T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

KESTANE PROPOLİSİNDEN BİOAKTİF BİLEŞİK EKSTRAKSİYON PROSESLERİNİN YÜZEY YANIT YÖNTEMİ İLE OPTİMİZASYONU VE EKSTRAKTLARIN KARAKTERİZASYONU

SEVDE NUR ŞENOL YAZKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DOÇ. DR. MÜGE HENDEK ERTOP

EYLÜL - 2022
KASTAMONU

TEZ ONAYI

Sevde Nur ŞENOL YAZKAN tarafından hazırlanan "**KESTANE PROPOLİSİNDEN BİOAKTİF BİLEŞİK EKSTRAKSİYON PROSESLERİNİN YÜZEY YANIT YÖNTEMİ İLE OPTİMİZASYONU VE EKSTRAKTLARIN KARAKTERİZASYONU**" adlı tez çalışmasının savunma sınavı **29.09.2022** tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**Gıda Mühendisliği Ana Bilim DalıYüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Doç. Dr. Müge Hendek ERTOP Kastamonu Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Seda ÖZGEN Çankırı Karatekin Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Fatma Yağmur HAZAR Kastamonu Üniversitesi	.....

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Enstitü Müdürü V. Doç. Dr. Osman ÇİÇEK .....

TAAHHÜTNAME

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu; ayrıcatez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını, bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini bildirir ve taahhüt ederim.

Sevde Nur ŞENOL YAZKAN

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KESTANE PROPOLİSİNDEN BİOAKTİF BİLEŞİK EKSTRAKSİYON PROSESLERİNİN YÜZEY YANIT YÖNTEMİ İLE OPTİMİZASYONU VE EKSTRAKTLARIN KARAKTERİZASYONU

SEVDE NUR ŞENOL YAZKAN

KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI
DANIŞMAN: DOÇ. DR. MÜGE HENDEK ERTOP

Propolis; arıların alt çeneleriyle çiçeklerin ve bitkilerin (çam, kestane, ökaliptus, kavak) tomurcuk, yaprak ve koruyucu reçinelerini zamk, polen gibi maddelerle karıştırıp alt çeneleriyle kazıyarak toplaması, ağızlarında nemlendirip salgıladıkları çeşitli enzimler ve balmumu ile yumuşatarak pelet şekline getirmesi ve arka ayaklarındaki polen sepetine iletilmesiyle oluşturulur. Propolis ham halinde içinde zamksı maddeler ve reçine bulunması sebebiyle direkt olarak kullanılamaz. Bu nedenle önce ekstraksiyonun etkin bir şekilde yapılması gerekir. Bu tez çalışmasında kestane propolisinin ekstraksiyonunda yöntem parametrelerinin optimizasyonu ve elde edilen ekstraktların karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Kastamonu kestane balı kovanlarından temin edilen kestane propolislerinde maserasyon, refluks ve ultrasound destekli ekstraksiyon yöntemleri uygulanmıştır. Her üç yöntem için işlem parametreleri Yüzey Yanıt Yöntemi, Merkezi Deneme Deseni kullanılarak optimize edilmiştir. Optimizasyonda antioksidan aktivite ve toplam fenolik madde miktarı yanıt (response) olarak kullanılmış ve proses parametrelerininoptimizasyonu yanıtların ise maximizasyonuistenmiştir. Optimizasyon sonucu maserasyon ekstraksiyon için etanol konsantrasyonu %78,46 ve ekstraksiyon süresi 71,05 saat olması durumunda toplam fenolik madde miktarı 977,50 mg GAE/100 ml ve antioksidan aktivite miktarı %88,61 olarak belirlenmiştir. Reflüks ekstraksiyon için optimizasyon sonucu etanol konsantrasyonu %80,64, ekstraksiyon süresi 117,44 dak ve sıcaklık 38,38°C olması durumunda 917,50 mg GAE/100 ml toplam fenolik madde ve %79,50 antioksidan aktivite olarak belirlenmiştir. Ultrasound destekli ekstraksiyon için optimizasyon sonucu etanol konsantrasyonu %82,49, ekstraksiyon süresi 59,12 dak ve sıcaklık 40,53°C olması durumunda ise 812,50 mg GAE/100 ml toplam fenolik madde miktarı ve %75,22 antioksidan aktivite olarak belirlenmiştir. Optimum kestane propolisi ekstraktlarında toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivite değeri maserasyon ekstraksiyonda diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre yüksek bulunmuştur. Her üç yöntem için elde edilen optimize sıvı kestane propolislerinin antioksidan aktivite, toplam fenolik madde içeriği, fenolik madde kompozisyonu, mineral madde ve uçucu bileşenler açısından karakterizasyonu yapılarak yapı aydınlatma çalışması gerçekleştirilmiştir. Kestane propolisinin genel olarak fenolik madde içeriği değerlendirildiğinde, bir flavon olan Krisin'in düzeyi en yüksek olarak bulunmuştur. Bunun yanı sıra kestane propolis ekstraktlarının Pinosembrin, Ferulik asit, Elajik asit ve CAPE gibi diğer fenolikler açısından da zengin olduğu belirlenmiştir. Uçucu madde içeriklerinde yağ asitlerinin tespiti, ekstraksiyon yönteminden etkilenmiş ve en fazla refluks yönteminde belirlenebilmişlerdir.

Özellikle oleik, stearik, palmitik asit gibi yağ asitleri yalnızca refluksekstraksiyon ile alınabilmiştir. Çalışmada kullanılan propolislerin kestane orijinli olması nedeniyle osimenin Cis- izomerinin baskın olarak bulunduğu düşünülmektedir. Optimize kestane propolis ekstraktları çiçek ve kestane ballarına 4 farklı oranda (%0; 1; 2; 4) ilave edilerek, bal karışımlarının antioksidan aktivite, toplam fenolik, renk ve duyusal analizleri yapılmıştır. Antioksidan aktivite değeri açısından; kestane balının antioksidan aktivite değeri çiçek balından yaklaşık 2 kat fazla olduğu; kestane ve çiçek ballarına propolis ilave oranı arttıkça arttığı ve ekstraksiyon çeşitliliğinin istatistiki olarak bir fark oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Kestane balının fenolik madde içeriğinin çiçek balından yaklaşık 3 kat fazla olduğu; kestane ve çiçek ballarına proplis ilavesine bağlı olarak toplam fenolik madde miktarının arttığı tespit edilmiştir. Kestane balının renginin çiçek balının renginden önemli düzeyde koyu olduğu; kestane ballarına farklı oranlarda ve farklı yöntemlerle ekstrakte edilmiş kestane propolisi eklenmesi durumunda renk yoğunluğunun önemli düzeyde etkilenmediği, çiçek ballarında ise propolis ilavesi ile renk yoğunluğunu önemli derecede arttığı görülmüştür. Çiçek ballarının renk yoğunluğu propolis ekleme yüzdesine bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Optimize kestane propolis ekstraktlarının etkilerini çoklu bileşene sahip bir gıda modelinde belirlemek, aynı zamanda ısıl işlemin biyoaktivite üzerindeki etkisini tespit etmek amacıyla, optimize ekstraktlar yine 4 farklı oranda (%0; 1; 2; 4) temel kek formülasyonuna ilave edilerek, elde edilen ürünlerin antioksidan aktivite, toplam fenolik, renk ve duyusal analizleri gerçekleştirilmiştir. Keklere propolis eklendiğinde propolis ilave oranının artması kekin antioksidan aktivite değerlerinin ve toplam fenolik madde miktarlarının istatistiki olarak anlamlı ölçüde artmasına neden olmuştur. Keklerin renk analiz sonuçlarında; kestane propolisi ilave oranının artması L^* parlaklık değerlerinin düşmesine, a^* kırmızılık ve b^* sarılık değerlerinin artmasına neden olmuştur.

ANAHTAR KELİMELER: Propolis, Yüzey yanıt yöntemi, Ekstraksiyon

Eylül 2022, 101 Sayfa

ABSTRACT

MSC THESIS

OPTIMIZATION OF BIOACTIVE COMPOUND EXTRACTION PROCESSES FROM CHESTNUT PROPOLIS BY SURFACE RESPONSE METHODOLOGY, AND CHARACTERIZATION OF EXTRACTS

SEVDE NUR ŞENOL YAZKAN

KASTAMONU UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING
SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. MÜGE HENDEK ERTOP

Propolis; the lower jaw with the bees flowers and plants (Pine, Chestnut, eucalyptus, Poplar) bud, leaf and protective resin glue, substances such as pollen and mix it with wax, and scraping off and lower jaws with a variety of mouths to moisten it with rollup secrete enzymes that soften the pellets into the pollen baskets on the hind legs and The Shape of transmitting by means of is created. Propolis can not be used directly in its raw form due to the presence of sticky substances and resin in it. Therefore, the extraction must first be carried out effectively. In this thesis study, optimization of the method parameters and characterization of the obtained extracts were carried out in the extraction of chestnut propolis. Maceration, reflux and ultrasound-assisted extraction methods were applied to chestnut propolis obtained from Kastamonu chestnut honey hives. Jul. The process parameters for all three methods are optimized using the Surface Response Method, the Central Trial Pattern. In the optimization, antioxidant activity and total phenolic substance amount were used as response, and optimization of process parameters and maximization of responses were requested. As a result of optimization, the total amount of phenolic substance was determined as 977,50 mg GAE/100 ml and the amount of antioxidant activity was determined as 88,61% if the ethanol concentration for maceration extraction was 78,46% and the extraction time was 71,05 hours. As a result of optimization for reflux extraction, ethanol concentration was determined as 80,64%, extraction time was 117,44 min and temperature was 38,38°C, 917,50 mg GAE/100 ml of total phenolic substance and antioxidant activity was determined as 79,50%. Ultrasound-assisted extraction optimization for the results of ethanol concentration %82,49, extraction time andtemperature 40,53; 59,12 min°C 812,50 mg GAE/100 ml) and the amount of total phenolic compounds, %antioxidant activity has been identified as 75,22. The total amount of phenolic substance and antioxidant activity value in optimal chestnut propolis extracts were found to be high in maceration extraction compared to other extraction methods. The optimized liquid chestnut propolis obtained for all three methods was characterized in terms of antioxidant activity, total phenolic substance content, phenolic substance composition, mineral substance and volatile components and the structure lighting study was carried out. When the phenolic content of chestnut propolis was evaluated in general, the level of Chrysin, a flavone, was found to be the highest. In addition, it has been determined that chestnut propolis extracts are also rich in other phenolics such as Pinosembrine, Ferulic acid, Elagic acid and CAPE. The detection of fatty acids in volatile matter contents was influenced by the extraction method and they could be determined most by the reflux method. In particular, fatty acids such as oleic, stearic, palmitic acid could only

be extracted by reflux extraction. Due to the chestnut origin of the propolis used in the study, it is believed that the Cis- isomer of osimen is predominant. Optimized chestnut propolis extracts to flower and chestnut honey in 4 different proportions (%0; 1; 2; 4) in addition, antioxidant activity, total phenolic, color and sensory analyses of honey mixtures were performed. In terms of antioxidant activity value; it has been observed that the antioxidant activity value of chestnut honey is approximately 2 times higher than flower honey; it increases as the rate of propolis addition to chestnut and flower honey increases, and the variety of extraction does not statistically make a difference. In terms of phenolic substance, chestnut honey is about 3 times more than flower honey; it has been found that the rate of proplis addition to chestnut and flower honey increases as it increases. The color of chestnut honey is about 3 times more than the color of flower honey; when chestnut propolis extracted in different proportions and by different methods is added to chestnut honey, the color densitydifference in honey mixtures is very small; when chestnut propolis is added to flower honey, the color density increases significantly. The color intensity of flower honeys was determined as the percentage of adding propolis increased. The effects of propolis extracts Chestnut optimized multi-component model to determine with a food at the same time, in order to identify the effect on the bioactivity of the thermal process was optimised in 4 different percentage extracts again (%0; 1; 2; 4) basic cake is added and the resulting products to the formulation of antioxidant activity, total phenolic, color, and sensory analysis was carried out. When propolis was added to the cakes, it was seen that increasing the propolis addition rate caused a statistically significant increase in the antioxidant activity values of the cake and the total amount of phenolic substances. In the color analysis results of the cakes; Increasing the ratio of chestnut propolis addition caused *L** brightness values to decrease, *a** redness and *b** yellowness values to increase.

KEYWORDS: Propolis, surface response method, extraction

September 2022, 101 Page

TEŞEKKÜR

Tez yapım ve yazım aşamalarının tümünde desteğini ve yardımlarını esirgemeyen, tecrübeleriyle yol gösteren ve tezin her aşamasının takibini, yönlendirmesini yapan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Müge HENDEK ERTOP'a (Kastamonu Üniversitesi) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kastamonu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (KÜBAP)'ne KÜ-BAP01/2021-14 Nolu Proje ile Sağladıkları Destekten Dolayı teşekkür eder şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimim başlayacağı için en çok sevinen, hayatımın her anında en büyük destekçim, mutluluğumla mutluluk bulan, verdiğim bütün kararlarda arkamda duran, bana en çok inanan ve hayatımda en çok sevdiğim süper kahramanım, canım babam Ali ŞENOL'a, fikirleriyle ve bakış açısıyla bana örnek olanve cesaretlendiren kıymetli abim İhsan ŞENOL'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum. Siz her an kalbimdesiniz.

Yüksek lisans eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen ve laboratuvar çalışmalarım boyunca yardımlarıyla büyük katkıda bulunan kıymetli arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca maddi manevi desteklerini esirmeyen, beni yüreklendiren ve her zaman benim yanımda olan babama, anneme, abime, ablama ve son olarak beni her an destekleyen, bana her daim güvenen sevgili hayat arkadaşım Metin YAZKAN'a en içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

SEVDE NUR ŞENOL YAZKAN

Kastamonu, 2022

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ ONAYI ..... **ii**
TAAHHÜTNAME ..... **iii**
ÖZET ..... **iv**
ABSTRACT ..... **vi**
TEŞEKKÜR ..... **viii**
İÇİNDEKİLER ..... **ix**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xi**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **xii**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xiv**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR **3**
2.1 Propolis 3
2.1.1 Propolisin Fiziksel Özellikleri 4
2.1.2 Propolisin Kimyasal İçeriği ve Özellikleri 5
2.1.3 Propolisin Fonksiyonel Nitelikleri 6
2.1.4 Propolisin Kullanım Alanları 8
2.1.5 Propolis Çeşitleri 9
2.1.5.1 Kestane propolisi 12
2.1.6 Mevzuatlarda Propolis 14
2.2 Ekstraksiyon Yöntemleri 15
2.2.1 Maserasyon Ekstraksiyon 17
2.2.2 Refluks Ekstraksiyon 19
2.2.3 Ultrasound Destekli Ekstraksiyon 20
2.3 Yüzey Yanıt Yöntemi 22
3. MATERYAL VE METOD **23**
3.1 Materyal 23
3.2 Metod 24
3.2.1 Propolis Ekstraksiyonu 24
3.2.2 Ekstraksiyon Yöntemlerinin Optimizasyonu 25
3.2.2.1 Deneysel dizayn 25
3.2.2.2 Maserasyon ekstraksiyon 26
3.2.2.3 Refluks ekstraksiyon 27
3.2.2.4 Ultrasound destekli ekstraksiyon 28
3.2.2.5 Validasyon 29
3.2.3 Kestane Propolisinin Karakterizasyon Analizleri 29
3.2.3.1 Toplam fenolik madde 29
3.2.3.2 Antioksidan aktivite 30
3.2.3.3 Fenolik madde kompozisyonu 31
3.2.3.4 Uçucu madde içeriği 31
3.2.3.5 Mineral madde kompozisyonu 32
3.2.4 Fonksiyonel Karakterizasyon 32
3.2.4.1 Soğuk ürün denemesi 32
3.2.4.2 Sıcak ürün denemesi 33
3.2.4.2.1 Kek yapımı 33

3.2.4.2.2 Renk tayini 33
3.2.4.2.3 Duyusal değerlendirme 34
3.2.5 İstatistiksel Analiz 34
4. BULGULAR 36
4.1 Ekstraksiyon Parametrelerinin Optimizasyonu 36
4.2 Maserasyon, Refluks ve Ultrasound Destekli Ekstraksiyon Yöntemi Optimizasyon Sonuçlarının Deneysel Doğrulanması 44
4.2.1 Optimizasyonu Sonucu Elde Edilen Kestane Propolis Ekstraktların Karakterizasyonu 45
4.2.2 Kestane Propolis Ekstraktlarının Biyoaktif Nitelikleri 45
4.2.2.1 Kestane propolis ekstraktlarının toplam fenolik, antioksidan aktivite içerikleri 45
4.2.2.2 Kestane propolis ekstraktlarının fenolik madde içerikleri 47
4.2.2.3 Kestane propolis ekstraktlarının uçucu madde içerikleri 52
4.2.2.4 Kestane propolis ekstraktlarının mineral madde içerikleri 56
4.2.3 Optimize Kestane Propolis Ekstraktlarının Kullanıldığı Bazı Gıda Modellerindeki Etkileri 60
4.2.3.1 Bal karışımı 60
4.2.3.1.1 Bal örneklerinde renk değişimi 63
4.2.3.1.2 Bal örneklerinin biyoaktif nitelikleri 65
4.2.3.1.3 Bal örneklerinin duyusal özellikleri 68
4.2.3.2 Kek 70
4.2.3.2.1 Kek örneklerinin biyoaktif nitelikleri 71
4.2.3.2.2 Kek örneklerinin renk değerleri 73
4.2.3.2.3 Kek örneklerinin duyusal özellikleri 76
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 81
5.1 Sonuç 81
5.2 Öneriler 85
KAYNAKLAR 87
ÖZGEÇMİŞ 101

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Propolis ve arılar 4
Şekil 3.1 Ham kestane propolisi 23
Şekil 3.2 Toz haline getirilmiş propolis örneği 24
Şekil 3.3 Farklı ekstraksiyon metodları ile hazırlanan propolis ekstraktları 24
Şekil 3.4 Propolis ekstraktı 25
Şekil 3.5 Gallik asit kalibrasyon eğrisi 30
Şekil 4.1 Maserasyon ekstraksiyonda Etanol konsantrasyonu ve Ekstraksiyon süresi bağımsız değişkenlerinin Antioksidan Aktivite (a) ve Toplam Fenolik İçerik (b)'e etkilerini gösteren yüzey yanıt grafikleri 41
Şekil 4.2 Ultrasound destekli ekstraksiyonda Etanol konsantrasyonu, Ekstraksiyon süresi ve Sıcaklık bağımsız değişkenlerinin Antioksidan Aktivite (a) ve Toplam Fenolik İçerik (b)'e etkilerini gösteren yüzey yanıt grafikleri 43
Şekil 4.3 Refluks ekstraksiyonda Etanol konsantrasyonu, Ekstraksiyon süresi ve Sıcaklık bağımsız değişkenlerinin Antioksidan Aktivite (a) ve Toplam Fenolik İçerik (b)'ye etkilerini gösteren yüzey yanıt grafikleri 44
Şekil 4.4 Maserasyon (a), Refluks (b) ve Ultrasound destekli (c) ekstrasiyon ile hazırlanan kestane propolis ekstraktlarının RP-HPLC-PDA analizi ile belirlenen fenolik madde kompozisyonu 48
Şekil 4.5 Maserasyon (a), Refluks (b) ve Ultrasound destekli (c) ekstrasiyon ile hazırlanan kestane propolis ekstraktlarının GC-MS ile belirlenen uçucu madde kompozisyonu 53
Şekil 4.6 Kontrol çiçek ve kestane balı 61
Şekil 4.7 Maserayonekstrasyon yöntemli optimize kestane propolisi farklı oranlarda ilaveli çiçek balları 61
Şekil 4.8 Reflux ekstraksiyon yöntemli optimize kestane propolisi farklı oranlarda ilaveli çiçek balları 62
Şekil 4.9 Ultrasound ekstraksiyon yöntemli optimize kestane propolisi farklı oranlarda ilaveli çiçek balları 62
Şekil 4.10 Maserayonekstrasyon yöntemli optimize kestane propolisi farklı oranlarda ilaveli kestane balları 62
Şekil 4.11 Reflux ekstraksiyon yöntemli optimize kestane propolisi farklı oranlarda ilaveli kestane balları 63
Şekil 4.12 Ultrasound ekstraksiyon yöntemli optimize kestane propolisi farklı oranlarda ilaveli kestane balları 63
Şekil 4.13 Optimize kestane propolisi ilave edilmiş kek örnekleri 70
Şekil 4.14 Maserayonekstrasyon yöntemli optimize kestane propolisi farklı oranlarda ilaveli kekler 71
Şekil 4.15 Reflux ekstraksiyon yöntemli optimize kestane propolisi farklı oranlarda ilaveli kekler 71
Şekil 4.16 Ultrasound ekstraksiyon yöntemli optimize kestane propolisi farklı oranlarda ilaveli kekler 71

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1 Bitki kaynağına göre gruplandırılan propolis türleri 10
Tablo 2.2 Literatürde propolis ekstraktlarının hazırlanmasında kullanılan solvent-propolis oranları ve yöntemleri 17
Tablo 3.1 Maserasyonla ekstraksiyonun optimizasyonunda bağımsız değişkenlerin seviyesi 26
Tablo 3.2 Deneysel yanıtlar için kullanılacak, maserasyon metodu ile ekstraksiyon parametrelerinin merkezi deneme desen matriksi..... 26
Tablo 3.3 Reflüks metoduyla ekstraksiyonun optimizasyonunda bağımsız değişkenlerin seviyesi 27
Tablo 3.4 Deneysel yanıtlar için kullanılacak, Reflüks metodu ile ekstraksiyon parametrelerinin merkezi deneme desen matriksi..... 27
Tablo 3.5 Ultrasound destekli ekstraksiyonun optimizasyonunda bağımsız değişkenlerin seviyesi 28
Tablo 3.6 Deneysel yanıtlar için kullanılan Ultrasound metodu ile ekstraksiyon parametrelerinin merkezi deneme desen matriksi..... 28
Tablo 3.7 Optimum noktada ortalama deneysel değerlerin modelden tahminlenen değerler ilekarşılaştırılmasında her bir ekstraksiyon için kullanılacak tablo 29
Tablo 3.8 Uçucu bileşik analizi için GC-MS koşulları..... 31
Tablo 3.9 Kek kalite özellikleri ve puanlama skalası 34
Tablo 4.1 Maserasyon ekstraksiyona ait bağımsız faktör ve yanıtlar..... 36
Tablo 4.2 Reflüks ekstraksiyona ait bağımsız faktör ve yanıtlar..... 37
Tablo 4.3 Ultrasound destekli ekstraksiyona ait bağımsız faktör ve yanıtlar 37
Tablo 4.4 Maserasyon, Ulrasound ve Refluks ekstraksiyon yöntemlerinde Model seçimi ve Model Uyumsuzluğu testi için belirlenen *p* değerleri (a); seçilen fonksiyona dair varyans analizi (ANOVA) tablosu (b)..... 39
Tablo 4.5 Optimum noktada ortalama deneysel değerlerin modelden tahminlenen değerler ile karşılaştırılması 45
Tablo 4.6 Kestane propolis ekstraktlarının bazı biyoaktif nitelikleri..... 46
Tablo 4.7 Kestane propolis ekstraktlarının HPLC ile belirlenen fenolik madde kompozisyonu 49
Tablo 4.8 Kestane propolis ekstraktlarının GC-MS ile belirlenenuçucu madde içerikleri 54
Tablo 4.9 Optimum propolis ekstraktların mineral madde içeriği..... 58
Tablo 4.10 Optimize kestane propolis ekstraktı ilave edilmiş bal karışımlarının renk yoğunluğu değerleri 64
Tablo 4.11 Optimize kestane propolis ekstraktı ilaveli bal örneklerinin antiksidan aktivite ve toplam fenolik madde içerikleri 66
Tablo 4.12 Optimize kestane propolis ilave edilmiş kastane balı ve çiçek balının duysal değerlendirme sonuçları..... 68
Tablo 4.13 Optimize kestane propolis ekstraktı ilaveli kek örneklerinin antioksidan aktivite ve toplam fenolik madde içerikleri 71

Tablo 4.14 Optimize kestane propolisi ilave edilmiş kek örneklerinin renk değerleri 74
Tablo 4.15 Optimize kestane propolisi ilave edilmiş kek örneklerinin duyusal değerlendirme sonuçları 78

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	**:** Yüzde
^{o}C	**:** Sıcaklık
Aw:	**:** Su Aktivitesi
g	**:** Gram
kg	**:** Kilogram
m	**:** Metre
ml	**:** Mililitre
mm	**:** Milimetre
mm/s	**:** Milimetre/saniye
N	**:** Azot
N	**:** Newton
N	**:** Normalite
pH	**:** Power of Hydrogen
t	**:** Zaman
s	**:** Saniye
vd.	**:** Ve Diğerleri

Kısaltmalar

ANOVA	**:** Analyses Of Varyans (Varyans Analizi)
EFSA	**:** Avrupa Birliği Gıda Güvenliği Otoritesi
LC	**:** Sıvı Kromotografi
MÖ	**:** Milattan Önce
T.C.	**:** Türkiye Cumhuriyeti
TSE	**:** Türk Standartları Enstitüsü
YYY	**:** Yüzey Yanıt Yöntemi

1. GİRİŞ

Propolis, bitkilerin çiçek ve tomurcuklarından bal arıları tarafından toplanan farklı miktarlarda reçine ve balmumu içeren ve kovanın içerisinde farklı amaçlara uygun olarak kullanılan doğalbir arı ürünüdür (Doğan ve Hayaoğlu, 2012).

Yapılan farklı çalışmalarda propolis yurt içi ve yurtdışında gıdalarda antioksidan özelliği kullanılarak doğal katkı maddesi olarak uygulanmıştır. Yapılan çalışmalarda meyve suyu, meyveli yoğurt, et ve ürünlerinde doğal koruyucu olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (AbdelRahman ve Mosaad, 2013; El-Neney vd., 2016; Güney, 2016; Han ve Park, 1995). Böylelikle propolisin antimikrobiyal, antifungal ve antioksidan özelliklerinden yararlanılarak gıdalarda kullanılmıştır (Jian-xin vd. 2011; Koç vd., 2007; Kumrath vd., 2017; Sağdıç vd., 2007).

Bilinçlenmenin artmasıyla fonksiyonel gıdalara yönelim de artmıştır. Yeni fonksiyonel gıdalar üretmek ve bazı katkılarla gıdalara fonksiyonel özellikler ilave etmenin son yıllarda talep gördüğü göz önünde bulundurulursa, çalışmanın sonuçları bu alanda devam çalışmaları yapmak isteyenlere fikir verecek, yayınsal olarak da literatüre katkı sağlayacaktır. Bu çalışma sonucunda elde edilecek temel ekstraksiyon yöntemleri ve yöntem parametreleri ileride çeşit, kalite ve optimizasyon açısından çalışma yapmak isteyen araştırmacılara kaynak başlangıç verisi sağlayacaktır.

Kestane propolisi kestane ağaçlarının yoğun olduğu bölgelerde yapılan arıcılık faaliyetlerinden elde edilen bir arı ürünüdür. Çalışmamızda kullanılan kestane propolisi Kastamonu'nun kestane ağaçlarının yoğun olarak bulunduğu orman bölgesindeki kestane balı kovanlarından temin edilmiştir. Propolis ham halinde içinde zamksı maddeler ve reçine bulunması sebebiyle direkt olarak kullanılamaz. Bu nedenle önce ekstraksiyonun etkin bir şekilde yapılması gerekir. Propolis ekstraktlarının hazırlanması için farklı ekstraksiyon yöntemleri vardır.

Propolise uygun ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi ve karakterizasyonu için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Ancak uygun ekstraksiyon yöntemi için belirli bir standardizasyon belirlenmemiştir.

Bu çalışmanın amacı Kastamonu kestane propolisinin optimum ekstraksiyon yöntemini tespit etmek, optimum ekstraktların karakterizasyonunu belirleyerek yapı aydınlatması yapmaktır. Çalışmamızda kestane propolisine maserasyon, refluks ve ultrasound destekli ekstraksiyon yöntemleri uygulanmıştır. Her üç yöntem için işlem parametreleri yüzey yanıt yöntemi, merkezi deneme deseni kullanılarak optimize edilmiştir. Optimizasyon sonucu elde edilen kestane propolis ekstraktlarının karakterizasyonunu belirlemek amacıyla optimum propolislerin antioksidan aktivite, toplam fenolik madde, fenolik madde kompozisyonları, uçucu madde içerikleri ve mineral madde kompozisyonu analizleri yapılmıştır.

Kestane propolisinin fonksiyonel karakterizasyonunu belirlemek için elde edilen optimum kestane propolisleri soğuk ve sıcak olmak üzere 2 tip üründe denemesi yapılarak renk, antioksidan aktivite, toplam fenolik içeriklerine bakılmış ve duyusal analiz gerçekleştirilmiştir. Soğuk ürün denemesinde kestane ve çiçek ballarına %0; 1; 2; 4 oranlarında optimum kestane propolisleri ilave edilmiştir. Sıcak ürün denemesinde ise temel kek formülasyonuna %0; 1; 2; 4 oranlarında optimum kestane propolisleri ilave edilerek analizler gerçekleştirilmiştir.

Sağlık açısından önemli yere sahip olan kestane propolisinin fizikokimyasal, besinsel nitelikleri belirlenip yapı aydınlatması yapılarak elde edilen sonuçlar ile Kastamonu yöresinde yetiştiriciliği gittikçe artan kestane propolisinin gıda sektörüne ve birçok sektöre yeni ve alternatif ürün sunulmuş olacaktır.

2. LİTERATÜR

2.1 Propolis

Arıcılığın başlangıcı oldukça eskidir. İspanya'da milattan önce 7000'lerde "Cuevas de la Arena" daki kazılarda ortaya çıkan resimler, insanların o zamanlardan beri arı ve arı ürünleri ile ilgilendiğini kanıtlamaktadır. Arıcılığın başlangıcı insanların arılara zarar vermeden ağaçlarda bulunan kovukların içindeki balın birazını arılara bırakıp geriye kalan kısmının hasadına dayanmaktadır. Daha sonra ağaç gövdelerinin içi oyularak arılara barınak oluşturmak için arılıklar yapılmıştır. Son zamanlarda ise arıcılık faaliyetleri işçi arı koloni sayısının fazlalaştırılması; bu kolonilerden polen, bal, arı sütü üretimi gibi alanlarda faydalanması amacıyla tarımsal etkinlik olarak ifade edilmektedir (Coşkun ve İnci 2020).

Propolis 1960'lı yılların başlarında bilim insanları tarafından araştırılmaya başlanmıştır. Propolisin fiziksel ve kimyasal yapısı, sağlık üzerine etkisi, biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi konularında incelemeler başlanmıştır. 1979 senesinde propolis hakkında ilk incelemelere Ghisalberti tarafından yapılmıştır (Kumova, 2002).

Ghisalberti, Yunanca'da pro (ön) ve polis (şehir) anlamlarında olan kelimelerin birleşmesiyle oluşmuş şehirden önce demek olan "propolis" adını vermiştir. Önceki dönemlerde yaşayan arıcılar arıların kovanlarının girişini bu maddeyle kapladıklarını gözlemleyerek bu maddeyi propolis olarak adlandırmışlardır. (Ghisalberti,1979).

Propolis; arıların alt çeneleriyle çiçeklerin ve bitkilerin (çam, kestane, ökaliptus, kavak) tomurcuk, yaprak ve koruyucu reçinelerini zamk, polen gibi maddeleri karıştırıp alt çeneleriyle kazıyarak toplaması, ağızlarında nemlendirip salgıladıkları çeşitli enzimler ve balmumu ile yumuşatarak pelet şekline getirmesi ve arka ayaklarındaki polen sepetine iletilmesiyle oluşur (Bayram, 2015; Burdock,1998; Castaldo ve Capasso, 2002; Ghisalberti, 1979).

Propolisin hasat edilmesinde en saf içerikte propolis elde etmek için arı kovanlarına farklı aralıklarda delikleri bulunan propolis tuzakları konulmalıdır. Arılar kovanlarının içerisindeki boşlukları doldurduğu gibi tuzakları da doldurmaktadır (Kutluca vd. 2006). Yapılan bir araştırmada küçük aralıkta olan propolis tuzaklarının propolis üretimini artırdığı ve propolisin daha hızlı bir şekilde toplandığı gözlenmiştir (Tsagkarakis vd., 2017).



Şekil 2.1 Propolis ve arılar (URL-1)

2.1.1 Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolis 15ºC den düşük sıcaklıklarda sert, kırılgan, don veya donmak üzere, 25-45ºC sıcaklık aralığında esnek, yumuşak ve çok yapışken haldedir. 45ºC'den sonra ise yapışkansılığı artmakta olup, 60-70ºC sıcaklıklara geldiğinde ise sıvı forma dönüşmektedir. Fakat istisnai durumlarda erime sıcaklığı elde edildikleri bölgelere bağlı olarak 100ºC'ye kadar yükselebilmektedir. Propolis ve ekstraktlarının ışık almayan, koyu renge sahip ambalajlarda ve 1-12ºC sıcaklıklarda muhafaza edilmelidir. Ayrıca etanol ekstraktlarının çok daha fazla dayandığı belirlenmiştir (Coşkun, 2020).

Propolislerin renk parametreleri de toplanan bölge, mevsim ve bitkinin kaynağıyla orantılı olarak açık sarıdan koyu kahverengine kadar değişim göstermektedir (Burdock, 1998). Buna örnek olarak ılıman iklimdeki ülkelerden üretilen

propolislerin renkleri genelde kahverengi, tropikal iklimdeki ülkelerden elde edilen propolisler ise siyah olduğu görülmüştür (Bağdatlı, 2019).

Propolisin sert ve kendine özgü bir kokusu bulunmaktadır. Sebebi ise uçucu fenolik asit fraksiyonları, mekanik safsızlıklar ve sağlam yapışma özelliğinde olmasıdır (Banskota vd., 2001; Thomson, 1990). Propolis işlenirken ilk olarak mamul, mumsu yapıda ise balmumunun ayrılması amacıyla soğuk su ile yıkanması gerekir. Ardından geriye kalan propolisin hava yolu ile kurutulması sağlanmaktadır. Mumsu yapısı az ise ikinci basamağa geçilmektedir. İkinci basamak, bir çözücü yardımı ile propolislerin çözdürme işlemidir. İz miktardaki balmumu, talaş ve arı parçalarından arındırıldıktan sonra sonuncu basamak olan filtrasyon işlemine geçilmektedir. Son kalan yabancı maddelerden arındırılması filtrasyon işlemi ile gerçekleşmektedir (Burdock, 1998).

2.1.2 Propolisin Kimyasal İçeriği ve Özellikleri

Propolisin kimyasal bileşimi, coğrafi kökeni, bitkisel kökeni ve hasat zamanı gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Genel olarak polifenoller (flavonoidler, fenolik asitler ve esterler), fenolik aldehitler ve ketonlar gibi 300'den fazla farklı bileşenden oluşur. Reçineler ve bitkisel balsam (%50), balmumu (%30), polen (%5), esansiyel ve aromatik yağlar (%10) ve diğer bazı organik bileşikleri içerir (Anjum vd., 2019). Propolis oldukça karmaşık bir kimyasal bileşime sahiptir ve içeriği toplandığı bölgenin florasına göre değişiklik göstermektedir (Bankova vd., 2000). Bu karmaşık yapıdan dolayı propolisin fraksiyonlarına ayrıştırılarak analiz edilmesi gerekmektedir. Fraksiyonlarına ayırabilmek için farklı solventler kullanılmaktadır. Bakterisit bileşenlerin geneli alkol yada su içerisinde çözünmektedir (Coşkun, 2021).

