



**ZEYTİNYAĞI BAZLI PROPOLİS
EKSTRAKTINDAN FENOLİK BİLEŞİK
EKSTRAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU VE
EKSTRAKTLARIN ANTİMİKROBİYAL
AKTİVİTESİ**

Aleyna MEVLÜTOĞULLARI

Yüksek Lisans Tezi

Kimya

Ana Bilim Dalı

Doç. Dr. Sinan BAYRAM

2025

(Her Hakkı Saklıdır)

T.C.
BAYBURT ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI
KİMYA TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

ZEYTİNYAĞI BAZLI PROPOLİS EKSTRAKTINDAN FENOLİK BİLEŞİK
EKSTRAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU VE EKSTRAKTLARIN
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aleyna MEVLÜTOĞULLARI

Danışman: Doç. Dr. Sinan BAYRAM

BAYBURT- 2025

KABUL VE ONAY

Doç. Dr. Sinan BAYRAM danışmanlığında, Aleyna MEVLÜTOĞULLARI tarafından hazırlanan “Zeytinyağı Bazlı Propolis Ekstraktından Fenolik Bileşik Ekstraksiyonunun Optimizasyonu ve Ekstraktların Antimikrobiyal Aktivitesi” başlıklı bu çalışma, 02.01.2025 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak jürimiz tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Naciye KUTLU KANTAR

Üye : Doç. Dr. Sinan BAYRAM

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Yusuf Can GERÇEK

Bu tezin kabulü Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/...../20... tarih ve 20...../.....-..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Bünyamin ALIM
Enstitü Müdürü

BEYANNAME

Bayburt Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre Doç. Dr. Sinan BAYRAM danışmanlığında hazırlamış olduğum “Zeytinyağı Bazlı Propolis Ekstraktından Fenolik Bileşik Ekstraksiyonunun Optimizasyonu ve Ekstraktların Antimikrobiyal Aktivitesi” başlıklı program seçin tezimin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

02.01.2025

Aleyna MEVLÜTOĞULLARI



ÖN SÖZ

Bu tez çalışmasında, her türlü bilgi, öneri, yardım ve desteklerini esirgemeyerek akademik olarak yetiştirme ve gelişme sürecime katkıda bulunan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Sinan BAYRAM'a,

Yüksek lisans eğitim sürecim boyunca her zaman tezimin deneysel kısımlarında sürekli yardımcı olan, bilgi ve deneyimlerini esirgemedi yol gösteren ve her zaman desteğini hissettiğim hocam Sayın Doç. Dr. Nesrin ECEM BAYRAM'a,

Tezimin deneysel kısımlarında sürekli yardımcı olan, bilgi ve deneyimlerini esirgemedi yol gösteren ve her zaman desteğini hissettiğim hocam Sayın Doç. Dr. Naciye Kutlu KANTAR ve Dr. Öğr. Üyesi Yusuf Can GERÇEK'e,

Varlığını sürekli yanımda hissettiğim, maddi ve manevi yanımda olan, benden desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen sevgili annem Songül MEVLÜTOĞULLARI ve sevgili babam Zekeriya MEVLÜTOĞULLARI'na yardımları ve sabırlarından dolayı içtenlikle teşekkürlerimi sunarım. Bu başarı onların varlıklarıyla daha anlamlı hale geldi.

Bu tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 122O191 nolu proje kapsamında desteklenmiş olup, desteği için TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Aleyna MEVLÜTOĞULLARI

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEYTİNYAĞI BAZLI PROPOLİS EKSTRAKTINDAN FENOLİK BİLEŞİK EKSTRAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU VE EKSTRAKTLARIN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ

Aleyna MEVLÜTOĞULLARI

Bayburt Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Sinan BAYRAM

Bayburt-2025, Sayfa: 57

Propolis bal arıları tarafından bitkilerin farklı kısımlarından toplanan reçinemsi bir üründür. Fakat, propolis doğrudan kovandan hasat edildiği ham şekli ile kullanıma uygun olmayıp, uygun çözücülerde ekstrakte edilerek tüketime sunulan doğal bir üründür. Bu nedenle propolise uygulanacak ekstraksiyon yöntemi ve ekstraksiyonda kullanılacak çözücünün seçimi oldukça önemlidir. Bu tez çalışmasında son yıllarda propolis ekstraksiyonunda çözücü olarak sıklıkla tercih edilmeye başlanan zeytinyağı kullanılarak geleneksel (maserasyon) ekstraksiyon yöntemine ait proses parametrelerinin optimizasyonunun yapılması ve ekstraktların antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ekstraksiyon yönteminin propolisten toplam fenolik bileşik, antioksidan madde, krisin, galangin ve pinosembrin ekstraksiyonu üzerine etkisi belirlenmiştir. Sonuç olarak, yanıt yüzey yöntemi ile yapılan optimizasyon sonucunda optimum koşullar; 1:15 g/ml katı: çözücü oranı, 30.10 °C sıcaklık ve 9 günlük bir bekletme süresi olarak belirlenmiştir. Modelin arzu edilebilirlik değeri (d) ise 0.92 olarak saptanmıştır. Ek olarak antimikrobiyal aktivite sonuçları değerlendirildiğinde propolis ekstraktlarına karşı en duyarlı örneklerin Gram (+) bakteriler olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen tüm bu sonuçlar uygun ekstraksiyon parametreleri altında zeytinyağının propolis ekstraksiyonu için alternatif bir çözücü olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Propolis, zeytinyağı, ekstraksiyon, maserasyon, optimizasyon, antimikrobiyal aktivite.

ABSTRACT

M. SC. THESIS

OPTIMIZATION OF PHENOLIC COMPOUND EXTRACTION FROM OLIVE OIL-BASED PROPOLIS EXTRACTS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXTRACTS

Aleyna MEVLÜTOĞULLARI

Bayburt University

Institute of Graduate Studies

Department of Chemistry

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Dr. Sinan BAYRAM

Bayburt-2025, Pages: 57

Propolis is a resinous product collected by honey bees from different parts of plants. However, propolis is not suitable for use in its raw form directly harvested from the hive, it is a natural product that is extracted in appropriate solvents and consumed. Therefore, the extraction method to be applied to propolis and the choice of solvent to be used in extraction are very important. For this reason, in this thesis, it was aimed to optimize the process parameters of the traditional (maceration) extraction method using olive oil, which has been frequently preferred as a solvent in propolis extraction in recent years, and to determine the antimicrobial activity of the extracts. The effect of extraction method on the extraction of total phenolic compounds, antioxidant substances, chrysin, galangin and pinocembrin from propolis was determined. As a result of the optimization by response surface method, the optimum conditions were determined as 1:15 g/ml solid:solvent ratio, 30.10 °C temperature and a holding time of 9 days. The desirability value (d) of the model was determined as 0.92. In addition, when the antimicrobial activity results were evaluated, it was observed that the most sensitive samples against propolis extracts were Gram (+) bacteria. In conclusion, all these results show that olive oil can be an alternative solvent for propolis extraction under appropriate extraction parameters.

Keywords: Propolis, olive oil, extraction, maceration, optimization, antimicrobial activity.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	II
BEYANNAME	III
ÖN SÖZ	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
TABLOLAR.....	IX
ŞEKİLLER	X
KISALTMALAR.....	XI
SİMGELER.....	XII
GİRİŞ.....	1
Araştırmanın Konusu ve Problemi	1
Araştırmanın Amacı	1
Araştırmanın Önemi ve Gerekçesi	1
Araştırmanın Sınırlılıkları.....	1
Varsayımlar	2
Terim ve Tanımları	2
BİRİNCİ BÖLÜM.....	3
1. KURAMSAL ÇERÇEVE	3
1.1. PROPOLİS.....	3
1.1.1. Üretimi, Hasatı ve Muhafaza Edilme Koşulları	3
1.1.2. Fiziksel- Kimyasal Özellikleri.....	5
1.1.3. Propolisin Ekstraksiyonu.....	5
1.1.4. Ekstraksiyon Yöntemleri	6
1.1.4.1. Maserasyon.....	6
1.1.4.2. Mikrodalga destekli ekstraksiyon.....	7
1.1.4.3. Ohmik ısıtma destekli ekstraksiyon.....	8
1.1.4.4. Süperkritik akışkan destekli ekstraksiyon	8
1.1.4.5. Ultrasonik destekli ekstraksiyon	9
1.2. PROPOLİS İLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	10
İKİNCİ BÖLÜM.....	15
2. MATERYAL VE YÖNTEM	15
2.1. PROPOLİS NUMUNESİNİN TEMİN EDİLMESİ.....	15
2.2. BOX-BEHNKEN DENEY TASARIMI VE YANIT YÜZEY YÖNTEMİ İLE OPTİMİZASYON	15
2.3. EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ	16
2.4. ANALİZLER.....	17
2.4.1. Zeytinyağı Kalite Analizleri	17
2.4.2. Ekstraktların Toplam Fenolik Madde (TFM) ve Antioksidan Aktivite Testlerinin Gerçekleştirilmesi	17
2.4.2.1. Toplam fenolik madde analizi	17

2.4.2.2.	DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürme kapasite tayini.....	18
2.4.2.3.	CUPRAC (Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) yöntemi.....	18
2.4.2.4.	CERAC (Seryum (IV) İndirgeyici Antioksidan Kapasite) yöntemi.....	18
2.4.3.	Ekstraktların LC-MS/MS ile Fenolik Profilinin Tespit Edilmesi.....	19
2.4.4.	Antimikrobiyal Aktivite Testleri	19
2.4.4.1.	Mikroorganizmalar ve büyüme koşulları	19
2.4.4.2.	In vitro antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi	20
ÜÇÜNCÜ BÖLÜM.....		22
3. BULGULAR VE TARTIŞMA		22
3.1.	ZEYTİNYAĞI KALİTE ANALİZLERİ.....	22
3.2.	ZEYTİNYAĞI İLE UYGULANAN EKSTRAKSİYONUN OPTİMİZASYONU.....	24
3.2.1.	Sıcaklık, Süre ve Katı:Çözücü Oranın Toplam Fenolik Madde Üzerine Etkisi	26
3.2.2.	Sıcaklık, Süre ve Katı:Çözücü Oranın Antioksidan Aktivite Üzerine Etkisi	28
3.2.3.	Sıcaklık, Süre ve Katı:Çözücü Oranın Bazı Fenolik Bileşikleri Üzerine Etkisi.....	33
3.3.	EKSTRAKTLARIN <i>IN-VİTRO</i> ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ.....	42
3.3.1.	Agar Kuyu Difüzyon Metodu.....	42
3.3.2.	Mikrobrot Seyreltme Metodu	44
SONUÇ VE ÖNERİLER		47
KAYNAKÇA.....		49
ÖZ GEÇMİŞ		57

TABLÖLAR

Tablo 1: Maserasyon Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Ekstraktların Hazırlanması Aşamasında Uygulanan Deney Tasarımı	16
Tablo 2: Kullanılan Bağımlı ve Bağımsız Değişkenler.....	16
Tablo 3: Zeytinyağı Numunesinde Gerçekleştirilen Analizlerin Sonuçları.....	22
Tablo 4: Zeytinyağı Numunesinin Yağ Asidi Kompozisyonu (%).....	23
Tablo 5: Box-Behnken Deney Tasarımına Göre Elde Edilen Bağımlı Değişkenlere Ait Deney Verileri.....	24
Tablo 6: Regresyon Analizi Sonucu Elde Edilen Denklemler ve İstatistiksel Parametreler...	25
Tablo 7: Ekstraktların Fenolik Profili (Mg/Kg)	33
Tablo 8: Ekstraktların Fenolik Profili (mg/kg) (M9-M17)	34
Tablo 9: Deney ve Teorik Değerler Arasında Yapılan Tek Örneklemli T-Testi Analizine Göre Elde Edilen P Değerleri.....	42
Tablo 10: Ekstraktların Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları.....	46

ŞEKİLLER

Şekil 1: Maserasyon Yöntemi Şeması.....	7
Şekil 2: Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Şeması.....	8
Şekil 3: Süperkritik Akışkan Destekli Ekstraksiyon Şeması.....	9
Şekil 4: Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Şeması.....	10
Şekil 5: Ham Haldeki Propolis Numunesi ve Toz Hale Getirilmiş Propolis Numunesi.....	15
Şekil 6: TFM Değerlerinin Sıcaklık ve Ekstraksiyon Süresi ile Değişimi.....	26
Şekil 7: CUPRAC Değerlerinin Farklı Koşullarda Değişimi a) Sıcaklık ve Süre, b) Sıcaklık ve Çözücü:Katı Oranı, c) Süre ve Çözücü:Katı Oranı.....	30
Şekil 8: DPPH Değerlerinin Farklı Koşullarda Değişimi a) Sıcaklık ve Süre, b) Sıcaklık ve Çözücü:Katı Oranı, c) Süre ve Çözücü:Katı Oranı.....	31
Şekil 9: CERAC Değerlerinin Süre ve Çözücü:Katı Oranı ile Değişimi.....	32
Şekil 10: Krisin (Chr) Miktarının Farklı Koşullarda Değişimi a) Sıcaklık ve Süre, b) Sıcaklık ve Çözücü:Katı Oranı, c) Süre ve Çözücü:Katı Oranı.....	36
Şekil 11: Galangin (gal) Miktarının Farklı Koşullarda Değişimi a) Sıcaklık ve Süre, B) Sıcaklık ve Çözücü:Katı Oranı, C) Süre ve Çözücü:Katı Oranı.....	38
Şekil 12: Pinosembrin Miktarının Farklı Koşullarda Değişimi a) Sıcaklık ve Çözücü:Katı Oranı, b) Süre ve Çözücü:Katı Oranı.....	39

KISALTMALAR

Ç/K	: Çözücü/Katı
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil Radikal Söndürücü Kapasite
CERAC	: Seryum (IV) İndirgeme Antioksidan Kapasitesi
CUPRAC	: Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite
DMSO	: Dimetil sülfoksit
MetOH	: Metanol
EtOH	: Etanol
UFLC	: Ultra Hızlı Sıvı Kromatografisi
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
pH	: Hidrojen potansiyeli
PCLC	: Polikaprolakton/kollajen
NFN	: Nano-fiber /ağlar
ESN	: Elektro-eğirme/ağ
MHA	: Mueller Hilton Agar
SDA	: Sabouraud dextrose agar
TE	: Troloks eşdeğeri
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
PTFE	: PoliTetraFloraEtilen
TFM	: Toplam fenolik madde
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
CUPRAC	: Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite
CERAC	: Seryum (IV) indirgeyici antioksidan kapasite tayini
RSM	: Yanıt yüzey yöntemi
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsntrasyonu

SİMGELER

CO₂	: Karbondioksit
Hz	: Hertz
kHz	: Kilohertz
mL	: Mililitre
g	: Gram
Ce (IV)	: Seryum
V	: Volt
cm	: Santimetre
NH₄Ac	: Amonyum Asetat
Nc	: Neokuproin
H₂SO₄	: Sülfürik Asit
dk	: Dakika
Cu	: Bakır
L	: Litre
M	: Molar
m	: Metre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mmol	: Milimol
Mo	: Molibden
µL	: Mikrolitre
nm	: Nanometre
V	: Hacim
α	: Alfa
γ	: Gama
Δ	: Delta
ω	: Omega
ε	: Epsilon
%	: Yüzdelik
Σ	: Toplam
°C	: Santigrat

GİRİŞ

Son yıllarda özellikle beslenme alışkanlıklarına bağlı olarak hastalıklarda meydana gelen artışlar, sağlığı ve refahı iyileştirebilen, hastalık riskini/risk faktörlerini azaltan veya başlamasını geciktiren fonksiyonel gıdaların özelliklerini belirlemek için araştırmaları teşvik etmiştir (Doyon ve Labrecque, 2008). Bu noktada, bal, polen, propolis, arı sütü, arı ekmeği, arı zehri ve apilarnil gibi farklı arı ürünleri, sağlık üzerine olumlu etkileri sebebiyle, tüm Dünya’da olduğu gibi Türkiye’de de son yıllarda fonksiyonel gıda olarak tüketimi artış gösteren ürünler arasında yerini almıştır. Bu ürünlerden biri olan propolis, arılar tarafından bitkilerin farklı kısımları kullanılarak üretilen ve daha sonra kovan içerisinde enfeksiyonlardan korunma amaçlı ve yapı maddesi olarak kullanılan reçinemsî bir maddedir (Bankova vd., 2014). Bu dikkat çekici özellikleri sebebiyle propolis insanlar tarafından yüzyıllardır farklı hastalıklardan korunma ve tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Oldukça kompleks bir yapıya sahip olan propolisin kimyasal içeriği ve fiziksel özellikleri, başta bitkisel kaynakların farklılığı olmak üzere iklim şartları, mevsim ve üretim koşulları gibi farklı faktörlerden etkilenmektedir. Farklı orijinlerden propolis örnekleri başta fenolik bileşikler olmak üzere, aldehitler, ketonlar, alifatik asitler, yağ asitleri ve alkoller gibi bileşikler ortak olarak kimyasal içeriğinde barındırmaktadır. Bu bileşiklerden özellikle fenolikler fonksiyonel gıdaların yapısında yoğun bir şekilde bulunmaktadır (Shahidi ve Ambigaipalan, 2015). Propolis antioksidan, anti-inflamatuar, antimikrobial, antikanser, antidiyabetik ve karaciğer koruyucu gibi birçok özelliği nedeniyle günümüzde fonksiyonel gıdaların, besin takviyelerinin ve kozmetiklerin geliştirilmesi aşamasında kullanımı artan popüler bir ürün halini almıştır (Tomaszewski vd., 2019; Shahinozzaman vd., 2020). Bununla birlikte, Dünyada en sık kullanılan geleneksel ilaçlardan biri olan propolisten faydalanılarak üretilen ürünler ve bu ürünlerin kullanım listesi sınırsızdır (Shahinozzaman vd., 2020). Fakat, literatürde atfedilen eşsiz fonksiyonel özelliklerine rağmen, propolis doğrudan kovandan hasat edildiği ham şekli ile değil uygun çözücülerde ekstrakte edilerek tüketilmesi gereken doğal bir üründür. Ekstraksiyon işlemi sayesinde propolisin kimyasal bileşimindeki istenmeyen bileşikler uzaklaştırılır ve maksimum oranda etken maddenin (biyoaktif bileşik) çözücüye aktarılması sağlanır. Propolisten biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyon verimi çözücü, çözücü konsantrasyonu, sıcaklık, süre, partikül boyutu ve uygulama prosedürü gibi farklı faktörlerden etkilendiği için ürüne uygulanacak ekstraksiyon yöntemi ve çözücünün seçimi oldukça önemlidir (Oroian vd., 2020a; Oroian vd., 2020b). Bu nedenle bu çalışmada da ön gördüğümüz gibi özellikle gıda ve ilaç uygulamaları için kullanılması hedeflenen propolis ekstraktlarının, zeytinyağı gibi ucuz ve çevre dostu çözücüler

ve ayrıca yeşil ekstraksiyon teknikleri kullanılarak elde edilmesi önem arz etmektedir. Fonksiyonel gıda pazarının her yıl yaklaşık olarak %7-10 arasında büyüme göstermesi (Doyon ve Labrecque, 2008) sebebiyle satışa sunulan bu ürünlerin özelliklerinin belirlenmesi ve standardizasyonuna yönelik araştırmaların yürütülmesi, insan sağlığını korumanın yanı sıra bu konuda yapılacak yasal düzenlemeleri ve ayrıca artan pazarı desteklemek açısından da önemli görülmektedir.

Propolisin ekstraksiyonunda en yaygın olarak kullanılan çözücü, bal mumu ve organik atıkları iyi derecede uzaklaştırdığı için etanol olmakla birlikte (Devequi-Nunes vd., 2018), su, zeytinyağı ve polietilen glikol gibi farklı zcler (Kubiliene vd., 2015) de kullanılmaktadır. Ekstraksiyon işlemi sonucunda yüksek biyoaktiviteye sahip ürün elde etmenin yanı sıra kullanılan çözücünün toksik/sağlığa zararlı olup olmadığı, tüketilebilir olması ve ekstraksiyon sonrası uzaklaştırılıp uzaklaştırılamayacağı oldukça önemlidir (Silici, 2020). Propolis ekstraktında sıklıkla tercih edilen etanol gibi alkol bazlı uçucu organik çözücüler yanıcı özellikte olduklarından tehlike arz etmekte ve ekstraktlarda kalıntı bırakabilmektedirler (Zhang vd., 2016). Ek olarak etanol propolis için yüksek bir çözünürlük sağlamasına rağmen yüksek oranda çözünürlük bazen istenmeyen bileşiklerin çözücüye geçmesine katkı sağlayabilmektedir. Ayrıca alkole hassasiyet gösteren hastalar (alkol intoleransı olanlar vb.), diyabetikler, kanser hastaları, çocuklar ve dini sebepler ile ürünü kullanmak istemeyenler için sorun oluşturmaktadır (Silici, 2020). Bu nedenle son yıllarda propolis ekstraktı hazırlama aşamasında kullanılan çözücünün seçimi yapılırken insan sağlığı üzerinde olumsuz etkisi olmayan ya da minimum düzeyde olabilen çözücü arayışlarına girilmiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde zeytinyağı son birkaç yıldır ülkemizde etil alkole alternatif olarak propolis ekstraksiyonunda kullanılan organik çözücünün yerini almıştır. Bu nedenle bu tez çalışmasında da maserasyona yöntemi kullanılarak zeytinyağı bazlı propolis ekstraktları hazırlanmış ve bu yöntem için de ayrıca optimum ekstraksiyon koşulları belirlenmiştir. Ek olarak tüm koşullarda hazırlanan ekstraktların Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirilmiştir.

BİRİNCİ BÖLÜM

1. KURAMSAL ÇERÇEVE

1.1. PROPOLİS

Yunanlılar tarafından keşfedilen ve doğal bir antibiyotik olarak kullanılan propolis, spesifik özelliklerinden dolayı 1960'ların sonlarına doğru bilim adamlarının dikkatini çekmiştir. Propolis, bal arıları tarafınca farklı bitki kaynaklarından toplanan, yoğun olarak reçine ve bal mumu bulunduran, sıcak ortamlarda yapışkan olan bir arı ürünüdür (Burdock vd., 1998). Arılar propolisi genellikle, davetsiz misafirlerin girmesini önlemek, kovan içindeki sabit iç sıcaklığı 35 °C'de tutmak, aseptik bir ortamın oluşması için katkıda bulunmak ve asıl olarak kovayı yaygın mikrobiyal enfeksiyonlardan korumak için kullanırlar (Bankova vd., 2000).

Propolisin rengi toplanan bitkinin kaynağına göre sarı, yeşil ve siyaha kadar değişkenlik gösterebilir (Fitzgerald ve Flood, 2006). Genellikle *Populus nigra*, *Populus tremula* ve *Populus alba* 'nın tomurcuk reçineleri propolis için ilk olarak arılar tarafından tercih edilmekle birlikte *Acacia spp.*, *Betula pendula L.*, *Alnus glutinosa*, *Aesculus hippocastanum L.*, *Salix alba L.* ve *Pinus spp.* gibi bitki türleri de farklı bir seçenek olarak tercih edilmektedir (Ristivojevic vd., 2015).

Propolisin ham olarak kullanılması zararlıdır bunun sebebi, bal arıları etrafta toplayacak yeterli kaynak bulamadıkları takdirde asfalt ve boya vb. gibi insan sağlığı açısından tehdit oluşturacak kimyasal içeriklere yönelirler ve bu durumda içeriği tespit edilmemiş ham propolisin kullanılması sınırlandırmaktadır (Shehu vd., 2016). Propolis lokal, anestezik, antiinflamatuvar, antifungal, antibakteriyel, antiviral, antiprotazoal ve bağışıklığı artırıcı gibi birçok farklı farmakolojik ve biyolojik özelliklere sahip bir üründür (Azza ve Abd-El-Rhman, 2009). Bu sebepten ötürü eski çağlardan beri insanların tıp alanındaki ilgisini çekmektedir (Albayrak ve Albayrak, 2008; Castolda ve Capasso, 2002).

