



**T.C.**

**HİTİT ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**PROPOLİS BİYOAKTİF BİLEŞENLERİNİN ULTRASONİK  
EKSTRAKSİYONUNDA SICAKLIK, SÜRE VE SOLVENT  
KONSANTRASYONUNUN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Büşra ÇAKIR**

**Çorum - 2022**



**PROPOLİS BİYOAKTİF BİLEŞENLERİNİN ULTRASONİK  
EKSTRAKSİYONUNDA SICAKLIK, SÜRE VE SOLVENT  
KONSANTRASYONUNUN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

**Büşra ÇAKIR**

**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Yüksek Lisans Tezi**

**TEZ DANIŞMANI**

**Dr. Öğr. Üyesi Nihal GÜZEL**

**Çorum 2022**

Büşra ÇAKIR tarafından hazırlanan “Propolis Biyoaktif Bileşenlerinin Ultrasonik Ekstraksiyonunda Sıcaklık, Süre ve Solvent Konsantrasyonunun Etkisinin Belirlenmesi” adlı tez çalışması .../ .../ ..... tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Hitit Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Bülent KABAK

.....

Doç. Dr.Özgür GÖLGE

.....

Dr. Öğr. Üyesi Nihal GÜZEL

.....

Hitit Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun .../ .../ ..... tarih ve ..... sayılı kararı ile Büşra ÇAKIR'ın Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Prof. Dr. Muhammed Asif YOLDAŞ

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını beyan ederim.

Büşra ÇAKIR

# PROPOLİS BİYOAKTİF BİLEŞENLERİNİN ULTRASONİK EKSTRAKSİYONUNDA SICAKLIK, SÜRE VE SOLVENT KONSANTRASYONUNUN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Büşra ÇAKIR

ORCID: 0000-0001-9244-9443

HİTİT ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Yüksek Lisans

Haziran 2022

## ÖZET

Yapılan bu çalışmada propolis biyoaktif bileşenleri ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon etkinliğinin belirlenmesi için etanol konsantrasyonu, sıcaklık, süre ve katı solvent oranı olmak üzere dört farklı parametre seçilmiştir. Seçilen bu parametreler en yüksek toplam fenolik madde, toplam flavonoid konsantrasyonu, antioksidan kapasite ve balsam verimini elde etmek amacıyla dört değişkenli ve ikinci dereceden merkezi karma tasarım desenine göre belirlenen deneylerle optimize edilmiştir. Ayrıca propolis biyoaktif bileşenlerinin ekstraksiyonu geleneksel yöntemle de gerçekleştirilerek yöntemlerin ekstraksiyon etkinliğine etkisi kıyaslanmıştır. Seçilen ekstraksiyon parametreleri içerisinde etanol konsantrasyonu ve katı solvent oranının toplam fenolik madde miktarı ve toplam flavonoid içeriği üzerine önemli derecede etkili olduğu belirlenmiştir ( $p<0.0001$ ). Etanol konsantrasyonu ayrıca antioksidan aktivite ve balsam verimi açısından da araştırılan parametreler içerisinde önemli derecede etkili bulunmuştur ( $p<0.0001$ ). Ultrases destekli ekstraksiyon sonucunda %90 etanol konsantrasyonunda, 51°C'de, 32 dakika süreyle 1:300 katı solvent oranında gerçekleştirilen ekstraksiyonun maksimum verim eldesi için optimum koşul olduğu belirlenmiştir. Belirlenen bu optimum ekstraksiyon koşulu altında toplam fenolik madde miktarı 252,74±5,77 mg GAE/g, toplam flavonoid madde miktarı 222,32±1,27 mg CE/g, antioksidan aktivitesi 1,43±0,004 mmol TEAC/g ve balsam verimi ise %71,99±6,31 olarak tespit edilmiştir. %75 etanol konsantrasyonunda, 50 °C'de, 1:200 katı solvent oranında, 1 gün süre ile gerçekleştirilen geleneksel ekstraksiyon yönteminde ise toplam fenolik madde miktarı 231,48±2,48 mg GAE/g, toplam flavonoid madde miktarı 240,13±4,39 mg CE/g, antioksidan aktivitesi 1,50±0,04 mmol

TEAC/g ve balsam verimi ise %58,87±0,12 olarak belirlenmiştir. Hem geleneksel hem de ultrasonik ekstraksiyonla elde edilen propolis örneğinde ferulik asit (5,31-6,55 mg/g propolis), kafeik asit (3,34-3,73 mg/g propolis), syringic asit (2,12-2,24 mg/g propolis) ve p-kumarik asit (2,63-2,95 mg/g propolis) hâkim fenolik asitler olarak belirlenirken, kuersetin (0,14-0,15 mg/g propolis) ve rutin (0,0027-0,0032 mg/g propolis) başat flavonoidler olarak saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar, propolisteki biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu için ultrasonik ekstraksiyon yönteminin geleneksel ekstraksiyon yöntemiyle kıyaslandığında ekstraksiyon etkinliği ve süre açısından avantajlı bir yöntem olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kavramlar:** Propolis, Antioksidan aktivite, Fenolik bileşikler, Ultrasonik ekstraksiyon, Balsam verimi

**Bilim Kodu:** 90808

# THE EFFECTS OF TEMPERATURE, TIME AND SOLVENT CONCENTRATION ON ULTRASONIC EXTRACTION OF PROPOLIS BIOACTIVE COMPOUNDS

Büşra ÇAKIR

ORCID: 0000-0001-9244-9443

HITIT UNIVERSITY

GRADUATE EDUCATION INSTITUTE

Master of Science of Thesis

June 2022

## ABSTRACT

In this study, propolis bioactive compounds extracted with ultrasound assisted extraction methods. Four different parameters (ethanol concentration, temperature, time and solid solvent ratio) were selected for determination of extraction efficiency. These selected parameters were optimized to achieve highest total phenolic content, total flavonoid content, antioxidant activity and balsam yield by using four variable, and second order central composite design. Furthermore, the extraction of bioactive compounds of propolis was carried out by conventional extraction and compared to ultrasonic extraction in terms of extraction efficiency. Results showed that the ethanol concentration and solid solvent ratio among the extraction parameters was significantly effective on total phenolic content and total flavonoid content ( $p < 0.0001$ ). Ethanol concentration was also found significantly effective on antioxidant activity and balsam yield ( $p < 0.0001$ ). The optimum condition to reach efficient extraction was determined as 90% ethanol concentration, 32 minute at 51°C with 1:300 solid solvent ratio. In this optimum condition, the amount of total phenolic content was  $252,74 \pm 5,77$  mg GAE/g, total flavonoid content was  $222,32 \pm 1,27$  mg CE/g, antioxidant activity was  $1,43 \pm 0,004$  mmol TEAC/g and balsam yield was  $\%71,99 \pm 6,31$ . In conventional extraction, which was carried out 75% ethanol concentration, 1:200 solid solvent ratio at 50°C during 1 day, the total phenolic content was  $231,48 \pm 2,48$  mg GAE/g, total flavonoid content was  $240,13 \pm 4,39$  mg CE/g, antioxidant activity was  $1,50 \pm 0,04$  mmol TEAC/g and balsam yield was  $\%58,87 \pm 0,12$ . In both propolis extracts obtained conventional and ultrasonic extraction, ferulic acid (5,31-6,55 mg/g propolis), caffeic acid (3,34-3,73 mg/g propolis), syringic acid (2,12-2,24 mg/g propolis) and p-coumaric acid (2,63-2,95 mg/g propolis) were found major phenolic



acid while quercetin (0,14-0,15 mg/g propolis) and rutin (0,0027-0,0032 mg/g propolis) were found major flavonoids. Results showed that ultrasound assisted extraction was better in terms of extraction efficiency and time when comparing conventional method.

**Keywords:** Propolis, Antioxidant activity, Phenolic compounds, Ultrasonic extraction, Balsam yield

**Science Code:**90808



## TEŐEKKÖR

Yüksek lisans eğitimim boyunca tecrübeleri ve bilgi birikimiyle yolumu aydınlatan, her anlamda yoğun desteğini hissettiğim ve üzerimde çok emeği bulunan değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Nihal GÜZEL'e,

Her daim bilgisini esirgemeyen kıymetli Prof. Dr. Savaş BAHÇECİ hocama ve değerli bölüm hocalarıma,

Tüm eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteğini asla esirgemeyen, her konuda yardımcıml olan canım aileme,

Tez çalışmam sürecinde güzel düşünceleriyle meşalem olan, özellikle manevi desteğini omuzumda her daim hissettiğim sevgili arkadaşım ve meslektaşım Oğuz USLU'ya,

Son olarak bu aşamada beni yalnız bırakmayan ve her zaman yanımda olan tüm arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ediyorum.

Bu tez çalışmasına, FBE19004.21.002 numaralı proje kapsamında vermiş oldukları destekten dolayı Hitit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederiz.

Büşra ÇAKIR

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
RESİMLER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
GİRİŞ.....	1

### 1. BÖLÜM

#### LİTERATÜR ÖZETİ

1.1. Propolisin Tarihçesi.....	3
1.2. Propolis.....	3
1.3. Propolisin Kullanım Alanları.....	4
1.4. Propolisin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	6
1.5. Propolis Ekstraksiyon Yöntemleri.....	11
1.5.1. Mikrodalga Yardımlı Ekstraksiyon.....	12
1.5.2. Derin Ötektik Çözücü Ekstraksiyonu.....	13
1.5.3. Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu.....	14
1.5.4. Ultrasonik Ekstraksiyon.....	15

### 2. BÖLÜM

#### MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal.....	20
2.2. Propolisin Geleneksel Ekstraksiyonu.....	20
2.3. Propolisin Ultrasonik Ekstraksiyonu.....	20

	<b>Sayfa</b>
2.4. Toplam Fenolik Madde Tayini .....	21
2.5. Toplam Flavonoid Tayini .....	22
2.6. ABTS Antioksidan Tayini .....	23
2.7. Balsam Tayini .....	25
2.8. Fenolik Dağılımının Belirlenmesi (LC-MS/MS) .....	25
2.9. Deneysel Ve İstatiksel Tasarım .....	27

### **3. BÖLÜM**

#### **ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA**

3.1. Modelleme ve İstatistiksel Analiz.....	28
3.2. Ekstraksiyon Parametrelerinin Optimizasyonu ve Modellerin Doğrulanması .....	29
3.3. Toplam Fenolik Madde Miktarı Analiz Sonuçları.....	32
3.4. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Analiz Sonuçları .....	36
3.5. ABTS Antioksidan Kapasitesi Analiz Sonuçları.....	39
3.6. Balsam Tayini Sonuçları.....	41
3.7. Fenolik Dağılım Sonuçları (LC-MS/MS) .....	43
<b>SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>49</b>
<b>KAYNAKÇA.....</b>	<b>51</b>

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 1.1.</b> Propolisin içerdiği bileşenlerin biyolojik aktiviteleri (Yonar, 2017) .....	<b>6</b>
<b>Tablo 1.2.</b> Propolisin biyoaktif kompozisyonu .....	<b>8</b>
<b>Tablo 1.3.</b> Propolis ile ilgili yapılan çalışmalardaki ultrasonik ekstraksiyon koşulları.....	<b>18</b>
<b>Tablo 2.1.</b> Tepki yüzey yanıt yöntemi faktörleri ve seviyeleri .....	<b>21</b>
<b>Tablo 2.2.</b> Elüsyon profili .....	<b>26</b>
<b>Tablo 2.3.</b> MS/MS cihaz koşulları .....	<b>26</b>
<b>Tablo 3.1.</b> Balsam miktarı, toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı ve antioksidan aktivite için model yanıtının ANOVA analizi.....	<b>30</b>
<b>Tablo 3.2.</b> Bazı kontrol noktalarından seçilen propolis örneklerinin TPC, TFC, AOA ve balsam sonuçları.....	<b>31</b>
<b>Tablo 3.3.</b> Bazı kontrol noktalarından seçilen propolis örneklerinin modelden üretilen TPC, TFC, AOA ve balsam sonuçları.....	<b>31</b>
<b>Tablo 3.4.</b> Propolis örneklerinin ekstraksiyon koşulları ile TPC, TFC, AOA ve balsam miktarları .....	<b>36</b>
<b>Tablo 3.5.</b> Örneklerdeki fenolik sonuçları.....	<b>44</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Propolisin kimyasal bileşimi .....	7
Şekil 2.1. Gallik asit kalibrasyon eğrisi .....	22
Şekil 2.2. Kateşin kalibrasyon eğrisi .....	23
Şekil 2.3. Trolox kalibrasyon eğrisi .....	25
Şekil 3.1. (a) TPC'nin deneysel ve tahmini verilerin karşılaştırılması, (b) TFC'nin deneysel ve tahmini verilerin karşılaştırılması, (c) AOA'nın deneysel ve tahmini verilerin karşılaştırılması, (d) balsam veriminin deneysel ve tahmini verilerin karşılaştırılması.....	32
Şekil 3.2. Ekstraksiyon parametrelerinin TPC üzerine etkisi .....	35
Şekil 3.3. Ekstraksiyon parametrelerinin TFC üzerine etkisi .....	39
Şekil 3.4. Ekstraksiyon parametrelerinin AOA üzerine etkisi .....	41
Şekil 3.5. Ekstraksiyon parametrelerinin balsam verimi üzerine etkisi .....	43
Şekil 3.6. Geleneksel ekstrakt örneği içerisinde yer alan protekatekuik aldehit, kafeik asit, sryingic asit, p-kumarik asit ve ferulik asitin LC-MS/MS kromatogramı .....	45
Şekil 3.7. Ultrasonik ekstrakt örneği içerisinde yer alan protekatekuik aldehit, kafeik asit, sryingic asit, p-kumarik asit ve ferulik asitin LC-MS/MS kromatogramı .....	47

## RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
<b>Resim 1.1.</b> (a): Propolisin kovandaki ham hali, (b): Propolisin öğütülmüş toz hali .....	<b>4</b>
<b>Resim 2.1.</b> LC-MS/MS (Sıvı Kromatografisi Tandem MS Kütle Spektroskopisi) Cihazı.....	<b>26</b>





## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

°C	santigrat derece
mg	miligram
g	gram
L	litre
mM	milimolar
N	normal
nm	nanometre
M	molar
min	minimum
dk	dakika
kHz	kilohertz
MHz	megahertz
μmol	mikromol
μg	mikrogram
mL	mililitre
W	watt
mPa	megapaskal
cm <sup>2</sup>	santimetrekare
μm	mikron
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	sodyum karbonat
NaOH	sodyum hidroksit
AlCl <sub>3</sub>	alüminyum klorür
NaNO <sub>2</sub>	sodyum nitrit
NaCl	sodyum klorür

## Kısaltmalar

GAE	gallik asit eşdeğeri
TEAC	trolox eşdeğer antioksidan kapasitesi
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
CAPE	kafeik asit fenil ester
TPC	toplam fenolik konsantrasyonu
TFC	toplam flavonoid konsantrasyonu
AOA	antioksidan aktivitesi
DMSO	dimetilsülfoksit
ABTS	2,2'-Azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit
QE	kuersetin eşdeğeri
CE	kateşin eşdeğeri
PG	propilen glikol
RuE	rutin eşdeğeri
DÖS	derin ötektik solvent
PBS	fosfat tamponu
A	solvent konsantrasyonu
B	sıcaklık
C	kati solvent oranı
D	süre

## GİRİŞ

Propolis TSE'ye göre "işçi arıların, kovan içerisindeki besinleri, yavru arıları ve kendilerini çeşitli patojen mikroorganizmalardan (virüs, bakteri, fungus) korumak amacıyla bitkilerin yaprak, gövde, tomurcuk vb. kısımlarından topladığı reçinemsii maddeleri ve bitki nektarlarını, başlarında yer alan salgı bezlerinden salgılanan enzimler ile biyokimyasal deđiŐikliđe uğratarak oluşturdukları, 'arı tutkalı' olarak da adlandırılan ürün" olarak tanımlanmaktadır (TS 12910). Propolis üretiminde in ilk sırada gelirken, Arjantin, Uruguay, Őili, Brezilya, Kanada ve Doğu Avrupa ülkelerinde de propolis üretimi yapılmaktadır. Propolisin kimyasal bileşimi mevsime, toplandıkları bölgeye, bitkilerin tür ve çeŐitliliđine göre farklılık göstermektedir (Pobiega ve ark., 2020). Propolisin rengine, toplandığı kaynağa bağlı olarak koyu sarıdan kahverengine, kırmızı ve yeŐile kadar deđiŐim gözlenebilmektedir (Karlıdağ ve Genç, 2007). 10 °C'nin altındaki sıcaklıklarda oldukça sert ve çabuk kırılabilen bir yapıya sahip olan propolis bu değerin üzerindeki sıcaklıklarda sakızimsı bir kıvam kazanmaya başlayarak, 25 °C-40 °C sıcaklıkta oldukça yapışkan bir form almaktadır. Flavonoid ve fenolik asitlerce zengin 300'den fazla bileşen içeren kompleks kimyasal bir yapıya sahip olmakla birlikte genel olarak reçine (%50), mum (%30), esansiyel yağlar (%10), polen (5%) ve diğer organik bileŐenlerden (5%) oluşmaktadır (Yucel ve ark., 2017). Propolis sahip olduğu zengin içerik nedeniyle yüzyıllardır geleneksel tıbbın bir parçası olmanın yanı sıra ilaç ve kozmetik sektörünün de ilgisini çekmiŐtir. Propolisin sahip olduğu antioksidan ve antimikrobiyel özellikler gıda alanında da kullanılması noktasında dikkat çekmektedir. Propolisin bazı bakteriler, virüsler ve küfler üzerine etkisi ve raf ömrüne katkısı bilimsel olarak belirlenmiştir (Doğan ve Hayoğlu, 2012). Bu nedenle son yıllarda yapay koruyuculara alternatif olarak gıdalarda kullanımı tercih edilmektedir. Ayrıca hayatımıza giren pandemi ile birlikte popülerlik kazanan gıda takviyeleri alanında da sıklıkla yararlanılan bir bileşen olarak karŐımıza çıkmaktadır.

Ancak, propolis ham haliyle kokusu, acımsı tadı ve içerdiği bazı bileşenler nedeniyle direk tüketime uygun olmadığından öncelikle ekstrakte edilmesi gerekmektedir. Ekstraksiyon işlemi maserasyon, soxhalet ekstraksiyonu gibi geleneksel yöntemlerle yapıldığında uzun ekstraksiyon süreleri ve aşırı solvent tüketimi gibi olumsuzluklar ortaya çıkabilmektedir. Suda özünürlüğu oldukça düşük olan propolisin ekstraksiyonunda çeşitli organik çözücüler kullanılmakla birlikte günümüzde evre bilincinin artmasıyla daha çevreci solventlerin ve ekstraksiyon metotlarının tercih edilirliliği artmaktadır. Ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi son yıllarda biyoaktif bileşen ekstraksiyonunda tercih edilen bir yöntem olmakla birlikte bu yöntem, akustik kavitasyon oluŐturarak solventin örneğe daha fazla nüfuz etmesini sağlamakta ve böylece materyalden solvante olan kütle transferini kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle, geleneksel ekstraksiyon yöntemine kıyasla, ultrasonik yöntem ile hem ekstraksiyon süresi kısaltmakta hem de etkinlik artmaktadır.

