ota, A., Megušar, P., Slukan, A., Humar, M., Levic, S., Nedović, V., Kopinč, R., Deželak, M., Gonzales, A. P., & Ulrih, N. P. (2019). Encapsulation of non-dewaxed propolis by freeze-drying and spray-drying using gum Arabic, maltodextrin and inulin as coating materials. Food and Bioproducts Processing, 116, 196-211. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.05.008

Suver, M. (2008). Arıcılık ve organik bal üretimi elkitabı. Marmara Grubu Vakfı, 173-205.

Şengül, M., & Ufuk S. (2023). The Effects of Different Extraction Methods and Solvents on Antioxidant Properties of Propolis. Black Sea Journal of Agriculture, 6(4), 386-393. https://doi.org/10.47115/bsagriculture.1273535

Tagliacollo, V. A., & Orsi, R. D. O. (2011). Quality of propolis commercialized in the informal market. Food Science and Technology, 31, 752-757. https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000300031

Tang, B., Bi, W., Zhang, H., & Row, K. H. (2014). Deep eutectic solvent-based HS-SME coupled with GC for the analysis of bioactive terpenoids in Chamaecyparis obtusa leaves. Chromatographia, 77, 373-377. https://doi.org/10.1007/s10337-013-2607-3

Temiz, A., Mumcu, A. Ş., Tüylü, A. Ö., Sorkun, K., & Salih, B. (2013). Antifungal activity of propolis samples collected from different geographical regions of Turkey against two food-related molds, Aspergillus versicolor and Penicillium aurantiogriseum. Gida, 38, 135-142. https://doi.org/10.5505/gida.2013.10820

Thirugnanasampandan, R., Raveendran, S. B., & Jayakumar, R. (2012). Analysis of chemical composition and bioactive property evaluation of Indian propolis. Asian Pacific journal of tropical biomedicine, 2(8), 651-654. https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60114-2

Topkaya, C. (2017). Nar kabuğu tozu ilavesinin keklerin besinsel, duyusal ve mikrobiyolojik özelliklerine etkisi (Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü). https://hdl.handle.net/11499/2016

Trusheva, B., Petkov, H., Popova, M., Dimitrova, L., Zaharieva, M., Tsvetkova, I., Najdenski, H. & Bankova, V. (2019). “Green” approach to propolis extraction:

natural deep eutectic solvents. Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences, 72(7). https://doi.org/10.7546/CRABS.2019.07.06

Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., Simova, S., Marcucci, M. C., Miorin, P. L., Pasin F. R., & Tsvetkova, I. (2006). Bioactive constituents of Brazilian red propolis. Evidence-based complementary and alternative medicine, 3, 249-254. https://doi.org/10.1093/ecam/nel006

Trusheva, B., Popova, M., Koendhori, E. B., Tsvetkova, I., Naydenski, C., & Bankova, V. (2011). Indonesian propolis: chemical composition, biological activity and botanical origin. Natural Product Research, 25(6), 606-613. https://doi.org/10.1080/14786419.2010.488235

Tuntarawongsa, S., & Phaechamud, T. (2012). Menthol, borneol, camphor and WS-3 eutectic mixture. Advanced Materials Research, 506, 355-358. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.506.355

Tzani, A., Pitterou, I., Divani, F., Tsiaka, T., Sotiroudis, G., Zoumpoulakis, P., & Detsi, A. (2022). Green Extraction of Greek Propolis Using Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) and Incorporation of the NADES-Extracts in Cosmetic Formulation. Sustainable Chemistry, 4(1), 8-25. https://doi.org/10.3390/suschem4010002

Uluslararası Standardizasyon Örgütü. (2023). Arı propolisi Teknik Özellikleri (ISO/DIS Standard No. 24381). https://www.iso.org/standard/78543.html

Valcic, S., Montenegro, G., & Timmermann, B. N. (1998). Lignans from Chilean propolis. Journal of natural products, 61(6), 771-775. https://doi.org/10.1021/np980017j

Vanda, H., Dai, Y., Wilson, E. G., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2018). Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents. Comptes Rendus Chimie, 21(6), 628-638. https://doi.org/10.1016/j.crci.2018.04.002

Vandenelzen, L., & Hopkins, T. A. (2019). Monosaccharide-based deep eutectic solvents for developing circularly polarized luminescent materials. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 7(19), 16690-16697. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b04100

Vardar-Ünlü, G., Silici, S., & Ünlü, M. (2008). Composition and in vitro antimicrobial activity of Populus buds and poplar-type propolis. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24, 1011-1017. https://doi.org/10.1007/s11274-007-9566-5

Vasilaki, A., Hatzikamari, M., Stagkos-Georgiadis, A., Goula, A. M., & Mourtzinos, I. (2019). A natural approach in food preservation: Propolis extract as sorbate alternative in non-carbonated beverage. Food chemistry, 298, 125080.

Vasileva, B., Staneva, D., Grozdanova, T., Petkov, H., Trusheva, B., Alipieva, K., Popova, M., Miloshev, G., Vassya Bankova, V. & Georgieva, M. (2022). Natural Deep Eutectic Extracts of Propolis, Sideritis scardica, and Plantago major Reveal Potential Antiageing Activity during Yeast Chronological Lifespan. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2022. https://doi.org/10.1155/2022/8368717

Vasyl Kosolovskyi, 2018

Wan Mahmood, W. M. A., Lorwirachsutee, A., Theodoropoulos, C., & Gonzalez-Miquel, M. (2019). Polyol-based deep eutectic solvents for extraction of natural polyphenolic antioxidants from Chlorella vulgaris. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 7(5), 5018-5026. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b05642

Watanabe, M. A. E., Amarante, M. K., Conti, B. J., & Sforcin, J. M. (2011). Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 63(11), 1378-1386. https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01331.x

Wikene, K. O., Bruzell, E., & Tønnesen, H. H. (2015). Improved antibacterial phototoxicity of a neutral porphyrin in natural deep eutectic solvents. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 148, 188-196. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.04.022

Wikene, K. O., Rukke, H. V., Bruzell, E., & Tønnesen, H. H. (2017). Investigation of the antimicrobial effect of natural deep eutectic solvents (NADES) as solvents in antimicrobial photodynamic therapy. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 171, 27-33. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.04.030

Woźniak, M., Mrówczyńska, L., Waśkiewicz, A., Rogoziński, T., & Ratajczak, I. (2019). Phenolic profile and antioxidant activity of propolis extracts from Poland. Natural Product Communications, 14(5), 1934578X19849777. https://doi.org/10.1177/1934578X19849777

Xu, M., Ran, L., Chen, N., Fan, X., Ren, D., & Yi, L. (2019). Polarity-dependent extraction of flavonoids from citrus peel waste using a tailor-made deep eutectic solvent. Food Chemistry, 297, 124970. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.124970

Yang, S. Z., Peng, L. T., Su, X. J., Chen, F., Cheng, Y. J., Fan, G., & Pan, S. Y. (2011). Bioassay-guided isolation and identification of antifungal components from propolis against Penicillium italicum. Food Chemistry, 127(1), 210-215. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.011

Yang, T. X., Zhao, L. Q., Wang, J., Song, G. L., Liu, H. M., Cheng, H., & Yang, Z. (2017). Improving whole-cell biocatalysis by addition of deep eutectic solvents and natural deep eutectic solvents. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 5(7), 5713-5722. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00285

