

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**ARI EKMEĞİNİN (PERGA) BİLEŞİMİ VE ENDÜSTRİYEL ÜRETİM OLANAKLARININ
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Atiye DEĞİRMENCİ

**ŞUBAT 2023
TRABZON**



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

ARI EKMEĞİNİN (PERGA) BİLEŞİMİ VE ENDÜSTRİYEL ÜRETİM OLANAKLARININ
ARAŞTIRILMASI

Atiye DEĞİRMENCİ

ORCID : - - -

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"DOKTOR (KİMYA)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 16 / 01 / 2023

Tezin Savunma Tarihi : 02 / 02 / 2023

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Oktay YILDIZ
ORCID : - - -

Trabzon 2023

ÖNSÖZ

Doktora eğitimine başladığım ilk günden tezimin tamamlanmasına kadar geçtiğim tüm zorlu süreçlerde bana yol gösteren, tecrübelerini paylaşan, her konuda destekleyen, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum sayın danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Oktay YILDIZ’a,

Tez izleme komitemde yer alarak değerli görüşlerini benimle paylaşan hocalarım Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI ve Prof. Dr. Hüseyin ŞAHİN’e, mikrobiyolojik analizlerimde tecrübelerinden faydalandığım Prof. Dr. Ömer ŞİMŞEK’e,

Doktora tezime 1505-Üniversite-Sanayi İşbirliği Destek Programı kapsamında 5220007 kodlu “Apiterapik Değeri Olan Fermente Bir Ürün: Endüstriyel Perga” adlı proje ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK’a,

Bu süreçte hep yanımda olan aynı ideali paylaştığım mesai arkadaşlığından öte aile olduğum Öğr. Gör. Gülsüm Merve BOYRACI ve Öğr. Gör. Mehtap ER KEMAL’e, sevgili arkadaşım Öğr. Gör. Gülsüm DEMİR KAYA’ya, gıda mühendisi meslektaşlarım Öğr. Gör. Gülşah OKUMUŞ, Ar. Gör. Mehmet KEMAL’e,

KTÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümünden Ar. Gör. Yakup KARA’ya, Maçka Meslek Yüksekokulundan değerli hocalarım Prof. Dr. Melike YILDIRIM AKATIN, Prof. Dr. Nevzat BATAN, Dr. Öğr. Üyesi Ayşe ŞENTÜRK ve tüm Maçka Meslek Yüksekokulu akademik personeline,

Benimle her zaman gurur duyan anneme, babama, kardeşlerime, halalarıma ve özellikle bu yoğun süreçte yanımda olan halam Züleyha YAYĞAZ’a,

Yıllardır olduğu gibi doktora sürecimde de beni yalnız bırakmayan, hafta sonu mesailerimde bile yanımda olan endişemi, yorgunluğumu paylaşan değerli eşim Muhammed Ferhat DEĞİRMENCİ’ye, biricik kızım Defne’ye,

Beni okutan, üzerimde büyük emekleri olan rahmetli babaannem Atiye YAYĞAZ’a teşekkür ederim.

Atiye DEĞİRMENCİ

Trabzon 2023

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora tezi olarak sunduğum “Arı Ekmeğinin (Perga) Bileşimi ve Endüstriyel Üretim Olanaklarının Araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Oktay YILDIZ’ın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 02/02/2023

Atiye DEĞİRMENCİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	IX
SUMMARY	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XIII
KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ	XVI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Polen	2
1.3. Arı Ekmeği (Perga).....	4
1.4. Laktik Asit Bakterileri	9
1.5. Fruktofilik Laktik Asit Bakterileri.....	13
1.6. Polen, Arı Ekmeği ve Bal Arısı Sindirim Sisteminin Mikrobiyal Florası.....	14
1.7. Fermantasyon Mekanizmaları	16
1.8. Polen Fermantasyonuna Yönelik Çalışmalar	16
1.9. Polen ve Arı Ekmeğinin Sindirilebilirliğine Yönelik Çalışmalar.....	21
1.10. Çalışmanın Amacı ve Önemi.....	24
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	25
2.1. Kullanılan Cihazlar.....	25
2.2. Kimyasal Maddeler.....	26
2.3. Kullanılan Çözeltiler.....	27
2.4. Polen ve Arı Ekmeği Hasadı ve Saklama Koşulları	30
2.5. Polen ve Arı Ekmeğinin Bileşiminin Belirlenmesine Yönelik Analizler.....	32
2.5.1. Nem Tayini	32
2.5.2. Kül Tayini.....	32
2.5.3. pH ve Titrasyon Asitliği	33
2.6. Polen ve Arı Ekmeği Ekstraktlarının Hazırlanması	33
2.7. Toplam Fenolik Madde Tayini	33

2.8. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Gücü (FRAP) ile Antioksidan Aktivite Tayini....	34
2.9. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikali Süpürme Aktivitesi Tayini.....	35
2.10. <i>In vitro</i> Sindirim Metodu.....	35
2.11. Bradford Metodu ile Protein Tayini	36
2.12. RP-HPLC-PDA ile Fenolik Madde Profilinin Belirlenmesi	37
2.13. Mikrobiyolojik Analizler.....	38
2.13.1. Laktik Asit Bakterilerine Yönelik Analizler	38
2.13.2. Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri ve Maya-Küf Yükünün Belirlenmesi	40
2.13.3. Koliform Bakteri ve Fekal Koliform Bakteri Sayımları.....	41
2.13.4. Polen ve Arı Ekmeği Örneklerinden LAB İzolasyonu ve Tanılanması	41
2.14. Arı Ekmeği Üretimi.....	42
2.14.1. Spontan Fermantasyon ile Arı Ekmeği Üretimi	42
2.14.2. Kovan İçerisinde Arı Ekmeği Üretimi.....	43
2.14.3. Laktik Asit Bakterisi İnokülasyonu ile Arı Ekmeği Üretimi.....	47
2.15. Spontan Fermantasyon ile Üretilen Arı Ekmeklerinden Mikroorganizma İzolasyonu ve İzole Edilen Mikroorganizmaların Tanılanması	48
2.16. Kovan İçerisinde Fermantasyon ile Üretilen Arı Ekmeği Örneklerinden Zenginleştirme Metodu (Enrichment Culturing) ile İzolasyon.....	49
2.17. İstatistiksel Analizler	49
3. BULGULAR	51
3.1. Polen ve Arı Ekmeği Örneklerinin Nem ve Kül İçeriği	51
3.2. Polen ve Arı Ekmeklerinin pH ve Titrasyon Asitliği Değerleri	52
3.3. Polen ve Arı Ekmeklerinin Toplam Fenolik Madde İçerikleri.....	53
3.4. Polen ve Arı Ekmeklerinin Antioksidan Aktivite Verileri	54
3.5. Polen ve Arı Ekmeği Örneklerinin Protein İçerikleri.....	56
3.6. Örneklerin <i>In vitro</i> Sindirim Sonuçları.....	57
3.6.1. Polen ve Arı Ekmeğine Ait Sindirim Fraksiyonlarının Toplam Fenolik Madde İçerikleri	58
3.6.2. Polen ve Arı Ekmeğine Ait Sindirim Fraksiyonlarının Demir İndirgeme Antioksidan Gücü (FRAP)	59
3.6.3. Polen ve Arı Ekmeğine Ait Sindirim Fraksiyonlarının DPPH Radikali Süpürme Aktivitesi.....	61
3.6.4. Polen ve Arı Ekmeğine Ait Sindirim Fraksiyonlarının Suda Çözünür Protein İçerikleri	62
3.7. Polen ve Arı Ekmeklerinin Fenolik Madde Profili.....	63
3.8. Polen ve Arı Ekmeği Mikrobiyolojisi	65

3.8.1. Polen ve Arı Ekmeğinin Mikrobiyal Yükü	65
3.8.2. Polen ve Arı Ekmeğinde Mikrobiyal Flora	67
3.9. Bulguların korelasyonu ve PCA*	71
3.10. Polen Fermantasyonu ile Arı Ekmeği Üretimine Yönelik Kimyasal ve Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları.....	76
3.10.1. Spontan Fermantasyon ile Arı Ekmeği Üretimi	78
3.10.1.1. Spontan Fermantasyonda Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları	78
3.10.1.2. Spontan Fermantasyon ile Üretilmiş Arı Ekmeği Örneklerinin Depolanması	83
3.10.1.3. Spontan Fermantasyon ile Üretilmiş Örneklerin Biyoaktivite ve Sindirilebilirlik Verileri.....	86
3.10.1.4. Spontan Fermantasyon ile Üretilmiş Örneklerin Fenolik Madde Profili	91
3.10.2. Kovan İçerisinde Arı Ekmeği Üretimi.....	93
3.10.2.1. Kovan İç Fermantasyon ile Üretilmiş Örneklerin Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları.....	93
3.10.2.2. Kovan İç Fermantasyon ile Üretilmiş Örneklerin Biyoaktivite ve Sindirilebilirlik Verileri.....	99
3.10.2.3. Kovan İç Fermantasyon ile Üretilen Örneklerin Fenolik Madde Profili.....	103
3.10.3. <i>Lactobacillus kunkeei</i> İnokülasyonu ile Arı Ekmeği Üretimi	105
3.10.3.1. <i>L. kunkeei</i> İnokülasyonu ile Üretilen Örneklerin Mikrobiyolojisi	105
3.10.3.2. <i>L. kunkeei</i> İnokülasyonu ile Üretilen Örneklerinin Biyoaktivite ve Sindirilebilirlik Verileri.....	110
3.10.3.3. <i>L. kunkeei</i> İnokülasyonu ile Üretilen Örneklerin Fenolik Madde Profili	114
3.11. Farklı Yöntemle Fermente Edilen Karışımların Biyoerişilebilirlik İndeksi ve Geri Kazanım Verileri.....	116
4. TARTIŞMA.....	121
4.1. Polen ve Arı Ekmeklerinin Fizikokimyasal Özellikleri	121
4.2. Polen ve Arı Ekmeklerinin Biyoaktif Özellikleri	123
4.3. Polen ve Arı Ekmeklerinin Protein İçerikleri	125
4.4. Polen ve Arı Ekmeklerinin Simüle Gastrointestinal Sindirim Koşullarında Biyoerişilebilirliği	125
4.5. Polen Fermantasyonu	127
4.6. Fermantasyonun Ürünün Biyoaktif Özelliklerine Etkisi	129
4.7. Fermantasyonun Ürünün Biyoerişilebilirlik Özelliklerine Etkisi.....	130
4.8. Fenolik Madde Profili.....	132
4.9. Farklı Fermantasyon Metotlarının Fenolik Madde Kompozisyonuna Etkisi	133
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	135

6. KAYNAKLAR.....	138
ÖZGEÇMİŞ	



Doktora Tezi

ÖZET

ARI EKMEĞİNİN (PERGA) BİLEŞİMİ VE ENDÜSTRİYEL ÜRETİM
OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Atiye DEĞİRMENCİ

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Oktay YILDIZ
2023, 155 Sayfa, 1 Sayfa Ek

Polen, polen peletlerini işçi arıların arka ayaklarından ayıran bir tuzak kullanılarak toplanmaktadır. Arı ekmeği üretiminde ise bal petekleri parçalanmakta ve sınırlı üretim yapılabilmektedir. Bu çalışmanın ilk bölümünde aynı bölge/kovan koşullarında toplanan polen ve arı ekmeğinin biyoaktiviteleri ve mikrobiyal florası tespit edilmiştir. Örneklerin hasat periyoduna bağlı olarak biyoaktif özelliklerinin değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Polen ve arı ekmeğinde *Candida magnoliae* (10 izolat) ve *Lactobacillus kunkeei* (25 izolat), arı ekmeğinde ek olarak *Leuconostoc pseudomesenteroides* (3 izolat) izolasyonu yapılmıştır. İkinci bölümde farklı polen:su oranlarında hazırlanan polen, su, bal karışımları spontan, laktik asit bakterisi inokülasyonu ve kovan içi fermantasyona tabi tutulmuştur. 1:1, 1:2, 2:1 polen:su oranları için *L. kunkeei* starter kültürünün polen substratına iyi uyum sağladığı ve inokülasyonun laktik asit bakterisi gelişimini hızlandırdığı görülmüştür. Fermantasyondan sonra toplam fenolik madde içeriğinde (1,05 kat ile 2,65 kat aralığında), antioksidan aktivitede, biyoerişilebilirlik indekslerinde artış meydana gelmiştir. Fenolik madde kompozisyonundaki değişimler ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi fotodiyot dizisi dedektörü (RP-HPLC-PDA) ile ortaya konulmuştur. Bulgular polen fermantasyonu ile arı ekmeğinin pazardaki talebinin karşılanabilmesi, sanayiye uygulanacak proses geliştirilmesi ve büyük miktarlarda arı ekmeği üretimi yapılabilmesi bakımından önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Polen, Arı ekmeği, Fermantasyon, Laktik asit bakterisi
Biyoerişilebilirlik

PhD. Thesis

SUMMARY

THE INVESTIGATION OF COMPOSITION AND INDUSTRIAL PRODUCTION POSSIBILITIES OF BEE BREAD (PERGA)

Atiye DEĞİRMENCİ

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Oktay YILDIZ
2023, 155 Pages, 1 Page Appendix

Pollen is collected using traps that separates pollen pellets from hind legs of worker bees. Honeycombs have been ruptured and limited production can be performed. The first part of this study deals with the bioactivities and microbial flora of pollen and bee bread collected in the same region/hive conditions. It has been determined that the bioactive properties of samples vary depending on the harvest period. *Candida magnoliae* (10 isolates) and *Lactobacillus kunkeei* (25 isolates) were isolated from pollen and bee bread samples, and *Leuconostoc pseudomesenteroides* (3 isolates) was also isolated from bee bread. Pollen, water, and honey mixtures with different pollen:water ratios were subjected to spontaneous, lactic acid bacteria inoculation, and in-hive fermentation. *Lactobacillus kunkeei* starter culture was well adapted to the pollen substrate for 1:1, 1:2, 2:1 pollen:water ratios, and the inoculation accelerated the fermentation. Total phenolic content (between 1.05 and 2.65 folds), antioxidant activity, and bioaccessibility indexes increased after fermentation. Changes in the phenolic composition were determined by reversed phase high pressure liquid chromatography photodiode array detector (RP-HPLC-PDA). The results are important to meet market demand, develop process for industry, and to produce large quantities of bee bread.

Keywords: Bee pollen, Bee bread, Fermentation, Lactic acid bacteria, Bioaccessibility

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Arı poleni.....	2
Şekil 2. Arı ekmeği.....	5
Şekil 3. Perga toplama aparatı ile arı ekmeği hasadı.....	6
Şekil 4. Arı ekmeği toplama aparatı ile hasat sonrası peteğin görüntüsü.....	7
Şekil 5. Petek gözlerinde depolanmış arı ekmeği.....	7
Şekil 6. Laktik asit bakterilerinde karbohidrat metabolik yolu	10
Şekil 7. Aday bir probiyotiğin probiyotik kriterlerini karşılayıp karşılamadığını belirlemek için karar ağacı	12
Şekil 8. Polen ve arı ekmeği hasadına ait fotoğraflar	30
Şekil 9. Kovanlardan toplanan polen örnekleri	31
Şekil 10. Kovanlardan toplanan arı ekmeği örnekleri	32
Şekil 11. Spontan fermantasyon için hazırlanmış polen, su, bal karışımları.....	43
Şekil 12. Kovan içi arı ekmeği üretiminde arının fermantasyon karışımıyla doğrudan temasına dair bir görsel	44
Şekil 13. Kovan içi üretim-1 için hava durumu verileri	45
Şekil 14. Kovanlara fermantasyon karışımlarının yerleştirilmesi	45
Şekil 15. Kovan içi üretim-2 için hava durumu verileri	46
Şekil 16. Kovan içi üretim-3 için hava durumu verileri	46
Şekil 17. <i>L. kunkei</i> stok kültürü	47
Şekil 18. Toplam fenolik madde tayininde kullanılan kalibrasyon eğrisi	53
Şekil 19. FRAP tayininde kullanılan kalibrasyon grafiği.....	55
Şekil 20. Bradford metodu ile protein tayinine ait standart grafiği	56
Şekil 21. MRS Agar besiyerinde görülen bakteri ve maya kolonileri.....	66
Şekil 22. MALDI-TOF MS ile tespit edilen izolatların besiyerine göre dağılımları	68
Şekil 23. FMRS Agar besiyerinde <i>Lactobacillus kunkei</i> izolatının görüntüsü.....	71
Şekil 24. Polen ve arı ekmeğine ait bulguların korelasyonunu gösteren ısı haritası	74
Şekil 25. Temel bileşen matrisi	75
Şekil 26. Temel bileşen analizi.....	76
Şekil 27. Spontan fermantasyonda 1:1 polen:su içeriğine sahip polen, su, bal karışımının LAB yükü ve titrasyon asitliği değişimi.....	78

Şekil 28. Spontan fermantasyonda 1:2 polen:su içeriğine sahip polen, su, bal karışımının LAB yükü ve titrasyon asitliği değişimi.....	79
Şekil 29. Spontan fermantasyonda 2:1 polen:su içeriğine sahip polen, su, bal karışımının LAB yükü ve titrasyon asitliği değişimi.....	80
Şekil 30. Spontan fermantasyonda 3:1 polen:su içeriğine sahip polen, su, bal karışımının LAB yükü ve titrasyon asitliği değişimi.....	81
Şekil 31. Spontan fermantasyonda 4:1 polen:su içeriğine sahip polen, su, bal karışımının LAB yükü ve titrasyon asitliği değişimi.....	82
Şekil 32. Fermantasyon periyodunun sonunda kovanlardan örneklerin alınması (Kovan içi üretim-1).....	93
Şekil 33. Küflenme görülen örnekler (Kovan içi üretim-1)	94
Şekil 34. Kovan içi üretim-2 sonrası arı ekmeği örnekleri.....	96
Şekil 35. Kovan içi fermantasyonla üretilen arı ekmeği örnekleri (Kovan içi üretim-3)....	99
Şekil 36. LAB inokülasyonu ile fermantasyonda 1:1 polen:su oranına sahip.....	106
Şekil 37. LAB inokülasyonu ile fermantasyonda 1:2 polen:su oranına sahip.....	106
Şekil 38. LAB inokülasyonu ile fermantasyonda 2:1 polen:su oranına sahip polen, su, bal karışımının LAB yükü ve titrasyon asitliği değişimi	107
Şekil 39. LAB inokülasyonu ile fermantasyonda 3:1 polen:su oranına sahip polen, su, bal karışımının LAB yükü ve titrasyon asitliği değişimi	108
Şekil 40. LAB inokülasyonu ile fermantasyonda 4:1 polen:su oranına sahip polen, su, bal karışımının LAB yükü ve titrasyon asitliği değişimi	108
Şekil 41. LAB inokülasyonu ile polen fermantasyonunda karışımların fermantasyon periyodu boyunca LAB sayıları.....	109

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Ülkemize ait arıcılık istatistikleri (TÜİK Hayvansal Üretim İstatistikleri, 2021)...	1
Tablo 2. Laboratuvar ölçekli polen fermantasyonu çalışmalarında mevcut durum	17
Tablo 3. Kullanılan cihazlar ve marka/model bilgileri.....	25
Tablo 4. Kimyasal maddeler ve satın alındıkları firma bilgileri.....	26
Tablo 5. Kimyasal analizlerde kullanılan çözeltiler	28
Tablo 6. Örneklerin hasat edildikleri aylar ve kodları.....	31
Tablo 7. Toplam fenolik madde içeriği analiz prosedürü.....	34
Tablo 8. Demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) analiz prosedürü	34
Tablo 9. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) analiz prosedürü	35
Tablo 10. Bradford metodunda yapılan pipetleme işlemleri	37
Tablo 11. Kullanılan besiyerlerinin bileşimi	39
Tablo 12. Örneklerin nem ve kuru maddede kül içerikleri (%).....	51
Tablo 13. pH ve titrasyon asitliği	52
Tablo 14. Örneklerin toplam fenolik madde içerikleri	54
Tablo 15. Polen ve arı ekmeği örneklerinin antioksidan aktivite sonuçları	56
Tablo 16. Polen ve arı ekmeği örneklerinin suda çözünür protein içeriği.....	57
Tablo 17. <i>In vitro</i> sindirim sonucu tespit edilen toplam fenolik madde içerikleri	58
Tablo 18. Polen ve arı ekmeği ekstraktlarına ait fenolik madde biyoerişilebilirlik indeksi ve geri kazanım verileri	59
Tablo 19. Sindirim fraksiyonlarının FRAP metodu ile tespit edilen antioksidan aktivite verileri.....	60
Tablo 20. Polen ve arı ekmeği ekstraktları için FRAP biyoerişilebilirlik indeksleri ve geri kazanım verileri	61
Tablo 21. Sindirim fraksiyonlarının DPPH metodu ile tespit edilen antioksidan aktivite verileri.....	62
Tablo 22. Sindirim fraksiyonlarının suda çözünür protein içeriği.....	63
Tablo 23. Polen ve arı ekmeği örneklerinin fenolik madde profili	64
Tablo 24. Polen ve arı ekmeği örneklerinde laktik asit bakterisi sayım sonuçları	66
Tablo 25. Polen ve arı ekmeği örneklerinde toplam mezofilik aerobik bakteri, maya-küf, koliform ve fekal koliform sayımları	67
Tablo 26. Polen numuneleri için bakteri ve maya izolatlarının MALDI Biotyper Real-Time Classification (RTC) programında tespit edilen analiz sonuçları.....	68

Tablo 27. Arı ekmeği numuneleri için bakteri ve maya izolatlarının MALDI Biotyper Real-Time Classification (RTC) programında tespit edilen analiz sonuçları	69
Tablo 28. Polen ve arı ekmeği örneklerine ait bulguların korelasyonu.....	72
Tablo 29. Pasaj polenine ait kimyasal analiz verileri	77
Tablo 30. Polen, su, bal karışımlarının % nem içerikleri	77
Tablo 31. Spontan fermantasyon ile üretilen ürünlerin maya-küf yükü.....	82
Tablo 32. Spontan fermantasyon ile üretilmiş arı ekmeği örneklerinin depolama periyodu boyunca laktik asit bakterisi sayım sonuçları.....	84
Tablo 33. Spontan fermantasyon ile üretilmiş arı ekmeği örneklerinin depolama periyodu boyunca toplam mezofilik aerobik bakteri ve maya-küf sayım sonuçları.....	85
Tablo 34. Spontan fermantasyon ile üretilmiş arı ekmeğinde tespit edilen mikroorganizmalar	86
Tablo 35. Polen, su, bal karışımlarının spontan fermantasyonun başlangıcında ve sonunda toplam fenolik madde içerikleri.....	87
Tablo 36. Farklı polen:su oranına sahip karışımların spontan fermantasyondan önce ve sonra sindirim fraksiyonlarına ait toplam fenolik madde içeriği verileri	88
Tablo 37. Polen, su, bal karışımlarının spontan fermantasyonun başlangıcında ve sonunda demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) verileri	89
Tablo 38. Farklı polen:su oranına sahip karışımların spontan fermantasyondan önce ve sonra sindirim fraksiyonlarına ait demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) verileri.....	90
Tablo 39. Polen, su, bal karışımlarının spontan fermantasyonun başlangıcında ve sonunda DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalı süpürme aktivitesi	90
Tablo 40. Farklı polen:su oranına sahip karışımların spontan fermantasyondan önce ve sonra sindirim fraksiyonlarına ait DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalı süpürme aktivitesi verileri	91
Tablo 41. Spontan fermantasyon ile üretilmiş arı ekmeği örneklerinin fenolik madde profili	92
Tablo 42. Kovan içi üretim-1 için fermantasyon periyodunun sonunda tespit edilen ağırlık kayıpları.....	94
Tablo 43. Küflenme görülen örneklerde (kovan içi üretim-1) laktik asit bakterisi sayım sonuçları	95
Tablo 44. Küflenme görülen örneklerde (kovan içi üretim-1) toplam mezofilik aerobik bakteri ve maya-küf sayım sonuçları.....	95
Tablo 45. Kovan içi üretim-2 için laktik asit bakterisi sayım sonuçları.....	97
Tablo 46. Kovan içi üretim-2 için toplam mezofilik aerobik bakteri ve maya-küf sayım sonuçları	97
Tablo 47. Polen:su oranı 3:1 olan karışımlardan zenginleştirme metodu ile elde edilen izolatlara ait MALDI Biotyper Real-Time Classification (RTC) sonuçları.....	98

Tablo 48. Polen, su, bal karışımlarının kovan içi fermantasyonun başlangıcında ve sonunda toplam fenolik madde içerikleri.....	100
Tablo 49. Farklı polen:su oranına sahip karışımların kovan içi fermantasyondan önce ve sonra sindirim fraksiyonlarına ait toplam fenolik madde içeriği verileri	100
Tablo 50. Polen, su, bal karışımlarının kovan içi fermantasyonun başlangıcında ve sonunda demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) verileri	101
Tablo 51. Farklı polen:su oranına sahip karışımların kovan içi fermantasyondan önce ve sonra sindirim fraksiyonlarına ait demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) verileri.....	101
Tablo 52. Polen, su, bal karışımlarının kovan içi fermantasyonun başlangıcında ve sonunda DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalı süpürme aktivitesi	102
Tablo 53. Farklı polen:su oranına sahip karışımların kovan içi fermantasyondan önce ve sonra sindirim fraksiyonlarına ait DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalı süpürme aktivitesi verileri	102
Tablo 54. Kovan içi fermantasyon ile üretilen arı ekmeği örneklerinin fenolik madde profili	103
Tablo 55. <i>L. kunkeei</i> izolatının asit ve safra tuzu toleransı.....	105
Tablo 56. <i>L. kunkeei</i> inokülasyonu ile üretilen ürünlerin TMAB ve maya-küf yükü	110
Tablo 57. Polen, su, bal karışımlarının starterli fermantasyonun başlangıcında ve sonunda toplam fenolik madde içerikleri.....	111
Tablo 58. Farklı polen:su oranına sahip karışımların starterli fermantasyondan önce ve sonra sindirim fraksiyonlarına ait toplam fenolik madde içeriği verileri	111
Tablo 59. Polen, su, bal karışımlarının starterli fermantasyonun başlangıcında ve sonunda demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) verileri	112
Tablo 60. Farklı polen:su oranına sahip karışımların starterli fermantasyondan önce ve sonra sindirim fraksiyonlarına ait demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) verileri.....	113
Tablo 61. Polen, su, bal karışımlarının starterli fermantasyonun başlangıcında ve sonunda DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalı süpürme aktivitesi	113
Tablo 62. Farklı polen:su oranına sahip karışımların starterli fermantasyondan önce ve sonra sindirim fraksiyonlarına ait DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalı süpürme aktivitesi verileri	114
Tablo 63. Starterli fermantasyona tabi tutulan karışımların fenolik madde profili	115
Tablo 64. Farklı yöntemlerle fermente edilen karışımların fenolik madde biyoerişilebilirlik indeksi verileri	117
Tablo 65. Farklı yöntemlerle fermente edilen karışımların fenolik madde geri kazanım (%) verileri.....	118
Tablo 66. Farklı yöntemlerle fermente edilen karışımların demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) biyoerişilebilirlik indeksi verileri	119
Tablo 67. Farklı yöntemlerle fermente edilen karışımların demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) geri kazanım verileri	120

KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

ADH	Alkol dehidrogenaz
adhE	Alkol/asetaldehit dehidrogenaz geni
ADP	Adenozin difosfat
Asetil-P	Asetil fosfat
ATP	Adenozin trifosfat
BI	Biyoerişilebilirlik indeksi
BSA	Sığır serum albümin
CAPE	Kafeik asit fenil ester
cm	Santimetre
CUPRAC	Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite
Dihidroksiaseton-P	Dihidroksiaseton fosfat
dk	Dakika
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EMP	Emden Meyerhof-Parnas
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FLAB	Fruktofilik laktik asit bakterisi
FMRS Agar	Fruktozlu MRS Agar
FRAP	Demir (III) indirgeme antioksidan gücü
Fruktoz 6-P	Fruktoz 6-fosfat
Fruktoz 1,6-BP	Fruktoz 1,6-bifosfat
FYP	Fruktozlu maya peptonu
g	Gram
GAE	Gallik asit eşdeğeri
Gliseraldehit 3-P	Gliseraldehit 3-fosfat
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IN	Seruma geçen fraksiyon
ISO	Uluslararası Standardizasyon Teşkilatı
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram

km	Kilometre
kob	Koloni oluşturan birim
kPa	Kilopaskal
Ksilüloz 5-P	Ksilüloz 5-fosfat
L	Litre
LAB	Laktik asit bakterisi
LDH	Laktat dehidrogenaz
LdhD	D-laktat dehidrogenaz
LdhL	L-laktat dehidrogenaz
LOD	Gözlenebilme limiti
log kob/g	Logaritma koloni oluşturan birim/g
MALDI-TOF MS	Matriks Aracılı Lazer Dezorpsiyon İyonizasyon-Uçuş Zamanlı-Kütle Spektrometresi
MAE	Malt Extract Agar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MRS Agar	de Man, Rogosa, Sharpe Agar
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
nm	Nanometre
OUT	Bağırsak sindirimi sonrasında kalan
p	Anlamlılık değeri
PCA	Plate Count Agar
PCA*	Temel bileşen analizi
PC1	Faktör 1
PC2	Faktör 2
PG	Mide sindirimi sonrası kalan fraksiyon
PP	Pasaj poleni
ppm	Milyonda bir birim
r	Korelasyon katsayısı
RP-HPLC-PDA	Ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi fotodiyot dizisi dedektörü

rpm	Dakikadaki devir sayısı
RTC	Real-Time Classification (Gerçek zamanlı sınıflandırma)
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
sig	Sigma
spp.	Türleri
subsp.	Alt tür
TMAB	Toplam mezofilik aerobik bakteri
TPC	Toplam fenolik madde
TPTZ	2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
U	Enzim ünitesi
UV-Vis	Ultraviyole-Görünür Bölge
VRBA	Violet Red Bile VRB Agar
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
SC ₅₀	Radikali yarıya indiren numune konsantrasyonu

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Ticari getirilerine ek olarak doğada sürekliliği sağlaması açısından da önemli bir işlevi yerine getiren arıcılık faaliyetleri sonucunda elde edilen arı ürünleri gıdadan tarıma, tarımdan kozmetiğe geniş bir yelpazede kullanım alanına sahiptir. Günümüzde yaygın olarak yürütülen tarımsal faaliyetlerden birisi olan arıcılık arı ürünlerine yönelik farkındalığın artmasına paralel olarak giderek önemi artan bir tarımsal faaliyet haline gelmiştir.

Ülkemiz zengin bitki örtüsü, bal arısı popülasyonlarındaki genetik çeşitlilik, farklı iklim ve doğa koşulları nedeniyle çok büyük arıcılık potansiyeline sahiptir. Türkiye’de mevcut kovan varlığı 1970’li yıllarda 2 milyon civarındayken zamanla artmıştır ve kilometrekareye düşen arılı kovan sayısı oldukça yüksek seviyelere ulaşmıştır (Akın ve Yılcı, 2021). Ülkemize ait bal üretimi, bal mumu üretimi, kovan sayısı istatistikleri Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Ülkemize ait arıcılık istatistikleri (TÜİK Hayvansal Üretim İstatistikleri, 2021).

	2020	2021	Değişim (%)
	Miktar	Miktar	
Bal üretimi (ton)	104077	96344	-7,4
Bal mumu üretimi (ton)	3765	3766	0
Kovan sayısı (adet)	8179085	8733394	6,8
Eski tip	222152	277089	24,7
Yeni tip	7956933	8456305	6,3

Tablodaki sayılar yuvarlamadan dolayı toplamı vermeyebilir.

1.2. Polen

Etimolojik olarak bitkilerin dölleme aracı olan toz anlamına gelen polen, tohumlu bitkilerin erkek üreme hücresidir (Şekil 1). İşçi arılar çiçek (negatif yüklü) ve arı gövdesi (pozitif yüklü) arasında oluşturulan zayıf elektrostatik alan ile yüz ile binlerce polen tanesini toplamakta, kolonilerini beslemek ve korumak için kullanmaktadırlar (Clarke vd., 2017). Toplanan polenler arının tükürük salgıları ve nektar ile karıştırılarak arının arka bacaklarında 1,4-4,0 mm boyutlarında pelet formuna getirilir ve böylece rüzgarla tozlaşan bitkilere ait polenlerden oldukça farklı bir karakter kazanır (Denisow ve Denisow-Pietrzyk, 2016). Bütün arı larvaları ilk 3 gün arı sütüyle, 4 günden büyük işçi ve erkek arı sulandırılmış bal, nektar ve polenle, ana arı ise larva dönemi dahil tüm yaşam döngüsü boyunca arı sütü ile beslenir. Arı kolonisi günde 50-250 gram yılda 15-40 kilogram polen toplayabilmektedir (Komosinska-Vassev vd., 2015).



Şekil 1. Arı poleni

Polen arı ürünleri içerisinde üretimi en kolay üründür. Bilindiği gibi her bir polen tanesi bal arılarının bir polen seferinde genellikle aynı bitki türüne ait poleni toplamaları nedeniyle kendi içinde bir örnek kaynağıdır. Her partideki polenlerin en az %45'i bir bitki türüne aitse monofloral polen olarak adlandırılabilir. Polen, arıcılar tarafından polen

peletlerini işçi arıların arka ayaklarından ayıran bir tuzak kullanılarak toplanmaktadır. Bu tuzaklarda, arılar kovanın girişinde veya hemen giriş kısmında başlayan delikli plakalardan kovana girerler. Bu işlemde polenin %60'ı, arıların bacağından kovanın altına yerleştirilen bir tepsi üzerine düşer. Izgara, popülasyonun bakımı ve beslenmesi için yeterli polenin koloniye girmesine izin verir (Sabuncu vd., 2002). Bal arısı kolonileri her koloninin ihtiyacına göre polen toplama faaliyetlerini düzenler ve yaklaşık 20000 arılık bir koloninin yılda ortalama 7 kilogram polen ihtiyacı mevcuttur (Crailsheim vd., 1992).

Arı polenin kimyasal içeriği toplandığı bitkiye, coğrafi bölgeye, iklim koşullarına, toprak tipine ve toplayan arının cinsine göre değişiklik göstermektedir (Komosinska-Vassev vd., 2015; Jannesar vd., 2017). %13-55 karbohidrat, %10-40 protein, %1-13 lipid ve %0,3-20 lif içeren polenin (Campos vd., 2008) esansiyel bir çok besin ögesini yüksek konsantrasyonlarda içeriği bilinmekte bu nedenle besin takviyesi olarak kullanılabileceği belirtilmektedir. Temel makro besin öğelerinin yanı sıra vitaminler, mineraller, polifenoller gibi yüksek biyolojik aktiviteye sahip mikro besin öğeleri bakımından da zengin bir üründür (Végh vd., 2021).

Polonya, Bulgaristan, İsviçre, Brezilya ve Arjantin gibi birkaç ülkede polen için yasal mevzuat mevcut olmasına rağmen (Thakur ve Nanda, 2020; Végh vd., 2021) Avrupa Birliği düzeyinde bu ürünün kalitesi, fiziksel-kimyasal özellikleri ve mikrobiyal yükü ile ilgili herhangi bir standart bulunmamaktadır. Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO) tarafından arı ürünleri için bir alt komite kurulmuş olup ISO/TC34/SC19 kodlu arı ürünleri standardı oluşturulmaya başlanmıştır (Végh vd., 2021).

Mevcut literatür çalışmalarında arı poleni ile ilgili en önemli gıda güvenliği riskleri pestisitler, toksik metaller ve metaloidler, mikotoksinler, pirolizidin alkaloidleri, alerjen proteinler ve genetik olarak modifiye edilmiş bitkilerin polen taneleri olarak belirtilmiştir (Campos vd., 2008; Thakur ve Nanda, 2020). Polen örneklerinde en çok klorprifos, fluvalinat, karbendazim, tiakloprid pestisitlerinin varlığı rapor edilmiş olup (Végh vd., 2021) bu ürün arının pestisit maruziyetini belirlemede temel besin kaynağı olması nedeniyle oldukça önemlidir. Toksik metal içeriği çevre kirliliği derecesine önemli ölçüde bağlı olup arıcıların kirlilik kaynaklarından en az 3 km uzaklıkta bulunan alanlarda faaliyetlerini sürdürmesi önerilmektedir. Ancak arılar kovandan 10 km uzaklıktaki alana kadar polen toplayabilmektedir (Garbuzov vd., 2015). Bu nedenle polenin toksik metal kontaminasyonuna maruz kalma riski artmaktadır.

Mikotoksinler düşük konsantrasyonlarda bile toksik etki gösterebilen filamentöz mantarlar tarafından üretilen sekonder metabolitlerdir. Çoğu mikotoksinin ısıtma işlemlere, fiziksel ve kimyasal uygulamalara karşı stabiliteyi nedeniyle gıda prosesleri ile elimine edilmesi oldukça zordur. İklim koşulları, işleme yöntemleri, arıcılık faaliyetleri sırasındaki hijyen-sanitasyon uygulamaları ve arı kovani olası mikotoksin kontaminasyonu kaynakları olup propolis aflatoksin üreten küflerden kovani koruma rolüne sahiptir (Kostić vd., 2019). Polen tuzaklarını günlük olarak boşaltmak, ürünü steril koşullarda saklamak ve mümkün olduğunca kısa sürede işlemek kontaminasyonun engellenmesinde oldukça önemlidir (Kačániová vd., 2011). Taze polen yüksek nem içeriği nedeniyle mikrobiyal gelişime açık bir üründür. Son on yılda, Avrupa'da arı poleni örneklerinin mikotoksin içeriği üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Günümüzde ticari polenler, nem içerikleri %7-10'a ulaşana kadar 40 °C'den yüksek olmayan sıcaklıklarda kurutulmaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda taze polenin yanı sıra kurutulmuş arı poleninde de mikotoksin kontaminasyonu rapor edilmiştir (Rodríguez-Carrasco vd., 2013). Literatürde kurutma prosesinin ayrıca arı polenin β -karoten, C vitamini (Almeida-Muradian vd., 2005), E vitamini (Pereira De Melo ve De Almeida-Muradian, 2010) ve toplam polifenol içeriği (Kayacan vd., 2018) üzerine olumsuz etkilerinin olduğuna yönelik çalışmalar bulunmaktadır.

1.3. Arı Ekmeği (Perga)

Polenler arılar tarafından bitkilerden toplanırken tükürük ile yapışkanlık kazandırılır ve polen sepetinde taşınarak kovana getirilir. Petek gözlerinde depolanan polen; bal arısı sekresyonları, laktik asit bakterileri, mayalar, nem ve sıcaklığın etkisiyle biyokimyasal değişikliklere uğramakta ve elde edilen ürün arı ekmeği (perga) olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2). Arıların yaşam döngüsünde, örneğin kolonilerin ürettiği veya yüksek balmumu üretiminin olduğu dönemlerde, oldukça aktif oldukları zamanlar vardır. Bu durumlarda koloninin polen ihtiyacı artar ve polen akışındaki azalma (sonbahar ve erken ilkbahar) veya besleyici özelliği düşük polenlerin varlığı koloni için ciddi problemlere neden olur. Bu gibi durumlar arıları mevcut ihtiyaçlarını karşılamak için arı ekmeği depolarına yönlendirmektedir (Anelkovi vd., 2014).



Şekil 2. Arı ekmeği

Arı ekmeğinin petek gözlerinden çıkarılmasında; suda ıslatma, titreşimle ekstraksiyon, kurutma, vakum altında kurutma, dondurma, segmentasyon ve filtrasyon gibi manuel teknikler kullanılmaktadır (Khalifa vd., 2020). Suda ıslatma metodunda önemli miktarda bileşen kaybı söz konusudur. Arı ekmeği ayrıca perga toplama aparatı ile petek gözlerinden alınabilmektedir. Aparat çapı 4,8-5,11 mm arasında değişen küçük sabit bir tüp, yaklaşık 4,8 mm çaplı bir piston ve 2-3 cm uzunluğunda bir yaydan oluşmaktadır (Şekil 3). Arı ekmeğini alabilmek için aparat bir kalem gibi tutulur ve arı ekmeği bulunan bir petek gözüne dikey olarak yerleştirilir, aynı zamanda sert tüpün petek gözünün alt kısmına ulaşmasını sağlamak için hem hafif bir basınç hem de döner bir hareket uygulanır. Genel olarak bir petek gözü 75 mg arı ekmeği içermekte olup bu aparatla yaklaşık 50 mg'lık kısmı alınabilmektedir. 10 g arı ekmeği toplayabilmek için 200-250 petek gözünden tek tek aparat yardımıyla arı ekmeği peletinin çıkarılması gerekmektedir (Loglio vd., 2019). Kurutma, dondurma, segmentasyon, filtrasyon ve gama ışınlama gibi oldukça fazla prosesin bir arada kullanıldığı kombine arı ekmeği üretim metodunda ise kovan 40 °C'de 8-10 saat süreyle %14-15 nem içeriğine kadar kurutulmaktadır. Bu işlemin ardından kuru kurutma sistemiyle -1 °C'de segmentasyon uygulanmakta ve kuru arı ekmeği toz hale getirilmektedir. Tohum temizleme makinası ile vakırlar uzaklaştırılmaktadır. Son ürün gama ışınlama ile sterilize edilmektedir (Akhmetova vd., 2012).



Şekil 3. Perga toplama aparatı ile arı ekmeği hasadı

Satışa uygun arı ekmeği üretimi için gerekli ekipmanlara bakıldığında arıcılıkta halihazırda bulunabilecek dondurucu, polen kurutucu, farklı gözenek boyutuna sahip elekler ile üretim yapılabilir. Ek cihaz arı ekmeği peteklerinin parçalanması ve balmumunun ayrılması için gereklidir. Bu tip bir proses uygulanabilir ve otomasyona uygun hale getirilebilir gibi görünse de, arıcı başına düşen ortalama kovan sayısı, iş gücü gereksinimi, arıcılar tarafından ürünün bilinirliğinin az olması gibi nedenlerle makul ve uygulanabilir seviyede olmadığı ve üretim hatlarının ticarileşmediği bilinmektedir (Semkiw ve Skubida, 2021).

Petek gözlerinde polen fermantasyonu ile meydana gelen arı ekmeğinin endüstriyel üretimi kovanın zarar görmesinin yanı sıra verim ve/veya elde edilen arı ekmeği miktarının oldukça düşük olması gibi problemleri ortaya çıkarır (Şekil 4). Kovandan arı ekmeği hasadı nispeten yeni bir konu olması nedeniyle bu konuda çok fazla literatür verisi bulunmamaktadır. Arı ekmeği üretimi kovan içerisindeki milyonlarca petek gözlerinden çok azında gerçekleştirilme, bu üretim de çoğu kez sadece kovanın ihtiyacını karşılamaktadır (Şekil 5). Kovan başına arı ekmeği miktarı 20-100 g seviyesini geçmemektedir. Bu nedenle arı ekmeğinin insanlarca tüketimine diğer arı ürünlerine kıyasla az rastlanmakta olup günümüzde en az tüketilen arı ürünlerinden biridir. Son yıllarda bilinirliği artan arı ürünlerinden biri olup günümüzde birçok arıcı koloninin gelişimini baskılamamak için arı

ekmeği rezervlerinin azaltılmaması gerektiğine inanmaktadır. Ayrıca üretim hacmi, hasat periyodu ve potansiyel maliyetler hakkında da bilgi eksikliği söz konusudur (Semkiw ve Skubida, 2021).



Şekil 4. Arı ekmeği toplama aparatı ile hasat sonrası peteğin görüntüsü



Şekil 5. Petek gözlerinde depolanmış arı ekmeği

Polen ile arı ekmeği bileşimindeki farklılığın ana kaynağı petek gözlerinde gerçekleşen laktik asit fermantasyonudur. Laktik asit fermantasyonu sonucu oluşan yan ürünler arı ekmeğinin polene göre asidik karakter kazanmasına neden olmaktadır. Fermantasyon prosesi sonucunda raf ömrü bakımından daha stabil ve biyoerişilebilirliği daha yüksek bir ürün olan arı ekmeği elde edilmektedir.

Arı ekmeğinin bileşiminin belirlenmesine yönelik yapılan iki çalışmada polifloral arı ekmeği örneklerinde fenilalanin, valin, histidin, metiyonin, isolösin, lösin, treonin, alanin, arjinin, tirozin, glisin, prolin, hidroksprolin, serin, glutamik asit, aspartik asit ve lisin aminoasitleri tespit edilmiştir (Othman vd., 2019; Mohammad vd., 2020). Arı ekmeğindeki aminoasitlerin kaynağı olarak genellikle hem çiçek (nektar, tatlı özsu ve ana polen) hem de hayvan (arı salgıları) gösterilmektedir. Örneğin; triptofan akasya kökenli arı ürünleri ile arjinin ise kestane kökenli ürünler ile ilişkilendirilmektedir (Pirini vd., 1992). Polen proteinleri, fermantasyon prosesi ile peptitlere ve amino asitlere parçalanır. Polendeki protein konsantrasyonunun arı ekmeğindeki daha yüksek olduğu, amino asit konsantrasyonlarının ise çoğu durumda daha düşük olduğu belirlenmiştir (De Grandi-Hoffman vd., 2013). Artmış serbest aminoasit seviyesinin, polipeptit zinciri içindeki peptit bağlarının parçalanmasına neden olan spesifik proteolitik enzimlerin aktivitesinin sonucu olabileceği bildirilmektedir (Kieliszek vd., 2018). Ancak bazı mikroorganizmalar, büyümeleri için bir karbon ve enerji kaynağı olarak aminoasitleri kullanabilmektedirler. Bu nedenle arı ekmeğindeki bu bileşenlerin içeriğinde belirleyici olan sadece polen değil, aynı zamanda polenin arı ekmeğine dönüşümünü gerçekleştiren arıların genotipidir (De Grandi-Hoffman vd., 2013).

İşçi arılar günlük enerji ihtiyaçlarını karşılamak için günlük 4 mg şeker ihtiyacı duymaktadır (Urcan vd., 2017). Fas'tan toplanan arı ekmeği örneklerinde 11,8 g/100 g ile en fazla bulunan şekerin fruktoz olduğu, fruktozu 5,7 g/100 g ile glukozun izlediği ve düşük miktarda (0,92 g/100 g) trehaloz bulunduğu belirlenmiştir (Bakour vd., 2019). Benzer şekilde Romanya arı ekmeğinde de 19,73 g/100 g fruktoz, 8,82 g/100 g glukoz ve düşük miktarda melezitöz (0,97 g/100 g) ve rafinoz (0,96 g/100 g) tespit edilmiştir (Dranca vd., 2020). Buna karşın literatürde Malezya'dan toplanan arı ekmeği örneklerinde en yüksek konsantrasyonda bulunan şekerin glukoz olduğu ve miktarının 10,27-12,40 g/100 g arasında değiştiği, glukozu sakkarozun takip ettiği (0,60 g/100 g-2,09/100 g) bir çalışma da bulunmaktadır. Bu araştırmada sakkarozdan sonra en yüksek oranda bulunan şeker fruktoz

olup konsantrasyonun 100 gramda 0,40 g ile 1,49 g aralığında değişim gösterdiği bildirilmiştir (Mohammad vd., 2020).

Arı ekmeğinde 14 doymuş, 11 doymamış yağ asidi tespit edilmiş olup en çok bulunan yağ asidinin %25 ile α -linolenik asit ve %23,2 ile araşidonik asit olduğu belirlenmiştir (Bakour vd., 2019). Türkiye’den toplanan arı ekmeklerinin yağ asidi içeriklerinin belirlendiği bir çalışmada beş monofloral arı ekmeği örneğinde toplam 37 yağ asidi belirlenmiş olup en çok bulunan doymuş yağ asitleri palmitik, stearik ve araşidik asit, doymamış yağ asitleri ise oleik, eikosenoik, erusik ve linoleik asittir (Kaplan vd., 2019). Arı ekmeğinin yağ asidi kompozisyonu jeo-iklimsel koşullara ve polenlerin floral orijinine bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

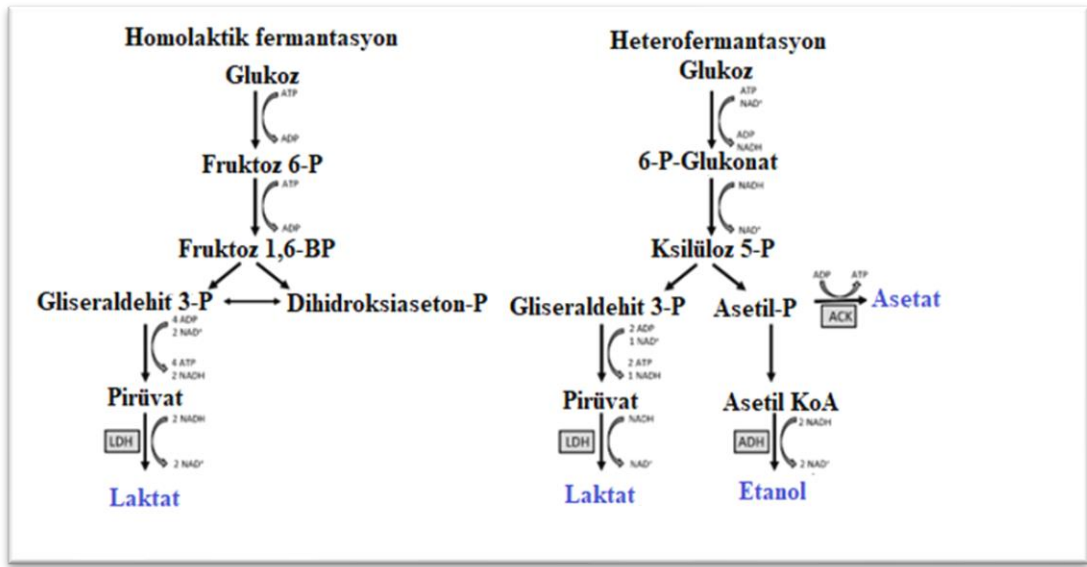
Topraktaki mineraller bitkilerin kökleri aracılığıyla bitkilere ve çiçek, nektar veya özsuların polenleri yoluyla da arı ekmeğine taşınmaktadır (Bakour vd., 2022). Fas arı ekmeğinin mineral içeriğinin belirlendiği bir çalışmada en çok bulunan mineralin potasyum olduğu (338 mg/100 g), bunu 251 mg/100 g ile fosforun izlediği bulunmuştur. Bu çalışmada analiz edilen örneklerin 198 mg/100 g kalsiyum, 61 mg/100 g magnezyum, 27,3 mg/100 g demir, 14,2 mg/100 g sodyum, 3,31 mg/100 g çinko içerdiği tespit edilmiştir (Bakour vd., 2019). Çinko, demir, manganez, selenyum ve bakır gibi antioksidan mineraller gibi mikro elementler, birçok antioksidan enzimin kofaktörleri olarak işlev göstermekte ve bu nedenle metabolizmada önemli bileşenler olarak kabul edilmektedirler (Anwar vd., 2018).

Polenden izole edilen bakteri ve mantarlar, polenin arı ekmeğine dönüşümüne ve son ürünün stabilizasyonuna katkıda bulunabilecek enzimler, vitaminler, antibakteriyel maddeler ve organik asitler üretme yeteneğine sahiptir (Anderson vd., 2014). Polen, petek gözlerinde depolandığında, arılar tarafından balın yanı sıra arıların tükürük bezlerinin salgılarında bulunan sindirim enzimleri ve organik asitlerle daha da zenginleştirilmektedir (Deveza vd., 2015).

1.4. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB) Gram pozitif, katalaz negatif mikroorganizmalardan oluşan oldukça farklı özelliklere sahip bir organizma grubu olup Streptococcus, Lactococcus, Lactobacillus ve Leuconostoc olmak üzere farklı cinslerden oluşmaktadır (Zheng vd., 2020). Laktik asit bakterileri fermantasyonu başlatıcı mikroorganizmalar olarak

bilinirler. Fermantasyon, oksijenin sınırlı olduğu anaerobik koşullar altında enerji üretimine izin veren metabolik bir süreç olup organik asitler, alkol ve karbondioksit dahil olmak üzere bir dizi ürün üretmek için karbohidratların oksidasyonunu içermektedir (Hofvendahl ve Hahn-Hägerdal, 2000). Glukoz, membrandan bir fosfotransferaz sistemi tarafından taşınır ve daha sonra piruvat üretmek için glikoliz yolunda kullanılır. Bu metabolik yolda NAD^+ tüketilir ve enerji üretilir. Piruvat daha sonra sırasıyla NAD^+ 'yı yeniden oluşturan ve redoks dengesini koruyan stereospesifik NAD 'ye bağlı laktat dehidrojenazlar (LDH'ler), LdhL ve LdhD tarafından L- ve D-laktata dönüştürülür (Şekil 6) (Ferain vd., 1994).



Şekil 6. Laktik asit bakterilerinde karbohidrat metabolik yolu (Suisa vs., 2022).

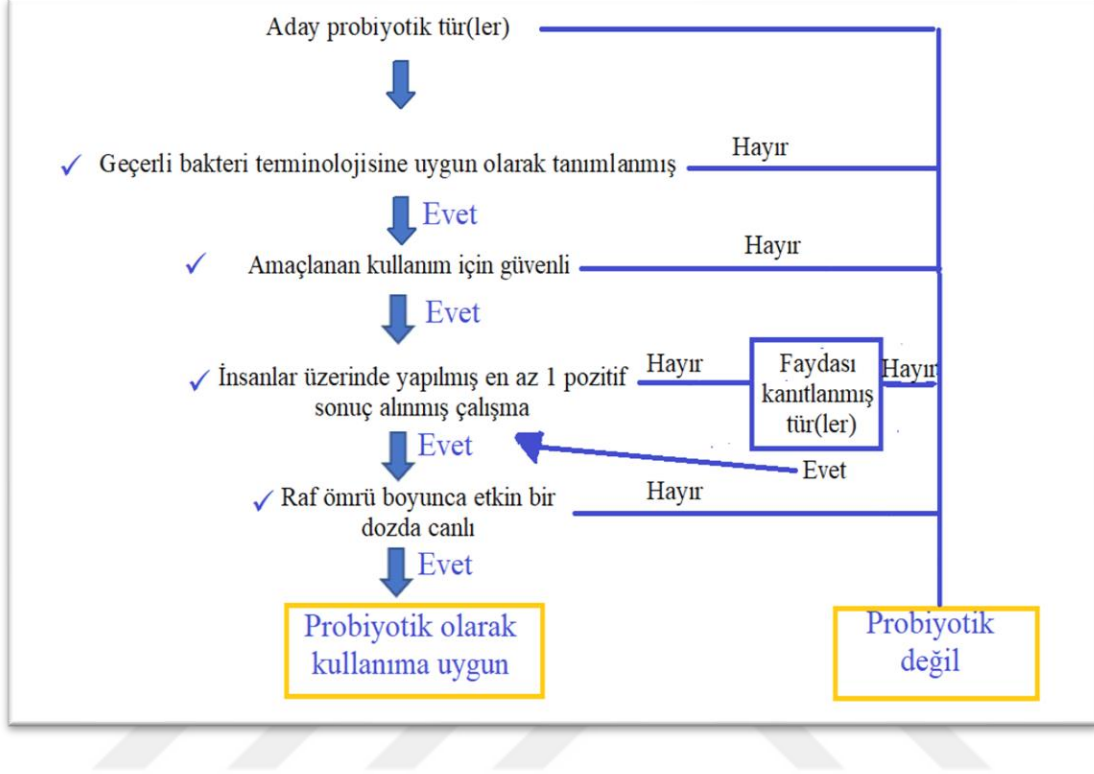
Homofermentasyonda glikoliz sırasında heksoz metabolizmasının son ürünü olarak sadece laktik asit üretilir. Bununla birlikte, heterofermentasyonda, fosfoketolaz yolu kullanılarak heksozdan eşmolar miktarlarda laktik asit, karbondioksit ve etanol veya asetat oluşur. Fakültatif heterofermentatif *Lactobacillaceae* tarafından, heksozlar sadece Embden Meyerhof-Parnas (EMP) yolu ile laktik aside fermente edilmektedir (Hammes ve Vogel, 1995). *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus paracasei* ve *Lactobacillus plantarum* fakültatif heterofermentatif, *Lactobacillus acidophilus* ise zorunlu homofermentatif laktik asit bakterilerindendir.