Propolisin kimyasal yapısını etkileyen etmenler, kovan çevresindeki flora, iklim ve coğrafi koşullar, bal arılarının çeşitleri olarak sıralanabilmektedir. Propolisin biyoaktivitesindeki değişimler ise kimyasal yapısındaki bileşenlerin farklılığından kaynaklanmaktadır (Ahn vd., 2007; Moreno vd., 2000; Silici ve Kutluca, 2005). Ülkelerin ekolojik şartlarına uyum sağlamış bal arısı ırkları vardır ve her biri çeşitli özelliktedir (Coşkun, 2021). Propolisin yapısı çok zengindir ve bu yapı bal arısının

yaşam ortamıyla ilgili bir olgudur. Bal arıları tarafından toplanan propolis, kavak *(Populus* sp. L), dişbudak (*Fraxinus* sp.), söğüt (*Salix* sp.), huş (*Betula verrucose*), kestane (*Castanea sativa*), çam (*Pinus*sp.), sekoya (*Sequoia*), karaağaç (*Ulmus*sp.), meşe (*Quercu s*sp.), kızılağaç (*Alnus glutinosa*) ve erik (*Prunus domestica* L.) gibi çeşitli bitki türlerinden elde edilmiştir. Propolisin içerdiği çeşitli bileşenler sayesinde doğal bir ilaç ve ek gıda olarak önemi giderek artmaktadır (Dezmirean vd., 2021).

Kavak tipi propolisin ılıman bölgeye ait olduğu ve flavonoidler, aromatik asitler ve esterleri tarzında fenolik bileşiklere sahip olduğu, ayrıca tropikal bölgelerden üretilen propolislerin de prenillenmiş ρ-kumarik asit, flavonoidler, benzofenonlar, lignanlar, terpenler şeklinde çeşitli fenolik bileşiklere sahip olduğu belirlenmiştir (Ozdal vd., 2019). Coğrafya farklılığının sonucu olarak Asya, Avrupa ve Güney Amerika'da üretilen propolislerler birbirlerinden farklı kimyasal bileşim göstermektedir. Avrupa ve Çin bölgesinden elde edilen propolislerin çok sayıda flavonoid ve fenolik asit esterleri içerdiği tespit edilmiştir (Bankova vd., 2000). Kimyasal yapısında flavonoidler, krisin, apigenin, acacetin,quercetin, kaempferide, kaemperol-7,4'-dimethyl ether, ermanin, galangin,pinochembrin, pinobanksin, pinobanksin-3acetate, pinostrobin, 3', 4'-dihydroxyflavanoids, flavan-3-ols, pectolinaringenin, luteolin, 3,4-dimethyl ether, luteolin, artepillin C, eriodictyol, pinosylvin (3,5-dihydroxystilbene),ferulic asit, ısoferulic asit, benzoik asit,cinnamic asit, ısopentylferulate, p-coumaric asit benzyl ester, caffeic asit, prenylcaffeate, 3-methyl-but-2-enyl caffeate, caffeic asitphenetyl ester, methylcaffeate, diterpenoidclerodan, eterik yağlar bulunmaktadır (Kutluca vd., 2006). Buna ilave olarak propolisin yapısında kalsiyum (Ca), potasyum (K), sodyum (Na), magnezyum (Mg), bakır (Cu), gümüş (Ag), demir (Fe), çinko (Zn), cıva (Hg), alüminyum (Al), potasyum (K), sezyum (Cs), lantan (La), antimon (Sb), manganez (Mn), vanadyum (V) ve silikon mineralleri bulunmaktadır. Ayrıca B1, B2, B6, C ve E vitaminlerini içermektedir (Coşkun, 2020).

2.1.3 Propolisin Fonksiyonel Nitelikleri

Propolis doğal ilaçlardan bir tanesi olup M.Ö. 300'lü yıllardan bu yana popüler tıp alanında kullanılmaktadır. Yapısında fenolik maddeler, aromatik asitler, mumlar,

amino asitler ve uçucu yağlar olmak üzere yüzlerce bileşik bulunmaktadır (Alencar vd., 2007). Propolisin antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiinflamatuar, antiülser ve antitümör özellikleri gibi faydalı biyolojik aktiviteye sahip olması tıpta ve kozmetikte yaygın olarak kullanılmasına neden olmuştur (Bankova vd., 2019; Chi vd., 2020; De Mendonça vd., 2020; Yıldız vd., 2014). Ayrıca flavonoidlerin çeşitli bakterilere karşı etkili olduğu, kan dolaşımını düzenleyici rol oynadığı, ülserlere karşı koruyucu olduğu, mide ülserini ve bacak ülserini iyileştirdiği, romatizma, incinme, kaşıntı, yanık ve yaraların tedavisinde etkili olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Alencar vd., 2007; Baltas vd., 2016; Ruiz-Hurtado vd., 2021). Propolis spreylerinin ise solunum yoluyla kullanımı sonucunda romatizma, astım, gut rahatsızlığı ve sinir sistemini sakinleştirici etkisi sebebiyle tercih edildiği belirtilmiştir (Coşkun, 2020). Propolisin içeriğinde farklı ve çeşitli kimyasal bileşikler bulundurmasından dolayı, sağlık alanında kullanımına ilave olarak, ilaç, gıda sanayii, apiterapi ve kozmetik alanlarında da yaygınlığının hızla arttığı gözlenmektedir (Coşkun ve İnci, 2020).

Propolisin içeriğinde Mn, Fe, Si, Mg, Zn, Se, Ca, K, Na, Cu mineralleri ile B1, B2, B6, C ve E vitaminleri bulunmaktadır (Bankova vd., 2000; Kedzia, 2017; Pasupuleti vd., 2017; Zabaiou vd., 2017).

Duran (2007) propolise dair kimyasal bileşenleri ayrıca aktivitileri açısından: Flavonoidler; (antimikrobiyal ve ateş düşürücü etkileri, antioksidan, kılcal damarların geçirgenliğinin azaltılması ile kanamanın durdurulması), Krisin; (Anti-Helicobacterpylori, tümör hücresel toksisite), Apigenin; (Gastrite bağlı ülserin iyileştirilmesi), Acacetin; (Ateş düşürmeye yardımcı), Kuersetin; (Kılcal damar güçlendirmeye yardımcı, anti viral ve antitümöral etki, spazmolitik), Kaemperol 7,4'-dimetil eter ve Ermanin; (Anti fungal etki), Galanjin; (Bakteriostatik, antibakteriyel ve anti fungal etki), Pinosembrin; (Bakteriostatik, antimikrobiyal ve anti fungal etki, Anti-Helicobacterpylori, lokal anaestetik, in-vitro ve harici kullanım), Ferulik asit; aglutinant, antibakteriyel ve kollojenik etki), Isoferulik asit (*Staphylococcus aureus*'a karşı etki), Benzoik asit; (Bakteriostatik, bakterisite etki ile balzamik, antiseptik etki), Sinnamik asit; (*Staphylococcus aureus*'a karşı etki), p-Kumarik asit benzil ester; (Antimikrobiyal, anti fungal etki), Kafeik asit; (Anti viral, gram pozitif ve

gram negatif bakterilere karşı anti bakteriyel ve ateş düşürücü etki), Kafeik asit fenetil ester; (Antitümoral etki) gibi faydalar sağladığı belirlenmiştir. Morales vd., (1997) çalışmalarında propolisin kullanım alanlarını; dermatoloji, kesik ve yara tedavileri, bir ve ikinci derece yanık tedavileri, soğuk ısırması, nasır, çıban ve egzama tedavileri, sedef, zona ve mantar hastalıkları, deride renk bozulmalarının giderilmesi gibi durumlar olduğunu belirlemişlerdir (Banskota vd., 2001; Burdock, 1998; De Groot, 2013).

EFSA (European Food Safety Authority) (2018), propolis için güvenle tüketilebilirliği ve toksik etki göstermediğini belirtmiştir. Fakat tüketiminin bilinçli bir şekilde yapılmadığında sağlığa zararlı etkiler oluşturabileceği, bu sebeple tedavilerde kullanımının doktor tavsiyesi üzerine yapılması ve maksimum alınabilecek günlük doza uyulması ve bununla ilgili çalışmaların sürdürülmesi gerekmektedir (Aydın ve Danacıoğlu, 2021).

2.1.4 Propolisin Kullanım Alanları

Günümüzde doğal ürünlere olan eğilim zamanla artış göstermektedir. Endüstride ise doğal ürünlerin kullanılmasıyla ortaya çıkan biyoaktif bileşiklerin, özellikle eczacılık, kozmetik ve gıda alanında değerlendirilmesi yönünde çalışmalar yapılmaktadır (Coşkun, 2020). Propolisin fonksiyonel ve antioksidatif etkilerinden dolayı, farmasötik ve gıda endüstrisinde kullanımı hızla artış göstermektedir (Nori vd. 2011). Ayrıca sağlık alanında sayısız olumlu etkiler gösterdiği tanımlanmıştır. Osteoartrit, anjiyoloji, göz rahatsızlıkları ve ortopedik hastalıklarda kullanıldığı da belirlenmiştir (Coşkun, 2020). Cildi nemlendirmesi ve kırışlıkların önlenmesinde, bakterisit ve fungusit özelliklerinden dolayı kozmetik alanında birçok farklı krem üretiminde de kullanılmaktadır (Krell ve Nations, 1996). Propolis içeren kozmetik ürünleri; sabun, losyon, şampuan, cilt kremi, antiseptik solüsyon, burun spreyleri, diş macunu ve yüz maskeleri şeklinde sıralanabilmektedir (Jung vd., 2020; Nori vd., 2011). Ağız bakım ürünü olan diş macunu grubuna %1-10 civarında propolis çözeltisi eklenmesiyle, normalde iki saat sonra ortaya çıkan mikroflora, altı saat sonra oluşmaktadır (Albayrak ve Albayrak, 2008). Kozmetik ürünlerin yanı sıra

birçok alanda kullanılan propolis, mobilya sektöründe de değerlendirilmektedir (Bankova vd., 2000).

Gıda alanında ise çikolata, sakız, şeker, konserve gıdalar ve diyet ürünlerinde de kullanımı yaygınlaşmıştır (Coşkun, 2020). Antioksidatif ve gıdalarda bozulmaya karşı etki gösterdiğinden dolayı tercih sebebi olmaktadır (Bankova vd., 2000; Ghisalberti, 1979; Nedji ve LoucifAyad, 2014). Gıda paketleme sistemleri için kullanılmakta olupçalışmaları devam etmektedir. Propolisin virüsler, mantarlar, bakteriler ve mikroorganizmalar üzerindeki etkisi de araştırılmış ve gram pozitif bakterilerin genel olarak propolise karşı daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (Doğan ve Hayoğlu 2012; Przybyłek ve Karpiński 2019). Meyve suyu üzerinde yapılan çalışmada propolisin koruyuculuğun, sodyum benzoat, potasyum sorbat gibi koruyuculara göre daha etkili olduğu belirlenmiştir (Koc vd., 2007; Yang vd., 2017). Çimlenmeyi önlemesinden dolayı yumrulu bitkilerin muhafazasında da kullanılmaktadır (Kumova, 2002).

Propolis antioksidan içeriği sayesinde lipit peroksidasyonunun önlenip, gıdaların raf ömrünün uzatılmasına sebep olmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 2015). Fakat alkolde çözünen propolis bitter tat-aromada olduğundan, gıdalarda belirli alanlarda kullanımı kısıtlı kalmaktadır (Nori vd., 2011). Çözüm olarak ise propolis gibi doğal özütlerin üretimini gerçekleştirirken, öğütülüp toz halde kullanımı önem arz etmektedir (Marquele vd., 2006). Propolisin kullanım alanlarında yenilik sağlamak ve geliştirilmesi, ayrıca propolisin toz halde üretiminin sağlanması açısından enkapsülasyon yöntemi alternatif bir uygulama olabilmektedir (Nori vd., 2011).

2.1.5 Propolis Çeşitleri

Son zamanlarda yapılan araştırmalar propolis çeşitliliğinin; iklim, bitki kaynağı, arının ırkı, farklı propolis üretim yöntemleri ve coğrafi orjin farklılığından kaynaklandığını göstermektedir (Dündar ve Yıldırım, 2018).

Propolis üretimi arı ırkına göre farklılık göstermektedir. Türkiye'de yapılan bir araştırmada aynı kovandaki *Apis mellifera* caucasia arı türünün yaptığı propolisin antibakteriyal aktivitesinin *Apis mellifera* anatolica türüne göre daha fazla olduğu

bulunmuştur (Silici ve Kutluca, 2005). Farklı çalışmada *Apis mellifera* anatoliaca türünün *Apis mellifera* carnica türüne oranla daha çok propolis ürettiği gözlenmiştir (Şahinler ve Gül, 2005). Çoğunlukla Asya, Afrika, Avrupa bölgelerinde propolis üretiminde en yaygın arı türü *Apis mellifera*'dır. Kafkas arılarının İtalyan ve Uzak Doğulu arılara oranla daha fazla propolis ürettikleri bilinmektedir (Ghisalberti, 1979).

Tablo 2.1 Bitki kaynağına göre gruplandırılan propolis türleri (Groot vd., 2013)

Propolis Türü	**Coğrafik Bölge**	**Bitki Kaynağı**	**Ana Bileşenleri**
Poplar (Kavak)	Avrupa, Kuzey Amerika, Asya'nın bazı Bölgeleri, Yeni Zellanda, Çin	Populus Türleri özellikle Aigeiros Türü ve sıklıkla *P. nigra* L.	Flavonlar ve flavanonlar (pinocembrin, pinobanksin, pinobanksin-3-O-asetat, chrysin, galangin,sinnamik asitler, özellikle kafeik asit ve kafeik asitin benzil-, feniletil-, ve prenil esterleri
Yeşil Birazilya Propolisi (alecrim)	Brazilya	Brazil Baccharis Türleri predominantly B. dracunculifolia DC	Prenil p-kumarik asitler, diterpenik asitler, Prenil asetofenonlar
Huş Ağacı Propolisi	Rusya	BetulaverrucosaEhrh	Poplar tiple aymı olmayan flavonlar ve flavanonlar (akasetin, apigenin, ermanin, rhamnocitrin, kaempferid, α-asetoksibetulenol)
Kırmızı Propolis	Küba, Brazilya, Meksika	*D. ecastophyllum* Ve diğer Dalbergia türleri	İzoflavanoidler (terokarpans, izoflavanlar)
Akdeniz Bölgesi Propolisi	Sicilya, Yunanistan, Girit, Malta	Cupressaceae (türler belirlenemedi muhtemelen *C. sempervirens*) ve Pinaceae	Diterpenler (çoğunlukla labdane tipi), antrakinonlar
Clusia Propolisi	Küba, Venezuella	Clusia türleri içeren *C. major, C. minor*	Poliprenillenmiş benzofenonlar
Pasifik Propolisi	Pasifik (Okinava, Tayvan, Endonezya)	*Macaranga tanarius*	C- prenil- flavanonlar

Türkiye'de ilk kez 2000'li yıllarda propolisin kimyasal açıdan tanımlanması yapılmıştır. Bölgesel farklılıklara bağlı olarak bitki kaynaklarının ve kimyasal içeriğinin değişebileceği belirtilmiştir. Türkiye'de coğrafi olarak bulunduğu bölgeye göre Populus türlerinin olduğu saptanmıştır (Silici, 2010).

Arı ürünleri gruplandırılırken temin edildikleri bitki florasına bağlı olarak gruplara ayrılır ve biyolojik aktiviteleri floraya bağlı değişim gösterir. Polen analizi metoduyla tespiti yapılan polenler, ait oldukları florayı tanımlamada yardımcı olur. Bu metod arıların hangi bitkilerden nektar topladığını ve elde edilen arı ürününün hangi bölgeden alındığı hakkında bilgi vermektedir (Kelez, 2009).

T.C. Tarım ve Orman Bakanlığınca 2020'de revize edilen Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (No: 2020/7) kapsamında bal tipleri az, normal ve yoğun unifloral (monofloral) bal türü olarak üç sınıfa ayrılmıştır. Kekik, biberiye, akasya, ıhlamur, narenciye poleni az olan ballar sınıfındadır ve ıhlamur için %5; akasya için %15; diğerleri için ise %15 oranında ilgili bitkinin polen tanesiyle temsil edilmelidir. Yonca, geven, kanola, üçgül, ayçiçeği, fazelya ve hayıt normal sınıftaunifloral tür olarak ifade edilmiştir. Bal örneklerinin bu bitkilerin ismini alabilmesi için ilgili bitkinin polenini en az %45 oranında içermelidir. Tebliğe göre polen oranı yoğun olan unifloral türler arasında ise kestane (*Castanea sativa*) ve okaliptüs balları ismiyle anıldığı bitkinin %70 polenini içermelidir (Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği No: 2020/7).

Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (No: 2020/7)'nde sınıflandırmanın yapılmasıyla üretilen kestane balının botanik orjininin doğrulanmasında polen yoğunluk miktarının ve polen analizinin önemli olduğunun altı çizilmiştir ve polen analizi parametresi eklenmiştir.

Önemli arı ürünlerinden olan arı poleninin kimyasal bileşimi bitkinin yaşına, bitkinin çeşidine, iklim koşullarına, toprağın türüne ve arıcılık faaliyetlerindeki değişime bağlı olarak farklılık göstermektedir (Feas vd. 2012). Tüm bu nedenlerden dolayı arı polen taneleri renk, boyut, biçim gibi morfolojik özellikleri çeşitlilik göstermektedir (Carpes vd. 2007).

2.1.5.1 Kestane propolisi

Kestane ağaçlarının yoğun olduğu bölgelerde yapılan arıcılık faaliyetlerinden elde edilen bal, arı ekmeği, arı sütü, propolis, polen gibi arıcılık ürünleri kestane propolisi, kestane balı şeklinde adlandırılır (Yıldız, 2011).

Kestane orman ekosistemleri, Türkiye'nin Karadeniz Bölgesi kıyılarında önemli bir oranda bulunmakta ve bu bölgede kestane bazlı ballar yüksek oranda üretilmektedir (Küçük vd., 2007). Türkiye'nin Kastamonu, Samsun, Zonguldak, Bolu, Giresun gibi çeşitli illerinde yoğun olarak bulunan kestane ağacı arılar tarafından fazla nektar verimi sağladığıiçin tercih edilmektedir. Unifloral kestane balı ve kestane propolisi kekik, ayçiçeği, narenciye ve çeşitli dağ çiçekleri gibi diğer bal çeşitlerinden daha koyudur (Sarıkaya vd., 2009).

T.C. Tarım ve Orman Bakanlığınca 2020'de revize edilen Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (No: 2020/7)'ne göre polen oranı yoğun olan unifloral türlerden olan kestane (*Castanea sativa*) balları ismiyle anıldığı bitkinin %70 polenini içermelidir. Türkiye'de *Castenea sativa* bitkisinin polen verimi fazladır (Özkırım 2018) ve tıbbi özellikleri yüksektir (Güneş vd. 2017). Özkök ve Bayram (2021) yılında yaptıkları çalışmalarında Kastamonu, İstanbul, Artvin, Bartın illerinden topladıkları kestane ballarının polen oranını %77,2 ile %98,5 aralığında bulmuşlardır. Silici ve Ülgen (2019) Bursa ilinden aldıkları bal numunelerinin kestane poleninin oranını %92,10 olarak tespit etmişlerdir.

Kekeçoğlu vd. (2021) yılında Düzce ilinde bulunan Yığılca bal arısı kolonilerinden topladıkları kestane propolisini polen, kimyasal bileşim ve antibakteriyal aktivite açısından incelemişlerdir. Propolis örneklerini kovana yerleştirilen propolis tuzaklarından toplamış ve polen analizi sonucunda *Fagaceae* familyasına ait olan Anadolu kestanesinin *(Castanea sativa*) polenlerininbaskın olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu polen analizi sonucu Yığılca bal arısının propolis örneğinin kestane propolisi olduğunu kanıtlamıştır. Propolis örneklerinin kimyasal bileşimlerini LC MS yöntemi ile belirlemiş olup, propolis örneklerinin ana bileşenlerini pinostrobin, gallik asit ve protokateşik asit olarak bulmuşlardır. 15 farklı

mikroorganizma üzerinde antimikrobiyal aktivitesi test edilen propolis örneğinin en güçlü etkisinin *M. smegmatis'e* karşı olduğunu ve Yığılca bal arısının propolis örneğinin daha önce antimikrobiyal aktivitesi test edilmiş birçok örneğe göre daha fazla aktiviteye sahip olduğu sonucuna varmışlardır.

Propolisin bileşimi ve biyolojik aktif özellikleri, çiçek kaynakları, toplama mevsimi ve arının performansı gibi birçok farklı parametreye bağlıdır. Kolaylı vd. (2018) çalışmalarında kestane orijinli propolis örneklerinin fenolik kompozisyonu ve bazı apiterapötik potansiyelleri araştırmışlardır. Ham propolis örnekleri Türkiye'nin Balıkesir bölgesinden temin ederek kestane propolisinin etanolik örneklerinin antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuar ve antitümöral özelliklerine bakmışlardır. Kestane kaynaklı propolis örneklerinin apiterapötik potansiyeller olduğu sonucuna varmışlardır.

Sarıkaya vd. (2009) Zonguldak'tan temin ettikleri kestane propolisi ve kestane balının antioksidan aktivitesine ve fenolik bileşenlerini araştırdıkları bir çalışmada propolisikovan girişinden ve kovan içinden kazıyarak almışlardır.Fenolik asit dağılımları her iki ekstraktta da gallik asit, protokateşik asit, p-hidroksibenzoik asit, klorojenik asit ve vanillik asit yönünden fakir fakat kafeik, şiringik, ferulik, *o*-kumarik, *p*-kumarik ve *trans*-sinnamik asit yönünden zengin olduğu sonucuna varmışlardır. Etanolik propolis numunelerinin antioksidan içeriklerinin metanolik ekstraktlara göre daha yüksek bulunduğunu ve kestane propolis örneklerinin toplam antioksidan kapasitesi ve toplam fenolik asit içerikleri aynı çiçekli bal örneklerinden daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca propolisin toplama şeklinin de analizler için önemli olduğunu arı kovanlarının girişinden elde edilen propolisin kovanın içinden alınan propolise göre toplam fenolik madde miktarı yaklaşık iki kat fazla olduğunu belirtmişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada Yıldız vd. (2014) kestane balı, polen ve propolis gibi çeşitli apiterapötik ürünlerin toplam monoamin oksidaz (MAO) inhibe edici etkisini araştırmışlardır. Araştırmada kullanılan numuneleri Türkiye'nin kuzeyindeki Karadeniz bölgesindeki arıcılardan kestane balı, polen ve kestane propolisi olarak temin etmişlerdir. Monoamin oksidaz (MAO) inhibitörleri genellikle depresif

bozuklukların ve parkinson hastalığı ve alzheimer hastalığı gibi bazı nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Çalışmanın sonucunda tüm numunelerde MAO'nun önemli ölçüde inhibisyonu sergilenmiş ve bunların içerisinden kestane propolisinin en yüksek seviyeye sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Song vd. (2002)'de yapılan bir çalışmada Kore'den toplanan kestane propolisinin HPLC analizi ile yaklaşık 16 tepe noktası belirlenmiş, bunların arasından 6 tepe noktası p-hidroksi benzoik asit, kafeik asit, ferulik asit, benzoik asit, sinnamik asit ve krisin olarak tanımlamışlardır.

2.1.6 Mevzuatlarda Propolis

Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (No: 2020/7) en güncel arı ürünleri tebliğidir. Bu tebliğde en yaygın arı ürünlerinden olan balın tekniğe uygun, hijyenik ortamda üretimi, hazırlığı, işlenmesi, depolanma ve nakledilme aşamalarından sonra piyasaya arzına kadar tüm süreçlerde balın taşıması gereken özellikler bildirilmiştir. Propolis ile ilgili bu mevzuatta bilgi verilmemiştir.

T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Türk Gıda Kodeksi Arı Ürünleri Tebliği Mevzuat Taslağı (Tebliğ No: Taslak)'nın içeriğinde propolise yer verilmiştir. Taslakta; propolis "Bal arılarının, bitkilerin gövde, yaprak ve tomurcuk gibi kısımlarından topladığı reçinemsi maddeler ile bitki nektar ve polenlerini, balmumu ve enzimleri ile karıştırarak oluşturdukları işlenmemiş ürünü" şeklinde tanımlanmıştır. Propolis ürünleri ise "Uygun işleme teknikleri ile propolisten elde edilen besin öğeleri ve biyoaktif bileşenler ile bu tebliğde izin verilen diğer bileşenlerin karışımıyla hazırlanan, üretildiği propolisin karakteristik özelliklerine sahip sıvı, konsantre veya toz formdaki işlenmiş ürünleri" olarak ifade edilmiştir.

Taslakta propolis gıda kapsamında sadece sıvı formda tüketim şeklinde piyasaya verilebilir. Takviye şeklinde kullanılan gıda ürünlerinde tablet, kapsül, sıvı ampül, pastil, damlalık şişe gibi propolis ürünleri sadece takviye edici gıda olarak piyasaya verilebilir, gıda şeklinde piyasaya verilemez. Propolis etiketinde ise propolisin çözücüsü, propolis miktarı (% olarak), "4 yaş ve altı çocukların tüketmesi uygun değildir" ibaresi ve propolisin formuna göre; propolis tozu, propolis özütü, propolis

ekstraktı gibi uygun adlandırmalar kullanılmalıdır. Propolis ürünleri tüketime sunulurken kullanılan propolis ulusal ve uluslararası standartlarda belirtilen fizikokimyasal niteliklere uygun olmalıdır.

Türk Gıda Kodeksi Arı Ürünleri Tebliği Mevzuat Taslağı (Tebliğ No: Taslak)'nda propolisin karakterizasyonunda "p-coumaricacid, pinobanksin 3-acetate, galangin, cinnamicacid, chrysin, pinocembrin, caffeicacid, kaempferol, ferulicacid, benzoicacit, quarcetin, artepiilin C, naringenin, catechol, rutin, myricetin, hesperedin, apigenin, CAPE, chlorogenicacid" bileşenlerinden en az sekiz tanesi ve her bir bileşikten minimum 1 mg/L ya da 1 mg/kg içeriğinde olması gerektiği bildirilmiştir.

TSE Standardında TS 12910 Arıcılık-Arı Tutkalı (Propolis) isimli metin 2003 yılında değiştirilmiştir. Standartda propolis "Arı tutkalı (Propolis) işçi arıların, kovan içerisindeki besinlerin yavru arıları ve kendilerini çeşitli patojen mikroorganizmalardan (virüs, bakteri, fungus) korumak amacıyla bitkilerin yaprak, gövde, tomurcuk vb. kısımlarından topladığı reçinemsi maddeleri ve bitki nektarlarını, başlarında yer alan salgı bezlerinden salgılanan enzimler ile biyokimyasal değişikliğe uğratarak oluşturdukları, arı tutkalı olarak da adlandırılan ürün." şeklinde tanımlanmaktadır. Arı tutkalının genel kriterleri ise; acımtırak/keskin tatta ve güzel kokulu olmalı, kirli sarıdan koyu kahverengine doğru değişmeli, oda sıcaklığında katı formda bulunmalı, 80^{o}C'de kısmen erimeli ve yabancı maddelerden arındırılmış olmalıdır. Kimyasal özellik açısından; fenolik asit, flavonlar, flavoneller, flavononlar bulunmalıdır. Piyasaya sunulurken nem ve hava geçirmeyen cam ambalajlı olmalıdır. Ambalajın üzerinde üretici firmanın ticari ünvanı, adresi, bu standardın işaret ve numarası (TS12910 şeklinde), parti numarası, imal tarihi, son kullanma tarihi, net miktarı(g) gibi bilgiler okunaklı biçimde yazılmalıdır.

2.2 Ekstraksiyon Yöntemleri

Ekstraksiyon farklı çözünürlük özelliklerinden yararlanılarak katı-sıvı ya da sıvı-sıvı fazda bulunan maddelerin sıvı forma geçirilmesidir. Ekstraksiyon işlemi için; maserayon ekstraksiyon, refluks ekstraksiyon, ultrasound destekli ekstraksiyon, mikrodalga ekstraksiyonu, süper kritik akışkan ekstraksiyonu gibi farklı yöntemler

bulunmaktadır (Atak ve Uslu, 2018; Yağcıoğlu, 2015). Ekstraksiyon işlemi; solventin katı matrisin içine girmesi, çözünen maddelerin solvent içerisinde çözünmesi, çözünen maddelerin matristen ayrılması ve son aşama olarak da çözünen maddelerin toplanması basamaklarından oluşur. Ekstraksiyon işleminin verimliliğini ekstraksiyon sıcaklık derecesi, ham maddenin boyutu, solvent seçimi ve ekstraksiyon işlem süresi gibi faktörler etkilemektedir (Zhang vd., 2018).

Propolisin kovandan alındığı ham haliyle doğrudan kullanılması veya hazırlanmasında ve pazarlanmasında bilimsel olmayan yöntemlerin kullanılması, kullanıcılar için yararlı olmaktan çok zararlı etkilere neden olabilir (Zainal vd.2021). Çeşitli ekstraksiyon işlemleri ve farklı çözücüler ile ekstraksiyon işlemi uygulanması gerekmektedir.

Propolisin ana bileşenleri reçineler, flavonoidler, fenolik asitler ve esterlerdir.Ayrıca flavonoidler, alkol gibi organik çözücülerde çözünen en önemli grubu oluşturur (Woźniak vd., 2020). Ekstraksiyon işlemi yapılırken propolisin içerisindeki istenmeyen maddeler uzaklaştırılırken fenolik bileşenler korunmalıdır (G. Bergonzini, 2006). Bu sebep ile ekstraksiyon için kullanılacak çözücü ekstraktın özelliklerinin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Çakıroğlu, 2010).

Propolisin esktraksiyonunda propolisin kimyasal bileşiminde bulunan fenolik bileşenler, flavonoidler, antioksidanlar gibi biyoaktif bileşiklerinde hasara neden olmayacak şekilde en uygun çözücü seçimi yapılmalıdır. Ekstraksiyon işlemi için çözücü çeşidi tercih edilirken propolisin hangi ürüne işleneceği önemli bir noktadır. Elde edilen ekstraktların işleneceği son ürün, gıda ve sağlık sektörlerinde insan sağlığını tehdit etmeyecek özellikte olmalıdır. Aynı zamanda seçilen çözücü endüstride kullanılırken ekstraksiyon hızına etkisi önemli bir faktördür (Büyüktuncel, 2012; Li vd. 2011;)

Propolis ekstraksiyonunda farklı konsantrasyonlarda en fazla kullanılan çözücü sulu alkol (etanol veya metanol) çözeltisidir (Cunha vd., 2004; Margeratha vd., 2012). Çözücü çeşitleri olarak; etanol, metanol (Bakdash vd., 2018), su (Cottica vd., 2015;

Ertürk vd., 2014), zeytinyağı (Taddeo vd., 2016), propilen glikol (Arslan vd., 2010) gibi çözücüler kullanılmaktadır.

Propolisin piyasada yaygın olarak kapsül, tablet, granül, boğaz pastili ve sakız gibi ürünleri mevcut olmasına rağmen, ekstraksiyon işlemi henüz standardize edilmemiştir. Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde propolis ekstraksiyonu için çeşitli farklı yöntemlerin kullanıldığını görülmektedir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2 Literatürde propolis ekstraktlarının hazırlanmasında kullanılan solvent-propolis oranları ve yöntemleri (Kara vd., 2022)

Yazar	solvent-propolis oranı	Yöntem
Tosi vd. (1996)	%30	%60 Etanol, gliserol, propilen glikol vb.
Trusheva vd. (2007)	1:1/50	%70 Etanol (ultrasonik ve mikrodalga)
Keskin ve Kolaylı (2018)	1:1/10	%96 Etanol, 7 gün
Karlıdağ ve Genç (2019)	1:1/10	%98 Etanol, 24 saat
Sürahi vd. (2014)	1:1/5	%80 Etanol, 24 saat
Ying vd. (2006)	1:1/25	%80 Etanol, 3 saat
Biscaia vd. (2009)	1:1/4	%70 Etanol, 7 gün
Muhtar vd. (2019)	1:1/10	%70 Etanol, 7 gün
Khacha-Ananda vd. (2013)	1:1/20	%70 Etanol, karanlıkta 3 gün
Bankova vd. (2019)	1:1/30	%70 Etanol, 1 gün, oda sıcaklığı

Tablo 2.2'de görüldüğü üzere propolis ekstraksiyonu için yapılan çalışmalarda farklı yüzdelerde hazırlanan etanol çözeltileri ve çözücü-propolis oranı kullanılmaktadır. Ancak etanolik propolis ekstraktının hazırlanmasında izlenecek yöntem belirsizdir. Bu nedenle propolis ekstraktlarının hazırlanmasında en uygun ekstraksiyon metodunun seçilmesi önemlidir. Bu çalışmanın amacı ideal çözücü yüzdesini, ideal süreyi ve sıcaklığı yüzey yanıt yöntemi ile 3 farklı ekstraksiyon metodu kullanarak kestane propolisinin karakterizasyonu açısından optimum ekstraksiyon yöntemini belirlemektir.

2.2.1 Maserasyon Ekstraksiyon

Diğer yöntemlere göre daha fazla vakit almasına rağmen propolis ekstraksiyonunda en yaygın uygulanan ekstraksiyon yöntemi maserasyon ekstraksiyon yöntemidir (Trusheva vd. 2007). Maserasyon yöntemi, örneğin uygun boyuta küçültülmesinin

ardından genellikle oda sıcaklığında uygun solvent (çözücü) içerisinde uygun ve kapalı bir kapta belli bir zaman bekletilmek ve karıştırılmak suretiyle ekstrakte edilmesini temel alan bir yöntemdir (Silici ve Kutluca, 2005). Maserasyon ekstraksiyon yöntemi bitki özlü olan ham maddelerin ekstraksiyonu için kullanılan en eski ve yaygın bir yöntemdir (İlbay, 2016).

Ekstraksiyon; sıvı veya katı fazdaki bileşenlerin farklı çözünürlük özelliklerinden yararlanarak sıvı faza alınması şeklinde tanımlanmaktadır. Yöntem katı-sıvı ve sıvı-sıvı olarak yapılmaktadır. Katı-sıvı ekstraksiyonda katı numunenin öğütülüp yüzey alanı artırıldıktan sonra sıvı solvent ile muamele edilir ve sonuçta katı numunenin içindeki bileşenlerin sıvı solvente geçişi sağlanır. Bu yöntemde ekstraksiyon hızını etkileyen faktörler; katı numunenin neminin belirlenmesi ve hazır hale getirilmesi, sıcaklığın belirlenmesi, işlem için en uygun çözücünün seçilmesidir (Takeuchi vd. 2008).

Katı-sıvı ekstraksiyonda seçilecek çözücünün katı numuneden istenilen bileşenleri çözebilir yapıda olması ve ekstraksiyon işlemi sonrasında ekstraktta çözünen bileşenlerden ve katı numuneden kolaylıkla ayrılabilir özellikte olması ekstraksiyon hızına etki eden önemli faktörlerden birisidir (Büyüktuncel 2012; Li vd., 2011).

