

Tuğçe ATAN

FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

2023



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ VE
TOKSİKOLOJİ
ANABİLİM DALI



PROPOLİS İLE FONKSİYONEL MADEN SUYU ÜRETİMİ

Tuğçe ATAN

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BURSA-2023





T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ
ANABİLİM DALI



PROPOLİS İLE FONKSİYONEL MADEN SUYU ÜRETİMİ

Tuğçe ATAN

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DANIŞMAN:

Prof. Dr. Hasan Hüseyin ORUÇ

BURSA-2023

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum;
“**Propolis İle Fonksiyonel Maden Suyu Üretimi**” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasınakadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Tuğçe ATAN
27/ 04/2023

TEZ KONTROL VE BEYAN FORMU

27/04/2023

Adı Soyadı: Tuğçe ATAN

Anabilim Dalı: Veteriner-Farmakoloji ve Toksikoloji

Tez Konusu: Propolis İle Fonksiyonel Maden Suyu Üretimi

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>AÇIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	■	□	
Dış Kapak Sayfası	■	□	
İç Kapak Sayfası	■	□	
Kabul Onay Sayfası	■	□	
Sayfa Düzeni	■	□	
İçindekiler Sayfası	■	□	
Yazı Karakteri	■	□	
Satır Aralıkları	■	□	
Başlıklar	■	□	
Sayfa Numaraları	■	□	
Eklerin Yerleştirilmesi	■	□	
Tabloların Yerleştirilmesi	■	□	
Kaynaklar	■	□	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Hasan Hüseyin ORUÇ

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak	
İç Kapak	
İÇİNDEKİLER	V
ÖZET	VI
İNGİLİZCE ÖZET	VII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Propolisin Tanımı.....	3
2.2. Propolisin Tarihçesi	4
2.3. Propolisin Kaynağı Olan Bitkiler.....	5
2.4. Propolisin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	6
2.5. Propoliste Bulunan Fenolik Bileşikler	8
2.6. Propolisin Hasadı	9
2.7. Propolisin Ekstraksiyon Yöntemleri	11
2.7.1. Ekstraksiyonda Kullanılan Çözücülerin Halk Sağlığı Açısından Durumu ...	13
2.8. Propolisin Analizi ve Kalitesi	14
2.9. Propolisin Kullanım Alanları	15
2.9.1. Propolisin Gıda Teknolojisinde Kullanımı	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Kimyasal Çözücüler	17
3.2. Analizi Yapılan Fenolik Bileşikler	17
3.2.1. Standartların Hazırlanması ve Metod Validasyonu	18
3.3. Analizde Kullanılan Cihaz ve Aparatlar	19
3.4. Propolis Numunesinin Özellikleri.....	19
3.5. Propolis Numunesin Ekstraksiyon Yöntemi ve Hazırlanması	19
3.6. HPLC-DAD Analizi.....	22
3.7. İstatistiki Analiz	24
4. BULGULAR	25
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	29
6. KAYNAKLAR	33
7. SİMGELER VE KISALTMALAR	37
8. TEŞEKKÜR	38
9. ÖZGEÇMİŞ	39

ÖZET

Propolis kavak, kayın, at kestanesi, huş ve kozalaklı ağaçlar gibi belirli bitkilerden arılar tarafından toplanan ve reçine içeren bir arı ürünüdür. Propolis antibakteriyel, antiviral, antifungal, yangı önleyici, antitümoral, antioksidan, bağışıklık sistemini uyarıcı, doku iyileşmesini hızlandıran ve antiülser etkilere sahiptir ve bu etkileri içerdikleri başlıca flavonoidler, fenolik asit ve esterleri gibi fenolik bileşiklere bağlıdır. Doğal bir madde olan propolis genellikle güvenlidir. Halk sağlığında faydalı etkileri nedeniyle uzun yıllardır tercih edilmektedir. Pek çok çalışmada, propolisin gıda ürünlerinde besin değerini, kalitesini ve foksiyonunu artırıcı etkisi çalışılmıştır. Propolis içeren pek çok ürün bulunmakla birlikte bu örneklerin gıda sektöründe artırılarak propolisin bu yararlı etkisinden daha fazla faydalanmak uygun olacaktır. İnsanların rahatlıkla tüketebileceği propolisli bir içecek için propolisli tentürün son kullanım aşamasında suda veya su bazlı bir içekte çözünür olması sağlanmalıdır. Bunun için de insan sağlığı açısından zararsız, ekonomik ve üretim pratikliği nedeniyle propilen glikol, gliserin, dimetilsülfoksit ve laktik asit gibi çözücüler propolisi suya göre çok daha iyi çözer ve daha sonra su ve su bazlı sıvılarla kolaylıkla karışabilirler. Bu nedenle bu tez projesiyle belirli bir kalitede su bazlı propolis kullanılarak fonksiyonel maden suyu üretilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Bursa'dan temin edilen ham propolisle ve mumu büyük oranda uzaklaştırılmış propolisin reçine kısmında propilen glikol, gliserin, laktik asit ve dimetilsülfoksitle ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyon aşamalarında ve sonucunda çözücülerin son ürünlerdeki tentürlerinde tat ve su ile karışma özellikleri, bireysel fenolik bileşikler içeriği oranları, elde edilen son ürün hacim miktarı, süzülme kolaylığı, çözücü toksisitesi ve çözücünün ekonomikliği değerlendirildi. Ham propolis ve tentürlerindeki bireysel fenolik bileşik içeriği analizi HPLC-DAD sistemi ile yapıldı. Genel olarak propolisli maden suyu için propilen glikol ve dimetilsülfoksit (ekonomik olmasa da) ile yapılan ekstraksiyonların gliserin ve laktik asitle yapılan ekstraksiyondan daha başarılı olduğu kanısına varıldı.

Anahtar sözcük: Propolis, su bazlı çözücüler, ekstraksiyon, maden suyu

İNGİLİZCE ÖZET

FONCTIONAL MINERAL WATER PRODUCTION WITH PROPOLIS

Propolis is a honey bee product contains resins that bees collect from certain plant species such as poplar, beech, horse chestnut, birch and conifer trees. The beneficial biological properties of propolis such as antibacterial, antiviral, antifungal, antiinflammatory, antitumoral, antioxidant, immunomodulatory, tissue regeneration, and antiulcerative, are mainly due to content of phenolic compounds such as flavonoids and phenolic acid and its esters. Being a natural product, propolis is generally classed as a safe product. Propolis has been preferred in public health for years due to its beneficial biological effects. Propolis use in food products for improve the nutritional value, quality and functionality of food have been investigated in many studies. However, there are many products with propolis, food products with propolis should be increase for much obtain of useful effects of propolis. The important issue is propolis tinctures should easily solve/mix in water or water based drinks to use by human rights. For this reasons, propylene glycol, glycerine, dimethylsulfoxide and lactic acid that harmless for human health, economic, practical production and can solve propolis than water, are easily mix with water and water-based liquids. The aim of the study was to produce functional mineral water with propolis. For this aim, raw propolis was purchased from Bursa, and raw and resin of the raw propolis was extracted using propylene glycol, glycerine, dimethylsulfoxide and lactic acid. Taste, properties of mixing with water, content of individual phenolic compounds, obtained final volume of propolis tincture, situation of filtration, toxicity of solvent and economize of solvents were evaluated. Individual phenolic compounds analysis in raw and resin are conducted by HPLC-DAD system. Generally, the propolis extraction with propylene glycol and dimethylsulfoxide (not economic) are very successfully than glycerine and lactic acid according to our results.

Key words: Propolis, water-based solvents, extraction, mineral water.

1. GİRİŞ

Arılardan elde edilen bal, polen, arı sütü, arı zehri ve propolis gibi birçok ürün mevcuttur. Propolis, işçi arıların bazı ağaç ve bitkilerin kabuk, yaprak, tomurcuk ve dallarındaki çatlaklardan topladığı reçinemsî maddeyi, bal mumu ve tükürük salgılarındaki kendi oluşturdukları enzimlerle (Beta-glycosidase) birleştirerek son halini verdikleri bir arı ürünüdür (Oruç, Sorucu, & Aydın, 2014). Kökeni Eski Yunanca olan propolis, “pro” ön ve “polis” şehir anlamına gelen iki kelimedenden oluşmaktadır. Ayrıca yapışkan özelliği ve kovadaki yarıkların kapatılması amacıyla kullanıldığı için arı tutkalı olarak da bilinmektedir (Bogdanov, & Bankova, 2012). Arıların, çatlak petekleri onarmak, kovan içinde aseptik bir ortam ve termal bir izolasyon oluşturmak, kovanın bakteri, mantar ve virüs gibi patojenlere karşı korumak gibi işlevler için propolisi kullandıkları bilinmektedir. Bu nedenle de topladıkları ürünlere farklı bir form kazandırarak faydalı bir ürün üretimi oluşturmuşlardır (Oruç ve ark., 2014).

Propolisin genel yapısını %50 reçine, % 30 mum, % 10 esansiyel ve aromatik yağlar, % 5 polen ve % 5 diğer organik maddeler oluşturmaktadır (Oruç ve ark., 2014). Fakat, arı ırkı, iklim, bitki kaynağı, coğrafi konum, propolis üretim yöntemi farklılıkları, toplama zamanı ve toplama şekli gibi faktörler propolisin içeriğinde bazı değişimlere neden olmaktadır (Dündar, & Kalkan, 2018). Bu değişimler propolislerin belirlenen kalite ve standarta sahip olmasını zorlaştırmakta ve bu nedenle propolis kalitesinin belirlenmesinde bazı yararlı bileşiklerin bulunması adına toplam fenolik bileşik, toplam flavonoid, toplam antioksidan kapasite ve bireysel fenolik bileşiklerin analizi gibi bazı parametreler dikkate alınmaktadır. Bu parametreler de propolis yapısında bulunması ve belirli bir düzeyin üzerinde olması istenilen bileşiklerdir. Propolis kuarsetin, kaemferol, rutin, luteolin, gallik asit, kafeik asit, kafeik asit fenetil ester (CAPE), ferulik asit, sinnamik asit, *p*-kumarik asit, pinokembrin, apigenin, naringenin, hesperidin, genkvanin ve krisin gibi birçok yararlı fenolik bileşiği içerir. Propolisteki her bir maddenin sahip olduğu faydalı etkiler bulunmaktadır. Bu faydalı etkiler antibakteriyel, antiviral, antifungal, antitümoral, antioksidan, antidiabetik, bağışıklık sistemini uyarıcı ve yara iyileştirici vb. olarak sayılabilir (Oruç ve ark., 2014).

Propolisin fiziksel yapısı soğukta sert ve kırılğan forma sahipken sıcakta yumuşak ve yapışkan forma dönüşmektedir (Oruç ve ark., 2014). Bu fiziksel yapısından kaynaklı olarak da insanlarda direkt olarak tüketime uygun değildir. Fakat yukarıda bahsedilen faydalı fenolik maddelerden faydalanmak istenildiğinde propolis uygun çözücülerle ekstrakte edilerek tüketilebilir duruma getirilmelidir. Bu ekstraksiyonda kullanılacak çözücülerin çeşidi, % miktarları ve karışımları istenilen yararlı bileşenlerin elde edilmesinde önem arz etmektedir. Propolis ekstraksiyon çalışmalarında en çok tercih edilen çözücü etanol olmakla birlikte bunun dışında su, metil alkol, metilen klorür, diklorometan, hegzan, etil asetat, aseton, zeytinyağı, β -siklodekstrin, dimetilsülfoksit, propilen glikol vb. birçok kimyasal kullanılarak da denemeler yapılmıştır (Bakkaloğlu, & Arıcı, 2019). Bu çalışmalarda da en çok etil alkolün %70 lik saf suyla oluşturduğu solüsyonlarında ekstraksiyon kalitesinin daha iyi olduğu gözlemlenmiştir. Diğer çözücüler kullanılarak hazırlanan solüsyonlarda elde edilen fenolik madde miktarları etil alkole göre daha az rapor edilmiştir. Hatta etil alkolün %70 ten daha düşük konsantrasyonlarda hazırlandığı çözeltilerde de yararlı bileşik kazanımı daha düşük bulunmuştur. Bunun nedeni, propolisin yapısında bulunan fenolik bileşiklerin nispeten polar karakterde olurken flavonoidlerin bazı gruplarının sudaki çözünürlüklerinin düşük olmasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle kullanılacak ekstraksiyon çözücüsüne oldukça önem arz etmektedir (Keskin, 2019).

