T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI ÇÖZÜCÜ VE YÖNTEMLER KULLANILARAK ELDE EDİLEN PROPOLİS EKSTRAKTLARININ KARAKTERİZASYONU

Zeynep BAKKALOĞLU

DOKTORA TEZİ
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Gıda Mühendisliği Programı

Danışman
Prof. Dr. Muhammet ARICI

Eş-Danışman
Doç. Dr. Salih KARASU

Kasım, 2020

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI ÇÖZÜCÜ VE YÖNTEMLER KULLANILARAK ELDE EDİLEN PROPOLİS EKSTRAKTLARININ KARAKTERİZASYONU

Zeynep BAKKALOĞLU tarafından hazırlanan tez çalışması 10.11.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Gıda Mühendisliği Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Muhammet ARICI
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Doç. Dr. Salih KARASU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Muhammet ARICI, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. İbrahim PALABIYIK, Üye
Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Görkem ÖZÜLKÜ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Ahmet Şükrü DEMİRCİ, Üye
Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi _____

Doç. Dr. Ömer Said TOKER, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Muhammet ARICI sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Farklı Çözücü ve Yöntemler Kullanılarak Elde Edilen Propolis Ekstraktlarının Karakterizasyonu 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.

Zeynep BAKKALOĞLU

İmza

Bu çalışma Yıldız Teknik Üniveristesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası: 3467.

Sevgili aileme
ve kıymetli hocalarıma,

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarını yürütmek ve tezi olumlu bir şekilde sonuçlandırmak herkes için uzun ve zahmetli bir yolculuktur. Ancak çevremdeki insanların desteği bu süreci en iyi şekilde tamamlamama yardımcı oldu. Bu nedenle tez çalışmam boyunca bana desteğini esirgemeyen, bana rehberlik eden ve danışmanım olduğu için kendimi şanslı hissettiğim kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Muhammet ARICI'ya en içten duygularımla teşekkürlerimi sunarım.

Tezim tamamlanırken elbette dışarıdan iyi bir gözlemcinin yorumlarına ihtiyaç duyulmaktaydı. Bu noktada tezimde eş danışman olmayı kabul eden, bilgi, tecrübe ve farklı bakış açılarını benimle paylaşan değerli akıl hocam Doç. Dr. Salih KARASU'ya teşekkürlerimi ve minnettarlığımı sunmak istiyorum.

Tezim için vaktimin çoğunu geçirdiğim laboratuvarda enstrümental analizlerimin gerçekleşmesinde katkıda bulunan, yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Öğr. Gör. Dr. Nur Çebi'ye en içten dileklerimle teşekkür ederim. Ayrıca laboratuvar arkadaşlarıma desteklerini esirgemedikleri ve laboratuvarı keyifli hale getirdikleri için teşekkür ediyorum.

Hazırlanan tez çalışması 3467 nolu YTÜ Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) kapsamında desteklenerek tamamlanmıştır. YTÜ BAP'a verdikleri maddi desteklerden ötürü teşekkürü bir borç bilirim.

En önemlisi bu çalışma boyunca motivasyonumun düştüğü, karamsarlığa kapıldığım her anda beni güçlendiren, destekleyen her zaman yeniden aynı heyecanla başlamamı sağlayan, her türlü ihtiyacımı koşulsuz yerine getirmeye çalışan ve her zaman başaracağıma inanan sevgili annem, babam, ablam ve kardeşlerime çok teşekkür ederim. Onları çok seviyorum ve bu tezi annem Filiz BAKKALOĞLU'na hediye etmek istiyorum.

Zeynep BAKKALOĞLU

İÇİNDEKİLER

KISALTMA LİSTESİ **ix**

ŞEKİL LİSTESİ **xi**

TABLO LİSTESİ **xiv**

ÖZET **xv**

ABSTRACT **xvii**

1 GİRİŞ **1**

1.1 Literatür Özeti 1

1.1.1 Propolisin Tanımı ve Önemi 1

1.1.2 Propolisin Kullanım Alanları 3

1.1.3 Propolisin Tüketimi 4

1.1.4 Propolis Ekstraksiyonu 6

1.1.5 Propolis Ekstraksiyonunda Kullanılan Çözücüler 7

1.1.6 Propolis Ekstraksiyonunda Kullanılan Yöntemler 8

1.1.7 Propolis Karakterizasyonu 13

1.1.8 Propolisin Biyoaktif Özellikleri 16

1.1.9 Propolisin Antimikrobiyal Özellikleri 18

1.1.10 Propolis Enkapsülasyonu 21

1.1.11 Enkapsüle Propolislerin Gıdalarda Kullanımı 23

1.1.12 İstatiksel Analiz 25

1.2 Tezin Amacı 25

1.3 Hipotez 27

2 MATERYAL VE YÖNTEM **29**

2.1 Ham Propolisin Toplanması 29

2.2 Propolis Ekstraksiyon Yöntemlerinin Geliştirilmesi ve Ekstrakt Hazırlanması 29

2.2.1 Klasik Çözücü Ekstraksiyon Metodu ile Propolis Ekstraktının Hazırlanması 30

2.2.2 Ultrases Destekli Ekstraksiyon Metodu ile Propolis Ekstraktının Hazırlanması 30
2.2.3 Ultrases Destekli Ekstraksiyon Metodu ile Optimum Propolis Ekstraktının Hazırlanması 32
2.3 Propolisin Spektroskopik Metotlar ile Karakterizasyonu 33
2.3.1 FT-IR Spektroskopisi ile Propolis Ekstraktlarının Karakterizasyonu 33
2.3.2 Raman Spektroskopisi ile Propolis Ekstraktlarının Karakterizasyonu 33
2.4 Propolisin Biyoaktif Bileşen İçeriğinin Belirlenmesi 34
2.4.1 Propolisin Toplam Fenolik Madde İçeriğinin Belirlenmesi 34
2.4.2 Propolisin Fenolik Bileşenlerinin HPLC ile Belirlenmesi 35
2.4.3 Propolisin Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi 36
2.5 Propolisin Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi 36
2.5.1 Mikroorganizma Kültürlerinin Hazırlanması 37
2.5.2 Agar Difüzyon Yöntemi İle Propolis Ekstraktlarının Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi 38
2.5.3 Propolis Ekstraktlarının Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının (MİK) Belirlenmesi 39
2.6 Propolis Ekstraktlarının Enkapsüle Edilmesi 40
2.6.1 Propolis Ekstraktlarının Enkapsülasyona Hazırlanması 40
2.6.2 Propolis Ekstraktlarının Dondurarak Kurutucu (Freze Dryer) ile Enkapsüle Edilmesi 40
2.6.3 Enkapsüle Edilmiş Propolislerin Enkapsülasyon Verimliliğinin Belirlenmesi 40
2.6.4 Enkapsüle Edilmiş Propolislerin Mikroyapısal Özelliklerinin Belirlenmesi 41
2.7 Enkapsüle Edilmiş Propolis Ekstraktlarının Balda Kullanılması 41
2.7.1 Baldaki Enkapsüle Edilmiş Propolislerin Fenolik Özelliklerinin Belirlenmesi 42
2.7.2 Baldaki Enkapsüle Edilmiş Propolislerin Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi 42
2.7.3 Baldaki Enkapsüle Edilmiş Propolislerin Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi 42
2.7.4 Enkapsüle Propolis İlave Edilmiş Balların Duyusal Analizi . . . 43
2.8 İstatiksel Analiz 44

3 BULGULAR VE TARTIŞMA **45**
3.1 Propolis Ekstraktlarının Spektroskopik Metotlar ile Karakterizasyonu . 45
3.1.1 FTIR Spektroskopisi ile Propolis Ekstraktlarının Karakterizasyonu 45

3.1.2 Raman Spektroskopisi ile Propolis Ekstraktlarının Karakterizasyonu 50
3.2 Propolis Ekstraktlarının Biyoaktif Bileşen İçeriği 55
3.2.1 Propolis Ekstraktlarının Toplam Fenolik Madde İçeriği 55
3.2.2 Propolis Ekstraktlarının Fenolik Bileşenlerin Profili 63
3.3 Propolis Ekstraktlarının Antioksidan Kapasitesi 68
3.4 Propolisin Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi 70
3.4.1 Agar Difüzyon Yöntemi ile Propolis Ekstraktlarının Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesinden Elde Edilen Sonuçlar 70
3.4.2 Propolis Ekstraktlarının Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları (MİK) 75
3.5 Propolis Ekstraktlarının Enkapsüle Edilmesi 76
3.5.1 Enkapsüle Edilmiş Propolislerin Enkapsülasyon Verimliliği . . . 76
3.5.2 Enkapsüle Edilmiş Propolislerin Mikroyapısal Özellikleri 77
3.6 Enkapsüle Edilmiş Propolis Ekstraktlarının Balda Kullanılması 78
3.6.1 Ballı Enkapsüle Edilmiş Propolis Karışımlarının Toplam Fenolik Özellikleri 79
3.6.2 Ballı Enkapsüle Edilmiş Propolis Karışımlarının Antioksidan Özellikleri 80
3.6.3 Baldaki Enkapsüle Edilmiş Propolislerin Antimikrobiyal Özellikleri 80
3.6.4 Enkapsüle Propolis İlave Edilmiş Balın Duyusal Özellikleri . . . 81

4 SONUÇ VE ÖNERİLER **85**

KAYNAKÇA **88**

A EK **106**
A.1 Duyusal Analiz Formu 106

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **107**

KISALTMA LİSTESİ

ANOVA	Analysis of Variance
CUPRAC	Cupric Reducing Antioxidant Capacity
DMSO	Dimetil sülfoksit
DS	Distile Su
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical
DRBC	Dichloran-Rose Bengal Chloramphenicol
EV	Enkapsülasyon Verimi
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma
FTIR	Fouirer Transform Infrared
GC	Gas Chromatography
GC-MS	Gas Chromatography–Mass Spectrometry
HAT	Hidrojen Atom Transferi
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IR	Infrared spectroscopy
KÇE	Klasik Çözücü Ekstraksiyonu
KE	Klasik Ekstraksiyon
KM	kurumadde Miktarı
LC-MS/MS	Liquid Chromatography - Mass Spectrometry/Mass Spectrometry
MEB	Malt Extract Broth
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
NMR	Nükleer manyetik rezonans

PDA	Patates Dekstroz Agar
PG	Propilen Glikol
RSM	Response Surface Methodology
SEM	Scanning Electron Microscope
SET	Single Electron Transfer
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TPC	Total Phenolic Content
UDE	Ultrases Destekli Ekstraksiyon
US	Ultrases
ÜM	Ürün Miktarı

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Ham propolis 29
Şekil 2.2 Klasik çözücü ekstraksiyon (KÇE) metodu kullanılarak edilen propolis ekstraktları 30
Şekil 2.3 Yüzey yanıt yöntemi dizaynına göre hazırlanan ultrases destekli propolis ekstraktları 31
Şekil 2.4 Yüzey yanıt yöntemi kullanılarak edilen ultrases destekli optimum propolis ekstraktları 32
Şekil 2.5 Raman spektroskopisi 34
Şekil 2.6 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) 35
Şekil 2.7 Propolis ekstraktlarının test mikroorganizmaları üzerine minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi için hazırlanan besiyerleri 39
Şekil 2.8 Dondurarak kurutucu (Freeze Dryer) 41
Şekil 3.1 Propolisin etanollü klasik çözücü ekstraksiyon örneklerinin FTIR ile belirlenen spektrumları 46
Şekil 3.2 Propolisin etanollü ultrases destekli ekstraksiyon örneklerinin FTIR ile belirlenen spektrumları 46
Şekil 3.3 Propolisin DMSO'lu klasik çözücü ekstraksiyon örneklerinin FTIR ile belirlenen spektrumları 47
Şekil 3.4 Propolisin DMSO'lu ultrases destekli ekstraksiyon örneklerinin FTIR ile belirlenen spektrumları 47
Şekil 3.5 Propolisin PG'li klasik çözücü ekstraksiyon örneklerinin FTIR ile belirlenen spektrumları 48
Şekil 3.6 Propolisin PG'li ultrases destekli ekstraksiyon örneklerinin FTIR ile belirlenen spektrumları 48
Şekil 3.7 Propolisin sulu klasik çözücü ekstraksiyon örneklerinin FTIR ile belirlenen spektrumları 49
Şekil 3.8 Propolisin sulu ultrases destekli ekstraksiyon örneklerinin FTIR ile belirlenen spektrumları 49
Şekil 3.9 Propolisin etanollü klasik çözücü ekstraksiyon örneklerine ait Raman spektrumu 51

Şekil 3.10 Propolisin etanollü ultrases destekli ekstraksiyon örneklerine ait Raman spektrumu 51
Şekil 3.11 Propolisin DMSO'lu klasik çözücü ekstraksiyon örneklerine ait Raman spektrumu 52
Şekil 3.12 Propolisin DMSO'lu ultrases destekli ekstraksiyon örneklerine ait Raman spektrumu 52
Şekil 3.13 Propolisin PG'li klasik çözücü ekstraksiyon örneklerine ait Raman spektrumu 52
Şekil 3.14 Propolisin PG'li ultrases destekli ekstraksiyon örneklerine ait Raman spektrumu 53
Şekil 3.15 Propolisin sulu klasik çözücü ekstraksiyon örneklerine ait Raman spektrumu 53
Şekil 3.16 Propolisin sulu ultrases destekli ekstraksiyon örneklerine ait Raman spektrumu 53
Şekil 3.17 Ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon sıcaklığı ve ultrases gücünün etanollü propolis ekstraktlarının toplam fenolik bileşen içeriği üzerine etkisi 60
Şekil 3.18 Ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon sıcaklığı ve ultrases gücünün DMSO'lu propolis ekstraktlarının toplam fenolik bileşen içeriği üzerine etkisi 60
Şekil 3.19 Ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon sıcaklığı ve ultrases gücünün PG'li propolis ekstraktlarının toplam fenolik bileşen içeriği üzerine etkisi . 61
Şekil 3.20 Ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon sıcaklığı ve ultrases gücünün distile sulu propolis ekstraktlarının toplam fenolik bileşen içeriği üzerine etkisi 61
Şekil 3.21 Propolisin etanollü klasik çözücü ekstraksiyon örneklerinin HPLC ile belirlenen kromatogramları 65
Şekil 3.22 Propolisin etanollü ultrases destekli ekstraksiyon örneklerinin HPLC ile belirlenen kromatogramları 66
Şekil 3.23 Propolisin DMSO'lu klasik çözücü ekstraksiyon örneklerinin HPLC ile belirlenen kromatogramları 66
Şekil 3.24 Propolisin DMSO'lu ultrases destekli ekstraksiyon örneklerinin HPLC ile belirlenen kromatogramları 66
Şekil 3.25 Propolisin PG'li klasik çözücü ekstraksiyon örneklerinin HPLC ile belirlenen kromatogramları 67
Şekil 3.26 Propolisin PG'li ultrases destekli ekstraksiyon örneklerinin HPLC ile belirlenen kromatogramları 67
Şekil 3.27 Propolisin sulu klasik çözücü ekstraksiyon örneklerinin HPLC ile belirlenen kromatogramları 67

Şekil 3.28 Propolisin sulu ultrases destekli ekstraksiyon örneklerinin HPLC ile belirlenen kromatogramları 68
Şekil 3.29 Propolis örneklerinin antioksidan kapasitesi ile toplam fenolik bileşen içeriğinin regrasyonu 70
Şekil 3.30 NA (Nutrient Agar) besi yerinde gram+ ve gram- bakteriler üzerine oluşan propolis ekstraktlarının inhibisyon zonları 71
Şekil 3.31 DRBC Agar (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar) besi yerinde oluşan propolis ekstraktlarının inhibisyon zonları 72
Şekil 3.32 PDA Agar (Patates Dekstroz Agar) besi yerinde *Penicillium carneum* üzerine oluşan propolis ekstraktlarının inhibisyon zonları 72
Şekil 3.33 PDA Agar (Patates Dekstroz Agar) besi yerinde *Aspergillus flavus* üzerine oluşan propolis ekstraktlarının inhibisyon zonlar 72
Şekil 3.34 PDA Agar (Patates Dekstroz Agar) besi yerinde *Aspergillus niger* üzerine oluşan propolis ekstraktlarının inhibisyon zonları 73
Şekil 3.35 Dondurarak kurutucuda enkapsüle edilmiş propolis örnekleri (1) kontrol (40 ml su: 8 g arap zamkı), (2) KÇE propolis (40 ml DS'li propolis: 8 g arap zamkı), (3) UDE propolis (40 ml DS'li propolis: 8 g arap zamkı) 76
Şekil 3.36 Enkapsüle edilen propolis örneklerinin SEM görüntüsü (1) kontrol (su:arap zamkı), (2) KÇE-DS propolis,(3) UDE-DS propolis 78
Şekil 3.37 Balda farklı oranlarda kullanılan enkapsüle edilmiş propolis ekstraktları 79
Şekil 3.38 Balda farklı oranlarda kullanılan enkapsüle edilmiş propolis ekstraktları 81
Şekil 3.39 Balda farklı oranlarda kullanılan enkapsüle edilmiş propolis karışımları 82

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Yüzey yanıt yöntemi kullanılarak ultrases destekli propolis ekstraksiyonunun deneysel tasarımı 31
Tablo 2.2 Yüzey yanıt yöntemi kullanılarak edilen ultrases destekli optimum propolis ekstraksiyonunun deneysel tasarımı 32
Tablo 3.1 Farklı çözücülerle klasik çözücü yöntemi ile ekstrakte edilmiş propolis örneklerinin toplam fenolik bileşen içeriği 55
Tablo 3.2 Farklı çözücülerle ekstrakte edilmiş ultrases destekli propolis örneklerinin toplam fenolik bileşen içeriği 57
Tablo 3.3 Farklı çözücülerle ekstrakte edilmiş ultrases destekli propolis ekstraktlarının toplam fenolik bileşen içeriği 58
Tablo 3.4 Propolis farklı çözücülerde ultrases destekli ekstraksiyonun optimizasyonu sonucu elde edilen örneklerin toplam fenolik madde içeriği 63
Tablo 3.5 Ultrases ve klasik çözücü yöntem kullanılan propolis ekstraktlarının fenolik bileşiklerinin konsantrasyonu 64
Tablo 3.6 Propolis farklı çözücülerde ultrases destekli ekstraksiyonun optimizasyonu sonucu elde edilen ekstraktların antioksidan kapasitesi 69
Tablo 3.7 Propolis ekstraktlarının test mikroorganizmaları üzerine antimikrobiyal aktivitesi 74
Tablo 3.8 Propolis ekstraktlarının test mikroorganizmaları üzerine minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerleri 76
Tablo 3.9 Enkapsüle edilmiş DS'li propolis örneklerinin ballı karışımlarının toplam fenolik bileşen içeriği 79
Tablo 3.10 Enkapsüle edilmiş DS'li propolis örneklerinin ballı karışımlarının antioksidan kapasitesi 80
Tablo 3.11 Duyusal analiz sonuçları 83
Tablo A.1 Duyusal analiz formu 106

ÖZET

Farklı Çözücü ve Yöntemler Kullanılarak Elde Edilen Propolis Ekstraktlarının Karakterizasyonu

Zeynep BAKKALOĞLU

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Muhammet ARICI
Eş-Danışman: Doç. Dr. Salih KARASU

Arıcılık ürünleri fonksiyonel özellikleri nedeni ile yüksek katma değeri olan gıdalardır. Arıcılık ürünlerinden biri olan propolis, içerisinde kanser türleri de olmak üzere bir çok hastalığa karşı ilaç veya tedaviye yardımcı gıda takviyesi olarak kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında, propolisin etanol, DMSO (dimetilsülfoksit), PG (propilen glikol) ve su ile ekstraksiyonunu gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyonların etkinliğini arttırmak için ultrases (US) uygulamasından yararlanılmış ve ekstraksiyon parametreleri yüzey tepki metodu (RSM) kullanılarak optimize edilmiştir.

Optimizasyon sonucu ekstraksiyonun etkinliği, propolis bileşiminde bulunan biyoaktif bileşenlerin tespiti ile kontrol edilmiştir. Biyoaktif bileşenler tespit edilirken HPLC yönteminden faydalanılmıştır. Propolis ekstraktlarının karakterizasyonu için FT-IR ve Raman spektroskopisi kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda ultrases uygulamasının tüm çözücüler için ekstraksiyon etkinliğini arttırdığı belirlenmiştir. Bununla birlikte çözücü etkinliğinin en etkili den en az etkili olana doğru etanol, DMSO, PG ve su olarak sıralandığı tespit edilmiştir.

Propolisin farklı çözücüler kullanılarak yapılan klasik çözücülü ve ultrases destekli ekstraktlarının antimikrobiyal etkisi incelenmiştir. Propolisin su dışındaki ekstraktları ile yapılan klasik çözücülü ve ultrases destekli ekstraktlarının test mikroorganizmaları üzerine antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir.

Propolisin gıda olarak tek başına kullanımı tüketici tarafından sağlık sebebiyle

tercih edilse de lezzet açısından rağbet görmemektedir. Bu nedenle propolis ekstraktları enkapsüle edilmiştir. Enkapsüle edilen sulu propolis ekstraktları SEM ile görüntülenmiştir. Enkapsüle edilen sulu propolis ekstraktları balda kullanılarak balın fonksiyonel özelliği arttırılmıştır. Ayrıca propolisin enkapsüle edilerek bala katılması sonucu yapılan hedonik testlerle propolisin istenmeyen tat ve koku özellikleri maskelenerek tüketimi kolaylaştırılmıştır. Enkapsüle edilmiş propolis-bal karışımının toplam fenolik kapasitesi, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. İnceleme sonucunda enkapsüle propolisin balın fenolik bileşen, antioksidan kapasitesi ve antimikrobiyal etkisine önemli bir katkı sağlamadığı tespit edilmiştir.

Bu çalışma ile propolisin fonksiyonel özelliklerinde en yüksek seviyede nasıl faydalanacağı tespit edilmiş ve farklı gıdalara katılarak fonksiyonel gıdalar kategorisine yeni birçok ürün katılmasına temel oluşturulmuştur. Ayrıca doğal gıda katkı maddesi olarak propolis ekstraktının kullanımının sadece gıda sektörüne değil kozmetik ve ilaç endüstrisinde de hammadde olarak kullanılması hedeflenmiştir.

Anahtar Kelimeler: FT-IR, Raman, HPLC, antioksidan aktivite, antimikrobiyal aktivite, enkapsülasyon.

ABSTRACT

Characterization of Propolis Extracts Obtained Using Different Solvents and Methods

Zeynep BAKKALOĞLU

Department of Food Engineering
Doctor of Philosophy Thesis

Advisor: Prof. Dr. Muhammet ARICI
Co-advisor: Assoc. Prof. Dr. Salih KARASU

Propolis, one of the bee products, is a very important functional product. Phenolic compounds are among the bioactive compounds that give propolis its functional properties. Therefore, extraction must be done effectively first. In the study, while extracting propolis, ethanol, DMSO (dimethylsulfoxide), propylene glycol (PG) and distilled water (DS) were used as solvents. By determining the optimum sample methods, both the classical solvent extraction method samples and the ultrasound assisted extraction method samples were characterized in FTIR and Raman spectroscopy.

The total phenolic ingredient content of the propolis samples obtained and the characterization of propolis phenolic substances was determined by HPLC method. DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrilhydrazyl) free radical scavenging assay was used in the determination of antioxidants, in the propolis. Antimicrobial properties of propolis, according to the findings, it was determined that the antifungal activity of propolis extracts was higher than its antibacterial activity. The highest phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity is ethanol, DMSO, PG and water in solvents, respectively. In terms of extraction efficiency, the samples used in ultrasound showed higher effects than unused samples.

Propolis's hedonic properties were obtained in the aqueous solvent of propolis were encapsulated. The encapsulated propolis were visualized using the SEM device. Hedonic properties, total phenolics content, antioxidant capacity and antimicrobial

activity were examined. Hedonic properties were determined using honey and the honey mixture with encapsulated propolis was generally accepted. However, the honey mixes with encapsulated propolis do not have important antimicrobial effects.

When all considering these data; it contributes to determination of the chemical components of propolis in Turkey. Propolis was encapsulated and used in foodstuffs for human consumption, providing raw materials suitable for the pharmaceutical and cosmetics industry, and natural additive production.

Keywords: FT-IR, Raman, HPLC, antioxidant activity, antimicrobial activity, encapsulation.

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

1.1.1 Propolisin Tanımı ve Önemi

Propolis, bal arılarının (*Apis mellifera L.*), ağaçlar ve bitkilerdeki filiz, yaprak, tomurcuk ve kabuk çatlaklarından topladıkları reçineye tükürük enzimleri (β-glukozidaz) ekleyerek elde ettikleri kısmen sindirilmiş ve balmumu ile karıştırılmış bir arı ürünüdür [1–3]. Propolis, arılar tarafından yuva veya kovandaki delikleri kapatmak, iç duvarları düzleştirmek ve girişi davetsiz misafirlere karşı korumak için kullanılan yapıskan, elastik ve reçineli bir maddedir [4].

Çin ve Mısır kaynaklarına göre arıcılık ürünleri milattan önceki dönemlerde de kullanılmaktadır. Ancak bir arı ürünü olan propolis ilk kez Yunanlılar tarafından kullanılmış olup, adını "Pro" ön, giriş; "polis" şehir anlamına gelen iki kelimenin birleşmesinden almaktadır. Bütün anlamı ile ise "şehrin girişi" anlamını ifade eden propolis kelimesi arıcılık için "kovanın girişi" manasını taşımaktadır [1]. Yunan yazıtlarında yer alan bilgilere göre propolis diş çürüklerinin tedavisi ve iltihaplı yaraların iyileşmesinde antibiyotik olarak kullanılmıştır. Roma döneminde ise yara iyileşmeleri için hazırlanan lapaması karışımın içerisinde yer almaktadır. Günümüzde sağladığı faydaların önem kazanmasıyla propolis birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır.

Propolislerin bitkisel kaynağı arıların seçimlerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Ağaç türlerinden kavak (*Populus spp.*), huş ağacı (*Betula spp.*), kayın (*Fagus sylvatica*), kestane (*Aesculus hippocastanum*) ve söğüt (*Salix spp.*) arılar tarafından daha çok tercih edilmektedir. Bu tercihler propolisin oluşumunda yer alan bileşenlerin ana kaynağını oluşturmaktadır [5]. Propolisin fitokimyasal bileşimi ağaç türlerine göre değişiklik gösterse de propolisin rengi ve bileşiminde asıl etken coğrafi kökendir.

Dünyanın her yerinde propolislerin rengi koyu kahverengiden kırmızımsı

kahverengiye ve sarıdan yeşilimsi bir renge kadar farklı tonda bulunmaktadır [6]. Bazı türleri kokusuz olmakla birlikte, türden türe değişebilen tipik bir kokuya sahip olabilmektedir. Propolis 10 °C altında sert ve kırılgan yapıda olup, 10 °C üzerindeki sıcaklıklarda elastik ve yapışkan bir hal almaktadır. 80 °C'de ise kısmen eriyen propolisin yanma noktası 100 °C'ye kadar çıkabilmektedir [7–9]. Ancak yüksek sıcaklıklar propolisin kimyasal içeriğini olumsuz olarak etkilemektedir [10].

Propolisin kimyasal içeriğinin temel kaynağı bitkiler, bal arısı metabolizmasından salgılanan maddeler ve propolis oluşumu sırasında ortaya çıkan bileşenler tarafından oluşturulmaktadır [11]. Ham propolis farklı yapı içermekte olup karışık bir kompozisyona sahiptir [12]. Propolisin genel bileşiminde, bitki reçinesi (% 50), balmumu (% 30), uçucu yağlar (% 10) ve polen (% 5) ve diğer bileşenler (% 5) yer almaktadır [13]. Diğer bileşenler vitamin (B1, B2, B3 ve B6), mineral, benzoik asit, yağ asitleri, ketonlar, laktonlar, kinonlar, steroidler, şekerler ve doğal pigmentler (klorofil ve karotenoidler) gibi diğer bileşiklerden oluşmaktadır [14, 15].

Propolisin kimyasal bileşik grupları arasında flavanoidler, hidroksiflavononlar, hidroksiflavonlar, kalkonlar, benzoik asit ve türevleri, asitler, esterler, benzaldehit türevleri, sinamil ve sinamik asit ile türevler, alkoller, ketonlar, fenoller, heteroaromatik bileşikler, terpen ve sekuterpen ve türevleri, alifatik hidrokarbonlar, sekuterpen ve triterpen, hidrokarbonlar, steroller ve steroid hidrokarbonlar, mineraller, şeker ve aminoasitler yer almaktadır [16, 17]. Fenolik bileşikler ise çoğu zaman ana bileşenler olarak karşımıza çıkar [18, 19]. Bu bileşiklerin bazıları (flavonoidler, terpenoidler, aromatik asitler ve bunların esterleri) biyolojik aktivitelerden sorumludur [20, 21].

Propolis ve özellikle ekstraktları antibakteriyel [22], antiviral, antifungal, antioksidan [23], antienflamatuar [24], antikanserojen [25], anti-alerjik, anti-diyabetik [26], sitostatik, hepatoprotektif etki, fotoprotektif etki, bağışıklık kazandırıcı ve uyuşturma gibi geniş biyolojik aktiviteleri nedeniyle çeşitli hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için uzun zamandır kullanılmaktadır [27, 28].

Birçok tedavide kullanılan propolisin antibiyotik, antifungal, antiviral ve antitümör özelliğine sahip olabileceğini gösteren önemli bir veritabanı vardır. Buna karşılık propolisin alerjenite ve toksisitesi hakkında çok fazla çalışma yapılmamıştır. Yapılan az sayıdaki çalışmaya göre propolis nispeten toksik değildir. Bu noktada propolisin toksisitesini etkileyen en önemli özellik ise çözücüdür. Kullanılan çözücülerin insan sağlığını tehdit etmeyen ve en yüksek faydanın alınmasını sağlayacak yaklaşımla seçilmesi gerekmektedir.

Propolisin içeriğindeki kıymetli bileşenlerin insan sağlığı için en etkin şekilde

propolisten ekstrakte edilebilmesi diğer önemli bir husustur. Ekstraksiyon yöntemlerinin seçilirken bileşenlere zarar vermeden en yüksek konsantrasyonda elde edilmesi istenir. Bu nedenle propolisin en faydalı şekilde işlenebilmesi için propolis ekstraksiyonunda kullanılacak çözücüler ve ekstraksiyon yöntemleri önem arz etmektedir.

1.1.2 Propolisin Kullanım Alanları

Propolis kovanlarda kapak ve kovan çerçeveleri gibi alanlarda yoğun olarak bulunmaktadır. Bir kovan için sezonda 250 - 400 g saf propolis elde edilmektedir. Dünya ise toplam ticari propolis üretimi yılda 100 ila 200 ton arasında değişmektedir. Pazara bakıldığında Çin diğer ülkelere göre daha fazla propolis üretmektedir. Çin'i Güney Amerika ülkeleri izlerken ithalatın çoğu Avrupa ülkeleri tarafından gerçekleştirilmektedir [29]. Türkiye'deki yıllık toplam propolis üretim miktarı hakkında kesin bir bilgi bulunmamaktadır. Ancak ülkemizdeki 2017 yılına ait kovan sayısı göz önüne alındığında yıllık toplam propolis üretim miktarı 2 bin 397-3 bin 995 ton arasında farklılık göstermektedir [30].

Üretimi yapılan propolisler kovandan toplandığı haliyle hamdır ve endüstride çeşitli saflaştırma işlemlerinden geçirilerek kullanılması daha uygundur. Bu nedenle marketlerde propolis ekstraktlar ve çeşitli karışımlar şeklinde bulunmaktadır. Propolis endüstride saf hale getirildikten sonra tıp, ilaç, kozmetik ve gıda gibi farklı sektörlere katkı sağlamaktadır.

1.1.2.1 Tıp ve İlaç Endüstrisinde Kullanımı

Dünyadaki birçok bölgede halk ilaçlarında da kullanılan propolis, son yıllarda propolis ekstraktları içeren katkı maddelerinin yiyecek ve içeceklerde kullanılmasıyla piyasada karşımıza çıkmaktadır [31]. Önceleri endüstri tarafından standardizasyonu sağlanamadığı için ilaç firmaları tarafından tercih edilmezken son dönemde doğal ilaçlara yönelimin artmasıyla tercih edilirliği artmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu propolisin ve ekstraktlarının içerdikleri farklı bileşenlerden dolayı antibakteriyel, antifungal, antiviral, antioksidan, antikanserojen, anti-alerjik, anti-diyabetik, antienflamatuar, sitostatik, hepatoprotektif etki, fotoprotektif etki, bağışıklık kazandırıcı ve uyuşturma gibi geniş bir etki spektrumu vardır.

Propolisin göstermiş olduğu yararlı etkiler sayesinde ilaç olarak kullanımı yaygınlaşmıştır [27, 28]. Özellikle kardiovasküler sistem, dolaşım sistemi, bağışıklık sistemi, sindirim sistemi, solunum yolları enfeksiyonları, deri hastalıkları ve yanıklar, mukoz zar enfeksiyonları ve lezyonları, çeşitli kanser hastalıklarının (cilt, kolon,

akciğer, karaciğer) tedavisinde kullanılır [32]. Antiviral etkisi sonucu uçuk ve grip gibi hastalıkların etmeni olan virüslerde etkilidirler [33].

Propolis diş çürüğüne yol açan mikroorganizmaların gelişimini engellemektedir. Diş hekimliğinde, diş macunlarının ve gargaraların içine katılarak ağız ve diş bakımının iyileştirilmesine katkıda bulunur.Ayrıca deri hastalıklarının tedavisi ile ilgili çeşitli araştırmalarda olumlu sonuçlara rastlanmıştır [34, 35]. Propolis çeşitli karışımlarla kullanılarak çözelti, tablet, kapsül, granül, pastil ve sakız formunda tüketilebilmektedir [11, 36, 37].

1.1.2.2 Gıda Endüstrisinde Kullanımı

Propolisin gıda endüstrisinde kullanımı ile ilgili son yıllarda daha fazla araştırma yapılmaya başlanmış ve elde edilen sonuçlar endüstride kullanılmaya başlanmıştır. Araştırmalarda propolisin en çok antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinden faydalanılmaktadır. Bu sayede propolisin gıdaların muhafazasında ve raf ömrünün uzamasında yardımcı olması planlanmaktadır. Gıda koruyucusu olarak gıdalara katılan propolisin: gıdanın doğal bozulmasını kontrol etmek ve patojenik olanlar da dahil olmak üzere mikroorganizmalar tarafından kontaminasyonu ve gelişimini önlemek gibi iki açıdan etki etmesi beklenir [38].

Öte yandan, propolisin sahip olduğu antioksidan kapasitesi depolama sırasında gıda maddelerinde en sık görülen oksidasyon türleri olan lipit peroksidasyonunu ve ransiditeyi önleyerek raf ömrünü uzatmak ve çürümeyi engellemek için kullanılır [39]. Propolis, antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri ve düşük toksisiteyi olumlu bir şekilde bir araya getirmektedir. Bu muhteşem kombinasyon, onu farklı yiyecekleri korumak için mükemmel bir katkı maddesi olmasını sağlamaktadır

Propolis ekstraktlarının çok sayıda ürünün muhafazasında kullanımı ile ilgili başarılı çalışmalar yapılmıştır. Şimdilik meyve suları [40–43], meyveler [44–50], sebzeler [50–56], yumurtalar [29, 57–61], et ve balık ürünleri [62–69] üzerine yapılan bu çalışmaların kapsamı hızla büyümektedir. Bu çalışmalara ek olarak, propolisin uygun bir kimyasal çözücü ile ekstraksiyonu propolisin karakterizasyonu ve standardizasyonu için oldukça önemlidir. Bu nedenle, propolisin bir gıda koruyucu katkısı olarak büyük ölçekli ticari kullanımı henüz gerçekleşmemiştir.

1.1.3 Propolisin Tüketimi

Yapısındaki flavonoidler ve fenolik bileşenler nedeniyle antikansorejen, antiinflamatuar, antioksidan, immünmodulatör, antimikrobiyal etkileri gibi birçok

biyoaktif özelliğe sahip olan propolisin, son zamanlarda tüketimi artmıştır. Özellikle propolisin içeriğindeki bileşenlerden kuersetin, kafeik asit, ve krisin gibi etken maddelerinin in vivo şekilde incelenmesiyle günlük tüketimi için farklı değerler ortaya çıkmıştır.

Propolisin etanollü ekstraktının kullanıldığı bir çalışmada 10 mg / kg dozun enjeksiyon şeklinde uygulanması ile kanser hastalarındaki tümör gelişiminin yavaşladığı görülmüştür [70].

Propolisin sulu ekstraktının oral yolla alındığı çalışmada tümör taşıyan fareler kullanılmıştır. Sulu propolis, farelere 10 gün boyunca her gün 5 kere olmak üzere 320 mg / kg (10 mg / fare vücut ağırlığı) veya 960 mg / kg (30 mg / fare vücut ağırlığı) olmak üzere tükettirilmiştir. 10 gün sonra tüm farelerde tümörlerin büyümesi önemli ölçüde inhibe ettiği görülmüştür ($p < 0.05$) [71].

Ultrases teknolojisi kullanılarak elde edilen etanollü propolis ekstraktlarının 50 ve 100 mg / kg olarak kullanılması 16 hafta sonunda farelerde tümör gelişimini önlemiştir [72].

Propolisin insanlar üzerinde incelemek isteyen bir çalışmada bir ay boyunca sağlıklı kişilere suda ekstrakte edilmiş toz şeklindeki propolis ekstratı (0,65 gr propolis içeren) verilerek vücudun serbest radikallere karşı üretmiş olduğu süperoksit dismutaz ile total kolesterol, düşük ve yüksek yoğunluklu lipoprotein, ürik asit, glikoz, ferritin, transferrin, plazma malondialddehit, rutin kırmızı kan hücresi seviyesi gibi parametreler değerlendirilmiştir. Propolisin günlük olarak alınışında cinsiyete göre farklı etkiler gösterdiği görülmüştür. Çalışmada on beş gün sonrasında erkeklerde lipid peroksidasyonu son ürünü olan malondialdehit konsantrasyonunun düştüğü ve kadınlarda ise 30 gün sonrasında hücrede serbest radikallere karşı temel savunma hattını oluşturan süperoksidaz dismutaz enzim aktivesinde artış görüldüğü bildirilmektedir. Bunun dışında, uygulanan propolisin kan değerlerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı belirtilmiştir [73].

Propolis tüketiminin kronik ve akut toksisitesiyle ilişkili yapılan çalışmaları yetersizdir. Ancak yapılan çalışmalar derlendiğinde propolis tüketiminde 0,02 g ve 5 mg/kg vücut ağırlığı günlük dozun deneyde kullanılan farelerde toksik ölüme sebep olmadığı, insanlar için toksik etki oluşturmayan güvenilir dozun 1.4 mg/kg vücut ağırlığı olduğu bildirilmiştir [74].

Propolisin tüketimi ile ilgili yapılan çalışmaların sayısı sağlıklı veya hasta gönüllü bulunamaması nedeniyle fazla değildir. Ancak yapılan çalışmalara göz atıldığında elde edilen sonuçlar propolisin günlük tüketiminin vücut ağırlığına göre değerlendirilmesi

gerektiğini göstermektedir. Fazla tüketildiğinde oluşacak sonuçlar için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

1.1.4 Propolis Ekstraksiyonu

Kovandan elde edilen ham haldeki propolis tüketim için uygun değildir. Bu nedenle ilk olarak çeşitli çözücülerle ekstraksiyon işlemine tabi tutulmalıdır. Ancak ekstraksiyon işlemi ile propolisin içeriğindeki birçok madde uzaklaştırılırken, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesinin etkinliği arttıran fenolik bileşenler korunmalıdır [75]. Bu nedenle kullanılan çözücü seçimi ekstraktın özelliklerinin belirlenmesinde etkilidir [76].

Propolis ekstraksiyonunda çözücü tercih edilirken dikkat edilecek en önemli nokta propolisin hangi ürüne işleneceğidir. Ekstraktların işleneceği son ürün sağlık ve gıda sektöründe ise insan sağlığı için risk içermeyen gliserol ve su gibi çözücülerden faydalanılmaktadır.

Çözücülerin insan sağlığını tehdit etmesinin dışında, endüstride kullanımı sırasında ekstraksiyon hızına etkisi diğer önemli parametrelerden biridir [77, 78]. Ekstraksiyon hızını tek başına çözücünün çeşidine bağlı değildir. Bunun dışında sıcaklık, ekstraksiyon öncesi katı fazın hazırlanması, difüzyon hızı ve katı materyalin nemi ekstraksiyon hızına etki eden diğer faktörlerdir [79].

Propolis ekstraksiyonunda farklı çözücülerin kullanımı ekstraksiyon metodları farklı yapıda ve farklı miktarlarda bileşen çözeceği için propolisin ekstraktlarının nicel ve nitel içerikleri farklı olacaktır. Ortaya çıkan bu farklılıklar propolisin fenolik madde içeriği, antioksidan kapasitesi ve antimikrobiyal aktivitesi gibi özellikleri üzerinde etkili olmaktadır.

Propolis ekstraksiyonu için etanol, su [80, 81], metanol [3, 82], metilen klorür [3], diklorometan [13], hegzan [83], etil asetat, aseton [81], zeytinyağı [84], β-siklodekstrin [84], dimetilsülfoksit [85], propilen glikol [86], gliserol [76] ve kloroform gibi çözücüler kullanılmaktadır. Ayrıca çözücü bileşenler arasında yapılan farklı orandaki birleşmelerle (metanol-metilen klorür, metanol-su) çözücülerin ekstraksiyon etkinliği ve hızı arttırılmaktadır [3].

Propolislerin ekstraksiyonunda birçok çözücü kullanılsa da mevzuatta sadece su, etanol, zeytinyağı, propilen glikol ve gliserol (gliserin) yer almaktadır. Bu nedenle tüketiciye sunulacak propolis ekstraktlarında farklı çözücüler kullanılması istenirse, insan sağlığına uygun olup olmadığı test edilerek ilgili ve yeterli çalışmaların yapılmalıdır.

1.1.5 Propolis Ekstraksiyonunda Kullanılan Çözücüler

1.1.5.1 Etanol

Propolisin ekstrakte edilmesinde daha büyük dipol momente sahip olması nedeniyle en çok kullanılan çözücü etanoldür [3, 4, 6, 15, 31, 84, 87–89]. Kimyasal formülü C_2H_5OH olan etanol suda tamamen çözülebildiği için ekstraksiyon aşamasında tek başına kullanılabildiği gibi etanol/su gibi farklı karışım oranlarıyla da kullanılmaktadır [80, 84]. Erime noktası $-114\,^{\circ}C$ ($158.8\,^{\circ}K$) olan etanolün, kaynama noktası $78.4\,^{\circ}C$ ($351.6\,^{\circ}K$) olup oda sıcaklığında sıvı halde bulunmaktadır.

Etanol daha fazla biyoaktif maddeyi çözebildiği için propolis ekstraksiyonunda kullanılan en basit ve etkili yöntemdir. Ancak propolisin kendine has kokusu ile birleşen alkol kokusu sonucunda, kozmetik, gıda ve ilaç sektöründe kullanımı kısıtlanmaktadır. Propolisin etanollü ekstraktı; göz rahatsızlıkları, kulak, burun ve boğaz iltihapları ve pediatri gibi çeşitli hastalıkların tedavisi için uygun değildir. Etanol, propilen glikol ve gliserinde alkol türevi çözücülerdir. Alkollü ekstraktlar, alkolün hem insan sağlığına zararlı olması (tahriş edici, mutajenik ve karsinojenik) hem de tüketicilerin dini hassasiyetlerinden dolayı tercih edilmemektedir. Alkol intoleransı ve dini açıdan hassasiyeti bulunan tüketicilerde göz önüne alındığında alkol bazlı olmayan etkili bir ekstraksiyon tekniğine ihtiyaç duyulmaktadır.

1.1.5.2 Dimetilsülfoksid

Dimetil sülfoksit (DMSO) renksiz ve sıvı halde bulunan bir organokükürt bileşiğidir. Kimyasal formülü $(CH_3)_2SO$ olan DMSO, bir polar çözücüdür. Erime noktası $18.5\,^{\circ}C$ ($65.3\,^{\circ}F$) olan DMSO'nun, kaynama noktası $189\,^{\circ}C$ ($372\,^{\circ}F$) olup oda sıcaklığında sıvı halde bulunmaktadır. İnsan cildi tarafından kolayca emilirken, oral yolla tüketildiğinde ağızda sarımsak gibi bir tat bırakır. Az toksik bir yapıya sahip olup günümüzde propolis ekstraksiyonunda etil alkole ikame olarak dimetilsülfoksit düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalara göre etanole en yakın biyoaktif bileşen çözünürlüğü dimetilsülfoksite aittir. Ancak mevzuatta yer almaması ve dimetilsülfoksitli propolis ekstraktlarının sahip olduğu yan etkilerin (cilt, solunum yolları ve gözlerde tahriş) ve gıda ile alımlarındaki etkilerinin belirlenmemesi kullanımını kısıtlamaktadır.

1.1.5.3 Propilen glikol

Sentetik organik bileşik olan propilen glikol (PG), propan-1,2-diol olarak da adlandırılmaktadır. $C_3H_8O_2$ kimyasal formülüne sahip kokusuz bir bileşendir. Tadı hafif tatlı olup viskoz renksiz bir sıvıdır. Kaynama noktası $188.2\,^{\circ}C$ ve erime noktası

−59 °C'dir. Kimyasal olarak diol sınıfında bulunan propilen glikol; su, aseton ve kloroform gibi birçok solvent ile karışabilir. Aroma, esans verici ve antimikrobiyal özelliği bulunan propilen glikol ilaç, kozmetik ve gıda sanayinde özellikle unlu mamullerde yaygın olarak kullanılmaktadır.