Yöntemin dezavantajlarına bakıldığında çok fazla solvent gerektirmesi, işlemin uzun süre olması, solventin çevreye olumsuz etkilerinin olması, çözücünün veriminin düşük olması gibi nedenlerden dolayı yeni ekstraksiyon yöntemlerine yönelim artmıştır (Ghafoor vd. 2010).

Maserasyon ekstraksiyon yöntemi kullanarak Devequi Nunes vd. (2018) Brezilya'nın çeşitli bölgelerinden toplanan kahverengi, kırmızı ve yeşil propolis örneklerini ekstrakte etmişlerdir. Masearyon yönteminin yanı sıra süperkritik ekstraksiyon yöntemini de denemişler ve yöntemleri kıyaslamışlardır. Karşılaştırmalarında maserasyon yönteminin antioksidan bileşiklerinin ekstraksiyonu için daha iyi sonuçlar verdiğini ve daha fazla seçicilik gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Çalışmanın sonucunda Brezilya kırmızı propolis çeşidinin antioksidan bileşiklerinin diğer çeşitlere oranla daha yüksek içerikte olduğunu bildirmişlerdir.

Cunha vd. (2004) maserasyon ekstraksiyonda maserasyon süresinin propolis ekstraktlarının verimine olan etksini incelemişlerdir. Araştırmada 10; 20; 30 günlük zaman dilimlerinde maserasyon sürecinde olan propolislerin kompozisyonunda nitel olarak aynı göründüğünü ama veriminin süre içerisinde az bir artış olduğunu gözlemlemişlerdir.

2.2.2 Refluks Ekstraksiyon

Propolis antioksidan, antitumoral, antiinflamatuar, antimikrobiyal gibi birçok özelliği barındıran biyoaktif arı ürünüdür ve ham hali ile reçinemsi yapışkan bir yapıdadır. Propolis, kovandan toplanıldığı gibi ham haliyle doğrudan kullanımı ya da bilimsel metodlar içermeyen metodlarlarla elde edilip tüketiciye sunulduğunda olumlu özelliklerinden çok olumsuz taraflar oluşturabilmektedir (Banskota vd., 2001) Ham haldeki propolisten daha fazla verim alabilmek için farklı çözücüler kullanarak propolis ekstraktları hazırlanmaktadır. Ekstraksiyon işlemi sonrasında elde edilen ekstraktların içeriğindeki bileşenler kayıp olmadan işleme tabi tutulmalı, ekstrakt atık solvent içermemeli ve yeniden saflaştırmaya gerek olmamalıdır. En uygun ekstraksiyon işlemi zamanı hızlı, maliyeti ucuz ve basit olmalıdır (Kılıç, 2008; Wang ve Weller, 2006).

Katı-sıvı ekstraksiyonu bitkisel kökenli kaynakların antioksidan ve fenolik madde ekstraksiyonları için uzun zamandır kullanılan bir yöntemdir. Bu ekstraksiyon esnasından uygulanmakta olan sıcaklık katı örneğe ve solventin çeşidine göre değişkenlik göstermektedir. Uygulanan sıcaklık solventin verimini artırmaya yardımcı olarak katı maddeye daha fazla geçmesine yardımcı olmaktadır. Böylelikle katı örnekteki çözünmesi istenen bileşenler solvente daha iyi geçiş yapmaktadırlar. Ancak katı örneğin çeşidine ve yapısına göre sıcaklıkla beraber ekstrasksiyon işleminin veriminde artış olurken, çok yüksek sıcaklıkta bazı bileşenlerde denatürasyon olabilmektedir (Bakkaloğlu, 2020).

Refluks ekstraksiyonda su banyosu kullanılmaktadır. Hazırlanan çözelti su banyosunda belirli sıcaklık ve belirli sürelerde tutulmaktadır (Margeretta, 2012).

Shouqin vd., (2005)'de, refluks ekstraksiyon yöntemi ile propolis ekstrakte etmiş ve propolisin miktarını incelemişlerdir. %95 etanol konsantrasyonunda, 85^{o}C'de 4 saat su banyosunda çözeltiyi bekletmişlerdir. Alencar vd. (2007), Brezilya propolisinin bir türü olan kırmızı propolisin kimyasal kompozisyonunu incelerken reflüks ekstraksiyon metodunu kullanmışlardır. %80 etanol konsantrasyonunda 70^{o}C'de 30 dakika su banyosunda bulundurarak ekstraksiyon işlemini gerçekleştirmişlerdir.

2.2.3 Ultrasound Destekli Ekstraksiyon

Ultrasound destekli ekstraksiyon katı-sıvı ve sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemlerinde ses dalgaları yardımı ile ekstraksiyon etkinliğini artırmak amacıyla kullanılan bir metottur (Büyüktuncel, 2012). İnsanın işitebileceği frekans aralığının üstünde olan ses dalgalarına ultrasonik ses dalgaları denir (İnce vd. 2001). İnsanın ses işitme aralığı 15-20 kHz (Ulusoy ve Karakaya, 2011) iken insanların ses dalgalarını duyamayacağı 20kHz üstendeki frekanslardaki titreşimlerde çalışan ve ortama ses dalgalarının yayılması için ultrasonik ses üreten ultrasonik aletler kullanılır (Avşar vd. 2014). Ultrasonik titreşimler sıvıdan geçerken boşluk ortaya çıkar ve bu boşluk ultrasonik enerji ile fazla sayıda daha küçük kabarcıklar oluşturarak katıların mekanik olarak sarsılmasına neden olur (Büyüktuncel, 2012).

Ultrasound metodunda gıdaya verilen akustik enerji hızlıca gıda içerisinde yayılarak kütle transferi gerçekleştirir ve hücre duvarını parçalayarak hücrenin içerisindeki bileşenlerin çözücüye geçmesini sağlar. Bu sayede ekstraksiyon işlemi diğer yöntemler göre daha hızlı gerçekleşir (Bayraktaroğlu ve Obuz, 2006; Ercan ve Soysal, 2011). Ultrasound destekli ekstraksiyon işlemi su banyosuna ultrasonik radyasyon verilerek ya da prob gibi cihaz yardımıyla yapılır. Daha çok kullanımı tercih edilen ve daha ucuz olan ultrasonik radyasyon kaynak ise ultrasonik su banyosudur (Büyüktuncel 2012; Santos ve Capelo 2007). Yöntemin avantajlarına bakıldığında; enerji tasarrufu, işlem süresinin kısalması, yüksek ekstraksiyon etkinliği, verimin yükselmesi, kullanım kolaylığı, gıda kalitesinde iyileşmelerin olması olarak sıralanabilmektedir (Chemat vd., 2004; Chemat vd., 2004a; Chemat vd., 2011; Jahouach Rabai vd., 2008).

Ultrasound yöntemi gıdalarda oksidasyonun hızlandırılmasında, biyoaktif bileşen ekstraksiyonunda, enzim aktivitesi inhibisyonunda, kurutma, kristalizasyon, fermantasyon, dondurulmuş gıdalarda filtrasyon işlemlerinin yapılmasında kullanılmaktadır (Ulusoy ve Karakaya 2011). Ultrasound destekli uygulamalar gıdalarda yüksek enerjili uygulama ve düşük enerjili uygulama olarak iki şekilde yapılır. Yüksek enerjili uygulamalarda gıdalarda mikrobiyal ve enzimatik inaktivasyonun oluşumunda; düşük enerjili uygulamalarda ise gıdanın kompozisyon, olgunluk ve sertlik gibi fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Ercan ve Soysal, 2011). Ultrasound destekli ekstraksiyon şifalı bitkilerden biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunda, antioksidan madde ekstraksiyonunda, esansiyal yağ elde edilirken kullanılmaktadır (Tavman vd. 2009).

Literatürde Ultrasound destekli ekstraksiyon yöntemi ile propolis ekstraksiyonu için yapılan farklı çalışmalar yer almaktadır. Cavalora vd. (2019), yaptıkları çalışmada propolisin antioksidan kapasitesi ve fenolik madde içeriğini ultrasound destekli ekstraksiyon metodunu kullanarak incelemişlerdir. Ekstraksiyon süresi, katı çözücü oranı ve etanol konsantrasyonunu merkezi kompozit dizayn kullanarak optimum ekstraksiyon koşullarını araştırmışlardır. Çalışmalarının sonucunda ise ultrasound destekli ekstraksiyonun geleneksel ekstraksiyon metodlarına göre zaman bakımından daha avantajlı olduğunu ve normalde uygulanan balmumu ayırma yöntemine gerek kalmadığı sonucuna varmışlardır.

Yapılan başka çalışmada Oraian vd. (2020), propolis ekstraksiyonu için farklı üç metod (maserasyon, mikrodalga ve ultrasound ekstraksiyon) kullanarak propolisteki biyoaktif bileşiklerin seçilen ekstraksiyon yöntemi ile nasıl etkilendiğini araştırmışlardır. Optimum yöntemi seçerken propolisin toplam fenolik içeriğine, ekstraksiyon verimine, flavonların içeriğine bakarak değerlendirmişlerdir. Ultrasound destekli ekstraksiyonun diğer ekstraksiyon metodlarına göre daha iyi bir yöntem olduğu çalışma sonucunda kanıtlanmıştır.

2.3 Yüzey Yanıt Yöntemi

Yüzey yanıt yöntemi (YYY) Myers ve Montgomery (2004); "proseslerin optimizasyonu ve geliştirilmesi için gerekli olan matematiksel ve istatiksel tekniklerin birlikte kullanıldığı yöntem" olarak ifade etmiştir.

YYY, proseslerin optimizasyonu ve geliştirilmesi için gerekli olan matematiksel ve istatiksel tekniklerin birlikte kullanıldığı yöntemdir (Myers ve Montgomery, 2004). Son 50 yılda biyoteknoloji, sosyal bilimler, mühendislik, fiziksel bilimler ve gıda endüstrisinde uygulanmaktadır. Ürün ve proses tanımlanmasında, tasarlanmasında, optimizasyon ve geliştirilmesinde, kalitenin iyileştirilmesinde ve belirsizlik analizlerinde sıklıkla uygulanan bir yöntemdir. YYY gıda bilimi ve teknolojisinde de yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Birçok araştırmacı tarafından kurutma, osmotik dehidrasyon, ekstraksiyon, fırında pişirme, enzim üretimi, fırında kavurma, ekstrüzyon, fermantasyon, pastörizasyon, biyoteknolojik işlemler gibi birçok alanda başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Cui vd. 1994; Eren ve Kaymak-Ertekin 2007; Gao vd. 2007; Koç vd. 2010; Mundra vd. 2007; Sacchetti vd. 2001).

De Zordi vd. (2014), yapmış oldukları propolis çalışmasındapolifenollerin süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunu merkezi bir kompozit tasarım yaklaşımında incelemişlerdir. Yüzey yanıt yöntemindeektraksiyonda bağımsız değişkenleri sıcaklık, basınç ve süre olarak belirlemişlerdir. Yanıtı ise ekstratların miktarı ve bileşimi üzerindeki değişkenleri (polifenolleri) daha iyi tanımlamak olarak belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda süperkritik karbondioksit ekstraksiyonun propolis kalıntısı için iyi miktarda flavon ve fenolik veren bir yöntem olduğunu bulmuşlardır. Bu tezde de yüzey yanıt yöntemi kullanılarak kestane propolisi için optimum ektraksiyon yöntemi ortaya konulmuş olacaktır.

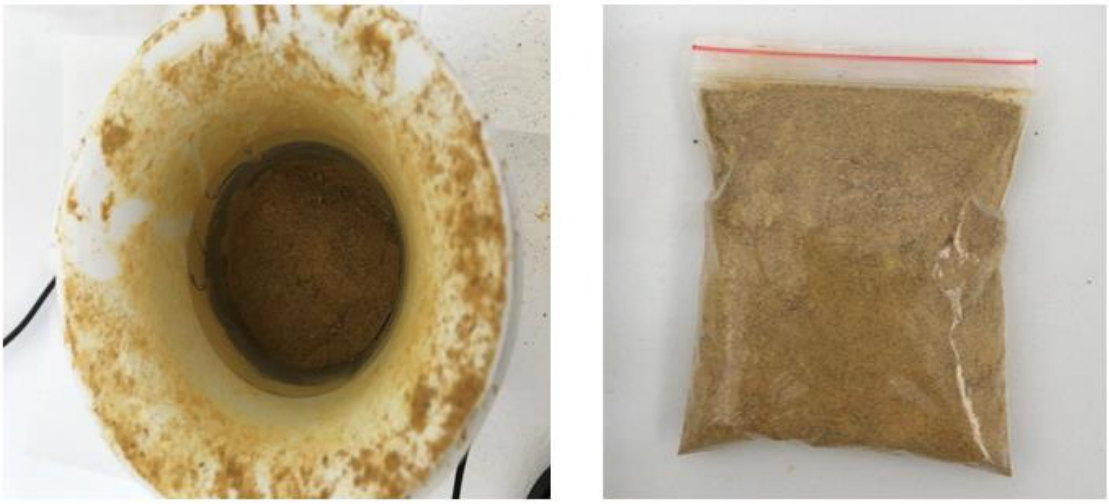
3. MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

Çalışmada hammadde olarak kullanılan kestane propolis örnekleri Kastamonu kestane orman bölgesi sınırlarını içine alan Azdavay, Bozkurt, Cide, Doğanyurt, İnebolu, Küre ilçelerinden Kastamonu Arı Yetiştiricileri Birliği aracılığıyla 2021hasat döneminde temin edilmiştir. Kestane propolisinin ekstraksiyon aşamaları ve analizleri Kastamonu Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği bölüm laboratuarında gerçekleştirilmiştir. Propolis ekstraksiyon işlemi için farklı ilçelerden temin edilen propolisler küçük parçalara ayrılarak (Şekil 3.1) -18^{o}C'de derin dondurucuda bekletildikten sonra blender yardımıyla öğütülüp homojen bir şekilde karıştırılarak propolisin toz hale gelmesi sağlanmıştır (Şekil 3.2). Toz haline gelen kestane propolisi analiz edilene kadar -18^{o}C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1 Ham kestane propolisi



Şekil 3.2 Toz haline getirilmiş propolis örneği

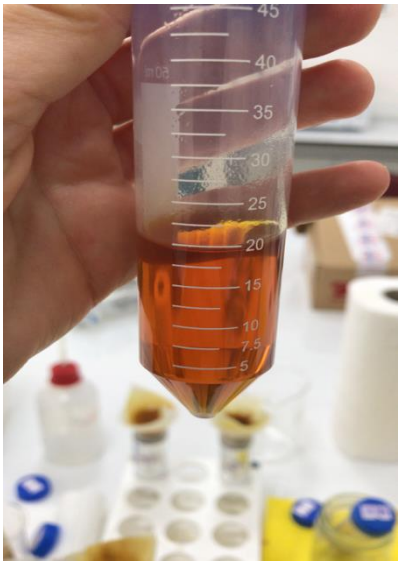
3.2 Metod

3.2.1 Propolis Ekstraksiyonu

Çalışmanın temelini oluşturan ekstraksiyon analizleri için -18^{o}C'de ışık ve hava almayacak şekilde muhafaza edilen toz propolis numuneleri üç farklı ekstraksiyon yöntemi (maserasyon ekstraksiyon, refluks ekstraksiyon, ultrasound destekli ekstraksiyon) kullanıldı. Her üç yöntem içinde 5'er gram toz propolisin üzerine her metod için farklı konsantrasyonlarda olan etil alkol çözücü (solvent) olarak kullanıldı. Yüzey yanıt yönteminde belirlenen etanol konsantrasyonu, ekstraksiyon süresi ve sıcaklık parametrelerine uygun ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Farklı ekstraksiyon metodları ile hazırlanan propolis ekstraktları



Şekil 3.4 Propolis ekstraktı

3.2.2 Ekstraksiyon Yöntemlerinin Optimizasyonu

Bu çalışma Ekstraksiyon yöntemlerinin Yüzey Yanıt Yöntemi ile optimizasyonu, optimize sonuçların validasyonu ve optimize ekstraksiyon prosesi ile hazırlanan ekstraktların karakterizasyonu olmak üzere 3 temel aşamadan oluşmaktadır.

3.2.2.1 Deneysel dizayn

Bu çalışmada 3 tip ekstraksiyon kullanılmıştır. Her ekstraksiyon için farklı faktörler ve faktör seviyeleri belirlenmiştir (Tablo 3.1; 3.2; 3.3; 3.4; 3.5; 3.6; 3.7). Tüm ekstraksiyonlarda ortak faktör ve seviye etanol konsantrasyonudur. Bu faktörlerin Toplam Fenolik (%) ve Antioksidan aktivite üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla Response Surface Methodology (RSM)-Yüzey Yanıt Yöntemi (YYM) bağlı olarak Central Composite Rotatable Design (CCRD)-Merkezi Bileşen Deneme Desenine göre hazırlanan ve Tablo 3.2; 3.4; 3.6'da gösterilen deneme desenleri kullanılmıştır. CCRD, Design Expert 7.0.0 paket programı kullanılarak oluşturulmuştur. Bağımsız değişkenler (faktörler) ve merkezi bilesen deneme desenine göre 5 merkez nokta belirlenmiştir. Yapılan ön çalışmalar ve literatür bilgileri ile faktör seviyeleri tespit edilmiştir. Programın Maserasyon ekstraksiyon için 13, Refluks ekstraksiyon için 20, Ultrasound ekstraksiyon için önerdiği 20 adet deneme ayrı ayrı yapılarak, Toplam fenolik (%) ve Antioksidan aktivite (% inhibisyon) yanıtları tespit edilmiştir. Deneme desenine göre yapılan ekstraksiyonlardan elde edilen sonuçlar CCRD

Overall Desirability fonksiyonu kullanılarak bir arada değerlendirilmişi ve 3 ekstraksiyon yöntemi için de optimize modeller elde edilmiştir.

3.2.2.2 Maserasyon ekstraksiyon

Propolis ekstraksiyonu Margeretha vd. (2012), tarafından tanımlanan metodun minör modifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Propolis (5g) deneysel dizaynda belirtilen (Tablo 3.1 ve 3.2) süre (6-72 saat) ve (%50-90, v:v) konsantrasyonlarda 50 ml etanol ile oda sıcaklığında periyodik olarak karıştırılarak ekstrakte edilmiştir. Ekstrakt 1500 g'da 5 dak. santrüfüjleme yapılarak kalıntılarından ayrıştırılmıştır. Ekstraktlar analize kadar 4°C'de saklanmıştır.

Tablo 3.1 Maserasyonla ekstraksiyonun optimizasyonunda bağımsız değişkenlerin seviyesi

Bağımsız değişken	**Seviye**				
	-1.414	-1	0	+1	+1.414
Etanol konsantrasyonu (%)	**50**	55,86	70	84,14	**90**
Ekstraksiyon süresi (saat)	**6**	15,67	39	62,33	**72**

Tablo 3.2 Deneysel yanıtlar için kullanılacak, maserasyon metodu ile ekstraksiyon parametrelerinin merkezi deneme desen matriksi

Deneme	**Etanol konsantrasyonu (%) (dizayn kodu)**	**Ekstraksiyon süresi (saat) (dizayn kodu)**	**Deneysel yanıt**	
			Toplam fenolik (%)	**Antioksidan aktivite (%)**
1	90,00 (+1.414)	39,00 (0)		
2	70,00 (0)	39,00 (0)		
3	50,00 (-1.414)	39,00 (0)		
4	84,14 (+1)	62,33 (+1)		
5	84,14 (+1)	15,67 (-1)		
6	55,86 (-1)	15,67 (-1)		
7	70,00 (0)	72,00 (+1.414)		
8	55,86 (-1)	62,33 (+1)		
9	70,00 (0)	39,00 (0)		
10	70,00 (0)	39,00 (0)		
11	70,00 (0)	39,00 (0)		
12	70,00 (0)	6,00 (-1.414)		
13	70,00 (0)	39,00 (0)		

3.2.2.3 Refluks ekstraksiyon

Propolis ekstraksiyonu Margeretha vd. (2012), tarafından tanımlanan metodun minör modifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Propolis (5g) deneysel dizaynda belirtilen (Tablo 3.3 ve 3.4) süre (10-160 dak), (%50-90, v:v) konsantrasyonlardave sıcaklık (30-90ºC)'de 50 ml etanol ile 70°C'de su banyosunda tutularak gerçekleştirilmiştir. Ekstrakt 1500 g'da 5 dak. santrüfüjleme yapılarak kalıntılarından ayrıştırılmıştır. Ekstraktlar analize kadar 4°C'de saklanmıştır.

Tablo 3.3 Reflüks metoduyla ekstraksiyonun optimizasyonunda bağımsız değişkenlerin seviyesi

Bağımsız değişken	Seviye				
	-1.414	-1	0	+1	+1.414
Etanol konsantrasyonu (%)	**50**	55,86	70	84,14	**90**
Ekstraksiyon zamanı (dak)	10	31,97	85	138,03	160
Ekstraksiyon sıcaklığı (C°)	30	42,16	60	77,84	90

Tablo 3.4 Deneysel yanıtlar için kullanılacak, Reflüks metodu ile ekstraksiyon parametrelerinin merkezi deneme desen matriksi

Deneme	**Etanol konsantrasyonu (%)**	**Ekstraksiyon süresi (dak)**	**Sıcaklık (C°)**	**Deneysel yanıt**	
				Toplam fenolik (%)	**Antioksidan aktivite (%)**
1	70,00	85,00	60,00		
2	70,00	85,00	60,00		
3	58,11	40,40	77,84		
4	81,89	129,60	42,16		
5	90,00	85,00	60,00		
6	81,89	40,40	77,84		
7	70,00	85,00	60,00		
8	70,00	85,00	90,00		
9	58,11	129,60	42,16		
10	70,00	85,00	60,00		
11	70,00	85,00	60,00		
12	81,89	40,40	42,16		
13	70,00	85,00	30,00		
14	58,11	129,60	77,84		
15	70,00	85,00	60,00		
16	70,00	10,00	60,00		
17	50,00	85,00	60,00		
18	58,11	40,40	42,16		
19	81,89	129,60	77,84		
20	70,00	160,00	60,00		

3.2.2.4 Ultrasound destekli ekstraksiyon

Propolis ekstraksiyonunda ultrasonik özellikte (su banyosuna ultrasonikradyasyon uygulanmasıyla yapılan) su banyosu kullanılmıştır. Propolis (5g) deneysel dizaynda belirtilen (Tablo 3.5 ve 3.6) ekstraksiyon zamanı (5-60 dak), (%50-90, v:v) konsantrasyonlarda 50 ml etanol vesıcaklık (30°C-70°C)'de ultrasonik banyoda tutularak gerçekleştirilmiştir. Ekstraktsantrüfüjleme yapılarak kalıntılarından ayrıştırılmıştır. Ekstraktlar analize kadar 4°C'de saklanmıştır.

Tablo 3.5 Ultrasound destekli ekstraksiyonun optimizasyonunda bağımsız değişkenlerin seviyesi

Bağımsız değişken	**Seviye**				
	-1.681	-1	0	+1	+1.681
Etanol konsantrasyonu (%)	**50**	58,11	**70**	81,89	**90**
Ekstraksiyon zamanı (dak)	**5**	16,15	**32,50**	48,85	**60**
Sıcaklık (°C)	**30**	38,11	**50**	61,89	**70**

Tablo 3.6 Deneysel yanıtlar için kullanılan Ultrasound metodu ile ekstraksiyon parametrelerinin merkezi deneme desen matriksi

Deneme	**Etanol konsantrasyonu (%) (dizayn kodu)**	**Ekstraksiyon süresi (dak) (dizayn kodu)**	**Sıcaklık (°C) (dizayn kodu)**	**Deneysel yanıt**	
				Toplam fenolik (%)	**Antioksidan aktivite (%)**
1	70,00 (0)	32,50 (0)	30,00 (-1.681)		
2	50,00 (-1.681)	32,50 (0)	50,00 (0)		
3	81,89 (+1)	16,15 (-1)	38,11 (-1)		
4	58,11 (-1)	16,15 (-1)	38,11 (-1)		
5	70,00 (0)	60,00 (+1.681)	50,00 (0)		
6	81,89 (+1)	48,85 (+1)	61,89 (+1)		
7	70,00 (0)	32,50 (0)	50,00 (0)		
8	58,11 (-1)	48,85 (+1)	61,89 (+1)		
9	70,00 (0)	32,50 (0)	50,00 (0)		
10	70,00 (0)	32,50 (0)	50,00 (0)		
11	70,00 (0)	32,50 (0)	70,00 (+1.681)		
12	81,89 (+1)	48,85 (+1)	38,11 (-1)		
13	70,00 (0)	32,50 (0)	50,00 (0)		
14	70,00 (0)	5,00 (-1.681)	50,00 (0)		
15	70,00 (0)	32,50 (0)	50,00 (0)		
16	81,89 (+1)	16,15 (-1)	61,89 (+1)		
17	58,11 (-1)	48,85 (+1)	38,11 (-1)		
18	58,11 (-1)	16,15 (-1)	61,89 (+1)		
19	70,00 (0)	32,50 (0)	50,00 (0)		
20	90,00 (+1.681)	32,50 (0)	50,00 (0)		

3.2.2.5 Validasyon

Optimizasyon sonunda optimum nokta doğrulama denemelerinden elde edilen ortalama sonuçlar ile modelden tahminlenen değerler arasında istatistiksel olarak önemli fark olup olmadığı tek örnek *T* –testi uygulanarak değerlendirilmiştir. Optimum proses modelinden elde edilen sonuçlar ile tahminlenen sonuçlar arasında farkın istatistiki olarak önemli olmaması (p>0,05) modelleme ve optimizasyon çalışmasının başarılı olduğunu gösterecektir.

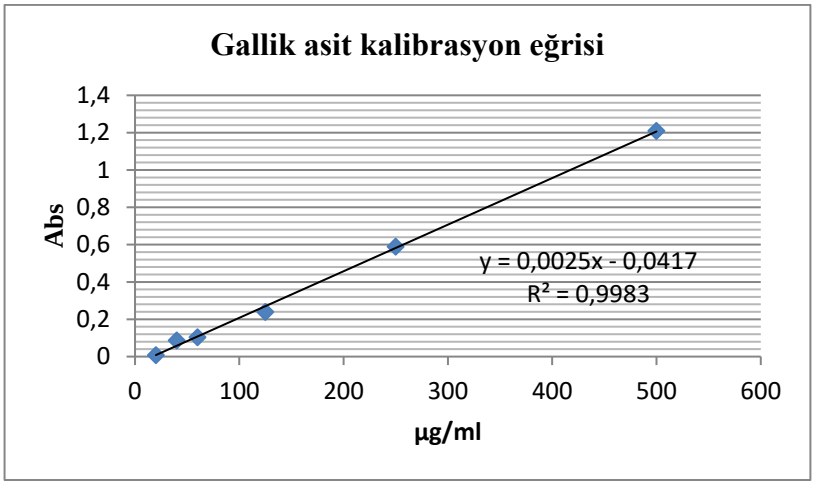
Tablo 3.7 Optimum noktada ortalama deneysel değerlerin modelden tahminlenen değerler ilekarşılaştırılmasında her bir ekstraksiyon için kullanılacak tablo

Yanıt	Tahminlenen Değer	Ortalama Deneysel Sonuç (±Standart Sapma)	Fark	*p*-değeri
Toplam fenolik (%)				
Antioksidan aktivite (%)				

3.2.3 Kestane Propolisinin Karakterizasyon Analizleri

3.2.3.1 Toplam fenolik madde

Örneklerin toplam fenolik madde içeriğinin tespiti amacıyla 3.2.12'de hazırlanan numune ekstraktları Folin-Ciocalteau yöntemi (Shahidi ve Naczk, 1995) kullanılarak belirlenmiştir. 0,1 mL ekstrakt sırasıyla, 0,5 mL Folin-Ciocalteu reaktifi ile (reaktif:su karışımı 1:10 v/v) karıştırılmış, 5 dak. karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra 0,4 mL doymuş sodyum karbonat çözeltisi ve 4 mL saf su ile karıştırılmıştır. Karışım yaklaşık 1 saat oda koşullarında karanlık ortamda bekletilmiş ve 760 nm'de UV-VIS spektrofotometrede absorbansları ölçülmüştür. Örneklerin fenolik madde içerikleri gallik asit eşdeğeri (GAE) üzerinden verilmiştir (Hayta ve Hendek Ertop, 2017; Mattıla vd. 2005; Mıchalska vd. 2007). Bu amaçla hazırlanan gallik asit standartları kullanılarak gallik asit standart kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.



Şekil 3.5 Gallik asit kalibrasyon eğrisi

3.2.3.2 Antioksidan aktivite

Ekstraksiyon için 2 g örnek üzerine 20 ml %80'lik metanol çözeltisi ilave edilerek 37°C'de 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Örnekler 15 dak. 10000 rpm'de santrifüjlenmiş ve supernatant kısımları alınarak filtre kağıdından süzülmüştür ve antioksidatif aktivite tayininde kullanılmak üzere cam şişelere alınmışlardır.

Antioksidan aktivite, serbest radikallerin süpürülmesine dayanan DPPH metodu kullanılarak elde edilen ekstrakt ile yapılmıştır. Antioksidan aktivite tayini, Atasoy ve Hendek Ertop (2021)'e göre modifiye edilmiştir.

Ekstrakt içerisindeki fenolik bileşiklerin DPPH radikali üzerindeki süpürücü etkisini tespit etmek amacıyla 75 µl 100 kat seyreltilmiş ekstrakt ve 1500 µl DPPH çözeltisinden oluşan karışım 15 s vortekste karıştırılıp, 30 dak. karanlıkta oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda UV-VIS spektrofotometrede 517 nm'de absorbansları okutulmuş ve % inhibisyon değerleri aşağıdaki formül ile tespit edilmiştir.

$$\text{İnhibisyon değeri } \% = [\ 1 - (\frac{AS}{AO})]*100 \qquad (3.1)$$

AS : Örnek ekstraktına ait absorbans değeri
A0 : Şahit DPPH çözeltisinin absorbans değeri

3.2.3.3 Fenolik madde kompozisyonu

RP-HPLC-PDA ile yapılan fenolik profil analizinde 25 adet polifenol kullanılarak valide edilen yönteme göre çalışma yapıldı. Yapılan tüm validasyon ve optimizasyon işlemleri (Kara vd. 2022) makalesinde verilmiştir. Üç adet etanolik propolis örneği dietil eter/ etilasetat sıvı-sıvı ekstraskiyonu tekniğine göre daha konsantre hale getirilerek 20 µL olarak C18 kolona verildi. Shimadzu Corporation LC 20AT HPLC ile yapılan çalışmada 70–30% asetonitril-ultrasaf suve 2% asetik asit-ultra saf su mobil faz kullanılarak gradient uygulandı.

3.2.3.4 Uçucu madde içeriği

Uçucu maddelerin ekstraksiyonu için 65 um kalınlığında bir polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB-mavi) tabakası ile bir fibere sahip manuel SPME cihazı (Supelco, Bellafonte, PA, ABD) kullanıldı. Numuneyi içeren şişe parafilm ile kapatıldı. Fiber (DVB/CAR/PDMS), 50°C'de 15 dakika boyunca ekstraktın tepe boşluğuna maruz bırakılmak üzere film tabakası boyunca itildi. Fiber daha sonra analiz için adsorbe edilen uçucu bileşiklerin desorpsiyonu için hemen GC-MS'nin enjeksiyon portuna yerleştirildi. SPME (katı faz mikroekstraksiyon) yöntemiyle propolisin içindeki uçucu maddeleri fibere toplayıp GC-MS cihazına enjekte edildi.

Tablo 3.8 Uçucu bileşik analizi için GC-MS koşulları

GC KOŞULLARI	
Cihaz	Shimadzu GCMS QP 2010 ULTRA
Kolon	RXİ-5MS Kapiler Kolon (30m ; 0.25 mm; 0.25 μm)
Taşıyıcı Gaz	Helyum (1ml/dk akışı)
Kolon Fırını Sıcaklığı	50˚C
Enjeksiyon Sıcaklığı	250˚C
Basınç	100 kPa
Fırın SıcaklıkProgramı	50˚C'de 5 dk, 50˚C'den 270˚C'ye 5˚C/dk artışla, 270 ˚Cde 5 dk, Toplam 54 dk
İnterface Sıcaklığı	250˚C
Iyon Kaynağı Sıcaklığı	200˚C
SPME; Fiber Tipi	DVB/CAR/PDMS 50/30um

3.2.3.5 Mineral madde kompozisyonu

Numuneler önce Isolab marka öğütücüde steril bir şekilde öğütülüp homojen hale getirilmiştir. Daha sonra Mikrodalga Yakma Sistemi (CEM MARS 6) kullanılarak yakılmıştır. Cihazın aplikasyon bilgilerine göre çalışılacak numune için prosedürde belirtildiği kadar numune tartılıp üzerine 10ml HNO_3 (67% v/v) ilave edilmiştir. Mikrodalga kaplarının ağızları sıkıca kapatılarak yakma için sıcaklık programı ayarlanmıştır. Analizi yapılacak numune için belirlenmiş sıcaklık programı prosedürüne göre 45 bar basınçta ilk 15 dk 200^oC ye çıkılmış daha sonra 15 dk 200^oC de sabit tutulmuştur. İşlem sonunda çözeltilerin oda sıcaklığına soğuması beklenmiştir. Daha sonra çözelti haline gelen numunelerin üzeri ultra saf su ile tamamlanmıştır. Seyreltme faktörü hesaplanarak ölçüm sonunda hesaba katılmıştır. İçinde partikül kalmayacak şekilde mikrofiltrelerden süzülür ve direk işleme alınır. ICP-OES cihazında metallerin konsantrasyonları ölçülürken cihaz kendiliğinden üç ölçüm yapmaktadır (n=3). Daha sonra bu üç ölçümün ortalaması alındı ve standart sapma hesaplandı. ICP-OES için temin edilen multielement standart stok çözeltisi (Merck, Germany) kalibrasyon standartlarının hazırlanmasında kullanılmıştır. Standart stok çözeltisi istenilen elementlere göre farklılık göstermektedir. Analize uygun standart çözelti seçilir. Hazırlanan örnekler ve kalibrasyon çözeltileri Spectro Blue marka ICP-OES cihazında analiz edilmiştir.

3.2.4 Fonksiyonel Karakterizasyon

Elde edilen propolis ekstraktlarının soğuk ve sıcak olmak üzere 2 tip üründe denemesi yapılarak renk, antioksidan aktivite, toplam fenolik içeriklerine bakılmış ve duyusal analiz gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.1 Soğuk ürün denemesi

Optimize kestane propolis ekstraktları çiçek ve kestane ballarına %0; 1; 2; 4 olarak farklı oranlarda ilave edilerek homojen karışımlar elde edilmiştir. Hazırlanan bal karışımlarının antioksidan aktivite, toplam fenolik, renk ve duyusal analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.2 Sıcak ürün denemesi

Optimize kestane propolis ekstraktlarının etkilerini çoklu bileşene sahip bir gıda modelinde belirlemek, aynı zamanda ısıl işlemin biyoaktivite üzerindeki etkisini tespit etmek amacıyla, optimize ekstraktlar %0; 1; 2; 4 olmak üzere farklı oranlarda temel kek formülasyonuna ilave edilerek homojen karışımlar elde edilmiş ve ürünler aynı proses koşullarında pişirilerek hazırlanmıştır. Elde edilen ürünlerin antioksidan aktivite, toplam fenolik, renk ve duyusal analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.2.1 Kek yapımı

Kek yapımı için Şeker vd. (2016) kullandıkları metod modifiye edilerek uygulanmıştır. Formülasyon; 60 gr şeker 58,9 gr yumurta ile mikserde (Kitchenaid, K5Ai USA) 2 dk 65 rpm'de karıştırılmıştır. Üzerine 40 ml ayçiçek yağı ve 45 gr süt eklenerek karıştırmaya devam edilmiştir. En son 100 gr un ve 5,78 gr kabartma tozu eklenerek oluşan kek hamuru kek kalıplarına alınarak önceden ısıtılmış fırında 175ºC'da ort. 25 dk süreyle pişirilmiştir. Kontrol kekine hiç propolis katılmamıştır. Diğer keklere optimum ekstraktlar her 3 yöntem içinde %0; 1; 2; 4 oranlarında eklenip karıştırılmıştır.