Yapılan bu çalışma ile propolisten toplam fenolik madde miktarı (TPC), toplam flavonoid içeriği (TFC), antioksidan aktivite (AOA, ABTS) ve balsam verimi açısından etkin bir ekstraksiyonun gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Biyoaktif bileşenlerinin ekstraksiyonunda yenilikçi ve çevreci bir yöntem olan ultrasonik ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Bilindiği üzere etkin bir solvent ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesi için solvent seçimi en önemli parametrelerden biri olmakla birlikte sıcaklık, süre, katı solvent oranı ve solvent konsantrasyonu gibi parametreler de ekstraksiyon verimini etkileyen önemli parametrelerdir. Bu nedenle ekstraksiyon yönteminin optimize edilmesi önem taşımaktadır. Yapılan bu tez çalışmasında sıcaklık, süre, katı solvent oranı ve solvent konsantrasyonunun ekstraksiyon etkinliğine etkisi araştırılmış olup, etkinliğin belirlenmesinde matematiksel bir model olan Yanıt Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology - RSM) kullanılmıştır. Ayrıca ekstraksiyon işlemi geleneksel yöntemle de gerçekleştirilmiş olup bu iki yöntem arasındaki farklılıklar araştırılmıştır. Yapısı itibarıyla ham haliyle tüketilemeyen ancak sağlık üzerine olumlu etkileri ve yüksek ticari değeri ile bilinen bu değerli ürünün kullanılabilirliğinin artırılması amacıyla hazırlanan tez çalışmasından elde edilen veriler ile, ekstraksiyon süresinin azaltıldığı buna karşın propolis biyoaktif bileşenlerin yüksek verim ile ekstrakte edilebildiği optimum koşullar belirlenmiştir. Elde edilen verilerin propolis ekstraktının gıda ve diğer sektörlerin kullanımına uygun kalitede üretilmesi noktasında bilgi birikimine katkı sağlanmıştır. Ayrıca ülkemizde önemli bir gelir kaynağı olan arıcılık sektöründe de bilincin artırılarak bu alandaki gelişime ve yapılacak sonraki çalışmalara katkı sağlaması hedeflenmektedir.

## 1.BÖLÜM

### LİTERATÜR ÖZETİ

#### 1.1. Propolisin Tarihçesi

Propolis şu anki adını Antik Yunancada kentin savunucusu anlamına gelen 'pro' ve 'polis' sözcüklerinin birleşimiyle almıştır. İlk kez Yunan yazıtlarında rastlanılan bu isim, propolisin kovanı ve kovan içindeki arıları enfeksiyonlardan koruduğunu keşfetmelerinin ardından verilmiştir (Kumova ve ark., 2002). Antik dönemlerden günümüze kadar tedavi amaçlı kullanılmakta olan propolis, genellikle yara ve çürük tedavisinde yararlanılan doğal ateş düşürücü ve enfeksiyon önleyici olarak kullanılmıştır (Castaldo ve Capasso, 2002). Tedavi amaçlı değerlendirilmesinin yanı sıra Antik Mısır'da ölen kişilerin bedenlerinin mikrobiyal zararlardan korunması amacıyla mumyalanması işleminde de kullanılmıştır. Mumyalama işlemini, arıların yabancı arıları öldürüp ardından propolis ile mumyalamalarını gözlemleyerek öğrendikleri tahmin edilmektedir (Gonsales ve ark., 2006). Propolisin tarihte başka bir kullanım alanı olan kozmetik sektöründe ilk kullanımı ise vücut kremlerinin bileşimine eklenmesi suretiyle Romalılar tarafından gerçekleştirilmiş, ardından da Antik Yunanlılar tarafından parfüm ana malzemesi olarak değerlendirilmiştir (Ahn ve ark., 2007; Li ve ark., 2008; Aliyazıcıoğlu ve ark., 2013).

#### 1.2. Propolis

Propolis bal arılarının (*Apis mellifera*) kavak, meşe, kestane ve çam gibi ağaçların ve bazı otsu bitkilerin tomurcuk, yaprak, gövde, kabuk gibi bölümlerinden topladıkları özleri enzimlerle işleyerek oluşturdukları reçinemsî doğal bir üründür (Ghisalberti, 1979; Keskin, 2018; Reis ve ark., 2019). Yapışkan bir formu olması sebebiyle kovan içerisine işçi arıların yardımıyla boşaltılarak belirli noktalara biriktirilmekte, birikimi gerçekleştirilen ürün ise kovan içi izolasyonunun sağlanması, kovandaki çatlak ve deliklerin kapatılması, hasarlı peteklerin tamiri, kovan giriş deliğinin daraltılması gibi pek çok amaç için kullanılmaktadır (Marcucci, 1994; Yavuz ve ark., 2012).

Propolis, arıların çalışma şartları ve balın toplanmasını zorlaştırması sebebiyle çita petekli balın pazarda istenmeyen bir özelliği haline gelmiş ve arıların tarafından arıların üretmesini istemedikleri bir bileşim formuna dönüşmüştür. Ancak, son yıllarda arıcılıkta üretim tekniklerinin gelişmesi ve arılarda farkındalık oluşmasıyla birlikte propolisin önemi anlaşılmış ve üretimi de artırılmıştır (Karacaoğlu, 1997; Kumova ve ark., 2002; Keskin, 2018). Türkiye'nin zengin bitki örtüsü arıların propolis oluşturması için uygun ortamı sunmaktadır. Aynı zamanda propolisin hasat edilen her dönemde kendine özgü bir formu vardır. Toplama kolaylığı ve propolisin kalitesi açısından sonbahar ve kış mevsimi en uygun dönemdir. Bu dönemlerde soğuk havalardan kovan içini korumak isteyen arılar daha kaliteli ve yoğun propolisler üretmektedir. Yaz mevsiminde sıcaklıktan dolayı yapışkan bir formda olan propolisin toplanması zorlaşmakta ve kovan içinde balmumuyla karışma ihtimali de

artmaktadır. Propolis toplanırken ufalanmamasına, ısıya tabi tutulmamasına ve temiz bir zemine yayılarak içerisinde bulunan yabancı cisimlerden uzaklaştırılmasına özen gösterilmesi gerekmektedir (Karlıdağ ve Genç 2007).



**Resim 1.1.** (a): Propolisin kovandaki ham hali, (b): Propolisin öğütülmüş toz hali

### 1.3. Propolisin Kullanım Alanları

Propolis eczacılık (Park ve ark., 1996; Mitu, 2021; Soós ve ark., 2021), sağlık (Sawicka ve ark., 2012; Arentz ve ark., 2021; Hao ve ark., 2021; Magnavacca ve ark., 2021; Mitu, 2021; Türkez ve ark., 2021; Uğur ve ark., 2021), gıda (Tosi ve ark., 2007; Pobiega ve ark., 2019; Cedeno-Pinos ve ark., 2021; Irigoiti ve ark., 2021), apiterapi (Aydın ve Tekeoğlu, 2018; Kekeçoğlu, 2021; Öztürk ve ark., 2021), kimya (Zarrin ve Sabzi, 2022), malzeme (Roy ve Rhim, 2020; Bayatbalay ve ark., 2021; Türkçen ve ark., 2021), kozmetik (Kashmoola ve Qasim, 2021) ve sanayi gibi birçok sektörde çok fonksiyonlu şekilde kullanılmaktadır (Doğan ve Hayoğlu, 2012). Tarihten bugüne kadar sağlık alanında propolisin; doku onarımı, cilt hastalıkları, yanık tedavisi, ülser, romatizma ve eklem hastalıklarında olumlu etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Yavuz ve ark., 2012). Sağlık alanındaki bu çeşitli kullanım olanakları, arı ürünlerinden maksimum avantaj elde etmeyi amaç edinen apiterapide de propolisten faydalanılmasının önünü açmıştır (Ulusoy, 2012). Sağlık ve apiterapi gibi alanlarda yararlanılmasının yanı sıra, günümüzde hastalık etmenlerinin ilaçlara direnç göstermeye başlaması ve kullanılan sentetik ilaçların olası yan etkilerinin görülmesiyle ilaç sektöründe kullanımı da oldukça yaygın hale gelmiştir. İlaç sektöründe doğal antibiyotik olarak tercih edilmekle birlikte kozmetik sektöründe antibakteriyel özellikleri nedeniyle vücut losyonu, burun spreyi, yüz maskesi, krem, şampuan vb. gibi birçok kozmetik ürününün yapım aşamasında da yararlanılmaktadır (Erdem, 2002).

Antimikrobiyal aktivite, propolisin gıda ürünlerinin raf ömrü konusunda en çok bilinen ve katkısı olan özelliklerinden biridir. Günümüzde tüketen, gelişen ve çalışan toplumların yeme alışkanlıklarına gıda sektörü çözüm olmaya çalışmaktadır. Hayatın hızlı akışından kaynaklı paketli gıdalara olan artan talebe çözüm olarak gıdaların hızlı bozulmalarını önleyici ve raf ömrünü uzatıcı çareler düşünülmektedir. Antimikrobiyal aktivitesi sayesinde bakteri, virüs ve küf gibi mikroorganizmaları etkisiz hale getirebilmektedir (Doğan ve Hayoğlu, 2012). Propolis gıdalarda doğal bir koruyucu ve kaplama materyali olarak tercih edilmektedir. Propolisin bozulmayı önleyici bir etkisi olması sebebiyle, yumru bitkilerin saklanması ve depolanmasında çimlenmeyi engelleyici olarak faydalanılmaktadır. Biyoaktif ambalaj malzemesi olarak kullanıldığında ise gıdayla ambalaj teması durumunda ambalajdan gıdaya herhangi zararlı bir bileşenin geçişinin olmadığı belirlenmiştir (Kumova ve ark., 2002; Cunha ve ark., 2020).

Propolisin insan sağlığı üzerine olumlu etkileri nedeniyle son zamanlarda bu alandaki çalışmalar artmıştır. Önemli bir apiterapik madde olmakla birlikte propolisin antitümör, antiinflamatuvar, çoğalmayı önleyici, bağışıklık güçlendirici gibi birçok etki ve aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Ahuja ve Ahuja, 2010; Can ve ark., 2015; Pobiega ve ark., 2019). Buna ek olarak dermatolojik, jinekolojik, mide ve kulak burun boğaz gibi bazı hastalık durumlarına karşı propolis kullanımının faydaları çalışmalarla sıkça gösterilmiştir (Marcucci, 1994). Çalışmalarca gösterilen medikal faydalarının propolisin çok yüksek antioksidatif etkiye sahip olmasından kaynaklandığı bildirilmektedir (Graikou ve ark., 2016). Propolisin sahip olduğu antioksidatif ve antimikrobiyal etkisinin, bileşiminde bulunan bazı uçucu yağlar ile flavonoidler olan pinocembrin, galangin, pinobanksin, asetik asit ve kafeik asit esterlerine bağlı olduğu tespit edilmiştir (Karlıdağ ve Genç, 2007; Dezmirean ve ark., 2017). Aynı zamanda antimikrobiyal etkisi; çözücü tipi, bitki çeşidi, coğrafi orijin ve propolisin içerdiği bileşiklere göre değişiklik gösterebilmektedir (Dezmirean ve ark., 2017).

**Tablo 1.1.** Propolisin içerdiği bileşenlerin biyolojik aktiviteleri (Yonar, 2017)

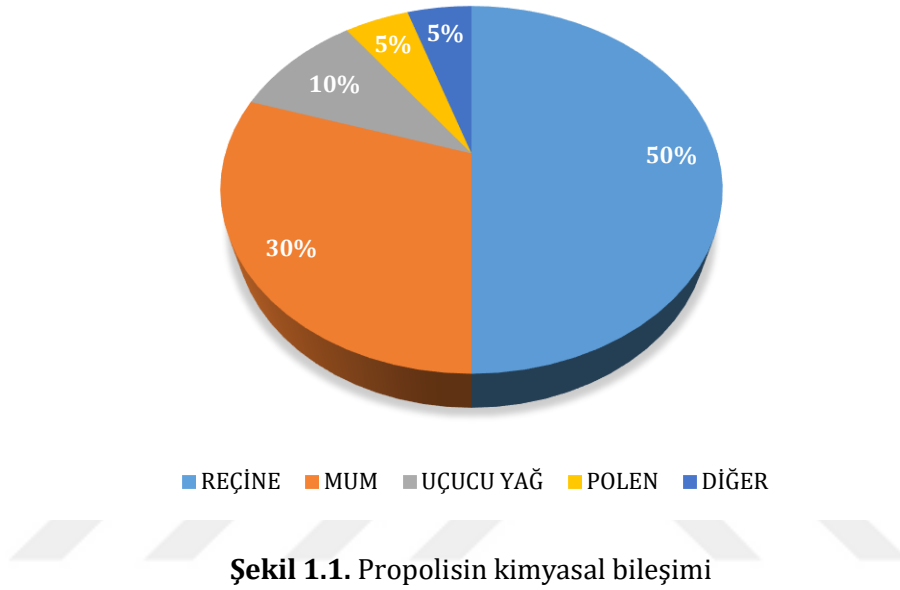
<b>Bileşik</b>	<b>Biyolojik ve Farmakolojik Etkisi</b>
Flavonoidler	Antimikrobiyal Antioksidan Antiinflamatuvar Antitümör Bağışıklık uyarıcı Antikarsinojenik Gastrik ülser iyileştirici Antiviral Kılcal damarları güçlendirici Antimikotik Lokal anestetik
Alifatik ve Aromatik Asitler	Antibakteriyel Antiseptik Antioksidan Antiviral Antibakteriyel Kollajenik etki Antihemorajik (kanama önleyici)
Terpenler	Antibakteriyel
Alkol ve Ketonlar	Antifungal Antioksidan Bağışıklık uyarıcı Antikarsinojenik
Hidrokarbonlar	Yara iyileştirici Karaciğer koruyucu Diş hastalıklarından koruyucu
Aminoasitler	Mitozu uyarıcı Protein biyosentezini artırıcı Kollajen ve elastinin oluşumunu destekleyici

#### **1.4. Propolisin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri**

Propolisin kendine özgü keskin ve aromatik bir kokusu vardır. Elde edildiği kaynağa, toplanma zamanı ve mevsime göre şekillenen koyu sarı, kahverengi, kırmızı ve yeşil gibi farklı renkleri mevcuttur (Brown, 1989). Propolisin kimyasal yapısı, kovanın konumlandırıldığı çevrenin iklimsel ve coğrafi özellikleri, propolisi oluşturan arının türü, botanik etkenler gibi birçok farklı etkene bağlı olduğu için fazlasıyla değişken ve komplekstir (Escriche ve Borrás, 2018; Özdal ve



ark., 2019). 300'den fazla farklı bileşik içerdiği bildirilen propolisin kimyasal bileşimi, genel olarak %50 reçine, %30 mum, %10 esansiyel yağ, %5 polen, %5 diğer organik bileşenler ve minerallerden oluşmaktadır (Yücel ve ark., 2017). Propolisin, 100 °C'de sıvı, 70-80 °C'lerde yarı sıvı, 25-40 °C'lerde yumuşak ve çok yapışkan bir formda, 15-25 °C'lerde sakız kıvamında ve esnek, 10 °C'nin altında ise donmuş bir halde bulunup, oldukça sert ve çabuk kırılabilen bir yapıya sahip olduğu bildirilmiştir (Bianchi 1995).



Şekil 1.1. Propolisin kimyasal bileşimi

Propolisin yapısında magnezyum, kalsiyum, potasyum, sodyum, demir gibi elementlerle B1, B2, B6, C ve E vitaminleri de tespit edilmiştir (Deblock-Bostyn, 1982). Ancak, propolisin yapısında yağ, karbonhidrat, protein, mineral ve vitaminler minör düzeyde bulunduğu için besin değeri oldukça düşüktür. Bu nedenle genellikle doğrudan besin takviyesi olarak düşünülemez. Propolisin yararlı özelliklerinin genelde fenolik asit türevleri ve flavonoid ihtiva etmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Propolisin ihtiva ettiği en önemli grup olarak flavonoidler görülmektedir. Tablo 1.2.'de propolisin biyoaktif bileşenleri ve flavonoid kompozisyonu gösterilmektedir. Flavonoidler ikincil bitki metabolitleri oldukları için insanlar tarafından sentezlenemezler ve bu nedenle beslenmede önemli bir yerleri vardır (Bankova 2005). Propoliste p-kumarik asit, kafeik asit, esterler (fenil esterler), terpenler (di ve tri terpenler ve seskiterpenler), aromatik aldehytler, şekerler, şeker alkolleri, hidrokarbonlar bulunmaktadır (Talla ve ark., 2014; Saral, 2018).

**Tablo 1.2.** Propolisin biyoaktif kompozisyonu

	<b>Miktar</b>	<b>Kaynak</b>
<b>TPC</b>	1734-3344 mg GAE/100 g	Gargouri ve ark.,2019
	43,77-97,96 mg GAE/mL	Zainal ve ark., 2021
	12,54-253,71 mg GAE/g	Rajan ve ark., 2021
	79,17-174,51 mg GAE/g	Al-Juhaimi ve ark., 2021
	2431-127318 mg GAE/L	Sağdıç ve ark., 2020
	4,8-504,2 mg GAE/g	Oroian ve ark., 2020b
	134,02-327,30 mg GAE/g	Shahbaz ve ark., 2021
	55,74-91,32 mg GAE/g	Andrade ve ark., 2017
	3462,4 mg GAE/g	Cavalero ve ark., 2020
	28,48-80,24 mg GAE/mL	Keskin ve ark., 2020
	510-575 mg GAE/g	Erdoğan ve ark., 2011
<b>TFC</b>	30,89-59,45 mg QE/g	Andrade ve ark., 2017
	117- 559 mg CE/100 g	Gargouri ve ark.,2019
	41,19-70,19 mg QE/g	Al-Juhaimi ve ark., 2021
	104-40516 mg/L	Sağdıç ve ark., 2020
	25,09 – 112,49 µg QE/mL	Zainal ve ark., 2021
<b>Antioksidan (DPPH)</b>	4431-4663,80 µmol TEAC/g	Andrade ve ark., 2017
	%37,00-%88,11	Zainal ve ark., 2021
	%44,73-73,18	Shahbaz ve ark., 2021
	%17,29-53,62	Al-Juhaimi ve ark., 2021
	409,6-503,7 mg TEAC/g	Erdoğan ve ark., 2011
<b>Antioksidan (ABTS)</b>	1868,5-2913,5 µmol TEAC/g	Andrade ve ark., 2017
	18,652 µmol TEAC/g	Cavalero ve ark., 2020
	109,76 -252,9 µmol TEAC/g	Gargouri ve ark.,2019
	237,7-285,3 mg TEAC/g	Erdoğan ve ark., 2011
<b>Flavonoidler</b>	<b>Miktar</b>	<b>Kaynak</b>
Apigenin	14-1209 mg/L	Sağdıç ve ark., 2020
	5,2-13,4 mg/g	Oroian ve ark., 2020b
	0,4-3 mg/g	Pellati ve ark., 2013
	0,09-0,42 mg/g	Hu ve ark., 2022
Chrisin	1-10760 mg/L	Sağdıç ve ark., 2020
	62,1-161,7 mg/g	Oroian ve ark., 2020b
	4,2-33 mg/g	Pellati ve ark., 2013
	641,33 µg/mL	Bozkuş ve ark., 2021
	4,06-15,61 mg/g	Hu ve ark., 2022

TPC: toplam fenolik konsantrasyonu, TFC: toplam flavonoid konsantrasyonu,

GAE: gallik asit eşdeğeri, QE: kuersetin eşdeğeri, TEAC: trolox eşdeğer antioksidan kapasitesi