Propolisin yararlı etkileri nedeniyle propolisli damla, ağız spreyleri, pastiller, diş macunu, bal, propolis ve polen karışımları, şeker ve çikolata gibi gıda içerikli ürünler bulunmaktadır. Her ne kadar propolisli ürünler mevcutsa da bu örneklerin artırılarak propolisin bu yararlı etkisinden daha fazla faydalanmak uygun olacaktır. İnsanların rahatlıkla tüketebileceği propolisli bir içecek için propolisli tentürün son kullanım aşamasında suda veya su bazlı bir içecekte çözünür olması sağlanmalıdır. Bunun için de insan sağlığı açısından zararsız, ekonomik ve üretim pratikliği nedeniyle propilen glikol, gliserin, dimetilsülfoksit ve laktik asit gibi çözücüler propolisi suya göre çok daha iyi çözer ve daha sonra su ve su bazlı sıvılarla kolaylıkla karışabilirler. Bu nedenle bu tez projesiyle belirli bir kalitede su bazlı propolis kullanılarak fonksiyonel maden suyu üretilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Propolisin Tanımı

Propolis veya bir diğerk adıyla arı tutkalı, *Apis mellifera* olarak bilinen bal arılarının çeşitli ağaç ve bitkilerden topladıkları eksudaları, tükürük salgılarındaki enzimlerle ve bal mumu ile birleştirerek zenginleştirdiği, karmaşık yapıllı, doğal ve reçineli bir arı ürünüdür (Castaldo, & Capasso, 2002). Şekil 1’de bir arının kavak tomurcuğundan reçineli kısmı topladığı görülmektedir (Bogdanov, & Bankova, 2012).



Şekil 1. Arının kavak tomurcuğundan propolis toplaması (Bogdanov, & Bankova, 2012)

Propolis toplama konusunda uzmanlaşmış olan en fazla 15 günlük işçi arılar, propolis toplamak için gün içinde havanın sıcak olduğu zaman dilimlerini tercih ederler. Bunun sebebi ise propolisin yapısının sıcakta yumuşak bir hal alarak toplanmaya daha uygun olmasıdır (Bogdanov, & Bankova, 2012). Arılar toplamış oldukları bu propolisleri kovana getirerek çeşitli amaçlar için kullanırlar. Bu amaçlar arasında kovandaki çatlak ve petekleri kaplayarak nem ve ısı dengesini korumak, çatlakları doldurmak, kovanda istenmeyen böcek ve fare gibi bir takım istilacı canlıları öldükten sonra propolis ile mumyalayarak kovanın güvenliği sağlamak (Şekil 2) ve kovana giriş ve çıkışlarında arıların basması için propolisi bir paspas gibi kullanarak kovanın dezenfeksiyonunu sağlamak vardır (Castaldo, & Capasso, 2002;

Bogdanov, & Bankova, 2012; Oruç ve ark., 2014). Tüm bu etkileri ise yapışkan bir doğasının olması ve içeriğini oluşturan önemli fenolik bileşikler dolayısıyla yapabilmektedir.



Şekil 2. Kovan içinde propolis ile kaplanmış fare (<https://www.honeybeesuite.com/mice-ate-our-bees/>) (Erişim Tarihi 19.10.2022).

2.2. Propolisin Tarihçesi

Propoliste, “pro” ön ve “polis” şehir anlamını taşır. Propolis şehrin yani kovanın korunması anlamına gelir. Sonbaharda kışa girerken arılar kovan giriş deliğini propolisle daraltarak kovanın güvenliğini sağlarlar (Bogdanov, & Bankova, 2012).

İnsanoğlunun propolisi kullanması çok eski çağlara dayanmaktadır. Eski Mısırlılar, Persler ve Romalılar’ın propolisi kullandığını gösteren kayıtlar ise bunun büyük bir kanıtıdır. Özellikle Eski Mısırlılar’ın propolis yapan arıları vazo vb. süs eşyalarına tasvir ettikleri ve birçok hastalığa karşı propolisi kullandıkları bilinmektedir (Król ve ark., 2013). Ayrıca arıların kovan içerisinde ölen fakat kovan dışına çıkartamayacakları büyüklükteki istilacı canlıları propolis kullanarak mumyaladığını öğrenen Mısırlılar, arılardan öğrendikleri bu bilgiyle kadavraları mumyalama işleminde propolis ve balmumu kullanmışlardır (Castaldo, & Capasso, 2002; Bogdanov, & Bankova, 2012; Król ve ark., 2013).

Eski Yahudiler, “Tzori” olarak bilinen propolisi ilaç olarak gördüklerini ve hastalıklarda kullandıklarını eski vasiyetnamelerinde belirtmiştir (Król ve ark., 2013). Yunan yazar ve filozof Aristoteles ise *Historia animalium* olarak bilinen

eserinde kovan girişinde koyu siyah renkli ve keskin kokulu bir yapının morluklara ve iltihaplı yaralara iyi gelmesinden bahsetmiştir ve bu maddenin propolis olduğu düşünülmektedir (Bogdanov, & Bankova, 2012; Król ve ark., 2013). Aristoteles gibi Dioscorides, Pliny ve Galen de propolisi tanımış ve tıbbi özelliklerini bilerek kullanmışlardır (Castaldo, & Capasso, 2002). Hatta Pedanios Dioscorides De materia Medica adlı eserinde propolisin öksürüğe iyi geldiğini, diken ve kıymık batmalarında kullanılabileceğini ve diğer tıbbi kullanımlarını anlatmıştır. Propolis hariçinde bal, balmumu ve ballı birtakım içkilerin ilaç olarak kullanıldığına da yer vermiştir (Król ve ark., 2013).

Tıbbın Babası Hipokrat propolisi yara ve ülserlerin tedavisinde kullanmış ve reçete etmiştir (Bankova, 2009; Król ve ark., 2013). M.S. birinci yüzyılda Cornelius Celsus da tıpkı Hipokrat gibi olgunlaşmış apselerin ve yaraların tedavisinde propolisin ilaç olarak kullanılabileceğini belirtmiştir (Król ve ark., 2013) Arapların da propolisi bildiği düşünülmektedir. Çünkü İbn Sina'nın temiz ve siyah mum olarak tanımladığı iki tür mumdan siyah olanının propolis olduğu düşünülmektedir (Bogdanov, & Bankova, 2012; Król ve ark., 2013).Yine Farsça yazılan bazı yazmalarda propolisin kas ağrılarına ve egzamaya iyi geldiğinden bahsedilmiştir (Król ve ark., 2013).

17. Yüzyıla gelindiğinde ise Londra farmakopeleri, propolisi resmi bir ilaç olarak listeye almıştır ve 17-20. yüzyıllar arasında, propolisin, antibakteriyel aktivitesi sebebiyle Avrupa'da kullanımı artmıştır (Castaldo, & Capasso, 2002).

Günümüzde ise propolis faydaları nedeniyle ön plana çıkmış, özellikle COVID-19 salgını süresince ve sonrasında bilinirliği ve kullanımı artmıştır. Bu nedenle ISO ve Türkiye dahil birçok ülkede standardizasyonu ile ilgili çalışmalar yürütülmektedir.

2.3. Propolisin Kaynağı Olan Bitkiler

Propolisin kimyasal yapısını mevsim, iklim ve bitkisel kaynak gibi faktörler etkilemektedir. İlk kez Popravko, propolisin bitkisel kökeninin onun kimyasal yapısına olan etkisini incelemek istemiş ve propolisin flavonoid bileşimini analiz ederek kavak ve huş ağaçlarının tomurcuklarıyla karşılaştırma yapmıştır. Bu araştırma sonunda ise Avrupa, Kuzey Amerika ve Asya gibi ılıman bölgelerde kavak

(*Populus spp.*) türü ağaçların eksudalarının propolis ana kaynağı olduğunu ispatlamıştır (Bankova ve ark., 2000; Bogdanov ve Bankova, 2012). Ilıman bölgelerde, kavak dışında propolis kaynağı olan ağaçlar arasında akça ağaç (*Acer L.*), kızılbaş (*Alnus miller*), fındık (*Corylus L.*), meşe (*Quercus L.*), erik (*Prunus L.*), karaağaç (*Ulmus L.*), söğüt (*Salix L.*), at kestanesi (*Aesculus hippocastanum L.*), çam (*Pinus L.*), okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis Dehnh.*), kestane (*Castaneasativa miller*), ıhlamur (*Tilia L.*) ve dişbudak (*Fraxinus L.*) yer almaktadır (Marucci, 1995; Bankova ve ark., 2000).

Malta'da propolis selvi kaynaklı olduğu dikkat çekerken Rusya gibi kuzey kesimlerde propolis kaynağını huş tomurcukları oluşturmaktadır. Çin'de kavak ağaçlarının yanında çam, selvi ve söğüt ağaçları da propolis kaynağı oluşturmaktadır. Türkiye'de ise propolis ana kaynağı olarak kavak ağacı ile birlikte arılar çam ağacı ve okaliptüs gibi kaynaklardan da propolis toplamaktadır (Bogdanov, & Bankova, 2012). Brezilya gibi tropikal iklim bölgelerinde kavak ve huş ağacı bulunmaması sebebiyle arılar propolis genellikle kırmızı propolis kaynağı (*Dalbergia ecastophyllum*) ve yeşil propolis kaynağı (*Baccharis dracunculifolia*) gibi bitkilerden toplamaktadır (Marucci, 1995; Bankova, 2005). Fakat arılar, propolis kaynağı bulamadığı veya kaynağın uzakta kaldığı durumlarda çevre bölgelerden bitkilerdeki reçineli maddeler ve eksudalar yerine asfalt, cam macunu, boya ve mineral yağları toplayarak propolis kaynağı olarak kullanabilmektedir. Bu gibi maddelerin bulunduğu propolislerin ise tüketimi sağlık açısından ciddi risk oluşturabileceği söylenmektedir (Bankova ve ark., 2000).

2.4. Propolis Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Propolis rengi, bitki kaynağına ve reçinenin özelliğine bağlı olarak sarımsı yeşil, kırmızı, koyu kahverengi ve siyaha yakın birçok değişik renkte olabilir (Şekil 3) ve kendine has hoş bir aromatik kokusu vardır (Wagh, 2013; Oruç ve ark., 2014). Propolis doğası gereği 25°C ile 45°C arasında yumuşak, esnek ve yapışkan bir forma sahipken dondurulduğunda sert ve kırılabilir bir hal alır. 45°C üzerinde ise giderek daha yapışkan olmaya başlar ve son olarak 60°C ile 70°C arasında sıvı hale gelir. Fakat bazı propolis örnekleri 100°C'de erimektedir (Wagh, 2013).



Şekil 3. Farklı renk ve görünümdeki propolis örnekleri (Oruç ve ark., 2014).

Propolis karmaşık bir karışım özelliği taşır fakat genel olarak ham propolis yaklaşık %50 reçine, %30 mum, %10 uçucu yağlar, %5 polen ve %5 çeşitli organik bileşiklerden oluşur. Bu kimyasal yapısı coğrafi bölge, iklim, arı türü, yükseklik gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişebilir (Wagh, 2013; Oruç ve ark., 2014; Oruç ve ark., 2017; Sorucu ve Oruç, 2019).

Propolisin yapısında bulunan bileşenlerin ayrılması ve tanımlanması için farklı birçok analitik yöntem kullanılmıştır ve yaklaşık 300'ten fazla bileşik elde edilmiştir. Bu bileşikler ise; fenolik bileşikler (flavonoidler ve fenolik asitler), benzoik asit ve türevleri, sinamik asit ve türevleri, monoterenler, diterpenler, triterpenler ve sesquiterpenler, diğer fenolik asit ve türevleri, alkoller, ketonlar, heteroaromatik bileşikler, alifatik hidrokarbonlar, mineraller, steroid hidrokarbonlar ve aminoasitlerdir. Propoliste lipid olarak en fazla yağ asitleri bulunur fakat ek olarak steroller, hidrokarbonlar ve uzun zincirli alkoller gibi maddeler de bulunmaktadır. Ayrıca stearik, palmitik, nervolik, ekosapentanoik, araşidonik, oleik, linoleik ve linolenik asit propolisin yapısında bulunur. Propolisin içerisinde şeker olarak ise glukoz, sukroz, ksiloz, galaktoz, maltoz, 10 ramnoz, furuktoz, ksilitol, taloz ve ribofuranoz bulunmaktadır (Sorucu, 2015). Propolisin içerisinde Na, K, Mg, Ca, Ba, Sr, Zn, Cd, Al, Si, Sn, Pb, Fe, Ni, Cr, Mn, Ti, Ag, Cu, Co, Mo mineralleri ve B1, B2, B6, C ve E vitaminleri bulunur (Sorucu, 2015; Walker ve Crane, 1987). Ayrıca

propoliste süksinik dehidrogenaz, glukoz-6-fosfataz, adenozin trifosfataz ve asit fosfataz gibi enzimler de tespit edilmiştir. Son olarak, propolis lipofilik karaktere sahip olması sebebiyle etanol, metanol, kloroform, aseton, diklorometan, eter, dimetil sülfoksit (DMSO) ve gliserin (gliserol) gibi organik çözücülerde yüksek oranda çözünürken suda ise daha düşük oranda çözünür (Sorucu, 2015).