3.2.4.2.2 Renk tayini

Renk değerleri kolorimetrik olarak (3nh Colorımeter, NR145, China) kek yüzeyinde 5 noktadan ölçüm yapılarak ve değerlerin ortalaması alınarak belirlenmiştir. Ölçümlenen L^*, a^* ve b^* değerleri kullanılarak örneklerin L^* (parlaklık), a^* (kırmızılık), b^* (sarılık) değerlerindeki değişimler belirlenmiştir (Rizzellovd, 2014).

Optimize kestane propolisi ilaveli bal örneklerinin renk yoğunluğunun belirlenmesinde Beretta vd., (2005) tarafından geliştirilen bal örneklerinin net absorbansının belirlenmesi metodu kullanılmıştır. Daha önce %50 (w/v)'lik olacak şekilde ayrı ayrı hazırlanmış olan propolisli bal numunelerinin metanol ve su ekstraktları Whatman 1 filtre kağıdından süzüldükten sonra 450 ve 720 nm'de spektrofotometre kullanılarak absorbansları ölçülmüştür. Absorbanslar arasındaki farktan aşağıdaki formül kullanılarak renk yoğunluğu mAU hesaplanmıştır.

Renk Yoğunluğu (mAU) = (ABS450-ABS720) x 1000 (3.2)

3.2.4.2.3 Duyusal değerlendirme

Kek üretimi sonrası 12 adet propolis ilaveli kekin duyusal değerlendirilmesi yapılmıştır. Bu amaçla duyusal değerlendirme kriterlerine dair bir form hazırlanmış, örneklerin genel yapı ve lezzet profiline ait sonuçlar karşılaştırılmıştır. 10 yarı eğitimli panelist seçilerek, örneklerin duyusal değişimleri değerlendirilmiştir. Değerlendirme formunda 5 puanlık hedonik skala kullanılmıştır. İstenen kek kalite özellikleri Tablo 3.8'de verilmiştir.

Tablo 3.9 Kek kalite özellikleri ve puanlama skalası

DIŞ ÖZELLİKLER	
Şekil Simetrisi	Düzgün ve simetrik olmalı, basıklık ve çökme olmamalı
Renk	Kendineözgüveuniformrenkteolmalı
Pişme Düzgünlüğü	Tüm yüzeyler düzgün ve eşit kızarmış olmalı
Görünüş	İnce ve kolay parçalanabilir olmalı
İÇ ÖZELLİKLER	
Tatlılık	Örneklerin damakta bıraktığı tatlılığın hissedilme düzeyi
Doku (Gözenek Yapısı)	Küçük, ince, homojen olmalı
Çiğneme Özellikleri	Hamurumsu ve yapışkan olmamalı
İç renk	Kendine özgü ve uniform renkte olmalı
Tatlılık	Şekertadıbaskınlığıvehissedilmedüzeyi
Lezzet	Örneklerin yuttuktan sonra ağızda bıraktığı tat düzeyi
KABULEDİLEBİLİRLİK DÜZEYİ	
5puan	Çok beğendim
4puan	Beğendim
3puan	Orta derecede beğendim
2puan	Az beğendim
1puan	Hiç beğenmedim

3.2.5 İstatistiksel Analiz

Deneylerde elde edilen analiz sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi SPSS 17.0.1 paket programı (SPSS Inc., Chicago, Illinois, US) kullanılarak yapılmıştır. Optimizasyon sonunda optimum nokta doğrulama denemelerinden elde edilen ortalama sonuçlar ile modelden tahminlenen değerler arasında istatistiksel olarak

önemli fark olup olmadığı tek örnek T –testi uygulanarak belirlenmiştir. Analiz değerlendirmelerinde ise çoklu varyans analizine tabi tutulan veri ortalamaları arasındaki fark $p<0,05$ anlamlılık düzeyinde Tukey çoklu karşılaştırma testi yapılarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Ekstraksiyon Parametrelerinin Optimizasyonu

Kestane propolisinde ekstraksiyon yöntemlerinde hangi bağımsız faktörün etkili olduğunu belirlemek amacıyla 3 farklı ekstraksiyon metodunun proses parametreleri bağımsız faktör olarak ele alınmış ve bunların optimizasyonu amacıyla Yüzey Yanıt Yöntemi uygulanmıştır. Maserasyon, reflüks ve ultrasound destekli ekstraksiyon yöntemlerinin proses parametreleri için (süre, sıcaklık vb) faktör seviyeleri belirlemiş ve buna göre de Design Expert yazılımı ile deneme desenleri oluşturulmuştur (Tablo 4.1, Tablo 4.2, Tablo 4.3)

Tablo 4.1 Maserasyon ekstraksiyona ait bağımsız faktör ve yanıtlar

Deneme	Etanol konsantrasyonu (%)	Ekstraksiyon süresi (saat)	Toplam fenolik (mg GAE/100ml)	Antioksidan aktivite (% inhibisyon)
1	90,00	39,00	680,96	72,57
2	70,00	39,00	793,30	70,65
3	50,00	39,00	422,50	43,31
4	84,14	62,33	899,60	78,74
5	84,14	15,67	893,52	74,43
6	55,86	15,67	753,17	61,53
7	70,00	72,00	966,40	80,53
8	55,86	62,33	572,90	56,29
9	70,00	39,00	787,41	63,54
10	70,00	39,00	841,60	68,37
11	70,00	39,00	751,39	70,13
12	70,00	6,00	760,29	74,07
13	70,00	39,00	668,80	66,52

Elde edilen toz propolislerden (farklı lokasyonlardan elde edilen) eşit miktarda karıştırılarak Kastamonu yöresini temsil edecek şekilde ortak bir toz propolis karışımı elde edilmiştir. Maserasyon için 13, Refluks için 20 ve Ultrasound destekli ekstraksiyon için 20 olmak üzere toplamda 53 adet ekstraksiyon denemesi gerçekleştirilmiştir. Ultrasound ekstraksiyon için ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon sıcaklığı ve etanol konsantrasyonu; Maserasyon için ekstraksiyon süresi ve etanol

konsantrasyonu; Reflüks için de ekstraksiyon süresi, sıcaklığı ve etanol konsantrasyonu değişken faktörleri kullanılmıştır.

Tablo 4.2 Reflüks ekstraksiyona ait bağımsız faktör ve yanıtlar

Deneme	Etanol konsantrasyonu (%)	Ekstraksiyon süresi (dak)	Sıcaklık (°C)	Toplam fenolik (mg GAE/100ml)	Antioksidan aktivite (% inhibisyon)
1	70,00	85,00	60,00	705,62	71,46
2	70,00	85,00	60,00	758,59	66,69
3	58,11	40,40	77,84	718,34	63,42
4	81,89	129,60	42,16	740,80	75,81
5	90,00	85,00	60,00	497,14	53,96
6	81,89	40,40	77,84	570,87	60,20
7	70,00	85,00	60,00	763,68	74,66
8	70,00	85,00	90,00	406,88	45,23
9	58,11	129,60	42,16	600,79	54,97
10	70,00	85,00	60,00	718,77	69,86
11	70,00	85,00	60,00	711,98	68,76
12	81,89	40,40	42,16	705,62	73,75
13	70,00	85,00	30,00	750,97	75,98
14	58,11	129,60	77,84	457,73	47,00
15	70,00	85,00	60,00	617,91	70,99
16	70,00	10,00	60,00	752,66	70,21
17	50,00	85,00	60,00	319,16	37,27
18	58,11	40,40	42,16	537,82	48,60
19	81,89	129,60	77,84	631,47	53,91
20	70,00	160,00	60,00	708,59	64,27

Tablo 4.3 Ultrasound destekli ekstraksiyona ait bağımsız faktör ve yanıtlar

Deneme	Etanol konsantrasyonu (%)	Ekstraksiyon süresi (dak)	Sıcaklık (°C)	Toplam fenolik (mg GAE/100ml)	Antioksidan aktivite (%inhibisyon)
1	70,00	32,50	30,00	533,20	75,00
2	50,00	32,50	50,00	399,76	49,36
3	81,89	16,15	38,11	512,39	64,02
4	58,11	16,15	38,11	498,41	58,07
5	70,00	60,00	50,00	664,30	76,10
6	81,89	48,85	61,89	507,31	73,55
7	70,00	32,50	50,00	598,84	69,92

Tablo 4.3'ün devamı

Deneme	Etanol konsantrasyonu (%)	Ekstraksiyon süresi (dak)	Sıcaklık (°C)	Toplam fenolik (mg GAE/100ml)	Antioksidan aktivite (%inhibisyon)
8	58,11	48,85	61,89	430,69	50,97
9	70,00	32,50	50,00	566,10	73,49
10	70,00	32,50	50,00	589,94	67,42
11	70,00	32,50	70,00	523,17	81,97
12	81,89	48,85	38,11	704,40	82,08
13	70,00	32,50	50,00	700,54	80,49
14	70,00	5,00	50,00	462,70	55,87
15	70,00	32,50	50,00	664,52	81,48
16	81,89	16,15	61,89	434,26	68,07
17	58,11	48,85	38,11	487,22	59,99
18	58,11	16,15	61,89	383,82	49,70
19	70,00	32,50	50,00	605,20	73,48
20	90,00	32,50	50,00	583,58	67,73

Yazılım programının Merkezi Deneme Deseni (Central Composite Design) öngördüğü deneme dizaynları uygulanmış, elde edilen 53 örnekte Yanıt (Response) olarak Antioksidan aktivite (% inhibisyon) ve Toplam Fenolik Madde miktarı belirlenmiştir. Her bir ekstraksiyon için belirlenen antioksidan aktivite ve toplam fenolik madde yanıtları Design Expert programı ile analiz edilerek hangi fonksiyonun önerildiği belirlenmiştir.

Denemeler sonucu elde edilen her bir örneğin toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite tayinleri (% inhibisyon) yapılmıştır. Ede edilen sonuçlar program tarafından işlenmiş ve her bir eksraksiyon yöntemine dair Tablo 4.3'deki veriler elde edilmiştir. Program tarafından verilerin analizi sonucu hangi fonksiyonun önerildiği belirlenmiştir. Bu belirleme yapılırken de etanol konstanrasyonu, ekstraksiyon süresi ve sıcaklık bağımsız faktörlerinin toplam fenolikmadde içeriği ve antioksidan aktivite değerleri için "Ardışık Model Kareler Toplamı (Tip I)" ve "Model Uyumsuzluğu" testleri yapılmış ve her bir fonksiyon için standart sapma, R^2, düzeltilmiş R^2 ve öngörülen R^2 değerleri göz önünde bulundurulmuştur.Bu değerler yazılım tarafından karşılaştırılarak önerilen fonksiyon program tarafından belirlenerek her bir fonksiyon için istatiksel parametreler hesaplatılmıştır (Tablo 4.4).

Bir sonraki aşamada, önerilen fonksiyonların hangisinin en iyi modelleme yaptığını belirlemek için ANOVA tabloları ayrı ayrı oluşturulup karşılaştırılmıştır. En iyi modellemeyi yapan fonksiyon seçilirken istatistiksel parametrelerde;

• Model; Önemli,
• Model uyumsuzluğu; Önemsiz "P>0,05",
• Bütün model terimleri için; "(Prob>F) değerleri <0,05",
• R^2; ~1,
• Düzeltilmiş R^2; ~1,
• Öngörülen R^2; ~1,
• Düzeltilmiş R^2 ~ Öngörülen R^2,
• Varyasyon Katsayısı (% V.K.); minumum olması öngörülmüştür (Hendek Ertop, 2014).

Tablo 4.4 Maserasyon, Ulrasound ve Refluks ekstraksiyon yöntemlerinde Model seçimi ve Model Uyumsuzluğu testi için belirlenen *p* değerleri (a); seçilen fonksiyona dair varyans analizi (ANOVA) tablosu (b)

		Maserasyon		**Ultrasound**		**Refluks**	
		Toplam fenolik	**Antioksidan aktivite**	**Toplam fenolik**	**Antioksidan aktivite**	**Toplam fenolik**	**Antioksidan aktivite**
Model seçimi	Quadratic	**0,0277**	**0,0006**	**0,0104**	**0,0073**	**0,0037**	**0,0002**
	Lineer	0,1147	0,0075	0,0216	0,0199	0,2144	0,0501
	Cubic	0,1658	0,3557	0,3172	0,4388	0,1861	0,0876
	Model Uyumsuzluğu	0,1497	0,6065	0,3738	0,3976	0,1093	0,0676
Model ve bağımsız değişken faktörler	Model	**0,0294**	**0,0001**	**0,0077**	**0,0055**	**0,0098**	**0,0002**
	A-Etanol konsantrasyonu	**0,0130**	**<0,0001**	**0,0084**	**0,0011**	**0,0496**	**0,0007**
	B-Ekstraksiyon süresi	0,6552	0,3173	**0,0106**	**0,0207**	0,5489	0,1657
	C-Sıcaklık	-	-	**0,0465**	0,6566	**0,0199**	**0,0006**
	AB	0,3297	0,1202	0,1725	0,2570	0,2064	0,6488
	AC	-	-	0,5199	0,4636	0,2239	0,0067
	BC	-	-	0,7049	0,4530	0,1997	**0,0311**
	A^2	**0,0316**	**0,0019**	**0,0054**	0,0022	**0,0008**	**<0,0001**
	B^2	0,0933	**0,0023**	0,1035	0,0366	0,3890	0,6390
	C^2	-	-	**0,0243**	0,7046	0,1104	**0,0309**

** p<0,05 istatistikselolarakönemliolduğunugöstermektedir

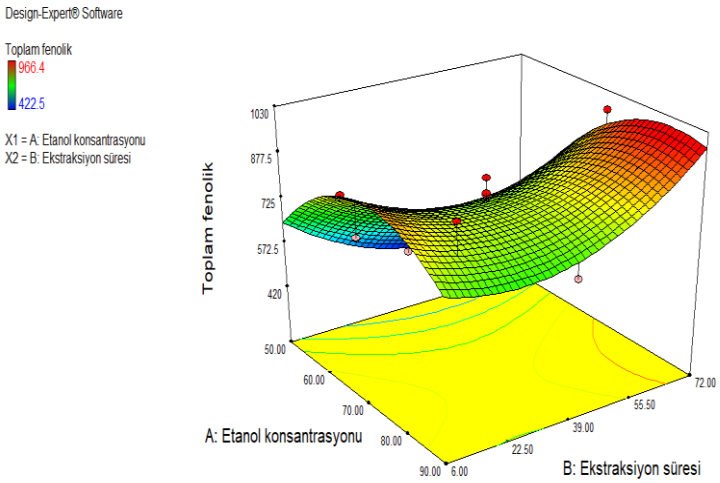
(a)

Tablo 4.4'ün devamı

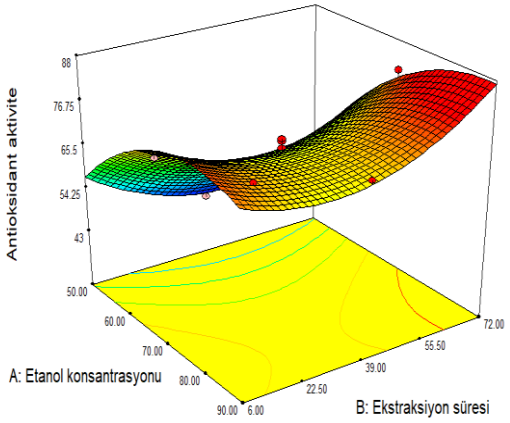
	Maserasyon		Ultrasound		Refluks	
	Toplam fenolik	**Antioksidan aktivite**	**Toplam fenolik**	**Antioksidan aktivite**	**Toplam fenolik**	**Antioksidan aktivite**
R^2	0,78	**0,96**	0,83	0,84	0,82	**0,92**
Düzeltilmiş R^2	0,62	0,93	0,67	0,70	0,65	0,86
Varyasyon kat sayısı (%)	11,81	3,98	10,17	8,82	12,11	7,04
Intercept	+768,50	+67.84	+621,74	+74,51	+710,94	+70,32
A-Etanol konsantrasyonu	+104,07	+9.59	+48,87	+7,31	+46,38	+5,69
B-Ekstraksiyon süresi	+14,66	+1.03	+46,85	+4,45	-12,89	-1,78
C-Sıcaklık, %	-	-	-33,92	-0,74	-57,50	-5,88
AB	+46,59	+2.38	+28,67	2,55	+36,68	+0,73
AC	-	-	-13,01	1,61	-35,19	-5,29
BC	-	-	-7,61	-1,65	-37,27	-3,89
A^2	-90,32	-4.92	-51,44	-6,44	-95,80	-8,21
B^2	+65,49	+4.76	-26,04	-3,80	+18,21	-0,56
C^2	-	-	-38,53	0,62	-35,42	-2,90

(b)

Maserasyon ekstraksiyonda toplam fenolik içerik ve antioksidan aktivite için Tablo 4.4'de görüleceği üzere Quadratic (2. dereceden) fonksiyon istatistiksel olarak önemli (p<0,05), "Model uyumsuzluğu" ise önemsiz (p>0,05) bulunmuş ve program tarafından önerilmiştir. Ayrıca her iki biyoaktif özellik açısından Etanol konsantrasyonu önemli (p<0,05) bulurken, ekstraksiyon süresi istaistiksel olarak önemli bulunmamıştır (p>0,05). Bu durumda "ekstraksiyon süresinin gerçekten de önemli olmamasından kaynaklanacağı gibi, ekstraksiyon süresi için seçilen aralığın (6-72 saat) yeterli etkiyi gösterebilecek faktör aralığında seçilmemesinden kaynaklanabilir. Bunu görmek için 3 boyutlu grafiğin yorumlanması gereklidir. Sistemi modelleyen en iyi fonksiyonlar belirlendikten sonra üç boyutlu yüzey yanıt grafikleri yazılım programı aracılığıyla elde edilmiştir.



(a)



(b)

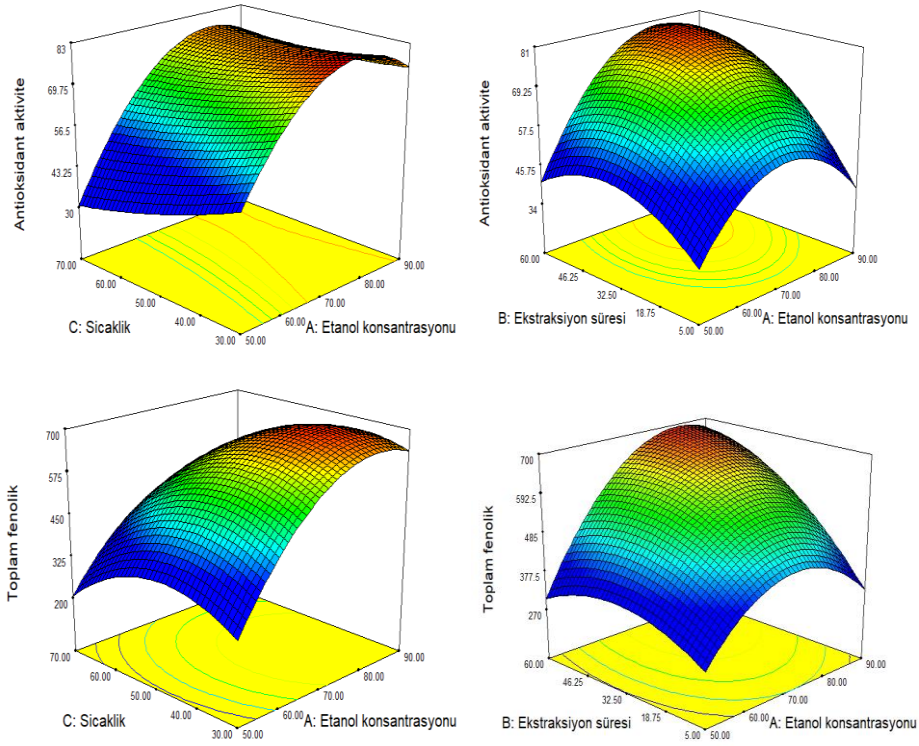
Şekil 4.1 Maserasyon ekstraksiyonda Etanol konsantrasyonu ve Ekstraksiyon süresi bağımsız değişkenlerinin Antioksidan Aktivite (a) ve Toplam Fenolik İçerik (b)'e etkilerini gösteren yüzey yanıt grafikleri

Desing Expert; "Sayısal optimizasyon, grafiksel optimizasyon, nokta tahmini" olmaküzere üç farklı optimizasyon gerçekleştirebilen bir programdır. Optimizasyonun amacı, istenilen cevabın elde edilmesini sağlayacak parametrelerin kesin değerlerinin belirlenmesini sağlamaktır. Yapılan çalışmada "sayısal optimizasyon" kullanılmıştır. Program tarafından tümyanıtlar (Toplam Fenolik ve Antioksidan Aktivite) bir arada değerlendirilmiş, yanıtların "maksimizasyonu"nun istendiği "İstenirliği=1" (Desirability=1) olan çözümler program tarafından önerilmiştir. Maserasyon ekstraksiyon için optimizasyon sonucu etanol konsantrasyonu %78,46; ekstraksiyon süresi 71,05 saat olması durumunda toplam fenolik madde 980,39 mg/100 ml ve antioksidan aktivite %84,16 olarak belirlenmiştir.

Yukarıdaki şekilde görüleceği üzere maserasyonda bu çalışma için belirlenen 6-72 saat aralığı istatistiki olarak önemli bulunmamakla birlikte sürenin uzatılması durumunda hem toplam fenolik hem de antioksidan aktivitenin artma eğiliminde olduğu belirlenmiştir.

Ultrasound destekli ekstraksiyonda, Tablo 4.4'de görüleceği üzere toplam fenolik ve antioksidan aktivite için Quadratic (2. derece) fonksiyon istatistiksel olarak önemli (p<0,05), "Model uyumsuzluğu" ise önemsiz (p>0,05) bulunmuş ve program tarafından önerilmiştir. Ayrıca her iki biyoaktif özellik açısından etanol konsantrasyonu veekstraksiyon süresi önemli (p<0,05) bulunurken, sıcaklık bağımsız değişkeni yalnızca toplam fenolik içerik açısından istatistiksel olarak önemli (p<0,05) bulunmuşlardır. Sistemi modelleyen en iyi fonksiyonlar belirlendikten sonra üç boyutlu yüzey yanıt grafikleri, yazılım programı aracılığıyla elde edilmiştir.

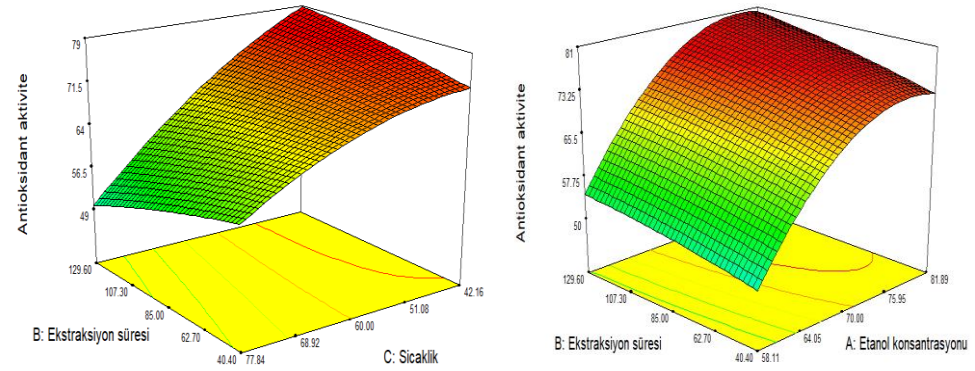
Program tarafından tüm yanıt (toplam fenolik ve antioksidan aktivite) değerleri bir arada değerlendirilmiş, yanıtların "maksimizasyonu" nun istendiği çözümler sunulmuştur. Ultrasound destekli ekstraksiyon için optimizasyon sonucu etanol konsantrasyonu %79,60; ekstraksiyon süresi 53,03 dak ve sıcaklık 37,42°C olması durumunda 695,91 mg/100 ml toplam fenolik madde ve %80,68 antioksidan aktivite olarak belirlenmiştir.



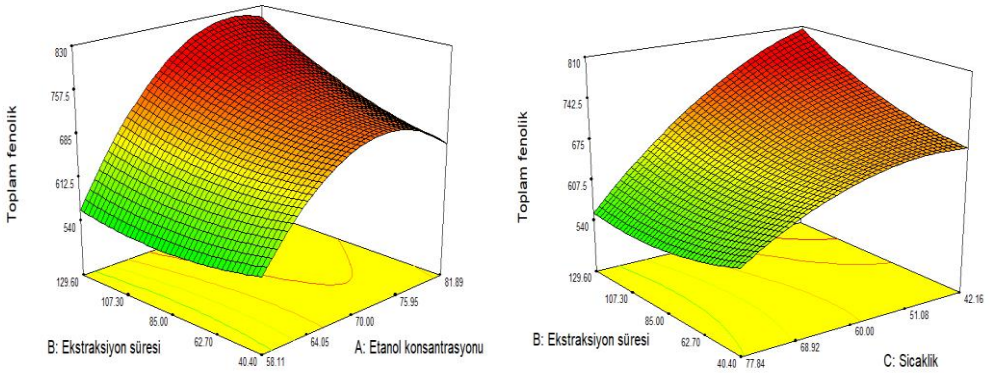
Şekil 4.2 Ultrasound destekli ekstraksiyonda Etanol konsantrasyonu, Ekstraksiyon süresi ve Sıcaklık bağımsız değişkenlerinin Antioksidan Aktivite (a) ve Toplam Fenolik İçerik (b)'e etkilerini gösteren yüzey yanıt grafikleri

Ultrasound destekli ekstraksiyonda toplam fenolik içerik ve antioksidan aktivitequadratic fonksiyon göstermiştir. Deneme deseninde öngördüğümüz faktör seviyeleri açısından uygulama süresinin en az 59,12 dak (ort 1 saat) olması gerektiği, sıcaklığın ise 40 ^{0}C düzeyinde olması gerektiği görülmektedir.

Refluks ekstraksiyonda toplam fenolik içerik ve antioksidan aktivite için Tablo 4.4'de görüleceği üzere Quadratic model istatistiksel olarak önemli (p<0,05), "Model uyumsuzluğu" ise önemsiz (p>0,05) bulunmuş ve program tarafından önerilmiştir. Ayrıca her iki biyoaktif özellik açısından etanol konsantrasyonu ve sıcaklık önemli bulurken, ekstraksiyon süresi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Bu durum "ekstraksiyon süresinin gerçekten de önemli olmamasından kaynaklanacağı gibi, ekstraksiyon süresi için seçilen aralığın (10-160 dak) yeterli etkiyi gösterebilecek faktör aralığında seçilmemesinden kaynaklanabilir. Bunu görmek için 3 boyutlu grafiğin yorumlanması gereklidir. Sistemi modelleyen en iyi fonksiyonlar belirlendikten sonra üç boyutlu yüzey yanıt grafikleri, yazılım programı aracılığıyla elde edilmiştir.



(a)



(b)

Şekil 4.3 Refluks ekstraksiyonda Etanol konsantrasyonu, Ekstraksiyon süresi ve Sıcaklık bağımsız değişkenlerinin Antioksidan Aktivite (a) ve Toplam Fenolik İçerik (b)'ye etkilerini gösteren yüzey yanıt grafikleri

Program tarafından tüm yanıt (toplam fenolik ve antioksidan aktivite) değerleri bir arada değerlendirilmiş, yanıtların "maksimizasyonu"nun istendiği "İstenirliği=1" (Desirability=1) olan çözümler sunulmuş, reflüks ekstraksiyon için optimizasyon sonucu etanol konsantrasyonu %80,64; ekstraksiyon süresi 117,44 dak ve sıcaklık 38,38°C olması durumunda 788,556 mg/100 ml toplam fenolik madde ve %79,76 antioksidan aktivite olarak belirlenmiştir.

4.2 Maserasyon, Refluks ve Ultrasound Destekli Ekstraksiyon Yöntemi Optimizasyon Sonuçlarının Deneysel Doğrulanması

Her üç ekstraksiyon yönteminin optimizasyonu sonucu program tarafından önerilen işlem parametreleri (*maserasyon*, etanol konsantrasyonu %78,46; ekstraksiyon süresi 71,05 saat; *refluks*, etanol konsantrasyonu %80,64, ekstraksiyon süresi 117,44 dak ve

sıcaklık 38,38°C; *ultrasound destekli*, etanol konsantrasyonu %82,49; ekstraksiyon süresi 59,12 dak ve sıcaklık 40,53°C) ile hazırlanan etanolik kestane propolis ekstraktlarında toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan aktivite analizleri gerçekleştirilerek, modelden tahminlenen değerler ile gerçekleşenler arasındaki farkın önem düzeyi istatistiki olarak belirlenmiştir. Elde edilen veriler Tablo 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.5 Optimum noktada ortalama deneysel değerlerin modelden tahminlenen değerler ile karşılaştırılması

Ekstraksiyon	**Yanıt**	**Tahminlenen Değer**	**Ortalama Deneysel Sonuç (±Standart Sapma)**	**Fark**	***p*-değeri**
Maserasyon	Toplam fenolik (mg/100 ml)	980,39	977,5±4,11	-2,89	0,610
	Antioksidan aktivite (%)	84,16	88,61±2,05	-4,45	0,275
Refluks	Toplam fenolik (mg/100 ml)	788,56	917,5±11,02	+128,94	0,054
	Antioksidan aktivite (%)	79,76	79,50±1,95	+0,26	0,916
Ultrasound destekli	Toplam fenolik (mg/100 ml)	695,91	812,5±10,18	+116,59	0,055
	Antioksidan aktivite (%)	80,68	75,22±2,17	-5,46	0,241

Her bir yanıt için, optimum nokta doğrulama denemelerinden elde edilen ortalama sonuçlar ile modelden tahminlenen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olup olmadığı SPSS 17.0.1 programı kullanılarak tek örnek *t* –testi ile gerçekleştirilmiştir. Doğrulama denemelerinden elde edilen sonuçlar ile modeldentahminlenen değerler arasında, istatistiksel olarak önemli bir farkın olmadığı ($p>0,05$) belirlenmiştir.

4.2.1 Optimizasyonu Sonucu Elde Edilen Kestane Propolis Ekstraktların Karakterizasyonu

4.2.2 Kestane Propolis Ekstraktlarının Biyoaktif Nitelikleri

4.2.2.1 Kestane propolis ekstraktlarının toplam fenolik, antioksidan aktivite içerikleri

Bitkisel kaynaklı ikincil metabolitler olan ve birçok doğal ürünlerde bulunan fenolik bileşikler ürünün antioksidan aktivitesinden sorumlu olan ajanlardır (do Nascimento

vd., 2016; Zhang vd., 2018). Maserasyon, refluks ve ultrasound destekli ekstraksiyon optimizasyonu ile elde edilen kestane propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite miktarları Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6 Kestane propolis ekstraktlarının bazı biyoaktif nitelikleri

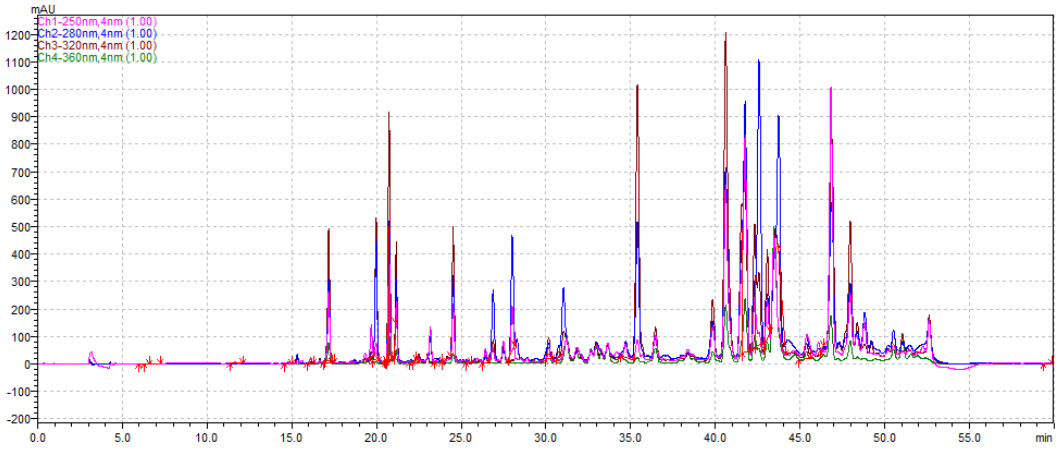
Ekstraksiyon	**Toplam fenolik madde (mg/100 ml)(mg/g)**		**Antioksidan aktivite (% inhibisyon)**
Maserasyon	977,50±4,11	97,75±0,41	88,61±2,05
Refluks	917,50±6,02	91,75±0,60	79,50±1,95
Ulasound destekli	812,50±10,18	81,25±1,02	75,22±2,17

Propolisin önemli bileşenlerinden olan fenolik madde miktarının tespiti için en yüksek fenolik madde içeriğine sahip olan ekstraksiyon metodu maserasyon ekstraksiyon yöntemi olduğu istatistiksel olarak tespit edilmiştir. Andrade vd. (2017) propolisin toplam fenolik içeriğini belirlemek için yaptıkları çalışmalarında Brezilya'daki farklı renklere sahip olan propolislerin toplam fenolik bileşenlerinin 55,74-91,32 mg GAE/g propolis aralığında olduğunu bulmuşlardır. Azerbeycan'da propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriğinin 10,94-79,23 mg GAE/g propolis olduğu tespit edilmiştir (Çalışkol, 2013). Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden toplanan propolislerin toplam fenlik madde içeriği 19,67-141,17 mg GA/g propolis aralığında bulunmuştur (Çakıroğlu, 2010). Keskin vd. (2018), yaptıkları çalışmada Anadolu propolislerinin toplam fenolik madde miktarının ham propolis için 16,13 – 178,34 mg GAE/g arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Dünyanın 16 farklı bölgesinden toplanan propolis örneklerinin toplam fenolik madde miktarlarının en düşük Tayland bölgesinde 31 mg GAE/ g propolis ve en yüksek Çin bölgesinde 299 mg GAE/ g propolis arasında değiştiğini bildirmişlerdir (Kumazawa vd. 2004).