**Tablo 1.2.** Propolisin biyoaktif kompozisyonu (Devam)

<b>Flavonoidler</b>	<b>Miktar</b>	<b>Kaynak</b>
Galangin	36-11987 mg/L	Sağdıç ve ark., 2020
	8,8-23 mg/g	Oroian ve ark., 2020b
	1,1-16,3 mg/g	Pellati ve ark., 2013
	534,11 µg/mL	Bozkuş ve ark., 2021
	0,57-3,41 mg/g	Hu ve ark., 2022
Isorhamnetin	5-2221 mg/L	Sağdıç ve ark., 2020
	8,8-23 mg/g	Oroian ve ark., 2020b
	0,5-3,8 mg/g	Pellati ve ark., 2013
	0,29-0,78 mg/g	Hu ve ark., 2022
Kaempferol	1-1292 mg/L	Sağdıç ve ark., 2020
	5,1-13,4 mg/g	Oroian ve ark., 2020b
	0,9-2,5 mg/g	Pellati ve ark., 2013
	98,72 µg/mL	Bozkuş ve ark., 2021
	0,08-12,21 mg/g	Rajan ve ark., 2021
	0,03-0,11 mg/g	Hu ve ark., 2022
Myristin	2-295 mg/L	Sağdıç ve ark., 2020
	95,5-248,7 mg/g	Oroian ve ark., 2020b
	2,32 µg/mL	Bozkuş ve ark., 2021
Naringenin	2-959 mg/L	Sağdıç ve ark., 2020
	372,39 µg/mL	Bozkuş ve ark., 2021
Pinobanksin	33-8778 mg/L	Sağdıç ve ark., 2020
	0,9-7,8 mg/g	Pellati ve ark., 2013
	0,37-2,47 mg/g	Hu ve ark., 2022
Pinocembrin	12-7822 mg/L	Sağdıç ve ark., 2020
	6,6-17,2 mg/g	Oroian ve ark., 2020b
	4,2-25 mg/g	Pellati ve ark., 2013
	572,67 µg/mL	Bozkuş ve ark., 2021
	2,51-6,58 mg/g	Hu ve ark., 2022
Kuersetin	4-2105 mg/L	Sağdıç ve ark., 2020
	4,8-12,4 mg/g	Oroian ve ark., 2020b
	0,5-2,5 mg/g	Pellati ve ark., 2013
	40,69 µg/mL	Bozkuş ve ark., 2021
	0,06-6,17 mg/g	Rajan ve ark., 2021

TPC: toplam fenolik konsantrasyonu, TFC: toplam flavonoid konsantrasyonu,

GAE: gallik asit eşdeğeri, QE: kuersetin eşdeğeri, TEAC: trolox eşdeğer antioksidan kapasitesi

**Tablo 1.2.** Propolisin biyoaktif kompozisyonu (Devam)

<b>Flavonoidler</b>	<b>Miktar</b>	<b>Kaynak</b>
Rutin	4-2164 mg/L	Sağdıç ve ark., 2020
	29-75,6 mg/g	Oroian ve ark., 2020b
	0,11-1,62 mg/g	Rajan ve ark., 2021
Kateşin	1-48 mg/L	Sağdıç ve ark., 2020
	0,04-2,33 mg/g	Rajan ve ark., 2021
<b>Fenolik asitler</b>	<b>Miktar</b>	<b>Kaynak</b>
4-OH Benzoik Asit	9-401 mg/L	Sağdıç ve ark., 2020
	43,17 mg/kg	Shahbaz ve ark., 2021
Kafeik Asit	326-6474 mg/L	Sağdıç ve ark., 2020
	8,1-21 mg/g	Oroian ve ark., 2020b
	2,3-6,7 mg/g	Pellati ve ark., 2013
	66 µg/mL	Bozkuş ve ark., 2021
	0,05-6,84 mg/g	Rajan ve ark., 2021
	4,13-21,66 mg/kg	Shahbaz ve ark., 2021
	0,043-7,128 mg/g	Rebiai ve ark., 2021
	0,33-1,73 mg/g	Hu ve ark., 2022
Kafeik Asit Fenil Ester (CAPE)	7-5054 mg/L	Sağdıç ve ark., 2020
	2,3-13,1 mg/g	Pellati ve ark., 2013
	630,67 µg/mL	Bozkuş ve ark., 2021
Klorojenik Asit	1-1139 mg/L	Sağdıç ve ark., 2020
	10,20 µg/mL	Bozkuş ve ark., 2021
	0,07-19,35 mg/g	Rajan ve ark., 2021
	6,33-31,80 mg/kg	Shahbaz ve ark., 2021
	52,193-148,151 µg/g	Rebiai ve ark., 2021
Epigallokateşin	5-102 mg/L	Sağdıç ve ark., 2020
	0,33-3,39 mg/g	Rajan ve ark., 2021
Ferulik Asit	3-1561 mg/L	Sağdıç ve ark., 2020
	0,90-56,44 mg/g	Rajan ve ark., 2021
	4,74-24,32 mg/kg	Shahbaz ve ark., 2021
	0,11-0,37 mg/g	Hu ve ark., 2022
	2,3-8,7 mg/g	Pellati ve ark., 2013
İsoferulik Asit	1,3-3 mg/g	Pellati ve ark., 2013
	0,34-1,47 mg/g	Hu ve ark., 2022

TPC: toplam fenolik konsantrasyonu, TFC: toplam flavonoid konsantrasyonu,

GAE: gallik asit eşdeğeri, QE: kuersetin eşdeğeri, TEAC: trolox eşdeğer antioksidan kapasitesi

**Tablo 1.2.** Propolisin biyoaktif kompozisyonu (Devam)

Fenolik asitler	Miktar	Kaynak
Gallik Asit	1-92 mg/L	Sağdıç ve ark., 2020
	0,21-13,77 mg/kg	Shahbaz ve ark., 2021
	0,328-0,440 mg/g	Rebiai ve ark., 2021
	0,03-0,30 mg/g	Rajan ve ark., 2021
Protokateşik Asit	3-235 mg/L	Sağdıç ve ark., 2020
	0,06-0,52 mg/g	Rajan ve ark., 2021
m-Kumarik Asit	1-2268 mg/L	Sağdıç ve ark., 2020
	1,33-13,57 mg/kg	Shahbaz ve ark., 2021
p-Kumarik Asit	3-7315 mg/L	Sağdıç ve ark., 2020
	104,3-271,7 mg/g	Oroian ve ark., 2020b
	1,9-10,2 mg/g	Pellati ve ark., 2013
	1,21-45,78 mg/g	Rajan ve ark., 2021
	2,86-14,98 mg/kg	Shahbaz ve ark., 2021
	3,0849-278,980 µg/g	Rebiai ve ark., 2021
	0,29-1 mg/g	Hu ve ark., 2022
Transsinamik Asit	37-3532 mg/L	Sağdıç ve ark., 2020
	91,49 µg/mL	Bozkuş ve ark., 2021
Vanilik Asit	8-5064 mg/L	Sağdıç ve ark., 2020
	12,67-26,81 mg/kg	Shahbaz ve ark., 2021

TPC: toplam fenolik konsantrasyonu, TFC: toplam flavonoid konsantrasyonu,

GAE: gallik asit eşdeğeri, QE: kuersetin eşdeğeri, TEAC: trolox eşdeğer antioksidan kapasitesi

### 1.5. Propolis Ekstraksiyon Yöntemleri

Propolisin biyoaktif bileşenlerce zengin kompleks bir yapısı olmasının yanı sıra ham haliyle reçineli, suda az çözünen, viskoz, güçlü tat ve koku gibi yapısal özelliklerinden dolayı biyoetkinliği ve doğal haliyle kullanılabilirliği kısıtlanmaktadır. Bu nedenle tüketime uygunluğunun artırılması için ekstrakte edilmesi gerekmektedir (Keskin, 2018). Ekstraksiyon sırasında vakslı bir dokusu olması sebebiyle apolar özellikteki yapıdan biyoaktif kısmın ayrılması oldukça zor hale gelmektedir ve bu zor sürecin kolaylaştırılması açısından ekstraksiyon aşamalarında kullanılacak solvent ve seçilecek ekstraksiyon yöntemi önem arz etmektedir (Yıldız, 2020).

Geleneksel ekstraksiyonda; süre kaybı yaşanması, yüksek miktarda ve saflıkta solvante ihtiyaç duyulması, kullanılan solventin uzaklaştırılma zorluğu, biyoaktif bileşen kaybı, sıcaklığa duyarlı olan bileşenlerin termal bozunumu, fazla maliyet harcanmasına karşın düşük performans alınması gibi bazı dezavantajlar farklı ekstraksiyon yöntemlerinin kullanımını

artırarak minimize edilmeye çalışılmaktadır (Şengül ve Topdaş, 2019). Geleneksel ekstraksiyona alternatif olarak kullanılan modern ekstraksiyon teknikleri çevreye verilen zararın minimumda tutulması sebebiyle yeşil teknikler olarak da adlandırılmaktadır. Yeşil ekstraksiyon tekniklerine, ultrasonik ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon, derin ötektik çözücülerle ekstraksiyon yöntemleri örnek verilebilmektedir (Yıldız, 2020). Yeşil tekniklerin güvenilir olması, daha az kimyasal kullanılması, düşük enerji harcanması, kirliliğin en aza indirgenebilir olması, zaman kaybı yaratmaması, yenilenebilir hammadde kullanımına olanak sağlaması son yıllarda gıda teknolojileri açısından tercih edilme nedenleri arasında gösterilmektedir (Şengül ve Topdaş, 2019).

### **1.5.1. Mikrodalga Yardımlı Ekstraksiyon**

300 GHz ile 300 MHz aralığında bulunan elektromanyetik alanlar mikrodalgalardır. Mikrodalga destekli ekstraksiyon, mikrodalga enerjisi yardımıyla materyalden bir sıvı içerisinde çözünebilir maddelerin ekstraksiyonu şeklinde tanımlanabilen yeni bir tekniktir (Şengül ve Topdaş, 2019). Mikrodalga enerjisi gibi yeni teknikler gıda ve özellikle analitik kimya alanında ekstraksiyon, kurutma, çözündürme, nem tayini vb. işlemlerde sıklıkla kullanılmaktadır (Yaman ve Kuleaşan, 2016). Ekstraksiyon işleminde kullanılan mikrodalga tekniğinin temel prensibi polar moleküllerin üzerinde oluşan mikrodalgaların yarattığı etkiye dayanmaktadır ve ardı ardına gerçekleşen üç adımı içermektedir. İlk adımda iyonların yönlerini belirlemesi sonucu moleküller arası çarpışmalar ısı üretimi meydana getirmekte ve ısıyla beraber basıncın artması sonucu malzemenin aktif kısımlarından çözünen maddelerin ayrılması gerçekleşmektedir. İkinci adım çözücünün ürün matriksi boyunca difüzyonunu ve son adım ise ürün matriksinden çözücüye çözünen maddelerin salınımını kapsamaktadır. Mikrodalga yardımlı ekstraksiyonun çalışma prensibini oluşturan bu üç adım ile ekstraksiyon veriminin artması, sürenin kısalması, ısıtmanın hızlanması, ekipman boyutunun küçülmesi, solvent kullanımının azalması gibi pek çok avantaj sağlanmaktadır (Şengül ve Topdaş, 2019).

Hamzah ve Leo'nun (2015), yaptıkları çalışmada Malezya'nın Trigona şehrine ait propolisin sıcaklık, süre, katı solvent oranı ve güç gibi farklı parametreler kullanarak mikrodalga destekli ekstraksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Propolisin mikrodalga destekli ekstraksiyonu için optimizasyon koşullarını; 1:5 katı solvent oranı, 300 W mikrodalga gücü ve 115 °C sıcaklık şeklinde tespit etmişlerdir. Çalışma sonucu olarak mikrodalga tekniğinin propolis ekstraksiyonunda alternatif olabileceği ve daha az çözücü kullanılarak 20 dakikada gerçekleştirilen ekstraksiyonla üretilen ekstraktın, maserasyonla elde edilen ekstrakttan daha üstün kaliteye sahip olduğu bildirilmiştir. Benzer bir çalışma olan Pellati ve ark., (2013) tarafından yapılan çalışmada İtalya'nın farklı bölgelerinden alınan ham propolisten fenolik asitlerin ve flavonoidlerin hızlı ekstraksiyonu için yanıt yüzeyi deneysel tasarım metodu aracılığıyla bir mikrodalga destekli ekstraksiyon geliştirip, ekstraksiyon verimi optimize

edilmiştir. Geleneksel yöntemle kıyasla mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminde solvent kullanımının ve sürenin azaldığı sonucuna varılmıştır.

Oroian ve ark.,'nın (2020a), yaptıkları çalışmada Romanya'dan temin ettikleri propolisi mikrodalga destekli ekstraksiyon, maserasyon ve ultrases destekli ekstraksiyon yöntemiyle ekstrakte etmişlerdir. Ekstraksiyon verimi en yüksek ultrasonik ekstraksiyon yöntemiyle elde edilirken (%97), mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemiyle elde ettikleri verimin de (%96) maserasyondan (%91) daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada üç farklı ekstraksiyon yöntemiyle biyoaktif bileşenleri belirlenen propolis için en uygun tekniğin ultrases olduğu ve mikrodalga destekli ekstraksiyonun maserasyona kıyasla üstün özellikler gösterdiği sonuca varılmıştır. Sonuç olarak yapılan tüm çalışmalar mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminin maserasyon tekniğinden daha avantajlı olduğunu, ultrasesin de mikrodalga destekli ekstraksiyondan daha avantajlı olduğunu göstermiştir.

### **1.5.2. Derin Ötektik Çözücü Ekstraksiyonu**

20. yüzyılın başlarından beri dikkat çeken derin ötektik çözücülerle ekstraksiyon yöntemi çevreci, sürdürülebilir ve düşük maliyetli bir yöntem olarak son yıllarda etkin bir şekilde biyoaktif bileşenlerin ve nutrientlerin ekstraksiyonunda kullanılmaktadır. Genel olarak derin ötektik çözelti, kuvvetli hidrojen bağı alıcısı (kolin klorür) ve hidrojen donöründen (glikoz, sukroz, fruktoz, oksalik asit ve malik asit) oluşmaktadır (Cunha ve Fernandes., 2018). Hazırlanan bu çözelti karbonhidrat türevi, üre türevi ve klorür tuzunun hidrojen bağı etkileşimi ile meydana gelmektedir (Ruß ve König, 2012). Geçmişten günümüze hazırlanmış ilk derin ötektik çözelti ise kolin klorür ve çinko klorürün 100 °C'nin altında karıştırılması ile oluşturulmuştur. Daha sonra farklı asitler eklenerek derin ötektik solventler (DÖS) geliştirilmiştir. Bileşenleri değiştirilerek farklı kimyasal özelliklere sahip DÖS çözeltileri elde edilebilmesi, kullanılan çözücülerin yanıcı ve uçucu olmaması, kokusuz, renksiz, kolay hazırlanması, klasik çözücülerde çözünmeyen selüloz gibi organik ve inorganik maddeleri çözebilmesi gibi özellikleri bu tekniğin avantajları arasında yer almaktadır (Abbott ve ark., 2001; Özgür, 2021).

Derin ötektik ekstraksiyon yönteminde sıklıkla kullanılan kolin klorür, kuarter amonyum tuzu ve alkol içeren aynı zamanda suda çabuk çözünebilen bir bileşiktir (Kantar ve ark., 2021). Kolin klorür bileşiğinin düşük buhar basıncı ve erime noktasına sahip olması, geri dönüşümünü kolaylaştırmakta ve tercih edilmesini sağlamaktadır. Ayrıca kolin klorür gibi avantajlı solventler kullanılarak gerçekleştirilen bu ekstraksiyon yönteminin ultrases ve mikrodalga gibi diğer yeşil tekniklerle kullanılması ekstraksiyon verimini artırarak kısa sürede istenilen sonuçlara ulaşılmasını sağlamaktadır (Kantar ve ark., 2021; Özgür, 2021). Propolisin derin ötektik solvent ekstraksiyonunun yaygınlaşmasıyla bu alanda yapılan çalışmalarda artmıştır. Dos Santos ve ark.,'nın (2021), yürüttükleri çalışmada kırmızı propolisin toplam flavonoid,

antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin iyonik sıvı ve derin ötektik solvent ekstraksiyonu incelenmiştir. Çalışmada propolisin ekstraksiyonu için kolin klorür ile 1:2 molar oranlarında üç farklı bileşen (gliserol, 1,4 bütandiol, levunilik asit) kullanılarak derin ötektik solventler hazırlanmıştır. Hazırlanan çözücülere 3,3 dakika boyunca ultrases destekli ekstraksiyon uygulanmıştır. Çalışma koşulları altında toplam flavonoid miktarı 36,30-394,39 mg RuE/g olarak tespit edilirken, antioksidan aktivitesi 5,48-7595,77 µmol TEAC/g bulunmuştur. Yapılan çalışmanın sonucu olarak ultrases destekli ekstraksiyon ve derin ötektik solvent tekniklerinin beraber kullanılmasıyla kırmızı propolisin ekstraksiyonunda yüksek antioksidan aktiviteye sahip bazı fitokimyasalların geri kazanıldığı bildirilmiştir. Ayrıca ekstraktların *Salmonella enteritidis* ve *Staphylococcus aureus* gibi bazı bakterilerin gelişimini engelleyerek mikrobiyolojik analizlerde olumlu etkiler gösterdiği tespit edilmiştir. Derin ötektik ekstraksiyon kullanılarak yapılan çalışmalar, çözücülerin biyobozunur olması, toksik olmaması ve düşük maliyetle kısa sürede sentezlenebilir olmasıyla avantaj sağladığını ve yeşil tekniklerle beraber kullandığında etkisinin arttığını net bir şekilde göstermiştir.

### 1.5.3. Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu

Basınçlı sıvı ekstraksiyonu ya da bir diğer adıyla hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu 20,3 MPa'a kadar çıkabilen yüksek basınçlar ve 40–200 °C arası sıcaklıklarda kapalı bir ortamda gerçekleştirilmektedir (Erdoğan ve ark., 2011). Basınçlı sıvı ekstraksiyon yönteminde temel amaç, sıvının yüksek sıcaklık ve basınç kullanarak ekstraksiyonunu gerçekleştirmektir. Uygulanan yüksek sıcaklık ve basınç, örneğin içine çözücünün daha iyi nüfuz etmesini sağlamaktadır. Yaygın olarak ekstraksiyonda sıcaklık, çözücünün kaynama noktasının üstündeki bir değerde kullanılmaktadır. Sıcaklıkla birlikte kaynama noktasının üzerine çıkılsa bile basınç sayesinde çözücü sıvı halde kalmaktadır. Çözücülerin sıvı halde kalması ekstraksiyon süresi boyunca çözücü kaybı yaşanmasının önüne geçmektedir. Düşük çözücü tüketimiyle olumlu çevresel etkiler görülmektedir. Basınçlı sıvı ekstraksiyonunda, temel olarak çözünürlüğünün ve kütle transfer hızının artmasıyla yüksek ekstraksiyon verimleri elde edilmektedir. Ekstraksiyonun yüksek sıcaklıklarda gerçekleşmesi, düşük sıcaklıklarda bitkilerdeki biyoaktif kısımların ekstrakte edilmesinde etkisiz olan su gibi çözücülerin verimli bir şekilde kullanımına olanak sağlamaktadır.

Hızlandırılmış solvent ekstraksiyonunun geleneksel ekstraksiyon yöntemleri ile kıyaslandığında, zaman kaybını azaltan ve daha az katı solvent oranları gerektiren bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Erdoğan ve ark., 2011; Sánchez Camargo ve ark., 2016).

Basınçlı sıvı ekstraksiyonunu verim açısından etkileyen iki temel faktör sıcaklık ve basınç şeklinde açıklanabilmektedir. Ekstraksiyon sırasında uygulanan yüksek sıcaklık benzer moleküller arasındaki çekme ve yapışma kuvvetlerini en aza indirgeyerek gerekli aktivasyon enerjisini azaltmaktadır. Aynı zamanda çözücünün yüzey gerilimini düşürerek kavite



oluşumunu kolaylaştırmaktadır. Böylelikle maddeler daha hızlı çözünmekte ve ekstraksiyon kinetiği hızlanarak verim artmaktadır. Ekstraksiyon verimini etkileyen bir diğer faktör olan yüksek basınç uygulaması çözücünün yüksek sıcaklıkta kaynamasının önüne geçerek sıvı halde kalmasını sağlamakta ve belirlenen ekstraksiyon koşulları altında geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinden daha hızlı gerçekleşmesini sağlamaktadır (Büyüktünel, 2012).