1.1.1. Üretimi, Hasatı ve Muhafaza Edilme Koşulları

Propolis çoğunlukla bitkilerin üst bölgelerinde yer alan tomurcuk kısımlarından toplandığından arıların propolis toplama davranışlarını gözlemlemek zordur. Fakat bazı belgesel kanallarında özel kamera sistemleri ile görüntülenmesi mümkündür. Arılar farklı bitkilerin koruyucu reçinelerini, ön bacaklarından yardım alarak, alt çeneleri sayesinde kazıyıp toplarlar. Daha sonra ağızlarında yumşattıktan sonra salgıladıkları enzimler sayesinde pelet

haline getirirler. Peleti, ön bacaklarından yardım alarak arkalarındaki polen sepetine propolis olarak aktarırlar (Ghisalberti, 1979; Doğan ve Hayoğlu, 2012). Arıların maksimum taşıyabileceği propolis miktarının depolanabilmesi için 15-16 dakika gerekmektedir. 15-16 dakika sonra yeterli miktarda propolis toplayan tarlacı arılar propolisi kovana taşırlar. Tarmacı arıların getirdiği propolis, genç işçi arılar tarafından parça parça alınarak kullanılacak yerlere götürürler ve baskı uygulayarak yapıştırırlar (Pehlivan vd., 2012; Genc ve Dodoloğlu, 2011). Getirilen propolis, kovanda ihtiyacı olan yerlerde kullanılmak üzere biraz bal mumu ekleyerek harmanlanır. Propolisin kovana taşınma işlemi arı ürününü getiren arının sayısına bağlı olarak değişmektedir. Bu işlemi 1-2 saat arasında değişiklik göstermektedir (Kumova vd., 2002).

Arıların en fazla propolis elde ettiği zaman dilimi yazın son günleri ve sonbahar aylarıdır (Pehlivan vd., 2012; Genc ve Dodoloğlu, 2011). Nektar akımının yoğun olduğu zaman dilimlerinde arıların propolis toplama eğilimlerinde azalma görülmektedir. Ayrıca propolis elde etmek için uygun zaman dilimi bölgeden bölgeye farklılık gösterdiği bilinmektedir. Mesela Batı ve Doğu Avrupa’da sonbahar ve yaz ortasında, Amerika Birleşik Devletleri’nde yaz ve yaz sonunda gerçekleştirilmekte olup Türkiye’de ise Orta ve Doğu Anadolu’da ağustos ve eylül aylarında, Ege bölgesinde mart ayında propolisin arılar tarafından toplanmakta olduğu gözlemlenmiştir (Kumova vd., 2002).

Arıların kovana taşıdıkları propolisi, kovanın duvarlarından spatül ile kazıyarak veya kovanın üst kısmına arıcılar tarafından yerleştirilen tuzaklar yardımı ile toplamak mümkündür (Waykar ve Alqadhi, 2016). Toplanan bu arı ürününün miktarı senede 10 ila 300 gram arasında değişmektedir. Fakat bu doğal ürünün toplanma miktarı arının cinsine, iklim koşulluna, bitki türlerinin çeşitliliğine ve son olarak toplanma şekline göre farklılık göstermektedir (Pehlivan vd., 2012).

Propolisin saflığının ve doğallığının korunması açısından muhafaza edilme koşulları oldukça önemlidir. Propolisin toplanmasından ekstrakte edilmesi aşamasına kadar en verimli biyolojik yararlılığı sağlayacak şekilde işlenmesine özen gösterilmelidir. Propolis -40 °C saklanma koşuluna sahip bir arı ürünüdür. Donmuş olan propolis daha iyi ezilir. Ezilen propolisin içerisindeki yabancı maddelerin uzaklaştırılması için cam bir kavanoza aktarılır ve üzerine ılık su eklenerek yabancı maddelerin dibe çökmesi sağlanır böylece propolisten uzaklaştırılmış olur. Son haldeki propolis kuru bir ortamda plastik torbada muhafaza edilebilir (Kumova vd., 2002). Ürün haline gelen propolisin muhafaza edilme koşullarında uyulmasıyla birlikte ışıktan ve yüksek sıcaklıktan uzak tutulmalıdır. Propolisin herhangi bir yan etkisinin bulunmamasının yanı sıra, nadiren de olsa alerjik bir reaksiyona neden olabilir. Alerjik bir

reaksiyonla karşı karşıya kalınması durumunda tüketim durdurulmalı veya tüketilmeden önce muhakkak bir doktor yardımı alınmalıdır. Propolis ve prolisli ürünler burun, anüs, deri ve ağız yoluyla tüketilir (Hartwich vd., 2000; Ghisalberti, 1979; Yücel vd., 2014).

1.1.2. Fiziksel- Kimyasal Özellikleri

Propolisin fiziksel açıdan bakıldığında 10°C'nin altında çok sert ve parçalanabilir bir yapıya sahip olan propolis, -20°C'ye konulduğunda daha fazla katılaşır ve kolay bir şekilde toz haline getirilebilir. 30-40°C arasında yumuşak ele yapışan bir hal alan propolis, 80°C'de kısmi olarak erime gösterir bu durum yaz ayarlarında arıların propolisi kovandan elde etmesini zorlaştırmaktadır. Propolisin rengindeki, kokusundaki ve biyolojik aktivitesindeki farklılık bitkiye, bölgeye, mevsime ve koloniye bağlı olarak değişiklik gösterebilir (Woo vd., 1997). Propolis kimyasal içeriği açısından ele alındığında, propolis coğrafi konumu ve bitkisel kökenlerine bağımlı haldedir. Propolisin %50'sini reçine, %30'unu balmumu, %10'unu uçucu yağlar, %5'ini polen ve kalan %5'lik kısmını diğer organik bileşikler oluşturmaktadır (Gómez-Caravaca vd., 2006). Propoliste bulunan organik bileşikler fenolik bileşikler, esterler, flavonoidler, terpenler, beta-steroidler, aromatik aldehydler ve alkollerdir (Huang vd., 2014). Bununla birlikte propolis kimyasal yapısında B1, B2, B6, C ve E gibi sağlık açısından önemli vitaminler ve magnezyum, kalsiyum, potasyum, sodyum, bakır, çinko, manganez ve demir gibi önemli mineralleri de içerir (Lotfy, 2006).

1.1.3. Propolisin Ekstraksiyonu

Reçinemsiz yapısından dolayı ve ham halde tüketilmesi önerilmeyen propolis, çeşitli çözücüler ile ekstrakte edilerek kullanılmaktadır. Ham propolisten en verimli seviyede yararlanabilmesi için farklı çözücüler kullanılarak propolis ekstraktları hazırlanmaktadır (Omene vd., 2013). Propolise uygun ekstraksiyon koşullarının seçilmesi, yüksek nitelikli ve uygun fiyatlı ürünlerin oluşumu için önemlidir. Propolisin ekstraksiyonu için yaygın olarak kullanılan yöntemler; maserasyon, vakum distilasyon, evaporasyon, membran konsantrasyon ve liyofilizasyon, ultrasonik destekli ekstraksiyon ve ohmik ısıtmalı ekstraksiyonudur (Mello vd., 2010).

Maserasyon yöntemi kullanılarak propolisin etanol, su, zeytinyağı, saf hindistan cevizi yağı ve propilen etilen glikol ekstraktlarının verimlerinin değerlendirildiği bir araştırmada farklı çözücülerle elde edilen ekstraktların verimlerinin %14,0-18,33 arasında değişiklik gösterdiği belirlenmiştir (Pujirahayu vd., 2014). Ekstraksiyon, propolisin biyoaktif bileşenlerinin ortaya çıkması için önemli bir basamaktır. Biyoaktif maddeler genellikle suda düşük çözünürlüğe

sahiptir ve su ile hazırlanan ekstraktlarındaki fenolik bileşiklerin miktarı etanolik ekstraktlardan 10 kat daha düşüktür (Moura vd., 2009). Bu sebepten ötürü, bu maddelerin sudaki çözünürlüğünü artıran etkili yardımcı çözücüler bulmak önemlidir. Bu nedenle uygun ekstraksiyon çözücüsünün ve koşulunun seçilmesi başta fenolik bileşikler olmak üzere diğer biyoaktif bileşiklerde hasara sebep olmamalıdır (Cunha vd., 2004).

Propolis için en iyi çözücünün %70'lik EtOH olduğu birçok çalışmada belirtilmekle olup ayrıca saf EtOH, saf MetOH ve dimetilsülfoksit (DMSO) de ekstraksiyonda kullanılmaktadır (Bhardwaj vd., 2015). Fakat yapılan çalışmalarda %70 EtOH kullanılması durumunda %20-30 oranında balmumu kalıntısına rastlandığından ötürü propolisin mumlar hariç aktif bileşenlerinin çoğunun %70 EtOH de çözündüğü bildirilmiştir (Margeretha vd., 2012; Bankova vd., 1992). Çözücü olarak EtOH'ın kullanıldığı durumlarda balmumu miktarına bağlı olarak propolisin %50-70'lik bir bölümü ve suyun kullanıldığı durumlarda ise propolisin %10'luk bir kısmı çözünmektedir (Margeretha vd., 2012). Bununla birlikte araştırmacılar son yıllarda propolis ekstraksiyonu için doğal ve insan sağlığına zararsız ekstraksiyon çözücüsü arayışına girmişlerdir (Silici, 2020).

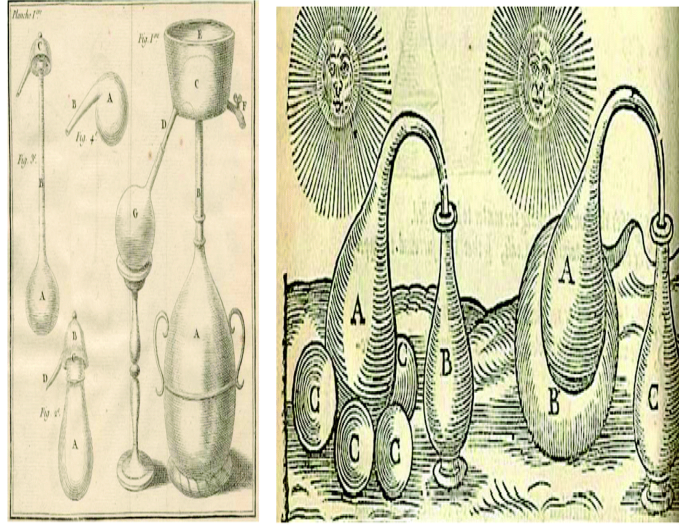
1.1.4. Ekstraksiyon Yöntemleri

Ekstraksiyon saf haldeki maddelerden hedeflenen doğal ürünlerin ayrıştırılmasının ilk basamağıdır. Hedeflenen bu doğal ürünlerin ekstraktı iki aşamadan oluşmaktadır. Bunlardan ilki çözücünün katı matristen ayrılması, ikincisi ise çözünen maddelerin toplanması aşamasıdır ve bu iki aşama sırasıyla gerçekleşmektedir. Bu ekstraksiyon aşamalarındaki verimi, çözücünün özellikleri, çözününen ürünün parçacık büyüklüğü, ekstraksiyon aşamasındaki sıcaklık oranı ve süre gibi faktörler etkilemektedir (Zhang vd., 2018). Teknolojinin ilerlemesi ile ekstraksiyon işlemi de çağa uygun olarak gelişim göstermiştir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon, ohmik ısıtımli ekstraksiyon, süperkritik ekstraksiyonu, ultrasonik destekli ekstraksiyon gibi bazı modern veya yeşil ekstraksiyon metotları da doğal ürünlere uygulanmıştır. Bu ekstraksiyonlar kısa ekstraksiyon süresi, düşük organik solvent tüketimi ve daha yüksek seçicilik gibi bazı avantajlar sunmaktadır (Büyüktuncel, 2012; Pawliszyn, 2003).

1.1.4.1. Maserasyon

Bu yöntem, en yaygın ve en eski yöntemlerden biri olmasıyla birlikte doğal besin kaynaklarından önemli bileşiklerin ekstraksiyonu işlemi için kullanılır (İlbaý, 2016). Maserasyon işlemi, ekstrakte edilecek ürünün istenilen miktarda boyut küçültme işlemlerinden sonra seçilen çözücü içerisinde çoğunlukla oda ile sıcaklığında kapalı bir

kapta belirli bir süre bekletilerek veya karıştırılarak gerçekleştirilen kolay bir işlemdir (Silici ve Kutluca, 2005).

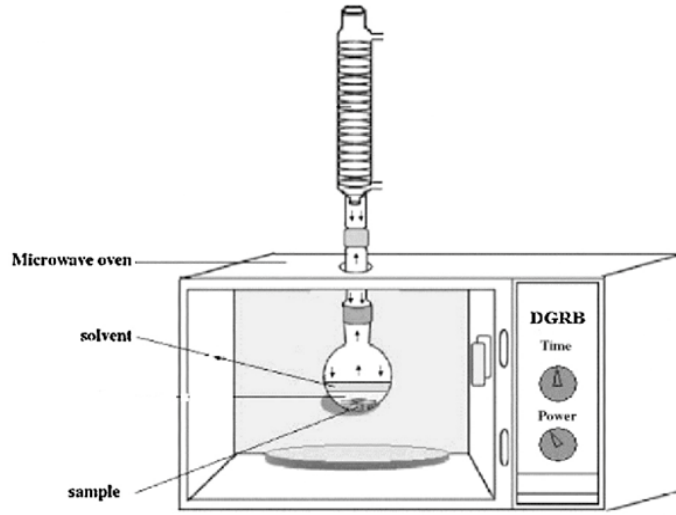


Şekil 1: Maserasyon Yöntemi Şeması

1.1.4.2. Mikrodalga destekli ekstraksiyon

Mikrodalga destekli ekstraksiyon metodu çözünen maddenin katı matrislerden hızlı bir şekilde çıkarılmasını sağlamaktadır. Diğer klasik tekniklerle aynı verimi sağlamaktadır fakat çözücü miktarının, atığının ve çevreye çözücünün salınmasının azaltılması gibi avantajlara sahiptir. Mikrodalgalar yüksek frekanslı elektromanyetik dalgalara sahip, enerjiyi ısıya çeviren, iyon iletimi ile dönmeyi sağlayan ve böylece molekül üzerine mikrodalga'nın direkt olarak etki etmesi prensibine dayanmaktadır. Bu prensip birçok mikrodalga uygulamasında eş zamanlı olarak işlenmektedir. Hazırlanan ekstraksiyon çözeltisinin iyon akışına göstermiş olduğu direnç sürtünme ile mevcut ısının artmasına sebep olur (Camel, 2001; Büyüktuncel, 2012). Ekstraksiyonun başarısını en çok etkilen faktör iyi bir çözücüdür. Eğer seçilen çözücü ısıya karşı aşırı duyarlı olursa hazırlanan karışımdaki bileşiklerin denatüre olmasına yol açar (Büyüktuncel, 2012).

Geleneksel olarak kullanılan temas yoluyla ısı iletimi sağlayan metotların aksine mikrodalgalar ekstraktın tümüne aynı anda ısı vermektedir. Bu ekstraksiyon metodu iki farklı sistem ile sağlanmaktadır. Birincisi ve en yaygını basıncı ve sıcaklığı kontrol altında olan kapalı bir kap ile yapılan ekstraksiyonu, ikincisi ise atmosferik basınç altında açık bir kapta yapılan ekstraksiyondur. Bu iki sistemden en avantajlısı kullanılan çözücü miktarının ve ekstraksiyon süresinin düşük seviyede olmasından ötürü ikinci ekstraksiyon metodudur. Mikrodalga destekli ekstraksiyon ile bitkilerde bulunan polifenoller ve lignanlar saflaştırılabilmektedir (Kaufmann ve Christen, 2002; Kaufmann vd., 2007; Beejmohun vd., 2007; Kılıç, 2010).



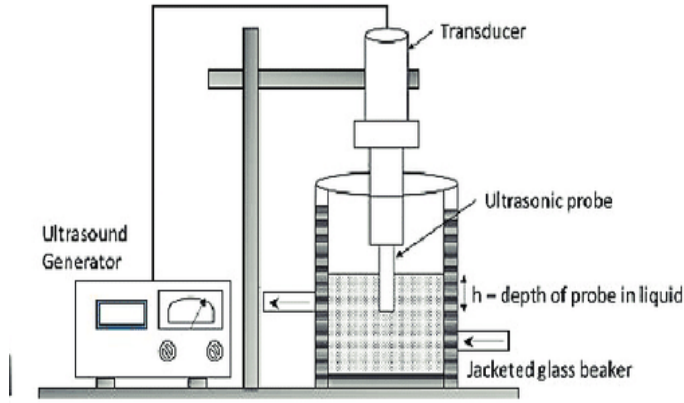
Şekil 2: Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Şeması

1.1.4.3. Ohmik ısıtma destekli ekstraksiyon

Ohmik ısıtma destekli ekstraksiyon, elektrik akımı ile doğal ürünlerdeki bileşiklerin ortaya çıkarılmasını sağlayan bir ekstraksiyon yöntemidir. Sıvı, katı veya yarı katı doğal ürünlerde dahil farklı gıdalarda kullanılabilen, sürdürülebilir ve enerji açısından verimli olan bir yöntemdir (Baysal vd., 2011). Ekstraksiyon işlemi, gıda içerisinde istenen bileşiklerin çıkarılmasına yardımcı olan ve ısı üreten elektrotlardan 1- 2000 Hz frekans ve 1-100 V/cm voltajda alternatif bir elektrik akımının geçmesiyle gerçekleşmektedir (Gavahian vd., 2015). Besinin elektrik akımına karşı oluşturduğu direnç gıda içerisinde ısı oluşumuna neden olmaktadır. Ekstraksiyonun verimliliği ısı üretim hızına, gıdanın elektriksel iletkenliğine, gıdanın bileşimine, elektrik alan şiddetine ve işlem süresine bağlıdır (Kutlu vd., 2017; Sastry, 2009).

1.1.4.4. Süperkritik akışkan destekli ekstraksiyon

Süperkritik ekstraksiyonu sırasında doğal ürün ve çözücü ile hazırlanmış karışımın içerisinde istenilen maddenin ayrılması prensibine dayanır. Bu ayrılmada süperkritik fazda karbondioksit (CO₂) kullanılmaktadır. Kritik bir basınç ve sıcaklık altında CO₂ süperkritik fazına geçerek karışımın içindeki mikro elementleri çözebilmektedir. Daha sonra yükselen basınç düşürülür ve çözücünden kolaylıkla ayrılır. Sonuç olarak elde edilen ürün tamamen uçucu gazlarda dahil olmak üzere tüm mikronlardan ayrılmış olarak hazır hale gelir (Bott, 1980). Süperkritik ekstraksiyon özellikle gıda teknolojisinde kullanılmaktadır. Bunun en büyük sebebi sıcaklığa karşı duyarlı olan vitamin, protein gibi insan sağlığı açısından önemli maddelerin yüksek sıcaklıkla yapılan ekstraksiyonlar sırasında yapılarının bozulmasından ötürü gıda teknolojilerinde çoğunlukla süperkritik ekstraksiyon kullanılmaktadır (Brunner, 2013).



Şekil 4: Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Şeması

1.2. PROPOLİS İLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR

Propolisin son yıllarda araştırmacıların ilgisini yoğun olarak çekmesinin sebebi, antioksidan, antifungal, antibakteriyel, antikarsinojenik, antiinflamatuvar, antiviral vb. biyoaktif özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Propolis bir alternatif ürün olarak düzenli kullanılması durumunda vücutta patojenlere karşı bir savunma sistemi oluşturmaktadır. Bu durum uzun süre kullanımda yapay antibiyotiklerin göstermiş olduğu etkinin aksine vücutta olumsuz bir etki yaratmamaktadır. Propolis bağışıklık sistemi açısından önemli bir besin kaynağının olması yanında antikor salgılanmasını da artırmaktadır. Fakat propolis ekstraksiyonun da kullanılan çözücünün etkisi günümüzde oldukça önemli konumdur. Bu nedenle propolis ekstraksiyonunda kullanılan çözücünün yeşil bir çözücü olması araştırmacıların önceliği olmuştur (Kutluca vd., 2006).

Bal arılarının bitkilerin farklı kısımlarından topladıkları reçinemi bir arı ürünü olan popolis ekstrete edilerek tüketilmektedir. Bu aşamada, ekstraksiyon yöntemleri açısından değerlendirildiğinde, propolis ekstraksiyonunda, yaygın olarak geleneksel yöntem olarak bilinen maserasyon yöntemi kullanılmaktadır ki bu konuda yayınlanmış birçok araştırma bulunmaktadır. Maserasyon yöntemi kullanılarak propolisin etanol, su, zeytinyağı, natürel hindistan cevizi yağı ve propilen etilen glikol ekstraktlarının verimlerinin değerlendirildiği bir çalışmada farklı çözücülerle elde edilen ekstraktların verimlerinin %14.0-18.33 arasında değişiklik gösterdiği belirlenmiştir (Pujirahayu vd., 2014). Nitekim en yüksek ekstraksiyon veriminin etanolde, en düşük ekstraksiyon veriminin ise zeytinyağında kaydedildiği rapor edilmiştir. Ekstraksiyon verimi ile bağlantılı olarak en düşük toplam flavonoid içeriği de zeytinyağı ekstraktında elde edilmiştir. Bununla birlikte yapılan bu çalışmanın sonuçları

değerlendirildiğinde, zeytinyağı ve etanol ekstraktlarının verimleri arasında büyük farklılıklar olmadığı görülmektedir. Yapılan birçok çalışmada propolis ekstraksiyonu için maserasyon yöntemi kullanılmasına rağmen bu yöntemin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin Trusheva vd. (2007) yürüttükleri çalışmada üç farklı teknik kullanarak elde ettikleri propolis ekstraktlarının verimlerini karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak bu araştırmacılar, maserasyon ile karşılaştırıldığında ultrasonik ekstraksiyon (ultrasonik su banyosu ile ekstraksiyon) metodunun daha kısa işlem süresi ve daha az emek gerektirdiğini ve sonuçta yüksek ekstraksiyon verimi sağladığını bildirmişlerdir. Ultrasonik ekstraksiyonun verim, ekstraksiyon süresi ve seçiciliği noktasında en etkili yöntem olduğu araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir. Benzer şekilde Cunha vd. (2004), yaptıkları çalışmada farklı maserasyon sürelerinin propolisin kimyasal kompozisyonu üzerine etkisini incelemişlerdir. Bu araştırmacılar ham propolis için uygulanan maserasyon süresinin verimi etkilediğini ve elde edilen bileşenlerin veriminin 20 günlük maserasyondan sonra %60.1'den 1 yıl sonunda %67.0'ye yükseldiğini rapor etmişlerdir. Bu sonuçlardan anlaşılabileceği üzere maserasyon süresi ekstrakt verimini etkileyen önemli bir parametredir. Farklı araştırmalarda zeytinyağı bazlı propolis ekstraktları hazırlanırken rastgele farklı maserasyon süreleri uygulanmasına (Pujirahayu vd., 2014, Silici ve Baysa, 2020) rağmen, optimum maserasyon şartlarının (süre, sıcaklık, katı/çözücü oranı) belirlendiği bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Bununla birlikte propolisin antibakteriyel aktivitesi açısından bazı çalışmalar yapılmış ve bu çalışmalarda propolis sadece gram pozitif bakteriler ve bazı fungus türlerine karşı bir etki gösterdiği gözlemlenmiştir (Albayrak ve Albayrak, 2008; Marcucci, 1995; Nieva vd., 1999). Gram negatif bakteriler ile yapılan çalışmalarda ise zayıf bir etki gösterdiği belirtilmiştir (Dobrowolski vd., 1991; Çerçiler, 2016; Sforcin vd., 2000; Grange ve Davey, 1990). Bu çalışmalar sonucunda gram pozitif bakterilerin, gram negatif bakterilere nazaran propolise karşı daha hassas olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca bazı fungus türlerine karşı da propolisin etki göstermesi propolisin antifungal aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (Mirzoeva vd., 1997; Hepşen, 1996).