Asidik koşullarda Lactobacillaceae cinsi bakterilerde stres gelişir ve oluşan bu stres hücrel ve çevresel pH seviyelerini düzenlemeye yönelik çeşitli mekanizmalar ile kontrol edilir. Mekanizmalar genellikle protonların uzaklaştırılması veya amonyak üretimi yoluyla ortamın alkalileştirilmesi şeklindedir (Budin-Verneuil vd., 2007). Amonyak üretim mekanizması arjinin deaminaz sistemini içermekte olup ornitin karbamil transferaz, arjinin deaminaz, karbamat kinaz enzimlerine ihtiyaç vardır. Arginin, arginin deaminaz tarafından parçalandığında amonyak ve sitriline dönüştürülebilmektedir. Sitrülin ornitin karbamil transferaz enzimi ile ornitin ve karbamoil fosfata parçalanır. Karbamoil fosfat ise karbamat kinaz enzimi tarafından substrat düzeyinde fosforilasyon mekanizması ile karbondioksit ve amonyaka parçalanmaktadır (Vergès vd., 1999).

L-malatin, malolaktik fermantasyon ile karbondioksite dönüştürüldüğü metabolik yolda oluşan karbondioksit ve laktik asit karbonik anhidraz enzimi tarafından bikarbonata dönüştürülmektedir. Bu metabolik yol konakçı bakteriyi koruyan tamponlayıcı sistem ile ilişkili olup birçok laktik asit bakterisi tarafından asidik koşullara uyum sağlamada kullanılmaktadır (Konings vd., 1997).

Probiyotikler, FAO (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü)/WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından konakçıya fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (World Health Organization, 2001). Günümüzde ise bu tanım, belirli mikroorganizma türlerinin gıdalarda ve diyet takviyelerinde kullanımı için probiyotik olarak nitelendirilip nitelendirilmediği sonucuna varılmasını özetleyen dört kritere dönüşmüştür. Bu kriterler, Şekil 7’de gösterilen bir karar ağacı olarak sunulabilir ve bir aday suşun veya suş kombinasyonunun, probiyotik özelliğe sahip olup olmadığını belirlemek için kullanılabilir. Probiyotik mikroorganizmalar bazı LAB, *Bifidobacterium* spp., mayalar ve bazı spesifik Gram-negatif suşlar dahil olmak üzere farklı türleri içermektedir (Foo vd., 2019). Laktik asit bakterileri geleneksel ve endüstriyel fermantasyonda kullanılan ve birçoğunun probiyotik özelliklere sahip olduğu bilinen en önemli mikroorganizmalardandır. Gıdalarla alınan laktik asit bakterilerinin gastrointestinal sistemde canlı kalması dolayısıyla probiyotik potansiyeli konakçının fizyolojik ve sağlık durumunun yanı sıra bakteriyel izolatların özelliklerini içeren birçok faktöre bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Ilango ve Antony, 2021). Genellikle probiyotiklerin seçimi için kriterler, gastrointestinal koşullara (gastrik asit ve safra) toleransa, gastrointestinal mukozaya tutunma kabiliyetine ve patojen

türlere karşı ilgili türün intestinal florada baskın hale gelmesine dayanmaktadır (Collins vd., 1998; Ouwehand vd., 2002).



Şekil 7. Aday bir probiyotiğin probiyotik kriterlerini karşılayıp karşılamadığını belirlemek için karar ağacı (Binda vd., 2020).

Başlıca probiyotik etki mekanizmaları, epitel bariyerin güçlendirilmesini, bağırsak mukozasına tutunmanın artmasını, patojen tutunmasının inhibisyonunu, patojen türlere karşı ilgili türün intestinal florada baskın hale gelmesini, antimikrobiyal bileşenlerin üretimini ve bağışıklık sisteminin modülasyonunu içerir (Bermudez-Brito vd., 2012).

Nihai üründe yeterli sayıda canlı bakteri sayısına ulaşılması ve konakçıda sağlığa olumlu etkilerin sağlanabilmesi adına yüksek canlılık oranına sahip, yüksek stres direnci sergileyen suşların varlığı oldukça önemlidir (Feng ve Wang, 2020). Oksijen, anaerobik aerotolerant probiyotik bakterilerin hayatta kalmasını etkileyen kritik faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir. Aerobik bir ortam, probiyotik laktik asit bakterilerinde reaktif oksijen türleri, reaktif nitrojen türleri ve reaktif kükürt türleri gibi toksik oksijen yan ürünlerinin üretimini uyarabilir (Amaretti vd., 2013). Böyle bir durumda açığa çıkan H_2O_2

Fenton reaksiyonu yoluyla Fe^{2+} tuzları ile reaksiyona girerek hidroksil radikali oluşumuna neden olabilmektedir (Kang vd., 2013). Bu radikaller, proteinlere, DNA'ya ve lipidlere doğrudan veya dolaylı olarak zarar verir ve hücre ölümüne yol açar. Bazı laktik asit bakterilerinde NADH oksidazlar, piruvat oksidaz ve laktat oksidaz gibi O_2 tüketen enzimler bulunur (Condon, 1987). Oksijen tüketen bu enzimler, oksijenin hızla uzaklaştırılmasından sorumludur ve hücre içi redoks dengesinin korunmasında önemli bir rol oynar. Güçlü redoks sistemlerine ek olarak, probiyotikler güçlü antioksidan özelliklere sahiptir (Feng ve Wang, 2020). Çok sayıda çalışma, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi probiyotiklerin, oksidatif strese karşı belirli bir derecede koruma sağlamak için mükemmel antioksidan kapasiteye sahip olduğunu ortaya koymuştur (Qian vd., 2018; Wang vd., 2018).

1.5. Fruktofilik Laktik Asit Bakterileri

Fruktofilik laktik asit bakterileri (FLAB), LAB içerisinde bir alt grup oluşturur. FLABlar birçok laktik asit bakterisinin aksine tercihen substrat olarak fruktozu kullanır ve fruktozdan mannitol üretir. *Lactobacillaceae* familyasından *Fructobacillus* spp. ve *Apilactobacillus* spp. (*Apilactobacillus ozensis* hariç) bu grubun üyeleridir (Maeno vd., 2016).

Büyüme karakteristikleri açısından FLAB zorunlu ve fakültatif laktik asit bakterileri olarak ikiye ayrılabilir. Zorunlu fruktofilik laktik asit bakterilerinin glukoz varlığında gelişim gösterebilmesi için piruvat veya oksijen gibi bir dış elektron alıcısına ihtiyaç vardır. Fakültatif fruktofilik laktik asit bakterileri, belirtilen dış elektron alıcıları olmaksızın glukoz üzerinde zayıf bir gelişim gösterebilirler (Endo ve Okada, 2008). *Lactobacillaceae* familyasından *Fructobacillus* spp. ve *Apilactobacillus* spp. (*Apilactobacillus ozensis* hariç) zorunlu FLAB olarak gelişim gösterirken *L. florum* ve *L. brevis* fakültatif FLAB grubunda yer almaktadır (Endo vd., 2010; Maeno vd., 2021). Fruktofilik laktik asit bakterileri, pentozları fermente edemeyen türler olup alkol/asetaldehit dehidrojenazı kodlayan adhE geninin olmaması nedeniyle laktik asit, asetik asit ve eser miktarda etanol üreten heterofermentatif LAB olarak sınıflandırılmaktadırlar (Endo vd., 2014).

Nispeten yeni bir çalışma alanı olarak nitelendirilebilecek olan fruktofilik laktik asit bakterilerinin çiçekler, meyveler, fermente ürünler, arıların gastrointestinal sindirim sistemi ve arı ürünlerinden izole edildiği çalışmalar mevcuttur (Endo vd., 2018). Literatürde ayrıca

FLAB'ların gelişimi sonucu oluşan yan ürünlerin arının sindirim sistemi florasını ve kovan içi florayı da belirleyici olabileceğine yönelik çalışmalar bulunmaktadır (Rokop vd., 2015).

Fructobacillus fructosus ilk olarak 1956 yılında Japonya'da bir çiçekten izole edilmiş (Kodama, 1956) ve sonraki 50 yıl boyunca bu türlerin izolasyonuna yönelik bir çalışma yayınlanmamıştır (Endo, 2012). Ardından fruktofilik bakterilerin çiçek, şarap ve "taberna" adlı Meksika'ya ait geleneksel bir fermente içecekten izolasyonuna yönelik çalışmalar yayınlanmıştır (Endo vd., 2009; Alcántara-Hernández vd., 2010; Mesas vd., 2011). *Fructobacillus pseudoficulneus* ise doğal kaynaklarda en sık tespit edilen FLAB olup incir, muz ve tabernadan izolasyonu yapılmıştır (Endo vd., 2009; Mesas vd., 2011). Kakao çekirdeğinin fermentasyonu da *Fructobacillus* türlerinin zengin bir kaynağı olarak nitelendirilmektedir (Nielsen vd., 2007; Lefeber vd., 2011). *Fructobacillus* cinsi dört *Leuconostoc* spp.'nin filogenetik konumlarına, biyokimyasal ve morfolojik özelliklerine göre yeniden sınıflandırılması ile ortaya çıkmıştır (Endo ve Okada, 2008). *Fructobacillus fructosus*, *Fructobacillus durionis*, *Fructobacillus ficulneus*, *Fructobacillus tropaeoli*, *Apilactobacillus kunkeei*, *Apilactobacillus apinorum*, *Fructilactobacillus florum* ve *Lactiplantibacillus plantarum* FLAB olarak rapor edilen türlerdendir (Endo vd., 2010; Ruiz Rodríguez vd., 2017; Gustaw vd., 2018).

L. kunkeei, *Lactobacillus* cinsi FLAB üyelerinden olup karbon kaynağı olarak D-fruktozu kullanır. Bu bakterinin Endo vd. (2012) tarafından ilk kez anaerobik koşullar altında glukoz varlığında zayıf gelişim gösterirken pirüvat, oksijen ve fruktoz gibi harici elektron alıcılarının varlığında gelişiminin hızlandığı bildirilmiş yani zorunlu fruktofilik olarak sınıflandırması yapılmıştır (Endo vd., 2012). Bu bakteri tarafından ligninin kullanımı özellikle ilginç bir husus olup polenin bu kompleks polisakkariti içerdiği göz önünde bulundurulduğunda polen sindiriminde de önemli bir role sahip olabileceği belirtilmiştir (Rokop vd., 2015). *L. kunkeei* asit, oksijen ve ozmotolerant özellikleri nedeniyle polenin arı ekmeğine dönüşümünde gerçekleşen laktik asit fermentasyonunda anahtar role sahiptir (Vásquez ve Olofsson, 2009; Anderson vd., 2013).

1.6. Polen, Arı Ekmeği ve Bal Arısı Sindirim Sisteminin Mikrobiyal Florası

Ergin arının sindirim sistemi kursak (bal midesi), orta bağırsak, ileum (ince bağırsağın alt ucu) ve rektum (kalın bağırsak) olmak üzere dört bölümden oluşmaktadır (Rangberg vd., 2015). Bal arısı sindirim sistemi ve arı ürünleri gibi fruktoz açısından zengin ortamlar, FLAB

suşlarının ana kaynaklarından biridir (Endo ve Salminen, 2013). *Lactobacillus* cinsinin arının bal midesinde bulunan en baskın mikroorganizmalar olduğu ve balda (%90,9), polende (%74,6), arı ekmeğinde (%83,9), arı sütünde (%93,3) dominant mikroflorayı oluşturduğu tespit edilmiştir (Olofsson ve Vásquez, 2008). Probiyotik olarak *Lactobacillus*, arıların patojenlere karşı bağışıklık sistemini güçlendirmektedir. Vasquez ve Olofsson (2008) tarafından yapılan çalışmada arının bal midesinde mevcut olan laktik asit bakteri florasının iki haftalık arı ekmeği örneğinde canlı formda olduğu tespit edilmiş ancak iki aylık arı ekmeği örneğinde laktik asit bakterisi izole edilememiştir. Bu durum fermantasyon sonucunda meydana gelen laktik asit ve antimikrobiyal maddelerin artışı ile açıklanmıştır. Arı midesindeki doğal floranın aydınlatılmasının amaçlandığı bu çalışmada filogenetik analizler ile tespit edilen 10 farklı filotipin 5'inin *Lactobacillus kunkeei*, *Bifidobacterium asteroides* ve *Bifidobacterium coryneforme* ile ilişkili olduğu diğer 5 filotipin de *Lactobacillus* cinsi ile büyük oranda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Dudakta labial mukoza ve ağzın orbiküler kası arasında bulunan salgı bezleri olarak da bilinen bal arısı tükürük bezleri kafadaki sefalik ve göğüs kafesindeki torasik bezler olmak üzere iki parçadan oluşmaktadır ve her ikisi de ortak bir kanal yoluyla ağza bağlanmaktadır. Bu her iki bez de ortak bir kanal ile ağza salgı yapmaktadır (Feng vd., 2013). Polenler arılar tarafından bitkilerden toplanırken tükürük ile yapışkanlık kazandırılır ve polen sepetinde taşınarak kovana getirilmektedir. Kovan içerisinde ise daha fazla nektar, tükürük ve mikrobiyal içerik eklenen polen arı ekmeği şeklinde tüketilmektedir. Birkaç bakteri türüyle karakterize edilen bal arısı sindirim kanalının aksine arı kovani laktik asit bakterileri dahil olmak üzere çok sayıda farklı mikroorganizmaya ev sahipliği yapmaktadır. Arı larvası, arı ekmeği ve nektar örneklerinde aynı *Lactobacillus* ve *Fructobacillus* operasyonel taksonomik birimleri tespit edilmiştir (Rokop vd., 2015).

Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan polen ve arı ekmeği örneklerinin mikrobiyal florasının araştırıldığı bir çalışmada *L. kunkeei*, *F. fructosus*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, arı ekmeği örneklerinde ise *L. kunkeei* tespit edilmiş ve çalışmada tespit edilen FLAB'ların arı ürünlerinin endüstriyel düzeyde üretimi için starter kültür olarak kullanılmasında kaynak görevi göreceği bildirilmiştir (İspirli ve Dertli, 2021).

FAO verilerine göre arı popülasyonundaki küresel artışa rağmen (Aizen ve Harder, 2009) birçok Avrupa ülkesinde arı popülasyonlarında azalmalar tespit edilmiştir (Potts vd., 2010). Arı popülasyonlarında meydana gelen azalmaları anlamak ve önlemek için

simbiyotik ve patojenik mikrobiyal etkileşimlerin araştırılması gerektiği belirtilmektedir (Powell vd., 2016). Bu noktada arılardaki patojenlere karşı ana savunma mekanizmalarında olumlu bir rolü olan FLAB florasına (Filannino vd., 2016) yönelik çalışmaların artması gerektiği oldukça açıktır.

1.7. Fermantasyon Mekanizmaları

Literatür çalışmalarında polenin arı ekmeğine dönüşümüyle meydana gelen biyokimyasal değişiklikler bakteri ve mayaların neden olduğu fermantasyon ile açıklanmaktadır. Del Risco (2004) tarafından iki muhtemel mekanizma rapor edilmiştir. İlk mekanizmada *Pseudomonas* cinsi bakterilerin anaerobik ortam oluşturduğu ve ekzin tabakasının degradasyonunda rol aldığı, *Lactobacillus* cinsinin ise laktik asit fermantasyonu gerçekleştirdiği belirtilmiştir. İkinci muhtemel mekanizmada ise *Pseudomonas* cinsi bakterilerin var olan oksijeni kullandığı ve böylece *Lactobacillus* cinsinin anaerobik fermantasyon gerçekleştirmesini sağladığı belirtilmiş, *Lactobacillus* cinsinin şekerleri parçalayarak laktik asit ürettiği ve son aşamada *Saccharomyces* tarafından kalan şekerlerin parçalanarak prosesin tamamlandığı bildirilmiştir (Del Risco, 2004). Önerilen başka bir mekanizmada petek gözlerinde polenin arı ekmeğine dönüşümünün ilk aşamasının 12 saat sürdüğü ve mayaların da dahil olduğu heterofermantatif fermantasyon gerçekleştiği belirtilmiştir. İkinci aşamada anaerobik laktik asit bakterilerinin (*Streptococcus*) gelişimiyle pH düşüşü meydana geldiği ve üçüncü aşamada *Lactobacillus* cinsi bakterilerin geliştiği, 7 günün sonunda başlayan son aşamada ise laktik asit oluşumuna bağlı olarak laktik asit bakterileri ve mayaların inaktivasyonunun söz konusu olduğu bildirilmiştir (Gilliam, 1979; Khalifa vd., 2020). Bir diğer mekanizmada polende bulunan aerobik bakterilerin polenin hücre içeriğinin serbest bırakılmasına yardımcı olduğu, ardından *Lactobacillus* cinsi bakterilerin pH 4'e ulaşmaya kadar laktik asit ürettiği ve son olarak laktik asit kullanılarak ön sindirime uğratılmış arı ekmeği elde edildiği belirtilmiştir (Loper vd., 1980).

1.8. Polen Fermantasyonuna Yönelik Çalışmalar

Polen fermantasyonuna yönelik çalışmalar incelendiğinde genellikle ticari laktik starter kültür kullanıldığı görülmüş olup laboratuvar ölçekli polen fermantasyonu çalışmaları Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. Laboratuvar ölçekli polen fermantasyonu çalışmalarında mevcut durum

Mikroorganizmalar	Substrat	Fermantasyon koşulları	Kaynak
<i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i>	Bal, polen	37 °C, 72 saat	(Vamanu vd., 2008)
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. paracasei</i>	Polen, su	35 °C, 72 saat	(Fuenmayor vd., 2011)
<i>L. plantarum</i> , <i>L. coryniformis</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i>	Polen, bal	35 °C, 15 gün	(Del Risco vd., 2012)
Arı ekmeği	Polen, bal	35 °C, 480 saat	(Araneda vd., 2014)
<i>L. plantarum</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Polen, su	35 °C, 72 saat	(Salazar-González ve Díaz-Moreno, 2014)
<i>L. rhamnosus</i>	Polen, su, bal	32 °C, 12 gün	(Kaškonienė vd., 2018)
<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. lactis</i>	Polen, su, bal	37 °C, 12 gün	(Kaškonienė vd., 2020)
<i>L. plantarum</i> (ATCC 8014) Ticari laktik starter kültür <i>S. cerevisiae</i> (ATCC 9763)	Polen, su	37 °C, 72 saat	(Zuluaga-Dominguez ve Quicazan, 2019)
Ticari laktik starter kültür	Polen, su	37 ve 42 °C, 45 saat	(Mora-Adames vd., 2021)

Polenin laboratuvar koşullarında fermente edilmesine yönelik yapılan ilk çalışmada *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus plantarum* ile polen fermantasyonu gerçekleştirilmiştir (Vamanu vd., 2008). Fermantasyon denemelerinde öğütülmüş veya öğütülmemiş polen kullanılmış ve 4 adet karışım hazırlanmıştır. İlk formülasyon 20 g öğütülmemiş polen, 3 g bal, 5 mL distile su, ikinci formülasyon 20 g öğütülmüş polen, 3 g bal, 5 mL distile su, üçüncü formülasyon %20 öğütülmemiş polen ve %3 bal, son formülasyon ise %20 öğütülmüş polen ve %3 bal içermektedir. Karışımların laktik asit içeriği 72 saat süreyle takip edilmiş ve en yüksek laktik asit oluşumunun ikinci formülasyona ait olduğu belirlenmiştir. Dördüncü formülasyonun laktik asit içeriği ikinci formülasyonun yarısı kadar olup bu durum besin ögesinin az su miktarının fazla olması ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca bir nolu formülasyonda da laktik asit oluşumu öğütülmemiş polen kullanılması ve dolayısıyla besin öğelerinin ortama nispeten daha yavaş salınımı nedeniyle

daha zayıf bulunmuş olup inoküle edilen bakterilerin hızlı çoğalması için polenin öğütülmesinin gerekli olduğu bildirilmiştir. Yüksek polen konsantrasyonlarında ve öğütülmüş polen kullanıldığında (iki nolu formülasyon) LAB gelişiminin daha yüksek olduğu görülmüştür.

Fuenmayor vd. (2011) tarafından polen:su oranı 2:1 olan karışıma 121 °C’de 15 dakika ısıtma işlemi uygulanmış ve 4 farklı ticari kültür *L. acidophilus*, *L. paracasei*, YOMIX® 205 LYO, (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*) ve CHOOZIT® MY 800 (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) inoküle edilerek karışım 35 °C’de 72 saat fermente edilmiştir. Bu çalışmada taramalı elektron mikroskobu ile elde edilen görüntüler fermantasyonun ekzin tabakasının yapısında istenen etkiyi sağladığını göstermiştir. Ticari kültürlerden *L. acidophilus* asitlendirme kapasitesi (0,16 g laktik asit/kg*saat) ve canlı kalma oranı (10⁸ kob/g 24 saat) bakımından en uygun suş olarak belirlenmiştir.

Polenin mikrobiyolojik kalitesinin artırılmasının amaçlandığı bir çalışmada polen fermantasyonu 35 °C sıcaklıkta 15 gün süre ile arı ekmeğinden izole edilen *L. plantarum*, *L. coryniformis* ve *L. delbrueckii* ve ticari olarak satın alınan *L. plantarum*, *L. casei* ve *L. acidophilus* ile yapılmıştır. Arı ekmeğinden izole edilen *L. plantarum* ve *L. delbrueckii* suşlarının %36 nem içeriğine sahip polen substratında yaklaşık %2 laktik asit üreterek mikrobiyolojik kaliteyi iyileştirdiği bildirilmiştir (Del Risco vd., 2012).

Araneda vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada polen fermantasyonunda arı ekmeği kullanılmış T₀: polen, T₁: arı ekmeği, T₂: polen + %5 inokulum, T₃: polen +%10 inokulum, T₄: polen + %15 inokulum, T₅: polen + %20 inokulum olmak üzere 5 farklı bileşim üzerinde çalışılmıştır. Fermantasyon denemeleri belirtilen oranlardaki inokulum ve polenin steril erlenlere alınması ve üzerine ince bir tabaka bal eklenmesi ile 35 °C sıcaklıkta 20 günde gerçekleştirilmiştir. Polen ve %20 inokulum ile hazırlanan karışımın asitliği doğal arı ekmeğine en yakın bulunmuş olup laboratuvar koşullarında arı ekmeği üretiminin yapılabileceği ancak bunun için ürün formülasyonun oldukça önemli olduğu belirtilmiştir.

Polen:su oranı 2:1 ve 1:1 olan karışımların *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum* ve *Saccharomyces cerevisiae* içeren karışık kültür ile fermente edildiği bir çalışmada 35 °C ve 40 °C’de 3 gün süreyle inkübasyon yapılmıştır. Bu çalışmada en iyi sonuç veren prosesin karışık kültür

kullanılarak 1:1 polen:su oranına sahip karışımın 35 °C’de fermente edilmesi ile gerçekleştirilen fermentasyon olduğu bildirilmiş ve üretilen ürünün biyoaktif özelliklerinde artış meydana geldiği tespit edilmiştir (Salazar-Gonzalez ve Diaz-Moreno, 2014).

Türkiye’nin 3 farklı ilinden (Afyon, İzmit, ve Sivas) toplanan polen örneklerinin laktik asit bakterilerinin inokülasyonu ile fermente edildiği bir çalışmada *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ya da ticari arı ekmeği kullanılmıştır. Bu çalışmada 10 g polen 5 mL steril su ile karıştırılmış ve karışım 90 dakika bekletilmiştir. 2,5 mL sterilize su ısıtılarak 1,5 g bal ile karıştırılmış ve karışım en az 5 dakika kaynatılmıştır. Karışımın sıcaklığı yaklaşık 30-32 °C olduğunda, 1 mL 10^7 kob/mL starter kültür (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) veya 0,5 g arı ekmeği ilave edilmiştir. Hazırlanan inokulum polen ve su karışımına ilave edilmiştir. Karışım 30 °C’de 3 gün bekletilmiş ardından 22 °C’ye alınarak fermentasyon 8 günde tamamlanmıştır. Afyon’dan toplanan polenlerin fermentasyon periyodunun sonunda laktik asit bakteri yükünde 3 logluk artış bulunmuş, İzmit’ten ve Sivas’tan toplanan polenlerde ise sırasıyla 0,5 ve 1 logluk artış belirlenmiştir. Ticari arı ekmeğinde yapılan mikrobiyolojik analizler sonucunda laktik asit bakterisi, maya ve toplam aerobik mezofilik bakteri üremesi olmamıştır. Laktik asit bakterisi inokülasyonu ile fermente edilen polen örneklerinin toplam fenolik madde içeriği fermente edilmemiş ve arı ekmeği ilave edilerek fermente edilmiş örneklerle göre düşük bulunmuştur. Biyoerişilebilirlik sonuçlarına bakıldığında toplam fenolik madde içeriği bakımından ortalama olarak İzmit fermente arı poleni örneklerine (%61) ve Sivas fermente arı poleni örneklerine (%61) kıyasla en düşük biyoerişilebilirlik değerine Afyon fermente arı poleni örneklerinin (%40) sahip olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bakterisinin arı poleni fermentasyonunda kullanılabileceği ve Afyon’dan toplanan polenin asitlik üretimi ve pH düşüşünde etkili olduğu belirtilmiştir (Gönül, 2016).

Polen fermentasyonuna yönelik bir diğer çalışmada ise 6 mL steril distile su ve homojenize edilmiş 30 g polen karıştırılmış ve bu karışıma 10 mL %60’lık (ağırlık/hacim) kaynatılıp soğutulmuş bal çözeltisi ilave edilmiştir. İnokulum olarak 600 µL *L. rhamnosus* GG ($2,92 \times 10^9$ kob/mL) kullanılmıştır. Karışımlar %20-25 tepe boşluğu bırakılmış kaplarda 32 °C’de 12 gün fermente edilmiş ve örneklerin biyoaktif özellikleri orijinal arı ekmeği ile kıyaslanmıştır. Bu çalışmada örneklerin flavonoid içeriği fermentasyondan önce 2,6-5,7 mg/g aralığında iken fermentasyondan sonra 6,0–9,3 mg/g aralığında bulunmuş olup tüm örneklerde 1,6-2,4 kat artış tespit edilmiştir. Ancak *L. rhamnosus* GG ile fermente edilen

örnekler ile bakteri inoküle edilmemiş örneklerin flavonoid içerikleri arasında belirgin bir farklılık olmadığı bildirilmiştir. Örneklerin flavonoid içeriklerinin benzer bulunması polenin doğal florasında bulunan bakterilerin fermentasyon prosesine katılması ile ilişkilendirilmiştir. Fermente edilen beş örnekten üçünün orijinal arı ekmeği ile benzer flavonoid içeriğine ulaştığı tespit edilmiştir (Kaškonienė vd., 2018).

Polen fermentasyonunda laktik asit bakterileri ve maya kullanılan bir çalışmada polen:su oranı 1:1 olan karışım 121 °C’de 15 dakika sterilize edilmiş ve farklı fermentasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Denemelerde *S. cerevisiae* ATCC 9763 ve ticari ekmek mayası, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 ve Choozit MY800 ticari kültür (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) kullanılmıştır. Ayrıca maya ve laktik asit bakterisi (ATCC) ve ticari ekmek mayası ve Choozit MY800 kültürünün birlikte kullanıldığı mikroorganizma konsorsiyumu oluşturulmuştur. Fermentasyon ise 37 °C’de 72 saat sürede gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon periyodunun sonunda en yüksek asitliğe (>200 miliekivalent/kg) Choozit MY800 ile fermente edilen polen:su karışımlarında ulaşılmıştır. *L. plantarum*, *S. cerevisiae* ve *L. plantarum* (ATCC) konsorsiyumu inoküle edilen örneklerin asitliği ise 140 miliekivalent/kg olarak belirlenmiştir. *L. plantarum* ile gerçekleştirilen fermentasyonda canlı mikroorganizma popülasyonu substrata yüksek bir adaptasyon göstermiş ve 8-9 log₁₀ kob/g düzeyinde kalmıştır. Bakteri ve maya konsorsiyumu (ATCC) ile yapılan üretimde fermentasyon periyodu boyunca canlı mikroorganizma sayısı azalarak 5 log₁₀ kob/g düzeyine inmiştir. Maya ile gerçekleştirilen fermentasyonda da benzer şekilde azalma görülmüş 72 saatin sonunda 4 log₁₀ kob/g düzeyinin altında canlı mikroorganizma tespit edilmiştir. Elde edilen bu veriler doğrultusunda çalışmada kullanılan ticari kültürlerin substrata daha iyi uyum sağladığı belirlenmiştir (Zuluaga-Dominguez ve Quicazan, 2019).

Kaškonienė vd. (2020) tarafından polen, su, bal karışımının fermentasyonunda *L. rhamnosus* ve *L. lactis* kullanılmış ve 6 farklı karışım hazırlanmıştır: i) pastörize edilmiş polen, su, bal karışımı ve 400 µL *L. rhamnosus* GG (2,9 x 10⁹ kob/mL), ii) pastörize edilmemiş polen, su, bal karışımı 400 µL *L. rhamnosus* GG (2,9 x 10⁹ kob/mL), iii) pastörize edilmiş polen, su, bal karışımı ve 400 µL *L. lactis* (2,9 x 10⁹ kob/mL), iv) pastörize edilmemiş polen, su, bal karışımı 400 µL *L. lactis* (2,9 x 10⁹ kob/mL), v) pastörize edilmiş polen, su, bal karışımı ve 400 µL MRS Broth vi) pastörize edilmemiş polen, su, bal karışımı ve 400 µL MRS Broth. Pastörizasyon 95 °C’de 20 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir.

Fermantasyon karışımları 1,4 mL steril distile su, 7 g homojenize edilmiş polen ve kaynatılıp soğutulmuş 1,05 g bal ile 1,75 g sudan oluşan bal çözeltisi içermektedir. Fermantasyon %20 tepe boşluğu bırakılmış kaplarda 37 °C’de 12 gün yapılmıştır. Bu çalışmada pastörize arı poleninin, fermente edilmiş doğal arı polenine göre fermentasyondan sonra önemli ölçüde daha düşük antimikrobiyal ve antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiş, arı poleninin doğal mikroflorasının, inoküle edilen bakterilerle birlikte fermentasyon sürecine katkıda bulunduğu görülmüştür.

Mora-Adames vd. (2021) tarafından 115 °C’de 10 dakika süreyle ısıtıl işlem uygulamasının 1:2 polen:su karışımı için (pH değeri 5,8’e ayarlanmış) pilot ölçekteki laktik asit fermentasyonunda yeterli olduğu belirtilmiş olup çalışmada ayrıca 80 kPa/115 °C koşullarında ısıtıl işlem uygulanmış polenin taramalı elektron mikroskopunda (SEM) elde edilen görüntüsü işlem görmemiş polen ile kıyaslanmış ve sıcaklık/basınç uygulamasının hücre duvarında açılmaya ve beraberinde sitoplazmik içeriğin salınımına olanak sağladığı belirtilmiştir. Bu çalışmada kullanılan polen fermentasyondan önce 50 °C’de nem içeriği %6’nın altına düşecek şekilde kurutulmuştur. Fermantasyonda kullanılan mikroorganizmalar starter A (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*), starter B (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *cremoris* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *biovar. diacetylactis*) ve starter C (*Lactobacillus acidophilus* NCFM)’dir. En yüksek asitlik starter C ile elde edilirken, mikrobiyal yükte en fazla artış starter A ile sağlanmıştır. 1:2 polen:su oranına sahip nötrale edilmiş (pH 5,8) substrat için canlı koloni sayısı $5,0 \pm 0,2 \log_{10}$ kob/g’dan starter C inoküle edilen substrat için 6,6’ya, starter B inoküle edilen için 7,8’e ve starter A kullanıldığında ise 8,3’e yükselmiştir.

1.9. Polen ve Arı Ekmeğinin Sindirilebilirliğine Yönelik Çalışmalar

Gastrointestinal sistemi simüle etmek için hızlı ve güvenilir olarak kabul edilen ve in vivo metotlar gibi etik sınırlamaları olmayan *in vitro* sindirim ve diyaliz metotları yaygın şekilde kullanılmaktadır (Liang vd., 2012). *In vitro* sindirim modeli mide ve bağırsak pH koşullarının sağlanmasıdır. Yapay olarak hazırlanan ağız, mide ve ince bağırsak koşullarında sindirimi sağlayan bileşenler sıralı bir şekilde kullanılarak insan sindirim sistemine benzetilmektedir. Antioksidan aktiviteye sahip bileşenlerin gıda matriksindeki sindirilebilirliğinin ve biyoyararlılığının tespit edilmesi söz konusu gıdanın sağlık üzerine

etkilerinin, sindirim sisteminin birebir yansıması olmasa dahi farklı ürünlerin sindirilebilirlik/biyoyerişilebilirlik karşılaştırmalarının yapılması açısından oldukça önemlidir.

Arı ürünlerinin kompleks yapısı besin öğelerinin sindirilebilirliğini olumsuz etkilemektedir. Çoğu yayın taze polen sindiriminin çok düşük olduğunu bildirmektedir (Campos vd., 2010; Wu vd., 2019). Sindirilebilirlik ve biyoyerişilebilirlik bu ürünlerin sağlığa yararlarını belirlemede önemli iki faktördür. Biyoyerişilebilirlik, alınan besinin normal fizyolojik fonksiyonlarda kullanılmak ve depolanmak için erişilebilir durumdaki kısmıdır. Besin öğesinin formuna ve konsantrasyonuna, söz konusu bileşenin bulunduğu gıdanın kompozisyonuna, gıda işleme ve hazırlama sırasındaki proseslere, sindirim hareketine bağlı olarak değişiklik gösterir. Diğer faktörler hamilelik, laktasyon, yaş, cinsiyet gibi bireysel fizyolojik özellikler (Millward vd., 2008) ve kişinin sağlık durumudur. Biyoyerişilebilirlik ise tüketilen gıdanın sindirildikten sonra, gıdanın matriksinden çıkabilen ve ince bağırsakta emilim için hazır olan miktarı olarak tanımlanır. Polen tanesini çevreleyen ekzin tabakası oldukça güçlü bir kimyasal yapıdır ve sporopolleninden oluşmaktadır. Sporopollenin asit ve alkali hidrolizine, enzimatik degradasyona dayanıklı bir biyopolimerdir. Bu yapı polenin sindirimini sınırlandırmaktadır.

Polen duvarının kesme kuvveti kullanılarak parçalanması oldukça basit ve ekipman bakımından düşük maliyetli bir yöntemdir. Ancak kesme kuvveti kullanımı ile oluşan ısı, ısıya duyarlı bileşenlerde kayba neden olmaktadır. Literatürde protamex hidrolizi ve ultrasonikasyon (Dong vd., 2015), süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu (Xu vd., 2009) gibi işlemlerle ekzin tabakasının parçalanmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Ancak bu proseslerin ekzin tabakasının tamamen parçalanmasında önemli eksiklikleri olduğu bildirilmiştir (Yan vd., 2019). Polenin sindirilebilirliğini artırmak amacıyla öğütme veya ılık suda bekletme gibi uygulamalardan da yararlanılmakta fakat bu işlemde önemli miktarda bileşen kaybı söz konusu olmaktadır. Ekzin tabakasının parçalanmasında etkili bir yöntem olarak değerlendirilen fermantasyon (Zhang vd., 2017) polen matriksinden bileşiklerin serbest bırakılmasını kolaylaştırmakta ve sindirim sırasında emilen fraksiyonun artmasına katkıda bulunmaktadır. Gıda fermantasyonunun kontrol edilmesi gıdaların lezzet ve tekstür gibi özelliklerinin standartlaşması açısından da önemlidir (Bachmann vd., 2015).

Ülkemizden toplanan üç propolis ve dokuz polen örneğinin *in vitro* sindirilebilirliğine yönelik bir çalışmada propolis için fenolik madde biyoyerişilebilirliği %1 olarak

bulunmuştur. Propolisin ortalama toplam flavonoid içeriği 452 mg kuersetin eşdeğeri/g ve gastrointestinal sindirimden sonra geri kazanılan miktar 0,92 mg kuersetin eşdeğeri/g olarak belirlenmiştir. Bu durumda toplam flavonoidlerin biyoerişilebilir yüzdesi %0,2 olarak bulunmuştur. Biyoerişilebilirlik sonuçlarına göre polen numunelerinin geri kazanımı 2,1 mg GAE/g olarak tespit edilmiş, polenin ortalama toplam fenolik madde içeriği ise 22,4 mg GAE/g olarak verilmiş olup fenolik madde biyoerişilebilirliği %9'dur (Yesiltas vd., 2014).

Silifke Karakaya, Silifke Çaltı, Silifke Kızıkalesi, Kaş, Tekirdağ, Çanakkale Erenköy, Çanakkale'den birer Alanya'dan ise iki adet olmak üzere toplam dokuz polen örneğinin biyoaktif özellikleri, fenolik ve flavonoid biyoerişilebilirlikleri araştırılmıştır. Bu çalışmada örneklerin toplam fenolik madde içeriği 3,93-9,27 mg GAE/g arasında iken mide sindirimi sonrası 0,627-1,077 mg GAE/g aralığında değiştiği ve dolayısıyla toplam fenolik madde içeriğinde *in vitro* mide sindirimi sonrası belirgin bir düşüş tespit edilmiştir. Gastrik sindirimden sonra fenolik içeriklerin geri kazanım yüzdeleri, %10,84 ile %16,44 aralığında bulunmuştur. Diyaliz edilebilir fenolik madde fraksiyonları (IN fazı, seruma geçen kısım) için fenolik madde içeriği 0,238 ile 0,376 mg GAE/g arasında değişmektedir. Yesiltas vd. (2014) tarafından polen için %9 olarak belirlenen IN fazındaki geri kazanım yüzdeleri ise bu çalışmada %4,01 ile %7,31 aralığında verilmiştir. Flavonoidlerin *in vitro* sindirim sistemindeki dağılımına bakıldığında bu bileşenlerde meydana gelen kayıp gastrik sistemdeki asidik degradasyona bağlı olarak %87,4 ile %99,7 arasında bulunmuştur. Bu çalışmada ayrıca IN fraksiyonlarında tespit edilen flavonoid miktarları polen örneklerinin flavonoid içeriğinin %1,1'i ile %5,9'una karşılık gelmektedir. Antioksidan aktivite sonuçlarına bakıldığında ise fenolik ve flavonoid madde içeriklerine benzer şekilde IN fraksiyonlarının antioksidan aktivite sonuçlarının mide sindirimi sonrası kalan (post gastric, PG) ve bağırsak sindirimi sonrasında kalan (OUT) fraksiyonlarının antioksidan aktivite sonuçlarından daha düşük olduğu görülmektedir. In fraksiyonlarının DPPH metodu ile belirlenen antioksidan aktivitesi polen örneklerinin sindirimden önceki antioksidan aktivitesinin %0,1'i ile %6,6'sına karşılık gelirken CUPRAC metodunda %0,5 ile %5,5 arasındadır. IN fraksiyonlarının DPPH ve CUPRAC yöntemleri ile değerlendirilen antioksidan aktivite sonuçlarında farklılıklar olmasına rağmen bu fraksiyonların hesaplanan biyoerişilebilirlik yüzdelerinin birbirine yakın olduğu görülmektedir (Ozkan vd., 2018).

Aylanc vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada Portekiz'in farklı bölgelerinde bulunan arılıklardan toplanan üç polen ve üç arı ekmeğinin üç farklı sindirim aşamasında

(ağız, mide, bağırsak) biyoerişilebilirliğinin ve antioksidan aktivitesinin belirlenmesine yönelik çalışılmıştır. Bu çalışmada toplanan polenler için toplam fenolik madde içeriği 2,4 ile 4,3 mg GAE/g arasında değişirken arı ekmeçlerinin toplam fenolik madde içeriği 3,2 ile 3,8 mg GAE/g arasında bulunmuştur. Ağızdaki sindirim aşamasından sonra örneklerin toplam fenolik madde içeriğinde hafif bir düşüş olduğu, gastrik fazda ise bu düşüşün çok daha yüksek olduğu tespit edilmiş polen örnekleri için gastrik fazdaki azalma %36-%69 olarak verilmiştir. Bağırsak sindiriminden sonra arı ekmeği numunelerinin fenolik madde içeriğinin 1,1-1,4 mg GAE/g arasında değiştiği belirlenmiştir. Ayrıca *in vitro* sindirimde arı ekmeği örneklerinden arı polenine göre daha yüksek fenolik içerik salınması, polen tanelerinin çok katmanlı yapısının arı ekmeğinin oluşum sürecindeki fermentasyon prosesinde bakteriyel enzimler tarafından kısmen sindirilmesiyle ilişkilendirilmiştir. Arı poleni numuneleri için ortalama toplam fenolik madde ve toplam flavonoid biyoerişilebilirlikleri sırasıyla %31 ve %25 iken, arı ekmeğinde bu değerler %38 ve %35 olarak bulunmuştur. Bu çalışma sonucunda elde edilen bulgular doğrultusunda arı ekmeğinin biyoaktif bileşikler açısından arı polenine göre daha sindirilebilir ve dolayısıyla biyoerişilebilirliği daha yüksek bir ürün olduğu bildirilmiştir.

1.10. Çalışmanın Amacı ve Önemi

Bu tez çalışmasının ilk bölümünde aynı bölge/kovan örnekleminde belirli aralıklarla polen ve arı ekmeği hasadı yapılarak bu ürünlerin biyoaktif özelliklerinin, sindirilebilirliklerinin, mikrobiyal florasının belirlenmesi amaçlanmıştır. İkinci bölümde ise hasat edilen polen pasajlanarak tek bir polen örneği elde edilmiş ardından 1:1, 1:2, 2:1, 3:1 ve 4:1 polen:su oranlarında ve %11 bal içeren polen, su bal karışımları hazırlanmıştır. Bu karışımlar spontan fermentasyon, kovan içi fermentasyon ve starterli fermentasyon olmak üzere üç farklı yöntemle fermente edilmiştir. Fermentasyon süresince LAB, TMAB ve maya-küf takipleri yapılmıştır. Fermente son ürünlerin biyoaktiviteleri ve sindirilebilirlik özellikleri tespit edilmiş, fermentasyonun polen karakteristiklerine etkisi ortaya konulmuştur.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Cihazlar

Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlara ait marka/model detayları Tablo 3’te verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan cihazlar ve marka/model bilgileri

Cihaz	Marka/model
UV-Vis spektrofotometre	Biochrom Libra
HPLC-PDA	Shimadzu Corporation LC 20AT-SPD M30A
pH-metre	Hanna pH 211
Etüv	Nüve FN500
İnkübatörler	Nüve EN-055 Nüve EN-500
Otoklav	HMC Hirayama HV-50 L
Biyogüvenlik kabini	Biosafety Cabinet Class-II
Stomacher cihazı	Interscience
Kül fırını	Nüve MF-100
Vorteks karıştırıcı	Wisemix VM-10
Santrifüj	Hermle Z 326K
Hassas terazi	Schimadzu AUX320
Abbe refraktometresi	Isolab 618.41.001
Homojenizatör	IKA T-18
Çalkalamalı su banyosu	Nüve ST-30
Manyetik karıştırıcı	IKA C-Mag HS 7

2.2. Kimyasal Maddeler

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler ve ilgili kimyasalların satın alındığı firma bilgileri Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Kimyasal maddeler ve satın alındıkları firma bilgileri

Kimyasal	Satın alındığı firma
Fruktoz	Merck
Maya ekstraktı	Merck
Poliipepton	Biobasic
Sodyum asetat	Merck
Tween 80	Merck
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sigma
MnSO ₄ .4H ₂ O	Sigma
FeSO ₄ .7H ₂ O (Besiyeri için)	Sigma
NaCl	Tekkim
Siklohekzimit	Cayman Chemical
Sodyum azid	Sigma
Agar-agar	Merck
Ringer tableti	Merck
Gliserol	Sigma
de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) Agar	Merck
Plate Count Agar (PCA)	Merck
Malt Extract Agar (MEA)	Merck
Tartarik asit	Sigma
Violet Red Bile (VRB) Agar	Merck
Gallik asit	Sigma
Folin-Ciocalteu reaktifi	Sigma
Na ₂ CO ₃	Sigma
DPPH	Sigma
Metanol	Isolab

Tablo 4'ün devamı

FeSO ₄ .7H ₂ O	Thomas Scientific
2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ)	Sigma
CH ₃ COONa.3H ₂ O	Merck
FeCl ₃	Merck
CH ₃ COOH (Glasıyel)	Isolab
Pepsin	Sigma
HCl	Isolab
Diyaliz poşeti	Spectra-Por
Safra tuzu	Sigma
Pankreatin	Sigma
NaHCO ₃	Sigma
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma
H ₃ PO ₄	Isolab
Sığır serum albümini	Sigma
Dietil eter	Isolab
Etil asetat	Isolab
Asetonitril	Isolab

2.3. Kullanılan Çözeltiler

Toplam fenolik madde içeriği, demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ile antioksidan aktivite tayini, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali süpürme aktivitesi tayini, *in vitro sindirim*, Bradford metodu ile protein tayininde kullanılan çözeltilerin adları ve hazırlanışı Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Kimyasal analizlerde kullanılan çözeltiler

Toplam fenolik madde içeriği tespiti	
Standart gallik asit çözeltileri	Metanol ile hazırlanan stok 1 mg/mL'lik gallik asit farklı konsantrasyonlara (0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 mg/mL) metanol ile seyreltilerek analizde kullanılmıştır.
Folin-Ciocalteu reaktifi (0,2 N)	2 N'lik Folin reaktifi saf su ile 1:10 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.
%10'luk Na ₂ CO ₃	25 g Na ₂ CO ₃ bir miktar saf suda çözülmüş ve hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır.
Demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ile antioksidan aktivite tayini	
40 mM HCl	Saf su üzerine 340 µL HCl (%37'lik) ilave edilmiş ve hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.
20 mM FeCl ₃	324,4 mg FeCl ₃ distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
Asetat tamponu (pH 3,6, 300 mM)	0,775 g CH ₃ COONa.3H ₂ O ve 4 mL glasiyel asetik asit saf su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır.
10 mM TPTZ	7,8083 mg TPTZ 2,5 mL 40 mM HCl içerisinde çözündürülmüştür.
FRAP reaktifi	Asetat tamponu (300 mM, pH 3,6), 10 mM TPTZ, 20 mM FeCl ₃ sırasıyla 10:1:1 oranında olacak şekilde karıştırılmış ve taze olarak hazırlanmıştır. Çözelti karanlıkta muhafaza edilmelidir.
1000 µM FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8 mg FeSO ₄ .7H ₂ O distile su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmış 500; 250; 125; 62,5; 31,25 µM konsantrasyonlara saf su ile seyreltilerek kullanılmıştır.

Tablo 5'in devamı

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali süpürme aktivitesi tayini	
0,1 mM DPPH çözeltisi	3,94 mg DPPH bir miktar metanolde çözülmüş ve son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.
<i>In vitro</i> sindirim metodu	
5 N HCl	Bir miktar saf su üzerine 41,46 mL HCl (%37, d=1,19 g/mL) yavaş yavaş eklenmiş ve hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
315 U/mL pepsin çözeltisi	10 mL pepsin çözeltisi hazırlayabilmek için 727 U/mg'lık pepsinden 4,33 mg alınmış ve 10 mL 0,1 N HCl'de çözüldürülmüştür.
1 M NaHCO ₃	8,401 g NaHCO ₃ bir miktar saf suda çözüldürülmüş ve son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.
Bradford metodu ile protein tayini	
Bradford reaktifi	100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 50 mL etanol (%95) içerisinde çözüldürülmüştür. 100 mL %85'lik fosforik asit eklenmiş ve distile su ile 1 L'ye seyreltilmiştir. Hazırlanan çözelti 1 gece boyunca karıştırılmış ve ardından filtre edilerek (Whatman No 1) koyu renkli şişede muhafaza edilmiştir.
Sığır serum albümin (BSA) standardı	1 mg/mL olacak şekilde stok BSA standardı hazırlanmış ve 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 ve 0,1 mg/mL'lik konsantrasyonlara distile su ile seyreltilerek kullanılmıştır.

2.4. Polen ve Arı Ekmeği Hasadı ve Saklama Koşulları

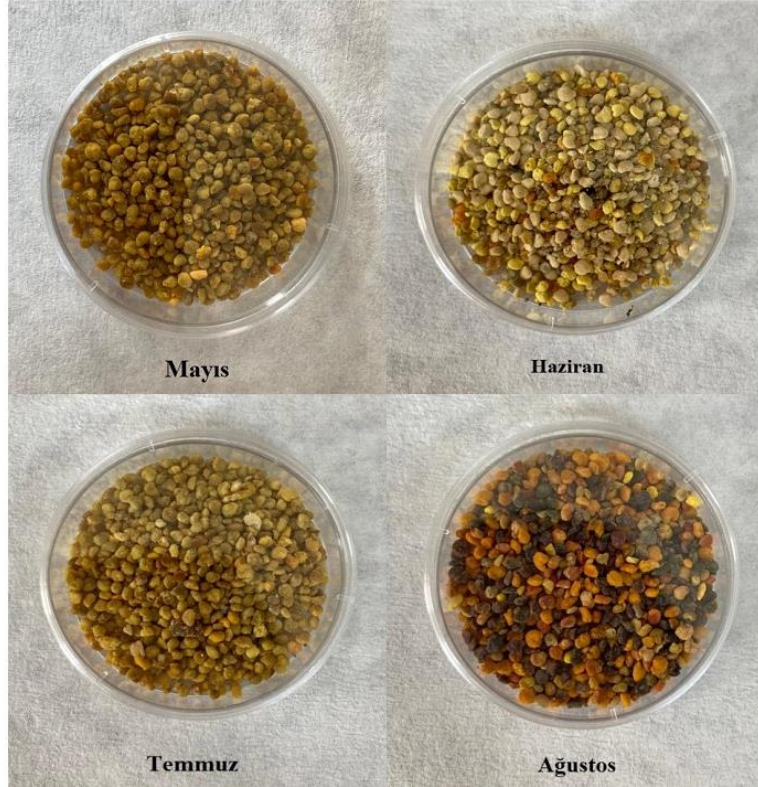
Bu tez çalışmasında analiz edilen polen ve arı ekmeği örneklerinin hasadı Trabzon ili Maçka ilçesine bağlı Barışlı köyünde 2021 yılında gerçekleştirilmiştir (Koordinatlar: 40,86557 °K, 39,70579 °D) (Şekil 8). Polen (Şekil 9) ve arı ekmeği hasadı (Şekil 10) Mayıs, Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarında yapılmış olup aynı yıl Ekim ayında ise nihai arı ekmeği hasadı yapılmıştır. Örneklerin hasat edildikleri aylar ve numune kodları Tablo 6’da verilmiştir.



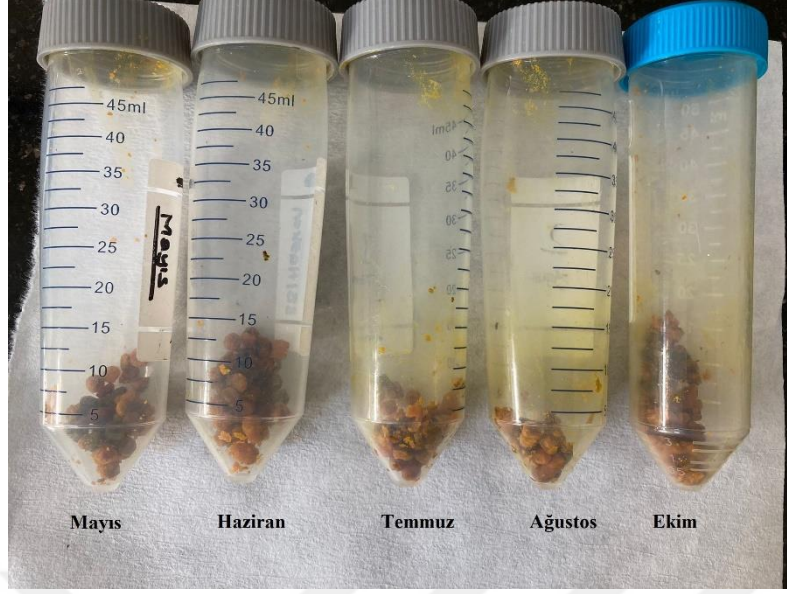
Şekil 8. Polen ve arı ekmeği hasadına ait fotoğraflar

Tablo 6. Örneklerin hasat edildikleri aylar ve kodları

Polenler	Numune Kodu
Mayıs	P1
Haziran	P2
Temmuz	P3
Ağustos	P4
Arı Ekmekleri	Numune Kodu
Mayıs	BB1
Haziran	BB2
Temmuz	BB3
Ağustos	BB4
Ekim	BB5



Şekil 9. Kovanlardan toplanan polen örnekleri



Şekil 10. Kovanlardan toplanan arı ekmeği örnekleri

2.5. Polen ve Arı Ekmeğinin Bileşiminin Belirlenmesine Yönelik Analizler

2.5.1. Nem Tayini

Örneklerden 2 g alınmış ve darası sabit tartıma getirilerek kaydedilmiş kurutma kaplarına konularak 60 °C’de bekletilmiştir. 1 saat ara ile yapılan iki tartım arasındaki farkın 0,1 mg veya altına düşmesiyle işlemin başlangıcındaki tartımla son tartım arasındaki farktan yararlanılarak örneğin %nem içeriği tespit edilmiştir (AOAC, 2005; Tomás vd., 2017).