1.1.5.4 Distile su

Mevzuatta yer alan çözücülerden suyun (H_2O), kaynama noktası: 100 °C ve erime noktası: 0 °C'dir. Yeterli ve etkin bir şekilde propolis içerisindeki biyoaktif bileşenleri çözemediği için tercih edilmemektedir. Bu nedenle su ile yapılan ekstraksiyonun etkinliğinin arttırılması için ultrases gibi farklı yöntemlerden faydalanılmaktadır. Su diğer çözücülerinin aksine yan etkisinin olmaması nedeniyle suda çözündürülmüş propolisler tüketiciler açısından daha çok tercih edilmektedir.

1.1.6 Propolis Ekstraksiyonunda Kullanılan Yöntemler

Bitkisel kaynaklardan çeşitli maddelerin elde edilmesinde farklı ekstraksiyon metotları kullanılmaktadır. Propoliste klasik çözücü ekstraksiyonu metodunun yanı sıra ultrases destekli, mikrodalga destekli ve süperkritik akışkan metodu gibi farklı yöntemler denenmiştir. Klasik çözücü ekstraksiyon metodu fazla zaman kaybına yol açtığı ve yüksek miktarlarda çözücü gerektirdiğinden dolayı tercih edilmemektedir. Ayrıca pratik bir metot olmayışı, çözücünün düşük seçiciliğe ve verime sahip olması diğer dezavantajlarındandır. Klasik çözücü ekstraksiyonda kullanılan çözücünün çevreye zararlı etkilerinin bulunması nedeni ile yeni ekstraksiyon tekniklerine ilgi giderek artmaktadır [90].

Mikrodalga destekli ekstraksiyonda gıda proseslerinde ekstraksiyon süresini ve çözücü kullanımını azalttığı için tercih edilmektedir. Dolayısıyla düşük maliyet sağlayarak ekstraksiyon veriminin arttırmaktadır. Ancak kullanılan çözücünün apolar ya da uçucu olması mikrodalganın etkinliğini azaltmaktadır. Bu nedenle mikrodalga uygulaması $110 - 150$ °C gibi yüksek sıcaklıklarda yapılarak etkinliğin arttırılması sağlanır. Ancak uygulanan yüksek sıcaklıklar sonucu ürün çeşitli bileşenler denatürasyona uğramaktadır [91]. Ayrıca ön işlem olarak katı kısmın ayrılması için ek olarak filtreleme veya santrifüjleme işlemi gerektirmektedir. Bu sebeplerden dolayı mikrodalga destekli ekstraksiyon kısıtlı olarak kullanılmaktadır.

Bir madde sahip olduğu kritik sıcaklık ve basınç değerinin üzerine getirilmesi tekniğine dayanan süper kritik akışkan ekstraksiyon metodu süper kritik akışkanların gaz ve sıvının özelliklerini taşıması sonucu ekstraksiyon sırasında maddelerin seçici olarak ekstrakte edilmesini sağlamaktadır [92]. Karbondioksit, etan, etilen, nitrozooksit,

triflormetan, klortriflor metan, propan, propilen, amonyak ve hekzan gibi geniş bir süper kritik akışkan spekrturumu vardır [93, 94]. Ancak yapılan çalışmalarda süper kritik ekstraksiyonun (CO_2 ekstraksiyonu) tek başına kullanılması ile süper kritik ekstraksiyon kullanılırken etanolün yardımcı çözücü olarak kullanılması kıyaslandığında etanolün yardımcı çözücü olarak kullanılması ekstraksiyon verimini üç katına çıkardığı tespit edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda propolis ekstrakte edilirken süper kritik ekstraksiyonun tek başına kullanılmasının yeterli olmadığı sonucuna varılmaktadır [95].

Propolis ekstraksiyonunda ultrases destekli ekstraksiyon çalışmalara son dönemde sıkça rastlanılmaktadır [13, 15, 88]. Propolisin içerdiği fonksiyonel bileşenler için yapılan bir çalışmada ultrases destekli ekstraksiyonun; klasik çözücü ve mikrodalga destekli ekstraksiyonla kıyaslandığında ekstraksiyon zamanı, verimliliği ve iş gücü açısından daha etkin bir yöntem olduğu tespit edilmiştir [31]. Bu nedenle çalışmada ultrases destekli ekstraksiyon metodunun kullanımı tercih edilmiştir.

1.1.6.1 Klasik Çözücü Ekstraksiyon Metodu

Gıda endüstrisinde klasik çözücü ekstraksiyonunun kullanımı oldukça yaygındır. Özellikle meyve sebze işlemede sıklıkla kullanılmaktadır. Ekstraksiyon işlemi, katı veya sıvı fazdaki bileşenlerin, farklı çözünürlük özelliklerinden faydalanılarak sıvı faza alınması işlemi olarak tanımlanmaktadır. Sıvı-sıvı ve katı-sıvı şeklinde iki farklı ekstraksiyon oluşturulmaktadır.

Katı-sıvı ekstraksiyonunda amaç öğütülerek yüzey alanı arttırılmış katı numunenin sıvı çözücü yardımı ile muamelesi sonucu katı matriksteki bileşenlerin sıvı çözücüye geçmesini sağlamaktır. Katı-sıvı ekstraksiyonunun endüstriyel uygulamalarında zaman kaybını önlemek için ekstraksiyon hızını etkileyen faktörler gözden geçirilmelidir. Ekstraksiyondan önce katı fazın hazır hale getirilmesi, uygun çözücünün seçilmesi, uygulanacak sıcaklığın belirlenmesi ve katı materyalin neminin ölçülmesi ekstraksiyon işleminin daha hızlı gerçekleşmesini sağlayacaktır [79].

Katı sıvı ekstraksiyonlarında çözücü seçimi ekstraksiyon aşamasında hıza etki eden en önemli parametrelerden biridir. Ekstraksiyon işlemi için tercih edilecek çözücünün istenilen bileşenleri çözebilir yapıya sahip olması gerekmektedir. Çözücü ekstraksiyon sonrasında, ekstrakte edilmesi istenen katı numuneden ve ekstrakta çözünen bileşenlerden kolayca ayrılabilme özelliğini taşımalıdır. Bu nedenle kaynama noktası düşük çözücüler daha çok tercih edilmektedir.

Dipol momenti yüksek olan çözücüler ekstraksiyon sırasında daha hızlı ısınır. Örneğin

polar olmayan bir çözücü olan hekzan (dipol moment < 0.1) mikrodalga veya yüksek ekstraksiyon sıcaklıklarında ısınmayacak ve bileşenlere zarar vermeyecektir. Ancak dipol momenti yüksek çözücü kullanılması ekstraksiyon etkinliğinin arttırılması için gerekli ise bu durumda polar polmayan çözücünün polar çözücü ile karıştırılarak kullanılması önerilmektedir [77, 78].

Katı-sıvı ekstraksiyonu bitkisel kaynaklardan antioksidan ve fenolik madde ekstraksiyonlarında da uzun yıllardır uygulanan yöntemlerden biridir. Bu amaçla en sık kullanılan çözücüler dipol momentlerine göre; asetonitril> metanol> aseton> etil asetat> distile su> etil alkol> hekzan olarak sıralanabilmektedir.

Katı-sıvı ekstraksiyonlarında uygulanan sıcaklık hem katı örneğe hem de çözücünün türüne göre değişmektedir. Ekstraksiyon işlemi sırasında uygulanan yüksek sıcaklıklar çözücünün etkinliğini arttırarak katı maddeye daha iyi nüfuz etmesini sağlar. Böylelikle katı madde içerisinde bulunan çözünmesi istenen bileşenlerin çözücüye geçişi hızlanır. Ekstrakte edilecek katı maddenin yapısına bağlı olarak sıcaklıkla birlikte ekstraksiyon veriminde artış gözlenirken, çok yüksek sıcaklıklarda bazı bileşenlerin yapısında denatürasyonlar yaşanabilmektedir.

Klasik çözücü ekstraksiyon yöntemleri en sık kullanılan yöntemler olsa da günümüzde eğilim ekstraksiyon süresini ve çözücü tüketimini azaltan, çevreci enstrümantal yöntemlerine doğru değişmektedir.

1.1.6.2 Ultrases Destekli Ekstraksiyon Metodu

Ultrases destekli ekstraksiyon ses dalgaları yardımı ile sıvı-sıvı ve katı-sıvı ekstraksiyonlarda etkiniği arttırmak için kullanılan bir yöntemdir [78]. Bu yöntemde örnek, insanların ses dalgalarını duyamayacağı düzeyde yani 20 kHz üstündeki frekanslardaki titreşimlere maruz bırakılır. Ultrases cihazlarının çalışma prensibi gelen alternatif akımı bir dönüştürücü yardımı ile mekanik titreşimlere dönüştürmesinden gelmektedir. Bu mekanik titreşimler içinden geçtiği sıvıda kavitasyon adı verilen boşluklar oluşturmaktadır. Oluşan boşluklar katı parçacıkları titreştirerek parçalanmasını sağlamaktadır. Böylelikle sıvı ile katı arasındaki temas eden yüzey alanı genişletilerek ekstraksiyon etkinliği arttırılmaktadır [84].

Ultrases destekli etkin bir ekstraksiyon verimi sağlamak için üç mekanizma bulunmaktadır [96]. Bunlardan ilki katı maddenin yüzey kısmındaki simetrik olmayan kabarcıkların çökmesi ile geçirgenliğin arttırılması sonucu hücre duvarının mekanik parçalanmasıdır. İkincisi, iç kısımdaki kabarcıkların patlaması ile o bölgede üniform ısı ve basınç artışı sonucu çözünen içerisine çözücü penetrasyonudur. Sonuncu ise

ultrasesin ürettiği şok dalgalarının bir sonucu olarak difüzyon oluşmasıdır.

Ultrases sistemlerinde jeneratör, dönüştürücü ve dağıtıcı olmak üzere üç temel birim bulunmaktadır. Jeneratör aldığı elektrik enerjisini yüksek frekanslı alternatif akıma çevirerek dönüştürücüye iletir. Dönüştürücü ise yüksek frekanslı alternatif akımı mekanik titreşimlere çevirerek dağıtıcıya gönderir. Dağıtıcı titreşimleri sıvı ortama göndererek kavitasyonu sağlar [97].

Ultrason destekli ekstraksiyon ultrasonik banyo (indirekt) ve proplu ultrason (direkt) olmak üzere iki farklı şekilde yapılmaktadır [79]. Ultrasonik banyolar paslanmaz çelik tanklardır ve çoğu zaman büyük hacimlerdeki sıvı-sıvı veya katı-sıvı örneklerde kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemde uygulama esnasında ortaya çıkan titreşimler örneğin ısınmasına neden olmaktadır. Proplu ultrason yönteminde ise prop direk olarak katı-sıvı karışım içerisine daldırılarak kullanılır. Yöntem küçük hacimli çalışmalarda fazla güç kullanımı gerektirmesine rağmen cihazın küçük ve taşınabilir boyutlarda olması laboratuvar ortamlarında kullanımını kolaylaştırmaktadır [98, 99].

Ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi birçok avantaja sahiptir. Ekipmanın ucuz olması, çözücü kullanımının az olması, kullanım kolaylığı, çevre dostu olması ve yüksek ekstraksiyon etkinliği yanında hızlı olması sanayide tercih sebebidir [100–102]. Buna rağmen ultrases destekli ekstraksiyonda kavitasyon sonucu oluşan ısı ile ekstrakte edilen örnekteki bileşenler üzerinde olumsuz etki göstermektedir [103, 104].

Gıdalarda antioksidan ve biyoaktif bileşen ekstraksiyon işleminin yanı sıra oksidasyonun hızlandırılmasında, enzim aktivitesinin inhibisyonunda, emülsiyon, kristalizasyon, fermantasyon, kurutma, dondurulmuş gıdalarda filtrasyon ve gaz çıkarma işlemlerinin yapılmasında kullanılır [105]. Ultrases uygulaması enzimatik ve mikrobiyal inaktivasyonun sağlanması için kullanılmaktadır [106]. Tek başına ultrases teknolojisi, yiyeceklerdeki bakterilerin öldürülmesinde etkili değildir; ancak basınçla veya ısıl işlem ile birleştirilmiş ultrases kullanımı daha etkili olmaktadır. Ultrases gıda endüstrisi tarafından gıdalardaki metal, cam veya ahşap parçaları gibi kirletici maddelerin saptanması, borulardan akış hızlarının ölçülmesi, gıda bileşiminin belirlenmesi ve dağınık sistemlerde parçacık boyutu dağılımının ölçülmesi gibi aşamalarda başarıyla kullanılmaktadır. [107].

Ultrases teknolojisi kullanılan biyoaktif madde ekstraksiyonu ile ilgili yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. *Hormosira banksii* alglerinin yüzey yanıt yöntemi (RSM) ile ultrases destekli antioksidan ve fenolik bileşen ekstraksiyonu optimizasyonunun gerçekleştiği çalışmada; zaman, ultrases gücü ve sıcaklık bağımsız değişkenler olarak belirlenmiştir. % 50 etanol konsantrasyonu, 30 dakika ekstraksiyon süresi, 60 °C

sıcaklık, 150 W ultrases gücü (% 60) *Hormosira banksii* algleri için optimum antioksidan ve fenolik bileşen ekstraksiyon koşulu olarak saptanmıştır [108].

Bir başka çalışmada zeytin yaprağının yüzey yanıt yöntemi ile ultrason destekli ekstraksiyonu sonucu antioksidan ve fenolik bileşen içeriği incelenmiştir [109]. Sıcaklık, etanol konsantrasyonu ve ultrases gücünün farklı sürelerde ekstraksiyon verimi üzerine etkileri incelenmiş ve :% 51 etanol; 65 °C'de 15 dakika optimum koşullar olarak uygulanmıştır. Optimum şartlar altında ekstraksiyon süresinin diğer ekstraksiyon yöntemlerine kıyasla önemli ölçüde azaldığını göstermiştir.

Elma posasından fenolik bileşenlerin ekstrakte edildiği bir çalışmada ultrases destekli ekstraksiyon ile klasik çözücü ekstraksiyon yöntemi karşılaştırılmıştır [110]. Çalışmada ultrases destekli ekstraksiyonla % 20'den fazla verim elde edildiği tespit edilmiştir.

Nar kabuğundan biyoaktif bileşenleri elde etmek için yüzey yanıt yöntemi ile ultrases destekli ekstraksiyon (UDE) teknolojisinin kullanıldığı bir çalışma yapılmıştır [111]. Çalışmada bağımsız değişkenler; ultrases gücü ve ultrasese maruz kalma süresi olarak belirlenmiştir. Toplam fenolik bileşikler (TPC) ve antioksidan özelliklerinin en yüksek çıktığı optimum koşullar % 60 ultrases gücü ve 6.2 dakika ultrasese maruz kalma süresi olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu koşullarda üretilen ekstraktın *Aspergillus niger*'e karşı antifungal aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir.

Mercanköşk bitkisinin ultrases destekli ekstraksiyon ve katı-sıvı ekstraksiyonunun antioksidan kapasitesi üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada yüzey yanıt yöntemi kullanılmıştır [112]. Ultrases genliği (24.4–61.0 μm), sıcaklık ($15-35\,^{\circ}C$) ve süre (5–15 dak) bağımsız değişkenler olarak belirlenmiştir. Optimizasyon parametreleri 61 μm, 35 °C ve 15 dakika olarak gerçekleştirilen ekstraksiyonda toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite değerleri en yüksek seviyelerde tespit edilmiştir.

Ultraseste propolis ile ilgili çalışmalar incelendiğinde farklı coğrafi kökenlerden gelen kırmızı propolislerin flavonoid, fenolik bileşen, antioksidan aktivite ve sitotoksitite seviyeleri iki farklı ekstraksiyon yöntemi ile belirlenmiştir [113]. Sonuçlara göre biyoaktif bileşikler açısından zengin ekstraktlar elde etmek için ultrases teknolojisinin, özellikle ekstraktların elde edilmesi için gerekenden daha kısa sürede verim sağladığı ve böylece endüstriyel ölçekte üretimin mümkün olduğu kanıtlanmıştır.

Yapılan diğer bir çalışmada ise, Oroian ve arkadaşları tarafından üç farklı yöntem (maserasyon, ultrases ve mikrodalga ekstraksiyonu) kullanılarak propolisten biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunun etkileri karşılaştırılmıştır [114]. En uygun ekstraksiyon yönteminin seçimi, ekstraksiyon veriminin, toplam fenolik içeriğin,

flavonların, flavonolların, flavanon ve dihidroflavonol içeriğinin değerlendirilmesine dayanmaktadır. Çalışma ultrases ekstraksiyon yönteminin biyoaktif bileşiklerin propolisten ekstraksiyonu için mikrodalga ekstraksiyonu ve maserasyonundan daha iyi bir yöntem olduğunu kanıtlamıştır.

Cavalaro ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada propolisin ultrases destekli ekstraksiyonunda etanol konsantrasyonu, katı-çözücü oranı ve ekstraksiyon süresinin merkezi kompozit dizayn kullanılarak toplam fenolik içeriği ve antioksidan kapasitesi üzerine etkileri araştırılmıştır [115]. Çalışma sonucunda optimum ekstraksiyon koşullarının geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine kıyasla ekstraksiyon süresinde açısından avantaj sağladığı ve normalde balmumu ayırmak için uygulanan adımdan yararlanılmasına gerek kalmadığı tespit edilmiştir.

1.1.7 Propolis Karakterizasyonu

Genel olarak, propolisin kimyasal ve biyolojik aktivitelerini belirleme yöntemleri, propoliste çeşitli kimyasal bileşiklerin tanımlanması ve nicelleştirilmesinde çok yararlı olan UV [3, 5], TLC [116], GC ve HPLC gibi geleneksel teknikleri içermektedir [117]. Propolis malzemesinin yüksek performans taraması için kullanılan DART [116], NMR (H NMR, C NMR) , LCMS-MS, IR ve Raman [118] gibi spektroskopik teknikler daha hızlı ve daha basit diğer analitik yöntemlerdir [3].

Propolis karakterizasyonunda uçucu kimyasal bileşenlerin tespiti için uygun yöntemlerden biri de GC-MS'dir [3, 4, 13, 119]. Propolisin kimyasal bileşenlerinin spektroskopik yöntemlerle incelenmesi sırasında kullanılan yöntemler NMR [3, 6, 116], LCMS-MS [4, 89], FT-IR [3, 88, 117] ve Raman spektroskopisi [120] olarak karşımıza çıkmaktadır. Raman spektranın en önemli avantajı suyun spektrayı engellememesidir. Ayrıca, cam veya kuvartz hücreler kullanılabilir, infraredde olduğu gibi, sodyum klorür veya diğer atmosfere karşı kararsız pencerelerle çalışma zorunluluğu yoktur.

1.1.7.1 FT-IR Spektroskopisi

Spektrofotometrik yöntemlerden biri olan FT-IR spektrometreler ilk olarak 1960 yıllarda ticari amaçla kullanılmıştır. Günümüzde ilaç, tekstil, gıda, tıp, kimya ve seramik gibi sektörlerde kullanımı oldukça yaygındır. FT-IR teknolojisinin çalışma prensibi matematiksel Fourier dönüşümü yöntemi kullanılarak kızıl ötesi ışınların infrared yoğunluğuna karşı dalga sayısının ölçümüne dayanmaktadır. Elektromanyetik ışık dizisinin kızıl ötesi bölgesi 25000 cm^{-1} ile 10 cm^{-1} arasındadır [121].

FT-IR cihazı; ışın kaynağı, dedektör ve Michelson interferometre olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Interferometre sistemi ışın bölücü, sabit ayna ve hareketli aynaları içermesi sayesinde gelen ışın demeti iki ayrı yola yönlendirir. Işın bölücüden çıkan bir ışın demeti sabit aynaya yönlendirilirken diğer ışın demeti ise hareketli aynaya gönderilir. Yansıma sonucu ışınların geri dönüp biraraya gelmesi ile interferans paterni oluşur. İnterferometrenin iki kolu arasında oluşan ışınların aldığı yollar arasındaki optik yol farkının bir fonksiyonu olarak interferans sinyalleri dedektör tarafından üretilir ve ölçülür [122]. Kızılötesi ışını seçici şekilde olarak örnek tarafından absorblandığı zaman dedektöre ulaşan enerjideki dalgalanmalar gerçek zamanlı olarak sayısallaştırılır ve bir interferogram elde edilir. İnterferogram üzerinden elde edilen spektrum interferogramın frekans düzlemine geçirilerek fourier dönüşümü ile yorumlanır [123].

FT-IR teknolojisi ile katı, sıvı ve çözelti halinde bulunan örneklerin yapılarında bulunan fonksiyonel gruplar, aynı iki bileşenin varlığı, yapısal bağların durumu, bağlanma noktaları ve örnek yapısı (aromatik-alifatik) belirlenebilmektedir. Aynı zamanda FT-IR farklı organik (karbonhidrat, fosfolipit, aminoasit ve protein) ve inorganik numunelerin niteliksel ve niceliksel tayinlerinde sıkça tercih edilmektedir.

Gaz veya sıvı kromatografisi, kütle spektroskopisi ile kıyaslandığında FT-IR, diğer analitik yöntemlere göre daha başarılı olmuştur [124]. Tekniğin kullanımının kolay olması, çevreci bir test yöntemi sunması, sarf malzemelerin maliyetinde azalma sağlaması, hızlı ve doğru sonuçlar vermesi gibi avantajları bulunmaktadır. Bu avantajlarından dolayı FT-IR spektroskopisi gıda analizlerinde vazgeçilmez bir yöntem olmuştur. Süt ve süt ürünlerinde birçok çalışmada faydalanılan bu teknoloji sayesinde gıdalarda yapılan taklit ve tağşişin belirlenmesi de hızlanmıştır [125–131]. Ayrıca mikrobiyal testler için kullanılması sonucu olumlu sonuçlar alınmıştır [121].

1.1.7.2 Raman Spektroskopisi

Raman spektroskopisi, maddelerin yapısı veya özelliklerinin tespiti için kullanılan spektroskopik yöntemlerden biridir. Işık-madde etkileşiminden yararlanan bu tekniğin prensibi, bir ışık saçılması sonucu ışığın kızılötesi spektroskopisi tarafından emilmesine dayanmaktadır. Raman spektroskopisi, molekül içi ve moleküller arası titreşimlerle bir maddeyi tanımlamak için gerekli olan bilgiyi verir. Ayrıca gerçekleşen kimyasal reaksiyonlar, alt frekanslardaki modlar ve titreşimler, kristal ve moleküler yapı gibi konular hakkında fazladan bilgi alınmasına olanak sağlamaktadır [118].

Lazer ışını gaz, sıvı veya katı haldeki numune içerisindeki moleküller ile etkileşime girdiğinde, fotonların büyük bir çoğunluğu saçılarak madde ile etkileşen ışığın

enerjisine eşit hale gelir ve birlikte aynı enerjide saçılmaya başlarlar. Bu tür saçılmaya elastik saçılma, diğer adıyla Rayleigh saçılması adı verilmektedir [132]. Elastik saçılma dışında az sayıda ışık, farklı bir frekansta dağılarak elastik olmayan saçılma yapar. Bu etki 1930 yılında Nobel Fizik Ödülüne layık görülen Sir Chandrashekhara Venkata Raman tarafından keşfedildiği için Raman saçılması olarak adlandırılır. Raman etkisi oluştuğu zaman foton, molekülün titreşimsel ve rotasyonel enerjisi artırıyorsa Stokes hatları; molekül fotonun enerjisini artırıyorsa Antistokes hatları meydana gelmektedir. Anlık ve saçılan ışımalar arasındaki bu farklılıklar Raman kayması olarak adlandırılır [133].

Raman, ışın kaynağı ve dedektör olmak üzere iki ana kısımdan oluşmaktadır. Raman saçılmasının şiddeti az olduğu için uyarma kaynağından çıkan ışının şiddetli olması gerekir. Ayrıca spektrumun karışık bir hal almaması için kaynaktan çıkan ışın monokromatik olmalıdır. Bu nedenle en uygun ışın kaynağı tek dalga boyuna sahip lazer ışın kaynağıdır. Bu kaynaktan çıkan ışın polarize ediciye gönderilerek yarım dalga plakası ile birlikte bütün ışınların numunenin uyarılması için aynı doğrultuda hareket etmesi sağlanır. Spot büyüklüğü ayarlanan ışın genişletilerek numuneye gönderilir. Numune içinden geçen ışın filtreden geçirilerek radyasyon engellenir. Diğer frekanslar bir monokromatörden geçerek dedektöre gönderilir. Raman cihazı, örnek moleküllerinin titreşimsel profilinin oluşturulması ve bir araya geldiği moleküllerle etkileşimleri hakkında bilgi vermektedir. Bu bilgiler analiz cihazları ile yorumlanarak kolayca sonuç elde edilmektedir [134].

Raman tekniği; tıp, malzeme bilimi ve gıda analizlerinde geniş bir uygulama alanına sahiptir. Yüksek seçici özelliği, inorganik materyaller ve maddenin her hali için uygun olması, sıvı örneklerde analiz kolaylığı, örnek hazırlığı gereksiniminin azlığı, analiz süresinin kısa olması ve cam veya polimer ambalaj içerisinde örnek analizinin yapılması sağladığı avantajlardandır. Ayrıca Raman spektroskopi ile FTIR'da gerçekleştirilen tüm analizler yapılabilmektedir [135]. Vakumlu ortamda çalışma gerektirmeyen Raman cihazında spektrumlar, fiber optik kablolar ile alınabilmektedir.

Raman cihazının birçok avantajı olmasına rağmen yüksek enerjili ışınların uygulanması ile örnek ısınarak bozulabilmektedir. Alaşımlar ve metallerde kullanılamayan Raman cihazı örneğin kendisinden veya oluşan kirlilikler sonucu Raman spektrumunu gizleyebilmektedir. Diğer bir dezavantajı ise etkisinin düşük olması nedeni ile duyarlılığının az olmasıdır. Bu sebepten dolayı düşük konsantrasyonlardaki örnekler için spektrum almakta zorlanılmaktadır. Ayrıca Raman cihazı örneklerde yalnızca kalitatif analiz yapılmasına olanak tanımaktadır. Kantitatif analizler neredeyse yok denecek kadar azdır [132].

Gıda sektöründe yapılan tağşişlerin belirlenmesinde Raman cihazından faydalanılmaktadır. Ramanla bitkisel yağlara karıştırılan ucuz yağların tespiti [136], et çeşitlerinin ayrımı, duyusal özellikleri, yağ, protein, su ve lif dokusu [137–142] ve mikrobiyolojik bozulmasının [143] tespiti hakkında birçok çalışma gerçekleştirilmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır.

1.1.8 Propolisin Biyoaktif Özellikleri

1.1.8.1 Propoliste Toplam Fenolik Madde Tayini

Gıda bileşeni olarak fenolik bileşikler; tat ve koku oluşumundaki etkileri, renk oluşumu ve değişimine katılmaları, enzim inhibisyonuna neden olmaları, değişik gıdalarda saflık kontrol kriteri olmaları gibi birçok açıdan önem taşımaktadırlar. Propoliste bulunan fenolik bileşenler, antikanserojenik, antiviral gibi insan sağlığı için önemli birçok fonksiyonel özelliğin kaynağını oluşturmaktadır.

Fenolik bileşikler en az 8000 çeşidi bulunan geniş bir gruptur [144]. Her gıdanın olduğu gibi toplanan her propolisin kendine özgü bir fenolik bileşik profili bulunmaktadır. Propolisin sahip olduğu fenolik bileşenler, bir alt grubu olan flavonoid bileşenlerin miktarı hakkında bizlere ipucu verebilmektedir [6]. Çalışmalar incelendiğinde propolis kafeik asit, ferulik asit, kuersetin kaemferol, krisin, pinosembrin, p-kumarik asit, galanjin, sinnamik asit, ellajik asit rutin, mirisetin, genistein, apigenin ve galanjin [6, 80, 89, 145, 146] gibi önemli fenolik bileşenler içermektedir. Bu bileşenler tek tek analiz edilebildiği gibi toplam fenolik madde miktarı bir fenolik madde eşdeğeri olarak verilebilir.

Propolisin sahip olduğu toplam fenolik madde tayininde en yaygın kullanılan yöntem Folin-Ciocalteu yöntemidir [6, 15, 80, 117, 147, 148]. Standart olarak gallik asit kullanıldığı tayin yönteminde gallik asit kalibrasyon eğrisi doğrultusunda gallik asit cinsinden mg GAE/100 g kuru madde olarak sonuç elde edilmektedir. Bu yöntemin dışında ekstrakte edilen propolis örneklerinin fenolik içerikleri UV yöntemiyle de belirlenebilmektedir [88, 145].

1.1.8.2 Propoliste Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Fenolik Bileşen Tayini

Fenolik maddelerin karakterizasyonu HPLC yöntemiyle belirlenebilmektedir. 1960 yıllarda geliştirilen yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) günümüzün modern analitik cihazlarındandır. HPLC'nin çalışma prensibi hareketli ve sabit faz arasında ayrılmaya dayanmaktadır. Ayrılması istenen sıvı hareketli fazla birlikte sistem içerisinde taşınmaktadır. Sıvı içeriğine bağlı olarak sabit ve hareketli faz

arasında dağılma göstermekte ve ayrılma gözlenmektedir. Sistemde ayrılma işlemi adsorpsiyon kromatografisi, partisyon kromatografisi, iyon değiştirme kromatografisi ve jelfiltrasyon kromatografisi olmak üzere bu dört ilkeye göre yapılmaktadır.

Genel olarak HPLC cihazı temelde pompa, enjeksiyon bloğu, HPLC kolonu ve dedektör ekipmanlarını bir arada bulunduran bir donanıma sahiptir. Üretici firmalar farklı olsa dahi cihaza ait kısımlar birbirlerine benzerken dedektör olarak absorbans, floresans, refraktif indeks, elektrokimyasal, iletkenlik ve kütle dedektörleri kullanılabilmektedir [149].

Gıda biliminde HPLC yöntemi gıda bileşenlerinin kalitatif ve kantitatif olarak analiz edilmesini sağlamaktadır [150]. HPLC metodu basit hassas ve güvenilir olduğu için propolisin kimyasal bileşenlerinin tayininde en çok kullanılan yöntemdir [6, 15, 95, 145, 147, 148]. Bu yöntemler propolis içerisindeki fenolik bileşenlerin varlığı ve konsantrasyon miktarları belirlenebilmektedir. Örnek gereksinimlerinin az olması, küçük miktarların tayinine olanak sağlaması, otomasyona müsait olması, hızlı analiz imkânı ve yüksek ayırma gücüne sahip olması HPLC kullanımının sağladığı avantajlardır. Bu avantajların yanında HPLC'nin geliştirilen yeni versiyonları (HPTLC, HPLC-DAD) propolis ekstraksiyonlarında olumlu sonuçlar vermektedir [7, 116]. Fakat bileşenlerin fazlalığı nedeniyle çok sayıda internal standarda ihtiyaç duymaktadır. Dolayısıyla bu kadar çok sayıdaki bileşenin HPLC metoduyla tespiti güç olmaktadır.

1.1.8.3 Propoliste Antioksidan Madde Tayini

Propolisin, antioksidan aktiviteye sahip flavonoid ve fenolik bileşimlerden zengin olduğu bilinmektedir. Bu nedenle propolisin, oksidanların yıkıcı etkilerinden bizi koruduğu bildirilmektedir. Propolisin antioksidan aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, Brezilya propolisinin serbest radikallere karşı, vitamin C, vitamin E, kafeik asite göre daha potansiyel bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Antioksidan aktivitesini hesaplama yöntemleri iki temel prensibe dayanır. Bunlardan birincisi 'Hidrojen Atom Transferini' (HAT) temel alan analizler, ikincisi ise 'Tek Elektron Transferini' (SET) temel alan analizlerdir. Propoliste antioksidan kapasitesi belirlenirken yapılan çalışmaların birçoğunda elektron transferine dayanan yöntemlerin (DPPH, FRAP, CUPRAC, TEAC/ABTS) kullanıldığı görülmektedir.

DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) serbest radikal giderim yöntemi ekstraktların antioksidan aktivitesi hidrojen bağlama kabiliyeti ya da başka bir deyişle DPPH radikalini yakalama kabiliyetine dayanılarak ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. DPPH serbest radikal giderim yöntemi, antioksidan tayininde ilk kez [151] tarafından

bulunmuş ve geliştirilerek günümüzde kullanılmıştır. Bu yöntem koyu mor bir renge sahip olan DPPH radikalinin antioksidan bulunan bir ortamda proton alarak indirgenmesi ve renksiz bir bileşiğe dönüşmesi prensibine dayanmaktadır. Sonrasında bu renk değişimi spektrofotometrik cihazlarla ölçülerek antioksidan içeriği saptanmaktadır. Ayrıca propolisin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için birçok çalışmada kullanılan yöntemdir [6, 15, 80, 117].

Propolisin portakal suyu içerisine katılarak portakal suyunun antioksidan kapasitesinin ölçüldüğü bir çalışmada propolisin var olan antioksidan özelliğinin portakal suyunun antioksidan özelliklerine önemli derecede katkı sağladığı DPPH yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir [15].

Antioksidan aktivitesi hesaplamada tercih edilen FRAP, CUPRAC, TEAC/ABTS gibi diğer yöntemler propolisin antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde de kullanılmıştır [6, 117]. Farklı antioksidan aktivitesi belirleme metotlarının aynı propolis ekstraktları üzerine etkileri incelendiğinde ise ortaya çıkan değerler propolisin antioksidan kapasitesi hakkında orantısal olarak doğru değerler vermektedir. Bu nedenle doğrulama yapmaya ihtiyaç duyulan durumlarda istenilen iki yöntem seçilerek uygulanabilir.

Propolis için bahsedilen bu metotlar (DPPH, ABTS, FRAP) sadece ektraksiyon çözücüleri veya yöntemleri değiştirildiğinde farklılıklar gösterebilmektedir [6, 117]. Yapılan bir çalışmada etanol ekstraksiyonundan geçmiş propolis ekstraktlarının antioksidan kapasitesinin su ile ekstrakte edilmiş propolis ekstraksiyonlarından yüksek olduğu belirtilmiştir [80]. Sonuçların yüksek çıkmasının nedeni polar olmayan bir serbest radikalin kullanılmasıdır. Suyun polaritesinin etanolün polaritesinden yüksek olması nedeniyle etanol ile ekstrakte edilmiş propolis ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri daha yüksek çıkmasına sebep olmuştur.

Bu nedenle propolis ekstraksiyonu için en ideal seçim, farklı antioksidan mekanizmaları içeren, hidrojen atomu transferine (HAT) ve tek elektron transferine (SET) dayanan yöntemlerin bir karışımını kapsayan metot olacaktır [117].

1.1.9 Propolisin Antimikrobiyal Özellikleri

Farklı bölgelerdeki bitki kaynaklarından toplanan, “doğal antibiyotik” olarak tanımlanan propolisin antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Propolisin antimikrobiyal özellikleri içeriğinde bulunan pinosembrin, galangin, kafeik asit fenil ester ve ferülik asit gibi komponentler sayesinde sağlanmaktadır. Propolise antifungal özelliği kazandıran pinosembrin, pinobanksin, kafeik asit fenil ester, benzil ester,

sakuranetin ve pterostilben bileşikleriyken antiviral özellikleri kafeik asit fenil ester, luteolin ve kuersetindir [12]. Propolisin antimikrobiyal aktivitesi propolis türlerine, propolis dozuna ve tüm mikroorganizmalar için ekstraksiyon çözücülerine bağlı olarak değişmektedir [81, 88, 148].

Propolisin en etkili olduğu mikroorganizmalar gram (+) bakterilerdir. Bunu sırasıyla Gram (-) bakteriler, mayalar ve küfler takip etmektedir. Propolisin antimikrobiyal özelliğini belirlemek için farklı metotlardan yararlanılmaktadır. Disk difüzyon yöntemi propolisin antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesinde bu metotlar arasında daha çok tercih edilmektedir [81, 85, 148, 152] Bu metodun dışında dilisyon yöntemi [119, 152], agar difüzyon yöntemi [145, 147, 153] ve gradient difüzyon yöntemi [152] tercih edilen diğer yöntemlerdir.

Yapılan çalışmalarda patojen mikroorganizmaların tercih edilmesinin sebebi oluşturdukları risklerin insan sağlığı açısından yüksek olmasıdır. Bu nedenle antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesinde daha fazla kullanılmaktadırlar. Ancak propolisin antimikrobiyal özellikleri ekstraksiyon çözücülerine bağlı olarak değişmektedir. Ertük'e göre propolisin sulu ekstraksiyonu ile etanol ekstraksiyonu karşılaştırılmıştır. Çalışma sonunda propolisin sulu ekstraksiyonunun çalışmada kullanılan mikroorganizma örnekleri üzerine inhibitör etkisi olmadığı saptanmıştır [81]. Bununla beraber aynı kaynaktan elde edilen propolisin etanolik ekstraktının çalışmada kullanılan mikroorganizmalar üzerine yüksek inhibitör etkisi olduğu belirlenmiştir.

Kubiliene ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada da propolis ekstraksiyonu için etanol, su ve zeytinyağı çözücü olarak kullanılmıştır [147]. Etanol, su ve zeytinyağı ile muamele edilen ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. İnceleme sonucunda su ve zeytinyağı ile ekstrakte edilmiş propolis örneklerinin çalışılan mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal aktivitesinin olmadığı görülmüştür.

Yapılan çalışmalarda propolise karşı en duyalı mikroorganizmanın $E.\ coli$ olduğu düşünülmektedir [6, 81]. $E.\ coli$ aynı zaman da diş sağlığı içinde tehdit oluşturan bakterilerden biridir. $E.\ coli$ ile birlikte $Stahpylococcus\ aureus$, $Candida\ ablicans$, $E.\ fecalis$ ve $Streptococcus\ mutans$ oral patojenlerdir. Özellikle $Streptococcus\ mutans$ diş çürümelerine sebep olan en etkili bakteridir. Yapılan çalışmalarda diş çürümelerinde etkin olan bakterilerin yok edilmesi ve etkilerinin en aza indirilmesinde propolisin etkili olduğu görülmüştür [12].

Propolisin, alkolsüz ekstraktı portakal suyuna alternatif ve sentetik olmayan bir koruyucu olarak hizmet edebileceği konulu çalışmada, propolis emülsiyonunun portakal suyu üzerindeki koruyucu etkisini 35 güne kadar sağladığı belirlenmiştir.

Propolis emülsiyonu, bakteri büyümesinin ve L-askorbik asit degradasyonunun önemli ölçüde inhibe etmiştir. Propolisin, portakal suyu veya diğer meyve sularında kimyasal koruyuculara alternatif olarak doğal katkı maddesi olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır [15].

Yakın zamana kadar, DMSO, propolis çalışmalarında nadiren kullanılmıştır. *Aspergillus fumigatus*, *Microsporum gypseum*, *Microsporum canis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ve *Enterococcus faecalis*'e karşı antimikrobiyal etkisi test edilen çalışmada tüm mikroorganizmalara karşı inhibitör etkiler belirlense de, doza bağlı farklı sonuçlar elde edilmiştir [85].

Başka bir çalışmada sıcak su içerisinde çözünen hazır çorbalar mikrobiyolojik açıdan incelenmiştir. Propolis ekstraktlarının inhibisyon etkisi üzerine yapılan analizlerde ise propolis örneklerinin inhibisyon etkilerinin olduğu ve farklı coğrafi bölgelerden elde edilen propolis örneklerinin farklı antimikrobiyal etki gösterdikleri ortaya konmuştur [154].

Kayseri ve çevresinden toplanan propolisin *Helicobacter pylori* üzerine antimikrobiyal aktivitesinin in vitro olarak araştırıldığı çalışmada Kayseri ve çevresinden toplanan propolisin *H. pylori*'ye karşı etkili olduğu belirlenmiştir [155]. Propolisin *Helicobacter pylori* üzerine olan antimikrobiyal etkisi olduğu belirlenerek gastrointestinal hastalıkların tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin yerini alması planlanmaktadır.

Propolisin tek başına antimikrobiyal özelliğinden yararlanıldığı birçok çalışmanın dışında süte katılarak antimikrobiyal etkisinin test edildiği farklı bir çalışma da mevcuttur. Çalışma da süte antimikrobiyal madde olarak propolis ilave edilirken, yapay olarak Listeria monosytogenes bakterisi eklenmiştir. 40 °C'de depolanan sütlerde propolisin süte antilisteral bir özellik kattığı belirlenmiştir [4].

Propolisin sağlığa yararlı özelliklerinden yararlanmak için Maca (*Lepidium meyenii*) ile karıştırılmış ve fonksiyonel özellikleri geliştirilmiş bir yoğurt üretimi ve tüketilebilirliği değerlendirilmiştir. Mikrobiyolojik analiz bulgularında *Lactobacillus* türlerinin sayısı bakımından gruplar arasında herhangi anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Hedonik testte ise sadece propolis içeren yoğurt ikinci sırada yer almıştır [156].

1.1.10 Propolis Enkapsülasyonu

Propolis aktif bileşenlerce zengin bir üründür. Propolisin içerisinde bulunan aktif bileşenlerin fonksiyonelliğinin kaybolmaması ve yapısının bozulmaması için enkapsülasyon en uygun yöntemlerden biridir. Enkapsülasyon işlemi temel olarak bir maddenin kendisini çevreleyen başka bir madde içerisinde tutunması prensibine dayanmaktır. Enkapsüle edilen katı, sıvı veya gaz halindeki maddeler çekirdek, öz, aktif ajan, dolgu ve iç faz olarak adlandırılmaktadır. Enkapsüle edici madde ise duvar matriksi, kabuk, taşıyıcı materyal, dış membran veya dış faz adını almaktadır [157].

Enkapsülasyon teknolojisi ile gıda sektöründe süreç zararlarından gıda bileşenlerini korumak, uçucu bileşen kaybını en aza indirmek, tat ve aroma kayıplarını azaltmak, istenmeyen aromaları maskelemek, sıvı formadaki maddeleri katı hale getirerek taşıma ve depolama kolaylık sağlamak, raf ömrünü uzatmak ve dolgu malzemesinin kontrollü salınımını gerçekleştirilmek amaçlanmaktadır [158, 159].

Propolisin enkapsülasyonu için taşıyıcı maddeler seçilirken son ürünün çözgende çözünürlüğü, su tutma kapasitesi, termal davranışı, enkapsülasyon verimliliği, dolguyu koruyucu ve çevreleyici özelliği, diğer bileşenler ile reaksiyona girme potansiyeli ve gastrointestinal sistemdeki salınımı dikkat edilmesi gereken noktaları oluşturmaktadır [160]. Ayrıca kaplama materyali gıdalarda kullanılabilir özellikte, düşük maliyetli, tatsız, temini kolay olmasının yanında toksik açıdan risk içermemelidir [161].

Endüstride, saydığımız bu özellikleri tek bir kaplama materyalinde bulmak oldukça güçtür. Bu nedenle farklı kaplama materyalleri bir araya getirilerek kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde tüketilebilir olması nedeniyle kaplama materyali olarak karbonhidratlar (maltodekstrin, modifiye nişasta), proteinler (süt proteini, peynir altı suyu proteini) ve gamlar (arabik gam, sodyum aljinat) kullanılmaktadır [162].

Kaplama materyallerinden doğada bitkilerin salgısı maddesi olarak bulunan arap zamkı (GA); galaktoz, arabinoz, ramnoz ve glukuronik asitleri içeren bir heteropolimerdir. Bu nedenle sudaki çözünürlüğü (% 50) diğer gamlara göre oldukça yüksektir [163]. Arap zamkı gıda endüstrisinde aroma ve köpük stabilizatörü, bağlayıcı ve emülgatör olarak kullanılmaktadır. Vizkozitesinin düşük olması ve diğer kaplama materyalleriyle birlikte kullanıma olanak sağlaması sebebiyle enkapsülasyon işleminde oldukça etkindir [164].

Enkapsülasyon işlemi için çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Fiziksel proseslerin kullanıldığı teknikler; püskürtmeli kurutma, dondurarak kurutma, ekstrüzyon

ve akışkan yatakta kaplama, fizikokimyasal proseslerin kullanıldığı teknikler; koaservasyon, lipozoma hapsetme ve kimyasal proseslerin kullanıldığı teknikler; arayüz polimerizasyonu ve moleküler inklüzyon olarak sınıflandırılmaktadır [162].

Enkapsülasyon teknolojisinde kullanılan yöntemlerden biri olan dondurarak kurutma işlemi, üç aşamadan oluşmaktadır [165]. İlk aşama olan dondurma aşaması, en önemli aşamadır. Bu aşamada kullanılacak materyalin sıcaklığının donma sıcaklığının altına indirilmesi gerekmektedir. Özellikle sıvı ve akışkan haldeki materyallerde denge fazı diyagramlarındaki ötektik noktasının altındaki sıcaklıklara kadar soğutularak kristal forma dönüştürülmelidir. İlk aşama sonunda donmuş materyaldeki suyun % 65-90'ı donarken, % 10-35'i ise bağlı su olarak donmamış şekilde bulunmaktadır. Dondurma işlemi yapılırken enkapsülasyon verimliliğini arttırmak için dondurma hızı, dondurma işleminde kullanılan kabın şekli ve materyali içeriğine uygun işlem yapılmalıdır.

Dondurma işleminden sonraki ikinci aşama birincil kurutma aşamasıdır. Donuk hale getirilen materyal içerisindeki su veya diğer çözücü maddeler süblimasyon yöntemi ile uzaklaştırılacaktır. Bu yöntemde kurutulacak materyalin içerisine konduğu dondurarak kurutucu cihaz basıncının, materyal içerisinde bulunan donmuş su veya çözücünün buhar basıncından daha az olması gerekmektedir. Böylelikle, kurutulacak materyalin içerisindeki serbest su uzaklaştırılmıştır. Dondurma işleminin son aşaması ise ikincil kurutma aşamasıdır. Birincil kurutma aşamasının ardından materyalde bulunan bağlı suyun (donmamış su) uzaklaştırılması işlemine dayanmaktadır [166, 167].