2.5. Propoliste Bulunan Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, propolisin kimyasal yapısını oluşturan ve propolise çok çeşitli biyolojik etkinlik kazandıran en önemli bileşenlerdir. Bu biyolojik etkinlikleri ise fenolik bileşikler içinde yer alan flavanoidler ve fenolik asitler sayesinde gerçekleştirirler (Oruç ve ark., 2014). Fenolik bileşikler temel olarak polifenoller ve basit fenoller olarak ikiye ayrılmaktadır. Basit fenoller ise fenolik asitler (hidroksisüksinamik asitler ve hidroksibenzoik asitler) ve kumarinler olarak iki gruba ayrılır. Polifenoller ise tanenler (hidrolizlenebilen gallik asit türevleri ve hidrolizlenmeyen epikateşin polimerleri), stilbenler, lignanlar ve flavanoidlerden oluşmaktadır. Flavanoidler de flavonoller, flavononlar, flavonlar, flavanololler, flavan-3-ol'lar, flavanon-3-ol'lar, isoflavonlar ve kalkon gibi alt gruplara ayrılmaktadır (Nyandwi, 2017; Oruç ve ark., 2014). Propolisin biyolojik etkilerini oluşturan maddelerden galangin, kuersetin, metil kuersetin, kuersetin glikozit, rutin, mirisetin, kaempferol ve türevleri flavonoller ve glikozitler grubunda yer alırken naringenin, naringin, pinokembrin, hesperidin, soforaflavanone G ve türevleri flavononlar grubunda yer almaktadır. Yine bu biyolojik maddelerden ponsiretin, apigenin, genkvanin, krisin (chrysin), luteolin, luteolin 7-glikosid flavonlar grubunda; flavan-3-ol'lerden epigallokateşin flavanoller grubunda; kumarik asit, p-kumarik asitler, kafeik asit, kafeik asit fenil ester (CAPE) ve ferulik asit süksinamik asit ve türevleri grubunda; gallik asit benzoik asit ve türevleri (hidroksibenzoik asit) grubunda ve son olarak labdane, diterpenler, esansiyel yağlar ve kalkonlar terpenoidler grubunda yer almaktadır (Oruç ve ark., 2014).

2.6. Propolisin Hasadı

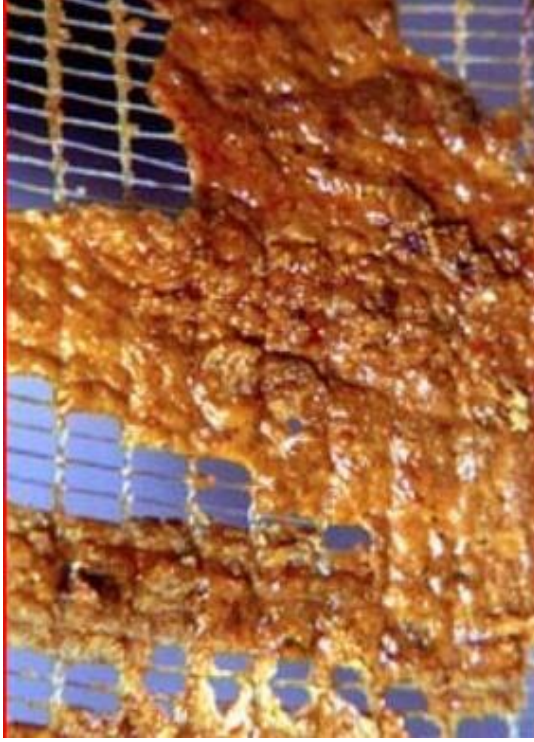
Arılar kovan içerisinde propolisi dip tahtasına, kovan girişinde bulunan uçuş deliği arkasına veya örtü tahtalarının arasına biriktirmektedir. Fakat dip tahtası ve uçuş deliği arkasında biriken propolisler içerisine atık maddeler ve mum karışabileceğinden dolayı en doğru ve tercih edilen yöntem kovanın üst tarafına propolis tuzağı yerleştirilmesidir (Kutluca, Genç, & Korkmaz, 2006; Oruç ve ark., 2014). Propolis tuzakları, Şekil 4’te gösterildiği gibi bölmeler ya da kovandaki çatlaklara benzeyen delikler içeren levhalardır. Genç işçi arılar, bu delikleri propolis ile doldururlar ve dolan kısımlar alınarak propolis toplama işlemi tamamlanır (Kutluca, Genç, & Korkmaz, 2006).



Şekil 4. Plastik ızgaralı örtü tahtası biçimindeki propolis tuzağı (Kutluca, Genç, & Korkmaz, 2006).

Propolis üretimi için plastik, naylon veya metalden hazırlanmış üzerinde arının geçemeyeceği delikler bulunan ve örtü tahtası yerine koyulan iç kapaklar da (Şekil 5) kullanılmaktadır. Özellikle Macaristan’da yaygın olarak kullanılan bu yöntemde kovanın üst kısmına yerleştirilen iç kapakların delikleri propolis ile dolunca alınır ve derin dondurucuya yerleştirilir. Böylelikle soğukta sert ve kırılğan

bir forma dönüşen propolis hafifçe yapılan bir bükme hamlesi ile kolayca ayrılır (Kutluca, Genç, & Korkmaz, 2006).



Şekil 5. Üzerinde arının geçemeyeceği delikler bulunan (3mm) ve bu delikleri propolis ile dolu olan iç kapak.

Bell Board Yöntemi ile Langstroth tipi ahşap kovanlarda, kovanın ön yüzünden 7,5 cm genişlikte ve kovan gövdesi uzunluğunda bir tahta çıkarılarak oluşan boşluğa üzerinde 0,46 cm genişliğinde 8 yarık açılmış bir tahta koyulur ve bu yarıklar propolis ile doldurularak toplama yapılabilir (Kutluca, 2003).

Propolis toplamak için geliştirilmiş tuzaklar dışında kovanda bulunan propolisi kazıyarak da toplamak mümkündür. Bunun için kovan kapakları birkaç gün birkaç milimetre yükseltilir ve oluşan aralıkları arılar propolis ile doldurur. Birikmiş propolisler ise en son kazınarak toplanır (Kutluca, Genç, & Korkmaz, 2006; Oruç ve ark., 2014). Propolis olgunlaşınca hasat edilmelidir. Olgunlaşmış propolis ise parlak bir renge sahiptir. Propolisin toplanması için sonbahar ve kış ayları tercih edilmelidir çünkü sıcaklıkta propolis yumuşak ve yapışkan hal alarak toplanması güçleşir (Kutluca, Genç, & Korkmaz, 2006).

2.7. Propolisin Ekstraksiyon Yöntemleri

Ekstraksiyon, bir hammaddenin belirli çözücüler yardımıyla içeriğindeki biyoaktif maddelerin elde edilmesi veya istenmeyen maddelerin uzaklaştırılması yöntemleri olarak açıklanabilir, bir diğer adıda özütlemedir.

Ekstraksiyon yöntemleri elde edilmek istenilen aktif maddeye göre değişkenlik göstermektedir. Bu değişkenliği oluşturan noktalardan bir diğeri de aktif maddenin bileşik yapılarındaki çekim kuvvetleridir. Ekstraksiyon işleminde mümkün olduğunca hedef maddenin çözücü fazına geçmesi sağlanmalıdır ve bu durum için uygun polaritede çözücü seçilmelidir. Benzer benzeri çözer prensibi göz önüne alınarak ekstraksiyon çözücülerinin seçilmesi, sonuçların daha verimli olmasını sağlayabilir (Angın, & Ertaş, 2021).

Çevre tahribatı her geçen gün artmaktadır ve hayatımızda çevreyi koruyucu uygulamalara geçiş artırılmalıdır. Yeşil teknoloji kavramı önem kazanmaktadır. Bu nedenle, tehlikeli maddelerin üretiminin ve tüketiminin azaltılması, enerji tasarrufu sağlanması ve yenilenebilir kaynakların kullanımının artırılması hedeflanmaktadır. Gıda, kimya ve ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılan geleneksel çözücüler yerine, sağlığa zararı olmayan ve çevreci yüksek ekstraksiyon verimine sahip çözücülerin kullanımı önerilmektedir. Yeşil çözücüler, toksik olmayan, geri dönüşümü mümkün olabilen, uçucu olmayan ve sentezi için yüksek maliyet gerektirmeyen çözücülerdir. Su, iyonik sıvılar veya süperkritik akışkanlar en çok kullanılan yeşil çözücülerdendir. Son yıllarda bu çözücülerin yanı sıra, derin ötektik çözücüler bu alanda kendine yer bulmuştur. Derin ötektik çözücülerin fiziksel özellikleri iyonik sıvılara benzer olsa da, kimyasal özellikleri farklıdır. Son yıllarda, derin ötektik çözücüler, gıda materyallerinden biyoaktif bileşiklerin (fenolik bileşik, antosiyanin vb.) ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır (Kantar ve ark., 2021).

Derin ötektik çözücüler, yapılarını oluşturan bileşikler baz alındığında 4 kategori altında toplanmaktadır. Bir kuarterner amonyum tuzu ve bir metal klorür (kategori 1), bir kuarterner amonyum tuzu ve bir metal klorür hidrat (kategori 2), bir kuarterner amonyum tuzu ve bir hidrojen bağı donörü (HBD) (kategori 3), son olarak da bir hidrojen bağı donörü ve bir metal klorürden (kategori 4) oluşabilmektedir.

Hızlı ve kolay hazırlanabilmesi, su ile reaktivlik göstermemesinden dolayı, derin ötektik çözücü oluştururken en çok kategori 3 kullanılmaktadır. En çok kullanılan derin ötektik çözücü türü ise, hidrojen bağı donörü olarak işlev gören amin, alkol, asit ve şeker gibi farklı kimyasal fonksiyonel gruplarla karıştırılan, hidrojen bağı alıcısı (HBA) kolin klorürden (ChCl) oluşmaktadır. Kolin klorür dışında kolin asetat, kolin bromür, kolin florür, kolin nitrat ve asetilkolin klorür diğer ötektik çözücülerdendir. Kolin klorür hem kuaterner amonyum tuzu hem de alkol içeren iki işlevli organik bir bileşiktir. Suda çözünebilen ve B grubu vitaminler sınıfında tanımlanan kolin, ayrıca göreceli olarak düşük maliyetlidir (Smith, Abbott, & Ryder, 2014; Kantar ve ark., 2021).

Ekstraksiyon kalitesini ve hızını çözücü farklılıklarının yanında, çözücü konsantrasyonları, hammaddenin yapısı, sıcaklık, karıştırma gibi yardımcı diğer proses uygulamaları da etkilemektedir. Proses farklılıklarının ekstraksiyondaki bioaktif madde üzerindeki etkilerine örnek vermek gerekirse; değişken güç ve frekanslarda ultrasonik destekli ekstraksiyon adına yapmış olduğu çalışmalar verilebilir. Bu çalışmalarda, düşük frekanslı dalga boyu ve yüksek frekanslı dalga boyunun uygulanması sonrasında biyoaktif madde miktarlarında belirgin farklılıklar ortaya çıkmaktadır (Ketenoglu, 2019).

Propolis antibakteriyel, antiviral, antitümoral, antidiabetik, bağışıklık sistemini uyarıcı ve yara iyileştirici gibi pek çok etkilere sahiptir. Bu etkileri ve propolisin kalitesini başlıca propolisin nitel ve nicel olarak içerdiği fenolik maddelere (flavonoidler, fenolik asitler ve esterleri gibi) bağlıdır.

Propolis sıvı olarak başlıca üç farklı ana grup çözücü ile çözdürülmekte ve tüketilmektedir. Bunlar:

1. Alkol bazlı (etil alkol ile veya etil alkol su karışımı),
2. Suda çözünür (su, propilen glikol, gliserin, laktik asit ve dimetil sülfoksit gibi),
3. Yağ bazlı (zeytinyağı gibi).

Günümüzde propolisin ticari ürünleri arasında iyi çözünmesi nedeniyle alkol bazlı ürünler ile tad ve dini hassasiyetler nedeniyle suda çözünür ürünlerin kullanımı ön plana çıkmaktadır. Bu ekstraksiyonlarda ham propolisin uygun dondurma, öğütme, belirli çözücü ve oranlarda çözdürülmesi, karıştırma, ekstraksiyon

işlemlerinin uygun sıcaklık ve sürelerde yapılması, süzülmesi ve kullanıma hazır şişelere alınması ve uygun ortamlarda saklanması gerekir.

2.7.1. Ekstraksiyonda Kullanılan Çözümlerin Halk Sağlığı Açısından Durumu

Ekstraksiyon sıvılarının seçimlerinde biyoyararlık üzerine bir çok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar elde edilmesi planlanan maddenin yapısına göre de geliştirilmeye çalışılmış ve endüstride ilaç sanayi, kozmetik, gıda endüstrisi gibi çok farklı alanlarda kullanımı görülmektedir. Gıda sanayinde direk tüketilen ürünler olmasa da taşıyıcı olarak gıda katkı maddeleri olarak kullanılabilir.

Gıda endüstrisinde mevzuatçada izin verilen, alkol bazlı ekstraksiyon çözümleri arasında sayılan, hızlı ve iyi kalitede ekstraksiyon eldesi gerçekleştirilebilen çözümlerinden biri etil alkoldür. Etil alkol ile propolis ekstraksiyonu yapılan bir çok çalışma mevcuttur. Çünkü etil alkol polar ve nonpolar bileşikleri çözmek için iyi bir çözümlüdür ve bu nedenle propolis ekstraksiyonunda en fazla tercih edilen çözümlerden biridir. Bitkisel alkol olarakta bilinen alkol türü, vücutta metabolize olabilen tek alkol türüdür; %90'ı karaciğerde metabolize olur ve %5-8 solunum, idrar ve ter ile vücuttan atılır (Khalily, 2019). Fakat dini hassasiyetler nedeniyle bu çözümlü için farklı alternatif çalışmaları yapılmıştır. Aynı süreçte suda çözünmeyen bileşikleri de çözeceği için çalışmaların yüzeyinde çözünmeyen maddelerde bulunabilecektir.