Literatürde polen ve arı ekmeklerinin nem tayininde etüv veya vakumlu etüv kullanılan çalışmalar mevcut olup bu çalışmada vakumlu etüvdeki nem içeriği tayin yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır.

2.5.2. Kül Tayini

1 g örnek sabit tartıma getirilmiş porselen kroze alınmış ve 550 °C’de kül fırınında hiç siyahlık kalmayıncaya kadar yakma işlemi uygulanmıştır. Yakma işleminin sonunda kroze bir desikatöre alınarak soğutulmuş sonuçlar kuru maddede %kül olarak hesaplanmıştır (AOAC, 2000).

2.5.3. pH ve Titrasyon Asitliği

Örneklerden 1 g alınarak 5 mL distile su ile süspansiyon haline getirilmiş ve 45 dakika beklendikten sonra pH ölçümü yapılmıştır. Aynı karışım 0,05 M NaOH ile çözeltisi ile pH $8,5 \pm 0,1$ 'e ulaşana kadar titre edilmiştir. Titrasyonda harcanan alkali hacmi büretten okunarak örneklerin asitliği laktik asit cinsinden hesaplanmıştır (Costa vd., 2017).

2.6. Polen ve Arı Ekmeği Ekstraktlarının Hazırlanması

Polen ve arı ekmeği örneklerinden ikişer g tartıldıktan sonra distile su ile hacim 20 mL'ye tamamlanmış ve 1 dakika süreyle homojenizatör yardımıyla homojen hale getirilmiştir.

Ekstraksiyon 37 °C'de 72 saat boyunca 200 rpm'de çalkalamalı su banyosunda gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon süresinin sonunda katı partiküller kaba filtre kağıdı ile süzüldükten sonra 2700 g'de +4 °C'de 10 dakika süreyle santrifügasyon yapılmış ve supernatant alınarak analizlerde kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.7. Toplam Fenolik Madde Tayini

Örneklerin toplam fenolik madde (TPC) içeriği Folin Ciocalteu metoduna göre belirlenmiştir (Slinkard ve Singleton, 1977). Bu yöntem fenoliklerin sodyum karbonat ile bazik hale getirilmiş reaksiyon ortamında Folin reaktifini indirgeyip kendilerinin yükseltgenmiş forma dönüştüğü bir yükseltgenme-indirgenme reaksiyonuna dayanmaktadır. İndirgenmiş reaktifin oluşturduğu mavi rengin şiddetinin 760 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek analizi yapılan örneğin toplam fenolik madde içeriği tespit edilebilmektedir.

Toplam fenolik madde tayininde gallik asitin farklı konsantrasyonları (1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 mg/mL) standart olarak kullanılmış ve sonuçlar mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g kuru madde olarak ifade edilmiştir.

Toplam fenolik madde tayininde analizin kısa bir özetini içeren pipetlemeler Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. Toplam fenolik madde içeriği analiz prosedürü

	Numune	Kör çözelti	Standart
Polen/arı ekmeği sulu ekstraktı	20 µL	-	-
Gallik asit	-	-	20 µL
Distile su	680 µL	700 µL	680 µL
Folin Ciocalteu	400 µL	400 µL	400 µL
Tüpler vorteks ile karıştırılır ve ardından 3 dakika beklenir.			
%10'luk Na ₂ CO ₃	400 µL	400 µL	400 µL
Tüpler 2 saat karanlıkta bekletilir. İnkübasyon süresinin sonunda 760 nm'de köre karşı absorbens okunur.			

2.8. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Gücü (FRAP) ile Antioksidan Aktivite Tayini

Bitkisel ekstraktlarda sıklıkla kullanılan bir antioksidan aktivite tespit metodu olan bu yöntem sulu çözeltiye antioksidan içeren bir numunenin eklenmesi ile Fe (III)-TPTZ kompleksinin indirgenerek mavi renkli Fe (II)-TPTZ kompleksinin oluşmasına dayanır (Benzie ve Strain, 1999). Analizde standart olarak FeSO₄.7H₂O kullanılmış olup 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 µM olmak üzere 6 farklı standart konsantrasyonunda çalışılarak standart eğri hazırlanmıştır. Analiz metodunda yer alan pipetlemeler Tablo 8'de detaylandırılmıştır.

Tablo 8. Demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) analiz prosedürü

	Numune	Kör (su)	Renk körü	Standart
Polen/arı ekmeği ekstraktı	50 µL	-	50 µL	-
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	-	-	50 µL
Distile su	-	50 µL	1,5 mL	-
FRAP reaktifi	1,5 mL	1,5 mL	-	1,5 mL
Tüpler vortekslenir ve 4 dakika karanlıkta bekletildikten sonra 593 nm'de absorbens okunur.				

2.9. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikali Süpürme Aktivitesi Tayini

Polen ve arı ekmeğinin sulu ekstraktlarında DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali süpürme aktivitesi tayininde sentetik olarak satın alınan DPPH'nin metanolik çözeltisi hazırlanmıştır. Örnekler distile su ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda numune çözeltileri elde edilmiş ve metanolik DPPH ile 1:1 oranında karıştırılarak 50 dakika süreyle karanlıkta inkübe edilmiş, ardından 517 nm'de absorbanslar okunmuştur. Kontrol çözelti 750 µL örnek çözücüsü (distile su) ve 750 µL DPPH karıştırılarak hazırlanmıştır. Konsantrasyon-absorbans grafiği çizilerek SC₅₀ değeri yani DPPH radikalinin miktarını/absorbansını yarıya indirmek için gerekli numune konsantrasyonu hesaplanmış, sonuçlar mg kuru ekstrakt/mL olarak verilmiştir (Brand-Williams vd., 1995).

DPPH metoduna ait analiz prosedürü Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) analiz prosedürü

	Numune	Reaktif körü	Renk körü
Polen/arı ekmeği sulu ekstraktı (en az 6 farklı konsantrasyonda)	750 µL	-	750 µL
DPPH	750 µL	750 µL	-
Distile su	-	750 µL	750 µL
Karanlıkta 50 dakikalık inkübasyon süresinin ardından 517 nm'de absorbans okunur.			

2.10. *In vitro* Sindirim Metodu

Bu çalışmada örneklerin sindirilebilirlik/biyoyerişilebilirlik özelliklerinin belirlenmesinde McDougall vd. (2005) tarafından verilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. 2,5 mL ekstrakt alınarak toplam hacim 20 mL'ye tamamlanmış ardından pH 5 N HCl kullanılarak 1,7'ye düşürülmüştür. Ortama 1,5 mL 315 U/mL pepsin ilave edilmiş ve 37 °C'de 100 rpm'de 2 saat inkübasyon yapılmıştır. Bu basamak mide sindirimine karşılık gelmekte olup inkübasyon süresinin sonunda 2 mL numune alınmış ve analizlerde

kullanılmak üzere ayrılmıştır (Post gastric, PG). Ardından 12-14 kDa diyaliz tüpü içerisine 1 M NaHCO₃ (20 mL) konulmuş ve uçları bağlanarak yerleştirilmiştir. pH 7'ye gelene kadar beklenmiş ve ardından 4,5 mL 4 mg/mL pankreatin ve 25 mg/mL safra tuzu karışımı ilave edilerek 37 °C'de 100 rpm'de 2 saat inkübasyon yapılmıştır. Bu metotta diyaliz tüpünün içerisindeki fraksiyon (IN) pasif difüzyon ile dolaşım sistemine geçen kısma karşılık gelmektedir. Diyaliz tüpünün dışındaki karışım (OUT) ise gastrointestinal sistemde kalan fraksiyonu temsil etmektedir. Fraksiyonlar analiz edilinceye kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Sindirim fraksiyonları analiz öncesi 4000 rpm +4 °C sıcaklıkta 25 dakika santrifüj edilmiş ve supernatantlarda toplam fenolik madde tayini, demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP), DPPH metotları ile antioksidan aktivite tayini yapılmıştır. Örneklerin suda çözünür protein içeriğinin tespiti için ise supernatant fazlarında Bradford metodu ile protein tayini gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda tüm örnekler için aşağıda verilen formüller kullanılarak biyoerişilebilirlik indeksi (%) ve geri kazanım (%) hesaplanmıştır (Ozkan vd., 2022).

$$\text{Biyoerişilebilirlik indeksi (\%)} = \frac{C_{\text{intestinal (IN+OUT)}}}{C_{\text{sindirim öncesi}}} \times 100 \quad (2.10.1)$$

$$\text{Geri kazanım (\%)} = \frac{C_{\text{IN}}}{C_{\text{sindirim öncesi}}} \times 100 \quad (2.10.2)$$

2.11. Bradford Metodu ile Protein Tayini

Sulu ekstraktlarda ve ekstraktların *in vitro* sindirime tabi tutulması sonucu elde edilen supernatantlarda (PG, IN, OUT) protein tayini standart bir metot olan Bradford yöntemi (Bradford, 1976) ile gerçekleştirilmiştir. Analizde kullanılan Bradford çözeltisinin hazırlanması ile ilgili ayrıntılar Bölüm 2.3'te verilmiştir. Boya-albümin kompleksinin ekstinksiyon katsayısı standardın 10 kat konsantrasyon aralığında hazırlanması durumunda sabit olup daha geniş aralıklarda standart eğri lineerlikten saparak parabolik olmaktadır. Protein tayininde 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 ve 0,1 mg/mL'lik sığır serum albümini (BSA) standartları hazırlanmıştır. Orijinal metotta 5 mL Bradford reaktifi ile 100 µL örnek kullanılıyor olup bu çalışmada reaktif:örnek oranına bağlı kalınarak 2 mL Bradford reaktifi ve çözücüsü ile seyreltilmiş 40 µL örnek ile reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Metoda ait analiz prodesürü Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Bradford metodunda yapılan pipetleme işlemleri

	Numune	Kör çözelti	Standart
Örnek	40 µL	-	-
Bradford reaktifi	2000 µL	2000 µL	2000 µL
Distile su	-	40 µL	-
BSA (1-0,1 mg/mL - aralığında)	-	-	40 µL
5 dakika karanlıkta inkübasyon yapılır (oluşan renk 60 dakika stabildir) ve 595 nm’de köre karşı absorbands okunur.			

2.12. RP-HPLC-PDA ile Fenolik Madde Profilinin Belirlenmesi

Kovanlardan toplanan polen ve arı ekmeklerinin ve üç farklı fermantasyon metodu ile üretilen arı ekmeklerinin fenolik madde profilinin tespitinde 200-800 nm dalga boyu aralığında eş zamanlı analiz yapılabilen Shimadzu Corporation LC 20AT HPLC cihazı kullanılmıştır. RP-HPLC-PDA analizlerinde standart olarak 25 standart fenolik madde ile çalışılmış olup 250 nm’de *m*-OH benzoik asit, protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, ellagik asit, daidzein ve rutin; 280 nm’de gallik asit, epikateşin, şiringik asit, *t*-sinnamik asit, hesperetin, krisin ve pinosembrin; 320 nm’de *p*-kumarik asit, ferulik asit, klorojenik asit, kafeik asit, apigenin, resveratrol ve CAPE; 360 nm’de myrisetin, luteolin, kuersetin, ramnetin ve kurkumin için tespit edilen absorbands verileri doğrultusunda kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Analizler ters faz C₁₈ (250 mmx4,6 mm, 5 µm; GL Sciences) kolonu ve mobil faz olarak asetonitril, su ve asetik asitle oluşturulan gradient program ile gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon hacmi 20 µL olup mobil akış hızı 1,0 mL/dk ve kolon sıcaklığı ise 30 °C’dir.

Gallik asit, *p*-OH benzoik asit, *m*-OH benzoik asit, protokatekuik asit, klorojenik asit, ferulik asit, kafeik asit, şiringik asit ve *p*-kumarik asit standartları için %50-50 metanol-saf su kullanılarak standartlara ait stok çözeltiler hazırlanmıştır. Ellagik asit için stok çözelti önce az miktarda DMSO daha sonra %100’lük metanol kullanılarak hazırlanmıştır. Epikateşin, rutin, myrisetin, kuersetin, apigenin, resveratrol, daidzein, *t*-sinnamik asit, hesperetin, luteolin, ramnetin, krisin, pinosembrin, CAPE ve kurkumin stok çözeltileri ise

%100'lük metanol ile hazırlanmıştır. Belirtilen şekillerde hazırlanan stok çözeltilerden 1,25; 2,5; 5; 10; 20 ve 40 ppm'lik çalışma çözeltileri oluşturulmuştur.

RP-HPLC-PDA ile fenolik madde profili tespit edilecek örneklerin 10 mL sulu ekstraktlarının pH değerleri 2'ye ayarlanmıştır. Bu işlemin ardından 10 mL ve 5 mL olmak üzere iki kez dietil eter ile oda sıcaklığında 15 dakika süreyle 200 rpm'de sıvı-sıvı ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Aynı işlem belirtilen şekilde etil asetat ile de tekrarlanmış olup her bir ekstraksiyon işlemi sonrası elde edilen organik faz darası alınmış balonda toplanmıştır. Organik fazdaki çözücü 40 °C'de döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılmış ve balondaki kalıntı 2 mL metanolde çözündürülerek 0,45 µm filtreden geçirilmiş ve RP-HPLC-PDA cihazına enjeksiyonu yapılmıştır (Kara, 2020).

2.13. Mikrobiyolojik Analizler

Örneklerin 10^{-1} 'lik dilüsyonları steril stomacher poşetlerine steril koşullar altında tartılan 3-5 g numunenin üzerine 27-45 mL sterilize edilmiş $\frac{1}{4}$ gücünde ringer çözeltisi eklenmesi ve stomacher cihazında 1 dakika süreyle homojenize edilmesi ile hazırlanmıştır. İlk dilüsyonların hazırlanmasında kovanlardan toplanan numune miktarlarına göre seyreltmeler yapılmıştır. Ardından 10^{-1} 'lik dilüsyondan steril pipet yardımı ile 1 mL alınarak 9 mL steril ringer çözeltisine aktarılmıştır. Bu şekilde devam edilerek 10^{-9} 'a kadar seri seyreltmeler yapılmış ve ekimlerde kullanılmıştır.

2.13.1. Laktik Asit Bakterilerine Yönelik Analizler

Örneklerin laktik asit bakteri florasının tespitinde de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) Agar, fruktozlu MRS Agar ve fruktozlu maya peptonu (FYP) olmak üzere 3 farklı besiyeri bileşimi kullanılmıştır.

MRS Agar ticari olarak satın alınmış olup fruktozlu MRS (FMRS) Agar (pH $5,7 \pm 0,2$), ticari MRS Agar besiyerine litrede 10 g D-fruktoz, 0,05 g siklohekzimit ve 0,05 g sodyum azid ilave edilmesiyle hazırlanmıştır.

Fruktozlu maya peptonu (FYP) literatürde fruktofilik laktik asit bakterileri için önerilen besiyerindeki bileşenler (Endo vd., 2009) dikkate alınarak besiyeri girdilerinin tek tek tartılıp birleştirilmesiyle elde edilmiştir. Kullanılan MRS Agar ve fruktozlu maya peptonu (FYP) Agar besiyerlerinin bileşimi Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. Kullanılan besiyerlerinin bileşimi

MRS Agar (pH 5,7±0,2)	
Bileşen	Miktar
Kazein peptonu	10,0 g/L
Et ekstraktı	10,0 g/L
Maya ekstraktı	4,0 g/L
D(+) glukoz	20,0 g/L
K ₂ HPO ₄	2,0 g/L
Tween 80	1,0 g/L
Diamonyum hidrojen sitrat	2,0 g/L
Sodyum asetat	5,0 g/L
MgSO ₄	0,2 g/L
MnSO ₄	0,04 g/L
Agar-agar	14,0 g/L
FYP Agar (pH 6,8±0,1)	
Fruktoz	10,0 g/L
Maya ekstraktı	10,0 g/L
Polipepton	5,0 g/L
Sodyum asetat	2,0 g/L
Tween 80	0,5 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g/L
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,01 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g/L
NaCl	0,01 g/L
Sikloheksimit	0,05 g/L
Sodyum azid	0,05 g/L
Agar-agar	14,0 g/L

Her örnek için 10^{-9} 'a kadar hazırlanan seri dilüsyonlar yukarıda bileşimi verilen MRS Agar, FMRS Agar ve FYP Agar besiyerlerine ekilmiştir. MRS Agar ve FMRS Agar 37 °C'de mikroaerofilik koşullarda 48-72 saat, FYP Agar ise 30 °C'de aerobik koşullarda 48-72 saat inkübe edilmiştir (Takatani ve Endo, 2021). Sonuçlar log kob/g olarak verilmiştir.

D-glukoz LAB tespitinde en sık kullanılan substrattır (Endo ve Okada, 2008). Gıdalarda LAB sayımı genellikle mikroaerofilik koşullar altında inkübe edilen MRS Agar ortamında yapılmaktadır. MRS Agar zengin bir bileşime sahip bir besiyeri olup bu besiyerinde LAB dışında birçok fakültatif anaerobik mikroorganizma gelişebilmektedir (Kang ve Fung, 1998). Bu besiyerlerinde LAB seçici sayımı ve LAB olmayan Gram pozitif ve Gram negatif bakteri gelişiminin ortadan kaldırılması için pH'ın 5,5'e düşürülmesi gibi uygulamalardan yararlanılmaktadır (Kim vd., 2001).

Sınırlı çalışmalarda arı ürünlerinde FLAB varlığı tespit edilmiş olup (Takatani ve Endo, 2021) bu çalışmalarda FYP Agar, FMRS Agar besiyerlerinin kullanıldığı görülmüştür.

Kovanlardan alınan polen ve arı ekmeğinin ve ayrıca polen fermantasyonu ile üretilen ürünlerin LAB sayımları için kullanılan MRS Agar (pH 5,7±0,2) ortamında fungal gelişimi baskılamak için sikloheksimit ilavesi yapılmamış olup genel besiyeri olarak ilgili türlerin tespitine olanak sağlanması amaçlanmıştır. Ayrıca FYP Agar ve FMRS Agar besiyerleri ile çalışılarak her üç besiyeri ile elde edilen mikrobiyal yüklerin kıyaslamasının yapılması ve bakteriyel floranın tespitinde bu besiyerlerinin farklılıklarının ortaya konulması da amaçlanmıştır.

2.13.2. Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri ve Maya-Küf Yükünün Belirlenmesi

Her örnek için 10^{-9} 'a kadar hazırlanan seri dilüsyonlar toplam mezofilik aerobik bakteriler için Plate Count Agar (PCA) besiyerine, maya-küf yükü için tartarik asit ile %2 asitlendirilmiş Malt Extract Agar (MEA) besiyerine ekilmiş ve sırasıyla 37 °C 48 saat ve 25 °C'de 5 gün inkübasyon süresinin sonunda kolonilerin sayımı yapılmıştır.

PCA ortamında maya-küf gelişimini baskılayarak sadece bakteriyel popülasyonun tespitini yapabilmek adına besiyerine sikloheksimit ilavesi (0,05 g/L) yapılmıştır.

2.13.3. Koliform Bakteri ve Fekal Koliform Bakteri Sayımları

Koliform bakteri ve fekal koliform bakteri sayımları VRB Agar kullanılarak sırasıyla 37 °C’de ve 44 °C’de 24 saat inkübasyon sonucunda tespit edilmiştir.

2.13.4. Polen ve Arı Ekmeği Örneklerinden LAB İzolasyonu ve Tanılanması

Laktik asit bakterisi sayımları MRS, FMRS ve FYP Agar olmak üzere 3 ayrı besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Bu besiyerlerinde gelişen koloniler steril öze ile alınarak ilgili besiyerinin sıvı formuna aktarılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda bulanıklık-tortu oluşumu gerçekleşen sıvı besiyerinden steril öze ile katı besiyerine tek koloni düşürme tekniği ile çizilmiştir. Bu şekilde tek koloni olarak elde edilen bakteri kültürleri identifikasyon basamağına kadar muhafaza edilmek için tekrar steril öze ile sıvı besiyerine aktarılmıştır. İnkübasyonun ardından %40’lık steril gliserol ile 1:1 oranında karıştırılarak vortekslenmiş ve -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

Gliserol stokları bakteri tanılama analizlerinin gerçekleştirilmesi için stoklandıkları sıvı besiyerine %5 oranında aşılınmış ve 24-48 saat inkübe edilmiştir. Kültürlerin aktive edilmesi için bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Sıvı besiyerinde toplam 3 kez pasajlanan bakteriler aktive ettikleri sıvı besiyerinin katı formuna tek koloni düşürme tekniği ile ekilmiştir.

Elde edilen saf bakteri izolatlarının tanılama işlemleri, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Sağlığı Kliniği Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry, Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Almanya) cihazı kullanılarak hizmet alımı ile yürütülmüştür. Bu yöntemde bakteri kültürlerinin protein izolasyon işlemleri etanol-formik asit metodu ile yapılmakta olup MALDI-TOF MS flex kontrol yazılım programı (Biotyper 3,0; Microflex LT; Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) ile elde edilen spektrumlar, MALDI Biotyper Real-Time Classification (RTC) yazılımı ile karşılaştırılarak tanı işlemi gerçekleştirilmektedir. Bakteri tanılamada, yüksek olasılıklı tür teşhisi; 2,000-3,000 (yeşil renk), cins düzeyinde ve muhtemel tür düzeyinde teşhis; 1,700-1,999 (sarı renk) arasındaki skala değerleri kullanılarak değerlendirmeler yapılmıştır (De Carolis vd., 2012; Wieser vd., 2012; Uysal vd., 2019).

2.14. Arı Ekmeği Üretimi

2021 yılı Mayıs, Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarında toplanan polen örnekleri örnek farklılığının etkisini ortadan kaldırmak amacıyla pasajlanarak tek bir karışım yapılmış elde edilen polen (PP) arı ekmeği üretiminde kullanılmıştır. Pasaj poleni için de kovandan alınan polen ve arı ekmeği örneklerinde tespit edilen pH, titrasyon asitliği, nem içeriği, fenolik madde, antioksidan aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir.

Arı ekmeği üretiminde polen, bal ve su miktarının seçiminde Krell (1996) tarafından FAO bünyesinde yayınlanan “Arıcılıkta Katma Değerli Ürünler” kitabında verilen Dany (1988) yöntemi esas alınmış ve bu yöntemde bazı modifikasyonlar yapılmıştır.

Proje kapsamında Dany (1988) tarafından verilen reçeteye ek olarak (polen:su oranı 3:1) Mora-Adames vd. (2021) tarafından yapılan çalışmadan da yararlanılmış (polen:su oranı 1:1 ve 1:2) ve arı ekmeği üretiminde 1:1, 1:2, 2:1, 3:1 ve 4:1 oranlarında polen:su karışımları ile çalışılmıştır.

Tüm fermantasyon karışımları, Dany (1988)’de verilen reçete baz alınarak tüm karışımın %11’ine karşılık gelecek şekilde bal içerecek şekilde hazırlanmıştır. Tüm formülasyonlarda aynı ticari süzme çiçek balı kullanılmıştır. Her üretim 5 farklı oranda polen:su içerecek şekilde ve 3 paralel olarak yapılmıştır.

Tüm formülasyonlarda ticari süzme çiçek balı kullanılmış olup fermantasyon karışımlarının analiz sonuçlarını kuru madde üzerinden verebilmek adına bal numunesinin kırılma indisi Abbe refraktometresi ile tespit edilmiştir. Belirlenen kırılma indisinden nem içeriğinin tespit edilmesi için standart çizelge kullanılmıştır (Chen, 2019).

2.14.1. Spontan Fermantasyon ile Arı Ekmeği Üretimi

Arı ekmeği üretiminde sadece polen kaynaklı bakterilerin fermantasyona etkisinin ortaya konulması amaçlandığından piyasadan satın alınan süzme çiçek balı steril su ile karıştırılmış ve bal-su karışımı soğutulduktan sonra pasaj polenine (PP) ilave edilmiştir. Hazırlanan fermantasyon karışımları içerdikleri polen:su oranları görsel üzerinde belirtilmiş olarak Şekil 11’de gösterilmiştir.



Şekil 11. Spontan fermantasyon için hazırlanmış polen, su, bal karışımları

Belirtilen şekilde hazırlanan karışımlar 30 °C’de inkübatörde fermente edilmiştir. Fermantasyon süresi tüm karışımlar için 15 gün olarak uygulanmıştır. 15 günlük fermantasyon periyodunun sonunda örnekler 25 °C’de 50 gün depolanmış, 10 günlük aralıklarla karışımların LAB, TMAB, maya-küf yükü takibi yapılmıştır.

2.14.2. Kovan İçerisinde Arı Ekmeği Üretimi

2020 yılı yaz sezonunda gerçekleştirilen ön denemelerde kovan içerisinde fermantasyona tabi tutulan polen, su ve bal karışımının bal akımı/nektar akış döneminde kavanozların açık ağız kısımlarından giren arılar tarafından çok az bir kısmının tüketildiği, bu tüketimin karışımın yüzeyi ile sınırlı olduğu dolayısıyla arıların bu karışımı yem olarak tüketmediği tespit edilmiştir. Bu kısmi tüketim arıların polenle temas etmesine ve arı vücudunda ve kovan florasında bulunan mikroorganizmaların arı ekmeğine bulaşmasına neden olmaktadır.

Dudakta labial mukoza ve ağzın orbiküler kası arasında bulunan salgı bezleri olarak da bilinen bal arısı tükürük bezleri kafadaki sefalik ve göğüs kafesindeki torasik bezler olmak üzere iki parçadan oluşmakta ve her ikisi de ortak bir kanal yoluyla ağza bağlanmaktadır. Bu her iki bez de ortak bir kanal ile ağza salgı yapmaktadır (Feng vd., 2013). Polenler arılar tarafından bitkilerden toplanırken tükürük ile yapışkanlık kazandırılır ve polen sepetinde taşınarak kovana getirilir. Kovan içerisinde ise daha fazla nektar, tükürük ve mikrobiyal içerik eklenen polen arı ekmeği şeklinde tüketilir. Bu nedenle bu tez çalışmasında ön deneme sonuçları doğrultusunda kovan içerisinde arı ekmeği üretiminde

doğal arı ekmeği üretiminde olduğu gibi arının kovan içerisinde fermantasyon karışımıyla doğrudan teması ve kovan içerisinde mevcut mikrobiyal floranın etkisiyle arı ekmeği üretimi gerçekleştirilmiştir (Şekil 12). Bu yöntemle kovan içerisinde arı ekmeği üretim metodu ile balmumu kalıntı problemi olmaksızın arı ekmeği üretiminin mümkün olacağı düşünülmüştür. Polen mikrobiyal florası ve kovan içi mikrobiyal floranın etkili olduğu üç ayrı kovan içi arı ekmeği üretimi yapılmıştır.

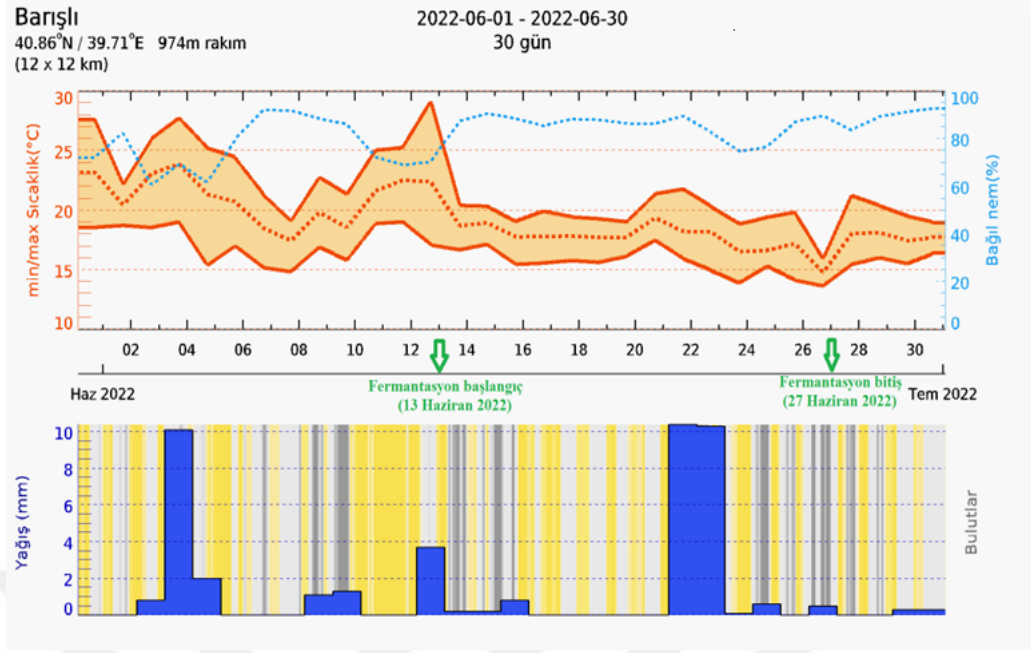


Şekil 12. Kovan içi arı ekmeği üretiminde arının fermantasyon karışımıyla doğrudan temasına dair bir görsel

Kovan içi arı ekmeği üretimlerinden ilki (Kovan içi üretim-1) Trabzon ili Maçka ilçesine bağlı Barışlı köyünde 2022 yılı Haziran ayında gerçekleştirilmiştir (Koordinatlar: 40,86557 °K, 39,70579 °D).

Kovan içi üretim-1'e ait sıcaklık, nem ve yağış verileri Şekil 13'te verilmiş olup üretim periyodu ilgili görsel üzerinde işaretlenmiştir (URL-1, 2022).

Kovanlara fermantasyon karışımlarının yerleştirilmesi Şekil 14'te verilmiştir.

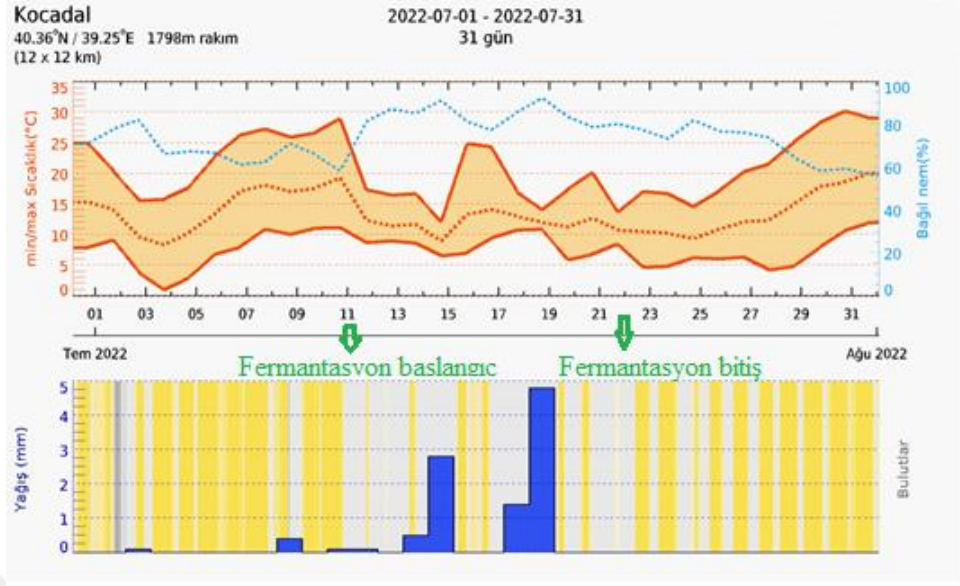


Şekil 13. Kovan içi üretim-1 için hava durumu verileri



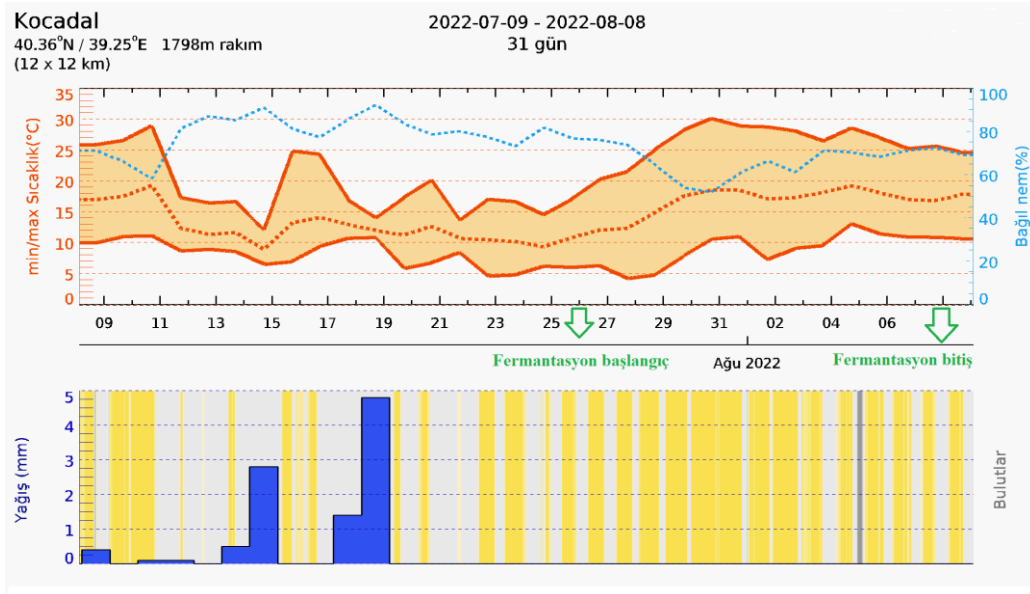
Şekil 14. Kovanlara fermantasyon karışımlarının yerleştirilmesi

Bu üretime ek olarak aynı kovanlar Gümüşhane ili Torul ilçesi Kocadal köyüne (Koordinatlar: 40,36813 °K, 39,22805 °D) taşınarak 11 Temmuz 2022-22 Temmuz 2022 tarihleri arasında kovan içi arı ekmeği üretimi denemesi yapılmıştır (Kovan içi üretim-2). Belirtilen üretim periyodu için hava durumu verileri Şekil 15'te verilmiştir (URL-2, 2022).



Şekil 15. Kovan içi üretim-2 için hava durumu verileri

Bir diğer arı ekmeği üretimi (kovan içi üretim-3) kovan içi üretim-2 ile aynı lokasyonda (Gümüşhane ili, Kocadal köyü) 26 Temmuz 2022-8 Ağustos 2022 tarihlerinde gerçekleştirilmiş olup fermantasyon sürecine dair hava durumu verileri Şekil 16'da verilmiştir (URL-3, 2022).



Şekil 16. Kovan içi üretim-3 için hava durumu verileri

2.14.3. Laktik Asit Bakterisi İnokülasyonu ile Arı Ekmeği Üretimi

LAB inokülasyonu ile polen fermantasyonu için MALDI-TOF MS ile *Lactobacillus kunkeei* olarak tespit edilen en yüksek skor değerine sahip (2,19), aside ve safra tuzuna dayanıklılığı belirlenen *L. kunkeei* izolatı kullanılmıştır. Bu izolatın gliserol stokundan 250 µL alınarak 5 mL steril FYP Broth ortamına aktarılmış ve 30 °C’de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon üç kez tekrarlanmış ve ardından elde edilen kültür +4 °C’de 12000 rpm’de 5 dakika süreyle santrifüj edilerek kültürün besiyerinden ayrılması sağlanmıştır. Elde edilen bakteri peleti üzerine serum fizyolojik ilave edilerek santrifüj etme işlemi tekrar edilmiştir. Son olarak darası alınmış steril santrifüj tüpleri içerisindeki bakteri peleti miktarları belirlenmiş, tüplerdeki alt faz üzerine steril su ilave edilerek peletler birleştirilmiş ve stok kültür oluşturulmuştur (Şekil 17).

Stok kültürün seri dilüsyonları hazırlanarak FYP agar ortamına yayma plak yöntemi ile ekimi yapılmış mL’deki *L. kunkeei* sayısı belirlenmiştir. Çalışılan tüm polen:su konsantrasyonları için $2,1 \times 10^8$ kob/mL *L. kunkeei* inokülasyonu yapılmış (%3) ve karışımlara eklenen kültürün mL’si karışıma eklenecek su miktarından düşürülerek polen, su, bal karışımları hazırlanmıştır. Fermantasyon 30 °C’de 15 gün süreyle gerçekleştirilmiş olup fermantasyon süresince örneklerin pH, titrasyon asitliği, laktik asit bakterisi, toplam mezofilik aerobik bakteri, maya-küf yükü takibi yapılmıştır.



Şekil 17. *L. kunkeei* stok kültürü

LAB inokülasyonu ile polen fermantasyonu için MALDI-TOF MS ile *Lactobacillus kunkeei* olarak tespit edilen en yüksek skor değerine sahip (2,19) bakteri izolatu kullanılmıştır. Bu izolatu gliserol stokundan 250 µL alınarak 5 mL steril FYP Broth ortamına aktarılmış ve 30 °C’de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Ardından bu işlem bir kez daha tekrarlanarak mL’deki canlı bakteri sayısının artırılması sağlanmıştır. İki kez FYP Broth ortamına pasajlanarak geliştirilen *Lactobacillus kunkeei* kültürü 12000 rpm’de 5 dakika süreyle +4 °C’de santrifüj edilmiştir. Aynı tüplerde üç paralel olarak belirtildiği şekilde santrifüjlenen bakteri kültürünün supernatantı atılmış ve pelet üzerine steril FYP Broth ilave edilmiştir (Kontrol örnek).

Lactobacillus kunkeei peletini içeren tüplere mide koşullarına dayanıklılığın belirlenmesi için pH değeri 1 M HCl ile pH 3,0’a ayarlanmış FYP Broth, safra tuzuna dayanıklılığın tespiti için ise %0,3 safra tuzu içeren FYP Broth kullanılmıştır. Asit ve safra tuzuna dayanıklılığın tespitinde sırasıyla Klingberg vd. (2005) ve Maragkoudakis vd. (2006) tarafından verilen yöntemlerde bazı modifikasyonlar yapılmış, bu tez çalışmasında kullanılan *in vitro* sindirim metodu ile uyumlu olması açısından hem asit direnci hem de safra tuzuna direnç tespiti için 37 °C’de 2 saat süreyle inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda tüplerden seri dilüsyonlar hazırlanmış ve katı besiyerine ekim yapılarak petrilerdeki koloniler sayılmıştır. Değerler log olarak hesaplanmış ve ilgili suşun %pH toleransı ve %safra tuzu toleransı belirlenmiştir.

2.15. Spontan Fermantasyon ile Üretilen Arı Ekmeklerinden Mikroorganizma İzolasyonu ve İzole Edilen Mikroorganizmaların Tanılanması

Spontan fermantasyon ile üretilen örnekler için fermantasyon periyodu boyunca LAB yükündeki log artış ve fermantasyonu takiben depolama sürecinde tespit edilen LAB yükleri esas alınarak yapılmıştır. 1:1, 1:2, 2:1, 3:1 ve 4:1 polen:su oranına sahip fermantasyon karışımları için en yüksek LAB sayısına ulaşılan ve depolama periyodu boyunca en uzun süre LAB sayımı alınan örnek grubu için sayımlar MRS, FMRS ve FYP Agar olmak üzere 3 ayrı besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Bu besiyerlerinde steril öze ile alınarak ilgili besiyerinin sıvı formuna aktarılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda bulanıklık-tortu oluşumu gerçekleşen sıvı besiyerinden steril öze ile katı besiyerine tek koloni düşürme tekniği ile çizilmiştir. Bu şekilde tek koloni olarak elde edilen bakteri kültürleri identifikasyon basamağına kadar muhafaza edilmek için tekrar steril öze ile sıvı besiyerine

aktarılmıştır. İnkübasyonun ardından %40'lık steril gliserol ile 1:1 oranında karıştırılarak vortekslenmiş ve -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Elde edilen saf bakteri izolatlarının tanılama işlemleri de polen ve arı ekmeğinden izole edilen kültürler için de olduğu gibi Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Sağlığı Kliniği Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry, Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Almanya) cihazı kullanılarak hizmet alımı ile yürütülmüştür.

2.16. Kovan İçerisinde Fermantasyon ile Üretilen Arı Ekmeği Örneklerinden Zenginleştirme Metodu (Enrichment Culturing) ile İzolasyon

Seri dilüsyon ile katı besiyerine ekilen numunelerden inkübasyon süresinin sonunda LAB sayımı gerçekleştirilemediğinden bu teknik tercih edilmiştir. Üretilen örnekler için hem FYP hem de FMRS agarda koloni gelişmediğinde, FYP Broth kullanılarak zenginleştirme kültürü hazırlanmıştır (Takatani ve Endo, 2021). Bu amaçla 5 mL steril FYP Broth içerisine 0,5 gram örnek steril koşullarda aktarılmış ve 30 °C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, steril bir öze yardımıyla FYP Broth'a inokülasyon yapılmış ve aynı şartlarda inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Sıvı besiyerinde bulanıklık ve tortu takip edilmiş ve besiyerinde bulunan bulanıklık ve tortunun durumuna göre 5 mL besiyerine 250 µL kültür olacak şekilde pasajlama işlemi 4 kez tekrar edilmiştir. Ardından FYP Agar besiyerine seri dilüsyonları hazırlanarak ekilmiştir (Endo vd., 2009; Rodríguez vd., 2017).

Gelişen koloniler steril öze ile alınarak ilgili besiyerinin sıvı formuna aktarılmıştır, ardından öze ile katı besiyerine tek koloni düşürme tekniği ile çizilmiştir. Bu şekilde tek koloni olarak elde edilen bakteri kültürleri identifikasyon basamağına kadar muhafaza edilmek için tekrar steril öze ile sıvı besiyerine aktarılmıştır. İnkübasyonun ardından %40'lık steril gliserol ile 1:1 oranında karıştırılarak vortekslenmiş ve -20 °C'de MALDI-TOF MS ile analiz edilinceye kadar muhafaza edilmiştir.

2.17. İstatistiksel Analizler

Tez çalışması kapsamındaki temel istatistiksel analizler, korelasyon değerlendirmeleri SPSS Versiyon 20.0 (Statistical Package for the Social Sciences) paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verilerin istatistiksel farklılığının ortaya konulmasında One-way ANOVA ve en az 3 grubun karşılaştırılmasında Duncan çoklu karşılaştırma testi

kullanılmıştır. İkili kıyaslamalar ise bağımsız örneklem t-testi ile yapılmıştır. $p < 0,05$ değeri anlamlı farklılık olarak kabul edilmiştir.

Isı haritasının oluşturulmasında Origin Pro 2022b (Origin Lab, Northampton, MA, USA), temel bileşen analizlerinde (PCA*), XLSTAT-Statistical Software for Excel (2022) programları kullanılmıştır.



3. BULGULAR

3.1. Polen ve Arı Ekmeği Örneklerinin Nem ve Kül İçeriği

Kovanlardan toplanan polen ve arı ekmeğinin nem ve kuru maddede kül içerikleri Tablo 12’de verilmiştir. Polen ve arı ekmeğinin nem içeriği %10,23 ile %14,04 arasında değişmekte olup en düşük nem değerleri temmuz ayında hasat edilen polen ve arı ekmeğine, en yüksek nem ise ekimde toplanan arı ekmeğine aittir. Kovanlardan aynı ayda hasat edilen polen ve arı ekmeği grupları dikkate alındığında mayıs ve ağustos poleninin bu aylardaki arı ekmeğinden daha yüksek nem içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. Haziran ayında kovandan alınan polen ve arı ekmeğinin nem içerikleri istatistiksel olarak benzer bulunmuştur ($p>0,05$). Aynı şekilde temmuz poleni ve temmuz arı ekmeğinin nem içeriklerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($p>0,05$).

Tablo 12. Örneklerin nem ve kuru maddede kül içerikleri (%)

Örnek adı	%Nem	Kuru maddede kül (%)
P1	12,81±0,07 ^d	3,50±0,02 ^f
P2	12,38±0,20 ^{bc}	3,39±0,03 ^e
P3	10,41±0,06 ^a	3,37±0,02 ^e
P4	13,28±0,26 ^e	3,19±0,03 ^d
BB1	12,45±0,30 ^c	2,28±0,06 ^c
BB2	12,16±0,07 ^b	2,22±0,02 ^b
BB3	10,23±0,05 ^a	2,19±0,02 ^b
BB4	12,74±0,17 ^d	2,23±0,02 ^b
BB5	14,04±0,17 ^f	2,05±0,02 ^a

^{a-f} Aynı sütunda yer alan farklı harfler örnekler arasındaki anlamlı farklılığı simgelemektedir ($p<0,05$).

Kuru maddede kül içerikleri incelendiğinde ise tüm polenlerin kül içeriğinin arı ekmeğinin kül miktarından daha yüksek olduğu tespit edilmiş olup örneklerin kül içerikleri %2,05 ile %3,50 arasında geniş bir aralıkta değişim gösterdiği görülmektedir.

Toplanan polenler içerisinde en yüksek kül oranı mayıs ayında toplanan polen örneğine ve arı ekmekleri içerisinde de benzer şekilde mayıs arı ekmeğine aittir. Haziran ve temmuz polenlerinin kül içerikleri arasında istatistiksel olarak belirgin bir farklılık olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Mayıs-ekim ayları arasındaki hasat periyodunda toplanan arı ekmekleri kül içeriği bakımından üç ayrı grup oluşturmuş olup haziran, temmuz ve ağustos arı ekmeklerinin kül içeriği istatistiksel olarak benzer bulunmuştur ($p>0,05$).

3.2. Polen ve Arı Ekmeklerinin pH ve Titrasyon Asitliği Değerleri

pH ve asitlik polen ve arı ekmeği gibi ürünlerin mikrobiyal stabilitesi açısından belirleyici faktörlerdendir. Analiz edilen örneklerin pH değerleri 3,54 ile 4,47 arasında değişiklik göstermektedir (Tablo 13).

Tablo 13. pH ve titrasyon asitliği

Örnek adı	pH	Titrasyon asitliği (% laktik asit)
P1	4,22±0,02 ^e	2,89±0,02 ^b
P2	4,06±0,04 ^d	3,46±0,02 ^e
P3	3,88±0,04 ^b	4,20±0,02 ^f
P4	3,86±0,03 ^b	4,22±0,02 ^f
BB1	4,47±0,02 ^f	2,46±0,03 ^a
BB2	3,84±0,08 ^b	2,96±0,02 ^c
BB3	3,87±0,02 ^b	3,17±0,04 ^d
BB4	3,96±0,01 ^c	3,18±0,05 ^d
BB5	3,54±0,02 ^a	4,39±0,05 ^g

^{a-g} Aynı sütunda yer alan farklı harfler örnekler arasındaki anlamlı farklılığı simgelemektedir ($p<0,05$).

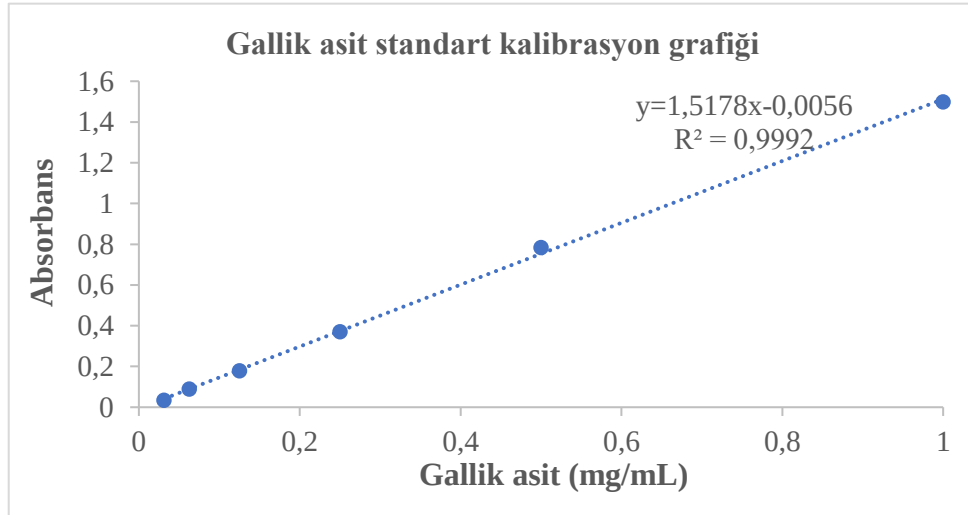
Temmuz poleni, ağustos poleni, haziran arı ekmeği ve temmuz arı ekmeği örneklerinin pH değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Mayıs, haziran, temmuz, ağustos polenlerinin pH değerleri sırasıyla 4,22; 4,06; 3,88; 3,86 olarak bulunmuştur. Mayıs, haziran, temmuz, ağustos ve ekim arı ekmekleri ise

sırasıyla 4,47; 3,84; 3,87; 3,96; 3,54 pH değerlerine sahiptir. Bu pH değerleri incelendiğinde başlangıç arı ekmeğinin (mayıs) en yüksek pH'ya sahip olduğu, haziran ayında arı ekmeğinin pH değerinde hızlı bir düşüş meydana geldiği ve ulaşılan pH değerinin temmuz ayında korunduğu, ekim ayında ise tüm örnekler arasında en düşük pH değerine ulaşıldığı belirlenmiştir.

Örneklerin titrasyon asitliği değerleri incelendiğinde pH ile benzer şekilde temmuz-ağustos polenlerinin %laktik asit içerikleri arasında anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Aynı hasat periyodundaki polen ve arı ekmeklerinin asitlik değerleri karşılaştırıldığında polen örneklerinin titrasyon asitliği değerlerinin arı ekmeğinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Hasat periyodu ilerledikçe polen örneklerinde %2,89'dan %4,42'ye, arı ekmeklerinde ise %2,46'dan %4,39'a asitlik artışı meydana gelmiştir. Ayrıca kovandan nihai ürün olarak alınan ekim arı ekmeği %4,39 laktik asit içermekte olup analiz edilen örnekler arasında en düşük pH ve en yüksek titrasyon asitliği değerine sahip olduğu belirlenmiştir.

3.3. Polen ve Arı Ekmeklerinin Toplam Fenolik Madde İçerikleri

Toplam fenolik madde içeriği tespitinde kullanılan gallik asit standart kalibrasyon grafiği Şekil 18'de verilmiştir.



Şekil 18. Toplam fenolik madde tayininde kullanılan kalibrasyon eğrisi

Örneklerin sulu ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriği 3,75-8,67 mg GAE/g kuru madde aralığında değişmekte olup en düşük fenolik madde içeriği mayıs arı ekmeğine, en yüksek fenolik madde içeriği ise temmuz polenine aittir (Tablo 14). Mayıs ve ağustos polenlerinin toplam fenolik madde içeriği istatistiksel olarak benzer bulunmuştur ($p>0,05$). Arı ekmeği örneklerinin fenolik madde içeriği incelendiğinde ise hasat periyodu ilerledikçe örneklerin toplam fenolik madde içeriğinde anlamlı bir artış meydana gelmiştir ($p<0,05$). Kovanlardan ağustos ve ekim aylarında alınan son iki arı ekmeği örneğinin fenolik madde içeriklerinde anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$).

Tablo 14. Örneklerin toplam fenolik madde içerikleri

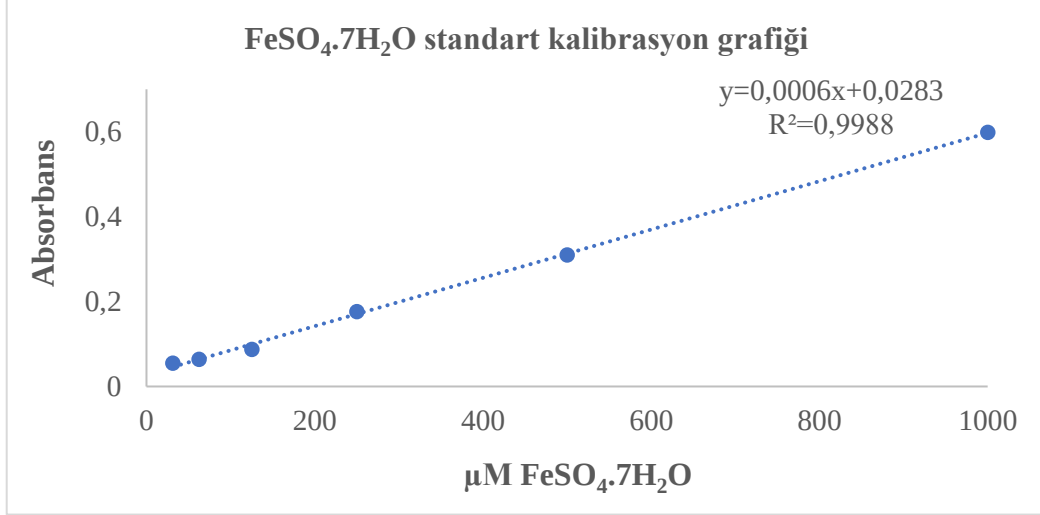
Örnek adı	Toplam Fenolik Madde (mg GAE/g kuru madde)
P1	7,81±0,40 ^f
P2	5,27±0,11 ^c
P3	8,67±0,12 ^g
P4	7,48±0,30 ^f
BB1	3,75±0,12 ^a
BB2	4,81±0,02 ^b
BB3	5,69±0,38 ^d
BB4	6,47±0,16 ^e
BB5	6,53±0,09 ^e

^{a-g} Aynı sütunda yer alan farklı harfler örnekler anlamlı farklılığı simgelemektedir ($p<0,05$).

3.4. Polen ve Arı Ekmeklerinin Antioksidan Aktivite Verileri

Örneklerin antioksidan aktivitesinin tespitinde demir indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikalının süpürme aktivitesi metotları kullanılmış olup sulu ekstraktlar ile çalışılmıştır (Tablo 15).

FRAP metodu ile antioksidan aktivite tayininde farklı konsantrasyonlarda $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltileri hazırlanarak çizilen kalibrasyon eğrisi Şekil 19'da verilmiştir.



Şekil 19. FRAP tayininde kullanılan kalibrasyon grafiği

Polen örneklerinin FRAP değerleri 13,86-28,17 $\mu\text{mol FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O/g}$ kuru madde aralığında arı ekmeklerinin ise 9,21-24,46 $\mu\text{mol FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O/g}$ kuru madde aralığında bulunmuştur. Aynı periyotta kovandan alınan örneklerin FRAP metodu ile belirlenen antioksidan aktivite verileri incelendiğinde haziran polen ve arı ekmeklerinin FRAP değerleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Benzer şekilde ağustos ayında toplanan polen ve arı ekmeği örneklerinin FRAP metodu ile tespit edilen antioksidan aktivite değerleri benzer bulunmuştur. Tüm arı ekmeği örneklerinin FRAP değerleri arasında belirgin farklılık olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

DPPH metodu ile antioksidan aktivitenin tespitinde her bir numune ekstraktı için konsantrasyona karşılık absorbans grafiği çizilmiş ve grafikten elde edilen üstel denklemden SC_{50} değeri hesaplanmıştır. Bu metotla elde edilen veriler doğrultusunda en yüksek antioksidan aktiviteye temmuz poleninin ve en düşük antioksidan aktiviteye de mayıs arı ekmeğinin sahip olduğu tespit edilmiştir. Mayıs ve temmuz polenlerinin antioksidan aktivitesi istatistiksel olarak benzer bulunmuştur. Ayrıca ağustos poleni, ağustos arı ekmeği ve ekim arı ekmeği örneklerinin DPPH metodu ile belirlenen antioksidan aktivitelerinde anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Hasat periyodu ilerledikçe kovanlardan alınan arı ekmeği örneklerinin antioksidan aktivitelerinde fenolik madde içeriğindeki benzer şekilde artış olduğu saptanmıştır.