Rocha ve ark. (2024) yapmış oldukları çalışmada, farklı bölgelerde yetişen 5 farklı iğnesiz arı türlerinin ürettiği propolisi 2019 ve 2020 yılında toplamış olan propolisten 0.5 gram tartmış ve üzerine %70 EtOH ilave etmişlerdir. Hazırlanan bu ekstrakt 25 °C'de su banyosunda 30 dk boyunca inkübe edilmiştir. Santrifüj edilen ekstrakt süzme işleminden geçirildikten sonra deneylere başlamışlardır. Bu ekstraktların fenolik ve kumarik bileşik içerikleri ve antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. *Melipona quadrifasciata*'dan ve *Frieseomelitta*

doederleini'den alınan numuneler üzerinde yapılan deneylerde en yüksek fenolik bileşik konsantrasyonu olduğu rapor edilmiştir. Bu propolis örneklerinde formenonetin, kaempferol, gallik asit ve kumarik asit bileşiklerinin varlığı saptanmıştır. Antimikrobiyal aktivite testlerinde *Candida albicans* türünün bütün ekstraktlara duyarlılık gösterdiği, *Escherichia coli* 'nin yalnızca *Melipona quadrifasciata* 'dan türünden elde edilen propolis tarafından inhibe edildiği ve ayrıca, *Enterococcus faecalis* bakterisinin ise *Plebeiadoryana*, *Melipona quadrifasciata* ve *Frieseomelitta doederleini* 'den türlerinden elde edilen propolis tarafından inhibe edildiği tespit edildiğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak Rocha ve arkadaşları (2024) iğnesiz arı türlerinin ürettiği propolisin arıların yetiştirildiği bölgeye göre farklılık gösterdiği dolayısıyla farklı biyobileşik kaynaklarının oluştuğu ve antifungal aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir (Rocha vd., 2024).

Nichitai ve ark. (2023) yapmış oldukları çalışmada Romanya propolisinden polifenol analizi yapmak için, ultrasonik destekli ekstraksiyon ile maserasyon metodunu karşılaştırmışlardır. Bu iki ekstraksiyon metodunu yalnızca zaman ve verim açısından değil ayrıca flavonoid ve polifenolik asitler açısından da karşılaştırma yapmak amacıyla çalışmışlardır. Farklı parametrelerde yapılan bu çalışmada UHPLC-HRMS ölçümü yapılmıştır. Bu ölçüme göre ultrasonik destekli ekstraksiyonda çözücü olarak EtOH kullanılmış ve bu ekstraksiyon metodu ile maserasyon karşılaştırıldığında antioksidan ve antimikrobiyal aktivite üzerinde daha fazla etkiye yol açtığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca ultrasonik yöntemle hazırlanan ekstraktların maserasyona oranla daha yüksek antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca bu ultrasonik destekli ekstraksiyonda kullanılan çözücülerden de en iyisi %50 etanol ile hazırlanmış ekstakta ait olduğunu ortaya koymuşlardır. Özellikle bu ekstraktın diğerlerine göre 3 kat daha fazla antioksidan aktivite sergilediğini ve bunun sonucunda da %50 etanolik çözeltilerin ultrasonik destekli ekstraksiyonu için uygun bir çalışma koşulu oluşturduğunu rapor etmişlerdir (Nichitai vd., 2023).

Bouchelaghem (2022), yapmış olduğu derlemede, farklı propolis türlerinin karakterizasyonu hakkında son on yılda propolisin karakterizasyonu hakkında yapılan çalışmaları karşılaştırmışlardır. Bu derlemede genel olarak propolisin antimikrobiyal aktivitesi ele alınmıştır. Özellikle *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans* 'a ile ilgili çalışmaları inceleyen bilim adamı propolisin kompozisyonunun genel anlamda toplandığı bölgeye ve kökenine bağlı olduğunu rapor etmiştir. Propolisin antimikrobiyal aktivite testlerinde genel olarak propolisin Gram-pozitif bakterilerin üzerine gösterdiği etkinin Gram-negatif bakteriler üzerinde göstermiş olduğu etkidenden daha fazla olduğunu raporlamıştır. Bouchelaghem (2022),

bununla birlikte propolisin sinerjik etkileşimi nedeniyle öncü maddenin etki mekanizmasının hala tam anlamıyla bilinmediğini ve bu doğal ürünün hücre içerisinde çok fazla aktiviteye sahip olduğunu öne sürmüştür. Sonuç olarak yapılan bu derlemede propolisin geniş spektrumlu biyolojik potansiyelleri, güçlü ve uygun maliyetli antimikrobiyal olarak geliştirilmesi için ideal bir ürün olduğunu bildirilmiştir (Bouchelaghem, 2022).

Doodmani ve ark. (2024) nanolifler hakkında bir çalışma yapmışlardır. Yaptıkları bu çalışmada polikaprolakton/kollajen(PCLC) nano-fiber /ağlar (NFN) kompoziti, biyolojik bir makromolekül olarak kollejenin rejeneratif potansiyelinden yararlanarak elektro-eğirme/ağ (ESN) metodu ile asetik asit ve formik asit çözücülerini kullanarak yapmışlardır. Buna ek olarak NFNs yapısını geliştirmek için yara iyileşme özelliği oluşan propolisten yararlanmışlardır. Beş tane PCL,PCLC,PCLC/Pro %5, PCLC/Pro %10 ve PCLC/Pro %15 ESN çözeltisi hazırlanmıştır. FE-Sem görüntüleme ile PCL formülasyonunun dışında bütün ESN çözeltilerinde daha başarılı nano-net oluşumu göstermişlerdir. Fabrikasyon iskeleler, kollajen eklenmesiyle örümcek ağı benzeri nanonetler sergilenmiştir. Propolisin eklenmesiyle daha da gelişmiş nano ağ oluşumu gözlemlenmiştir. Gövde nanoliflerinin, ortalama çapı 164-728 nm olan, herhangi bir boncuksuz filamentli yapı gösterirken, dallı liflerin (nanonetlerin) çapı hemen hemen 20 nm boyutunda. NFN'lerin WCTR değerleri Tedavi gibi ticari pansuman işlemleri ile pansuman için ticari bir önem taşıyabilir olduğunu öne sürmüşlerdir. Doodmani ve takım arkadaşları yaptıkları bu çalışmanın sonucunda propolis ile yüklenmiş NFN'lerin güçlü sitoprotektif etkilerinin uygulanan doza bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca PCLC NFL'lerde 72 saatlik hücre kültürden sonra HFF-2 hücrelerinin canlılığı, 24,48 ve 72 saatlik hücre kültürlerinden sonra PCLC/Pro %15 nanofiberlerden gözlemlendiğini not etmişlerdir ve bu durumda da propolis ekstraktının nanoformüle edilmiş formda proliferatif etkisini gösterdiğini belirtmişlerdir (Doodmani vd., 2024).

Ecem Bayram ve ark. 2020 yılında farklı çözücüler ve ekstraksiyon yöntemleri kullanarak elde ettikleri propolis ekstraktlarının biyoaktif özelliklerini değerlendirmişlerdir. Çalışmada elde edilen ekstraktlar, gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ile analiz edilmiştir. Antibakteriyel aktiviteleri, disk difüzyon yöntemiyle değerlendirilmiştir. Ayrıca, insan göbek kordonu endotel hücreleri üzerine propolis ekstraktlarının biyoaktif etkileri araştırılmıştır. Ekstraktların proliferatif etkileri ve sitotoksik etkileri, sırasıyla 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ve laktat dehidrojenaz analizleri ile belirlenmişlerdir. Biyokimyasal etkilerin değerlendirilmesinde toplam antioksidan kapasite ve toplam oksidatif durum parametreleri kullanılmıştır. DNA hasarı, genotoksisite göstergesi

olarak 8-okso-2-deoksiguanozin (8-OH-dG) seviyesi ile analiz edilmiştir. Ecem Bayram ve ark. (2020) sonuç olarak MTT analizi sonucunda test edilen ekstraktların hücre canlılığı etkinlikleri bakımından: propolisin %95'lik etanol ekstraktı (propolisin %95'lik etanol ekstraktı (PEE95) > propolisin ultrasonik etanol ekstraktı (PUEE) > propolisin %50'lik etanol ekstraktı (PEE50) > propolisin ultrasonik su ekstraktı (PUWE) şeklinde sıralandığını rapor etmişlerdir. PEE95'nin yüksek konsantrasyonlarının LDH salınımına sebep olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, PEE50, PUEE ve PUWE'nin yüksek konsantrasyonlarda oksidatif stresi artırdığı bulunmuştur. 8-OHdG analizi, test edilen tüm ekstraktların genotoksik etki göstermediğini ortaya koymuştur. Antibakteriyel aktivite ve minimum inhibisyon konsantrasyon testleri, PUEE ve PEE95'in PEE50 ve PUWE'den daha güçlü antibakteriyel etkiler sergilediği belirtilmiştir.



İKİNCİ BÖLÜM

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. PROPOLİS NUMUNESİNİN TEMİN EDİLMESİ

Ülkemizde propolis toplama eğilimi genel olarak sonbahar aylarında yapılmakta olup bu tez çalışmasında kullanılan propolis örneği Bayburt ilinin Merkez ilçesine bağlı Yazyurdu köyünde bulunan bir arılıktaki kovanlardan propolis tuzağı aracılığıyla toplanmıştır. Tuzaktan hasat edilen örnekler bir gece boyunca -18°C 'de bekletildikten sonra öğütücü yardımı ile toz haline getirilmiş ve ilgili analizlere kadar -18°C 'de dondurucuda muhafaza edilmiştir. Toz haline getirilen propolis örneği Şekil 5'te sunulmuştur.



Şekil 5: Ham Haldeki Propolis Numunesi ve Toz Hale Getirilmiş Propolis Numunesi

2.2. BOX-BEHNKEN DENEY TASARIMI VE YANIT YÜZEY YÖNTEMİ İLE OPTİMİZASYON

Tez çalışmasının bu aşamasında çözücü olarak zeytinyağı kullanılarak Tablo 1'de belirtilen deney tasarımına uygun olarak propolis ekstraktları hazırlanmıştır. Dış faktörlerin etkilerini azaltmak amaçlı deney sıralaması rastgele hazırlanmıştır. Bu çalışmada tüm olası kombinasyonları test etmeden, daha az deneme ile değerli ve anlamlı veri eldesi sağladığı için Box-Behnken deney tasarımı tercih edilmiştir. Ekstraksiyon yöntemi için kullanılan bağımlı ve bağımsız değişkenler Tablo 2'de sunulmuştur.

Tablo 1: Maserasyon Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Ekstraktların Hazırlanması Aşamasında Uygulanan Deney Tasarımları

Deney No	Sıcaklık (°C)	Ekstraksiyon süresi (gün)	Çözücü/katı oranı (mL/g)
1	20	1	10
2	40	1	10
3	30	5	10
4	20	9	10
5	30	9	15
6	30	9	5
7	30	5	10
8	20	5	5
9	40	5	15
10	40	5	5
11	30	5	10
12	30	1	15
13	20	5	15
14	30	5	10
15	40	9	10
16	30	5	10
17	30	1	5

Tablo 2: Kullanılan Bağımlı ve Bağımsız Değişkenler

Bağımsız Değişkenler	Bağımlı Değişkenler
Sıcaklık: 20, 30 ve 40 °C	Toplam fenolik bileşik
Süre: 1, 5 ve 9 gün	Antioksidan aktivite (DPPH, CUPRAC, CERAC)
K/Ç oranı: 1/5, 1/10 ve 1/15 g/mL	Pinosembrin, galangin ve krisin miktarları

2.3. EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ

Maserasyon (M) yöntemi, Tablo 1’de sunulduğu gibi 3 farklı sıcaklık (20, 30 ve 40 °C), süre (1, 5 ve 9 gün) ve çözücü/katı oranı (Ç/K) (5, 10 ve 15 mL/g) kullanılarak elde edilmiştir. Örneklerin hazırlanması sırasında Heidolph/Unimax 1010 (Almanya) marka model sıcaklığı ayarlanabilir çalkalayıcılı inkübatör kullanılmıştır. Elde edilen örnekler Whatman (No:4) filtre kağıdından süzülmüştür. Elde edilen süzüntü ekstrakt olarak değerlendirilmiş ve analiz öncesine kadar buzdolabında muhafaza edilmiştir.

2.4. ANALİZLER

2.4.1. Zeytinyağı Kalite Analizleri

Tez çalışması kapsamında Muğla’da üretilen natural sızma (soğuk sıkım erken hasat) zeytinyağı kullanılmıştır. Zeytinyağının serbest yağ asitliği (%), peroksit sayısı (meqO₂/kg), sabunlaşma sayısı, iyot sayısı ve özgül soğurma değerleri sırasıyla AOCS Ca 5’a-40, AOCS Cd 8b-90, AOCS Cd 3-25, AOCS Cd 1-25, AOCS Ch 5-91 yöntemlerine göre belirlenmiştir.

Zeytinyağının yağ asiti kompozisyonunu belirlemek için zeytinyağının metil esterleri IUPAC (1987)’de verilen yöntemle göre hazırlanmış ve gaz kromatografi cihazında (GC 2010, Shimadzu, Kyoto, Japonya) DB-23 kapiler kolon (60 m x 0.25mm i.d. ve 0.25 µm film kalınlık) (J ve W Scientific) kullanılarak analiz edilmiştir. Kolon fırını, enjeksiyon bloğu ve dedektör (Alev iyonlaştırmalı dedektör) sıcaklıkları sırasıyla 190, 230 ve 240 °C olarak belirlenmiştir. Taşıyıcı gaz olarak 1.0 ml/dk akış hızında helyum kullanılmıştır. Ek olarak zeytinyağı örneğinde 2.4.2 başlığı altında detayları verilen toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite testlerinin yanı sıra 2.4.3 başlığı altında açıklanan fenolik profil analizleri de kontrol amaçlı olarak gerçekleştirilmiştir.

2.4.2. Ekstraktların Toplam Fenolik Madde (TFM) ve Antioksidan Aktivite Testlerinin Gerçekleştirilmesi

Propolisin zeytinyağı bazlı ekstraktlarının toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite tayinlerini yapabilmek için spektrofotometrik deneylerde kullanılacak ekstraktlar öncelikle Fuentes vd. (2012) önermiş olduğu yöntemle uygun olarak sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Buna göre, 2.5 g ekstrakt üzerine 5 mL hekzan ve daha sonra 3 mL metanol/su (60:40, v/v) eklenerek 2 dk boyunca vortekslenmiştir (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Daha sonra elde edilen karışım 3500 rpm’de 10 dk santrifüj edilerek metanol ve hekzan fazının ayırımı sağlanmıştır. Elde edilen hekzan fazına tekrardan 3 mL metanol/su (60:40, v/v) karışımı eklendikten sonra 3500 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiş ve elde edilen metanolik fazlar birleştirilerek spektrofotometrik analizlerde kullanılmıştır.

2.4.2.1. Toplam fenolik madde analizi

Ekstraktların TFM tayini 96-kuyulu mikrotiplere uyarlanmış olan (Magalhães vd., 2010) Folin-Ciocalteu metoduna (Singleton vd., 1965) göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre, 50 µL ekstrakt, 50 µL Folin–Ciocalteu ayırıcı (1:5, v/v) ve 100 µL NaOH (0.35 M) sırasıyla plate kuyucuğuna yerleştirilmiş ve elde edilen karışım 3 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra,

mikroplaka okuyuculu bir spektrofotometrede (Epoch, BioTek, ABD) 760 nm’de absorbans ölçümü alınmıştır. Toplam fenolik madde içeriği gallik asit (GA) kullanılarak hazırlanan standart eğrinin denkleminde hesaplanarak sonuçlar mg GA/g olarak ifade edilmiştir.

2.4.2.2. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürme kapasite tayini

DPPH testi kullanılarak antioksidan kapasite tayini Bobo-García vd. (2015)’nin belirtmiş olduğu metotta bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre, 50 µL ekstrakt ve 150 µL metanolde çözündürülmüş DPPH radikali (150 µmol/L) sırasıyla mikrotelate kuyucuğuna yerleştirilmiştir. Elde edilen karışım oda sıcaklığında, karanlıkta 20 dk boyunca bekletildikten sonra mikroplaka okuyuculu bir spektrofotometrede (Epoch, BioTek, ABD) 510 nm’de absorbans ölçümü alınmıştır. Toplam antioksidan kapasite troloks ile hazırlanan standart eğrinin denkleminde hesaplanarak sonuçlar mg TE/g olarak ifade edilmiştir.

2.4.2.3. CUPRAC (Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) yöntemi

Ekstraktlarda CUPRAC yöntemi kullanılarak antioksidan kapasite ölçümleri Apak vd. (2004)’nin önerdiği yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre 1 mL CuCl₂.2H₂O solüsyonu (10⁻² M), 1 mL neocuproine solüsyonu (7.5x10⁻³ M) ve 1 mL NH₄Ac solüsyonu (1 M) sırasıyla deney tüpüne aktarılmıştır. Ardından x mL örnek eklenmiş ve hacim dH₂O ile 4,1 mL’ye tamamlanmıştır. Karışım vortekslendikten sonra 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiş ve mikroplaka okuyuculu bir spektrofotometrede (Epoch, BioTek, ABD) absorbans ölçümü 450 nm’de alınmıştır. Toplam antioksidan kapasite troloks ile hazırlanan standart eğrinin denkleminde hesaplanarak sonuçlar mg TE/g olarak ifade edilmiştir.

2.4.2.4. CERAC (Seryum (IV) İndirgeyici Antioksidan Kapasite) yöntemi

Ekstraktlarda CERAC yöntemi kullanılarak antioksidan kapasite ölçümleri Özyurt vd. (2007)’nin önerdiği yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre, 1 mL 2x10⁻³ M Ce (IV) solüsyonu, x mL örnek ve 9-x mL dH₂O deney tüpüne aktarılmış ve karışım vortekslendikten sonra 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra mikroplaka okuyuculu bir spektrofotometrede (Epoch, BioTek, ABD) 320 nm’de absorbans ölçümü alınıp kaydedilmiştir. Toplam antioksidan kapasite troloks ile hazırlanan standart eğrinin denkleminde hesaplanarak sonuçlar mg TE/g olarak ifade edilmiştir.

2.4.3. Ekstraktların LC-MS/MS ile Fenolik Profilinın Tespit Edilmesi

Maserasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan ekstraktlarda toplamda 27 farklı fenolik bileşik ((-)-epikateşin, apigenin, artepillin c, epigallokateşin+gallokateşin, epikateşin gallat, galangin, gallik asit, hesperidin, hiperozid, kafeik asit fenil ester, kamferol, kateşin+epikateşin, kateşol, klorojenik asit, krisin, kuersetin, kuersitrin, luteolin, mirisetin, naringenin, pinobanksin, pinosembrin, *p*-kumarik asit, rutin, *trans*-ferulik asit, *trans*-kafeik asit, *trans*-sinnamik asit) standart olarak kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Zeytinyağı bazlı propolis ekstraktlarında fenolik bileşiklerin taraması için 100 µL propolis ekstraktı ve 900 µL kromatografi solüsyonu (su:metanol:formik asit; v:v:v, 80:19:1) karıştırılmış ve 2 dakika vortekslendikten sonra 10.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Ardından örnekler kantitatif analizler için LC-MS/MS sistemine enjekte edilmek üzere hazır hale getirilmiştir. LC-MS/MS analizleri Thermo TSQ Quantis kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veri eldesi ve işlenmesi Chromeleon 7.1 (Thermo LC-MS yazılımı) ile yapılmıştır. Maddelerin ayrıştırılması Thermo C18 HPLC kolonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Otomatik örnekleyici sıcaklığı, 4 °C; kolon sıcaklığı, 30 °C; akış hızı 0.2 mL/dk, mobil fazlar, 5 mM amonyum asetat (mobil faz A) ve %1 asetik asit içeren asetonitril:metanol (1:1, v:v) çözeltileri; 5 µL enjeksiyon hacmi ve toplam analiz süresi 28 dk olacak şekilde LC parametreleri ayarlanmıştır. Elektrosprey iyonizasyon kaynağı ile donatılmış üç kutuplu LC-MS Thermo TSQ Quantis ile MS analizleri gerçekleştirilmiştir. Sprey voltajı pozitif ve negatif modda 3 kV, sheat gaz akışı 54 arb, oksilyer gaz akışı 11 arb, sweep gazı 1 arb, iyon transfer tüpü sıcaklığı 275 °C ve buharlaşma sıcaklığı 400 °C olacak şekilde MS parametreleri ayarlanmıştır (Gerçek vd., 2024).

2.4.4. Antimikrobiyal Aktivite Testleri

2.4.4.1. Mikroorganizmalar ve büyüme koşulları

Bu tez çalışmasında, zeytinyağı propolis özütlerinin *in-vitro* antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi sürecinde, dört adet Gram pozitif bakteri (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 35668, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Bacillus cereus* ATCC 14579), dört adet Gram negatif bakteri (*Salmonella Typhimurium* RSSK 95091, *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) ve üç adet maya benzeri mantar (*Candida krusei* ATCC 6258, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida albicans* ATCC 10231) kullanılmıştır. Stok kültürler halinde -20 °C'de muhafaza edilen patojen mikroorganizma örnekleri besiyerlerine inoküle

edilerek ve 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Bu süreçte, bakteriler için Mueller Hinton Agar (MHA), maya benzeri mantar (MBM = *Candida*) suşları için ise Sabouraud dextrose agar (SDA) besiyeri kullanılmıştır. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda besiyerleri üzerinde tek düşen kolonilerden alınan bakteri ve maya örnekleri sırasıyla mueller hinton broth (MHB) ve sabouraud dextrose broth (SDB) besiyerlerine aktararak 37°C’de 24 saat mikroorganizmaların sıvı besiyerinde çoğalmaları sağlanmıştır. Elde edilen mikroorganizma süspansiyonları 0.5 McFarland standart bulanıklığa ayarlanarak çalışmada inokulum olarak kullanılmıştır (Drago vd., 2000).

2.4.4.2. *In vitro* antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi

Propolis zeytinyağı ekstraktlarının *in-vitro* antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla agar kuyu difüzyon (AKD) metodu kullanılmıştır. Bu işlemler için öncelikle otoklavda steril edilen besiyerlerinden 30 mL alınarak steril petri kaplarına aktarılmıştır. Bu şekilde hazırlanan MHA ve SDA besiyerleri oda sıcaklığında katılaştıktan sonra, steril bir mantar delici (cork borer) kullanılarak 6 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Bu işlemlerin hemen ardından, 0.5 McFarland standart bulanıklığına ayarlanan inokulum örnekleri steril bir swab aracılığıyla besiyerlerinin yüzeyini tamamiyle kaplayacak şekilde ekilmiştir. İnokülasyon işlemleri tamamlandıktan hemen sonra propolis zeytinyağı özütlerinden bir mikropipet aracılığıyla 50 µL alınarak kuyucuklara aktarılmıştır. Tüm petri kapları için aynı işlemler tamamlandıktan sonra örnekler 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyon periyodu sonunda görülen zon çapları ölçülerek kaydedilmiştir. *In-vitro* inhibitör etkinin belirlenmesinde negatif kontrol olarak zeytinyağı ve pozitif kontrol olarak ise *Candida* suşları için fluconazole (50 µg.mL⁻¹) bakteri suşları için ise penisilin G ve gentamisin (50 µg.mL⁻¹) antibiyotikleri kullanılmıştır (González-Montiel vd., 2022).