Dondurarak kurutma yöntemi ile enkapsülasyon sonucu ürünler; fiziksel açıdan iyi bir forma sahip, aroması ve biyoaktif bileşenleri iyi korunmuş şekilde elde edilmektedir [168]. Ancak yöntem pahalı olması, uzun zaman içerisinde sonuç vermesi ve yüksek enerji tüketiminin olması gibi dezavantajlara sahiptir [169]. Ayrıca bu yöntemle, dondurarak kurutulan ürünlerin tekrar nem kapmaması ve oksijenle temas etmemesi için iyi şekilde muhafaza edilmesi gerektirmektedir [170].

Propolisin enkapsüle edilmesine ilişkin çalışmalarda püskürtmeli kurutma, koaservasyon ve basınçlı anti-solvent kristalizasyon tekniklerinden yararlanılmıştır. Propolisin sprey kurutucu ile enkapsüle edildiği çalışmalarda maltodekstrin, gum arabic ve bitkisel proteinler (pirinç, bezelye, soya fasulyesi ve ovalbumin) taşıyıcı materyal olarak kullanılmıştır. Kompleks koaservasyon metoduyla yapılan propolisin enkapsülasyonunda ise taşıyıcı madde olarak jelatin ve aljinat tercih edilmiştir [160, 171, 172].

Yapılan diğer çalışmalarda propolisin enkapsüle edilerek gıda ve ilaç sanayinde

kullanımları değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda toplam fenolik madde ve antioksidan içeriğinin yüksek miktarda korunması ve istenmeyen aroma ve tadın istenilen düzeyde azaltılması sebebiyle kullanımında sakınca görülmemektedir [173]. Ayrıca sitotoksik etkilerinin bulunmayışı ve kanser hücreleri üzerine etkilerinin pozitif sonuçlanması özellikle kanser ilaçlarında kullanımını desteklemektedir [172].

Başka bir çalışmada Brezilya propolisi püskürterek kurutma yöntemiyle arap zamkı ve maltodekstrin kullanarak enkapsüle edilmiştir. Propolis mikropartikülleri değerlendirildiğinde mikro parçacıkların küresel formlar, düzgün yüzeyler, amorf özellikler, düşük su aktivitesi, nem ve higroskopisite, yüksek çözünürlük, iyi kapsülleme etkinliği, iyi antioksidan aktivite gösterdiklerini, ancak toplam fenolik ve flavonoidlerin kapsüllenmemiş propoliste azaldığı tespit edilmiştir [171].

Propolisin pirinç, bezelye, soya fasülyesi ve ovoalbümin proteinleri ile enkapsüle edilerek gıdalarda kullanımı ve in vitro sindirimi analiz edilmiştir. Bezelye proteini ile kapsüllenmiş mikrotanecikler, kontrollü salım nedeniyle Minas Frescal peyniri formülasyonlarında kullanılabilirken, diğer mikrotaneciklerinin puding formülasyonlarında kullanılabilir olduğu belirlenmiştir [160].

1.1.10.1 Enkapsüle Edilmiş Propolis Örneklerinin Mikroyapısal Özellikleri

Enkapsüle edilen propolis örneklerinin mikroyapısal özellikleri belirlenmek istendiğinde taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak görüntü alınabilmektedir. Bu sayede mikropartiküllerin kullanılan duvar malzemesi ile oluşturdukları şekiller, boyutlar ve yüzey özellikleri belirlenebilmektedir.

SEM istenilen örneklerin 100.000 kat büyültülerek yüzey yapılarını görüntülemeye yaramaktadır. Bu sayede örnek yüzeyinde meydana gelen değişimler üç boyutlu görselden faydalanılarak belirlenebilmektedir. Her geçen gün gelişen bu teknoloji sayesinde tıp, kimya, biyoloji ve fizik alanında araştırmalarda önemli yolar katedilmiştir. Pürüzlü yüzeylerde bile sonuç alınabilen SEM, örnekleri sadece görsel olarak sunmamaktadır. Aynı zamanda partiküllerin kümeleşme (agregasyon), dağılım, emilim (absorbans), boyut, yapı ve şekil gibi özellikleri hakkında bilgi edinilmesine yardımcı olmaktadır.

1.1.11 Enkapsüle Propolislerin Gıdalarda Kullanımı

Propolisin kovanda ham haldedir ve tek başına gıda olarak kullanılması tüketiciler tarafından tercih edilmemektedir. Bu nedenle propolis farklı çözücülerde çözdürülerek arıların kopmuş vücut parçaları, tahta yongaları ve diğer yabancı

maddeler giderilmektedir. Elde edilen propolis ekstraktı gıdalarda kullanımı tüketici tarafından sağlık sebebiyle tercih edilse de lezzet açısından rağbet görmemektedir. Bu nedenle propolis ekstraktları enkapsüle edilmelidir. Propolisin enkapsüle edilerek kullanılması veya deoderizasyon (koku giderme) işleminden geçirilmiş olması gıdalarda kullanımı ve tüketimi açısından büyük yarar sağlamaktadır. Ayrıca enkapsüle edilecek propolis ekstraktları farklı gıdalarda kullanılarak fonksiyonellikleri arttırılabilmektedir.

Propolisin gıdalardaki kullanımına bakıldığında genellikle antimikrobiyal özelliklerin geliştirilerek raf ömrünün attırıldığı çalışmalara rastlamaktayız. Portakal sularında [15], hazır çorbalarda [154] raf ömrü üzerine olumlu sonuçlar çıkaran propolis ekstraktlarının kullanımı için et ve et ürünlerinde, dondurulmuş etlerde [85] de raf ömrünü arttırıcı çalışmalar yapılmıştır.

Sütün raf ömrü üzerine yapılan bir çalışmada antimikrobiyal özelliklerin geliştirilmesi için katılan propolisin, içilebilirlik özellikleri de test edilmiş ve sonuçlar ortalama tüketilebilir düzeyde olduğunu göstermiştir [4]. Propolisin yoğurtta antimikrobiyal aktivitenin arttırılması için kullanıldığı bir çalışma da ise *Lactobacillus* türleri üzerine arttırıcı ve azaltıcı bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Bununla beraber yapılan hedonik analizlerde toplam tüketilebilirlik ve beğeni algısı bakımından sadece propolis ilave edilen yoğurtlar en beğenilen ikinci ürün olmuştur [156].

Enkapsüle edilmiş propolisin peynir ve pudinge eklenerek uygunluğunun tespit edildiği bir çalışmada propolisin enkapsüle edildiği taşıyıcı maddenin önemli olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle propolis enkapsülasyonunda kullanılan taşıyıcı maddenin sahip olduğu özellikler kullanılacak gıdanın özelliğine göre belirlenmelidir. Çalışmada bezelye proteini ile enkapsüle edilmiş propolis peynir formülasyonu için uygun görülürken diğer taşıyıcı maddelerle (pirinç, soya fasülyesi, ovalbümin) enkapsüle edilmiş propolisin puding formülasyonlarında kullanımı uygun bulunmuştur [160].

Propolisin balda kullanımı ile ilgili yapılan çalışmada propolis konsantrasyonları % 0.5'ten yüksek olan bal ve propolis karışımları, hoş olmayan organoleptik özellikleri nedeniyle duyusal olarak kabul edilmemiştir. Tüketicilerin bala eklenen propolis konsantrasyonuna olan tercihleri (% 0,1-0,5) bal türüne bağlı olarak değişkenlik göstermiştir. Bala ilave edilen propolis ekstraktı, % 0.1 kadar düşük bir konsantrasyonda bile, balın antimikrobiyal, antioksidan ve antienflamatuar aktivitesini artırmaktadır. Bala daha yüksek konsantrasyonlarda propolis eklendiğinde biyoaktif özelliklerini artırır. Ballar ve propolis arasında sinerjik antimikrobiyal aktivite olduğu tespit edilmekle beraber bal ile yapılan yenilebilir ürünler az miktarda kullanıldığında (% 0.1 ile % 0.3) arasında tüketiciye hitap etmektedir. Propolis

ayrıca balın biyoaktif özelliklerini geliştirerek arıcılık karlılığını artırmaya yardımcı olmaktadır [174].

1.1.12 İstatiksel Analiz

İstatiksel analizler alınan verilerin doğru yorumlanmasında faydalanılan en önemli araçlardır. Optimizasyon işlemi ise uygulanacak işlemlerde istenilen yanıtlar doğrultusunda, birbirinden bağımsız değişkenlerin birbirleri ile ve yanıtlar üzerine olan etkilerini ortaya koyan bir uygulamadır [175].

Matematiksel modelleme yöntemlerinden biri olan yüzey yanıt yöntemi (RSM), bağımsız değişkenlerin yanıtlar üzerinden optimize edilmesini amaçlamaktadır. Yüzey yanıt yöntemi içerisinde Central Composite, Box-Behnken gibi çeşitli dizaynlar yer almaktadır. Uygulanacak olan faktör seviyelerine göre uygun dizayn tercih edilmelidir. Bu nedenle her faktör için üç seviyenin kullanıldığı Box-Behnken dizaynı gıda analizlerinde sıkça kullanılmaktadır. Kullanılan dizayn sonrasında regresyon analizi ve varyans analizi (ANOVA) gerçekleştirilerek modelin uygunluğu test edilmektedir. Model uygunluğu yakalanan bu dizaynlar kullanılarak, oluşturulan optimum koşullarla zaman kaybı ve ürün sarfiyatı en aza indirilmektedir.

Propolisin ekstraksiyon kısmında optimizasyon için yüzey yanıt yönteminin (RSM) kullanıldığı az sayıda çalışma bulunmaktadır. Propolisin süper kritik CO_2 ekstraksiyonunun etkinliğininin belirlendiği bir çalışma da basınç, sıcaklık ve ekstraksiyon süresi değişken faktörler olarak belirlenmiştir. Farklı süper kritik CO_2 ekstraksiyonunu modellemek ve optimize etmek için başarıyla kullanılan yanıt yüzey yanıt yöntemi (RSM) propolis ekstraksiyonunda problem modelleme ve analizi için faydalı bir istatistiksel ve matematiksel yaklaşım grubudur [7].

Propolisle ilgili yapılan diğer bir çalışma da enkapsüle edilmiş propolis örneklerinin iki faktörlü RSM (polietilen glikol propolis (PEG) ve anti-solvent propolis (PAS)) olarak tasarlanarak beş ana parametre (PEG ve PAS çökeltilerindeki propolis miktarı, kapsüllenmiş flavonoidlerin miktarı, kapsüllenmiş maddenin ilaç içeriği, toplam çökelti verimi ve toplam flavonoidlerin geri kazanımı) kuadratik bir regresyon modeliyle analiz edilmiştir [176].

1.2 Tezin Amacı

Beslenme ve gıda sektöründe yeni akım olarak karşımıza fonksiyonel gıda kavramı çıkmaktadır. Fonksiyonel gıdaların temeli esas olarak Orta Asya'ya temelli olsa da farklı coğrafyalarda dahi bu tarz gıdalar sağlıklı yaşamın bir parçası olmuştur.

Günümüzde fonksiyonel gıdalar, gıda takviyesi, tıbbi gıdalar, süper gıdalar gibi farklı isimler altında raflarda bulunmaktadır [177]. Fonksiyonel gıdalar; gıdaların bileşiminde bulunan fitokimyasallar, biyoaktif peptidler, yağ asitleri, prebiyotik ve probiyotikler gibi bileşenler sayesinde insan sağlığına fayda sağlamaktadır. Bir gıda veya gıda ürünü, kendi içeriğinde bulunan bileşenlerle fonksiyonel gıda olarak adlandırılabildiği gibi, içerisine sonradan ilave edilen bileşenlerle de fonksiyonel gıda olarak isimlendirilebilmektedir.

Fonksiyonel birer gıda ürünü olan bal ve diğer arı ürünleri son yıllar da arıcılığa verilen önemle beraber öne çıkmaktadır. Arı ürünleri; bal, polen ve arı ekmeği gibi, doğrudan insan gıdası olarak tüketimi olan çeşitlerinin dışında arı sütü, propolis gibi işlenerek insan gıdası olarak kullanılanlar ve arı zehri, bal mumu gibi doğrudan insan gıdası olarak tüketilmeyen fakat sağlığa faydalı fonksiyonlarının ilaç ve kozmetik sanayine katkı sağlaması amacıyla kullanılanlar olmak üzere üç gruba ayrılabilir [178].

Arıcılık ürünlerinin Çin kitabelerinde ve Mısır'daki yazılı kaynaklarda milattan önce ve sonraki dönemlerde hastalıkların tedavi edilmesinde kullanıldığı belirtilmektedir [179]. Günümüzde ise arıcılık ürünlerinin (bal, polen, propolis, arı ekmeği, arı zehri, bal mumu) hastalıkların tedavisinde kullanılmasına "Apiterapi" adı verilmektedir [180].

Apiterapi tedavisinde karşımıza çıkan ve arı ürünlerinden biri olan propolisin insan sağlığına fayda sağlamakla beraber kalp hastalıkları, diyabet, kanser ve enflamasyon (iltihaplanma) faktörleri üzerine önleyici etkisi bulunmaktadır [87]. Propolisin sahip olduğu antiseptik, antimikotik, bakteriyostatik, spazmolitik, anti-inflamatuar, anestetik antimikrobiyal, antioksidan ve antikanserojenik özellikler içerdiği fonksiyonel bileşenlerden kaynaklanmaktadır [181]. Propolisin fonksiyonel bileşen içeriği toplandığı bölgedeki yerel floraya bağlı olarak değişim göstermektedir [18]. Propolisteki değerli bileşenlerden faydalanmak için propolisin ekstrakte edilmesi gereklidir. Propolisin bölgeden bölgeye değişiklik gösteren kimyasal bileşenlerinin belirlenmesi ve elde edilmesi için birçok çalışma yapılmıştır. Çalışmalar propolisin kimyasal bileşiminin yanında propolisin antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi, antioksidan kapasitesinin tespiti, antikanserojenik çalışmalar ve gıda maddesi olarak tüketilebilirliğinin arttırılması üzerine yoğunlaşmaktadır.

Yapılan çalışmalar tıp, kozmetik, ilaç ve gıda gibi farklı sektörlere katkı sağlamaktadır. Ancak propolis farklı sektörlerde kullanılsa da ekstraksiyon işleminde faydalı bileşenlerin ortaya konması için kullanılan etanol maddesinin kullanımı helal/haram hassasiyeti olan tüketiciler açısından problem oluşturmaktadır. Ayrıca propolisin doğrudan gıda maddesi olarak tüketilmemesi farklı gıdalarla bir araya getirilerek

yapılacak gıda ürünleriyle beraber tüketiminin arttırılması gerekmektedir.

Bu çalışma ile propolisin farklı çözücülerle ekstraksiyonu ve karakterizasyonu yapılarak,

- Türkiye'deki propolislerin kimyasal bileşenlerinin tespitine katkı sağlamak,
- katma değeri yüksek ürünler haline getirmek,
- farklı sektörlerdeki kullanımına olanak tanımak,
- helal tüketim ihtiyacına cevap verebilmek (etanol ekstraksiyonu yerine farklı ekstraksiyon çözücüleri kullanmak),
- propolisin enkapsüle edilerek insan gıdası olarak tüketilebilmesini sağlamak ve
- doğal gıda katkı maddesi olarak kullanımı ile ürünlerin fonksiyonelliğini ve raf ömrünü arttırması amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Propolis oldukça önemli fonksiyonel bir arı ürünüdür. Bu ürün fonksiyonellik kazandıran biyoaktif bileşiklerin başında fenolik bileşikler gelmektedir. Fenolik bileşiklerin tespitinden önce ekstraksiyonun etkin bir şekilde yapılması gerekmektedir. Propolis ekstraksiyonu, ucuz ve yüksek verimlilik sağlıyor olmasından dolayı genel olarak etanol ile yapılmaktadır. Çalışmada kontrol için etanol kullanılmasının dışında distile su, dimetilsülfoksit (DMSO) ve propilen glikol (PG) kullanılarak etkinliğinin arttırılması için ultrases teknolojisinden yararlanılacaktır. Propolis ekstraksiyonu için tercih edilen etanol dışındaki helal çözücüler ve yeni teknolojilerin kullanımı ile ekstraksiyon optimizasyonunun yapılması planlanmaktadır. Optimize edilen propolis ekstraktları fenolik bileşen kapasitesi, antioksidan aktivitesi ve antimikrobiyal özellikleri açısından incelenerek enkapsüle edilecektir. Bu sayede propolislerin biyoaktif özellikleri korunacak ve içerisine girdikleri gıda ürününde aroma sorunları oluşmayacaktır. Ayrıca antimikrobiyal aktivitesinin yüksek olması sebebi ile gıdaların raf ömrünün uzun olmasını sağlayacaktır. Çalışma sonunda;

- Propolis ekstraksiyonu için su, dimetilsükfoksit (DMSO) ve propilen glikol (PG) gibi çözücüler ve ultrases (US) yönteminin kullanılmasıyla etanolün kullanımından kaynaklı göz rahatsızlıkları, kulak, burun ve boğaz iltihapları ve pediatri gibi bazı hastalıkların ya da alkol intoleransı olan kişilerin tedavisinde kullanılması sağlanmış olacaktır. Ayrıca tüketicilerin helal tüketim ihtiyacına cevap verilecektir.

- Doğal katkı maddesi (antimikrobiyal ve antioksidan) olarak kullanılabilecektir. Propolisin antimikrobiyal özellikleri, içeriğinde bulunan birçok bileşenden kaynaklanmaktadır. Propolisin antimikrobiyal aktivitesinin tespitiyle, insan sağlığı açısından zararlı birçok patojen mikroorganizma inaktif hale getirilerek doğal antibiyotik olarak kullanılabilir. Bunun yanında gıdaların, raf ömrünü attırmakta mümkün olacaktır.

- Propolisin ham haldeki hedonik (duyusal) özellikleri tüketiciler tarafından tercih edilmemektedir. Bu nedenle propolisin enkapsüle edilerek istenmeyen tat ve aroma giderilerek insan tüketimine uygun hale getirilecektir.

- HPLC yöntemi ile içeriğindeki fenolik bileşen profili tespit edilerek gerekli bileşenlerin ilaç ve kozmetik sanayinde hammadde olarak kullanılması sağlanacaktır.

- Balda kullanımıyla balın fonksiyonel özelliklerine katkı sağlayacaktır. Bu kullanımı, diğer gıdalarda kullanımına örnek oluşturması beklenmektedir.

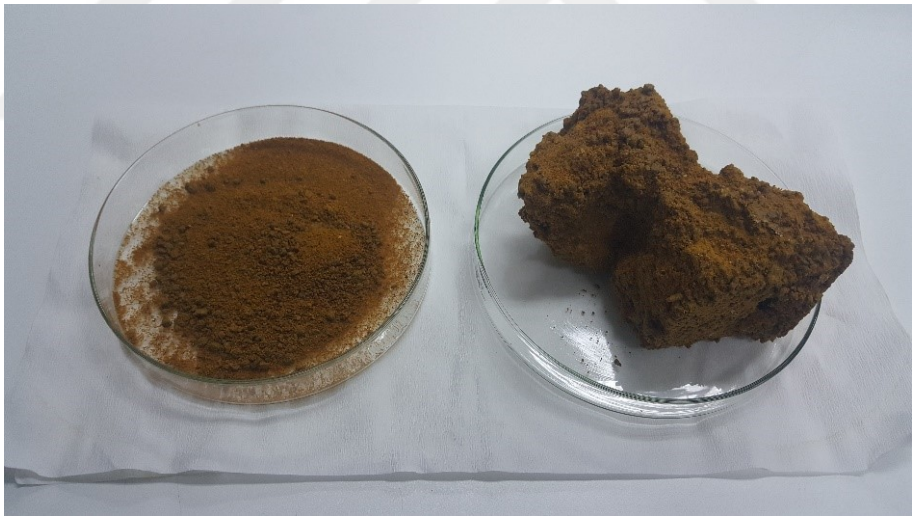
- Türkiye'de Denizli yöresine ait propolislerin kimyasal profilinin tespitine katkı sağlanacaktır.

Konu ile ilgi çalışmalar, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (YTU BAP) doktora tez projesi kapsamında başlatılmıştır. Bu proje kapsamında propolisin farklı çözücülerle ekstraksiyonu ve karakterizasyonu ultrases teknolojisi uygulanarak yüzey yanıt yöntemi yardımı ile optimize edilerek gerçekleştirilmiştir. Çalışmada bütün analizler başarı ile uygulanmış ve önemli bulgular elde edilmiştir.

2
MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Ham Propolisin Toplanması

Çalışmada Denizli-Yeşilova bölgesindeki arıcılar tarafından 2018 yılı Nisan ayında toplanan propolisler aynı yılın Temmuz ayında temin edilmiştir. Analiz için kullanılacak olan propolisler öğütülerek −18 °C'de dondurularak muhafaza edilmiştir (Şekil 2.1). Karniyol arısı (*Apis mellifera carnica*) ve Kafkas arısının (*Apis mellifera caucasica*) ürettiği propolislerin kaynağını söğütgiller (*Salicaceae*) ailesine ait bölgedeki kavak ağaçları oluşturmaktadır.



Şekil 2.1 Ham propolis

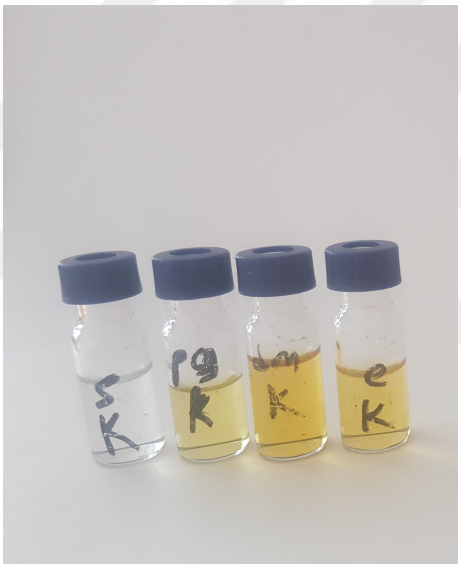
2.2 Propolis Ekstraksiyon Yöntemlerinin Geliştirilmesi ve Ekstrakt Hazırlanması

Çalışmanın temelini oluşturan ekstraksiyon işlemi için klasik çözücü ekstraksiyonu (KÇE) ve ultrases ekstraksiyonu (UDE) kullanıldı. Propolis örneklerinin klasik çözücü ve ultrases destekli ekstraksiyonunda çözücü olarak etanol, dimetilsülfoksit (DMSO), propilen glikol (PG) ve distile su (Merck, Almanya) kullanıldı. Kullanılan bütün

kimyasallar Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (YTU BAPK) tarafından farklı firmalardan temin edilmiştir.

2.2.1 Klasik Çözücü Ekstraksiyon Metodu ile Propolis Ekstraktının Hazırlanması

Propolis numuneleri öğütülmüş ve 5 g'lık kısımlara ayrılmıştır. Her bir kısım, 50 mL etanol (% 70 w/v), DMSO (% 100 w/v), PG (% 100 w/v) ve distile su (% 100 w/v) içinde 20 °C'de 150 rpm'de 24 saat boyunca çözündürülmüştür. Çözündürülen propolisler 4.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip, Whatmann A4 filtre kağıdı kullanılarak süzülmüştür ([85]). Elde edilen kontrol örnekleri deney aşamasına kadar anne sütü saklama poşetlerinde +4 °C'de buzdolabında deney aşamasına kadar muhafaza edilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Klasik çözücü ekstraksiyon (KÇE) metodu kullanılarak edilen propolis ekstraktları

2.2.2 Ultrases Destekli Ekstraksiyon Metodu ile Propolis Ekstraktının Hazırlanması

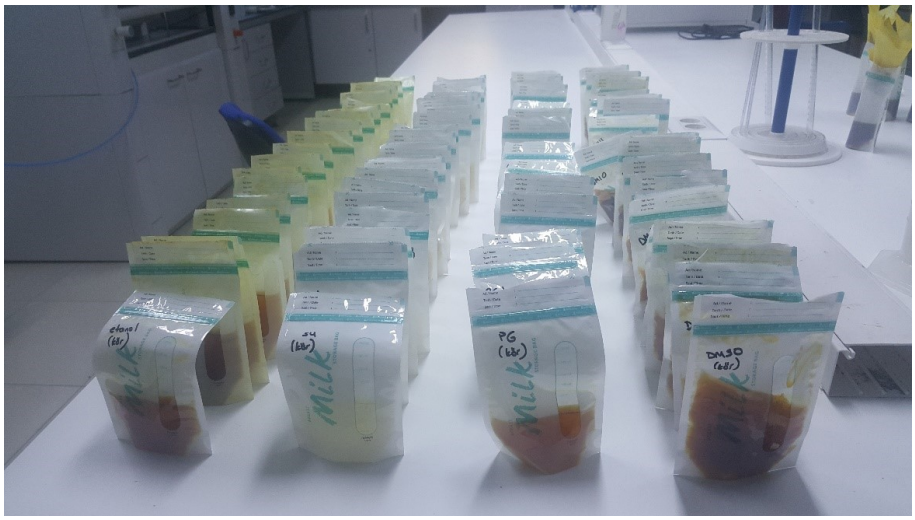
Ultrases teknolojisinden (Hielscher Ultrasonikatör UIP2000hdT, Teltow, Almanya) faydalanarak ekstrakte edilecek örnekler öğütüldükten sonra, 5 g'lık kısımlara ayrılmıştır. Her bir kısım, 50 mL etanol (% 70 w/v), DMSO (% 100 w/v), PG (% 100 w/v) ve distile su (% 100 w/v) içinde yüzey yanıt yönteminden çıkartılan dizyana göre ekstrakte edilmiştir. Yüzey yanıt yönteminde üç faktörlü 3 seviyeli bir dizayn sonucu 17 örnek oluşmuştur (Tablo 2.1).

Değişken faktörler olarak ekstraksiyon sıcaklığı (30, 45 ve 60 °C), ekstraksiyon süresi

Tablo 2.1 Yüzey yanıt yöntemi kullanılarak ultrases destekli propolis ekstraksiyonunun deneysel tasarımı

Örnek no	Ekstraksiyon süresi (dakika)	Ekstraksiyon sıcaklığı (°C)	Ultrases Gücü (Watt)
1	1	60	500
2	1	45	250
3	1	30	500
4	2	45	500
5	2	45	500
6	2	60	250
7	2	60	750
8	1	45	750
9	2	45	500
10	2	30	250
11	2	45	500
12	3	30	500
13	3	60	500
14	2	45	500
15	2	30	750
16	3	45	750
17	3	45	250

(1, 2 ve 3 dakika) ve ultrases gücü (250, 500 ve 750 watt) belirlenmiştir [108, 182–184]. Dizayna uygun ekstrakte edilen propolisler, ultrases uygulamasından sonra 6.000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüjleme işleminin ardından Whatmann A4 filtre kâğıdı yardımı ile filtre edilmiş, filtrasyon sonucu elde edilen ekstraktlar anne sütü saklama poşetlerinde +4 °C'de buzdolabında optimizasyon deneyleri yapılıncaya kadar muhafaza edilmiştir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Yüzey yanıt yöntemi dizaynına göre hazırlanan ultrases destekli propolis ekstraktları

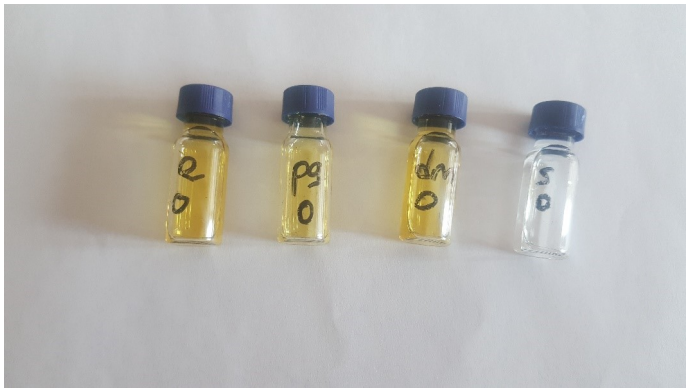
2.2.3 Ultrases Destekli Ekstraksiyon Metodu ile Optimum Propolis Ekstraktının Hazırlanması

Yüzey yanıt yönteminde elde edilen dizayndaki optimizasyon işlemi sadece toplam fenolik içerik bakılarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda öğütülmüş propolisler 5 g'lık kısımlara ayrılmıştır. Her bir kısım, 50 mL etanol (% 70 w/v), DMSO (% 100 w/v), PG (% 100 w/v) ve distile su (% 100 w/v) içinde yüzey yanıt yönteminden çıkartılan optimum koşullara göre ekstrakte edilmiştir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2 Yüzey yanıt yöntemi kullanılarak edilen ultrases destekli optimum propolis ekstraksiyonunun deneysel tasarımı

Kullanılan çözücü	Ekstraksiyon süresi (dakika)	Ekstraksiyon sıcaklığı (°C)	Ultrases Gücü (Watt)
Etanol	2,95	58,61	615,26
DMSO	3	60	580
PG	3	59	591
DS	2,70	59,19	591,73

Optimum koşullara uygun ekstrakte edilen propolisler, ultrases uygulamasından sonra 6.000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüjleme işleminin ardından Whatmann A4 filtre kâğıdı yardımı ile filtre edilmiş, filtrasyon sonucu elde edilen ekstraktlar anne sütü saklama poşetlerinde +4 °C'de buzdolabında deney aşamasına kadar muhafaza edilmiştir. Çalışmanın bundan sonraki aşamalarında ultrases kullanılan örneklerde optimum şartlarda elde edilen ekstraktlar kullanılmıştır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Yüzey yanıt yöntemi kullanılarak edilen ultrases destekli optimum propolis ekstraktları

2.3 Propolisin Spektroskopik Metotlar ile Karakterizasyonu

2.3.1 FT-IR Spektroskopisi ile Propolis Ekstraktlarının Karakterizasyonu

Örneklerin FT-IR ile karakterizasyonunda (Perkin Elmer Spectrum 100, ABD) ATR modülü spektrometre kullanılmıştır. FT-IR ölçümlerindeki ATR modülü elmas kristale sahiptir. KBr ışın demeti bölücülü DLaTGS detektöründe, 4000 - 650 cm^{-1} dalga boyu aralığında, orta kızılötesi bölgede kaydedilmiştir. Hazırlanan propolis ekstraktlarının ATR-FTIR spektrumları 4 cm^{-1} çözünürlükte, her bir spektrum için 16 tarama olacak şekilde örneklerin ayırt edilmesi sağlanmıştır. Her ölçüm öncesi, hava ile background alınarak ölçümler 3 kez tekrar edilmiştir. Aynı koşullar altında alınan üç ölçüm toplanarak spektrumların ortalaması alınmıştır.

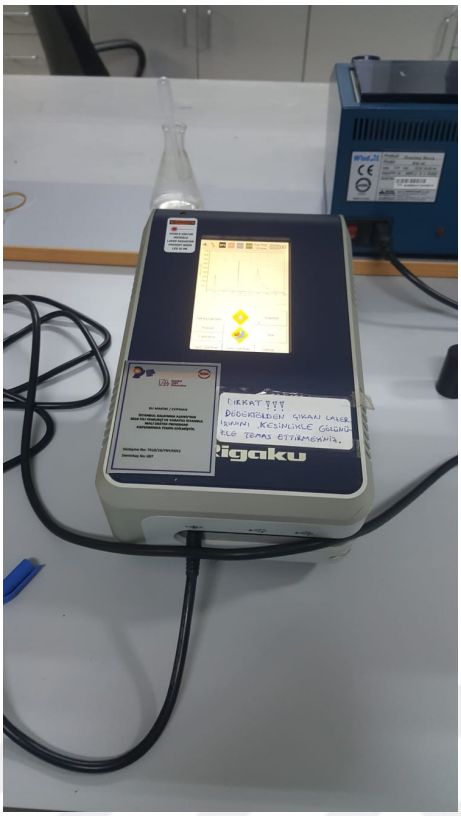
Örnekler ön hazırlık olmaksızın doğrudan ATR kristali üzerinde sıkıştırılarak ölçümleri alınmıştır. ATR modülünün kristal yüzeyi % 100 saf etil alkol (Merck, Almanya) ve saf su kullanılarak temizlenmiştir.

2.3.2 Raman Spektroskopisi ile Propolis Ekstraktlarının Karakterizasyonu

Propolis örneklerinin Raman spektroskopisi ile karakterizasyonunda, Strehle ve arkadaşlarının petekteki propolisin kimyasal kompozisyonunu ve dağılımını araştırmak için kullandıkları yöntem uyarlanarak çalışılmıştır [118]. Raman cihazındaki analizler 785 nm dalga boyunda lazer ve 1024x256 piksel çözünürlüğündeki Raman cihazı (RIGAKU-PROGENY-X2,Tokyo, Japonya) kullanılarak yapılmıştır (Şekil 2.5).

Analiz öncesinde Raman cihazından en yüksek verimin elde edilebilmesi için kalibrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Böylece en uygun lazer kaynağı, lazer şiddeti, lazerin birikme süresi ve toplanma sayısını belirlenerek, raman spektroskopisi yüksek performansta kullanılmıştır.

Analizi yapılacak her ekstraktan homojen olması için 50 μL örnek alınarak vortekslenmiş, vortekslenen örnekler çalışmalarda en güvenilir ve düzgün spektrum veren 785 nm lazer, % 5 lazer gücü, 40 akümülasyon ve 50x objektif kullanılarak ölçülmüştür. Raman ölçümleri için seçilen spektral aralık 3000-100 cm^{-1} olarak alınmış, tüm analizler üç tekrarlı olacak şekilde ölçüm yapılmıştır. Bölgesel Raman tarama verisinin detaylı bir şekilde değerlendirilmesi HCA (Hierarchical cluster analysis) ile gerçekleştirilmiştir. Petek üzerindeki farklı maddelerin dağılımı hakkında bilgi veren bir teknik olan Raman haritalaması için hareketli xy tablası kullanılmış, elde edilen spektrumlar Bio-Rad Laboratories Informatics Division yardımı ile grafiğe dökülerek yorumlanmıştır.



Şekil 2.5 Raman spektroskopisi

2.4 Propolisin Biyoaktif Bileşen İçeriğinin Belirlenmesi

2.4.1 Propolisin Toplam Fenolik Madde İçeriğinin Belirlenmesi

Propolis ekstraktlarının, toplam fenolik madde miktarının belirlenmesinde Folin–Ciocalteu (FC) yöntemi kullanılmıştır [185]. Bu amaç için, hazırlanan tüm propolis ekstraklarından, deney tüpü içerisine 500 μL konulduktan sonra üzerine 2,5 mL 0,2 N Folin-Ciocalteu (FC) reaktifi ilave edilmiştir. Bu işlemden 3 dakika sonra, % 7.5 sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisinden 2 mL ilave edilip, 30 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olarak örnek yerine çözücü olarak kullanılan etanol, dimetilsülfoksit, propilen glikol ve distile su kullanılmıştır. Bu süre sonunda, örneklerin 760 nm'de UV- spektrofotometrede (Shimadzu UV-1800, Japonya) absorbansı okundu. Üç paralelli yapılan çalışmanın sonuçları mg/L GAE (gallik asit eşdeğeri) cinsinden belirlenmiştir.

Gallik asit standart grafiği elde edilirken, metanollü stok gallik asit çözeltisi oluşturulmuş, hazırlanan stok çözeltiden sırasıyla 20, 40, 60, 125, 250 ve 500 μL alınarak her bir kısıma 680 μL saf su ilave edilmiştir. Hazırlanan çözeltilerden 500 μL alınarak deney tüplerine 500 μL aktarıldıktan sonra üzerine 2,5 mL 0,2 N Folin-Ciocalteu (FC) reaktifi ilave edilmiştir. Bu işlemden 3 dakika sonra, % 7,5 sodyum karbonat (Na_2CO_3N) çözeltisinden 2 mL ilave edilip, 30 dakika oda

sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda, örneklerin 760 nm'de UV- spektrofotometrede (Shimadzu UV-1800, Japonya) absorbansı okunmuş ve grafiğe çevrilmiştir. Grafikten alınan formül yardımı ile propolis örneklerindeki toplam fenolik madde miktarı mg/L GAE olarak belirlenmiştir.

2.4.2 Propolisin Fenolik Bileşenlerinin HPLC ile Belirlenmesi

Ultrases uygulanan ve ultrases uygulanmayan propolis ekstraktlarının fenolik bileşenlerinin tespit edilmesinde, yüksek performanslı sıvı kromatografisinden (HPLC) yararlanılmıştır (Şekil 2.6). HPLC analizi, bir otomatik örnekleyici, kuaterner pompa ve UV dedektörü ile donatılmış HPLC sistemi üzerinde gerçekleştirilmiştir. Geleneksel ve ultrases destekli propolis ekstrelerinin münferit fenolik bileşikleri, bir diyot dizisine (HPLC-DAD, Shimadzu Corp., Kyoto, Japonya) birleştirilmiş ve HPLC ile belirlenmiştir. Tüm numuneler filtrasyondan sonra HPLC-UV / Vis sistemine enjekte edilmiştir. Propolis özleri, önceden degassing yapılmış mobil faz % 0,1 formik asit/su (A) ve % 0,1 formik asit/asetonitril (CH_3CN) (B) kullanılarak bir C18 kolonu (2 μm x 2,1 x 50 mm) ile 215 nm'de analiz edilmiştir.



Şekil 2.6 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

TPC analizinde kullanılmak üzere daha önce elde edilen ekstraktlar, önce santrifüjlenmiş ve Phenex-PTFE (4 mm, 0,45 m) şırınga filtreleri (Phenomenex, Torrance, CA, ABD) membran filtreden geçirilmiş 1 mL süzülmüş numune, bir HPLC sisteminde (LC-20AD pompası, SPDM20A DAD dedektörü, SIL-20A HT otomatik örnekleyici, CTO-10ASVP kolon fırını, DGU-20A5R degazör ve CMB-20A iletişim veri yolu modülü; (Shimadzu Corp., Kyoto, Japonya) cihaz programı ve kalibrasyon kontrolü yapıldıktan sonra kolona enjekte edilmiştir. Ayrımlar, ters fazlı bir kolon (Intersil® ODS C- 18, GL Sciences, Tokyo, Japonya) 250 mm x 4,6 mm uzunluğunda, 5 μm parçacık boyutunda olup, mobil fazlar çözücü A (% 0,1 (v / v) asetik asit ile

damıtık su) ve çözücü B (% 0,1 (v / v) ile asetonitril Gradyan elüsyonu % 10 B (0-2 dakika), % 10–30 B (2-27 dak),% 30–90 B (27-50 dak) ve % 90-100 B (51-60 dakika) ve 63 dakika sonra başlangıç koşullarına döner. Akış hızı 1 mL / dakika ve kolon fırını sıcaklığı 40 °C olacak şekilde ayarlanmıştır. Kromatogramlar 254-356 nm'de kaydedilmiştir. Tanımlama ve kantitatif analiz tutma sürelerine ve standart eğrilere göre yapılmıştır. Tek tek fenolik miktarların sonucu, tüm numuneler için mg/L olarak ifade edilmiştir [186].

Bu amaç için gallik asit, protokateknik asit, kateşin, p-hidroksibenzoik asit, sirinjik, ellajik, m-kumarik, o-kumarik, p-kumarik, krisin, kafeik asit, ferülik asit, mirisetin, kuersetin ve kaempferole ait fenolik standartları temin edilmiştir. Üç tekrarlı olacak şekilde yapılan çalışmada her bir örnek için kromatogram elde edilmiştir. Kromotogramlarda yer alan piklere ait noktalar örnek içeriğini ppm cinsinden hesaplanmasına yardımcı olmuştur. Değerlerin altındaki sonuçlar için mevcut değildir ifadesi olarak "nd" kullanılmıştır.

2.4.3 Propolisin Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi

Propolislerin antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) serbest radikal giderim yöntemi kullanılmıştır [187]. Ekstrakte edilmiş örnekler 3 paralelli olarak 100 kat seyreltildikten sonra 0,1 mL örnek, 4,9 mL DPPH (0,025 g/L metanol) çözeltisi ile karıştırılmıştır. Kontrol olarak örnek yerine çözücü olarak kullanılan etanol, dimetilsülfoksit, propilen glikol ve distile su kullanılmıştır. Örnekler vortekslenmiş ve 27 °C'de 20 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örneklerin, 517 nm'de UV- spektrofotometrede (Shimadzu UV-1800, Japonya) absorbansı okunmuştur. Sonuçlar antiradikal aktivite (% ARA) değeri ve mg/L trolox cinsinden belirlenmiştir.

2.5 Propolisin Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi

Propolis örneklerinin (ultrases uygulanan ve uygulanmayan); *Escherichia coli* 0157H7 (ATCC®43888), *Listeria monocytogenes* (ATCC®13932), *Salmonella typhimurium* (ATCC®14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC®29213), *Streptococcus mutans* UA159 (ATCC®700610), *Candida albicans* (ATCC® 10251), *Penicillium carneum* (IBT14®042), *Aspergillus flavus* (ATCC®15517) ve *Aspergillus niger* (ATCC®9642) üzerine antimikrobiyal özellikleri çalışılmıştır. Antimikrobiyal aktivite değerleri ve örneklerinin etki ettiği minimum inhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesinde agar difüzyon metodu kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan test mikroorganizmaları Namık Kemal Üniversitesi ve Yıldız Teknik

Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümleri Laboratuvarlarından temin edilmiştir.

2.5.1 Mikroorganizma Kültürlerinin Hazırlanması

2.5.1.1 Besiyerlerinin Hazırlanması

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde kullanılan agar difüzyon yönteminde öncelikle kültürler aktifleştirilmiştir. Kullanılacak olan mikroorganizma kültürlerini aktifleştirmede bakteriler için Nutrient Agar (NA) ve Nutrient Broth (NB), mayalar için DRBC Agar (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar) ve küf kültürlerini aktifleştirmek için Patates Dekstroz Agar (Potato Dextrose Agar, PDA) ve Malt Extract Broth (MEB) besiyerleri kullanılmıştır.

Çalışmada bakteri kültürleri (*Escherichia coli* 0157H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Tyhpimurium, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* UA159) için kullanılacak olan steril NA besiyeri, 20 g/1000 mL saf su olacak şekilde erlen mayerler içerisinde 500 mL hazırlanmış ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Maya (*Candida albicans*) için kullanılacak olan steril DRBC Agar (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar) besiyeri 31,6 g/L steril su olacak şekilde 250 mL hazırlanmış ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir.

Küf kültürleri için kullanılan PDA (Patates Dekstroz Agar) besi yeri 39 g / 1000 mL saf su oranı göz önüne alınarak 500 mL'lik hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Otoklavdan alınan besiyerinin sıcaklığı 50 °C iken içerisine 7 mL steril tartarik asit çözeltisi (% 10) ilave edilmiştir. Otoklavlanan tüm besiyerleri 45 °C sıcaklığa soğutulduktan sonra steril kabin içerisinde deneme desenine uygun olarak hazırlanmış ve numaralandırılmış steril plastik petri kutularına 15 mL olacak şekilde dökülmüştür.

Kültürlerin aktifleştirilmesinde bakteriler için steril NB besiyeri, 8,0 g/L saf su olacak şekilde 100 mL hazırlandı. Hazırlanan NB besiyeri 5'er mL olacak şekilde tüplere dağıtılarak 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Maya ve küfler için steril MEB besiyeri, 17 g/L saf su olacak şekilde 100 mL hazırlanmış ve tüplere dağıtıldıktan sonra, otoklavda 115 °C'de 10 dakika sterilize edilmiştir.

2.5.1.2 Mikroorganizma Kültürlerinin Üretilmesi

Stok kültürlerden alınan bakteri kültürleri, tek koloni düşürme yöntemi ile NA besiyerine ekilmiş ve 37 °C'de 24 saat etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrilerde üreyen bakterilerden tek koloni alınarak içerisinde Nutrient

broth bulunan tüplere inoküle edilmiştir. İnokülayonun ardından 37°C'de 24 saat etüvde inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda nutrient brothda bulanıklık gözlenen brothlar vortekslendikten sonra steril kabin içerisinde önceden hazırlanan steril NA besiyerlerine yine steril pipetler yardımı ile 100 μL alınarak homojen şekilde yayılmıştır. Ardından 5-10 dakika süre ile oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Stok kültürlerden alınan maya kültürü, tek koloni düşürme yöntemi ile DRBC besiyerine ekilmiş ve 27°C'de 72 saat etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrilerde üreyen maya kültüründen tek koloni alınarak içerisinde malt extract broth bulunan tüplere inoküle edilmiştir. İnokülayonun ardından 127°C'de 72 saat etüvde inkübe edilmiş, bulanıklık gözlenen brothlar vortekslendikten sonra steril kabin içerisinde önceden hazırlanan steril DRBC besiyerlerine yine steril pipetler yardımı ile 100 μL alınarak homojen şekilde yayılmıştır. Ardından 5-10 dakika süre ile oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Stok kültürlerden alınan küf kültürleri, tek koloni düşürme yöntemi ile PDA besiyerine ekilmiş ve 27°C'de 72 saat etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrilerde üreyen küf kültüründen tek koloni alınarak içerisinde malt extract broth bulunan tüplere inoküle edilmiştir. İnokülayonun ardından 27°C'de 72 saat etüvde inkübe edilmiş, 72 saatin sonunda bulanıklık gözlenen brothlar vortekslendikten sonra steril kabin içerisinde önceden hazırlanan steril PDA besiyerlerine yine steril pipetler yardımı ile 100 μL alınarak homojen şekilde yayılmıştır. Ardından 5-10 dakika süre ile oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

2.5.2 Agar Difüzyon Yöntemi İle Propolis Ekstraktlarının Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakteri kültürleri için 100 μL ekim yapılarak kurumaya bırakılan Nutrient Agar (NA) besiyerleri üzerine belli aralıklarla 1 numaralı korkbor ile delik açılmıştır. Açılan deliklere, 10'ar μL propolis ekstraktları ve kontrol olarak propolis ekstraksiyonunda kullanılan çözücüler ilave edildikten sonra 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, deliklerin çevresinde oluşan inhibisyon zonları kumpasla ölçülmüştür. Ölçülen zonlar mm cinsinden ifade edilmiştir.