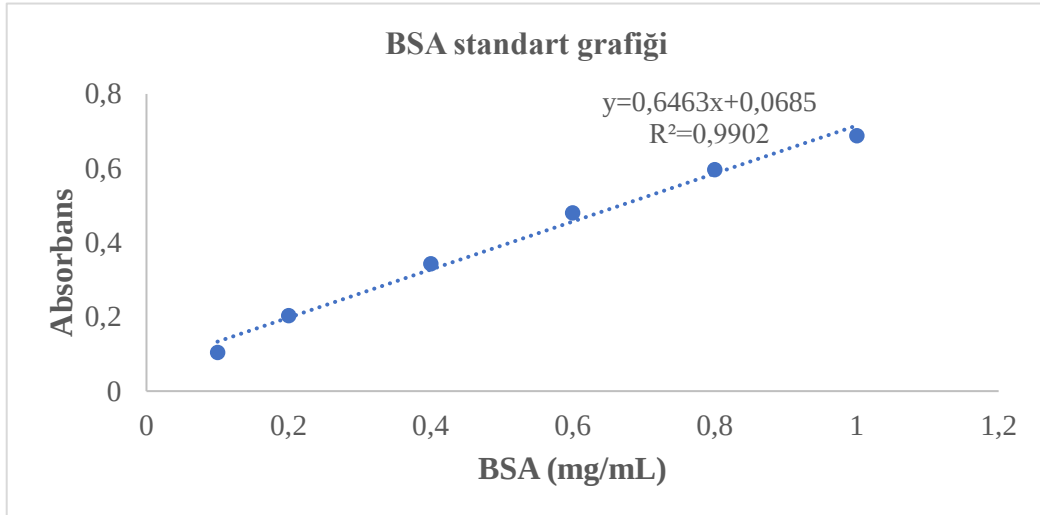
Tablo 15. Polen ve arı ekmeği örneklerinin antioksidan aktivite sonuçları

Örnek adı	FRAP ($\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ kuru madde)	DPPH SC ₅₀ (mg kuru madde/mL)
P1	27,40 $\pm$ 0,51 ^f	5,47 $\pm$ 0,18 ^{ab}
P2	13,86 $\pm$ 1,52 ^b	18,03 $\pm$ 0,09 ^c
P3	28,17 $\pm$ 1,13 ^f	5,16 $\pm$ 0,01 ^a
P4	19,85 $\pm$ 0,21 ^d	5,68 $\pm$ 0,06 ^b
BB1	9,21 $\pm$ 0,49 ^a	22,46 $\pm$ 0,15 ^e
BB2	12,65 $\pm$ 0,14 ^b	18,38 $\pm$ 0,03 ^d
BB3	16,94 $\pm$ 1,15 ^c	18,26 $\pm$ 0,18 ^{cd}
BB4	19,33 $\pm$ 1,87 ^d	5,64 $\pm$ 0,12 ^b
BB5	24,46 $\pm$ 1,18 ^e	5,75 $\pm$ 0,45 ^b

^{a-f} Aynı sütunda yer alan farklı harfler örnekler arasındaki farklılığı simgelemektedir (p<0,05).

3.5. Polen ve Arı Ekmeği Örneklerinin Protein İçerikleri

Sulu ekstraktların protein içerikleri Bradford metodu ile tespit edilmiş ve standart olarak BSA kullanılmıştır. Analize ait standart kalibrasyon eğrisi Şekil 20’de verilmiştir.



Şekil 20. Bradford metodu ile protein tayinine ait standart grafiği

Tablo 16. Polen ve arı ekmeği örneklerinin suda çözünür protein içeriği

Örnek adı	Suda çözünür protein (mg/g kuru madde)
P1	94,90±1,10 ^d
P2	88,42±0,70 ^c
P3	79,51±0,65 ^b
P4	78,38±0,48 ^b
BB1	76,28±1,63 ^a
BB2	79,77±0,80 ^b
BB3	78,73±0,92 ^b
BB4	78,81±0,47 ^b
BB5	78,67±0,42 ^b

^{a-d} Aynı sütunda yer alan farklı harfler anlamlı farklılığı simgelemektedir (p<0,05).

Kovandan toplanan polen ve arı ekmeklerinin protein içeriği 76,28-94,90 mg/g kuru madde aralığında değişmekte olup en yüksek protein içeren örnek mayıs polenidir (Tablo 16). Protein içeriği bakımından mayıs polenini haziran poleni izlemektedir.

Arı ekmeklerinin suda çözünür protein içeriğine bakıldığında mayıs arı ekmeğinin protein içeriğinin en düşük olduğu haziran, temmuz, ağustos ve ekim arı ekmeklerinin protein içeriklerinin ise benzer olduğu görülmüştür (p>0,05). Temmuz ve ağustos polenlerinin protein içerikleri ile haziran, temmuz, ağustos ve ekim arı ekmeklerinin protein içerikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir (p>0,05).

3.6. Örneklerin *In vitro* Sindirim Sonuçları

Polen ve arı ekmeklerinin sulu ekstraktlarının *in vitro* sindirimi gerçekleştirilmiş ve her ekstrakt için PG, IN ve OUT fazlarında toplam fenolik madde, FRAP ve DPPH metodu ile antioksidan aktivite ve Bradford metodu ile suda çözünür protein tayinleri gerçekleştirilmiştir.

3.6.1. Polen ve Arı Ekmeğine Ait Sindirim Fraksiyonlarının Toplam Fenolik Madde İçerikleri

Sulu polen ve arı ekmeği ekstraktlarının *in vitro* sindirime tabi tutulmasıyla elde edilen fraksiyonların toplam fenolik madde içerikleri Tablo 17’de verilmiştir.

Sindirim uygulamasının tüm polen ve arı ekmeği ekstraktlarının fenolik madde içeriğine etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Mide sindirimi sonrası (PG) tüm örneklerin fenolik madde içeriğinde belirgin bir azalma tespit edilmiştir. Temmuz ayında kovandan alınan arı ekmeğinin sulu ekstraktının *in vitro* sindirime tabi tutulmasıyla elde edilen IN ve OUT fraksiyonlarının fenolik madde içeriği benzer bulunmuş olup diğer tüm örnekler için pasif difüzyon ile dolaşım sistemine geçen fraksiyon ile (IN) gastrointestinal sistemde kalan (OUT) fraksiyonların fenolik madde içeriği birbirinden farklı bulunmuştur.

Tablo 17. *In vitro* sindirim sonucu tespit edilen toplam fenolik madde içerikleri

	Sindirim öncesi	PG	IN	OUT
P1	7,81±0,39 ^{fC}	0,54±0,01 ^{cB}	0,06±0,01 ^{aA}	0,25±0,02 ^{aB}
P2	5,27±0,11 ^{cC}	0,27±0,03 ^{aB}	0,04±0,01 ^{aA}	0,31±0,02 ^{abB}
P3	8,67±0,12 ^{gD}	0,79±0,01 ^{eC}	0,19±0,02 ^{cA}	0,52±0,08 ^{cB}
P4	7,48±0,30 ^{fC}	0,64±0,07 ^{dB}	0,11±0,01 ^{bA}	0,57±0,02 ^{cB}
BB1	3,75±0,12 ^{aD}	0,89±0,02 ^{fC}	0,05±0,01 ^{aA}	0,37±0,03 ^{bB}
BB2	4,81±0,02 ^{bD}	0,45±0,05 ^{bC}	0,06±0,01 ^{aA}	0,34±0,04 ^{bB}
BB3	5,69±0,38 ^{dC}	0,96±0,01 ^{fB}	0,27±0,02 ^{dA}	0,36±0,03 ^{bA}
BB4	6,47±0,16 ^{eD}	1,31±0,04 ^{gC}	0,32±0,01 ^{eA}	0,69±0,01 ^{dB}
BB5	6,53±0,09 ^{eC}	0,74±0,05 ^{eB}	0,11±0,02 ^{bA}	0,65±0,02 ^{dB}

Sonuçlar mg GAE/g kuru madde olarak verilmiştir.

^{a-g} Aynı sütundaki farklı küçük harfler örneklerin aynı sindirim fraksiyonundaki farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).

^{A-D} Aynı satırdaki farklı büyük harfler bir örneğin farklı sindirim fraksiyonları arasındaki (sindirim öncesi, PG, IN, OUT) farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).

Elde edilen fenolik madde verileri kullanılarak her örnek için biyoerişilebilirlik indeksi (%) ve geri kazanım (%) hesaplanmıştır (Tablo 18). En yüksek biyoerişilebilirlik indeksi ağustos arı ekmeğine ait olup geri kazanım da aynı şekilde bu örnek için en yüksek

bulunmuştur. Ağustos arı ekmeğinin geri kazanımı ile temmuz arı ekmeğinin sindirim sistemindeki geri kazanımı istatistiksel olarak benzerdir ($p>0,05$). Çalışılan polenlerin biyoerişilebilirlik indeksleri %4,03 ile %9,06 arasında değişirken bu değer arı ekmekleri için bu değer %8,62 ile %15,60 aralığındadır. Geri kazanım ise polen ekstraktları için %0,79-2,15 arı ekmeği ekstraktları için ise %1,26-5 bulunmuştur. *In vitro* sindirim sonucunda elde edilen biyoerişilebilirlik indeksi ve geri kazanım verileri doğrultusunda arı ekmeği fenolik madde sindirilebilirliği bakımından polenden daha üstündür.

Tablo 18. Polen ve arı ekmeği ekstraktlarına ait fenolik madde biyoerişilebilirlik indeksi ve geri kazanım verileri

	Biyoerişilebilirlik indeksi (%)	Geri kazanım (%)
P1	4,03±0,48 ^a	0,79±0,03 ^a
P2	6,74±0,74 ^b	0,85±0,06 ^a
P3	8,15±0,10 ^c	2,15±0,13 ^c
P4	9,06±0,37 ^c	1,49±0,17 ^b
BB1	11,14±1,17 ^d	1,26±0,04 ^{ab}
BB2	8,62±0,95 ^c	1,58±0,25 ^{bc}
BB3	11,11±0,55 ^d	4,72±0,36 ^d
BB4	15,60±0,28 ^e	5,00±0,16 ^d
BB5	11,67±0,15 ^d	1,70±0,22 ^{bc}

^{a-e} Aynı sütunda yer alan farklı harfler örnekler arasındaki anlamlı farklılığı simgelemektedir ($p<0,05$).

3.6.2. Polen ve Arı Ekmeğine Ait Sindirim Fraksiyonlarının Demir İndirgeme Antioksidan Gücü (FRAP)

Örnek ekstraktlarının ve bu ekstraktların *in vitro* sindirime uğratılmasıyla her bir örnek için elde edilen sindirim fraksiyonlarının (PG, IN, OUT) FRAP metodu ile tespit edilen antioksidan aktivite verileri Tablo 19’da verilmiştir. *In vitro* sindirim uygulamasının tüm örneklerin demir indirgeme antioksidan gücü (FRAP) üzerine etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ($p<0,05$) olup *in vitro* sindirim sonucunda örneklerin FRAP değerlerinde belirgin azalmalar tespit edilmiştir. Polen örnekleri için PG fazda azalmalar %86,90 ile %88,98 arasında, arı ekmekleri için ise %78,22 ile %86,96 arasında değişiklik

göstermektedir. Bu fazda düşük azalma %78,22 ile temmuz arı ekmeğine aittir. Haziran poleni için seruma geçen fraksiyon (IN) ve bağırsak sindirimi sonrasında kalan fraksiyon (OUT) için tespit edilen FRAP değerleri arasında fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). Aynı durum mayıs ve temmuz arı ekmekleri için de geçerli olup bu üç örnek için seruma geçen fraksiyon ile bağırsak sindirimi sonrasında kalan fraksiyon için FRAP değerleri benzer bulunmuştur.

Tablo 19. Sindirim fraksiyonlarının FRAP metodu ile tespit edilen antioksidan aktivite verileri

	Sindirim öncesi	PG	IN	OUT
P1	27,40±0,51 ^{dD}	3,02±0,09 ^{dC}	1,08±0,04 ^{cA}	2,02±0,02 ^{bB}
P2	13,86±1,52 ^{bB}	1,64±0,04 ^{aA}	0,89±0,02 ^{bA}	1,07±0,04 ^{aA}
P3	28,17±1,13 ^{fC}	3,14±0,05 ^{eB}	1,44±0,04 ^{efA}	2,99±0,02 ^{eB}
P4	19,85±0,21 ^{dD}	2,60±0,02 ^{cC}	1,22±0,01 ^{dA}	2,34±0,03 ^{dB}
BB1	9,21±0,49 ^{aC}	1,91±0,01 ^{bB}	0,71±0,03 ^{aA}	1,13±0,01 ^{aA}
BB2	12,65±0,14 ^{bC}	1,65±0,06 ^{aB}	0,92±0,09 ^{bA}	1,50±0,04 ^{bB}
BB3	16,94±1,15 ^{cC}	3,69±0,03 ^{fB}	1,39±0,08 ^{eA}	2,19±0,05 ^{cA}
BB4	19,33±1,87 ^{dC}	3,78±0,04 ^{gB}	1,57±0,18 ^{fA}	2,96±0,03 ^{eAB}
BB5	24,46±1,18 ^{eC}	3,75±0,04 ^{fgB}	1,41±0,03 ^{eA}	3,64±0,05 ^{fB}

Sonuçlar $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ kuru madde olarak verilmiştir.

^{a-g} Aynı sütundaki farklı küçük harfler polen ve arı ekmeği örneklerinin aynı sindirim fraksiyonundaki farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).

^{A-D} Aynı satırdaki farklı büyük harfler bir örneğin farklı sindirim fraksiyonları arasındaki (sindirim öncesi, PG, IN, OUT) farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).

Arı ekmeği örneklerinin FRAP biyoerişilebilirlik indeksleri %19,14 ile %23,33 aralığında değişim gösterirken polenler için tespit edilen biyoerişilebilirlik indeks değerlerinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Tablo 20). Benzer şekilde geri kazanım verileri bakımından da ekim arı ekmeği dışındaki tüm arı ekmeklerinin polen örneklerinden üstün olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 20. Polen ve arı ekmeği ekstraktları için FRAP biyoerişilebilirlik indeksleri ve geri kazanım verileri

	Biyoeerişilebilirlik indeksi (%)	Geri kazanım (%)
P1	11,31±0,21 ^a	3,94±0,16 ^a
P2	14,17±0,38 ^b	6,42±0,18 ^c
P3	15,73±0,08 ^c	5,12±0,16 ^b
P4	17,92±0,15 ^d	6,13±0,06 ^c
BB1	19,96±0,36 ^f	7,71±0,34 ^{de}
BB2	19,14±0,60 ^e	7,27±0,70 ^d
BB3	21,17±0,74 ^g	8,23±0,44 ^e
BB4	23,44±0,79 ^h	8,11±0,94 ^e
BB5	20,64±0,22 ^{fg}	5,78±0,11 ^{bc}

^{a-h} Aynı sütunda yer alan farklı harfler örnekler arasındaki anlamlı farklılığı simgelemektedir (p<0,05).

3.6.3. Polen ve Arı Ekmeğine Ait Sindirim Fraksiyonlarının DPPH Radikali Süpürme Aktivitesi

Örnek ekstraktlarının ve bu ekstraktların *in vitro* sindirime uğratılmasıyla her bir örnek için elde edilen sindirim fraksiyonlarının (PG, IN, OUT) DPPH metodu ile tespit edilen antioksidan aktivite verileri Tablo 21’de verilmiştir.

Polen ve arı ekmeği örneklerinin *in vitro* sindirime uğratılması ile elde edilen fraksiyonların DPPH aktivitelerinde belirgin azalmalar tespit edilmiştir. IN fazını sırasıyla OUT ve PG fazları takip etmektedir. Polen örneklerinin IN fraksiyonlarına ait SC₅₀ değerlerine bakıldığında sindirim öncesi SC₅₀ değerlerine göre P1, P2, P3 ve P4 için sırasıyla 25,2; 7,9; 18,9 ve 23,7 kat artış tespit edilmiş olup tüm örnekler için DPPH aktivitesindeki azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,05). BB1, BB2, BB3, BB4 ve BB5 örnekleri için SC₅₀ değerlerindeki artış 5,9; 4,6; 3,5; 9,9 ve 12,1 kat olarak belirlenmiş olup P2 hariç antioksidan aktivitedeki azalmalar arı ekmeklerinde polenlere kıyasla daha düşüktür.

P1, P2, P3 ve P4 için OUT fazlarında belirlenen SC₅₀ değerleri sindirim öncesi SC₅₀ değerlerine göre 23,9; 6,9; 15,2 ve 21,1 kat yüksektir. Arı ekmeklerinde bu artış BB1, BB2, BB3, BB4 ve BB5 için 5,7; 4,1; 9,6; 9,5 ve 11,7 kat olarak bulunmuştur.

IN ve OUT fraksiyonlarındaki antioksidan aktivite değişimleri göz önünde bulundurulduğunda P2 poleni hariç arı ekmeklerinin DPPH aktivitesi polen örneklerinden daha üstün bulunmuştur.

Tablo 21. Sindirim fraksiyonlarının DPPH metodu ile tespit edilen antioksidan aktivite verileri

	Sindirim öncesi	PG	IN	OUT
P1	5,47±0,18 ^{abA}	54,36±0,32 ^{fb}	137,90±4,26 ^{ghD}	130,65±0,48 ^{hC}
P2	18,03±0,09 ^{cA}	54,99±0,39 ^{fgB}	141,76±2,94 ^{hD}	124,77±1,87 ^{fc}
P3	5,16±0,01 ^{aA}	39,82±0,74 ^{dB}	97,63±2,20 ^{eD}	78,61±0,93 ^{dC}
P4	5,68±0,06 ^{bA}	44,05±0,96 ^{eB}	134,47±2,87 ^{fgD}	120,05±2,15 ^{eC}
BB1	22,46±0,15 ^{cA}	42,35±0,39 ^{eB}	132,84±3,36 ^{fd}	127,33±0,80 ^{gC}
BB2	18,38±0,03 ^{dA}	56,50±2,90 ^{gB}	85,62±2,80 ^{dD}	75,72±1,45 ^{cC}
BB3	18,26±0,18 ^{cdA}	25,88±0,61 ^{bB}	63,38±0,23 ^{bD}	53,89±0,41 ^{aC}
BB4	5,64±0,12 ^{bA}	13,98±0,46 ^{aB}	55,80±0,40 ^{aD}	53,44±0,75 ^{aC}
BB5	5,75±0,45 ^{bA}	29,85±0,49 ^{cB}	69,39±1,29 ^{cD}	67,16±1,29 ^{bC}

SC₅₀ değerleri mg kuru madde/mL olarak verilmiştir.

^{a-h} Aynı sütundaki farklı küçük harfler polen ve arı ekmeği örneklerinin aynı sindirim fraksiyonundaki farklılıkları göstermektedir (p<0,05).

^{A-D} Aynı satırdaki farklı büyük harfler bir örneğin farklı sindirim fraksiyonları arasındaki (sindirim öncesi, PG, IN, OUT) farklılıkları göstermektedir (p<0,05).

3.6.4. Polen ve Arı Ekmeğine Ait Sindirim Fraksiyonlarının Suda Çözünür Protein İçerikleri

Örnek ekstraktlarının ve bu ekstraktların *in vitro* sindirime uğratılmasıyla her bir örnek için elde edilen sindirim fraksiyonlarının (PG, IN, OUT) Bradford metodu ile tespit edilen suda çözünür protein içerikleri Tablo 22’de verilmiştir.

Tablo 22. Sindirim fraksiyonlarının suda çözünür protein içeriği

	Sindirim öncesi	PG	IN	OUT
P1	94,90±1,10 ^{dB}	107,34±4,03 ^{dC}	10,19±0,38 ^{aA}	124,42±1,45 ^{aD}
P2	88,42±0,70 ^{cB}	101,87±0,33 ^{cC}	13,20±0,90 ^{bA}	122,27±2,43 ^{aD}
P3	79,51±0,65 ^{bB}	84,12±0,77 ^{aC}	16,72±0,08 ^{cA}	185,28±4,34 ^{dD}
P4	78,38±0,48 ^{bB}	86,21±0,72 ^{aC}	19,89±0,17 ^{dA}	199,64±2,42 ^{dD}
BB1	76,28±1,63 ^{aB}	98,92±3,10 ^{bcC}	20,63±0,56 ^{dA}	150,66±2,65 ^{bD}
BB2	79,77±0,80 ^{bB}	87,69±1,82 ^{aC}	25,80±0,14 ^{fA}	150,36±3,65 ^{bD}
BB3	78,73±0,92 ^{bB}	99,10±1,51 ^{bcC}	25,80±0,97 ^{fA}	180,98±2,56 ^{dD}
BB4	78,81±0,47 ^{bB}	95,56±1,33 ^{bcC}	24,95±0,43 ^{efA}	193,80±1,72 ^{eD}
BB5	78,67±0,42 ^{bB}	99,51±1,57 ^{cC}	24,17±0,45 ^{eA}	162,82±0,91 ^{cD}

Sonuçlar mg/g kuru madde olarak verilmiştir.

^{a-f} Aynı sütundaki farklı küçük harfler polen ve arı ekmeği örneklerinin aynı sindirim fraksiyonundaki farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).

^{A-D} Aynı satırdaki farklı büyük harfler bir örneğin farklı sindirim fraksiyonları arasındaki (sindirim öncesi, PG, IN, OUT) farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).

Tüm örneklerin PG ve OUT fraksiyonlarının suda çözünür protein içeriklerinde sindirim öncesine kıyasla artış tespit edilmiş olup OUT fazlarında bu artış PG fazlarından daha yüksektir. Pasif difüzyon ile seruma geçen kısmı temsil eden IN fraksiyonlarında belirlenen suda çözünür protein içerikleri örneklerin sindirim öncesi suda çözünür protein içerikleri ile kıyaslandığında geri kazanım P1, P2, P3, P4 için %10; %15, %21, %25'tir. Arı ekmeğinde geri kazanım BB1, BB2, BB3, BB4, BB5 için %27, %32, %33, %32 ve %30'dur. Tüm örnekler için suda çözünür protein sindirilebilirlikleri bakımından arı ekmeği örnekleri polen örneklerinden üstün bulunmuştur.

3.7. Polen ve Arı Ekmeklerinin Fenolik Madde Profili

Polen ve arı ekmeği örneklerinde 25 adet fenolik standardı ile çalışılmış, sulu ekstraktların en az birinde tespit edilen fenoliklerin miktarları Tablo 23'te verilmiştir. Tüm polen örneklerinde *p*-kumarik asit, tüm arı ekmeklerinde ise protokatekuik asit belirlenmiştir. Mayıs ve Haziran poleninde protokatekuik asit tespiti yapılamamıştır. Arı ekmeği örnekleri 19,85 ile 56,99 µg/g kuru madde aralığında *p*-kumarik asit içermekte olup sadece Haziran arı ekmeğinde *p*-kumarik asit gözlelenebilir limitinin altındadır. Polen

örneklerinin tamamında *t*-sinnamik asit tespiti yapılmamış yalnızca Ağustos ve Ekim arı ekmeğinde sırasıyla 6,22 µg/g kuru madde ve 7,56 µg/g kuru madde *t*-sinnamik asit belirlenmiştir.

Tablo 23. Polen ve arı ekmeği örneklerinin fenolik madde profili

Standart madde	P1	P2	P3	P4	BB1	BB2	BB3	BB4	BB5
Gallik asit	<LOD	27,11	8,44	5,39	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	9,73
Protokatekuik asit	<LOD	<LOD	26,07	3,99	37,92	32,59	16,56	11,57	7,56
<i>p</i> -OH benzoik asit	112,48	<LOD	<LOD	76,87	<LOD	166,22	33,32	31,96	27,84
Epikateşin	31,36	18,52	<LOD	60,25	<LOD	66,20	92,72	59,45	<LOD
Şiringik asit	<LOD	25,94	<LOD	<LOD	<LOD	52,04	<LOD	<LOD	<LOD
Rutin	<LOD	<LOD	28,60	22,33	73,34	<LOD	46,74	94,02	96,41
Ellagik asit	32,98	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<i>p</i> -kumarik asit	10,44	12,36	80,00	13,00	19,85	<LOD	32,18	56,99	27,60
<i>t</i> -sinnamik asit	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	6,22	7,56

Sonuçlar µg/g kuru madde olarak verilmiştir. <LOD: Standart gözlenebilme limitinin altındadır.

3.8. Polen ve Arı Ekmeği Mikrobiyolojisi

3.8.1. Polen ve Arı Ekmeğinin Mikrobiyal Yüğü

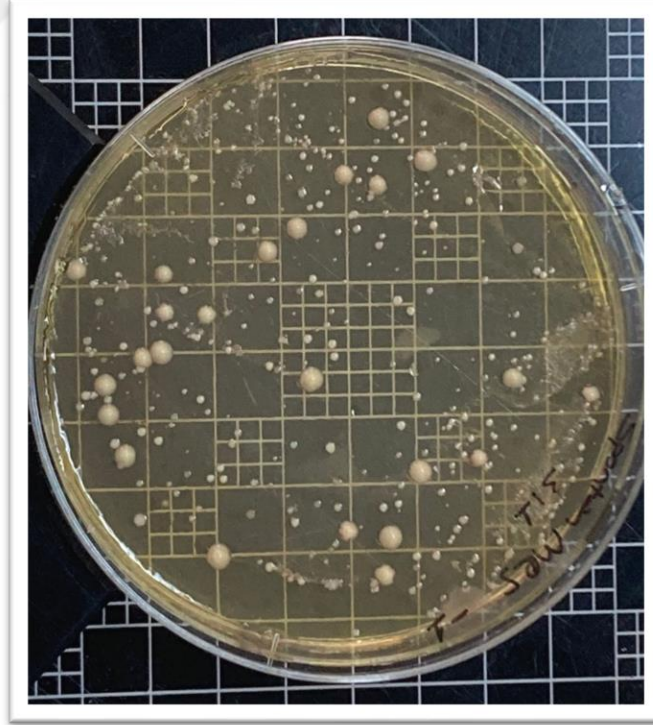
Kovandan alınan polen ve arı ekmeği örneklerinde laktik asit bakterisi, toplam mezofilik aerobik bakteri, maya-küf, koliform ve fekal koliform bakteri sayımları gerçekleştirilmiştir. Örneklerin mikrobiyolojik analiz sonuçları Tablo 24 ve Tablo 25'te verilmiştir. P1 ve P3 örnekleri için sadece MRS Agar ortamında gelişim görülmüş olup P2 ve P4 örneklerinde çalışılan her üç besiyeri için de gelişim tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında MRS Agar besiyerinde maya-küf gelişimini baskılamak için sikloheksimit kullanılmamış olup literatürde genel LAB besiyeri olarak kabul edildiğinden çalışılan besiyerlerine dahil edilmiştir. Nitekim yapılan ekimlerde de MRS ortamında örneğe göre değişmekle birlikte LAB gelişimine ek olarak tipik maya kolonileri görülmüş ve bu kolonilerin identifikasyonu MALDI-TOF MS ile gerçekleştirilerek sonuçlar bölüm 3.8.2'de verilmiştir. Aynı hasat periyodunda kovandan alınan polen-arı ekmeği ikili grupları incelendiğinde mayıs poleni ve mayıs arı ekmeğinde LAB tespiti yapılmamıştır. Haziran poleninde LAB gelişimi görülmüş olup haziran poleni ile arı ekmeğinin titrasyon asitliği değerleri incelendiğinde bu hasat periyodunda polenin titrasyon asitliğinin arı ekmeğinden daha yüksek olduğu görülmektedir. FMRS ve FYP Agar ortamında haziran poleninde sırasıyla 3,68 ve 3,62 log kob/g düzeyinde LAB tespit edilmiştir. Ancak haziran arı ekmeğinde LAB sayımı alınmamıştır. Haziran poleninin yüksek titrasyon asitliğinin LAB faaliyeti sonucu asitliğin gelişmesine bağlı olduğu söylenebilir. Haziran-ekim ayları arasında hasat edilen örneklerde her üç besiyerinde elde edilen sonuçlara bakıldığında en yüksek LAB sayısına polen örneklerinde ağustos poleni arı ekmeğinde ise temmuz ve ağustos arı ekmeği sahiptir. Haziran arı ekmeği hariç tüm örneklerde MRS Agar ortamında gelişim tespit edilmiş ancak mayıs poleni, temmuz poleni ve mayıs arı ekmeğinde FMRS ve FYP Agarda gelişim görülmemiştir. Bu tez çalışmasında MRS Agar besiyerinde polen ve arı ekmeği örneklerinin ekimi yapıldığında inkübasyon süresinin sonunda laktik asit bakterisi ve/veya tipik maya kolonisi varlığı tespit edilmiştir. Buna yönelik bir görsel Şekil 21'de verilmiş olup besiyerinde düzgün veya buruşuk kenarlı, küresel formda, açık krem renkli, tipik maya kokulu koloni varlığı söz konusudur. Bu nedenle temel olarak LAB izolasyonu ve identifikasyonu amaçlansa da MRS Agar ortamında gelişen tipik maya kolonilerinin de MALDI-TOF MS ile tür teşhisi yapılmıştır.

Tablo 24. Polen ve arı ekmeği örneklerinde laktik asit bakterisi sayım sonuçları

Örnekler	MRS	FMRS	FYP
P1	2,04±0,01 ^a	<1	<1
P2	3,70±0,06 ^c	3,68±0,01 ^b	3,62±0,01 ^b
P3	5,78±0,02 ^g	<1	<1
P4	5,90±0,02 ^h	5,84±0,02 ^e	5,58±0,01 ^e
BB1	5,68±0,02 ^f	<1	<1
BB2	<1	<1	<1
BB3	4,20±0,05 ^e	3,73±0,01 ^c	3,76±0,03 ^c
BB4	4,02±0,01 ^d	3,92±0,02 ^d	3,95±0,01 ^d
BB5	3,60±0,01 ^b	2,42±0,03 ^a	2,48±0,04 ^a

Sonuçlar log kob/g olarak verilmiştir.

^{a-h} Aynı sütunda yer alan farklı harfler örnekler arasındaki anlamlı farklılığı simgelemektedir (p<0,05).



Şekil 21. MRS Agar besiyerinde görülen bakteri ve maya kolonileri

Tablo 25. Polen ve arı ekmeği örneklerinde toplam mezofilik aerobik bakteri, maya-küf, koliform ve fekal koliform sayımları

Örnekler	TMAB	Maya-küf	Koliform	Fekal koliform
P1	3,30±0,06 ^a	2,00±0,20 ^a	<1	<1
P2	3,95±0,01 ^b	4,57±0,03 ^d	<1	<1
P3	7,00±0,05 ^h	3,60±0,02 ^c	<1	<1
P4	5,95±0,02 ^e	4,84±0,03 ^{fg}	<1	<1
BB1	6,49±0,02 ^g	5,04±0,02 ^h	<1	<1
BB2	6,34±0,01 ^f	4,90±0,01 ^g	<1	<1
BB3	4,29±0,02 ^c	4,64±0,02 ^{de}	<1	<1
BB4	5,00±0,10 ^d	4,75±0,05 ^{ef}	<1	<1
BB5	3,20±0,03 ^a	3,23±0,04 ^b	<1	<1

Sonuçlar log kob/g olarak verilmiştir.

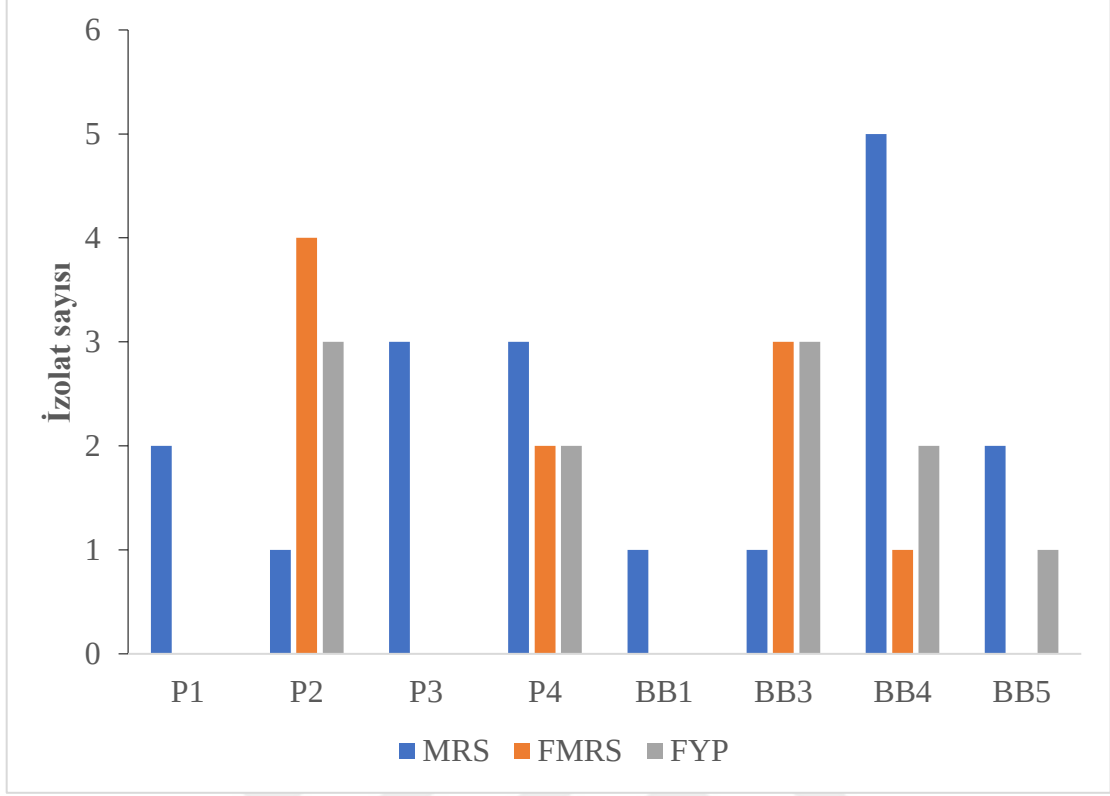
^{a-h} Aynı sütunda yer alan farklı harfler örnekler arasındaki anlamlı farklılığı simgelemektedir (p<0,05).

3.8.2. Polen ve Arı Ekmeğinde Mikrobiyal Flora

Bu tez çalışması kapsamında hasat edilen 9 adet polen ve arı ekmeğinden LAB izolasyonunu gerçekleştirmek için 3 ayrı besiyeri ile çalışılmış olup izolatların besiyerlerine göre dağılımı Şekil 22’de verilmiştir.

Polen örneklerinden 20 arı ekmeğinden ise 18 adet mikroorganizmanın MALDI TOF MS ile identifikasyonu yapılmıştır (Tablo 26, Tablo 27).

FMRS ve FYP Agarda LAB izolasyonu hedeflenmiş özellikle MRS Agarda ekimler sonucunda tipik maya kolonileri görüldüğünden MRS Agar besiyerinden gözlemlenen maya kolonilerinin de identifikasyonu yapılmıştır.



Şekil 22. MALDI-TOF MS ile tespit edilen izolatların besiyerine göre dağılımları

Tablo 26. Polen numuneleri için bakteri ve maya izolatlarının MALDI Biotyper Real-Time Classification (RTC) programında tespit edilen analiz sonuçları

Örnek	İzole edilen besiyeri	İzolat kodu	Mikroorganizma	Skor değeri
P1	MRS	15	<i>Candida magnoliae</i>	2,11
	MRS	16	<i>Candida magnoliae</i>	2,14
P2	MRS	6	<i>Candida magnoliae</i>	1,91
	FMRS	15	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,87
	FMRS	29	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,74
	FMRS	33	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,80
	FMRS	34	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,79
	FYP	1	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,90
	FYP	2	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,86
	FYP	1a	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,72

Tablo 26'nın devamı

P3	MRS	2	<i>Candida magnoliae</i>	1,75
	MRS	7	<i>Candida magnoliae</i>	1,98
	MRS	13	<i>Candida magnoliae</i>	1,88
P4	MRS	3	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,90
	MRS	5	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,95
	MRS	25	<i>Candida magnoliae</i>	2,10
	FMRS	40	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,70
	FMRS	41	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,92
	FYP	3	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,87
	FYP	4	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,90

Tablo 27. Arı ekmeği numuneleri için bakteri ve maya izolatlarının MALDI Biotyper Real-Time Classification (RTC) programında tespit edilen analiz sonuçları

Örnek	İzole edilen besiyeri	İzolat kodu	Mikroorganizma	Skor değeri
BB1	MRS	1	<i>Candida magnoliae</i>	1,90
BB3	MRS	21	<i>Candida magnoliae</i>	2,20
	FMRS	31	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,96
	FMRS	32	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,83
	FMRS	44	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,84
	FYP	3a	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,71
	FYP	5	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	1,93
BB4	MRS	10	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,93
	MRS	12	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,78
	MRS	18	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,76
	MRS	19	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	2,06
	MRS	20	<i>Candida magnoliae</i>	2,12
	FMRS	43	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,97
	FYP	5a	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,94
	FYP	10	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	1,87

Tablo 27'nin devamı

BB5	MRS	24	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,92
	MRS	28	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	2,19
	FYP	12	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	1,74

Mayıs ve temmuz poleni için FYP Agar ve FMRS Agar besiyerlerinde sayım alınmamış olup MRS Agar ortamında ise maya kolonilerinin geliştiği görülmüştür. Belirtilen tipik maya kolonileri *Candida magnoliae* olarak tespit edilmiştir.

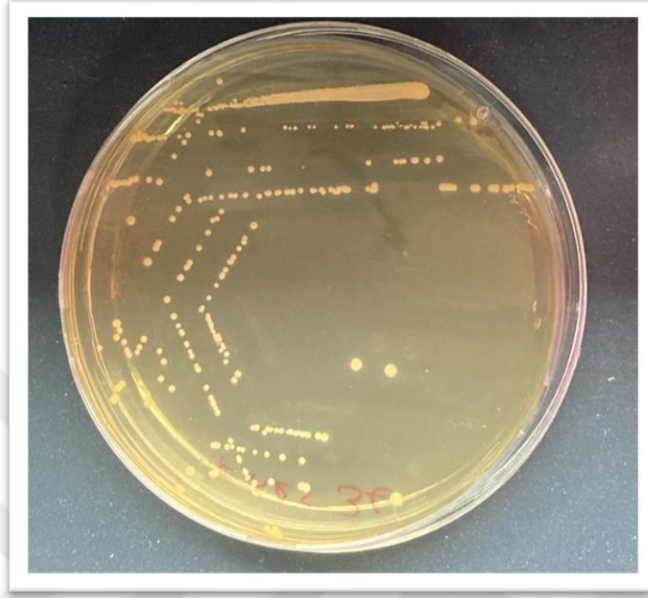
FYP Agar ve FMRS Agar besiyerlerinde LAB tespiti yapılan Haziran ve Ağustos polenlerinde de *C. magnoliae* izolasyonu yapılmıştır.

Polen ve arı ekmeginde mikrobiyal floranın aydınlatılmasına yönelik yapılan en eski çalışmada arı ekmeginde maya sayısının depolamanın ilk haftasında maksimum sayıya ulaştığı belirtilmektedir (Gilliam, 1979). Bu tez çalışmasında kovandan hasat edilen polen ve arı ekmegi örneklerinin tamamında *Candida (Starmerella) magnoliae* tespiti yapılmıştır. *C. magnoliae* ayrıca bal arılarının bal midelerinden ve bağırsaklarından da en sık izole edilen türlerdendir (Detry vd., 2020).

FMRS Agar ve FYP Agar ortamında hem polen hem de arı ekmegi örneklerinden alınan 25 adet izolat *Lactobacillus kunkeei*'dir (Şekil 23). İlk olarak şaraptan izole edilen (Edwards vd., 1998) *L. kunkeei* doğadaki en baskın fruktofilik tür olarak nitelendirilmektedir (Neveling vd., 2012). Arı ürünlerinde FLAB tespitine yönelik yapılan bir araştırmada 12 adet polen örneğinden 10 tanesinin hasat zamanına yönelik net bilgi bulunmadığı ancak 2 aydan fazla süre önce hasat edildiğinin bilindiği belirtilmiştir. Bu 10 örnekte FYP Agar ve FMRS Agar besiyerlerinde LAB sayımı alınmamıştır. Hasat zamanı bilinen ve 5 günlük olduğu belirtilen aynı arılıktan alınan 2 adet polen örneğinin birinde LAB sayımı alınamamış olup diğer 5 günlük polende FYP Agar besiyerinde LAB sayısı log 3,87 kob/g olarak belirlenmiştir. Bu örnekten *L. kunkeei* izole edilmiştir (Takatani ve Endo, 2021).

Polen örneklerinden farklı olarak Temmuz, Ağustos ve Ekim arı ekmeklerinde FYP Agar besiyerinde *Leuconostoc pseudomesenteroides* tespit edilmiştir. Literatürde *Bombus pratorum*, *Apis mellifera*, *Bombus terrestris*, *Bombus lucorum* arılarından MALDI-TOF MS

ile fruktozca zenginleştirilmiş MRS ve %2 glukozca zenginleştirilmiş besiyerleri kullanılarak *Leuconostoc pseudomesenteroides* izolasyonun gerçekleştirildiği bir çalışma mevcuttur (Molina vd., 2022).



Şekil 23. FMRs Agar besiyerinde *Lactobacillus kunkeei* izolatının görüntüsü

3.9. Bulguların korelasyonu ve PCA*

Bu tez çalışmasında analiz edilen polen ve arı ekmeklerine ait bulguların birbirleri ile korelasyonları Tablo 28’de verilmiştir.

Korelasyon tablosunda sadece istatistiksel olarak korelasyon gösteren parametreler verilmiş aralarında anlamlı bir korelasyon bulunmayan parametreler ise gösterilmemiştir.

Toplam fenolik madde içeriği ile FRAP ve DPPH antioksidan aktivite değerleri yüksek korelasyon göstermiştir (TPC-FRAP $r=0,94$, TPC-DPPH $r=-0,90$, FRAP-DPPH $r=-0,88$). Bu yüksek korelasyonlar sindirim fraksiyonları için de söz konusu olup PG fraksiyonlarına ait TPC değerleri ile aynı fraksiyonlara ait FRAP değerleri için korelasyon katsayısı 0,68; DPPH değerleri için ise -0,91’dir.

IN fazlarında TPC ve FRAP metotları için korelasyon katsayısı 0,83’tür. OUT fazları için ise bu katsayı 0,80 olarak bulunmuştur.

Tablo 28. Polen ve arı ekmeği örneklerine ait bulguların korelasyonu

		TPC	FRAP	DPPH	TPC pg	TPC in	TPC out	FRAP pg	FRAP in	FRAP out	DPPH pg
TPC	r		0,94**	-0,90**							
	p		0,00	0,00							
FRAP	r	0,94**		-0,88**						0,74*	
	p	0,00		0,00						0,02	
DPPH	r	-0,90**	-0,88**						-0,71*	-0,80*	
	p	0,00	0,00						0,03	0,01	
TPC pg	r					0,83**		0,68*			-0,91**
	p					0,01		0,04			0,00
TPC in	r				0,83**			0,76*	0,83**		-0,88**
	p				0,01			0,02	0,01		0,00
TPC out	r								0,72*	0,80**	-0,73*
	p								0,03	0,01	0,03
FRAP pg	r				0,68*	0,76*			0,90**	0,86**	-0,81**
	p				0,04	0,02			0,00	0,00	0,01
FRAP in	r			-0,71*		0,83**	0,72*	0,90**		0,89**	-0,77*
	p			0,03		0,00	0,03	0,00		0,00	0,02
FRAP out	r		0,74*	-0,80*			0,80**	0,86**	0,89**		
	p		0,02	0,01			0,01	0,00	0,00		
DPPH pg	r				-0,91**	-0,88**	-0,73*	-0,81**	-0,77*		
	p				0,00	0,00	0,03	0,01	0,02		

Tablo 28'in devamı

		DPPH in	DPPH out	Protein in	LAB FMRS	LAB FYP
DPPH in	r		0,99**	-0,79*		
	p		0,00	0,01		
DPPH out	r	0,99**		-0,77*		
	p	0,00		0,02		
Protein in	r	-0,79*	-0,77*			
	p	0,01	0,02			
LAB (FMRS)	r					1,00**
	p					0,00
LAB (FYP)	r				1,00**	
	p				0,00	

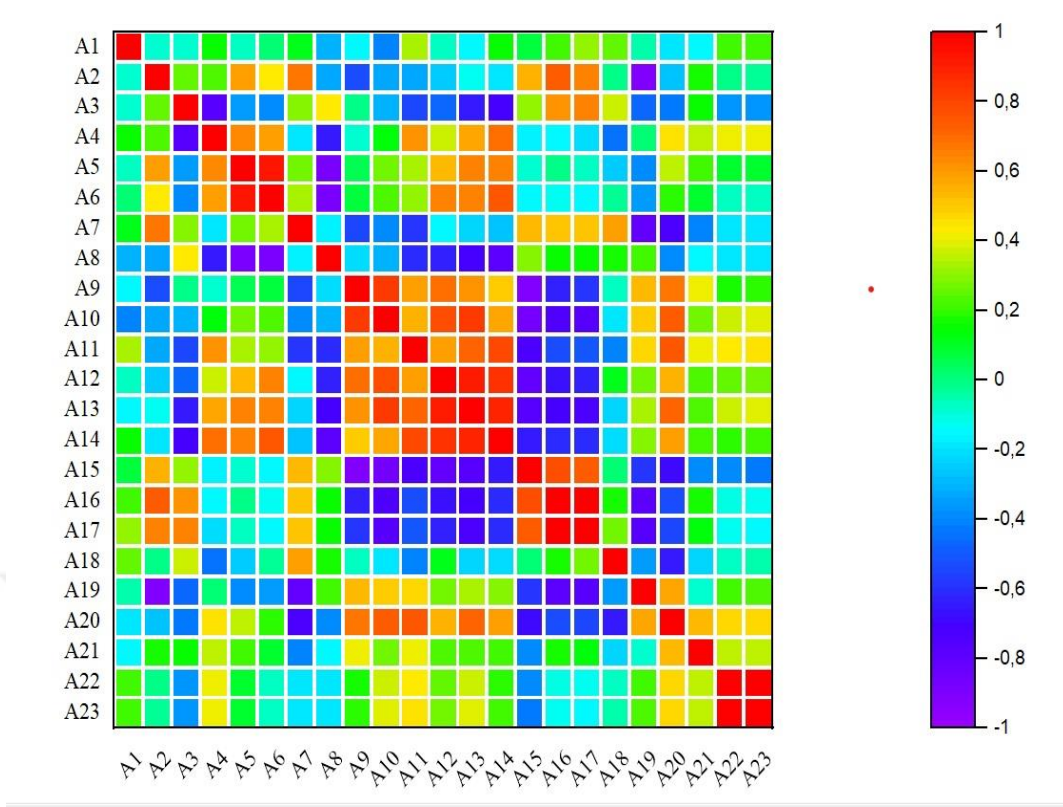
r: Pearson korelasyon katsayısı; p: Anlamlılık

*:Korelasyon 0,05 düzeyinde anlamlıdır.

** : Korelasyon 0,01 düzeyinde anlamlıdır.

Bulguların korelasyonuna dair bir görsel de Şekil 24'te verilmiştir.

Isı haritasında 23 ayrı parametre (A1: Nem, A2: Kül, A3: pH, A4: Titrasyon asitliği, A5: TPC, A6: FRAP, A7: Protein, A8: DPPH, A9: TPC (PG), A10: TPC (IN), A11: TPC (OUT), A12: FRAP (PG), A13: FRAP (IN), A14: FRAP (OUT), A15: DPPH (PG), A16: DPPH (IN), A17: DPPH (OUT), A18: Protein (PG), A19: Protein (IN), A20: Protein (OUT), A21: LAB (MRS), A22: LAB (FMRS), A23: LAB (FYP)) arasındaki korelasyon katsayıları 0,2 birimlik aralıklar halinde ve farklı renkler ile gösterilmiştir.

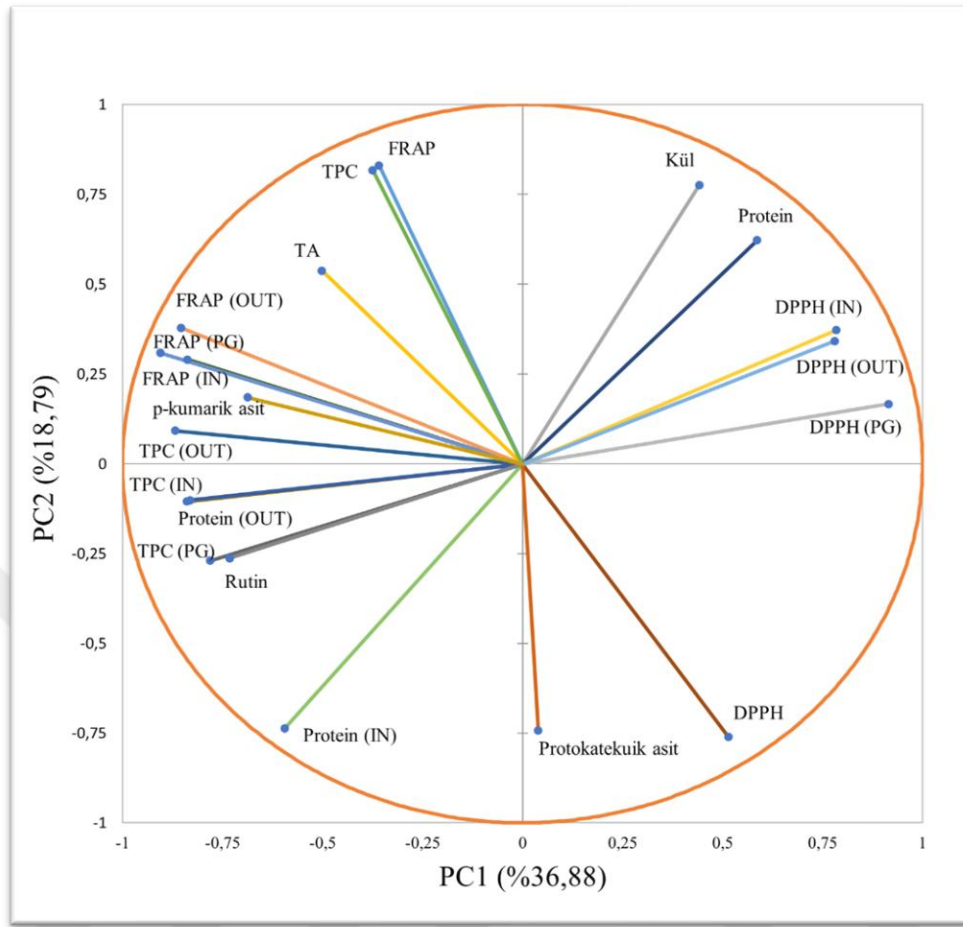


Şekil 24. Polen ve arı ekmeğine ait bulguların korelasyonunu gösteren ısı haritası

Polen ve arı ekmeği örnekleri için parametreler indirgenerek numunelerin temel bileşen analizi (PCA*) gerçekleştirilmiştir (Şekil 25 ve Şekil 26).

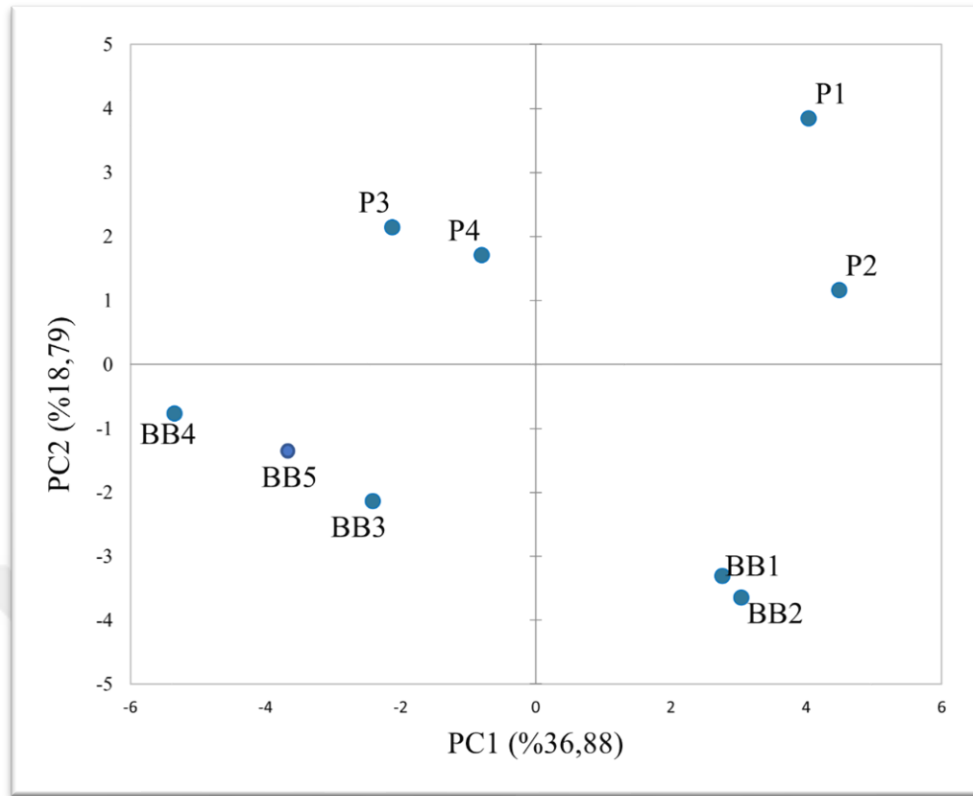
Temel bileşen analizinde Faktör 1 (PC1) varyansın %36,88'ini Faktör 2 (PC2) ise %18,79'unu kapsamaktadır. PC1 ve PC2 ile oluşturulan biplot diyagramında faktör analizinde esas alınan parametreler arası ilişkiler iki boyutlu uzayda konumlandırılmıştır.

Faktör 1 PG, IN ve OUT sindirim fraksiyonlarının toplam fenolik madde içeriği, FRAP ve DPPH değerleri, OUT fazına ait protein içerikleri, rutin, *p*-kumarik asit ile ilişkili iken faktör 2 ise kül, titrasyon asitliği, toplam fenolik madde, FRAP, protein, DPPH, protokatekuik asit ve IN fraksiyonlarına ait protein içeriği ile ilişkilidir.