Mikrobroth seyreltme metodunda kullanılmak amacıyla propolis zeytinyağı ekstraktları Fuentes vd. (2012) tarafından uygulanan yöntem uygun olarak sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu uygulama sonunda elde edilen metanolik fazlar pasteur fırınında 70°C sıcaklıkta yaklaşık 72 saat bekletildikten sonra elde edilen biyoaktif bileşenler tartılarak DMSO-steril distile su (20:80 v/v) ile hazırlanan çözeltide çözünmüştür. Hazırlanan DMSO çözeltisi MİK değerlerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır (Fuentes vd., 2012). MİK değerlerinin belirlenmesi sürecinde 96 kuyucuklu mikrolakalar kullanılmıştır. Başlangıçta, 100 µL hacimli çoklu kanallı bir mikropipet yardımıyla bu mikrolakaların bütün kuyucukları 95 µL hacimde sıvı besiyeri (broth) ile doldurulmuştur (Bakteriler için MHB, maya benzeri mantarlar, *Candida* suşları için SDB). Bu işlemlerin hemen ardından inokülüm olarak

hazırlanan mikroorganizmalardan 5 µL alınarak mikropalakada tek bir sütun boyunca tüm kuyucuklara aktarılmıştır. Böylelikle bütün kuyucuklarda 100 µL hacimde broth + inokülüm çözeltisi hazırlanmıştır. Tüm bu işlemlerin ardından, daha önce metanolün uçurulması ile elde edilen biyoaktif bileşen çözeltisinden (20 mg/mL konsantrasyonda DMSO- steril distile su (20:80 v/v) çözeltisi) 100 µL alınarak mikropalakada tüm sütunların ilk kuyucuklarına aktarılmıştır. İlk kuyucuklarda toplanan 200 µL hacimdeki bu solüsyonlar çoklu bir mikropipet yardımı ile 3 defa al-ver yapılarak iyice karışması sağlanmış ve bu kuyucuklardan alınan 100 µL hacimdeki solüsyon ikinci kuyucuklara aktarılmıştır. Aynı işlemler tekrarlanarak bu seyreltme işlemleri sekizinci kuyucuğa kadar gerçekleştirilmiş ve böylelikle ardışık olarak her kuyucukta biyoaktif bileşenlerin seri olarak seyreltilmesi sağlanmıştır (Ecem-Bayram vd., 2021).

2.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ VE OPTİMİZASYON

Propolis ekstraksiyonunda optimum koşulların elde edilmesi için yüzey yanıt yöntemi (RSM) uygulanmıştır. Deneysel tasarımın ayrıntıları başlık 2.2.'de sunulmuştur. Ekstraksiyon yönteminin toplam fenolik bileşik, antioksidan aktivite ve fenolik bileşikler üzerindeki (pinosembrin, galangin ve krisin) etkisi ve aralarındaki korelasyon ile regresyon analizleri Minitab 17 istatistik programında tespit edilmiştir. Optimum nokta ekstraksiyon yöntemi için bağımlı değişkenlerin (TFM, CUPRAC, CERAC, DPPH, pinosembrin, galangin ve krisin) maksimize edilmesi ile belirlenmiştir.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. ZEYTİNYAĞI KALİTE ANALİZLERİ

Çalışma kapsamında kullanılan zeytinyağı örneğinde serbest yağ asitliği (%), peroksit sayısı (meqO₂/kg), sabunlaşma sayısı, iyot sayısı ve özgül soğurma değerleri belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 3'te sunulmuştur. Bununla birlikte zeytinyağı numunesinin yağ asidi kompozisyonunu tespit etmek için GC'de yapılan analiz neticesinde elde edilen sonuçlar Tablo 4'te sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliği (Tebliğ No: 2017/26)'nde Natürel Sızma Zeytinyağı “doğrudan tüketime uygun, serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden her 100 gramda 0.8 gramdan fazla olmayan yağlar” olarak tanımlanmaktadır. Tebliğe uygun bir şekilde tez kapsamında kullanılan natürel sızma zeytinyağının serbest asitlik değeri %0.59 olarak tespit edilmiştir. Ek olarak bu tebliğde doğal sızma zeytinyağı için belirtilen peroksit sayısının 20 meqO₂/kg veya bu değerden daha az olması gerektiği rapor edilmiş olup, tezde kullanılan zeytinyağının peroksit sayısı 2.05 meqO₂/kg olarak belirlenmiştir. Ayrıca, aynı tebliğde E₂₃₂, E₂₇₀ ve Delta E için uygun değerlerin sırasıyla 2.5, 0.22 ve 0.01 veya bu değerlerden daha düşük olması gerektiği bildirilmiş olup, bu tez kapsamında kullanılan zeytinyağı için bu değerler sırasıyla 2.195, 0.1875, 0.0035 olarak tespit edilmiştir. Zeytinyağı örneğinde gerçekleştirilen bu kalite analizleri sonucunda, elde edilen tüm değerlerin Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliği (Tebliğ No: 2017/26)'nde Natürel Sızma Zeytinyağı için belirtilen değerlere uygun olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliği (Tebliğ No: 2017/26)'nde Natürel Sızma Zeytinyağının yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi, bu yağın kalitesi değerlendirmede dikkate alınması gereken parametreler arasında yer almıştır. Bu bağlamda çalışmada kullanılan natürel sızma zeytinyağının, miristik asit, palmitik asit, palmitoleik asit, margarik asit, margoleik asit, stearik asit, oleik asit, linoleik asit, linolenik asit, araşidik asit, gadoleik asit, behenik asit ve lignoserik asit içeriği açısından Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliği (Tebliğ No: 2017/26)'nde bildirilen kalite kriterleri açısından uygun olduğu belirlenmiştir.

Tablo 3: Zeytinyağı Numunesinde Gerçekleştirilen Analizlerin Sonuçları

Serbest yağ asitliği (%)	0.59±0.01
Peroksit sayısı (meqO₂/kg)	2.05±0.06
Sabunlaşma Sayısı	192±1
İyot sayısı	91±1

Özgül Soğurma	E₂₃₂	2.195±0.015
	E₂₇₀	0.1875±0.0015
	Delta E	0.0035±0.0005

Tablo 4: Zeytinyağı Numunesinin Yağ Asidi Kompozisyonu (%)

14:0	Miristik Asit	0.010±0.001
16:0	Palmitik Asit	10.210±0.320
16:1	Palmitoleik Asit	2.572±0.379
17:0	Margarik Asit	0.010±0.000
17:1	Margoleik Asit	0.022±0.000
18:0	Stearik Asit	2.136±0.085
18:1	Oleik Asit	64.568±0.483
18:2	Linoleik Asit	19.206±0.515
18:3	Linolenik Asit	0.596±0.006
20:0	Araşidik Asit	0.325±0.007
20:1	Gadoleik Asit	0.236±0.003
22:0	Behenik Asit	0.027±0.003
24:0	Lignoserik Asit	0.085±0.001

Çalışma kapsamında ekstraksiyonda kullanılan ham zeytinyağının fenolik profili, toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan aktivitesi de kontrol amaçlı olarak belirlenmiştir. Buna göre zeytinyağında (-)-epicatechin, artepillin C, klorojenik asit, epikateşin gallate, gallokateşin + epigallokateşin, p-kumarik asid, kuersetin, t-sinamik asid, kafeik asit ve ferulik asit fenolikleri tespit edilememiştir. Bununla birlikte, apigenin fenoliği 0.283 mg/kg, CAPE fenoliğini 0.001 mg/kg, kateşin+epikateşin 0.002 mg/kg, kateşol 0.152 mg/kg, krisin 0.007 mg/kg, galangin 0.003 mg/kg, gallik asit 0.013 mg/kg, hesperidin 0.020, mg/kg hiperozid 0.007 mg/kg, kamferol 1.173 mg/kg, luteolin 3.522 mg/kg, myrisetin 0.004 mg/kg, naringenin 0.128 mg/kg, pinobanksin 0.004 mg/kg, pinosembrin 0.003 mg/kg, kuersitrin 0.001 mg/kg ve rutin 0.010 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Benzer şekilde Muğla, Aydın, İzmir ve Manisa bölgesinden elde edilen zeytin yağlarında bizim de çalışmamızda taramasını yaptığımız luteolin (0.08-1.70 mg/kg), rutin (0.01-2.61 mg/kg), sinamik asit (0.04-1.49 mg/kg), kafeik asit (0.01-0.19 mg/kg), ferulik asit (0.01-0.32 mg/kg), p-kumarik asit (0.00-0.37 mg/kg) ve apigenin (0.00-0.27 mg/kg) fenolikleri tespit edilmiştir (Kara vd., 2018). Farklı olarak bu çalışmada kullanılan zeytinyağı örneğinde kafeik asit ve ferulik asiti belirlenememiştir. Ek olarak, çalışmada kullanılan zeytinyağının toplam fenolik madde içeriği 0.16 mg GAE/g olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte zeytinyağı örneğinin CUPRAC, CERAC ve DPPH testleri kullanılarak tespit edilen antioksidan aktivitesi değerleri ise sırasıyla 0.36, 0.55 ve 0.30 mg TE/g olarak belirlenmiştir.

Benzer şekilde Kara vd. (2018) tarafından Ege Bölgesinde üretilen farklı zeytinyağı çeşitleri üzerine yürütülen çalışmada bizim çalışmamıza benzer şekilde toplam fenolik içerik 0.016-0.153 mg kafeik asit/g arasında tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar arasındaki bu farklılıklar kullanılan zeytinyağların elde edildiği bölgeye, zeytinyağının elde edilme şekli ve aynı zamanda hasat zamanlarının farklılığı gibi değişkenlerden kaynaklanabilir.

3.2. ZEYTİNYAĞI İLE UYGULANAN EKSTRAKSİYONUN OPTİMİZASYONU

Maserasyon yöntemi basit bir ekipman gerektirmesi sebebiyle halen en yaygın olarak kullanılan ekstraksiyon yöntemleri arasında olmasına rağmen çok fazla solvent kullanımı gerektirmesi ve diğer yöntemlere kıyasla ısıya duyarlı bileşikler için uygun olmaması bu yöntemin dezavantajları arasındadır (Gori vd., 2022). Fakat bu yöntem halen propolis ekstraksiyonu için en fazla tercih edilen yöntemdir. Bununla birlikte, en çok tercih edilen yöntem olmasına rağmen propolis ekstraksiyonu esnasında bu yöntem için oldukça farklı ekstraksiyon koşulları (çözücü tipi, sıcaklık, katı: çözücü oranı, süre) kullanılmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada maserasyon yöntemi ile propolisin zeytinyağı ile ekstrakte edilmesi aşamasında uygulanan ekstraksiyon parametreleri optimize edilmiştir. Sonuç olarak, propolisten zeytinyağı kullanılarak maserasyon yöntemi ile yapılan ekstraksiyon işlemleri, 17 aşamalı (5 merkez noktalı) Box-Behnken deney tasarımına göre yapılmış olup, bağımsız (X_i) ve bağımlı değişkenlere (Y_i) ait elde edilen sonuçlar Tablo 5’de verilmiştir. Tablo 5’te incelendiğinde, farklı koşullarda elde edilen ekstraktların TFM (Y_1) değerleri 13.83-58.12 mg GAE/g, CUPRAC (Y_2) değerleri 21.99-90.69 mg TE/g, DPPH (Y_3) değerleri 29.38-126.68 mg TE/g, CERAC (Y_4) değerleri 60.41-230.20 mg TE/g, krisin miktarları (Y_5) 6.72-80.50 mg/kg, galangin miktarları (Y_6) 0.57-35.68 mg/kg ve pinosembrin miktarları (Y_7) 1.89-62.91 mg/kg aralığında değişmiştir.

Tablo 5: Box-Behnken Deney Tasarımına Göre Elde Edilen Bağımlı Değişkenlere Ait Deneysel Veriler

Deney No	X_1^*	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6	Y_7
1	20	1	10	55.17± 0.86	52.71± 1.06	73.47± 4.29	177.99± 16.57	21.03±0.02	15.74±0.2	10.62±0.53
2	40	1	10	39.44± 3.11	47.33± 2.03	69.04± 2.5	138.17± 12.42	24.68±1.03	15.66±0.18	8.07±0.1
3	30	5	10	35.69± 3.76	60.59± 2.18	64.71± 4.73	144.40± 13.14	17.96±0.72	9.93±0.83	16.05±0.66
4	20	9	10	34.47± 3.68	59.90± 4.23	57.67 ± 3.73	209.46± 26.97	26.72±0.66	7.21±0.31	9.98±0.53
5	30	9	15	58.12± 3.06	90.69± 2.71	126.68± 2.21	127.69± 11.32	80.50±3.38	35.68±1.3	39.47±1.32
6	30	9	5	31.37± 1.31	41.85± 1.38	32.56± 0.08	86.32± 3.43	23.74±0.26	23.03±0.99	13.30±0.78

7	30	5	10	39.66± 3.24	48.50± 4.33	55.58± 2.42	107.19± 0.58	14.97±1.06	7.03±0.78	13.38±0.58
8	20	5	5	27.30± 0.77	44.16± 3.58	30.73± 0.3	95.92± 5.8	18.38±1.32	14.08±1.09	13.08±0.7
9	40	5	15	41.21± 2.67	64.12± 2.41	86.27± 2.04	175.56± 9.43	18.21±0.35	11.58±0.26	22.87±1.54
10	40	5	5	13.83± 0.68	21.99± 0.19	29.38± 0.58	60.41± 3.21	6.72±0.45	0.57±0.11	1.89±0.28
11	30	5	10	42.82± 3.44	52.70± 6.23	62.94± 3.44	142.06± 17.02	19.64±0.79	14.54±0.67	20.11±0.53
12	30	1	15	46.48± 3.64	72.43± 2.19	81.14± 1.81	201.14± 13.57	36.77±0.23	32.14±2.53	62.91±3.4
13	20	5	15	53.00± 2.48	81.86± 4.05	102.54± 7.75	161.56± 2.26	28.37±1.29	17.94±0.82	20.13±1.1
14	30	5	10	35.79± 3.7	56.13± 0.97	65.73± 4.04	141.50± 15.11	12.51±0.49	29.84±1.65	15.69±0.06
15	40	9	10	35.87± 3.65	53.27± 5.19	63.14± 3.31	161.56± 6.57	16.96±0.48	5.74±0.32	12.96±0.18
16	30	5	10	36.70± 2.48	64.31± 4.36	64.84± 3.51	155.29± 14.29	25.41±0.22	9.53±0.8	15.52±0.38
17	30	1	5	54.32± 0.45	90.38± 2.38	98.15± 0.92	230.20± 14.73	12.88±0.01	10.20±0.48	7.57±0.51

*X₁, sıcaklık (°C); X₂, ekstraksiyon süresi (gün); X₃, çözücü:katı oranı (mL/g); Y₁, toplam fenolik madde (TFM-mg GAE/g); Y₂, antioksidan aktivite (CUPRAC-mg TE/g); Y₃, antioksidan aktivite (DPPH -mg TE/g); Y₄, antioksidan aktivite (CERAC-mg TE/g); Y₅, krisin (chr) miktarı (mg/kg); Y₆, galangin (gal) miktarı (mg/kg); Y₇, pinosembrin (pino) miktarı (mg/kg).

Box–Behnken deney tasarımı kullanılarak elde edilen ekstraktlara ait bağımlı değişkenler, yanıt yüzey yöntemi ile optimize edilmiştir. Çoklu regresyon analizine göre ikinci dereceden polinom ampirik denklemler ile elde edilen eşitlikler ve istatistiksel parametreler Tablo 6’da sunulmuştur.

Tablo 6: Regresyon Analizi Sonucu Elde Edilen Denklemler ve İstatistiksel Parametreler

Bağımlı değişkenler	Model eşitlikleri	R ²	Model uyumsuzluğu
TFM	$Y_1=11.4+4.67X_1^*-13.03X_2^*-2.14X_3^*-0.0964X_1^2*+0.797X_2^2*+0.2136X_3^2*+0.1071X_1X_2+0.0084X_1X_3$	%95.70	0.219
CUPRAC	$Y_2=35.2+9.50X_1^*-22.43X_2^*-15.68X_3^*-0.1723X_1^2*+0.945X_2^2*+0.594X_3^2*-0.0079X_1X_2+0.0222X_1X_3+1.412X_2X_3^*$	%94.03	0.437
DPPH	$Y_3=59.9+6.21X_1^*-28.23X_2^*-8.30X_3^*-0.1179X_1^2*+0.929X_2^2*+0.160X_3^2+0.0618X_1X_2+0.0708X_1X_3+1.540X_2X_3^*$	%98.65	0.198
CERAC	$Y_4=207+14.22X_1-72.6X_2^*-27.2X_3^*-0.297X_1^2*+3.961X_2^2*+0.598X_3^2-0.050X_1X_2+0.248X_1X_3+3.634X_2X_3^*$	%91.93	0.270
Krisin	$Y_5=29.3+8.68X_1^*-21.84X_2^*-17.69X_3^*-0.1447X_1^2*+1.285X_2^2*+0.6449X_3^2*-0.0838X_1X_2+0.0075X_1X_3+1.135X_2X_3^*$	%98.49	0.343
Galangin	$Y_6=7.7+5.48X_1^*-9.74X_2^*-10.36X_3^*-0.1010X_1^2*+0.684X_2^2*+0.4357X_3^2*-0.0087X_1X_2+0.0358X_1X_3+0.225X_2X_3$	%93.32	0.201
Pinosembrin	$Y_7=-88.1*+8.48X_1^*+1.83X_2-7.38X_3^*-0.1575X_1^2*+0.625X_2^2*+0.5636X_3^2*+0.0346X_1X_2+0.0696X_1X_3-0.836X_2X_3^*$	%96.99	0.062

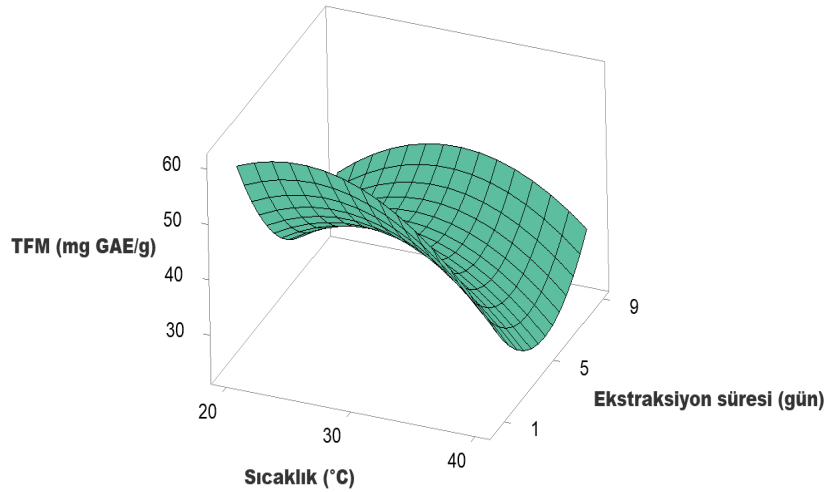
* Önem derecesi P≤0.05; X₁, sıcaklık (°C); X₂, ekstraksiyon süresi (gün); X₃, çözücü:katı oranı (mL/g); Y₁, toplam fenolik madde (TFM-mg GAE/g); Y₂, antioksidan aktivite (CUPRAC-mg TE/g); Y₃, antioksidan aktivite (DPPH-mg TE/g); Y₄, antioksidan aktivite (CERAC-mg TE/g); Y₅, krisin (chr) miktarı (mg/kg); Y₆, galangin (gal) miktarı (mg/kg); Y₇, pinosembrin (pino) miktarı (mg/kg).

Modelin iyi uyum sağlayabilmesi için regresyon katsayısının (R^2) %80'dan yüksek olması arzu edilmektedir (Gan vd., 2007). Maserasyon yöntemiyle elde edilen ekstraktların analizleri sonucunda denklemlerin regresyon katsayıları %91.93-%98.65 aralığında bulunmuş olup bu koşulu sağladığı belirlenmiştir. Diğer bir istatistiksel faktör olan model uyumsuzluğu (Lack of fit) ise modelin matematiksel formunun uygunsuzluğundan kaynaklanan hataya denilmekte olup bu değer istatistiksel olarak önemsiz olması beklenmektedir (Box ve Draper, 2007). Tablo 6 incelendiğinde, regresyon modelinin uyumsuzluk değerinin önemsiz bulunduğu görülmüştür ($P>0.05$).

3.2.1. Sıcaklık, Süre ve Katı: Çözücü Oranın Toplam Fenolik Madde Üzerine Etkisi

Maserasyon yöntemi için bağımsız değişkenler olan sıcaklık, süre ve katı:çözücü oranının TFM üzerine etkisi incelendiğinde, en etkili bağımsız değişkenin sıcaklık ve süre olduğu belirlenmiştir.

TFM üzerine, sıcaklığın pozitif, ekstraksiyon süresinin ise negatif korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca tüm bağımsız değişkenlerinin karelerinin de istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur. TFM değerlerinin sıcaklık ve ekstraksiyon süresi ile değişimi Şekil 6'da verilmiştir. En yüksek TFM değeri sıcaklığın 30 °C, ekstraksiyon süresinin 9 gün ve çözücü:katı oranının 15 mL/g olduğu koşullarda 58.12 mg GAE/g olarak elde edilmiştir.