Erdoğan ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada ülkenin farklı noktalarından topladıkları propolis örneklerini basınçlı sıvı ekstraksiyonu yardımıyla ekstrakte edip antiradikal kapasiteleri ve toplam fenolik içeriklerini tespit etmeyi amaçlamışlardır. Ekstraksiyonun optimizasyonu amacıyla solvent konsantrasyonu, sıcaklık, ekstraksiyon süresi ve basınç gibi farklı değişkenler kullanmışlardır. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu sonucu toplam fenolik madde miktarını 510-575 mg GAE/g bulmuşlardır. Aynı zamanda DPPH reaktifi kullanılarak yapılan antioksidan aktiviteyi 1,6-503,7 mg TEAC/g tespit ederken, ABTS yöntemi kullanılarak yapılan antioksidan aktiviteyi 1,8-285,3 mg TEAC/g bulduklarını bildirmişlerdir. Literatürde basınçlı sıvı ekstraksiyonu ile yapılan çalışmalar propolisten biyoaktif bileşiklerin elde edilmesi için bu yöntemin uygun olduğunu göstermiştir. Ancak, ısıya dayanıklı olmayan örneklerde yüksek sıcaklığın termal bozunuma sebep olması basınçlı sıvı ekstraksiyonunun dezavantajları arasında yer almaktadır (Büyüktünel, 2012).

#### **1.5.4. Ultrasonik Ekstraksiyon**

İnsan kulağının algılayabileceğinin üzerindeki ses dalgaları ultrasonik ses dalgalarıdır. Gıda sektöründe 10 MHz ile 20 kHz frekans aralığındaki ultrasonik ses dalgalı alet ve ekipmanlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Ultrasonik ses uygulamaları yüksek ve düşük enerjili olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır ve gruplandırmada enerji miktarı en önemli kriter olarak baz alınırken sesin gücü, yoğunluğu, ses enerji yoğunluğu da oldukça önem arz etmektedir. Düşük enerjili ultrasonik uygulamalarda kullanılan referans; 1 W/cm<sup>2</sup> 'den düşük ses yoğunluğu ve 100 kHz'den yüksek frekansken, yüksek enerjili ultrasonik uygulamalarda kullanılan referans ise 1 W/cm<sup>2</sup>'den yüksek ses yoğunluğu ve 18-100 kHz 'den daha düşük frekans aralığı olarak belirlenmiştir (Cavuldak ve ark., 2016). Yüksek frekanslı düşük enerjili ultrasonik uygulamalar gıdanın yapısında kimyasal ve fiziksel etkileşimler meydana getirmediği için fizikokimyasal özelliklerinin tespitinde kullanılmaktadır. Düşük frekanslı yüksek enerjili ultrasonik uygulamalarda ise gıdanın yapısında kimyasal ya da fiziksel değişimler meydana gelmekte ve hedeflenen bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanılabilir (Oroian ve ark., 2020b).

Ultrasonik ses; kavitasyonu, hücre membranında incelmeyi, mikroorganizmalar üzerinde öldürücü etkiye neden olan lokal ısınmayı ve serbest radikal oluşumunu sağlamaktadır. Ultrasonik ses dalgaları materyalin yüzeyine çarptığında bir güç yaratmakta ve bu güç hücre duvarlarını mekanik olarak parçalayarak madde geçişini sağlamaktadır. Hücre duvarının yıkılmasıyla hücre içindeki sıvı ekstrakt hücre dışına kolayca çıkabilmektedir ve böylelikle

partikül çapının azalması sonucunda katı ve sıvı kısımlar arasındaki yüzey alanı artmaktadır. Ultrasonik ses dalgalarının mekanik aktivitesi, solventin dokulara doğru olan dağılımını hızlandırarak hücre duvarı parçalanmasını ve hücre içi bileşenlerin çözücüye kolayca geçmesini sağlamaktadır (Cavuldak ve ark., 2016; Cavalaro ve ark., 2019; Oroian ve ark., 2020b).

Ultras, kullanıldığı bazı sistemlerde tek başına yeterli olurken bazılarında ısı ve/veya basınç gibi işlemlerle kombine edilerek kullanılmaktadır ve bu kombine sistemlere termosonikasyon, manosonikasyon, manotermosonikasyon uygulamaları örnek verilebilmektedir. Termosonikasyon; ultras ve sıcaklık kombinasyonuyken, manosonikasyon ultras ve basınç kombinasyonlu bir uygulama olarak belirtilmektedir. Manotermosonikasyon ise basınç, sıcaklık ve ultras uygulamasının kombinasyonuyla gerçekleşen işlem şeklinde adlandırılmaktadır (Knorr ve ark., 2004; Rahman, 2007). Ultras destekli ekstraksiyon geleneksel yöntemlere kıyasla daha yüksek geri kazanım elde edilebilecek yeşil bir teknik olarak görülmektedir. Yeşil ve modern teknikler olarak gösterilen mikrodalga, yüksek hidrostatik basınç destekli ekstraksiyon ve süper kritik akışkan ekstraksiyonu gibi ekstraksiyon yöntemleriyle karşılaştırıldığında, ultrasin kullanım kolaylığı ve cihazın daha düşük maliyetli olması avantaj sağlamaktadır. Ultrasin, ekstraksiyon ve ayırma süreçlerinde karışmayan fazlar arasında kütle transferi sağladığı ve homojenizasyona yardımcı olduğu bilinmektedir. Son araştırmalar, ultras destekli ekstraksiyon yönteminin çözücü kullanımını azaltması, düşük sıcaklıklarda çalışma kolaylığı sağlayarak bazı aktif bileşiklerin termal bozunmasını önlemesiyle daha kısa sürelerde birçok bileşiğin ekstraksiyonunu sağladığını göstermektedir (Cavalaro ve ark., 2019; Oroian ve ark., 2020b).

Belirtilen son araştırmalara örnek olarak Cavalaro ve ark. (2020), yaptıkları çalışmada biberiye ve yeşil propolisi ultras destekli ekstraksiyonla ekstrakte edip antioksidan sonuçlarını karşılaştırmayı amaçlamışlardır. Çalışmada kullanılacak yeşil propolisi 40 kHz frekansta ısıtmalı bir ultras banyosunda, 1:35 katı solvent oranında, %99 etanol kullanarak 3-25 °C'de 20 dakika boyunca ekstrakte etmişlerdir. Belirtilen ekstraksiyon koşulları altında; propolisteki toplam fenolik madde miktarını 3462,4 mg GAE/g bulunmuşken, DPPH yöntemi ile bakılan antioksidan kapasitesini 18,652 µmol TEAC/g şeklinde tespit etmişlerdir. Sonuç olarak ultras destekli ekstraksiyon koşullarının propolis için antioksidan bileşiklerin geri kazanımını artırdığı ve yeşil propolisin ultras yardımı ile üretilen bitki özüne kıyasla daha yüksek antioksidan kapasite sunduğu belirlenmiştir. Çalışmada geliştirilen her iki ekstraktın da gıda ve kozmetik amaçlı kullanıma yönelik antioksidan kapasiteye sahip doğal içerikler üretmeye uygun olduğu bildirilmiştir.

Yeşil propolis kullanılarak gerçekleştirilen başka bir çalışma olan Andrade ve ark. (2017), yaptıkları çalışmada Brezilya'nın yeşil, kahverengi ve kırmızı propolisinin biyoaktif bileşen içeriğini ve antioksidan aktivitesini değerlendirmişlerdir. Propolisleri 35 °C'de %70'lik etanolde 60 dk, 2:15 katı solvent oranında ultrasonik ekstraksiyona tabi tutmuşlar ve bunun

neticesinde toplam fenolik madde miktarını 56 mg GAE/g bulmuşlardır. Bu sonuçlar yeşil propoliste maksimum 90,6 mg GAE/g olarak belirlenirken, kırmızı propoliste maksimum elde ettikleri değer 91,3 mg GAE/g olmuştur. Toplam flavonoid miktarı kahverengi propoliste 30,9 mg QE/g bulunmuşken, yeşil propoliste maksimum 59,5 mg QE/g ve kırmızı propoliste 31,5 mg QE/g olarak saptanmıştır. Antioksidan kapasitesine DPPH yöntemi ile bakılmış ve kahverengi propolis 45-4431 µmol TEAC/g, yeşil propolis 80-4554 µmol TEAC/g, kırmızı propoliste 68-4664 µmol TEAC/g bulunmuştur. ABTS serbest radikaliyle yaptıkları antioksidan tayininde ise kahverengi propoliste antioksidan aktivite 131-1868 µmol TEAC/g, yeşil propoliste 21-2215 µmol TEAC/g, kırmızı propoliste ise 95-2914 µmol TEAC/g olarak bulmuşlardır. Çalışmanın sonucu olarak kırmızı, kahverengi ve yeşil gibi farklı türlerden Brezilya propolisinin etanolik ekstraktlarının, yüksek flavonoid ve fenolik bileşik içeriğiyle yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Tablo 1.3.'de ultrasonik ekstraksiyonla ilgili yapılan çalışmalarda ekstraksiyon parametreleri gösterilmiştir. Yürütülen çalışmalarda yaygın olarak sıcaklık, süre, katı solvent oranı ve çözücü konsantrasyonu ekstraksiyon parametresi olarak belirlenmektedir. Genellikle çözücü olarak etanolün farklı konsantrasyonları kullanılırken dimetilsülfoksit, propilen glikol vb. çözücülerden de yararlanıldığı görülmektedir. Çalışmalarda katı solvent oranları 1:9-1:10 aralığında sıcaklık ise 25-75 °C aralığında değişmektedir. Ekstraksiyon süresi olarak neredeyse her çalışmada farklı süreler seçilirken minimum 2-3 dakika, maksimum 60 dakika seçilmiştir. Oroian ve ark. (2020b), ultrasonik genlik, sıcaklık, çözücü konsantrasyonu ve süre gibi bağımsız değişkenleri yaptıkları çalışmada kullanarak propolisteki biyoaktif bileşenlerin ultrases destekli ekstraksiyonu üzerine etkisini incelemişlerdir. Ekstraksiyondan en yüksek verimin elde edildiği optimum koşullar; %100 ultrasonik amplitude, %70 solvent konsantrasyonu, 58 °C ve 30 dakika olarak belirlenmiştir. Belirlenen koşullar altında toplam fenolik madde miktarı 459,9 mg GAE/g, toplam flavonoid miktarı 220,6 mg QE/g ve balsam içeriği de %1,95 olarak bildirilmiştir. Ayrıca, propolisin yüksek miktarda kaempferol (228,8 mg/g), mirisetin (115,5 mg/g), luteolin (27,2 mg/g) ve kuersetin (25,2 mg/g) gibi fenolik bileşikler içerdiği sonucuna ulaşılmıştır. Yapılan bu çalışma ile ultrases destekli ekstraksiyon yönteminin propolisin yapısından biyoaktif bileşenlerin ekstrakte edilmesi için uygun olduğunu göstermiştir.

**Tablo 1.3.** Propolis ile ilgili yapılan çalışmalardaki ultrasonik ekstraksiyon koşulları

<b>Katı-Solvent Oranı</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Süre</b>	<b>Kullanılan Çözücü ve Konsantrasyonu</b>	<b>Kaynak</b>
1:9	—	30 dk	%70 etanol	Sorucu, 2015
1:10	75 °C	40 dk	%60 etanol	Acun ve Gül, 2021
1:9	—	30 dk	%70 etanol	Sariyev ve ark., 2019
1:10	58-60 °C	2-3 dk	%70 etanol,%100 DMSO,%100 PG	Bakkaloglu ve ark., 2021
1:9	—	15 dk	%70 etanol	Nyandwi, 2017
1:10	Oda sıcaklığı	60 dk	%70 etanol	Uçak, 2018

DMSO: dimetilsülfoksit, PG: propilen glikol

Sambou ve ark., (2020) Kanada propolisinin ekstraksiyonunda soxhalet, mikrodalga ve ultrases destekli ekstraksiyon yöntemlerine uygun solventi belirlemek amacıyla on farklı solvent (su, metanol, etanol, aseton, etil asetat, diklorometan, etil asetat-hekzan (1:1), etil asetat-hekzan (4:1), etil asetat-hekzan (1:4), hekzan) kullanmışlardır. Üç farklı ekstraksiyon yöntemi gerçekleştirilmesine rağmen, polar çözücülerle (etanol ve metanol vb.) toplam fenolik ve flavonoid miktarları benzer düzeylerde tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda ultrases destekli aseton solventiyle gerçekleştirilen ekstraksiyon ile elde edilen propolis ekstraktının en yüksek antiradikal potansiyeli gösterdiği bildirilmiştir (IC50 = 48 µg/mL). Ultrasesin yüksek antiradikal aktiviteye sahip moleküllerin ekstraksiyonunu oda sıcaklığında bile destekleyebildiği bildirilmiştir. Propolisin biyoaktif bileşiklerinin ekstraksiyonunda polar çözücülerle soxhalet veya maserasyon gibi geleneksel yöntemler tercih edilmekteyken yapılan bu çalışmayla birlikte çevreci yeşil bir teknik olan ultrasesin propolis verimi açısından önemi vurgulanmıştır.

Gargouri ve ark. (2019), dört farklı bölgeden temin edilen Tunus propolisinin fitokimyasal bileşimini ve biyolojik özelliklerini inceledikleri bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu bağlamda propolisi geleneksel ve ultrases destekli ekstraksiyon yöntemiyle ekstrakte ederek toplam fenolik, flavonoid, ABTS serbest radikal, hidroksil radikalleri süpürme yetenekleri ve antimikrobiyal aktiviteleri açısından karşılaştırarak değerlendirmişlerdir. Ultrases destekli ekstraksiyon için 2 g propolis karanlık koşullarda 30 mL %80'lik etanol ile ultrasonik bir

banyoda 20 dakika boyunca 40 kHz ısıtma frekansıyla ekstre edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı Folin Ciocalteu reaktifi kullanılarak analiz edilmiş ve 1734-3344 mg GAE/100 g bulunmuştur. Toplam flavanol içeriğinin ise 117-559 mg CE/100 g arasında değişen flavanollerden oluştuğu bildirilmiştir. Propolis örneklerinin antioksidan kapasitesi, ABTS radikal katyon renk giderme testi ile gerçekleştirilmiş ve antioksidan aktivitesi 109,8-252,9 µmol TEAC/g aralığında bulunmuştur. Çalışmanın sonucu olarak Tunus propolisinde genistein, galangin ve CAPE'nin (kafeik asit fenetil ester) en çok bulunan fenolik bileşikler olduğu ve Tunus propolisinin yüksek antioksidan, antiinflamatuvar ve antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Antioksidanlar ve biyolojik aktivitelerin çoğu için en iyi ekstraksiyon tekniğinin ultrases destekli ekstraksiyon olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalar propolisin tüm türleri için biyoaktif bileşenler açısından en verimli ekstraksiyon tekniğinin ultrases destekli ekstraksiyon olduğunu açıkça göstermektedir. Farklı ekstraksiyon teknikleri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda ultrases destekli ekstraksiyonun diğer ekstraksiyon tekniklerine kıyasla toplam fenolik, flavonoid ve antioksidan aktiviteden maksimum verim elde etmek açısından üstün özellikler sergilediği görülmektedir. Propolis ekstraksiyonu ile ilgili yeşil tekniklere giren bu yöntemin ekstraksiyon verimini artırması, daha kısa sürelerde gerçekleşerek zaman kaybını önlemesi, çözücü kullanımında azalma sağlanması ve ekstraktların biyolojik aktivitesi açısından umut vadettiği yapılan çalışmalar neticesinde kanıtlanmıştır.

## 2. BÖLÜM

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### 2.1. Materyal

Ham propolis örneği, Bolu ilinin Gerede ilçesine bağlı İkinci Afşar köyündeki (40°48' N, 32°11' E) aktif olarak arıcılık yapan yerel bir arıcıdan yaklaşık 350 g olarak temin edilmiştir. Propolisin kaynağı bölgede hâkim olan çiçek florası ve çam ağaçlarıdır. Rengi ise kızıla çalan kahverengidir. 2020 yılının sonbahar mevsiminde ham haliyle kovan diplerinden, giriş deliğinden, çıta aralarından kazıma yöntemiyle toplanılmıştır. Araştırma kapsamında ekstrakte edilip kullanılacak olan ham propolis örneği toplandıktan sonra Hitit Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne getirilmiştir. Ardından 40 °C'de etüvde (Mommert, UN 55, Almanya) 2 gün boyunca kurutulmuş ve nem miktarı hızlı nem tayin cihazıyla (Shimadzu Moisture Analyzer, TypeMOC634) %1,38±0,11 olarak belirlenmiştir. Kurutulan propolis analiz öncesinde kahve öğütücüsünde öğütülüp toz haline getirildikten sonra partikül boyutu 420 µm olan elekten geçirilmiştir. Kahverengi şişelere konulan toz propolis analize kadar buzdolabında (+4 °C) muhafaza edilmiştir.

Folin Ciocalteu reaktifi, gallik asit, ABTS (2,2'-Azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit), Trolox ve (+)-Kateşin Sigma (St. Louis, Missouri) firmasından satın alınmıştır. Etanol ve diğer tüm reaktifler analitik saflıkta olup Merck'ten (Darmstadt, Germany) temin edilmiştir.

#### 2.2. Propolisin Geleneksel Ekstraksiyonu

Propolisin geleneksel solvent ekstraksiyonu Pobiega ve ark. (2019) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. 0,1 g tartılan toz propolis, %75'lik etanol ve saf suyla 1:200 katı solvent oranında 50 °C'de çalkalamalı su banyosunda ekstrakte edilmiştir. Çalkalamalı su banyosu (Wise Bath, Daihan Scientific, Kore) 200 rpm'de çalıştırılmıştır. Ekstraksiyon süresi 1 gün olacak şekilde gerçekleştirilmiştir ve ekstraksiyon yapıldıktan sonra tüpler 5000 rpm'de 15 dk santrifüj (Sigma, 3-30K, Almanya) işlemine tabi tutulup ekstraksiyon işlemi tamamlanmıştır.

#### 2.3. Propolisin Ultrasonik Ekstraksiyonu

Biyoaktif bileşenlerin ultrases destekli ekstraksiyonunda, uygulanan parametrelerin verim üzerine etkileri tepki yüzey yöntemi ile dört değişkenli ve ikinci dereceden merkezi karma tasarım sistemine göre hazırlanan ve merkez noktada 6 tekrar denemenin bulunduğu 30 adet deney yapılarak belirlenmiştir (Tablo 2.1.). Bu anlamda solvent konsantrasyonu (etanol:su),

sıcaklık, katı solvent oranı, süre değişkenler olarak belirlenmiştir. Toz haline gelen propolis 0,0001 g hassas terazide (Precisa Gravimetrics, XB220 A, İsviçre) tartılıp, tartımlar not edilmiştir. Her bir propolise farklı konsantrasyonlardaki (%50-100) etanol, farklı katı solvent oranlarında (1:100-1:300) eklenmiştir.

Ultrasonik su banyosu (Sonorex DigiPlus DL 255 H Bandelin, BANDELIN electronic GmbH & Co.) 30-70 °C ( $\pm 2$  °C) sıcaklık aralığında %100 genlik ile çalıştırılmıştır. Süre sonunda propolis ekstraktları 5000 rpm'de 15 dk santrifüjlenip, ekstraksiyon işlemi tamamlanmıştır.