Şekil 25. Temel bileşen matrisi

BB1-BB2 örneklerinin aynı alanda kümelenerek diğer örneklerden PC2 ile ilişkili olarak ayrıldığı görülmüştür. BB3, BB4 ve BB5 ise PC1 ile ayrılmış olup bu ayrım rutin, IN ve PG fazlarındaki fenolik madde içeriği ile sağlanmıştır. P1 ve P2 her iki temel bileşenin pozitif bölgesinde konumlanmıştır. BB1 ve BB2'nin diğer örneklerden farklılaşmasında etkili olan veriler protokatekuik asit ve DPPH aktivitesidir. Sindirim fraksiyonlarına ait DPPH, kül ve protein verileri ile *p*-kumarik asit, FRAP ve titrasyon asitliği verileri P1-P2 ile P3-P4 örneklerinin ayrılmasında etkili olmuştur.



Şekil 26. Temel bileşen analizi

3.10. Polen Fermantasyonu ile Arı Ekmeği Üretimine Yönelik Kimyasal ve Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

Tez çalışması kapsamında farklı oranlarda hazırlanan polen, su, bal karışımları spontan fermantasyon, kovan içerisinde fermantasyon ve laktik asit bakterilerinin inokülasyonu ile fermantasyon olmak üzere 3 farklı yöntemle fermantasyona tabi tutulmuştur.

Üretimlerde polen farklılığının son ürün özelliklerine etkisini önlemek amacıyla bu tez çalışması kapsamında hasat edilen polen örnekleri pasajlanmış ve homojen bir örnek haline getirilmiştir.

Pasaj polenine (PP) yönelik nem, pH, asitlik, toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir (Tablo 29).

Tablo 29. Pasaj polenine ait kimyasal analiz verileri

	%Nem	pH	Titrasyon asitliği (%laktik asit)	TPC (mg GAE/g kuru madde)	FRAP (μ mol FeSO ₄ .7H ₂ O/g kuru madde)	DPPH SC ₅₀ (mg kuru ekstrakt/mL)
PP	10,95±0,07	4,10±0,01	3,71±0,02	7,17±0,32	15,64±0,64	6,67±0,12

Arı ekmeği formülasyonlarında kullanılan süzme çiçek balının Abbe refraktometresi ile kırılma indisi 1,493 olarak belirlenmiştir. Okunan kırılma indislerinden %nem düzeyinin hesaplanması için standart çizelge kullanılmıştır. Tez çalışması kapsamında hazırlanan polen, su, bal formülasyonlarının kuru madde içeriğinin hesaplanmasında süzme çiçek balının nem içeriği %17,4 olarak bulunmuştur. Örneğin 1:1 polen:su oranına sahip %11 bal içeren fermantasyon karışımı hazırlanırken 48 g polen (%10,95 nem), 48 mL su ve 11,86 g bal (%17,4 nem) kullanılmış olup bu durumda bu karışımın nem içeriği eşitlik 3.10.1 kullanılarak hesaplanmış ve %51,29 olarak bulunmuştur. Tüm fermantasyon karışımlarının nem içeriği belirtilen şekilde hesaplanmış ve 1:2, 2:1, 3:1 ve 4:1 polen:su oranları için karışımların nem içeriği sırasıyla %64,50; %38,08; %31,47 ve %27,51 olarak tespit edilmiştir (Tablo 30). Üretilen arı ekmeklerinin kimyasal analiz sonuçlarının kuru madde üzerinden verilmesi adına kütle denkliği kullanılarak fermantasyon karışımlarının nem içeriği ilgili hesaplamalarda kullanılmıştır.

$$48 \times 10,95 + 48 \times 100 + 11,86 \times 17,4 = (48 + 48 + 11,86) \times Nem \quad (3.10.1)$$

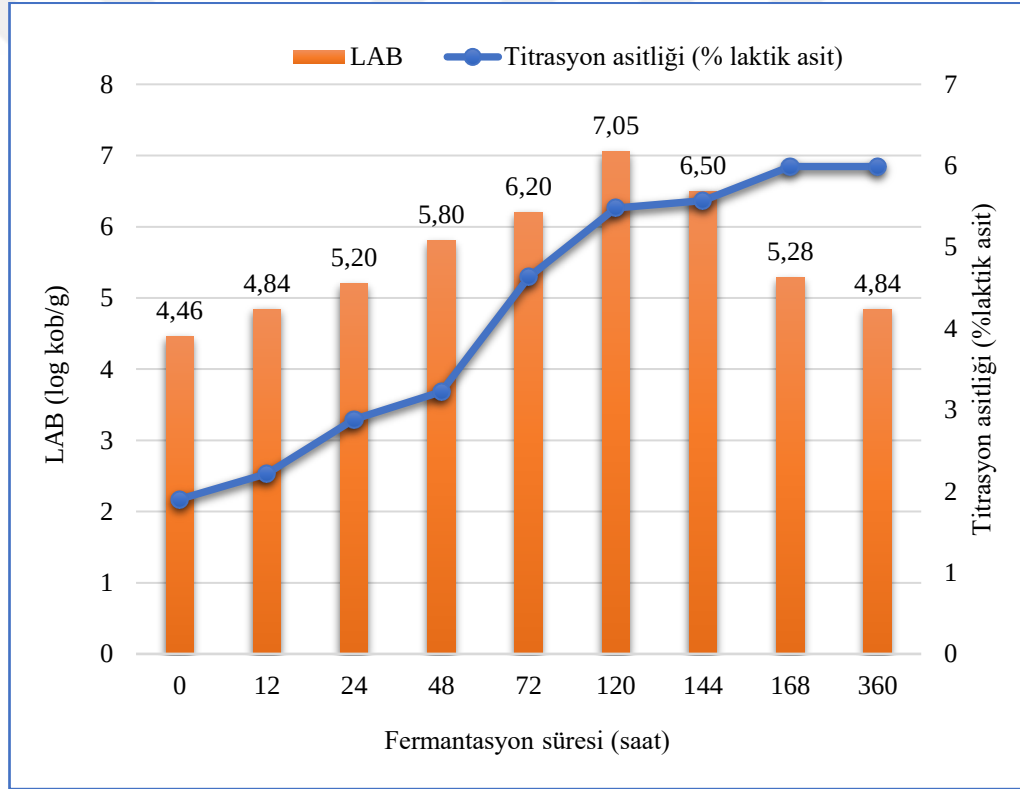
Tablo 30. Polen, su, bal karışımlarının %nem içerikleri

Polen:su oranı	%Nem
1:1	%51,29
1:2	%64,50
2:1	%38,08
3:1	%31,47
4:1	%27,51

3.10.1. Spontan Fermantasyon ile Arı Ekmeği Üretimi

3.10.1.1. Spontan Fermantasyonda Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

Fermantasyonun başlangıcında yöntem 2.14’te belirtilen şekilde hazırlanan polen, su, bal karışımları 30 °C’de fermantasyona tabi tutulmuş ve bu sıcaklıkta karışımların 12-24 saatlik periyotlarda pH-titrasyon asitliği takipleri yapılmıştır. 1:1 polen:su oranına sahip karışımın fermantasyon periyodu boyunca FYP Agar ortamında tespit edilen LAB yükünü ve titrasyon asitliği değerlerini gösteren grafik Şekil 27’de verilmiştir.

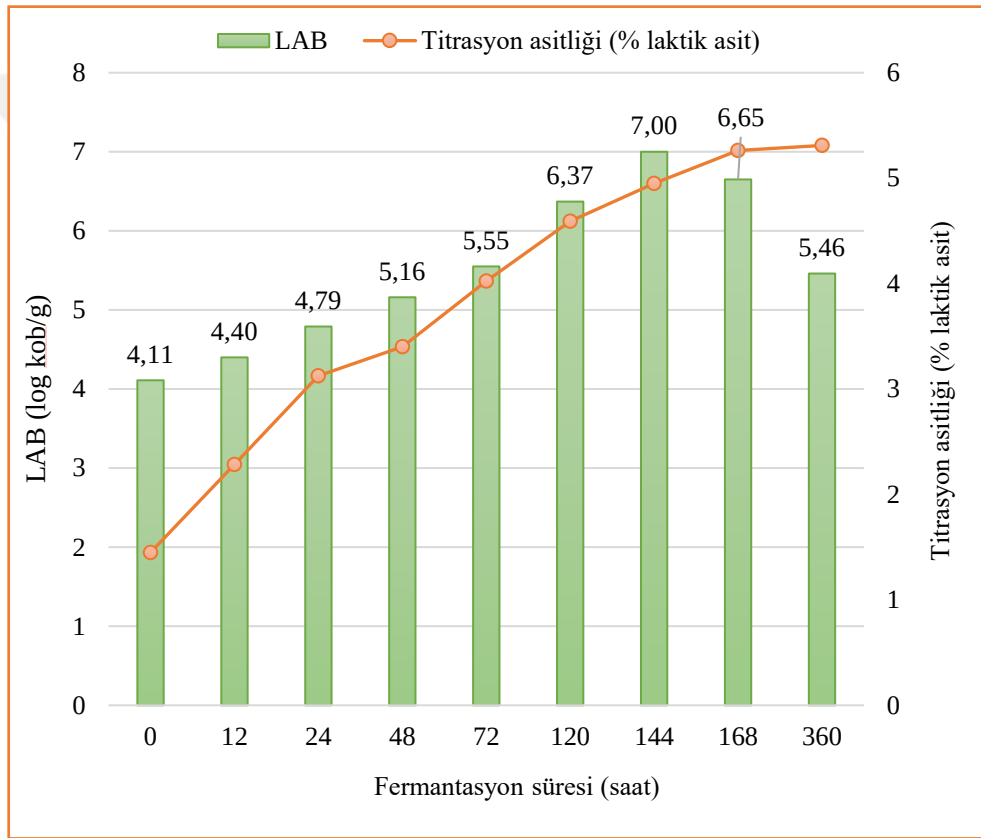


Şekil 27. Spontan fermantasyonda 1:1 polen:su içeriğine sahip polen, su, bal karışımının LAB yükü ve titrasyon asitliği değişimi

1:1 polen:su oranına sahip karışımın spontan fermantasyona tabi tutulmasıyla başlangıçta log 4,46 olan LAB yükü 120 saat inkübasyon periyodunun sonunda log 7,05’e ulaşmıştır. Fermantasyonun 6. ve 7. günlerinde LAB yükü sırasıyla log 6,50 ve log 5,28 olarak belirlenmiştir. 15 günün sonunda ise log 4,84 bulunmuştur. LAB gelişimine bağlı

olarak titrasyon asitliği değerlerindeki artış fermantasyonun 7. gününe kadar devam etmiş ve kalan fermantasyon sürecinde titrasyon asitliği değerlerinde anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir.

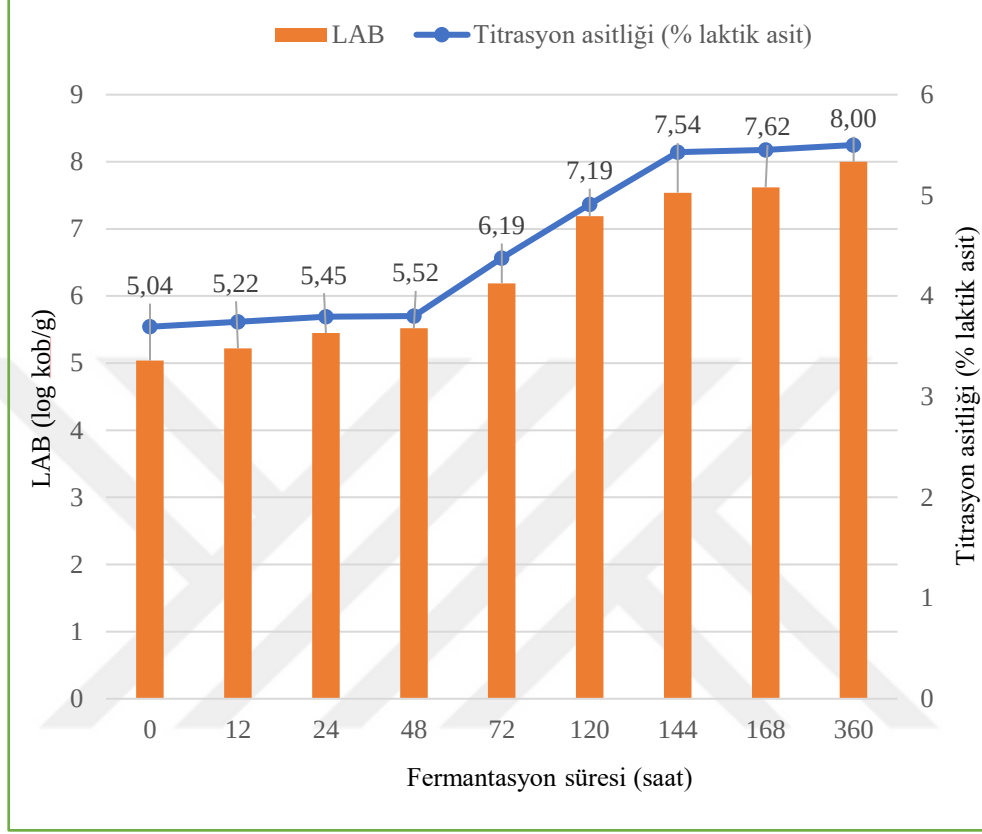
1:2 polen:su oranına sahip karışım için ise başlangıç LAB yükü 4,11 iken 144 saatin sonunda log 7,0 kob/g değerine ulaşmıştır (Şekil 28). Fermantasyonun 7. gününde LAB sayısı azalarak log 6,65'e düşmüş ve fermantasyonun sonunda ise log 5,46 olarak tespit edilmiştir. Fermantasyon periyodunun sonunda karışımın titrasyon asitliği %5,31'e ulaşmıştır.



Şekil 28. Spontan fermantasyonda 1:2 polen:su içeriğine sahip polen, su, bal karışımının LAB yükü ve titrasyon asitliği değişimi

Polen:su oranı 2:1 olan karışımında 15 günlük fermantasyon periyodunun sonunda maksimum LAB yüküne ulaşılmış olup başlangıçta log 5,04 olan LAB sayısı 6. gün log 7,54, 7. gün ise log 7,62 olarak tespit edilmiştir (Şekil 29). 1:1 ve 1:2 polen:su oranına sahip karışımlardan farklı olarak LAB artışı 15 günlük fermantasyon süresi boyunca artış göstermiş ve 15. günün sonunda log 8,0 LAB sayısına ulaşılmıştır. Bu polen:su oranında

özellikle 48 saat ile 144 saat aralığında titrasyon asitliği değerlerinde önemli artışlar meydana gelmiştir. 6. gün titrasyon asitliği değeri %5,43 iken fermantasyonun sonunda %5,50 olarak bulunmuştur.



Şekil 29. Spontan fermantasyonda 2:1 polen:su içeriğine sahip polen, su, bal karışımının LAB yükü ve titrasyon asitliği değişimi

Spontan fermantasyonda polen:su oranı 3:1 olan karışımlar için ise başlangıçta log 5,26 olan LAB yükü 7. günün sonunda log 8,09 15. günün sonunda ise log 7,78 olarak bulunmuştur. Bu polen:su oranı için asitlik özellikle 3. günden itibaren artmaya başlamış fermantasyonun sonunda ise %4,52'ye ulaşmıştır (Şekil 30).

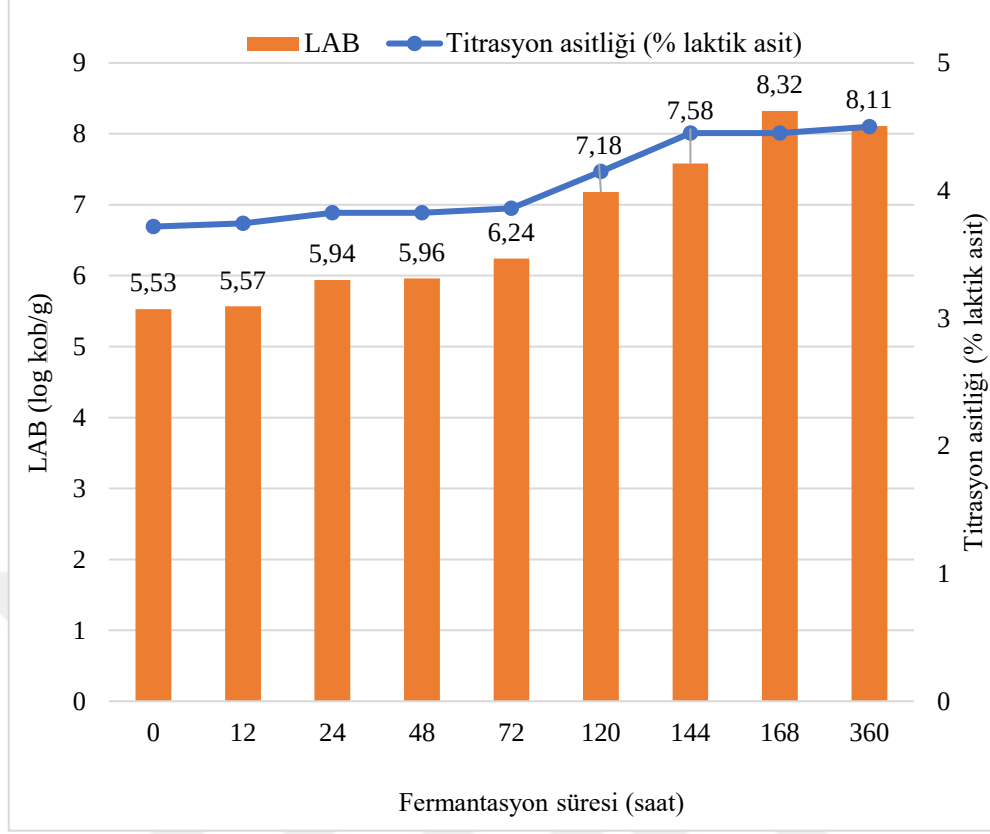


Şekil 30. Spontan fermantasyonda 3:1 polen:su içeriğine sahip polen, su, bal karışımının LAB yükü ve titrasyon asitliği değişimi

Polen:su oranı 4:1 olan polen, su, bal karışımının başlangıç LAB yükü log 5,53 olarak bulunmuş fermantasyonun 5. gününde log 7,18, 6. gününde log 7,58, 7. gününde ise log 8,32'ye ulaşmıştır (Şekil 31).

Fermantasyonun sonunda LAB yükü log 8,11'dir. Bu polen:su oranında ilk 72 saat asitlik gelişimi zayıftır. 72 saat ile 144 saat aralığında titrasyon asitliği artarak %4,45'e ulaşmıştır. Kalan periyotta titrasyon asitliği değerlerinin sabit kaldığı belirlenmiştir.

Global ölçekte spontan fermantasyon ile üretilen gıdaların çoğunun üretimi geleneksel koşullarda yapılmaktadır (Tamang vd., 2016). Spontan fermantasyonda ilgili mikroorganizmalar genellikle son ürünün karakteristik özellikleri üzerine belirleyici etkileri olan bakteri ve/veya mayalardan oluşan bir konsorsiyumdur (Smid ve Kleerebezem, 2014). Bu nedenle polenin spontan fermantasyonunda maya-küf yükünün de takibi yapılmıştır. Fermantasyonun başlangıcında ve 15 günlük fermantasyon periyodunun sonunda üretilen ürünlerde koliform ve fekal koliform bakteri saptanmamış olup örneklerin maya-küf yükü Tablo 31'de verilmiştir.



Şekil 31. Spontan fermantasyonda 4:1 polen:su içeriğine sahip polen, su, bal karışımının LAB yükü ve titrasyon asitliği değişimi

Tablo 31. Spontan fermantasyon ile üretilen ürünlerin maya-küf yükü

Polen:su oranı	Süre (saat)	Maya-küf
1:1	0	4,34
	360	4,20
1:2	0	4,32
	360	4,28
2:1	0	4,43
	360	3,70
3:1	0	4,30
	360	3,28
4:1	0	4,04
	360	3,20

Sonuçlar log kob/g olarak verilmiştir.

3.10.1.2. Spontan Fermantasyon ile Üretilmiş Arı Ekmeği Örneklerinin Depolanması

Tez çalışması kapsamında spontan fermantasyon ile üretilmiş arı ekmeği örnekleri 25 °C’de 50 gün süreyle depolanmış ve 10 günlük periyotlarda örneklerin laktik asit bakterisi (Tablo 32), toplam mezofilik aerobik bakteri ve maya-küf yükü takip edilmiştir (Tablo 33).

Örneklerin takibinde laktik asit bakterisi yükü esas alınmış olup çalışılan besiyerlerinde laktik asit bakterisi gelişiminin görülmeyişi periyotta depolama sonlandırılmıştır.

1:1, 1:2, 2:1, 3:1 ve 4:1 polen:su oranları için fermantasyondan sonra LAB sayımı sırasıyla 10 gün, 20 gün, 20 gün, 30 gün ve 40 gün süreyle alınabilmekmiştir.

Spontan fermantasyon 1:1 ve 1:2 polen:su oranı için log 4,84 ve 4,46 kob/g LAB ile sonlanırken, 2:1 polen:su oranında depolama başlangıcında LAB sayısı log 8,00’dir. 10 günlük depolama periyodunun ardından log 7,78 bulunmuştur. Depolamanın 20. gününde ise LAB sayısı azalmış ve FYP Agar ortamında log 4,50 olarak belirlenmiştir. 30 günün sonunda ise LAB tespiti yapılmamıştır.

3:1 ve 4:1 polen:su oranları için depolama sırasıyla log 7,78 ve log 8,11 kob/g LAB yükü ile başlatılmış 30 günün sonunda log 6,0 olarak bulunmuştur. Bu periyoda kadar kademeli ve diğer polen:su konsantrasyonlarına göre yüksek LAB sayısı korunmuş ancak 10 gün sonra LAB sayımı alınamamış ve bu polen:su konsantrasyonu için depolama sonlandırılmıştır. 4:1 polen:su oranına sahip karışımın spontan fermantasyonunda ise laktik asit bakterilerinin 40 güne kadar canlılığını koruduğu görülmüştür.

Spontan fermantasyon ile üretilmiş 4:1 polen:su oranına sahip polen, su, bal karışımında LAB izolasyonu yapılarak MALDI-TOF MS ile identifikasyonu yapılmış sonuçlar Tablo 34’te verilmiştir.

Tablo 32. Spontan fermantasyon ile üretilmiş arı ekmeği örneklerinin depolama periyodu boyunca laktik asit bakterisi sayım sonuçları

Polen:su oranı	Depolama süresi (gün)	MRS	FMRS	FYP
1:1	0	5,02	4,83	4,84
	10	3,83	3,60	3,60
	20	<1	<1	<1
	Depolama sonlandırıldı.			
1:2	0	5,53	5,50	5,46
	10	5,41	5,36	5,36
	20	3,70	4,15	4,20
	30	<1	<1	<1
	Depolama sonlandırıldı.			
2:1	0	8,03	8,05	8,00
	10	7,46	7,23	7,78
	20	4,61	4,28	4,50
	30	<1	<1	<1
	Depolama sonlandırıldı.			
3:1	0	7,89	7,83	7,78
	10	7,32	7,45	7,18
	20	7,23	7,12	7,11
	30	6,04	6,30	6,00
	40	<1	<1	<1
	Depolama sonlandırıldı.			
4:1	0	8,30	8,15	8,11
	10	8,20	8,03	8,02
	20	7,61	7,70	7,79
	30	6,52	6,41	6,93
	40	4,34	3,95	4,60
	50	<1	<1	<1

Sonuçlar log kob/g olarak verilmiştir.

Tablo 33. Spontan fermantasyon ile üretilmiş arı ekmeği örneklerinin depolama periyodu boyunca toplam mezofilik aerobik bakteri ve maya-küf sayım sonuçları

Polen:su oranı	Depolama süresi (gün)	TMAB	Maya-küf
1:1	10	5,04	4,34
	20	5,48	4,20
	Depolama sonlandırıldı.		
1:2	10	6,15	4,46
	20	6,60	4,46
	30	4,60	4,48
	Depolama sonlandırıldı.		
2:1	10	5,00	4,20
	20	6,30	4,20
	30	6,18	4,30
	Depolama sonlandırıldı.		
3:1	10	6,00	3,74
	20	7,65	3,90
	30	5,60	3,90
	40	5,61	3,94
	Depolama sonlandırıldı.		
4:1	10	6,04	3,30
	20	6,30	3,78
	30	5,38	4,30
	40	5,48	4,30
	50	5,49	5,48

Sonuçlar log kob/g olarak verilmiştir.

Spontan fermantasyon ile üretilmiş 4:1 polen:su oranına sahip karışımda tespit edilen mikroorganizmalar hem FYP Agar hem de FMRS Agar için *Lactobacillus kunkeei*'dir. Bir izolat ise *Lactobacillus kefir*'nin iki farklı suşu olarak skorlandırılmış ancak skor değeri oldukça düşük bulunmuştur.

Tablo 34. Spontan fermantasyon ile üretilmiş arı ekmeğinde tespit edilen mikroorganizmalar

İzole edildiği besiyeri	İzolat kodu	Mikroorganizma	Skor değeri
FYP	SS1	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,775
FYP	SS20	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	2,078
FYP	SS22	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,755
FYP	SS4	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,914
FYP	SS17	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,956
FYP	SS6	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,704
FYP	SS16	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,844
FYP	SS9	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,771
FMRS	SS1	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,841
FMRS	SS5	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,735
FMRS	SS9	<i>Lactobacillus kefir</i> DSM 20485 DSM	1,576
		<i>Lactobacillus kefir</i> DSM 20587T DSM	1,378

3.10.1.3. Spontan Fermantasyon ile Üretilmiş Örneklerin Biyoaktivite ve Sindirilebilirlik Verileri

Beş farklı konsantrasyonda hazırlanan polen, su, bal karışımlarının fermantasyonun başlangıcında ve sonunda sulu ekstraktları hazırlanarak toplam fenolik madde içeriği, demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ve DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali süpürme aktivitesi tayini yapılmıştır.

Örneklerin fermantasyonun başlangıcında ve sonunda toplam fenolik madde içeriği analiz sonuçları Tablo 35'te verilmiştir. Fermantasyonun çalışılan tüm polen:su

konsantrasyonları için toplam fenolik madde içeriğine etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 1:1, 1:2, 2:1, 3:1 ve 4:1 polen:su oranları için fenolik madde içeriğinde sırasıyla 1,06; 1,18; 1,58; 1,58 ve 1,51 kat artış meydana gelmiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde polen:su oranı 1:1 ve 1:2 olan polen, su, bal karışımları için fenolik madde içeriğindeki artış diğer üç polen:su oranından daha düşüktür.

Tablo 35. Polen, su, bal karışımlarının spontan fermantasyonun başlangıcında ve sonunda toplam fenolik madde içerikleri

Polen:su konsantrasyonu	Fermantasyondan önce toplam fenolik madde içeriği	Fermantasyondan sonra toplam fenolik madde içeriği	Sig (2-kuyruklu)
1:1	5,89±0,17 ^a	6,24±0,08 ^b	0,031
1:2	5,08±0,16 ^a	5,99±0,06 ^b	0,001
2:1	6,06±0,09 ^a	9,56±0,37 ^b	0,000
3:1	6,23±0,13 ^a	9,82±0,14 ^b	0,000
4:1	6,38±0,10 ^a	9,65±0,18 ^b	0,000

Sonuçlar mg GAE/g kuru madde olarak verilmiştir.

Farklı küçük harfler ile aynı satırda gösterilen ortalamalar arasında t-testine göre anlamlı farklılık vardır (p<0,05).

Spontan fermantasyon ile üretilen örneklerin sindirim fraksiyonlarının toplam fenolik madde içeriği Tablo 36'da gösterilmiştir. 1:1 polen:su oranı için başlangıçta 5,89 mg GAE/g kuru madde olarak belirlenen toplam fenolik madde içeriği PG fazında 5,35 bulunmuş ancak IN ve OUT fazlarında belirgin azalmalar olduğu görülmüştür. Bu polen:su oranı için fermantasyondan sonra PG, IN ve OUT fraksiyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir.

Spontan fermantasyonda 1:2 polen:su oranı için fenolik madde içeriği yaklaşık 1,18 kat artarken fermantasyondan önce PG fazında 6,22 mg GAE/g kuru madde iken fermantasyondan sonra 7,23 mg GAE/g kuru madde olarak bulunmuştur. 1:2 polen:su oranında IN ve OUT fraksiyonlarında 1:1 polen:su oranına benzer şekilde belirgin bir farklılık meydana gelmemiştir.

2:1 polen:su oranına sahip karışım için toplam fenolik madde içeriğinde 1,58 kat artış meydana gelirken sırasıyla PG fazda 5,86 mg GAE/g kuru madde olarak tespit edilen toplam

fenolik madde içeriği fermantasyondan sonra 7,02 mg GAE/g kuru madde değerine ulaşmıştır. IN fazında fermantasyondan önce 0,42 mg GAE/g kuru madde olarak bulunan toplam fenolik madde istatistiksel olarak önemli ölçüde artmış ve 1,82 mg GAE/g kuru madde değerine ulaşmıştır. Benzer şekilde OUT fazında da toplam fenolik madde içeriğinde fermantasyondan sonra 1,43 kat artış tespit edilmiştir.

Tablo 36. Farklı polen:su oranına sahip karışımların spontan fermantasyondan önce ve sonra sindirim fraksiyonlarına ait toplam fenolik madde içeriği verileri

Polen:su oranı	Fermantasyondan önce			Fermantasyondan sonra		
	PG	IN	OUT	PG	IN	OUT
1:1	5,35±0,28 ^c	0,36±0,08 ^a	0,94±0,16 ^b	6,28±0,21 ^c	0,54±0,04 ^a	0,97±0,14 ^b
1:2	6,22±0,34 ^d	0,36±0,05 ^a	0,79±0,03 ^c	7,23±0,75 ^e	0,59±0,07 ^{ab}	0,84±0,02 ^c
2:1	5,86±0,22 ^e	0,42±0,01 ^a	0,91±0,03 ^b	7,02±0,45 ^f	1,82±0,12 ^d	1,30±0,12 ^c
3:1	7,72±0,51 ^f	0,46±0,07 ^a	0,92±0,09 ^b	6,06±0,08 ^e	1,78±0,08 ^d	1,47±0,16 ^c
4:1	6,23±0,19 ^d	0,39±0,06 ^a	1,03±0,04 ^b	6,23±0,09 ^d	1,86±0,09 ^c	1,12±0,03 ^b

Sonuçlar mg GAE/g kuru madde olarak verilmiştir.

^{a-f} Aynı satırdaki farklı küçük harfler ilgili polen:su oranlarında sindirim fraksiyonları arasındaki (PG, IN, OUT) anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$).

3:1 polen:su oranı için fermantasyon ile IN fazının toplam fenolik madde içeriği 3,87 kat OUT fazının ise 1,60 kat artmıştır. Belirlenen tüm artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

4:1 polen:su oranına sahip karışım için ise PG fraksiyonunun toplam fenolik madde içeriğinde fermantasyondan sonra bir farklılık tespit edilmemiştir. IN fazında 4,77 kat artarken OUT fazı için istatistiksel olarak benzer bulunmuştur ($p > 0,05$).

Spontan fermantasyon ile üretilen polen, su, bal karışımlarının spontan fermantasyonun başlangıcında ve sonunda demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) verileri Tablo 37’de verilmiştir. Tüm polen:su oranlarında toplam fenolik madde içeriğine benzer şekilde FRAP metodu ile tespit edilen antioksidan aktivite değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar meydana gelmiştir. 1:1, 1:2, 2:1, 3:1 ve 4:1 polen:su oranları için sırasıyla FRAP değerlerinin 1,06; 1,11; 1,18; 1,14 ve 1,07 kat arttığı belirlenmiştir.

Tablo 37. Polen, su, bal karışımlarının spontan fermantasyonun başlangıcında ve sonunda demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) verileri

Polen:su konsantrasyonu	Fermantasyondan önce FRAP değeri	Fermantasyondan sonra FRAP değeri	Sig (2-kuyruklu)
1:1	19,01±0,29 ^a	20,22±0,47 ^b	0,018
1:2	18,80±0,44 ^a	20,87±0,15 ^b	0,001
2:1	21,33±0,34 ^a	25,24±0,23 ^b	0,000
3:1	23,77±0,57 ^a	27,20±0,25 ^b	0,003
4:1	23,86±0,37 ^a	25,56±0,27 ^b	0,003

Sonuçlar $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ kuru madde olarak verilmiştir.

Farklı küçük harfler ile aynı satırda gösterilen ortalamalar arasında t-testine göre anlamlı farklılık vardır ($p < 0,05$).

Elde edilen sindirim fraksiyonlarının antioksidan aktivitesi FRAP ve DPPH antioksidan aktivite metotları ile de değerlendirilmiş sonuçlar Tablo 38 ve Tablo 39'da verilmiştir.

1:1 polen:su oranı için mide sindirimi sonrası kalan fraksiyon (PG) için FRAP değerleri istatistiksel olarak benzer bulunurken IN fazında 1,43 kat artış tespit edilmiştir. Bu polen:su oranında OUT fraksiyonlarının antioksidan aktivite değerlerinde farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$). 1:2 polen:su oranı için ise fermantasyondan sonra PG, IN ve OUT fraksiyonlarının FRAP değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir.

2:1 polen:su oranında PG fraksiyonu için FRAP değeri fermantasyondan önce 20,78 $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ kuru madde iken spontan fermantasyondan sonra 22,80 $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ kuru madde olarak bulunmuştur. IN fraksiyonu için FRAP değeri fermantasyondan sonra 1,52 kat artarken OUT fazının FRAP değeri ise fermantasyondan sonra 1,42 kat daha yüksek olarak tespit edilmiştir.

3:1 ve 4:1 polen:su oranlarında da fermantasyonun IN ve OUT fraksiyonlarının FRAP değerlerine etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). 3:1 polen:su oranı için IN fraksiyonunun FRAP değeri fermantasyondan sonra 1,26 kat, 4:1 polen:su oranı için ise 1,57 kat artış göstermiştir. 3:1 polen:su oranında OUT fraksiyonunda FRAP değerlerinde 1,40 kat artış, 4:1 polen:su oranında ise 1,12 kat artış belirlenmiştir.

Tablo 38. Farklı polen:su oranına sahip karışımların spontan fermentasyondan önce ve sonra sindirim fraksiyonlarına ait demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) verileri

Polen:su oranı	Fermentasyondan önce			Fermentasyondan sonra		
	PG	IN	OUT	PG	IN	OUT
1:1	17,42±0,72 ^d	1,86±0,33 ^a	3,44±0,14 ^c	17,28±0,08 ^d	2,66±0,18 ^b	3,47±0,24 ^c
1:2	21,32±0,83 ^c	1,70±0,27 ^a	3,68±0,24 ^b	23,32±0,61 ^c	2,62±0,40 ^a	3,66±0,37 ^b
2:1	20,78±0,16 ^d	2,22±0,05 ^a	3,57±0,05 ^b	22,80±0,27 ^e	3,37±0,26 ^b	5,07±0,15 ^c
3:1	23,56±0,61 ^f	2,63±0,30 ^a	3,96±0,15 ^c	18,78±0,24 ^e	3,32±0,21 ^b	5,55±0,16 ^d
4:1	20,64±0,23 ^e	2,06±0,19 ^a	4,40±0,21 ^c	20,72±0,19 ^e	3,24±0,25 ^b	4,94±0,05 ^d

Sonuçlar $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ kuru madde olarak verilmiştir.

^{a-f} Aynı satırdaki farklı küçük harfler ilgili polen:su oranlarında sindirim fraksiyonları arasındaki (PG, IN, OUT) anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).

Tüm konsantrasyonlarda fermentasyonun karışımların DPPH radikali süpürme aktivitesine etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup 1:2 polen:su oranı hariç spontan fermentasyonun karışımların antioksidan aktivitesine olumlu etkisi olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 39. Polen, su, bal karışımlarının spontan fermentasyonun başlangıcında ve sonunda DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali süpürme aktivitesi

Polen:su konsantrasyonu	Fermentasyondan önce DPPH aktivitesi	Fermentasyondan sonra DPPH aktivitesi	Sig (2-kuyruklu)
1:1	18,87±0,13 ^b	14,65±0,23 ^a	0,000
1:2	20,93±0,60 ^a	25,64±0,06 ^b	0,000
2:1	14,05±0,06 ^b	12,98±0,08 ^a	0,002
3:1	12,61±0,18 ^b	8,48±0,04 ^a	0,000
4:1	13,26±0,06 ^b	9,52±0,10 ^a	0,000

Sonuçlar SC_{50} mg kuru ekstrakt/mL olarak verilmiştir.

Farklı küçük harfler ile aynı satırda gösterilen ortalamalar arasında t-testine göre anlamlı farklılık vardır ($p<0,05$).

1:1 polen:su oranı için sindirim fraksiyonlarının DPPH radikali süpürme aktivitesi verileri incelendiğinde PG fazında anlamlı bir değişiklik olmadığı, IN ve OUT fazlarında ise SC_{50} değerinin azaldığı görülmüştür. 1:2 polen:su oranında ise 1:1 polen:su oranından farklı olarak OUT fraksiyonlarının DPPH aktivitesi benzer bulunmuştur (Tablo 40).

2:1, 3:1 ve 4:1 polen:su oranları için spontan fermantasyon ile karışımların IN ve OUT fraksiyonlarının SC₅₀ değerlerinde istatistiksel olarak önemli azalmalar tespit edilmiş olup fermantasyonun antioksidan aktiviteyi arttırdığı söylenebilmektedir.

Tablo 40. Farklı polen:su oranına sahip karışımların spontan fermantasyondan önce ve sonra sindirim fraksiyonlarına ait DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali süpürme aktivitesi verileri

Polen:su oranı	Fermantasyondan önce			Fermantasyondan sonra		
	PG	IN	OUT	PG	IN	OUT
1:1	19,02±0,22 ^a	185,80±0,07 ^e	54,14±1,00 ^c	19,84±0,12 ^a	104,55±1,27 ^d	52,36±0,96 ^b
1:2	12,73±0,02 ^a	188,10±1,09 ^d	51,63±0,04 ^b	12,39±0,10 ^a	120,25±1,47 ^c	52,29±0,54 ^b
2:1	14,98±0,16 ^b	129,76±1,02 ^f	53,57±1,14 ^d	13,81±0,08 ^a	59,22±0,18 ^e	29,56±0,42 ^c
3:1	11,00±0,16 ^a	112,85±1,81 ^f	49,15±0,14 ^d	16,02±0,35 ^b	57,90±0,50 ^e	26,05±0,25 ^c
4:1	14,01±0,19 ^a	135,50±1,64 ^f	38,62±0,93 ^c	14,69±0,07 ^b	62,90±0,84 ^e	40,50±0,20 ^d

Sonuçlar SC₅₀ mg kuru ekstrakt/mL olarak verilmiştir.

^{a-f} Aynı satırdaki farklı küçük harfler ilgili polen:su oranlarında sindirim fraksiyonları arasındaki (PG, IN, OUT) anlamlı farklılıkları göstermektedir (p<0,05).

3.10.1.4. Spontan Fermantasyon ile Üretilmiş Örneklerin Fenolik Madde Profili

Beş farklı konsantrasyonda hazırlanan polen, su, bal karışımlarının fermantasyondan önce ve sonra fenolik madde kompozisyonuna ait veriler Tablo 41’de verilmiştir.

Fermantasyonun başlangıcında gallik asit tüm karışımlar için gözlenebilme limitinin altında iken fermantasyondan sonra karışımların 1:1, 1:2, 2:1 ve 3:1 polen:su oranları için 3,85 µg/g kuru madde ile 5,15 µg/g kuru madde aralığında gallik asit içerdiği belirlenmiştir.

Protokatekuik asit gallik asite benzer şekilde başlangıçta gözlenebilme limitinin altında iken fermantasyondan sonra tüm polen:su oranları için protokatekuik asit tespit edilmiştir.

4:1 polen:su konsantrasyonu hariç tüm polen:su konsantrasyonları için fermantasyon ile rutin konsantrasyonunda azalma meydana gelmiştir. Buna karşın spontan fermantasyon ile 4:1 polen:su oranı hariç *p*-kumarik asit ve *t*-sinnamik asit içeriğinde artış sağlanmıştır.

Spontan fermantasyon 1:1 polen:su oranı hariç farklı polen:su oranlarına sahip karışımların epikateşin içeriğinde azalmaya neden olmuştur.

Tablo 41. Spontan fermentasyon ile üretilmiş arı ekmeği örneklerinin fenolik madde profili

Fenolik bileşen (µg/g kuru madde)					
Gallik asit					
Polen:su konsantrasyonu	1:1	1:2	2:1	3:1	4:1
Başlangıç	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fermentasyondan sonra	3,85	5,15	5,01	4,82	<LOD
Protokatekuik asit					
Başlangıç	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fermentasyondan sonra	19,45	31,38	19,92	19,59	35,34
<i>p</i> -OH benzoik asit					
Başlangıç	32,37	33,94	39,91	37,35	36,98
Fermentasyondan sonra	30,67	18,66	35,19	28,53	25,36
Epikateşin					
Başlangıç	41,44	37,06	40,89	40,49	40,04
Fermentasyondan sonra	42,10	24,12	27,56	29,18	24,61
Kafeik asit					
Başlangıç	15,53	15,12	16,06	15,49	13,58
Fermentasyondan sonra	13,36	15,85	21,97	23,27	18,98
Rutin					
Başlangıç	7,48	8,66	10,03	10,66	11,76
Fermentasyondan sonra	4,86	7,88	5,64	6,07	13,13
<i>p</i> -kumarik asit					
Başlangıç	29,82	23,71	28,90	32,97	33,85
Fermentasyondan sonra	31,74	34,74	40,43	40,68	30,50
Ferulik asit					
Başlangıç	3,57	4,83	3,37	4,82	5,05
Fermentasyondan sonra	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<i>t</i> -sinnamik asit					
Başlangıç	3,57	2,84	2,94	3,41	3,26
Fermentasyondan sonra	4,33	3,51	3,59	3,80	<LOD

<LOD: İlgili standart gözlenebilir limitinin altında bulunmuştur.

Mikroorganizmaların hidroliz reaksiyonları ile fenolik bileşenlerin çözünürlüğünü arttırdığı ve ekstraksiyonu kolaylaştırdığına yönelik muhtemel mekanizmalar rapor edilmiş

olup meydana gelen değişimler özellikle fermantasyonda kullanılan mikroorganizmalara bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Madeira Junior vd., 2015).

3.10.2. Kovan İçerisinde Arı Ekmeği Üretimi

3.10.2.1. Kovan İçi Fermantasyon ile Üretilmiş Örneklerin Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

Kovan içi üretimlerden Trabzon ili Maçka ilçesi Barışlı köyünde gerçekleştirilen fermantasyonda (Kovan içi üretim-1) 15 günlük periyodun sonunda kovanlardan örnekler alınmıştır (Şekil 32). Bu üretimde tüm polen:su oranlarında küflenme görülmüş olup fermantasyon sonrası örneklerin görüntüsü karışımların polen:su oranını gösterecek şekilde verilmiştir (Şekil 33).



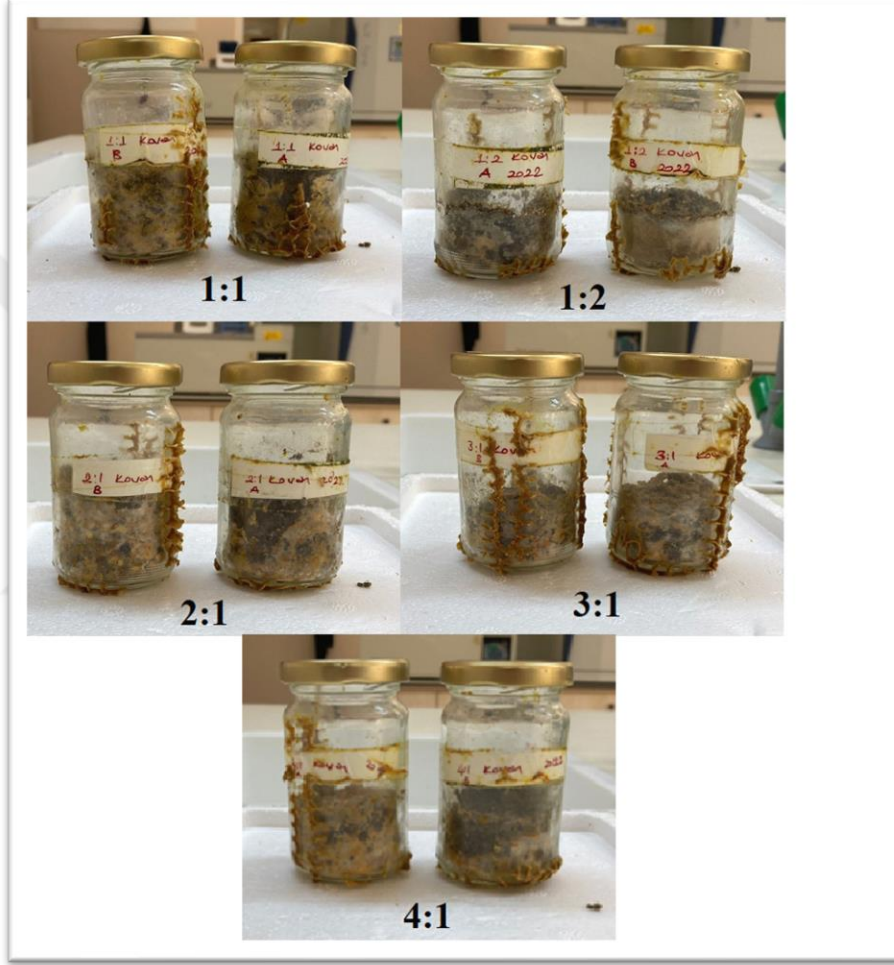
Şekil 32. Fermantasyon periyodunun sonunda kovanlardan örneklerin alınması (Kovan içi üretim-1)

Kovan içi üretim-1 için kovanda fermantasyon sonrası meydana gelen ağırlık kayıpları hesaplanmış ve % olarak Tablo 42’de gösterilmiştir.

Tablo 42. Kovan içi üretim-1 için fermantasyon periyodunun sonunda tespit edilen ağırlık kayıpları

	1:1	1:2	2:1	3:1	4:1
Kayıp (%)	40,00±0,16 ^c	42,32±0,67 ^d	35,49±0,61 ^b	33,40±0,62 ^a	32,06±0,88 ^a

^{a-d} Aynı satırdaki farklı küçük harfler istatistiksel farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).



Şekil 33. Küflenme görülen örnekler (Kovan içi üretim-1)

Tüm polen:su oranlarında küflenme tespit edilmesi nedeniyle bu örneklerde yalnızca son üründe LAB, toplam mezofilik aerobik bakteri, maya-küf sayımları gerçekleştirilmiş, kimyasal analizler yapılmamıştır. Belirtilen sayım sonuçları Tablo 43 ve Tablo 44'te verilmiştir.

Tablo 43. Küflenme görülen örneklerde (kovan içi üretim-1) laktik asit bakterisi sayım sonuçları

Polen:su oranı		MRS	FMRS	FYP
1:1	Başlangıç	4,11	3,83	4,46
	Fermantasyon sonunda	4,64	3,80	4,15
1:2	Başlangıç	4,08	3,86	4,11
	Fermantasyon sonunda	<1	<1	<1
2:1	Başlangıç	4,67	4,83	5,04
	Fermantasyon sonunda	<1	<1	<1
3:1	Başlangıç	4,89	4,99	5,26
	Fermantasyon sonunda	4,84	4,92	4,76
4:1	Başlangıç	5,11	5,26	5,53
	Fermantasyon sonunda	3,78	3,60	3,11

Sonuçlar log kob/g olarak verilmiştir.

Tablo 44. Küflenme görülen örneklerde (kovan içi üretim-1) toplam mezofilik aerobik bakteri ve maya-küf sayım sonuçları

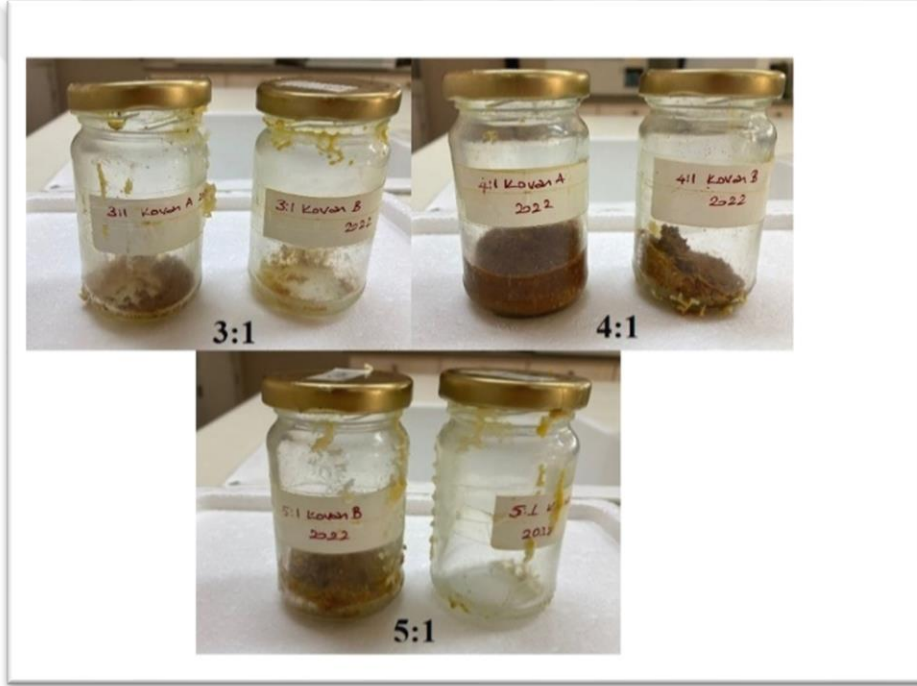
Polen:su oranı		TMAB	Maya-küf
1:1	Başlangıç	5,50	4,34
	Fermantasyon sonunda	6,21	6,30
1:2	Başlangıç	5,30	4,32
	Fermantasyon sonunda	6,30	7,15
2:1	Başlangıç	6,11	4,43
	Fermantasyon sonunda	5,43	5,78
3:1	Başlangıç	6,34	4,30
	Fermantasyon sonunda	5,30	5,48
4:1	Başlangıç	6,64	4,04
	Fermantasyon sonunda	5,26	5,46

Sonuçlar log kob/g olarak verilmiştir.

Kovan içi üretim-1 ile üretilen arı ekmeği örneklerinde 1:1 ve 1:2 polen:su oranları için maya-küf yükünün oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Hem 1:2 hem de 2:1 polen:su oranı için ise fermantasyon periyodunun sonunda LAB tespit edilememiştir.

Kovan içi üretim-1’de elde edilen bulgular doğrultusunda Gümüşhane ili Kocadal köyünde yapılan üretimde (Kovan içi üretim-2) 3:1, 4:1 ve 5:1 oranlarında polen:su oranlarında fermantasyon karışımları hazırlanarak kovanlara yerleştirilmiş ve fermantasyon süresi de 3 gün kısaltılarak 12 güne düşürülmüştür.

Örneklerin LAB ve maya-küf sayısı tespiti yapılmıştır (Tablo 45, Tablo 46). Kovan içi fermantasyon sonrasında örneklerin görüntüsü Şekil 34’te verilmiştir.



Şekil 34. Kovan içi üretim-2 sonrası arı ekmeği örnekleri

Tablo 45. Kovan içi üretim-2 için laktik asit bakterisi sayım sonuçları

Polen:su oranı		MRS	FMRS	FYP
3:1	Başlangıç	4,89	4,99	5,26
	Fermantasyon sonunda	5,67	5,26	5,52
	Log artış	0,78	0,27	0,26
4:1	Başlangıç	5,11	5,26	5,53
	Fermantasyon sonunda	6,29	5,45	5,72
	Log artış	1,18	0,19	0,19
5:1	Başlangıç	5,46	5,59	5,74
	Fermantasyon sonunda	5,82	5,48	5,44
	Log artış	0,36	-	-

Sonuçlar log kob/g olarak verilmiştir.

Tablo 46. Kovan içi üretim-2 için toplam mezofilik aerobik bakteri ve maya-küf sayım sonuçları

Polen:su oranı		TMAB	Maya-küf
3:1	Başlangıç	6,34	4,30
	Fermantasyon sonunda	5,57	6,70
4:1	Başlangıç	6,64	4,04
	Fermantasyon sonunda	5,76	6,69
5:1	Başlangıç	6,97	4,24
	Fermantasyon sonunda	5,83	7,20

Sonuçlar log kob/g olarak verilmiştir.

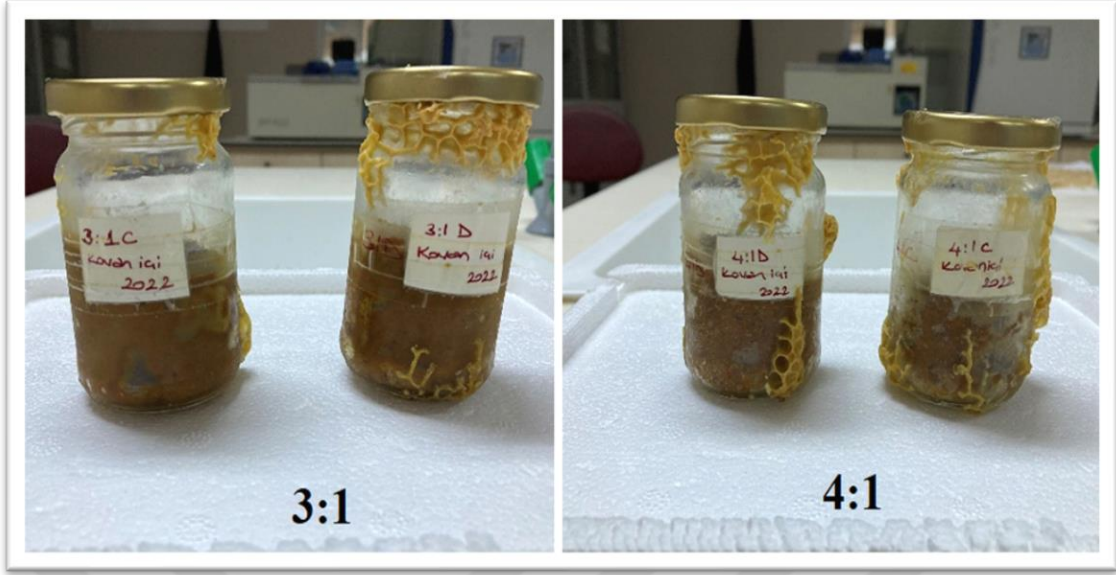
Kovan içi üretim-2 ile aynı lokasyonda (Gümüşhane ili, Kocadal köyü) 26 Temmuz 2022-8 Ağustos 2022 tarihlerinde gerçekleştirilen üçüncü kovan içi arı ekmeği üretimine ait sıcaklık ve yağış verileri Şekil 35'te verilmiştir. Bu üretimde ortalama sıcaklık diğer iki üretimden daha yüksek olup yağışsız bir dönemde fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Bu üretimde seri dilüsyon ile katı besiyerine ekilen numunelerden inkübasyon süresinin sonunda LAB sayımı gerçekleştirilemediğinden zenginleştirme metodu tercih edilmiştir.