Maya kültürü için DRBC Agar (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar) besiyeri üzerine yüzeye yayma metodu kullanılarak 100 μL ekim yapıldıktan sonra besiyeri üzerine belli aralıklarla 1 numaralı korkbor ile delik açılmıştır. Açılan deliklere, 10'ar μL propolis ekstraktları ve kontrol olarak propolis ekstraksiyonunda kullanılan çözücüler ilave edildikten sonra 27°C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, deliklerin çevresinde oluşan inhibisyon zonları kumpasla

ölçülmüştür. Ölçülen zonlar mm cinsinden ifade edilmiştir.

Küf kültürleri için PDA (Potato Dextrose Agar) besiyeri üzerine üzerine yüzeye yayma metodu kullanılarak 100 μL ekim yapıldıktan sonra besiyeri üzerine belli aralıklarla 1 numaralı korkbor ile delik açılmıştır. Açılan deliklere, 10'ar μL propolis ekstraktları ve kontrol olarak propolis ekstraksiyonunda kullanılan çözücüler ilave edildikten sonra 27 °C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, deliklerin çevresinde oluşan inhibisyon zonları kumpasla ölçülmüştür. Ölçülen zonlar mm cinsinden ifade edilmiştir. Tüm test mikroorganizmalarına karşı yapılan antimikrobiyal aktivite deneyleri üç tekrarlı olarak çalışılmıştır.

2.5.3 Propolis Ekstraktlarının Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının (MİK) Belirlenmesi

Propolisin farklı çözücülerle yapılmış ekstraktlarının minimum inhibisyon konsantrasyonlarının (MİK) belirlenmesinde, antimikrobiyal aktivite belirlemede kullanılan mikroorganizma kültürleri ve besiyerleri kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan mikroorganizma kültürlerinin içerisinde gelişmiş olduğu steril besiyerlerine belli aralıklarla 1 numaralı korkbor ile delik açılmıştır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 Propolis ekstraktlarının test mikroorganizmaları üzerine minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi için hazırlanan besiyerleri

Propolis ekstraktları her bir çözücü ve kullanılan yöntem olmak üzere ayrı ayrı 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} konsantrasyonlarda seyreltilerek hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan farklı konsantrasyondaki çözücülerin her biri ile birlikte kontrol olarak ekstraktlardaki çözücü maddelerden (etanol, DMSO, PG, distile su) 10'ar μL alınmıştır. Alınan numuneler steril kabin içerisinde uygun besi yerlerinde korkbor ile açılmış

deliklere aktarılmıştır. Aktarma işleminin ardından ekstraktların minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi için besiyerleri bakteriler için 37 °C'de 24 saat, maya ve küfler için 27 °C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, deliklerin çevresinde oluşan inhibisyon zonları kumpasla ölçülmüştür. Ölçülen zonlar mm cinsinden ifade edilmiştir. Tüm test mikroorganizmalarına karşı yapılan antimikrobiyal aktivite deneyleri iki tekrarlı olarak çalışılmıştır.

2.6 Propolis Ekstraktlarının Enkapsüle Edilmesi

2.6.1 Propolis Ekstraktlarının Enkapsülasyona Hazırlanması

Propolis ekstraktlarının enkapsülasyonunda yalnızca sulu örnekler kullanılmıştır. Diğer örnekler uygulanacak olan yönteme uygun olmadığı için kullanılmamıştır. Enkapsülasyonda kaplama materyali olarak arap zamkı kullanılmıştır. Her bir sistemde 100 mL propolis ekstraktlarına 20 g arap zamkı eklenmiştir. Kontrol olarak propolis örnekli çözeltiler yerine saf su kullanılmıştır. Sistemler Ultra-Turrax T18 (IKA, Königswinter, Germany) kullanılarak 15,000 rpm de 2 dakika boyunca homojenize edilmiştir.

2.6.2 Propolis Ekstraktlarının Dondurarak Kurutucu (Freze Dryer) ile Enkapsüle Edilmesi

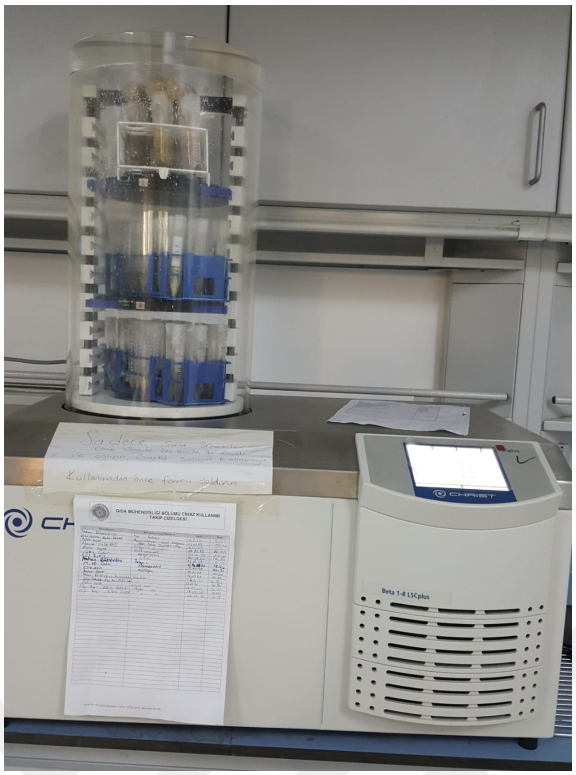
Homojenize edilmiş örnekler uygun kaplara alındıktan sonra −80 °C'deki dondurucuda 18 saat dondurulmuştur. Dondurulmuş ürünler bu sürenin sonunda dondurucudan alınarak dondurarak kurutucuda (Christ Beta 1-8 LSC plus, Almanya) −60 °C'deki serpantin sıcaklığı ve 0,1 mbar basınçta kurutulmuştur (Şekil 2.8). Kurutulmuş haldeki ürünler nem kapmaması ve oksijen ile temasının önlenmesi için uygun kaplara alınarak +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.6.3 Enkapsüle Edilmiş Propolislerin Enkapsülasyon Verimliliğinin Belirlenmesi

Dondurarak kurutma yöntemi ile elde edilen sulu propolis ekstraktlarının verimliliğinin belirlenmesinde, aşağıdaki eşitlikten faydalanılmıştır (Eşitlik 2.1).

$$EV = (UM/KM) * 100 \tag{2.1}$$

EV: Enkapsülasyon verimi (%) ÜM: Son ürün miktarı (g) KM: Karışımdaki kurumadde miktarı (g)



Şekil 2.8 Dondurarak kurutucu (Freeze Dryer)

2.6.4 Enkapsüle Edilmiş Propolislerin Mikroyapısal Özelliklerinin Belirlenmesi

Optimum şartlar kullanılarak üretilen enkapsüle propolislerin mikroyapısal özelliklerinin belirlenmesi amacı ile Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarlarında Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Örnekler, dondurarak kurutucuda arap zamkı tabakasıyla kaplandıktan sonra Zeiss EVO® LS 10 model SEM (Almanya) cihazında görüntülenmiştir. Analiz için katı toz numunelerden 100 mg tartılarak gerçekleştirilmiştir.

2.7 Enkapsüle Edilmiş Propolis Ekstraktlarının Balda Kullanılması

Enkapsüle edilen propolis örnekleri model gıda olarak çam balında karıştırılarak kullanılmıştır. Her bir kapsüle edilmiş örnekten, karışımda % 0,1 % 0,3 ve % 0,5 oranında kapsüllenmiş propolis ekstraktı bulunacak şekilde, 100 g bala ilave edilmiştir. Ardından 15000 rpm'de 2 dakika Ultra-Turrax kullanılarak homojenize edilmiştir. Bütün örnekler analizlere kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.7.1 Baldaki Enkapsüle Edilmiş Propolislerin Fenolik Özelliklerinin Belirlenmesi

Enkapsüle edilmiş propolis içeren ballı karışımların, toplam fenolik madde miktarının belirlenmesinde Folin–Ciocalteu (FC) yöntemi kullanılmıştır [185]. Bu amaç için, hazırlanan tüm enkapsüle propolisli ballı karışımlar 1:10 oranında saf su ile seyreltilmiştir. Seyreltilen örneklerden deney tüpü içerisine 500 μL konulduktan sonra üzerine 2,5 mL 0,2 N Folin-Ciocalteu (FC) reaktifi ilave edilmiştir. Bu işlemden 3 dakika sonra, % 7,5 sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisinden 2 mL ilave edilip, 30 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olarak örnek yerine çözücü olarak saf su kullanılmıştır. Bu süre sonunda, örneklerin 760 nm'de UV- spektrofotometrede (Shimadzu UV-1800, Japonya) absorbansı okunmuştur. Çalışma üç paralelli yapılmış olup, sonuçlar mg/L GAE (gallik asit eşdeğeri) cinsinden belirlenmiştir.

2.7.2 Baldaki Enkapsüle Edilmiş Propolislerin Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi

Enkapsüle edilmiş propolis içeren ballı karışımların, antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) serbest radikal giderim yöntemi kullanılmıştır [187]. Bu amaç için, hazırlanan tüm enkapsüle propolisli ballı karışımlar 1:10 oranında saf su ile seyreltilmiştir. Seyreltilen örneklerden daha sonra 0,1 mL alınarak, 4,9 mL DPPH (0,025 g/L metanol) çözeltisi ile karıştırılmış, kontrol olarak örnek yerine çözücü olarak saf su kullanılmıştır. Örnekler vortekslenmiş ve 27 °C'de 20 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda üç paralelli çalışılan örneklerin, 517 nm'de UV- spektrofotometrede (Shimadzu UV-1800, Japonya) absorbansı okunmuştur. Sonuçlar antiradikal aktivite (% ARA) değeri ve mg/L trolox cinsinden belirlenmiştir.

2.7.3 Baldaki Enkapsüle Edilmiş Propolislerin Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi

Enkapsüle edilmiş propolis içeren ballı karışımların, *Escherichia coli* 0157H7 (ATCC®43888), *Listeria monocytogenes* (ATCC®13932), *Salmonella typhimurium* (ATCC®14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC®29213), *Streptococcus mutans* UA159 (ATCC®700610), *Candida albicans* (ATCC®10251), *Penicillium carneum* (IBT14®042), *Aspergillus flavus* (ATCC®15517) ve *Aspergillus niger* (ATCC®9642) üzerine antimikrobiyal özellikleri çalışılmıştır. Antimikrobiyal aktivite değerlerinin belirlenmesinde agar difüzyon metodu kullanılmıştır.

Hazırlanan *Escherichia coli* 0157H7 (ATCC®43888), *Listeria monocytogenes* (ATCC®13932), *Salmonella typhimurium* (ATCC®14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC®29213) ve *Streptococcus mutans* UA159 (ATCC®700610) kültürleri için 100 μL ekim yapılarak kurumaya bırakılan Nutrient Agar (NA) besiyerleri üzerine belli aralıklarla 1 numaralı korkbor ile delik açılmıştır. Açılan deliklere, 1:10 oranında saf su ile seyreltilmiş enkapsüle propolisli ballı karışımlardan 10'ar μL ve kontrol olarak saf sudan 10 μL ilave edildikten sonra 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, deliklerin çevresinde oluşan inhibisyon zonları kumpasla ölçülmüştür. Ölçülen zonlar mm cinsinden ifade edilmiştir.

Maya kültürü için DRBC Agar (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar) besiyeri üzerine yüzeye yayma metodu kullanılarak 100 μL ekim yapıldıktan sonra besiyeri üzerine belli aralıklarla 1 numaralı korkbor ile delik açılmıştır. Açılan deliklere 1:10 oranında saf su ile seyreltilmiş enkapsüle propolisli ballı karışımlardan 10'ar μL ve kontrol olarak saf sudan 10 μL ilave edildikten sonra 27°C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, deliklerin çevresinde oluşan inhibisyon zonları kumpasla ölçülmüştür. Ölçülen zonlar mm cinsinden ifade edilmiştir.

Küf kültürleri için PDA (Potato Dextrose Agar) besiyeri üzerine üzerine yüzeye yayma metodu kullanılarak 100 μL ekim yapıldıktan sonra besiyeri üzerine belli aralıklarla 1 numaralı korkbor ile delik açılmıştır. Açılan deliklere, 1:10 oranında saf su ile seyreltilmiş enkapsüle propolisli ballı karışımlardan 10'ar μL ve kontrol olarak saf sudan 10 μL ilave edildikten sonra 27°C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, deliklerin çevresinde oluşan inhibisyon zonları kumpasla ölçülmüştür.Ölçülen zonlar mm cinsinden ifade edilmiştir.

Tüm test mikroorganizmalarına karşı yapılan antimikrobiyal aktivite deneyleri üç tekrarlı olarak çalışılmıştır.

2.7.4 Enkapsüle Propolis İlave Edilmiş Balların Duyusal Analizi

Dondurarak kurutma yöntemi ile enkapsüle edilmiş propolis ekstraktları balda denenerek panelistlerin beğenisine sunulmuştur. Bu amaçla hiçbir işlem uygulanmamış ve enkapsüle edilmiş propolis içeren ballı karışım örnekleri koku, renk, tat ve doku açısından değerlendirilmiştir. Duyusal analiz, Yıldız Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde hem lisansüstü öğrenciler hem de öğretim üyeleri arasından seçilen 10 panelist tarafından gerçekleştirilmiştir. Değerlendirme skalası; 5: mükemmel, 4: iyi, 3: kabul edilebilir, 2: kötü (neredeyse kabul edilemez), 1: kabul edilemez şeklinde kullanılarak değerlendirildi. Değerlendirilen örneklerin

sonuçları tabloda gösterilmiştir.

2.8 İstatiksel Analiz

Propolis ekstraksiyonunda optimum koşullarda ekstraktların elde edilmesi için yüzey yanıt yöntemi (RSM) içeren Design-Expert 7.0.0 yazılımında Box-Behnken dizaynı kullanılmıştır. Bu yöntem kullanılırken propolis ekstraksiyonunun üç faktörlü-üç seviyeli deneysel tasarımı ve optimum ekstraksiyon yöntemleri belirlenmeye çalışılmıştır. Dizayndaki üç faktör ve seviyeleri; ekstraksiyon sıcaklığı: -1 (30 °C), 0 (45 °C), 1 (60 °C), ekstraksiyon süresi: -1 (1 dakika), 0 (2 dakika), 1 (3 dakika) ve ultrases gücü: -1 (250W), 0 (500W), 1 (750W) olarak belirlenmiştir. Kullanılan her bir çözücü için 17 kombinasyon elde edilmiştir. Dizaynda yanıt olarak toplam fenolik bileşen içerine (mg/L Gallik asit eşdeğeri) bakılmıştır. Sonuçlara regresyon ve varyans analizi (ANOVA) uygulanmış ve üç boyutlu grafikler elde edilmiştir.

Ekstraksiyon yöntemleri ve çözücü tiplerinin TPC, DPPH ve fenolik bileşikler üzerindeki etkisi ANOVA ile belirlenmiştir. Tüm analizler üç kez ve ortalama olarak yapılmış ve standart sapmayla birlikte verilmiştir. Ortalama değerleri karşılaştırmak için Duncan çoklu test aralığı kullanıldmıştır. $P < 0{,}05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel analizler, Statistica yazılım programı (StatSoft Inc., OK, ABD) kullanılarak yapılmıştır.

3
BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 Propolis Ekstraktlarının Spektroskopik Metotlar ile Karakterizasyonu

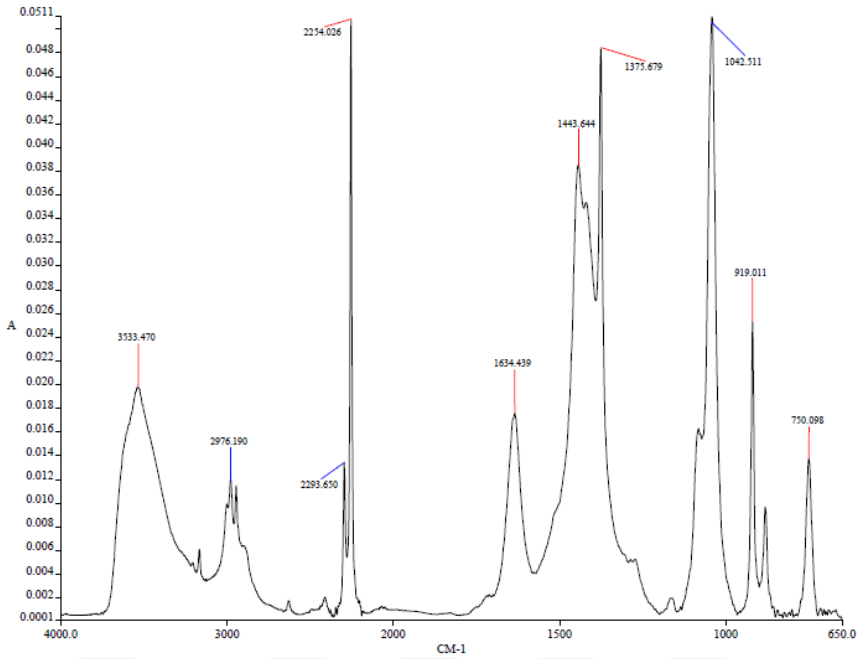
3.1.1 FTIR Spektroskopisi ile Propolis Ekstraktlarının Karakterizasyonu

Propolis örneklerinin klasik çözücü ve optimum ultrases destekli ekstraktlarına ait toplam sekiz örneğin FTIR spektrumları, ATR tekniği ile 4000-650 cm^{-1} dalga boyu aralığında FTIR spektrometresi ile elde edilmiştir (Şekil 1, Şekil 2, Şekil 3, Şekil 4, Şekil 5, Şekil 6, Şekil 7, ve Şekil 8). Propolis örnekleri çözücüye ve uygulanan ekstraksiyon yöntemine bağlı olarak farklı karakteristik özelliklerdeki FTIR spektrumlarına sahiptirler. Farklı propolis numunelerinde yaklaşık olarak aynı dalga boyu aralığındaki bantlar da tanımlanmıştır. Bu nedenle, fenolik bileşikleri ayırt etmek için spesifik bantları incelemek gerekir. Özellikle C – OH, C = O, C = C ve CH titreşimleri, fenolik bileşikler için FTIR spektrumunun değerlendirilmesinde çok faydalı bilgiler sağlayabilir.

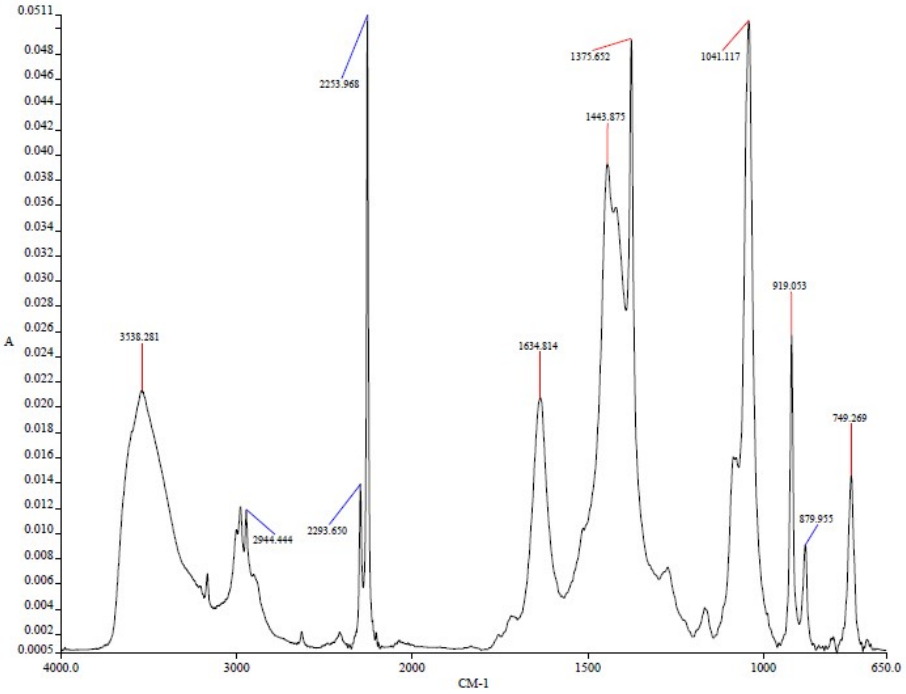
Propolis ekstraktlarının spektrumlarında alifatik C – H ve OH emilimini içeren 4000-2000 bölgesinde gözlemlenen bant, polifenolik bileşikler hakkında sınırlı bilgi vermektedir. Etanollü ve propilen glikollü propolis ekstraktlarında 3500 cm^{-1} bölgesinde, OH fonksiyonel grubunun emilimini temsil eden çok yoğun bir bant mevcuttur [188]. Bu bant propolislerde çözücü olarak kullanılan alkollerden kaynaklanmaktadır.

Propolis ekstraktlarının sulu çözeltilerinde 3366 cm^{-1} ve 3273 cm^{-1} bölgesinde hidroksil (OH) gruplarıyla ilgili olan alanda, 3315 cm^{-1}'de [189] bir bant mevcuttur. Bu bant propolislerde çözücü olarak kullanılan sudan kaynaklanmaktadır. 3000-2800 cm^{-1} aralığı ise, C - H'nin asimetrik ve simetrik germe modlarına bağlı bantların yani metil ve metilen gruplarının bulunduğu bölgedir [117].

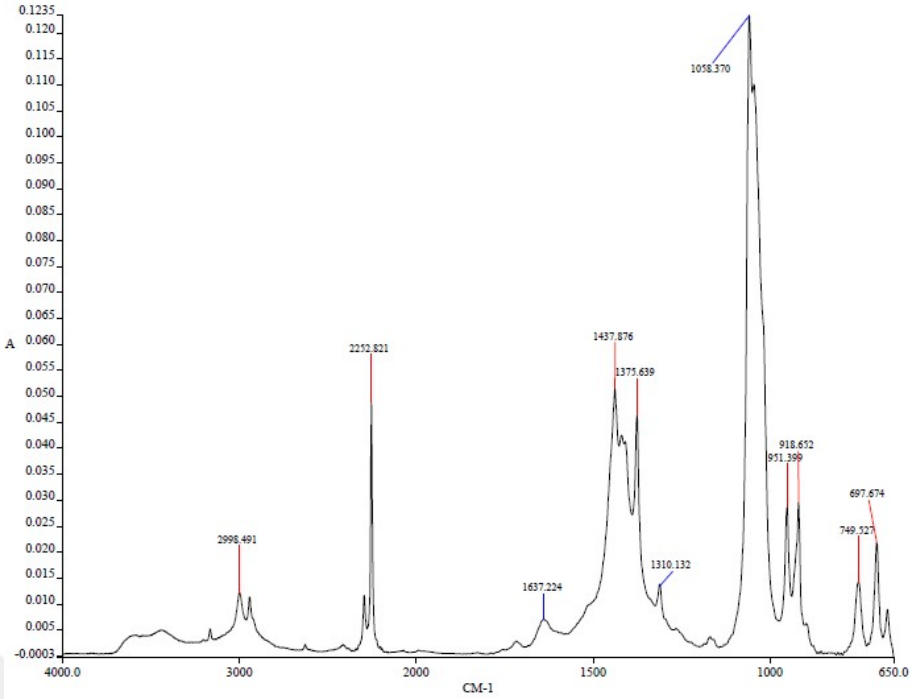
Propolislerin farklı çözücülerdeki 1634 cm^{-1}, 1635 cm^{-1}, 1637 cm^{-1} ve 1639 cm^{-1}'de bulunan bantlar karbonil grubunun gerilme titreşiminden oluşan C = O,



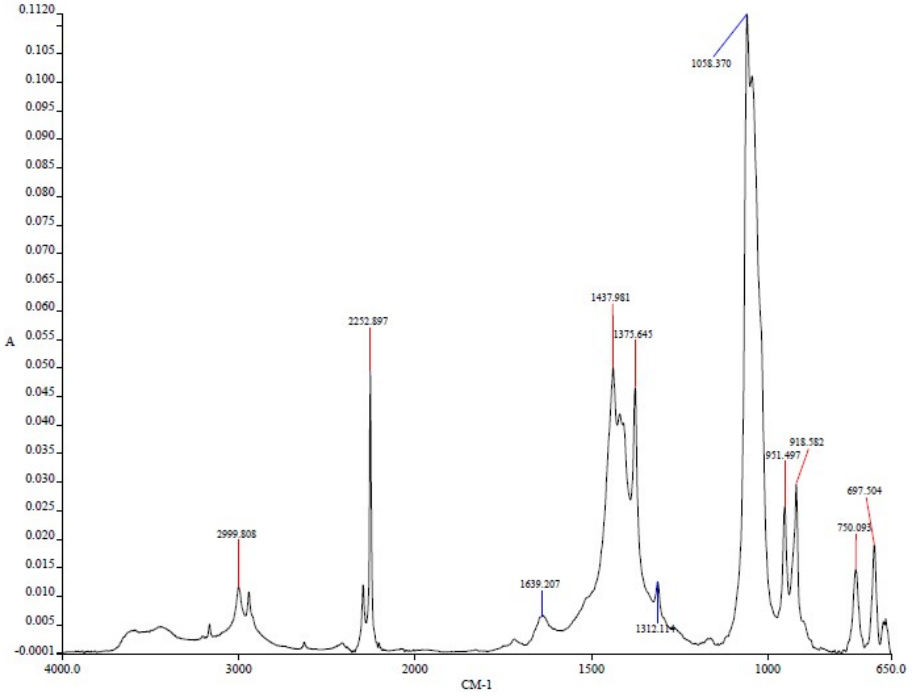
Şekil 3.1 Propolisin etanollü klasik çözücü ekstraksiyon örneklerinin FTIR ile belirlenen spektrumları



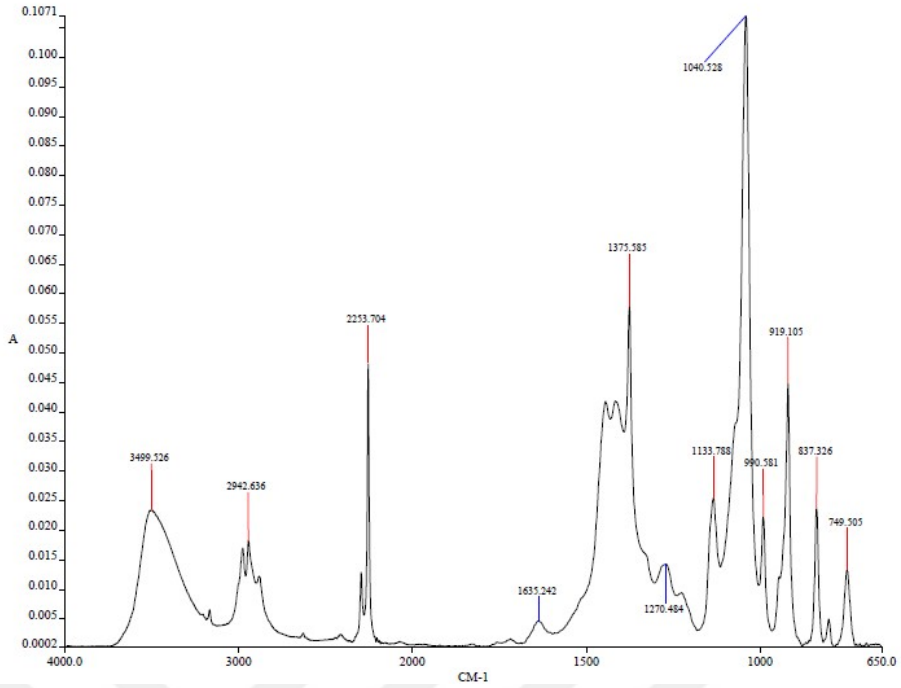
Şekil 3.2 Propolisin etanollü ultrases destekli ekstraksiyon örneklerinin FTIR ile belirlenen spektrumları



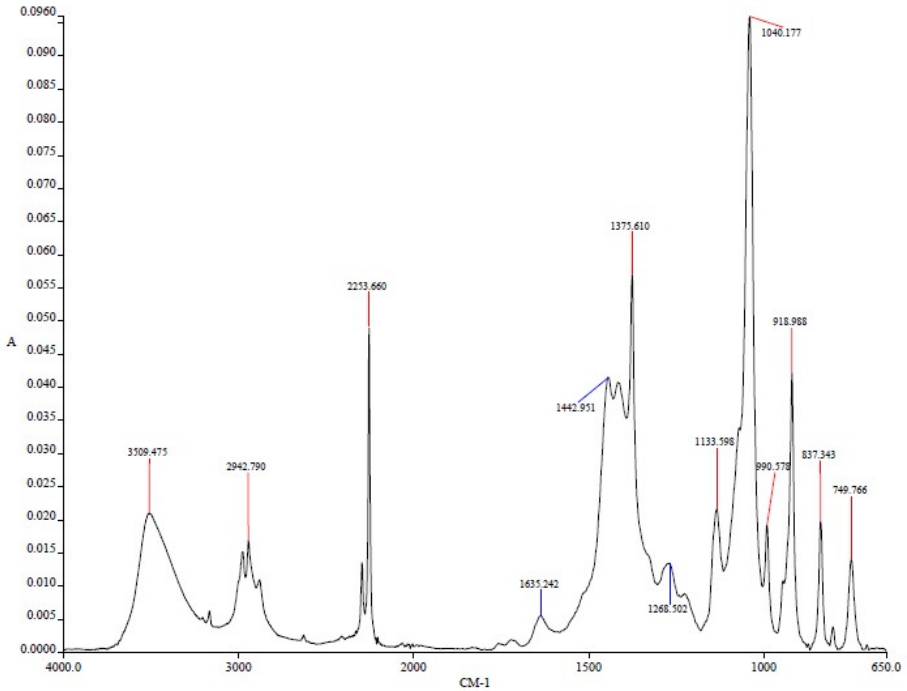
Şekil 3.3 Propolisin DMSO'lu klasik çözücü ekstraksiyon örneklerinin FTIR ile belirlenen spektrumları



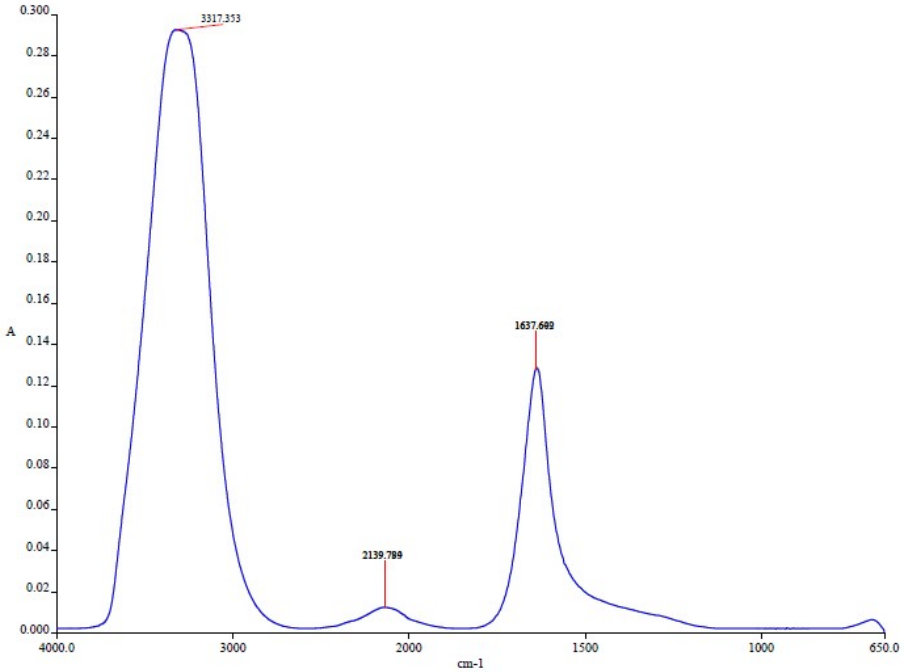
Şekil 3.4 Propolisin DMSO'lu ultrases destekli ekstraksiyon örneklerinin FTIR ile belirlenen spektrumları



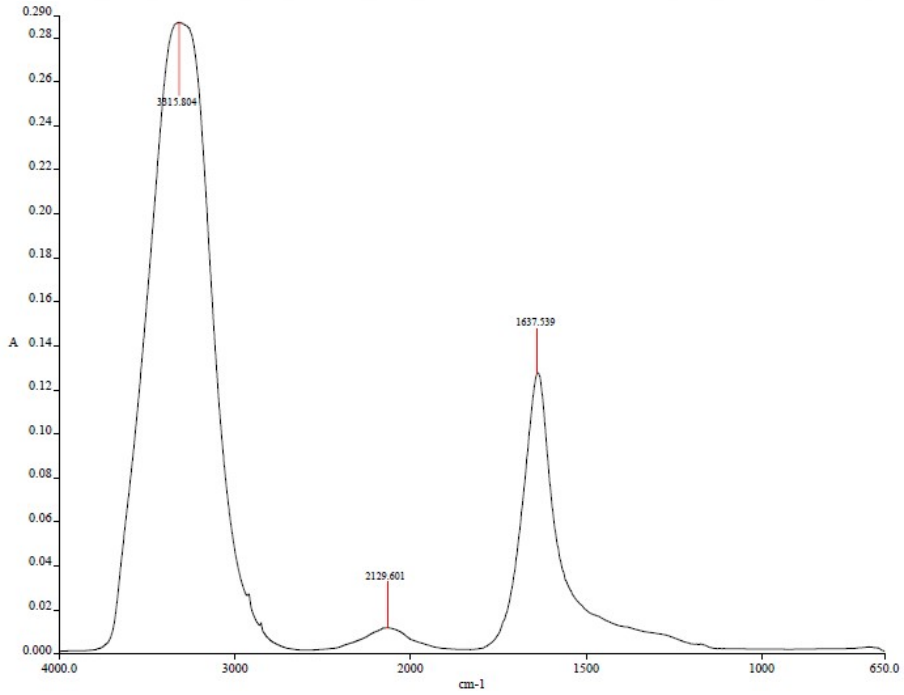
Şekil 3.5 Propolisin PG'li klasik çözücü ekstraksiyon örneklerinin FTIR ile belirlenen spektrumları



Şekil 3.6 Propolisin PG'li ultrases destekli ekstraksiyon örneklerinin FTIR ile belirlenen spektrumları



Şekil 3.7 Propolisin sulu klasik çözücü ekstraksiyon örneklerinin FTIR ile belirlenen spektrumları



Şekil 3.8 Propolisin sulu ultrases destekli ekstraksiyon örneklerinin FTIR ile belirlenen spektrumları

aromatik halkaların gerilmesinden oluşan C = C ve NH'nin asimetrik bükülme titreşimi bantlarının bulunduğu bölge 1680-1600 cm^{-1} arasındadır [188, 190]. Bu bant flavonoidleri ayırt etmede çok önemlidir. Bu bant tüm çözücülerde gözlenmiştir. Aynı bantlar, Küba kırmızı propolislerinde de mevcuttur [191]. Bu bağlar propolisteki aromatik halkaları [192], flavonoidler ve amino asitleri [193], kafeik asit ve türevlerini [194] ve lipit ve flavonoidlerin varlığını ortaya koymaktadır.

Sulu çözücüler dışındaki propolis ekstraktlarında görülen 1437-1443 cm^{-1} arasındaki bantlar C - H'nin (CH_3, CH_2) bükülme (δ) titreşimi, flavonoidler ve aromatik halkalarla ilişkili olabilir [195]. PG'li propolis çözeltilerinde bulunan 1268 cm^{-1}'deki bant, hidroksiflavonoidler gibi C-O poliol grubunun titreşiminden kaynaklanmaktadır [196].

1375 cm^{-1}'deki bant, fenol halkasının C-OH deformasyon titreşimi ile ilgilidir. 1300 ve 1000 cm^{-1} arasındaki bantlar, çoğunlukla propolis ekstraktlarında bulunan fenolik asitler ve flavonoidlerdeki fonksiyonel grup olan alkoller, eterler, esterler ve karboksilik asitlerden kaynaklanan C – O germe ve C-OH bükülmesini temsil eder [191, 197–201] 1060-1040 cm^{-1}'deki bant aralığı lipitler ve alkol grupları (ikincil alkoller, C-O'nun gerilmesi ve C-OH'nin bükülmesi) oluştuğu düşünülmüştür [189].

900-690 cm^{-1} aralığında, fenolik bileşiklere bağlı olarak aromatik halkalardan C – H'nin gerilme ve bükülme titreşimleriyle ilgili bantlar görülebilir [202, 203]. Bu fonksiyonel grupların polifenollerin kimyasal yapıları üzerindeki varlığı ve dağılımı antioksidan özelliklerine ve biyoyararlılıklarına etki eder. Bu nedenle FT-IR, propolisten ekstrakte edilen fenolik bileşiklerin tanımlanmasında kullanılabilir.

Elde edilen spektrumlara bakıldığında kullanılan aynı propolis örneği için farklılıkların gözlenmesi bileşen içeriğindeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Bu farklılıkları ortaya çıkaran ekstraksiyon işlemi için kullanılan çözücüler ve ekstraksiyon yöntemleridir. Bu işlem sayesinde propolise uygulanacak olan ekstraksiyon işlemlerinde seçilen çözücünün ve ektraksiyon yönteminin propolisin bileşen içeriğine önemli etkisi olduğu saptanmıştır.

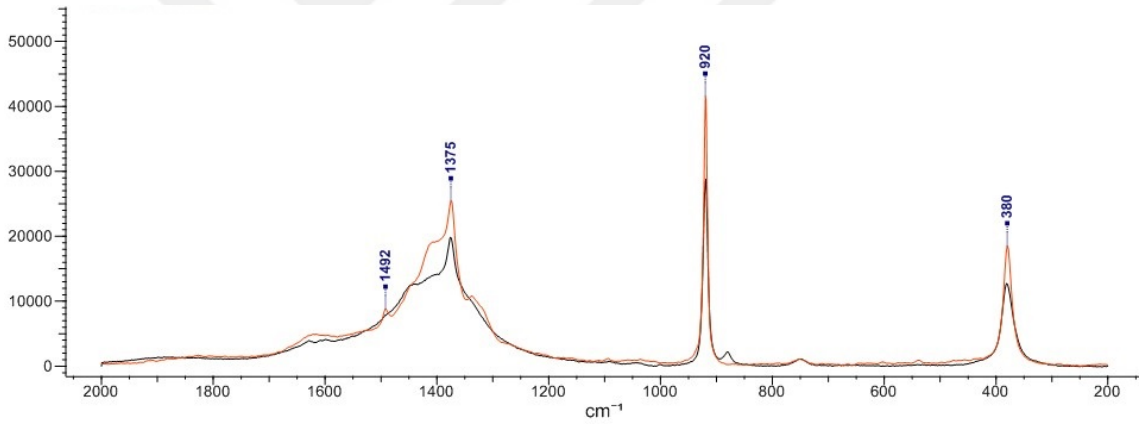
3.1.2 Raman Spektroskopisi ile Propolis Ekstraktlarının Karakterizasyonu

Moleküler titreşimlerin ölçüldüğü Raman spektrometresinde, propolisin içeriğinde bulunan kimyasal bileşenlerin tespiti ve bağ yapıları hakkında bilgi edinilmektedir. Çalışma kapsamında Raman Spektroskopisinin kullanılmasının nedeni ATR FTIR tekniği kullanılarak tespit edilemeyen spektral bilgiye ulaşabilmektir. ATR FTIR tekniği kullanılarak propolisler çözücülere göre ayırt edilebilse de parmak izi

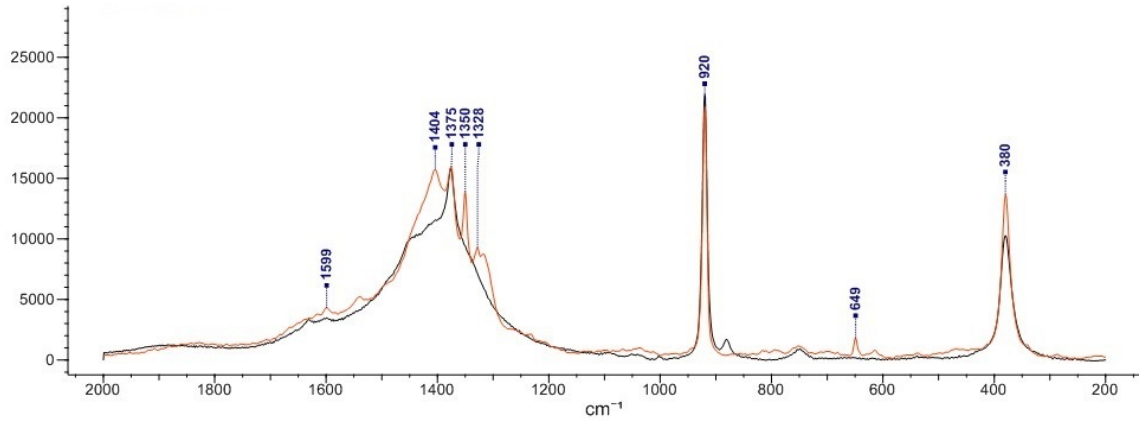
oluşturması bakımından spektral bantlar tespit edilememiştir. Bu nedenle Raman spektroskopisinden faydalanılmıştır.

Propolis örneklerinin klasik çözücü ve optimum ultrases destekli ekstraktlarına ait toplam sekiz örneğin Raman spektroskopisindeki spektrumları ayrı ayrı belirlenmiştir (Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11, Şekil 3.12, Şekil 3.13, Şekil 3.14, Şekil 3.15, Şekil 3.16). Propolisin etanollü çözücüdeki spektrumları literatürde bulunmaktadır [118]. Ancak propoliste kullanılan farklı çözücülere göre spektral özellikler farklılık göstermektedir. Özellikle DMSO'lu çözücülü propolislere ait spektrumların diğer çözücülerde çözünen ham propolislerin spektrumlarından daha fazla pike sahip olduğu belirlenmiştir.

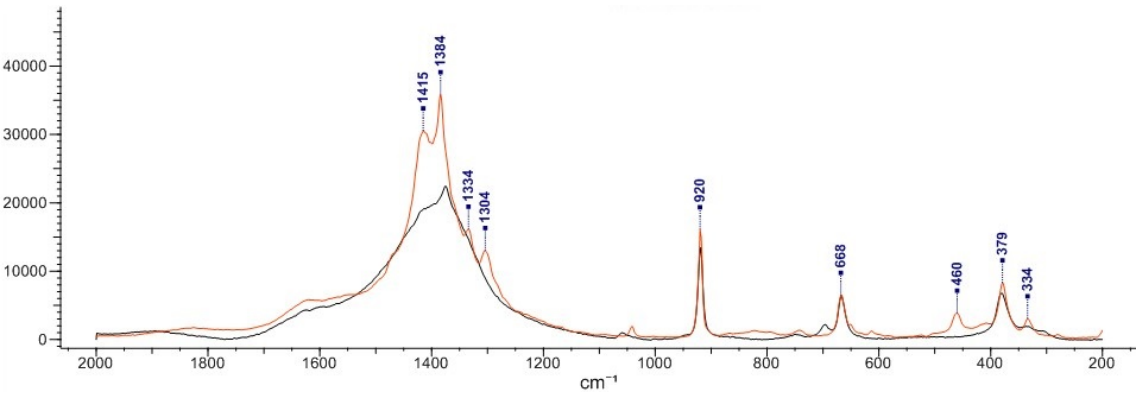
Ekatraksiyonda ultrases desteğinin kullanılmasının etkileri Raman cihazından elde edilen spektrumlarda kendini ortaya koymaktadır. Ultrases destekli ekstraksiyon sayesinde propolis içerisindeki bileşenler daha iyi çözünerek spektrumda farklı pik oluşturmuşlardır.