11/6/2010 tarihli ve 5996 sayılı Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu'nun 21, 22, 24, 26, 28, 30 ve 43 üncü maddelerine dayanılarak ve 2002/46/EC sayılı Avrupa Parlamentosu ve Konsey Direktifi doğrultusunda hazırlanmış olan Takviye Edici Gıdalar Yönetmeliğinde "Propolis içeren takviye edici gıdalarda çözümlü olarak su, etil alkol, bitkisel yağ, propilen glikol, gliserol (gliserin), poligliserol esterleri, laktik asit kullanılabilir. Bunların dışındaki çözümlü Bakanlık tarafından değerlendirilir" şeklinde propolis ekstraksiyonunda kullanılacak çözümlü belirlenmiştir (Takviye Edici Gıdalar Yönetmeliği Taslağı, 2022).

Propilen glikol, Avrupa Birliği Regülasyonu (EC 1333/2008) ve 30/06/2013 tarihli ve 28693 sayılı Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği'nde,

propilen glikol E 1520 numarası ile tanımlanan bir gıda katkı maddesidir ve son üründe 1000mg/kg(L)'a kadar bulunmasına izin verilmektedir. Ancak, propilen glikol gıdalarda doğrudan kullanmak yerine daha çok gıdaya eklenen renklendiriciler, emülgatörler, antioksidanlar, aroma vericiler ve enzim preparatları gibi diğer katkı maddelerinde taşıyıcı olarak kullanılmaktadır (Türk Gıda Kodeksi, 2013a).

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (The European Food Safety Authority, EFSA), gıda katkısı olarak kullanımında gliserinin (gliserol) güvenli bir madde olduğunu belirtmekte ve günlük alım dozu (Acceptable Daily Intake, ADI) belirlemeye gerek görmemektedir (EFSA ANS Panel, 2017).

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi, gıda katkısı olarak kullanımında laktik asitin güvenli bir madde olduğunu belirtmektedir (EFSA CEP Panel, 2022).

2.8. Propolisin Analizi ve Kalitesi

Propolis içeriğinin belirlenmesi amacıyla propolisin çeşitli çözücülerde hazırlanan ekstraksiyonlarının nicel, yarı nicel ve nitel olmak üzere farklı şekillerde analizleri yapılmıştır (Monero, Isla, Sampietro, & Vattuone, 2000; Sorucu, 2015). Bu analizler içerisinde propolisin nitel analizi, Folin-Ciocalteu ayıracağı ile total fenolik düzeyi belirlenirken, nicel analizde ise yüksek performanslı sıvı kromatografisi-diyot array dedektör (HPLC-DAD-UV), ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi-diyot array dedektör (RP HPLC-DAD-UV), sıvı kromatografi kütle spektrometresi (LC-MS), sıvı kromatografi kütle/kütle spektrometresi (LC-MS/MS), yüksek performanslı sıvı kromatografisi elektrosprey iyonizasyon/kütle spektrometresi (HPLC-ESI/MS), yüksek performanslı sıvı kromatografisi-elektrosprey iyonizasyon-kütle/kütle spektrometresi (HPLC-ESI-MS/MS) ve nükleer manyetik rezonans spektrometresi (NMR) gibi kromatografi yöntemleri kullanılmaktadır. Propolisin yarı nicel analizinde ise ince tabaka kromatografisi (TLC) ile içeriğindeki bileşiklerin tespiti ve gaz kromatografisi kütle spektrometresi (GC-MS) ve gaz kromatografisi kütle/kütle spektrometresi GC-MS/MS sistemleri ile içeriğinde bulunan bileşiklerin farklı MS kütüphanelerinde taranarak tespiti yapılmakta ve yaklaşık yüzde değerleri verilmektedir (Rodriguez-Delgado, Malovana, Perez, Borges, & Montelongo, 2001; Campo Fernandez ve ark., 2008; Sorucu, 2015).

2.9. Propolisin Kullanım Alanları

Propolis, olumlu birçok etkisi sebebiyle çok geniş kullanım alanına sahip olan ve gün geçtikçe önemi ve değeri giderek artan bir arı ürünüdür (Kumova, Korkmaz, Avcı, & Ceyran, 2002). Medikal önemi büyük olan propolisin başlıca kullanım alanları arasında sağlık sektörü yer almaktadır. Özellikle kardiyovasküler sistem hastalıkları ve solunum yolları enfeksiyonlarını gidermek, bakteriyel ve fungal hastalıkları tedavi etmek, grip ve uçuk gibi viral enfeksiyonlara karşı mücadele etmek ve yanık yaralarını iyileştirmek amacıyla kullanılmaktadır (Kumova ve ark., 2002; Doğan, & Hayoğlu, 2012). Sahip olduğu antitümöral etkisi sebebiyle akciğer kanserine karşı ve antiromamatizmal etkisi sebebiyle de romatizmal hastalıklara karşı kullanılmıştır (Kumova ve ark., 2002). Ayrıca, evcil hayvanların ayak ve deri problemlerinin giderilmesinde, ineklerde endometritis ve tavuklarda tavuk tifosu hastalığına çözüm olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Doğan, & Hayoğlu, 2012). Propolis, halsizlik ve yorgunluk gidermek ve bağışıklık sistemini güçlendirerek hastalıklara karşı direnci arttırmak amacıyla kullanımı mevcuttur. Propolisin içeriğindeki esansiyel yağ asitleri dolayısıyla lokal anestezi olarak kullanıldığı da bilinmektedir. Son olarak, propolisin tüm bu etkileri göz önüne alınarak propolis kullanılarak hazırlanan ürünler mevcuttur. Propolis tableti ve kapsülleri, propolisli diş macunu ve ağız spreyi, propolis alkol eriyiği, propolis özü, propolis ve bal karışımı, propolis ve çay ağacı merhemi, propolis sabunu, propolis tozu ve jeli, propolis ekstraktı, propolis konsantre özü ve sıvılaştırılmış saf propolis bu ürünlerden bazılarıdır (Kumova ve ark., 2002).

Hücre yenileme ve onarma özelliğine sahip olan propolisin bir diğer geniş kullanım alanı ise kozmetik sektördür. Bakterisit ve fungusit özellikleri sayesinde bu alanda kullanımı ön plana çıkmaktadır. Propolis bitki ekstraktları, E vitamini ve arı sütü ile birlikte cildi besleyen ve temizleyen ürünlerin kozmetik alanında kullanıldığı bildirilmiştir. Yine aynı amaçla hazırlanan ve satışa sunulan propolis içerikli kremler, losyonlar, şampuanlar, yüz maskeleri, burun spreyleri ve diş macunları bulunmaktadır (Erdem, 2002; Kumova ve ark., 2002; Doğan, & Hayoğlu, 2012).

Propolis farklı olarak ahşap cilalamak amacıyla mobilya sanayinde, çimlenme önleyici etkisi sebebiyle yumru bitkilerin saklanması ve yem katkı maddesi

olarak hayvan beslemede kullanımı da bildirilmiştir (Kumova ve ark., 2002; Seven, Aksu, & Tatlı Seven, 2007).

2.9.1. Propolisin Gıda Teknolojisinde Kullanımı

Propolis, sahip olduğu antibakteriyel, antifungal ve antioksidan özellikleri sayesinde birçok alanda olduğu gibi gıda teknolojisi alanında da kullanımı bulunmaktadır. Doğası gereği yapışkan ve reçinemsî forma sahip olan propolis, etanol, metanol ve eter gibi çözücülerle ekstraksiyonu yapılarak kullanımı sağlanmaktadır (Atik, & Gümüş, 2017).

Gıda teknoloji alanında gıdanın bozulmasını önleyerek uzun süre muhafaza etmek amacıyla işlem görmemiş tavuk etlerine propolis uygulanarak bakteriyel gelişim önlenmiştir. Aynı amaçla et ürünleri ve sığır etlerinden yapılan köfteler propolis ile muamele edilip saklandığında ürünlerin muhafaza sürelerinin uzun olduğu tespit edilmiştir (Atik, & Gümüş, 2017). Süt ürünlerinde koruyucu olarak propolis kullanımının da mümkün olduğu peynir ve yoğurt gibi süt ürünlerine eklenen propolisin bakteri gelişimi ve küf oluşumunu inhibe ettiği görülmektedir (Aly, & Elewa, 2007; Atik, & Gümüş, 2017). Bir başka çalışmada ise pastörize meyve sularında istenmeyen bazı değişiklikler oluşturan 6 maya türüne karşı propolis kullanılarak propolisin mayalara üzerindeki etkisi incelenmiş ve mayalara karşı da etkisi olduğu görülmüştür (Koç, Silici, Mutlu, & Sağdıç, 2007). Gıda kaynaklı patojenlerden *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* patojenlerine karşı propolisin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, patojenlerin tamamına karşı önemli bir etki gösterdiği tespit edilmiştir (Nedji, & Loucif-Ayad, 2014). Gıda toksikasyonuna neden olan mikotoksinlerden *Aspergillus versicolor* ve *Penicillium aurantiogriseum* etkenlerine karşı %1, %5 ve %10 konsantrasyonda hazırlanan propolis ekstraktlarının etkisi incelenmiş ve %10 konsantrasyonla hazırlanan ekstraktın her iki etkene de %100 etki gösterdiği bildirilmiştir (Temiz, Mumcu, Tüylü, Sorkun, & Salih, 2013).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Çözücüler

HPLC kalitesinde metanol ve asetonitril, analiz kalitesinde formik asit (%98-100), analiz kalitesinde etanol (Merck®, Darmstadt, Germany) ve HPLC kalitesinde distile su (ELGA® LabWater, Purelabflex, Buckinghamshire, UK) kullanıldı. 1,2-Monopropilen glikol (Extra Pure, Farma Kalite, %99,5, CAS No: 579-55-6, Tekkim, Bursa, Türkiye), gliserin (Food Grade/Vegetable, %87, CAS No: 56-81-5, Zag Kimya, İstanbul, Türkiye), dimetil sülfoksit (ACS Kalite, %99,9, CAS No: 67-68-5, Tekkim, Bursa, Türkiye) ve laktik asit (Extra Pure, Gıda Kalite, %80-85, CAS No: 79-33-4, Tekkim, Bursa, Türkiye) kullanıldı.

3.2. Analizi Yapılan Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşiklerin standartları ve özellikleri aşağıdaki gibidir:

1. Gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid). Molekül ağırlığı: 170,12, CAS no: 149-91-47, Sigma, G7384, %≥97,5.
2. (-)-Epigallocatechin gallate ((-)-cis-2-(3,4,5-Trihydroxyphenyl)-3,4-dihydro1(2H)-benzopyran-3,5,7-triol 3-gallate, (-)-cis-3,3',4',5,5',7-Hexahydroxyflavane-3-gallate, EGCG, Teavigo). Molekül ağırlığı: 458,37; CAS Number: 989-51-5, Santa-cruz, sc-200802, %≥98.
3. Caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid, trans-3,4-dihydroxycinnamic acid). Molekül ağırlığı: 180,16, CAS no: 331-39-5, Sigma-Aldrich, C0625, %≥98.
4. *p*-Coumaric acid (*trans*-4-hydroxycinnamic acid, hydroxycinnamic acid, naringeninic acid). Molekül ağırlığı: 164,16; CAS Number: 501-98-4; Sigma, C9008, %≥98.
5. *trans*-Ferulic acid (3-hydroxy-4-methoxycinnamic acid, caffeicacid 3-methyl ether, conifericacid). Molekül ağırlığı: 194,18, CAS no: 537-98-4, Fluka, 52229, %99.
6. *trans*-Isoferulic acid (trans-3-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl) acrylicacid, trans-3-Hydroxy-4-methoxycinnamic acid). Molekül ağırlığı: 194,1; CAS Number: 25522-33-2; Fluka, 05407, %≥98.