Üretilen örnekler için hem FYP hem de FMRS Agarda koloni gelişmediğinde, FYP Broth kullanılarak zenginleştirme kültürü hazırlanmıştır. Polen:su oranı 4:1 olan karışım için zenginleştirme metodu ile de koloni gelişimi sağlanamış olup 3:1 polen:su oranı için 4 adet koloni izolasyonu yapılmıştır. İzolatların MALDI Biotyper Real-Time Classification (RTC) programında tespit edilen analiz sonuçları Tablo 47’de verilmiştir.

Kovan içi üretim-3 ile üretilen 3:1 polen:su oranına sahip karışımında FYP Agar ortamında geliştirilen 3 izolat *Lactobacillus kunkeei* olarak tespit edilmiştir. 1 izolat için ise farklı *Leuconostoc* türleri verilmiş olup skor değeri doğrultusunda bu sonucun güvenilir olmadığı sonucuna varılmıştır.

Tablo 47. Polen:su oranı 3:1 olan karışımlardan zenginleştirme metodu ile elde edilen izolatlarla ait MALDI Biotyper Real-Time Classification (RTC) sonuçları

İzole edildiği besiyeri	İzolat kodu	Mikroorganizma	Skor değeri
FYP	KS11	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,775
FYP	KS21	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	2,078
FYP	KS15	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	1,755
FYP	KS7	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> DSM 20193T	1,688
		<i>Leuconostoc lactis</i> DSM 8582	1,478
		<i>Leuconostoc lactis</i> DSM 20202T	1,466



Şekil 35. Kovan içi fermantasyonla üretilen arı ekmeği örnekleri (Kovan içi üretim-3)

3:1 ve 4:1 polen:su oranları için kovan içi üretim-3 ile üretilen ürünlerde maya-küf yükü sırasıyla log 5,08 ve log 5,54 kob/g olarak bulunmuştur.

3.10.2.2. Kovan İçi Fermantasyon ile Üretilmiş Örneklerin Biyoaktivite ve Sindirilebilirlik Verileri

Kovan içi üretim-3 ile belirtilen üretim koşullarında fermantasyonu yapılan 3:1 ve 4:1 polen:su oranına sahip polen, su, bal karışımlarının fermantasyonun başlangıcında ve sonunda sulu ekstraktları hazırlanarak toplam fenolik madde içeriği, demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ve DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali süpürme aktivitesi tayini yapılmıştır.

3:1 ve 4:1 polen:su oranı için kovan içi fermantasyonun karışımların toplam fenolik madde içeriğine etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ($p < 0,05$) ve fenolik madde içeriğinde 3:1 ve 4:1 polen:su oranı için sırasıyla 1,36 kat ve 1,05 kat artış belirlenmiştir (Tablo 48).

Tablo 48. Polen, su, bal karışımlarının kovan içi fermantasyonun başlangıcında ve sonunda toplam fenolik madde içerikleri

Polen:su konsantrasyonu	Fermantasyondan önce toplam fenolik madde içeriği	Fermantasyondan sonra toplam fenolik madde içeriği	Sig (2-kuyruklu)
3:1	6,23±0,13 ^a	8,46±0,08 ^b	0,000
4:1	6,38±0,10 ^a	6,72±0,11 ^b	0,015

Sonuçlar mg GAE/g kuru madde olarak verilmiştir.

Farklı küçük harfler ile aynı satırda gösterilen ortalamalar arasında t-testine göre anlamlı farklılık vardır ($p<0,05$).

Kovan içi fermantasyona ait sindirim fraksiyonlarının toplam fenolik madde içeriği Tablo 49’da gösterilmiştir. Kovan içi fermantasyonda her iki polen:su oranı için PG fraksiyonunda fermantasyondan sonra önemli kayıplar meydana geldiği görülmüştür. Ancak 3:1 polen:su oranı için PG fazının aksine seruma geçen fraksiyona karşılık gelen IN fazının toplam fenolik madde içeriğinde 2,67 kat OUT fazında ise 1,48 kat artış meydana geldiği tespit edilmiştir.

4:1 polen:su oranı için kovan içi fermantasyon ile IN fazının toplam fenolik madde içeriğinde belirgin bir farklılık olmadığı görülmüştür. Ancak bu polen:su oranında OUT fraksiyonunun toplam fenolik madde içeriği 1,33 kat artmıştır.

Tablo 49. Farklı polen:su oranına sahip karışımların kovan içi fermantasyondan önce ve sonra sindirim fraksiyonlarına ait toplam fenolik madde içeriği verileri

Polen:su oranı	Fermantasyondan önce			Fermantasyondan sonra		
	PG	IN	OUT	PG	IN	OUT
3:1	7,72±0,51 ^e	0,46±0,07 ^a	0,92±0,09 ^b	2,08±0,03 ^d	1,23±0,15 ^c	1,36±0,02 ^c
4:1	6,23±0,19 ^e	0,39±0,06 ^a	1,03±0,04 ^b	2,01±0,01 ^d	0,48±0,06 ^a	1,37±0,04 ^c

Sonuçlar mg GAE/g kuru madde olarak verilmiştir.

^{a-e} Aynı satırdaki farklı küçük harfler ilgili polen:su oranlarında sindirim fraksiyonları arasındaki (PG, IN, OUT) anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).

Kovan içi fermantasyon ile 3:1 ve 4:1 polen:su oranına sahip karışımların FRAP değerlerinde sırasıyla 1,10 ve 1,04 kat artış tespit edilmiş olup bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 50).

Tablo 50. Polen, su, bal karışımlarının kovan içi fermantasyonun başlangıcında ve sonunda demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) verileri

Polen:su konsantrasyonu	Fermantasyondan önce FRAP değeri	Fermantasyondan sonra FRAP değeri	Sig (2-kuyruklu)
3:1	23,77±0,57 ^a	26,14±0,23 ^b	0,003
4:1	23,86±0,37 ^a	24,80±0,24 ^b	0,021

Sonuçlar $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ kuru madde olarak verilmiştir.

Farklı küçük harfler ile aynı satırda gösterilen ortalamalar arasında t-testine göre anlamlı farklılık vardır ($p < 0,05$).

Kovan içi fermantasyona ait sindirim fraksiyonlarının FRAP değerleri Tablo 51’de verilmiştir.

Toplam fenolik madde içeriğine benzer şekilde her iki polen:su oranı için PG fazının FRAP değerlerinde azalmalar olduğu belirlenmiştir. IN fraksiyonunun FRAP değerlerinde kovan içi fermantasyon ile 3:1 ve 4:1 polen:su oranı için sırasıyla 1,50 kat ve 1,28 kat artış sağlanmıştır. 3:1 polen:su oranı için OUT fraksiyonunun FRAP değeri 1,24 kat artarken 4:1 polen:su oranı için fermantasyondan önceki ve sonraki FRAP değerleri istatistiksel olarak benzer bulunmuştur ($p > 0,05$).

Tablo 51. Farklı polen:su oranına sahip karışımların kovan içi fermantasyondan önce ve sonra sindirim fraksiyonlarına ait demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) verileri

Polen:su oranı	Fermantasyondan önce			Fermantasyondan sonra		
	PG	IN	OUT	PG	IN	OUT
3:1	23,56±0,61 ^e	2,63±0,30 ^a	3,96±0,15 ^b	8,12±0,05 ^d	3,96±0,44 ^b	4,90±0,13 ^c
4:1	20,64±0,23 ^e	2,06±0,19 ^a	4,40±0,21 ^c	6,26±0,20 ^d	2,63±0,19 ^b	4,12±0,10 ^c

Sonuçlar $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ kuru madde olarak verilmiştir.

^{a-e} Aynı satırdaki farklı küçük harfler ilgili polen:su oranlarında sindirim fraksiyonları arasındaki (PG, IN, OUT) anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$).

Kovan içi fermantasyonda 3:1 ve 4:1 polen:su oranı için fermantasyonun karışımların DPPH radikali süpürme aktivitesine etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$) (Tablo 52).

Tablo 52. Polen, su, bal karışımlarının kovan içi fermantasyonun başlangıcında ve sonunda DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali süpürme aktivitesi

Polen:su konsantrasyonu	Fermantasyondan önce DPPH aktivitesi	Fermantasyondan sonra DPPH aktivitesi	Sig (2-kuyruklu)
3:1	12,61±0,18 ^b	4,19±0,11 ^a	0,000
4:1	13,26±0,06 ^b	5,73±0,26 ^a	0,000

Sonuçlar SC₅₀ mg kuru ekstrakt/mL olarak verilmiştir.

Farklı küçük harfler ile aynı satırda gösterilen ortalamalar arasında t-testine göre anlamlı farklılık vardır (p<0,05).

Kovan içi fermantasyonda 3:1 ve 4:1 polen:su oranı için sindirim fraksiyonlarının DPPH radikali süpürme aktivitesi verileri Tablo 53'te verilmiştir.

Toplam fenolik madde içeriği ve FRAP verilerine benzer şekilde fermantasyondan sonra PG fraksiyonlarının antioksidan aktivitesinde azalma meydana gelmiştir. 3:1 polen:su oranı için IN fraksiyonunun DPPH metodu ile tespit edilen SC₅₀ değeri fermantasyondan önce 112,85 mg kuru ekstrakt/mL iken fermantasyondan sonra 51,21 mg kuru ekstrakt/mL olarak belirlenmiştir. 4:1 polen:su oranı için ise fermantasyondan önce ve sonra sırasıyla 135,50 mg kuru ekstrakt/mL ve 91,20 mg kuru ekstrakt/mL'dir. IN fraksiyonlarının SC₅₀ değerlerinde meydana gelen değişim istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). OUT fraksiyonu için 3:1 polen:su oranında fermantasyondan sonra antioksidan aktivitede artış meydana gelmiştir. Bunun aksine 4:1 polen:su oranında OUT fraksiyonu için antioksidan aktivitede azalma olduğu belirlenmiştir.

Tablo 53. Farklı polen:su oranına sahip karışımların kovan içi fermantasyondan önce ve sonra sindirim fraksiyonlarına ait DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali süpürme aktivitesi verileri

Polen:su oranı	Fermantasyondan önce			Fermantasyondan sonra		
	PG	IN	OUT	PG	IN	OUT
3:1	11,00±0,16 ^a	112,85±1,81 ^f	49,15±0,14 ^d	20,15±0,09 ^b	51,21±1,22 ^e	30,04±0,52 ^c
4:1	14,01±0,19 ^a	135,50±1,64 ^f	38,62±0,93 ^c	24,33±0,22 ^b	91,20±1,31 ^e	43,57±0,14 ^d

Sonuçlar SC₅₀ mg kuru ekstrakt/mL olarak verilmiştir.

^{a-f} Aynı satırdaki farklı küçük harfler ilgili polen:su oranlarında sindirim fraksiyonları arasındaki (PG, IN, OUT) anlamlı farklılıkları göstermektedir (p<0,05).

3.10.2.3. Kovan İçi Fermantasyon ile Üretilen Örneklerin Fenolik Madde Profili

Kovan içi fermantasyonla üretilen 3:1 ve 4:1 polen:su oranına sahip polen, su, bal karışımlarının fenolik madde kompozisyonu Tablo 54'te verilmiştir.

Kovan içi fermantasyon ile 3:1 polen:su oranı için protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, epikateşin, kafeik asit, rutin, ellagik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, *t*-sinnamik içeriğinde farklılıklar meydana gelmiştir. 4:1 polen:su oranı için kovan içi fermantasyondan sonra *p*-OH benzoik asit, epikateşin, kafeik asit, rutin, *p*-kumarik asit, ferulik asit ve *t*-sinnamik konsantrasyonlarında değişiklikler tespit edilmiştir.

Protokatekuik asitte fermantasyon ile meydana gelen değişim yalnızca 3:1 polen:su konsantrasyonu için söz konusu olup bu bileşenin konsantrasyonu kovan içi fermantasyon ile artmıştır. 3:1 ve 4:1 polen:su konsantrasyonu için rutin miktarında sırasıyla 5,17 kat ve 7,78 kat artış görülmüştür. Başlangıçta da nispeten düşük konsantrasyonda bulunan ferulik asit ve *t*-sinnamik asit fermantasyondan sonra her iki konsantrasyon için de gözlenebilme limitinin altında bulunmuştur.

Fermantasyonun başlangıcında karışımlarda gözlenebilme limitinin altında bulunan protokatekuik asit 3:1 polen:su oranı için 4:1 polen:su oranından farklı olarak kovan içi fermantasyondan sonra 12,22 µg/g kuru madde'ye yükselmiştir. Belirtilen bu değişimler sulu ekstraktlar için RP-HPLC-PDA ile 25 standart fenolik madde kullanılarak yapılan analiz koşullarında tespit edilmiş olup farklı çözücü kullanımı, metoda ait gözlenebilme limitleri, kolon şartları önemli belirleyici faktörlerdir. Çalışılan metot ile tespit edilemeyen farklı standartlar, fenolik maddelerin farklı türevlerinin de fermantasyonda oluşma olasılığı söz konusudur.

Tablo 54. Kovan içi fermantasyon ile üretilen arı ekmeği örneklerinin fenolik madde profili

Fenolik bileşen (µg/g kuru madde)		
Protokatekuik asit		
Polen:su konsantrasyonu	3:1	4:1
Başlangıç	<LOD	<LOD
Fermantasyondan sonra	12,22	<LOD

Tablo 54'ün devamı

<i>p</i> -OH benzoik asit		
Başlangıç	37,35	36,98
Fermantasyondan sonra	24,33	34,30
Epikateşin		
Başlangıç	40,49	40,04
Fermantasyondan sonra	<LOD	7,65
Kafeik asit		
Başlangıç	15,49	13,58
Fermantasyondan sonra	<LOD	<LOD
Rutin		
Başlangıç	10,66	11,76
Fermantasyondan sonra	55,08	91,47
Ellagik asit		
Başlangıç	<LOD	<LOD
Fermantasyondan sonra	63,21	<LOD
<i>p</i> -kumarik asit		
Başlangıç	32,97	33,85
Fermantasyondan sonra	<LOD	11,88
Ferulik asit		
Başlangıç	4,82	5,05
Fermantasyondan sonra	<LOD	<LOD
<i>t</i> -sinnamik asit		
Başlangıç	3,41	3,26
Fermantasyondan sonra	<LOD	<LOD

<LOD: İlgili standart gözlenebilme limitinin altında bulunmuştur.

3.10.3. *Lactobacillus kunkeei* İnokülasyonu ile Arı Ekmeği Üretimi

3.10.3.1. *L. kunkeei* İnokülasyonu ile Üretilen Örneklerin Mikrobiyolojisi

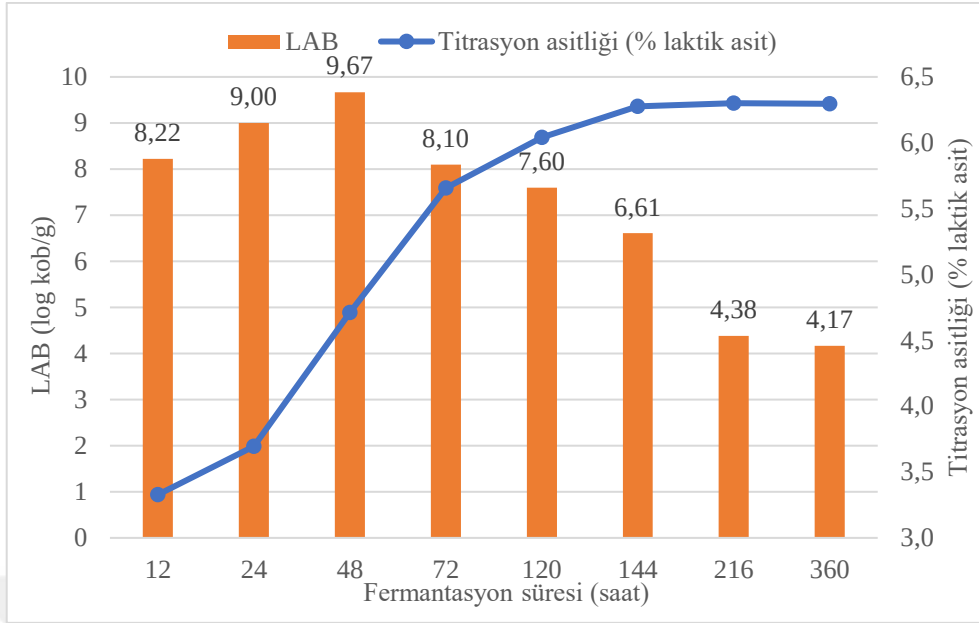
Polen fermantasyonunda kullanılan *L. kunkeei* izolatu için aside ve safra tuzuna dayanıklılık belirlenmiş olup düşük pH ve safra tuzu varlığında tespit edilen *L. kunkeei* sayım sonuçları Tablo 55'te verilmiştir.

Tablo 55. *L. kunkeei* izolatının asit ve safra tuzu toleransı

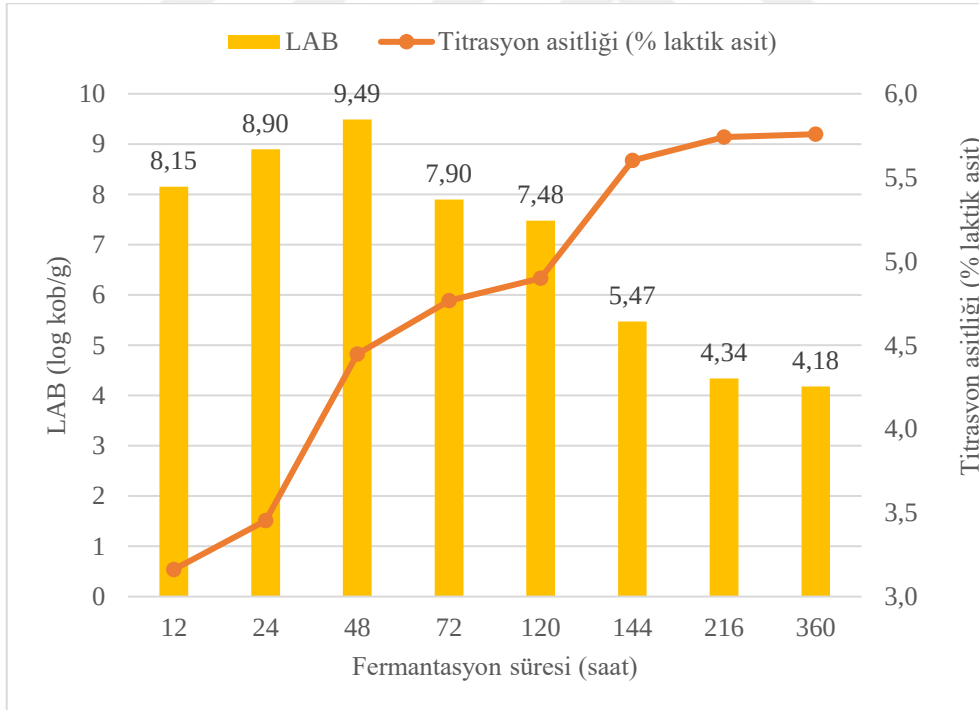
	Kontrol	pH 3,0	%0,3 safra tuzu varlığında
<i>L. kunkeei</i>	log 7,28±0,11	log 6,89±0,04	log 4,74±0,23
	Tolerans (%)	94,64	65,04

L. kunkeei inokülasyonu ile üretimde 1:1 polen:su oranına sahip karışım için 48 saatlik fermantasyon periyodunun sonunda LAB yükü log 9,67 olarak maksimuma ulaşmıştır. 72, 120 ve 144 saatlik fermantasyonun sonunda LAB sayısı sırasıyla log 8,1; log 7,60 ve log 6,61'e düşmüştür. Ayrıca asitlik artışı 12. saatin sonunda başlamış olup 6 günün sonunda titrasyon asitliği laktik asit cinsinden %6,3 olarak belirlenmiştir. LAB sayısı fermantasyonun 9. gününde log 6,61'den log 4,38'e düşmüştür. Fermantasyonun sonunda ise log 4,17 olarak bulunmuştur (Şekil 36).

Polen:su oranı 1:2 olan karışım için 48 saatte LAB yükü log 9,49'a ulaşmıştır. Ardından 72, 120, 144 saatlik fermantasyon periyodunun sonunda LAB yükü sırasıyla log 7,9; log 7,48 ve log 5,47 olarak belirlenmiştir. Kalan fermantasyon sürecinde LAB yükü 1:1 polen:su oranına benzer şekilde azalmış olup fermantasyonun sonunda LAB yükü log 4,17'ye düşmüştür. Asitlik LAB yüküyle ilişkili olarak artış göstermiş ve fermantasyonun sonunda titrasyon asitliği %5,76 değerine ulaşmıştır (Şekil 37).

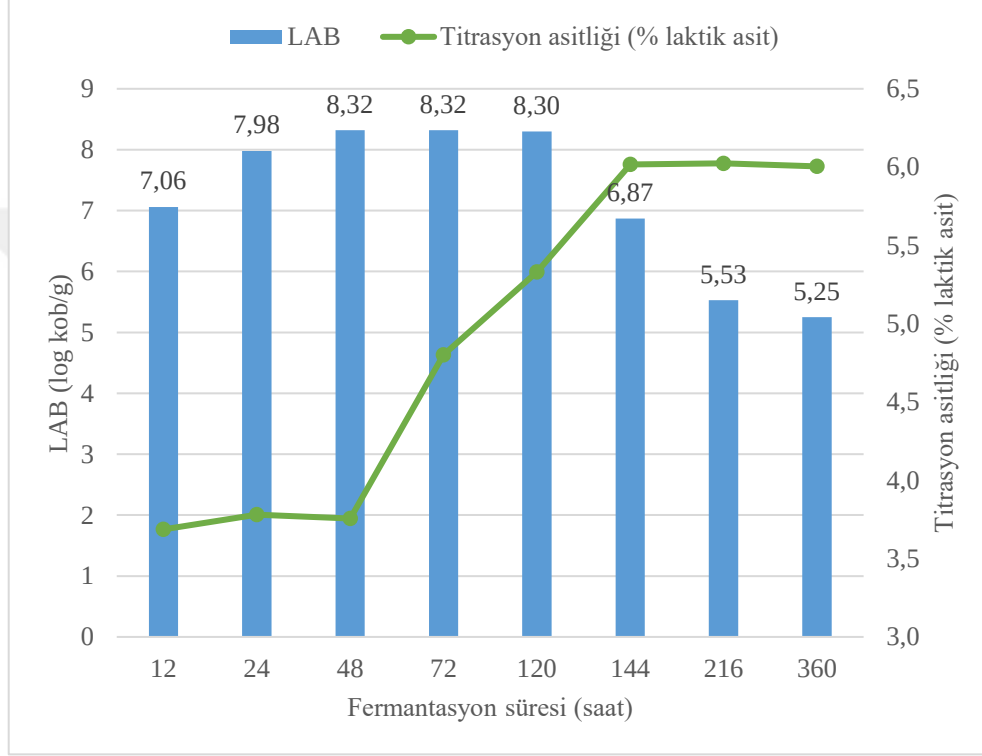


Şekil 36. LAB inokülasyonu ile fermantasyonda 1:1 polen:su oranına sahip polen, su, bal karışımının LAB yükü ve titrasyon asitliği değişimi



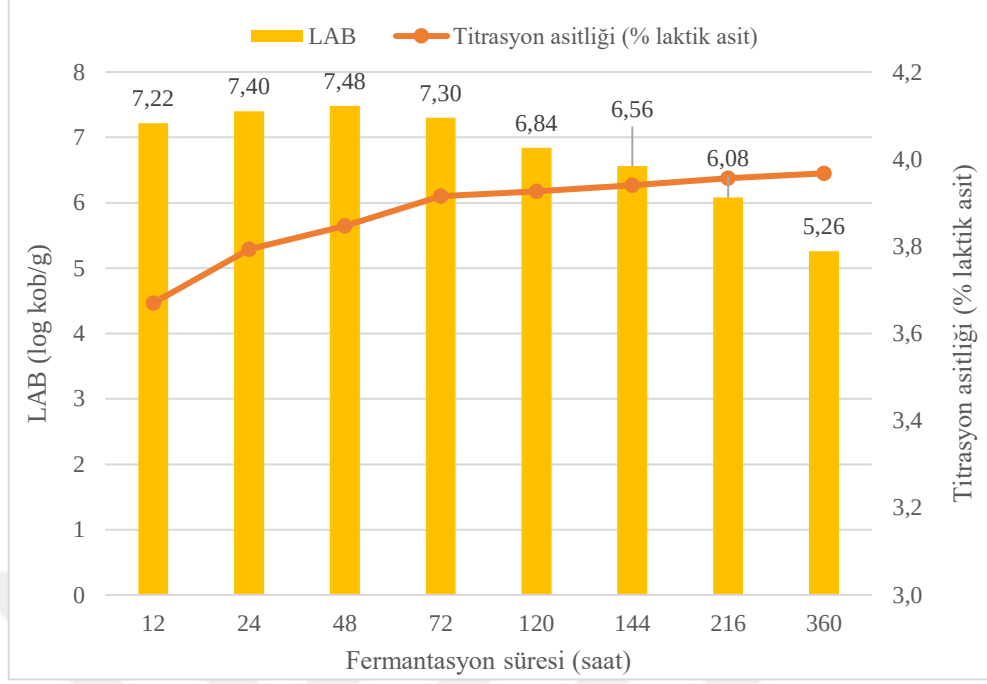
Şekil 37. LAB inokülasyonu ile fermantasyonda 1:2 polen:su oranına sahip polen, su, bal karışımının LAB yükü ve titrasyon asitliği değişimi

Polen:su oranı 2:1 olan polen, su, bal karışımı için LAB yükü 48 saatin sonunda log 8,32 olarak bulunmuş olup mevcut LAB sayısı 5 gün boyunca korunmuştur. 6 günlük fermentasyonun sonunda log 6,87'ye düşmüştür. Bu periyottan sonra titrasyon asitliği değerlerinde de önemli bir farklılık meydana gelmemiştir. LAB yükündeki azalma 9. günde devam etmiş ve 15. günün sonunda log 5,25 olarak bulunmuştur (Şekil 38).

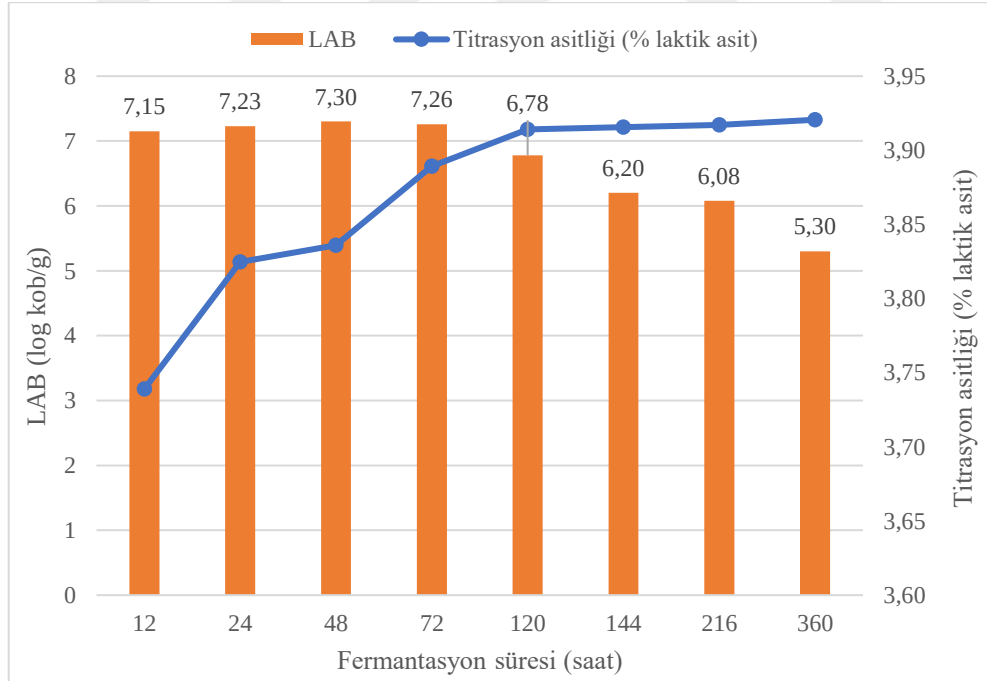


Şekil 38. LAB inokülasyonu ile fermentasyonda 2:1 polen:su oranına sahip polen, su, bal karışımının LAB yükü ve titrasyon asitliği değişimi

Polen:su oranı 3:1 ve 4:1 olan polen, su ve bal karışımları için 48 saatin sonunda LAB yükü sırasıyla log 7,48 ve log 7,3 olarak bulunmuş olup bu polen:su oranlarında diğer polen su konsantrasyonlarında tespit edilen LAB sayılarına ulaşamamıştır (Şekil 39 ve Şekil 40).



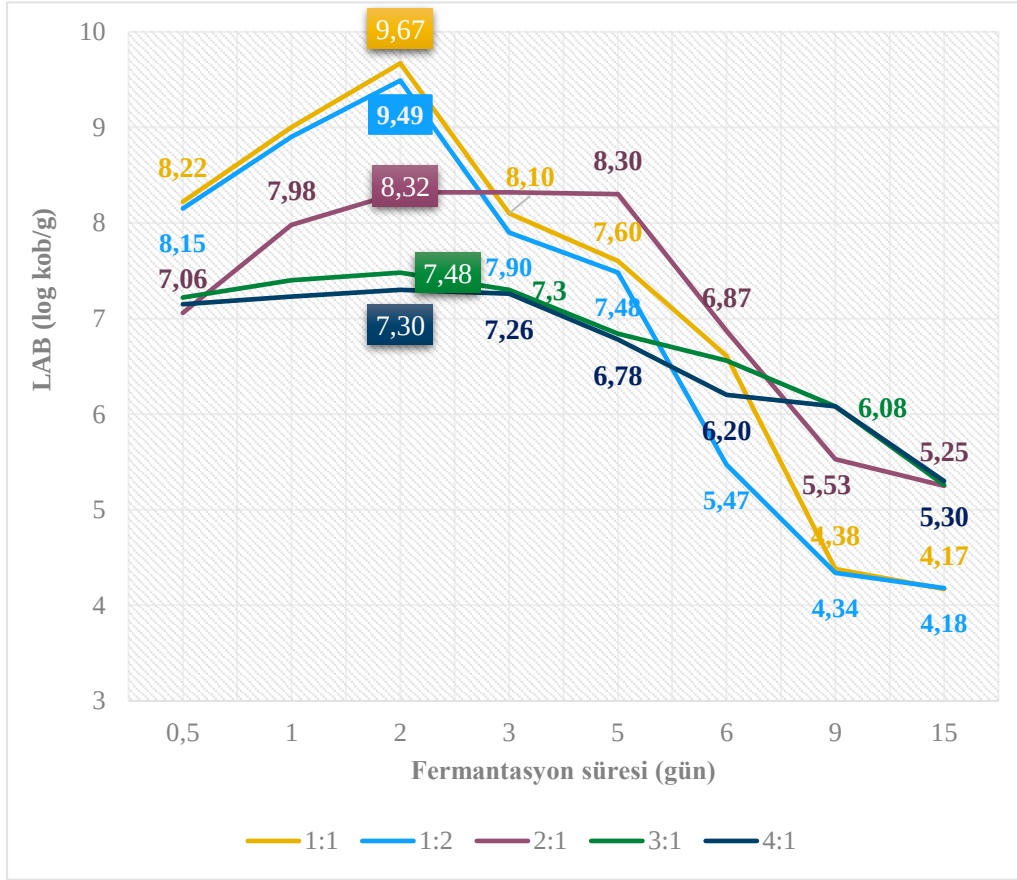
Şekil 39. LAB inokülasyonu ile fermantasyonda 3:1 polen:su oranına sahip polen, su, bal karışımının LAB yükü ve titrasyon asitliği değişimi



Şekil 40. LAB inokülasyonu ile fermantasyonda 4:1 polen:su oranına sahip polen, su, bal karışımının LAB yükü ve titrasyon asitliği değişimi

48 saatten sonra 3:1 ve 4:1 polen:su konsantrasyonları için LAB yükünde azalmalar meydana gelmiştir. 9. gün ve fermantasyon sonunda 3:1 ve 4:1 polen:su oranına sahip karışımların LAB yükleri oldukça benzerdir.

Başlangıçta 3:1 polen:su oranı için %3,67 olan titrasyon asitliği fermantasyonun sonunda % 3,97 iken 4:1 polen:su oranı için başlangıçta %3,74 fermantasyon sonunda ise %3,92'dir. Tüm karışımlar için LAB yükünün değişimini gösteren bir grafik Şekil 41'de verilmiştir.



Şekil 41. LAB inokülasyonu ile polen fermantasyonunda karışımların fermantasyon periyodu boyunca LAB sayıları

Tablo 56. *L. kunkei* inokülasyonu ile üretilen ürünlerin TMAB ve maya-küf yükü

Polen:su oranı		TMAB	Maya-küf
1:1	Başlangıç	5,50	4,34
	Fermantasyon sonunda	5,68	2,90
1:2	Başlangıç	5,30	4,32
	Fermantasyon sonunda	5,46	3,63
2:1	Başlangıç	6,11	4,43
	Fermantasyon sonunda	6,26	3,84
3:1	Başlangıç	6,34	4,30
	Fermantasyon sonunda	6,89	4,30
4:1	Başlangıç	6,64	4,04
	Fermantasyon sonunda	7,22	5,65

Sonuçlar log kob/g olarak verilmiştir.

3.10.3.2. *L. kunkei* İnokülasyonu ile Üretilen Örneklerinin Biyoaktivite ve Sindirilebilirlik Verileri

Beş farklı konsantrasyonda hazırlanan polen, su, bal karışımlarının fermantasyonun başlangıcında ve sonunda sulu ekstraktları hazırlanarak toplam fenolik madde içeriği, demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ve DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali süpürme aktivitesi tayini yapılmıştır.

Starterli fermantasyon ile polen:su oranı 1:1, 1:2, 2:1, 3:1 ve 4:1 olan karışımların toplam fenolik madde içeriğinde sırasıyla 2,27; 2,65; 1,60; 1,44 ve 1,38 kat artış tespit edilmiştir (Tablo 57).

Tablo 57. Polen, su, bal karışımlarının starterli fermantasyonun başlangıcında ve sonunda toplam fenolik madde içerikleri

Polen:su konsantrasyonu	Fermantasyondan önce toplam fenolik madde içeriği	Fermantasyondan sonra toplam fenolik madde içeriği	Sig (2-kuyruklu)
1:1	5,89±0,17 ^a	13,39±0,18 ^b	0,000
1:2	5,08±0,16 ^a	13,48±0,19 ^b	0,000
2:1	6,06±0,09 ^a	9,72±0,18 ^b	0,000
3:1	6,23±0,13 ^a	8,98±0,11 ^b	0,000
4:1	6,38±0,10 ^a	8,81±0,12 ^b	0,000

Sonuçlar mg GAE/g kuru madde olarak verilmiştir.

Farklı küçük harfler ile aynı satırda gösterilen ortalamalar arasında t-testine göre anlamlı farklılık vardır (p<0,05).

Starterli fermantasyona ait sindirim fraksiyonlarının toplam fenolik madde içerikleri Tablo 58’de gösterilmiştir.

1:1 polen:su oranı için starterli fermantasyon ile PG, IN ve OUT fraksiyonlarında TPC içeriğinde artış meydana geldiği belirlenmiştir. Bu artış IN fazı için 4,47 kat iken OUT fazı için 3,85 kat olarak bulunmuştur. 1:2 polen:su oranında ise fermantasyondan önce ve sonra PG fraksiyonunun TPC içeriğinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir (p>0,05). IN fazında 4,78 kat OUT fazında ise 4,70 kat artış belirlenmiştir. 2:1, 3:1, 4:1 polen:su oranlarında TPC içeriğinde meydana gelen artış IN fraksiyonu için sırasıyla 3,33 kat, 3,65 kat ve 3,18 kat iken OUT için artış 2,52 kat, 1,93 kat ve 1,82 kat olarak bulunmuştur.

Tablo 58. Farklı polen:su oranına sahip karışımların starterli fermantasyondan önce ve sonra sindirim fraksiyonlarına ait toplam fenolik madde içeriği verileri

Polen :su oranı	Fermantasyondan önce			Fermantasyondan sonra		
	PG	IN	OUT	PG	IN	OUT
1:1	5,35±0,28 ^e	0,36±0,08 ^a	0,94±0,16 ^b	6,14±0,20 ^f	1,61±0,07 ^c	3,62±0,03 ^d
1:2	6,22±0,34 ^e	0,36±0,05 ^a	0,79±0,03 ^b	5,80±0,43 ^e	1,72±0,23 ^c	3,71±0,09 ^d
2:1	5,86±0,22 ^e	0,42±0,01 ^a	0,91±0,03 ^b	7,64±0,20 ^f	1,40±0,02 ^c	2,29±0,05 ^d
3:1	7,72±0,51 ^d	0,46±0,07 ^a	0,92±0,09 ^b	8,18±0,12 ^e	1,68±0,07 ^c	1,78±0,03 ^c
4:1	6,23±0,19 ^d	0,39±0,06 ^a	1,03±0,04 ^b	6,17±0,11 ^d	1,24±0,09 ^b	1,88±0,10 ^c

Sonuçlar mg GAE/g kuru madde olarak verilmiştir.

^{a-f} Aynı satırdaki farklı küçük harfler ilgili polen:su oranlarında sindirim fraksiyonları arasındaki (PG, IN, OUT) anlamlı farklılıkları göstermektedir (p<0,05).

Starterli fermantasyonun tüm polen:su oranları için karışımların FRAP değerlerine etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup 1:1, 1:2, 2:1, 3:1 ve 4:1 polen:su oranları için FRAP değerleri fermantasyondan sonra sırasıyla 1,63 kat, 1,86 kat, 1,51 kat, 1,34 kat ve 1,20 kat artış göstermiştir (Tablo 59).

Tablo 59. Polen, su, bal karışımlarının starterli fermantasyonun başlangıcında ve sonunda demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) verileri

Polen:su konsantrasyonu	Fermantasyondan önce FRAP değeri	Fermantasyondan sonra FRAP değeri	Sig (2-kuyruklu)
1:1	19,01±0,29 ^a	31,08±0,93 ^b	0,000
1:2	18,80±0,44 ^a	34,94±0,76 ^b	0,000
2:1	21,33±0,34 ^a	32,21±0,64 ^b	0,000
3:1	23,77±0,57 ^a	31,89±0,56 ^b	0,000
4:1	23,86±0,37 ^a	28,73±0,17 ^b	0,000

Sonuçlar $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ kuru madde olarak verilmiştir.

Farklı küçük harfler ile aynı satırda gösterilen ortalamalar arasında t-testine göre anlamlı farklılık vardır ($p < 0,05$).

Starterli fermantasyon için sindirim fraksiyonlarının FRAP verileri Tablo 60'ta verilmiştir.

1:1, 1:2, 2:1 ve 3:1 polen:su oranları için starterli fermantasyondan sonra IN fraksiyonlarının demir (III) indirgeme antioksidan gücünde sırasıyla 1,87 kat, 2,51 kat, 1,82 kat, 1,54 kat artış tespit edilmiştir. 4:1 polen:su oranı için ise fermantasyondan önce ve sonra IN fraksiyonunun FRAP verileri arasında anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$).

OUT fraksiyonu için fermantasyondan sonra önemli artışlar meydana gelmiş olup 1:1, 1:2, 2:1, 3:1 ve 4:1 polen:su oranları için artışlar sırasıyla 2,14 kat, 2,39 kat, 2,11 kat, 1,64 kat ve 1,46 kat olarak belirlenmiştir.

Tablo 60. Farklı polen:su oranına sahip karışımların starterli fermantasyondan önce ve sonra sindirim fraksiyonlarına ait demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) verileri

Polen: su oranı	Fermantasyondan önce			Fermantasyondan sonra		
	PG	IN	OUT	PG	IN	OUT
1:1	17,42±0,72 ^e	1,86±0,33 ^a	3,44±0,14 ^b	15,27±0,50 ^d	3,48±0,36 ^b	7,35±0,27 ^c
1:2	21,32±0,83 ^e	1,70±0,27 ^a	3,68±0,24 ^b	17,24±0,53 ^d	4,27±0,43 ^b	8,80±0,29 ^c
2:1	20,78±0,16 ^e	2,22±0,05 ^a	3,57±0,05 ^b	29,68±0,29 ^f	4,04±0,16 ^c	7,53±0,14 ^d
3:1	23,56±0,61 ^d	2,63±0,30 ^a	3,96±0,15 ^b	27,94±0,24 ^e	4,05±0,08 ^b	6,48±0,08 ^c
4:1	20,64±0,23 ^d	2,06±0,19 ^a	4,40±0,21 ^b	21,35±0,41 ^d	2,14±0,38 ^a	6,45±0,19 ^c

Sonuçlar $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ kuru madde olarak verilmiştir.

^{a-f} Aynı satırdaki farklı küçük harfler ilgili polen:su oranlarında sindirim fraksiyonları arasındaki (PG, IN, OUT) anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).

Starterli fermantasyonda 1:1, 1:2, 3:1 ve 4:1 polen:su oranına sahip karışımların DPPH aktivitesinde anlamlı farklılıklar tespit edilmiş olup bu konsantrasyonların tamamı için SC_{50} değerleri fermantasyondan sonra azalma göstermiştir. 2:1 polen:su oranı için ise fermantasyondan önce ve sonra belirlenen DPPH aktivitesi istatistiksel olarak benzer bulunmuştur ($p>0,05$) (Tablo 61).

Tablo 61. Polen, su, bal karışımlarının starterli fermantasyonun başlangıcında ve sonunda DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalı süpürme aktivitesi

Polen:su konsantrasyonu	Fermantasyondan önce DPPH aktivitesi	Fermantasyondan sonra DPPH aktivitesi	Sig (2-kuyruklu)
1:1	18,87±0,13 ^b	10,97±0,17 ^a	0,000
1:2	20,93±0,60 ^b	14,56±0,06 ^a	0,003
2:1	14,05±0,06 ^a	13,57±0,02 ^a	0,086
3:1	12,61±0,18 ^b	8,45±0,07 ^a	0,000
4:1	13,26±0,06 ^b	7,56±0,03 ^a	0,000

Sonuçlar SC_{50} mg kuru ekstrakt/mL olarak verilmiştir.

Farklı küçük harfler ile aynı satırda gösterilen ortalamalar arasında t-testine göre anlamlı farklılık vardır ($p<0,05$).

Sindirim fraksiyonlarının DPPH verileri Tablo 62’de gösterilmiştir. Starterli fermantasyonun IN ve OUT fraksiyonlarının DPPH değerlerine etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 1:1 polen:su oranı için IN fraksiyonunun SC₅₀ değeri 1,77 kat, OUT fraksiyonunun ise 1,61 kat azalmış olup hem IN hem OUT fraksiyonlarında antioksidan aktivitede artış belirlenmiştir.

Tablo 62. Farklı polen:su oranına sahip karışımların starterli fermantasyondan önce ve sonra sindirim fraksiyonlarına ait DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali süpürme aktivitesi verileri

Polen:su oranı	Fermantasyondan önce			Fermantasyondan sonra		
	PG	IN	OUT	PG	IN	OUT
1:1	19,02±0,22 ^a	185,80±0,07 ^e	54,14±1,00 ^c	18,13±0,35 ^a	104,76±0,99 ^d	33,71±0,94 ^b
1:2	12,73±0,02 ^a	188,10±1,09 ^f	51,63±0,04 ^d	19,48±0,66 ^b	88,65±0,50 ^e	28,38±0,46 ^c
2:1	14,98±0,16 ^b	129,76±1,02 ^f	53,57±1,14 ^d	12,44±0,07 ^a	91,55±1,80 ^e	28,74±0,20 ^c
3:1	11,00±0,16 ^a	112,85±1,81 ^e	49,15±0,14 ^c	10,49±0,14 ^a	91,47±0,57 ^d	31,73±0,18 ^b
4:1	14,01±0,19 ^a	135,50±1,64 ^e	38,62±0,93 ^c	14,48±0,04 ^a	118,95±0,48 ^d	35,82±0,04 ^b

Sonuçlar SC₅₀ mg kuru ekstrakt/mL olarak verilmiştir.

^{a-f} Aynı satırdaki farklı küçük harfler ilgili polen:su oranlarında sindirim fraksiyonları arasındaki (PG, IN, OUT) anlamlı farklılıkları göstermektedir (p<0,05).

1:2 polen:su oranı için IN fraksiyonunda SC₅₀ değeri fermantasyondan sonra 2,12 kat OUT fraksiyonunda ise 1,82 kat azalmıştır. 2:1 polen:su oranı için IN ve OUT fraksiyonlarında SC₅₀ değerlerindeki azalmalar sırasıyla 1,42 kat ve 1,86 kat olarak belirlenmiştir. 3:1 polen:su oranında IN fraksiyonunda SC₅₀ değeri 1,23 kat azalırken 4:1 için 1,14 kat azalmıştır. OUT fraksiyonunda ise 3:1 ve 4:1 polen:su oranı için sırasıyla 1,55 kat ve 1,08 kat olarak bulunmuş olup SC₅₀ değerlerindeki tüm bu değişimler istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05).

3.10.3.3. *L. kunkei* İnokülasyonu ile Üretilen Örneklerin Fenolik Madde Profili

Starterli fermantasyona tabi tutulan polen, su, bal karışımlarının fenolik madde kompozisyonundaki değişim Tablo 63’te gösterilmiştir.

L. kunkei inokülasyonu ile fermantasyon ile çalışılan tüm polen:su konsantrasyonları için *p*-kumarik konsantrasyonunda artış sağlanmıştır.

Tablo 63. Starterli fermantasyona tabi tutulan karışımların fenolik madde profili

Fenolik bileşen (µg/g kuru madde)					
Gallik asit					
Polen:su konsantrasyonu	1:1	1:2	2:1	3:1	4:1
Başlangıç	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fermantasyondan sonra	7,89	<LOD	<LOD	<LOD	5,13
Protokatekuik asit					
Başlangıç	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fermantasyondan sonra	9,84	47,04	<LOD	<LOD	<LOD
<i>p</i> -OH benzoik asit					
Başlangıç	32,37	33,94	39,91	37,35	36,98
Fermantasyondan sonra	37,61	45,78	23,64	47,51	32,37
Epikateşin					
Başlangıç	41,44	37,06	40,89	40,49	40,04
Fermantasyondan sonra	32,06	<LOD	56,86	16,99	17,65
Şiringik asit					
Başlangıç	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fermantasyondan sonra	<LOD	<LOD	<LOD	30,03	43,56
Kafeik asit					
Başlangıç	15,53	15,12	16,06	15,49	13,58
Fermantasyondan sonra	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Rutin					
Başlangıç	7,48	8,66	10,03	10,66	11,76
Fermantasyondan sonra	11,89	<LOD	4,25	2,46	4,40
<i>p</i> -kumarik asit					
Başlangıç	29,82	23,71	28,90	32,97	33,85
Fermantasyondan sonra	57,10	67,41	71,20	63,27	42,56
Ferulik asit					
Başlangıç	3,57	4,83	3,37	4,82	5,05
Fermantasyondan sonra	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<i>t</i> -sinnamik asit					
Başlangıç	3,57	2,84	2,94	3,41	3,26
Fermantasyondan sonra	5,36	<LOD	5,31	5,66	2,33

<LOD: İlgili standart gözlenebilme limitinin altında bulunmuştur.

Başlangıçta polen, su, bal karışımlarında gözlenebilme limitinin altında bulunan gallik asit konsantrasyonu fermantasyondan sonra 1:1 ve 4:1 polen:su konsantrasyonlarına sahip karışımlarda sırasıyla 7,89 µg/g kuru madde ve 5,13 µg/g kuru madde olarak belirlenmiştir. Protokatekuik asit ise starterli fermantasyondan sonra 1:1 polen:su oranı için 9,84 µg/g kuru madde iken 1:2 polen:su oranı için 47,04 µg/g kuru madde bulunmuş, LAB inokülasyonu ile bu fenolik bileşende artış görülmüştür.

Kafeik asit ve ferulik asit çalışılan tüm polen:su konsantrasyonları için fermantasyondan sonra tespit edilememiştir. Rutin konsantrasyonu 1:1 polen:su oranında starterli fermantasyon ile artarken diğer konsantrasyonlar için bu bileşenin miktarında azalmalar meydana gelmiştir. Epikateşin konsantrasyonu ise 2:1 polen:su oranı hariç azalmıştır. Başlangıçta düşük miktarda bulunan *t*-sinnamik asit 1:1, 2:1 ve 3:1 polen:su oranları için artarken 1:2 ve 4:1 polen:su oranlarına sahip karışımlarda *t*-sinnamik asit içeriğinin azaldığı belirlenmiştir.

3.11. Farklı Yöntemle Fermente Edilen Karışımların Biyoerişilebilirlik İndeksi ve Geri Kazanım Verileri

Spontan fermantasyon, kovan içi fermantasyon ve starterli fermantasyonun polen, su, bal karışımlarının biyoyararlılığı üzerine etkisinin tespit edilebilmesini adına çalışılan tüm polen:su oranları için fermantasyondan önce ve sonra fenolik madde biyoerişilebilirlik indeksi hesaplanmıştır. Fenolik madde biyoerişilebilirliğine yönelik veriler Tablo 64'te geri kazanıma yönelik veriler ise Tablo 65'te verilmiştir.

1:1 polen:su oranı için spontan fermantasyon biyoerişilebilirlik indeksleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). Starterli fermantasyonda ise fermantasyon öncesi %22,07 olan biyoerişilebilirlik indeksi artarak fermantasyondan sonra %39,06'ya ulaşmıştır. 1:2, 2:1, 3:1 ve 4:1 polen:su oranı için her üç fermantasyon metodu da biyoerişilebilirlik indeksi verilerinde artışa neden olmuştur. Ayrıca en yüksek biyoerişilebilirlik indeksleri starterli fermantasyon ile sağlanmıştır.

Aynı fermantasyon metodu için farklı polen:su oranlarının biyoerişilebilirlik indeksindeki farklılıklar incelendiğinde ise spontan fermantasyonda 1:1 ve 1:2 polen:su oranlarının fermantasyondan sonraki biyoerişilebilirlik indeksi verileri istatistiksel olarak benzer bulunmuştur ($p>0,05$). En yüksek biyoerişilebilirlik indekslerinin ise 2:1 ve 3:1

polen:su oranına sahip karışımlara ait olduğu ve sırasıyla %32,64 ve %33,10 olduğu görülmüştür.

Kovan içi fermantasyonda 3:1 ve 4:1 polen:su oranı için biyoerişilebilirlik indeksleri istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($p<0,05$). 3:1 polen:su oranı için kovan içi fermantasyondan sonra biyoerişilebilirlik indeksi %30,61 iken 4:1 polen:su oranı için %27,53'tür.

Starterli fermantasyonda polen:su oranlarındaki farklılıkların biyoerişilebilirlik indekslerinde anlamlı bir farklılığa neden olduğu belirlenmiştir. En düşük biyoerişilebilirlik indeksi %35,41 ile 4:1 polen:su oranına aittir. En yüksek biyoerişilebilirlik indeksi ise %40,28 olarak 1:2 polen:su oranına ait karışım için hesaplanmıştır.

Tablo 64. Farklı yöntemlerle fermente edilen karışımların fenolik madde biyoerişilebilirlik indeksi verileri

Polen:su oranı	Fermantasyondan önce BI (%)	Fermantasyondan sonra BI (%)		
		Spontan fermantasyon	Kovan içi fermantasyon	Starterli fermantasyon
1:1	22,07±0,97 ^{aA}	24,20±0,12 ^{aA}		39,06±0,56 ^{bC}
1:2	22,64±0,73 ^{aA}	23,87±0,24 ^{bA}		40,28±0,58 ^{cD}
2:1	21,95±0,34 ^{aA}	32,64±0,96 ^{bC}		37,96±0,70 ^{cB}
3:1	22,15±0,38 ^{aA}	33,10±0,43 ^{cC}	30,61±0,28 ^{bB}	38,53±0,47 ^{dBC}
4:1	22,26±0,35 ^{aA}	30,89±0,57 ^{cB}	27,53±0,43 ^{bA}	35,41±0,46 ^{dA}

^{a-d} Aynı satırdaki farklı küçük harfler farklı fermantasyon yöntemlerine ait biyoerişilebilirlik indeksleri arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

^{A-D} Aynı sütundaki farklı büyük harfler bir fermantasyon metodu için farklı polen:su oranlarının biyoerişilebilirlik indeksleri arasındaki farklılığı simgelemektedir. Sütun bazlı değerlendirme tüm fermantasyon yöntemleri için Duncan metodu ile yapılmıştır. Yalnızca kovan içi fermantasyonda iki konsantrasyonda çalışıldığından kıyaslama için t-testi kullanılmıştır.

1:1 polen:su oranı için fermantasyondan önce %6,11 olarak belirlenen fenolik madde geri kazanımı artarak spontan fermantasyonda %8,66, starterli fermantasyonda ise %12,02'ye ulaşmıştır. 1:2 polen:su oranında fermantasyon ile geri kazanım oranı hem spontan fermantasyonda hem de starterli fermantasyonda artış göstermiş olup starterli

fermantasyonda spontan fermentasyondan daha yüksektir. 2:1 polen:su oranında ise spontan fermentasyon için geri kazanım %19,04 starterli fermentasyon için ise %14,40 olarak bulunmuştur. 3:1 polen:su oranında geri kazanım bakımından starterli fermentasyon spontan fermentasyondan daha üstündür. 4:1 polen:su oranı için ise spontan fermentasyon için geri kazanım %19,27 iken starterli fermentasyonda bu polen:su oranında %14,07'dir.

Tablo 65. Farklı yöntemlerle fermente edilen karışımların fenolik madde geri kazanım (%) verileri

Polen:su oranı	Fermentasyondan önce (%)	Fermentasyondan sonra (%)		
		Spontan fermentasyon	Kovan içi fermentasyon	Starterli fermentasyon
1:1	6,11±0,18 ^{aA}	8,66±0,11 ^{bA}		12,02±0,17 ^{cA}
1:2	7,09±0,19 ^{aB}	9,85±0,08 ^{bB}		12,76±0,18 ^{cB}
2:1	6,94±0,10 ^{aB}	19,04±0,73 ^{cD}		14,40±0,26 ^{bC}
3:1	7,38±0,16 ^{aC}	18,13±0,23 ^{cC}	14,55±0,13 ^{bB}	18,71±0,22 ^{dD}
4:1	6,11±0,09 ^{aA}	19,27±0,36 ^{dD}	7,14±0,11 ^{bA}	14,07±0,19 ^{cC}

^{a-d} Aynı satırdaki farklı küçük harfler farklı fermentasyon yöntemlerine ait geri kazanım verileri arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

^{A-D} Aynı sütundaki farklı büyük harfler bir fermentasyon metodu için farklı polen:su oranlarının geri kazanım verileri arasındaki farklılığı simgelemektedir. Sütun bazlı değerlendirme tüm fermentasyon yöntemleri için Duncan metodu ile yapılmıştır. Yalnızca kovan içi fermentasyonda iki konsantrasyonda çalışıldığından kıyaslama için t-testi kullanılmıştır.