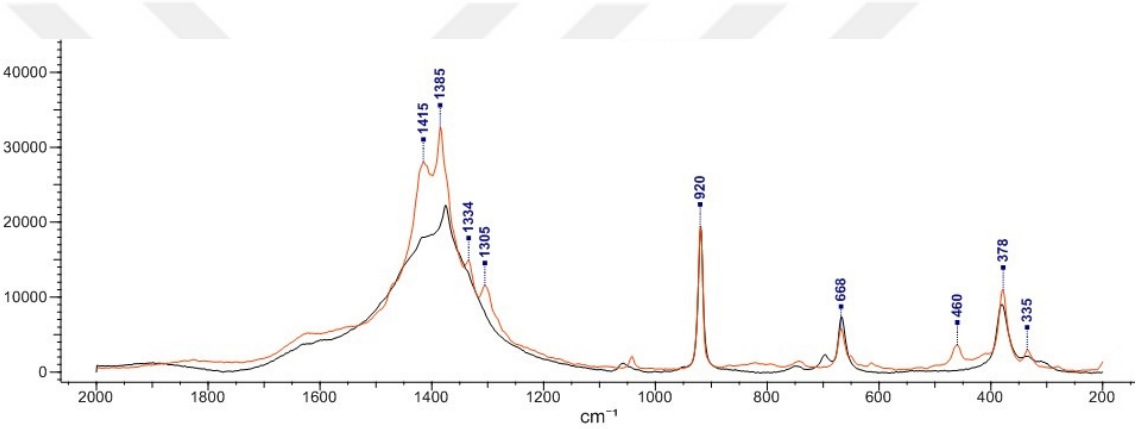
Şekil 3.9 Propolisin etanollü klasik çözücü ekstraksiyon örneklerine ait Raman spektrumu



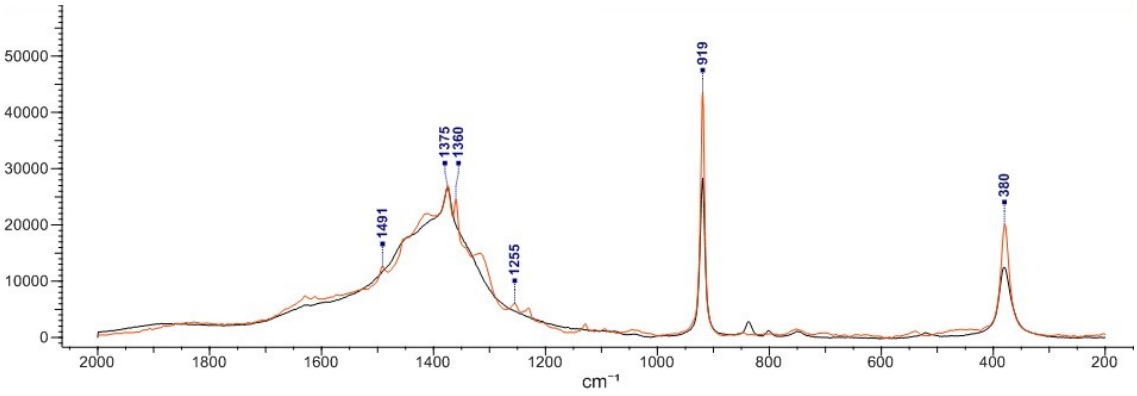
Şekil 3.10 Propolisin etanollü ultrases destekli ekstraksiyon örneklerine ait Raman spektrumu



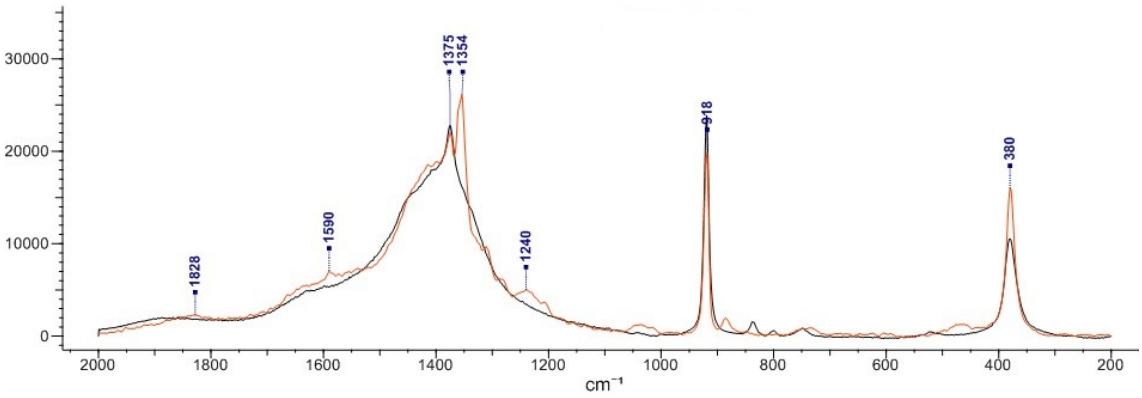
Şekil 3.11 Propolisin DMSO'lu klasik çözücü ekstraksiyon örneklerine ait Raman spektrumu



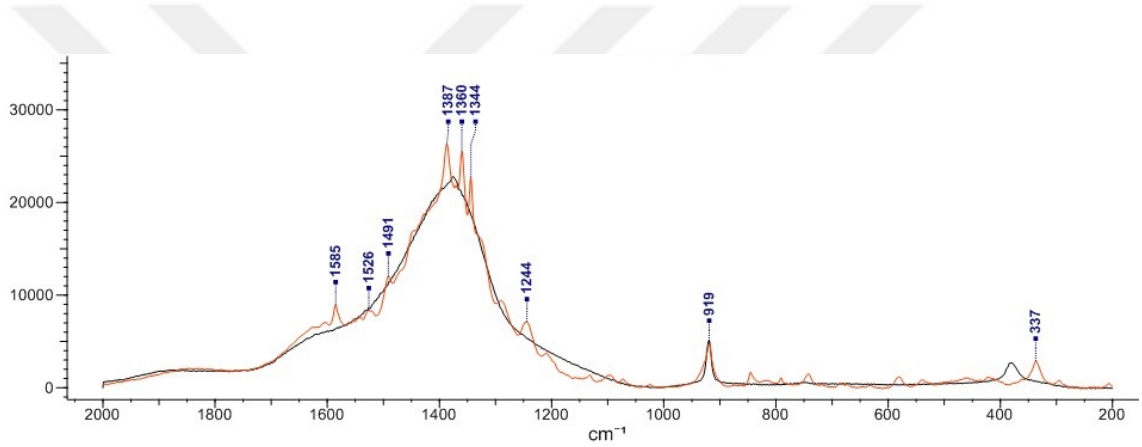
Şekil 3.12 Propolisin DMSO'lu ultrases destekli ekstraksiyon örneklerine ait Raman spektrumu



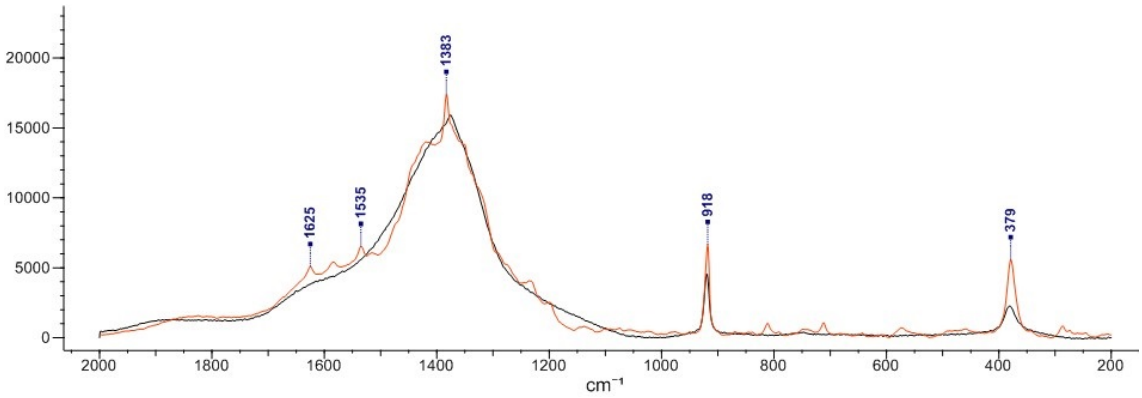
Şekil 3.13 Propolisin PG'li klasik çözücü ekstraksiyon örneklerine ait Raman spektrumu



Şekil 3.14 Propolisin PG'li ultrases destekli ekstraksiyon örneklerine ait Raman spektrumu



Şekil 3.15 Propolisin sulu klasik çözücü ekstraksiyon örneklerine ait Raman spektrumu



Şekil 3.16 Propolisin sulu ultrases destekli ekstraksiyon örneklerine ait Raman spektrumu

Bio-Rad Laboratories Informatics Division programı ile yapılan değerlendirmeye göre 1380-1265 cm^{-1} aralığı $C-N$'nin güçlü ve orta seviyedeki gerilme bağlarını, 1300-900 cm^{-1} aralığı $C-F$ değişken ve güçlü gerilme bağlarını, 1025-870 cm^{-1} aralığı $P-O-P$ güçlü gerilme bağlarını, 970-920 cm^{-1} aralığı $Si-O$ güçlü gerilme bağlarını, 920-820 cm^{-1} aralığı $Si-F$ güçlü gerilme bağlarını, 945-915 cm^{-1} aralığı $Si-F$ güçlü simetrik olmayan gerilme bağlarını, 910-870 cm^{-1} aralığı $Si-F$'nin orta seviyedeki simetrik gerilme bağlarını, 880-800 cm^{-1} aralığı $O-O$ zayıf gerilme bağlarını ve 800-580 cm^{-1} aralığı $P=S$'nin değişken gerilme bağlarını ifade etmektedir. Buna göre propolisin etanollü örnekleri; aminler ($Ph-N-(R)_2$), halojenler ($C-F$), fosforlu bileşenler ($P-O-P$, $P=S$), silikon bileşikleri ($Si-O-Ph$, $(R)_3Si-F$), $(R)_2SiF_2$) ve peroksitler ($R-O-O-R$) gibi fonksiyonel grupları içermektedir.

Propolisin DMSO'lu örnekleri; aminler ($Ph-N-(R)_2$), fosforlu bileşenler ($P-O-P$, $P=S$), silikon bileşikleri ($Si-O-Ph$, $(R)_3Si-F$) ve eterler (5 halka eterler) gibi daha az sayıda fonksiyonel grupları içermektedir. Propolisin PG'li örnekleri incelendiğinde ise etanollü örneklere benzemekte olduğu ve aminler ($Ph-N-(R)_2$), halojenler ($C-F$), fosforlu bileşenler ($P-O-P$, $P=S$), silikon bileşikleri ($Si-O-Ph$, $(R)_3Si-F$) ve peroksitler ($R-O-O-R$) gibi fonksiyonel grupları içerdiği tespit edilmiştir. Propolisin sulu örnekleri ise fonksiyonel grup olarak sadece aminleri ($Ph-N-(R)_2$) bulundurmaktadır.

Propolis örneklerinin Raman cihazı ile karakterizasyonu yapılması ile propolis ekstraksiyonunda kullanılan çözücülerin propolisin bileşen içeriğinde farklılıklara yol açtığı görülmektedir. Bunun esas nedeni kullanılan her çözücünün propolis içerisindeki bileşenleri çözme yeteneğinden kaynaklanmaktadır. Raman cihazı sayesinde kullanılan farklı çözücülere ait propolis ekstraktlarının parmak izi belirlenmiştir.

Raman spektrometresinde, propolisin farklı çözücülere ve yöntemlerle yapılan ekstraklarının karakterizasyonu sonucunda literatüre propolisin DMSO, PG ve sulu ekstraktlarına ait spektrumlarda eklenmiş ve propolis için yeni parmak izleri oluşturulmuştur. Raman spektroskopisi ile elde edilen sonuçlar çalışmadaki ATR FTIR tekniği ile yapılmış olan karakterizasyon sonuçlarını desteklemiş ve farklı spektral bantlar tespit edilmesine olanak sağlmıştır.

3.2 Propolis Ekstraktlarının Biyoaktif Bileşen İçeriği

3.2.1 Propolis Ekstraktlarının Toplam Fenolik Madde İçeriği

3.2.1.1 Propolisin Klasik Çözücü Ekstraksiyonu ile Elde Edilmiş Ekstraktlarının Toplam Fenolik Madde İçeriği

Propolisin en büyük oransal bileşeni olan fenolik madde miktarının tespiti için kullanılan çözücü ve yöntemlerin etkisi belirlenmiştir. Propolisin klasik çözücü yöntemi ile ekstraksiyonu sonucu etanollü ekstraktındaki toplam polifenol içeriği 48,35 mg GAE/ 100 g propolis, DMSO'lu ekstraktındaki toplam polifenol içeriği 35,67 mg GAE/ 100 g propolis, propilen glikollü ekstraktlarındaki toplam polifenol içeriği 12,71 mg GAE/ 100 g propolis ve distile sulu ekstraktlarındaki toplam polifenol içeriği 1,65 mg GAE/ 100 g arasında değişen değerlerde bulunmuştur (Tablo 3.1). Bu bilgiler doğrultusunda propolisin fenolik içeriğinin en fazla etanollü çözücüde çözündüğü tespit edilmiştir. Etanolü sırasıyla DMSO, PG ve distile sulu çözücü kullanılan propolis örnekleri izlemiştir.

Tablo 3.1 Farklı çözücülerle klasik çözücü yöntemi ile ekstrakte edilmiş propolis örneklerinin toplam fenolik bileşen içeriği

Kullanılan çözücü	Toplam Fenolik Bileşen (mg GAE)/ 100 g propolis)
Etanol	48.35^{a}
DMSO	35.67^{b}
PG	12.17^{c}
DS	1.658^{d}

Propolisin toplam fenolik içeriğinin belirlenmesi için yapılan çalışmaların bir çoğu propolis için en etkili çözücü olduğu düşünülen etanol ile yapılmıştır. Etanol kullanılarak yapılan bu çalışmalarda Brezilya'daki farklı renklere sahip propolislerin toplam fenolik bileşen içeriğinin 55.74-91.32 mg GAE/ g propolis arasında değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir [204].

Rivera-Yañez ve arkadaşlarının Meksika propolisleri ile yapmış olduğu çalışmada propolislerin etanollü ekstraktlarının toplam fenolik bileşen içeriği 314 mg GAE/g propolis olarak belirlenmiştir [205]. Yavuz'un 2011 yılında yapmış olduğu diğer bir çalışmada Türkiye'nin değişik bölgelerinden toplanan etanollü propolis örneklerinin toplam fenolik madde miktarlarları 180.89-270.22 mg GAE/g propolis olarak bulunmuştur [153]. Azerbaycan'da ise propolis ekstraktlarının toplam fenolik bileşen içeriği 10.94-79.23 mg GAE/g propolis olduğu rapor edilmiştir [206].

Etanol dışında kullanılan çözücülerin toplam fenolik madde içeriğine etkisi için yapılan çalışmalar incelendiğinde Türkiye'de farklı bölgelerden toplanan propolislerin

DMSO, aseton, gliserol ve su ile yapılan ekstraksiyonu sonucunda toplam fenolik bileşen içeriği sırasıyla 141.17 (mg GA/g propolis), 100.49 (mg GA/g propolis), 88.75 (mg GA/g propolis) ve 19.67 (mg GA/g propolis) olarak hesaplanmıştır [76].

Kubiliene ve arkadaşlarının Litvanya bölgesinden topladığı propolislerin ekstraksiyonu için kullandığı etanol, su ve zeytinyağı gibi farklı çözücüler sonucunda ekstraktların toplam fenolik bileşen içeriği sırasıyla 12.7, 1.6 ve 0.5 mg/mL GAE olarak ifade edilmiştir [147].

Çalışmalara bakıldığında propolislerin toplandığı çoğrafi konum, iklim ve bitki örtüsü gibi etmenlerden dolayı toplam fenolik madde içeriğinin değişkenlik gösterdiği söylenebilir. Aynı propolisler üzerine yapılan çalışmalarda ise kullanılan çözücülerin etkisine rastlanılmaktadır. Çözücü için kullanılan maddenin farklı olması diğer çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada da ekstraktların toplam fenolik madde içeriğinde farklılıklara neden olmuştur. Literatürdeki çalışmalar ile yapılan çalışma sonucu elde edilen klasik çözücü yöntemine ait toplam fenolik bileşen içeriği bulgular karşılaştırıldığında toplam fenolik madde içeriğinin daha düşük düzeyde olduğu görülmektedir. Bunun nedeni ekstraksiyon sırasında çözücü dışında kullanılan yöntem, sıcaklık ve süre gibi parametrelerin propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriği üzerinde etkili olmasıdır.

3.2.1.2 Propolisin Ultrases Destekli Ekstraksiyonu ile Elde Edilmiş Ekstraktlarının Toplam Fenolik Madde İçeriği

Propolisin ultrases destekli ekstraksiyonuna ilişkin, RSM'den elde edilen 17 örnekli dizaynına ait toplam fenolik bileşen sonuçları Tablo 2'de yer almaktadır. Tablo 3.2'de yer alan verilere göre propolisin etanollü ekstraktlarındaki toplam polifenol içeriği 78.26 – 140.58 mg GAE / 100 g propolis, DMSO'lu ekstraktlarındaki toplam polifenol içeriği 76.07 – 119.32 mg GAE/ 100 g propolis, propilen glikollü ekstraktlarındaki toplam polifenol içeriği 12.71 - 38.52 mg GAE/ 100 g propolis ve distile sulu ekstraktlarındaki toplam polifenol içeriği 1.01 – 3.30 mg GAE/ 100 g arasında değişen değerlerde bulunmuştur.

Ultrases destekli ekstraksiyon sonuçlarına bakıldığında çözücüler arasındaki en yüksek toplam fenolik içeriğin etanollü ekstraktlara ait olduğu görülmektedir. Etanollü ekstraktları DMSO, PG ve distile sulu propolis ekstraktlarının takip ettiği belirlenmiştir. Yapılan hesaplamalarda distile su dışındaki ekstraktların diğer çözücülerle kıyaslandığında önemli ölçüde düşük olduğu görülmektedir.

Tablo 3.1 ve Tablo 3.2 beraber değerlendirildiğinde, ultrases ile yapılan

Tablo 3.2 Farklı çözücülerle ekstrakte edilmiş ultrases destekli propolis örneklerinin toplam fenolik bileşen içeriği

No.	Süre (dak.)	Sıcaklık (^0C)	Ultrases gücü (W)	DS	Etanol	DMSO	PG
1	1	60	500	1.88	97.07	76.07	22.2
2	1	45	250	1.36	92.68	80.36	17.38
3	1	30	500	1.01	78.26	78.24	12.71
4	2	45	500	2.19	108.77	111.64	28.06
5	2	45	500	2.15	108.57	110.87	28.33
6	2	60	250	2.28	113.49	112.93	18.85
7	2	60	750	3.19	132.84	119.32	38.52
8	1	45	750	1.59	94	87.26	18.18
9	2	45	500	2.28	106.16	110.11	27.66
10	2	30	250	1.19	85.76	84.81	13.11
11	2	45	500	2.35	108.03	101.64	28.46
12	3	30	500	2.44	129.8	110.73	35
13	3	60	500	3.30	140.58	125.60	35.92
14	2	45	500	2.47	108.43	116.01	24.73
15	2	30	750	2.03	126.59	104.73	21.24
16	3	45	750	3.18	136.47	118.98	27.65
17	3	45	250	2.87	101.49	105.87	22.72

ekstraksiyonun klasik çözücü yöntemi ekstraksiyonuna göre propolisin toplam fenolik içeriği üzerindeki etkinliği oldukça yüksektir. Katı-sıvı ekstraksiyonu ultrasesle desteklendiğinde, ekstraksiyon uygulamalarının olası faydaları; kütle transferinin hızlandırılması, temas yüzey alanını artırarak kabuk matrisine gelişmiş çözücü penetrasyonudur. Bileşenlerin yakınındaki kavitasyon kabarcıklarının çökmesinin, çözücünün ultrases yoluyla matrikse iyi nüfuz etmesi ile birlikte çözünmenin hızlanması gerçekleşmiştir [207].

Aynı çözücülerin kullanıldığı ultrases destekli ekstraksiyondaki propolisin toplam fenolik bileşen içeriği, klasik çözücü ekstraksiyonunda elde edilen toplam fenolik bileşen içeriği ile kıyaslandığında etanol ve DMSO çözücülerinin ultrasesle desteklendiğinde çok daha yüksek miktarda fenolik bileşeni çözdüğü belirlenmiştir. Ayrıca propolisin PG ve distile su kullanılan ekstraktları ultrasesle desteklendiğinde elde edilen en düşük değerlerin klasik çözücü ekstraksiyonu ile elde edilen değerlerle yakın olduğu görülmüştür. Ancak ultrases destekli ekstraksiyonda kullanılan parametreler değiştikçe PG ve distile su kullanılan ekstraktlarda klasik çözücü ekstraksiyon yöntemine göre artış meydana gelmektedir.

Her çözücü uygulaması için, farklı ekstraksiyon parametrelerinin TPC değeri üzerindeki etkisi kuadratik modelle modellenmiştir. Ekstraksiyon parametrelerinin TPC değeri üzerindeki önemini göstermek için varyans analizi yapılmıştır. 0.05'in

altındaki p değeri ekstraksiyon parametrelerinin TPC değeri üzerinde anlamlı bir etkisi olduğunu göstermiştir. Propolisin ultrases destekli farklı çözücülerdeki ekstraksiyonu üzerine ekstraksiyon süresi (A), ekstraksiyon sıcaklığı (B) ve ultrases gücünün (C) etkileri incelenmiştir (Tablo 3.3). Her bir çözücü uygulamasında, model etkisi anlamlı ($p < 0.01$) ve uyum eksikliği değerleri önemsiz bulunmuştur. 0.0500'den küçük "Prob> F" değerleri model terimlerinin önemli olduğunu gösterir.

Tablo 3.3 Farklı çözücülerle ekstrakte edilmiş ultrases destekli propolis ekstraktlarının toplam fenolik bileşen içeriği

Regresyon Katsayıları	Etanol			DMSO			PG			DS		
	Mean square	F	p	Mean square	F	p	Mean square	F	p	Mean square	F	p
Model	548.27	12.08	0.0017	409.44	9.43	0.0037	84.78	4.05	0.0393	0.79	19.06	0.0004
A	2676.5	58.98	0.0001	2423.8	55.85	0.0001	322.83	15.42	0.0057	4.43	106.71	< 0.0001
B	505.14	11.13	0.0125	383.78	8.84	0.0207	139.70	6.67	0.0363	1.98	47.74	0.0002
C	1163.5	25.64	0.0015	268.19	6.18	0.0419	140.53	6.71	0.0359	0.66	15.81	0.0054
AB	16.12	0.36	0.5699	72.59	1.67	0.2370	18.36	0.88	0.3802	$2.5*10^{-5}$	$6.028*10^{-4}$	0.9811
AC	283.25	6.24	0.0411	9.64	0.22	0.6518	4.26	0.20	0.6654	$1.6*10^{-3}$	0.039	0.8499
BC	115.35	2.54	0.1549	45.77	1.05	0.3386	33.29	1.59	0.2477	$1.225*10^{-3}$	0.030	0.8684
A^2	27.11	0.60	0.4649	409.51	9.44	0.0180	6.26	0.30	0.6016	$2.957*10^{-3}$	0.071	0.7972
B^2	150.21	3.31	0.1117	26.99	0.62	0.4562	0.22	0.011	0.9213	0.046	1.10	0.3295
C^2	2.09	0.046	0.8360	18.12	0.42	0.5388	94.86	4.53	0.0708	$5.568*10^{-4}$	0.013	0.9110
Lack of fit	104.39	93.02	0.0004	64.78	2.37	0.2118	45.65	19.00	0.0079	0.075	4.56	0.0884
R^2	0.9395			0.9238			0.8389			0.9608		
Adj-R^2	0.8618			0.8259			0.6317			0.9104		

Etanol uygulamasında, R^2 ve Adj-R^2 değerleri sırasıyla 0.9395 ve 0.8618 olarak belirlenmiştir. Bu, kuadratik modelin, model parametrelerinin TPC üzerindeki etkisini başarıyla modellediğini göstermektedir. Model parametrelerinin etkileşimini incelediğimizde sadece zaman ve güç etkileşimi anlamlı bulunmuştur. Model parametrelerinin diğer etkileşimleri ve kuadratik etkileri önemsiz bulunmuştur ($p > 0.05$).

DMSO uygulamasında R^2 ve adj-R^2 değerleri sırasıyla 0.9238 ve 0.8259 olarak bulunmuştur. Model parametrelerinin etkileşimleri önemsizken, doğrusal etkileri önemlidir. Ayrıca DMSO'da ekstraksiyon süresinin kuadratik etkisi anlamlı bulunmuştur. PG ve su uygulamalarında R^2 değerleri 0.8389 ve 0.9608, adj-R^2 değerleri sırasıyla 0.7317 ve 0.9104 olarak bulunmuştur. Her iki çözücü uygulamasında doğrusal etki anlamlıyken, model parametrelerinin etkileşimleri önemsiz bulunmuştur. PG için gücün kuadratik etkisi anlamlıdır. Tüm solvent

uygulaması için elde edilen model eşitlikleri aşağıda gösterilmiştir:

$$\text{ET, TPC} = 107.99 + 18.29A + 7.95B + 12.06C - 2.01AB + 8.42AC - 5.37BC - 2.54A^2 + 5.97B^2 + 0.71C^2 \quad (3.1)$$

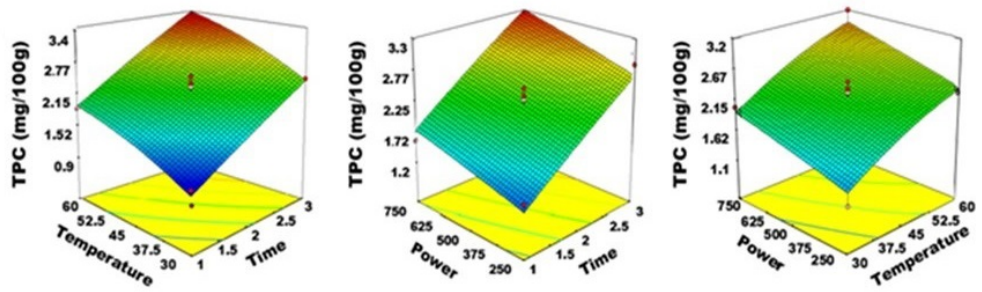
$$\text{DMSO, TPC} = 110.05 + 17.41A + 6.93B + 5.79C + 4.26AB + 1.55AC - 3.38BC - 9.86A^2 - 2.53B^2 - 2.07C^2 \quad (3.2)$$

$$\text{PG, TPC} = 27.45 + 6.35A + 4.18B + 4.19C - 2.14AB + 1.03AC + 2.89BC - 1.22A^2 + 0.23B^2 - 4.75C^2 \quad (3.3)$$

$$\text{DS, TPC} = 2.29 + 0.74A + 0.50B + 0.29C - 0{,}025AB + 0.020AC + 0.018BC - 0.026A^2 - 0.10B^2 - 0.012C^2 \quad (3.4)$$

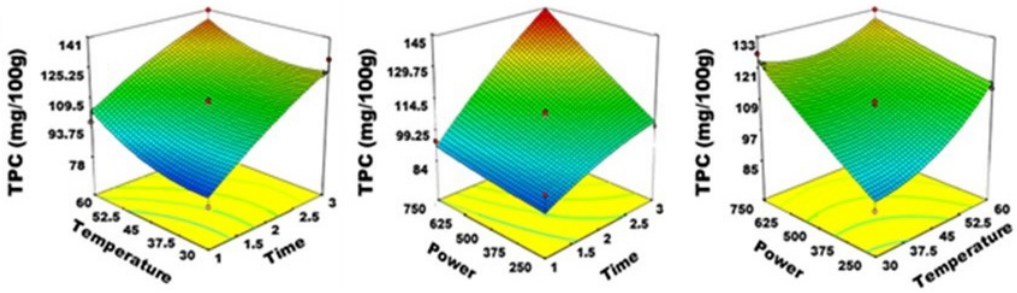
Model parametrelerinin pozitif doğrusal, etkileşimleri ve kuadratik katsayıları ekstraksiyon sıcaklığı, zaman ve ultrason gücünün TPC değeri ile pozitif korelasyonu olduğunu göstermiştir. Analiz sonucunda propolisin; en yüksek toplam fenolik bileşen içeriğine sahip ultrases destekli etanollü ekstraktları için, elde edilen grafiklere bakıldığında ekstraksiyon sıcaklığın ve süresinin artmasıyla propolisin toplam fenolik bileşen içeriğinin arttığı gözlemlenmektedir (Şekil 3.17). Aynı şekilde uygulanan ultrases gücü ile beraber ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon sıcaklığının artması sonucu etanollü propolis örneklerinin toplam fenolik bileşen içeriğinde artış olmuştur.Ancak etanolle ekstrakte edilmiş propolisin fenolik bileşen içeriğini elde etmede en önemli etki Tablo 3.3'e göre ultrases gücü ile beraber uygulanan sürenin artışında olmaktadır.

Etanollü ekstraktlardan sonra en yüksek toplam fenolik içeriğine sahip olan ultrases destekli DMSO'lu propolis ekstraktları için elde edilen grafiklere bakıldığında ekstraksiyon sıcaklığın ve süresinin artmasıyla propolisin toplam fenolik bileşen içeriğinin arttığı gözlemlenmektedir (Şekil 3.18). Aynı şekilde uygulanan ultrases gücü ile beraber ekstraksiyon süresinin artması sonucu DMSO'lu propolis örneklerinin toplam fenolik bileşen içeriğinde artış olmuştur. Ancak Şekil 3.18 ve Tablo 3.3'de yer alan verilere göre DMSO ile ekstrakte edilmiş propolislerin fenolik bileşen içeriğine ultrases gücü ve ekstraksiyon sıcaklığının etkisi önemsizdir. Bunun yanında DMSO ile ekstrakte edilmiş propolislerin fenolik bileşen içeriğine elde etmede en önemli etki



Şekil 3.17 Ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon sıcaklığı ve ultrases gücünün etanollü propolis ekstraktlarının toplam fenolik bileşen içeriği üzerine etkisi

Tablo 3.3'e göre uygulanan ekstraksiyon süresinin artışında olmaktadır.

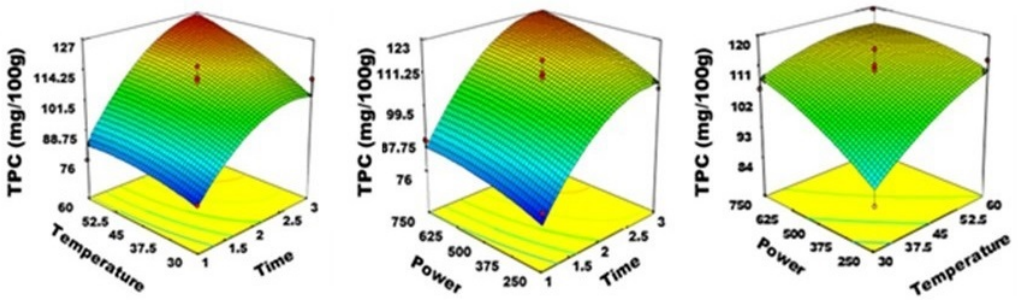


Şekil 3.18 Ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon sıcaklığı ve ultrases gücünün DMSO'lu propolis ekstraktlarının toplam fenolik bileşen içeriği üzerine etkisi

Ultrases destekli PG'li propolis ekstraktları için elde edilen grafiklere bakıldığında kullanılan parametrelerin her birinin ayrı ayrı propolisin toplam fenolik bileşen içeriğinin artmasında önemli olduğu belirlenmiştir (Tablo 3.3). Grafiklere bakıldığında ekstraksiyon sıcaklığın ve süresinin artmasıyla PG'li propolis ekstraktlarının toplam fenolik bileşen içeriğinin arttığı gözlemlenmektedir (Şekil 3.19).

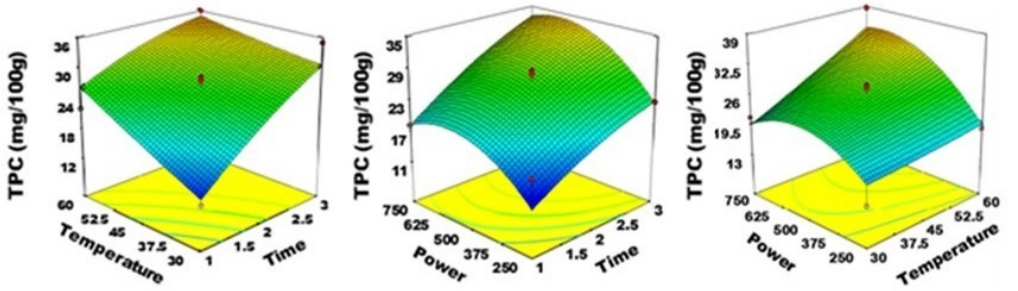
Ultrases gücü ve ekstraksiyon süresinin PG'li propolis ekstraktlarının toplam fenolik bileşen içeriğine etkisine bakıldığında, ultrases gücünün 750 watt uygulanması kısa sürede az bir etki gösterirken sürenin arttırılmasıyla etkinin iyileştiği görülmektedir (Şekil 3.19). Ancak etkileşimlerinin sonunda toplam fenolik bileşen içeriğinin etkin bir şekilde arttırılmasında Ultrases gücü ve ekstraksiyon sıcaklığının sinerjik etkisi önemli derecede hissedilememiştir (Tablo 3.3, Şekil 3.19).

Propolisin distile sulu ekstraktları için elde edilen verilerden oluşan grafikler Şekil 3.20'de verilmiştir. Propolisin ekstraktları arasında en düşük toplam fenolik içeriğine sahip olan ultrases destekli sulu propolis ekstraktları için elde edilen grafiklerde



Şekil 3.19 Ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon sıcaklığı ve ultrases gücünün PG'li propolis ekstraktlarının toplam fenolik bileşen içeriği üzerine etkisi

ekstraksiyon sıcaklığın ve süresinin artmasıyla propolisin toplam fenolik bileşen içeriğinin arttığı gözlemlenmektedir (Şekil 3.20). Aynı şekilde uygulanan ultrases gücü ile beraber ekstraksiyon süresinin ve ekstraksiyon sıcaklığının artması sonucu sulu propolis örneklerinin toplam fenolik bileşen içeriğinde artış görülmektedir.



Şekil 3.20 Ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon sıcaklığı ve ultrases gücünün distile sulu propolis ekstraktlarının toplam fenolik bileşen içeriği üzerine etkisi

Propolisin farklı çözücülerdeki ultrases destekli ekstraksiyonunun toplam fenolik bileşen içeriğine ait sonuçlara bakıldığında kullanılan çözücülere, uygulanan ekstraksiyon koşullarına göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca yüzey yanıt yöntemi kullanıldığı bu analizlerde elde edilen sonuçlara göre propolisin ekstraksiyonunda her çözücü için optimizasyon yapılmıştır.

Ultrases teknolojisi kullanılarak yapılan çalışmalara bakıldığında Sanpa ve arkadaşları propolisin etanollü çözücüdeki ultrases destekli ekstraktlarının toplam fenolik içeriğini 7.13-14.07 mg GAE/g propolis olarak belirlemiştir [182].

De Lima ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada maserasyon, soxhlet ve ultrases destekli ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak propolis ekstrakte edilmiştir. Kullanılan yöntemlerin propolisin antimikrobiyal aktivitesi üzerine etkisine bakılan çalışmada,

ultrases destekli ekstraktların diğer metotların uygulandığı ekstraktlardan daha yüksek etkinliğe sahip olduğu ortaya konmuştur [88].

Geleneksel maserasyon ekstraksiyon, ultrases destekli ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyon metotlarının propolisin biyoaktif özellikleri üzerine etkisinin incelendiği diğer bir çalışmada verim, ekstraksiyon süresi ve seçicilik gözönünde bulundurulduğunda en verimli yöntemin ultrases destekli yöntem olduğu tespit edilmiştir [31].

Yapılan bu çalışmada çözücü farketmeksizin ultrases destekli ekstraksiyona tabi tutulan propolis ekstraktlarının literatürdeki bilgileri destekleyici şekilde klasik ekstraksiyon metoduyla kıyaslandığında daha etkin olduğu ve ekstraksiyon verimini arttırdığı gözlemlenmiştir. Ancak en etkili ultrases desteğinin tespiti için yapılan optimizasyon işlemi ile bu etkinliğin en yüksek düzeyde fayda sağlayacak hale getirilmiştir.

3.2.1.3 Propolisin Ultrases Destekli Ekstraksiyonun Optimizasyonu ile Elde Edilen Ekstraktlarının Toplam Fenolik Madde İçeriği

Propolisin farklı çözücülerdeki ultrases destekli ekstraksiyonunun toplam fenolik bileşen içeriği için yüzey yanıt yöntemi kullanılarak optimal koşulların belirlenmesi amaçlanmıştır. İşlem boyunca ultrases gücü, ekstraksiyon sıcaklığı ve ultrases süresi toplam fenolik bileşenler için maksimum olacak şekilde tahminler hesaplanmıştır. Optimizasyon sonucu elde edilen her çözücüye ait örneklerin toplam fenolik bileşen içeriği tespit edilmiştir (Tablo 3.4).

Tablo 3.4'te yer alan bilgilere göre propolisin ultrases destekli ekstraksiyonu sonucu etanollü optimum ekstraktındaki toplam polifenol içeriği 144.30 mg GAE/ 100 g propolis, DMSO'lu optimum ekstraktındaki toplam polifenol içeriği 132.58 mg GAE/ 100 g propolis, propilen glikollü ekstraktlarındaki toplam polifenol içeriği 36.25 mg GAE/ 100 g propolis ve distile sulu ekstraktlarındaki toplam polifenol içeriği 4.38 mg GAE/ 100 g arasında değişen değerlerde bulundu. Bu değerler doğrultusunda propolisin ultrases destekli ekstraksiyonu optimum örneklerinin toplam fenolik içeriğinin, klasik çözücü ekstraksiyonda ve ultrases destekli dizaynda olduğu gibi en fazla etanollü çözücüde çözündüğü tespit edilmiştir. Etanolü sırasıyla DMSO, PG ve distile sulu çözücü kullanılan propolis örnekleri izlemiştir. Ayrıca tahmini sonuçların ve deneysel sonuçların değerleri kıyaslandığında deneysel analiz ile optimizasyonun başarıyla doğrulandığını gösterilmiştir.

Etanollü optimum propolis örneklerine bakıldığında etanollü klasik çözücü

Tablo 3.4 Propolis farklı çözücülerde ultrases destekli ekstraksiyonun optimizasyonu sonucu elde edilen örneklerin toplam fenolik madde içeriği

Kullanılan çözücü	Toplam Fenolik Bileşen (mg GAE/ 100 g propolis)	
	Tahmini sonuçlar	**Deneysel sonuçlar**
Etanol	141.66^{Ba}	144.30^{Aa}
DMSO	126.24^{Ab}	132.58^{Bb}
PG	34.20^{Bb}	36.25^{Ab}
DS	3.35^{Bc}	4.38^{Ad}

ekstraksiyonun toplam fenolik içeriğinin yaklaşık 3 katı olduğu dikkat çekmektedir. DMSO'lu optimum örneklerin ise DMSO'lu klasik çözücü ekstraksiyonun 1.5 katı toplam fenolik içeriği olduğu tespit edilmiştir. PG'li optimum propolis örneklerinin toplam fenolik içeriğinin PG'li klasik çözücü ekstraksiyonun neredeyse 4 kat artarak en yüksek düzeyde ultrasesin etkinliğini ortaya koyduğunu göstermektedir. Sulu optimum propolis örnekleri ise klasik çözücü ekstraksiyonundaki sulu propolis örneklerinin toplam fenolik içeriğinin 2.5 katı toplam fenolik bileşen içeriğine sahiptir. Elde edilen veriler ve klasik çözücü ekstraksiyonu ile yapılan kıyaslamalar sonucunda, ultrases destekli ekstraksiyonun optimum sevilerde uygulanması propolisin toplam fenolik içeriğinden en çok faydalanılması anlamına gelmektedir.

Optimizasyon sonucu örneklerin elde edilmesinden sonra, çalışmada diğer analizlerde klasik çözücü ekstraksiyon örnekleri ile beraber ultrases ekstraksiyonuna ait optimum örnekler kullanılmıştır.

3.2.2 Propolis Ekstraktlarının Fenolik Bileşenlerin Profili

Propolis örneklerinin klasik çözücü ve optimum ultrases destekli örneklerinin (toplam 8 örnek) toplam fenolik içeriği tespit edildikten sonra içeriğinde bulunan fenolik bileşenlerin profili belirlenmiştir. Propolis ekstraktlarının fenolik bileşen profilinin belirlenmesi için örnekler HPLC cihazı ile analiz edildi.

Bu aşamada, her çözücü için optimum noktalarda elde edilen ultrases destekli propolis ekstraktlarının fenolik bileşen profili, klasik çözücü ekstraktlarının fenolik bileşen profili ile karşılaştırıldı. Tablo 3.5 klasik çözücü ekstraksiyon yöntemi ve ultrases destekli ekstraksiyon yönteminden optimum koşullar altında elde edilen propolis ekstraktlarının bireysel fenolik bileşenlerini mg / 100 g propolis cinsinden göstermektedir.

Optimum koşullar altında elde edilen değerler, her bir çözücü uygulaması ve ekstraksiyon yöntemi için karşılaştırıldı. Tablo 3.5'te görülebileceği gibi, yöntem tipi

ve farklı çözücü uygulamalarının ekstraktların fenolik bileşen profili üzerindeki etkisi anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

Tablo 3.4'de aynı satırdaki farklı büyük harfler ekstraksiyon yönteminin fenolik bileşen üzerindeki önemini göstermektedir ($p < 0.05$). Aynı satırdaki farklı küçük harfler, solvent tipinin fenolik bileşen üzerindeki önemini göstermektedir ($p < 0.05$). KE; Klasik çözücü ekstraksiyonu, UDE; Ultrason destekli ekstraksiyon. DS; Distile su, DMSO; Dimetil sülfoksit, PG; propilen glikolü ifade etmektedir.

Tablo 3.5 Ultrases ve klasik çözücü yöntem kullanılan propolis ekstraktlarının fenolik bileşiklerinin konsantrasyonu

Fenolik bileşenler	Etanol		DMSO		PG		DS	
	KÇE	UDE	KÇE	UDE	KÇE	UDE	KÇE	UDE
Srinjik asit	nd	nd	2.61^{B}	3.54^{A}	nd	1.95	1.13^{B}	1.35^{A}
ellajik asit	3.75^{Ba}	4.61^{Aa}	3.90^{Aa}	4.56^{Ba}	3.05^{Ab}	3.34^{Ab}	0.51^{Bc}	0.84^{Ac}
m-kumarik asit	0.21^{Ba}	0.48^{Aa}	0.22^{Ba}	0.50^{Aa}	nd	0.01cc	0.05^{Bb}	0.18^{Ab}
o- kumarik asit	0.19^{Ba}	0.31^{Ab}	0.16^{Ba}	0.39^{Aa}	nd	0.02d	0.14^{B}	0.21^{Ac}
krisin	189.00^{Bb}	277.32^{Ab}	256.36^{Ba}	335.66^{Aa}	149.86^{Bc}	185.91^{Ac}	0.34^{Ba}	3.42^{Ad}
kafeik asit	4.07^{Ba}	5.05^{Aa}	4.14^{Ba}	5.02^{Aa}	3.03^{Bb}	3.47^{Ab}	1.25^{Bc}	1.47^{Ac}
p- kumarik asit	1.22^{Ba}	1.45^{Aa}	1.10^{Bb}	1.44^{Aa}	0.72^{Bc}	0.84^{Ab}	0.21^{Bd}	0.38^{Ac}
ferülik asit	0.95^{Ba}	1.19^{Aa}	0.99^{Aa}	1.18^{Aa}	0.74^{Bb}	0.82^{Ab}	0.13^{Bc}	0.22^{Ac}
mirisetin	9.41^{Ba}	11.35^{Aa}	8.41^{Bb}	10.01^{Ab}	8.39^{Bc}	9.41^{Ac}	nd	0.84d
kuersetin	4.87^{Ba}	6.87^{Aa}	3.88^{Bb}	5.38^{Ab}	3.86^{Ab}	4.87^{Ac}	nd	0.38d
kaempferol	1.76^{Ab}	2.97^{Aa}	1.93^{Ba}	2.52^{Ab}	1.75^{Bb}	2.43^{Ab}	0.13^{Ac}	0.19^{Ac}
TPB **(mg GAE/100 g)**	48.35^{Ba}	146.89^{Aa}	35.67^{Ab}	124.79^{Bb}	12.17^{Bc}	33.75^{Ac}	1.658^{Bd}	3.46^{Ad}
AA **(mg Trolox/g)**	4.96^{Ba}	835.34^{Aa}	4.85^{Ab}	818.74^{Bb}	4.83^{Bb}	735.01^{Ac}	0.48^{Bc}	382.68^{Ad}

Aynı satırdaki farklı büyük harfler ekstraksiyon yönteminin fenolik bileşen üzerindeki önemini göstermektedir ($p < 0.05$). Aynı satırdaki farklı küçük harfler, solvent tipinin fenolik bileşen üzerindeki önemini göstermektedir ($p < 0.05$). KÇE; Klasik çözücü ekstraksiyonu, UDE; Ultrason destekli ekstraksiyon. DS; Distile su, DMSO; Dimetil sülfoksit, PG; propilen glikol, TPB; Toplam fenolik bileşen, AA; Antioksidan aktivite.

Elde edilen HPLC analizi sonuçları, çözücüye göre farklılık göstermekle birlikte propolisin içeriğinde sirinjik asit, ellajik asit, m-kumarik asit, o-kumarik asit, p-kumarik asit, krisin, kafeik asit, ferülik asit, mirisetin, kuersetin ve kaempferolin varlığı tespit edilmiştir. Bu bileşenler daha önceki çalışmalarda rapor edilen bileşenlerle benzerlik göstermektedir [6, 82, 87, 145].

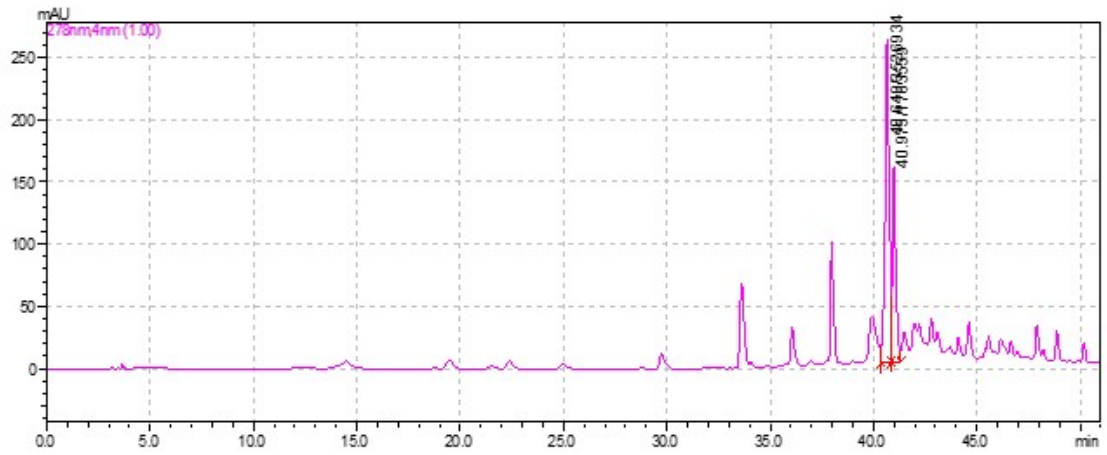
Ultrases uygulaması fenolik bileşen miktarlarında önemli bir artışa neden olmuştur ($p < 0.05$). Çözücü ve yöntem farklılıklarından bağımsız olarak, krisin ana fenolik bir

bileşik olarak belirlenmiştir. Mirisetin, kuersetin ve ellajic asit, tüm örnekler için en yoğun bulunan diğer fenolik bileşenlerdir. Bazı fenolik bileşikler, geleneksel yöntemle tespit edilememekle birlikte, UDE yöntemiyle tespit edilmiştir. Bu, ekstraksiyon yönteminin etkisi ile bazı fenoliklerin salınmasıyla açıklanabilir. Örnek olarak, PG uygulamasında, sirinjik asit, m-kumarik asit ve o-kumarik asit geleneksel yöntemle tespit edilemezken, bu bileşenler UDE yöntemiyle belirlenmiştir.