Yarfani, R., Khosravi, A. R., & Shokri, H. (2010). The antifungal activity of Iranian propolis samples against fluconazole-resistant Candida albicans strains isolated from HIV+ patients with oropharyngeal candidiasis. J ApiProd ApiMed Sci, 2(4), 161-6. https://doi.org/10.3896/IBRA.4.02.4.05

Yazkan, S. N. Ş., & Ertop, M. H. (2024). Maserasyon, refluks ve ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemleri ile üretilen kestane propolis ekstraktlarının farklı gıda modellerinde kullanımı: Fizikokimyasal, duyusal ve biyoaktif niteliklere etkisi. Food and Health, 10(1), 22-39. https://doi.org/10.3153/FH24003

Yıldırım, H. K. (2022). Assessment of propolis treated by different extraction methods. Brazilian Archives of Biology and Technology, 65. https://doi.org/10.1590/1678-4324-2022210251

Yuan, Y., Zheng, S., Zeng, L., Deng, Z., Zhang, B., & 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. https://doi.org/10.1111/1750-3841.14934

Yusof, N., Munaim, M. S. A., & Veloo Kutty, R. (2021). Optimization of total phenolic compounds extracted from propolis by ultrasound-assisted extraction. Chemical Engineering Communications, 208(4), 564-572. https://doi.org/10.1080/00986445.2020.1761799

Zahrina, I., Nasikin, M., Krisanti, E., & Mulia, K. (2018). Deacidification of palm oil using betaine monohydrate-based natural deep eutectic solvents. Food Chemistry, 240, 490-495. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.132

Zainal-Abidin, M. H., Hayyan, M., Hayyan, A., & Jayakumar, N. S. (2017). New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review. Analytica Chimica Acta, 979, 1-23. https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.05.012

Zdanowicz, M., Wilpiszewska, K., & Spychaj, T. (2018). Deep eutectic solvents for polysaccharides processing. A review. Carbohydrate polymers, 200, 361-380. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.078

Zhang, Q., Vigier, K. D. O., Royer, S., & Jérôme, F. (2012). Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. Chemical Society Reviews, 41(21), 7108-7146. https://doi.org/10.1039/C2CS35178A

Zhao, B. Y., Xu, P., Yang, F. X., Wu, H., Zong, M. H., & Lou, W. Y. (2015). Biocompatible deep eutectic solvents based on choline chloride: characterization and application to the extraction of rutin from Sophora japonica. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 3(11), 2746-2755. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00619

Zhao, H., Baker, G. A., & Holmes, S. (2011). Protease activation in glycerol-based deep eutectic solvents. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 72(3-4), 163-167. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.05.015

A
EKLER

Tablo A1 Doğal derin ötektik çözücülerin stabilite süresi sonundaki görünümleri

NADES	NADES Görünümü	NADES	NADES Görünümü
1	Şeffaf Sıvı	**31**	Çözünmemiş Kristaller Sarı Sıvı
2	Şeffaf Sıvı	**32**	Çözünmemiş Kristaller Koyu Sarı Sıvı
3	Jölemsi Beyaz Sıvı	**33**	Sarı Şeffaf Sıvı
4	Şeffaf Sıvı	**34**	Siyah Renkli Sıvı
5	Sarımsı Şeffaf Sıvı	**35**	Kahverengi Şeffaf Sıvı
6	Çözünmemiş Kristaller	**36**	Açık Sarı Şeffaf Sıvı
7	Şeffaf Sıvı	**37**	Çözünmemiş Kristaller İçeren Şeffaf Sıvı
8	Şeffaf Sıvı	**38**	Şeffaf Sıvı
9	Çözünmemiş Kristaller	**39**	Şeffaf Sıvı
10	Çözünmemiş Kristaller	**40**	Şeffaf Sıvı
11	Şeffaf Sıvı	**41**	Büyük Kristaller İçeren Sarı Sıvı
12	Büyük Kristalli Sarımsı Sıvı	**42**	Büyük Kristaller İçeren Bulutsu Sarı Sıvı
13	Çözünmemiş Kristaller	**43**	Şeffaf Sıvı
14	Şeffaf Sıvı	**44**	Şeffaf Sıvı
15	Çözünmemiş Kristaller İçeren Sarımsı Sıvı	**45**	Açık Kahverengi Bulutsu Katı
16	Çözünmemiş Kristaller İçeren Sarımsı Sıvı	**46**	Açık Kahverengi Bulutsu Katı
17	Siyah Renkli Sıvı	**47**	Beyaz Jölemsi Görünüm
18	Sarı Renkli Şeffaf Sıvı	**48**	Şeffaf Sıvı
19	Sarımsı Şeffaf Sıvı	**49**	Kahverengi Şeffaf Sıvı
20	Çözünmemiş Kristaller İçeren Sarımsı Sıvı	**50**	Koyu Kahverengi Şeffaf Sıvı
21	Sarımsı Katı	**51**	Şeffaf Sıvı
22	Şeffaf Sıvı	**52**	Şeffaf Sıvı
23	Kahverengi Şeffaf Sıvı	**53**	Şeffaf Sıvı
24	Şeffaf Sıvı	**54**	Çözünmemiş Kristal İçeren Şeffaf Sıvı
25	Açık Kahverengi Şeffaf Sıvı	**55**	Sarı Renkli Şeffaf Sıvı
26	Açık Sarı Şeffaf Sıvı	**56**	Açık Sarı Bulutsu Kristaller
27	Çözünmemiş Kristaller İçeren Sarımsı Sıvı	**57**	Şeffaf Sıvı
28	Siyah Renkli Sıvı	**58**	Sarı Renkli Şeffaf Sıvı
29	Siyah Renkli Sıvı	**59**	Siyah Renkli Sıvı
30	Açık Sarı Şeffaf Sıvı	**60**	Siyah Renkli Bulutsu Katı