Şekil 6: TFM Değerlerinin Sıcaklık ve Ekstraksiyon Süresi ile Değişimi

Elde edilen sonuçlar 1:15 g/mL katı:çözücü oranında genel olarak daha yüksek miktarda (41.21-58.12 mg GAE/g) toplam fenolik bileşik elde edildiğini göstermiştir. Bu durum yüksek çözücü miktarının propolisin fenolik bileşiklerini ekstrakte etmede daha etkili olduğunu göstermektedir. Literatürde propolisin zeytinyağı bazlı ekstraktının toplam fenolik madde

içeriğini araştıran bir araştırmada Kubiliene vd. (2015) Litvanya'dan elde ettikleri propolisi 1:10 oranında oda sıcaklığında 5 saat bekleterek propolisin zeytinyağı bazlı ekstraktını hazırlamışlardır. Araştırmacılar ekstraktın toplam fenolik madde içeriğini 0.5 mg GAE/mL olarak belirlerken aynı şartlarda hazırladıkları etanol ekstraktının toplam fenolik madde içeriğini 12.7 ± 1.2 mg GAE/mL olarak belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda ise maserasyon yöntemi ile elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde içeriği 13.83-58.12 mg GAE/g aralığında değişmekte olup daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Farklı özellikte ve konsantrasyonlarda zeytinyağları ve farklı çözücüler (alkol, propilen glikol ve su) kullanılarak maserasyon yöntemi ile (3 gün) hazırlanan propolis ekstraktlarının toplam fenolik içeriğinin araştırıldığı bir araştırmada alkol, propilen glikol ve su için bu değerler sırasıyla 20.11, 21.57 ve 0.89 mg GAE/g olarak, farklı konsantrasyonlarda zeytinyağı ekstraktlarının toplam fenolik içeriği ise 4.62-20.65 mg GAE/g olarak tespit edilmiştir (Şahin, 2022). Benzer şekilde, Kolaylı vd. (2020) Türkiye'den elde ettikleri Anadolu propolisinin ve aynı zamanda zeytinyağının dahil olduğu farklı çözücülerde ekstrakte edilmiş olan ticari propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriğini karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar Anadolu propolisini 1:10 oranında %70'lik etanolde 1 saat ultrasonik su banyosunda işledikten sonra 1 gün boyunca maserasyona bırakmışlardır. Anadolu propolisi etanol ekstraktının toplam fenolik madde içeriğini 51.05 mg GAE/g olarak belirlemişlerdir. Propolisin ticari etanol ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriğini ise 10.93-59.31 mg GAE/g arasında; iki farklı ticari zeytinyağı ekstraktının total fenolik içeriğini ise 4.92 ve 6.42 mg GAE/g olarak tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise maserasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan ekstraktların toplam fenolik madde içeriği daha yüksek olarak 13.83-58.12 mg GAE/g arasında değişkenlik göstermiştir. Benzer şekilde Doğan vd. (2024) yaptıkları bir araştırmada propolisin toplam fenolik içeriğini 1:10 oranında 1 günlük maserasyon sonucu hazırladıkları zeytinyağı bazlı propolis ekstraktlarının toplam fenolik içeriğini 5.70 mg GAE/g olarak belirlenmişlerdir. Ek olarak Silici vd. (2024) yaptıkları çalışmada propolisin zeytinyağı ekstraktının toplam fenolik içeriğini 15.21 mg GAE/g olarak rapor etmişlerdir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan zeytinyağı ile 40 °C'yi geçmeyecek şekilde 1 haftalık maserasyon sonucu elde edilen propolis ekstraktlarının toplam fenolik içeriği ise 6.33-20.64 mg GAE/g arasında değişkenlik göstermiştir (Silici ve Baysa, 2020). Benzer bir araştırmada 35°C'de 3 günlük bir maserasyon sonucu elde edilen propolisin zeytinyağı ve etanol ekstraktlarının toplam fenolik içeriğinin araştırıldığı bir çalışmada zeytinyağı ekstraktının toplam fenolik içeriği 129.05 ± 1.04 µg GAE/g olarak belirlenirken etanol ekstraktının içeriği ise daha düşük bir konsantrasyonda 88.20 ± 0.75 µg GAE/g olarak belirlenmiştir (Cirrik vd., 2023). Bizim çalışmamızda ise benzer şekilde 1:10 oranında ve 1

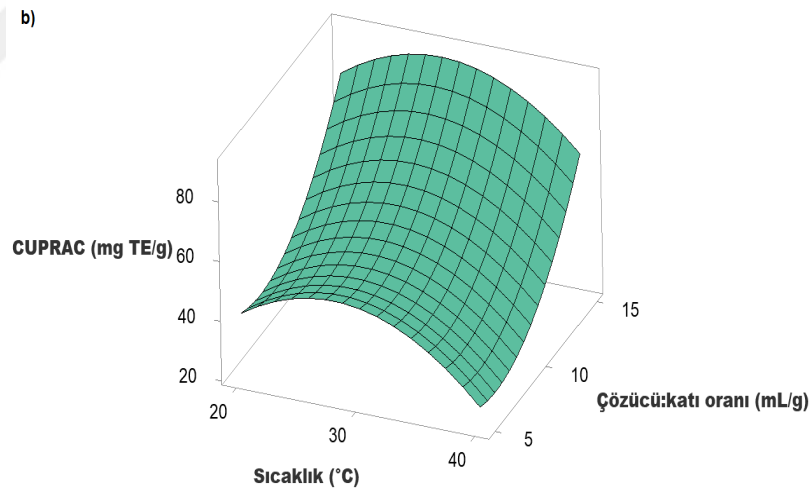
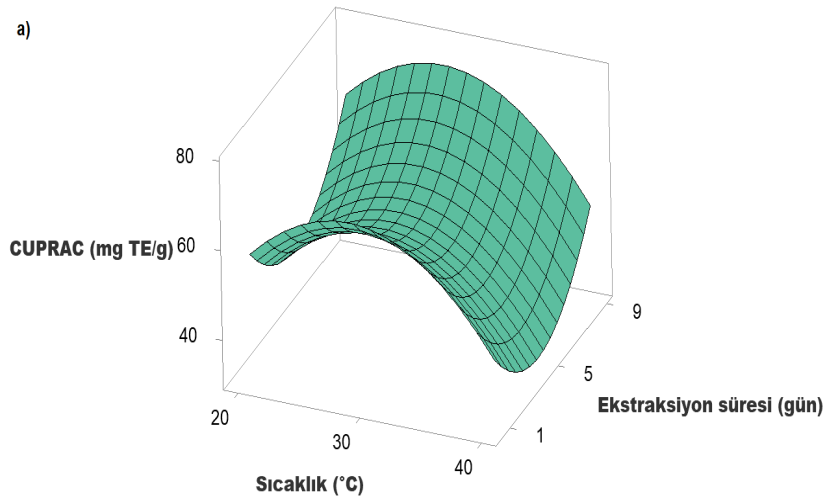
günlük maserasyon sonucu hazırlanan örneklerin toplam fenolik içeriği 20°C ve 40 °C 'lık sıcaklık uygulamalarında 55.17 ve 39.44 mg GAE/g olarak daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Literatürde zeytinyağı kullanılarak hazırlanan bu propolis ekstraktlarından elde edilen sınırlı sayıda sonuç ile bizim sonuçlarımızın farklılık göstermesinin temel nedeni kullanılan maserasyon şartlarının farklılığıyla açıklanabileceği gibi çalışmada kullanılan zeytinyağının tipi ve kalite özellikleri ile ve ayrıca kullanılan propolis örneğinin farklılığı ile de açıklanabilir. Literatürde sunulan sınırlı sayıdaki bu çalışmaların birçoğunda kullanılan zeytinyağının hangi çeşit olduğu verilmemekle birlikte bu çalışmaların hiç birisinde ekstraksiyonda kullanılan zeytinyağının kalite özellikleri de verilmemiştir.

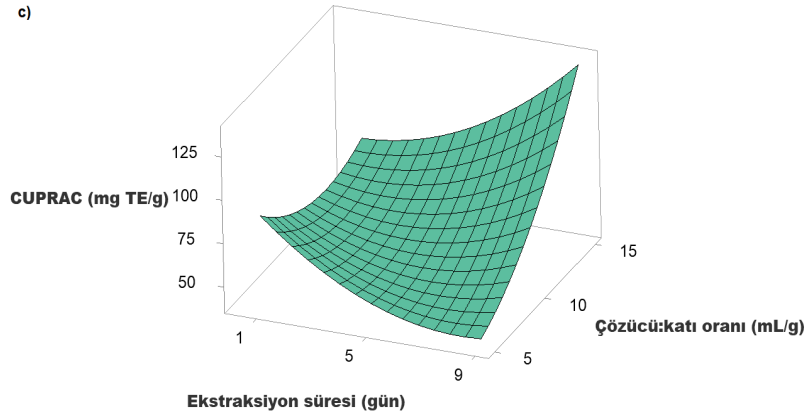
Literatürde propolisin zeytinyağı kullanılarak elde edilen ekstraktlarının toplam fenolik içeriğini araştıran araştırma sayısı az olmasına rağmen özellikle etanol ekstraktlarının toplam fenolik içeriğini sunan birçok araştırma bulunmaktadır. Bu araştırmaların birisinde, Türkiye'nin 23 farklı lokasyonundan toplan propolis örneklerinin 1:30 oranında 1 günlük maserasyon sonucu hazırlanan %70'lik etanol ekstraktlarının toplam fenolik içeriğinin 34.53-259.4 mg GAE/g arasında oldukça değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir (Özkök vd., 2021). Benzer şekilde Chen vd. (2008) 1:10 oranında 48 saatlik maserasyon sonucu farklı orijinden 34 farklı propolis örneğinin kullanılmasıyla hazırlanan ekstraktların toplam fenolik içeriğini 51.5-408.5 mg kateşin/g arasında rapor etmişlerdir. Bu literatür çalışmalarından da aynı koşullarda hazırlanan farklı propolis örnekleri için bu aralıkta değişen sonuçların elde edilmiş olması, propolisin elde edildiği lokasyonun da propolisin toplam fenolik içeriğini önemli ölçüde etkilediğinin bir kanıtıdır. Nitekim bizim çalışmamızda kullanılan ve farklı maserasyon koşulları altında elde edilen zeytinyağı propolis ekstraktlarının toplam fenolik içeriği (13.83-58.12 mg GAE/g) de genel olarak Özkök vd. (2021) ve Chen vd. (2008)'nin propolisin etanol ekstraktları için rapor ettikleri aralıkta belirlenmiştir. Bu sonuçlar ekstraksiyon koşullarının da propolisin toplam fenolik içeriğini etkilediğinin açık bir göstergesidir.

3.2.2. Sıcaklık, Süre ve Katı:Çözücü Oranın Antioksidan Aktivite Üzerine Etkisi

Propolisin toplam fenolik içeriğinin yanı sıra dikkate değer antioksidan özelliğe sahip olması sebebiyle (Jenny vd., 2024; Rahman vd., 2024) bu çalışmada propolisin zeytinyağı ekstraktlarının antioksidan aktivitesi CUPRAC, DPPH ve CERAC yönetmeleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Bağımsız değişkenlerin CUPRAC üzerine etkisine bakıldığında, 3 bağımsız değişkenin de etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır. Sıcaklık ile pozitif, süre ve çözücü:katı oranı ile ise negatif korelasyon olduğu belirlenmiştir. Ayrıca tüm bağımsız değişkenlerinin karelerinin ve süre*çözücü:katı oranı interaksiyonunun da istatistiksel olarak

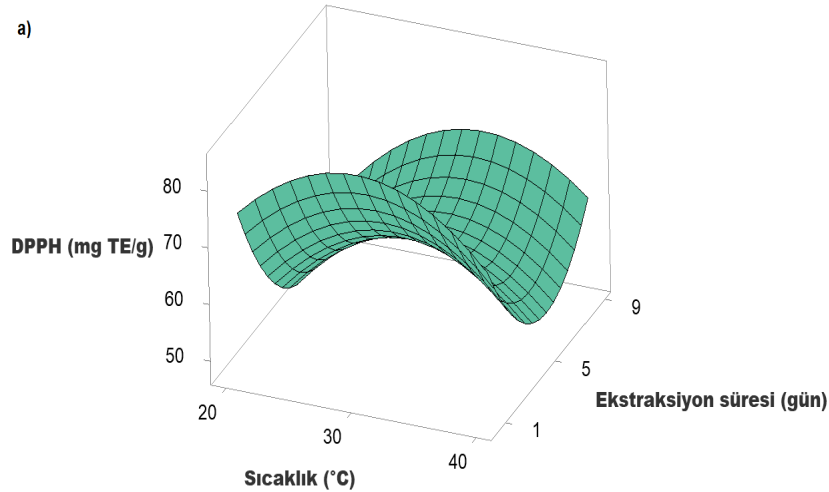
önemli olduğu bulunmuştur (Tablo 6). CUPRAC değerlerinin farklı koşullar altında değişimi Şekil 7a-c'de verilmiştir. CUPRAC değerlerinin sıcaklık ve süre ile değişimi Şekil 7a'da, sıcaklık ve çözücü:katı oranı ile değişimi Şekil 7b'de ve süre ve çözücü:katı oranı ile değişimi ise Şekil 7c'de verilmiştir. En yüksek CUPRAC değeri, TFM'nin de en yüksek değerini aldığı koşullarda (sıcaklık 30 °C, ekstraksiyon süresi 9 gün ve çözücü:katı oranı 15 mL/g) 90.69 mg TE/g olarak elde edildiği belirlenmiştir.

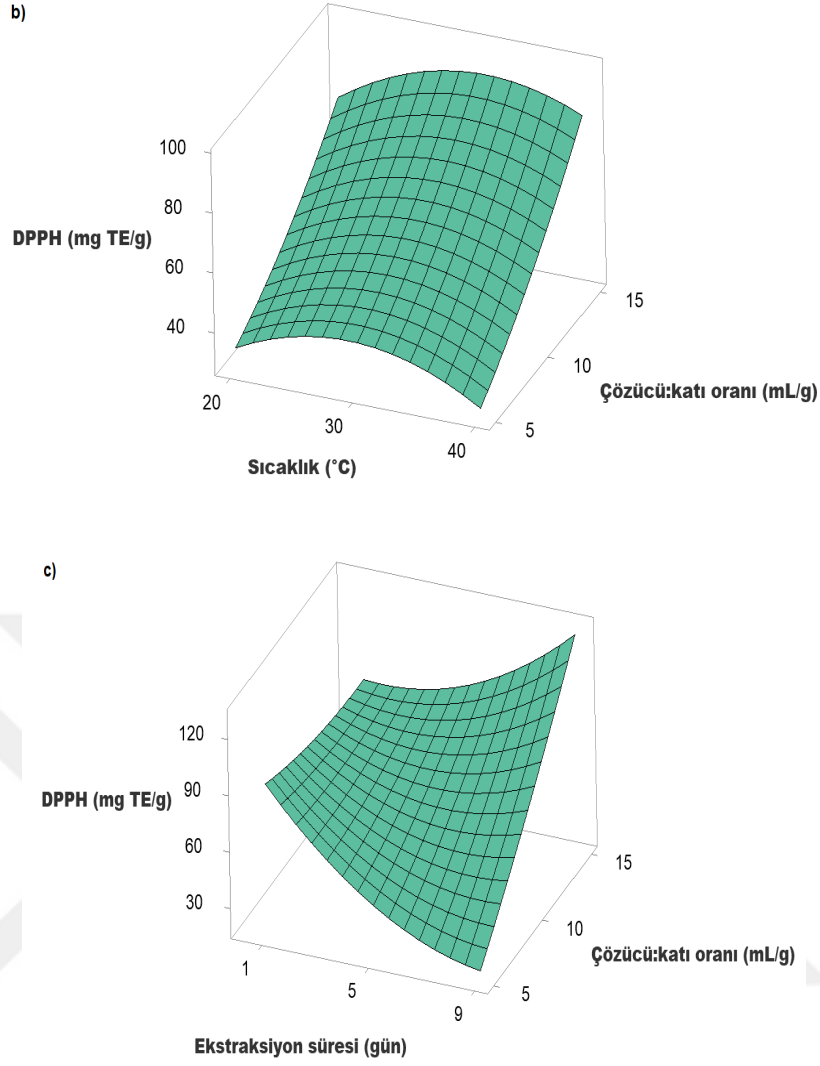




Şekil 7: CUPRAC Değerlerinin Farklı Koşullarda Değişimi a) Sıcaklık ve Süre, b) Sıcaklık ve Çözücü: Katı Oranı, c) Süre ve Çözücü: Katı Oranı

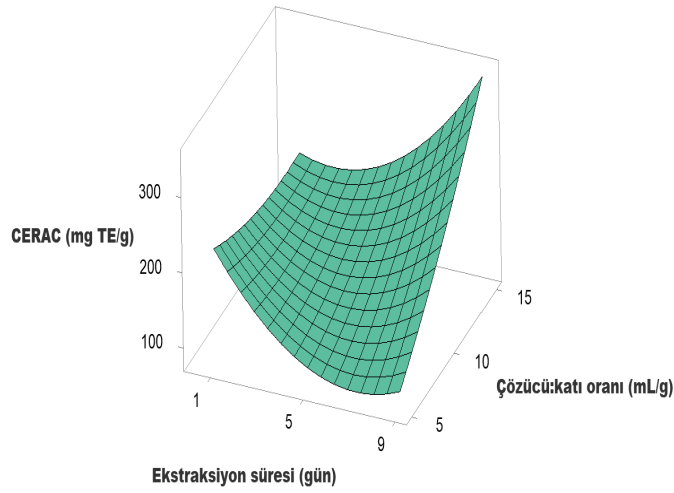
Bağımsız değişkenlerin DPPH üzerine etkisi araştırıldığında, CUPRAC ile benzer sonuçlar elde edilmiş ve 3 bağımsız değişkenin de etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır. Ayrıca sıcaklık ve süre değişkenlerinin kareleri ile süre*çözücü:katı oranı interaksiyonunun da istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur (Tablo 6). DPPH değerlerinin farklı koşullar altında değişimi Şekil 8a-c’de verilmiştir. DPPH değerlerinin sıcaklık ve süre ile değişimi Şekil 8a’da, sıcaklık ve çözücü:katı oranı ile değişimi Şekil 8b’de ve süre ve çözücü:katı oranı ile değişimi ise Şekil 8c’de verilmiştir. En yüksek DPPH değeri hem TFM hem de CUPRAC’ın en yüksek değerini aldığı koşullarda (sıcaklık 30 °C, ekstraksiyon süresi 9 gün ve çözücü:katı oranı 15 mL/g) 126.68 mg TE/g olarak elde edildiği belirlenmiştir.





Şekil 8: DPPH Değerlerinin Farklı Koşullarda Değişimi a) Sıcaklık ve Süre, b) Sıcaklık ve Çözücü:Katı Oranı, c) Süre ve Çözücü:Katı Oranı

Bağımsız değişkenlerin CERAC üzerine etkisine bakıldığında, en etkili bağımsız değişkenin süre olduğu görülmektedir. CERAC ile ekstraksiyon süresi arasında negatif korelasyon olduğu saptanmıştır. En yüksek CERAC değerinin 30 °C, 1 gün ve 5 mL/g koşullarında saptandığı görülmektedir. Ek olarak sıcaklık ve süre değişkenlerinin kareleri ile süre*çözücü:kati oranı interaksiyonunun da istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur (Tablo 6). CERAC değerlerinin ekstraksiyon süresi ve çözücü:kati oranı ile değişimi Şekil 9’da sunulmuştur. İnteraksiyonun gösterdiği pozitif korelasyon, Şekil 9’da da görülmekte olup, süre ve çözücü:kati oranı birlikte arttırıldığında CERAC değeri de maksimum olmuştur.



Şekil 9: CERAC Değerlerinin Süre ve Çözücü: Katı Oranı ile Değişimi

Genel olarak propolisin maserasyon ile elde edilen zeytinyağı ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri değerlendirildiğinde CUPRAC ve DPPH testlerini için en yüksek değer sıcaklık 30 °C, ekstraksiyon süresi 9 gün ve çözücü:kati oranı 15 mL/g olduğu uygulama koşullarında elde edilmiş olup bu koşullar aynı zamanda toplam fenolik içeriğinin en yüksek oranda ekstrakte edildiği uygulama şartları olarak belirlenmiştir. Farklı olarak diğer bir antioksidan aktivite testi olan CERAC için en yüksek değer 30 °C, 1 gün ve 5 mL/g'lık uygulama koşullarında elde edilmiştir. CUPRAC ve DPPH üzerine her üç bağımsız değişkenin (Sıcaklık, süre ve çözücü:kati oranı) istatistiki olarak etkili olduğu belirlenirken CERAC üzerine bağımsız değişken olarak yalnızca ekstraksiyon süresinin istatistiki olarak etkisinin anlamlı olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte tüm üç yöntem (CUPRAC, DPPH, CERAC) için genel bir değerlendirme yapıldığında ekstraktların antioksidan aktivite değeri 21.99-230.20 mg TE/g arasında oldukça değişkenlik göstermiştir. Literatürde propolisin zeytinyağı ekstraktlarının antioksidan aktivitesini değerlendiren oldukça sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu çalışmalar arasında Silici ve Baysa (2020) tarafından yapılan bir çalışmada farklı konsantrasyonlarda hazırlanan propolisin zeytinyağı ekstraktlarının antioksidan aktivitesi 12.75-27.39 mg AAE/g arasında yine DPPH testi ile yürütülen antiradikal aktivite sonuçları ise %69.61-82.21 arasında tespit edilmiştir. Benzer şekilde farklı bir çalışmada farklı zeytinyağı örnekleri kullanılarak elde edilen propolis ekstraktları için en yüksek antioksidan aktivite değeri sızma (virgin) zeytinyağı örneğinden elde edilmiş olup bu değer 9.27-27.39 mg AAE/g arasında kaydedilmiştir (Silici, 2020). Literatürde yapılan bu çalışma ekstraksiyonda kullanılan zeytinyağı çeşidinin elde edilen sonuçları etkilediğinin bir göstergesidir. Ek olarak farklı bir çalışmada, katı: çözücü oranı 1:10 olan ve 5 günlük süre ile oda sıcaklığında yapılan ekstraksiyon sonucu elde edilen propolisin zeytinyağı ekstraktının DPPH testi ile yapılan

antioksidan aktivitesi %20.6 olarak belirlenmiştir (Kubiliene vd., 2015). Bununla birlikte farklı orijinlerden elde edilen propolis maserasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan etanol ekstraktının CUPRAC testi kullanılarak test edilen antioksidan aktivite değeri 95.35-710.43 mg TE/g arasında tespit edilmiştir (Özkök vd., 2021). Ek olarak Sonverdi vd. (2024) propolis ekstraktının antioksidan aktivitesini DPPH testi ile 37.30 ± 4.2 mg TE/g olarak tespit ederken CUPRAC testi ile 239.37 ± 16.7 mg TE/g olarak rapor etmişlerdir. Benzer şekilde 1:10 oranında oda sıcaklığında 1 günlük maserasyon sonucu hazırlanan 24 farklı lokasyondan toplanan propolis örneklerinin etanol ekstraktlarının CUPRAC ve DPPH testleri ile antioksidan aktivite değerleri sırasıyla 61.55- 370.18 mg TE/g ve 46.72- 228.23 mg TE/g arasında tespit edilmiştir. Literatürde propolis etanol ekstraktı için elde edilen bu farklı sonuçlar, kimyasal içeriği birçok faktöre bağlı olarak değişkenlik gösteren propolis için bizim de bu tez çalışmasında zeytinyağı propolis ekstraktı için elde ettiğimiz antioksidan aktivite değerlerinin farklılığını desteklemektedir.

3.2.3. Sıcaklık, Süre ve Katı: Çözücü Oranın Bazı Fenolik Bileşikleri Üzerine Etkisi

Antibakteriyal, antifungal ve anti-inflamatuvar gibi birçok biyoaktif özelliğe sahip olan propolis yapısında şu ana kadar 300'den daha fazla bileşik tanımlanmıştır. Bu bileşikler arasında özellikle fenoliklerin propolisin farmakolojik ve biyoaktif özelliği ile bağlantılı olduğu literatürde birçok çalışmada ifade edilmektedir (Escriche ve Juan-Borrás, 2018). Bu nedenle bu grup bileşiklerin propolis araştırmalarında özellikle incelenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada propoliste 27 farklı fenolik bileşiğin taraması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 7'de sunulmuştur. Ek olarak maserasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan ekstraktlarda bağımsız değişkenler olan sıcaklık, süre ve katı:çözücü oranın propolisin önemi fenolik bileşikleri arasında yer alan krisin, galangin ve pinosembrin bileşikleri üzerine etkisi değerlendirilmiştir.