**Tablo 2.1.** Tepki yüzey yanıt yöntemi faktörleri ve seviyeleri

Faktör	Seviye		
	-1	0	1
A:Solvent Konsantrasyonu (%)	50	75	100
B:Ekstraksiyon Sıcaklığı (°C)	30	50	70
C:Katı Solvent Oranı (g:mL)	1:100	1:200	1:300
D:Ekstraksiyon Süresi (dakika)	10	30	50

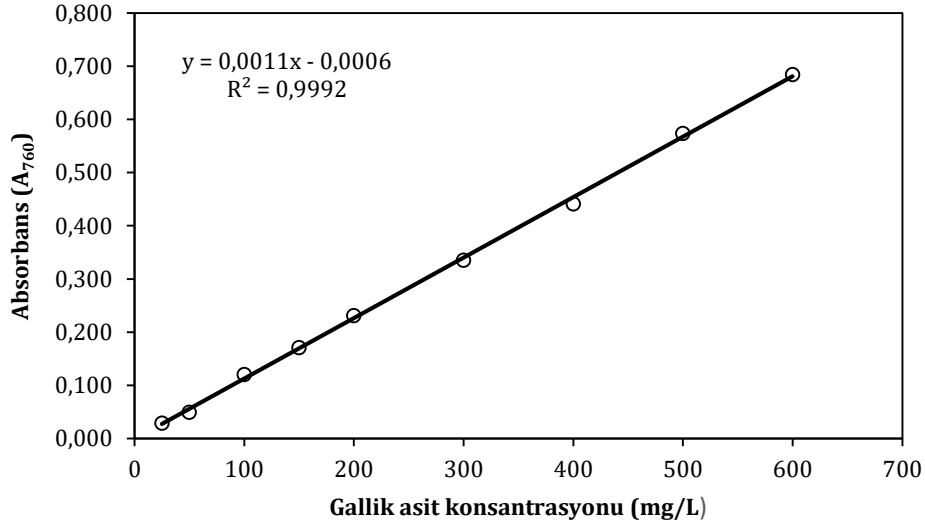
-1: çalışma aralığının alt sınırı, 0: çalışma aralığının orta değeri, +1: çalışma aralığının üst sınırı

#### 2.4. Toplam Fenolik Madde Tayini

Toplam fenolik madde tayini Güzel (2021) tarafından yapılan Folin Ciocalteu yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen teknik, fenolik maddelerin Folin ayırıcını alkali bir ortamda indirgemeleri sonucu, oksitlenmiş forma dönüştükleri bir redoks reaksiyonuna yol açmaktadır. Bu reaksiyon neticesinde indirgenmiş olan Folinin meydana getirdiği mavi rengin spektrofotometrede 760 nm dalga boyunda şahide karşı okunmasına dayanmaktadır.

Analiz öncesinde kullanılacak olan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisi (%7,5) ve Folin çözeltisi (0,2 N) hazırlanmıştır. Propolis örneklerinde ultrasonik ve geleneksel ekstraksiyon gerçekleştirildikten sonra uygun oranlarda seyreltilen ekstraktlardan 50  $\mu\text{L}$  deney tüpüne alınmış ve üzerine 2,5 mL Folin Ciocalteu çözeltisi ilave edilerek tüp etkili bir şekilde karıştırılmış ve 3 dakika bekletilmiştir. Üstüne 2 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisi ilave edilip deney tüpü bir kez daha iyice karıştırılmıştır. Deney tüpü karanlık bir ortamda 1 saat bekletildikten sonra spektrofotometrede (Shimadzu, UV-1800, Japonya) şahide karşı 760 nm'de absorbans ölçümleri yapılmıştır. Propolis örneklerindeki fenolik madde içeriği gallik asit kullanılarak hazırlanan standart eğriden hesaplanmıştır. Bu amaçla 25-600 mg gallik asit/L konsantrasyonlarında 9 farklı standart çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerde de propolis

örneklerinde gerçekleştirilen analiz basamakları gerçekleştirilip 760 nm’de absorbands değerleri tespit edilmiştir. Tespit edilen absorbands değerlerine karşılık gallik asit konsantrasyonlarından oluşan bir grafik çizdirilmiştir. Ardından lineer regresyon analizi ile gallik asit standart eğrisi ( $R^2=0,9992$ ) ve eğriyi tanımlayan eşitliğe ( $y=0,0011x-0,0006$ ) ulaşılmıştır. Propolis örneklerindeki toplam fenolik bileşen miktarı gallik asit standart eğrisini tanımlayan eşitlikten hesaplanarak sonuçlar “mg gallik asit/g” cinsinden belirlenmiştir.



Şekil 2.1. Gallik asit kalibrasyon eğrisi

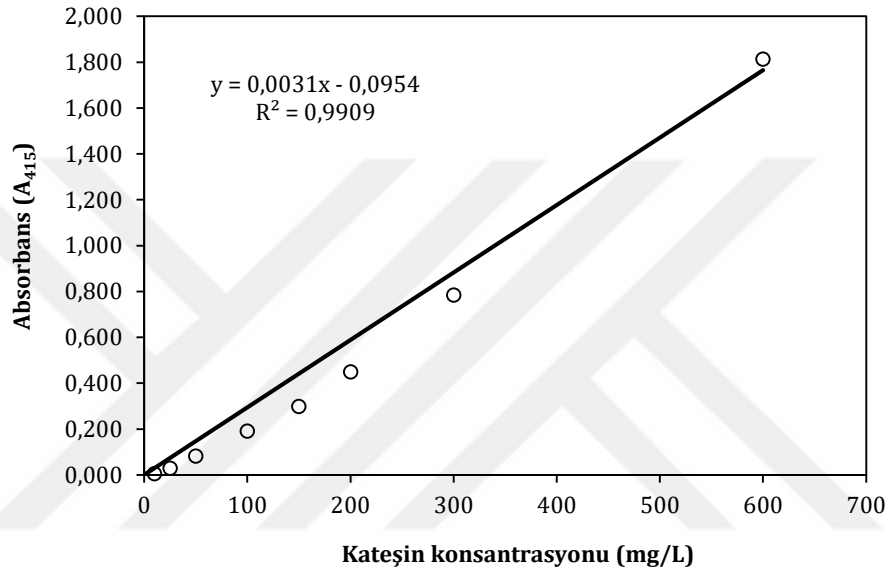
## 2.5. Toplam Flavonoid Tayini

Toplam flavonoid analizi Popova ve ark. (2007) tarafından önerilen yöntemle göre kolorimetrik olarak spektrofotometrede (415 nm) yapılan ölçüm ile belirlenmiştir. Analize başlamadan önce, bu analizde kullanılacak NaOH (1M), AlCl<sub>3</sub> (%10) ve NaNO<sub>2</sub> (%5) çözeltileri hazırlanmıştır. Ultrasonik ve geleneksel ekstraksiyonu gerçekleştirilen ve uygun oranda seyreltilen örneklerden deney tüpüne 1 mL alıp bunun üzerine 300 µL NaNO<sub>2</sub> çözeltisi eklenip vortekslenmiş ve 5 dk beklenmiştir. Ardından 300 µL AlCl<sub>3</sub> çözeltisi eklenip iyice karıştırıldıktan sonra tekrar 5 dk beklenerek üzerine 2 mL NaOH çözeltisi eklenip karıştırılmış ve son hacim 10 mL olacak şekilde saf suyla tamamlanmıştır. Elde edilen karışım tekrar vortekslenip 30 dk karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Deney tüpü 30 dk karanlıkta bekletildikten sonra spektrofotometrede (Shimadzu, UV-1800, Japonya) aynı prosedürde hazırlanmış olan şahide karşı 415 nm’de absorbandsı belirlenmiştir.

Propolis örneklerindeki flavonoid madde miktarı kateşinin standart eğrisinden faydalanarak belirlenmiştir. Kateşin stok çözeltisi hazırlanmış ve bu stok çözeltiden 10, 25, 50, 100, 150, 200,



300, 600 mg kateşin/L konsantrasyonlarında 8 farklı standart çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerde de propolis örneklerinde gerçekleştirilen analiz basamakları gerçekleştirilip 415 nm'de absorbans değerleri tespit edilmiştir. Tespit edilen absorbans değerlerine karşılık kateşin konsantrasyonlarından oluşan grafik çizdirilmiştir. Ardından lineer regresyon analizi ile kateşin standart eğrisi ( $R^2=0,9909$ ) ve eğriyi tanımlayan eşitliğe ( $y=0,0031x-0,0954$ ) ulaşılmıştır. Propolis örneklerinin toplam flavonoid miktarı kateşin standart eğrisini tanımlayan denklemden hesaplatılmış ve toplam flavonoid madde miktarı mg CE/g propolis olarak ifade edilmiştir.



**Şekil 2.2.** Kateşin kalibrasyon eğrisi

## 2.6. ABTS Antioksidan Tayini

Propolis ekstraktlarının antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla Arts ve ark.'nın (2001) yaptıkları çalışmada önerdikleri yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem kullanılarak yapılan antioksidan tayini, potasyum persülfat ve ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) arasındaki reaksiyon sonucu mavi/yeşil renkli ABTS<sup>•+</sup> radikal katyonunun meydana gelmesi ve katyon tarafından tutulan antioksidatif bileşiklerin miktarıyla sentetik antioksidanın (Trolox) standart miktarlarının karşılaştırılarak bağıl ölçümünün çıkarılmasına dayanmaktadır. Yapılan ölçümler, ABTS<sup>•+</sup> radikalinin kayboluşunun spektrofotometreyle tespiti şeklinde gerçekleşmiştir.

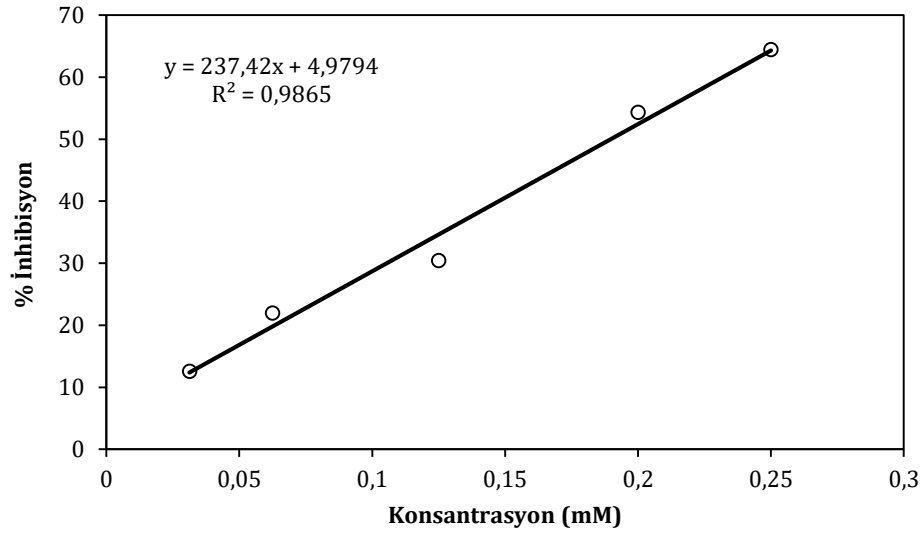
Analiz öncesinde 2,45 mM potasyum persülfat çözeltisi hazırlanıp, bu çözeltilerden de ABTS (7 mM) çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan ABTS çözeltisi, 20 °C'de 12-16 saat arasında inkübatörde ABTS<sup>•+</sup> radikal çözelti oluşana kadar bekletilmiştir. Ardından Trolox standartlarının ve örneklerin seyreltilmesinde yararlanılacak olan PBS (fosfat tamponu;

Phosphate Buffer Saline) çözeltisi hazırlanmıştır. 7,4 pH'lı bu PBS çözeltisi hazırlanırken fosfat tamponunun (0,1 M) üstüne NaCl (8,77 g) ilave edilip 1 L'ye tamamlanmıştır. Propolis ekstraktları yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğundan PBS ile analiz öncesinde seyreltilmiştir. Absorbans ölçümü yapmak için tek kullanımlık mikro küvetlerle 734 nm'de çalışılmış ve analiz öncesinde ABTS<sup>•+</sup> radikal çözeltisi 734 nm'de absorbansı 0,700±0,02 olacak biçimde seyreltik hale getirilmiştir. Küvete 1900 µL seyreltik ABTS<sup>•+</sup> çözeltisinden eklenmiş ve PBS çözeltisine karşı spektrofotometrede (Shimadzu, UV-1800, Japonya) başlangıç absorbans değeri okunmuştur.

Küvet içerisindeki radikal çözeltiliye 100 µL örnekten eklendikten hemen sonra kronometre çalıştırılıp 6 dk beklendikten sonra her bir dakikada bir ölçüm yapılarak absorbanslar not edilmiştir. Bu absorbans değerleri baz alınarak başlangıç değerine göre inhibisyon oranı aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır (Eşitlik 2.1).

$$\text{İnhibisyon oranı (\%)} = \frac{\text{Başlangıç absorbans değeri} - \text{Son absorbans değeri}}{\text{Başlangıç absorbans değeri}} * 100 \quad (2.1)$$

Örnekten 100 µL alınarak gerçekleştirilen bu işlemler 2 defa tekrar edilmiştir. Ardından yüzde inhibisyon oranlarının ortalaması belirlenmiştir. Propolis örneklerinin antioksidan aktivitelerinin hesaplanması amacıyla 62,57 mg Trolox tartılıp 100 mL'ye PBS ile tamamlanarak 2,5 mM Trolox stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stok Trolox çözeltisinden belirli miktarlarda alınarak 0,03-0,25 mM konsantrasyon aralığında 5 standart çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan Trolox standart çözeltilerine örneklerle uygulanan spektrofotometrik analiz aşamaları aynı şekilde uygulanmıştır. İnhibisyon değerlerinin ortalaması alınarak Trolox konsantrasyonuna karşı grafik oluşturulmuş ve Trolox standart eğrisi ( $R^2 = 0,9865$ ) ve eğriyi tanımlayan eşitlik ( $y = 237,42x + 4,9794$ ) elde edilmiştir. Sonuçlar g propolis örneğinde mmol TEAC (Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi; Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) olarak verilmiştir.



**Şekil 2.3.** Trolox kalibrasyon eğrisi

## 2.7. Balsam Tayini

Propolis ekstrakt örneklerinde balsam veriminin hesaplanması Oroian ve ark.'nın (2020b) yaptıkları çalışmada kullanılan yöntem minör düzeyde revize edilerek yapılmıştır. Bu yöntemle göre ekstraksiyon verimi, 5 g propolis ekstraktının fanlı bir etüvde (Mommert, UN 55, Almanya) 70 °C'de sabit ağırlığa gelinceye kadar buharlaştırılmasıyla belirlenmiştir. Kurutma sonrası desikatörde soğutulan örnekler tartılarak balsam yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Eşitlik 2.2).

$$\text{Balsam Verimi} = \frac{\text{Kuru Etanolik Özütün Ağırlığı}}{\text{Ham Propolisin Ağırlığı}} * 100 \quad (2.2)$$

## 2.8. Fenolik Dağılımının Belirlenmesi (LC-MS/MS)

LC-MS/MS (Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi, Thermo Scientific) ile fenolik dağılımın belirlenmesi Hitit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Merkezi'nde (HÜBTÜAM) gerçekleştirilmiştir. Geleneksel ve ultrasonik ekstraksiyon yöntemiyle optimum koşulda ekstrakte edilen propolis örnekleri 0,45 µm'lik şırınga filtresinden süzülen örnekler 2 mL amber renkli cam şişelere (vial) alınmıştır ve bekletilmeden analiz edilmiştir. Fenolik bileşenlerin LC-MS/MS ile (Resim 2.1) kantitatif olarak belirlenmesinde %0,1 asitlendirilmiş su (%A) ile metanol (%B) çözücü olarak seçilmiştir. Metoda ilişkin elüsyon profili Tablo 2.2'de MS/MS koşulları ise Tablo 2.3'de sunulmuştur. Çözücü akış hızı 0,7 mL/dk ve kolon (ODS

HYPERSİL 4,6\*250 mm 5µm kolon) fırını sıcaklığı 30 °C, enjeksiyon hacmi 20 µL olarak belirlenmiştir.



**Resim 2.1.** LC-MS/MS (Sıvı Kromatografisi Tandem MS Kütle Spektroskopisi) Cihazı

**Tablo 2.2.** Elüsyon profili

Elüsyon süresi (dakika)	(%A)	(%B)
0	100	0
1	100	0
22	5	95
25	5	95
30	0	100

**Tablo 2.3.** MS/MS cihaz koşulları

Cappillary Temperature	300 °C
Vaporizer Temperature	350 °C
Sheat Gas Pressure (Arb)	30
Aux Gas Pressure (Arb)	13
Sprey Voltage (V) (Pozitive Polarity)	4000
Sprey Voltage (V) (Negative Polarity)	2500
Discharge Current (µA)	4,0

## 2.9. Deneysel Ve İstatiksel Tasarım

Bu çalışmada solvent konsantrasyonu (A), ekstraksiyon sıcaklığı (B), katı solvent oranı (C) ve ekstraksiyon süresi (D) bağımsız değişkenler olarak belirlenmiş olup, belirlenen dört bağımsız değişkenin 3 seviyesi ile merkezi karma tasarım ile deney planı oluşturularak değişkenlerin toplam fenolik bileşen, toplam flavonoid içeriği, antioksidan aktivite ve balsam verimi etkinliğine etkisi ile optimum koşul araştırılmıştır. Faktörlere ait kodlanmış seviyeler Tablo 2.1'de sunulmuştur. Optimizasyon çalışması hesaplamaları ve grafikleri Design Expert (versiyon 7, USA) programı kullanılarak belirlenmiştir. Optimum koşul ve model validasyonu için uygulanan deneyler iki tekrarlı olarak yürütülmüştür. İkinci dereceden polinoma ait denklem Eşitlik 2.3'de sunulmuştur.

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^n (b_i x_i) + \sum_{i=1}^n (b_{ii} x_i^2) + \sum_{ij=1}^n (b_{ij} x_i x_j) \quad (2.3)$$

Eşitlikte  $y$ ; toplam fenolik madde, toplam flavonoid içeriği, antioksidan kapasite ve balsam verimine ilişkin tahmini yanıtı göstermekteyken,  $x_i$ ; kodlanmış değişkenleri (etanol konsantrasyonu, sıcaklık, süre, katı:solvent oranı),  $b_0$ ; denklem sabiti,  $b_i$ ; lineer etkiyi,  $b_{ii}$ ; kuadratik etkiyi,  $b_{ij}$  ise interaksiyon etkisini göstermektedir.