NADES	NADES Görünümü	NADES	NADES Görünümü
61	Çözünmemiş Kristaller İçeren Koyu Sarı Sıvı	**86**	Aşırı Viskoz Sarımsı Şeffaf Sıvı
62	Sarımsı Şeffaf Sıvı	**87**	Beyaz Renkli Katı
63	Çözünmemiş Kristaller İçeren Sarı Sıvı	**88**	Açık Sarı Renkli Bulutsu Katı
64	Beyaz Renkli Bulutsu Katı	**89**	Aşırı Viskoz Sarımsı Şeffaf Sıvı
65	Çözünmemiş Kristaller İçeren Şeffaf Sıvı	**90**	Aşırı Viskoz Siyah Sıvı
66	Siyah Renkli Sıvı	**91**	Aşırı Viskoz Şeffaf Sıvı
67	Şeffaf Sıvı	**92**	Aşırı Viskoz Siyah Sıvı
68	Siyah Renkli Sıvı	**93**	Aşırı Viskoz Siyah Sıvı
69	Siyah Renkli Sıvı	**94**	Aşırı Viskoz Açık Kahverengi Sıvı
70	Açık Kahverengi Şeffaf Sıvı	**95**	Kahverengi Bulutsu Katı
71	Siyah Renkli Bulutsu Katı	**96**	Aşırı Viskoz Sarı Sıvı
72	Az Miktarda Çözünmemiş Kristaller İçeren Sarı Sıvı	**97**	Aşırı Viskoz Sarı Sıvı
73	Sarı Şeffaf Sıvı	**98**	Çözünmemiş Kristaller İçeren Şeffaf Sıvı
74	Beyaz Renkli Bulutsu Katı	**99**	Aşırı Viskoz Sarı Sıvı
75	Sarı Şeffaf Sıvı	**100**	Aşırı Viskoz Açık Pembe Sıvı
76	Sarı Şeffaf Sıvı	**101**	Şeffaf Sıvı
77	Şeffaf Sıvı	**102**	Çözünmemiş Kristaller İçeren Şeffaf Sıvı
78	Şeffaf Sıvı	**103**	Şeffaf Sıvı
79	Aşırı Viskoz Sarımsı Şeffaf Sıvı	**104**	Büyük Kristaller İçeren Şeffaf Sıvı
80	Aşırı Viskoz Bulutsu Sıvı	**105**	Büyük Kristaller İçeren Şeffaf Sıvı
81	Aşırı Viskoz Şeffaf Sıvı	**106**	Büyük Kristaller İçeren Şeffaf Sıvı
82	Aşırı Viskoz Sarımsı Şeffaf Sıvı	**107**	Beyaz Bulutsu Katı
83	Aşırı Viskoz Kahverengi Sıvı	**108**	Açık Sarı Şeffaf Sıvı
84	Aşırı Viskoz Siyah Sıvı	**109**	Açık Sarı Şeffaf Sıvı
85	Aşırı Viskoz Sarımsı Şeffaf Sıvı		

Tablo A2 Doğal derin ötektik çözücülerin çözücü gücü analiz sonuçları[14]

#.	Sinnamik Asit (mg/mL)	Kersetin (mg/mL)	Rutin (mg/mL)	Vanillin (mg/mL)
1	2,3±0,1^{qrst}	0±0^{e}	1,1±0,1^{lmno}	1,3±0,1^{jklmno}
2	2±0,1^{stu}	0±0^{e}	1±0,1^{lmno}	1,4±0,1^{ijklmn}
4	3,5±0,2^{klmnop}	0±0^{e}	1,5±0,1^{ijk}	1,6±0,2^{ghijklm}
5	2,2±0,1^{rstu}	0±0^{e}	1±0,1^{mno}	1,1±0,1^{klmno}
7	7,6±0,4^{fghi}	0±0^{e}	1,8±0,1^{i}	1,8±0,2^{defghijkl}
8	2,6±0,2^{opqrst}	0±0^{e}	1,7±0,1^{ij}	1,8±0,4^{defghijkl}
11	7,4±0,5^{fghi}	0±0,1^{e}	1,6±0,1^{ijk}	1,5±0,5^{ghijklmn}
14	4,1±0,3^{jklmn}	0±0^{e}	1,8±0,1^{i}	2±0,2^{bcdefghijkl}
18	3,4±0,2^{klmnop}	0±0^{e}	2,4±0,2^{ef}	2,8±0,3^{bcdef}
19	8,2±0,4^{efg}	0±0^{e}	2,3±0,1^{efg}	2,3±0,2^{bcdefghij}
22	3,5±0,1^{klmnop}	0±0^{e}	1,3±0,1^{jklm}	2,2±0,2^{bcdefghijk}
24	1,2±0,1^{uvw}	0±0^{e}	0,8±0,1^{op}	2±0,5^{bcdefghijkl}
25	1,2±0,1^{uvw}	0±0^{e}	1±0,1^{lmno}	2,5±0,3^{bcdefgh}
26	3±0,2^{nopqrs}	0±0^{e}	1,6±0,1^{ijk}	2,8±0,3^{bcde}
30	2,7±0,2^{opqrs}	0±0^{e}	1,6±0,1^{ijk}	3±0,3^{b}
33	6,8±0,4^{hi}	0,9±0,5^{d}	2,6±0,2^{cdef}	1,9±0,2^{cdefghijkl}
35	9±0,5^{cde}	0±0^{e}	2,3±0,1^{efgh}	2,3±0,2^{bcdefghij}
36	4,5±0,3^{jk}	0±0^{e}	2,3±0,2^{fgh}	2,4±0,2^{bcdefghi}
38	3,2±0,2^{mnopqr}	0±0^{e}	1,5±0,1^{ijkl}	2,9±0,3^{bcd}
39	4,7±0,3^{j}	0±0^{e}	2,3±0,1^{fgh}	2,6±0,2^{bcdefg}
40	6,6±0,4^{i}	1,1±0,3^{cd}	1,9±0,3^{ghi}	2,3±0,2^{bcdefghij}

[14] Tüm deneyler üç tekrarlı olarak yapılmış ve ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur. Her sütun için aynı harfi paylaşmayan ortalamalar istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p < 0.05$).

43	4,3±0,3^{jkl}	0±0^{e}	1,6±0,1^{ijk}	2,1±0,2^{bcdefghıjk}
44	3,3±0,2^{lmnopq}	0±0^{e}	1,6±0,1^{ijk}	1,4±0,1^{hıjklmn}
48	3,3±0,2^{lmnopq}	0±0^{e}	1,6±0,1^{ijk}	0,9±0,8^{lmno}
49	3,3±0,2^{lmnopq}	0,1±0^{e}	1,8±0,1^{ı}	1,8±0,2^{defghıjkl}
51	1,6±0,1^{tuv}	0±0^{e}	0,3±0^{q}	0,4±0,4^{no}
52	0,4±0^{w}	0±0^{e}	0,1±0^{q}	0,2±0^{o}
53	3,6±0,2^{klmno}	0±0^{e}	1,7±0,1^{ijk}	1,9±0,2^{cdefghıjkl}
55	3,6±0,3^{klmno}	0±0^{e}	1,3±0,1^{jklmn}	1,3±0,1^{jklmno}
57	7,7±0,4^{fgh}	1,8±0,1^{ab}	2,3±0,2^{fgh}	2,3±0,6^{bcdefghıj}
58	8,2±0,5^{def}	1,7±0,2^{ab}	2,9±0,3^{bcd}	2,2±0,9^{bcdefghıj}
62	7,8±0,4^{fgh}	1,5±0,2^{bc}	2,3±0,2f^{gh}	1,8±0,8^{efghıjkl}
67	2,4±0,1^{pqrst}	0±0^{e}	1,2±0,1^{klmno}	1,9±0,5^{cdefghıjkl}
70	1,6±0,1^{tuv}	0±0^{e}	0,9±0,1^{nop}	1,3±0,1^{jklmno}
73	9,3±0,5^{cd}	1,1±0,7^{cd}	3,3±0,2^{b}	2,2±0,2^{bcdefghıjk}
75	6,6±0,4^{ı}	1,1±0,1^{cd}	1,7±0,1^{ij}	1,7±0,2^{fghıjklm}
76	9,4±0,5^{c}	2,1±0,2^{a}	3,1±0,2^{bc}	3,1±0,3^{b}
77	7,1±0,4^{ghı}	1,5±0,1^{bc}	1,9±0,1^{hı}	2,3±0,2^{bcdefghıj}
101	4,2±0,2^{jklm}	0±0^{e}	0,9±0,1^{nop}	0,9±0,1^{lmno}
103	10,7±0,6^{b}	0±0^{e}	2,8±0,2^{cde}	3±0,3^{bc}
108	8,9±0,5^{cde}	0,1±0^{e}	2,5±0,1^{def}	2,5±0,2^{bcdefgh}
109	16,1±0,9^{a}	0±0^{e}	4,6±0,3^{a}	4,8±0,5^{a}