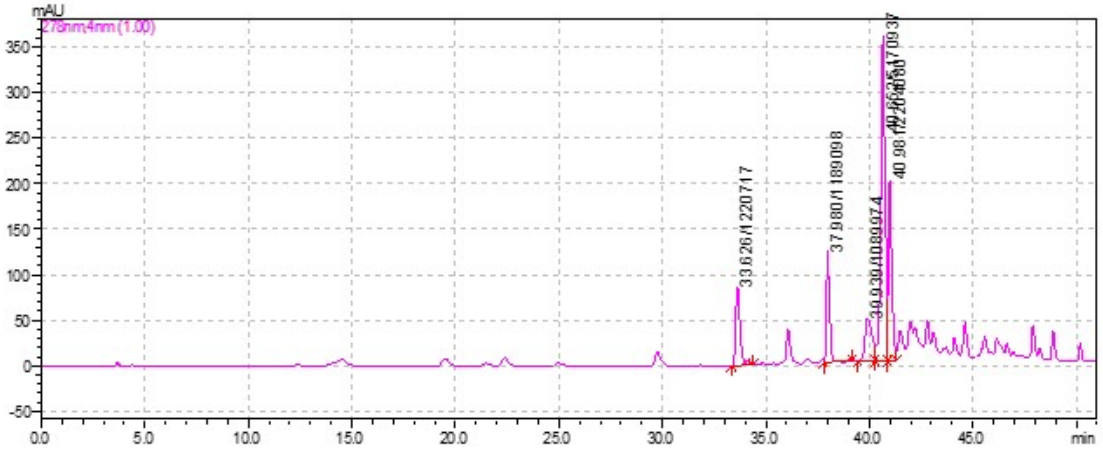
Su uygulamalarında, UDE yöntemi ile mirisetin ve kuersetin tespit edilebimektedir. Ultrases yöntemi ile krisin miktarlarında belirli bir artış oldu. Etanolde % 46.7, DMSO için % 30.9, PG için % 24.05 artış olurken, su uygulamasında 9 kat artış gözlemlendi. Ultrases uygulaması ile bazı fenolik bileşiklerin TPC değerindeki artış ve ekstrakte edilebilirliği diğer çalışmalarla da bildirilmiştir [31, 208]. Bu, propolisten maksimum miktarda fenolik bileşen elde etmek için optimizasyon ve ultrason yardımının gerekli olduğunu göstermektedir.

Ekstraksiyon yöntemine benzer şekilde, farklı çözücü uygulamaları da fenoliklerin dağılımı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ($p < 0.05$). Fenolik bileşen içeriğindeki en yüksek değer hem klasik çözücü hem de ultrases destekli ekstraksiyonda etanollü ekstraktlarda elde edilmiştir. Ayrıca DMSO, diğer çözücü uygulamalarından daha yüksek krisin içermektedir. Sirinjik asit ise etanollü ekstraktlarda tespit edilememiştir.

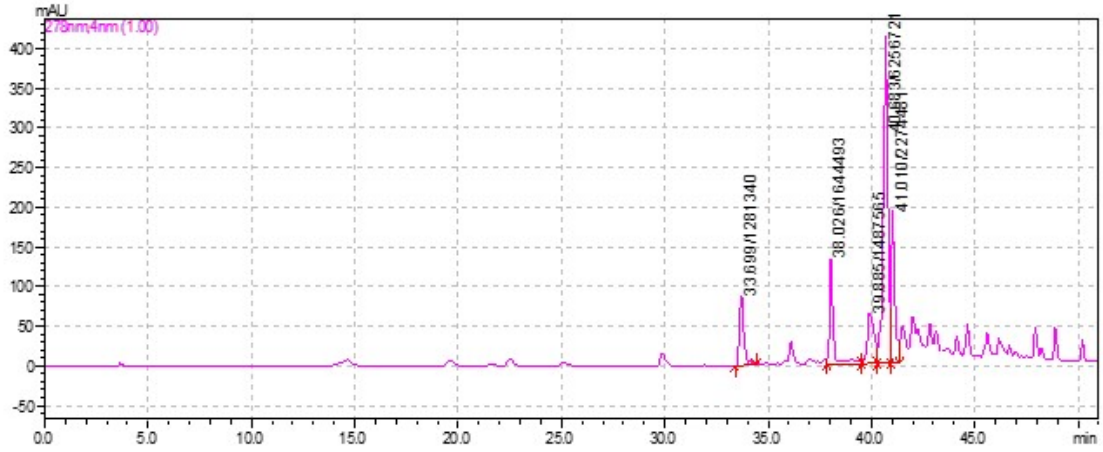
Propolis örneklerinin klasik çözücü ve optimum ultrases destekli örneklerinin farklı fenolik bileşiklerin ultraviole - görünür bölge (UV-VIS) spektrumlarını elde edebilmek için kromatogramlar en yüksek absorbansın elde edildiği 278, 320 ve 360 nm'de okunmuştur. Elde edilen farklı çözücülere ve ekstraksiyon koşullarına ait propolis ekstraktlarının kromatogramları Şekil 3.21, Şekil 3.22, Şekil 3.23, Şekil 3.24, Şekil 3.25, Şekil 3.26, Şekil 3.27 ve Şekil 3.28'de gösterilmektedir.



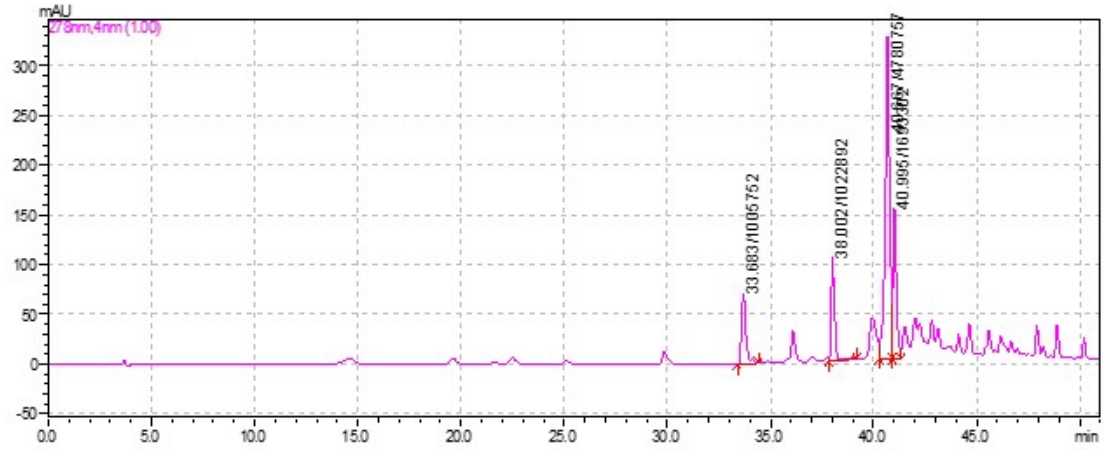
Şekil 3.21 Propolisin etanollü klasik çözücü ekstraksiyon örneklerinin HPLC ile belirlenen kromatogramları



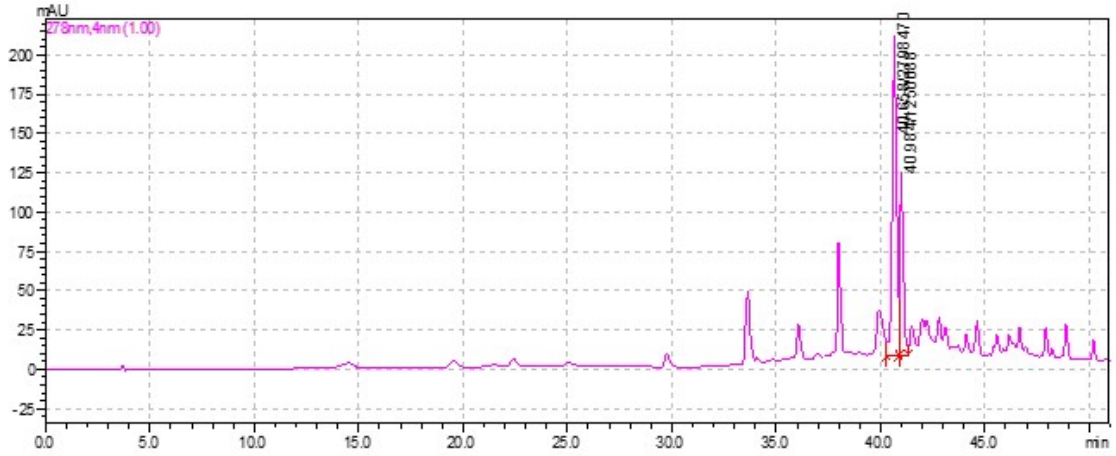
Şekil 3.22 Propolisin etanollü ultrases destekli ekstraksiyon örneklerinin HPLC ile belirlenen kromatogramları



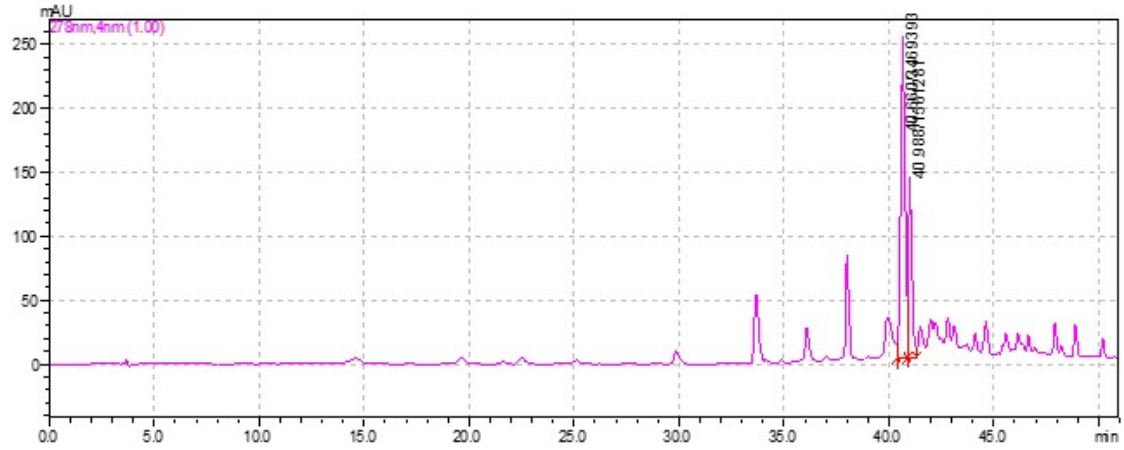
Şekil 3.23 Propolisin DMSO'lu klasik çözücü ekstraksiyon örneklerinin HPLC ile belirlenen kromatogramları



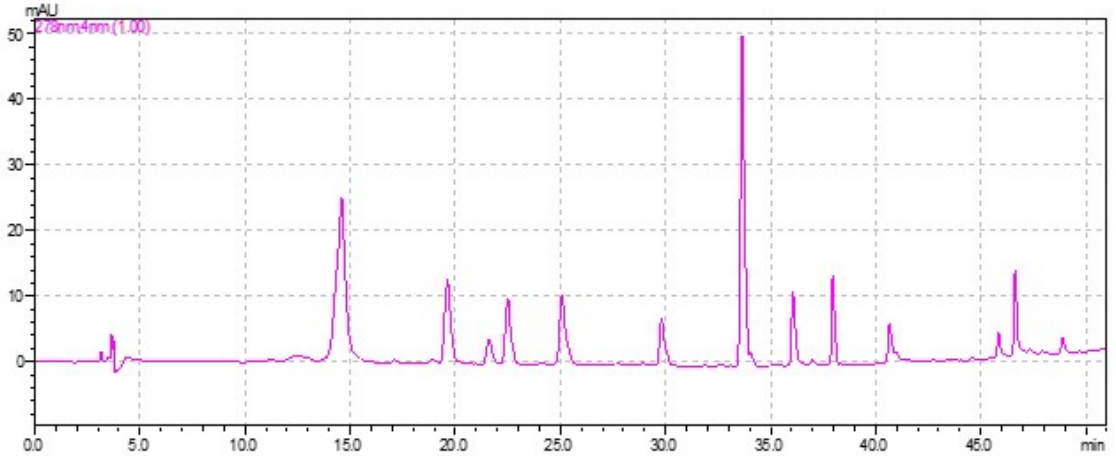
Şekil 3.24 Propolisin DMSO'lu ultrases destekli ekstraksiyon örneklerinin HPLC ile belirlenen kromatogramları



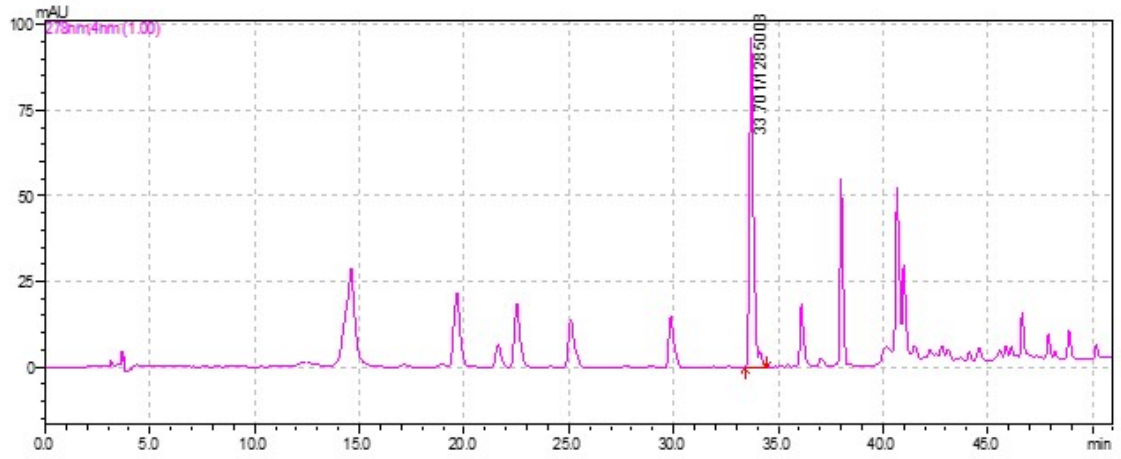
Şekil 3.25 Propolisin PG'li klasik çözücü ekstraksiyon örneklerinin HPLC ile belirlenen kromatogramları



Şekil 3.26 Propolisin PG'li ultrases destekli ekstraksiyon örneklerinin HPLC ile belirlenen kromatogramları



Şekil 3.27 Propolisin sulu klasik çözücü ekstraksiyon örneklerinin HPLC ile belirlenen kromatogramları



Şekil 3.28 Propolisin sulu ultrases destekli ekstraksiyon örneklerinin HPLC ile belirlenen kromatogramları

Propolisin farklı çözücülerde ve iki farklı yöntemdeki ekstraktlarına ait kromatogramlara bakıldığında daha fazla sayıda pike sahip olan örneklerin içerisinde çözünen fenolik bileşen miktarının daha fazla olduğu söylenebilmektedir. Bu durumda pik sayısı en fazla olan ultrases uygulanmış örneklerin klasik çözücü ekstraksiyonuna tabi tutulmuş propolis örneklerine göre daha fazla fenolik bileşen çözdüğü görülmektedir.

Ekstraksiyonda kullanılan çözücülere göre pikler değerlendirildiğinde ise DMSO'nun fenolik bileşen içeriğinin tespitinde en etkili çözücü olduğu görülmektedir. DMSO'yu sırasıyla propolis ekstraktlarında kullanılan etanol, PG ve distile su takip etmektedir.

3.3 Propolis Ekstraktlarının Antioksidan Kapasitesi

Farklı çözücülerle ekstrakte edilmiş propolisin ultrases destekli ve klasik çözücü ekstraksiyonuna ait örneklerin DPPH yöntemi ile antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Tüm propolis numuneleri antioksidan aktivite göstermiştir. Ultrases destekli ve klasik çözücü ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilmiş propolislerin antioksidan kapasitesi Tablo 3.6'da mg Trolox / 100 g propolis cinsinden verilmiştir. Elde edilen verilere göre ultrases destekli propolis ekstraktlarının klasik çözücü ekstraksiyonundan daha yüksek antioksidan kapasitesine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 3.6'da aynı satırdaki farklı büyük harfler ekstraksiyon yönteminin antioksidan aktivite üzerindeki önemini göstermektedir ($p < 0.05$). Aynı satırdaki farklı küçük harfler ise, solvent tipinin antioksidan aktivite üzerindeki önemini göstermektedir ($p < 0.05$). KÇE; Klasik çözücü ekstraksiyonu, UDE; Ultrason destekli ekstraksiyon. DS;

Tablo 3.6 Propolis farklı çözücülerde ultrases destekli ekstraksiyonun optimizasyonu sonucu elde edilen ekstraktların antioksidan kapasitesi

Kullanılan çözücü	Antioksidan Kapasitesi (mg Trolox / 100 g propolis)	
	KÇE	**UDE**
Etanol	4.96^{Ba}	835.34^{Aa}
DMSO	4.85^{Ab}	818.74^{Bb}
PG	4.83^{Bb}	835.01^{Aa}
DS	0.48^{Bc}	382.68^{Ad}

Distile su, DMSO, Dimetil sülfoksit, PG; propilen glikol olarak kısaltılmıştır.

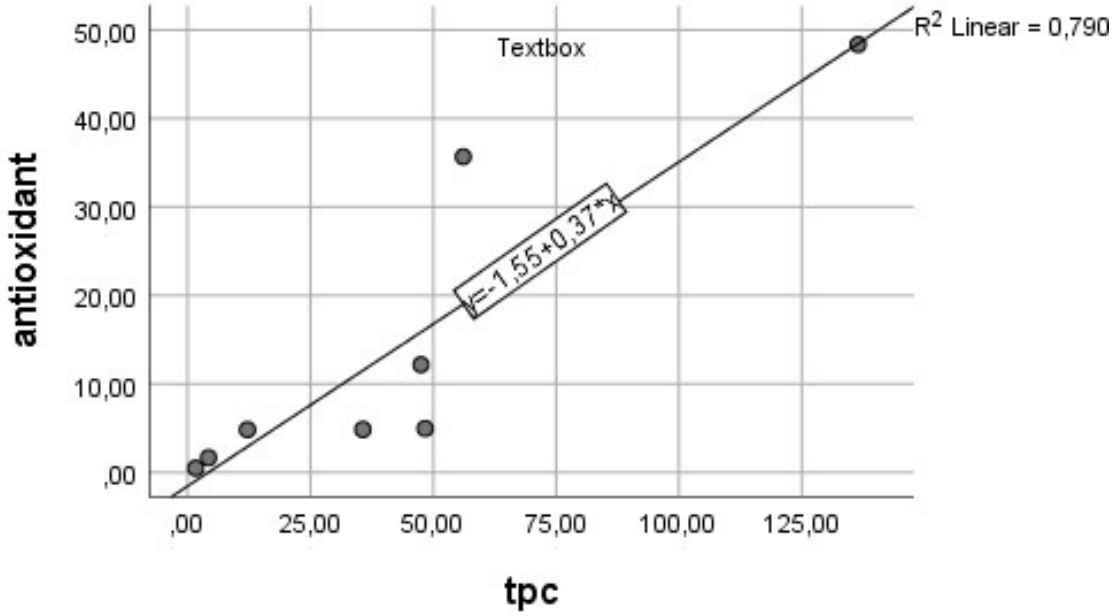
Klasik çözücü yöntemlerinin kullanıldığı çalışmalar incelendiğinde propolisin etanollü ekstraktlarının üzerine etkileri incelendiği bir çalışmada DPPH yönteminde 1230.7 mikromol Trolox / g, 11.68-275.2 mikromol Trolox / g ve 4431-4663 mikromol Trolox / g olarak bulunmuştur. [117, 204, 209]. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre klasik çözücü ekstraksiyonuna tabi tutulan propolislerin antioksidan kapasitesi 0.48-4.96 mg Trolox/100 g propolis olarak belirlenmiştir.

Propolisin klasik çözücü ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktlarının antioksidan kapasitesi ile ultrases destekli ekstraksiyon kıyaslandığında ultrases uygulaması antioksidan kapasitesi miktarında önemli bir artışa sebep olmuştur ($p < 0.05$).

Propolis ekstraksiyonunda kullanılan çözücülerin antioksidan kapasitesi üzerindeki etkilerine bakıldığında etanol, DMSO ve PG arasında önemli farklılıklar görülmemektedir. Bu nedenle yöntem tipi ve farklı çözücü uygulamalarının ekstraktların fenolik bileşenleri üzerindeki etkisi anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Ancak propolisin sulu çözücülü ekstraktların antioksidan kapasitesi çalışmada kullanılan diğer çözücülere göre oldukça düşüktür. Çakıroğlu'da ABTS radikal katyonunun absorpsiyon spektrumu yöntemi ile farklı çözücüler kullanarak elde ettiği propolis ekstraktlarının antioksidan kapasitesini incelemiştir. Çalışmada DMSO, etanol, gliserol, aseton ve suyun çözücü olarak kullanıldığı propolis ekstraktlarının antioksidan kapasitesleri sırasıyla 248.50 mmol Trolox / 100 g propolis, 233.08 mmol Trolox / 100 g propolis, 159.82 mmol Trolox / 100 g propolis, 157.52 mmol Trolox / 100 g propolis ve 15.38 mmol Trolox / 100 g propolis olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu verilere göre propolis ekstraktında kullanılan farklı çözücüler propolisin antioksidan kapasitesi üzerinde etkili olmaktadır [76].

Gıdanın sahip olduğu antioksidan kapasitesi, fenolik bileşenler ve flavonoidler tarafından desteklenen biyoaktif özelliklerdir. Bu destekleyici etki özellikle DPPH yöntemi ile daha belirgin tespit edilebilmektedir [210, 211]. Bu nedenle propolis

örneklerinin antioksidan aktivitesi ile toplam fenolik bileşen içeriği arasındaki ilişki araştırılmıştır. Araştırmaya göre propolisin antioksidan aktivitesi ile toplam fenolik bileşen içeriği arasındaki pozitif bir ilişki olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.29).



Şekil 3.29 Propolis örneklerinin antioksidan kapasitesi ile toplam fenolik bileşen içeriğinin regrasyonu

Elde edilen korelasyon eğrisi ve toplam fenolik bileşen-antioksidan kapasitesi sonuçlara bakıldığında, propolis örneklerinin toplam fenolik bileşen içeriğinin yüksek olması, yüksek antioksidan aktivitenin fenolik maddelerden kaynaklandığını ortaya koymuştur. Daha önce yapılmış çalışmalarda da propolisin toplam fenolik ve flavonoid içeriği ile antioksidan kapasitesinin yüksek korelasyona sahip olduğu belirlenmiştir [2, 212, 213].

3.4 Propolisin Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi

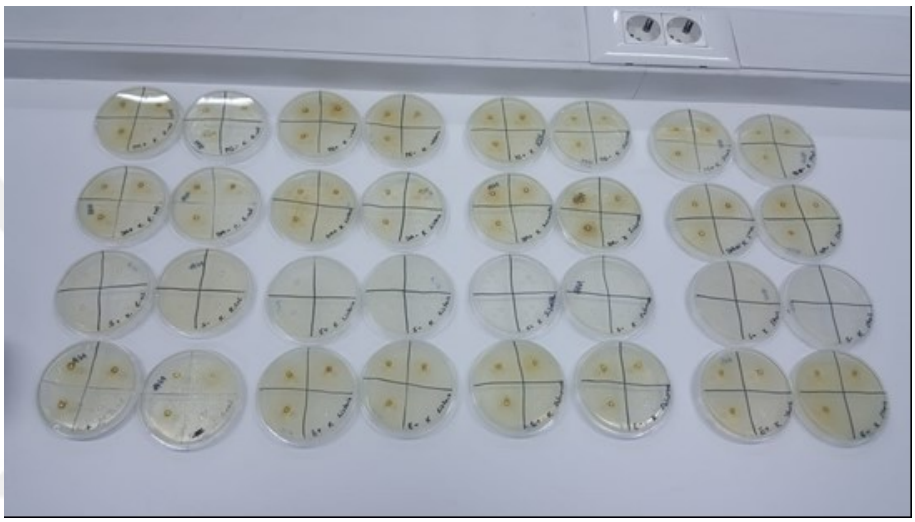
3.4.1 Agar Difüzyon Yöntemi ile Propolis Ekstraktlarının Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesinden Elde Edilen Sonuçlar

Mikroorganizmalar gıdalar için bir çok olumlu etkisinin yanında olumsuz etkileride içermektedir. Mikroorganizmaların olumsuz etkileri sonucunda gıdalarda toksin oluşumu, istenmeyen renk, koku ve şekil değişiklikleri meydana gelmektedir. Propolis örneklerinin antimikrobiyal etkileri incelenirken kullanılan mikroorganizmalar gıdalarda olumsuz etkiler oluşturabilecek etkilere sahiptir.

Çalışmada Denizli bölgesinden toplanan propolislerin farklı çözücüler ve farklı yöntemler ile elde edilen ekstraktların gram negatif (-) ve gram pozitif (+)

bakteriler, maya ve küfler üzerine olan antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Propolis örneklerinin antimikrobiyal aktiviteleri araştırılırken agar difüzyon metodu kullanılmıştır.

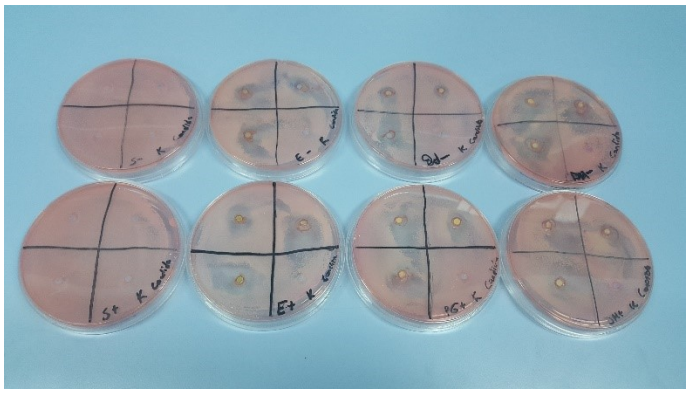
Propolis örneklerinin (ultrases uygulanan ve uygulanmayan); gıdalarda patojen olarak bilinen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella enterica* bakterileri üzerine antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi için inkübasyon sonrasında, deliklerin çevresinde oluşan inhibisyon zonları kumpasla ölçülmüştür (Şekil 3.30). Petri üzerinde yapılan ölçümler sonucunda propolisin test bakterileri üzerine antimikrobiyal aktivitesi olduğu tespit edilmiştir.



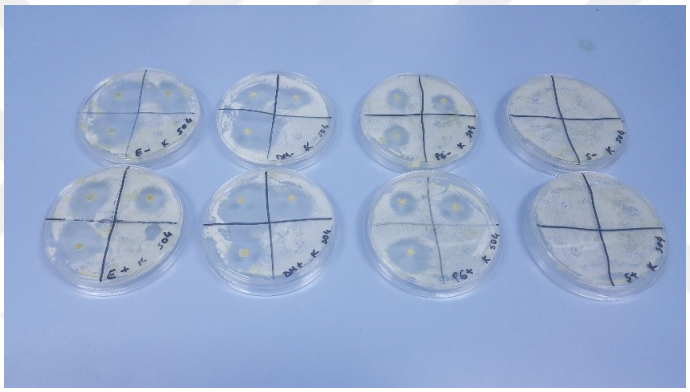
Şekil 3.30 NA (Nutrient Agar) besi yerinde gram+ ve gram- bakteriler üzerine oluşan propolis ekstraktlarının inhibisyon zonları

Propolisin mayalar üzerindeki etkisi *Candida albicans* kullanılarak belirlenmiştir. İnkübasyon sonrasında, DRBC Agar (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar) besi yerinde korkbor deliklerinin çevresinde oluşan inhibisyon zonları kumpasla ölçüldü (Şekil 3.31). Yapılan ölçümler sonucunda propolisin farklı çözücü ve ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ekstraktlarının *Candida albicans* üzerine antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir.

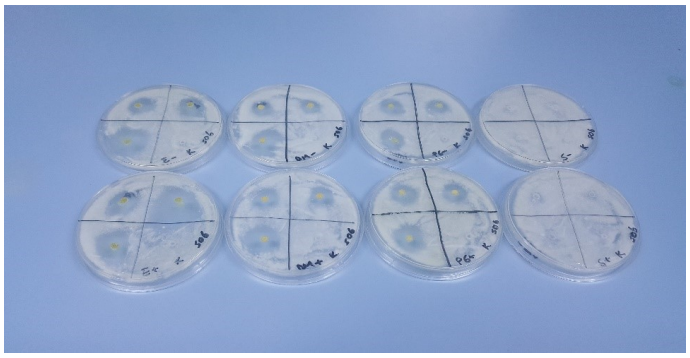
Propolis örneklerinin (ultrases uygulanan ve uygulanmayan); antifungal etkileri *Penicillium carneum*, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus niger* küfleri kullanılarak Şekil 3.32, Şekil 3.33 ve Şekil 3.34'te sırasıyla belirlenmiştir. İnkübasyon sonrasında, PDA (Patates Dekstroz Agar) besi yerinde korkbor deliklerinin çevresinde oluşan inhibisyon zonları kumpasla ölçüldü (Şekil 3.36). Yapılan ölçümler sonucunda propolisin farklı çözücü ve ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ekstraktlarının (sulu ekstraktlar hariç) *Penicillium carneum*, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus niger* küfleri üzerine yüksek antifungal etki gösterdiği belirlenmiştir.



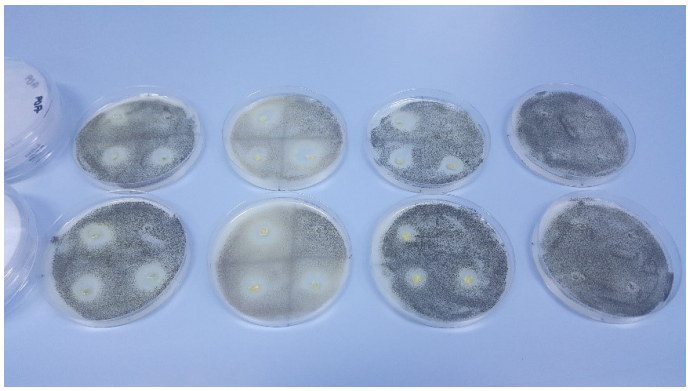
Şekil 3.31 DRBC Agar (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar) besi yerinde oluşan propolis ekstraktlarının inhibisyon zonları



Şekil 3.32 PDA Agar (Patates Dekstroz Agar) besi yerinde *Penicillium carneum* üzerine oluşan propolis ekstraktlarının inhibisyon zonları



Şekil 3.33 PDA Agar (Patates Dekstroz Agar) besi yerinde *Aspergillus flavus* üzerine oluşan propolis ekstraktlarının inhibisyon zonlar



Şekil 3.34 PDA Agar (Patates Dekstroz Agar) besi yerinde *Aspergillus niger* üzerine oluşan propolis ekstraktlarının inhibisyon zonları

Antimikrobiyal aktivite tayini sonucunda, propolis ekstraktlarının kumpasla ölçülen inhibisyon zonları hesaplanarak mm cinsinden ifade edilmiştir (Tablo 3.7). Tablo 3.7'ye göre tüm propolis ekstraktlarının test edilen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal ve antifungal aktivite gösterdiği ve bu etkinin 4-19 mm arasında inhibisyon zonuna sahip olduğu tespit edilmiştir. Ekstraksiyon yöntemlerinin ve çözücü tipinin etkisi antimikrobiyal aktiviteyi önemli ölçüde etkiledi ($p < 0.05$).

Genellikle, propolis ekstraktlarının antifungal aktivitesinin antimikrobiyal aktiviteden daha güçlü olduğu belirlenmiştir. Propolis ekstreleri gram-pozitif bakteriler üzerinde gram-negatif bakterilere göre daha güçlü bir antibakteriyel etki göstermiştir. Bu sonuçlar, propolis ekstraktlarının gram-pozitif suşların hücre duvarı ile gram-negatif suşların hücre duvarından daha iyi etkileşimi nedeniyle olabilir [19]. Bu sonuçlar diğer araştırmacıların bulgularıyla doğrulanmıştır [214, 215].

Çalışmanın antimikrobiyal aktivite sonuçlarında sulu propolis ekstraktları dışındaki örneklerin gram+ bakterilere karşı (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*) daha etkili olduğu gözlenmektedir.Marcucci ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, bu bilgiyi doğrular nitelikte propolisin metanollü ekstraktlarının gram pozitif bakteriler üzerine inhibitör etkisinin daha yüksek olduğunu bildirmiştir [216]. Yapılan başka bir araştırmada farklı çözücülerle hazırlanan propolis özütlerinin *Streptococcus mutans* üzerine in vitro antimikrobiyal aktivitesi çalışılmış ve *Streptococcus mutans*'ın büyümesini engellediği gözlenmiştir [86].

UAE, tüm numuneler için KÇE'ye kıyasla inhibisyon bölgesi çapını önemli ölçüde arttırdı. Aynı yöntemler arasında, etanollü ekstraktlar diğerlerine göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir ($p < 0.05$). Propolisin etanol ve DMSO ekstraktları, PG ve DS'ninkinden daha yüksek antimikrobiyal aktivite sergiledi. Bununla birlikte, propolisin DS ekstraktları, tüm test mikroorganizmalarına karşı çok

zayıf bir inhibitör etki göstermiştir.

Propolisin antimikrobiyal aktivitesinin, fenolikler, flavonoidler, aromatik asitler ve esterler gibi bileşenlerinden kaynaklandığı bildirilmektedir [74]. Yüksek fenolik bileşik seviyeleri enzimlerin denatürasyonuna ve bakteriyel hücre ölümüne neden olabilir [217]. Bu nedenle, propolisin ultrases destekli ekstraksiyon örnekleri, propolisin geleneksel ekstraksiyon örneklerine kıyasla test mikroorganizmalarının gelişmesi üzerinde oldukça inhibitör bir etki göstermiştir. Propolisin sonuç olarak test mikroorganizmalarına karşı aktif inhibitör bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur [218–221].

Tablo 3.7 Propolis ekstraktlarının test mikroorganizmaları üzerine antimikrobiyal aktivitesi

Mikroorganizmalar	Etanol		DMSO		PG		DS	
	KÇE	UDE	KÇE	UDE	KÇE	UDE	KÇE	UDE
Escherichia coli 0157H7 ATCC 43888	7.60^{Ba}	9.20^{Aa}	7.20^{Bb}	8.00^{Ab}	6.40^{Bc}	8.20^{Ab}	5.00^{Bd}	6.20^{Ac}
Listeria monocytogenes ATCC 13932	10.25^{Ba}	12.50^{Aa}	10.20^{Ba}	12.40^{Aa}	9.60^{Bb}	11.00^{Ab}	6.00^{Bc}	7.00^{Ac}
Salmonella typhimurium ATCC14028	7.25^{Ba}	8.30^{Aa}	7.50^{Ba}	8.20^{Aa}	6.20^{Bb}	7.40^{Ab}	4.20^{Bc}	5.00^{Ac}
Staphylococcus aureus ATCC 29213	8.50^{Ba}	10.00^{Aa}	8.80^{Ba}	10.00^{Aa}	7.00^{Bb}	8.50^{Ab}	6.40^{Bc}	7.50^{Ac}
Streptococcus mutans UA159 (ATCC 700610)	10.20^{Ba}	11.50^{Aa}	9.20^{Bb}	10.80^{Ab}	8.20^{Bc}	9.40^{Ac}	7.10^{Bd}	7.80^{Aa}
Candida albicans 10251	9.30^{Ba}	11.20^{Aa}	9.20^{Ba}	10.40^{Ab}	9.00^{Bb}	10.40^{Ab}	4.40^{Bc}	4.90^{Ac}
Penicillium carneum IBT14 042	19.50^{Ba}	21.50^{Aa}	14.40^{Bb}	16.80^{Ab}	13.20^{Bc}	15.80^{Ab}	6.20^{Bd}	7.20^{Ac}
Aspergillus flavus ATCC 15517	12.20^{Ba}	15.20^{Aa}	11.50^{Bb}	12.70^{Ab}	11.00^{Bc}	12.30^{Ac}	6.00^{Bd}	8.50^{Ad}
Aspergillus niger ATCC9642	11.50^{Ba}	12.50^{Aa}	11.20^{Ba}	11.50^{Ab}	10.00^{Bb}	10.80^{Ac}	7.50^{Bc}	7.20^{Ad}

Testler üç tekrarlı yapıldı. İnhibisyon zonlarının çaplarının değerleri mm cinsinden verilmiştir. Aynı satırdaki farklı büyük harfler ekstraksiyon yönteminin antimikrobiyal aktivite üzerindeki önemini göstermektedir ($p < 0.05$). Aynı satırdaki farklı küçük harfler, solvent tipinin antimikrobiyal aktivite üzerindeki önemini göstermektedir ($p < 0.05$). KÇE; Klasik çözücü ekstraksiyonu, UDE; Ultrases destekli ekstraksiyon. DS; Damıtılmış su, DMSO, Dimetil sülfoksit, PG; propilen.

Pobiega ve arkadaşları, ultrases işlemi zamanındaki artışın test mikroorganizmalarına karşı daha güçlü bir inhibitör etki gösterdiğini bildirmiştir [222]. Daha uzun ultrases uygulama sürelerinin daha yüksek flavonoid ve fenol içeriği ve antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Ertürk ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada kullanılan propolisin etanollü ekstraktı yüksek antimikrobiyal aktivite gösterirken sulu propolis ekstraktının antimikrobiyal aktivitesinin sadece *Streptococcus mutans* (RSHE 676) üzerine olduğu belirlenmiştir [81]. Bu sonuçlar suyun propolis içerisindeki antimikrobiyal özellikteki bileşenleri çözememesinden kaynaklandığını ortaya koymaktadır. Bu

nedenle ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi uygulanması propolisin sulu ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesinin az da olsa iyileşmesini sağlamaktadır.

Propolisin antifungal aktiviteleri için yapılan çalışmalar incelediğinde; propolisin fıstıklarda aflatoksin üreten en önemli küfler olan *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus*'un büyümesi üzerindeki etkisini belirlenmiştir. Yapılan çalışmada; heksan, diklorometan, metanol ve su çözücü olarak ekstraksiyon için kullanılmış ve antifungal etkilere sahip olduğu görülmüştür [221]. Ancak *Penicillium carneum* ve *Aspergillus niger* üzerine çalışmalara rastlanmamaktadır. Çalışma sonucunda ise propolis ekstraktlarının küflere karşı en yüksek inhibisyon etkisi ortalama 13 mm ile *Penicillium carneum* üzerindedir.

Propolis ekstraktlarının elde edilmesinde farklı çözücülerin ve yöntemlerin kullanılması propolisin antimikrobiyal aktivitesini etkilemektedir. Ancak bu etkilerin mikroorganizmanın türüne göre değiştiğ de unutulmamalıdır.

Bu incelemede kullanılan mikroorganizmaların gıdalarda olumsuz etkiler oluşturabilecek etkilere sahip olması, propolisin antimikrobiyal aktivitesinin etkinliğinin ne kadar yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Propolisin antimikrobiyal aktivitesinin yüksek olması nedeniyle gıdalarda bu mikroorganizmaların ortaya çıkardığı zararlı etkilere karşı antimikrobiyal madde olarak kullanılabilir.

3.4.2 Propolis Ekstraktlarının Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları (MİK)

Antimikrobiyal aktivite değerleri belirlenen farklı çözücü ve yöntemle elde edilen propolis ekstraktlarının test mikroorganizmalarına karşı etki ettiği minimum inhibisyon konsantrasyonu değerleri belirlenmiştir. Minimum inhibisyon konsantrasyonu değerleri belirlenirken agar difüsyon metoduna göre, örneklerin farklı konsantrasyonları (1:10, 1:100, 1:1000 ve 1:10000 μg/mL) hazırlanarak, test mikroorganizmalarına olan etkisi korkborla açılan deliklerin çevresindeki inhibisyon zonlarının kumpasla ölçülmesi ile belirlenmiştir (Tablo 3.8). İnhibisyon zonlarının çaplarının değerleri mm cinsinden verilmiştir. Ekstraksiyon yöntemlerinin ve çözücü tipinin etkisi minimum inhibisyon konsantrasyonundaki değerleri önemli ölçüde etkilemiştir ($p < 0.05$).

Elde edilen verilere göre propolis ekstraktlarının 1:100 konsantrasyonuna kadar antimikrobiyal etkiye sahip olduğu görülmektedir. DS'li ekstraktlar hariç diğer çözücülerde 1:1000 ve DMSO'lu ultraseste çözünmüş ekstraktlarda 1:10000 konsantrasyonunda propolisin inhibisyon etkisine rastlanmaktadır.Darwish ve arkadaşlarının, *Candida albicans*, *Candida krusei* ve *Candida glabrata*

üzerine yapmış olduğu minimum inhibisyon konsantrasyonu çalışmalarında düşük konsantrasyonlarda bile etanollü propolis ekstraktlarının *C. albicans* ve *C. glabrata* üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır [223].

Tablo 3.8 Propolis ekstraktlarının test mikroorganizmaları üzerine minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerleri

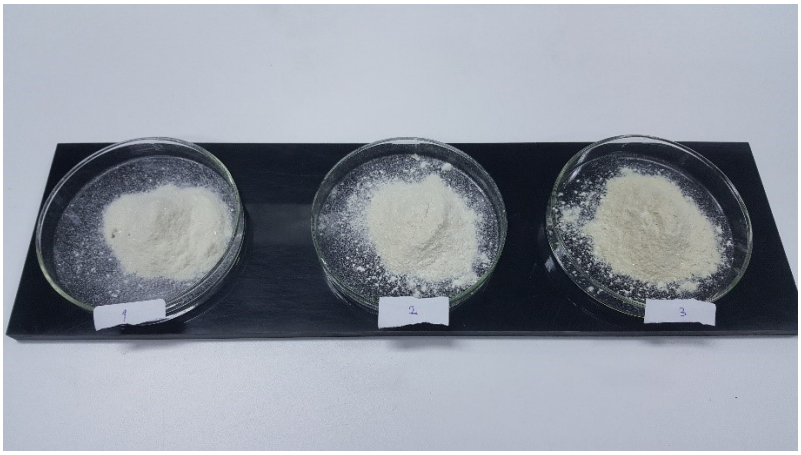
	Etanol						DMSO							PG						DS			
	KÇE			UDE			KÇE			UDE				KÇE			UDE			KÇE		UDE	
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-1}	10^{-2}
E.c.	4	4	3	5	4	4	3	3	3	4	4	4	3	3	3	3	4	4	4	2	2	3	3
L.m.	5	4	3	7	5	3	6	6	4	7	4	4	3	6	4	3	7	5	4	-	-	3	2
S. t.	4	3	3	5	5	3	4	4	4	5	4	3	-	3	3	3	5	5	4	2	2	3	3
S.a.	4	4	3	4	4	3	4	4	3	5	4	4	3	4	4	3	4	4	3	-	-	3	-
S.m.	6	5	3	7	5	3	5	4	3	5	4	3	-	4	4	-	5	4	3	3	-	3	3
C.a.	5	5	4	8	8	4	7	4	3	7	6	4	-	5	5	-	6	4	4	2	-	-	-
P.c.	10	7	3	15	8	4	10	7	-	12	8	-	-	9	6	-	11	8	-	-	-	4	-
A. f.	7	4	-	8	5	-	8	5	-	11	8	-	-	6	-	-	10	5	-	-	-	-	-
A.n.	4	4	-	5	5	4	4	4	-	6	3	-	-	4	3	-	5	4	-	-	-	-	-

KÇE; Klasik çözücü ekstraksiyonu, UDE; Ultrases destekli ekstraksiyon. DS; Damıtılmış su, DMSO, Dimetil sülfoksit, PG; propilen glikol. E.c.: Escherichia coli, L.m.: Listeria monocytogenes, S.t.: Salmonella typhimurium, S.a.: Staphylococcus aureus, S.m.: Streptococcus mutans, C.a.: Candida albicans, P.c.: Penicillium carneum, A.f.: Aspergillus flavus, A.n.: Aspergillus niger. Testler üç tekrarlı yapıldı. İnhibisyon zonlarının çaplarının değerleri mm cinsinden verilmiştir.

3.5 Propolis Ekstraktlarının Enkapsüle Edilmesi

3.5.1 Enkapsüle Edilmiş Propolislerin Enkapsülasyon Verimliliği

Propolisin enkapsülasyon yöntemi, sadece DS'li örneklerde süblimasyon prensibine dayanan dondurarak kurutma yoluyla gerçekleştirilmiştir. Dondurarak kurutmanın sonucu, propolis katı toz bir formda üretilmiştir (Şekil 3.35). Dondurarak kurutmadan elde edilen enkapsüle propolis örneklerine bakıldığında ultrases destekli örneklerden biraz daha farklı renkte olduğu görülmektedir.



Şekil 3.35 Dondurarak kurutucuda enkapsüle edilmiş propolis örnekleri (1) kontrol (40 ml su: 8 g arap zamkı), (2) KÇE propolis (40 ml DS'li propolis: 8 g arap zamkı), (3) UDE propolis (40 ml DS'li propolis: 8 g arap zamkı)

Arap zamkı ile enkapsüle edilmiş propolis örneklerinin, enkapsülasyon verimliliği kontrol örneğinde % 58.1, KÇE'li sulu propolis örneğinde % 56.3, UDE'li sulu propolis örneğinde % 51.4 olarak belirlenmiştir. Kapsülleme verimliliğinin sonuçları duvar malzemesine göre değişmektedir. Duvar malzemesi değiştirilerek yapılan bir çalışmada pirinç ve bezelye proteinleri diğer proteinlerden önemli ölçüde daha yüksek verimlilik değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir [160].