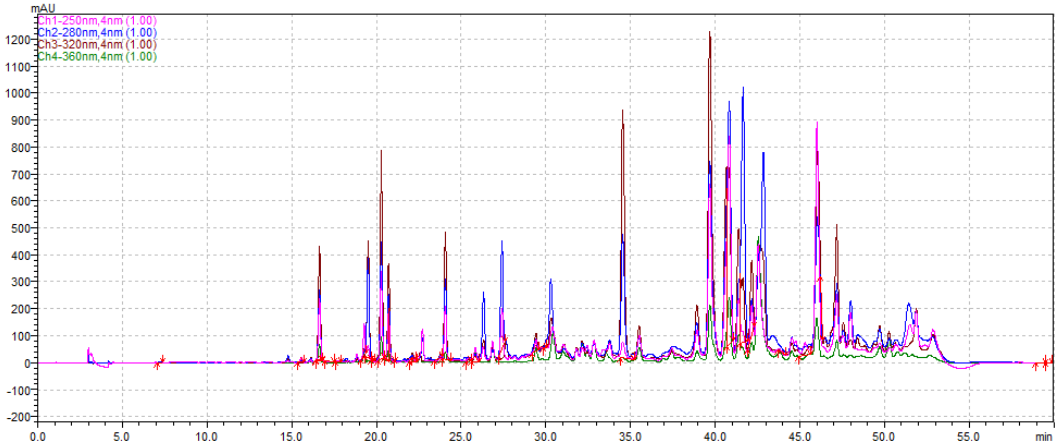
Türkiye ve dünyanın farklı bölgelerinden elde edilen propolislerin toplam fenolik madde miktarlarına ait bulgular incelendiğinde bulduğumuz sonuçların daha önceden yapılan çalışmalarla benzer nitelikte olduğunu ve literatürle uyumlu olduğu belirlenmiştir. Propolisin toplandığı coğrafi konum, bitki örtüsü, baskın flora, iklim, propolisin toplanma sezonu, ekstraksiyon çeşitleri ve uygulanan farklı yöntemler gibi çeşitli etmenlerin toplam fenolik madde içeriğinin değişkenliğine neden olduğu söylenebilir.

4.2.2.2 Kestane propolis ekstraktlarının fenolik madde içerikleri

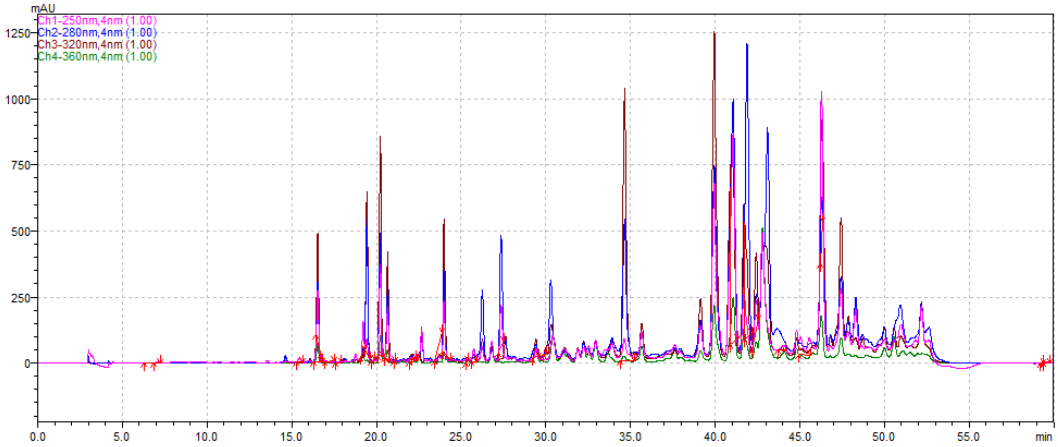
Propolis 300'den fazla fenolik maddeye sahiptir ve insan metabolizmasında bu fenolikler önemli bir yere sahiptir. Fenolik maddelerin belirlenmesi ve kullanılabilir formda olması için propoliste farklı yöntemler kullanılmıştır. Bu yöntemlerden en sık kullanılan yöntemler kromatografik analizler olmuştur. Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda tek bir analiz işlemiyle en çok sayıda fenolik standardının analizleri yapılabilen RP-HPLC-PDA analizi ile kestane propolisindeki fenolik madde kompozisyonu incelenmiştir. Optimize ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilmiş kestane propolis ekstraktlarının fenolik madde içeriği Tablo 4.7'de bu verilere ait kromotogramlar da Şekil 4.4'de verilmiştir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.4 Maserasyon (a), Refluks (b) ve Ultrasound destekli (c) ekstrasiyon ile hazırlanan kestane propolis ekstraktlarının RP-HPLC-PDA analizi ile belirlenen fenolik madde kompozisyonu

Tablo 4.7 Kestane propolis ekstraktlarının HPLC ile belirlenen fenolik madde kompozisyonu

	Maserasyon ekstraksiyon		Refluks ekstraksiyon		Ulrasound destekli ekstraksiyon	
	µg fenolik /ml numune	Alıkonma zamanı	µg fenolik /ml numune	Alıkonma zamanı	µg fenolik /ml numune	Alıkonma zamanı
Gallik Asit	-		4,468	7,24	4,668	7,1
Protokatekuik Asit	-		-		-	
Klorojenik Asit	-		-		-	
p-OH Benzoik Asit	6,628	16,13	7,152	15,57	6,232	15,45
Epikateşin	-		-		-	
Kafeik Asit	210,721	17,17	190,694	16,64	208,94	16,52
Şiringik Asit	-		-		-	
m-OH Benzoik Asit	-		-		-	
Rutin	-		-		-	
Ellagik Asit	432,404	19,7	416,036	19,27	400,666	19,22
p-Kumarik Asit	194,356	19,98	174,396	19,51	216,034	19,43
Ferulik Asit	453,406	20,74	412,556	20,29	424,05	20,23
Mirisetin	-		-		-	
Resveratrol	-		-		-	
Daidzein	-		-		-	
Luteolin	-		-		-	
Kuersetin	32,03	26,43	31,866	25,83	31,936	25,74
t-Sinnamik Asit	117,868	28,02	106,724	27,41	111,902	27,35
Apigenin	41,108	30,17	38,402	29,43	38,686	29,41
Hesperetin	23,956	30,76	17,884	30,05	15,87	30,02
Ramnetin	-		-		-	
Krisin	763,852	41,76	668,454	40,83	764,674	41,07
Pinosembrin	740,354	42,6	687,05	41,66	726,41	41,9
CAPE	292,89	43,08	263,696	42,18	283,464	42,44
Curcumin	-		-		-	

- : tespit edilemedi

Maserasyon ile elde edilen propolis ekstraktında fenolik asitlerden gallik asit tespit edilememesine rağmen, kafeik asit, elajik asit, ferulik asit, kuersetin, t-sinnamik asit, apigenin, pinosembrin ve CAPE gibi başlıca fenolikler açısından, diğer iki yöntemle elde edilen ekstraktlara göre içeriği daha zengin bulunmuştur. Genel olarak fenolik madde içeriği değerlendirildiğinde, bir flavon olan krisinin düzeyi en yüksek olarak belirlenmiştir. Bitkisel orijinli olan krisinnin temel olarak antiinflamatuar (yara iğleştirici), antiplasitik ajan (tümör hücresinin büyüme ve çoğalmasını engelleyici), önemli bir antioksidan ve hepatoprotectif ajan (karaciğer koruyucu) olarak işlev gördüğü bilinmektedir (URL-2). Bunun yanı sıra kestane propolis ekstraktlarının pinosembrin, ferulik asit, elajik asit ve CAPE gibi diğer fenolikler açısından da zengin olduğu belirlenmiştir.

Propolis ekstraktlarında tanımlanan başlıca fenolik bileşikler;hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitler (Calegari vd., 2020), flavonlar, flavonoller, flavanonlar, pinocembrin, chrysin, galangin, luteolin (Peter vd., 2017) ve asit feniletil ester

(Calegari vd., 2020; Çiftci-Yilmaz vd., 2017) tanımlanmıştır.Kafeik asit fenetil ester (CAPE) içeren propolis örneklerinin daha güçlü radikal süpürücü aktivite sergilemektedir (Sulaiman vd., 2014).

Kara vd., (2022) yılında yaptıkları çalışmalarında propolis ekstaktları hazırlanırken en uygun solvent yüzdesi ve solvent- propolis oranını araştırmışlardır. Araştırmalarında RP-HPLC-PDA kullanarak propolisin fenolik madde kompozisyonunu incelemişlerdir. Çalışmalarında %0; %20 ve %40 etanol içeren solventlerle hazırlanan ekstraktlarda kafeik asit ana bileşen olarak, %60 ve daha fazla etanol içeren solventlerle hazırlanan ekstraktlarda ise krisin ve pinosembrin ana bileşen olarak belirlemişlerdir. Etanol yüzdesi ile ters orantılı olarak gallik asit ve protokateşik asitte azalma olurken yüksek oranda su içeren çözücülerde fenolik asit seviyelerinin daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. CAPE, krisin ve pinosembrinin en yüksek seviyeleri çözücü içinde kullanılan etanol yüzdesi %70 olduğunda gözlenmiş ancak etanol yüzdesi daha yüksek olan çözücülerde önemli bir değişiklik saptamamışlardır.

Propolis fenolik içeriği belirleme analizinde propolis örneklerinde ferulik asit, kafeik asit, t-sinnamik asit, p-kumarik asit ve luteolin olduğu farklı çalışmalarda tespit edilmiştir (Aliyazıcıoğlu vd., 2013; Uzel vd., 2005).

Bozkuş vd., (2021) Türkiye'nin kuzey, güney, doğu ve batıdaki dört farklı bölgesinden dört ayrı coğrafi konumu temsil eden propolis örneklerini karıştırarak Anadolu propolisinin su ve etanolikekstrarktlarınının kimyasal karakterizasyonunu incelemişlerdir. HPLC-DAD analizlerinde, Türk propolisinin suile ekstraktı sonucu antioksidan aktiviteden sorumlu fenolik asit içeriğini; kafeik asit (204,00 µg/mL), trans-sinnamik, klorojenik ve kafeoilkinik asit olarak bulmuşlardır. Anadolu propolisinin etanolik özüt fenolik asit içeriğini ise;krisin (641,33 µg/mL), kafeik asit fenetil ester (630,67 µg/mL), pinosembrin (572,67 µg/mL), galangin (534,11 µg/mL), naringenin (372,39 µg/mL), kaempferol, trans-sinnamik asit, kafeik asit, mirisetin ve kuarsetin olarak tespit etmişlerdir. Her iki ekstrede de kafeik ve trans-sinnamik asitleri ortak bileşikler olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda etanol ile ekstrakte edilen propolislerde kafeik asit miktarı maserasyon ekstraksiyonda 210,721

µg/mL, refluks ekstraksiyonda 190,694 µg/mL ve ultrasound destekli ekstraksiyonda 208,94 µg/mL olarak bulunmuştur ve literatür ile benzerlik göstermektedir.

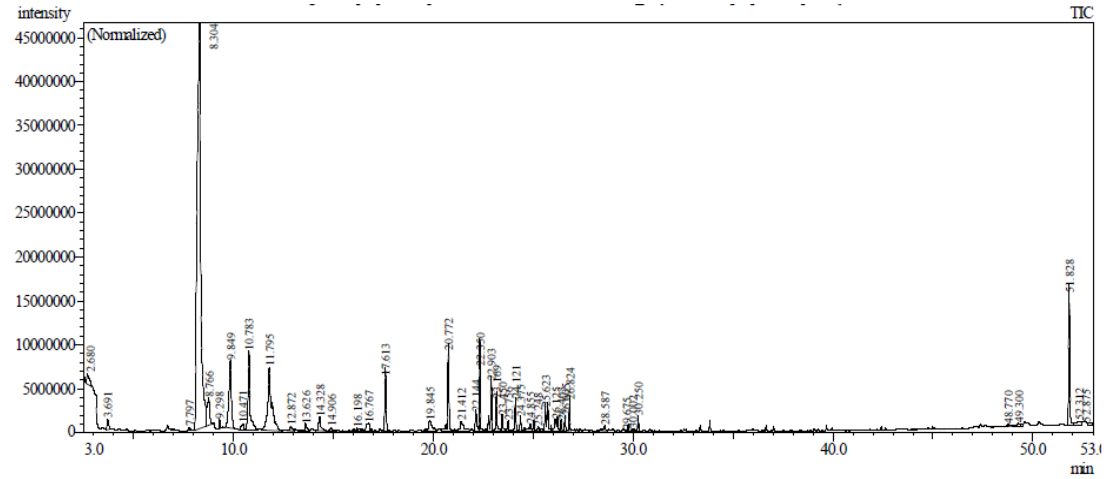
Propoliste yapılan başka bir çalışmada ise pinocembrin'in (83,4 mg/g) tanımlanan bileşikler arasında ana bileşik olduğu belirlenmiştir (Touzani vd., 2019).

Uzun yıllardan beri tamamlayıcı ve geleneksel tıpta enfeksiyonlara karşı özellikle de mumyalanma işleminde kullanılan propolisin 1980'li yıllarda antikanser etki göstermesine sebep olan majör bileşeninin kafeik asit fenil ester (CAPE) olduğu tespit edilmiştir. CAPE miktarının daha çok Türkiye gibi ılıman bölgelerde yüksek olduğu ve kavak tipi propolislerin CAPE açısından zengin olduğu rapor edilmiştir. Yapılan çalışmada CAPE miktarı ile kafeik asit miktarı arasında ilişki olduğu; kafeik asit olan her numunede CAPE'de olduğu tespit edilmiştir (Keskin, 2018).

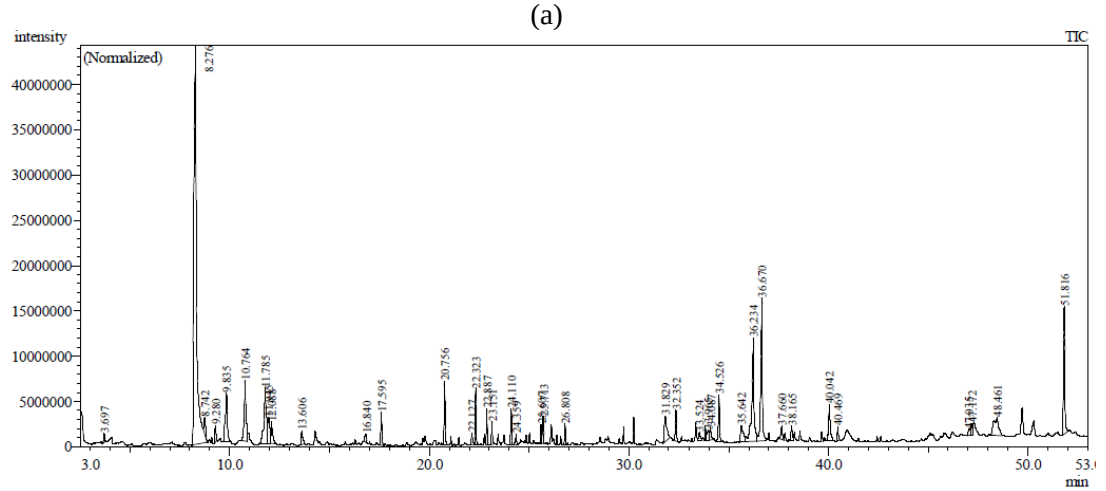
Ülkemizde Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (No: 2020/7) en güncel arı ürünleri tebliğidir. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Türk Gıda Kodeksi Arı Ürünleri Tebliği Mevzuat Taslağı (Tebliğ No: Taslak)'nı oluşturmuş ve içeriğinde propolise yer verilmiştir. Taslak tebliğ henüz yürürlüğe girmemekle birlikte tebliğde tüketime sunulacak arı ürünlerinin nitelikleri ve limit değerleri yer almaktadır. Taslak tebliği propolis ekstraktının fenolik madde kompozisyonu açısından verilen 20 tane bileşenden (p-coumaricacid, pinobanksin 3-acetate, galangin, cinnamicacid, chrysin, pinocembrin, caffeicacid, kaempferol, ferulicacid, benzoicacit, quarcetin, artepiilin C, naringenin, catechol, rutin, myricetin, hesperedin, apigenin, CAPE ve chlorogenicacid) en az 8 tanesini ve her birini en az 1 mg/L veya 1 mg/kg olacak şekilde içermesi gerektiğini belirtmektedir. Yapmış olduğumuz bu tez çalışmasında kestane propolis ekstraktlarının HPLC ile belirlenen fenolik madde kompozisyonu (Tablo 4.7) taslak tebliğde belirtilen bileşenlerden 11 tane bileşen maserasyon ekstraksiyon yönteminde, 12 tane bileşen ise refluks ve ultrasound destekli ekstraksiyon yönteminde içerdiği tespit edilmiştir. Çalışmamızda incelediğimiz kestane propolisi fenolik madde kompozisyonu açısından Taslak tebliğ ile uygunluk göstermektedir.

4.2.2.3 Kestane propolis ekstraktlarının uçucu madde içerikleri

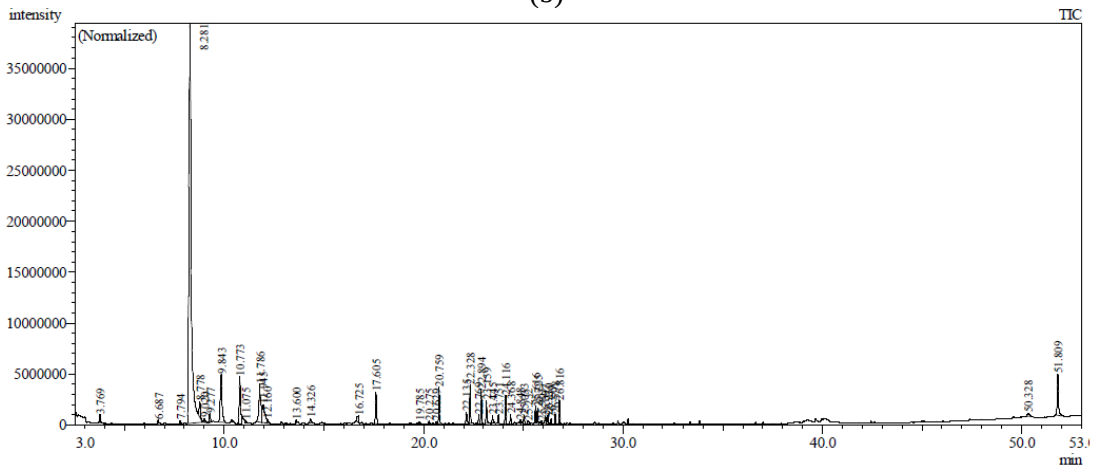
Optimize ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilmiş kestane propolis ekstraktlarının GC-MS'de SPME (Katı faz mikro ekstraksiyon) yöntemi ile belirlenmiş uçucu madde kompozisyonları Tablo 4.8'de, bu verilere ait kromotogramlar da Şekil 4.5'de verilmiştir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.5 Maserasyon (a), Refluks (b) ve Ultrasound destekli (c) ekstrasiyon ile hazırlanan kestane propolis ekstraktlarının GC-MS ile belirlenen uçucu madde kompozisyonu

Tablo 4.8 Kestane propolis ekstraktlarının GC-MS ile belirlenenuçucu madde içerikleri

Tür	Bileşik	Maserasyon	Refluks	Ultrasound
Benzentürevi	**Styrene**	**-**	**-**	**0,19**
Monoterpen	Trisiklen	0,21	-	0,22
Monoterpen	**cis-Ocimene**	**44,05**	**36,02**	
Monoterpen	**.Δ.3-Carene**	**-**	**-**	**56,6**
Monoterpen	Kampen	2,38	0,83	1,32
Monoterpen	Verbenene	-	-	0,45
Aromatikaldehit	**Benzaldehyde**	**0,23**	**0,42**	**0,44**
Monoterpen	Pinen	4,9	3,4	5,27
Hidrokarbon	Decane	4,4	3,47	4,11
Alifatikhidrokarbon	Limonen	7,15	4,05	3,97
Aromatikalkol	Benzyl alcohol	-	1,12	
Diğer	p-Cresol	0,45	0,64	0,17
Alkol	Farnesol	0,27	-	-
Aromatikhirokarbon	Undecane, 5-methyl-	0,33	-	-
Karboksilikasitveesterleri	Benzoic acid	0,85	0,42	0,58
Aromatikhirokarbon	Dodecane	2,3	1,17	2,05
Diğer	Bornyl acetate	-	-	0,2
Monoterpenoid fenol	Carvacrol	4,26	2,21	2,07
Fenol	Eugenol	2,59	1,61	1,92
Seski terpenoid	Ylangene	-	-	0,96
Seski terpen	α-Cubebene	0,97	0,48	0,7
Seski terpen	α-Copaene	2,2	1,01	1,77
Seski terpen	Longifolene	0,41	-	0,41
Seski terpen	Caryophyllene	1,09	1,14	1,62
Seski terpen	Germacrene	0,44	0,38	0,47
Fenilpropen	trans-Isoeugenol	-	-	0,18
Seski terpen	α--Humulene	-	-	0,37
Fenol	Phenol, 2-methoxy-3-(2-propenyl)-	0,97		
Seski terpen	Amorphene	1,76	0,64	0,87
Seski terpen	β.-Selinene	-	-	0,13
Seski terpen	α--Guaiene	1,23		
Seski terpen	Muurolene	-	-	0,5
Seski terpen	Bisabolene	0,34	-	0,28
Seski terpen	Cadinene	0,77	0,62	0,47
Yağasiti	**Myristic acid**	**-**	**3,17**	**-**
Yağasiti	**Pentadecylic acid**	**-**	**2,43**	**-**
Keton	**Cyclopentadecanone, 2-hydroxy-**	**-**	**9,44**	**-**
Yağasiti	**Palmitic acid**	**-**	**7,69**	**-**
Yağasiti	**Oleic acid**	**-**	**3,79**	**-**
Yağasiti	**Stearic acid**	**-**	**0,48**	**-**
Yağasiti	**Arachidic acid**		**2,89**	
Diğer	Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-	1,02	-	1,15
Diğer	Alloaromadendrene oxide-(1)	0,18	-	0,2
Sterol	Amyl acetate	0,4		
Tri-terpen	Squalene	5,58	5,86	3,24
Diğer	Cyclooctasiloxane, hexadecamethyl-	0,40	-	-
Sterol	Stigmast-5-en-3-ol, (3.beta.)- (CAS)	0,8	-	-

Propolisin organik bileşiklerinin üç kaynağı vardır; bal arılarının metabolizmasından elde edilen bileşikler, bitki orijini ve propolisi üretmek/ekstrakte etmek için kullanılan malzemelerdir. Propolis numunelerinin GC-MS kromatogramlarının analizi, çeşitli bileşiklerin varlığını gösteren 40'a yakın pik göstermiştir. Bu bileşikler Tablo 4.8'de görüleceği üzere farklı sınıflara aittirler; Hidrokarbonlar, terpenoidler, diterpenoidler, triterpenoidler ve fenoller vb. terpenoidler, uçucu

organik bileşikler oldukları için en çok bulunan maddelerdir ve bu nedenle GC-MS'de tespit edilmeleri en iyi yöntemdir (Kegode vd., 2022). Hidrokarbonlar da uçucudur ancak propoliste bulunanların çoğu uzun zincirli olmaları (Tablo 4.8) nedeniyle orta düzeyde tespit edilebilirler. Bu çalışmada Tablo 4.8'de görüleceği yağ asitlerinin tespiti, ekstraksiyon yönteminden etkilenmiş ve en fazla refluks yönteminde belirlenebilmişlerdir. Özellikle oleik, stearik, palmitik asit gibi yağ asitleri yalnızca refluks ekstraksiyon ile alınabilmiştir. Bileşiklerin flavonoid ve fenol sınıfları ise en az tespit edilebilenlerdir.

Çoğu çiçeğin uçucu bileşikleriyaygın olanlardan bazı nadir bileşiklere kadar değişir, ancak bazı uçucular ise tüm bitki ailelerinden türlerin çiçek kokularında çok yaygın olarak bulunur. Esasen herhangi bir çiçek kokusunun temel bileşenleri olan bu uçucular, tozlayıcı canlıları çekmek için de büyük bir potansiyele sahiptir. En yaygın çiçek uçucu bileşenleri benzaldehit, limonen, β-osimen ve linalool'dür ki sadece çok yaygın olmakla kalmaz, aynı zamanda birçok türün çiçek kokularının baskın bileşenleridirler. Bitki uçucu bileşiklerinin en belirgin iki kimyasal grubu terpenoidler ve benzenoidlerdir (Farre Armengol vd., 2017). Osimen, çiçek kokularında yaygınlığı ve bolluğu nedeniyle çiçeklerde büyük ekolojik roller oynar. β- Osimen (3,7-dimetil-1,3,6-oktatrien), kimyasal formülü $C_{10}H_{16}$ olan birmonoterpenoid'dir. *Trans* izomeri, çiçek kokularında*cis*izomerinden daha yaygındır. *Cis*-β-ocimene bu nedenle çiçek kokularında *trans*-β-osimen'den daha az bulunur. Tablo 4.11'de görüldüğü üzere Cis–Osimen özellikle maserasyonda %44,05 ve refluks ekstraksiyonda %36,02'lik oranı oluşturmaktadır ki, ultrasound destekli ekstrasyonla elde edilen numunede tespit edilememiştir. Çalışmada kullanılan propolislerin kestane orijinli olması nedeniyle osimenin Cis- izomerinin baskın olarak bulunduğu düşünülmektedir. Ultrasound destekli ekstraksiyon ile sitren tespit edilirken diğer yöntemlerle bu bileşik alınamamıştır. Sitren bir benzen türevi olup, bazı bitki ve gıdalarda (tarçın, kahve çekirdekleri, balzam ağaçları ve yer fıstığı) doğal olarak küçük miktarlarda bulunur. Ultrasound destekli propolis ekstraktının %56,60'ını oluşturan, Δ-3-carene, kenevir ve diğer bitkilerde bulunan bir bisiklikmonoterpendir. Δ-3-carene, terebentinin doğal olarak oluşan bir bileşenidir. Narenciye, selvi ve çam ağacında bulunan tatlı, keskin karakterde bitkisel ve toprak kokusuna sahiptir. Fesleğen, biberiye ve bazı biberler gibi otlar ile çam ve sedir

ağaçları da doğal olarak Δ-3-carene üretirler. Δ-3-carene birçok bitki esansiyel yağında bulunur ve kozmetikte, koku ürünlerinde ve gıda tatlandırıcı ajanlarında popüler bir bileşendir. Terebentin içindeki varlığı aynı zamanda onu endüstriyel güçte böcek kovucularda güçlü bir ajan yapar. Δ-3-carene anti-inflamatuar, anti-alzheimer etkileri olduğu bildirilirken, mantar enfeksiyonlarına karşı etkili, ayrıca kemiklere artan kalsiyum emilimi yoluyla kemik sağlığını iyileştirme potansiyeli olduğu da belirtilmektedir (URL-3). Her üç yöntemle elde edilen numunede ortak bulunan diğer bir bileşik benzaldehitiseönemli bir aromatik aldehit grubuna girer. Kokusu birçok kaynakta acı badem yağını andırmaktadır. Benzaldehit üzerine yapılan çalışmalar bir anti-tumör bileşiği olarak antikanser etki potansiyeline sahip olduğunu belirtmektedir (Gameil vd., 2019). Her üç ekstraksiyon numunesinde de tespit edilen Karvakrol, kekik (*Origanum vulgare*), kekik (*Thymus vulgaris*), karabiber (*Lepidium flavum*), yabani bergamot (*Citrus aurantium bergamia*) ve diğer bazı bitkilerin uçucu yağlarında bulunan fenolik bir monoterpenoiddir. karvakrol, antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser aktivite gibi geniş bir biyoaktivite yelpazeye sahiptir (Rad vd., 2018). Eugenol, esas olarak karanfil yağından elde edilen fenolik aromatik bir bileşiktir. Bilinen antibakteriyel, antiviral, antifungal, antikanser, antiinflamatuar ve antioksidan özelliklerinden dolayı kozmetik, tıp ve farmakoloji gibi çeşitli alanlarda uzun süredir kullanılmakta, doğal sivrisinek kovucu olarak bilinmektedir (Ulanowska ve Olasi, 2021).

4.2.2.4 Kestane propolis ekstraktlarının mineral madde içerikleri

Canlı organizmaların sağlıklı olmasında eser elementlerin önemi oldukça fazladır ve temel-temel olmayan elementler olarak gruplandırılır. Canlı organizmada bir element fizyolojik ya da yapısal olarak eksiklik sendromuna sebep oluyorsa ama bu eksiklik ilaç alımıyla tedavi edilebiliyorsa temel element olarak tanımlanır. Bir elementin canlı organizmada olması gereken limitten daha çok ya da daha az olması durumunda elementlerin yiyecekler ile organizmaya alınması belirli düzeyde limitler ile sınırlandırılmıştır (Karasakal, 2012).

Na, Ca, K, P, Cl, S ve Mg vücutta yaklaşık olarak %4 oranında bulunurlar ve makro elementler olarak adlandırılırlar. Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb gibi elementler

ise mikro elementlerdir ve insan vücudunun %0,01'den daha azından oluşurlar. Eser elementler canlı organizmalarda az miktarlarda bulunmasına rağmen vücutta mutlaka bulunması gerekir (Zurnacı, 2015). Mikro mineraller olarak da bilinen eser elementler vücutta denge halinde bulundukları zaman çok fazla hayati fonksiyonlarda görev alırlar. Vücutta vitamin sentezine, enzim oluşuna, kan yapımına katılırlar ve hormon fonsiyonlarına yardımcı olmaktadırlar (Küçükaslan, 2011).

Mineral çeşitliliği, toprağın mineral bileşiminin propolisin elde edildiği bitkilere aktarılması yoluyla propolisin bileşimine yansır. Bu nedenle, bitki kaynakları propolisin elementel bileşimini büyük ölçüde etkiler (Lovakovic vd., 2018). Propolisin temel içeriği, çevre kirliliğinin bir göstergesi olarak üretildiği coğrafi alanların ayırt edici özelliklerini ve güvenilir izlenebilirlik yöntemlerini geliştirmek için kullanılır (Golubkina vd., 2016).

Propolis insan sağlınına faydalı antibakteriyel, antifungal, antiviral içeriğinin yanı sıra tedavi edici özelliklere sahiptir. Aynı zamanda propolis güçlü antioksidan aktivitesi sayesinde bağışıklık direncini desteklemeye yardımcı olur. Bu sebeplerden dolayı tüketilen propolisin metal içeriklerinin belirlenmesi insan sağlığı açısından oldukça büyük bir öneme sahiptir. Kestane propolisinin mineral madde içeriği ICP-OES analizi ile tayin edilmiştir.

Tablo 4.9 Optimum propolis ekstraktların mineral madde içeriği

	İz elementler (ppm)									Makro elementler(ppm)			
	Al	**Cr**	**Mn**	**Fe**	**Ni**	**Cu**	**Zn**	**Cd**	**Pb**	**P**	**Na**	**Ca**	**K**
M	-	0,055±6,631^{A}	0,148±3,354^{A}	0,676±10,929^{B}	0,048±10,479^{B}	-	0,150±4,779^{B}	-	0,806±5,326^{B}	7,386±33,971^{A}	12,750±0,141^{A}	10,750±0,070^{B}	78,550±417^{A}
R	0,203±8,520	-	0,147±2,601^{A}	2,710±9,481^{A}	-	-	0,569±9,979^{A}	-	1,361±7,447^{A}	7,998±36,452^{A}	12,625±0,368^{A}	49,250±0,0425^{A}	-
U	-	0,070±2,713^{B}	0,093±0,432^{B}	0,422±2,259^{C}	0,071±2,647^{A}	-	0,167±2,426^{B}	-	0,941±2,284^{B}	6,160±60,032^{B}	11,400±0,062^{B}	7,000±0,071^{C}	56,800±0,317^{B}

- : Tespit edilemedi

**Aynı sütundaki büyük harflerdeki farklılık (A-C) ekstraksiyon yöntemleri arasında fark olup olmadığını göstermektedir.*

**M: maserasyonekstrasyon yöntemli R: refluksekstrasyon yöntemi U: ultrasound ekstrasyon yöntemi

Çalışmamızda kestane propolisi numunelerinde 13 tane elementin (Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb, P, Na, Ca, K) konsantronyonları ICP-OES ile belirlenmiştir. Maserasyon, refluks ve ultrasound destekli ekstraksiyon optimizasyonu ile elde edilen kestane propolis ekstraktlarının mineral madde içerikleri Tablo 4.9'da verilmiştir. Tabloya bakıldığında diğer yöntemlerle kıyaslandığında refluks ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilmiş propoliste Al elementinin olduğu Ni ve Cr elementinin ise tespit edilemediği görülmüştür.

Mn elementi maserasyon ve refluks ekstraksiyon metodu ile ekstrakte edilen kestane propolislerinin konsantrasyon sonuçları birbilerine çok yakın (0,148-0,147ppm) bulunurken; ultrasound destekli esktraksiyonda ise 0,093 ppm konsantrasyon bulunmuştur.

Fe, Zn ve Pb elementleri her 3 yöntemde bulunurken refluks ekstraksiyonda diğer ekstraksiyon çeşitlerine göre konsantrayonlar daha yüksek çıkmıştır. Cu ve Cd elementleri her 3 yöntemde de tespit edilememiştir.

Makro elementlere bakıldığında ise P ve Na elementleri tüm ekstraksiyon yöntemlerinde elde edilmiş ve miktarları maserasyon ve refluks ekstraksiyonda konsantrasyonlar birbirlerine çok yakın ve ultrasound destekli ekstraksiyon metodundan daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Ca elementi analiz sonuçlarına göre en yüksek miktara (konsantrasyona) sahip numune 49,250 ppm ile refluks ekstraksiyon metodu ile ekstrakte edilen kestane propolisi olmuştur. Maserasyon ve ultrasound destekli ekstraksiyonda ise Ca elementi 10,750-7,00 ppm bulunmuştur.

K elementi ise maserasyon ekstraksiyon yönteminde 78,550 ppm olurken ultrasound destekli esktraksiyonda 56,800 ppm bulunmuş, refluks ekstraksiyonda ise tespit edilememiştir.

Elementlerin propolisin içinde var olup olmaması ve konsantrasyon miktarlarının ekstraksiyon yöntemlerine göre farklılık göstermesi propolisin ekstrakte edilme

metoduna göre değişiklik göstermiştir. Propolis ekstrakte edilirken ekstraksiyon süresi, çözücü yüzdesinin farklılığı, ekstrasksiyon esnasında sıcaklık ve ultrases uygulamasının yapılıp yapılmaması bu farklılığın nedenlerindendir.

Arda (2022)'de yaptığı çalışmasında üç farklı ticari propolis damla ürünlerinde (A, B ve C markası) bulunan mineral maddeleri ICP-OES analizi ile belirlemiştir. Ca elementini B ve C markasında 9,28-5,53 ppm olarak bulmuştur. Cu elementini A numunesinde 0,79 ppm bulurken B ve C numunelerinde rastlamamıştır. Zn elementinde B ve C numunelerinde 2,09- 0,12 ppm olarak tespit etmiştir. Sonuçlar bizim sonuçlarımız ile paraleldir.

Yapılan bir başka çalışmada (Acun, 2021) mikroenkapsülasyon tekniğiyle elde edilen çeşitli propolis ekstraktları ve bal tozunun kek üretiminde kullanılması incelenmiştir. Bu çalışmada kestane propolisinin Fe elementi 1,53 ppm bulunmuştur. Bu değer bizim kestane propolisi Fe elementi konsantrasyonları (0,422-2,710) aralığındadır. Aynı çalışmada kestane propolisinde K elementi 3,11ppm bulunurken bizim çalışmamızda K elementi çok daha yüksek bulunmuştur.