Tablo A3 Doğal derin ötektik çözücülerin fizikokimyasal analiz sonuçları[15]

#.	pH	Yoğunluk (g.cm^{-3})	Polarite (E_{NR})	Viskozite (cP)
1	2,09	1,1949 ± 0,00061^{no}	47,88±0,01^{mnop}	24,2 ± 0,00^{xy}
2	1,98	1,2095 ± 0,00362^{m}	47,90±0,06^{mnop}	25,0 ± 0,00^{wxy}
4	3,97	1,1832 ± 0,00191^{op}	48,26±0,09 ^{ijklmno}	25,8 ± 0,00^{wxy}
5	3,47	1,1724 ± 0,00435^{p}	-	24,2 ± 0,00^{xy}
7	2,73	1,2036 ± 0,00072^{mn}	48,54±0,04^{hijk}	36,7 ± 0,00^{tuvwxy}
8	2,24	1,2439 ± 0,0005^{kl}	47,89±0,01^{mnop}	32,5 ± 0,00^{uvwxy}
11	1,78	1,1902 ± 0,00091^{o}	47,90±0,02^{mnop}	169,4 ± 1,27^{lmno}
14	2,68	1,2566 ± 0,00049^{jk}	48,52±0,01^{ijkl}	76,1 ± 0,48^{qrstuvwx}
18	2,73	1,2897 ± 0,00155^{ghi}	48,02±0,03^{klmnop}	91,3 ± 0,00^{qrst}
19	2,89	1,2539 ± 0,00201^{jk}	48,76±0,12^{ghi}	89,4 ± 0,00^{qrstu}
22	2,52	1,2872 ± 0,00035^{hi}	48,02±0,01 ^{klmnop}	120,3 ± 0,46 ^{opqr}
24	2,26	1,334 ± 0,00046^{d}	47,78±0,01 ^{op}	94,2 ± 0,00 ^{qrst}
25	2,32	1,3408 ± 0,00092^{d}	47,65±0,02 ^{p}	110,0 ± 0,00 ^{pqr}
26	2,26	1,3059 ± 0,00026^{ef}	47,72±0,01 ^{op}	67,1 ± 0,00 ^{rstuvwxy}
30	1,86	1,3722 ± 0,00051^{bc}	47,64±0,01 ^{p}	197,9 ± 0,00 ^{kl}
33	5,22	1,3016 ± 0,0112^{fg}	48,42±0,23 ^{ijklm}	133,8 ± 0,4 ^{mnopq}
35	5	1,2516 ± 0,00069^{jk}	48,63±0,01^{ghij}	123,1 ± 0,4 ^{nopqr}
36	2,66	1,2977 ± 0,00147^{fgh}	48,03±0,02^{klmnop}	96,4 ± 0,00^{qrs}
38	2,51	1,3365 ± 0,00068^{d}	47,77±0,02^{op}	159,1 ± 0,4^{lmnop}
39	2,72	1,3002 ± 0,00151^{fg}	48,12±0,03^{jklmnop}	180,5 ± 0,81 ^{lmn}
40	2,03	1,3791 ± 0,00025^{b}	47,64±0,01^{p}	190,0 ± 25,29 ^{klm}
43	4,4	0,9117 ± 0,00359^{tu}	53,57±0,08^{a}	20,4 ± 0,36 ^{xy}

[15] Tüm deneyler üç tekrarlı olarak yapılmış ve ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur. Her sütun için aynı harfi paylaşmayan ortalamalar istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p < 0.05$).

44	4,48	0,9084 ± 0,00165^{u}	53,27±0,06^{a}	26,3 ± 0,00 ^{wxy}
48	4,86	0,9116 ± 0,00534^{tu}	53,53±0,14^{a}	28,8 ± 0,00 ^{vwxy}
49	3,81	0,9552 ± 0,00153^{s}	50,77±0,05^{bc}	12,5 ± 0,00 ^{y}
51	3,81	0,924 ± 0,00045^{t}	53,23±0,02^{a}	15,3 ± 0,29^{y}
52	3,9	0,915 ± 0,01287^{tu}	53,33±0,34^{a}	82,2 ± 106,38^{qrstuvw}
53	2	1,2371 ± 0,00061^{l}	47,90±0,01^{mnop}	200,6 ± 0,98^{kl}
55	2,67	1,2641 ± 0,00145^{j}	49,09±0,04^{fgh}	505,0 ± 1,70^{f}
57	2,19	1,2829 ± 0,00372^{i}	47,85±0,06^{nop}	294,5 ± 10,72^{ij}
58	2,66	1,2851 ± 0,00123^{hi}	49,12±0,03^{fg}	1046,7 ± 25,93^{d}
62	2,88	1,2922 ± 0,00144^{ghi}	49,45±0,03^{ef}	2426,7 ± 5,77^{b}
67	2,21	1,4116 ± 0,0002^{a}	47,63±0,00^{p}	1586,0 ± 0,00^{c}
70	1,77	1,4154 ± 0,0004^{a}	47,58±0,02^{p}	296,7 ± 6,65^{i}
73	5,29	1,3171 ± 0,00217^{e}	-	291,7 ± 1,44^{a}
75	2,55	1,3741 ± 0,00103^{b}	47,97±0,03^{lmnop}	376,1 ± 8,4^{h}
76	2,74	1,36 ± 0,00134^{c}	48,50±0,04^{ijkl}	238,3 ± 3,35^{jk}
77	1,95	1,3065 ± 0,00057^{ef}	47,67±0,02^{p}	445,6 ± 4,18^{g}
101	4,19	1,1182 ± 0,00126^{q}	49,92±0,03^{de}	42,5 ± 0,00^{stuvwxy}
103	1,89	1,1837 ± 0,00056^{op}	47,98±0,01^{lmnop}	195,5 ± 0,46^{kl}
108	4,46	1,1009 ± 0,00297^{r}	50,36±0,07^{bcd}	73,3 ± 0,00^{rstuvwx}
109	2,65	1,2051 ± 0,00061^{mn}	50,24±0,03^{cd}	895,6 ± 11,74^{e}

Tablo A4 Fenolik profili analizi için kullanılan çoklu reaksiyon izleme (MRM) değerleri

Bileşik	**RZ (dk.)**	**ESI (+/-)**	**Öncü iyon (m/z)**	**Parçalanma iyonları (m/z)**	**Giriş Voltajları (V)**	**Çarpışma Enerjileri (eV)**
4-Hidroksibenzoik	8,9	(-)	137,0	92,9	20	15
trans-Sinnamik Asit	21,1	(-)	147,0	77,0	25	20
				102,8	25	20
Genistein	24,7	(-)	269,0	133,2	40	30
				159,2	40	20
				224,2	40	25
				240,0	40	20
Protokateşuik Asit	6,6	(-)	152,9	108,8	25	15
p- Kumarik Asit	13,5	(-)	163,0	93,0	25	20
				119,0	25	20
				147,0	25	20
Kafeik Asit	10,9	(-)	179,0	135,0	25	20
m-Kumarik Asit	15,2	(-)	163,0	93,0	25	20
				119,0	25	20
				147,0	25	20
trans-Ferulik Asit	14,7	(-)	193,0	134,0	25	20
				149,0	25	20
				178,0	25	20
Krisin	30,9	(-)	253,0	185.0	30	20
				209,0	25	20
				225,0	25	20
Pinosembrin	31,1	(-)	255,0	151,0	25	20
				171,0	25	20
				213,0	25	20
3,4 Dimetoksi Sinnamik Asit	19,1	(-)	206,7	102,7	25	20
Apigenin	25,0	(-)	269,0	117,3	40	30
				149,0	40	25
				151,0	40	25