### 3. BÖLÜM

#### ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

##### 3.1. Modelleme ve İstatistiksel Analiz

Biyoaktif bileşenlerin ultrases destekli ekstraksiyonunda, uygulanan parametrelerin verim üzerine etkileri tepki yüzey yanıt yöntemi ile dört değişkenli ve ikinci dereceden merkezi karma tasarım sistemine göre hazırlanan ve merkez noktada 6 tekrar denemenin bulunduğu 30 adet deney yapılarak belirlenmiştir. Bu anlamda solvent konsantrasyonu (A), sıcaklık (B), katı solvent oranı (C), süre (D) değişkenler olarak belirlenmiştir. İkinci dereceden bir polinom denklemi, çoklu regresyon analizi yoluyla gözlemlenen verilerden türetilmiştir. İkinci mertebeden polinom denklemleri kodlanmış halleriyle aşağıda verilmiştir.

$$\begin{aligned} TPC = & 244,24 + 24,95 \cdot A + 3,13 \cdot B + 19,53 \cdot C + 3,30 \cdot D + 2,20 \cdot A \cdot B + 4,55 \cdot A \cdot C + 1,46 \cdot A \cdot D - 0,62 \cdot B \cdot C \\ & + 7,15 \cdot B \cdot D - 8,23 \cdot C \cdot D - 17,21 \cdot A^2 - 4,54 \cdot B^2 + 0,55 \cdot C^2 - 2,56 \cdot D^2 - 1,76 \cdot A \cdot B \cdot C - 0,76 \cdot A \cdot B \cdot D \\ & + 7,10 \cdot A \cdot C \cdot D - 3,17 \cdot B \cdot C \cdot D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} TFC = & 222,90 + 47,72 \cdot A + 0,48 \cdot B + 25,94 \cdot C - 7,23 \cdot D + 8,85 \cdot A \cdot B - 13,47 \cdot A \cdot C + 8,69 \cdot A \cdot D + \\ & 9,52 \cdot B \cdot C + 13,13 \cdot B \cdot D + 6,90 \cdot C \cdot D - 34,08 \cdot A^2 - 1,94 \cdot B^2 - 11,33 \cdot C^2 + 1,15 \cdot D^2 - 12,25 \cdot A \cdot B \cdot C - \\ & 11,08 \cdot A \cdot B \cdot D - 2,56 \cdot A \cdot C \cdot D - 3,24 \cdot B \cdot C \cdot D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} AOA = & 1,35 + 0,47 \cdot A + 0,031 \cdot B + 0,12 \cdot C + 0,046 \cdot D + 3,760E-003 \cdot A \cdot B - 0,093 \cdot A \cdot C - 5,681E \\ & 003 \cdot A \cdot D - 0,12 \cdot B \cdot C - 0,047 \cdot B \cdot D - 0,039 \cdot C \cdot D - 0,36 \cdot A^2 - 7,694E-003 \cdot B^2 + 0,12 \cdot C^2 - 0,059 \cdot D^2 \\ & + 6,455E-003 \cdot A \cdot B \cdot C + 6,951E-003 \cdot A \cdot B \cdot D - 0,020 \cdot A \cdot C \cdot D - 0,029 \cdot B \cdot C \cdot D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} Balsam = & 64,28 + 9,50 \cdot A + 1,84 \cdot B + 1,40 \cdot C - 0,93 \cdot D + 2,09 \cdot A \cdot B - 1,11 \cdot A \cdot C - 0,13 \cdot A \cdot D + 2,04 \cdot B \cdot C \\ & + 3,47 \cdot B \cdot D - 0,079 \cdot C \cdot D - 5,15 \cdot A^2 + 2,64 \cdot B^2 + 0,69 \cdot C^2 - 0,46 \cdot D^2 - 3,60 \cdot A \cdot B \cdot C - 2,62 \cdot A \cdot B \cdot D \\ & + 0,55 \cdot A \cdot C \cdot D - 0,78 \cdot B \cdot C \cdot D \end{aligned}$$

Deneysel veri modellerinin istatistiksel analiz sonuçları (ANOVA) Tablo 3.1.'de verilmiştir. Bütün modeller deneysel verilere uygunluk fonksiyonuna göre seçilmiş olup kullanılan her model ikinci dereceden polinom yanıt yüzey modelidir. Seçilmiş olan modelin uygunluğu  $R^2$ , adj- $R^2$ , F değeri ve p değerleriyle belirlenmiştir. Tüm yanıtlar için seçilen model maksimum  $R^2$  ve adj- $R^2$  değerini göstermiştir (TPC 0,973-0,929; TFC 0,972-0,926; AOA 0,956-0,886 ve balsam 0,873-0,666). İncelenen parametrelerin modelleri, parametrelerin tahmini için önerilen modelin geçerliliğini doğrulayan düşük p değerlerine (balsam 0,0095 ve TPC, TFC, AOA < 0,0001) sahiptir. Deneylerin doğruluğu ve güvenilirliği varyans katsayısı ile analiz edilmiş olup, düşük varyans katsayısı (TPC 3,46; TFC 7,55; AOA 12,74 ve balsam 9,16) deneylerin doğruluğunu ve tutarlılığını göstermektedir

### 3.2. Ekstraksiyon Parametrelerinin Optimizasyonu ve Modellerin Doğrulanması

Propolisten biyoaktif bileşenler ve balsam ekstraksiyonu için optimum koşul; 1:300 katı solvent oranı, %90,1 etanol konsantrasyonu, 51,5 °C ve 32,48 dakika olarak belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullarda toplam fenolik madde miktarı 276,078 mg GAE/g, toplam flavonoid miktarı 246,826 mg CE/g, antioksidan aktivite 1,68 mmol TEAC/g, balsam verimi ise %69,70 olarak hesaplanmıştır. Ekstraksiyon için belirlenen koşulların pratikteki uygulaması için 1:300 katı solvent oranı, %90 etanol konsantrasyonu, 51 °C ve 32 dakika seçilmiştir. Optimum koşullar altında ölçülen toplam fenolik madde miktarı 252,74±5,77 mg GAE/g, toplam flavonoid miktarı 222,32±1,27 mg CE/g, antioksidan aktivite 1,43±0,004 mmol TEAC/g, balsam verimi ise %71,99±6,31 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda optimum koşulun yanı sıra Tablo 3.2.'de sunulan 7 farklı ekstraksiyon koşulu random olarak belirlenerek bu noktalarda da araştırılan parametreler için deneysel veriler elde edilmiş ve model yardımıyla tahminlenen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Tahmini ve deneysel sonuçların karşılaştırılması Şekil 3.1.'de sunulmuştur

**Tablo 3.1.** Balsam miktarı, toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı ve antioksidan aktivite için model yanıtının ANOVA analizi

Source	DF	Balsam (%)		DF	TPC (mg GAE/g)		DF	TFC (mg CE/g)		DF	AOA ( $\mu\text{mol TEAC/g}$ )	
		F-value	p-value		F-value	p-value		F-value	p-value		F-value	p-value
Model	18	4.21	0.0095	18	22.29	< 0.0001	18	21.14	< 0.0001	18	13.56	< 0.0001
A	1	48.95	< 0.0001	1	177.02	< 0.0001	1	188.58	< 0.0001	1	174.81	< 0.0001
B	1	1.84	0.2026	1	2.79	0.1233	1	0.019	0.8923	1	0.76	0.4021
C	1	1.06	0.3260	1	108.46	< 0.0001	1	55.70	< 0.0001	1	11.85	0.0055
D	1	0.47	0.5078	1	3.10	0.1061	1	4.33	0.0616	1	1.70	0.2184
AB	70.07	0.1741		77.19	0.2931		1253.33	0.0352		2.262E-004	0.9216	
AC	19.79	0.4562		331.42	0.0429		2903.65	0.0038		0.14	0.0295	
AD	0.27	0.9292		34.01	0.4789		1208.80	0.0379		5.164E-004	0.8819	
BC	66.69	0.1840		6.17	0.7607		1448.71	0.0255		0.23	0.0084	
BD	193.10	0.0345		817.81	0.0042		2758.26	0.0045		0.035	0.2359	
CD	0.099	0.9574		1082.93	0.0017		760.79	0.0882		0.024	0.3192	
A <sup>2</sup>	68.64	0.1782		767.47	0.0051		3009.17	0.0034		0.33	0.0026	
B <sup>2</sup>	18.03	0.4765		53.33	0.3784		9.71	0.8365		1.534E-004	0.9354	
C <sup>2</sup>	1.23	0.8508		0.79	0.9133		332.38	0.2420		0.039	0.2139	
D <sup>2</sup>	0.54	0.9009		16.97	0.6148		3.43	0.9023		9.096E-003	0.5363	
ABC	207.15	0.0296		49.84	0.3939		2399.54	0.0068		6.668E-004	0.8659	
ABD	109.45	0.0967		9.14	0.7112		1963.84	0.0120		7.731E-004	0.8557	
ACD	4.90	0.7082		805.91	0.0044		104.56	0.5024		6.481E-003	0.6007	
BCD	9.73	0.5990		160.47	0.1396		167.71	0.3985		0.014	0.4497	
R <sup>2</sup>	0.8731			0.9733			0.9719			0.9569		
AdjR <sup>2</sup>	0.6656			0.9297			0.9259			0.8863		
CV%	9.16			3.46			7.55			12.74		
Adeq.Pre	8.597			20.090			16.256			13.477		

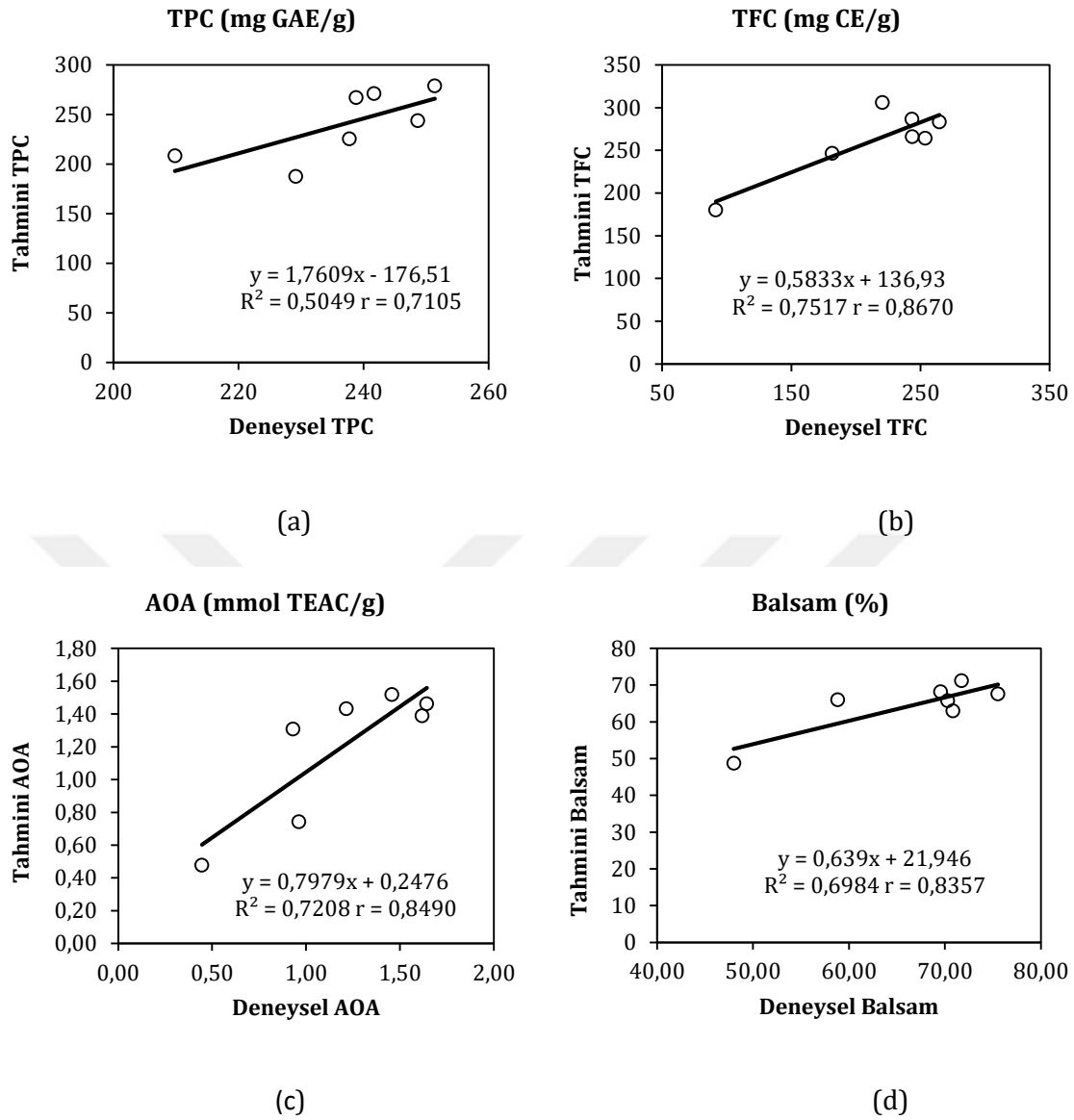


**Tablo 3.2.** Bazı kontrol noktalarından seçilen propolis örneklerinin TPC, TFC, AOA ve balsam sonuçları

Örnek No	Çözücü Derişimi (%)	Sıcaklık (°C)	Katı Solvent Oranı (W/V)	Süre (Dk)	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg CE/g)	AOA (mmol TEAC/g)	Balsam (%)
D1	95	70	1:300	50	251,38±3,13	283,35±3,13	1,52±0,04	67,62
D2	70	30	1:100	10	209,84±5,14	305,94±31,35	1,31±0,05	65,79
D3	65	70	1:300	45	248,68±10,37	265,86±8,81	1,43±0,08	71,21
D4	80	30	1:300	10	238,81±0,00	286,69±6,68	1,39±0,01	68,23
D5	85	60	1:300	10	241,66±4,00	264,23±5,33	1,46±0,11	62,99
D6	50	50	1:100	30	229,15±42,47	180,15±3,28	0,48±0,05	48,74
D7	60	60	1:200	40	237,74±0,34	246,52±13,16	0,74±0,04	65,99

**Tablo 3.3.** Bazı kontrol noktalarından seçilen propolis örneklerinin modelden üretilen TPC, TFC, AOA ve balsam sonuçları

Örnek No	Çözücü Derişimi (%)	Sıcaklık (°C)	Katı Solvent Oranı (W/V)	Süre (Dk)	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg CE/g)	AOA (mmol TEAC/g)	Balsam (%)
D1	95	70	1:300	50	278,78	264,66	1,43	75,53
D2	70	30	1:100	10	208,33	220,47	0,93	70,27
D3	65	70	1:300	45	243,69	243,64	1,21	71,71
D4	80	30	1:300	10	267,19	243,43	1,62	69,55
D5	85	60	1:300	10	271,24	253,57	1,64	70,83
D6	50	50	1:100	30	187,75	91,46	0,45	47,98
D7	60	60	1:200	40	225,64	181,48	0,96	58,83



**Şekil 3.1.** (a) TPC'nin deneysel ve tahmini verilerin karşılaştırılması, (b) TFC'nin deneysel ve tahmini verilerin karşılaştırılması, (c) AOA'nın deneysel ve tahmini verilerin karşılaştırılması, (d) balsam veriminin deneysel ve tahmini verilerin karşılaştırılması

### 3.3. Toplam Fenolik Madde Miktarı Analiz Sonuçları

Çalışmamızda incelenen ekstraksiyon parametrelerinin toplam fenolik bileşen verimine etkisi Şekil 3.2. ve Tablo 3.4. sunulmuştur. Propolis örneklerinde toplam fenolik madde miktarı %50 etanol, 1:100 katı solvent oranı, 70 °C'de 10 dakikalık ultrases uygulamasıyla minimum düzeyde (147,22 mg GAE/g) ekstrakte edilirken %100 etanol, 1:300 katı solvent oranında 70 °C'de, 50 dk ekstrakte edildiğinde maksimum değere (284,92 mg GAE/g) ulaşılmıştır. Tablo 3.1.'de sunulan ANOVA sonuçlarına göre propolisten biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunda

en önemli parametre etanol konsantrasyonu ( $p<0.0001$ ) ve katı solvent oranı ( $p<0.0001$ ) olarak belirlenmiştir. Etanol konsantrasyonunu %40'dan %80'e artırılmasıyla TPC konsantrasyonu %42,43 artış göstermektedir. Katı solvent oranının 1:100'den 1:300'e artışı ile birlikte ise TPC %19,41 oranında artış göstermektedir. Elde edilen bu sonuçlar etanol konsantrasyonu ve katı solvent oranındaki artışla birlikte fenolik madde miktarının da arttığını göstermektedir. Benzer şekilde Oroian ve ark. (2020b) yaptıkları modelleme çalışmasında propolis örneklerinde etanol konsantrasyonunun %40'dan %80'e artırılmasıyla ekstrakte edilen toplam fenolik madde miktarının %42,87 oranında arttığını belirlemişlerdir. Riciputi ve ark. (2018) tarafından patates atıklarından polifenollerin ekstrakte edildiği çalışmada da etanol konsantrasyonu, ekstraksiyon verimi üzerine etkili en önemli parametre olarak belirlenmiştir. Fenolik bileşen ekstraksiyonunda en önemli faktörlerden biri çözünenin polaritesidir. Bu nedenle alkolün tek başına çözünen olarak kullanılmasından ziyade belli oranda su ile karıştırılarak kullanılması ile ekstraksiyon verimi artabilmektedir. Nitekim, etanol konsantrasyonunun %40'dan %75,30'a artırılmasıyla Sparganii rhizoma bitkisinden fenolik bileşen ekstraksiyonunda verim artışı gözlenmiştir (Wang ve ark., 2013). Bu durum çözünen polaritesinin yanı sıra fenolik içeriği ile de ilgili olabilmektedir (Shirzad ve ark., 2017). Bunun yanı sıra araştırılan parametreler arasındaki etkileşimler (BD, CD) ekstraksiyon verimi üzerine etkili olmaktadır (Tablo 3.1.). Değişken etkileşimlerinin toplam fenolik madde üzerine etkileri Şekil 3.2.'de sunulmuştur. Ekstraksiyon sıcaklığı (B) ve ekstraksiyon süresi (D) propolisten toplam fenolik madde ekstraksiyonu üzerine etkili olan etkileşimlerdir ( $p<0.005$ ). Katı solvent oranı (C) ve ekstraksiyon süresi (D) etkileşimi de ekstraksiyon verimi üzerine etkili olmaktadır ( $p<0.005$ ).

Shirzad ve ark. (2017) tarafından zeytin yapraklarında fenolik bileşen ekstraksiyonunun optimize edildiği çalışmada toplam fenolik ekstraksiyonunda etanol konsantrasyonu ve süre arasındaki etkileşimin verim üzerine önemli etkisinin olduğunu belirlemişlerdir. Curcuma zedoaria yapraklarından fenolik bileşenlerin ultrasonik ekstraksiyonunda ise sıcaklık ve süredeki artışla birlikte ekstraksiyon veriminin arttığı belirlenmiştir. Diğer yandan yüksek sıcaklık (80 °C), uzun ekstraksiyon süresi (120 dakika) kombinasyonunun ekstraksiyon verimi üzerine olumsuz etkisi olduğu yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Azahar ve ark. 2017). De Moraes ve ark., (2021) Brezilya kırmızı propolisinin maserasyon yöntemiyle ekstraksiyonuyla ilgili yaptıkları çalışmada etanol konsantrasyonunu artırdıkça hem fenolik ekstraksiyonun hem de antioksidan aktivitenin büyük ölçüde arttığını tespit etmişlerdir. TPC verimi için etanol konsantrasyonu %60'tan %90'a yükseldiğinde TPC değerlerinin 123 mg GAE/g'dan 135 mg GAE/g'ye arttığını gözlemlemiştir.

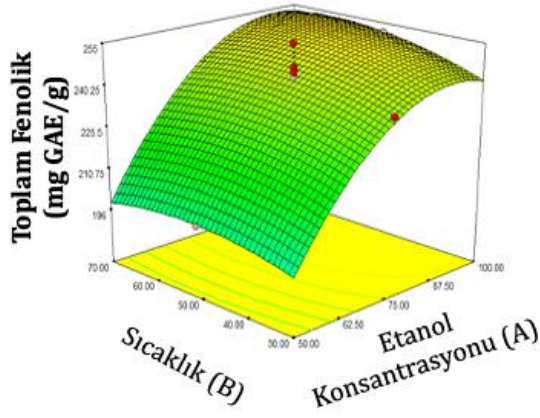
Çalışmamızda elde ettiğimiz toplam fenolik bileşen miktarlarını yapılan diğer çalışmalarla kıyasladığımızda uyguladığımız ekstraksiyon parametreleri ile daha yüksek TPC değerleri elde edildiği görülmüştür. Örneğin, Bouchelaghem ve ark. (2022), Macaristan'ın altı farklı bölgesinden toplanan propolis örneklerini 2:9 katı solvent oranında, %80'lik etanol kullanarak

70 °C'de 30 dk maserasyon işlemiyle toplam fenolik madde miktarını 10,4-71,1 mg GAE/g olarak tespit etmişlerdir.