Bayram (2020)'de yaptığı çalışmasında Türkiye, Çin, Brezilya ve Etiyopya'dan elde edilen propolislerin kalitesini değerlendirmiştir. Mineral madde içeriğinde propolis örneklerindeki ana elementleri potasyum (K), kalsiyum (Ca), demir (Fe), magnezyum (Mg) ve sodyum (Na) olarak bulmuştur. Türkiyeden elde edilen propolis örneğinde en yüksek Na, Zn ve Fe konsantrasyonları sırasıyla 191,15; 74,95 ve 1425,82 mg/kg olarak bulmuştur.

4.2.3 Optimize Kestane Propolis Ekstraktlarının Kullanıldığı Bazı Gıda Modellerindeki Etkileri

4.2.3.1 Bal karışımı

Propolis başta olmak üzere arı ürünleri biyolojik olarak aktif maddelerin zengin bir kaynağıdır. Propolisi insan beslenmesine dâhil etmenin yollarından birisi de propolisin bala ilavesidir. Bu çalışmanın bir amacı da kestane balının kestane

propolisi ile zenginleştirilmesinin balın biyoaktif nitelikleri, rengi ve duyusal özelliklerinin üzerindeki etkisini analiz etmektir.

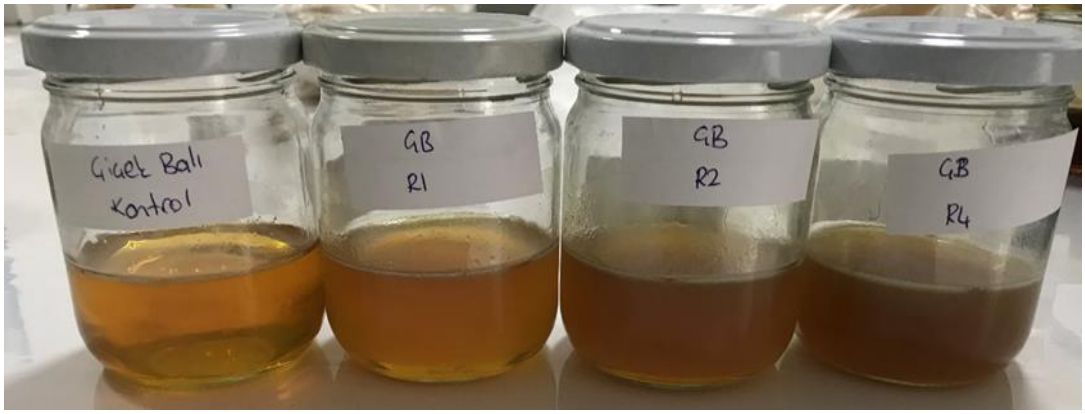
Optimize kestane propolis ekstraktları çiçek ve kestane ballarına 4 farklı oranda ilave edilerek homojen karışımlar elde edilmiştir. Hazırlanan bal karışımlarının antioksidan aktivite, toplam fenolik ve renk analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bal karışımları Şekil 4.6; 4.7; 4.8, 4.9; 4.10; 4.11; 4.12 'de, analiz sonuçları ise Tablo 4.10 ve Tablo 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.6 Kontrol çiçek ve kestane balı



Şekil 4.7 Maserayonekstrasyon yöntemli optimize kestane propolisi farklı oranlarda ilaveli çiçek balları



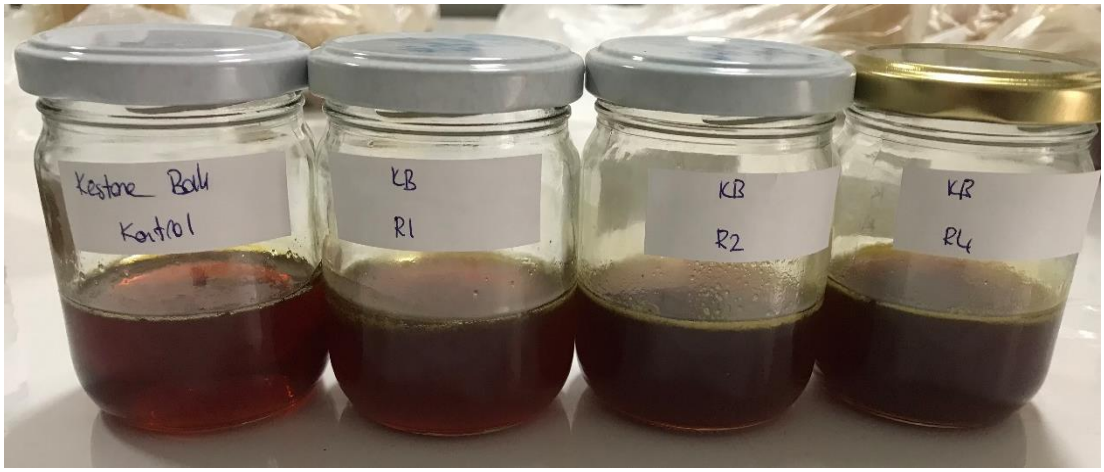
Şekil 4.8 Reflux ekstraksiyon yöntemli optimize kestane propolisi farklı oranlarda ilaveli çiçek balları



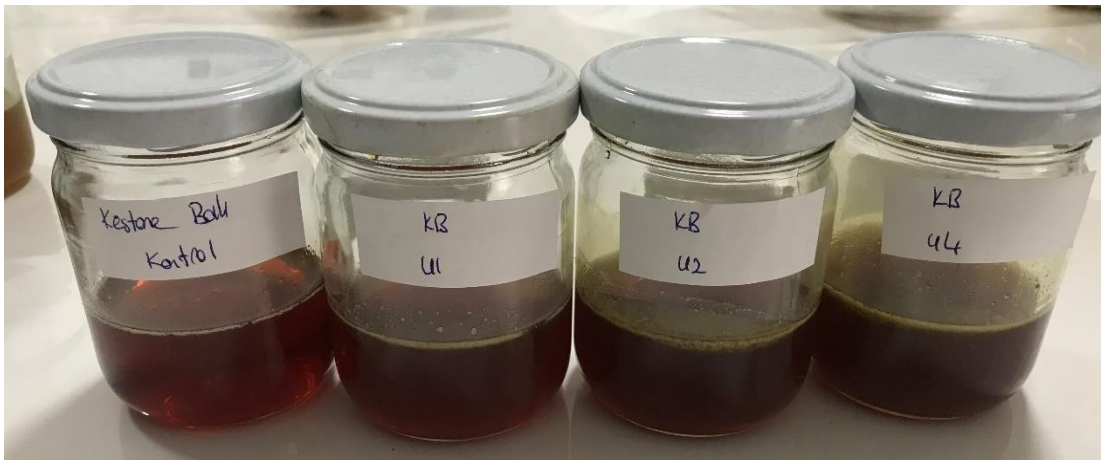
Şekil 4.9 Ultrasound ekstraksiyon yöntemli optimize kestane propolisi farklı oranlarda ilaveli çiçek balları



Şekil 4.10 Maserayonekstrasyon yöntemli optimize kestane propolisi farklı oranlarda ilaveli kestane balları



Şekil 4.11 Reflux ekstraksiyon yöntemli optimize kestane propolisi farklı oranlarda ilaveli kestane balları



Şekil 4.12 Ultrasound ekstraksiyon yöntemli optimize kestane propolisi farklı oranlarda ilaveli kestane balları

4.2.3.1.1 Bal örneklerinde renk değişimi

Maserasyon, refluks ve ultrasound destekli ekstraksiyon ile ekstrakte edilmiş optimize kestane propolisleri kestane ve çiçek ballarına %0; 1; 2; 4 oranlarında ilave edilmiş ve bal propolis karışımlarının renk yoğunluğu 450 ve 720 nm'de ölçüm yapılarak bulunmuştur. Sonuçlar Tablo 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4.10 Optimize kestane propolis ekstraktı ilave edilmiş bal karışımlarının renk yoğunluğu değerleri

	Ekstraksiyon Tipi	Propolis İçeriği (%)	450 nm'de abs.	720 nm'de abs.	Renk Yoğunluğu
PE_{opt}	M		2,537±0,002	0,091±0,001	2.446,0^{A}
	R		2,595±0,005	0,101±0,001	2.494,0^{A}
	U		2,635±0,002	0,127±0,002	2.508,0^{A}
Kestane Balı	M	0	2,052±0,031	0,248±0,001	1.803,5^{B}
		1	2,107±0,001	0,278±0,001	1.828,5^{A}
		2	2,340±0,004	0,278±0,001	1.990,0^{A}
		4	2,251±0,026	0,370±0,000	1.881,5^{A}
	R	1	2,190±0,048	0,282±0,006	1.908,0^{A}
		2	2,177±0,023	0,283±0,007	1.894,0^{A}
		4	2,244±0,001	0,306±0,002	1.938,0^{A}
	U	1	2,186±0,013	0,264±0,000	1.921,5^{A}
		2	2,173±0,026	0,265±0,000	1.907,5^{A}
		4	2,191±0,010	0,269±0,000	1.921,5^{A}
Çiçek Balı	M	0	0,550±0,003	0,171±0,003	378,5^{B}
		1	0,589±0,006	0,264±0,001	424,5^{B}
		2	0,632±0,001	0,181±0,000	451,0^{B}
		4	0,712±0,000	0,178±0,002	534,5^{B}
	R	1	0,597±0,002	0,172±0,003	425,5^{B}
		2	0,673±0,002	0,176±0,002	497,0^{B}
		4	0,763±0,003	0,178±0,000	585,0^{B}
	U	1	0,615±0,001	0,160±0,003	455,0^{B}
		2	0,646±0,005	0,162±0,001	484,0^{B}
		4	0,766±0,004	0,197±0,002	568,5^{B}

**Aynı sütundaki büyük harflerdeki farklılık (A-B) ekstraksiyon yöntemleri arasında fark olup olmadığını göstermektedir.*

**M: maserasyonekstrasyon yöntemli R: refluxekstrasyon yöntemi U: ultrasound ekstrasyon yöntemi

Kestane balı ve çiçek balının renk yoğunluğuna bakıldığında kestane balının renginin çiçek balının renginden yaklaşık 3 kat daha koyu olduğu görülmektedir. Kestane ballarına farklı oranlarda ve farklı yöntemlerle ekstrakte edilmiş kestane propolisi eklendiğinde bal karışımlarında renk yoğunluğu farkının çok az olduğu gözlenmiştir. Çiçek ballarına kestane propolisi ilave edildiğinde ise renk yoğunluğunu önemli derecede arttığı görülmektedir. Ekstraksiyon yöntemlerinin çiçek ballarının renk yoğunluğunu, propolis ekleme yüzdesi arttıkça artırdığı tespit edilmiştir.

Ertop (2020), Kastamonu'nun çeşitli bölgelerinden temin ettiği kestane ballarının renk yoğunluklarını 107,25 mAU ile 336,00 mAU değerleri arasında bulmuştur. Bizim çalışmamızda kullanılan Kastamonu ili Doğanyurt ilçesinden tek bir kovandan temin edilen kestane balının renk yoğunluğu 1803,5 mAU olarak bulunmuştur. Renk

yoğunluğu farkının kestane balının toplanma sezonunun farklı olmasından, farklı bal kovanlarından temin edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.2.3.1.2 Bal örneklerinin biyoaktif nitelikleri

Antioksidan, kimyasal bir bileşenin oksitlenme özelliğini durduran ya da yavaşlatan bir moleküldür (Moon ve Shibamoto, 2009). Antioksidan özelliği olan ürünler diyet ürünleri ile kullanılarak bal gibi ürünlerin tüketimini artırdığı ve fonksiyonel gıda olarak tanımlandığı gözlemlenmiştir. Yapılan araştırmalarda bal içerisindeki antioksidan ve fenolik madde arasında birbirleri ile bağlantılı oldukları tespit edilmiştir (Zalibera vd., 2008). Bal içerisinde bulunan fenolik madde bala aroma, tat, renk ve sağlık açısından önemli bir etkiye sahip bileşiktir (Estevinho vd., 2008). Yapılan çalışmalarda balın antioksidan özelliğinin kimyasal yapısına bağlı olduğu ve kalp hastalıklarına, immün sistemde zayıflamaya ve kansere etkili olduğu belirtilmiştir (Khalil vd., 2012). Koyu renkli balların antioksidan madde içeriğinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Baltrusaityte vd., 2007). Balın antioksidan özelliğini balın kaynağı, bal elde edilirken uygulanan yöntem, balın yetiştiği bölgenin coğrafi yapısı ve depolama koşulları etkilemektedir (Khalil vd., 2012; Silici vd., 2010).

Baldaki fenolik bileşenler incelendiğinde balın florası hakkında bilgi edilebilmektedir. Kestane balı içerisinde p-kumarik asit, kafeik asit bulunurken çiçek balında protokatekuik asit bulunması balların florasına ait bilgi içermektedir (Kassim vd., 2010).

Maserasyon (M), Refluks (R) ve Ultrasound destekli (U) ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen optimize kestane propolislerinin ilave edildiği çiçek ve kestane ballarının antioksidan aktivite ve toplam fenolik içerikleri Tablo 4.11'de verilmiştir.

Tablo 4.11 Optimize kestane propolis ekstraktı ilaveli bal örneklerinin antiksidan aktivite ve toplam fenolik madde içerikleri

Bal çeşiti	Ekstraksiyon tipi	Propolis içeriği (%)	Antioksidan aktivite (%inhibisyon)	AO_{ort}	Toplam fenolik madde (µg GAE /g)	TFM_{ort}
Çiçek	M	0	49,69±0,60^{Ad}	66,39^{B}	127,50±2,50^{Ad}	406,53^{B}
		1	56,70±1,26^{Ac}		402,50±8,20^{Ac}	
		2	80,00±0,02 ^{Ab}		432,50±2,00^{Ab}	
		4	89,86±0,02^{Aa}		917,50±4,20^{Aa}	
	R	0	49,69±0,60 ^{Ad}		127,50±2,50^{Ad}	
		1	57,98±0,20^{Ac}		422,50±3,,15^{Ac}	
		2	64,30±0,04 ^{Ab}		455,00±1,80^{Ab}	
		4	89,88±0,04^{Aa}		862,50±9,40^{Aa}	
	U	0	49,69±0,60^{Ac}		127,50±2,50^{Ac}	
		1	58,75±0,30 ^{Ab}		292,50±2,10^{Ab}	
		2	59,89±0,08 ^{Ab}		350,00±4,30^{Aa}	
		4	90,26±0,50^{Aa}		360,80±1,50^{Aa}	
Kestane	M	0	82.96±0,70^{Ac}	86,80^{A}	412,50±0,98^{Ad}	649,58^{A}
		1	85,57±0,54^{Ab}		620,00±12,00^{Ac}	
		2	89,14±0,00^{Aa}		900,00±2,80^{Ab}	
		4	89,34±0,08^{Aa}		975,00±5,50^{Aa}	
	R	0	82.96±0,70^{Ab}		412,50±0,98^{Ad}	
		1	86,69±0,46^{Aa}		522,50±1,60^{Ac}	
		2	88,16±0,02^{Aa}		692,50±0,85^{Ab}	
		4	88,74±0,02^{Aa}		880,00±11,00^{Aa}	
	U	0	82.96±0,70^{Ab}		412,50±0,98^{Ac}	
		1	86,90±0,41^{Aa}		597,50±3,90^{Ab}	
		2	89,01±0,00^{Aa}		677,50±7,20^{Aa}	
		4	89,16±0,06^{Aa}		692,50±2,00^{Aa}	

Aynı sütunda küçük harflerdeki (a-d) farklılık örneklerin oransal propolis artışı arasındaki farkın istatiksel olarak ($p<0,05$) önemli olduğunu, aynı sütundaki büyük harf (A) ekstraksiyon yöntemleri arasında ki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir.

Ç: Çiçek balı, K: Kestane balı, M: Maserasyon ekstraksiyon, R: Refluks ekstraksiyon, U: Ultrasonik destekli ekstraksiyon

Tablo 4.17'de Kestane balının propolis ilave edilmeden antioksidan aktivite değeri çiçek balından yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu; farklı ekstraskiyon yöntemleriyle elde edilen propolisin farklı oranlarda çiçek balına ve kestane balına ilavesi sonucunda kestane ballarının antioksidan aktivitesi çiçek ballarının antioksidan aktivitesinden istatistiki olarak önemli düzeyde (p<0,00) yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.

Çiçek ve kestane ballarının antioksidan aktivite değerleri için propolis ekstraksiyon yöntemlerinin etkisi incelendiğinde; maserasyon, refkluks ve ultrasonik ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak elde edilen propolis ilavesinin etkisi istatiksel olarak önemli bulunmamıştır.

Farklı yöntemlerle ekstrakte edilen propolis çiçek ve kestane balına %0; 1; 2; 4 oranlarında katıldığında propolis oranının arttıkça antioksidan aktivite düzeyinin arttığı her iki bal çeşidinde de gözlemlenmiştir. Çiçek balına maserasyon, refluksve ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemleri ile ekstrakte edilmiş propolis ilave edildiğinde propolis oranının artması antioksidan aktivite düzeyini yaklaşık 2 kat arttırmıştır.

Çiçek ve kestane ballarına farklı oranlarda farklı yöntemlerle ekstrakte edilmiş propolis ilave edildiğinde ektraksiyon yöntemlerinin farklılığının toplam fenolik madde miktarını istatistiki olarak önemli bir düzeyde etkilemediği (p>0,05) görülmüştür.

Maserasyon, refluks ve ultrasound destekli ekstraksiyon yöntemleri ile ekstrakte edilmiş propolisin çiçek ve kestane ballarına farklı oranlarda ilave edilmesi toplam fenolik madde miktarının oran arttıkça artmasına neden olmuştur.

Soylu ve Bayram (2020)'de yaptıkları çalışmalarında bal, propolis, ekinezya ve çivanperçemi karışımının biyokimyasal ve fizikokimyasal özelliklerini incelemişlerdir. Karışımda bal numunesi olarak kestane balını kullanmışlar ve kestane balının antioksidan aktivitesini DPPH analizinde %19 bulurken fonksiyonel ürünü %64,49 bulmuşlardır. Toplam fenolik madde miktarı fonksiyonel üründe kestane balına göre daha fazla tespit etmişlerdir. Artan bu farklılığın kestane balına ilave edilen propolis, arı sütü ve otlardan kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada bala propolis ilavesinin toplam fenolik içerikte önemli bir artışa yol açtığını ve propolis ekstraktlarının çeşitli biyolojik olarak aktif maddelerin antioksidanlar da dahil olmak üzere mükemmel bir kaynağı olduğu bulunmuştur. Antioksidan aktivite miktarı propolis ilaveli bal örneklerinde artan bir antiradikal aktivite göstermiştir (Oses vd., 2016).

Habryka vd. (2020)'de propolis ile zenginleştirilmiş balın antioksidan aktivite, duyusal özellikler ve kalite parametreleri üzerine etkisini incelemişlerdir. Çalışmada elde edilen sonuçlar, bala propolis ekstraktının eklenmesinin, balda chrysin, pinocembrin, p-kumarik asit ve ferulik asit bulunan flavonoidler ve fenolik asitler de dahil olmak üzere polifenolik bileşiklerin içeriğinde önemli bir artışa katkıda bulunduğunu göstermiştir. Bala propolis ilavesinin antioksidan aktivite miktarını ve fenolik madde miktarını artırdığı çalışma sonucunda tespit edilmiştir.

4.2.3.1.3 Bal örneklerinin duyusal özellikleri

Maserasyon, refluks ve ultrasound destekli ekstraksiyon ile ekstrakte edilmiş optimize kestane propolisleri kestane ve çiçek ballarına %0; 1; 2; 4 oranlarında ilave edilmiş ve bal propolis karışımlarının duyusal değerlendirme sonuçları Tablo 4.12'de gösterilmiştir.

Tablo 4.12 Optimize kestane propolis ilave edilmiş kastane balı ve çiçek balının duysal değerlendirme sonuçları

Bal Çeşidi	Ekstraksiyon Tipi	Propolis İçeriği (%)	Görünüş-Renk	Kıvam	Aroma-Koku	Lezzet	Ağızda Bıraktığı His	Genel Kabul Edilebilirlik
KESTANE BALI	M	0	5,00±0,00^{aA}	4,80±0,40^{aA}	2,60±0,49^{aA}	2,00±0,63^{aA}	2,00±0,63^{aA}	1,80±0,40^{aA}
		1	3,60±0,49^{bB}	4,00±0,63^{abB}	2,60±0,49^{aA}	2,60±0,49^{aA}	2,20±0,40^{aA}	2,00±0,63^{aA}
		2	3,60±0,49^{bB}	3,80±0,40^{bB}	2,80±0,40^{aA}	2,80±0,40^{aA}	2,20±0,40^{aA}	1,80±0,40^{aA}
		4	2,60±0,49^{cB}	2,80±0,40^{cB}	3,00±0,63^{aA}	2,00±0,63^{aA}	1,60±0,49^{aA}	1,80±0,40^{aA}
	R	0	5,00±0,00^{aA}	4,80±0,40^{aA}	2,60±0,49^{abA}	2,00±0,63^{bA}	2,00±0,63^{aA}	1,80±0,40^{aA}
		1	3,60±0,49^{bB}	3,80±0,40^{bB}	3,00±0,00^{aA}	3,00±0,00^{aA}	2,60±0,49^{aA}	2,00±0,00^{aA}
		2	3,00±0,63^{bcB}	3,60±0,49^{bB}	2,20±0,40^{abA}	2,00±0,00^{bA}	1,80±0,40^{aA}	2,00±0,00^{aA}
		4	2,60±0,49^{cB}	2,60±0,49^{cB}	2,00±0,63^{bA}	1,60±0,49^{bA}	1,60±0,49^{aA}	1,80±0,40^{aA}
	U	0	5,00±0,00^{aA}	4,80±0,40^{aA}	2,60±0,49^{aA}	2,00±0,63^{aA}	2,00±0,63^{aA}	1,80±0,40^{aA}
		1	4,00±0,00^{bB}	3,60±0,49^{bB}	2,80±0,40^{aA}	2,20±0,40^{aA}	2,40±0,49^{aA}	2,00±0,63^{aA}
		2	3,00±0,00^{cB}	3,00±0,63^{bB}	2,00±0,63^{aA}	2,00±0,40^{aA}	1,60±0,49^{aA}	1,80±0,40^{aA}
		4	2,20±0,40^{dB}	3,00±0,63^{bB}	2,00±0,63^{aA}	1,80±0,00^{aA}	1,60±0,49^{aA}	1,60±0,49^{aA}

Tablo 4.12'nin devamı

Bal Çeşidi	Ekstraksiyon Tipi	Propolis İçeriği (%)	Görünüş-Renk	Kıvam	Aroma-Koku	Lezzet	Ağızda Bıraktığı His	Genel Kabul Edilebilirlik
ÇİÇEK BALI	M	0	4,60±0,49^{aA}	4,80±0,40^{aA}	4,40±0,49^{aA}	4,20±0,40^{aA}	4,00±0,63^{aA}	4,00±0,63^{aA}
		1	4,40±0,49^{aB}	4,60±0,49^{aB}	4,00±0,00^{aB}	4,00±0,63^{aB}	4,00±0,63^{aB}	3,80±0,75^{aB}
		2	3,60±0,49^{abB}	4,40±0,49^{abB}	3,20±0,40^{bB}	2,80±0,40^{bB}	2,60±0,49^{bB}	3,00±0,63^{aB}
		4	3,00±0,63^{bB}	3,60±0,49^{bB}	2,80±0,40^{bB}	2,40±0,49^{bB}	2,00±0,63^{bB}	1,60±0,49^{bB}
	R	0	4,60±0,49^{aA}	4,80±0,40^{aA}	4,40±0,49^{aA}	4,20±0,40^{aA}	4,00±0,63^{bA}	4,00±0,63^{aA}
		1	4,40±0,49^{abB}	3,80±0,40^{bC}	3,80±0,40^{abB}	3,80±0,40^{abB}	3,80±0,40^{abB}	3,40±0,49^{aB}
		2	3,60±0,49^{bB}	3,20±0,40^{bC}	3,20±0,40^{bB}	3,00±0,63^{bB}	2,80±0,75^{bcB}	2,20±0,40^{bB}
		4	2,60±0,49^{cB}	3,00±0,63^{bC}	3,00±0,63^{bB}	3,40±0,49^{abB}	2,40±0,49^{cB}	2,00±0,63^{bB}
	U	0	4,60±0,49^{aA}	4,80±0,40^{aA}	4,40±0,49^{aA}	4,20±0,40^{aA}	4,00±0,63^{aA}	4,00±0,63^{aA}
		1	4,20±0,40^{aB}	4,00±0,00^{aC}	3,20±0,40^{bC}	3,80±0,40^{aB}	3,00±0,63^{abB}	3,00±0,63^{aB}
		2	3,00±0,63^{bB}	3,00±0,63^{bC}	2,60±0,49^{bC}	2,60±0,49^{bB}	2,40±0,49^{bcB}	1,60±0,49^{bB}
		4	2,80±0,40^{bB}	3,00±0,63^{bC}	2,40±0,49^{bC}	2,00±0,63^{bB}	1,80±0,40^{cB}	1,60±0,49^{bB}

Aynı sütunda küçük harflerdeki (a-c) farklılık örneklerin oransal propolis artışı arasındaki farkın istatiksel olarak ($p<0,05$) önemli olduğunu, aynı sütundaki büyük harf (A-B) ekstraksiyon yöntemleri arasında ki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir.
M: Maserasyon ekstraksiyon, R: Refluks ekstraksiyon, U: Ultrasonik destekli ekstraksiyon

Kestane propolisi ilave edilmiş kestane ve çiçek ballarınınduyusal değerlendirilmesi sonucunda; görünüş-renk özelliğinin kestane propolis ilavesi arttıkça hem kestane balında hem de çiçek balında beğeninin azaldığı en yüksek puanı propolis ilavesiz balların aldığı tespit edilmiştir.

Propolis ilave oranının artması her iki bal çeşidi içinde kıvamın azalmasına neden olmuştur. Kestane balına ilave edilen propolisin kıvam açısından ekstraksiyon işlemi farkından etkilenmediği; çiçek balına ilave edilen propolis ekstraksiyon çeşitlerinde ise maserasyon ekstraksiyon yönteminin diğer yöntemlerden daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Aroma-kokuda kestane balına propolis ilave oranının artması sadece refluks ekstraksiyon metodunda azalmaya neden olurken maserasyon ve ultrasound destekli ekstraksiyonda istatistiksel olarak değişmemiştir. Propolis ekstraksiyon yönteminin farklı olması kestane balında aroma-koku açısından istatistiki olarak fark yapmamıştır. Çiçek balında propolisin ilavesinin artması aroma-kokunun azalmasına neden olurken; ultrasound destekli ekstraksiyon ile ekstrakte edilmiş kestane propolisinin çiçek balına ilavesi sonucunda aroma-kokunun diğer ekstrasiyon çeşitlerinden daha az olduğu tespit edilmiştir.

Kestane ve çiçek ballarına kestane propolisi ilavesi lezzet açısından ekstraksiyon yöntemleri arasında bir fark oluşturmamıştır. Kestane balına propolis ilave oranının artması lezzet açısından refluks ekstraksiyon yönteminde azalmıştır. Çiçek balında ise propolis ilave oranı arttıkça lezzet her 3 yöntemde de düşmüştür.

Kestane balına kestane propolisi ilavesi ekstraksiyon yöntemi açısından ve propolis ilave oranı açısından ağızda bıraktığı his istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. Çiçek balında ise porpolis ilave oranı arttıkça beğeni düşmüş ve ekstraksiyon yöntemi çeşidi farklılığa sebep olmamıştır.

Genel kabul edilebilirlikte ise kestane balına eklenen kestane propolisinin ekstraksiyon yöntemi farkılığından ve oranınından etkilenmediği görülmüştür. Çiçek balında ise propolis ilave oranının artması genel kabul edilebilirliği düşürmüştür.

4.2.3.2 Kek

Optimize kestane propolis ekstraktlarının etkilerini çoklu bileşene sahip bir gıda modelinde belirlemek, aynı zamanda ısıl işlemin biyoaktivite üzerindeki etkisini tespit etmek amacıyla, optimize ekstraktlar 4 farklı oranda temel kek formülasyonuna ilave edilerek homojen karışımlar elde edilmiş ve ürünler aynı proses koşullarında pişirilerek hazırlanmıştır. Elde edilen ürünlerin antioksidan aktivite, toplam fenolik, renk ve duyusal analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ürünler Şekil 4.13; 4.14; 4.15 ve 4;16'da analiz sonuçları ise Tablo 4.13 ve Tablo 4.14'de verilmiştir.



Şekil 4.13 Optimize kestane propolisi ilave edilmiş kek örnekleri



Şekil 4.14 Maserayonekstrasyon yöntemli optimize kestane propolisi farklı oranlarda ilaveli kekler



Şekil 4.15 Reflux ekstraksiyon yöntemli optimize kestane propolisi farklı oranlarda ilaveli kekler



Şekil 4.16 Ultrasound ekstraksiyon yöntemli optimize kestane propolisi farklı oranlarda ilaveli kekler

4.2.3.2.1 Kek örneklerinin biyoaktif nitelikleri

Tablo 4.13 Optimize kestane propolis ekstraktı ilaveli kek örneklerinin antioksidan aktivite ve toplam fenolik madde içerikleri

Ekstraksiyon tipi	Propolis içeriği (%)	Antioksidan aktivite (%inhibisyon)	Toplam fenolik madde (µg GAE /g)
M	Kontrol kek	$11,97\pm0,90^{Ad}$	$285,0\pm3,20^{Ad}$
	1	$25,73\pm0,25^{Ac}$	$402,5\pm1,80^{Ac}$
	2	$37,48\pm1,20^{Ab}$	$432,5\pm2,00^{Ab}$
	4	$47,67\pm0,85^{Aa}$	$917,5\pm0,95^{Aa}$

Tablo 4.13'ün devamı

Ekstraksiyon tipi	Propolis içeriği (%)	Antioksidan aktivite (%inhibisyon)	Toplam fenolik madde (µg GAE /g)
R	Kontrol kek	11,97±0,90^{Ac}	285,0±3,20^{Ad}
	1	18,65±0,90^{Ab}	422,5±1,70^{Ac}
	2	24,64±1,20^{Ab}	455,0±2,20^{Ab}
	4	35,62±2,30^{Aa}	862,5±0,90^{Aa}
U	Kontrol kek	11,97±0,90^{Ac}	285,0±3,20^{Ac}
	1	24,18±0,70^{Ab}	292,5±0,25^{Ac}
	2	26,83±0,50^{Aab}	350,0±0,60^{Ab}
	4	30,29±0,90^{Aa}	360,8±0,40^{Aa}

Aynı sütundaki küçük harflerdeki (a-d) farklılık örneklerin oransal propolis artışı arasındaki farkın istatiksel olarak (p<0,05) öenmli olduğunu, aynı sütundaki büyük harf(A) ekstraksiyon yöntemleri arasında farkın önemli olduğunu göstermektedir.
M: Maserasyon ekstraksiyon, R: Refluks ekstraksiyon, U: Ultrasonik destekli ekstraksiyon

Keklere farklı yöntemlerle elde edilmiş propolisler farklı oranlarda ilave edildiğinde antioksidan aktivite ve toplam fenolik madde miktarındaki değişim Tablo 4.13'de verilmiştir. Maserasyon, refluks ve ultrasound destekli ekstraksiyon yöntemleri ile ekstrakte edilmiş propolisler, keklere farklı oranlarda katıldığında antioksidan aktivite ve toplam fenolik madde miktarı açısından ekstraksiyon yönteminin değişmesinin istatistiksel olarak bir fark oluşturmadığını (p>0,05) göstermiştir.

Keklere %0; 1; 2; 4 oranlarında farklı metodlarla ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiş propoliseklendiğinde, propolis ilave oranının artması kekin antioksidan aktivite değerlerinin ve toplam fenolik madde miktarlarının istatistiki olarak anlamlı ölçüde (p<0,05) artmasına neden olduğu sonucuna varılmıştır.

Yapılan bir çalışmada meyveli yoğurt örneklerine farklı oranlarda propolis ilavesi yapılmıştır. İlave edilen propolis oranı DPPH inhibisyon miktarı üzerinde etkili bulunmuş ve propolis ilave oranı arttıkça % DPPH inhibisyonunun artmıştır. Aynı çalışmada toplam fenolik madde miktarının propolis ilave oranı arttıkça arttığı tespit edilmiştir (Güney, 2016).

Başka bir çalışmada yoğurda propolis ve bal ilave edilmişve bu yoğurtların özellikleri incelenmiştir. Çalışmada antioksidan aktivite tayini % DPPH yöntemiyle incelenmiş ve toplam fenolik madde miktarına bakılmıştır. İçerisine ilave edilen

propolis ve bal gibi arı ürünlerinin antioksidan aktivite toplam fenolik madde miktarını artırdığı belirtilmiştir (Kıran, 2021).

4.2.3.2.2 Kek örneklerinin renk değerleri

Optimize kestane propolisi ilave edilmiş kekin renk analizi sonuçları için kekin hem iç yüzeyinden hem de dış yüzeyinden ölçüm yapılmıştır. Kek örneklerinin renk değerleri Tablo 4.14'de verilmiştir.

Tablo 4.14 Optimize kestane propolisi ilave edilmiş kek örneklerinin renkdeğerleri

		İÇ			DIŞ		
Ekstraksiyon tipi	Propolis içeriği (%)	***L****	***a****	***b****	***L****	***a****	***b****
	Kontrol	$59,42\pm1,81^{ABCD}$	$2,54\pm0,21^{D}$	$23,38\pm0,65^{E}$	$42,12\pm0,33^{BCD}$	$17,88\pm0,27^{E}$	$30,78\pm0,60^{D}$
M	1	$61,79\pm1,83^{aAB}$	$3,21\pm0,46^{bC}$	$24,70\pm0,60^{bCD}$	$42,20\pm0,83^{aBC}$	$18,67\pm0,57^{bDE}$	$31,34\pm0,81^{bCD}$
	2	$61,20\pm2,80^{aAB}$	$2,94\pm0,40^{bCD}$	$25,07\pm0,62^{abABCD}$	$41,65\pm0,50^{aCD}$	$19,09\pm0,43^{abCD}$	$31,98\pm0,33^{abBCD}$
	4	$56,26\pm2,17^{bDEF}$	$4,36\pm0,22^{aA}$	$26,01\pm0,45^{aA}$	$39,02\pm0,37^{bE}$	$19,82\pm0,31^{aBC}$	$32,54\pm0,61^{aBC}$
R	1	$57,17\pm1,66^{aCDEF}$	$3,36\pm0,20^{cC}$	$24,79\pm0,80^{bBCD}$	$43,79\pm0,99^{aA}$	$18,84\pm0,51^{bDE}$	$20,80\pm0,91^{cF}$
	2	$55,22\pm1,689^{abEF}$	$4,05\pm0,18^{bAB}$	$25,01\pm0,48^{abABCD}$	$41,88\pm0,29^{bCD}$	$18,75\pm0,55^{bDE}$	$28,19\pm0,35^{bE}$
	4	$54,11\pm0,27^{bF}$	$4,59\pm0,23^{aA}$	$25,98\pm0,70^{aAB}$	$39,09\pm0,71^{cE}$	$19,81\pm0,28^{aBC}$	$31,19\pm0,29^{aD}$
U	1	$62,49\pm1,57^{aA}$	$3,13\pm0,15^{cC}$	$24,36\pm0,41^{bDE}$	$44,08\pm0,36^{aA}$	$18,44\pm0,45^{cDE}$	$32,76\pm0,64^{bB}$
	2	$60,46\pm1,63^{abABC}$	$3,5\pm0,17^{bBC}$	$25,01\pm0,50^{abABCD}$	$43,17\pm0,58^{bAB}$	$20,16\pm0,70^{bB}$	$34,20\pm0,67^{aA}$
	4	$58,63\pm0,82^{bBCDE}$	$4,26\pm0,24^{aA}$	$25,71\pm0,540,39^{aABC}$	$40,97\pm0,31^{cD}$	$21,13\pm0,30^{aA}$	$34,95\pm0,44^{aA}$

Aynı sütundaki küçük harflerdeki (a-c) farklılık örneklerin oransal propolis artışı arasındaki farkın istatiksel olarak ($p<0,05$) farklı olduğunu, aynı sütundaki büyük harflerdeki farklılık (A-F) ekstraksiyon yöntemleri arasında fark olup olmadığını göstermektedir.