Galangin	31,9	(-)	269,0	197,0	25	20
				213,0	25	20
				227,0	25	20
Pinobanksin	24,3	(-)	271,2	153,0	25	20
				225,0	25	20
				253,0	25	20
CAPE	32,4	(-)	283,0	135,0	25	20
				161,0	25	20
				179,0	25	20
Kamferol	25,4	(-)	285,0	93,0	25	20
				151,0	25	20
				257,0	25	20
Naringenin	24,2	(-)	271,0	145,0	25	20
				151,0	25	20
Kersetin	22,4	(-)	301,0	150,8	35	20
				178,9	35	20
İzoramnetin	25,9	(-)	315,0	300,0	25	20
3-*O*-metilkersetin	23,2	(-)	316,0	186,5	30	25
				301,0	40	30
Vanilik Asit	10,4	(-)	166,9	90,8	20	20
				108,1	25	20
				123,2	25	10
				152,2	25	25
Lasyokarpin B	29,0	(-)	441,4	162,8	30	20
				179,1	30	20
				295,2	30	20
				380,8	30	20
Lasyokarpin C	26,7	(-)	457,4	161,0	30	22
				179,2	30	22
				234,8	30	22
				294,9	30	22

Tablo A5 NADES 76 için deneysel tasarım ve toplam fenolik içerik sonuçları

Run	X1	X2	X3	TPİ (Ort.)	TPİ
1	0	0	0	1202,5 ± 93,6	1194,4
2	-	-1	1	1036,3 ± 29,1	1024,9
3	-	-1	-1	394,5 ± 65,7	405,2
4	-1	1	-1	1099,0 ± 23,1	1123,6
5	0	0	0	1201,1 ± 60,7	1194,4
6	-1	1	1	1400,9 ± 20,1	1427,3
7	1	1	-1	1430,1 ± 44,3	1457,6
8	0	0	0	1151,5 ± 34,2	1194,4
9	0	-1	1	1398,0 ± 20,7	1380,7
10	0	0	0	1253,6 ± 63,3	1194,4
11	1	1	1	1686,8 ± 55,1	1672,4
12	0	-1	-1	852,5 ± 35,1	837,1
13	0	0	1,68	1781,6 ± 85,4	1795,4
14	-	0	0	1103,3 ± 41,7	1068,2
15	0	1,68	0	1873,5 ± 50,5	1835,9
16	0	0	-1,68	1217,1 ± 41,7	1192,3
17	0	0	0	1386,4 ± 44,3	1395
18	-1	-	0	1091,7 ± 112,6	1116,1
19	1,68	0	0	1609,5 ± 59,8	1613,8
20	0	0	0	1348,4 ± 30,3	1395

Tablo A6 NADES 62 için deneysel tasarım ve toplam fenolik içerik sonuçları

Run	X_1	X_2	X_3	TPİ (Ort.)	TPİ (Hesapsal)
1	0	0	0	2690,4 ± 632,0	2422,4
2	-	-1	1	1148,6 ± 396,1	1232,4
3	-	-1	-1	975,0 ± 343,3	829,2
4	-1	1	-1	2602,8 ± 680,8	2382,9
5	0	0	0	2363,6 ± 897,0	2422,4
6	-1	1	1	3161,5 ± 669,2	3059,0
7	1	1	-1	3142,5 ± 373,9	3053,1
8	0	0	0	2643,7 ± 490,2	2422,4
9	0	-1	1	1431,5 ± 554,4	1812,2

10	0	0	0	2595,5 ± 1027,0	2422,4
11	1	1	1	3374,4 ± 562,5	3900,7
12	0	-1	-1	1091,7 ± 499,0	1262,1
13	0	0	1,68	4294,8 ± 1136,9	3834,3
14	-	0	0	1520,5 ± 739,6	1912,2
15	0	1,68	0	3823,7 ± 329,1	3848,1
16	0	0	-	2441,0 ± 472,6	2684,2
17	0	0	0	2554,7 ± 435,0	2718,9
18	-1	-1,68	0	1412,6 ± 848,8	1129,6
19	1,68	0	0	3011,3 ± 826,3	2743,7
20	0	0	0	2531,4 ± 1214,4	2718,9

Tablo A7 NADES 58 için deneysel tasarım ve toplam fenolik içerik sonuçları

Run	**X_1**	**X_2**	**X_3**	**TPİ (Ort.)**	**TPİ (Hesapsal)**
1	0	0	0	1253,6 ± 24,1	1289,2
2	-1,68	-1	1	592,8 ± 90,2	613,1
3	-1,68	-1	-1	339,0 ± 50,7	327,3
4	-1	1	-1	638,1 ± 56,4	649,5
5	0	0	0	1282,8 ± 68,7	1289,2
6	-1	1	1	976,5 ± 85,2	927,7
7	1	1	-1	1258,0 ± 42,5	1253,3
8	0	0	0	1339,7 ± 30,3	1289,2
9	0	-1	1	753,3 ± 53,8	725,2
10	0	0	0	1247,8 ± 50,5	1289,2
11	1	1	1	1597,8 ± 21,9	1576,9
12	0	-1	-1	350,7 ± 82,0	400,5
13	0	0	1,68	945,8 ± 27,3	988,4
14	-1,68	0	0	438,2 ± 30,3	455,8
15	0	1,68	0	995,4 ± 85,4	1031,9
16	0	0	-1,68	499,5 ± 31,6	468,7
17	0	0	0	1065,4 ± 14,1	1016,0
18	-1	-1,68	0	134,8 ± 15,4	112,4
19	1,68	0	0	886,1 ± 94,3	889,1
20	0	0	0	1012,9 ± 52,2	1016,0

Tablo A8 Ultra Saf Su için Deneysel Tasarım ve Toplam Fenolik İçerik Sonuçları

Run	X_1	X_2	X_3	TPİ (Ort.)	TPİ (Hesapsal)
1	0	0	0	347,1 ± 18,3	349,8
2	-1,68	-1	1	148,4 ± 25,6	140,4
3	-1,68	-1	-1	252,7 ± 22,0	252,4
4	-1	1	-1	449,9 ± 19,4	444,5
5	0	0	0	354,0 ± 27,3	349,8
6	-1	1	1	478,8 ± 12,1	472,2
7	1	1	-1	510,0 ± 23,5	522,2
8	0	0	0	335,7 ± 31,5	349,8
9	0	-1	1	226,9 ± 31,0	227,5
10	0	0	0	354,0 ± 32,0	349,8
11	1	1	1	742,2 ± 20,5	737,2
12	0	-1	-1	175,1 ± 31,6	179,0
13	0	0	1,68	475,8 ± 5,7	486,2
14	-1,68	0	0	365,4 ± 16,5	380,5
15	0	1,68	0	685,1 ± 15,2	686,9
16	0	0	-1,68	322,8 ± 17,3	315,5
17	0	0	0	402,7 ± 23,0	398,1
18	-1	-1,68	0	191,1 ± 25,2	193,0
19	1,68	0	0	677,5 ± 30,9	673,2
20	0	0	0	411,1 ± 14,0	398,1