7. 3,4-Dimethoxycinnamic acid (Caffeic acid dimethylether). Molekül ağırlığı: 208,21, CAS no: 2316-26-9, Santa Cruz Biotechnology.
8. Quercetin hydrate (3 3' 4' 5 7-pentahydroxyflavone). Molekül ağırlığı: 302,24, CAS no: 849061-97-8, Sigma-Aldrich, 337951, %≥95.
9. *trans*-Cinnamic acid (trans-3-phenylacrylic acid, trans-cinnamate, trans-3-phenylacrylate). Molekül ağırlığı: 148,16, CAS no: 140-10-3, Sigma-Aldrich, C80857, %≥99.
10. (±)-Naringenin (4',5,7-trihydroxyflavanone). Molekül ağırlığı: 272,25, CAS no: 67604-48-2, Fluka, 52186, %≥95.
11. Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone, naringenin-chalcone). Molekül ağırlığı: 270,24, CAS no 520-36-5, Fluka, 42251, %≥95.
12. Kaempferol (3,4',5,7-tetrahydroxyflavone). Molekül ağırlığı: 286,24, CAS no: 520-18-3, Fluka, 96353, % ≥99.
13. Chrysin (5,7-Dihydroxyflavone). Molekül ağırlığı: 254,24; CAS Number: 480-40-0, Aldrich, C80105, % 97.
14. Pinocembrin (S-5,7-dihydroxyflavanone, dihydrochrysin, galanginflavanone). Molekül ağırlığı: 256,25, CAS no: 480-39-7, Fluka, P5239, %≥95.
15. Galangin (3.5.7-trihydroxyflavone). Molekül ağırlığı: 270,24, CAS no: 548-83-4, Sigma-Aldrich, %95, 282200.
16. Caffeic acid phenetly ester (CAPE) (2-phenylethyl caffeate). Molekül ağırlığı: 284,31, CAS no: 104594-70-9, Sigma-Aldrich, C8221, %≥97.
17. *trans*-Chalcone (Benzylideneacetophenone). Molekül ağırlığı: 208,26, CAS no: 614-47-1, Santa Cruz Biotechnology, ≥97%.

3.2.1. Standartların Hazırlanması ve Metod Validasyonu

Fenolik bileşiklerin stok çözeltileri 1 mg/ml olacak şekilde metanolde hazırlandı. Fenolik bileşiklerin standartlarının HPLC sistemine tek tek ve miks enjeksiyonları yapılarak ana pikler, geliş zamanları ve spektrumları tespit edildi. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için stok çözeltiler metanol ile dilüe edilerek 3, 6, 12, 24 ve 48 µg/ml konsantrasyonlarda 5 farklı ara çözelti hazırlandı. Kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayıları (R^2), fenolik bileşiğe bağlı olarak 0.967 ile 0.999 aralığında bulundu. Fenolik bileşiklerin kuantifikasyon limitlerinin (LOQ) 2.46 ile

7.56 µg/ml arasında ve deteksiyon limitlerinin (LOD) 0.82 ile 3.36 µg/ml değerleri arasında olduğu tespit edildi.

3.3. Analizde Kullanılan Cihaz ve Aparatlar

Analizde, HPLC-DAD (Shimadzu Corporation, LC-20 AD/SPD-M20A, Tokyo, Japan), distile su cihazı (ELGA® LabWater, Purelabflex, Buckinghamshire, UK), öğütücü (Lavion® 500g, China), karıştırıcı (ES-20/60 Orbital Shaker-Incubator, Latvia), Vortex® (V1 Plus, Boeco, Germany), ultrasonik banyo (Bandelin® Sonorex RK100, Berlin, Germany), hassas terazi (Acculab, Vic-123 Sartorius Group, North Carolina, USA) kullanıldı. Sisteme bağlı bilgisayar (HP Compaq dx 2200, Windows® XP profesyonel) ve yazıcı (HP LaserJet, P1102) kullanıldı.

3.4. Propolis Numunesinin Özellikleri

Propolis numunesi, Türkiye'nin farklı illerinden (Sivas, Samsun, Zonguldak ve Bursa gibi) temin edilmiş, karıştırılmış ve üretime hazır hale getirilmiş bir şekilde 5 kg olarak Bursa'dan satın alındı ve -20°C'de analiz ve ekstraksiyon aşamalarına kadar saklandı. Propolis numunesinin rengi yeşil kahverengi tonlara sahiptir.

3.5. Propolis Numunesin Ekstraksiyon Yöntemi ve Hazırlanması

Propolis ekstraksiyonunda ve HPLC analizinde Oruç, Çaycı, Sorucu, Uzabacı, & Nyandwi (2021) bildirdiği yöntemle yapıldı. Ham propolis numuneleri -20°C'de en az 24 saat donduruldu, sonrasında ham propolisler (30-50 g) küçük parçalara bölündü ve paslanmaz çelik baharat değirmeni (Lavion, 500g öğütücü) ile öğütülerek toz haline getirildi. Her bir propolis numunesinin ekstraksiyonu 1:6 oranında yapıldı. Bu ekstraksiyon için 10 g propolis 500 ml'lik erlenmayer içerisine alındı ve üzerine 60 ml propilen glikol, gliserin, dimetilsülfoksit ve laktik asit (propilen glikol, gliserin ve dimetilsülfoksit saf ve %75'lik olarak, laktik asit %80 ve %60'lık olarak) ilave edildi. Karışım 15 dakika ultrasonik banyoda tutuldu; daha sonra Şekil 6'da görüldüğü gibi kapalı karıştırıcıda (SL Shel Lab, Shaking Incubator) 60 °C'de, 3 saat karıştırıldı ve sonra tekrar 15 dakika ultrasonik

banyoda karıştırıldı. Karıştırıldıktan sonra, önce adi süzgeç kağıdı ve sonra Watman süzgeç kağıdından (Watman® No: 1, Buckinghamshire, UK) süzülerek propolis içerisinde bulunan yabancı cisimler uzaklaştırıldı (Şekil 7). Elde edilen filtratlar (Şekil 8-10) HPLC analizi için polivinil diflorür (PVDF) şırınga filtresinden (Millipore Millex-HV, 0.45 µm) geçirilerek 1,5 ml'lik viallere alındı ve otosampler ile 5 µl HPLC-DAD sistemine enjeksiyonu yapıldı. Propolis numunelerinin ekstraksiyon işlemi ve HPLC-DAD analizleri, Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirildi.



Şekil 6. Propolislerin ekstraksiyon aşamasında kullanılan karıştırma sistemi.



Şekil 7. Propolislerin ekstraksiyon aşamasında filtrasyon işlemleri.



Şekil 8. Propolislerin DMSO ve PG filtratlarının bir kısmı.



Şekil 9. Propolislerin DMSO ve PG filtratlarının bir kısmı.



Şekil 10. Propolislerin DMSO ve PG filtratlarının bir kısmı.

3.6. HPLC-DAD Analizi

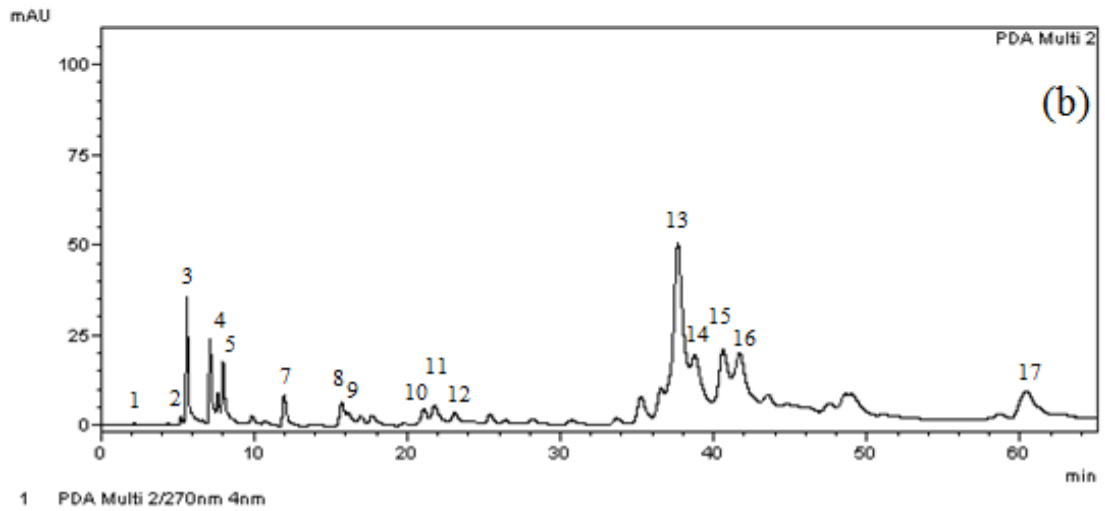
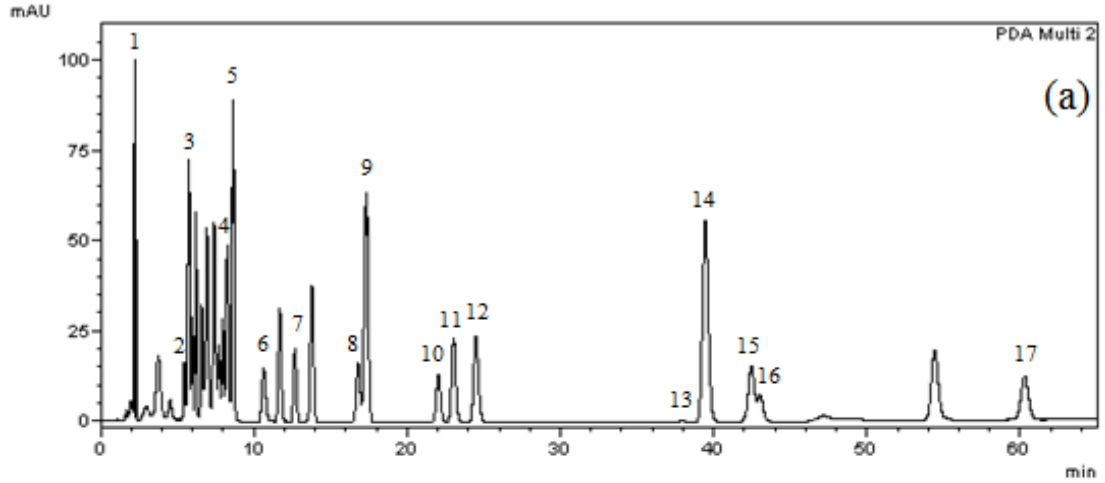
Propolis numunelerinde fenolik bileşiklerin analizi yapılan HPLC sistemi, sıvı kromatografi (LC-20AD), diode array detektör (SPD-M20A), otosampler

(SIL20AC, 20 MPa max. pressure), degaser (DGU-20A5) ve kolon fırını (CTO-10ASVP) bölümlerinden oluşmaktadır (Şekil 11). Analizler Oruç ve ark. (2021) kullandığı metoda göre yapıldı. Kromatografik sistem, 1 ml/dk akış hızında bir Inertsil® ODS-3 (5µm, 4.6x150mm, Tokyo, Japan) kolon kullanıldı. Taşıyıcı solvent olarak mobil faz A (% 0,1 formik asit ve deiyonize su, v/v) ve mobil faz B (asetonitril) kullanıldı. Analiz 30°C kolon ısısında, 5 µl örnek enjeksiyonu ile ve 270 nm dalga boyunda ve gradient sistemle yapıldı.



Şekil 11. Propolislerde fenolik bileşiklerin analizlerinin yapıldığı HPLC sistemi.

Propolislerde fenolik bileşikler bakımından kalite kontrol için bireysel fenolik bileşiklerden flavonoidler grubunda yer alan kuarsetin, apigenin, kaemferol, naringenin, krisin, pinokembrin ve galanginin; fenolik asit ve esterleri grubunda yer alan gallik asit, kafeik asit, kumarik asit, trans-ferulik asit, iso-ferulik asit, dimetoksisinnamik asit, sinnamik asit ve kafeik asit fenetil ester analizleri yapıldı. Propoliste analizi yapılan fenolik bileşiklerin standartlarının kromatogramı ve çalışmada kullanılan propolisin analiz kromatogramı Şekil 12’da sunulmuştur.



Şekil 12. a. Fenolik bileşiklerin standart kromatogramı. b. Çalışmada kullanılan propolis numunesinin kromatogramı.

1: Gallik asit; 2: Epigallokateşin galler; 3: Kafeik asit; 4: Ferulik asit; 5: İsoferulik asit; 6: Metilsiringat; 7: 3,4-Dimetoksinamik asit; 8: Kuersetin; 9: Sinamik asit; 10: Naringenin; 11: Apigenin; 12: Kaemferol; 13: Krisin; 14: Pinokembrin; 15: Galangin; 16: Kafeik asit fenetil ester; 17: Kalkon.

3.7. İstatistiksel Analiz

Çalışma sonuçları farklı çözücülerle, çözücülerin farklı yüzdelik oranlarıyla, farklı sıcaklık, mumlu ve mumsuz propolisle çalışmak gibi pek çok parametre içermektedir. Ancak her parametrenin bireysel numune sayısı az olduğu için sonuçların istatistiksel olarak değerlendirmeye uygun olmadığı görüldü.

4. BULGULAR

Propolisin propilen glikol, gliserin, dimetilsülfoksit ve laktik asit (propilen glikol, gliserin ve dimetilsülfoksit saf ve %75'lik olarak, laktik asit %80 ve %60'lık olarak) ile aynı parti ham propolisin mumlu ve reçineli olarak yapılan ekstraksiyonlarının analizinde elde edilen bireysel fenolik bileşik sonuçları Tablo 1, 2, 3 ve 4'de sunulmuştur. Farklı çözücülerle ekstraksiyon sonucu elde edilen filtrat miktarları Tablo 5'de, elde edilen filtratların sade, meyveli ve meyve aromalı maden sularıyla karıştırılması ve tad kontrol çalışmaları Şekil 13'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Dimetilsülfoksit (DMSO) ile ilgili bireysel fenolik bileşik miktarları ($\mu\text{g/ml}$).