Aynı fermentasyon metodu için farklı polen:su oranlarının geri kazanıma etkisi incelendiğinde spontan fermentasyonda en yüksek geri kazanım 2:1 ve 4:1 polen:su oranlarına aittir. Kovan içi fermentasyonda 3:1 polen:su oranında 4:1 polen:su oranından daha yüksek fenolik madde geri kazanımı tespit edilmiştir. Starterli fermentasyonda ise 3:1 polen:su oranındaki fenolik madde geri kazanımı diğer polen:su oranlarından belirgin olarak daha yüksektir ($p<0,05$).

Polen, su, bal karışımlarının FRAP biyoerişilebilirlik indeksi verileri Tablo 66'da verilmiştir. 1:1 polen:su oranı için fermentasyon ile FRAP biyoerişilebilirlik indeksi artmış fermentasyondan önce %27,88 iken spontan fermentasyondan sonra %30,32 starterli fermentasyondan sonra ise %34,84 olarak belirlenmiştir.

Tablo 66. Farklı yöntemlerle fermente edilen karışımların demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) biyoerişilebilirlik indeksi verileri

Polen:su oranı	Fermantasyondan önce BI (%)	Fermantasyondan sonra BI (%)		
		Spontan fermantasyon	Kovan içi fermantasyon	Starterli fermantasyon
1:1	27,88±0,42 ^{aA}	30,32±0,70 ^{bA}		34,84±0,96 ^{cC}
1:2	28,62±0,68 ^{aA}	30,09±0,21 ^{aA}		37,41±0,98 ^{bD}
2:1	27,14±0,44 ^{aA}	33,44±0,31 ^{bC}		35,92±0,71 ^{cC}
3:1	27,72±0,67 ^{aA}	32,61±0,30 ^{bB}	33,89±0,30 ^{cB}	33,02±0,58 ^{bCB}
4:1	27,07±0,42 ^{aA}	32,00±0,30 ^{cB}	27,21±0,27 ^{aA}	29,90±0,18 ^{bA}

^{a-c} Aynı satırdaki farklı küçük harfler farklı fermantasyon yöntemlerine ait FRAP biyoerişilebilirlik indeksi verileri arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

^{A-D} Aynı sütundaki farklı büyük harfler bir fermantasyon metodu için farklı polen:su oranlarının FRAP biyoerişilebilirlik indeksleri arasındaki farklılığı simgelemektedir. Sütun bazlı değerlendirme tüm fermantasyon yöntemleri için Duncan metodu ile yapılmıştır. Yalnızca kovan içi fermantasyonda iki konsantrasyonda çalışıldığından kıyaslama için t-testi kullanılmıştır.

1:2 polen:su oranı için spontan fermantasyon FRAP biyoerişilebilirlik indeksinde herhangi bir farklılığa neden olmamıştır. Starterli fermantasyonda ise %28,62'den %37,41'e yükselmiştir. 2:1 polen:su oranında hem spontan fermantasyonda hem de starterli fermantasyonda FRAP biyoerişilebilirlik indeksi artış göstermiştir. 3:1 polen:su oranında en yüksek FRAP biyoerişilebilirlik indeksi kovan içi fermantasyona ve starterli fermantasyona aittir. 4:1 polen:su oranı için ise kovan içi fermantasyonda FRAP biyoerişilebilirlik indeksinde anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Starterli fermantasyonda %29,90 spontan fermantasyonda ise %32,00 olarak bulunmuştur.

Aynı fermantasyon metodu için farklı polen:su oranlarının FRAP biyoerişilebilirlik indeksi verileri incelendiğinde en yüksek FRAP biyoerişilebilirlik indeksleri spontan fermantasyonda 2:1 polen:su oranına (%33,44), kovan içi fermantasyonda 3:1 polen:su oranına (%33,89), starterli fermantasyonda ise 1:2 polen:su oranına (%37,41) aittir.

Farklı fermantasyon metodlarına ait FRAP geri kazanım verileri Tablo 67'de gösterilmiştir. Tüm polen:su oranları için fermantasyonun FRAP geri kazanımına etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Ayrıca fermantasyon metoduna bağlı

olarak FRAP geri kazanımı da değişiklik göstermektedir. Yalnızca 1:2 polen:su oranı için spontan fermantasyon ile starterli fermantasyon arasında belirgin bir farklılık olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$).

Tablo 67. Farklı yöntemlerle fermente edilen karışımların demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) geri kazanım verileri

Polen:su oranı	Fermantasyondan önce (%)	Fermantasyondan sonra (%)		
		Spontan fermantasyon	Kovan içi fermantasyon	Starterli fermantasyon
1:1	9,78±0,14 ^{aC}	13,16±0,31 ^{cC}		11,20±0,37 ^{bB}
1:2	9,04±0,21 ^{aB}	12,55±0,09 ^{bB}		12,22±0,39 ^{bC}
2:1	10,41±0,27 ^{aD}	13,35±0,09 ^{cC}		12,54±0,25 ^{bC}
3:1	11,06±0,27 ^{aE}	12,20±0,11 ^{bA}	15,15±0,14 ^{dB}	12,70±0,22 ^{cC}
4:1	8,63±0,13 ^{bA}	12,68±0,14 ^{dB}	10,60±0,10 ^{cA}	7,45±0,04 ^{aA}

^{a-d} Aynı satırdaki farklı küçük harfler farklı fermantasyon yöntemlerine ait FRAP geri kazanım verileri arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

^{A-E} Aynı sütundaki farklı büyük harfler bir fermantasyon metodu için farklı polen:su oranlarının FRAP geri kazanım verileri arasındaki farklılığı simgelemektedir. Sütun bazlı değerlendirme tüm fermantasyon yöntemleri için Duncan metodu ile yapılmıştır. Yalnızca kovan içi fermantasyonda iki konsantrasyonda çalışıldığından kıyaslama için t-testi kullanılmıştır.

4. TARTIŞMA

4.1. Polen ve Arı Ekmeklerinin Fizikokimyasal Özellikleri

Arı ekmeği genel olarak fermente bir ürün olması ve bu nedenle içerdiği yüksek laktik asit nedeniyle polene kıyasla daha stabil ürün olarak değerlendirilmektedir. Ancak fermantasyon tamamlandıktan sonra bile uygun olmayan nem içeriği ve su aktivitesi değerleri, arı ekmeğinin mikrobiyal stabilitesini olumsuz etkileyebilmektedir. Anadolu arı ekmeğinin besleyici ve antioksidan özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada Van, Muğla, Sivas, Kırşehir illerinden nisan-eylül aylarında 2018 yılında toplanan arı ekmeği örneklerinin nem içeriğinin %10,13 ile %18,10 aralığında değiştiği belirlenmiştir (Beykaya vd., 2021). Bu çalışmada bölge farklılığının örneklerin nem içeriğine etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup Muğla ilinde bulunan farklı kovanlardan alınan arı ekmeklerinin nem içeriklerinde de belirgin farklılıklar tespit edilmiştir. Bir diğer çalışmada Adana'dan toplanan arı ekmeklerinin nem içeriği %15,82-%16,43; Mersin'den toplanan örneklerin nem içeriği ise %11,01-%12,34 aralığında bulunmuş ve benzer şekilde örneklerin nem içeriklerinde belirgin farklılıklar olduğu bildirilmiştir (Kaplan vd., 2019). Bu tez çalışmasında aynı lokasyonda bulunan aynı kovanlardan belirli aralıklarla polen ve arı ekmeği hasadı yapılması nedeniyle aynı hasat periyodu için polen ve arı ekmeğinin nem içeriğinin kıyaslamasının yapılabilmesi mümkün kılınmıştır. Van, Muğla, Sivas, Kırşehir gibi farklı iklim koşullarının görüldüğü bölgelerden toplanan arı ekmeğinin nem içeriğinin bu tez çalışmasında polen (%10,41-%13,28) ve arı ekmeği için belirlenen (%10,23-%14,04) nem değerlerinden daha geniş bir aralıkta değişim göstermesi numune toplama koşulları bakımından olası bir sonuçtur. Ankara, Bursa, Kırklareli ve Rize'de bulunan arılıklardan 6 ay boyunca 15 gün aralıklarla polen ve arı ekmeklerinin hasat edilip bu örneklerin fenolik madde içeriklerinin ve antioksidan aktivitelerinin tespit edildiği bir çalışmada Ankara'dan aynı kovanlardan toplanan polen ve arı ekmeği hariç diğer üç bölge için polen ve arı ekmeğinin nem içerikleri arasında anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir. Bursa poleninin nem içeriğinin Bursa arı ekmeğinden ve benzer şekilde Kırklareli poleninin nem içeriğinin Kırklareli arı ekmeğinden daha düşük olduğu belirlenmiştir. Rize için ise diğerlerinden farklı olarak polenin nem içeriği aynı kovandan alınan arı ekmeğinden daha yüksektir (Mayda vd., 2020).

Bu tez çalışması kapsamında kovanlardan toplanan örneklerin nem içeriklerindeki farklılıklar kovanların bulunduğu bölgenin yağış koşulları ile ilişkilendirildiğinde hasat periyodu açısından en yüksek aylık toplam yağış miktarı ortalamasına ekim ayının sahip olduğu görülmektedir. Yüksek yağış toplanan örneklerin nem içeriğiyle paralellik göstermiş olup ekim arı ekmeği %14,04 nem ile en yüksek nem içeriğine sahip üründür. Temmuz ayında hasat edilen polen ve arı ekmeğinin nem içeriği diğer örneklerden düşük bulunmuştur. Bu sonuç özellikle kovanların bulunduğu bölgede temmuz ayının ortalama aylık yağış miktarının diğer aylardan önemli derecede düşük olması ile açıklanabilmektedir (URL-4, 2022).

Mineral içeriği ile ilişkili bir parametre olan kül miktarı polen örneklerinde arı ekmeğinden daha yüksek bulunmuştur. Karadeniz bölgesinden toplanan arı polenine yönelik bir çalışmada Trabzon, Zonguldak ve Giresun illerinden toplanan polenlerin kuru maddede kül içerikleri %2,23-3,03 aralığında bulunmuş olup (Yıldız, 2011) bu tez çalışmasında polenler için kuru maddede kül içeriği %3,19 ile %3,50 aralığında değişmektedir. Adana ve Mersin'den toplanan beş arı ekmeği örneği için kül içeriği yaş temelde %1,86 ile %2,42 aralığında bulunmuştur. Belirtilen çalışmadaki örneklerin nem içeriği göz önünde bulundurulduğunda arı ekmeklerinin kül içeriği kuru temelde %2,22-%2,76 aralığına denk gelmektedir (Kaplan vd., 2019). Bu aralık tez çalışmasında arı ekmekleri için tespit edilen %2,05-%2,28 kuru maddede kül içeriği ile uyumludur. Aynı hasat periyodunda kovanlardan alınan polen ve arı ekmeklerinin kül içerikleri kıyaslandığında polen örneklerinin kül içeriğinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Kül miktarında arı ekmeği örneklerinde meydana gelen azalma fermentasyonda rol alan mikroflora tarafından polenin mineral içeriğinin metabolik faaliyetlerde kullanılması ile ilişkili olabilir. Nitekim literatürde farklı gıda fermentasyonlarında rol oynayan mikroorganizmaların fermentasyon sürecinde ilgili ürünün mineral içeriğinden yararlanması ve kül miktarındaki azalma ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Tropea vd., 2021).

Polen ve arı ekmeğine yönelik pH, titrasyon asitliği değerlendirmesi yapılırken genellikle mevcut kaynaklar polenin laktik asit fermentasyonu ile arı ekmeğine dönüşüm prosesinde laktik asit oluşumuna bağlı olarak arı ekmeğinin daha asidik karakter kazandığını ve düşük pH-yüksek laktik asit içeriği nedeniyle arı ekmeğinin mikrobiyal açıdan daha stabil bir gıda olduğu üzerinde durmaktadır (Nagai vd., 2004). Çalışmalarda polenin pH değerinin toplandığı bölge, iklim koşulları, arı türü gibi faktörlere bağlı olarak 3,8-6,3 gibi oldukça

geniş bir aralıkta değişiklik gösterdiği (Barene vd., 2015) olgunlaşmış arı ekmeğinde ise pH'ın laktik asit üretimine bağlı olarak 3,5-4,2 seviyesine düştüğü (Isidorov vd., 2009) belirtilmektedir. Bununla birlikte aynı kovanlardan belirli aralıklarla polen ve arı ekmeği hasadının yapıp bu örneklerin pH, asitlik kıyaslamasının yapıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında aynı kovanlardan toplanan mayıs poleninin pH değeri mayıs arı ekmeğinden daha düşüktür. Ayrıca mayıs poleninin titrasyon asitliği mayıs arı ekmeğinden daha yüksek bulunmuştur. Haziranda hasat edilen arı ekmeğinin pH değeri ise haziran poleninden daha yüksek iken titrasyon asitliği bakımından polenin üstün olduğu görülmüştür. Dolayısıyla hasat periyodunun ilk dönemlerinde arı ekmeği için tespit edilen titrasyon asitliği değerleri laktik asit fermantasyonu sonucunda beklenen asitlik artışı değerlerini yansıtmamaktadır. Titrasyon asitliği ve pH gıda analizlerinde sıklıkla kullanılan birbiri ile ilişkili iki kavramdır. Örneğin, bir mikroorganizmanın belirli bir gıdada büyüme yeteneğini değerlendirmek için pH önemli bir faktör olarak değerlendirilirken, titre edilebilir asitlik, gıdadaki organik asitlerin dolayısıyla ürünün duyuşal özelliklerinin daha iyi bir ölçütüdür. Tamamen iyonlaşan kuvvetli asitlerin aksine, gıda asitleri sadece kısmen iyonize olurlar. Gıdaların bazı özellikleri yalnızca asit moleküllerinin iyonize olma durumundan bazı özellikleri ise toplam asit içeriğinden etkilenmektedir (Sadler ve Murphy, 2010). Temmuz ayında toplanan polen ve arı ekmeği örneklerinin pH değeri istatistiksel olarak benzer iken temmuz ve ağustos polenlerinin ilgili ayların arı ekmeklerinden daha yüksek titrasyon asitliğine sahip olma durumu devam etmiştir. Ağustos ayında hasat edilen polen ile temmuz poleninin laktik asit içeriği istatistiksel olarak benzerdir ($p>0,05$). Ekim ayında nihai ürün olarak hasat edilen arı ekmeği en düşük pH (3,54) ve en yüksek titrasyon asitliği (%4,39) değerlerine sahiptir. Kovandan alınan arı ekmeklerinin hasat periyodu ilerledikçe pH değerinin düştüğü ve titrasyon asitliğinin arttığı belirlenmiştir.

4.2. Polen ve Arı Ekmeklerinin Biyoaktif Özellikleri

Polifenollerin çözünürlük/ayrılma özellikleri bu bileşenlerin yapısal farklılıklarından etkilenmektedir. Herhangi bir fenolik bileşenin yapısal özelliği polaritesi, konjugasyonu, örnek matriksiyle etkileşimi üzerine önemli bir etkiye sahiptir. Fenolik bileşiklerin stabilitesi oldukça değişken olup bazı fenolik bileşikler birçok koşulda stabil iken bazıları oksidasyona eğilimli, bazıları ısıya dayanıklı iken bazıları uçucu özellik göstermektedir. Polifenollerin kaynağından geri kazanılması, çoğu gıda ve bitkide yüksek düzeyde enzim aktivitesi

nedeniyle oldukça meşakkatli bir prosestir. Bu nedenle, hedef bileşiklerin kimyasal değişimini önlemek için ekstraksiyon işleminin seçimi önem taşımaktadır (Bohlin, 1998; Robards, 2003; Alara vd., 2021). Baldan propolise, polenden arı ekmeğine arı ürünlerine yönelik ekstraksiyon çalışmaları incelendiğinde birçok araştırmada çözücü olarak genellikle etanol, metanol vb. organik çözücülerin kullanıldığı görülmektedir. Bu tez çalışmasında ise polen ve arı ekmeği için sindirim sisteminde sulu ekstraktlar esas olduğundan çözücü olarak su kullanılmıştır.

Ankara, Bursa, Kırklareli ve Rize’de bulunan arılıklardan 6 ay boyunca 15 gün aralıklarla polen ve arı ekmeklerinin hasat edilip bu örneklerin fenolik madde içeriklerinin ve antioksidan aktivitelerinin tespit edildiği bir çalışmada etanolik polen ve arı ekmeği ekstraktları hazırlanmıştır. Ankara Beytepe’ye ait polen örneği için TPC 30,933 mg GAE/g aynı arılıktaki arı ekmeği için ise 9,220 mg GAE/g olarak bulunmuştur. Sırasıyla Ankara Kahramankazan poleni, arı ekmeği; Bursa Cumalıkızık poleni, arı ekmeği; Kırklareli Çağlayık poleni, arı ekmeği; Rize Kaplıca köyü poleni, arı ekmeği için 41,370, 11,11; 26,69, 8,26; 35,99, 12,71; 43,32, 11,75 mg GAE/g olarak verilmiştir. Bu çalışmada analiz edilen tüm bölgeler için polenin fenolik madde içeriği aynı kovanlardan alınan arı ekmeğinden daha yüksek bulunmuştur (Mayda vd., 2020).

Bu tez çalışmasında Mayda vd. (2020) tarafından yapılan araştırmaya benzer olarak mayıs, haziran, temmuz ve ağustosta toplanan polen örneklerinin toplam fenolik madde içeriği karşılık gelen ayda toplanan arı ekmeği örneğinden daha yüksektir. Bir diğer önemli nokta ise tüm arı ekmeklerinin TPC içeriğinde hasat periyodu ilerledikçe belirgin bir artış meydana gelmesidir. LAB metabolizması, fenoliklerin gallik, kinik, kafeik, *p*-kumarik, ferulik, dihidrokafeik, dihidroferulik asit, vinil katekol, vinilguaiakol gibi fenolik asitlere deesterifikasyonunu, hidrolizini veya dönüşümünü içerir ve buna organik asitlerde bir artış eşlik eder (Filannino vd., 2018). Bu nedenle, LAB ile fermente edilmiş birçok gıdada fenolik madde içeriğinde, antioksidan aktivitede artış bildirilmiştir (Khubber vd., 2022). Fenolik madde içeriğine benzer şekilde bu sonuç FRAP ve DPPH metotları ile belirlenen antioksidan aktivite içeriklerinde de görülmüştür. Mayıs ve temmuz aylarında polenin FRAP değeri aynı hasat periyodundaki arı ekmeğinden yüksek bulunurken ağustos ayında polen ve arı ekmeğinin FRAP değeri istatistiksel olarak benzerdir ($p>0,05$). Kovanlardan alınan tüm arı ekmeklerinin FRAP değerleri arasında anlamlı farklılıklar tespit edilmiş ve TPC içeriğine benzer şekilde hasat periyodu ilerledikçe antioksidan aktivitede artış görülmüştür.

4.3. Polen ve Arı Ekmeklerinin Protein İçerikleri

Proteinler, polende karbohidratlardan sonra en fazla bulunan bileşendir (Thakur ve Nanda, 2020). Arı polenin protein içeriğinin botanik orijinine bağlı olarak %2,5-61 gibi oldukça geniş bir aralıkta değişim gösterdiği bildirilmiştir (Campos vd., 2010). Arı ürünlerinde tespit edilen protein miktarı kullanılan analitik metoda göre de değişiklik göstermektedir. Bu tez çalışmasında Bradford metodu kullanılarak polenlerin suda çözünür protein içeriği 94,90 mg/g kuru madde ile 78,38 mg/g kuru madde aralığında, arı ekmeklerinin ise 76,28 mg/g kuru madde ile 79,77 mg/g kuru madde aralığında bulunmuştur. Hasat periyodunun mayıs ve haziran olmak üzere ilk iyi ayında kovanlardan toplanan polenlerin Bradford metodu ile tespit edilen protein içeriği ilgili aydaki arı ekmeğinden daha yüksek bulunmuştur. Benzer şekilde Mayda vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada da aynı kovanlardan alınan polenin protein içeriği arı ekmeğinden yüksektir. Temmuz ve ağustos ayları için ise toplananan tüm polen ve arı ekmeklerinin protein içerikleri istatistiksel olarak benzer olup ($p>0,05$) aynı durum ekim arı ekmeği için de geçerlidir. Dolayısıyla hasat periyodu ilerledikçe kovanlardan hasat edilen arı ekmeği örneklerinin protein içeriklerinde anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir.

Mevcut çalışmalarda arı ekmeğinin arı poleninden daha az protein içerdiği ancak arı ekmeği proteinlerinin sindiriminin daha kolay olduğu bildirilmiş olup (Saa-Otero vd., 2000) polen ve arı ekmeğinin protein sindirilebilirliği ile ilgili karşılaştırmalara *in vitro* sindirim sonuçlarında değinilmiştir.

4.4. Polen ve Arı Ekmeklerinin Simüle Gastrointestinal Sindirim Koşullarında Biyoerişilebilirliği

Biyoaktif bileşiklerin gastrointestinal sistemdeki davranışının ortaya konulması söz konusu ürünün vücutta beklenen olumlu etkileri yaratıp yaratmadığının tespiti açısından önem taşımaktadır. Bitkilerde bulunan yaklaşık sekiz bin fitokimyasalın polariteleri, moleküler ağırlıkları, kimyasal yapılarındaki farklılıklar sindirim sürecini farklı şekillerde etkilemektedir (Schulz vd., 2017).

Polifenoller gıdalarda esas olarak serbest formda olmayıp esterler, glikozitler ve bu doğal formlarda emilemeyen ve dolayısıyla sindirim sistemi enzimleri veya bağırsak mikrobiyotası tarafından hidroliz gerektiren polimer formunda bulunmaktadır. Tüm

polifenollerden sadece aglikonlar yüksek oranda lipofilik olduklarından biyolojik membranlardan geçebilmektedirler. Polifenollerin biyoyararlılığını etkileyen bir diğer faktör gıda matriksinin yapısıdır. Sindirilebilirliklerini doğrudan etkileyecek şekilde karbohidrat, protein gibi bazı gıda bileşenleri ile interaksyona girebilirler. Diğer önemli faktörler ise pH, safra tuzlarının varlığı gibi sindirim sistemi koşullarıdır (Manach vd., 2004).

Fenolik bileşikler ve proteinler arasındaki etkileşimler iki açıdan incelenmelidir. Bunlardan birincisi, fenolik bileşiklerle etkileşimin proteinlerin fizikokimyasal özelliklerinde değişikliklere neden olmasıdır. Bu tür komplekslerin oluşumu, proteinlerin çözünürlüklerini, termal kararlılıklarını ve sindirilebilirliklerini değiştirerek besin değerinde, teknolojik değerde, enzimatik aktivitede ve diğer biyolojik etkilerde azalmaya yol açabilmektedir (Kroll vd., 2003; Tomás-Barberán ve Andrés-Lacueva, 2012; Ozdal vd., 2013). İkincisi ise proteinlerle kompleks oluşumunun fenolik bileşenlerin antioksidan özelliklerini maskeleyerek aktivitelerini önemli ölçüde azaltabilecek olmasıdır (Ozdal vd., 2013; Gonzales vd., 2015).

Bu tez çalışmasında *in vitro* sindirim koşullarında polen ve arı ekmeği örneklerinin fenolik madde içeriklerindeki değişimin incelendiği örneklerin tamamında mide sindirimi sonrası (PG) fenolik madde içeriğinde önemli ölçüde azalmalar tespit edilmiştir. PG fazında fenolik madde içeriğindeki azalmalar %76 ile %95 arasında değişiklik göstermektedir. Bu azalmalar midede *in vitro* koşullarda sağlanan düşük pH nedeniyle fenolik bileşenlerde meydana gelen yapısal değişiklikler ve protein komplekslerinin oluşumu ile ilişkilendirilebilir. Nitekim mevcut çalışmalarda farklı pH değerlerinde fenolik bileşiklerin yapısal ve çözünürlük özelliklerindeki değişikliklere ek olarak ilgili değişikliklerin protein komplekslerinin oluşumuna da yol açabileceği bildirilmiştir (Stojadinovic vd., 2013). Literatürde gastrointestinal sistemin simülasyonu ile *in vitro* sindirim prosesi sonucunda çeşitli bitki ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriğinde önemli düşüşler meydana geldiği rapor edilmiştir (Siracusa vd., 2011; Wong vd., 2014). Bununla birlikte, fenolik madde içeriğinin intestinal fazdan sonra azaldığını, gastrik fazda ise arttığını veya stabil kaldığını gösteren araştırmalar da mevcuttur (Chiang vd., 2013). Bu fark, *in vitro* sindirim metodundaki farklılıktan veya doğrudan çalışılan numunenin kendisinden kaynaklanmaktadır (Celep vd., 2015). Özellikle polen ve arı ekmeği gibi kompleks arı ürünlerinin yapısı düşünüldüğünde mide koşullarında polifenollerin protein ve diyet lifi ile interaksyonları tespit edilen azalmalar ile ilişkili olabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalar,

polifenollerin diyet lifi ile etkileşimleri nedeniyle asidik mide koşullarına karşı fiziksel bir bariyer oluşturdıklarını, bu etkileşimlere ek olarak hücre duvarlarının güçlü yapısı bağırsak aşamasında emilimini engellediğini göstermektedir. Ancak sindirilemeyen fraksiyonda kalmaları olarak ifade edilen bu durum polifenollerin insan sağlığına etkileri olan çeşitli metabolitlerin üretimi için yararlı etkiler sağlamasına olanak vermektedir (Domínguez-Avila vd., 2017).

Seruma geçen fraksiyonu temsil eden (IN) fazında elde edilen fenolik madde içeriklerine bakıldığında temmuz arı ekmeği hariç analiz edilen tüm polen ve arı ekmeği örnekleri için PG ve OUT fraksiyonlarından çok daha düşük TPC belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuç Türkiye’den 9 polen, İspanya’dan 2 polen örneğine *in vitro* sindirim uygulaması yapılan Yesiltas vd. (2014) tarafından yapılan çalışma ile de uyumludur. Temmuz arı ekmeğinin IN ve OUT fraksiyonlarının fenolik madde içeriği benzer bulunmuş olup diğer tüm örnekler için pasif difüzyon ile dolaşım sistemine geçen fraksiyon ile (IN) gastrointestinal sistemde kalan (OUT) fraksiyonların fenolik madde içeriği birbirinden farklı bulunmuştur.

Analiz edilen ürünlerin fenolik madde biyoerişilebilirlikleri karşılaştırıldığında haziran arı ekmeği hariç hasat edilen tüm arı ekmeklerinin toplanan polenlerden daha yüksek biyoerişilebilirlik indeksine sahip olduğu görülmüştür. Bu durum polen duvarının ekzin ve intin tabakalarının kimyasal, fiziksel ve biyolojik degradasyona karşı oldukça dirençli olması, bu kompleks yapının besin öğelerinin biyoyararlılığını ve sindirilebilirliğini büyük ölçüde sınırlandırması ile ilişkilendirilebilir (Dobson ve Peng, 1997; Cook vd., 2003; Uțoiu vd., 2018; Wu vd., 2019). Ayrıca arı ekmeği örneklerinden arı polenine göre daha yüksek fenolik madde geri kazanımı, arı ekmeğinin fermentasyon süreci boyunca polen tanelerinin çok katmanlı yapısının bakteriyel enzimler tarafından kısmen sindirilmesiyle açıklanabilir (Aylanc vd., 2021).

4.5. Polen Fermentasyonu

Bu tez çalışmasında polen, su, bal karışımlarının fermentasyonunda kullanılan spontan fermentasyon, kovan içi fermentasyon ve starterli fermentasyon metotları LAB yükü bakımından farklı sonuçlar vermiştir. Spontan fermentasyonda 1:1, 1:2, 2:1, 3:1 ve 4:1 polen:su oranları için sırasıyla maksimum LAB sayısı log 7,05; log 7,00; log 8,00; log 8,09; log 8,32 kob/g olarak belirlenmiştir. Bu LAB sayılarına 1:1 polen:su oranı için 120 saatte

1:2 polen:su oranı için 144 saatte, 2:1 polen:su oranı için 15 günde, çalışılan diğer polen:su oranları için ise 168 saatte ulaşılmıştır. Starterli fermantasyonda ise tüm polen:su oranları için maksimum LAB sayısına yalnızca 48 saatte ulaşılmış olup bu sürede tespit edilen LAB sayıları 1:1, 1:2, 2:1, 3:1 ve 4:1 polen:su oranları için sırasıyla log 9,67; 9,49; log 8,32; log 7,48; log 7,3 kob/g'dır. Polenin spontan fermantasyonu polendeki mevcut mikrobiyal floranın etkisi ile gelişmektedir. Özellikle 1:1, 1:2, 2:1 polen:su oranları için spontan fermantasyon ve starterli fermantasyon karşılaştırıldığında *L. kunkeei* starter kültürünün polen substratına iyi uyum sağlayarak daha kısa sürede geliştiği ve asitlendirme kapasitesinin daha yüksek olduğu söylenebilir. Fermantasyonda standart üretim yapılabilmesi için özellikle fermantasyon koşullarının kontrolü önemlidir. Kovan içi fermantasyonda diğer iki yönteme kıyasla sıcaklık dalgalanmaları ve fermantasyonun daha düşük sıcaklıklarda yürütülmesi söz konusu olduğundan spontan fermantasyon ve starterli fermantasyonun aksine kovan içi fermantasyonda canlı LAB sayımı yapılamamış zenginleştirme metodu ile LAB izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Polenin spontan ve starterli fermantasyonuna yönelik yapılan bir çalışmada polen ve su kullanılarak nem içeriği %40 olan bir karışım hazırlanmış ve 3 adet *L. kunkeei* suşu ve pektinolitik bir maya olan *Hanseniaspora uvarum* AN8Y27B kullanılarak yaklaşık 8 log kob/g olacak şekilde inokülasyon yapılmış ve starterli fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada fermantasyon 30 °C'de 9 gün süreyle yapılmıştır. Starter kültür kullanılmadan aynı koşullarda hazırlanan polen, su karışımı aynı koşullarda fermente edilmiş ve bu fermantasyon startersiz üretim olarak adlandırılmıştır. Bu çalışmada starterli üretimde 96 saat sonra LAB sayısı 9 log kob/g'a ulaşmış, 144 saate kadar neredeyse sabit kalmış 9 günün sonunda ise LAB sayısı 7,03 log kob/g olarak bildirilmiştir. Starter kültür kullanılmadan yapılan fermantasyonda ise 120 saatte 9 log kob/g'a ulaşılmış 9 günün sonunda ise 3,95 log kob/g olarak tespit edilmiştir (Di Cagno vd., 2019). Bu çalışma fermente edilen karışımın nem içeriği bakımından 2:1 polen:su oranına ait karışımın nem içeriği ile uyumludur. Ancak karışımın bal içermemesi, starter kültür olarak LAB yanında maya içermesi nedeniyle farklılıklar söz konusudur. Fermantasyon için kullanılan mikroorganizmaların farklı olması, farklı bir bölgeye ait polen örneğinin kullanılmış olması nedeniyle fermente edilen polen örneğinin bileşimindeki farklılıklar, bileşimde balın bulunması ve farklı fermantasyon süresi LAB gelişimi bakımından farklı sonuçlar vermiştir.

4.6. Fermantasyonun Ürünün Biyoaktif Özelliklerine Etkisi

Fermantasyonun polen, su, bal karışımlarının biyoaktif özelliklerine etkisinin belirlenmesi amacıyla spontan fermantasyon, kovan içi fermantasyon ve starterli fermantasyon ile üretilen ürünlerin fermantasyondan önce ve sonra toplam fenolik madde içeriğinde ve antioksidan aktivitelerindeki değişim ortaya konulmuştur. Spontan, kovan içi ve starterli fermantasyonda çalışılan tüm polen:su oranlarında toplam fenolik madde içeriğinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar tespit edilmiştir. Spontan fermantasyonda TPC içeriği 1:1, 1:2, 2:1, 3:1, 4:1 polen:su oranları için sırasıyla 1,06 kat; 1,18 kat; 1,58 kat; 1,58 kat ve 1,51 kat artış göstermiştir. Starterli fermantasyonda ise bu artışlar 2,27 kat; 2,65 kat; 1,60 kat; 1,44 kat ve 1,38 kat iken kovan içi fermantasyonda 3:1 ve 4:1 polen su oranı için 1,36 kat ve 1,05 kat bulunmuştur.

Literatürde fermantasyonun fenolik madde içeriğine etkisine yönelik çalışmalar incelendiğinde kombucha (Chu ve Chen, 2006) ve Çin'e özgü bir soğan çeşidi (*Allium chinense*) (Hong vd., 2016) fermantasyonunda TPC içeriğinde artış sağlandığı bildirilmiştir. Buna karşın zeytin (Othman vd., 2009) ve kakao (do Carmo Brito vd., 2017) fermantasyonunda azalma tespit edilen çalışmalar da mevcuttur. %40 nem içeren bir polen, su karışımının spontan fermantasyonunun ve 3 adet *L. kunkeei* suşu ile pektinolitik bir maya olan *Hanseniaspora uvarum* AN8Y27B kullanılarak starterli fermantasyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada fermantasyonun polen karakteristiklerine etkisi belirlenmiştir. Fermantasyondan önce polenin suda ve metanolde çözünür fenolik madde içeriğinin sırasıyla 8,43 g GAE/kg kuru madde ve 45,73 g GAE/kg kuru madde olduğu starterli fermantasyon ile 15,98 g GAE/kg kuru madde ve 69,53 g GAE/kg kuru madde'ye ulaştığı, istatistiksel olarak anlamlı artışların olduğu bildirilmiştir. Startersiz fermantasyonda ise artış meydana geldiği ancak bu artışların istatistiksel olarak belirgin olmadığı ($p>0,05$) ifade edilmiştir (Di Cagno vd., 2019). Starterli fermantasyon açısından bu çalışmada elde edilen sonuçlar tez çalışmasındaki artışlar ile uyumludur. Starterli fermantasyon ile sağlanan artış polen:su oranına göre değişmekle birlikte 1,38-2,65 kat aralığında iken spontan fermantasyonda 1,06-1,58 kat aralığındadır. Bu açıdan starterli fermantasyonun spontan fermantasyondan daha yüksek artış sağladığı söylenebilir.

Toplam fenolik madde içeriğine benzer şekilde FRAP metodu ile tespit edilen antioksidan aktivite değerlerinde de spontan fermantasyonda 1:1, 1:2, 2:1, 3:1, 4:1 polen:su oranları için sırasıyla 1,06 kat; 1,11 kat; 1,18 kat; 1,14 kat ve 1,07 kat artış belirlenmiştir. Bu

artış starterli fermantasyon için ise 1,63 kat; 1,86 kat; 1,51 kat; 1,34 kat; 1,20 kat bulunmuştur. Kovan içi fermantasyonda ise 3:1 ve 4:1 polen:su oranları için FRAP değerlerindeki artış 1,10 kat ve 1,04 kat olarak belirlenmiştir. Toplam fenolik madde ile FRAP ve DPPH metotları ile tespit edilen antioksidan aktivite değerleri birbiri ile uyumlu olup literatürde de benzer şekilde *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* ile nar suyu fermantasyonunda (Valero-Cases vd., 2017), *L. rhamnosus* ile çavdar, buğday, arpa ve karabuğday fermantasyonunda (Đorđević vd., 2010) artışlar rapor edilmiştir.

Fermantasyon ile gıdanın mevcut fenolik bileşenlerinde epimerizasyon, degradasyon, oksidasyon, hidroliz gibi farklı reaksiyonlar meydana gelebilir. Fenolik madde içeriğindeki bu değişimin gıda matriksi ile de ilişkili olduğu ifade edilmektedir (Kaškonienė vd., 2018). Polen tanesini çevreleyen ekzin tabakası oldukça güçlü bir kimyasal yapıdır. Ekzin tabakasının parçalanmasında etkili bir yöntem olarak değerlendirilen fermantasyonun polen matriksinden bileşiklerin serbest bırakılmasını kolaylaştırdığı bilinmektedir (Zhang vd., 2017).

4.7. Fermantasyonun Ürünün Biyoerişilebilirlik Özelliklerine Etkisi

Üç farklı yöntemle fermente edilen polen, su, bal karışımlarının biyoerişilebilirlik değerlerinde meydana gelen farklılıklar incelendiğinde 1:1 polen:su oranı için fenolik madde biyoerişilebilirlik indeksinde anlamlı bir farklılık meydana gelmediği belirlenmiştir. Ancak 1:2, 2:1, 3:1 ve 4:1 polen:su oranları için başlangıçta yaklaşık %22 olan biyoerişilebilirlik indeksi sırasıyla %23,87; %32,64; %33,10 ve %30,89'a ulaşmıştır. Elde edilen bu artışlar özellikle fermantasyondaki LAB gelişimi ile ilişkilendirildiğinde fermantasyonda daha yüksek LAB sayısına ulaşılan ve 15 günlük fermantasyon periyodunun sonunda da log 7,78- log 8,11 LAB yüküne sahip olan 2:1, 3:1 ve 4:1 polen:su oranlarında daha yüksek biyoerişilebilirlik indeksi sağlandığı görülmüştür. Kovan içi üretimlerde fermantasyonun sonunda zenginleştirme metodu ile LAB izolasyonu yapılamayan 4:1 polen su oranı için biyoerişilebilirlik indeksi %27,53 iken LAB izolasyonu yapılabilen 3:1 polen:su oranı için %30,61 olarak bulunmuştur. Starterli fermantasyona ait toplam fenolik madde biyoerişilebilirlik indeksleri bu yöntem için en düşük 4:1 polen:su oranına ait ve %35,41 iken 1:2 polen:su oranı için en yüksek olup %40,28'dir. Starterli fermantasyonun spontan fermantasyona benzer şekilde LAB gelişimi ile ilişkili olarak farklı polen:su oranları için farklı sindirilebilirlik özellikleri sergilediği görülmüştür. FRAP biyoerişilebilirlik indeksi

verilerine bakıldığında ise fermantasyonun spontan fermantasyonda 1:2 polen:su oranı için ve kovan içi fermantasyonda ise 4:1 polen:su oranı için istatistiksel olarak anlamlı değişimlere neden olmadığı belirlenmiştir. Spontan fermantasyon için en yüksek FRAP biyoerişilebilirlik indeksi 2:1 polen su oranına ait olup %33,44; kovan içi fermantasyon için 3:1 polen su oranı ve %33,89, starterli fermantasyon için ise 1:2 polen:su oranı ve %37,41'dir. FRAP biyoerişilebilirlik indeksleri ile toplam fenolik madde biyoerişilebilirlik indeksleri en iyi polen:su oranları bakımından benzer sonuçlar vermiştir.

Fermantasyon, gıdadaki fenolik bileşiklerin biyoerişilebilirliğini, kullanılan mikroorganizmaların türüne ve gıda matriksine bağlı olarak farklı şekilde etkilemektedir. Üç farklı zeytin çeşidinin maya ve LAB fermantasyonun yapıldığı bir çalışmada farklı biyoerişilebilirlik değerlerine ulaşılmış; Bella di Cerignola çeşidi için biyoerişilebilirliğin azaldığı, Termite di Bitetto çeşidi için arttığı, Cellina di Nard`o çeşidi için ise fenolik madde biyoerişilebilirliğinde önemli bir değişiklik meydana gelmediği bildirilmiştir (D'Antuono vd., 2018). Fenolik bileşenlerin fermantasyondan sonra biyoerişilebilirliğindeki artış toplam fenolik madde içeriğindeki artışa benzer şekilde fenoliklerin gıda matriksinden salınmasının kolaylaşması ve daha basit yapılara biyotransformasyonları ile açıklanmaktadır (Leonard vd., 2021).

Biyoeerişilebilirlik, fenolik bileşiğin biyoyararlanımını etkileyen bir kavramdır. Biyoyararlanım/biyoyararlılık, fizyolojik fonksiyonlar için vücutta emilen ve metabolize edilen bileşiklerin gerçek miktarlarını ifade eder ve öncelikli olarak ince bağırsakta incelenir.

Az sayıda insan ve hayvan çalışmasında, fermente gıdaların alınmasının fenoliklerin biyoyararlanımı üzerindeki etkisi detaylandırılmıştır. Fermente edilmiş ve fermente edilmemiş rooibos çayı ile yapılan bir çalışmada çayın içilmesinden sonraki beş saat içerisinde sırasıyla flavonoid metabolitlerinin yalnızca %0,35 ve %0,18'inin idrardan geri kazanıldığı belirlenmiş ve ince bağırsakta aspalatinin (rooibostaki temel flavonoid) son derece sınırlı biyoyararlanımına ve bu bileşenin biyoyararlanımı üzerine fermantasyonun olumsuz etkisine dikkat çekilmiştir (Stalmach vd., 2009). Buna karşın literatürde siyah çay ile yapılan bir çalışmada LAB fermantasyonunun *in vivo* flavonoid biyoyararlanımını arttırmadaki etkisinin rapor edildiği bir çalışma da mevcuttur (Zhao ve Shah, 2016). Benzer şekilde, *Lactobacillus rhamnosus* ile fermente edilmiş soya sütünün farelerde izoflavon metabolitlerinin (daidzein, glisitin, genistein) idrardaki konsantrasyonunda artış sağladığı bildirilmiştir (Dai vd., 2019). Genel olarak fermantasyon, fenoliklerin biyoyararlanımını

iyileştirme potansiyeline sahip bir yöntem olarak değerlendirilse de kullanılan spesifik mikroorganizmaların ve gıda matriksinin etkisini analiz etmek için daha ileri in vivo çalışmalara ihtiyaç vardır (Leonard vd., 2021).

4.8. Fenolik Madde Profili

Kovanlardan hasat edilen polen ve arı ekmeklerinin fenolik madde içeriklerinde önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Protokatekuik asit arı ekmeklerinin tamamında ve temmuz, ağustos polenlerinde tespit edilirken mayıs ve haziran polenlerinde gözlenebilme sınırının altındadır. Benzer bir çalışmada ülkemizde bulunan 5 farklı arılıktan polen ve arı ekmeği örnekleri toplanmış ve fenolik madde profilinin tespiti yapılmış analizi yapılan 4 polen ve arı ekmeği örneğinde protokatekuik asit konsantrasyonu polen örneklerinden daha yüksek bulunmuştur (Bayram vd., 2021). Bir polen ve arı ekmeği ikili grubunda ise polen örneğinde protokatekuik asit tespiti yapılamazken bu fenolik bileşenin arı ekmeğinde bulunduğu belirlenmiştir. Fenolik bileşen kompozisyonunda bir diğer dikkat çeken bileşen rutindir. Polen örneklerinin ikisinde 22,33 µg/g ile 28,60 µg/g rutin tespit edilmiş arı ekmeklerinde ise yalnızca haziran arı ekmeğinde rutin bulunmadığı, diğer arı ekmeklerinin polenlerden daha yüksek rutin içerdiği görülmüştür. Rutin bazı çalışmalarda arı ekmeğinin temel fenolik bileşeni olarak değerlendirilmektedir (Rzepecka-Stojko vd., 2015). Ayrıca polenin katı faz fermantasyonuna tabi tutulmasıyla da rutin içeriğinin arttığı belirtilmektedir (Adaşkevičiūtė vd., 2022). Literatüre göre fermantasyonda fenolik asitlerin oluşumu, laktik asit bakterilerinin bazı bileşikler benzoik ve vanilik asitlere parçalamasıyla ilişkilidir. Bu fenolik asitler hem patojen bakterilerin hem de mantarların gelişimini durdurdıkları için daha uzun bir raf ömrü sağlar ve ürünlerin bozulmaya karşı korunmasına yardımcı olur (Garmiene vd., 2010). Bu tez çalışmasında da mayıs arı ekmeği hariç tüm arı ekmeklerinde *p*-OH benzoik asit bulunmuştur. Bununla birlikte organik solventlerin hücre duvarını bütünlüğünü bozmada ve hammaddeden fenolik bileşenlerin ekstraksiyonunda daha başarılı olduğu, kullanılan solventin yanında ekstraksiyon metodunun ve ürünün taze veya kurutulmuş olmasının da analiz sonuçlarını etkilediği bilinmektedir (Adaşkevičiūtė vd., 2022).

p-kumarik asit farklı çalışmalarda polen (Garmiene vd., 2010) ve arı ekmeğinde (Isidorov vd., 2009) rapor edilen temel fenolik bileşenlerden biridir. Bu tez çalışmasında da kovanlardan belirli aralıklarla hasat edilen polen ve arı ekmeği ikili gruplarında farklı

miktarlarda *p*-kumarik asit tespiti yapılmıştır. Bu ürünlerin hasat periyoduna bağlı olarak *p*-kumarik asit içeriğinin değiştiği belirlenmiştir.

4.9. Farklı Fermantasyon Metotlarının Fenolik Madde Kompozisyonuna Etkisi

Spontan fermantasyonda 1:1 polen su oranı hariç, starterli fermantasyonda 2:1 polen:su oranı hariç karışımların epikateşin içeriğinde azalma tespit edilmiştir. Kovan içi fermantasyonda ise hem 3:1 hem de 4:1 polen:su konsantrasyonunda epikateşinde azalma belirlenmiştir. Literatürde fermantasyon ile epikateşin içeriğinde azalma özellikle çay fermantasyonunda rapor edilmiş olup çay fermantasyonunda epigallokateşin gallat, epigallokateşin ve epikateşin içeriğindeki azalmayla fenolik madde biyoyararlanımının arttığı ifade edilmektedir (Tu vd., 2005). LAB ile çay fermantasyonuna yönelik bir başka çalışmada fermantasyonun gallatlanmış kateşinlerden gallik asit üretimini sağlamanın yanı sıra kateşinlerin hücre içerisine alımını da arttırdığı tespit edilmiştir (Zhao ve Shah, 2016). Çay fermantasyonuna benzer şekilde spontan fermantasyonda 4:1 polen:su oranı hariç karışımların gallik asit konsantrasyonu artış göstermiş, starterli fermantasyonda ise 1:1 ve 4:1 polen:su oranlarında gallik asit içeriğinde artış belirlenmiştir.

Bazı mikroorganizmalar galloil gruplarıyla ilişkili ester bağlarını hidroliz etme yeteneğine ve gallik asidi büyük ölçüde pirogallol metabolize edebilme potansiyeline sahiptir. Ayrıca kateşin gallatlarından veya gallik asit türevlerinden serbest kalan gallik asidin bir kısmının ayrıca pirogallol dönüştürülmesi de bir diğer olası fermantasyon mekanizmasıdır (Zhao ve Shah, 2016). Pirogallolün radikal temizleme aktivitesi bütildihidroksianisol, bütildihidroksitoluen, troloks gibi birçok standart sentetik antioksidandan daha güçlü olup ilgili gıdanın antioksidan aktivitesinde artış sağlama potansiyeline sahip bir molekül olduğu bilinmektedir (Zhou vd., 2020). Ek olarak kateşin asidik koşullara hassas bir molekül olup fermantasyonda kateşin içeriğindeki azalma organik asit artışı ile de ilişkilendirilmektedir (Tu vd., 2005).

Kateşin, kateşin oksijenaz veya tannaz enzimi ile protokatekuik aside metabolize edilebilmektedir (Hopper ve Mahadevan, 1991; Zhou vd., 2020). Tannaz enzimi hidroliz edilebilir tanenler üzerine etki gösteren esteraz grubu bir enzimdir. Şaraptan izole edilen *Lactobacillus hilgardii*'nin tannaz enzimine sahip olduğu, kateşinleri gallik asit ve protokatekuik aside metabolize ettiği belirlenmiştir (Alberto vd., 2004). Bu tez çalışmasında protokatekuik asit spontan fermantasyonda tüm polen:su oranlarında, starterli

fermantasyonda 1:1 ve 1:2 polen:su oranlarında, kovan içi fermentasyonda ise 3:1 polen:su oranlarında artış göstermiştir. Fermentasyonda bu fenolik bileşendeki artış literatürde kivi fermentasyonuna yönelik bir çalışmada da rapor edilmiştir. *L. plantarum* ile gerçekleştirilen kivi fermentasyonunda protokatekuik konsantrasyonunda artış sağladığı ve bu artışın *L. plantarum*'un tannaz aktivitesi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Zhou vd., 2020).

Polen, su bal karışımlarının fenolik asit profilinde de farklılıklar belirlenmiş; spontan fermentasyon, starterli fermentasyon ve kovan içi fermentasyon ile karışımların ferulik asit içeriği fermentasyondan sonra gözlenebilme limitinin altında bulunmuştur. Karışımların spontan ve starterli fermentasyondan sonra ise *p*-kumarik asit içeriğinin arttığı belirlenmiştir. LAB ve mayaların dekarboksilaz veya redüktaz grubu enzimlerinin fermentasyonda kafeik asit, ferulik asit *p*-kumarik asit gibi hidroksinamik asitlerin biyotransformasyonunu katalizlediği bilinmektedir (Leonard vd., 2021). Örneğin kafeik asit dehidroksilasyon ile *p*-kumarik asite dönüşebilmekte ve ardından bir dizi α -oksidasyon, dehidrojenasyon reaksiyonları ile protokatekuik asit oluşabilmektedir (Zhou vd., 2020). Ferulik asit esterleri bitki hücre duvarlarında polisakkaritler ile ferulik asiti birbirine bağlar ve koruyucu bir tabaka oluşturur. Ferulik asit esteraz ferulat ve polisakkarit zinciri arasındaki ester bağı kırarak selülazın erişilebilirliğini arttırabilir ve hücre duvarının hidrolizi bu şekilde gerçekleşebilir (Koseki vd., 2009).

Mikrobiyal suşlar, polifenollerin ve aroma maddelerinin metabolize edilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Xu vd., 2019). Genel olarak mikroorganizmalar, fenolikleri daha basit formlara hidroliz etmek için hidrolitik enzimler üretebilmektedirler (Oh vd., 2017). Bununla birlikte bu dönüşümlerin metabolik yolu her suş için farklılık arz etmektedir. Mikroorganizmaların hücre içi NADH/NAD⁺ dengesi tarafından yönlendirilen redüktaz veya karboksilaz aktivitelerinin fenolik madde biyotransformasyonunda önemli rol oynadığı kanıtlanmıştır (Li vd., 2021). Bazı araştırmacılar tarafından özellikle *Lactobacillus* türlerinin *Streptococcus* ve *Bifidobacterium* türlerinden daha fazla β -glukozidaz ve β -galaktozidaz üretebildiği tespit edilmiş olup (Wu vd., 2021) bu tez çalışmasında da fermentasyonun fenolik maddelerin biyotransformasyonunda ve ilgili gıdanın biyoerişilebilirliğinde artış sağlanmasında etkili olduğu belirlenmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Arı ekmeği en az bilinen arı ürünlerinden olmasına rağmen bu ürünlerin sağlık faydalarına yönelik farkındalığın artmasıyla farklı markalar altında yüksek fiyatlarla satışa sunulmaya başlanmıştır. Arı ekmeği üretimindeki en önemli sorunlar kovan başına üretimin sınırlı olması, kovanın zarar görmesi ve işgücü maliyetidir.

Bu tez çalışmasının ilk kısmında Trabzon ili Maçka ilçesine bağlı Barışlı köyünde mayıs, haziran, temmuz, ağustos aylarında ikili gruplar halinde polen ve arı ekmeği hasadı yapılmış ekim ayında ise nihai ürün olarak bir arı ekmeği hasadı daha yapılmıştır. 4 polen ve 5 arı ekmeği olmak üzere aynı bölge ve yöre örnekleminde toplam 9 örneğin bileşiminin ve biyoaktif özelliklerinin tespiti için temel fizikokimyasal analizler, toplam fenolik madde içeriği, FRAP ve DPPH metotları ile antioksidan aktivite, *in vitro* sindirim metodu ile biyoerişilebilirlik indeksi ve geri kazanım belirlenmiştir. Belirlenen bu özelliklerin hasat periyoduna göre değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu bölge için sonraki yıllarda aynı periyotlarda polen ve arı ekmeği hasadı gerçekleştirilerek daha fazla veri doğrultusunda karakterizasyon çalışmaları güçlendirilebilir.

Ek olarak mikrobiyal floranın tespitine yönelik çalışmalar da yapılmış ve farklı besiyeri ortamlarında LAB sayımları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen toplam 38 izolatın MALDI TOF MS ile identifikasyonu yapılmıştır. Polen ve arı ekmeği örneklerinde *Candida magnoliae* (10 izolat) ve *Lactobacillus kunkeei* (25 izolat), arı ekmeğinde ek olarak *Leuconostoc pseudomesenteroides* (3 izolat) tespit edilmiş, polen fermantasyonunda etkili olan suşların aydınlatılması amaçlanmıştır. İzole edilen suşlar starter kültür olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olup izolatların 16S rDNA geninin tümü kullanılarak homoloji taraması ile sekans analizleri gerçekleştirilebilir.

Tez çalışmasının ikinci kısmında pazardaki talebin karşılanabilmesi ve büyük hacimlerde arı ekmeği üretilebilmesi için 1:1, 1:2, 2:1, 3:1, 4:1 polen:su oranlarında hazırlanan %11 bal içeren polen, su ve bal karışımlarının spontan fermantasyon, *Lactobacillus kunkeei* inokülasyonu ile fermantasyon, kovan içi fermantasyon olmak üzere üç farklı yöntemle fermantasyonu gerçekleştirilmiştir. Laktik asit bakterilerinin inokülasyonu ve spontan fermantasyon ile laboratuvar şartlarında, kovan içerisinde fermantasyon tekniğinde ise arının fermantasyon karışımıyla doğrudan teması ve kovanda mevcut mikrobiyal floranın etkisiyle polen fermantasyonu yapılarak endüstriyel olarak

uygulanabilme potansiyeli olan teknikler tercih edilmiştir. Fermantasyon süresince LAB, maya-küf takipleri ve ayrıca son üründe LAB florasının tespiti yapılmıştır. Fermantasyonun polen, su, bal karışımlarının biyoaktivitelerine, sindirilebilirlik özelliklerine ve fenolik madde kompozisyonuna etkisi ortaya konularak ürünlerin biyokimyasal ve mikrobiyolojik karakterizasyonu üzerine çalışılmıştır.

Starterli fermantasyonda pH toleransı %94,64, safra tuzu toleransı %65,04 olarak belirlenen *Lactobacillus kunkeei* kullanılmıştır. Tüm izolatlarda aside ve safra tuzuna dayanıklılık denemelerine ek olarak probiyotik potansiyelin belirlenmesine yönelik farklı tuz konsantrasyonunda gelişim, toplam asit üretme yeteneği, dondurma ve liyofilizasyon gibi işlemlere dayanıklılık, proteolitik aktivite gibi özellikler tespit edilebilir. Bu sonuçlar doğrultusunda fermantasyon için farklı starter kültür kombinasyonları oluşturulabilir. Fermantasyon için kullanılacak farklı mikroorganizmalar, fermente edilecek polen örneğinin bileşimindeki farklılıklar, farklı polen, su, bal oranları ve fermantasyon koşulları polen fermantasyonu açısından farklı sonuçlar verecektir.