Tablo A9 80 Etil alkol için Deneysel Tasarım ve Toplam Fenolik İçerik Sonuçları

Run	X_1	X_2	X_3	TPİ (Ort.)	TPİ (Hesapsal)
1	0	0	0	2073,6 ± 125,2	2198,8
2	-1,68	-1	1	4175,1 ± 107,9	4250,7
3	-1,68	-1	-1	4813,9 ± 296,5	4855,9
4	-1	1	-1	2144,5 ± 267,2	2079,0
5	0	0	0	2349,9 ± 263,7	2198,8
6	-1	1	1	5341,1 ± 109,8	5339,0
7	1	1	-1	2339,7 ± 104,5	2203,6
8	0	0	0	2159,8 ± 142,7	2198,8

9	0	-1	1	4783,4 ± 137,0	4891,2
10	0	0	0	2261,2 ± 181,4	2198,8
11	1	1	1	6289,3 ± 321,4	6304,7
12	0	-1	-1	4763,2 ± 161,4	4775,5
13	0	0	1,68	6672,0 ± 59,1	6560,0
14	-1,68	0	0	2078,6 ± 195,1	2042,5
15	0	1,68	0	2550,1 ± 68,1	2684,0
16	0	0	-1,68	2496,9 ± 130,4	2591,2
17	0	0	0	1698,4 ± 53,4	1678,5
18	-1	-1,68	0	4154,8 ± 251,9	3999,8
19	1,68	0	0	3891,1 ± 82,3	3912,1
20	0	0	0	1604,6 ± 72,3	1678,5

Tablo A10 NADES 57 için deneysel tasarım ve toplam flavonoid içerik sonuçları

Run	**X_1**	**X_2**	**X_3**	**TFİ (Ort.)**	**TFİ (Hesapsal)**
1	0	0	0	474,9 ± 72	509,1
2	-1,68	-1	1	365,6 ± 58,8	346,3
3	-1,68	-1	-1	113,8 ± 21,5	130,1
4	-1	1	-1	199,1 ± 53,1	193,7
5	0	0	0	517,2 ± 61,2	509,1
6	-1	1	1	227,0 ± 68,8	269,7
7	1	1	-1	482,1 ± 26,7	498,4
8	0	0	0	573,2 ± 25,5	509,1
9	0	-1	1	377,4 ± 96,9	400,3
10	0	0	0	516,6 ± 73,5	509,1
11	1	1	1	377,3 ± 95,3	386,4
12	0	-1	-1	382,6 ± 33,2	345,3
13	0	0	1,68	385,8 ± 67,1	358,0
14	-1,68	0	0	394,9 ± 90,3	374,7
15	0	1,68	0	413,1 ± 109,2	378,9

16	0	0	-1,68	344,8 ± 95,9	356,3
17	0	0	0	525,7 ± 63,7	553,8
18	-1	-1,68	0	329,2 ± 75,0	344,0
19	1,68	0	0	668,8 ± 81,6	664,8
20	0	0	0	521,8 ± 96,4	553,8

Tablo A11 NADES 58 için deneysel tasarım ve toplam flavonoid içerik sonuçları

Run	**X_1**	**X_2**	**X_3**	**TFİ (Ort.)**	**TFİ (Hesapsal)**
1	0	0	0	46,2 ± 9,4	40,0
2	-1,68	-1	1	28,6 ± 5,7	29,8
3	-1,68	-1	-1	24,1 ± 3,4	25,2
4	-1	1	-1	18,2 ± 3,3	19,8
5	0	0	0	38,1 ± 5,7	40,0
6	-1	1	1	38,4 ± 6,7	40,3
7	1	1	-1	37,4 ± 4,0	38,1
8	0	0	0	45,2 ± 14,4	40,0
9	0	-1	1	58,9 ± 5,6	60,0
10	0	0	0	40,0 ± 4,0	40,0
11	1	1	1	62,1 ± 5,9	63,2
12	0	-1	-1	50,7 ± 6,6	51,4
13	0	0	1,68	48,5 ± 6,8	46,5
14	-1,68	0	0	69,9 ± 4,5	66,7
15	0	1,68	0	45,9 ± 7,9	43,9
16	0	0	-1,68	18,5 ± 5,0	17,2
17	0	0	0	50,4 ± 1,7	57,0
18	-1	-1,68	0	60,2 ± 14,7	58,1
19	1,68	0	0	154,5 ± 32,4	153,9
20	0	0	0	52,4 ± 8,8	57,0

Tablo A12 NADES 62 için deneysel tasarım ve toplam flavonoid içerik sonuçları

Run	X_1	X_2	X_3	TFİ (Ort.)	TFİ (Hesapsal)
1	0	0	0	265,7 ± 31,4	241,4
2	-1,68	-1	1	122,5 ± 5,7	116,2
3	-1,68	-1	-1	63,9 ± 22,6	78,0
4	-1	1	-1	232,0 ± 16,7	233,7
5	0	0	0	255,9 ± 40,6	241,4
6	-1	1	1	313,4 ± 42,0	325,1
7	1	1	-1	317,7 ± 34,3	333,6
8	0	0	0	249,4 ± 33,8	241,4
9	0	-1	1	184,3 ± 39,5	191,0
10	0	0	0	223,4 ± 20,3	241,4
11	1	1	1	454,3 ± 20,3	442,8
12	0	-1	-1	140,9 ± 33,2	137,6
13	0	0	1,68	397,9 ± 41,3	401,1
14	-1,68	0	0	193,0 ± 21,6	180,3
15	0	1,68	0	456,5 ± 22,1	449,5
16	0	0	-1,68	275,4 ± 22,5	261,9
17	0	0	0	255,9 ± 29,8	280,6
18	-1	-1,68	0	153,9 ± 37,0	148,6
19	1,68	0	0	316,6 ± 37,0	315,7
20	0	0	0	268,9 ± 39,4	280,6

Tablo A13 NADES 76 için deneysel tasarım ve toplam flavonoid içerik sonuçları

Run	X1	X2	X3	TFİ (Ort.)	TFİ (Hesapsal)
1	0	0	0	114,9 ± 13,2	107,0
2	-1,68	-1	1	93,2 ± 9,8	87,5
3	-1,68	-1	-1	78,1 ± 13,1	82,9
4	-1	1	-1	84,6 ± 22,1	82,6
5	0	0	0	99,7 ± 0,0	107,0

6	-1	1	1	105,2 ± 26,3	112,7
7	1	1	-1	93,2 ± 0,0	96,9
8	0	0	0	103 ± 5,7	107,0
9	0	-1	1	112,8 ± 5,7	115,0
10	0	0	0	107,3 ± 16,4	107,0
11	1	1	1	187,6 ± 35,2	182,9
12	0	-1	-1	71,6 ± 11,4	62,5
13	0	0	1,68	177,8 ± 5,6	177,8
14	-1,68	0	0	86,7 ± 5,7	82,7
15	0	1,68	0	162,6 ± 31,6	159
16	0	0	-1,68	79,1 ± 16,7	80,3
17	0	0	0	112,8 ± 5,7	120,8
18	-1	-1,68	0	103,0 ± 9,8	107,9
19	1,68	0	0	106,2 ± 5,7	108,0
20	0	0	0	129,0 ± 9,8	120,8