Fenolik bileşikler	DMSO %100 Mumlu 40°C	DMSO %100 Mumlu 60°C	DMSO %100 Reçine 40°C	DMSO %100 Reçine 60°C	DMSO %75 Mumlu 40°C	DMSO %75 Mumlu 60°C	DMSO %75 Reçine 40°C	DMSO %75 Reçine 60°C
GAL	36,71	20,96	61,02	50,33	72,2	111,19	67,39	90,71
EGKG	43,71	86,43	105,78	99	119,55	248,82	147,27	246,36
KA	775,32	709,26	886,05	995,7	824,76	887,91	992,79	1028,1
KU	350,52	357,39	406,59	470,43	373,89	427,53	442,53	484,83
FR	96,39	74,31	93,48	125,37	87,96	112,53	106,5	1348,2
İFR	724,32	768,99	881,82	991,92	773,25	884,52	933,84	987,09
DMCA	779,46	815,31	954,45	995,16	779,88	903,48	974,91	1030,74
QE	221,82	203,19	260,19	252,42	238,47	276,48	279,96	312,39
SA	143,1	141,93	146,7	162,33	147,6	169,47	157,26	175,95
NR	792,99	725,43	797,82	941,7	715,62	834,36	918,27	983,97
AP	237,9	238,38	281,49	310,71	255,27	292,53	307,44	334,02
KF	9,0	10,68	9,57	20,97	14,94	23,28	27,45	20,7
KR	1348,5	1360,8	1604,31	1725,63	1400,7	1560,48	1638,63	1803,18
PN	1732,5	1694,19	1948,35	1990,71	1795,86	1952,4	1981,14	2029,71
GL	1774,89	1877,34	2012,4	2155,86	1927,47	2205,78	2105,28	2206,08
CAPE	3507,24	3474,27	4144,02	3791,49	3848,46	3827,22	4427,94	3785,64
KL	1239,49	1276,95	1431,24	1452,09	1235,46	1412,73	133,67	1476,78

GAL": Galik asit, "EGKG": Epigallokateşin gallat, "KA": Kafeik asit, "KU": *p*-Kumarik asit, "FR": *trans*-Ferulik asit, "İFR": *trans*-İsoferulik asit, "DMCA": 3,4-Dimetoksisinamik asit, "QE": Kuersetin, "SA": *trans*-Sinamik asit, "NR": Naringenin, "AP": Apigenin, "KF": Kaemferol, "KR": Krisin, "PN": Pinokembrin, "GL": Galangin, "CAPE": Kafeik asit fenetil ester, "KL": *trans*-Kalkon.

Tablo 2. Propilen glikol (PG) ile ilgili bireysel fenolik bileşik miktarları (µg/ml).

Fenolik bileşikler	PG %100 Mumlu 40°C	PG %100 Mumlu 60°C	PG %100 Reçine 40°C	PG %100 Reçine 60°C	PG %75 Mumlu 40°C	PG %75 Mumlu 60°C	PG %75 Reçine 40°C	PG %75 Reçine 60°C
GAL	20,32	19,85	17,73	20,2	20,83	58,77	24,36	28,08
EGKG	107,07	142,98	162,9	136,05	109,71	160,77	159,12	168,93
KA	721,23	757,23	859,77	909,42	679,98	833,52	928,44	985,56
KU	338,91	377,04	410,76	417,96	317,25	396,36	429,06	445,35
FR	85,35	76,86	101,46	112,68	79,62	100,95	113,22	117,06
İFR	717,84	743,64	851,19	887,61	658,08	816,3	927,57	938,46
DMCA	750,09	753,21	889,44	909,27	668,88	842,13	928,26	958,86
QE	238,23	236,73	290,91	295,92	210,48	260,82	303,21	307,5
SA	139,92	135,69	145,11	156	121,38	150,84	157,47	163,59
NR	846,96	903,66	1030,08	1080,45	805,2	994,32	1110,12	1117,11
AP	223,98	244,41	307,5	300,33	220,77	288,99	305,46	310,83
KF	22,53	25,23	32,67	32,94	21,54	36,27	30,09	29,64
KR	1303,98	1331,46	1542,69	1554,99	1104,45	1388,7	1545,54	1639,59
PN	1517,31	1452,15	1719,54	1749,3	1282,53	1673,13	1725,3	1809,12
GL	1457,55	1552,74	1780,8	1703,58	1257,63	1716,16	1834,11	1942,8
CAPE	3967,41	4004,28	3975,18	5042,22	3396,21	4571,25	4675,11	4728,42
KL	972,87	1065,19	1262,21	127,75	690,27	921,7	1174,23	1143,06

GAL”: Galik asit, “EGKG”: Epigallokateşin gallas, “KA”: Kafeik asit, “KU”: *p*-Kumarik asit, “FR”: *trans*-Ferulik asit, “İFR”: *trans*-İsoferulik asit, “DMCA”: 3,4-Dimetoksisinamik asit, “QE”: Kuersetin, “SA”: *trans*-Sinamik asit, “NR”: Naringenin, “AP”: Apigenin, “KF”: Kaemferol, “KR”: Krisin, “PN”: Pinokembrin, “GL”: Galangin, “CAPE”: Kafeik asit fenetil ester, “KL”: *trans*-Kalkon.

Tablo 3. Gliserin ile ilgili bireysel fenolik bileşik miktarları (µg/ml).

Fenolik bileşikler	Gliserin %100 Mumlu 40°C	Gliserin %100 Mumlu 60°C	Gliserin %100 Reçine 40°C	Gliserin %100 Reçine 60°C	Gliserin %75 Mumlu 40°C	Gliserin %75 Mumlu 60°C	Gliserin %75 Reçine 40°C	Gliserin %75 Reçine 60°C
GAL	9,79	10,56	27,05	10,17	15,51	12,67	19,56	60,28
EGKG	37,2	37,23	50,28	78,87	85,29	83,01	122,97	140,7
KA	439,35	366,33	554,79	672,66	515,22	424,02	804,72	990
KU	228,57	182,13	263,67	310,05	226,38	198,63	332,52	399,63
FR	48,42	39,03	55,59	70,56	51,87	42,18	71,52	75,54
İFR	433,11	350,82	552,48	603,3	390,84	362,19	579,39	719,07
DMCA	369,15	305,73	392,22	489,84	246,27	281,28	309,42	443,94
QE	105,39	84,09	126,24	166,05	72,09	88,02	92,64	129,21
SA	81,6	63,96	79,05	95,28	59,16	65,61	69,3	86,49
NR	442,8	352,95	511,74	660,15	278,01	333,24	387,93	499,86
AP	119,91	92,46	144,84	179,82	79,8	84,6	114,24	142,38
KF	11,58	8,31	14,04	17,43	5,52	7,62	6,87	11,19
KR	378,33	493,95	384,09	535,71	108,33	215,13	127,38	200,55
PN	630,36	549,6	618,48	761,91	202,5	357,84	227,58	378,42
GL	653,49	549,66	664,77	743,61	193,68	308,04	210,36	354,21
CAPE	1484,94	1314,24	1430,22	1897,35	411,69	764,79	451,98	786,6
KL	82,68	81,36	73,26	88,1	16,47	30,6	22,53	42,18

GAL”: Galik asit, “EGKG”: Epigallokateşin gallas, “KA”: Kafeik asit, “KU”: *p*-Kumarik asit, “FR”: *trans*-Ferulik asit, “İFR”: *trans*-İsoferulik asit, “DMCA”: 3,4-Dimetoksisinamik asit, “QE”: Kuersetin, “SA”: *trans*-Sinamik asit, “NR”: Naringenin, “AP”: Apigenin, “KF”: Kaemferol, “KR”: Krisin, “PN”: Pinokembrin, “GL”: Galangin, “CAPE”: Kafeik asit fenetil ester, “KL”: *trans*-Kalkon.

Tablo 4. Laktik asit (LA) ile ilgili bireysel fenolik bileşik miktarları (µg/ml).

Fenolik bileşikler	LA %80	LA %80	LA %80	LA %80	LA %60	LA %60	LA %60	LA %60
	Mumlu 40°C	Mumlu 60°C	Reçine 40°C	Reçine 60°C	Mumlu 40°C	Mumlu 60°C	Reçine 40°C	Reçine 60°C
GAL	32,52	71,23	56,9	40,73	56,9	30,97	67,88	54,65
EGKG	215,52	193,86	198,09	245,46	161,55	21,63	220,47	246,6
KA	857,64	1419,36	1031,52	15,3	1039,16	149,85	1019,55	1621,98
KU	358,5	396,06	418,92	18,12	358,17	420,6	403,17	481,56
FR	83,22	98,01	94,38	824,22	84,69	53,46	96,39	53,28
İFR	732,9	837,84	883,17	43,11	691,47	84,93	796,23	98,58
DMCA	738,18	791,58	863,85	12,24	593,22	800,31	705,03	934,74
QE	220,98	215,76	258,12	117,39	159,06	146,04	210,93	256,71
SA	128,58	131,88	139,02	77,01	103,74	63,39	109,2	145,05
NR	828,81	937,08	981	1175,37	645,75	923,61	704,85	1063,74
AP	216,57	243	264,99	279,18	156,75	213,45	179,31	258,88
KF	21,63	31,05	26,37	32,82	14,85	22,74	17,88	25,32
KR	1276,65	1163,46	1078,74	1689,36	502,29	1172,1	515,46	1340,31
PN	1243,56	1281,96	1356,84	1571,52	681,42	1154,82	742,02	1311,66
GL	1230,39	1269,27	1343,22	1583,37	556,77	1073,94	669,15	1207,5
CAPE	3417,66	3446,43	3814,29	4320,96	1656,48	3117,6	2043,93	3580,71
KL	841,75	1063,35	871,64	1334,37	231,75	711,11	248,73	813,24

GAL”: Galik asit, “EGKG”: Epigallokateşin gallat, “KA”: Kafeik asit, “KU”: *p*-Kumarik asit, “FR”: *trans*-Ferulik asit, “İFR”: *trans*-İsoferulik asit, “DMCA”: 3,4-Dimetoksisinamik asit, “QE”: Kuersetin, “SA”: *trans*-Sinamik asit, “NR”: Naringenin, “AP”: Apigenin, “KF”: Kaemferol, “KR”: Krisin, “PN”: Pinokembrin, “GL”: Galangin, “CAPE”: Kafeik asit fenetil ester, “KL”: *trans*-Kalkon.

Tablo 5. Filtrasyon sonrası çözücülere göre elde edilen filtrat hacimleri (ml).

	DMSO %100	DMSO %100	DMSO %100	DMSO %100	DMSO %75	DMSO %75	DMSO %75	DMSO %75
	Mumlu 40°C	Mumlu 60°C	Reçine 40°C	Reçine 60°C	Mumlu 40°C	Mumlu 60°C	Reçine 40°C	Reçine 60°C
Hacim	43ml	45ml	40 ml	35	45ml	40ml	43ml	38ml
	PG %100	PG %100	PG %100	PG %100	PG %75	PG %75	PG %75	PG %75
	Mumlu 40°C	Mumlu 60°C	Reçine 40°C	Reçine 60°C	Mumlu 40°C	Mumlu 60°C	Reçine 40°C	Reçine 60°C
Hacim	41ml	55ml	60ml	36ml	47ml	55ml	61ml	50ml
	Gliserin %100	Gliserin %100	Gliserin %100	Gliserin %100	Gliserin %75	Gliserin %75	Gliserin %75	Gliserin %75
	Mumlu 40°C	Mumlu 60°C	Reçine 40°C	Reçine 60°C	Mumlu 40°C	Mumlu 60°C	Reçine 40°C	Reçine 60°C
Hacim	29ml	7ml	38ml	10ml	18ml	8ml	40ml	11ml
	LA %80	LA %80	LA %80	LA %80	LA %60	LA %60	LA %60	LA %60
	Mumlu 40°C	Mumlu 60°C	Reçine 40°C	Reçine 60°C	Mumlu 40°C	Mumlu 60°C	Reçine 40°C	Reçine 60°C
Hacim	40ml	9ml	43ml	7ml	50ml	19ml	33ml	20ml



Şekil 13. Elde edilen filtratların sade, meyveli ve meyve aromalı maden sularıyla karıştırılması ve tadlarının kontrol edilmesi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Propolisli bir içecek alkol bazlı veya su bazlı olarak hazırlanabilir. Ancak her yaştan herkesin rahatlıkla iebilmesi, fazla içilmesi durumunda etil alkolden kaynaklanabilecek toksisite riskinin olmaması, dini hassasiyetler ve piyasadeki propolisin karıştırılabileceği içeceklerin su bazlı olması nedeniyle suda çözüner bir propolisli ieeğin üretilmesi daha uygun olacaktır. Bu nedenle propilen glikol, gliserin, dimetilsülfoksit ve laktik asitle çalışmaya karar verildi. Alkole alternatif olarak çevreyle daha dost ve daha az maliyetli çözümlerin kullanımı tüm ekstraksiyonlarda ön plana çıkmaktadır ve propolis için de bu durum geçerlidir. Bu çözümler Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) olarak adlandırılmaktadır. Bu solventler maksimum çözünme ve çözme yeteneği olan karışımlar olarak adlandırılabilir ve propolis ekstraksiyonu için de çalışmalar devam etmektedir (Funari ve ark., 2019; Ivanović, Islamčević Razboršek, & Kolar, 2020; Trusheva ve ark., 2019). Bu solventlerin bazıları sitrik asit – 1,2-propanediol 1:4 (CAPD) (Trusheva ve ark., 2019), kolin klorür: propilen glikol 1:1 (mol/mol) ve 10% w/w sulu l-lisin (Funari ve ark., 2019) gibi karışımlardır. Bu çalışmada kullanılan çözümlerin mümkün olduğunca gıda sektöründe kullanılabilir, suyla kolayca karışabilir ve propolisin iyi çözümlenebileceği çözümler olmasına dikkat edildi.