M: Maserasyon ekstraksiyon, R: Refluks ekstraksiyon, U: Ultrasonik destekli ekstraksiyon

Keklerin tümünün iç yüzey *L** parlaklık değerlerinin kestane propolisi ilavesinin yüzde oranının artmasıylaistatistiki olarak (p<0,05) azaldığı tespit edilmiştir. Bu durum propolis ilavesinin *L** parlaklık değerini azaltıcı etki göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yöntemler birbiri arasında *L** parlaklık değerleri karşılaştırıldığında ise en yüksek parlaklık değeri ultrasonik ekstraksiyon %1 kestane proplisi ilaveli kekte olduğu, en düşük ise refluks ekstraksiyon %4 kestane propolisi ilaveli kekte olduğu bulunmuştur. Refluks ekstraksiyon yönteminin *L** parlaklık değerini daha çok düşürdüğü tespit edilmiştir.

Keklerin tümünün dış yüzey *L** parlaklık değerlerinin kestane propolisi ilavesinin yüzde oranının artmasıyla istatistiki olarak (p<0,05) parlaklığın kekin iç yüzeyinde olduğu gibi azaldığı görülmüştür. Ekstraksiyon yöntemleri birbirleri arasında karşılaştırıldığında *L** değerinin en yüksek ve kekin en parlak olduğu ulstrasound ekstraksiyon %1 kestane propolisi ilave edilmiş kekte, en koyu kekin ise maserasyon ekstraksiyon %4 propolis ilaveli kekte olduğu bulunmuştur.

Acun ve Gül (2021)'de yaptıkları bir çalışmada mikroenkapsüle çam propolisinin top kek üretiminde kullanılmasını incelemişlerdir. Araştırmalarında top keke 3 farklı oranda (%6; 9; 15) mikroenkapsüle çam propolisi ilave ederek kekin dış yüzeyinde *L** parlaklık değerini ölçmüşlerdir. Propolis ilave edilme oranının artmasının *L** parlaklık değerinin azalmasına sebep olduğu sonucuna varmışlardır.

Keklerin iç yüzeylerinde *a** kırmızılık değerlerine bakıldığında kestane propolisi ilavesi arttıkça *a** değerinin arttığı ve keklerin daha koyu olduğu tespit edilmiştir. Tüm ekstraksiyon yöntemlerinde %4 oranında kestane propolisi ilaveli kekler diğer oranlardaki keklere göre daha koyu bulunmuştur. Refluks ekstraksiyon metodunun keklerin rengini daha da koyulaştırdığı gözlemlenmiştir.

Kestane propolisi ilavesi kekin dış yüzeyinde koyuluğun artmasına neden olmuştur. *a** kırmızılık değerinin kontrol kekinde en az olduğu; ultrasound destekli ekstraksiyon yönteminin %4 oranında kestane propolisi ilavesinin ise en yüksek olduğu ve böylelikle kekin en koyu dış kabuk rengine sahip kek olmasında etkili olduğu bulunmuştur.

Keklerin tümünün iç yüzey *b** sarılık değerlerinin kestane propolisi ilavesinin yüzde oranının artmasıyla istatistiki olarak (p<0,05) arttığı tespit edilmiştir. Maserasyon ekstraksiyon yönteminin %4 oranında ilave edildiği M4 kekinin sarılık değerinin en yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Keklerin dış yüzeylerindeki *b** sarılık değerlerine bakıldığında ise kestane propolisi ilavesinin her 3 yöntem içinde keklerdeki sarılık değerini artırdığı bulunmuştur. Ultrasonik ekstraksiyon metodunun %2 ve %4 kestane propolisi ilavesinin sarılık değerini diğer yöntemlerden daha fazla artırdığı tespit edilmiştir.

Acun ve Gül (2021)'de yaptıkları bir çalışmada mikroenkapsüle çam propolisinin top kek üretiminde kullanılmasını incelemişlerdir. Araştırmalarında top keke 3 farklı oranda (%6; 9; 15) mikroenkapsüle çam propolisi ilave ederek kekin dış yüzeyinde *L** parlaklık değerini ölçmüşlerdir. Propolis ilave edilme oranının artmasının *L** parlaklık değerinin azalmasına sebep olduğu sonucuna varmışlardır. Kekin dış yüzey *a** ve *b** değerinde kontrol gurubuna göre enkapsüle propolis ilave edilen top kekler daha yüksek *a** ve *b** değerlerinde olduğunu bulmuşlardır. Kekin iç yüzeyinde ise *a** kırmızılık ve *b** sarılık değerlerinin enkapsüle çam propolisi ilavesi ile arttığını tespit etmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada yoğurt numunelerine farklı oranlarda (%0; %0,25; %0,5 ve %0,75) propolis ilave edilerek propolisli yoğurdun renk *(L*, a*, b**) değerleri incelenmiştir. Depolama süresi ve propolis ilave edilme oranı arttıkça *L** ve *a** değerlerinin düştüğü, *b** değerinin ise arttığı gözlemlenmiştir (Çiftçi, 2015).

Keklerin renk analiz sonuçlarında; kestane propolisi ilave oranının artması *L** parlaklık değerlerinin düşmesine, *a** kırmızılık ve *b** sarılık değerlerinin artmasına neden olmuştur.

4.2.3.2.3 Kek örneklerinin duyusal özellikleri

Gıdalarda bozulmaya tanımlamak, tespit edebilmek ve yeme kalitesini ölçmek için birçok farklı metod kullanılmaktadır. En fazla kullanılan yöntem ise duyusal analiz yöntemidir (Gebresellassie ve Clifford, 2016). Farklı metotlar ile ekstrakte edilen

optimize kestane propolisi ilave edilmiş kek örneklerinin duyusal değerlendirme sonuçları Tablo 4.15'de verilmiştir.

Tablo 4.15 Optimize kestane propolisi ilave edilmiş kek örneklerinin duyusal değerlendirme sonuçları

		Dış Özellikler					İç Özellikler				
Ekstraksiyon tipi	**Propolis İçeriği (%)**	**Şekil simetrisi**	**Renk**	**Pişme düzgünlüğü**	**Görünüş**	**Doku (Gözenek)**	**Çiğneme özellikleri**	**Tatlılık**	**İç renk**	**Lezzet**	**Kabul edilebilirlik Puanı**
M	K	4,80±0,45^{aA}	4,80±0,45^{aA}	5,00±0,00^{aA}	4,60±0,55^{aA}	4,80±0,45^{aA}	5,00±0,00^{aA}	4,80±0,45^{aA}	4,80±0,45^{aA}	4,80±0,45^{aA}	5,00±0,00^{aA}
	1	4,40±0,55^{aAB}	4,60±0,55^{aAB}	4,80±0,45^{aA}	4,60±0,55^{aAB}	4,60±0,55^{aAB}	4,40±0,55^{aAB}	4,60±0,55^{abAB}	4,80±0,45^{aAB}	4,60±0,55^{aAB}	4,80±0,45^{aA}
	2	4,40±0,55^{aAB}	4,60±0,55^{aAB}	4,80±0,45^{aA}	4,00±0,71^{aAB}	4,40±0,55^{aAB}	4,60±0,55^{aAB}	3,80±0,45^{bAB}	4,40±0,55^{aAB}	4,20±0,45^{aAB}	4,40±0,45^{aA}
	4	4,60±0,55^{aAB}	4,40±0,89^{aAB}	4,40±0,55^{aA}	4,20±0,84^{aAB}	4,20±0,84^{aAB}	4,20±1,09^{aAB}	3,80±0,45^{abB}	3,80±1,10^{aAB}	4,00±1,00^{aAB}	4,20±0,84^{aA}
R	K	4,80±0,45^{aA}	4,80±0,45^{aA}	5,00±0,00^{aA}	4,60±0,55^{aA}	4,80±0,45^{aA}	5,00±0,00^{aA}	4,80±0,45^{aA}	4,80±0,45^{aA}	4,80±0,45^{aA}	5,00±0,00^{aA}
	1	4,00±0,71^{abBC}	4,40±0,55^{aBC}	4,20±0,84^{abB}	4,20±0,84^{abBC}	4,40±0,55^{abBC}	4,40±0,89^{aB}	4,40±0,55^{abB}	4,20±0,45^{aB}	4,00±1,00^{aB}	4,20±0,84^{abB}
	2	4,60±0,55^{abBC}	4,60±0,55^{aBC}	3,80±0,84^{bB}	4,00±0,71^{abBC}	4,20±0,45^{abBC}	4,40±0,55^{aB}	4,20±0,45^{abB}	4,00±1,00^{aB}	4,00±0,71^{aB}	4,00±0,00^{bB}
	4	3,80±0,45^{bBC}	3,20±0,84^{bBC}	3,60±0,55^{bB}	3,20±0,84^{bBC}	3,60±0,55^{bBC}	3,80±0,84^{aB}	3,60±0,55^{bB}	2,80±0,45^{bB}	3,60±0,55^{aB}	3,40±0,55^{bB}
U	K	4,80±0,45^{aA}	4,80±0,45^{aA}	5,00±0,00^{aA}	4,60±0,55^{aA}	4,80±0,45^{aA}	5,00±0,00^{aA}	4,80±0,45^{aA}	4,80±0,45^{aA}	4,80±0,45^{aA}	5,00±0,00^{aA}
	1	4,00±0,00^{bC}	4,20±0,83^{abC}	4,20±0,45^{abB}	3,60±0,55^{bC}	4,20±0,45^{abB}	4,00±0,71^{aB}	4,20±0,45^{abB}	4,20±0,84^{aB}	4,00±0,71^{abB}	4,00±0,71^{bB}
	2	3,80±0,45^{bC}	3,60±0,55^{bC}	4,00±0,70^{abB}	3,60±0,55^{bC}	3,60±0,55^{bB}	4,20±0,45^{aB}	4,20±0,45^{abB}	4,00±0,00^{aB}	4,00±1,00^{abB}	3,60±0,55^{bB}
	4	3,40±0,55^{bC}	3,20±0,45^{bC}	3,80±0,84^{bB}	3,40±0,55^{bC}	3,40±0,55^{bB}	4,00±1,00^{aB}	3,60±0,55^{bB}	2,80±0,45^{bB}	3,40±0,55^{bB}	3,20±0,45^{bB}

**Aynı sütundaki küçük harflerdeki (a-c) farklılık örneklerin oransal propolis artışı arasındaki farkın istatiksel olarak ($p<0,05$), aynı sütundaki büyük harflerdeki farklılık (A-C) ekstraksiyon yöntemleri arasında fark olup olmadığını göstermektedir.*

K: Kontrol, propolis ilavesiz kek, M: meserasyonekstrasksiyon yöntemli optimize kestane propolis ekstraktı, R: Refluksekstrasksiyon yöntemli optimize kestane propolis ekstraktı, U: Ultrasound ekstrasksiyon yöntemli optimize kestane propolis ekstraktı

Farklı metotlar ile ekstrakte edilen optimize kestane propolisi ilave edilmiş kek örneklerinin duyusal değerlendirme sonuçlarına bakıldığında şekil simetrisi açısından en çok beğenilen kontrol keki olurken, ultrasound ekstraksiyon metodu ile ekstrakte edilmiş propolis ilaveli keklerin dış şekil simetrisi diğer ekstraksiyon metodlarından daha düşük bulunmuştur. Dış renk değerlendirildiğinde refluks ve ultrasound destekli ekstraksiyon ile ekstrakste edilmiş propolis ilaveli keklerin maserasyon ekstraksiyon ile ekstrakte edilmiş propolis ilaveli keklerden daha koyu renkte olduğu bulunmuştur. Kekin dış renginin koyuluğunun artmasında keke ilave edilen propolis oranının artmasının etkili olduğu düşünülmektedir. Pişme düzgünlüğünün ve dış görünüşün maserasyon ekstraksiyon ile ekstrakte edişmiş propolis ilaveli keklerde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Keklerin dokusu incelendiğinde en yüksek gözenek yapısı kontrol örneği olurken; refluks ekstraksiyon metodu ile ekstrakte edilmiş propolis ilavesi keklerde doku (gözenek yapısı) üzerinde olumsuz etki gösterdiği tespit edilmiştir. Keklerin çiğneme özellikleri açısından istatistiki olarak (p>0,05) farkın olmadığı bulunmuştur. Tatlılıkta en yüksek değeri kontrol keki alırken %4 propolis ilaveli keklerde tatlılık azalmıştır. Propolis ilavesi arttıkça propolisin kekteki tadı baskıladığı düşünülmektedir. Kekin iç renginde dış renkte olduğu gibi refluks ve ultrasound destekli ekstraksiyon ile ekstrakste edilmiş propolis ilaveli keklerin maserasyon ekstraksiyon ile ekstrakte edilmiş propolis ilaveli keklerden daha koyu renkte olduğu bulunmuştur. Keklerin renk farklılıklarında propolis ilavesinin artması ve propolis ekstraksiyon yönteminin etkili olduğu düşünülmektedir. Bu durum keklerin renk analiz sonuçlarında da propolis ilavesinin rengi koyulaştırdığı tespitini desteklemektedir. Lezzet açısından kekler değerlendirildiğinde maserasyon ekstraksiyon ile ekstrakte edilmiş kekler değerlendirmede daha yüksek sonuçlanmıştır.

Keklerin kabul edilebilirliği değerlendirildiğinde ise kontrol kekinin en kabul edilebilir kek olduğu; propolis ekstraksiyon yönteminin ve propolis ilave oranının genel kabul edilebilirliği etkilediği görülmüştür.

Tüm parametrelere dayanarak duyusal değerlendirme sonuçları değerlendirildiğinde kontrol kekinin beğenisinin en yüksek olduğu ve %1 propolis ilavesinin beğenildiği sonucuna ulaşılmıştır. Propolis ilave yüzdesinin beğeni oranını azalttığı; ultrasonik ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilmiş propolis ilavesi keklere olumsuz etkiler yaptığı tespit edilmiştir.

Acun ve Gül (2021), mikroenkapsüle çam propolisinin top kek üretiminde kullanılmasının duyusal özelliklerini incelediklerinde top keklerin İç renklerinde mikroenkapsüle çam propolisi ilavesinin artması keklerin tüketici beğenisinin azalmasına neden olduğu sonucuna varmışlardır. Tekstür, çiğnenebilirlik, ağızda dağılma, koku, aroma, tat/lezzet ve genel kabul edilebilirlik puanlarının da mikroenkapsüle çam propolisi ilave edilme oranının artmasıyla azaldığını tespit etmişlerdir. Duyusal özellikleribir bütün olarak incelediklerinde ise çam propolisinin maltodekstrin/arap zamkı ile mikroenkapsülasyonu sonucu istenmeyen koku-aroma bileşenlerinin maskelenerek kek üretiminde kullanılabileceğine, %6 oranına kadar mikroenkapsüle çam propolisi ilave edilerek üretilen fonksiyonel özellikteki keklerin duyusal özellikler açısından önemli bir farklılık oluşturmadığı sonucuna varmışlardır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1 Sonuç

Arı ürünleri insanlar için yüzyıllardır ilgi odağı olmuş ve farklı amaçlarla kullanılmıştır. En çok bilinen arı ürünü bal olsa da, propolis bünyesinde barındırdığı çeşitli maddeler sayesinde antioksidan, antibakteriyel, antiinflamatuar gibi özellikler göstermektedir. Propololisin bu metabolik etkileri yapısında olan mineraller, esansiyel yağlar, organik maddeler, fenolik asit gibi bileşenlerden kaynaklanmaktadır. Propolisin içeriği elde edildiği bölgeye, toplama şekline ve bölgeye göre değişmektedir. Bu nedenle propolisin içeriğinin aydınlatılması propolisin etkisi hakkında bilgi sağlar.

Kestane propolisi kestane ağaçlarının yoğun olduğu bölgelerde yapılan arıcılık faaliyetlerinden elde edilen bir arı ürünüdür. Kestane propolisi Kastamonu'nun kestane ağaçlarının yoğun olarak bulunduğu orman bölgesi sınırlarını içine alan Azdavay, Bozkurt, Cide, Doğanyurt, İnebolu, Küre ilçelerinin kestane balı kovanlarından temin edilmiştir. Propolis ham halinde içinde zamksı maddeler ve reçine bulunması sebebiyle direkt olarak kullanılamaz. Bu nedenle önce ekstraksiyonun etkin bir şekilde yapılması gerekir. Propolis ekstraktlarının hazırlanması için farklı ekstraksiyon yöntemleri vardır.

Bu çalışmada, kestane propolisine maserasyon, refluks ve ultrasound destekli ekstraksiyon yöntemleri uygulanmıştır. Her üç yöntem için işlem parametreleri Yüzey Yanıt Yöntemi, Merkezi Deneme Deseni kullanılarak optimize edilmiştir. Optimizasyonda antioksidan aktivite ve toplam fenolik madde miktarı yanıt (response) olarak kullanılmıştır. Her üç yöntem için de yanıtlar değerlendirildiğinde; Maserasyon ekstraksiyon için optimizasyon sonucu etanol konsantrasyonu %78,46; ekstraksiyon süresi 71,05 saat olması durumunda toplam fenolik madde miktarı 980,39 mg/100 ml ve antioksidan aktivite miktarı %84,16 olarak tahminlenmiştir. Reflüks ekstraksiyon için optimizasyon sonucu etanol konsantrasyonu %80,64; ekstraksiyon süresi 117,44 dak ve sıcaklık 38,38°C olması durumunda 788,556 mg/100 ml toplam fenolik madde ve %79,76 antioksidan aktivite olarak

tahminlenmiştir. Ultrasound destekli ekstraksiyon için optimizasyon sonucu etanol konsantrasyonu %82,49; ekstraksiyon süresi 59,12 dak ve sıcaklık 40,53°C olması durumunda 695,911 mg/100 ml toplam fenolik madde miktarı ve %65,68 antioksidan aktivite olarak belirlenmiştir. Tahminlenen değerlerin validasyonu yapılarak sonuçlar doğrulanmıştır.

Optimizasyon sonucu elde edilen kestane propolis ekstraktlarının karakterizasyonunu belirlemek amacıyla optimum propolislerinin antioksidan aktive, toplam fenolik madde, fenolik madde kompozisyonları, uçucu madde içerikleri ve mineral madde kompozisyonu analizleri yapılmıştır. Optimum ekstraktlarda toplam fenolik madde miktarı; maserasyon ekstraksiyon yöntemi ile 977,50 mg/100ml, refluks ekstraksiyon yöntemi ile 917,50 mg/100ml ve ultrasound destekli ekstraksiyon ile 812,50 mg/100 ml bulunmuştur. Optimum kestane propolisi ekstraktlarında toplam fenolik madde miktarı maserasyon ekstraksiyonda diğer yöntemlere göre yüksek bulunmuştur.

Optimum ekstraktlarda antioksidan aktivite % inhibisyon değerleri; maserasyon ekstraksiyonda %88,61; refluks ekstraksiyonda %79,50; ultrasound destekli ekstraksiyonda %75,22 olarak bulunmuştur.

Optimum kestane propolislerinin fenolik madde içeriklerinde maserasyon ekstraksiyon ile elde edilen propolis ekstraktında fenolik asitlerden gallik asit tespit edilememesine rağmen, kafeik asit, elajik asit, ferulik asit, kuersetin, t-sinnamik asit, apigenin, pinosembrin ve CAPE gibi başlıca fenolikler açısından, diğer iki yöntemle elde edilen ekstraktlara göre içeriği daha zengin bulunmuştur. Genel olarak fenolik madde içeriği değerlendirildiğinde, bir flavon olan krisinin düzeyi en yüksek olarak belirlenmiştir. Bunun yanı sıra kestane propolis ekstraktlarının pinosembrin, derulik asit, elajik asit ve CAPE gibi diğer fenolikler açısından da zengin olduğu belirlenmiştir.

Uçucu madde içeriklerinde yağ asitlerinin tespiti, ekstraksiyon yönteminden etkilenmiş ve en fazla refluks yönteminde belirlenmiştir. Özellikle oleik, stearik, palmitik asit gibi yağ asitleri yalnızca refluks ekstraksiyon ile alınabilmiştir. Bileşiklerin flavonoid ve fenol sınıfları ise en az tespit edilenlerdir. Çalışmada

kullanılan propolislerin kestane orijinli olması nedeniyle osimenin Cis- izomerinin baskın olarak bulunduğu düşünülmektedir. Ultrasound destekli ekstraksiyon ile Sitren tespit edilirken diğer yöntemlerle bu bileşik alınamamıştır. Her üç yöntemle elde edilen numunede ortak bulunan diğer bir bileşik benzaldehitönemli bir aromatik aldehit grubuna girer. Her üç ekstraksiyon numunesinde de tespit edilen Karvakrol, bazı bitkilerin uçucu yağlarında bulunan fenolik bir monoterpenoiddir.

Kestane propolisi numunelerinde 11 tane elementin (Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Zn, Pb, P, Na, Ca, K) konsantronyonları tespit edilmiştir. Makro elementlerden P ve Na elementleri tüm ekstraksiyon yöntemlerinde elde edilirken miktarları maserasyon ve refluks ekstraksiyonda konsantrasyonlar birbirlerine çok yakın ve ultrasound destekli ekstraksiyon metodundan daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ca elementi analiz sonuçlarına göre en yüksek miktara sahip numune 49,250 ppm ile refluks ekstraksiyon metodu ile ekstrakte edilen kestane propolisi olmuştur. K elementi ise maserasyon ekstraksiyon yönteminde 78,550 ppm olurken ultrasound destekli esktraksiyonda 56,800 ppm bulunmuş, refluks ekstraksiyonda ise tespit edilememiştir. Mineral madde içeriği açısından ekstraksiyon yönteminin önemli olduğu; makro minerallerde K elementi hariç refluks ekstraksiyonun ppm değeri daha yüksek bulunduğu gözlemlenmiştir.

Optimize kestane propolis ekstraktları çiçek ve kestane ballarına 4 farklı oranda ilave edilerek bal karışımlarının antioksidan aktivite, toplam fenolik, renk ve duyusal analizleri gerçekleştirilmiştir. Kestane balının propolis ilave edilmeden antioksidan aktivite değeri çiçek balından yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu;farklı ekstraskiyon yöntemleriyle elde edilen propolisin farklı oranlarda çiçek balına ve kestane balına ilavesi sonucunda kestane ballarının antioksidan aktivitesi çiçek ballarının antioksidan aktivitesinden istatistiki olarak önemli düzeyde (p<0,05) yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Çiçek ve kestane ballarının antioksidan aktivite değerleri için propolis ekstraksiyon yöntemleri istatiksel olarak önemli bulunmamıştır. Farklı yöntemlerle ekstrakte edilen propolis çiçek ve kestane balına %0; 1; 2; 4 oranlarında katıldığında propolis oranının arttıkça antioksidan aktivite düzeyinin arttığı her iki bal çeşidinde de gözlemlenmiştir. Çiçek ve kestane ballarına farklı oranlarda farklı yöntemlerle ekstrakte edilmiş propolis ilave edildiğinde ektraksiyon yöntemlerinin

farklılığının toplam fenolik madde miktarını istatistiki olarak önemli bir düzeyde etkilemediği görülmüştür. Maserasyon, refluks ve ultrasound destekli ekstraksiyon yöntemleri ile ekstrakte edilmiş propolisin çiçek ve kestane ballarına farklı oranlarda ilave edilmesi toplam fenolik madde miktarının oran arttıkça artmasına neden olmuştur. Çiçek ve kestane ballarında toplam fenolik madde miktarı açısından maserasyon ekstraksiyon yöntemiyle ekstrakte edilmiş propolis ilaveli ballarda yüksek olduğu görülmüştür.

Kestane balı ve çiçek balının renk yoğunluğuna bakıldığında kestane balının renginin çiçek balının renginden yaklaşık 3 kat daha koyu olduğu görülmüştür. Kestane ballarına farklı oranlarda ve farklı yöntemlerle ekstrakte edilmiş kestane propolisi eklendiğinde bal karışımlarında renk yoğunluğu farkının çok az olduğu; çiçek ballarına kestane propolisi ilave edildiğinde ise renk yoğunluğunu önemli derecede arttığı görülmüştür. Çiçek ballarının renk yoğunluğunun propolis ekleme yüzdesi arttıkça tespit edilmiştir.

Optimize kestane propolis ekstraktlar 4 farklı oranda temel kek formülasyonuna ilave edilerek ürünlerin antioksidan aktivite, toplam fenolik, renk ve duyusal analizleri gerçekleştirilmiştir. Maserasyon, refluks ve ultrasound destekli ekstraksiyon yöntemleri ile ekstrakte edilmiş propolisler keklere farklı oranlarda katıldığında antioksidan aktivite ve toplam fenolik madde miktarı açısından ekstraksiyon yönteminin değişmesinin istatistiksel olarak bir fark oluşturmadığı görülmüştür. Keklere %0; 1; 2; 4 oranlarında propolis eklendiğinde propolis ilave oranının artması kekin antioksidan aktivite değerlerinin ve toplam fenolik madde miktarlarının istatistiki olarak anlamlı ölçüde artmasına neden olduğu görülmüştür.

Keklerin renk analiz sonuçlarında; kestane propolisi ilave oranının artması L^* parlaklık değerlerinin düşmesine, a^* kırmızılık ve b^* sarılık değerlerinin artmasına neden olmuştur.

Keklerin duyusal analiz sonuçları incelendiğinde kontrol kekinin beğenisinin en yüksek olduğu ve %1 propolis ilavesinin beğenildiği sonucuna ulaşılmıştır. Propolis

ilave yüzdesinin beğeni oranını azalttığı; ultrasonik ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilmiş propolis ilavesi keklere olumsuz etkiler yaptığı tespit edilmiştir.

Kestane ve çiçek balına ilave edilen propolis sonucunda balın antioksidan ve fenolik madde açısından elde edilen değerler propolis ilaveli kekten elde edilen sonuçlardan daha yüksektir.

5.2 Öneriler

Propolis, içerdiği fenolik maddeler sayesinde arı ürünleri arasında insan beslenmesi açısından çok önemli bir yere sahiptir. Propolis ile ilgili çok uzun zamandır çalışmalar mevcut olsa da, özellikle son yıllarda yaşanan pandemi süreci nedeniyle bağışıklık destekleyici gıda takviyelerine olan taleple birlikte önemi ve kullanımı hem tüketiciler hem de araştırmacılar açısından artmıştır.

Çalışmamızda Kastamonu bölgesinden elde edilen kestane propolisinin karakterizasyonu belirlenmiş ve ekstraksiyon yöntem parametrelerinin optimizasyonu yapılmıştır. Propolisin kovandan alındığı ham haliyle doğrudan kullanılması veya hazırlanmasında bilimsel olmayan yöntemlerin kullanılması kullanıcılar için yararlı olmaktan çok zararlı etkilere neden olabileceğinden ektraksiyon işlem parametrelerinin gelecek araştırmalara ve sektöre fayda sağlayacağı, pratikte de kullanılabileceği düşünülmektedir.

Yüksek antioksidan ve fenolik madde içeriği için ham propolise uygulanan ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi arı üreticilerine ve sektöre yön gösterecek ve literatüre katkı sağlayacaktır. Maserasyon ekstraksiyon ile ekstrakte edilen propolislerin antioksidan aktivite ve fenolik madde değerleri diğer ekstraksiyon yöntemlerinden daha yüksek olduğundan tercih edilebilir.

Maserasyon esktraksiyon yöntemine kıyasla diğer iki yöntemin ekonomik açıdan daha pahalı olduğu fakat daha kısa zamanda ekstraksiyon işlemini gerçekleştirdiğini gözlemledik. Propolis ekstraksiyon işlemi için ekonomik açıdan daha uygun olması ve yeterli zaman varsamaserasyon işlemi tercih edilebilirken; ticari açıdan

bakıldığında ekstraksiyon süresinin kısa olması yönünden refluks veya ultrasound destekli ekstraksiyon yöntemi tercih edilebilir.

Yapmış olduğumuz tez çalışması sonucunda propolisi ekstraksiyon seçiminde ekstraksiyon parametreleri belirlenirken etanol yüzdesinin ortalama %75-85 oranında olması; sıcaklık uygulaması yapılacaksa ortalama 38-40^{o}C'lerde olması önerilmektedir. Bu değerler seçilecek ekstraksiyon metoduna göre farklılık gösterebilmektedir.

Çalışmamız sonucunda her 3 yönteminde avantajlarının olduğu, benzer biyoaktif sonuçlar verdiği görülmüştür. Propolis işleme proseslerinde 3 yöntemin de hem ayrı ayrı hem de kombine edilebileceği sonucuna varılmıştır. Bu çalışmanın propolisin ekstraksiyonu için yürütülen standardizasyon çalışmalarına katkı sağlanması beklenmektedir. Propolis için dünya genelinde kabul gören en ideal ekstraksiyon yöntemi, ekstraksiyon süresi, çözücü seçimi, fenolik ve diğer bileşen analizleri için kullanılacak analiz metodu gibi birçok parametreyi kapsayan bir standardizasyona ihtiyaç vardır. Böylelikle ulusal ve uluslararası propolis standartlarının oluşturulması sağlanabilir.

Propolis ilavesi bal ve kekin fonksiyonel niteliklerini artırmış ve propolisin günlük diyette insan beslenmesine dahil olmasına katkı sağlamıştır. Kek karışımlarına %1 propolis ilavesi duyusal açıdan beğenildiğinden günlük yaşantıda keke propolis ilavesi tavsiye edilmektedir.

Çiçek ve kestane balına propolis ilavesi karışımın antioksidan ve fenolik madde değerini artırdığından bal-propolis karışımının apiterapik olarak kullanımına olanak sağlamıştır.

Bu çalışmada propolis ilavesinin ürün biyoaktif niteliklerine katkısı incelenmekle birlikte, propolisin antioksidan ve antimikrobiyal etkileri sayesinde gıdaların raf ömrü değişimleri üzerinde olumlu etki sağlayabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abdel Rahman, M, A. & Mosaad, G, M. (2013). Effect of Propolis as Additive on Some Behavioural Patterns, Performanceand Blood Parameters in Muscovy Broiler Ducks. *Journal of Advanced Veterinary Research 3*, 64-68.

Acun, S. & Gül, H. (2021). Mikroenkapsüle Çam Propolisinin Top Kek Üretiminde Kullanılması. *Journal of theInstitute of Scienceand Technology*, *11*(2), 1205-1217.

Acun, S. (2021). Mikroenkapsülasyon Tekniğiyle Üretilen Farklı Propolis Ekstraktlarının Ve Bal Tozunun Kek Üretiminde Kullanılması. Doktora Tezi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.* Isparta.

Ahn, M. R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F. & Nakayama, T. (2007). Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of China. *Food Chemistry*, 101, 1383–1392. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.045.

Albayrak, S. & Albayrak, S. (2008). Propolis: Natural Antimicrobial Matter. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 37*, 201–215.61 164.

Alencar, S. M., Oldoni, T. L. C., Castro, M. L., Cabral, I. S. R., Costa-Neto, C. M., Cury, J. A., Rosalen, P. L. & Ikegaki, M. (2007). Chemical Composition and Biological Activity of A New Type of Brazilian Propolis: Red Propolis. *Journal Of Ethnopharmacology*, *113*, 278–283.

Aliyazıcioglu, R., Sahin, H., Erturk, O., Ulusoy, E. ve Kolayli, S. (2013). Properties of Phenolic Composition and Biological Activity of Propolis from Turkey, *International Journal of Food Properties*, *16*, 277-287.

Andrade, J. K. S., Denadai, M., de Oliveira, C. S., Nunes, M. L., Narain, N. (2017). "Evaluation of Bioactive Compounds Potential and Antioxidant Activity of Brown, Greenand Red Propolis from Brazilian Northeast Region," *Food Research International*, *vol. 101*, *pp*. 129–138.

Anjum, S., Ullah, A., Khan, K., Attaullah, M., Khan, H., Ali, H. & Dash, C. (2019). Propolisin (Arı Tutkalı) Bileşimi Ve Fonksiyonel Özellikleri: Bir İnceleme, *Suudi J. Biol. Bilim, Cilt. 26,* Hayır. 7, S. 1695-1703.

Arda, G. (2022). Propolis Ürünlerindeki Makro Ve Mikro Element İçeriklerinin Icp-Oes İle Tayini. Yüksek Lisans Tezi. *Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Tekirdağ.

Arslan, S., Perçin, D., Silici, S., Koça, N. &, Özgür, E. (2010). "Farklı Çözücülerle Hazırlanan Propolis Özütlerinin Mutans Streptokoklar Üzerine In Vıtro Antimikrobiyal Etkisi," *Sağlık Bilimleri Dergisi*, *vol. 19, no. 1*, pp. 68–73.

Atak, E., & Uslu, M. E. (2018). Fenolik Bileşikler, Ekstraksiyon Metotları ve Analiz Yöntemleri. *Soma Meslek Yüksekokulu Teknik Bilimler Dergisi, 3*(27), 39-48.

Atasoy, R., & Hendek Ertop, M. (2021). Assessment of Nutritional and Bioactive Propertiesfor Gluten-Free Tarhana Containing Various Legumes and Cereals. *Journal of Food Processing and Preservation, 45* (7), e15606.

Avşar, G., Topallar, S., Özdemir, S.& Külekçi, B. (2014). Uçucu Bileşen İçeren Bitkilerden Süperkritik Ekstraksiyon Yöntemi ile Özütleme. 4. *Kozmetik Kimyasi, Üretimi, Standardizasyonu Kongresi, Kimyagerler Dernegi,* 14-16 Subat 2014, Antalya.

Aydın, M., Danacıoğlu, D. A., & Türker, S. (2021). Propolisin Genel Özellikleri Ve Kullanımı.*Gıda, 46* (1), 69-81.

Bağdatlı, M., 2019. Enkapsüle Propolisin Fonksiyonel Gıda Üretiminde Kullanılması. Yüksek Lisans Tezi, *İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Malatya.

Bakdash, A., Almohammadi, O., Taha, N. A., Abu Rumman, A. & Kumar, S. (2018). "Chemical Composition of Propolis from The Baha Region in Saudi Arabia," *Czech Journal of Food Sci*, vol. 36, no. 2, pp. 00–10.

Bakkaloğlu, Z. (2020). Farklı Çözücü Ve Yöntemler Kullanılarak Elde Edilen Propolis Ekstraktlarının Karakterizasyonu. Doktora Tezi. *Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.* İstanbul.

Baltas, N. Karaoglu, S. A. Tarakci, C. & Kolayli, S. (2016). Effect of Propolis in Gastric Disorders: İnhibition Studies on The Growth of Helicobacter Pyloriand Production of İts Urease. *Journal of enzymeinhibition and med. Chemistry, 31(sup2),* 46–50.