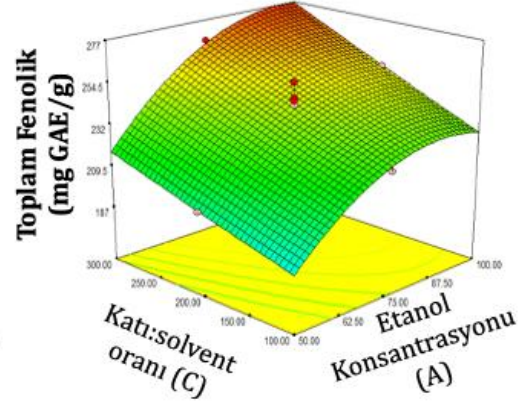
Analizimizde elde ettiğimiz minimum toplam fenolik madde miktarı bu çalışmada elde edilen minimum değerden yaklaşık 15 kat, maksimum toplam fenolik madde miktarı ise bu çalışmanın maksimum değerinden 4 kat daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Başka bir çalışma olarak Aboulghazi ve ark. (2022), Fas propolisinin ultrasonik ekstraksiyonuyla gerçekleştirdikleri analizde toplam fenolik madde miktarını 192 mg GAE/g olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen toplam fenolik madde miktarının ise elde ettiğimiz maksimum değerden 1,5 kat daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Rajan ve ark. (2021), yaptıkları çalışmada Brezilya kahverengi propolisini %80 etanol konsantrasyonu kullanarak ardışık solvent ekstraksiyonuyla ekstrakte etmiş ve toplam fenolik madde miktarını 214,13-383,6 mg GAE/g olarak bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada ultrasonik ekstraksiyonla benzer sonuçlar elde etmiş olmamız ardışık solvent ekstraksiyonuyla ultrasonik ekstraksiyonunun toplam fenolik madde verimi açısından benzerlikler sergilediğini göstermektedir. Andrade ve ark. (2017), Brezilya'nın yeşil, kahverengi ve kırmızı propolisini kullanarak yaptıkları çalışmada propolis örneklerinin 35 °C'de %70'lik etanolde 60 dk, 2:15 katı solvent oranında ultrasonik ekstraksiyona tabi tutulduklarını bildirmişlerdir. Bu ekstraksiyon koşulları altında toplam fenolik madde miktarını 55,7 mg GAE/g olarak bulmuşlardır. Toplam fenolik madde konsantrasyonu yeşil propoliste maksimum 90,6 mg GAE/g olarak belirlenmişken, kırmızı propoliste maksimum elde ettikleri değer 91,3 mg GAE/g olmuştur. Yapılan bu çalışmanın elde ettiği maksimum değerden (55,7 mg GAE/g), yaptığımız çalışma sonuçlarının (284,9 mg GAE/g) yaklaşık 5 kat yüksek olduğu görülmektedir.

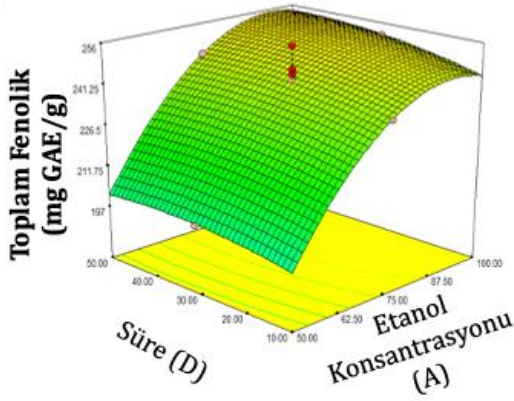
Yaptığımız çalışmada geleneksel ekstraksiyon tekniğini kullanarak Tablo 3.4.'de gösterildiği üzere %75 etanol konsantrasyonunda, 50 °C'de, 1:200 katı solvent oranında, 1 gün süre ile gerçekleştirilen yöntemde toplam fenolik madde miktarı 231,48±2,48 mg GAE/g olarak tespit edilmiştir. Optimum koşullarda ultrases destekli ekstraksiyonla elde ettiğimiz toplam fenolik sonuçlarının (252,74±5,77 mg GAE/g) geleneksel ekstraksiyondan daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar, propolisteki biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu için ultrasonik ekstraksiyon yönteminin geleneksel ekstraksiyon yöntemiyle kıyaslandığında toplam fenolik madde miktarı açısından avantajlı bir yöntem olduğunu göstermiştir.



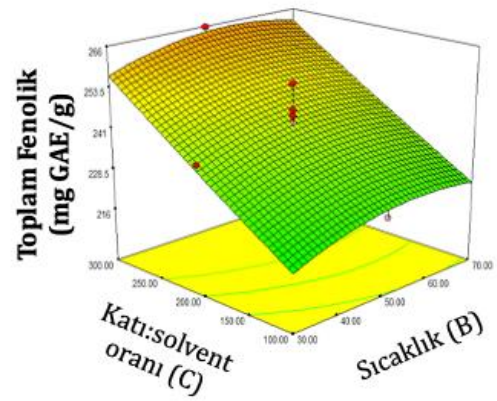
a



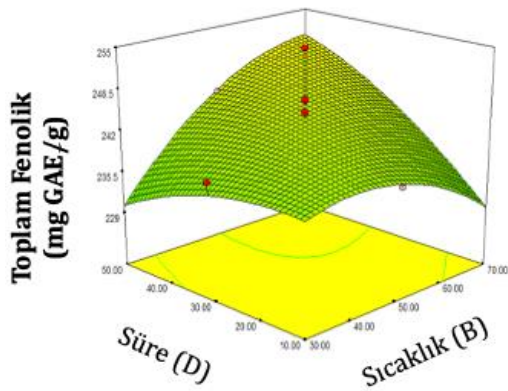
b



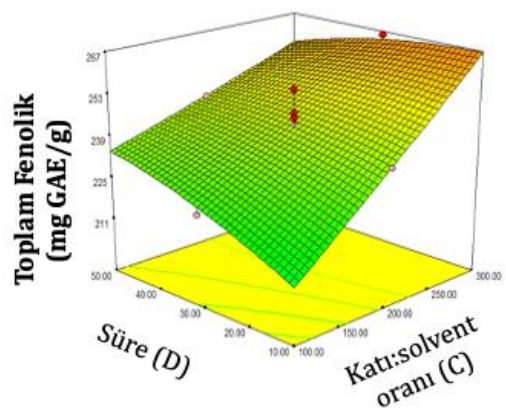
c



d



e



f

Şekil 3.2. Ekstraksiyon parametrelerinin TPC üzerine etkisi

**Tablo 3.4.** Propolis örneklerinin ekstraksiyon koşulları ile TPC, TFC, AOA ve balsam miktarları

Örnek No	Çözücü Derişimi (%)	Sıcaklık (°C)	Oran	Süre (Dk)	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg CE/g)	AOA (mmol TEAC/g)	Balsam (%)
1	50	30	1:300	10	220,67±4,12	180,11±12,48	0,70±0,05	53,72
2	75	50	1:300	30	265,83±4,16	218,58±24,29	1,59±0,33	66,11
3	50	70	1:300	10	227,03±3,98	174,03±2,31	0,79±0,03	59,82
4	75	50	1:200	30	246,91±2,67	225,28±7,98	1,32±0,06	70,31
5	100	30	1:300	10	271,20±6,33	230,15±14,93	1,61±0,17	73,22
6	75	70	1:200	30	239,95±11,79	216,38±6,59	1,22±0,09	69,63
7	50	70	1:100	10	147,22±7,19	51,57±3,95	0,44±0,19	34,48
8	100	30	1:300	50	260,91±9,92	235,26±18,00	1,64±0,05	65,50
9	100	70	1:100	50	239,55±2,61	220,95±1,32	1,73±0,03	73,28
10	75	50	1:100	30	222,82±2,91	211,99±2,97	1,26±0,04	66,04
11	75	50	1:200	30	254,86±9,69	220,27±14,94	1,22±0,24	64,49
12	50	30	1:100	10	180,25±7,25	171,42±2,98	0,14±0,04	41,36
13	75	50	1:200	50	244,58±5,59	228,41±2,38	1,23±0,07	66,04
14	75	50	1:200	10	237,84±6,27	227,11±6,02	1,27±0,02	63,81
15	50	70	1:300	50	198,45±16,48	194,17±11,96	0,62±0,11	61,18
16	50	30	1:300	50	195,29±7,31	130,14±19,92	1,04±0,34	45,62
17	75	30	1:200	30	238,52±7,25	232,97±1,76	1,38±0,05	66,41
18	75	50	1:200	30	241,75±11,80	207,59±14,52	1,60±0,05	58,81
19	75	50	1:200	30	245,01±15,78	210,29±14,19	1,32±0,07	63,13
20	50	70	1:100	50	214,75±3,36	60,63±1,19	0,64±0,02	53,25
21	100	70	1:300	50	284,92±9,71	255,17±22,13	1,46±0,06	76,35
22	50	50	1:200	30	201,36±3,29	153,96±9,61	0,59±0,12	50,36
23	100	70	1:100	10	219,74±7,35	224,99±8,09	1,62±0,04	79,47
24	100	70	1:300	10	260,16±4,46	241,03±10,82	1,53±0,03	71,99
25	75	50	1:200	30	236,97±4,40	228,06±2,34	1,41±0,07	68,10
26	50	30	1:100	50	181,35±5,53	56,92±4,31	0,26±0,22	45,36
27	100	30	1:100	10	211,76±8,33	202,36±4,84	1,19±0,16	65,83
28	100	50	1:200	30	251,76±5,57	231,10±3,96	1,31±0,16	70,11
29	75	50	1:200	30	242,77±2,61	223,61±9,12	1,56±0,11	64,04
30	100	30	1:100	50	215,47±8,84	190,94±3,79	1,52±0,18	64,86
C	75	50	1:200	24 h	231,53±2,48	240,13±4,39	1,50±0,04	58,87

1-30: ultrases destekli ekstraktlar, C: geleneksel ekstrakt, TPC: toplam fenolik konsantrasyonu, GAE: gallik asit eşdeğeri, TFC: toplam flavonoid konsantrasyonu, CE: Katesin eşdeğeri, AOA: Antioksidan aktivite, TEAC: trolox eşdeğer antioksidan kapasitesi

### 3.4. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Analiz Sonuçları

Çalışmamızın sonucunda ekstraksiyon parametrelerinin toplam flavonoid bileşen verimine etkisi Şekil 3.3. ve Tablo 3.4. sunulmuştur. 30 farklı propolis örneğinde toplam flavonoid madde miktarı %50 etanol, 1:100 katı solvent oranı, 70 °C'de 10 dakikalık ultrases

uygulamasıyla minimum düzeyde (51,57 mg CE/g) ekstrakte edilirken %100 etanol, 1:300 katı solvent oranında 70 °C'de, 50 dk ekstrakte edildiğinde maksimum değere (255,17 mg CE/g) ulaşılmıştır. Tablo 3.1. 'de sunulan ANOVA sonuçlarına göre propolisten biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunda en önemli parametre etanol konsantrasyonu ( $p < 0.0001$ ) ve katı solvent oranı ( $p < 0.0001$ ) olarak belirlenmiştir. Etanol konsantrasyonunun %40'dan %80'e artırılmasıyla TFC konsantrasyonu %97,83 artış göstermektedir. Katı solvent oranının 1:100'den 1:300'e artışı ile birlikte ise TFC %19,06 oranında artış göstermektedir. Elde edilen bu sonuçlar etanol konsantrasyonu ve katı solvent oranındaki artışla birlikte flavonoid madde miktarının da arttığını göstermektedir.

Sheng ve ark.'nın (2013), yaptıkları *Flos Populi*'den maserasyon yöntemiyle flavonoid ekstraksiyonunda katı solvent oranının 1:5' ten 1:15'e çıkarılmasıyla flavonoid veriminin büyük oranda arttığı bildirilmiştir. Başka bir çalışma olan Oroian ve ark. (2020b) yaptıkları modelleme çalışmasında propolis örneklerinde etanol konsantrasyonunun %40'dan %80'e artırılmasıyla ekstrakte edilen toplam flavonoid madde miktarının %175 oranında arttığını belirlemişlerdir. Jing ve ark. (2015) Alfalfa bitkisinden flavonoidlerin ultrasonik ekstraksiyonu üzerine yaptıkları çalışmada yaptığımız çalışmaya paralel olarak, etanol konsantrasyonunun %20'den %50'ye arttırılmasıyla TFC veriminin arttığını gözlemlemiş ve bunu ikili çözücü sisteminin mono çözücü sisteminden daha üstün olduğu sonucuyla ilişkilendirmişlerdir. Aynı şekilde katı solvent oranında 1:20'den 1:60'a arttırılmasıyla TFC veriminin arttığını tespit etmişlerdir. Ancak 1:60 katı solvent oranından sonra TFC veriminin düştüğü gözlemlenmiş ve bunun sebebi olarak flavonoidlerin çözülmesini engelleyecek safsızlıkların daha fazla miktarda çözüldüğü gösterilmiştir.

Araştırılan parametreler arasındaki interaksiyonlar (AC, BD) ekstraksiyon verimi üzerine etkili olmaktadır (Tablo 3.1.). Değişken interaksiyonlarının toplam flavonoid madde üzerine etkileri Şekil 3.3.'de sunulmuştur. Etanol konsantrasyonu (A) ve katı solvent oranı (C) propolisten toplam flavonoid madde ekstraksiyonu üzerine etkili olan interaksiyonlardır ( $p < 0.005$ ). Ekstraksiyon sıcaklığı (B) ve ekstraksiyon süresi (D) interaksiyonu da ekstraksiyon verimi üzerine etkili olmaktadır ( $p < 0.005$ ). Prasad ve ark. (2012) kahverengi mangodan flavonoid ekstraksiyonunun optimizasyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada katı solvent oranının 1:20'den 1:42'e yükseldiğinde ekstrakt veriminin %32,1'den %38,3'e yükseldiği görülmektedir ve bunun nedenini hücrelere daha fazla çözücünün girerek daha fazla miktardaki bileşiğin hücre içine nüfuz etmesi olarak belirtmişlerdir.

Yine aynı çalışmada %30-50 etanol konsantrasyonlarında daha düşük TFC verimi (10835-18115 µg QE /g) elde edilirken etanol konsantrasyonundaki %50-68'lik artış ile daha yüksek TFC verimi (25396 µg QE /g) elde edildiği görülmektedir.

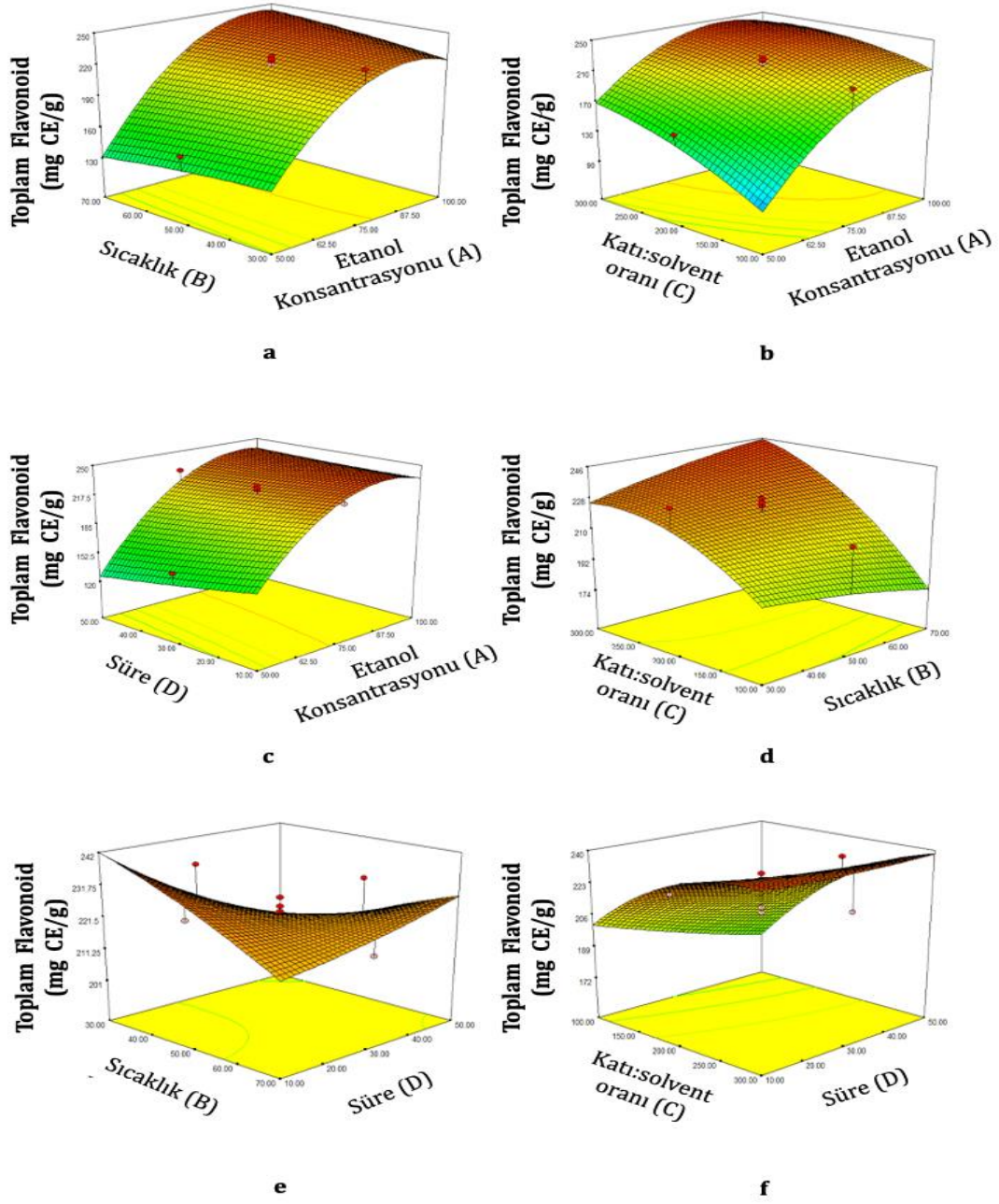
Yaptığımız çalışmanın sonuçları Andrade ve ark.'nın (2017) Brezilya kahverengi propolisinin biyoaktif bileşen içeriğinin değerlendirilmesine ilişkin yaptıkları çalışmayla karşılaştırıldığında çalışmamızda elde edilen sonuçların daha yüksek olduğu görülmektedir.

Andrade ve ark. (2017), kahverengi propolise 35 °C'de, %70'lik etanolde, 2:15 katı solvent oranında, 60 dk ultrasonik ekstraksiyon işlemi uygulayarak toplam flavonoid madde miktarını 30,89 mg QE/g bulmuşlardır. Çalışmamızda ise minimum toplam flavonoid madde miktarını (51,57 mg CE/g) elde ettiğimiz ekstraksiyon koşulları; 70 °C, %50'lik etanol, 1:100 katı solvent oranı ve 10 dk ultrasonik ekstraksiyon işlemi şeklindedir. Çalışmamızda diğer çalışmaya kıyasla 6 kat daha hızlı ekstraksiyon işlemi gerçekleşmiş olup daha az çözücü kullanarak daha verimli TFC elde edildiği görülmektedir. Maksimum olarak elde ettiğimiz toplam flavonoid madde miktarının (255,17 mg CE/g) ise Andrade ve ark.'nın (2017) yaptıkları çalışmadan elde edilen sonuçtan yaklaşık 8 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara benzer sonuçlar elde eden bir çalışma gerçekleştiren Gargouri ve ark. (2019), 1:15 katı solvent oranında, %80'lik etanolde 20 dk ultrasonik ekstraksiyon işlemine tabi tuttıkları propolisten toplam flavonoid madde miktarını 117 mg CE/100 olarak tespit etmişlerdir. Bouchelaghem ve ark. (2022), Macaristan'ın altı farklı bölgesinden toplanan propolis örneklerini 2:9 katı solvent oranında, %80'lik etanol kullanarak 70 °C'de 30 dk maserasyon işlemiyle yaptıkları çalışmada ise toplam flavonoid madde miktarını 33,8-273,2 mg CE/g olarak tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar çalışmamızdaki sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada geleneksel ekstraksiyon tekniğini kullanarak Tablo 3.4.'de gösterildiği üzere %75 etanol konsantrasyonunda, 50 °C'de, 1:200 katı solvent oranında, 1 gün süre ile gerçekleştirilen yöntemde toplam flavonoid madde miktarı 240,13±4,39 mg CE/g olarak tespit edilmiştir. %100 etanol konsantrasyonu, 1:300 katı solvent oranında, 70 °C'de 50 dk süre koşullarında ultrases destekli ekstraksiyonla maksimum verim elde ettiğimiz toplam flavonoid sonuçlarının (255,17±22,13 mg CE/g) geleneksel ekstraksiyondan daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar, propolisteki biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu için ultrasonik ekstraksiyon yönteminin geleneksel ekstraksiyon yöntemiyle kıyaslandığında toplam flavonoid madde miktarı açısından avantajlı bir yöntem olduğunu göstermiştir.