Spontan fermantasyonda karışımların toplam fenolik madde içeriğinde 1:1, 1:2, 2:1, 3:1 ve 4:1 polen:su oranları için fenolik madde içeriğinde sırasıyla 1,06; 1,18; 1,58; 1,58 ve 1,51 kat artış belirlemiştir. Toplam fenolik madde içeriğine benzer şekilde FRAP ve DPPH metodu ile tespit edilen antioksidan aktivite değerlerindeki artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Fermantasyonda standart üretim yapılabilmesi için fermantasyon koşullarının kontrolü önemlidir. Kovan içi fermantasyonda diğer iki yöntemle kıyasla sıcaklık dalgalanmaları ve fermantasyonun daha düşük sıcaklıklarda yürütülmesi söz konusu olduğundan spontan fermantasyon ve starterli fermantasyonun aksine kovan içi fermantasyonda 1:1; 1:2; 2:1 polen:su oranlarında maya-küf yükünün kontrolü sağlanamamıştır. 3:1 ve 4:1 polen:su oranlarında canlı LAB sayımı yapılamamış zenginleştirme metodu ile 3:1 polen:su oranına sahip karışımdan LAB izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Kovan içi fermantasyon ile 3:1 ve 4:1 polen:su oranlarında karışımların toplam fenolik madde içeriğinde ve FRAP değerlerinde sırasıyla 1,36 kat-1,05 ve 1,10-1,04 kat artış bulunmuştur.

1:1, 1:2, 2:1, 3:1, 4:1 polen:su oranlarında starterli fermantasyonda toplam fenolik madde içeriği sırasıyla 2,27; 2,65; 1,60; 1,44 ve 1,38 kat artmıştır. FRAP metodu ile tespit edilen antioksidan aktivite değerleri ise 1,20 ile 1,86 kat aralığında artış göstermiştir.

Yalnızca 2:1 polen:su oranı için DPPH aktivitesinde belirgin bir farklılık meydana gelmemiştir.

Üç farklı yöntemle fermente edilen karışımların fenolik madde kompozisyonundaki değişimler de belirlenmiş fermantasyonun fenolik maddelerin biyotransformasyonundaki rolüne yönelik bulgulara ulaşılmıştır. Polen:su oranı ve fermantasyon metoduna bağlı olarak biyotransformasyon reaksiyonlarında farklılıklar olduğu görülmüştür. Biyoerişilebilirlik açısından sulu ekstraktlar esas olduğundan belirtilen analizler sulu ekstraktlar ile gerçekleştirilmiştir. Fenolik bileşenlerin ekstraksiyonunda organik solvent kullanımının farklı sonuçlar vereceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Starterli fermantasyonda fermantasyon öncesi %22,07 olan fenolik madde biyoerişilebilirlik indeksi artarak fermantasyondan sonra %39,06'ya ulaşmıştır. 1:2, 2:1, 3:1 ve 4:1 polen:su oranı için her üç fermantasyon metodu da fenolik madde biyoerişilebilirlik indeksi verilerinde artışa neden olmuştur. Ayrıca en yüksek biyoerişilebilirlik indeksleri starterli fermantasyon ile sağlanmıştır. Kullanılan *in vitro* sindirim modelinde yapay mide ve bağırsak koşulları oluşturulmuştur. Bu metot ile fermantasyonun ürünün biyoerişilebilirlik özelliklerini iyileştirme potansiyeline sahip olduğu görülmüştür. Ancak kullanılan spesifik mikroorganizmaların, gıda matriksinin ve fermantasyonun etkilerini analiz etmek için elde edilen sonuçların *in vivo* biyoyararlanım çalışmaları ile desteklenmesi gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Adaškevičiūtė, V., Kaškonienė, V., Barčauskaitė, K., Kaškonas, P. ve Maruška, A., 2022. The Impact of Fermentation on Bee Pollen Polyphenolic Compounds Composition, Antioxidants, 11, 4, 645.
- Aizen, M. A. ve Harder, L. D., 2009. The Global Stock of Domesticated Honey Bees Is Growing Slower Than Agricultural Demand for Pollination, Current Biology, 19, 915-918.
- Akhmetova, R., Sibgatullin, J., Garmonov, S. ve Akhmetova, L., 2012. Technology for Extraction of Bee-Bread from the Honeycomb, Procedia Engineering, 42, 1822-1825.
- Akın, M. Ş. ve Yılcı, A., 2021. Kırsal Kalkınma İçin Arıcılığın Önemi: Refahiye Örneği, Çekmece İZÜ Sosyal Bilimler Dergisi, 9, 33-48.
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H. ve Ukaegbu, C. I., 2021. Extraction of Phenolic Compounds: A Review, Current Research in Food Science, 4, 200-214.
- Alberto, M. R., Gómez-Cordovés, C. ve Manca De Nadra, M. C., 2004. Metabolism of Gallic Acid and Catechin by *Lactobacillus hilgardii* from Wine, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 21, 6465-6469.
- Alcántara-Hernández, R. J., Rodríguez-Álvarez, J. A., Valenzuela-Encinas, C., Gutiérrez-Miceli, F. A., Castañón-González, H., Marsch, R., Ayora-Talavera, T. ve Dendooven, L., 2010. The Bacterial Community in “Taberna” a Traditional Beverage of Southern Mexico, Letters in Applied Microbiology, 51, 5, 558-563.
- Almeida-Muradian, L. B., Pamplona, L. C., Coimbra, S. ve Barth, O. M., 2005. Chemical Composition and Botanical Evaluation of Dried Bee Pollen Pellets, Journal of Food Composition and Analysis, 18, 1, 105-111.
- Amaretti, A., Di Nunzio, M., Pompei, A., Raimondi, S., Rossi, M. ve Bordoni, A., 2013. Antioxidant Properties of Potentially Probiotic Bacteria: *In vitro* and *in vivo* Activities, Applied Microbiology and Biotechnology, 97, 809-817.
- Anderson, K. E., Sheehan, T. H., Mott, B. M., Maes, P., Snyder, L., Schwan, M. R., Walton, A., Jones, B. M. ve Corby-Harris, V., 2013. Microbial Ecology of the Hive and Pollination Landscape: Bacterial Associates from Floral Nectar, the Alimentary Tract and Stored Food of Honey Bees (*Apis mellifera*), PLoS ONE, 8, 12, e83125.

- Anderson, K. E., Carroll, M. J., Sheehan, T., Mott, B. M., Maes, P. ve Corby-Harris, V., 2014. Hive-Stored Pollen of Honey Bees: Many Lines of Evidence are Consistent with Pollen Preservation, Not Nutrient Conversion, Molecular Ecology, 23, 5904-5917.
- Anelkovi B, Jevti G, Markovi J, Mladenovi M ve Peševa V, 2014. Quality of Honey Bee Bread Collected in Spring, Journal of Hygienic Engineering and Design, 275-277.
- Anwar, H., Hussain, G. ve Mustafa, I., 2018. Antioxidants in Foods and Its Applications, Shalaby, E. ve Mostafa Azzam, G., 1st Edition, 3-28, Antioxidants from Natural Sources, BoD – Books on Demand.
- AOAC., 2000. Official Methods of Analysis of AOAC International, CD-ROM, 17th edition, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
- AOAC., 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th edition, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
- Araneda, X., Velásquez, C., Morales, D. ve Martínez, I., 2014. Producción de Pan de Abejas (*Apis mellifera* L.) Bajo Condiciones de Laboratorio, Idesia (Arica), 32, 63-69.
- Aylanc, V., Tomás, A., Russo-Almeida, P., Falcão, S. I. ve Vilas-Boas, M., 2021. Assessment of Bioactive Compounds Under Simulated Gastrointestinal Digestion of Bee Pollen and Bee Bread: Bioaccessibility and Antioxidant activity, Antioxidants, 10, 651.
- Bachmann, H., Pronk, J. T., Kleerebezem, M. ve Teusink, B., 2015. Evolutionary Engineering to Enhance Starter Culture Performance in Food Fermentations, Current Opinion in Biotechnology, 32, 1-7.
- Bakour, M., Fernandes, Â., Barros, L., Sokovic, M., Ferreira, I. C. F. R. ve Lyoussi, B., 2019. Bee Bread as a Functional Product: Chemical Composition and Bioactive Properties, LWT, 109, 276-282.
- Bakour, M., Laaroussi, H., Ousaaïd, D., El Ghouizi, A., Es-Safi, I., Mechchate, H. ve Lyoussi, B., 2022. Bee Bread as a Promising Source of Bioactive Molecules and Functional Properties: An Up-to-Date Review, Antibiotics, 11, 203.
- Barene, I., Daberte, I. ve Siksna, S., 2015. Investigation of Bee Bread and Development of its Dosage Forms, Medicinos Teorija ir Praktika, 21, 16-22.
- Bayram, N. E., Gercek, Y. C., Çelik, S., Mayda, N., Kostić, A., Dramićanin, A. M. ve Özkök, A., 2021. Phenolic and Free Amino Acid Profiles of Bee Bread and Bee Pollen with the Same Botanical Origin-Similarities and Differences, Arabian Journal of Chemistry, 14, 3, 103004.

- Benzie, I. F. F. ve Strain, J. J., 1999. Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version For Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration, Methods in Enzymology, 299, 15-27.
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llrente, C. ve Gil, A., 2012. Probiotic Mechanisms of Action, Annals of Nutrition and Metabolism, 61, 2, 160-174.
- Beykaya, M., Tanuğur Samancl, A. E., Samancl, T., Önder, E. Y., Uzun, E. M. ve Tosun, F., 2021. Investigation of Nutritional and Antioxidant Properties of Anatolian Bee Bread, Journal of Apicultural Science, 65, 2, 255-263.
- Binda, S., Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B., Sanders, M. E., Tremblay, A. ve Ouwehand, A. C., 2020. Criteria to Qualify Microorganisms as “Probiotic” in Foods and Dietary Supplements, Frontiers in Microbiology, 11, 1662.
- Bohlin, L., 1998. Natural Products Isolation, Drug Discovery Today, 3, 12, 536-537.
- Bradford, M. M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, Analytical Biochemistry, 72, 1-2, 248-254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. ve Berset, C., 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, LWT, 28, 1, 25-30.
- Budin-Verneuil, A., Pichereau, V., Auffray, Y., Ehrlich, D. ve Maguin, E., 2007. Proteome Phenotyping of Acid Stress-Resistant Mutants of *Lactococcus lactis* MG1363, Proteomics, 7, 12, 2038-2046.
- Campos, M. G. R., Bogdanov, S., de Almeida-Muradian, L. B., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C. ve Ferreira, F., 2008. Pollen Composition and Standardisation of Analytical Methods, Journal of Apicultural Research, 47, 2, 154-161.
- Campos, M. G. R., Frigerio, C., Lopes, J. ve Bogdanov, S., 2010. What is the Future of Bee-Pollen?, Journal of ApiProduct and ApiMedical Science, 2, 4, 131-144.
- Celep, E., Charehsaz, M., Akyüz, S., Acar, E. T. ve Yesilada, E., 2015. Effect of *in vitro* Gastrointestinal Digestion on the Bioavailability of Phenolic Components and the Antioxidant Potentials of Some Turkish Fruit Wines, Food Research International, 78, 209-215.
- Chen, C., 2019. Relationship between Water Activity and Moisture Content in Floral Honey, Foods, 8, 30.

- Chiang, C. J., Kadouh, H. ve Zhou, K., 2013. Phenolic Compounds and Antioxidant Properties of Gooseberry as Affected by *in vitro* Digestion, LWT - Food Science and Technology, 51, 2, 417-422.
- Chu, S. C. ve Chen, C., 2006. Effects of Origins and Fermentation Time on the Antioxidant Activities of Kombucha, Food Chemistry, 98, 3, 502-507.
- Clarke, D., Morley, E. ve Robert, D., 2017. The Bee, the Flower, and the Electric Field: Electric Ecology and Aerial Electoreception, Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology, 203, 737-748.
- Collins, J. K., Thornton, G. ve Sullivan, G. O., 1998. Selection of probiotic strains for human applications. International Dairy Journal, 8, 5-6) 487-490.
- Condon, S., 1987. Responses of Lactic Acid Bacteria to Oxygen, FEMS Microbiology Reviews, 46, 269-280.
- Cook, S. M., Awmack, C. S., Murray, D. A. ve Williams, I. H., 2003. Are Honey Bees' Foraging Preferences Affected by Pollen Amino Acid Composition?, Ecological Entomology, 28, 5, 622-627.
- Costa, M. C. A., Morgano, M. A., Ferreira, M. M. C. ve Milani, R. F., 2017. Analysis of Bee Pollen Constituents from Different Brazilian Regions: Quantification by NIR Spectroscopy and PLS Regression, LWT - Food Science and Technology, 80, 76-83.
- Crailsheim, K., Schneider, L. H. W., Hrassnigg, N., Bühlmann, G., Brosch, U., Gmeinbauer, R. ve Schöffmann, B., 1992. Pollen Consumption and Utilization in Worker Honeybees (*Apis mellifera carnica*): Dependence on Individual Age and Function. Journal of Insect Physiology, 38, 6, 409-419.
- Dai, S., Pan, M., El-Nezami, H.S., Wan, J. M. F., Wang, M. F., Habimana, O., Lee, J. C. Y., Louie, J. C. Y. ve Shah, N. P., 2019. Effects of Lactic Acid Bacteria-Fermented Soymilk on Isoflavone Metabolites and Short-Chain Fatty Acids Excretion and Their Modulating Effects on Gut Microbiota. Journal of Food Science, 84, 7, 1854-1863.
- Dany, B. 1988. Selbstgemachtes aus Bienenprodukten, Ehrenwirth Verlag, Munchen, 174 p.
- D'Antuono, I., Bruno, A., Linsalata, V., Minervini, F., Garbetta, A., Tufariello, M., Mita, G., Logrieco, A.F., Bleve, G. ve Cardinali, A., 2018. Fermented Apulian Table Olives: Effect of Selected Microbial Starters on Polyphenols Composition Antioxidant Activities and Bioaccessibility, Food Chemistry, 248, 137-145.

- De Carolis, E., Posteraro, B., Lass-Flörl, C., Vella, A., Florio, A. R., Torelli, R., Girmenia, C., Colozza, C., Tortorano, A. M., Sanguinetti, M. ve Fadda, G., 2012. Species Identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with Direct Surface Analysis by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, Clinical Microbiology and Infection, 18, 5, 475-484.
- De Grandi-Hoffman, G., Chen, Y. ve Simonds, R., 2013. The Effects of Pesticides on Queen Rearing and Virus Titers in Honey Bees (*Apis mellifera* L.), Insects, 4, 71-89.
- Del Risco, R. C. A., 2004. Polen-Pan De Abejas: Composición, Nutrición, Acción En La Salud Humana y Microbiología, Conferencia de Polen. Estación Experimental Apícola de La Habana, Cuba.
- Del Risco, R. C. A., Pérez-Piñeiro, A., Ivarez-Rivera, V., Rodríguez-Castro, G., Leiva-Castillo, V., Puig-Peña, Y. ve García-Neninger, R., 2012. Bacterias ácido-lácticas para ensilar polen apícola, Revista CENIC:Ciencias Biológicas, 43, 1, 17-21.
- Denisow, B. ve Denisow-Pietrzyk, M., 2016. Biological and Therapeutic Properties of Bee Pollen: A Review, Journal of the Science of Food and Agriculture, 96, 4303-4309.
- Detry, R., Simon-Delso, N., Bruneau, E. ve Daniel, H. M., 2020. Specialisation of Yeast Genera in Different Phases of Bee Bread Maturation, Microorganisms, 8, 11, 1789.
- Deveza, M. V., Keller, K. M., Lorenzon, M. C. A., Nunes, L. M. T., Sales, É. O. ve Barth, O. M., 2015. Mycotoxycological and Palynological Profiles of Commercial Brands of Dried Bee Pollen, Brazilian Journal of Microbiology, 46, 4, 1171-1176.
- Di Cagno, R., Filannino, P., Cantatore, V. ve Gobbetti, M., 2019. Novel Solid-State Fermentation of Bee-Collected Pollen Emulating the Natural Fermentation Process of Bee Bread, Food Microbiology, 82, 218-230.
- Do Carmo Brito, B. D. N., Chisté, R. C., da Silva Pena, R., Gloria, M. B. A. ve Lopes, A. S. 2017. Bioactive Amines and Phenolic Compounds in Cocoa Beans are Affected by Fermentation. Food Chemistry, 228, 484-490.
- Dobson, H. E. M. ve Peng, Y. S., 1997. Digestion of Pollen Components by Larvae of the Flower-Specialist Bee *Chelostoma florissomne* (Hymenoptera: Megachilidae), Journal of Insect Physiology, 43, 89-100.

- Domínguez-Avila, J. A., Wall-Medrano, A., Velderrain-Rodríguez, G. R., Chen, C. Y. O., Salazar-López, N. J., Robles-Sánchez, M. ve González-Aguilar, G. A., 2017. Gastrointestinal Interactions, Absorption, Splanchnic Metabolism and Pharmacokinetics of Orally Ingested Phenolic Compounds, Food and Function, 8, 1, 15-38.
- Dong, J., Gao, K., Wang, K., Xu, X. ve Zhang, H., 2015. Cell Wall Disruption of Rape Bee Pollen Treated with Combination of Protamex Hydrolysis and Ultrasonication, Food Research International, 75, 123-130.
- Dorđević, T. M., Šiler-Marinković, S. S. ve Dimitrijević-Branković, S. I. 2010. Effect of Fermentation on Antioxidant Properties of Some Cereals and Pseudo Cereals, Food Chemistry, 119, 3, 957-963.
- Dranca, F., Ursachi, F. ve Oroian, M., 2020. Bee Bread: Physicochemical Characterization and Phenolic Content Extraction Optimization, Foods, 9, 10, 1358.
- Edwards, C. G., Haag, K. M., Collins, M. D., Hutson, R. A. ve Huang, Y. C., 1998. *Lactobacillus kunkeei* sp. nov.: A Spoilage Organism Associated with Grape Juice Fermentations, Journal of Applied Microbiology, 84, 5, 698-702.
- Endo, A. ve Okada, S., 2008. Reclassification of the Genus Leuconostoc and Proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58, 2195–2205.
- Endo, A., Futagawa-Endo, Y. ve Dicks, L. M. T., 2009. Isolation and Characterization of Fructophilic Lactic Acid Bacteria from Fructose-Rich Niches, Systematic and Applied Microbiology, 32, 8, 593-600.
- Endo, A., Futagawa-Endo, Y., Sakamoto, M., Kitahara, M. ve Dicks, L. M. T., 2010. *Lactobacillus florum* sp. nov., a Fructophilic Species Isolated from Flowers, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60, 10, 2478-2482.
- Endo, A., 2012. Fructophilic Lactic Acid Bacteria Inhabit Fructose-Rich Niches in Nature, Microbial Ecology in Health and Disease, 23, 18563.
- Endo, A., Irisawa, T., Futagawa-Endo, Y., Takano, K., Toit, M. Du, Okada, S. ve Dicks, L. M. T., 2012. Characterization and Emended Description of *Lactobacillus kunkeei* as a Fructophilic Lactic Acid Bacterium, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62, 500-504.
- Endo, A. ve Salminen, S., 2013. Honeybees and Beehives are Rich Sources for Fructophilic Lactic Acid Bacteria, Systematic and Applied Microbiology, 36, 6, 44.

- Endo, A., Tanaka, N., Oikawa, Y., Okada, S. ve Dicks, L., 2014. Fructophilic Characteristics of *Fructobacillus* spp. May be due to the Absence of an Alcohol/Acetaldehyde Dehydrogenase Gene (*adhE*), Current Microbiology, 68, 531–535.
- Endo, A., Maeno, S., Tanizawa, Y., Kneifel, W., Arita, M., Dicks, L. ve Salminen, S., 2018. Fructophilic Lactic Acid Bacteria, a Unique Group of Fructose-Fermenting Microbes, Applied and Environmental Microbiology, 84, 19, e01290-18.
- Feng, M., Fang, Y., Han, B., Zhang, L., Lu, X. ve Li, J., 2013. Novel Aspects of Understanding Molecular Working Mechanisms of Salivary Glands of Worker Honeybees (*Apis mellifera*) Investigated by Proteomics and Phosphoproteomics, Journal of Proteomics, 87, 1-15.
- Feng, T. ve Wang, J., 2020. Oxidative Stress Tolerance and Antioxidant Capacity of Lactic Acid Bacteria as Probiotic: A Systematic Review, Gut Microbes, 12, 1, e1801944
- Ferain, T., Garmyn, D., Bernard, N., Hols, P. ve Delcour, J., 1994. *Lactobacillus plantarum* *ldhL* Gene: Overexpression and Deletion, Journal of Bacteriology, 176, 3, 596-601.
- Filannino, P., di Cagno, R., Addante, R., Pontonio, E. ve Gobbetti, M., 2016. Metabolism of Fructophilic Lactic Acid Bacteria Isolated from the *Apis mellifera* L. Bee Gut: Phenolic Acids as External Electron Acceptors, Applied and Environmental Microbiology, 82, 23, 6899-6911.
- Filannino, P., Di Cagno, R. ve Gobbetti, M., 2018. Metabolic and Functional Paths of Lactic Acid Bacteria in Plant Foods: Get Out of the Labyrinth, Current Opinion in Biotechnology, 49, 64-72.
- Foo, H. L., Loh, T. C., Abdul Mutalib, N. E. ve Rahim, R. A., 2019. The Myth and Therapeutic Potentials of Postbiotics, Microbiome and Metabolome in Diagnosis, Therapy, and other Strategic Applications, Academic Press, 201-214, London.
- Fuenmayor, C. A., Quicazán, M. C. ve Figueroa, J., 2011. Desarrollo de un suplemento nutricional mediante la fermentación en fase sólida de polen de abejas empleando bacterias ácido lácticas probióticas, Alimentos Hoy, 20, 23, 17-39.
- Garbuzov, M., Couvillon, M. J., Schürch, R. ve Ratnieks, F. L. W., 2015. Honeybee Dance Decoding And Pollen-Load Analysis Show Limited Foraging On Spring-Flowering Oilseed Rape, A Potential Source Of Neonicotinoid Contamination, Agriculture, Ecosystems and Environment, 203, 62-68.
- Garmiene, G., Salomskiene, J., Jasutiene, I., Macioniene, I. ve Miliauskiene, I., 2010. Production of Benzoic Acid by Lactic Acid Bacteria from *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus* Genera in Milk, Milchwissenschaft, 65, 3, 295-298.

- Gilliam, M., 1979. Microbiology of Pollen and Bee Bread : The Yeasts, Apidologie, 10, 43–53.
- Gönül, S., 2016. Impact of Bee Pollen Fermentation on the Profile and Bioaccessibility of Phenolic Compounds, Yüksek Lisans tezi, İ.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Gonzales, G. B., Smagghe, G., Grootaert, C., Zotti, M., Raes, K. ve Camp, J. V., 2015. Flavonoid interactions during digestion, absorption, distribution and metabolism: A sequential structure-activity/property relationship-based approach in the study of bioavailability and bioactivity, Drug Metabolism Reviews, 47, 2, 175-190.
- Gustaw, K., Michalak, M., Polak-Berecka, M. ve Waśko, A., 2018. Isolation and Characterization of a New Fructophilic *Lactobacillus plantarum* FPL Strain from Honeydew, Annals of Microbiology, 68, 7, 459-470.
- Hammes, W. P. ve Vogel, R., 1995. The Genus *Lactobacillus*: The Lactic Acid Bacteria, Blackie Academic, London.
- Hofvendahl, K. ve Hahn-Hägerdal, B., 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources, Enzyme and Microbial Technology, 26, 2-4, 87-107.
- Hong, H., Niu, K. M., Lee, J. H., Cho, S., Han, S. G. ve Kim, S. K., 2016. Characteristics of Chinese chives (*Allium tuberosum*) fermented by *Leuconostoc mesenteroides*, Applied Biological Chemistry, 59, 3, 349-357.
- Hopper, W. ve Mahadevan, A., 1991. Utilization of Catechin and its Metabolites by *Bradyrhizobium japonicum*, Applied Microbiology and Biotechnology, 35, 3, 411-415.
- Ilango, S. ve Antony, U., 2021. Probiotic microorganisms from non-dairy traditional fermented foods, Trends in Food Science and Technology, 118, 617-638.
- Isidorov, V. A., Isidorova, A. G., Szczepaniak, L. ve Czyzewska, U., 2009. Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Investigation of the Chemical Composition of Beebread, Food Chemistry, 115, 3, 1056-1063.
- Ispirli, H. ve Dertli, E., 2021. Detection of Fructophilic Lactic Acid Bacteria (FLAB) in Bee Bread and Bee Pollen Samples and Determination of Their Functional Roles, Journal of Food Processing and Preservation, 45, 5, e15414.
- Jannesar, M., Shoushtari, M. S., Majd, A. ve Pourpak, Z., 2017. Bee Pollen Flavonoids as a Therapeutic Agent in Allergic and Immunological Disorders, Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology, 16, 3, 171-182.

- Kačániová, M., Miroslav, J., Chlebo, R., Kňazovická, V., Kadasi-Horáková, M., Kunová, S., Lejková, J., Haščík, P., Mareček, J. ve Šimko, M., 2011. Mycobiota and Mycotoxins in Bee Pollen Collected from Different Areas of Slovakia, Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 46, 7, 623-629.
- Kang, D. ve Fung, D. Y. C., 1998. Comparison of Kang-Fung Medium and MRS Medium for Screening *Pediococcus* spp. from Mixed Culture Systems, Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 6, 2, 77-83.
- Kang, T. S., Korber, D. R. ve Tanaka, T., 2013. Influence of Oxygen on NADH Recycling and Oxidative Stress Resistance Systems in *Lactobacillus panis* PM1, AMB Express, 3, 1, 1-9.
- Kaplan, M., Karaoglu, Ö. ve Silici, S., 2019. An Evaluation on Bee Bread: Chemical and Palynological Analysis, Mellifera, 19, 1, 21-29.
- Kara, Y., 2020. Fenolik Bileşiklerin RP-HPLC-PDA ile Analiz Yöntemi Geliştirilmesi, Validasyonu ve Etanolik Propolis Özütlerine Uygulanması, Yüksek Lisans Tezi, K. T. Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Kaškonienė, V., Katilevičiūtė, A., Kaškonas, P. ve Maruška, A., 2018. The Impact of Solid-State Fermentation on Bee Pollen Phenolic Compounds and Radical Scavenging Capacity, Chemical Papers, 72, 8, 2115-2120.
- Kaškonienė, V., Adaškevičiūtė, V., Kaškonas, P., Mickienė, R. ve Maruška, A., 2020. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Natural and Fermented Bee Pollen, Food Bioscience, 34, 100532.
- Kayacan, S., Sagdic, O. ve Doymaz, I., 2018. Effects of Hot-Air and Vacuum Drying on Drying Kinetics, Bioactive Compounds and Color of Bee Pollen, Journal of Food Measurement and Characterization, 12, 2, 1274-1283.
- Khalifa, S. A. M., Elashal, M., Kieliszek, M., Ghazala, N. E., Farag, M. A., Saeed, A., Xiao, J., Zou, X., Khatib, A., Göransson, U. ve El-Seedi, H. R., 2020. Recent Insights into Chemical and Pharmacological Studies of Bee Bread, Trends in Food Science and Technology, 97, 300-316.
- Khubber, S., Marti-Quijal, F. J., Tomasevic, I., Remize, F. ve Barba, F. J., 2022. Lactic Acid Fermentation as a Useful Strategy to Recover Antimicrobial and Antioxidant Compounds from Food and By-Products, Current Opinion in Food Science, 43, 189-198.
- Kieliszek, M., Piwowarek, K., Kot, A. M., Błażej, S., Chlebowska-Śmigiel, A. ve Wolska, I., 2018. Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review, Trends in Food Science and Technology, 71, 170-180.

- Kim, S., Fung, D. Y. C. ve Kang, D., 2001. Evaluation of Kang-Fung-Sol Medium for Selectivity of Lactic Acid Bacteria from Laboratory Medium and Ground Beef, Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 9, 3, 161-169.
- Klingberg, T. D., Axelsson, L., Naterstad, K., Elsser, D. ve Budde, B. B., 2005. Identification of Potential Probiotic Starter Cultures for Scandinavian-Type Fermented Sausages. International Journal of Food Microbiology, 105, 3, 419-431.
- Kodama, R., 1956. Studies on the Nutrition of Lactic Acid Bacteria. Part IV. *Lactobacillus fructosus* nov. sp., A New Species of Lactic Acid Bacteria, Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 30, 705-708.
- Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L. ve Olczyk, K., 2015. Bee pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application, Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2015, 297425.
- Konings, W. N., Lolkema, J. S., Bolhuis, H., Van Veen, H. W., Poolman, B. ve Driessen, A. J. M., 1997. The Role of Transport Processes in Survival of Lactic Acid Bacteria, Antonie van Leeuwenhoek, 71, 117-128.
- Koseki, T., Fushinobu, S., Ardiansyah, Shirakawa, H. ve Komai, M., 2009. Occurrence, Properties, and Applications of Feruloyl Esterases, Applied Microbiology and Biotechnology, 84, 5, 803-810.
- Kostić, A., Milinčić, D. D., Petrović, T. S., Krnjaja, V. S., Stanojević, S. P., Barać, M. B., Tešić, Ž. L. ve Pešić, M. B., 2019. Mycotoxins and Mycotoxin Producing Fungi in Pollen: Review, Toxins, 11, 64.
- Krell, R., 1996. Value-Added Products from Beekeeping, FAO Agricultural Services Bulletin, 124, Rome.
- Kroll, J., Rawel, H. M. ve Rohn, S., 2003. Reactions of Plant Phenolics with Food Proteins and Enzymes under Special Consideration of Covalent Bonds, Food Science and Technology Research, 9, 3, 205-218.
- Lefeber, T., Gobert, W., Vrancken, G., Camu, N. ve De Vuyst, L., 2011. Dynamics and Species Diversity of Communities of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria During Spontaneous Cocoa Bean Fermentation in Vessels, Food Microbiology, 28, 3, 457-464.
- Leonard, W., Zhang, P., Ying, D., Adhikari, B. ve Fang, Z., 2021. Fermentation Transforms the Phenolic Profiles and Bioactivities of Plant-Based Foods, Biotechnology Advances, 49, 107763.

- Li, T., Jiang, T., Liu, N., Wu, C., Xu, H. ve Lei, H., 2021. Biotransformation of Phenolic Profiles and Improvement of Antioxidant Capacities in Jujube Juice by Select Lactic Acid Bacteria, Food Chemistry, 339, 127859.
- Liang, L., Wu, X., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., Zou, Y., Mao, G. ve Yang, L., 2012. *in vitro* Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Anthocyanins from Mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) Following Simulated Gastro-Intestinal Digestion, Food Research International, 46, 1, 76-82.
- Loglio, G., Formato, G., Pietropaoli, M., Jannoni-Sebastianini, R., Carreck, N. ve van der Steen, J., 2019. An Innovative Home-Made Beebread Collector as a Tool for Sampling and Harvesting, Bee World, 96, 16-18.
- Loper, G. M., Standifer, L. N., Thompson, M. J. ve Gilliam, M., 1980. Biochemistry and Microbiology of Bee-Collected Almond (*Prunus Dulcis*) Pollen and Bee Bread. I- Fatty Acids, Sterols, Vitamins And Minerals, Apidologie, 11, 1, 63-73.
- Madeira Junior, J. V., Teixeira, C. B. ve Macedo, G. A., 2015. Biotransformation and Bioconversion of Phenolic Compounds Obtainment: An Overview, Critical Reviews in Biotechnology, 35, 1, 75-81.
- Maeno, S., Tanizawa, Y., Kanesaki, Y., Kubota, E., Kumar, H., Dicks, L., Salminen, S., Nakagawa, J., Arita, M. ve Endo, A., 2016. Genomic Characterization of a Fructophilic Bee Symbiont *Lactobacillus kunkeei* Reveals its Niche-Specific Adaptation, Systematic and Applied Microbiology, 39, 8, 516-526.
- Maeno, S., Nishimura, H., Tanizawa, Y., Dicks, L., Arita, M. ve Endo, A., 2021. Unique Niche-Specific Adaptation of Fructophilic Lactic Acid Bacteria and Proposal of Three *Apilactobacillus* Species as Novel Members of the Group, BMC Microbiology, 21, 1, 1–14.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. ve Jiménez, L., 2004. Polyphenols: Food Sources and Bioavailability, The American Journal of Clinical Nutrition, 79, 5, 727-747.
- Maragkoudakis, P., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. ve Tsakalidou, E., 2006. Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains Isolated from Dairy Products, International Dairy Journal, 16, 189-199.
- Mayda, N., Özkök, A., Ecem Bayram, N., Gerçek, Y. C. ve Sorkun, K., 2020. Bee Bread and Bee Pollen of Different Plant Sources: Determination of Phenolic Content, Antioxidant Activity, Fatty Acid and Element Profiles, Journal of Food Measurement and Characterization, 14, 4, 1795-1809.
- McDougall, G. J., Dobson, P., Smith, P., Blake, A. ve Stewart, D., 2005. Assessing Potential Bioavailability of Raspberry Anthocyanins Using an *in vitro* Digestion System, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 15, 5896-5904.

- Mesas, J. M., Rodríguez, M. C. ve Alegre, M. T., 2011. Characterization of Lactic Acid Bacteria from Musts and Wines of Three Consecutive Vintages of Ribeira Sacra, Letters in Applied Microbiology, 52, 3, 258-268.
- Millward, D. J., Layman, D. K., Tomé, D. ve Schaafsma, G., 2008. Protein Quality Assessment: Impact of Expanding Understanding of Protein and Amino Acid Needs for Optimal Health, American Journal of Clinical Nutrition, 87, 5, 1576S-1581S.
- Mohammad, S. M., Mahmud-Ab-Rashid, N. K. ve Zawawi, N., 2020. Botanical Origin and Nutritional Values of Bee Bread of Stingless Bee (*Heterotrigona itama*) from Malaysia, Journal of Food Quality, 2020, 2845757.
- Molina, G. E. S., Shetty, R., Xiao, H., Wätjen, A. P., Tovar, M. ve Bang-Berthelsen, C. H., 2022. Development of a Novel Lactic Acid Bacteria Starter Culture Approach: From Insect Microbiome to Plant-Based Fermentations. LWT, 167, 113797.
- Mora-Adames, W. I., Fuenmayor, C. A., Benavides-Martín, M. A., Algecira-Enciso, N. A. ve Quicazán, M. C., 2021. Bee Pollen As a Novel Substrate in Pilot-Scale Probiotic-Mediated Lactic Fermentation Processes, LWT, 141, 110868.
- Nagai, T., Nagashima, T., Myoda, T. ve Inoue, R., 2004. Preparation and Functional Properties of Extracts From Bee Bread, Nahrung - Food, 48, 3, 226-229.
- Neveling, D. P., Endo, A. ve Dicks, L. M. T., 2012. Fructophilic *Lactobacillus kunkeei* and *Lactobacillus brevis* Isolated from Fresh Flowers, Bees and Bee-Hives, Current Microbiology, 65, 507–515.
- Nielsen, D. S., Teniola, O. D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T. S. ve Holzapfel, W. H., 2007. The Microbiology of Ghanaian Cocoa Fermentations Analysed Using Culture-Dependent and Culture-Independent Methods, International Journal of Food Microbiology, 114, 2, 168-186.
- Oh, B. T., Jeong, S. Y., Velmurugan, P., Park, J. H. ve Jeong, D. Y., 2017. Probiotic-Mediated Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) Fruit Fermentation to Yield Functionalized Products for Augmented Antibacterial and Antioxidant Activity, Journal of Bioscience and Bioengineering, 124, 5, 542-550.
- Olofsson, T. C. ve Vásquez, A., 2008. Detection and Identification of a Novel Lactic Acid Bacterial Flora within the Honey Stomach of the Honeybee *Apis mellifera*, Current Microbiology, 57, 4, 356-363.
- Othman, N. Ben, Roblain, D., Chammen, N., Thonart, P. ve Hamdi, M., 2009. Antioxidant Phenolic Compounds Loss During the Fermentation of Chétoui olives, Food Chemistry, 116, 3, 662-669.

- Othman, Z. A., Noordin, L., Ghazali, W. S. W., Omar, N. ve Mohamed, M., 2019. Nutritional, Phytochemical and Antioxidant Analysis of Bee Bread from Different Regions of Malaysia, Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 81, 955-960.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S. ve Isolauri, E., 2002. Probiotics: An Overview of Beneficial Effects, Antonie van Leeuwenhoek, 82, 279-289.
- Ozdal, T., Capanoglu, E. ve Altay, F., 2013. A Review on Protein-Phenolic Interactions and Associated Changes, Food Research International, 51, 2, 954-970.
- Ozkan, K., Sagcan, N., Ozulku, G., Sagdic, O., Toker, O. S. ve Muz, M. N., 2018. Bioactive and Bioaccessibility Characteristics of Honeybee Pollens Collected from Different Regions of Turkey, Journal of Food Measurement and Characterization, 12, 1, 581-587.
- Ozkan, K., Karadag, A. ve Sagdic, O., 2022. The Effects of Different Drying Methods on the *in vitro* Bioaccessibility of Phenolics, Antioxidant Capacity, Minerals and Morphology of Black ‘Isabel’ grape, LWT, 158, 113185.
- Pereira De Melo, I. L. ve De Almeida-Muradian, L. B., 2010. Stability of Antioxidants Vitamins In Bee Pollen Samples, Quimica Nova, 33, 514-518.
- Pirini, A., Conte, L. S., Francioso, O. ve Lercker, G., 1992. Capillary Gas Chromatographic Determination of Free Amino Acids in Honey as a Means of Discrimination between Different Botanical Sources, Journal of High Resolution Chromatography, 15, 3, 165-170.
- Potts, S. G., Roberts, S. P. M., Dean, R., Marris, G., Brown, M. A., Jones, R., Neumann, P. ve Settele, J., 2010. Declines of Managed Honey Bees and Beekeepers in Europe, Journal of Apicultural Research, 49, 15-22.
- Powell, E., Ratnayeke, N. ve Moran, N. A., 2016. Strain Diversity and Host Specificity in A Specialized Gut Symbiont of Honeybees and Bumblebees, Molecular Ecology, 25, 18, 4461-4471.
- Qian, Y., Zhang, J., Zhou, X., Yi, R., Mu, J., Long, X., Pan, Y., Zhao, X. ve Liu, W., 2018. *Lactobacillus plantarum* CQPC11 Isolated From Sichuan Pickled Cabbages Antagonizes D-Galactose-Induced Oxidation And Aging in Mice, Molecules, 23, 3026.
- Rangberg, A., Mathiesen, G., Amdam, G. V. ve Diep, D. B., 2015. The Paratransgenic Potential of *Lactobacillus kunkeei* in the Honey Bee *Apis mellifera*, Beneficial Microbes, 6, 4, 513-523.
- Robards, K., 2003. Strategies for the Determination of Bioactive Phenols in Plants, Fruit and Vegetables, Journal of Chromatography A, 1000, 657-691.

- Rodríguez-Carrasco, Y., Font, G., Mañes, J. ve Berrada, H., 2013. Determination of Mycotoxins in Bee Pollen by Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61, 8, 1999-2005.
- Rokop, Z. P., Horton, M. A. ve Newton, I. L. G., 2015. Interactions between Cooccurring Lactic Acid Bacteria in Honey Bee Hives, Applied and Environmental Microbiology, 81, 20, 7261-7270.
- Ruiz Rodríguez, L. G., Aller, K., Bru, E., De Vuyst, L., Hébert, E. M. ve Mozzi, F., 2017. Enhanced Mannitol Biosynthesis by the Fruit Origin Strain *Fructobacillus trophaeoli* CRL 2034, Applied Microbiology and Biotechnology, 101, 15, 6165-6177.
- Rzepecka-Stojko, A., Stojko, J., Kurek-Górecka, A., Górecki, M., Kabała-Dzik, A., Kubina, R., Możdziej, A., Buszman, E. ve Iriti, M., 2015. Polyphenols from Bee Pollen: Structure, Absorption, Metabolism and Biological Activity, Molecules, 20, 12, 21732-21749.
- Saa-Otero, M. P., Díaz-Losada, E. ve Fernández-Gómez, E., 2000. Analysis of Fatty Acids, Proteins and Ethereal Extract in Honeybee Pollen - Considerations of Their Floral Origin, Grana, 39, 4, 175-181.
- Sabuncu, A. G. İ., Biçakçı, A., Tatlıdıl, A. G. S. ve Malyer, H. 2002. Bursa Piyasasında Satılan ve Uludağ ile Karacabey Yörelerine Ait Olduğu Belirtilen Polenlerin Mikroskobik Analizi, Uludag Bee Journal, 4, 3-9.
- Sadler, G. D. ve Murphy, P. A., 2010. pH and Titratable Acidity, Food Analysis, Springer, Boston, 219-238.
- Salazar-González, C. ve Díaz-Moreno, C., 2014. Características Bioactivas y Sensoriales en Procesos de Fermentación en Fase Sólida de Polen Apícola, Encuentro Nacional de Investigación Y Desarrollo-ENID, 4, Bogotá, Colombia.
- Schulz, M., Biluca, F. C., Gonzaga, L. V., Borges, G. da S. C., Vitali, L., Micke, G. A., de Gois, J. S., de Almeida, T. S., Borges, D. L. G., Miller, P. R. M., Costa, A. C. O. ve Fett, R., 2017. Bioaccessibility of Bioactive Compounds and Antioxidant Potential of Juçara Fruits (*Euterpe edulis* Martius) Subjected to *in vitro* Gastrointestinal Digestion, Food Chemistry, 228, 447-454.
- Semkiw, P. ve Skubida, P., 2021. Bee Bread Production-A New Source of Income for Beekeeping Farms?, Agriculture (Switzerland), 11, 6, 468.

- Siracusa, L., Kulisic-Bilusic, T., Politeo, O., Krause, I., Dejanovic, B. ve Ruberto, G., 2011. Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Aqueous Infusions from *Capparis spinosa* L. and *Crithmum maritimum* L. Before and After Submission to a Two-Step *in vitro* Digestion Model, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 23, 12453-12459.
- Slinkard, K. ve Singleton, V., 1977. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods, American Journal of Enology and Viticulture, 28, 1, 49-55.
- Smid, E. J. ve Kleerebezem, M., 2014. Production of Aroma Compounds in Lactic Fermentations, Annual Review of Food Science and Technology, 5, 313-326.
- Stalmach, A., Mullen, W., Pecorari, M., Serafini, M. ve Crozier, A. 2009. Bioavailability of C-Linked Dihydrochalcone and Flavanone Glucosides in Humans Following Ingestion of Unfermented and Fermented Rooibos Teas, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, 15, 7104-7111.
- Stojadinovic, M., Radosavljevic, J., Ognjenovic, J., Vesic, J., Prodic, I., Stanic-Vucinic, D. ve Cirkovic Velickovic, T., 2013. Binding Affinity between Dietary Polyphenols and β -lactoglobulin Negatively Correlates with the Protein Susceptibility to Digestion and Total Antioxidant Activity of Complexes Formed, Food Chemistry, 136, 1263-1271.
- Suissa, R., Oved, R., Jankelowitz, G., Turjeman, S., Koren, O. ve Kolodkin-Gal, I., 2022. Molecular Genetics for Probiotic Engineering: Dissecting Lactic Acid Bacteria, Trends in Microbiology, 30, 3, 293-306.
- Takatani, N. ve Endo, A., 2021. Viable Fructophilic Lactic Acid Bacteria Present in Honeybee-based Food Products, FEMS Microbiology Letters, 368, 21–24.
- Tamang, J. P., Shin, D. H., Jung, S. J. ve Chae, S. W., 2016. Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods, Frontiers in Microbiology, 7, 578.
- Thakur, M. ve Nanda, V., 2020. Composition and Functionality of Bee Pollen: A Review, Trends in Food Science and Technology, 98, 82,106.
- Tomás-Barberán, F. A. ve Andrés-Lacueva, C., 2012. Polyphenols and Health: Current State and Progress, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60, 36, 8773-8775.
- Tomás, A., Falcão, S. I., Russo-Almeida, P. ve Vilas-Boas, M., 2017. Potentialities of Beebread as a Food Supplement and Source of Nutraceuticals: Botanical Origin, Nutritional Composition and Antioxidant Activity, Journal of Apicultural Research, 56, 3, 219-230.

- Tropea, A., Potortì, A. G., Turco, V. Lo, Russo, E., Vadalà, R., Rando, R. ve Di Bella, G., 2021. Aquafeed Production from fermented Fish Waste and Lemon Peel, Fermentation, 7, 4, 272.
- Tu, Y. Y., Xia, H. L. ve Watanabe, N., 2005. Changes in Catechins During the Fermentation of Green Tea, Applied Biochemistry and Microbiology, 41, 6, 574-577.
- Urcan, A. C., Marghitas, L. Al, Dezmirean, D. S., Bobis, O., Bonta, V., Muresan, C. I. ve Margaoan, R., 2017. Chemical Composition and Biological Activities of Beebread-Review, Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies, 74, 1, 6-14.
- URL-1, https://www.meteoblue.com/tr/hava/hafta/barisli_turkiye_751059, Barışlı Hava Durumu. 30 Haziran 2022.
- URL-2, https://www.meteoblue.com/tr/hava/hafta/torul_turkiye_738668, Torul Hava Durumu. 1 Ağustos 2022.
- URL-3, https://www.meteoblue.com/tr/hava/hafta/kocadal_turkiye_738577, Torul Hava Durumu. 20 Ağustos 2022.
- URL-4, www.mgm.gov.tr/veridegerlendirme/il-ve-ilceler-istatistik.aspx?m=TRABZON, İllere Ait Mevsim Normalleri. 1 Ocak 2023.
- Uțoiu, E., Matei, F., Toma, A., Diguță, C. F., Ștefan, L. M., Mănoiu, S., Vărăjmașu, V. V., Moraru, I., Oancea, A., Israel-Roming, F., Cornea, C. P., Constantinescu-Aruxandei, D., Moraru, A. ve Oancea, F., 2018. Bee Collected Pollen with Enhanced Health Benefits, Produced by Fermentation with a Kombucha Consortium, Nutrients, 10, 10, 1365.
- Uysal, A., Kurt, Ş., Soylu, S., Soylu, E. M. ve Kara, M., 2019. Identification of Microorganism Species in Leafy Vegetables Using MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization Mass Spectrometry) Technique, Yuzuncu Yil University Journal of Agricultural Sciences, 29, 4, 595-601.
- Valero-Cases, E., Nuncio-Jáuregui, N. ve Frutos, M. J. 2017. Influence of Fermentation with Different Lactic Acid Bacteria and *in vitro* Digestion on the Biotransformation of Phenolic Compounds in Fermented Pomegranate Juices. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65, 31, 6488-6496.
- Vamanu, A., Vamanu, E., Popa, O., Câmpeanu, G., Albulescu, R., Drugulescu, M., Niță, S. ve Bâbeani, N., 2008. Obtaining of a Symbiotic Product Based on lactic Bacteria, Pollen and Honey, Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS, 11, 4, 613-617.

- Vásquez, A. ve Olofsson, T. C., 2009. The Lactic Acid Bacteria Involved in the Production of Bee Pollen and Bee Bread, Journal of Apicultural Research, 48, 3, 189-195.
- Végh, R., Csóka, M., Sörös, C. ve Sipos, L., 2021. Food Safety Hazards of Bee Pollen—A Review, Trends in Food Science and Technology, 114, 490-509.
- Vergès, M. C. C., Zuñiga, M., Morel-Deville, F., Pérez-Martínez, G., Zagorec, M. ve Ehrlich, S. D., 1999. Relationships between Arginine Degradation, pH and Survival in *Lactobacillus sakei*, FEMS Microbiology Letters, 180, 2, 297-304.
- Wang, Y., Guo, Y., Chen, H., Wei, H. ve Wan, C., 2018. Potential of *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 and *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 in Relieving Colitis by Gut Microbiota, Immune, and Anti-Oxidative Stress, Canadian Journal of Microbiology, 64, 5, 327-337.
- Wieser, A., Schneider, L., Jung, J. ve Schubert, S., 2012. MALDI-TOF MS in Microbiological Diagnostics-Identification of Microorganisms and Beyond (Mini Review), Applied Microbiology and Biotechnology, 93, 3, 965-974.
- Wong, Y. H., Tan, C. P., Long, K. ve Nyam, K. L., 2014. *In vitro* Simulated Digestion on the Biostability of *Hibiscus cannabinus* L. Seed Extract, Czech Journal of Food Sciences, 32, 2, 177-181.
- World Health Organization, 2001. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, Cordoba, Argentina, 34 p.
- Wu, W., Wang, K., Qiao, J., Dong, J., Li, Z. ve Zhang, H., 2019. Improving Nutrient Release of Wall-Disrupted Bee Pollen with a Combination of Ultrasonication and High Shear Technique, Journal of the Science of Food and Agriculture, 99, 2, 564-575.
- Wu, Y., Li, S., Tao, Y., Li, D., Han, Y., Show, P. L., Wen, G. ve Zhou, J., 2021. Fermentation of Blueberry and Blackberry Juices using *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus* and *Bifidobacterium bifidum*: Growth of Probiotics, Metabolism of Phenolics, Antioxidant Capacity *in vitro* and Sensory Evaluation, Food Chemistry, 348, 129083.
- Xu, X., Sun, L., Dong, J. ve Zhang, H., 2009. Breaking the Cells of Rape Bee Pollen and Consecutive Extraction of Functional Oil with Supercritical Carbon Dioxide, Innovative Food Science and Emerging Technologies, 10, 1, 42-46.
- Xu, X., Bao, Y., Wu, B., Lao, F., Hu, X. ve Wu, J., 2019. Chemical Analysis and Flavor Properties of Blended Orange, Carrot, Apple and Chinese Jujube Juice Fermented by Selenium-Enriched Probiotics, Food Chemistry, 289, 250-258.

- Yan, S., Li, Q., Xue, X., Wang, K., Zhao, L. ve Wu, L., 2019. Analysis of Improved Nutritional Composition of Bee Pollen (*Brassica campestris* L.) After Different Fermentation Treatments, International Journal of Food Science and Technology, 54, 6, 2169-2181.
- Yesiltas, B., Capanoglu, E., Firatligil-Durmus, E., Sunay, A. E., Samanci, T. ve Boyacioglu, D., 2014. Investigating the *in-vitro* Bioaccessibility of Propolis and Pollen Using a Simulated Gastrointestinal Digestion System, Journal of Apicultural Research, 53, 1, 101-108.
- Yıldız, O., 2011. Bir Gıda Maddesi Olarak Kestane Poleninin Kimyasal Bileşimi, Biyoaktif Özellikleri ve Karaciğer Hasarını Önlemedeki Rolü, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Zhang, Z., Cao, H., Chen, C., Chen, X., Wei, Q. ve Zhao, F., 2017. Effects of Fermentation by *Ganoderma lucidum* and *Saccharomyces cerevisiae* on Rape Pollen Morphology and Its Wall, Journal of Food Science and Technology, 54, 12, 4026-4034.
- Zhao, D. ve Shah, N. P., 2016. Lactic acid Bacterial Fermentation Modified Phenolic Composition in Tea Extracts and Enhanced Their Antioxidant Activity and Cellular Uptake of Phenolic Compounds Following *in vitro* Digestion, Journal of Functional Foods, 20, 182-194.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G. ve Lebeer, S., 2020. A Taxonomic Note on the Genus *Lactobacillus*: Description of 23 Novel Genera, Emended Description of the Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and Union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 70, 2782–2858.
- Zhou, Y., Wang, R., Zhang, Y., Yang, Y., Sun, X., Zhang, Q. ve Yang, N., 2020. Biotransformation of Phenolics and Metabolites and the Change in Antioxidant Activity in Kiwifruit Induced by *Lactobacillus plantarum* Fermentation, Journal of the Science of Food and Agriculture, 100, 8, 3283-3290.
- Zuluaga-Dominguez, C. M. ve Quicazan, M., 2019. Effect of Fermentation on Structural Characteristics and Bioactive Compounds of Bee-Pollen Based Food, Journal of Apicultural Science, 63, 2, 209-222.

ÖZGEÇMİŞ

Liseyi 2008 yılında Şanlıurfa Fen Lisesi'nde bitirdikten sonra 2009 yılında Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünü kazandı ve 2013 yılında mezun oldu. Aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim dalında yüksek lisansa başladı. 2015 yılında Gıda Yüksek Mühendisi unvanını aldı. Eylül 2016'da Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında doktora programına başladı. Aralık 2015'ten beri Karadeniz Teknik Üniversitesi Maçka Meslek Yüksekokulu Gıda İşleme Bölümünde öğretim görevlisi olarak görev yapmaktadır. Yabancı dili İngilizce'dir.

Yazarın SCI kapsamındaki Dergilerde Yayınlanmış Makaleleri:

Turkut, G. M., **Degirmenci, A.**, Yildiz, O., Can, Z., Cavarar, S., Yaylaci Karahalil, F. ve Kolayli, S., 2018. Investigating 5-hydroxymethylfurfural Formation Kinetic and Antioxidant Activity in Heat Treated Honey from Different Floral Sources, Journal of Food Measurement and Characterization, 12, 4, 2358-2365.

Ersus Bilek, S., **Degirmenci, A.**, Tekin, İ. ve Yılmaz, F. M., 2019. Combined Effect of Vacuum and Different Freezing Methods on the Quality Parameters of Cherry Tomato (*Lycopersicon esculentum* var. *Cerasiforme*), Journal of Food Measurement and Characterization, 13, 3, 2218-2229.

Abidar, S., Yildiz, O., **Degirmenci, A.**, Amakran, A., El Maadoudi, M. ve Nhiri, M., 2019. Glucose-Mediated Protein Glycation: Contribution of Methanolic Extract of *Ceratonia siliqua* L. in Protection and *in vitro* Potential İnhibition of Acetylcholinesterase, Journal of Food Biochemistry, 43, 11, e13009.

Degirmenci, A., Can, Z., Boyraci, G. M., Yildiz, O., Asadov, E. ve Kolayli, S., 2020. Honeys from Some Different Regions of Azerbaijan: Bioactive Characteristics Based on Phenolic Profile and Antioxidant Activity, Journal of Apicultural Research, 59, 4, 390-397.

Yildiz, O., Gurkan, H., Sahingil, D., **Degirmenci, A.**, Er Kemal, M., Kolayli, S. ve Hayaloglu, A. A., 2022. Floral Authentication of Some Monofloral Honeys Based on Volatile Composition and Physicochemical Parameters, European Food Research and Technology, 248, 2145–2155.