Tablo A14 Saf su için deneysel tasarım ve toplam flavonoid içerik sonuçları

Run	**X_1**	**X_2**	**X_3**	**TFİ (Ort.)**	**TFİ (Hesapsal)**
1	0	0	0	10,6 ± 1,2	11,9
2	-1,68	-1	1	10,6 ± 0,6	9,9
3	-1,68	-1	-1	8,9 ± 1,6	10,2
4	-1	1	-1	7,5 ± 1,5	6,8
5	0	0	0	11,1 ± 1,4	11,2
6	-1	1	1	14,3 ± 0,9	14,0
7	1	1	-1	14,7 ± 1,7	16,4
8	0	0	0	10,6 ± 0,4	10,4
9	0	-1	1	10,6 ± 0,8	9,9
10	0	0	0	12,8 ± 1,7	13,6
11	1	1	1	11,0 ± 0,8	11,7
12	0	-1	-1	13,9 ± 0,4	13,6
13	0	0	1,68	16,1 ± 1,0	17,2

14	-1,68	0	0	17,7 ± 1,2	19,0
15	0	1,68	0	19,6 ± 1,3	18,2
16	0	0	-1,68	16,9 ± 1,0	17,5
17	0	0	0	18,5 ± 0,6	19,0
18	-1	-1,68	0	18,6 ± 2,0	20,8
19	1,68	0	0	28,0 ± 0,6	27,7
20	0	0	0	19,5 ± 1,4	19,1

Tablo A15 80 Etanol için deneysel tasarım ve toplam flavonoid içerik sonuçları

Run	**X_1**	**X_2**	**X_3**	**TPİ (Ort.)**	**TPİ**
1	0	0	0	342,2 ± 4,6	346,2
2	-1,68	-1	1	741,3 ± 17,5	758,3
3	-1,68	-1	-1	852 ± 9,2	857,3
4	-1	1	-1	252,0 ± 3,0	249,0
5	0	0	0	344,9 ± 4,7	350,2
6	-1	1	1	1031,4 ± 10,4	1034,7
7	1	1	-1	350,9 ± 9,3	340,2
8	0	0	0	340,9 ± 4,5	341,2
9	0	-1	1	809,1 ± 8,6	801,4
10	0	0	0	338,9 ± 3,5	335,2
11	1	1	1	1210,2 ± 17,1	1192,2
12	0	-1	-1	859,1 ± 5,0	864,4
13	0	0	1,68	1252,4 ± 21,4	1243,7
14	-1,68	0	0	300,2 ± 5,5	296,5
15	0	1,68	0	596,6 ± 6,0	595,9
16	0	0	-1,68	424,8 ± 5,0	424,8
17	0	0	0	287,2 ± 6,6	281,2
18	-1	-1,68	0	777,8 ± 11,3	784,8
19	1,68	0	0	602,4 ± 6,1	601,1
20	0	0	0	284,2 ± 0,0	284,2

Tablo A16 Optimum koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda elde edilen çözeltilerin *Aspergillus oryzae*'ye karşı inhibisyon ve bakteriyosidal etkileri

	NADES 57	NADES 58	NADES 62	NADES 76	USS	%80 Etanol
25%	106,5 ± 0,6	122,3 ± 0,8	114,6 ± 1,8	104,2 ± 0,1	56,1 ± 1,7	145 ± 7,9
12,50%	108,1 ± 0,8	115 ± 0,6	110,2 ± 0,7	103,6 ± 0,3	26,2 ± 2,2	144,8 ± 3,5
6,30%	106,4 ± 0,3	113,9 ± 0,7	106,9 ± 0,5	102,2 ± 1,5	20,6 ± 3,7	156,8 ± 1,5
3,20%	95,7 ± 2,6	99,5 ± 1,3	104,7 ± 1,2	90,6 ± 5,7	17,2 ± 2	146,4 ± 2,2
1,60%	86,2 ± 1,3	88,2 ± 1,3	95,9 ± 0,9	81,9 ± 2,5	12,7 ± 1,2	118,4 ± 3,2
0,80%	73,6 ± 5,1	75,3 ± 6,4	85,2 ± 6,3	76,2 ± 4,3	11,4 ± 1,3	94,1 ± 3
0,40%	47,7 ± 8,6	64,9 ± 6,3	75,3 ± 3,7	57 ± 7,7	9,2 ± 1,5	74 ± 4,6
0,20%	25,5 ± 2,7	45 ± 12,6	52,7 ± 10,8	34,4 ± 5,5	6,7 ± 0,8	67,4 ± 9,5
Ant.	100,6 ± 0,4	99,6 ± 1,2	100,3 ± 0,5	101,1 ± 1,3	100,3 ± 0,2	100,3 ± 0,6
Ant.	93,1 ± 1	93,4 ± 0,8	94,6 ± 1,1	98,8 ± 5,4	94,1 ± 2,3	95,9 ± 1
(+)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
(-)	102,1 ± 0,2	101,9 ± 0,1	102 ± 0,1	101,9 ± 0	101,8 ± 0,1	102 ± 0,1

Tablo A17 Optimum koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda elde edilen çözeltilerin *Aspergillus niger*'e karşı inhibisyon ve bakteriyosidal etkileri

	NADES 57	NADES 58	NADES 62	NADES 76	USS	%80 Etanol
25%	108,2 ± 0,9	120,7 ± 1	117,5 ± 3,7	104,3 ± 0,3	68,5 ± 23,4	149,8 ± 13,1
12,50%	109,5 ± 0,7	116,3 ± 1,1	112,6 ± 3	103,9 ± 0,3	39,6 ± 34,2	145,5 ± 9,3
6,30%	107,5 ± 0,5	114,3 ± 1,1	107,6 ± 0,3	102,5 ± 0,3	16,4 ± 12,6	155,1 ± 4
3,20%	99,4 ± 3,8	99,4 ± 0,9	101,7 ± 1,3	42,5 ± 5,7	7,2 ± 4,9	139,6 ± 2,6
1,60%	54,1 ± 7,5	36,2 ± 5,3	100,3 ± 0,9	14,1 ± 4,8	1,3 ± 6,5	120,3 ± 1,7
0,80%	37,6 ± 2,1	33,9 ± 3,9	55,6 ± 50,7	13,3 ± 3,9	1,6 ± 3,3	109 ± 1,2
0,40%	9,5 ± 12,7	20,6 ± 5,2	43,5 ± 13,2	8,7 ± 4,3	2,3 ± 2,6	63,7 ± 20,9
0,20%	3,3 ± 5,6	11 ± 2,2	13,3 ± 13,1	-0,4 ± 8,5	1,4 ± 3,9	14,3 ± 15,1
Ant.	99 ± 0,1	99 ± 0,7	99 ± 0,3	99,4 ± 0,2	98,9 ± 1	99,5 ± 0,3
Ant.	95,6 ± 1,3	94,9 ± 0,4	94,3 ± 1,6	94 ± 1,3	95,5 ± 0,9	95,7 ± 1,7
(+)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
(-)	102,4 ± 0,2	102,3 ± 0	102,4 ± 0,1	102,4 ± 0,2	102,2 ± 0,1	102,1 ± 0,1