Tablo 7: Ekstraktların Fenolik Profili (mg/kg)(M1-M8)

Fenolik Bileşik	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2	23.69±0.17	31.45±1.2	24.24±0.4	28.08±0.6	83.86±5.8	17.8±0.6	23.38±1.48	13.3±0.31
3	0.04±0.01	nd	0.02±0	0.02±0	0.1±0.02	0.01±0	0.03±0	0.02±0
4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6	15.74±0.2	15.66±0.1	9.93±0.83	7.21±0.31	35.68±1.3	23.03±0.99	7.03±0.78	14.08±1.09
7	0.3±0.03	0.49±0.01	0.28±0.08	0.26±0.05	1.49±0.01	0.3±0.04	2.85±0.31	0.66±0.04
8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.13±0.02	0.38±0.06
9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

10	26.02±0.14	30.87±0.98	32.03±1.05	32.64±0.05	87.48±1.11	34.21±1.04	30.34±1.1	23.02±0.74
11	30.93±0.97	36.04±0	35.94±1.21	38.27±3.64	109.93±1.99	29.73±1.03	8.16±0.95	20.36±0.25
12	0.22±0.01	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
13	1.76±0.04	nd	1.99±0.14	2.62±0.22	9.51±0.71	2.25±0.15	1.3±0	1.75±0.02
14	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
15	21.03±0.02	24.68±1.03	17.96±0.72	26.72±0.66	80.5±3.38	23.74±0.26	14.97±1.06	18.38±1.32
16	13.12±0.28	18.8±0.8	8.84±0.92	13.64±1.25	47.42±0.13	17.36±1.16	13.01±0.82	11.26±0.72
17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
18	3.58±0.28	3.63±0.33	3.41±0.25	3.95±0.16	13.82±1.99	1.18±0.14	2.33±0.21	1.37±0.09
19	4.98±0.31	1.66±0.17	5.00±0.21	1.59±0.05	14.89±0.73	1.28±0.01	2.41±0.15	3.85±0.21
20	5.37±1.23	9.85±0.45	10.2±1.37	7.51±0.34	23.6±0.78	8.38±0.98	11.53±1.29	7.43±0.13
21	163.99±7.99	215.65±8.45	232.47±4.34	232.29±2.16	360.68±3.15	218.84±10.41	256.28±10.43	227.86±10.74
22	10.62±0.53	8.07±0.1	16.05±0.66	9.98±0.53	39.47±1.32	13.3±0.78	13.38±0.58	13.08±0.7
23	5.76±0.48	30.45±1.82	23.45±2.71	14.61±0.33	49.95±4.86	22.13±0.31	22.48±0.63	13.59±1.45
24	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25	12.63±1.36	18.33±1.02	17.25±0.14	5.76±0.1	42.53±6	19.23±1.01	20.08±0.91	13.56±0.51
26	31.23±2.93	59.04±4	54.05±1.3	67.74±3.18	96.59±11.29	62.55±0.32	18.15±1.72	35.2±2.18
27	7.12±1.1	7.08±0.5	9.61±1.18	1.91±0.19	9.19±0.56	1.6±0.01	3.55±0.35	1.55±0.04
Toplam	378.13	511.75	497.72	494.8	1106.69	496.92	451.39	420.7

*1: (-)-Epikateşin, 2: Apigenin, 3: Artepillin C, 4: Epigallokateşin+gallokteşin, 5: Epikateşin gallat, 6: Galangin, 7: Gallik asit, 8: Hesperidin, 9: Hiperozid, 10: Kafeik asit fenil ester, 11: Kamferol, 12: Kateşin+Epikateşin, 13: Kateşol, 14: Klorojenik asit, 15: Krisin, 16: Kuersetin, 17: Kuersitrin, 18: Luteolin, 19: Mirisetin, 20: Naringenin, 21: Pinobanksin, 22: Pinosembrin, 23: *p*-kumarik Asit, 24: Rutin, 25: trans-ferulik asit, 26: *trans*-kafeik asit, 27: *trans*-sinnamik asit; nd; tespit edilemedi; M1-M8: Farklı maserasyon koşulları altında hazırlanan zeytinyağı bazı propolis ekstraktları.

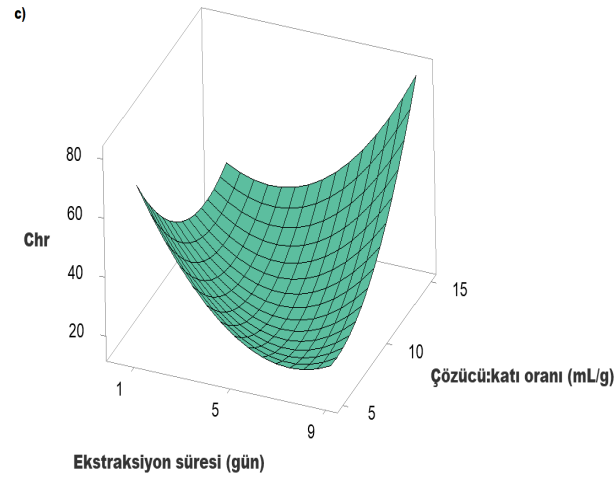
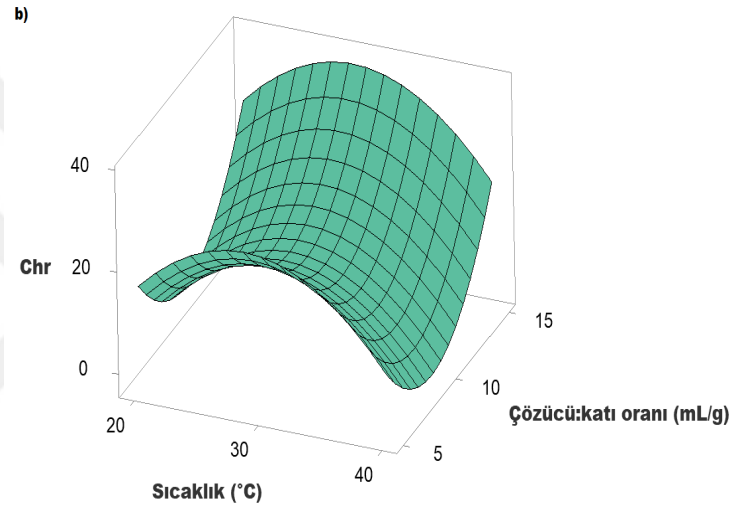
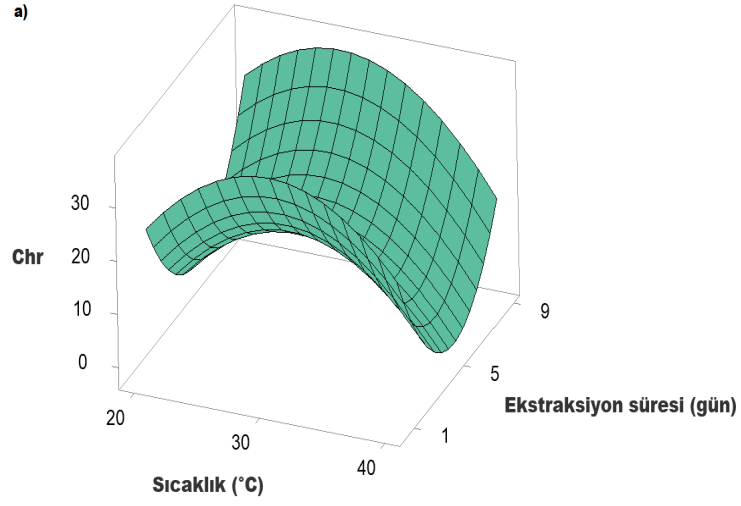
Tablo 8: Ekstraktların Fenolik Profili (mg/kg) (M9-M17)

Fenolik Bileşik	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17
1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2	30.15±2.07	11.14±0.26	25.94±0.68	36.21±1.05	32.1±0.51	19.64±1.08	24.13±0.18	24.56±1.62	10.91±0.45
3	nd	0.01±0	0.02±0	0.03±0	0.09±0.01	0.03±0	0.03±0	0.02±0	0.02±0
4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6	11.58±0.26	0.57±0.11	14.54±0.67	32.14±2.53	17.94±0.82	29.84±1.65	5.74±0.32	9.53±0.8	10.2±0.48
7	1.59±0.16	0.57±0.04	0.51±0.05	0.63±0.13	1.76±0.05	1.51±0.1	0.49±0.02	0.69±0.06	0.54±0.38
8	0.78±0.09	0.45±0.01	0.53±0.03	1.07±0.02	1.1±0.03	0.82±0.11	1.1±0.13	1.15±0	0.58±0.02
9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3.46±0.22
10	30.78±0.72	10.04±0.17	35.04±1.38	56.58±2.21	60±3.36	30.49±1.3	26.87±0.34	30.16±0.26	15.08±0.83

11	20.26±3 .05	9.26±0. 6	28.1±1. 9	42.32±0. 33	15.52±1.6 1	31.71±0.7 1	24.13±2.2 9	39.71±1.2 6	17.44±1 .11
12	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
13	nd	0.48±0. 07	0.62±0. 1	2.9±0.17	1.22±0.03	1.3±0.21	5.02±0.13	2.01±0.02	0.53±0. 06
14	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
15	18.21±0 .35	6.72±0. 45	19.64±0 .79	36.77±0. 23	28.37±1.2 9	12.51±0.4 9	16.96±0.4 8	25.41±0.2 2	12.88±0 .01
16	17.06±0 .17	2.22±0. 26	15.39±0 .62	5.32±0.1 8	15.43±0.9 4	8.54±1.08	10.56±0.7 1	12.08±0.0 8	5.03±0. 16
17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
18	3.77±0. 17	1.25±0. 13	3.62±0. 08	3.56±0.2 3	3.31±0.43	1.8±0.07	2.87±0.03	2.34±0.1	1.88±0. 06
19	6.02±0. 39	0.56±0. 1	5.38±0. 22	7.23±0.4 9	2.24±0.08	2.94±0.45	1.81±0.13	3.92±0.29	0.65±0. 01
20	9.37±0. 17	4.53±0. 25	13.4±0. 45	17.27±0. 24	11.73±0.7 4	8.78±0.39	1.28±0.15	1.49±0.04	4.63±0. 34
21	255.26± 5.9	139.12± 3.2	86.41±1 1.01	108.52± 10.32	227.47±1 6.66	167.61±2 1.28	207.88±2 2.17	174.61±1 6.22	83.76±5 .74
22	22.87±1 .54	1.89±0. 28	20.11±0 .53	62.91±3. 4	20.13±1.1	15.69±0.0 6	12.96±0.1 8	15.52±0.3 8	7.57±0. 51
23	19.95±0 .9	7.53±0. 47	22.97±2 .95	23.81±1. 12	21.34±2.5	14.55±0.3 4	17.78±1.1	14.57±1.1 7	9.51±0. 7
24	0.78±0. 02	0.36±0. 02	0.64±0. 03	0.58±0.0 1	0.97±0.01	0.33±0.03	0.43±0.04	0.62±0.06	0.61±0. 03
25	17.34±0 .66	6.45±0. 18	19.87±0 .3	22.96±0. 72	14.26±1.7 4	12.42±0.7 1	14.12±0.3 6	3.24±0.1	7.2±0.7 8
26	51.26±1 .77	14.15±1 .27	48.18±1 .61	64.47±3. 13	50.55±3.0 2	30.31±1.3 9	49.69±8.1 4	33.27±1.8 3	17.56±0 .87
27	1.14±0. 12	0.39±0. 02	1.71±0. 26	11.15±0. 1	1.19±0.07	2.17±0.14	4.59±0.25	3.58±0.28	4.42±0. 18
Toplam	518,17	217,68	362,62	536,43	526,72	392,99	428,44	398,48	214,46

*1: (-)-Epikateşin, 2: Apigenin, 3: Artepillin C, 4: Epigallokateşin+gallokteşin, 5: Epikateşin gallat, 6: Galangin, 7: Gallik asit, 8: Hesperidin, 9: Hiperozid, 10: Kafeik asit fenil ester, 11: Kamferol, 12: Kateşin+Epikateşin, 13: Kateşol, 14: Klorojenik asit, 15: Krisin, 16: Kuersetin, 17: Kuersitrin, 18: Luteolin, 19: Mirisetin, 20: Naringenin, 21: Pinobanksin, 22: Pinosembrin, 23: *p*-kumarik Asit, 24: Rutin, 25: trans-ferulik asit, 26: *trans*-kafeik asit, 27: *trans*-sinnamik asit; nd; tespit edilemedi; M9-M17: Farklı maserasyon koşulları altında hazırlanan zeytinyağı bazı propolis ekstraktları.

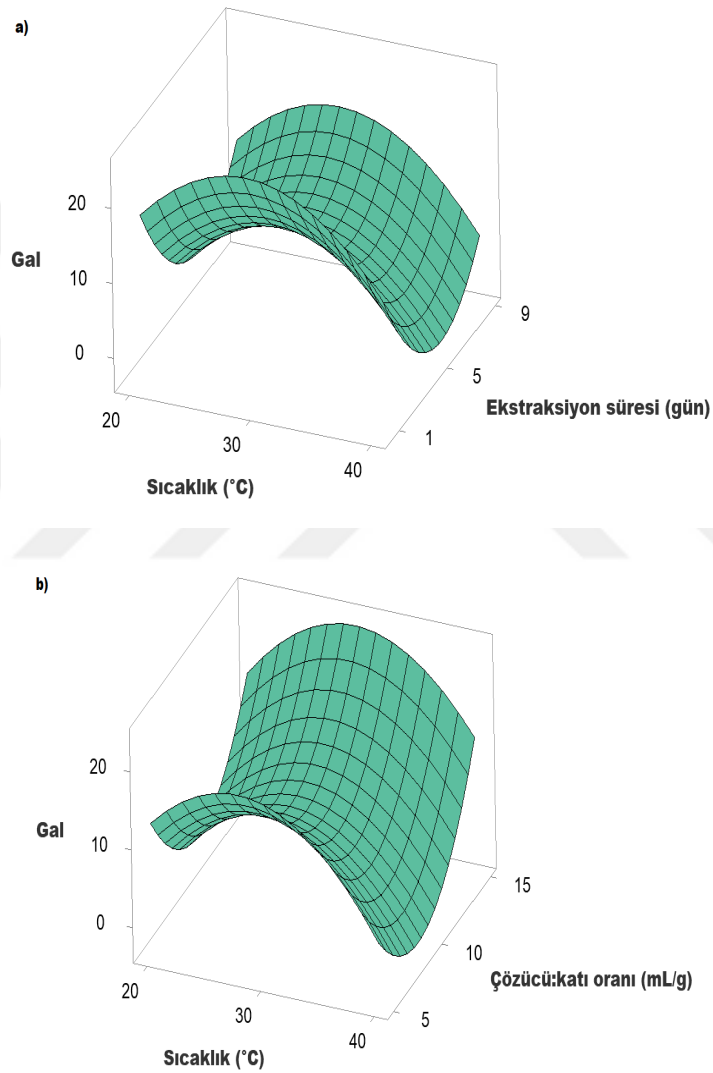
Bağımsız değişkenlerin krisin fenolik bileşiği üzerine etkisi incelendiğinde, 3 bağımsız değişkenin de etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır. Sıcaklık ile pozitif, süre ve çözücü:katı oranı ile ise negatif korelasyon olduğu belirlenmiştir. Ayrıca tüm bağımsız değişkenlerinin karelerinin ve süre*çözücü:katı oranı interaksiyonunun da istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur (Tablo 6).Krisin miktarlarının farklı koşullar altında değişimi Şekil 10a-c’de verilmiştir. Krisin miktarlarının sıcaklık ve süre ile değişimi Şekil 10a’da, sıcaklık ve çözücü:katı oranı ile değişimi Şekil 10b’de ve süre ve çözücü:katı oranı ile değişimi ise Şekil 10c’de verilmiştir. En yüksek krisin miktarı, TFM, CUPRAC ve DPPH’nın da en yüksek değerlerini aldığı koşullarda (sıcaklık 30 °C, ekstraksiyon süresi 9 gün ve çözücü:katı oranı 15 mL/g) 80.5 mg/kg olarak elde edilmiştir.

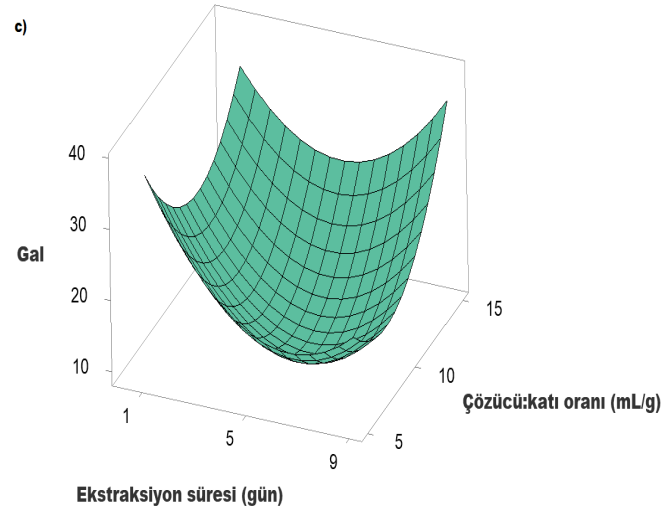


Şekil 10: Krisin (chr) Miktarının Farklı Koşullarda Değişimi a) Sıcaklık ve Süre, b) Sıcaklık ve Çözücü: Katı Oranı, c) Süre ve Çözücü: Katı Oranı

Bağımsız değişkenlerin galengin fenolik bileşiği üzerine etkisine bakıldığında, 3 bağımsız değişkenin de etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır. Sıcaklık ile

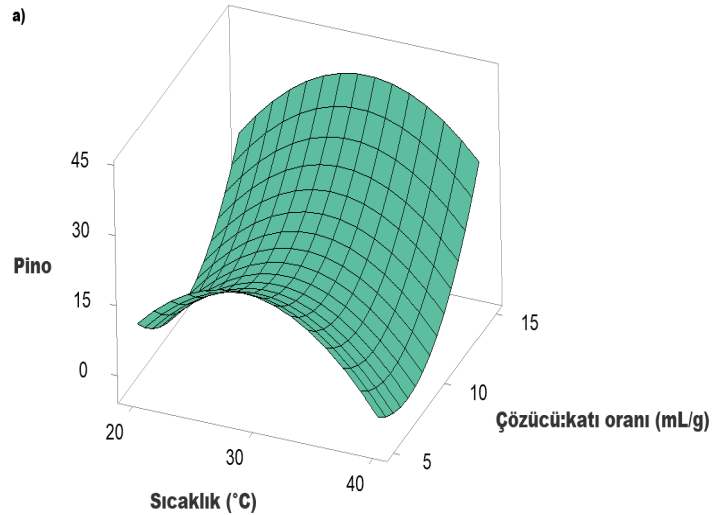
pozitif, süre ve çözücü:katı oranı ile ise negatif korelasyon olduğu belirlenmiştir. Ayrıca tüm bağımsız değişkenlerinin karelerinin de istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur (Tablo 6). Galangin miktarlarının farklı koşullar altında değişimi Şekil 11a-c’de verilmiştir. Galangin miktarlarının sıcaklık ve süre ile değişimi Şekil 11a’da, sıcaklık ve çözücü:katı oranı ile değişimi Şekil 11b’de ve süre ve çözücü:katı oranı ile değişimi ise Şekil 11c’de verilmiştir. En yüksek galangin miktarı, TFM, CUPRAC, DPPH ve krisinin de en yüksek değerlerini aldığı koşullarda (sıcaklık 30 °C, ekstraksiyon süresi 9 gün ve çözücü:katı oranı 15 mL/g) 35.68 mg/kg olarak elde edilmiştir.

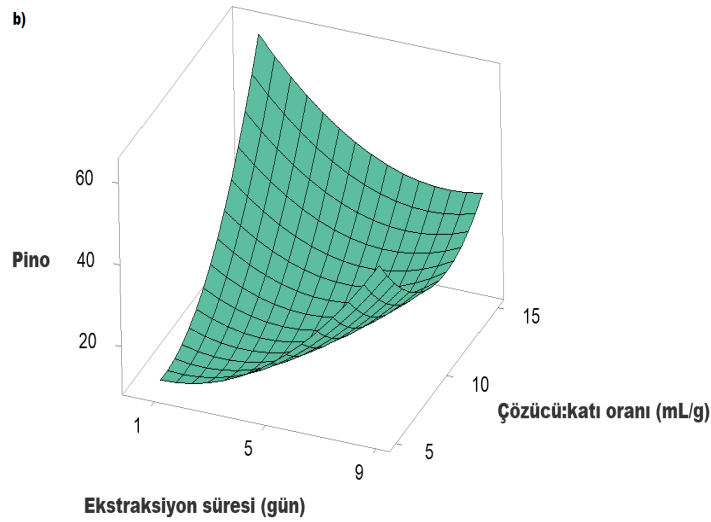




Şekil 11: Galangin (gal) Miktarının Farklı Koşullarda Değişimi a) Sıcaklık ve Süre, B) Sıcaklık ve Çözücü: Katı Oranı, C) Süre ve Çözücü: Katı Oranı

Son olarak, bağımsız değişkenlerin pinosembrin fenolik bileşiği üzerine etkisine bakıldığında ise bağımsız değişkenlerden sıcaklık ve çözücü:kati oranının etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır. Sıcaklık ile pozitif, çözücü:kati oranı ile ise negatif korelasyon olduğu belirlenmiştir. Ayrıca tüm bağımsız değişkenlerinin karelerinin ve süre*çözücü:kati oranı interaksiyonunun da istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur (Tablo 6). Pinosembrin miktarlarının sıcaklık ve çözücü:kati oranı ile değişimi Şekil 12a’da, süre ve çözücü:kati oranı ile değişimi ise Şekil 12b’de verilmiştir. En yüksek pinosembrin miktarı, sıcaklığın 30 °C, ekstraksiyon süresinin 1 gün ve çözücü:kati oranının 15 mL/g olduğu koşullar altında 62.91 mg/kg olarak elde edilmiştir.





Şekil 12: Pinosembrin Miktarının Farklı Koşullarda Değişimi A) Sıcaklık ve Çözücü:Kati Oranı, B) Süre ve Çözücü:Kati Oranı

Genel olarak bağımsız değişkenlerin üç farklı fenolik bileşik üzerine etkisi incelendiğinde, krisin ve galangin bileşikler tıpkı en yüksek TFM, CUPRAC ve DPPH değerlerinin elde edildiği ekstraksiyon koşullarının (sıcaklık 30 °C, ekstraksiyon süresi 9 gün ve çözücü:kati oranı 15 mL/g) uygulandığı ekstraktta elde edilmiştir. Pinosembrin bileşiği ise bu iki bileşiğe kıyasla daha düşük ekstraksiyon süresi altında (1 gün) elde edilmiştir. Krisin, galangin ve pinosembrin bileşiklerinin miktarı farklı ekstraksiyon koşulları altında sırasıyla 6.72-80.5 mg/kg, 0.57-35.68 mg/kg ve 1.89-62.91 mg/kg arasında tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ekstraksiyon koşullarının bu fenoliklerin ekstraksiyon başarısı üzerine önemli derecede etkili olduğunun bir göstergesidir. Bununla birlikte elde edilen sonuçlar incelendiğinde sadece bu üç fenoliğin değil diğer fenoliklerinde farklı ekstraksiyon koşulları altında oldukça farklı oranlarda ekstrakte edildiği görülmüştür. Farklı ekstraksiyon koşulları altında elde edilen ekstraktlar 27 bireysel fenoliğin toplam içeriği açısından değerlendirildiğinde, bu oran 214.46-1106 mg/kg arasında değişkenlik göstermiştir. Bireysel fenoliklerin en yüksek değeri sıcaklık 30 °C, ekstraksiyon süresi 9 gün ve çözücü:kati oranı 15 mL/g olduğu ekstraksiyon koşullarında elde edilmiştir. Bununla birlikte, propolisin önemli fenolik bileşikler arasında bilinen apigenin, gallik asit, CAPE, kuersetin, naringenin, pinobanksin, *trans*-ferulik asit ve *trans*-kafeik asit bileşiklerinin miktarı, 17 farklı ekstraksiyon koşulu altında elde edilen ekstraktlarda sırasıyla 10.91-83.86, 0.3-2.85, 10.04-87.48, 2.22-42.42, 1.28-23.6, 36.41-360.68, 3.24-22.96, 14.15-96.59 mg/kg arasında belirlenmiştir.