Baltrusaityte, V., Venskutonis, P.R., Ceksteryte, V. (2007). Radical Scavenging Activity of Different Floral Origin Honey and Bee Dread Phenolic Extract. *Food Chemistry, 101*, 502-514.

Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B. J., Da Silva Cunha, I. B., Danert, C. & Zampini, C. (2019). Standard Methodsfor Apis Mellifera Propolis Research. *Journal of Apicultural Res, 58*(2):1–49.

Bankova, V., Castro, D. & Marcucci, M. (2000). Propolis: Recent Advancesin Chemistry and Plant Origin. *Apidologie*, 31: 3–15.

Banskota, A. H., Tezuka, Y., Kadota & S. (2001). Recent Progressin Pharmacological Research of Propolis. *Phytotherapy Research, 15*, 561–571.

Bayraktaroglu, G. & Obuz, E. (2006). Ultrasound Yönteminin İlkeleri ve Gıda Endüstrisinde Kullanımı. *9. Gıda Kongresi, 24-26*. Mayıs. Bolu.

Bayram, N. E. (2015). Hakkari Bölgesi Propolislerinin Botanik Orijininin Ve Kimyasal İçeriğinin Saptanması. Doktara Tezi, *İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. İstanbul.

Bayram, N. E. (2020). A Study on Free-Radical Scavenging Activity, İndividual Phenolic Compounds and Element Concentration of Propolis. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, *20*(2), 145-156.

Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., & Facino, R. M. (2005). Standardization of Antioxidant Properties of Honeybya Combination of Spectrophotometric/Fluorimetric Assays and Chemometrics. *Analytica Chimica Acta, 533*(2), 185-191.

Bozkuş, T. N., Değer, O., & Yaşar, A. (2021). Chemical Characterization of Waterand Ethanolic Extracts of Turkish Propolis by HPLC-DAD and GC-MS. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, *44*(1-2), 77-86.

Burdock, G. A. (1998). Reviewof The Biological Properties and Toxicityof Bee Propolis (Propolis). *Food And Chemical Toxicology, 36,* 347–363. Doi.Org/10.1016/S0278-6915(97)00145-2.

Büyüktuncel, E. (2012). "Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri" *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, no. 2, pp. 209–242.

Calegari, M. A., Ayres B. B., Dos Santos Tonial L. M., De Alencar S. M., Oldoni T. L. C. (2020). Fourier Transform Near İnfrared Spectroscopyas a Tool for Predicting Antioxidant Activity of Propolis. *Journalof King Saud University-Sci 32*(1):784–790.

Carpes, S. T., Begnini, R., Alencar, S. M. & Masson, M. L. (2007). Study of Preparations of Bee Pollen Extracts, Antioxidant and Antibacterial Activity. *Ciênc. agrotec, 31* (6): 1818-1825.

Castaldo, S. & Capasso, F. (2002). Propolis, An Old Remedy Used in Modern Medicine. *Fitoterapia,* 73, S1–S6.

Cavalaro, R. I., Cruz, R. G. Da Dupont, S., Moura de, J. M. L. N. & De Souza Vieira, T. M. F., et al. (2019). "In Vitro and InVivo Antioxidant Properties of Bioactiv compounds from Green Propolis Obtained by Ultrasound-Assisted Extraction,". *Foodchemistry*: X, vol. 4, p. 100 054.

Chemat, F., Grondin, I., Costes, P., Moutoussamy, L., Shum Cheong Sing & A., Smadja, J. (2004b). Highpower Ultrasound Effects on Lipid Oxidation of Refined Sunflower Oil. *Ultrasonics Sonochemistry* 11: 281-285.

Chemat, F., Grondin, I., Shum Cheong Sing, A. & Smadja, J. (2004a). Deterioration of Edible Oils During Food Processing by Ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11: 13-15.

Chemat, F., Huma, Z. & Khan, M. K. (2011). Applications of Ultrasound in Food Technology: Processing, Preservation and Extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18: 813-835.

Chi Y., Luo L., Cui M., Hao Y., Liu T., Huang X. & Guo X. (2020). Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oilof Chinese Propolis. *Chem. & biodiverse., 17*(1), e1900489.

Ciftci Yilmaz S., Azman Z. N., Kosem K., Gunduz E. & Grenman R. (2017). Evaluating Antioxidant Capacity of Different Propolis Samples from Konya, Turkey and Their Inhibitory Effect on Headand Neck Cancer Cells. *Bio Rxiv*, 183913.

Coşkun, N. Ö. (2020). Püskürtmeli Kurutma Yöntemi ile Propolis Enkapsülasyonu Yüksek Lisans Tezi, *Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.*Aydın.

Coşkun, P. & İnci. H. (2020). Propolisin Kimyasal İçeriği ile Antibakteriyel, Antiviral ve Antioksidan Aktivitesi. *ISPEC Journal of Agricultural Sciences, 4*(4), 1053-1070.

Cottica, S. M., Sabik, H., Antoine, C., Fortin, J., Graveline, N., Visentainer, J. V. & Britten, M. (2015). "Characterization of Canadian Propolis Fractions Obtained from Two-Step Sequential Extraction," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 60, no. 1, pp. 609–614.

Cui, W., Mazza, G., Oormah, B. D., & Biliaderis, C. G. (1994). of an Aqueous Extraction Processfor Flaxseed Gumby Response Surface Methodology. *Lebensmittel Wissenschauftund Technologie*, 27: 363-369.

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 Yieldand Composition of Brazilian Propolis Extract. *Journal Brazilian Chemistry Society*, 15, 964-970.

Çakıroğlu, T. (2010). "Çesitli Çözücülerde Türk Propolisinin Çözünürlüğünün İncelenmesi," PhDthesis, Yüksek Lisans Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri.

Çalışkol, M. M. (2013). "Azerbaycan Yöresine Ait Propolis Örneklerinin Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi," PhD thesis, Karadeniz Teknik Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü.

Çifçi, F. (2015). Propolisin Yoğurt Üretiminde Kullanılması. Yüksek Lisans Tezi. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Samsun.

De Groot, A. C. (2013). Propolis: a Review of Properties, Applications, Chemical Composition, Contact Allergy, and Other Adverse Effects. *Dermatitis, 24*(6), 263-282.

De Mendonça, M. A., Ribeiro, A. R., Lima, A. K. D.., Bezerra, G. B., Pinheiro, M. S., de Albuquerque Júnior, R. L.. & Cardoso, J. C. (2020). Kırmızı Propolis ve Dislipidemik Düzenleyici Formononetin: Sıçan Mide Ülseri Modelinde Antioksidan Aktivite ve Gastroprotektif Etkilerin Değerlendirilmesi. *Besinler 12* (10): 2951.

De Zordi, N., Cortesi, A., Kikic, I., Moneghini, M., Solinas, D., Innocenti, G., & Dall'Acqua, S. (2014). The Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Polyphenols from Propolis: a Central Composite Design Approach. *The Journal of Supercritical Fluids,* 95, 491-498.

Değirmencioğlu, N., Gürbüz, O., Herken, E. N. & Yıldız, A. Y. (2016). The İmpact of Drying Techniqueson Phenolic Compound, Total Phenolic Content and Antioxidant Capacityof Oat Flour Tarhana. *Food Chemistry* 194, 587–594.

Devequi Nunes, D., Machado, B. A. S., de Abreu Barreto, G., Silva, J. R., da Silva, D. F., daRocha, J. L. C., & Umsza-Guez, M. A. (2018). Chemical Characterization Andbiological Activity of Six Different Extractsof Propolis Through Conventional Methods and Supercritical Extraction. *Plosone, 13*(12), e0207676.

Dezmirean, D. S., Paşca, C., Moise, A. R., Bobiş, O. (2021). Plant Sourcesresponsible for The Chemical Composition and Main Bioactiveproperties of Poplar-Type Propolis. *Plants 10* (1):22.

Do Nascimento, T. G., Da Silva, P. F., Azevedo, L. F., Da Rocha, L.G., de Moraes Porto, I. C.C., Lima e Moura, T. F. A., vd. (2016). Polymeric Nanoparticles of Brazilian Redpropolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. *Nanoscale Res Lett*. 11, 301.

Doğan N., Hayoğlu İ. (2012). Propolis ve Kullanım Alanları. *Harran Tarım Ve Gıda Bilimleri Dergisi 16*(3): 39–48.

Duran, G. G. (2007). In-Vıtro Koşullarda Propolis'in Antibakteriyel, Antifungal Ve Leyişmanyasidal Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. *Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.* Hatay.

Dündar, E., & Yıldırım, H. K. (2018). Propolisin Çeşitliliğine Etki Eden Faktörler. *Arıcılık Araştırma Dergisi, 10*(2), 61-66.

El Neney, B. A. M., Awadşen, N, B. & Eid, Y. Z. (2016). The Use of Bee Propolis as a Source of Natural Additives to Improve the Productive Performance and Immune System of Local Chickens. *9th International Poultry Conference* 7 – 10 November 2016, Hurghada, Red Sea – Egypt.

Ercan, S. Ş. & Soysal, Ç., (2011). Ultrasonun Gıdalarda ve Enzimlerin İnaktivasyonunda Kullanılması, *Gıda/ The Journal of Food, 36*(4). 225-231.

Eren, İ. & Kaymak-Ertekin, F. (2007). Optimization of Osmotic Dehydration of Potato Using Response Surface Methodology. *Journal of Food Engineering, 79*(1), 344-352.

Ertop, U. (2020). Kastamonu İlinde Üretilen Kestane Ballarının Bazı Ağır Metal İçerikleri Ve Kimyasal özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. *Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.* Kastamonu.

Ertürk, Ö., Yavuz, C., Sıralı, R., vd. (2014). "The Antimicrobial Activity of Propolis Fromordu Province of Turkey," *Mellifera*, vol. 14, no. 27-28, pp. 11–16.

Estevinho, L., Pereira, A. P., Moreira, L., Dias, L. G., Pereira, E. (2008). Antioxidant and Antimicrobial Effect of Phenolic Compounds Extracts of Northeast Portugalhoney. *Foodand Chemical Toxicology*, 46, 3774-3779.

FarreArmengol, G. Filella, I., Llusia, J., Penuelas, J. (2017). β-Ocimene, a Key Floral and Foliar Volatile Involved in Multiple Interactions between Plantsand Other Organisms. *Molecules, 13;22*(7): 1148.doi: 10.3390/molecules22071148.

Feas, X., Vazquez Tato, M. P., Estevinho, L., Seijas, J. A. & Iglesias, A. (2012). Organic Bee Pollen: Botanical Origin, Nutritional Value, Bioactive Compounds, Antioxidant Activity and Microbiological Quality. *Molecules*, 17: 8359-8377.

G. Bergonzini, N. Volpi. (2006). "Analysis of FlavonoidsFrom Propolis by On-Linehplc–Electrospray Mass Spectrometry," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 42, no. 3, pp. 354–361.

Gameil, A. H. M., Hashim, Y. Z. H, Zainurin, N. A. A, Salleh, H. M., Abdullah, N. S. (2019). Anticancer Potentialand Chemical Profile of Agarwood Hydrosol. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences, 15* (5):761-766.

Gao, Y. L., Xing-Rong, J., Qiu, W., & Jiang, H. (2007). Investigation of the Effects of Food Constituents on Bacillus Subtilis Reduction During High Pressure and Moderate Temperature. *Food Control*, 18: 1250–1257.

Gebreselassie, E., & Clifford, H. (2016). Oxidative Stability and Shelf Life of Crackers, Cookies, and Biscuits. Department of Plant Sciences, *North Dakota State University,* Fargo, ND, USA. 461–478.Doi:10.1016/B978-1-63067-056-6.00012-4.

Ghafoor, K., Park, J., Choi, Y.-H. (2010). Optimization of Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds from Grape (Vitis Labrusca b.) Peelby Using Responsesurface Methodology," *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 11, no. 3, pp. 485–490, 2010.

Ghisalberti, E. L., (1979). Propolis: A review, *Bee World*, 60, 59-84.

Golubkina, N. A., Sheshnitsan, SS., Kapitalchuk, MV., Erdenotsogt, E. (2016). Variationsof Chemical Element Compositionof Bee And Beekeeping Products İn Different Taxons Of The Biosphere. *Ecological Indicators* 66, 452-457. DOI: 10.1016/j.jtemb.2017.09.022.

Güneş, ME., Şahin, S., Demir, C., Borum, E. & Tosunoğlu, A. (2017). Determination of Phenolic Compounds Profile in Chestnut And floral Honeys and Their

Antioxidant Andantimicrobial Activities. *Journal of Food Biochemistry, 41*(3): e12345, whttps://doi.org/10.1111/jfbc.12345.

Güney, F. (2016). Bazı Propolis Özütlerinin Meyveli Yoğurtların Biyokimyasal, Fizikokimyasal ve Raf Ömrü Üzerine Etkilerinin Araştırılması.Yüksek Lisans Tezi. *Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ordu.

Habryka, C., Socha, R.&Juszczak, L. (2020). The Effect of Enrichinghoneywith Propolis on the Antioxidant Activity, Sensory Characteristics, and Quality Parameters. *Molecules 25*(5):1176.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. (2015). Free Radicals in Biology and Medicine. *5th Edition. USA: Oxford University Press*.

Han, S. K. & Park, H. K. (1995). A Studyon The Preservation of Meat Products by Natural Propolis: Effectof EEP on Protein Change of Meat Products. *Korean Journal Of Animal Science, 37*(5):551–557.

Hayta, M., & Hendek Ertop, M. (2017). Optimisation of Sourdough Bread İncorporation İnto Wheat Bread by Response Surface Methodology: Bioactive and Nutritional Properties. *International Journal of Food Science& Technology*, *52*(8), 1828-1835.

Hendek Ertop, M. (2014). Ekşi Hamur Formül Optimizasyonunun Ekmeğin Aromatik Profili, Biyoaktif Nitelikleri Ve Raf Ömrü Üzerine Etkileri. Doktora Tezi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Kayseri.

İlbay, Z. (2016). Turunçgil Meyve ve Yapraklarının Farklı Ekstraksiyon Yöntemleriyle Ekstraksiyonu ve Matematik Modellemesi (Yayınlanmamış doktora tezi). *İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. İstanbul.

Jahouach Rabai, W., Trabelsi, M., Van Hoed, V., Adams, A., Verhe´, R., De Kimpe, N. & Frikha, M. H. (2008). Influence of Bleaching by Ultrasound on Fatty Acids and Minor Compounds of Olive Oil. Qualitative and Quantitative Analysis of Volatile Compounds (by SPME oupledto GC/MS). *Ultrasonics Sonochemistry* 15: 590-597.

Jian-xin, G., Hai-ying, C. & Zhao-yun, L. (2011). The Influence of Propolis on Bifidobacteria and Lactobacillus in Yogurt. *Chinese Journal of Disinfection* 02.

Jung, E., Weon J. B. Ji, H. You, J. Oh S. Y. Kim, H. & Park D. (2020). Comparative Study of the Biological Activity of Propolis Extracts withVarious Countries of Origin as Cosmetic Materials. *Journal of theSchool of CosmeticSci. of Korea, 46*(2), 159–166.

Kara, Y., Can, Z. & Kolaylı, S. (2022). Etanolik Propolis Ekstraktının Hazırlanmasında İdeal Çözücü Yüzdesi ve Çözücü-Propolis Oranı Ne Olmalıdır? *Gıda Analiz Yöntemleri* 15, 1707-1719. https://doi.org/10.1007/s12161-022-02244-z.

Kara, Y., Can, Z., & Kolaylı, S. (2022). What Should Be theIdeal Solvent Percentageand Solvent-Propolis ratio in the Preparation of Ethanolic Propolis Extract?. *Food Analytical Methods, 15*(6), 1707-1719.

Karasakal, A. (2012). Çevre Örneklerinde Ultraeser Arsenik ve Selenyumun Hidrür Oluşturmalı Atomik Absorpsiyon Spektrometri ile Tayini. Doktora Tezi, *Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi*, Edirne.

Kassim, M., Achoui, M., Mustafa, M. R., Mohd, M. A., Yusoff, K. M. (2010). Ellagic Acid, Phenolic Acids, and Flavonoids in Malaysian Honey Extracts Demonstratein Vitro Anti- Inflammatory Activity. *Nutrition Research* 30, 650–659.

Kedzia, B., Hołderna-Kedzia, E. (2017). Pinocembrin—Flavonoid Component of Domestic Propolis with Delaying E_Ect Of The Development of Alzheimer's Disease. Post. Fitoter. 18: 223–228.

Kegode, T. M, Bargul, J. L., Mokaya, H. O., Lattorff, H. M. G. (2022). Phytochemical Composition and Bio-Functional Properties of Apis Mellifera Propolis from Kenya, *Royal Society Open Science*, *9*(7): 2112142 https://doi.org/10.1098/rsos.211214.

Kekecoglu, M., Sonmez, E., Acar, M. K., & Karaoglu, S. A. (2021). Pollen Analysis, Chemical Composition and Antibacterial Activity of Anatolian Chestnut Propolis Collected FromYıgılca Region. *Biology Bulletin, 48*(6), 721-728.

Kelez, A. (2009). Batı Karadeniz Bölgesi Ballarının Polen Analizi. Yüksek Lisans Tezi. *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.* İzmir.

Keskin, M. (2018). Propolis ve Özütlerinin Kalite Parametrelerinin Belirlenmesi ve Enkapsülasyonu. Doktora Tezi. *Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Trabzon.

Keskin, M., Keskin, Ş., & Kolaylı, S. (2018). Alginat-Propolis Mikrokapsüllerinin Vitro Sindirim Sisteminde Salınımının Ham Propolis ile Kıyaslanması. *Uludag Bee Journal, 18*(2).

Keskin, M., Kolaylı, S. (2018). Standardization of Propolis is it Possible? *Uludağ Arı Dergisi 18*(2): 101-110.

Khalil, M. I., Moniruzzaman, M., Boukraâ, L., Benhanifia, M., Islam, M. A., Sulaiman, S. A., Gan, S. H. (2012). Physicochemical and Antioxidant Properties of Algerian Honey, *Molecules, 17*, 11199-11215.

Kılıç, A. (2008). Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 10:13, 37-45.

Kıran, M. D. (2021). Farklı Kültür Çeşidi Ve Prebiyotik Kaynak Kullanarak Üretilen Ballı Propolisli Yoğurtların Özellikleri. Yüksek Lisans Tezi. *Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.* Manisa.

Koç, A, N., Silici, S., Sarigüzel, F, M. & Sağdıç, O. (2007). Antifungal Activity of Propolis in Four Different Fruit Juices. Food Technol. Biotechnol. 45 (1) 57–61.

Koç, B. & Kaymak-Ertekin, F. (2010). Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda İşleme Uygulamaları. *GIDA/The Journal of Food, 35*(1), 1-8.

Kolaylı, S., Eksı, S., Yazıcı, Z., Yıldız, O., Sahın, H., Can, Z. & Karaoglu, S. (2018). Some Apitherapeutic Properties of Chestnut Propolis. *Journal of Apitherapy and Nature, 2nd Propolis Conference Special Issue, 14-14.* Retrieved from https://dergipark.org.tr/en/pub/jan/issue/40577/488579.

Krell, R. (1996). Value-Added Products from Beekeeping, *Fao Agricultural Services Bulletin No. 124, Chapter 3,* Pollen, http://www.fao.org/docrep.

Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T. (2004). Antioxidant Activity of Propolis of Geographic Origins. 84(3): 329-339.

Kumova, U., Korkmaz, A., Avcı, B. C.&Ceyran, G. (2002). Önemli Bir Arı Ürünü: Propolis. *Uludag Bee Journal*, May 2002.

Kunrath, C, A., Savoldi, D, C., Mileski, J, P, F., Novello, C, R., Alfaro, A, T., Marchi, J, F.& Tonial, I, B. (2017). Application and Evaluation of Propolis, the Natural Antioxidant in Italian-Type Salami. *Brazilian Journal Food Technology*, v. 20, e2016035.

Kutluca, S., Genç, F., & Korkmaz, A. (2006). Propolis. Samsun Tarım İl Müdürlüğü Çiftçi Eğitimi ve Yayım Şubesi, Samsun, p. 57.

Küçük, M., Kolaylı, S., Karaoglu, S.A., Ulusoy, E. & Baltacı, C. (2007). Biological Activities of Three Different Turkish Honey. *Food Chem,* 100,526–534.

Küçükaslan, İ. (2011). İz Elementler ve İneklerde Reprodüktif Açıdan Önemi. *Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 1*(4), 26-35.

Li, Y., Skouroumounis, G. K., Elsey, G. M. & Taylor, D. K. (2011). Microwave-Assistanceprovides Very Rapid and Efficient Extraction of Grape Seed Polyphenols. *Food Chemistry*, vol. 129, no. 2, pp. 570–576.

Lovakovic, B. T., Lazarus, M., Karaconji, I. B., Jurica, K., Semren, T. Z., Lusic D., Pizent, A. (2018). Multi-Elemental Composition and Antioxidant Properties of Strawberry Tree (Arbutus Unedo L.) Honey from the Coastal Region of Croatia: Risk-Benefit Analysis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 45, 2018, pp. 85-92.

Margeretha, I., Suniarti, D. F., Herda, E. M., & Alim, Z. (2012). Optimization and Comparativestudy of Different Extraction Methods of Biologically Active Components of IndonesianpropolisTrigonaspp, *Doğal Ürünler Dergisi*, 5, 233-242.

Marquele, F. D., Stracieri, K. M., Fonseca, M. J. V. & Freitas, L. A. P. de. (2006). Spraydried Propolis Extract. I: Physicochemical and Antioxidant Properties. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 61, 325–330.

Mattıla, P., Pıhlava, J., & Hellstro, J., (2005). Contents of Phenolic Acids, Alkyl- and Alkenylresorcinols, and Avenanthramides in Commercial Grain Products, *Journal of The Agricultural Food Chemistry*, 53: 8290-8295.

Mıchalska, A., Ceglınska, A., Amarowıcz, R., Pıskula, M. K., Szawara-Nowak, D., & Zıelınskı, H. (2007). Antioxidant Contents and Antioxidative Properties of Traditional Rye Breads, *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 55:734-740.

Moon, J. K., Shibamoto, T. (2009). AntioxidantAssaysforPlantandFoodComponents. *JournalAgricultureFoodChemistry,* 57, 1655-1666.

Moreno, M.I.N., Isla, M.I., Sampietro, A.R.&Vattuone, M.A. (2000). Comparison of theFreeRadical-ScavengingActivity of Propolis fromSeveralRegions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 109–114.

Mundra, P., & Desai, K., Lele, S. S. (2007). Application of Response Surface Methodology to Cell Immobilization for the Production of Palatinose. *Bioresource Technology*, 98: 2892–2896.

Myers, R. H., Montgomery, D. C., Vining G. G., Borror, C. M. & Kowalski, S. M. (2004). Response Surface Methodology: A Retrospective and Literature Survey, *Journal of Quality Technology*, 36:53-77.

Nedji, N. & Loucif-Ayad, W. (2014). Antimicrobial Activity of Algerian Propolis in Foodborne Pathogens and Its Quantitati ve Chemical Composition. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, 433–437.

Nori, M. P., Favaro Trindade, C. S., De Alencar, S. M., Thomazini, M., De Camargo Balieiro, J. C., & Castillo, C. J. C. (2011). Microencapsulation of Propolis Extract by Complex Coacervation. *LWT-Food Science and Technology*, *44*(2), 429-435.

Oses, S. M., Pascual Mate, A., Fernandez Muiño, M. A., Lopez Díaz, T. M., Sancho, M. T. (2016). Propolisli Balın Biyoaktif Özellikleri. *Gıda Kimyası*, *196*, 1215–1223.

Ozdal, T., Ceylan, F. D., Eroglu, N., Kaplan, M., Olgun, E. O. & Capanoglu, E., (2019). Investigation of antioxidantcapacity, bioaccessibility and LCMS/MS phenolic profile of Turkish propolis. *Food Research International,* 122, 528–536.

Özkırım, A. (2018). Beekeeping in Turkey: Bridging Asiaand Europe. *In Asian Beekeeping in the 21st Century (pp. 41-69), Springer,* Singapore, https://doi.org/10.1007/978-981-10-8222-1_2.

Özkök, A., & Bayram, N. E. (2021). Kestane (Castanea Sativa) Balı Örneklerinin Botanik Orijinlerinin Doğrulanması ve Toplam Polen Sayıları. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, *21*(1), 54-65.

Özkök, A., Özenirler, Ç., Canli, D., Mayda, N. & Sorkun, K. (2018). Unifloral Features of Turkish Honeys According to Mellissopalynologic, Total Phenolic Acidand Total Flavonoid Content. *Gazi University Journal of Science*, *31*(3): 713-723.

Pasupuleti, Vr., Sammugam, L., Ramesh, N. & Gan, Sh. (2017). Honey, Propolis And Royal Jelly: A Comprehensive Review Of Their Biological Actions And Health Benefits. *Oxid. Med. Cell Longev*, 1259510.

Peter, C. M., Picoli, T., Zani, J.L., Latosinski, G. S., Lima, M. D., Vargas, G.D., Fischer, G. (2017). Antiviral and Virucidal Activity of Hydroalcoholicextracts of Propolis Brown, Greenand Jatai Bees (Tetragoniscaangustula) Against Bovine Herpesvirus Type-1 (BoHV-1) and Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV). *Pesqui Agrovet Brasileira* 37:667–675.

Przybyłek, I., & Karpinski, T. M. (2019). Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules 24*(11): 2047k.

Rad, M.S., Varoni, E. M., Iriti, M., Martorell, M., Setzer, W. N., Contreras, Bahare Salehi, M. M., Soltani-Nejad, A., Rajabi, S., Tajbakhsh, M., Sharifi-Rad. J. (2018). Carvacrol and Human Health: A Comprehensive Review, *Phytotherapy Research*, 32:1675–1687.

Rizzello, C. G., Curiel, J. A., Nionelli, L., Vincentini, O., Cagno, R. D., Silano, M., Gobbetti, M., & Coda, R. (2014). Use of Fungal Proteases and Selected Sour Doughlacticacid Bacteria Formaking Whea Tbread With an İntermediate Content of Gluten. *Food Microbiology*, 37: 59-68. Doi:10.1016/j.fm.2013.06.017.

Ruiz Hurtado, P. A., Garduno Siciliano, L., DominguezVerano, P., Martinez Galero, E., Canales Martinez, M. M., & Rodriguez Monroy, M. A. (2021). Evaluation of the Gastroprotective Effects of Chihuahua Propolis on Indomethacin-Induced Gastric Ulcers Inmouse. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 137, 111345.

Sacchetti, G., Gianotti, A., & Dalla Rosa, M. (2001). Sucrose-Salt Combined Effects On Mass Transfer Kineticsand Product Acceptability. Study on appleosmotictreatment, *Journal of Food Engineering*, 49:163-173.

Sağdıç, O., Silici, S. & Yetim, H. (2007). Fate of Escherichia Coliand E. Coli O157: H7 in Apple Juice Treated With Propolis Extract. *Annals of Microbiology, 57* (3) 345-348.

Santos, H. M., & Capelo, J. L. (2007). Trends in Ultrasonic-Based Equipment for Analytical Sample Treatment. *Talanta*, 73, 795-802.

Sarikaya, A. O., Ulusoy, E., Öztürk, N., Tuncel, M., & Kolayli, S. (2009). Antioxidant Activity and Phenolic Acid Constituents of Chestnut (Castania Sativa Mill.) Honey and Propolis. *Journal of Food Biochemistry*, 33, 470-481.

Shahidi, F., & Naczk, M. (1995). Methods of Analysis And Quantification of Phenolic Compounds. Food Phenolic: Sources, Chemistry, Effectsand Applications, pp 287-293.

Shouqin, Z., Jun, X. & Changzeng, W. (2005). High Hydrostatic Pressure Extraction of Flavonoids from Propolis. *Journal Chemistry Technology Biotechnol*, 80: 50-54.

Silici, S. & Ülgen, N. (2019). Bioactive Properties of Blossom and Honeydew Honeys. *Mellifera,19*(2): 43-54.

Silici, S. (2010). Turkish Propolis: Chemical Constituents. *Mellifera, 10*(19).

Silici, S., & Kutluca, S. (2005). ChemicalCompositionandAntibacterial Activity of Propolis Collectedby Three Different Racesof Honeybeesin The Same Region. *J. Ethnopharmacol.* 99, 69–73.

Silici, S., Sagdic, O., Ekici, L. (2010). Total Phenolic Content, Antiradical, Antioxidant and Antimicrobial Activitiesof Rhododendron Honeys, *Food Chemistry*, 121 238– 243.

Song, H. N., & Gil, B. I. (2002). Analysis of Nutritional Composition and Phenolic Compoundin Propolis Collected from Falseacacia and Chestnut Treein Korea. *Korean Journal of Food Science and Technology*, *34*(4), 546-551.

Soylu, P., & Bayram, B. (2020). Bal, Propolis, Arı Sütü, Çivanperçemi (Achilleamillefolium) ve Ekinezya (Echinaceaparadoxa) Karışımından Fonksiyonel Gıda Üretimi, Ürünün Fizikokimyasal ve Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi. *Bahri Dağdaş Hayvancılık Araştırma Dergisi*, *9*(1), 25-38.

Spinelli, S., Conte, A., Lecce, L., Incoronato, A. L., & Del Nobile, M. A. (2015). Microencapsulated Propolis to Enhance the Antioxidant Properties of Fresh Fish Burgers. *Journal of Food Process Engineering*, *38*(6), 527-535.

Sulaiman, G. M., Al-Amiery, A. A., & Bagnati, R. (2014). Theoretical, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Caffeic Acid Phenethyl Esterand Chrysin. *International journal of foodScientand Nutrition, 65*(1), 101–105.

Şahinler, N., & Gül, A. (2005). The effects of Propolis Production Methods and Honeybee Genotypes on Propolis Yield. *Pakistan Journal of Biological Sciences, 8*(9), 1212-1214.

Şeker, İ. T., Hendek Ertop, M., & Hayta, M. (2016). Physicochemical and Bioactive Propertiesof Cakes İncorporated with Gilaburu Fruit (Viburnum Opulus) Pomace. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 8 (2), 261-266.

Taddeo, V. A., Epifano, F., Fiorito, S. & Genovese, S. (2016). Comparison of Differentextraction Methods and Hplc Quantification of Prenylated and Unprenylatedphenylpropanoidsin Raw Italian Propolis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 129, pp. 219–223.

Takeuchi, T., Pereira, C., Braga, M., Marostica, Jr M., Leal, P. (2008). Low Pressure Solvent extraction (Solid-Liquid Extraction, Microwave Assistedan D Ultrasound) From condimentary Plants" In Maa Meireles (Ed). *Extracting Bioactive Compounds: Theoryandapplications*.

Tavman, Ş., Kumcuoğlu, S. & Akkaya, Z. (2009). Bitkisel Ürünlerin Atıklarından Antioksidan Maddelerin Ultrason Destekli Ekstraksiyonu. *Gıda Dergisi, 34*(3).

Thomson, W. M. (1990). Propolis. *Medical Journal Of Australia*, 153.

Touzani, S., Al Waili, N., El Menyiy, N., Filipic, B., Pereyra, A., Arabi, I. E., Lyoussi, B. (2018). Chemical Analysis and Antioxidant Content of Various Propolis Samples Collected from Different Regions and Their Impact on Antimicrobial Activities. *Asian Pac Journal of Tropical Med 11*(7):436.

Trusheva, B., Trunkova, D., & Bankova, V. (2007). Different Extraction Methodsof Biologically Active Components from Propolis: A Preliminary Study. *Chemistry Central Journal*, 1:13, doi:10.1186/1752-153X-1-13.

Tsagkarakis, A. E., Katsikogianni, T., Gardikis, K., Katsenios, I., Spanidi, E., & Balotis, G. N. (2017). Comparison of TrapsCollecting Propolis byHoney Bees. *Advances in Entomology*, *5*(02), 68.

Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (No: 2020/07). https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2020/04/20200422-13.htm.

Ulanowska, M, Olas, B. (2021). Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol—A Review. *International Journal of Molecular Sciences. 22*(7): 3671. https://doi.org/10.3390/ijms22073671.

Ulusoy, K. & Karakaya, M. (2011). Gıda Endüstrisinde Ultrasonik Ses Dalgalarının Kullanımı. *Gıda Dergisi, 36*(2).113-120.

URL-1.Propolis ve Arılar https://propolisfaydalari.com/propolis-nasil-uretilir/ Erişim Tarihi: 23/04/2022.

URL-2.https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chrysin. Erişim Tarihi 19.09.2022.

URL-3.https://leafwell.com/blog/delta-3-carene/. Erişim tarihi 19.09.2022.

Uzel, A., Sorkun, K., Öçağ, Ö., Coğulu, D., Gencay, Ö. ve Salih, B. (2005). Chemical Compositions and Antimicrobial Activities of Four Different Anatolian Propolis Samples, *Microbiological Research*, 160, 189-195.

Wang, L & Weller, C. L. (2006). Recent Advances in Extraction of Nutraceuticals From Plants. *Trends in Food Science and Technology*, 17: 300-312.

Wozniak, M., Mrowczynska, L., KwasniewskaSip, P., Waskiewicz, A., Nowak, P. & Ratajczak, I. (2020). Effect of the Solvent on Propolis Phenolic Profile and İts Antifungal, Antioxidant, andin Vitro Cytoprotective Activity in Human Erythrocytes Under Oxidative Stress. *Molecules 25*(18):4266.

Yağcıoğlu, P. (2015). Farklı Ekstraksiyon Metotları ile Adaçayı (Salvia Officinalis L.) Bitkisinden Antioksidan Ekstraksiyonunun Optimizasyonu. Doktora Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 121s., İstanbul.

Yang, W., Wu, Z., Huang, Z. Y. & Miao, X. (2017). Preservation of Orange Juice Using Propolis. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 3375–3383.

Yıldız, O. (2011). Bir Gıda Maddesi Olarak Kestane Poleninin Kimyasal Bileşimi, Biyoaktif Özellikleri Ve Karaciğer Hasarını Önlemedeki Rolü. Doktora Tezi. *Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.* Trabzon.

Yıldız, O., Karahalil, F., Can, Z., Sahin, H. & Kolayli, S. (2014). Total monoamine Oxidase (MAO) İnhibition by Chestnut Honey, Pollen and Propolis. *Journal of enzymeinhibition and medicinal chemistry*, *29*(5),690–694.

Zabaiou, N., Fouache, A. & Trousson, A. Baron, S., Zellagui, A., Lahouel, M., Lobaccaro, J. A. (2017). Biological Propertiesof Propolis Extracts: Something New Froman Ancient Product. *Chemistry Physics Lipids*, 207, 214–222.

Zainal, W. N. H. W. Azian, N. A. A. M. Albar, S. S. & Rusli, A. S. (2021). Effects of Extraction Method, Solvent and Time on the Bioactive compounds and Antioxidant Activity of Tetrigona Apicalis Malaysian propolis. *Journal Apicultural Resarch*, 1–7.

Zhang, H., Fu, Y., Niu, F., Li, Z., Ba, C., & Jin, B. (2018). Enhanced Antioxidant Heat-Denaturedzein and Carboxymethyl Chitosan. *Food Hydrocoll*, 81, 104–112.

Zurnacı, M. (2015). Vitamin Komplekslerindeki Metallerin ICP-OES Cihazı Kullanılarak Tayini.Yüksek Lisans Tezi, *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Sakarya.