Propolisin enkapsüle edildiği diğer bir çalışmada ise kapsüllenmiş örnekte en yüksek fenolik bileşik içeriği maltodekstrin duvar malzemesi olarak kullanıldığında elde edilmiştir. Arap zamkı da kullanılan çalışmada kullanılan kurutma işleminden bağımsız olarak en düşük fenolik bileşen içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir [224]. Bu davranış, kapsülleme verimliliğinin, kapsüllenmiş bileşiklere ve kullanılan kaplama malzemesine büyük ölçüde bağlı olmasıyla açıklanabilir [225].

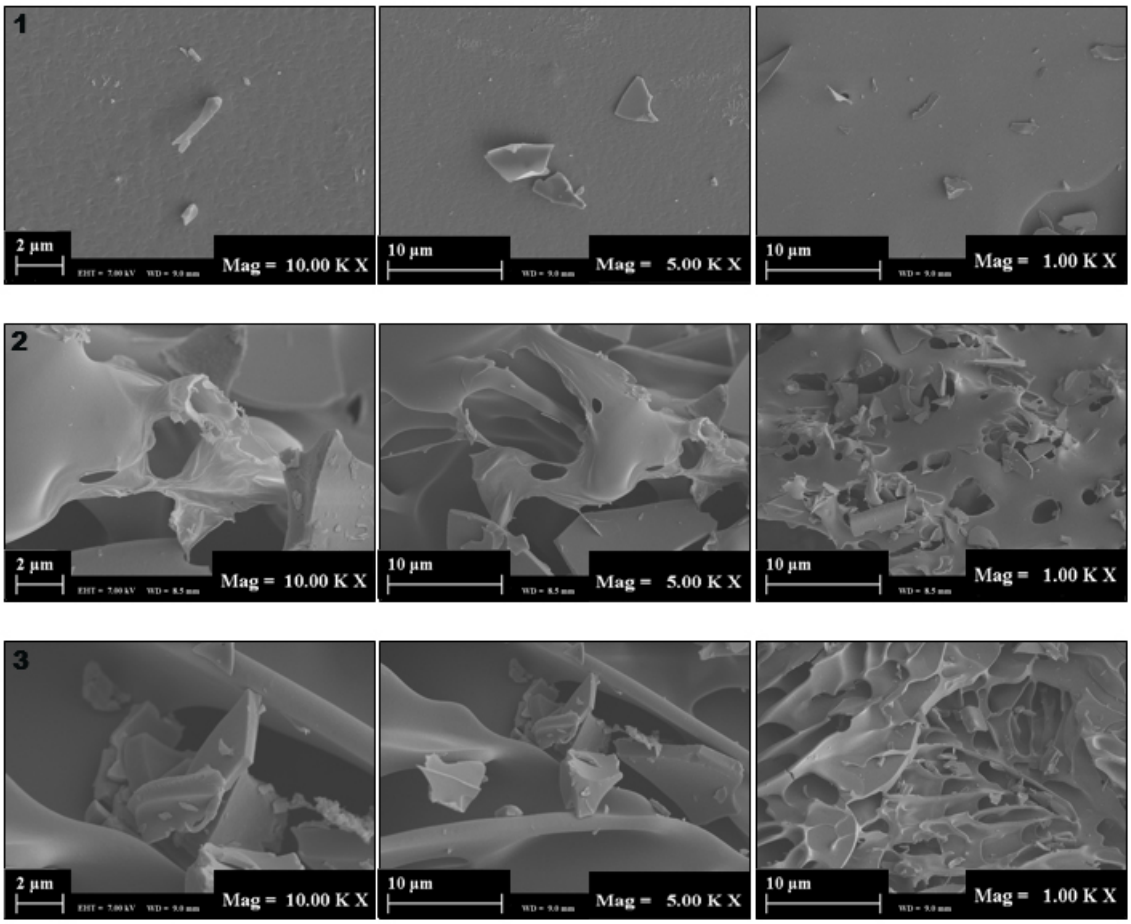
3.5.2 Enkapsüle Edilmiş Propolislerin Mikroyapısal Özellikleri

Arap zamkı ile dondurarak kurutma yöntemi ile enkapsüle edilmiş propolis toz partiküllerinin, taramalı elektron mikroskobu (SEM) tarafından 10000x ve 50000'lik büyüklüklerde görünümleri elde edilmiştir (Şekil 3.36).

Enkapsüle propolislerin görüntüleri incelendiğinde, partiküllerin biçimsiz camsı şekiller sergilediği görülmektedir. Oluşan bu biçimsiz camsı şekildeki yapı formu dondurarak kurutma sırasında partiküllerin toplanma ve bütünleşmesi ile meydana gelmektedir [226].

Elde edilen görüntülerde enkapsüle propolislerin gözeneksiz ve pürüzsüz bir yüzeye sahip oldukları gözlemlenmektedir. Bu durum kaplama materyalinin propolisleri iyi bir şekilde enkapsüle ettiğini göstermektedir. Arap zamkı ile enkapsüle edilmiş propolis partiküllerinin analizi diğer çalışmalardaki sonuçlarla benzerlik göstermiştir [207, 227]. Tonon ve arkadaşları, pürüzsüz yüzeylere sahip parçacıkların pürüzlü yüzeylere sahip olanlardan daha az temas alanları olduğunu bildirmiş ve bunun onları oksidasyon gibi bozunma reaksiyonlarına karşı daha korunaklı hale getirdiğini belirlemiştir [228].

Enkapsüle partiküllerin iyi bir kapsülleme matris bariyeri ve çekirdek malzemenin daha iyi korunmasını teşvik ettiği için minimal çatlama veya pürüzlülük ile düzgün bir yüzeye sahip olması arzu edilir [207, 229]. Enkapsüle propolislerde oluşan bu camsı ve pürüzsüz yapı enkapsüle edilmiş propolisin fenoliklerini ısıya ve oksijene maruz kalmaktan koruyabilir [230]. Görüntüler ayrıca KÇE-DS'li ve UDE-DS'li enkapsüle propolis örnekleri karşılaştırıldığında ve UDE'li enkapsüle propolis örneklerinin



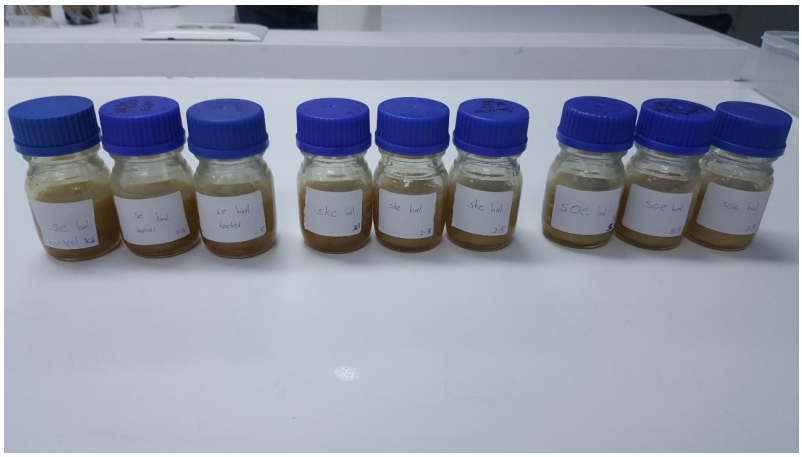
Şekil 3.36 Enkapsüle edilen propolis örneklerinin SEM görüntüsü (1) kontrol (su:arap zamkı), (2) KÇE-DS propolis,(3) UDE-DS propolis

daha yuvarlatılmış köşelere sahip olduğu görülmektedir. Bu da UDE-DS'li propolis örneklerinin ısıya ve oksijene karşı daha iyi korunmasını sağlayacaktır.

3.6 Enkapsüle Edilmiş Propolis Ekstraktlarının Balda Kullanılması

Propolisin normalde tüketilmesine engel olan organoleptik özellikleri nedeniyle balda kullanılmıştır. Bal örneklerine enkapsüle edilen kontrol (arap zamkı+su), enkapsüle edilmiş klasık çözücü uygulanan DS'li propolis (KÇE-EDS) ve enkapsüle edilmiş ultrases destekli DS'li propolis (UDE-EDS) örneklerinden % 0.1, % 0.3 ve % 0.5 konsantrasyonlarına sahip karışımlar hazırlanmıştır (Şekil 3.37). Böylelikle balın ve propolisin sahip olduğu sinerjik etki ve propolisin tüketilebilirliği arttırılmaktadır.

Enkapsüle edilmiş sulu propolis ekstraktlarının balda kullanımı dışında yapılan çalışmalar sahip olduğu yüzey karakteristikleri ve higroskobik özelliklerinden dolayı enkapsüle edilmiş etanolle çözündürülen propolis örneklerinin peynir ve puding gibi gıda maddelerinin formülasyonunda kullanılabilir olduğunu ortaya çıkarmıştır [160].



Şekil 3.37 Balda farklı oranlarda kullanılan enkapsüle edilmiş propolis ekstraktları

Başka bir çalışmada Arap zamkı ve oktenil süksinik anhidrit (OSA) nişastası kullanılarak sprey kurutucuda enkapsüle edilmiş etanollü propolis numuneleri üretilmiştir. Bu işlem propolisin antioksidan aktivitesinin korunmasına ve oda sıcaklığında depolama sırasında soğuk suda yüksek oranda dağılabilen bir toz formda elde edilmesini sağlamıştır [231].

Propolis ekstraksiyonunda enkapsülasyon teknolojisinin uygulanması, gıda endüstrisindeki uygulamalarda antimikrobiyal ve antioksidan katkı maddesi kullanımları gibi çeşitli alanlarda propolis kullanımını artırabilir.

3.6.1 Ballı Enkapsüle Edilmiş Propolis Karışımlarının Toplam Fenolik Özellikleri

Enkapsüle edilmiş DS'li propolis örneklerinin ballı karışımlarının toplam fenolik bileşen içeriği belirlenmiştir (Tablo 3.9). Tabloya göre enkapsüle propolislerin, balla karıştırıldıktan sonra balın fenolik içeriği üzerine katkı sağladığı görülmektedir. Ayrıca kullanılan enkapsüle propolis konsantrasyonu arttırıldıkça karışımların toplam fenolik bileşen içeriği artmıştır. Buradan anlaşılacağı üzere propolisler enkapsüle edildikten sonra fenolik bileşen içeriklerini korumaktadır.Enkapsüle edilmiş propolislerin fenolik bileşen içeriklerini korumasında kullanılan kaplama materyalinin etkisi burada görülmektedir.

Tablo 3.9 Enkapsüle edilmiş DS'li propolis örneklerinin ballı karışımlarının toplam fenolik bileşen içeriği

Çözücü	Toplam Fenolik Bileşen (mg GAE / 100 g karışım)		
	0.1	**0.3**	**0.5**
Kontrol (bal)	1,60	1,79	1,87
KÇE-DS	1,95	2,17	2.23
UDE-DS	2,13	2,25	2,59

Arap zamkı kullanılarak yapılan başka bir çalışma da propolisin sahip olduğu bileşiklerin kaybını önleyerek daha yüksek bir tutma elde etmiş ve toplam fenolik bileşen ve antioksidan kapasitesini azaltmamıştır [232]. Da Silva ve diğ. (2013) ayrıca Arap zamkının, spreyle kurutma sırasında biyoaktif bileşikleri korumak için diğer taşıyıcılardan daha iyi olduğunu bulmuşlardır [231].

3.6.2 Ballı Enkapsüle Edilmiş Propolis Karışımlarının Antioksidan Özellikleri

Enkapsüle edilmiş DS'li propolis örneklerinin ballı karışımlarının antioksidan kapasitesi belirlenmiştir (Tablo 3.10).Tabloya göre enkapsüle propolislerin, balla karıştırıldıktan sonra balın antioksidan kapasitesi üzerine önemli bir etkisinin olmadığı görülmektedir ($p< 0.05$). Balda kullanılan UDE'li enkapsüle propolis örneklerinin ve KÇE'li enkapsüle propolis örneklerinin karışımın antioksidan kapasitesi üzerine önemli bir farklılık içermediği tespit edilmiştir ($p< 0.05$). Bu nedenle sulu propolis ekstraktlarının enkapsüle edilmesi ve ardından bala katılması sonucu var olan antioksidan aktivitesinin propolis ekstraktı içeriğinin azalmasından dolayı etkili olmadığı söylenebilir.

Tablo 3.10 Enkapsüle edilmiş DS'li propolis örneklerinin ballı karışımlarının antioksidan kapasitesi

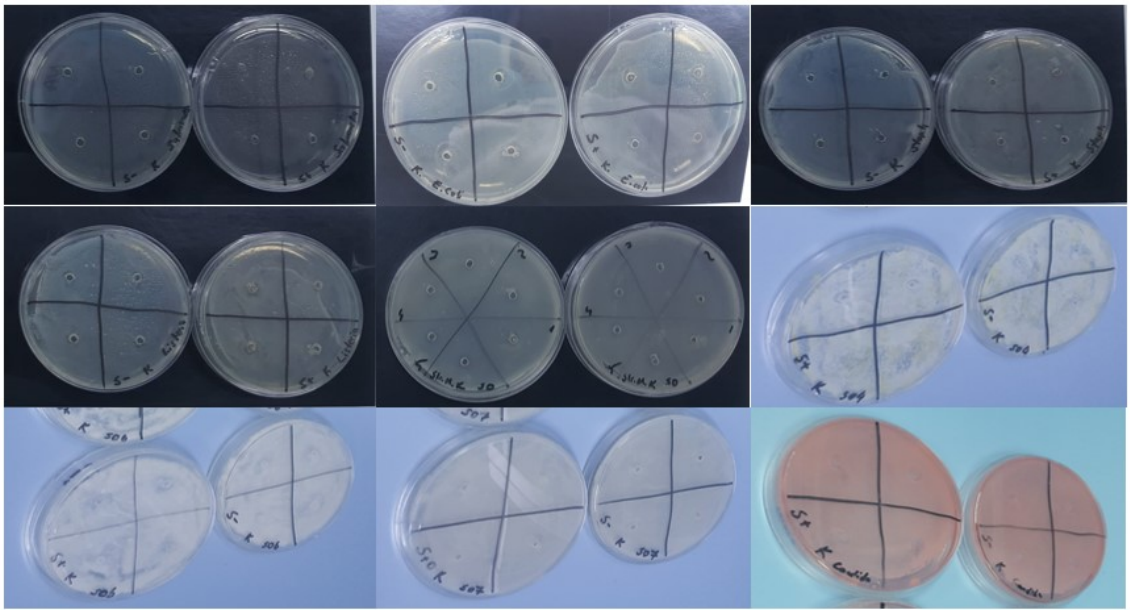
Çözücü	Antioksidan Kapasitesi (mg Trolox / 100 g propolis)		
	0.1	**0.3**	**0.5**
Kontrol (bal)	$0{,}160^{ab}$	$0{,}161^{ab}$	$0{,}163^{ab}$
KÇE-DS	$0{,}167^{ab}$	$0{,}171^{ab}$	0.173^{ab}
UDE-DS	$0{,}176^{ab}$	$0{,}178^{ab}$	$0{,}183^{ab}$

Yapılan çalışmalara bakıldığında enkapsüle edilmiş propolislerin kullanılmış olduğu bal örneklerinde propolisin balın antioksidan kapasitesi üzerine etkili olmasında kullanılan kaplama materyalinin önemli olduğu bidirilmiştir. Da Porto ve arkadaşları, arap zamkı kullanılan enkapsüle propolislerde DPPH yöntemi ile antioksidan etkinliğinin tespitinin daha yüksek olduğunu ve bu yöntemle kurutma işlemlerinde kullanılan kapsülleme malzeme miktarını düşürüldüğünü belirlemiştir [207]. Busch ve arkadaşları ise arap zamkının DPPH antioksidan kapasitesini daha yüksek bir şekilde tutulduğunu bildirmiştir [232].Bu nedenle karışımdaki antioksidan aktivitesinin önemli bulunamamasının sebebinin kaplama materyaline ait olmadığı düşünülmektedir.

3.6.3 Baldaki Enkapsüle Edilmiş Propolislerin Antimikrobiyal Özellikleri

Çalışmada klasik çözücü ve ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen distile sulu enkapsüle propolis örneklerinin ballı karışımlarının *Escherichia coli*,

Listeria monocytogenes, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Penicillium carneum*, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus niger* üzerine antimikrobial özellikleri incelenmiştir. Propolis örneklerinin antimikrobiyal aktiviteleri araştırılırken agar difüzyon metodu kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite tayini sonucunda, enkapsüle propolis içeren ballı karışımların besi yerlerinde oluşturduğu inhibisyon zonları kumpasla ölçülmüştür (Şekil 3.38). Şekil göre tüm propolis ekstraktlarının test edilen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal ve antifungal aktivite göstermediği tespit edilmiştir.



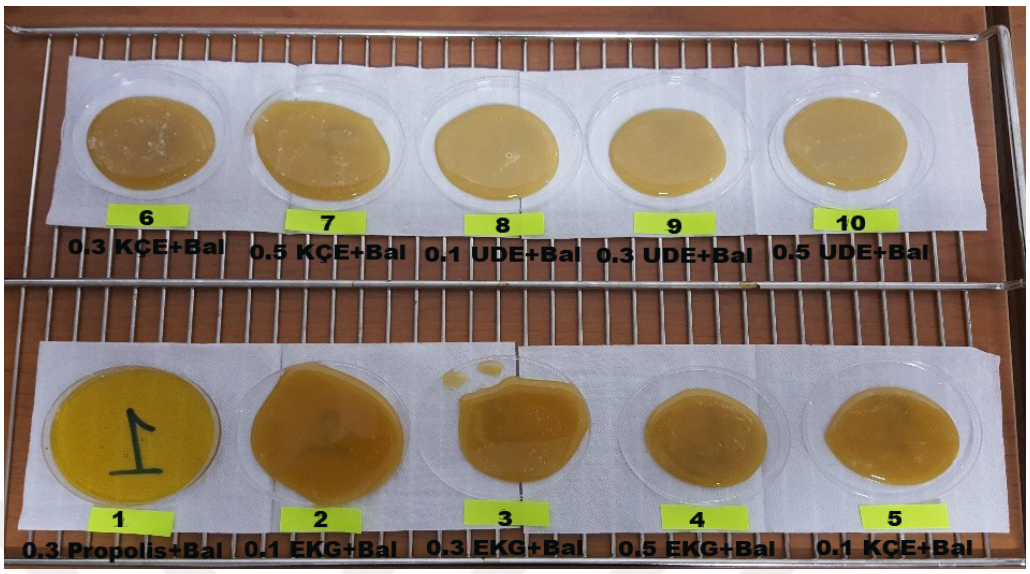
Şekil 3.38 Balda farklı oranlarda kullanılan enkapsüle edilmiş propolis ekstraktları

Propolisin antimikrobiyal aktivitesi içerisinde bulunan yüksek miktardaki fenolikler, flavonoidler, aromatik asitler ve esterler gibi bileşenlerin [74] mikroorganizmalardaki enzimlerin denatürasyonuna ve bakteriyel hücre ölümüne neden olmasından ileri gelmektedir [217]. Ancak enkapsüle propolis içeren ballı karışımlardaki toplam fenolik bileşen oranı antimikrobiyal aktivite için yeterli bulunmamaktadır. Çünkü hem enkapsülasyon için kullanılan DS'li propolis ekstraktlarının toplam fenolik içeriğine sahip olması hem bu ekstraktlardan alınan örneklerin enkapsüle edilirken ve bala karıştırılıtken seyreltilmesi sonucu fenolik bileşen içeriği seyrelmiştir. Böylelikle enkapsüle edilmeden önceki sulu propolis ekstraktlarının düşük antimikrobiyal etkinliği daha da azalarak etksini kaybetmiştir.

3.6.4 Enkapsüle Propolis İlave Edilmiş Balın Duyusal Özellikleri

Duyusal analiz kapsamında koku, tat, renk, doku ve genel kabul edilebilirlik özellikleri bakımından farklı (%,1 %,3 ve %,5) konsantrasyonlardaki KÇE'li ve UDE'li enkapsüle sulu propolis içeren ballar, enkapsülasyon kontrol grubunu (EKG) içeren (su+arap

zamkı) ballar ve sadece propolis içeren bal arasında faklılıklar belirlemeye çalışılmıştır (Şekil 3.39).



Şekil 3.39 Balda farklı oranlarda kullanılan enkapsüle edilmiş propolis karışımları

Panelistler tarafından yapılan puanlamaların ortalaması alınarak değerlendirme yapılmıştır (Tablo 3.11). Elde edilen verilere göre toplam beğenilirlik açısından enkapsüle kontrol grubu örnekleri (EKG) içeren ballar, klasik çözücülü enkapsüle ekstrakt (KÇEE) örnekleri içeren ballar ve ultrases destekli enkapsüle ekstrakt (UDEE) örnekleri içeren ballar sırasıyla daha çok beğenilmiştir. Ama genel kabul edilebilirlik açısından bütün ballar kabul edilebilir olarak tüketime uygun bulunmuştur. Gruplar içerisindeki farklı konsantrasyonlarda kullanılan enkapsüle propolis örnekleri içeren ballar arasında öneli bir farklılık görülmemiştir.

Renk açısından örnekler değerlendirildiğinde 1 numaralı örnekten 10 numaralı örneğe doğru gidildikçe renk beğenilirliğinin düştüğü görülmektedir. Bunun nedeni karışımların balın doğal renginden uzaklaşmasıdır. Bu renk değişimi beğenilirliği düşürse de genel kabul edilirliği etkilememiştir.

Propoliste tüketilebilirliği en çok etkileyen faktörlerden bir tanesi sahip olduğu kokudur. Bu koku propolislerin enkapsüle edilmesiyle en aza indirilmeye çalışılmıştır. Duyusal analiz sonucu elde edilen verilerde enkapsüle propolis katılan bal örnekleriyle propolis katılmayan örnekler arasında önemli bir farkın olmadığını ortaya koymaktadır.

Balın sahip olduğu tada enkapsüle propolislerin etkisi incelendiğinde tadı etkilediği gözlemlenmiştir. Duyusal analizden elde edilen sonuçlara göre propolis az veya çok konulması tadda belirlenmesi güç bir farklılık oluştururken hiç konulmaması ve konulması arasında önemli derecede belirlenebilir bir farklılık gözlemlenmiştir

Tablo 3.11 Duyusal analiz sonuçları

Örnek no	Koku	Tat	Renk	Doku	Kıvam	Genel kabul edilebilirlik
01 (0.3 propolis+bal)	4.2	4.7	4.8	4.4	4.5	4.4
02 (0.1 EKG+bal)	4.1	4.7	4.1	4.3	4.4	4.2
03 (0,3 EKG+bal)	4.2	4.6	3.6	4.0	4.5	4.2
04 (0,5 EKG+bal)	3.9	4.6	3.4	4.1	4.5	3.9
05 (0,1 KÇEE+bal)	4.0	3.9	3.3	4.0	3.7	3.7
06 (0,3 KÇEE+bal)	4.0	3.9	3.2	4.3	3.8	3.7
07 (0,5 KÇEE+bal)	3.9	4.0	3.1	4.2	3.5	3.7
08 (0,1 UDEE+bal)	3.9	3.8	3.1	4.3	3.7	3.6
09 (0,3 UDEE+bal)	3.6	3.9	3.1	4.4	3.8	3.6
10 (0,5 UDEE+bal)	3.3	3.9	3.1	4.2	3.6	3.5

($p<0.005$).

Bala katılan enkapsüle edilmiş propolislerin doku üzerine etkisi incelendiğinde propolis katılan örneklerin balın dokusunu değiştirmediği belirlenmiştir. Panelistlere göre bal ağıza alındıktan sonra herhangi bir pütürlülük veya aşırı yapışkanlık hissedilmemiştir. Çiğnenebilirlik ve yutma hissinde kontrol örneğinden farklı bir yaklaşım yaşanmamıştır.

Balın fiziksel özelliklerinden olan kıvamın enkapsüle propolis katılmasıyla bala yoğunluk kattığı tespit edilmiştir. Bu yoğunluğun algılanabilen belirgin bir düzeyde olduğu ifade edilmiştir. Bala enkapsüle propolis katılmasıyla yoğunlaşmayla balın vizkozitesi artmış ve akışkanlığı azalmıştır. Bunun nedeninin propolisin enkapsüle edildiği arap zamkı maddesidir. Arap zamkının suda iyi çözünen bir madde olması sebebi ile balın içerisinde bulunan serbest su moleküllerini bağlayarak balın kıvamını koyulaştırdığı düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalarda propolis et ürünlerinde % 0.5'in altındaki konsantrasyonlarda propolis kullanımı tüketiciler açısından kabul görmektedir [63, 69]. Ayrıca yapılan başka bir çalışmada propolisin tadının bastırılması amacı ile taze balık burgerlerinde propolis konsantrasyonunu % 5 kullanılmış ancak kabul edilebilirliği arttırmak için ürünün formülasyonuna patates gevreği ve sızma zeytinyağı gibi yeni bileşenler eklenmiştir.

Tadım analizi gerçekleştirilen panelistler tarafından enkapsüle edilerek bal içerisine katılan propolis karışımları arasından 2 7 ve 10 numaralı örnekler en beğenilen ürünler olmuştur. 2 numaralı ürün içerisinde propolis içermezken, 7 numaralı ürün %0.5 oranında enkapsüle edilmiş KÇE'li DS propolis ekstratını ve 10 numaralı ürün %0.5 oranında enkapsüle edilmiş UDE'li DS propolis ekstratını içermektedir.

Duyusal analiz sonuçları toplu olarak ele alındığında propolisin ekstrakte ürünlerinin enkapsüle edilerek bala katılması propolisin tek başına katılmasından hem biyoaktif özellikleri hem de duyusal özellikleri açısından daha faydalı olacağı belirlenmiştir.

4
SONUÇ VE ÖNERİLER

Arı ürünlerinden biri olan propolis oldukça önemli bir fonksiyonel üründür. Propolisin sahip olduğu fonksiyonel özellikleri kazandıran biyoaktif bileşiklerin başında fenolik bileşikler gelmektedir. Fenolik bileşiklerin tespitinde ise en önemli nokta ekstraksiyondur. Bu nedenle önce ekstraksiyonun etkin bir şekilde yapılması gerekmektedir. Çalışmada propolis ekstrakte edilirken etanol, DMSO (dimetilsülfoksit), propilen glikol (PG) ve distile su (DS) çözücü olarak kullanılmıştır. Kullanılan çözücüler propolisteki fenolik bileşen ekstraksiyon etkinliği etkilemiştir. Ekstraksiyon aşamasında kullanılacak çözücünün etkinliği dışında etkinliğin arttırılması için ultrases ekstraksiyonu yöntemi kullanılmıştır. Ayrıca her iki etkinliğin arttırılması ile birlikte optimizasyon çalışması yapılarak propolisin fenolik maddeler gibi biyoaktif bileşenlerinin en yüksek bulunduğu ekstraksiyon yöntemi belirlenmiştir. Optimum örnek yöntemlerinin belirlenmesi ile hem klasik çözücülü ekstraksiyon yöntemi örneklerinin hem de ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi örneklerinin FTIR ve Raman spektroskopilerinde karakterizasyonu yapılmıştır.

Elde edilen propolis örneklerinin toplam fenolik bileşen madde içeriği Folin Folin-Ciocalteu yöntemi ile elde edilmiştir. Propolisleri fenolik maddelerin karakterizasyonu ise HPLC yöntemiyle belirlenmiştir. Propoliste diğer bir biyoaktif bileşen olan antioksidanların tayininde DPPH $(1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil)$ serbest radikal giderim yöntemi kullanılmıştır. En yüksek fenolik bileşen içeriği sırasıyla çözücüler için etanol, DMSO, PG ve su şeklindedir. Ekstraksiyonda ise ultrases kullanılan örneklerin kullanılmayan örneklere oranla daha yüksek fenolik içeriğe sahip olduğu belirlendi. Propolisin sahip olduğu antioksidan özelliklerde fenolik bileşen içeriği ile doğru orantı göstermiştir. Bu nedenle en yüksek antioksidan kapasitesi sırasıyla çözücüler için etanol, DMSO, PG ve su şeklindedir. Ekstraksiyonda ise ultrases kullanılan örnekler kullanılmayan örneklere oranla daha yüksek antioksidan kapasitesine sahiptir.

Propolisin antimikrobiyal özellikleri içeriğinde bulunan birçok bileşenden kaynaklanmaktadır. Propolisin antimikrobiyal aktivitesi; *Escherichia coli*

0157*H*7 (ATCC®43888), *Listeria monocytogenes* (ATCC®13932), *Salmonella typhimurium* (ATCC®14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC®29213), *Streptococcus mutans* UA159 (ATCC®700610), *Candida albicans* (ATCC®10251), *Penicillium carneum* (IBT14®042), *Aspergillus flavus* (ATCC®15517) ve *Aspergillus niger* (ATCC®9642) üzerinde çalışılmıştır. Elde edilen bulgulara göre propolis ekstraktlarının antifungal etkinliği antibakteriyel etkinliğinden daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca propolisin sahip olduğu fenolik bileşen içeriği arttıkça mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal etkisi de artmaktadır. Bu nedenle en yüksek antimikrobiyal etki sırasıyla çözücülerde etanol, DMSO, PG ve su şeklindedir. Ekstraksiyon etkinliğine bakıldığında ise ultrases kullanılan örnekler kullanılmayan örneklere oranla daha yüksek antimikrobiyal etki göstermiştir.

Antimikrobiyal etkileri ile gıdalarda kullanımı raf ömrü üzerine etkili olabilirken, propolisin ham haldeki hedonik özellikleri tüketiciler tarafından tercih edilmemektedir. Bu nedenle propolisin sulu çözücüde elde edilen ekstraktları dondurarak kurutucuda arap zamkı kullanılarak enkapsüle edilmiştir. Enkapsüle edilen propolis ekstraktları SEM cihazı kullanılarak görüntülenmiştir. Enkapsülasyon işlemi sonrasında balda kullanılarak hedonik özellikleri belirlenmiştir. Balda kullanımından elde edilen bulgularda enkapsüle propolis ekstraktlı ballı karışım hedonik (duyusal) özellikleri açısından genel olarak kabul edilmiştir. Enkapsüle ile birlikte tadın ve kokunun maskelendiği belirlenmiştir.

Enkapsüle propolis ekstraktlı ballı karışımlar toplam fenolik içeriği ve antioksidan kapasitesi bakımından incelenmiş ve enkapsüle propolis ekstraktı ilavesinin balın antioksidan ve fenolik bileşen içeriğine katkı sağlamadığı belirlenmiştir. Aynı zmanda enkapsüle propolisli ballı karışımın *Escherichia coli* 0157*H*7 (ATCC®43888), *Listeria monocytogenes* (ATCC®13932), *Salmonella typhimurium* (ATCC®14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC®29213), *Streptococcus mutans* UA159 (ATCC®700610), *Candida albicans* (ATCC®10251), *Penicillium carneum* (IBT14®042), *Aspergillus flavus* (ATCC®15517) ve *Aspergillus niger* (ATCC®9642) üzerine antimikrobiyal etkisine rastlanmamıştır.

Bütün bu veriler göz önüne alındığında su, dimetilsükfoksit (DMSO), propilen glikol (PG) gibi çözücüler ve ultrases (US) yöntemlerinin kullanılmasıyla etanolün kullanımından kaynaklı dezavantajlar ortadan kaldırılmış olup Türkiye'deki propolislerin kimyasal bileşenlerinin tespitine katkı sağlanmıştır. Alkollü çözücülere alternatif bulunarak helal tüketim ihtiyacına cevap verilmiştir.

Katıldığı ürünlerin raf ömrü propolisin antimikrobiyal etkisi sayesinde doğal olarak

uzamaktadır. Sağlık açısından hem insanlarda hem de hayvanlarda kullanımında doğal antibiyotik özellikleri sayesinde hiçbir sakıncası bulunmadan tedavilerde kullanımına olanak sağlanacaktır. Yapılan bu çalışmayla doğal gıda katkı maddesi olarak propolis ekstraktının kullanımının sadece gıda sektörüne değil aynı zamanda propolisin enkapsüle edilerek gıda maddelerinde insan tüketimine uygun şekilde kullanılması, ilaç ve kozmetik sanayiine uygun hammadde sağlanması ve doğal katkı maddesi (antimikrobiyal ve antioksidan) üretimine temel oluşturulmuştur.

KAYNAKÇA

[1] E. Ghisalberti, "Propolis: A review," *Bee world*, vol. 60, no. 2, pp. 59–84, 1979.

[2] M. Marcucci, "Chemical composition, plant origin and biological activity of brazilian propolis," *Current Topics Phytochem.*, vol. 2, pp. 115–123, 1999.

[3] N. Segueni, F. Khadraoui, S. Rhouati, "Volatile compounds as propolis characterization markers," in *Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration*, Springer, 2017, pp. 1271–1273.

[4] I.-A. I. Thamnopoulos, G. F. Michailidis, D. J. Fletouris, A. Badeka, M. G. Kontominas, A. S. Angelidis, "Inhibitory activity of propolis against listeria monocytogenes in milk stored under refrigeration," *Food microbiology*, vol. 73, pp. 168–176, 2018.

[5] A. Hazem, I. M. Pitică-Aldea, C. Popescu, L. Matei, D. Dragu, M. Economescu, I. Alexiu, I. CRIŞAN, C. C. Diaconu, C. Bleotu, *et al.*, "The antiviral/virucidal effects of alchoolic and aqueous extracts with propolis," *Farmacia*, vol. 65, no. 6, pp. 868–876, 2017.

[6] D. M. Kasote, M. V. Pawar, R. S. Bhatia, V. S. Nandre, S. S. Gundu, S. D. Jagtap, M. V. Kulkarni, "Hplc, nmr based chemical profiling and biological characterisation of ındian propolis," *Fitoterapia*, vol. 122, pp. 52–60, 2017.

[7] N. De Zordi, A. Cortesi, I. Kikic, M. Moneghini, D. Solinas, G. Innocenti, A. Portolan, G. Baratto, S. Dall'Acqua, "The supercritical carbon dioxide extraction of polyphenols from propolis: A central composite design approach," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 95, pp. 491–498, 2014.

[8] U. Kumova, "Önemli bir arı ürünü: Propolis," *Uludağ Arıcılık Dergisi*, vol. 2, no. 2, 2002.

[9] N. Durán, P. Marcato, C. Buffo, M. De Azevedo, E. Esposito, "Poly (ε-caprolactone)/propolis extract: Microencapsulation and antibacterial activity evaluation," *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 62, no. 4, pp. 287–290, 2007.

[10] A. Özkırım, B. Küçüközmen, Ö. G. Çelemli, "Impact of sterilization process on chemical composition and antimicrobial activity of propolis," *Journal of Apicultural Research*, vol. 58, no. 5, pp. 780–787, 2019.

[11] M. C. Marcucci, "Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity," *Apidologie*, vol. 26, no. 2, pp. 83–99, 1995.

[12] F. Özan, "Propolis' in kırık iyileşmesi üzerine etkilerinin deneysel olarak incelenmesi," *Sivas: Doktora Tezi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi*, 2006.

[13] A. A. Al-Ghamdi, N. I. Bayaqoob, A. I. Rushdi, Y. Alattal, B. R. Simoneit, A. H. El-Mubarak, K. F. Al-Mutlaq, "Chemical compositions and characteristics of organic compounds in propolis from yemen," *Saudi journal of biological sciences*, vol. 24, no. 5, pp. 1094–1103, 2017.

[14] R. Christov, B. Trusheva, M. Popova, V. Bankova, M. Bertrand, "Chemical composition of propolis from canada, its antiradical activity and plant origin," *Natural product research*, vol. 20, no. 06, pp. 531–536, 2006.

[15] W. Yang, Z. Wu, Z. Y. Huang, X. Miao, "Preservation of orange juice using propolis," *Journal of Food Science and Technology*, vol. 54, no. 11, pp. 3375–3383, 2017.

[16] S. Kumazawa, J. Nakamura, M. Murase, M. Miyagawa, M.-R. Ahn, S. Fukumoto, "Plant origin of okinawan propolis: Honeybee behavior observation and phytochemical analysis," *Naturwissenschaften*, vol. 95, no. 8, p. 781, 2008.

[17] M. Popova, C.-N. Chen, P.-Y. Chen, C.-Y. Huang, V. Bankova, "A validated spectrophotometric method for quantification of prenylated flavanones in pacific propolis from taiwan," *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, vol. 21, no. 2, pp. 186–191, 2010.

[18] V. S. Bankova, S. L. de Castro, M. C. M, "Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin," *Apidologie*, vol. 31, no. 1, pp. 3–15, 2000.

[19] Y.-W. Chen, S.-W. Wu, K.-K. Ho, S.-B. Lin, C.-Y. Huang, C.-N. Chen, "Characterisation of taiwanese propolis collected from different locations and seasons," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 88, no. 3, pp. 412–419, 2008.

[20] S. Kumazawa, T. Hamasaka, T. Nakayama, "Antioxidant activity of propolis of various geographic origins," *Food chemistry*, vol. 84, no. 3, pp. 329–339, 2004.

[21] H. Yang, Z. Huang, Y. Huang, W. Dong, Z. Pan, L. Wang, "Characterization of chinese crude propolis by pyrolysis–gas chromatography/mass spectrometry," *Journal of analytical and applied pyrolysis*, vol. 113, pp. 158–164, 2015.

[22] H. Yadav, P. Mungara, M. Jivrajani, M. Nivsarkar, S. Anandjiwala, "Tlc-densitometric quantification of negundoside, ursolic acid, eugenol, lupeol, and β-sitosterol using hptlc from vitex negundo leaves," *Journal of liquid chromatography & related technologies*, vol. 35, no. 11, pp. 1565–1584, 2012.

[23] A. L. Piccinelli, T. Mencherini, R. Celano, Z. Mouhoubi, A. Tamendjari, R. P. Aquino, L. Rastrelli, "Chemical composition and antioxidant activity of algerian propolis," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 61, no. 21, pp. 5080–5088, 2013.

[24] S. Moura, "Aqueous extract of brazilian green propolis: Primary components, evaluation of inflammation and wound healing by using subcutaneous implanted sponges," *Evid. Based Complement Alternat. Med.*, vol. 1, pp. 1–9, 2009.

[25] D. Sawicka, H. Car, M. H. Borawska, J. Nikliński, "The anticancer activity of propolis," *Folia histochemica et cytobiologica*, vol. 50, no. 1, pp. 25–37, 2012.

[26] L.-J. Kang, H. B. Lee, H.-J. Bae, S.-G. Lee, "Antidiabetic effect of propolis: Reduction of expression of glucose-6-phosphatase through inhibition of y279 and y216 autophosphorylation of gsk-3α/β in hepg2 cells," *Phytotherapy research*, vol. 24, no. 10, pp. 1554–1561, 2010.

[27] P. A. de Castro, M. Savoldi, D. Bonatto, I. Malavazi, M. H. S. Goldman, A. A. Berretta, G. H. Goldman, "Transcriptional profiling of saccharomyces cerevisiae exposed to propolis," *BMC complementary and alternative medicine*, vol. 12, no. 1, p. 194, 2012.

[28] Y. Nakajima, K. Tsuruma, M. Shimazawa, S. Mishima, H. Hara, "Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 9, no. 1, p. 4, 2009.

[29] J. X. de Carvalho, R. O. Suárez, F. Q. Mendes, R. V. de Barros Fernandes, M. C. da Cunha, A. M. X. de Carvalho, "Increased shelf life of eggs through the use of propolis," *Semina: Ciências Agrarias*, vol. 34, no. 5, pp. 2287–2296, 2013.

[30] Z. Bakkaloğlu M. Arıcı, "Farklı çözücülerle propolis ekstraksiyonunun toplam fenolik içeriği, antioksidan kapasite ve antimikrobiyal aktivite üzerine etkileri," *Akademik Gıda*, vol. 17, no. 4, pp. 538–545,

[31] B. Trusheva, D. Trunkova, V. Bankova, "Different extraction methods of biologically active components from propolis: A preliminary study," *Chemistry Central Journal*, vol. 1, no. 1, p. 13, 2007.

[32] R. Krell, *Value-added products from beekeeping*, 124. Food & Agriculture Org., 1996.

[33] N. DOĞAN İ. HAYOĞLU, "Propolis ve kullanım alanları," *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, vol. 16, no. 3, pp. 39–48, 2012.

[34] F. Ayala, G. Lembo, P. Nappa, N. Balato, "Contact dermatitis from propolis," *Contact Dermatitis*, vol. 12, no. 3, pp. 181–182, 1985.

[35] B. E. Björkner, "Industrial airborne dermatoses," *Dermatologic clinics*, vol. 12, no. 3, pp. 501–509, 1994.

[36] V. Bankova, S. Popov, N. Marekov, "A study on flavonoids of propolis," *Journal of Natural Products*, vol. 46, no. 4, pp. 471–474, 1983.

[37] J. W. Dobrowolski, S. Vohora, K. Sharma, S. A. Shah, S. Naqvi, P. Dandiya, "Antibacterial, antifungal, antiamoebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products," *Journal of ethnopharmacology*, vol. 35, no. 1, pp. 77–82, 1991.

[38] V. Bankova, M. Popova, B. Trusheva, "New emerging fields of application of propolis," *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, vol. 35, no. 1, pp. 1–11, 2016.

[39] B. Nanditha P. Prabhasankar, "Antioxidants in bakery products: A review," *Critical reviews in food science and nutrition*, vol. 49, no. 1, pp. 1–27, 2008.

[40] S. Silici, N. KOC, F. M. Sariguzel, O. SAGDIC, "Mould inhibition in different fruit juices by propolis," 2005.

[41] S. Silici K. Karaman, "Inhibitory effect of propolis on patulin production of penicillium expansum in apple juice," *Journal of food processing and preservation*, vol. 38, no. 3, pp. 1129–1134, 2014.

[42] M. Makarewicz, I. Drożdż, T. Tuszyński, "The effect of some bee products on microbiological stability of fresh fruit juices," *Journal Of Health Sciences*, vol. 2, no. 4, pp. 125–140, 2012.

[43] A. Luis-Villaroya, L. Espina, D. Garcıa-Gonzalo, S. Bayarri, C. Pérez, R. Pagán, "Bioactive properties of a propolis-based dietary supplement and its use in combination with mild heat for apple juice preservation," *International journal of food microbiology*, vol. 205, pp. 90–97, 2015.

[44] S. Yang, L. Peng, Y. Cheng, F. Chen, S. Pan, "Control of citrus green and blue molds by chinese propolis," *Food Science and Biotechnology*, vol. 19, no. 5, pp. 1303–1308, 2010.

[45] O. N. Matny, S. H. Al-Warshan, A. M. Ali, "Antifungal evaluation of ıraqi propolis against penicillium expansum and mycotoxin production in apple," *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, vol. 4, no. 11, pp. 399–405, 2015.

[46] E. E. Candir, A. Ozdemir, E. M. Soylu, N. Sahinler, A. Gul, "Effects of propolis on storage of sweet cherry cultivar aksehir napolyon," *Asian J. Chem*, vol. 21, pp. 2659–2666, 2009.

[47] A. E. Özdemir, E. E. Candir, M. Kaplankiran, E. M. Soylu, N. Şahinler, A. Gül, "The effects of ethanol-dissolved propolis on the storage of grapefruit cv. star ruby," *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, vol. 34, no. 2, pp. 155–162, 2010.

[48] B.-H. Mattiuz, M.-N. Ducamp-Collin, C. F. M. Mattiuz, C. Vigneault, K. M. Marques, W. Sagoua, D. Montet, "Effect of propolis on postharvest control of anthracnose and quality parameters of 'kent'mango," *Scientia Horticulturae*, vol. 184, pp. 160–168, 2015.

[49] N. Zahid, A. Ali, Y. Siddiqui, M. Maqbool, "Efficacy of ethanolic extract of propolis in maintaining postharvest quality of dragon fruit during storage," *Postharvest Biology and Technology*, vol. 79, pp. 69–72, 2013.

[50] A. Ali, W. L. Chow, N. Zahid, M. K. Ong, "Efficacy of propolis and cinnamon oil coating in controlling post-harvest anthracnose and quality of chilli (capsicum annuum l.) during cold storage," *Food and bioprocess technology*, vol. 7, no. 9, pp. 2742–2748, 2014.

[51] G. A. Griffiths, U. Toshitaka, T. Fumihiko, H. Daisuke, "Effect of vapors from fractionated samples of propolis on microbial and oxidation damage of rice during storage," *Journal of food engineering*, vol. 88, no. 3, pp. 341–352, 2008.

[52] X. Feás, L. Pacheco, A. Iglesias, L. M. Estevinho, "Use of propolis in the sanitization of lettuce," *International journal of molecular sciences*, vol. 15, no. 7, pp. 12 243–12 257, 2014.

[53] C. A. G. Piva, I. dos Santos, A. W. Júnior, D. W. Heck, M. F. Flores, K. Pazolini, "Propolis for the control of powdery mildew and the induction of phytoalexins in cucumber," *Idesia*, vol. 33, no. 1, pp. 39–47, 2015.

[54] O. N. Matny, E. K. Abdul-Karim, R. A. Naemah, R. A. Al-Ani, *et al.*, "Activity of propolis and boswellia sp. resins extract against sclerotinia sclerotiorum causative agent of white rot disease of phaseolus vulgaris and daucus carota under storage conditions," *J. Exp. Biol. Agric. Sci*, vol. 2, pp. 65–71, 2014.

[55] M. V. Alvarez, A. G. Ponce, C. A. Mazzucotelli, M. R. Moreira, "The impact of biopreservatives and storage temperature in the quality and safety of minimally processed mixed vegetables for soup," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 95, no. 5, pp. 962–971, 2015.