40 °C'yi geçmeyen 1 haftalık maserasyonu sonucu hazırlanan propolisin zeytinyağı ekstraktının vanilin, *p*-coumaric acid, ferulic acid, kafeik asit, dimetoksisinamik asit ve CAPE içeriği açısından değerlendirildiği bir araştırmada, elde edilen ekstraktın CAPE içeriğinin

(yaklaşık 600 mg/mL) taraması yapılan diğer fenoliklere kıyasla daha baskın olduğu rapor edilmiştir (Silici ve Baysa, 2020). Bizim çalışmamızda ise bu değer 10.04-87.48 mg/kg aralığında değişmiş olup daha düşük oranda belirlenmiştir. Benzer şekilde Kubiliene vd. (2015) yaptıkları araştırmada maserasyon sonucu (5 saat, 1:10, oda sıcaklığı) elde ettikleri propolis ekstraktının bileşiminde kafeik asit, *trans-p* kumarik asit ve ferulik asitin varlığını tanımlarken naringenin, kamferol ve galangin bileşiklerini tanımlayamadıklarını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise farklı olarak bu 6 fenolik bileşiğin tamamı kantitatif olarak farklı oranlarda ekstraktlarda tanımlanmıştır. Bu farklılıklar ekstraksiyon koşullarının yanı sıra kullanılan zeytinyağının çeşidi, propolisin coğrafik orijini, botanik orijini ve toplanma zamanı gibi parametrelerin farklılığından da kaynaklanıyor olabilir. Nitekim propolisten fenolikler gibi biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda bu parametrelerin dikkate değer öneme sahip olduğunu gösteren birçok literatür çalışması mevcuttur (Toreti vd., 2013; Letullier vd., 2020; Kasote vd., 2022). Literatürde propolisin zeytinyağı ekstraktlarının fenolik profilini araştıran yeterli araştırma olmamasına rağmen özellikle farklı ekstraksiyon parametreleri kullanılarak hazırlanan propolisin etanol ekstraktlarının fenolik profilini araştıran çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Örneğin Özdal vd. (2019) yaptıkları çalışmada Türkiye'nin farklı 11 bölgesinden topladıkları propolis örneklerini 1:15 oranında %70 'lik etanolde 1 gün bekleterek elde ettikleri ekstraktların LC-MS/MS ile fenolik profilini belirlemişlerdir. Araştırmacılar bizimde çalışmamızda araştırdığımız fenoliklerden apigenini maksimum 528 mg/kg; kafeik asiti maksimum 613 mg/kg; *p*-kumarik asiti maksimum 6602 mg/kg; klorojenik asiti maksimum 93.7 mg/kg; ferulik asiti maksimum 448 mg/kg; gallik asiti maksimum 442 mg/kg; *trans*-sinnamik asiti maksimum 1149 mg/kg; *trans*-ferulik asiti maksimum 373 mg/kg; CAPE'yi maksimum 2857.33 mg/kg; kamferolu maksimum 604 mg/kg; kateşini maksimum 573 mg/kg; kuersetini maksimum 4620 mg/kg; naringenini maksimum 588 mg/kg; pinobanksini maksimum 3836 mg/kg ve hesperidini maksimum 229 mg/kg olarak tespit ettiklerini rapor etmişlerdir. Özdal vd. (2019) yaptıkları çalışmada bu fenolikleri 11 örneğin bazılarında çok düşük oranlarda bazılarında ise hiç ekstrakte edememişlerdir. Benzer şekilde Kurek-Górecka vd. (2022) yaptıkları araştırmada 1:5 oranında oda sıcaklığında 7 günlük bekletme süresi sonucu elde ettikleri farklı bölgelerden propolis ekstraktlarında apigenini 0.00-219.721 mg/kg; kafeik asiti 89.611-547.929 mg/kg; gallik asiti 9.506-77.786 mg/kg; ferulik asiti 119.007-1114.551 mg/kg; kuersetini 0.00-138.984 mg/kg; *trans*-sinnamik asiti 23.354-235.758 mg/kg; krisini 457.006-2817.433 mg/kg; pinosembrini 8.865-2816.289 mg/kg; CAPE'yi 122.557-1118.623 mg/kg arasında tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise bu değerler apigenin için 10.91-83.86; kafeik asit için 4.15-96.59; *p*-coumaric acid için 7.53-49.95;

klorojenik asid için 0.00; *trans*-ferulik asit için 3.24-42.53; gallik asit için 0.28-2.85; *trans*-sinnamik asit için 0.39-9.61; CAPE için 10.04-87.48; kamferol için 8.16-109.93; kuersetin için 2.22-47.42; naringenin için 1.28-23.6; pinobanksin için 83.76-360.68 ve hesperidin için ise 0.00-1.15 mg/kg arasında belirlenmiş olup zeytinyağı ekstraktlarından elde ettiğimiz bu değerler Özdal vd. (2019)'nın etanol ekstraktlarından bu bileşikler için elde ettikleri değerlerle uyumludur. Bu durum aynı Özdal vd. (2019)'un çalışmalarında olduğu gibi aynı ekstraksiyon koşulları uygulansa bile farklı coğrafik kökenlerden elde edilen propolis örneklerinin kimyasal içeriklerinin oldukça değişkenlik gösterdiğine ve ayrıca bizim çalışmamızdaki gibi aynı propolis örneğine farklı ekstraksiyon koşullarının uygulanmasının ekstrakte edilen fenolik bileşiğin oranını açık bir şekilde etkilediğini işaret etmektedir. Benzer şekilde propolis örneklerinin coğrafik orijinine bağlı olarak da kimyasal içeriğinin de değiştiği gösteren birçok araştırma mevcuttur. Örneğin farklı orijinlerden toplanan 17 farklı propolis örneğinin etanol ekstraktlarının kafeik asit içeriği 0.00-5.8, *p*-kumarik asit içeriği 0.00-5.8; ferulik asit içeriği 0.00-3.0; pinobanksin içeriği 0.00-27.9; kamferol içeriği 0.00-19.5; apigenin içeriği 0.00-6.4; pinosembrin içeriği 0.3-67.1; pinobanksin 3-asetat içeriği 0.4-127.4; krisin içeriği 0.3-66.0; CAPE içeriği 0.00-10.9 ve galangin içeriği 0.00-73.8 mg/g arasında belirlenmiştir (Kumazawa vd., 2010). Literatürde yapılan bu çalışmalar dikkate alındığında propolis için kullanılan çözücü tipi, katı: çözücü oranı ve aynı zamanda coğrafik orijininin de oldukça etkili faktörler olduğu açıktır.

Sonuç olarak, yapılan bu tez çalışmasında maserasyon için bağımlı değişkenler maksimize edilerek yanıt yüzey yöntemi ile yapılan optimizasyon sonucu optimum koşullar; sıcaklık için 30.10 °C, ekstraksiyon süresi için 9 gün ve çözücü:katı oranı için 15 mL/g olarak bulunmuştur. Modelin bileşik arzu edilebilirlik değeri (d) 0.92 olarak saptanmıştır. Optimum koşullarda tahmini TFM, CUPRAC, DPPH, CERAC, krisin, galangin ve pinosembrin değerlerinin sırasıyla 60.77 mg GAE/g, 136.8 mg TE/g, 129.36 mg TE/g, 348.0 mg TE/g, 80.43 mg/kg, 35.67 mg/kg ve 35.57 mg/kg olduğu görülmüştür. Bununla birlikte optimum koşullarda hazırlanan zeytinyağı ekstraktının TFM, CUPRAC, DPPH, CERAC, krisin, galangin ve pinosembrin değerleri ise sırasıyla 38.87 mg GAE/g, 119.35 mg TE/g, 121.25 mg TE/g, 261.39 mg TE/g, 83.19 mg/kg, 44.45 mg/kg ve 48.16 mg/kg olarak belirlenmiştir. Deneysel elde edilen bu değerler ile optimizasyon sonucunda elde edilen tahmini değerler arasında tek örneklemli t-testi uygulanarak aralarında fark olmadığı görülmüş ($p>0.05$) ve *p* değerleri Tablo 8'da sunulmuştur.

Tablo 9: Deneyisel ve Teorik Değerler Arasında Yapılan Tek Örneklemli T-Testi Analizine Göre Elde Edilen P Değerleri

Yanıt (M)	P
TFM (mg GAE/g)	0.398
CUPRAC (mg TE/g)	0.486
DPPH (mg TE/g)	0.572
CERAC (mg TE/g)	0.427
Krisin (mg/kg)	0.798
Galangin (mg/kg)	0.447
Pinosembrin (mg/kg)	0.425

3.3. EKSTRAKTLARIN *IN-VİTRO* ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ

3.3.1. Agar Kuyu Difüzyon Metodu

Araştırma sürecinde hazırlanan zeytinyağı bazlı propolis özütlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla agar kuyu difüzyon tekniği ve mikro brot seyreltme tekniği kullanılmıştır. Agar kuyu difüzyon (AKD) uygulamasında, petri kapları içerisinde besiyerlerine açılan 6 mm çapındaki kuyulara 50 µL hacminde zeytinyağı propolis ekstraktı aktarılmıştır (Goel vd., 2016). Maserasyon örnekleri için agar kuyu difüzyon metodundan elde edilen sonuçlar Tablo 10'da listelenmiştir.

Agar kuyu difüzyon metodunda elde edilen sonuçlarda maserasyon yöntemi ile hazırlanan zeytinyağı propolis ekstraktlarına karşı en duyarlı örneklerin Gram (+) bakteriler olduğu gözlemlenmiştir. Ancak, Gram (+) bakterilerde gözlemlenen bu inhibisyon zon ölçülerinin 7-9 mm çapında değiştiği ve zeytinyağı bazlı propolis ekstraktlarının agar kuyu yöntemi ile oluşturduğu inhibisyon zonlarının ihmal edilecek düzeyde düşük olduğu görülmüştür (Petri kaplarında 6 mm çapındaki kuyucuklara 50 µL hacminde zeytinyağı propolis ekstraktı aktarılmıştır). Bunlara ek olarak, maserasyon yöntemi ile hazırlanan zeytinyağı propolis ekstraktlarının Gram (-) suşlarda çok az sayıda örnekte inhibe edici etkiye sahip olduğu ve hatta pek çok örnekte inhibisyon zonu oluşturmadığı görülmüştür. Maya benzeri mantar suşlarında (*Candida* spp.) ise zeytinyağı bazlı propolis ekstraktlarının inhibe edici özelliğe sahip olmadığı tespit edilmiştir.

Nichitoy vd. (2023) Rumen propolisinden polifenollerin öztülenmesi için ultrasonik destekli ve maserasyon tekniklerini kullanarak kıyaslamalı bir araştırma gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen sonuçlarda, ultrasonik destekli ekstraksiyon yönteminin kullanımıyla ekstraksiyon süresinin kısaltılmasının yanı sıra ekstraksiyon veriminin de arttığı ifade edilmiştir. Bu çalışmada, sıcaklık parametresi sabit tutulurken, süre (10-100 dakika), çözücü bileşimi (su, %25 ve %50; etanol, w/w) ve sıvı:kati oranı (2:1, 4:1 ve 6:1, w/w) şeklinde değişkenler belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlarda, %50 etanol içerikli ekstraktların, yaklaşık üç kat daha yüksek düzeyde antioksidan kapasite sunduğu ve maserasyona kıyasla daha güçlü antibakteriyel, antifungal aktivite gösterdiği ifade edilmiştir. Araştırmacılar bu çalışmada antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi amacıyla disk difüzyon metodu kullanmışlardır. Bu sonuçlar, Nichitoy vd. (2023) tarafından elde edilen sonuçlarla örtüşmektedir (Nichitoy vd., 2023).

Niaz ve Fatima (2017) tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, gıda kaynaklı patojenlere karşı zeytinyağı ve sirkenin antimikrobiyal aktiviteleri agar kuyu difüzyon yöntemiyle araştırılmıştır. Bu çalışmada hedef patojen olarak tavuk eti örneklerinden izole edilen *E. coli*, *Klebsiella*, *Salmonella* ve *Shigella* bakterileri kullanılmıştır. Bu çalışmada seçilen dört adet Gram (-) bakterinin tamamının agar kuyu yöntemi ile elde edilen sonuçlarda zeytinyağı örneğine karşı dirençli olduğu ve antimikrobiyal aktivite testlerinde inhibisyon zonu oluşmadığı rapor edilmiştir (Niaz ve Fatima, 2017). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarda Gram (-) bakterilerin çoğunlukla zeytinyağı ekstraktlarına karşı dirençli olması bu araştırmanın sonuçları ile örtüşmektedir. Çalışmamızda, zeytinyağı bazı propolis ekstraktlarının, az sayıda Gram (-) bakteriye karşı küçük düzeyde (7 mm çapında) inhibisyon zonu oluşturmasının sebebinin, zeytinyağı içerisinde çözünen polifenolik bileşenlerden kaynaklandığı söylenebilir.

Medina vd. (2006) gerçekleştirdikleri bir çalışmada, farklı bitkisel yağların antimikrobiyal aktivitesini incelemişlerdir. Bu çalışmada, bir model deney tasarlayan araştırmacılar: tween 20 içeren sterilize edilmiş fosfat tamponlu salini (PBST, pH 7,0) 2 mL'si, 0,2 mL hedef suşla aşılayarak bir ilk aşı elde etmişlerdir. Daha sonra, aşılanmış tamponu içeren test tüpüne 2 mL bitkisel yağ ilave edilerek 32°C, 450 rpm'de 1 saat boyunca orbital çalkalayıcıda çalkalamışlardır. Bu çalışmada elde edilen *in vitro* sonuçlarda ayçiçeği yağı ve mısırözü yağı örneklerinin test edilen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite göstermediği, buna karşın zeytinyağı örneğinin geniş bir mikroorganizma yelpazesine karşı güçlü bir bakterisidal etkiye sahip olduğu vurgulanmaktadır. Ancak zeytinyağında elde edilen bu antibakteriyel etkinin genel olarak Gram-negatif bakterilere kıyasla Gram-pozitif

bakterilerde daha yüksek olduğu ifade edilmiştir. Devam eden uygulamalar sonunda dekarboksimetil oleuropein, hidrokstitirosol ve tirosol bileşiklerinin antibakteriyel aktivite ile ilişkili fenolik bileşikler olduğu değerlendirilmiş ve bu bulgular, HPLC ile izole edilen her bir fenolik bileşiğin *Listeria monocytogenes*'e karşı test edilmesiyle doğrulanmıştır. Özellikle dekarboksimetil ligestrosid aglikonunun dialdehit formu güçlü bir antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Bu sonuçlar, zeytinyağı olarak sınıflandırılan tüm yağların benzer bakterisidal etkilere sahip olmadığını ve bu biyoaktivitenin belirli fenolik bileşiklerin içeriğine bağlı olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak bu araştırmada Medina vd. (2006) tarafından tasarlanan antimikrobiyal aktivite tekniğinin, bizim araştırmamızda kullanmış olduğumuz agar kuyu difüzyon tekniğine kıyasla farklı olması nedeniyle, araştırma sonuçlarımızın tam anlamıyla örtüşmediği görülmektedir. Ancak, Gram (+) bakterilerin zeytinyağı örneklerine daha duyarlı olması ve Gram (-) bakterilerin zeytinyağı örneklerine daha dirençli olması durumu çalışmamızda elde edilen sonuçlarla örtüşmektedir.

3.3.2. Mikrobrot Seyreltme Metodu

Maserasyon ekstraktlarının mikrobrot seyreltme metodunda elde edilen minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) sonuçları sırasıyla Tablo 10'da listelenmiştir.

Janani vd. (2022) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada Hindistan'ın iki farklı fitocoğrafik bölgesinden toplanan propolis ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi değerlendirilmiştir. Jammu, Kashmir ve Rajasthan bölgelerinden alınan propolis örnekleri, maserasyon, ultrasonik destekli ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemleriyle ekstrakte edilmiştir. Çalışma sürecinde ekstraksiyon süreleri maserasyon uygulaması için 1 – 7 gün olarak uygulanmış, ultrasonik destekli ekstraksiyon işlemlerinde 5, 10 ve 15 dakika ekstrakte edilmiş, son olarak mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminde ise 1-3-5 dakika sürelerle ekstraksiyon işlemleri tamamlanmıştır. Elde edilen ekstraktların *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı antibakteriyel etkileri, minimum inhibitör konsantrasyon metodu ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlarda, maserasyon ile ekstrakte edilen propolis özütlerinin *Staphylococcus aureus* için MİK değerlerinin 5 mg/mL olduğu görülmektedir. *Escherichia coli* için ise bu değerlerin 10 mg/mL olduğu ifade edilmektedir. Bu tez çalışmasında ise maserasyon yöntemi ile elde edilen ekstraktların sonuçları Gram (+) örnekler için MİK değerlerinin 5-10 mg/mL arasında değiştiği, buna ek olarak az sayıda Gram (-) bakteri suşu için MİK değerlerinin 10 mg/mL olduğu ancak geri kalan Gram (-) suşlarda inhibisyon konsantrasyonunun 10 mg/mL'den daha yüksek düzeyde olduğu gözlemlenmiştir.

Bu araştırmaya ek olarak Barreto vd. (2022) tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada ultrasonik destekli yöntem kullanılarak hazırlanmış Brezilya kırmızı propolisi ekstraktlarının aktif bileşenlerinin içeriği analiz edilmiş ve bu ekstraktın antioksidan kapasitesi, bakteri ve tümör hücrelerine karşı *in vitro* performansları değerlendirilmiştir. Bu araştırmada elde edilen sonuçlar, özütlenen on ekstraktın, iki bakteri suşuna karşı antibakteriyel etkiye sahip olduğunu ve sekiz propolis özütünün beş neoplastik hücre hattına karşı %70'ten fazla sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Antimikrobiyal aktivite açısından değerlendirildiğinde, Barreto vd. (2022)'nin çalışmasında kullanılan propolis örneklerinin MİK değerlerinin *S. aureus* ATCC 25923 suşu için 6- 23 µg/mL arasında değiştiği, *E. coli* ATCC 1775 suşu için ise MİK değerlerinin 23-93 µg/mL arasında değiştiği rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlarla kıyaslandığı zaman, bu araştırmada elde edilen MİK değerlerinin yaklaşık olarak bin kat daha düşük olması dikkat çekmektedir (Araştırmamızda elde edilen sonuçlar mg.mL⁻¹ olarak ifade edilirken, Barreto vd. (2022) tarafından gerçekleştirilen çalışmada elde edilen sonuçlar µg.mL⁻¹ olarak ifade edilmektedir). Ancak Gram (+) bakterilerin propolis özütlerine karşı Gram (-) bakterilere kıyasla daha duyarlı olması açısından çalışmada elde edilen sonuçlar benzerlik göstermektedir (Barreto vd., 2022).

Sokolonski vd., (2021) tarafından gerçekleştirilen bir diğer araştırmada, ultrasonik destekli ve maserasyon yöntemleriyle özütlenen Brezilya yeşil ve kırmızı propolis örneklerinin oral *Candida* türleri izolatlarına karşı antifungal aktivitesi karşılaştırılmıştır. Protez stomatiti lezyonlarından izole edilen ve dizileme yöntemi ile tanımlanan oral *Candida* türleri ve referans suşları için, mikrobrot seyreltme tekniği ile MİK değerleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. dubliniensis* suşlarının, tüm yeşil ve kırmızı propolis özütlerine duyarlı oldukları ve buna ek olarak ultrason ön işleminin yeşil veya kırmızı propolisin antifungal aktivitesinde bir artışa neden olmadığı rapor edilmiştir. MİK değerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen mikrobrot dilüsyon yönteminde dört farklı propolis ekstraktı örneğinin *Candida* suşlarına karşı MİK değerlerinin 1-8 mg/mL arasında değiştiği, az sayıda *Candida* suşunun ise bu propolis örneklerine dirençli olduğu ve MİK değerlerinin 8 mg/mL değerinden daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile kıyasladığında Sokolonski vd. (2021) tarafından gerçekleştirilen çalışmada elde edilen MİK değerlerinin, bizim araştırmamızda elde edilen sonuçlara kıyasla daha düşük düzeyde olduğu görülmektedir.

Tablo 10: Ekstraktların Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

No	Gram (+)										Gram (-)						Maya Benzeri Mantar							
	P1		P2		P3		P4		P5		P6		P7		P8		P9		P10		P11			
	AKD	MİK	AKD	MİK	AKD	MİK	AKD	MİK	AKD	MİK	AKD	MİK	AKD	MİK	AKD	MİK	AKD	MİK	AKD	MİK	AKD	MİK		
1	-	>10	7	10	-	>10	7	10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10		
2	-	>10	7	10	-	>10	8	5	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10		
3	-	10	8	10	-	>10	7	10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10		
4	-	>10	7	10	-	>10	7	10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10		
5	-	>10	7	10	-	>10	8	10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10		
6	-	10	9	5	7	>10	9	5	-	>10	7	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10		
7	-	>10	8	10	-	>10	8	10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10		
8	-	>10	8	10	-	10	7	10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10		
9	-	>10	7	10	-	>10	7	10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10		
10	-	>10	7	10	-	>10	8	10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10		
11	7	10	8	5	-	>10	9	5	7	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10		
12	-	>10	7	10	-	>10	7	10	-	>10		>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10		
13	-	>10	8	10	-	>10	7	10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10		
14	7	10	7	5	7	10	9	5	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10		
15	-	>10	8	10	-	>10	8	10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10		
16	-	>10	8	10	-	>10	7	10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10		
17	-	>10	7	10	-	>10	7	10	-	>10		>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	>10		
NK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PEN	27	ND	25	ND	29	ND	28	ND	21	ND	23	ND	20	ND	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
GEN	18	ND	15	ND	17	ND	21	ND	16	ND	20	ND	17	ND	14	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
FLU	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	29	ND	28	ND	26	ND		

AKD: Agar Kuyu Difüzyon metodu (mm); MİK: Minimum inhibisyon konsantrasyonu (mg/mL); NK: Negatif kontrol = zeytinyağı; PEN: Penisilin G; GEN: Gentamisin; FLU: Fluconazole; ND: Not detected; P1 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; P2 *Streptococcus mutans* ATCC 35668; P3 *Enterococcus faecalis* ATCC 49452; P4 *Bacillus cereus* ATCC 14579; P5 *Salmonella* Typhimurium RSSK 95091; P6 *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729; P7 *Escherichia coli* ATCC 25922; P8 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; P9 *Candida krusei* ATCC 6258; P10 *Candida glabrata* ATCC 90030; P11 *Candida albicans* A

SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde gelişen teknolojinin sağlık üzerine getirmiş olduğu olumsuz etkiler ve hazır gıda tüketiminin artması gibi nedenlerden dolayı, insanların beslenme alışkanlıklarında değişiklikler meydana gelmiş ve insanlar doğal ürünlere yönelmiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde, propolisin biyoaktif bileşenlerinin bir çoğunun gıda ve/veya gıda katkı maddelerinde mevcut olması gerçeği, onu yeni gıda uygulamalarında doğal bir koruyucu olarak çekici bir aday haline getirmiştir (Paviani vd., 2010). Propolis içeriğindeki biyoaktif bileşenlerden maksimum düzeyde yararlanılabilmesi için diğer arı ürünlerinin aksine, ham olarak tüketilmeyen ve bu nedenle ekstrakte edilerek tüketilmesi gereken bir arı ürünüdür. Son yıllarda yapılan çalışmalar neticesinde yüksek fenolik bileşik içeriği nedeniyle dikkate değer biyolojik aktivitelere sahip olduğu belirlenen ve bu nedenle umut verici bir ürün olan propolisin, biyoaktif madde miktarının daha yüksek oranda elde edilmesi ve standardizasyon çalışmalarına katkı sağlanması amacı ile yeni ekstraksiyon metotları arayışına girilmiş ve farklı araştırma grupları tarafından yürütülen çalışmalarda propolis ekstraktı hazırlarken farklı teknikler uygulanmıştır (Alencar vd., 2007; Popova vd., 2014; Silici ve Kutluca, 2005). Ek olarak propolisin biyoaktif içeriğinin ekstraksiyonunda oldukça yüksek bir başarı sağlayan alkol bazlı propolis ekstraktlarının kullanımına alternatif olarak, ürünün biyoaktif içeriğini maksimum düzeyde ortaya çıkarabilecek alternatif çözücü arayışı da sürekli devam etmektedir. Bu nedenle, bu çalışmada çözücü olarak zeytinyağı kullanılarak maserasyon yöntemi ile propolisten toplam fenolik bileşik, antioksidan madde, krisin, galangin ve pinosembren ekstraksiyonu optimize edilmiştir. Bu kapsamda, katı:çözücü oranı, ekstraksiyon süresi ve sıcaklık gibi değişkenlerin etkisi incelenmiştir. Ek olarak farklı koşullarda elde edilen ekstraktların 27 farklı bireysel fenolik bileşik açısından içeriği ve antimikrobiyal aktiviteleri de değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak maserasyon yöntemi kullanılarak aynı propolis örneğinden elde edilen ekstraktların biyoaktif içerikleri arasında dikkate değer derecede istatistiki olarak anlamlı farklılıklar elde edilmiştir. Bu durum literatürü destekler şekilde, ekstraksiyon yönteminin ekstraksiyon aşamasındaki en önemli parametrelerden biri olduğunu göstermektedir. Bu tez çalışmasında maserasyon için bağımlı değişkenler maksimize edilerek yanıt yüzey yöntemi ile yapılan optimizasyon sonucu optimum koşullar; sıcaklık için 30.10 °C, ekstraksiyon süresi için 9 gün ve çözücü:katı oranı için 15 mL/g olarak bulunmuştur. Modelin bileşik arzu edilebilirlik değeri (d) 0.92 olarak saptanmıştır. Tez kapsamında elde edilen tüm bu sonuçlara göre, birçok yenilikçi yöntemle sahip olduğu bazı avantajlar sayesinde halen propolis ekstraksiyonunda

en yaygın olarak tercih edilen bir yöntem olan maserasyon yöntemi ile, yüksek biyoaktif madde içeriğine sahip olan zeytinyağı bazlı propolis ekstraktları elde etmek için, 1:15 g/ml katı: çözücü oranı, 30.10 °C sıcaklık ve 9 günlük bir bekletme süresinin ekstraksiyon parametreleri arasında tercih edilebileceği söylenebilir. Bununla birlikte coğrafik orijin, botanik orijin ve toplanma zamanı vb. birçok faktöre bağlı olarak kimyasal içeriği ve biyokatif özellikleri değişiklik gösteren propolis gibi bir arı ürününün standardizasyonuna katkı sağlamak amacıyla, farklı propolis örnekleri için de bu gibi optmizasyon çalışmalarının yapılması tavsiye edilmektedir.