Tablo A18. Optimum koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda elde edilen çözeltilerin *Penicillium*'a karşı inhibisyon ve bakteriyosidal etkileri

	NADES 57	NADES 58	NADES 62	NADES 76	USS	%80 Etanol
25%	116,2 ± 5,6	175,5 ± 30,3	162,9 ± 10,1	112 ± 3,8	88,4 ± 2,4	248,6 ± 54,2
12,50%	115,2 ± 5,4	148,2 ± 22	142,6 ± 15,2	110,9 ± 4,5	78,1 ± 8	323 ± 96,7
6,30%	112,8 ± 4,1	149,8 ± 21,5	127,4 ± 10,6	110,3 ± 3,2	72,5 ± 7,6	357,2 ± 104,3
3,20%	109,7 ± 3,2	120,4 ± 8,3	119,1 ± 8	109,8 ± 3,5	59,5 ± 4	285,6 ± 72
1,60%	104,2 ± 1,8	115 ± 6	114,8 ± 6,1	100,5 ± 1,4	32,1 ± 8,9	169,8 ± 28,8
0,80%	98,5 ± 0,7	98,7 ± 2,3	109,3 ± 3,7	95,3 ± 1	35,2 ± 2,7	120,1 ± 6,3
0,40%	81,8 ± 4	90,7 ± 4,4	97,5 ± 1,7	84,5 ± 6	21,1 ± 23,8	105,1 ± 3,6
0,20%	48,8 ± 10,5	53 ± 5,8	90,7 ± 4,7	41 ± 7,7	20,3 ± 17,3	92,8 ± 4,7
Ant.	104,7 ± 1,5	107,3 ± 3,4	107,8 ± 3,4	106,5 ± 2,4	110,4 ± 4,8	111,2 ± 5,3
Ant.	101,5 ± 0,7	99,2 ± 0,8	96,9 ± 2,2	99,3 ± 1,1	96,3 ± 2,5	98,2 ± 2,5
(+)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
(-)	103,9 ± 1,5	106,4 ± 2,7	107 ± 3,3	105,8 ± 1,7	109,2 ± 2,7	110,9 ± 4,6

Tablo A19. Optimum koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda elde edilen çözeltilerin *Salmonella*'ya karşı inhibisyon ve bakteriyosidal etkileri

	NADES 57	NADES 58	NADES 62	NADES 76	USS	%80 Etanol
50%	84,3 ± 1,4	117 ± 2,3	122,9 ± 3,5	96 ± 0,7	49,1 ± 10,1	237,4 ± 4,7
25%	87,9 ± 0,8	108,2 ± 2,2	112,6 ± 2,2	95,9 ± 1	41,5 ± 10,6	153,4 ± 3,9
12,50%	93 ± 2,7	105,2 ± 0,1	105,8 ± 3	99,6 ± 1	43 ± 5	155,7 ± 1,6
6,30%	97,6 ± 0,7	102 ± 0,5	100,9 ± 2,1	99,9 ± 0,1	43,7 ± 2,3	108,5 ± 1,9
3,10%	98,7 ± 0,3	98,8 ± 1,2	99,7 ± 1,3	100,2 ± 0,1	36,6 ± 4,7	89,8 ± 1,2
1,60%	91,2 ± 3	99,9 ± 1	99,7 ± 0,9	99,9 ± 0,4	26,1 ± 3,5	76,9 ± 2,3
0,80%	39,4 ± 5,1	94,5 ± 2,7	83,9 ± 4,5	100,1 ± 0,1	12,1 ± 6,1	56,3 ± 2,5
0,40%	15,5 ± 2	40,1 ± 9,9	36,9 ± 8,8	65,6 ± 5,1	0,2 ± 5,9	44,5 ± 2
Ant.	97,5 ± 1,2	98,6 ± 0,5	99,2 ± 0,7	95,1 ± 8,5	99,9 ± 0,5	99,8 ± 0,3
Ant.	97,6 ± 0,6	98,8 ± 0,6	98,8 ± 0,5	99,5 ± 0,3	99,6 ± 0,2	99,9 ± 0,1
(+)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
(-)	95,9 ± 0,1	96 ± 0,2	97,2 ± 2,6	100 ± 0,2	100,1 ± 0,1	100 ± 0,1

Tablo A20. Optimum koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda elde edilen çözeltilerin *Staphylococcus aureus*'a karşı inhibisyon ve bakteriyosidal etkileri

	NADES 57	NADES 58	NADES 62	NADES 76	USS	%80 Etanol
50%	75,2 ± 5,5	126,4 ± 9,1	124,8 ± 6,2	79,1 ± 10,2	94,9 ± 1,9	221,8 ± 30,9
25%	75,6 ± 4	120,2 ± 5,5	115,4 ± 5,9	77 ± 11,7	87,9 ± 2,4	158,2 ± 15,3
12,50%	89,9 ± 2	110,1 ± 2,3	103 ± 2,5	83,5 ± 6,2	85,3 ± 3,2	131,5 ± 11,1
6,30%	96,9 ± 0,5	104,8 ± 1,4	97,1 ± 1,4	89 ± 5,1	82 ± 7,1	85,6 ± 14,9
3,10%	98,5 ± 0,4	102 ± 1	97,9 ± 1,4	92,8 ± 7,3	65,3 ± 16	85,2 ± 7,7
1,60%	99 ± 0,2	101,8 ± 0,6	98,7 ± 1,1	98 ± 0,5	47,4 ± 16,4	90,4 ± 12,2
0,80%	91,3 ± 1,5	100,7 ± 0,3	98,9 ± 0,9	91,7 ± 4,1	22,7 ± 38,2	90,9 ± 4,6
0,40%	70,6 ± 10,5	84,3 ± 2,9	95,6 ± 1,6	37,2 ± 77	16,4 ± 15,8	83,2 ± 3,4
Ant.	98,2 ± 1	98,8 ± 0,2	98,8 ± 0,6	97,8 ± 0,9	98,1 ± 1	97,9 ± 1,1
Ant.	99,2 ± 0,6	99,3 ± 0,4	99 ± 0,6	98,3 ± 0,6	99,1 ± 0,8	98,6 ± 0,1
(+)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
(-)	93,4 ± 1,1	93,2 ± 0,8	95 ± 1,4	92,3 ± 2,7	94,6 ± 1,5	93,1 ± 2

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Alpat, U., Nar, T., Karasu, S., & Sagdıc, O. (2023 03-05 Mayıs). Optimization of propolis extraction with natural deep eutectic solvents using central composite design. The 9th International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, Ankara, Türkiye

2. Alpat, U., Nar, T., Karasu, S., & Sagdıc, O. (2023, 09-11 Kasım). Optimization of Propolis Extraction with Natural Deep Eutectic Solvents and Evaluation of Their Bioactive Content and Antimicrobial Activity. The 3rd International Propolis Conference, İstanbul, Türkiye

Makaleler

1. Alpat, U., Nar, T., Karasu, S., & Sagdıc, O., (2023). Optimization of propolis extraction with natural deep eutectic solvents using central composite design. Phytochemistry Letters, 58, 49-59. https://doi.org/10.1016/j.phytol.2023.09.013