Bireysel fenolik bileşikler bakımından değerlendirdiğimizde (Tablo 1), %100 Dimetilsülfoksit (DMSO) ile mumlu ve reçine ekstraksiyonlarında propolislerde sıcaklık farkının (mumlu ve reçine kendi içinde) genellikle pek önemli olmazken %75 DMSO ile mumlu ve reçine ekstraksiyonlarında propolislerde sıcaklık farkının genellikle kendi içlerinde önemli olduğu ve sıcaklık arttıka fenolik bileşiklerin miktarlarının arttığı görölmektedir. Bu sonuçlar %100 DMSO ile ham ve reçineli propolis ekstraksiyonlarında sıcaklık artışı pek fazla etkili olamazken %75 DMSO ile ham ve reçineli propolis ekstraksiyonlarında sıcaklık artışının olumlu yönde etkili olabildiğini göstermektedir. %100 DMSO ile mumlu 40°C ve 60°C ekstraksiyon sonuçlarının aynı şartlardaki reçine ekstraksiyon sonuçlarından düşük olduğu görölmektedir (Tablo 1). Bu sonuçların elde edilmesini normal kabul etmek gerekir, çünkü mum oranı çıktığı için ve fenolik bileşikler mumda bulunmadığı için belirtilen sıcaklıklardaki reçineli ekstraksiyonlarda fenolik madde miktarları yüksek olacaktır. Süzölme aşamasının kolay olduğu ve son ürün miktarlarının genel olarak yüksek

olduğu tespit edildi (Tablo 5). Sonuç olarak DMSO ile ham propolis ve reçine ekstraksiyonunda %75'liğinin kullanılmasının daha uygun olacağı ve sıcaklık arttıkça (40°C'den 60°C'ye) fenolik madde içeriğinin de yükseldiği görülmektedir. Süzülme işleminin kolay olduğu, elde edilen toplam ürün miktarının fazla olduğu, fenolik madde içeriğinin yüksek olduğu ve tadının da kabul edilebilir olduğu tespit edildi. Reçine kısmının tadının daha az acı olduğu farkedildi. Suyu ve meyve suyu ile karışımının homojen olduğu görüldü (Şekil 13). Türk Gıda Kodeksi, Gıda Maddelerinin ve Gıda Bileşenlerinin Üretiminde Kullanılan Ekstraksiyon Çözücülerini Tebliği'nde (Türk Gıda Kodeksi, 2013b) yer verilmemesi ve Avrupa Sağlık Ajansının yayınlamış olduğu klavuzda (European Commission Guideline, 2022) gıda ürünleri içeriğinde çözücü olarak kullanımına izin verilmemesi nedeniyle bu aşamada DMSO'nun çözücü olarak kullanılması uygun görülmemektedir.

Propilen glikol ile ekstraksiyonu bireysel fenolik bileşikler bakımından değerlendirdiğimizde (Tablo 2), %100 propilen glikol ile mumlu ve reçine ekstraksiyonlarında propolislerde sıcaklık farkının (mumlu ve reçine kendi içinde) genellikle pek önemli olmazken %75 propilen glikol ile mumlu propolislerde sıcaklık farkının genellikle önemli olduğu ve sıcaklık arttıkça fenolik bileşiklerin miktarlarının arttığı görülmekle birlikte reçine ekstraksiyonunda sıcaklık artışının çok önemli olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar %100 propilen glikol ile ham ve reçineli propolis ekstraksiyonlarında sıcaklık artışı pek fazla etkili olamazken özellikle %75 propilen glikol ile ham (mumlu) propolis ekstraksiyonlarında sıcaklık artışının olumlu yönde etkili olabildiğini göstermektedir. %100 propilen glikol ile mumlu 40°C ve 60°C ekstraksiyon sonuçlarının aynı şartlardaki reçine ekstraksiyon sonuçlarından az da olsa düşük olduğu görülmektedir (Tablo 1). Bu durumun DMSO sonuçları ile benzerlik gösterdiği ve normal olarak kabul etmek gerekir, çünkü mum oranı çıktığı için ve fenolik bileşikler mumda bulunmadığı için bu beklenen normal bir sonuç olarak yorumlanabilir. %75 propilen glikol ile mumlu 40°C ve 60°C ekstraksiyon sonuçlarından 40°C'deki sonuçların 60°C'deki mumlu ekstraksiyon ve aynı şartlardaki reçine ekstraksiyon sonuçlarından düşük olduğu görülmektedir. Süzülme aşamasının kolay olduğu ve son ürün miktarlarının genel olarak DMSO gibi yüksek olduğu tespit edildi ve elde edilen son ürünlerin (filtrat) miktarının DMSO'dan elde edilen miktarlardan daha yüksek olduğu görüldü (Tablo 5). Sonuç

olarak propilen glikol ile ham propolis ve reçine ekstraksiyonunda %75'liğinin kullanılmasının daha uygun olacağı ve sıcaklık arttıkça (40°C'den 60°C'ye) fenolik madde içeriğinin de yükseldiği görülmektedir. Süzülme işleminin kolaylığı, elde edilen toplam ürün miktarının fazla olması, fenolik madde içeriğinin yüksekliği ve tadının da kabul edilebilir olduğu kanısında varıldı. Reçine kısmının tadının daha az acı olduğu saptandı. Suyla ve meyve suyu ile karışımının homojen olduğu tespit edildi (Şekil 13).

Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği Ek listesinde, propilen glikolün kullanım miktarları sınırlandırılmıştır (E 1520) ve etikette bildirilmesi zorunlu kılınmıştır. İçeceklerde -kremalı likörler dışında-tüm kaynaklardan gelen propilen glikol için maksimum miktar 1000 mg/L olması gerekmektedir. Bu sınırlandırmalar dikkate alınarak günlük kullanım miktarları ayarlanmalıdır (Türk Gıda Kodeksi, 2013a).

Gliserin ile ekstraksiyonu bireysel fenolik bileşikler bakımından değerlendirdiğimizde (Tablo 3), %100 gliserin ile mumlu ekstraksiyonlar arasında sıcaklık çok önemli değilken reçine ekstraksiyonlarında propolislerde sıcaklık farkının genellikle önemli olduğu ve sıcaklık arttıkça fenolik madde miktarlarının arttığı görülmektedir. %75 gliserin ile mumlu propolislerde sıcaklık farkı çok önemli değilken reçinede 60°C ekstraksiyonda 40°C'de ekstraksiyona göre fenolik bileşiklerin miktarlarının arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar %100 gliserin ile ham propolis ekstraksiyonlarında sıcaklık artışı pek fazla etkili değilken reçinede etkili olduğunu; %75 gliserin ile ham propolis (mumlu) ekstraksiyonunda yine fazla etkili değilken reçineli propolis ekstraksiyonlarında sıcaklık artışının olumlu yönde etkili olabildiğini göstermektedir. %100 gliserin ile mumlu 40°C ve 60°C ekstraksiyon sonuçlarının aynı şartlardaki reçine ekstraksiyon sonuçlarından düşük olduğu görülmektedir (Tablo 3). Bu sonuçlar da DMSO ve propilen glikolde elde edilen benzer sonuçlar gibi normaldir. Çünkü mum oranı çıktığı için ve fenolik bileşikler mumda bulunmadığı için bu beklenen normal bir sonuç olarak yorumlanabilir. %75 gliserin ile mumlu 40°C ve 60°C ekstraksiyon sonuçlarından 40°C'deki sonuçların 60°C'deki mumlu ekstraksiyon sonuçlarının aynı şartlardaki reçine ekstraksiyon sonuçlarından düşük olduğu görülmektedir. Süzülme aşamasının zor olduğu ve son ürün miktarlarının genel olarak DMSO ve propilen glikole göre düşük olduğu tespit

edildi (Tablo 5). Sonuç olarak gliserin ile ham propolis ve reçine ekstraksiyonunda %100'lüğünün kullanılmasının daha uygun olacağı ve sıcaklık arttıkça (40°C'den 60°C'ye) reçinede fenolik madde içeriğinin de yükseldiği görülmektedir. Süzülme işleminin DMSO ve propilen glikol kadar kolay olmadığı, elde edilen toplam ürün miktarının DMSO ve propilen glikol kadar olmadığı, fenolik madde içeriğinin yüksekliği ve tadının da kabul edilebilir olduğu kanısında varıldı. Reçine kısmının tadının daha az acı olduğu tespit edildi. Suyla ve meyve suyu ile karışımının homojen olduğu görüldü.

Laktik asit ile ekstraksiyonu bireysel fenolik bileşikler bakımından değerlendirdiğimizde (Tablo 4), %80 laktik asit ile mumlu 40°C, 60°C ekstraksiyon sonuçları ve reçine 40°C ekstraksiyon sonuçları ile reçine 60°C ekstraksiyon sonuçları arasında farklar olduğu ve reçine 60°C ekstraksiyon sonuçlarının özellikle kafeik asit, kumarik asit, dimetoksisinnamik asit ve sinamik asit miktarlarının belirgin olarak düşük olduğu görüldü. Benzer istikrarsız sonuçlar %60 laktik asit ekstraksiyonunda da görüldü. Gruplar ve sonuçlarının değeri arasında istikrarsız sonuçlar fazla olduğundan sağlıklı bir değerlendirme yapmak mümkün olmamıştır. Sıcaklık artışının olumlu yönde etkilediği, %60'luk reçinedeki ekstraksiyonların mumlu olanlardan daha iyi sonuç verdiği görülmektedir. Süzülme aşamasında laktik asit propolis karışımının koyulaştığı, süzülmenin çok zor olduğu ve son ürün miktarlarının genel olarak gliserin gibi düşük olduğu tespit edildi. Tadının da acımtırak ve alımının zor olduğu ancak suyla dilüe ederek içiminin kolay olduğu görüldü. Suyla ve meyve suyu ile karışımının homojen olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak propilen glikol, dimetilsülfoksit ve gliserinle propolisin ham ve reçine kısmının ekstraksiyonunun pratik, fenolik madde içeriği yüksek olduğu, genel olarak reçine kısmında bu miktarların daha da yükseldiği, sıcaklık artışının (40°C'den 60°C'ye) fenolik madde miktarını artırdığı ve tadlarının daha iyi olduğu tespit edildi. DMSO nun gıda sektöründe kullanımına izin verilmemesine rağmen propilen glikolün gıda sektöründe yaygın kullanılması, fazla ürün elde edilmesi ve birim litre başına fiyatının daha ekonomik olması nedeniyle propolisin glikolle suda çözünür propolis üretiminin uygun olabileceği kanısına varıldı. Fakat bu çalışmalarında daha detaylı olarak yapılması da laktik asitte olduğu gibi bazı durumların daha net ortaya konmasını sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Aly, S.A., & Elewa, N.A. (2007). The effect of Egyptian honeybee propolis on the growth of *Aspergillus versicolor* and sterigmatocystin biosynthesis in Ras cheese. *Journal of Dairy Research*, 74(1), 74-48. DOI: 10.1017/S002202990600207X
- Angın, N. & Ertaş, M. (2021). Farklı çözücü türlerinin ekstraksiyon reçinesinin verimi ve kimyasal özellikleri üzerine etkisi. *Turkish Journal of Forestry*, 22 (4) , 439-443 . DOI: 10.18182/tjf.960674
- Atik, A., & Gümüş, T. (2017). Propolisin Gıda Endüstrisinde Kullanım Olanakları. *Akademik Gıda* 15(1), 60-65. DOI: 10.24323/akademik-gida.306066
- Bakkaloğlu, Z., & Arıcı, M. (2019). Farklı Çözücülerle Propolis Ekstraksiyonunun Toplam Fenolik İçeriği, Antioksidan Kapasite ve Antimikrobiyal Aktivite Üzerine Etkileri. *Akademik Gıda*, 17 (4), 538-545 . DOI: 10.24323/akademik-gida.667272
- Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 114-117. DOI: 10.1016/j.jep.2005.05.004
- Bankova, V. (2009). Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. *Journal of Api Product and Api Medical Science*, 1, 23-28. DOI 10.3896/IBRA.4.01.2.01
- Bankova, V.S., De Castro, S.L., & Marucci, M.C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31, 3-16. DOI: 10.1051/apido:2000102
- Bogdanov, S., & Bankova, V. (2012). Propolis: Origine, Production, Composition. *Bee Product Science*, 1, 1-15.
- Campo Fernandez, M., Cuesta-Rubio, O., Rosado Perez, A.S., Montes De Oca Porto, R., Marquez Hernandez, I., Piccinelli, A.L., & Rastrelli, L. (2008). GC-MS determination of isoflavonoids in seven red Cuban propolis samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9927-9932. DOI: 10.1021/jf801870f
- Castaldo, S., & Capasso, F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73, 1-6. DOI: 10.1016/s0367-326x(02)00185-5
- Doğan, N., & Hayoğlu, İ. (2012). Propolis ve Kullanım Alanları. *HR. Ü.Z.F. Dergisi*, 16(3): 39-48. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/harranziraat/issue/18440/194111>
- Dündar, E., & Kalkan Yıldırım, H. (2018). Propolisin Çeşitliliğine Etki Eden Faktörler. *Arıcılık Araştırma Dergisi*, 10 (2) , 61-66.
- EFSA ANS Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food), Mortensen, A., Aguilar, F., Crebelli, R., Di Domenico, A., Dusemund, B., Frutos, M.J., ... Lambré, C. (2017). Scientific opinion on the re-evaluation of glycerol (E 422) as a food additive. *EFSA Journal*, 15(3):4720, 64 pp. DOI: 10.2903/j.efsa.2017.4720
- EFSA CEP Panel (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids), Lambré, C., Barat Baviera, J.M., Bolognesi, C., Chesson, A., Cocconcelli, P.S., Crebelli, R., ... Mortensen, A., (2022). Scientific Opinion on the evaluation of the safety and efficacy of lactic acid to reduce microbiological surface contamination on carcasses from kangaroos, wild pigs,