KAYNAKÇA

- Albayrak, S., & Albayrak, S. (2008). Propolis: Doğal antimikrobiyal madde. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 37, 201-215.
- Alencar, S. M., Oldoni, T. L. C., Castro, M. L., Cabral, I. S. R., Costa-Neto, C. M., Cury, J. A., & Ikegaki, M. (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(2), 278-283.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970–7981.
- Azza M. M., & Abd-El-Rhman, A. (2009). Antagonism of aeromonas hydrophila by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, oreochromis niloticus. *Fish & Shellfish Immunol*, 27, 454–459.
- Bankova, V., Christov, R., Stoev, G., & Popov, S. (1992). Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 607(1), 150-153.
- Bankova, V. S., Castro, S. L., & Marcucci, M. C. (2000). Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3-15.
- Bankova, V., Popova, M., & Trusheva, B. (2014). Propolis volatile compounds: Chemical diversity and biological activity: A review. *Chemistry Central Journal*, 8, 1-8.
- Barreto, G. D. A., Cerqueira, J. C., Reis, J. H. D. O., Hodel, K. V. S., Gama, L. A., Anjos, J. P., & Machado, B. A. S. (2022). Evaluation of the potential of Brazilian red propolis extracts: An analysis of the chemical composition and biological properties. *Applied Sciences*, 12(22), 11741.
- Baysal, T., İçier, F., & Baysal, A.H. (2011). Güncel Elektriksel Isıtma Yöntemleri. İzmir, Sidas Yayıncılık (1. Baskı).
- Beejmohun, V., Fliniaux, O., Grand, E., Lamblin, F., Bensaddek, L., Christen, P., Kovensky, J., Fliniaux, M., & Mesnard, F. (2007). Microwave-assisted extraction of the main phenolic compounds in flaxseed. *Phytochemical Analysis*, 18, 275-282.
- Bhardwaj, S. K., Dwivedia, K. & Agarwala, D. D. (2015). A Review: HPLC method development and validation. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 5(4), 76-81.
- Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírveda, P., Marín-Arroyo, M. R., & Navarro, M., (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 204-209.
- Bott, T. R. (1980). Supercritical gas extraction. *Chemistry & Industry*, 6, 228-232.
- Bouchelaghem, S. (2022). Propolis characterization and antimicrobial activities against Staphylococcus aureus and Candida albicans: A review. *Saudi journal of biological sciences*, 29(4), 1936-1946.
- Box, G. E., & Draper, N. R. (2007). Response surfaces. *Mixtures, and Ridge Analyses*, 649.
- Brunner, G. (2013). Gas extraction: An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes. *Springer Science & Business Media*.

- Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chemistry Toxicology*, 36, 347-363.
- Büyüktuncel, E. (2012). Gelişmiş ekstraksiyon teknikleri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 2, 209-242.
- Camel, V. (2001). Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: Their potential and pitfalls. *Analyst*, 126, 1182-1193.
- Capelo, J. L., & Mota, A. M. (2005). Ultrasonication for analytical chemistry. *Current Analytical Chemistry*, 1, 193-201.
- Castolda, S., & Capasso, F. (2002). Propolis an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73, 51-56.
- Chen, Y. W., Wu, S. W., Ho, K. K., Lin, S. B., Huang, C. Y., & Chen, C. N. (2008). Characterisation of Taiwanese propolis collected from different locations and seasons. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(3), 412-419.
- Cirrik, S., Kabartan Cokell, E., Gulec Peker, E. G., & Hacıoglu, G. (2023). The effects of propolis on doxorubicin-induced hepatorenal damage: A comparison of ethanolic and oily extracts of propolis. *CyTA-Journal of Food*, 21(1), 666-673.
- Cunha, I. B. S., Sawaya, A. C. H. F., Caetano, F. B., Shimizu, M.T., Marcucci, M. C., Drezza, F.T., Povia, G., & Carvalho, P.O., (2004). Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extract. *Journal Brazilian Chemistry Society*, 15(6), 964-970.
- Çerçiler, S. (2016). *Türk propolisinin sulu ekstraktının insanların epidermoid karsinoma (Hep-2) hücre serilerinde mitokondriyal membran potansiyeline etkisi*, (Yayınlanmamış yüksek lisans tezi). Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Devequi-Nunes, D., Machado, B. A. S., Barreto, G. D. A., Rebouças Silva, J., da Silva, D. F., Rocha, J. L. C., & Umsza-Guez, M. A. (2018). Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *PLoS One*, 13(12), 0207676.
- Dobrowolski, J. W., Vohora, S. B., Sharma, K., Shah, S. A., Naqvi, S. A. H., & Dandiya, P. C. (1991). Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J. Ethnopharmacol*, 35, 77-82.
- Doğan, N., & Hayoğlu, İ. (2012). Propolis ve kullanım alanları. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 16, 39-48.
- Doodmani, S. M., Bagheri, A., Natouri, O., Nobakht, A., & Saghebasl, S. (2024). Electrospinning-netting of spider-inspired polycaprolactone/collagen nanofiber-nets incorporated with propolis extract for enhanced wound healing applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 267, 131452.
- Doyon, M., & Labrecque, J. (2008). Functional foods: A conceptual definition. *British Food Journal*, 110(11), 1133-1149.
- Drago, L., Mombelli, B., Vecchi, E. D., Tocalli, M. F. L., & Gismondo, M. R. (2000). *In vitro* antimicrobial activity of propolis dry extract. *Journal of Chemotherapy*, 12(5), 390-395.
- Ecem-Bayram, N. (2021). Vitamin, mineral, polyphenol, amino acid profile of bee pollen from *Rhododendron ponticum* (source of “mad honey”): Nutritional and palynological approach. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(3), 2659-2666.

- Ecem-Bayram, N., Gerçek, Y. C., Bayram, S., & Toğar, B. (2020). Effects of processing methods and extraction solvents on the chemical content and bioactive properties of propolis. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14, 905-916.
- Escríche, I., & Juan-Borrás, M. (2018). Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis. *Food Research International*, 106, 834-841.
- Ferreira-Santos, P., Nobre, C., Rodrigues, R. M., Genisheva, Z., Botelho, C., & Teixeira, J. A. (2024). Extraction of phenolic compounds from grape pomace using ohmic heating: Chemical composition, bioactivity and bioaccessibility. *Food Chemistry*, 436, 137780.
- Fitzgerald, K. F., & Flood, A. A., (2006). Hymenoptera stings. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 21, 194-204.
- Fuentes, E., Báez, M. E., Bravo, M., Cid, C., & Labra, F. (2012). Determination of total phenolic content in olive oil samples by UV–visible spectrometry and multivariate calibration. *Food Analytical Methods*, 5, 1311-1319.
- Gan, H. E., Karim, R., Muhammad, S. K. S., Bakar, J. A., Hashim, D. M., & Rahman, R. A. (2007). Optimization of the basic formulation of a traditional baked cassava cake using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 40(4), 611-618.
- Gavahian, M., Farhoosh, R., Javidnia, K., Shahidi, F., & Farahnaky, A. (2015). Effect of applied voltage and frequency on extraction parameters and extracted essential oils from *Mentha piperita* by ohmic assisted hydrodistillation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 29, 161-169.
- Genc, F., & Dodoloğlu, A. (2011). Arıcılığın temel esasları. Atatürk Üniversitesi Yayınları No: 931. Ziraat Fakültesi Yayın No: 341. Erzurum.
- Ghisalberti, E. L., (1979). Propolis: A review. *Bee World*, 60, 59-84.
- Goel, N., Rohilla, H., Singh, G., & Punia, P. (2016). Antifungal activity of cinnamon oil and olive oil against *Candida* spp. Isolated from blood stream infections. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 10(8), DC09.
- Gómez-Caravaca, A., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A., (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(4), 1220–1234.
- González-Montiel, L., Figueira, A. C., Medina-Pérez, G., Fernández-Luqueño, F., Aguirre-Álvarez, G., Pérez-Soto, E., & Campos-Montiel, R. G. (2022). Bioactive compounds, antioxidant and antimicrobial activity of propolis extracts during *in vitro* digestion. *Applied Sciences*, 12(15), 7892.
- Gori, A., Boucherle, B., Rey, A., Rome, M., Fuzzati, N., & Peuchmaur, M. (2021). Development of an innovative maceration technique to optimize extraction and phase partition of natural products. *Fitoterapia*, 148, 104798.
- Grange, J. M., & Davey, R. W. (1990). Antibacterial properties of propolis (Bee Glue). *J. Roy. Soc. Medicine*, 83, 159–161.
- Hartwich, A., Legutko, J., & Wszolek, J. (2000). Propolis: Its properties and administration to patients treated for some surgical diseases. *Przegląd Lekarski*, 57(4), 191-194.
- Hepşen, İ. F., Tilgen, F., & Er, H. (1996). Propolis: Tıbbi özellikleri ve oftalmolojik kullanımı. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 3, 386-391.
- Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G. Q., & Hu, F. L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 19(12), 19610–19632.

- Huertas-Perez, J. F., Iruela, M. D., Garcia-Campana, A. M., Gonzalez-Casado, A., & Sanchez-Navarro, A. (2006). Determination of the herbicide metribuzin and its major conversion products in soil by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1102, 280-286.
- İlbay, Z. (2016). *Turunçgil meyve ve yapraklarının farklı ekstraksiyon yöntemleriyle ekstraksiyonu ve matematik modellemesi* (Yayınlanmamış doktora tezi). İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Janani, D., Lad, S. S., Rawson, A., Sivanandham, V., & Rajamani, M. (2022). Effect of microwave and ultrasound-assisted extraction methods on phytochemical extraction of bee propolis of Indian origin and its antibacterial activity. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(11), 7205-7213.
- Jenny, J. C., Kuś, P. M., & Szveda, P. (2024). Investigation of antifungal and antibacterial potential of green extracts of propolis. *Scientific Reports*, 14(1), 13613.
- Kasote, D., Bankova, V., & Viljoen, A. M. (2022). Propolis: Chemical diversity and challenges in quality control. *Phytochemistry Reviews*, 21(6), 1887-1911.
- Kara, H. H., Kıralan, M., Çalıkoğlu, E., & Bayrak, A. (2018). Ege bölgesi zeytinyağlarının fenolik bileşenleri. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 6(1), 07-15.
- Kaufmann, B., & Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical analysis. An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 13(2), 105-113.
- Kaufmann, B., Rudaz, S., Cherkaoui, S., Veuthey, J. L., & Chisten, P. (2007). Influence of plant matrix on microwave-assisted extraction process. The case of diosgenin extracted from fenugreek. *Phytochemical Analysis*, 18, 70-76.
- Kılıç, Ö. (2010). Defected ground structure and its applications to microwave devices and antenna feed networks, master of science in electrical and electronics engineering department. *Middle East Technical University*.
- Kolaylı, S., Kara, Y., & Can, Z. (2020). Comparative study of some commercial propolis extract with new prepared ethanolic propolis extract. *Bee Studies*, 12(2), 27-30.
- Kubiliene, L., Laugaliene, V., Pavilonis, A., Maruska, A., Majiene, D., Barauskaite, K., & Savickas, A. (2015). Alternative preparation of propolis extracts: Comparison of their composition and biological activities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 1-7.
- Kumazawa, S., Ahn, M. R., Fujimoto, T., & Kato, M. (2010). Radical-scavenging activity and phenolic constituents of propolis from different regions of Argentina. *Natural Product Research*, 24(9), 804-812.
- Kumova, U., Korkmaz, A., Avcı, B. C., & Ceyran, G. (2002). Önemli bir arı ürünü: Propolis. *Uludağ Arıcılık Dergisi*.
- Kurek-Górecka, A., Keskin, Ş., Bobis, O., Felitti, R., Górecki, M., Otręba, M., & Rzepecka-Stojko, A. (2022). Comparison of the antioxidant activity of propolis samples from different geographical regions. *Plants*, 11(9), 1203.
- Kutlu, N., Yeşilören, G., İşci, A., & Şakıyan, Ö. (2017). Konvansiyonel ekstraksiyona alternatif: Yeşil teknolojiler. *Gıda*, 42(5), 514-526.
- Kutluca, S., Genç, F., & Korkmaz, A. (2006). Propolis. *Samsun Tarım İl Müdürlüğü Çiftçi Eğitimi ve Yayın Şubesi*, Samsun, 57.

- Letullier, C., Manduchet, A., Dlalal, N., Hugou, M., Georgé, S., Sforcin, J. M., & Cardinault, N. (2020). Comparison of the antibacterial efficiency of propolis samples from different botanical and geographic origins with and without standardization. *Journal of Apicultural Research*, 59(1), 19-24.
- Lotfy, M. (2006). Arı propolisinin sağlık ve hastalıktaki biyolojik aktivitesi. *Asya Pac J Kanser Önceki*, 7(1), 22-31.
- Magalhães, L. M., Santos, F., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. (2010). Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta*, 83(2), 441–447.
- Marcucci, MC. (2005). Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutical activity. *Apidologie*, 26, 83-99.
- Margeretha, I., Suniarti, D. F., Herda, E. M., & Alim, Z. (2012). Optimization and comparative study of different extraction methods of biologically active components of indonesian propolis *Trigona spp.* *Doğal Ürünler Dergisi*, 5, 233- 242.
- Medina, E., De Castro, A., Romero, C., & Brenes, M. (2006). Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: Correlation with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(14), 4954-4961.
- Mello, B. C. B. S., Petrus, J. C. C., & Hubinger, M. D. (2010). Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. *Journal of Food Engineering*, 96, 533-539.
- Mirzoeva, O. K., Grishanin, R. N., & Calder, P. C. 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol. Res*, 152, 239-246.
- Moura, S.A.L., Negri, G., Salatino, A., Lima L.D.C., Dourado, L.P.A., & Mendes, J.B. (2009). Aqueous extract Brazilian propolis: Primary components, evaluation of inflammation and wound healing by using subcutaneous implanted sponges. *Evidence Based Complement Alternatative Medicine*, 18,1-9.
- Niaz, K., & Fatima, A. (2017). Screening antibacterial activity of vinegar and olive oil on enteric bacteria. *RADS Journal of Biological Research & Applied Sciences*, 8(1), 14-17.
- Nichitoi, M. M., Josceanu, A. M., Isopescu, R. D., Isopencu, G. O., Geana, E. I., Ciucure, C. T., & Lavric, V. (2023). Do ultrasonic field effects upon the polyphenolics profile of propolis extracts improve their antioxidant and antimicrobial activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 92, 106274.
- Nieva, M. M. I., Isla, M. I., Cudmani, N. G., Vattuone, M. A., & Sampietro, A. R. (1999). Screening of antibacterial activity of amaicha del valle (tucuman, argentina) propolis. *J. Ethnopharmacol*, 68, 97–102.
- Ozdal, T., Ceylan, F. D., Eroglu, N., Kaplan, M., Olgun, E. O., & Capanoglu, E. (2019). Investigation of antioxidant capacity, bioaccessibility and LC-MS/MS phenolic profile of Turkish propolis. *Food Research International*, 122, 528-536.
- Omene, C., Kalac, M., Wu, J., Marchi, E., Frenkel, K., & O'Connor, O. A. (2013). Propolis and its active component, caffeic acid phenethyl ester (CAPE), modulate breast cancer therapeutic targets via an epigenetically mediated mechanism of action. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 5(10), 334.
- Oroian, M., Dranca, F., & Ursachi, F. (2020a). Comparative evaluation of maceration, microwave and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from propolis. *Journal of Food Science and Technology*, 57, 70-78.

- Oroian, M., Ursachi, F., & Dranca, F. (2020b). Influence of ultrasonic amplitude, temperature, time and solvent concentration on bioactive compounds extraction from propolis. *Ultrasonics Sonochemistry*, 64, 105021.
- Özkök, A., Keskin, M., Tanuğur Samancı, A. E., Yorulmaz Önder, E., & Takma, Ç. (2021). Determination of antioxidant activity and phenolic compounds for basic standardization of Turkish propolis. *Applied Biological Chemistry*, 64(1), 1-10.
- Özyurt, D., Demirata, B., & Apak, R. (2007). Toplam antioksidan kapasitesinin, Ce (IV) azaltıcı kapasite ölçümüne dayalı yeni bir spektrofotometrik yöntemle belirlenmesi. *Talanta*, 71(3), 1155-1165.
- Paviani, L., Sacoda, P., Saito, E., & Cabral, F. (2011). Extraction techniques of red and green propolis: extraction yield of phenolic compounds. *Proc. 11th. Int. Congr. Eng. Food. Greece*, 22-26.
- Pawliszyn, J. (2003). Sample preparation: quo vadis? *Analytical Chemistry*, 75, 2543-2558.
- Pehlivan, T., Şahinler, N., & Gül, A. (2012). Doğal bir ürün propolis: Yapısı ve kullanım alanları. *Aricılık Araştırma Dergisi*, 4(7), 9-13.
- Popova, M., Reyes, M., Le Conte, Y., & Bankova, V. (2014). Propolis chemical composition and honeybee resistance against varroa destructor. *Natural Product Research*, 28(11), 788-794.
- Pujirahayu, N., Ritonga, H., & UslinaWaty, Z. (2014). Properties and flavonoids content in propolis of some extraction method of raw propolis. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 6, 338-340.
- Rahman, S., Talukdar, N. C., Patowary, K., & Mohanta, Y. K. (2024). Propolis from the North-East region of India exhibits potent antioxidant and anticancer activity against breast cancer cells. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 103269.
- Ristivojević, P., Trifković, J., Andrić, F., & Milojković-Opsenica, D. (2015). Poplar-Type propolis: Chemical composition, botanical origin and biological activity. *Natural Product Communications*, 10(11), 1934578X1501001117.
- Rocha, V. M., Portela, R. W., Lacerda, L. E., Sokolonski, A. R., De Souza, C. O., Dos Anjos, J. P., & Umsza-Guez, M. A. (2024). Propolis from different Brazilian stingless bee species: phenolic composition and antimicrobial activity. *Food Production, Processing and Nutrition*, 6(1), 1-14.
- Santos, H. M., & Capelo, J. L. (2007). Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. *Talanta*, 73, 795-802.
- Sastry, S.K. (2009). Ohmic heating. *Food Engineering-Volume III*, 37.
- Sforcin, J. M., Fernandes, Jr., A., Lopes, C. A. M., Bankova, V., & Funari, S. R. C. (2000). Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol*, 73, 243-249.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects: A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820-897.
- Shahinozzaman, M., Basak, B., Emran, R., Rozario, P., & Obanda, D. N. (2020). Artepillin C: A comprehensive review of its chemistry, bioavailability, and pharmacological properties. *Fitoterapia*, 147, 104775.
- Shehu, A., Ismail, S., Rohin, M. A. K., Harun, A., Aziz, A. A., & Haque., M. (2016). Antifungal properties of Malaysian Tualang honey and stingless bee propolis against Candida

- albicans and *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(2), 044-050.
- Silici, S. (2020). Bilimsel Gerçeklerle Apiterapi (1. Baskı), Ankara, Akademisyen Kitapevi.
- Silici, S., & Baysa, M. (2020). Antioxidant, antiradical and antipyretic effects of olive oil extract of propolis. *Journal of Apicultural Research*, 59(5), 883-889.
- Silici, S., & Kutluca, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *J. Ethnopharmacol.* 99, 69-73.
- Silici, S., Kaynar, L., Okan, A., & Doğanyigit, Z. (2024). Protective role of olive oil extract of propolis on short and long-term administration of tamoxifen in rats. *Environmental Toxicology*, 39(4), 2102-2122.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Sokolonski, A. R., Fonseca, M. S., Machado, B. A. S., Deegan, K. R., Araújo, R. P. C., Umsza-Guez, M. A., & Portela, R. W. (2021). Activity of antifungal drugs and Brazilian red and green propolis extracted with different methodologies against oral isolates of *Candida* spp. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21, 1-14.
- Şahin, S., Tonkaz, T., & Yarılgac, T. (2022). Chemical composition, antioxidant capacity and total phenolic content of hazelnuts grown in different countries. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19(2), 262-270.
- Şahinler, N. (2000). Arı ürünleri ve insan sağlığı açısından önemi. *MKÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 5(1-2), 139-148.
- Tadeo, J. L., Sanchez-Brunete, C., Albero, B., & Garcia-Valcarcel, A. I. (2010). Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2415-2440.
- Tomaszewski, M., Dein, M., Novy, A., Hartman, T. G., Steinhaus, M., Luckett, C. R., & Munafo Jr, J. P. (2019). Quantitation and seasonal variation of key odorants in propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(5), 1495-1503.
- Toreti, V. C., Sato, H. H., Pastore, G. M., & Park, Y. K. (2013). Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(1), 697390.
- Trusheva, B., Trunkova, D., & Bankova, V. (2007). Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*, 1, 1-4.
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 303-313.
- Waykar, B., & Alqadhi, Y. A. (2016). Beekeeping and bee products; boon for human health and wealth. *Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research*, 4(3), 20.
- Woo, K.S., Park, J.S., Mizrahi, A., & Lensky, Y. (1997). Eucalyptus propolis beverages with their composition and effects. *Bee Products Properties, Applications and Apitherapy*, 2, 125-128.
- Yücel B., Topal, E., Akçiçek, E., & Kösoğlu, M. (2014). Propolisin insan sağlığına etkileri. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 24, 41-49.

Zhang, H., Fu, Y., Niu, F., Li, Z., Ba, C., & Jin, B. (2018). Enhanced antioxidant heat-denatured zein and carboxymethyl chitosan. *Food Hydrocoll.*, 81, 104-112.



ÖZ GEÇMİŞ

 Aleyna MEVLÜTOĞULLARI. İlk orta ve lise eğitimlerini Bayburt'ta tamamladıktan sonra 2017 yılında Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümüne başladı. Lisans eğitimini 2021 yılında tamamladı. 2022 yılında Bayburt Üniversitesi Kimya Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.