[56] M. V. Alvarez, A. G. Ponce, M. R. Moreira, "Combined effect of bioactive compounds and storage temperature on sensory quality and safety of minimally processed celery, leek and butternut squash," *Journal of Food Safety*, vol. 35, no. 4, pp. 560–574, 2015.

[57] N. Sahinler, A. Gül, G. Çopur, "Chemical composition and preservative effect of turkish propolis on egg quality during storage," *Asian J. Chem*, vol. 21, pp. 1877–1886, 2009.

[58] G. Copur, O. Camci, N. Sahinler, A. Gul, "The effect of propolis egg shell coatings on interior egg quality," *Archiv fur Geflugelkunde*, vol. 72, no. 1, p. 35, 2008.

[59] A. Aygun, D. Sert, G. Copur, "Effects of propolis on eggshell microbial activity, hatchability, and chick performance in japanese quail (coturnix coturnix japonica) eggs," *Poultry Science*, vol. 91, no. 4, pp. 1018–1025, 2012.

[60] A. Aygun D. Sert, "Effects of prestorage application of propolis and storage time on eggshell microbial activity, hatchability, and chick performance in japanese quail (coturnix coturnix japonica) eggs," *Poultry science*, vol. 92, no. 12, pp. 3330–3337, 2013.

[61] G. Akpinar, S. Canogullari, M. Baylan, S. Alasahan, A. Aygun, "The use of propolis extract for the storage of quail eggs," *Journal of Applied Poultry Research*, vol. 24, no. 4, pp. 427–435, 2015.

[62] F. H. Ali, G. M. Kassem, O. A. Atta-Alla, *et al.*, "Propolis as a natural decontaminant and antioxidant in fresh oriental sausage," *Veterinaria italiana*, vol. 46, no. 2, pp. 167–172, 2010.

[63] C. Gutiérrez-Cortés H. SUAREZ MAHECHA, "Antimicrobial activity of propolis and its effect on the physicochemical and sensoral characteristics in sausages," *Vitae*, vol. 21, no. 2, pp. 90–96, 2014.

[64] R. Casquete, S. M. Castro, S. Jácome, P. Teixeira, "Antimicrobial activity of ethanolic extract of propolis in "alheira", a fermented meat sausage," *Cogent Food & Agriculture*, vol. 2, no. 1, p. 1 125 773, 2016.

[65] R. D. Vargas-Sánchez, G. R. Torrescano-Urrutia, E. Acedo-Félix, E. Carvajal-Millán, A. F. González-Córdova, B. Vallejo-Galland, M. J. Torres-Llanez, A. Sánchez-Escalante, "Antioxidant and antimicrobial activity of commercial propolis extract in beef patties," *Journal of Food science*, vol. 79, no. 8, pp. C1499–C1504, 2014.

[66] M. Kročko, M. Bobko, O. Bučko, M. Čanigová, V. Ducková, "Sensory quality, colour and oxidative stability of cured cooked ham with propolis extract," *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, vol. 8, no. 1, pp. 102–106, 2014.

[67] S. I. Hassanin E.-S. A. El-Daly, "Effect of propolis and garlic on nile tilapia oreochromis niloticus fillets during frozen storage," *J. Arab. Aquacul. Soc*, vol. 8, no. 1, pp. 237–247, 2013.

[68] S. Spinelli, A. Conte, L. Lecce, A. L. Incoronato, M. A. Del Nobile, "Microencapsulated propolis to enhance the antioxidant properties of fresh fish burgers," *Journal of Food Process Engineering*, vol. 38, no. 6, pp. 527–535, 2015.

[69] M. Duman E. Özpolat, "Effects of water extract of propolis on fresh shibuta (barbus grypus) fillets during chilled storage," *Food Chemistry*, vol. 189, pp. 80–85, 2015.

[70] E. M. Novak, M. C. Marcucci, A. C. H. F. Sawaya, B. G.-C. López, M. A. H. Z. Fortes, R. R. Giorgi, K. T. Marumo, R. F. Rodrigues, D. A. Maria, *et al.*, "Antitumoural activity of brazilian red propolis fraction enriched with xanthochymol and formononetin: An in vitro and in vivo study," *journal of functional foods*, vol. 11, pp. 91–102, 2014.

[71] K. Inoue, M. Saito, T. Kanai, T. Kawata, N. Shigematsu, T. Uno, K. Isobe, C.-H. Liu, H. Ito, "Anti-tumor effects of water-soluble propolis on a mouse sarcoma cell line in vivo and in vitro," *The American journal of Chinese medicine*, vol. 36, no. 03, pp. 625–634, 2008.

[72] R. N. Pereira-Filho, F. Santos Batista, D. Rodrigues Ribeiro, G. C. de Melo, F. Prado Reis, A. U. Carvalho de Melo, M. Zanardo Gomes, J. Cordeiro Cardoso, R. L. C. de Albuquerque Júnior, "Chemopreventive effect of brazilian green propolis on experimental dermal carcinogenesis in murine model.," *International Journal of Morphology*, vol. 32, no. 2, 2014.

[73] I. Jasprica, A. Mornar, Ž. Debeljak, A. Smolčić-Bubalo, M. Medić-Šarić, L. Mayer, Ž. Romić, K. Bućan, T. Balog, S. Sobočanec, *et al.*, "In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 110, no. 3, pp. 548–554, 2007.

[74] G. Burdock, "Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis)," *Food and Chemical toxicology*, vol. 36, no. 4, pp. 347–363, 1998.

[75] N. Volpi G. Bergonzini, "Analysis of flavonoids from propolis by on-line hplc–electrospray mass spectrometry," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 42, no. 3, pp. 354–361, 2006.

[76] T. Çakıroğlu, "Çeşitli çözücülerde türk propolisinin çözünürlüğünün incelenmesi," PhD thesis, Yüksek Lisans Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri …, 2010.

[77] Y. Li, G. K. Skouroumounis, G. M. Elsey, D. K. Taylor, "Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols," *Food Chemistry*, vol. 129, no. 2, pp. 570–576, 2011.

[78] E. Büyüktuncel, "Gelişmiş ekstraksiyon teknikleri ı," *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, no. 2, pp. 209–242, 2012.

[79] T. Takeuchi, C. Pereira, M. Braga, M. Maróstica Jr, P. Leal, *Low pressure solvent extraction (solid-liquid extraction, microwave assisted an d ultrasound) from condimentary plants" ın maa meireles (ed)."extracting bioactive compounds: Theory and applications"*, 2008.

[80] S. M. Cottica, H. Sabik, C. Antoine, J. Fortin, N. Graveline, J. V. Visentainer, M. Britten, "Characterization of canadian propolis fractions obtained from two-step sequential extraction," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 60, no. 1, pp. 609–614, 2015.

[81] Ö. Ertürk, C. Yavuz, R. Sıralı, *et al.*, "The antimicrobial activity of propolis from ordu province of turkey," *Mellifera*, vol. 14, no. 27-28, pp. 11–16, 2014.

[82] A. Bakdash, O. Almohammadi, N. A. Taha, A. Abu-Rumman, S. Kumar, "Chemical composition of propolis from the baha region in saudi arabia," *Czech J. Food Sci*, vol. 36, no. 2, pp. 00–10, 2018.

[83] L. G. Mohtar, S. A. Rodrıguez, M. A. Nazareno, "Comparative analysis of volatile compound profiles of propolis from different provenances," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 98, no. 9, pp. 3409–3415, 2018.

[84] V. A. Taddeo, F. Epifano, S. Fiorito, S. Genovese, "Comparison of different extraction methods and hplc quantification of prenylated and unprenylated phenylpropanoids in raw ıtalian propolis," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 129, pp. 219–223, 2016.

[85] L. Netıková, P. Bogusch, P. Heneberg, "Czech ethanol-free propolis extract displays inhibitory activity against a broad spectrum of bacterial and fungal pathogens," *Journal of Food Science*, vol. 78, no. 9, pp. M1421–M1429, 2013.

[86] S. Arslan, D. Perçin, S. Silici, A. N. KOÇ, E. Özgür, "Farklı çözücülerle hazırlanan propolis özütlerinin mutans streptokoklar üzerine ın vıtro antimikrobiyal etkisi," *Sağlık Bilimleri Dergisi*, vol. 19, no. 1, pp. 68–73, 2010.

[87] K. M. Kasiotis, P. Anastasiadou, A. Papadopoulos, K. Machera, "Revisiting greek propolis: Chromatographic analysis and antioxidant activity study," *PloS one*, vol. 12, no. 1, 2017.

[88] G. G. de Lima, R. O. de Souza, A. D. Bozzi, M. A. Poplawska, D. M. Devine, M. J. Nugent, "Extraction method plays critical role in antibacterial activity of propolis-loaded hydrogels," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 105, no. 3, pp. 1248–1257, 2016.

[89] H. Noureddine, R. Hage-Sleiman, B. Wehbi, H. Fayyad-Kazan, S. Hayar, M. Traboulssi, O. A. Alyamani, W. H. Faour, Y. ElMakhour, "Chemical characterization and cytotoxic activity evaluation of lebanese propolis," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 95, pp. 298–307, 2017.

[90] K. Ghafoor, J. Park, Y.-H. Choi, "Optimization of supercritical fluid extraction of bioactive compounds from grape (vitis labrusca b.) peel by using response surface methodology," *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 11, no. 3, pp. 485–490, 2010.

[91] L. B. Roseiro, L. C. Duarte, D. L. Oliveira, R. Roque, M. G. Bernardo-Gil, A. I. Martins, C. Sepúlveda, J. Almeida, M. Meireles, F. M. Gırio, *et al.*, "Supercritical, ultrasound and conventional extracts from carob (ceratonia siliqua l.) biomass: Effect on the phenolic profile and antiproliferative activity," *Industrial crops and products*, vol. 47, pp. 132–138, 2013.

[92] D. Kaya, P. Ergönül, *et al.*, "Obtaining methods of volatile oils.," *GIDA-Journal of Food*, vol. 40, no. 5, pp. 303–310, 2015.

[93] N. Çolak T. Tülek, "Süperkritik akışkan ekstraksiyonu," *Gıda*, vol. 28, no. 3, 2003.

[94] K. Başer, "Tıbbi ve aromatik bitkisel ürünlerin üretimi ve kalite kontrolü," *Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Yayın*, no. 2109, 2010.

[95] D. Biscaia S. R. Ferreira, "Propolis extracts obtained by low pressure methods and supercritical fluid extraction," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 51, no. 1, pp. 17–23, 2009.

[96] T. J Mason, F. Chemat, M. Vinatoru, "The extraction of natural products using ultrasound or microwaves," *Current Organic Chemistry*, vol. 15, no. 2, pp. 237–247, 2011.

[97] C. E. Leadley A. Williams, "Pulsed electric field processing, power ultrasound and other emerging technologies," *Food processing handbook*, p. 201, 2006.

[98] F. Chemat, V. Tomao, M. Virot, "Ultrasound-assisted extraction in food analysis," *Handbook of food analysis instruments*, pp. 85–103, 2008.

[99] P. Torley B. R. Bhandari, "Ultrasound in food processing and preservation," in *Handbook of food preservation*, CRC Press, 2007, pp. 731–758.

[100] G. S. Vieira, R. N. Cavalcanti, M. A. A. Meireles, M. D. Hubinger, "Chemical and economic evaluation of natural antioxidant extracts obtained by ultrasound-assisted and agitated bed extraction from jussara pulp (euterpe edulis)," *Journal of Food Engineering*, vol. 119, no. 2, pp. 196–204, 2013.

[101] M. González-Centeno, F. Comas-Serra, A. Femenia, C. Rosselló, S. Simal, "Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (vitis vinifera l.): Experimental kinetics and modeling," *Ultrasonics sonochemistry*, vol. 22, pp. 506–514, 2015.

[102] H. Wu, J. Zhu, W. Diao, C. Wang, "Ultrasound-assisted enzymatic extraction and antioxidant activity of polysaccharides from pumpkin (cucurbita moschata)," *Carbohydrate polymers*, vol. 113, pp. 314–324, 2014.

[103] L. Zhao, G. Zhao, F. Chen, Z. Wang, J. Wu, X. Hu, "Different effects of microwave and ultrasound on the stability of (all-e)-astaxanthin," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 54, no. 21, pp. 8346–8351, 2006.

[104] M. Biesaga, "Influence of extraction methods on stability of flavonoids," *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, no. 18, pp. 2505–2512, 2011.

[105] K. Ulusoy M. Karakaya, "Gıda endüstrisinde ultrasonik ses dalgalarının kullanımı," *Gıda*, vol. 36, no. 2, pp. 113–120, 2011.

[106] S. Ercan C. Soysal, "Effect of ultrasound and temperature on tomato peroxidase," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 18, no. 2, pp. 689–695, 2011.

[107] P. Piyasena, E. Mohareb, R. McKellar, "Inactivation of microbes using ultrasound: A review," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 87, no. 3, pp. 207–216, 2003.

[108] T. T. Dang, Q. Van Vuong, M. J. Schreider, M. C. Bowyer, I. A. Van Altena, C. J. Scarlett, "Optimisation of ultrasound-assisted extraction conditions for phenolic content and antioxidant activities of the alga hormosira banksii using response surface methodology," *Journal of Applied Phycology*, vol. 29, no. 6, pp. 3161–3173, 2017.

[109] H. Shirzad, V. Niknam, M. Taheri, H. Ebrahimzadeh, "A multivariate analysis of the composition and properties of extra virgin olive oils produced from different cultivars grown in ıran," *Journal of AOAC International*, vol. 100, no. 6, pp. 1804–1813, 2017.

[110] M. Virot, V. Tomao, C. Le Bourvellec, C. Renard, F. Chemat, "Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 17, no. 6, pp. 1066–1074, 2010.

[111] P. Sharayei, E. Azarpazhooh, S. Zomorodi, H. S. Ramaswamy, "Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate (punica granatum l.) peel," *Lwt*, vol. 101, pp. 342–350, 2019.

[112] M. B. Hossain, N. P. Brunton, A. Patras, B. Tiwari, C. O'donnell, A. B. Martin-Diana, C. Barry-Ryan, "Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (origanum majorana l.) using response surface methodology," *Ultrasonics sonochemistry*, vol. 19, no. 3, pp. 582–590, 2012.

[113] J. H. de Oliveira Reis, G. de Abreu Barreto, J. C. Cerqueira, J. P. dos Anjos, L. N. Andrade, F. F. Padilha, J. I. Druzian, B. A. S. Machado, "Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts from different regions of northeastern brazil obtained by conventional and ultrasound-assisted extraction," *PloS one*, vol. 14, no. 7, 2019.

[114] M. Oroian, F. Dranca, F. Ursachi, "Comparative evaluation of maceration, microwave and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from propolis," *Journal of Food Science and Technology*, vol. 57, no. 1, pp. 70–78, 2020.

[115] R. I. Cavalaro, R. G. da Cruz, S. Dupont, J. M. L. N. de Moura, T. M. F. de Souza Vieira, *et al.*, "In vitro and in vivo antioxidant properties of bioactive compounds from green propolis obtained by ultrasound-assisted extraction," *Food chemistry: X*, vol. 4, p. 100 054, 2019.

[116] E. Guzelmeric, P. Ristivojević, J. Trifković, T. Dastan, O. Yilmaz, O. Cengiz, E. Yesilada, "Authentication of turkish propolis through hptlc fingerprints combined with multivariate analysis and palynological data and their comparative antioxidant activity," *LWT*, vol. 87, pp. 23–32, 2018.

[117] C. da Silva, A. Prasniewski, M. A. Calegari, V. A. de Lima, T. L. Oldoni, "Determination of total phenolic compounds and antioxidant activity of ethanolic extracts of propolis using atr–ft-ır spectroscopy and chemometrics," *Food Analytical Methods*, vol. 11, no. 7, pp. 2013–2021, 2018.

[118] M. Strehle, F. Jenke, B. Fröhlich, J. Tautz, M. Riederer, W. Kiefer, J. Popp, "Raman spectroscopic study of spatial distribution of propolis in comb of apis mellifera carnica (pollm.)," *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, vol. 72, no. 4, pp. 217–224, 2003.

[119] N. E. Bayram, "Major constituents of different propolis samples," *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, vol. 45, no. 4, pp. 581–584, 2018.

[120] A. B. Raschi, E. Romano, M. V. Castillo, P. Leyton, C. Paipa, L. M. Maldonado, S. A. Brandan, "Vibrational study of caffeic acid phenethyl ester, a potential anticancer agent, by infrared, raman, and nmr spectroscopy," *Vibrational Spectroscopy*, vol. 70, pp. 100–109, 2014.

[121] G. B. Kılıç A. G. Karahan, "Fourier dönüşümlü kızılötesi (ftır) spektroskopisi ve laktik asit bakterilerinin tanısında kullanılması," *GIDA*, vol. 35, no. 6, pp. 445–452, 2010.

[122] A. Alvarez-Ordóñez M. Prieto, *Fourier transform infrared spectroscopy in food microbiology*. Springer, 2012.

[123] A. A. Ismail, F. R. van de Voort, J. Sedman, "Fourier transform infrared spectroscopy: Principles and applications," in *Techniques and instrumentation in analytical chemistry*, vol. 18, Elsevier, 1997, pp. 93–139.

[124] M. Curk, F. Peledan, J. Hubert, "Fourier transform infrared (ftır) spectroscopy for identifying lactobacillus species," *FEMS microbiology letters*, vol. 123, no. 3, pp. 241–248, 1994.

[125] Y. Etzion, R. Linker, U. Cogan, I. Shmulevich, "Determination of protein concentration in raw milk by mid-infrared fourier transform infrared/attenuated total reflectance spectroscopy," *Journal of dairy science*, vol. 87, no. 9, pp. 2779–2788, 2004.

[126] J. I. Boye, I. Alli, A. A. Ismail, "Interactions involved in the gelation of bovine serum albumin," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 44, no. 4, pp. 996–1004, 1996.

[127] N. Parris, J. M. Purcell, S. M. Ptashkin, "Thermal denaturation of whey proteins in skim milk," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 39, no. 12, pp. 2167–2170, 1991.

[128] L. Rodriguez-Saona, N. Koca, W. Harper, V. Alvarez, "Rapid determination of swiss cheese composition by fourier transform infrared/attenuated total reflectance spectroscopy," *Journal of dairy science*, vol. 89, no. 5, pp. 1407–1412, 2006.

[129] G. Chen, N. Kocaoglu-Vurma, W. J. Harper, L. E. Rodriguez-Saona, "Application of infrared microspectroscopy and multivariate analysis for monitoring the effect of adjunct cultures during swiss cheese ripening," *Journal of dairy science*, vol. 92, no. 8, pp. 3575–3584, 2009.

[130] A. Kher, P. Udabage, I. McKinnon, D. McNaughton, M. A. Augustin, "Ftır investigation of spray-dried milk protein concentrate powders," *Vibrational Spectroscopy*, vol. 44, no. 2, pp. 375–381, 2007.

[131] H. Dıraman, D. Özdemir, H. H. Gündüz, M. Demirci, "Trakya bölgesinde üretilen çeşitli süt ürünlerinin nitrat ve nitrit düzeylerine göre kemometrik yöntemlerle sınıflandırılması," *GIDA/The Journal of FOOD*, vol. 34, no. 6, 2009.

[132] M. Y. Çağlar, M. Demirci, A. Şahiner, B. Çakır, A. F. Çağlar, "Gıda analizlerinde kullanılan spektroskopik teknikler," *Akademik Gıda*, vol. 17, no. 1, pp. 121–130, 2019.

[133] L. Rodriguez-Saona M. Allendorf, "Use of ftır for rapid authentication and detection of adulteration of food," *Annual Review of Food Science and Technology*, vol. 2, pp. 467–483, 2011.

[134] R. L. McCreery, "Raman spectroscopy for chemical analysis," *Measurement Science and Technology*, vol. 12, no. 5, p. 653, 2001.

[135] D. Yang Y. Ying, "Applications of raman spectroscopy in agricultural products and food analysis: A review," *Applied Spectroscopy Reviews*, vol. 46, no. 7, pp. 539–560, 2011.

[136] M.-Q. Zou, X.-F. Zhang, X.-H. Qi, H.-L. Ma, Y. Dong, C.-W. Liu, X. Guo, H. Wang, "Rapid authentication of olive oil adulteration by raman spectrometry," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, no. 14, pp. 6001–6006, 2009.

[137] J. R. Beattie, S. E. Bell, C. Borgaard, A. Fearon, B. W. Moss, "Prediction of adipose tissue composition using raman spectroscopy: Average properties and individual fatty acids," *Lipids*, vol. 41, no. 3, pp. 287–294, 2006.

[138] R. J. Beattie, S. J. Bell, L. J. Farmer, B. W. Moss, D. Patterson, "Preliminary investigation of the application of raman spectroscopy to the prediction of the sensory quality of beef silverside," *Meat Science*, vol. 66, no. 4, pp. 903–913, 2004.

[139] U. Böcker, R. Ofstad, Z. Wu, H. C. Bertram, G. D. Sockalingum, M. Manfait, B. Egelandsdal, A. Kohler, "Revealing covariance structures in fourier transform infrared and raman microspectroscopy spectra: A study on pork muscle fiber tissue subjected to different processing parameters," *Applied Spectroscopy*, vol. 61, no. 10, pp. 1032–1039, 2007.

[140] A. M. Herrero, P. Carmona, M. Careche, "Raman spectroscopic study of structural changes in hake (merluccius merluccius l.) muscle proteins during frozen storage," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 52, no. 8, pp. 2147–2153, 2004.

[141] A. M. Herrero, "Raman spectroscopy for monitoring protein structure in muscle food systems," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 48, no. 6, pp. 512–523, 2008.

[142] B. J. Marquardt J. P. Wold, "Raman analysis of fish: A potential method for rapid quality screening," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 37, no. 1, pp. 1–8, 2004.

[143] A. A. Argyri, R. M. Jarvis, D. Wedge, Y. Xu, E. Z. Panagou, R. Goodacre, G.-J. E. Nychas, "A comparison of raman and ft-ır spectroscopy for the prediction of meat spoilage," *Food Control*, vol. 29, no. 2, pp. 461–470, 2013.

[144] P. Pietta, C. Gardana, A. Pietta, "Flavonoids in herbs," *Oxidative Stress and Disease*, vol. 9, pp. 43–70, 2003.

[145] E. T. da Cruz Almeida, M. C. D. da Silva, J. M. dos Santos Oliveira, R. U. Kamiya, R. E. dos Santos Arruda, D. A. Vieira, V. da Costa Silva, P. B. Escodro, I. D. Basılio-Júnior, T. G. do Nascimento, "Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with brazilian red propolis extract," *Journal of pharmaceutical analysis*, vol. 7, no. 5, pp. 280–287, 2017.

[146] S. B. Waller, C. M. Peter, J. F. Hoffmann, T. Picoli, L. d. G. Osório, F. Chaves, J. L. Zani, R. O. de Faria, J. R. de Mello, M. C. Meireles, "Chemical and cytotoxic analyses of brown brazilian propolis (apis mellifera) and its in vitro activity against itraconazole-resistant sporothrix brasiliensis," *Microbial pathogenesis*, vol. 105, pp. 117–121, 2017.

[147] L. Kubiliene, V. Laugaliene, A. Pavilonis, A. Maruska, D. Majiene, K. Barcauskaite, R. Kubilius, G. Kasparaviciene, A. Savickas, "Alternative preparation of propolis extracts: Comparison of their composition and biological activities," *BMC complementary and alternative medicine*, vol. 15, no. 1, p. 156, 2015.

[148] Y. M. Monroy, R. A. Rodrigues, M. V. Rodrigues, A. S. Sant'Ana, B. S. Silva, F. A. Cabral, "Brazilian green propolis extracts obtained by conventional processes and by processes at high pressure with supercritical carbon dioxide, ethanol and water," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 130, pp. 189–197, 2017.

[149] M. Banger, B. Hermes, S. Härtter, C. Hiemke, "Monitoring serum concentrations of clomipramine and metabolites: Fluorescence polarization immunoassay versus high performance liquid chromatography," *Pharmacopsychiatry*, vol. 30, no. 04, pp. 128–132, 1997.

[150] L. E. Rodriguez-Saona, M. P. Pujolras, M. M. Giusti, "Targeted and non-targeted analysis," *Analytical Separation Science*, pp. 1401–1436, 2015.

[151] W. Brand-Williams, M. Cuvelier, C. Berset, "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity," *LWT-Food science and Technology*, vol. 28, no. 1, pp. 25–30, 1995.

[152] S. Duman, "Çanakkale (türkiye) ilinde toplanan propolis örneklerinin antimikrobiyal aktiviteleri üzerine çalışmalar," PhD thesis, Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri …, 2010.

[153] C. Yavuz, "Türkiye'nin bazı illerinden toplanan propolislerin antimikrobiyal, antioksidan aktiviteleri ve biyoaktif bileşenlerinin tayini," Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011.

[154] H. Apaydın, "Propolisin hazır çorbalardan izole edilen staphylococcus aureus üzerine inhibisyon etkisi," Master's thesis, Namık Kemal Üniversitesi, 2015.

[155] E. Karabulut, "Proplisin etanolik ekstresinin helicobacter pyroli'ye karşı antimikrobiyal etkisinin araştırılması," PhD thesis, Yüksek Lisans Tezi. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 2011.

[156] C. Bilici, "Lepidium meyenii tozu ve propolis ekstraktı ilave edilerek fonksiyonel özellikleri geliştirilmiş yoğurt üretilmesi," 2017.

[157] S. Young, X. Sarda, M. Rosenberg, "Microencapsulating properties of whey proteins. 1. microencapsulation of anhydrous milk fat," *Journal of Dairy Science*, vol. 76, no. 10, pp. 2868–2877, 1993.

[158] A. D. Troise V. Fogliano, "Reactants encapsulation and maillard reaction," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 33, no. 1, pp. 63–74, 2013.

[159] F. Shahidi X.-Q. Han, "Encapsulation of food ingredients," *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, vol. 33, no. 6, pp. 501–547, 1993.

[160] C. Jansen-Alves, K. F. Fernandes, M. M. Crizel-Cardozo, F. D. Krumreich, C. D. Borges, R. C. Zambiazi, "Microencapsulation of propolis in protein matrix using spray drying for application in food systems," *Food and Bioprocess Technology*, vol. 11, no. 7, pp. 1422–1436, 2018.

[161] N. J. Zuidam E. Heinrich, "Encapsulation of aroma," in *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*, Springer, 2010, pp. 127–160.

[162] A. Madene, M. Jacquot, J. Scher, S. Desobry, "Flavour encapsulation and controlled release–a review," *International Journal of Food Science & Technology*, vol. 41, no. 1, pp. 1–21, 2006.

[163] E. Dickinson, V. B. Galazka, D. M. Anderson, "Effect of molecular weight on the emulsifying behaviour of gum arabic," in *Food polymers, gels and colloids*, Elsevier, 1991, pp. 490–493.

[164] N. Malik, S. Muttakin, E. Lopez-Quiroga, N. Watson, P. Fryer, S. Bakalis, O. Gouseti, "Microstructure and reconstitution of freeze-dried gum arabic at a range of concentrations and primary drying temperatures," *Food Hydrocolloids*, vol. 104, p. 105 712, 2020.

[165] H. Sadıkoğlu M. Özdemir, "Dondurarak kurutma teknolojisi ve evreleri," *GIDA*, vol. 28, no. 6, 2003.

[166] E. A. Boss, R. Maciel Filho, E. C. V. de Toledo, "Freeze drying process: Real time model and optimization," *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, vol. 43, no. 12, pp. 1475–1485, 2004.

[167] G. V. Barbosa-Cánovas, E. Ortega-Rivas, P. Juliano, H. Yan, *Food powders: physical properties, processing, and functionality*. Springer, 2005, vol. 86.

[168] S. Gouin, "Microencapsulation: İndustrial appraisal of existing technologies and trends," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 15, no. 7-8, pp. 330–347, 2004.

[169] N. J. Zuidam E. Shimoni, "Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them," in *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*, Springer, 2010, pp. 3–29.

[170] İ. Saldamlı E. Saldamlı, *Gıda endüstrisi makineleri*. Savaş yayınevi, 2004.

[171] J. K. S. Andrade, M. Denadai, G. R. S. Andrade, C. da Cunha Nascimento, P. F. Barbosa, M. S. Jesus, N. Narain, "Development and characterization of microencapsules containing spray dried powder obtained from brazilian brown, green and red propolis," *Food Research International*, vol. 109, pp. 278–287, 2018.

[172] R. Onbas, S. Kazan, A. Nalbantsoy, O. Yesil-Celiktas, "Cytotoxic and nitric oxide inhibition activities of propolis extract along with microencapsulation by complex coacervation," *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 71, no. 3, pp. 286–293, 2016.

[173] O. Catchpole, K. Mitchell, S. Bloor, P. Davis, A. Suddes, "Anti-gastrointestinal cancer activity of cyclodextrin-encapsulated propolis," *Journal of Functional Foods*, vol. 41, pp. 1–8, 2018.

[174] S. Osés, A. Pascual-Maté, M. Fernández-Muiño, T. López-Dıaz, M. Sancho, "Bioactive properties of honey with propolis," *Food chemistry*, vol. 196, pp. 1215–1223, 2016.

[175] B. Koç F. Kaymak-Ertekin, "Yanıt yüzey yöntemi vegıda işleme uygulamaları," *Gıda*, vol. 35, no. 1, pp. 1–8, 2010.

[176] S.-J. Yang, J.-J. Wu, Y.-C. Wang, C.-F. Huang, T.-M. Wu, C.-J. Shieh, C.-M. J. Chang, "Encapsulation of propolis flavonoids in a water soluble polymer using pressurized carbon dioxide anti-solvent crystallization," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 94, pp. 138–146, 2014.

[177] T. Nagai R. Inoue, "Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly," *Food chemistry*, vol. 84, no. 2, pp. 181–186, 2004.

[178] N. Sahinler, "Ari ürünleri ve ınsan sagligi açisindan önemi," *MKÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, vol. 5, no. 1-2, pp. 139–148, 2000.

[179] N. R. Sangeeta J. K. Virdi, "Role of propolis in attenuating arsenic toxicity in rat testes,"

[180] A. Atik T. Gümüş, "Propolisin gıda endüstrisinde kullanım olanakları," *Akademik Gıda*, vol. 15, no. 1, pp. 60–65, 2017.

[181] M. Viuda-Martos, Y. Ruiz-Navajas, J. Fernández-López, J. Pérez-Álvarez, "Functional properties of honey, propolis, and royal jelly," *Journal of food science*, vol. 73, no. 9, R117–R124, 2008.

[182] S. Sanpa, K. Sutjarittangtham, T. Tunkasiri, S. Eitssayeam, P. Chantawannakul, "Ultrasonic extraction of thai propolis for antimicrobial and antioxidant properties," in *Advanced Materials Research*, Trans Tech Publ, vol. 506, 2012, pp. 371–374.

[183] Z. İlbay, S. Şahin, K. Büyükkabasakal, "A novel approach for olive leaf extraction through ultrasound technology: Response surface methodology versus artificial neural networks," *Korean Journal of Chemical Engineering*, vol. 31, no. 9, pp. 1661–1667, 2014.

[184] P. Jha, A. J. Das, S. C. Deka, "Optimization of ultrasound and microwave assisted extractions of polyphenols from black rice (oryza sativa cv. poireton) husk," *Journal of Food Science and Technology*, vol. 54, no. 12, pp. 3847–3858, 2017.

[185] V. Singleton, R. Orthofer, R. Lamuela-Raventós, "[14] analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent," in *Methods in Enzymology*, vol. 299, Elsevier, 1999, pp. 152–178.

[186] S. I. Falcão, N. Vale, P. Cos, P. Gomes, C. Freire, L. Maes, M. Vilas-Boas, "In vitro evaluation of portuguese propolis and floral sources for antiprotozoal, antibacterial and antifungal activity," *Phytotherapy research*, vol. 28, no. 3, pp. 437–443, 2014.

[187] R. Singh, K. Chidambara Murthy, G. Jayaprakasha, "Studies on the antioxidant activity of pomegranate (punica granatum) peel and seed extracts using in vitro models," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 50, no. 1, pp. 81–86, 2002.

[188] D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz, J. A. Vyvyan, *Introduction to spectroscopy*. Cengage Learning, 2008.

[189] R. N. Oliveira, M. C. Mancini, F. C. S. d. Oliveira, T. M. Passos, B. Quilty, R. M. d. S. M. Thiré, G. B. McGuinness, "Ftır analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing," *Matéria (Rio de Janeiro)*, vol. 21, no. 3, pp. 767–779, 2016.

[190] Y.-W. Wu, S.-Q. Sun, J. Zhao, Y. Li, Q. Zhou, "Rapid discrimination of extracts of chinese propolis and poplar buds by ft-ır and 2d ır correlation spectroscopy," *Journal of Molecular Structure*, vol. 883, pp. 48–54, 2008.

[191] L. Chang-Bravo, A. López-Córdoba, M. Martino, "Biopolymeric matrices made of carrageenan and corn starch for the antioxidant extracts delivery of cuban red propolis and yerba mate," *Reactive and Functional Polymers*, vol. 85, pp. 11–19, 2014.

[192] J. R. Franca, M. P. De Luca, T. G. Ribeiro, R. O. Castilho, A. N. Moreira, V. R. Santos, A. A. Faraco, "Propolis-based chitosan varnish: Drug delivery, controlled release and antimicrobial activity against oral pathogen bacteria," *BMC complementary and alternative medicine*, vol. 14, no. 1, p. 478, 2014.

[193] H. d. S. Barud, A. M. de Araújo Júnior, S. Saska, L. B. Mestieri, J. A. D. B. Campos, R. M. De Freitas, N. U. Ferreira, A. P. Nascimento, F. G. Miguel, M. M. d. O. L. Vaz, *et al.*, "Antimicrobial brazilian propolis (epp-af) containing biocellulose membranes as promising biomaterial for skin wound healing," *Evidence-based complementary and alternative medicine*, vol. 2013, 2013.

[194] S. Sharaf, A. Higazy, A. Hebeish, "Propolis induced antibacterial activity and other technical properties of cotton textiles," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 59, pp. 408–416, 2013.

[195] A. C. Moţ, R. Silaghi-Dumitrescu, C. Sârbu, "Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using dpph bleaching kinetic profiles, ft-ır and uv–vis spectroscopic data," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 24, no. 4-5, pp. 516–522, 2011.

[196] A. J. Silva, J. R. Silva, N. C. de Souza, P. C. Souto, "Membranes from latex with propolis for biomedical applications," *Materials Letters*, vol. 116, pp. 235–238, 2014.

[197] E. d. O. Cardoso, B. J. Conti, K. B. Santiago, F. L. Conte, L. P. G. Oliveira, R. T. Hernandes, M. d. A. Golim, J. M. Sforcin, "Phenolic compounds alone or in combination may be involved in propolis effects on human monocytes," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 69, no. 1, pp. 99–108, 2017.

[198] J. Cao, L.-Q. Peng, L.-J. Du, Q.-D. Zhang, J.-J. Xu, "Ultrasound-assisted ionic liquid-based micellar extraction combined with microcrystalline cellulose as sorbent in dispersive microextraction for the determination of phenolic compounds in propolis," *Analytica chimica acta*, vol. 963, pp. 24–32, 2017.

[199] E.-K. Soltani, R. Cerezuela, N. Charef, S. Mezaache-Aichour, M. A. Esteban, M. M. Zerroug, "Algerian propolis extracts: Chemical composition, bactericidal activity and in vitro effects on gilthead seabream innate immune responses," *Fish & shellfish immunology*, vol. 62, pp. 57–67, 2017.

[200] V. Bankova, "Chemical diversity of propolis and the problem of standardization," *Journal of ethnopharmacology*, vol. 100, no. 1-2, pp. 114–117, 2005.

[201] A. H. Banskota, Y. Tezuka, S. Kadota, "Recent progress in pharmacological research of propolis," *Phytotherapy research*, vol. 15, no. 7, pp. 561–571, 2001.

[202] S. E. Soares, "Ácidos fenólicos como antioxidantes," *Revista de nutrição*, vol. 15, no. 1, pp. 71–81, 2002.

[203] C. M. d. M. Sousa, H. R. Silva, M. C. C. Ayres, C. L. S. d. Costa, D. S. Araújo, L. C. D. Cavalcante, E. D. S. Barros, P. B. d. M. Araújo, M. S. Brandão, M. H. Chaves, *et al.*, "Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais," *Quimica nova*, vol. 30, no. 2, pp. 351–355, 2007.

[204] J. K. S. Andrade, M. Denadai, C. S. de Oliveira, M. L. Nunes, N. Narain, "Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from brazilian northeast region," *Food Research International*, vol. 101, pp. 129–138, 2017.

[205] N. Rivera-Yañez, M. Rodriguez-Canales, O. Nieto-Yañez, M. Jimenez-Estrada, M. Ibarra-Barajas, M. Canales-Martinez, M. Rodriguez-Monroy, "Hypoglycaemic and antioxidant effects of propolis of chihuahua in a model of experimental diabetes," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2018, 2018.

[206] M. M. Çalışkol, "Azerbaycan yöresine ait propolis örneklerinin antioksidan özelliklerinin belirlenmesi," PhD thesis, Karadeniz Teknik Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, 2013.

[207] C. Da Porto, E. Porretto, D. Decorti, "Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (vitis vinifera l.) seeds," *Ultrasonics sonochemistry*, vol. 20, no. 4, pp. 1076–1080, 2013.

[208] W. Gargouri, S. M. Osés, M. A. Fernández-Muiño, M. T. Sancho, N. Kechaou, "Evaluation of bioactive compounds and biological activities of tunisian propolis," *LWT*, vol. 111, pp. 328–336, 2019.

[209] D. Skaba, T. Morawiec, M. Tanasiewicz, A. Mertas, E. Bobela, E. Szliszka, M. Skucha-Nowak, M. Dawiec, R. Yamamoto, S. Ishiai, *et al.*, "Influence of the toothpaste with brazilian ethanol extract propolis on the oral cavity health," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, 2013.

[210] M. V. Eberhardt, C. Y. Lee, R. H. Liu, "Antioxidant activity of fresh apples," *Nature*, vol. 405, no. 6789, pp. 903–904, 2000.

[211] D. Marinova, F. Ribarova, M. Atanassova, *et al.*, "Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables," *Journal of the university of chemical technology and metallurgy*, vol. 40, no. 3, pp. 255–260, 2005.

[212] D. Valencia, E. Alday, R. Robles-Zepeda, A. Garibay-Escobar, J. C. Galvez-Ruiz, M. Salas-Reyes, M. Jiménez-Estrada, E. Velazquez-Contreras, J. Hernandez, C. Velazquez, "Seasonal effect on chemical composition and biological activities of sonoran propolis," *Food chemistry*, vol. 131, no. 2, pp. 645–651, 2012.

[213] I. Revilla, A. M. Vivar-Quintana, I. González-Martın, O. Escuredo, C. Seijo, "The potential of near infrared spectroscopy for determining the phenolic, antioxidant, color and bactericide characteristics of raw propolis," *Microchemical Journal*, vol. 134, pp. 211–217, 2017.

[214] Y.-W. Chen, S.-R. Ye, C. Ting, Y.-H. Yu, "Antibacterial activity of propolins from taiwanese green propolis," *Journal of food and drug analysis*, vol. 26, no. 2, pp. 761–768, 2018.

[215] R. Aryaei P. Pakzad, "Evaluation of the antibacterial activity of ıranian propolis on the strains of pseudomonas aeruginosa and staphylococcus aureus," *Amazonia Investiga*, vol. 7, no. 14, pp. 5–10, 2018.

[216] M. C. Marcucci, F. Ferreres, C. Garcıa-Viguera, V. Bankova, S. De Castro, A. Dantas, P. Valente, N. Paulino, "Phenolic compounds from brazilian propolis with pharmacological activities," *Journal of ethnopharmacology*, vol. 74, no. 2, pp. 105–112, 2001.

[217] K. Takasi, N. Kikuni, H. Schilr, "Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of propolis," *Povenance Planta Med*, vol. 60, pp. 222–7, 1994.

[218] M. Kartal, S. Yıldız, S. Kaya, S. Kurucu, G. Topçu, "Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of anatolia," *Journal of ethnopharmacology*, vol. 86, no. 1, pp. 69–73, 2003.

[219] H. Koo, P. L. Rosalen, J. A. Cury, G. M. Ambrosano, R. M. Murata, R. Yatsuda, M. Ikegaki, S. M. Alencar, Y. K. Park, "Effect of a new variety of apis mellifera propolis onmutans streptococci," *Current Microbiology*, vol. 41, no. 3, pp. 192–196, 2000.

[220] Y. Choi, D. Noh, S. Cho, H. J. Suh, K. Kim, J. Kim, "Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of korea," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 39, no. 7, pp. 756–761, 2006.

[221] M. Khezri, S. Rostami, R. Riseh, A. Alizadeh, "Effect of propolis and clotrimazole on controlling aflatoxin in pistachio (pistacia vera l.)," *Intl. J. Agri. Biol*, vol. 8, pp. 605–608, 2006.

[222] K. Pobiega, K. Kraśniewska, D. Derewiaka, M. Gniewosz, "Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods," *Journal of food science and technology*, vol. 56, no. 12, pp. 5386–5395, 2019.

[223] R. Darwish, R. A. Fares, M. A. Zarga, I. Nazer, "Antifungal activity of jordanian propolis on different resistant and standard species of candida.," *Mellifera*, vol. 9, no. 18, 2009.

[224] L. F. Ballesteros, M. J. Ramirez, C. E. Orrego, J. A. Teixeira, S. I. Mussatto, "Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials," *Food chemistry*, vol. 237, pp. 623–631, 2017.

[225] C. G. Da Rosa, C. D. Borges, R. C. Zambiazi, J. K. Rutz, S. R. da Luz, F. D. Krumreich, E. V. Benvenutti, M. R. Nunes, "Encapsulation of the phenolic compounds of the blackberry (rubus fruticosus)," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 58, no. 2, pp. 527–533, 2014.

[226] J. L. P. Reátegui, F. M. Barrales, C. A. Rezende, C. L. Queiroga, J. Martınez, "Production of copaiba oleoresin particles from emulsions stabilized with modified starches," *Industrial crops and products*, vol. 108, pp. 128–139, 2017.

[227] K. M. Khazaei, S. Jafari, M. Ghorbani, A. H. Kakhki, "Application of maltodextrin and gum arabic in microencapsulation of saffron petal's anthocyanins and evaluating their storage stability and color," *Carbohydrate polymers*, vol. 105, pp. 57–62, 2014.

[228] R. V. Tonon, R. B. Pedro, C. R. Grosso, M. D. Hubinger, "Microencapsulation of flaxseed oil by spray drying: Effect of oil load and type of wall material," *Drying Technology*, vol. 30, no. 13, pp. 1491–1501, 2012.

[229] C. A. Di Battista, D. Constenla, M. V. Ramırez-Rigo, J. Piña, "The use of arabic gum, maltodextrin and surfactants in the microencapsulation of phytosterols by spray drying," *Powder Technology*, vol. 286, pp. 193–201, 2015.

[230] V. Kaushik Y. H. Roos, "Limonene encapsulation in freeze-drying of gum arabic–sucrose–gelatin systems," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 40, no. 8, pp. 1381–1391, 2007.

[231] F. C. da Silva, C. R. da Fonseca, S. M. de Alencar, M. Thomazini, J. C. de Carvalho Balieiro, P. Pittia, C. S. Favaro-Trindade, "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*, vol. 91, no. 1, pp. 28–36, 2013.

[232] V. Busch, A. Pereyra-Gonzalez, N. Šegatin, P. Santagapita, N. P. Ulrih, M. Buera, "Propolis encapsulation by spray drying: Characterization and stability," *LWT*, vol. 75, pp. 227–235, 2017.

A
EK

A.1 Duyusal Analiz Formu

PANELİST

Yaş :

Cinsiyet :

Talimatlar

Size verilen örnekleri belirtilen özelliklere göre aşağıdaki skalayı kullanarak (5-4-3-2-1) değerlendiriniz. Varsa tercih ettiğiniz örneği belirtiniz.

Skala

5: Çok iyi. 4: İyi 3: Kabul edilebilir. 2: Zorlukla kabul edilebilir. 1: Kabul edilemez.

Tablo A.1 Duyusal analiz formu

Örnek no	Koku	Tat	Renk	Doku	Kıvam	Genel kabul edilebilirlik
01						
02						
03						
04						
05						
06						
07						
08						
09						
10						

Tercih:.....

Yorum:.....

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

İletişim Bilgileri: bakkalogluzeynep@gmail.com

Makale

1. Z. Bakkaloğlu, M. Arıcı, "Farklı çözücülerle propolis ekstraksiyonunun toplam fenolik içeriği, antioksidan kapasite ve antimikrobiyal aktivite üzerine etkileri," Akademik Gıda, 17(4), 538-545,2019. DOI:10.24323/akademik-gida.667272.

2. Z. Bakkaloğlu, M. Arıcı S. Karasu, "Optimization of ultrasound-assisted extraction of Turkish propolis and characterization of phenolic profile, antioxidant and antimicrobial activity. *Food Science and Technology*, 2020.

Konferans Bildirisi

1. M. Arıcı, Z. Bakkaloğlu. The effects of ultrasound technology on total phenolic content of Turkish propolis. 1st International Conference of Food Technology and Nutrition, Tetovo, N. Macedonia, 2019. (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:5081836)

2. Z. Bakkaloğlu, M. Arıcı. The effects of different solvents on bioactive properties of propolis extracts. 1st International Conference of Food Technology and Nutrition, Tetovo, N. Macedonia 2019. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:5081839)

3. M. Arıcı, Z. Bakkaloğlu. Farklı çözücüler kullanılarak ultrason destekli propolis ekstraksiyonu: antimikrobiyel aktivitenin belirlenmesi, Türkiye 13. Gıda Kongresi, Çanakkale, Türkiye, 2020. (Özet Bildiri/Poster Sunum)

Proje

1. Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü; Proje numarası: 3467.