- goats and sheep. *EFSA Journal*, 20(5):7265, 31 pp. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7265>
- European Commission Guideline (2022). Annex to the European Commission guideline on 'Excipients in the labelling and package leaflet of medicinal products for human use' (SANTE-2017-11668) Excipients and information for the package leaflet. EMA/CHMP/302620/2017 Rev.2. Annex to the European Commission guideline on 'Excipients in the labelling and package leaflet of medicinal products for human use' | European Medicines Agency (europa.eu)
- Erdem, G.B. (2002). Propolisin Diş Çürüklüğü Oluşumuna Etkisinin Sıçan Dişlerinde Araştırılması. *Teknik Arıcılık*, 77, 27-28 Erişim: T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Merkez Kütüphanesi
- Funari, C.S., Sutton, A.T., Carneiro, R.L., Fraige, K., Cavalheiro, A.J., Bolzani, V., Hilder, E.F., & Arrua, R.D. (2019). Natural deep eutectic solvents and aqueous solutions as an alternative extraction media for propolis. *Food Research International*, 125. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.108559
- Ivanović, M., Islamčević Razboršek, M., & Kolar, M. (2020). Innovative Extraction Techniques Using Deep Eutectic Solvents and Analytical Methods for the Isolation and Characterization of Natural Bioactive Compounds from Plant Material. *Plants*, 9, 1428. <https://doi.org/10.3390/plants9111428>
- Kantar, N.K., Yılmaz, M.S., Yakan, A.İ., & Demirkol, Ö.Ş. (2021). Gıdalardan biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda derin ötektik çözücülerin kullanımı. *NÖHÜ Müh. Bilim. Derg.*, 10(2), 591-597.
- Karadağ, A., Sağdıç, O. & Karasu, S. (2022). Gıdalarda Katkı Maddesi ve Çözücü Olarak Kullanılan Propilen Glikol Üzerine Değerlendirmeler. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (35), 157-160.
- Keskin, M. (2019). Ticari Propolis Ekstraktlarının Kalite Parametreleri Açısından Karşılaştırılması. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 19 (1) , 43-49. DOI: <https://doi.org/10.31467/uluaricilik.568302>
- Ketenoğlu, O. (2019). Yer Fıstığı (*Arachis Hypogaea* L.) Yağının Farklı Çözücüler Kullanılarak Değişken Güç ve Frekanslarda Ultrason Destekli Ekstraksiyonu. *Gıda*, 45 (1) , 61-71 . DOI: 10.15237/gida.GD19132
- Khalily, F (2019). *Farklı Çözücülerde Ekstrakte Edilen Propolisin Antioksidan Aktivitesi ve Toplam Fenolik Madde İçeriklerinin Belirlenmesi*, Niğde Ömer Halis Demir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Hayvansal Üretim ve Teknolojileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Sy:9
- Koç, A.N., Silici, S., Mutlu, S.F., & Sağdıç, O. (2007). Antifungal activity of propolis in four different fruit juices. *Food Technology and Biotechnology*, 45(1), 57-61.
- Król, W., Bankova, V., Sforcin, J.M., Szliszka, E., Czuba, Z., & Kuropatnick, A.K. (2013). Propolis: Properties, Application, and Its Potential. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1-2. DOI <https://doi.org/10.1155/2013/807578>
- Kumova, U., Korkmaz A., Avcı B.C., & Ceyran G., (2002). Önemli bir arı ürünü: propolis. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 2 (2), 10-24.
- Kutluca, S., 2003. *Propolis Üretim Yöntemlerinin Koloni Performansı ve Propolisin Kimyasal Özellikleri Üzerine Etkileri*. [Yayınlanmış doktora tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü].

- Kutluca, S., Genç, F., & Korkmaz, A. (2006) Propolis. *Samsun Tarım İl Müdürlüğü Çiftçi Eğitimi ve Yayım Şubesi*, Samsun.
- Marucci, M.C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26(2), 83-99.
- Moreno, M., Isla, M., Sampietro, A.R., & Vattuone, M.A. (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 109-114. DOI: 10.1016/S0378-8741(99)00189-0
- Nedji, N., & Loucif-Ayad, W. (2014). Antimicrobial activity of Algerian propolis in food borne pathogen sandits quantitative chemical composition. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4 (6), 433-437. DOI: 10.1016/S2222-1808(14)60601-0
- Nyandwi, R. (2017). *Farklı ülkelerden sağlanan ham propolislerin biyolojik aktiviteye sahip fenolik bileşikler içeriklerinin karşılaştırılması*. [Yayınlanmış yüksek lisans tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü] Erişim adresi: <http://hdl.handle.net/11452/3419>.
- Oruç, H.H, Sorucu, A., & Aydın, L. (2014). Propolisin Sağlık Açısından Önemi, Kalitesinin Belirlenmesi ve Türkiye Açısından İrdelenmesi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 14 (1), 35-43. DOI: 10.31467/uluaricilik.376728
- Oruç, H.H., Çaycı, M., Sorucu, A., Uzabacı, E., & Nyandwi, R. (2021). Characterization of commercially available propolis products in Turkey based on individual phenolic compounds. *Journal of Apicultural Research*, DOI: 10.1080/00218839.2021.1962110
- Oruç, H.H., Sorucu, A., Ünal, H.H., & Aydın, L. (2017). Effects of season and altitude on biological active certain phenolic compounds levels and partial standardization of propolis. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 64, 13-20. DOI:10.1501/VETFAK 0000002767
- Rodriguez-Delgado, M., Malovana, S., Perez, J., Borges, T., & Montelongo, F.G. (2001). Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, 912, 249-257. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)00598-2
- Seven, İ., Aksu, T., & Tatlı Seven, P. (2007). Propolis ve Hayvan Beslemede Kullanımı. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18(2), 79-84. DOI: dergipark.org.tr/tr/pub/yyuvfd/issue/13741/166325
- Smith, E.L., Abbott A. P., & Ryder, K.S. (2014). Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chemical Reviews*, 114, 11060–11082, DOI: 10.1021/cr300162p
- Sorucu, A. (2015). *Marmara bölgesindeki propolislerde biyolojik etkisi olan fenolik madde ve miktarlarının mevsim ve rakım farkına bağlı olarak belirlenmesi* [Yayınlanmış doktora tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü] Erişim adresi: <http://hdl.handle.net/11452/5457>.
- Sorucu, A., & Oruç, H.H. (2019). Determination of biologically active phenolic compounds in propolis by LC–MS/MS according to seasons and altitudes. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13, 2461-2469. DOI:10.1007/s11694-019-00166-9
- Takviye Edici Gıdalar Yönetmeliği Taslağı (2022). Erişim tarihi : 19.05.2023, erişim adresi: <https://www.tarimorman.gov.tr> > GKGM > Duyuru.

- Teixeira, E.W., Negri., Meira, R.M., &Salatino, A. (2005). Plantorigin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2, 85-92. DOI: 10.1093/ecam/neh055
- Temiz, A., Mumcu, A.Ş., Tüylü, A.Ö., Sorkun, K., & Salih, B. (2013). Antifungal activity of propolis samples collected from different geographical regions of Turkey against two food-related molds, *Aspergillus versicolor* and *Penicillium aurantiogriseum*. *Gıda*, 38(3), 135-142. DOI: 10.5505/gida.2013.10820
- Türk Gıda Kodeksi (2013a). Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği. <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2013/06/20130630-4.htm>
- Türk Gıda Kodeksi (2013b). Gıda Maddelerinin ve Gıda Bileşenlerinin Üretiminde Kullanılan Ekstraksiyon Çözücüleri Tebliği (Tebliğ No: 2013/45). <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2013/08/20130818-8.htm>
- Trusheva, B., Petkov, H., Popova, M., Dimitrova, L., Zaharieva, M., Tsvetkova, I., Najdenski, H., & Bankova, V. (2019). “Green” Approach to Propolis Extraction: Natural Deep Eutectic Solvents. *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*. 72 (7), 897-905. DOI: 10.7546/CRABS.2019.07.06
- Wagh, V.D. (2013). Propolis: A wonder bees product and its pharmacological potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2013,1-11. DOI: 10.1155/2013/308249
- Walker, P., & Crane, E. (1987). Constituents of propolis. *Apidologie*, 18, 327-334. DOI: 10.1051/apido:19870404

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

GAL: Galik asit
EGKG: Epigallokateşin gallat
KA: Kafeik asit
KU: *p*-Kumarik asit
FR: *trans*-ferulik asit
İFR: *trans*-İsoferulik asit
MYS: Metilsiringate
DMCA: 3,4-Dimetoksisinamik asit
QE: Kuersetin
SA: *trans*-Sinamik asit
NR: Naringenin
AP: Apigenin
KF: Kaemferol
KR: Krisin
PN: Pinokembrin
GL: Galangin
CAPE: Kafeik asit fenetil ester
KL: *trans*-kalkon
LA: Laktik asit
PG: Propilen glikol
DMSO: Dimetilsülfoksit
TGK: Türk Gıda Kodeksi

8. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim öncesi ve öğrenimim süresince hayata geçirilmesini düşündüğüm proje için gerekli desteğini, bilgi birikimlerini, güler yüz ve samimiyetini, değerli ve yoğun zamanından bir kısmını bana ve projeme ayırması dolayısıyla kıymetli danışmanım Prof. Dr. Hasan Hüseyin ORUÇ'a teşekkürü bir borç bilir, şükran ve saygılarımı sunuyorum. Tez yazımında desteklerinden dolayı Nurçin YILMAZ'a ve tezin düzenlenmesinde yardımlarından dolayı Yiğit PINAR'a teşekkürlerimi sunarım. Ders aşamasında yaptıkları katkıdan dolayı Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden kıymetli hocalarımız Prof. Dr. Songül SONAL ve Prof. Dr. Murat CENGİZ'e şükran ve saygılarımı iletirim.

Fonksiyonel bir içecek olarak insan yararına sunulmasında maddi desteğini sağlayan Freşa İçecek Sanayi ve Tic. A.Ş. firma yönetim kurulu üyesi Sayın Hasan Çakırmelikoğlu'na, tüm desteğini ve bilgi birikimlerini sağlayan sevgiliği fabrika genel müdürüm Sayın Yasin Günaydın'a, proje fikrinin oluşmasından son ürüne dönüştürülmesinde gerekli destek ve bilgisini esirgemeyen eski şefim Ayhan HEMİŞ'e teşekkür ediyorum.

Bu çalışma süresince bana destek veren anne ve babam Bilgi ve Ferruh ATAN'a, kardeşlerim Burak ATAN ve Tuba SEFER'e ve projenin geliştirilmesi, bilgi veya fikirlerini sunan diğer tanıdıklarına teşekkürlerimi sunarım.

Tuğçe ATAN
25 /04/ 2023

9. ÖZGEÇMİŞ

İlk, orta ve lise öğrenimimi Bursa'da tamamladıktan sonra, 2017 yılında Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü'nden mezun oldum. 2017-2022 Yılları arasında İnegölde, Freşa İçecek Sanayi ve Tic. A.Ş. -Kalite Sistem ve Arge Mühendisi olarak çalıştım. 2022 Yılında Freşa İçecek Sanayi ve Tic. A.Ş.- Kalite Güvence Şefi olarak çalışmaya başladım ve halen aynı göreve devam ediyorum.