Şekil 3.3. Ekstraksiyon parametrelerinin TFC üzerine etkisi

### 3.5. ABTS Antioksidan Kapasitesi Analiz Sonuçları

Çalışmamızda incelenen ekstraksiyon parametrelerinin antioksidan kapasitesine etkisi Şekil 3.4. ve Tablo 3.4. sunulmuştur. Propolis örneklerinde antioksidan kapasitesi %50 etanol, 1:100 katı solvent oranı, 30 °C'de 10 dakikalık ultrases uygulamasıyla minimum düzeyde (0,14 mmol TEAC/g) ekstrakte edilirken, %100 etanol, 1:100 katı solvent oranında 70 °C'de, 50 dk

ekstrakte edildiğinde maksimum değere (1,73 mmol TEAC/g) ulaşılmıştır. Tablo 3.1.'de sunulan ANOVA sonuçlarına göre propolisten biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunda en önemli parametre etanol konsantrasyonu ( $p<0.0001$ ) olarak belirlenmiştir. Etanol konsantrasyonunun %40'dan %80'e artırılmasıyla antioksidan kapasitesi yaklaşık olarak 4,5 kat artış göstermektedir. Elde edilen bu sonuçlar etanol konsantrasyonundaki artışla birlikte antioksidan kapasitesinin de arttığını göstermektedir.

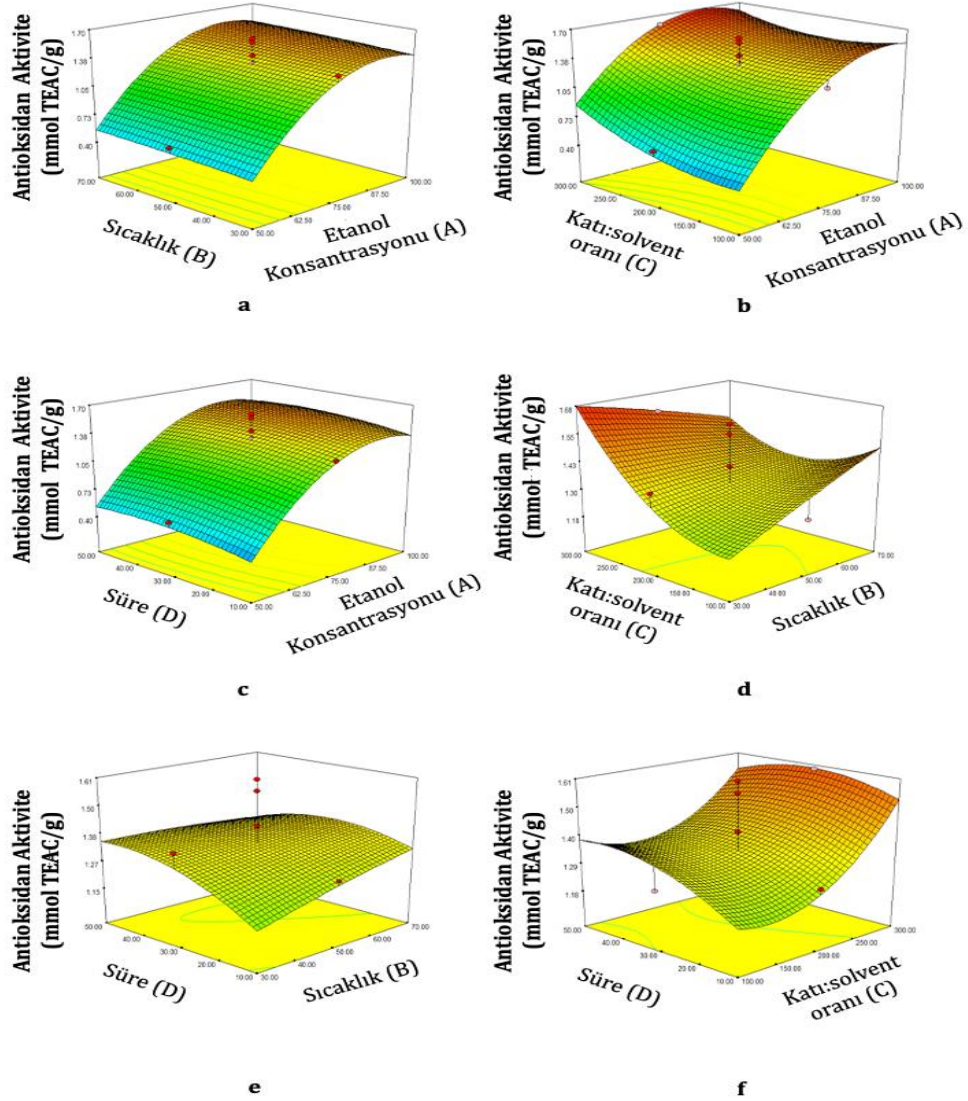
Aybastier ve ark., (2013) metanol konsantrasyonunu %50'e kadar artırdıklarında böğürtlen yapraklarından ultrasonik ekstraksiyonla antioksidan bileşiklerin veriminin arttığını tespit etmişlerdir. Gong ve ark., (2012) kadife çiçeğiyle yaptıkları çalışmada etanol konsantrasyonunda %60'ın üzerine çıkıldıkça sürenin de artmasıyla paralel olarak antioksidan aktivitenin arttığını ve daha sonrasında sabit bir seviyede kaldığını belirlemişlerdir. Yapılan bu çalışmalar çözücü konsantrasyonunun antioksidan veriminde etkili bir parametre olduğunu göstermektedir.

Andrade ve ark., (2017) yaptıkları çalışmada kahverengi propolisin ultrasonik ekstraktında ABTS yöntemiyle bakılan antioksidan aktivitesini ortalama olarak 1,86 mmol TEAC/g bulmuşlardır. Bulunan bu değerlerin çalışmamız sonucunda elde edilen değerlere oldukça yakın olduğu görülmektedir. Benzer sonuçlar elde edilen başka bir çalışma olan Cavalero ve ark., (2020) yaptıkları çalışmayla %99 etanol, 1:35 katı solvent, 20 dk ve 25 °C ultrasonik ekstraksiyon koşulları altında ekstrakte ettikleri propolisi biberiye ile biyoaktif bileşenler açısından karşılaştırmışlardır. ABTS yöntemiyle tespit edilen antioksidan aktiviteyi 1,34 mmol TEAC/g olarak tespit etmişlerdir. Aynı zamanda maksimum etanol konsantrasyonunda (%99 etanol) antioksidan veriminin en yüksek olduğunu bununda özütlenen ana bileşiklerin polar olmayan özelliklere sahip olmasından kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Gargouri ve ark. (2019), Tunus propolisini 1:15 katı solvent oranında, 20 dk, %80 etanol konsantrasyonunda ultrasonik ekstraksiyona tabi tutarak propolis ekstraktında antioksidan aktivite kapasitesini 0,11-0,25 mmol TEAC/g olarak tespit etmişlerdir. Bulunan bu sonuçlar bizim çalışmamızla karşılaştırıldığında elde ettikleri maksimum değerden (0,25 mmol TEAC/g) kendi çalışmamızda elde edilen değer (1,73 mmol TEAC/g) yaklaşık olarak 7 kat daha yüksek olduğu görülmektedir. Erdoğan ve ark., (2011) basınçlı sıvı ekstraksiyon yöntemiyle yaptıkları çalışmada propolis örneklerinin antioksidan aktivitesini 237,7-285,3 mg TEAC/g olarak tespit etmişlerdir. Bu değerlerden çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarımızın yaklaşık 2 kat daha fazla antioksidan verimi açısından üstün olduğu görülmektedir.

Yaptığımız çalışmada geleneksel ekstraksiyon tekniğini kullanarak Tablo 3.4.'de gösterildiği üzere %75 etanol konsantrasyonunda, 50 °C'de, 1:200 katı solvent oranında, 1 gün süre ile gerçekleştirilen yöntemde antioksidan kapasitesi  $1,50\pm 0,04$  mmol TEAC/g olarak tespit edilmiştir. %100 etanol konsantrasyonu, 1:100 katı solvent oranında, 70 °C'de 50 dk süre koşullarında ultrases destekli ekstraksiyonla maksimum verim elde ettiğimiz antioksidan kapasitesi sonuçlarının ( $1,73\pm 0,03$  mmol TEAC/g) geleneksel ekstraksiyondan daha yüksek

olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar, propolisteki biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu için ultrasonik ekstraksiyon yönteminin geleneksel ekstraksiyon yöntemiyle kıyaslandığında antioksidan kapasitesi açısından avantajlı bir yöntem olduğunu göstermiştir.



Şekil 3.4. Ekstraksiyon parametrelerinin AOA üzerine etkisi

### 3.6. Balsam Tayini Sonuçları

Yapılan çalışmamızın sonucunda ekstraksiyon parametrelerinin propolisin balsam verimine etkisi Şekil 3.5. ve Tablo 3.4. sunulmuştur. Analiz sonucunda 30 farklı propolis örneğinde

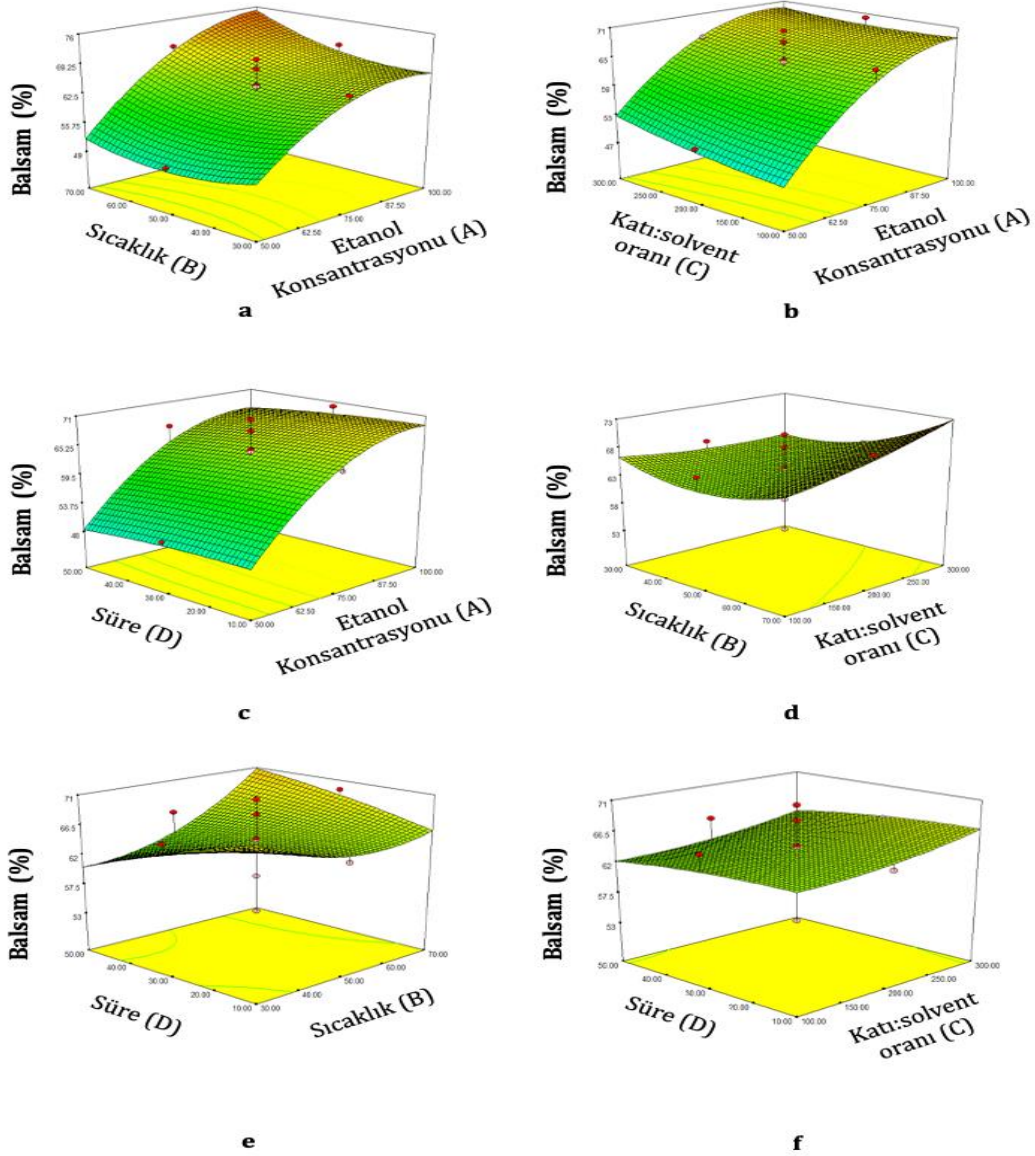
balsam verimi minimum %34,48 bulunurken maksimum %79,47 olarak tespit edilmiştir. Minimum balsam verimi (%34,48) bulunan örnek %50 etanol, 1:100 katı solvent oranı, 70 °C'de 10 dk ekstrakte edilirken maksimum balsam verimi (%79,47) tespit edilen örnek ise %100 etanol konsantrasyonu, 1:100 katı solvent oranında 70 °C'de, 10 dk ekstrakte edilmiştir. Tablo 3.1.'de sunulan ANOVA sonuçlarına göre propolisten biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunda ve balsam veriminde en önemli parametre etanol konsantrasyonu ( $p < 0.0001$ ) olarak belirlenmiştir. Etanol konsantrasyonunun %40'dan %80'e artırılmasıyla balsam verimi %52,13 artış göstermektedir. Elde edilen bu sonuçlar etanol konsantrasyonundaki artışla birlikte balsam veriminde arttığını göstermektedir.

Çözücüde (etanol) çözünen kısım şeklinde tanımlanan balsam değeri arttıkça propolis kalitesinin arttığı belirtilmektedir. Propoliste yüksek oranda balsam ve reçinenin varlığı daha az çözünmeyen madde ve daha az mum içeriğinin bir göstergesidir. Yaptığımız çalışma ile aynı metodu kullanarak balsam verimi elde eden Oroian ve ark., (2020b) yaptıkları çalışmada etanol konsantrasyonunu %40'tan %80'e çıkarttıklarında balsam içeriğinin %150 arttığını tespit etmişlerdir. Modifiye edilmiş ekstraksiyon koşulları altında balsam verimini %1,95 bulmuşlardır, buda bizim çalışmamızda elde ettiğimiz maksimum değerden yaklaşık 40 kat daha düşük bir değerdir. Keskin (2019), yaptığı çalışmada balsam miktarı tayinini etil alkol ekstraksiyon yöntemine göre yaparak sulu ve etanolik propolis ekstraktlarının % balsam değerinin %0,1-95 arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Çözücü olarak su kullanılan ekstraktlarla çözücü olarak etanol kullanılan ekstraktlardaki balsam miktarı arasındaki farkın yüksekliği çözücüye göre balsam miktarının değiştiğini göstermektedir. Benzer bir çalışma olarak Popova ve ark. (2013), Rusya menşeli propoliste balsam verimini %52,3-66 olarak tespit etmişlerdir. Maksimum olarak elde ettikleri balsam veriminden (%66) bizim çalışmamızda elde ettiğimiz maksimum balsam verimi (%79,47) yaklaşık olarak 1,2 kat daha yüksek çıkmıştır.

Esrache ve Borrás'ın (2018) yaptıkları çalışma ile Bonvehí ve Gutiérrez'in (2011) yaptıkları çalışma benzer olup elde edilen sonuçlar anlamında da benzerlik taşımaktadır. Esrache ve Borrás (2018) çalıştıkları propoliste 48,3-76,9 g/100 balsam verimi elde ederken Bonvehí ve Gutiérrez (2011) 52,5-76,2 g/100 g balsam verimi elde etmiştir. Aynı propolis örneğinde çalışılarak farklı balsam verimlerinin elde edilmesinin ana nedeni olarak propolisin farklı kovanlardan toplanmış olabilmesi, içerisinde ihtiva ettiği böcek kalıntıları ve kazıma işlemi esnasında kovandan gelebilecek ahşap parçaları, balmumu gibi safsızlıklar gösterilmektedir.

Yaptığımız çalışmada geleneksel ekstraksiyon tekniğini kullanarak Tablo 3.4.'de gösterildiği üzere %75 etanol konsantrasyonunda, 50 °C'de, 1:200 katı solvent oranında, 1 gün süre ile gerçekleştirilen yöntemde balsam verimi  $58,87 \pm 0,12$  olarak tespit edilmiştir. Optimum koşullarda ultrases destekli ekstraksiyonla elde ettiğimiz balsam verimi sonuçlarının ( $71,99 \pm 6,31$ ) geleneksel ekstraksiyondan daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar, propolisteki biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu için ultrasonik ekstraksiyon yönteminin

geleneksel ekstraksiyon yöntemiyle kıyaslandığında etanolde çözünen madde miktarı şeklinde ifade edilen balsam verimi açısından avantajlı bir yöntem olduğunu göstermiştir.



**Şekil 3.5.** Ekstraksiyon parametrelerinin balsam verimi üzerine etkisi

### 3.7. Fenolik Dağılım Sonuçları (LC-MS/MS)

LC-MS/MS cihazı ile analizi gerçekleştirilen geleneksel ve ultrasonik ekstraktların her ikisinde de Tablo 3.5.'de gösterildiği üzere başat fenolik asit ferulik asit olarak tespit edilmiştir.

Ultrasonik ekstrakta sırasıyla kafeik asit, p-kumarik asit, syringic asit, protekatekuik aldehit, vannilin, kuersetin, taxifolin, protekatekuik asit, rutin, epikateşin, salisilik asit ve kateşin olmak üzere 13 adet flavonoid ve fenolik asit belirlenmiştir. Çalışmamızda olduğu gibi Sağdıç ve ark., (2020) inceledikleri örneklerin çoğunda hâkim fenolik olarak kafeik asit ve p-kumarik asiti belirlemişlerdir. Ultrasonik ekstraktla gerçekleştirilen analiz sonucunda 4-OH-benzoik asit, rozmarinik asit, ellagic asit, kaempferol, apigenin ve flavon tespit edilememiştir. Geleneksel ekstraktla yapılan analiz sonucunda ferulik asit başta olmak üzere sırasıyla kafeik asit, p-kumarik asit, syringic asit, protekatekuik aldehit, vannilin, kuersetin, protekatekuik asit, taxifolin, rutin, salisilik asit ve kateşin olmak üzere 12 adet flavonoid ve fenolik asit belirlenmiştir. Ultrasonik ekstrakta epikateşin tespit edilebilirken geleneksel ekstraksiyonda epikateşin tespit edilememiştir. 4-OH-benzoik asit, rozmarinik asit, ellagic asit, kaempferol, apigenin ve flavonda geleneksel ekstrakta tespit edilemeyen diğer flavonoid türleridir.

**Tablo 3.5.** Örneklerdeki fenolik sonuçları

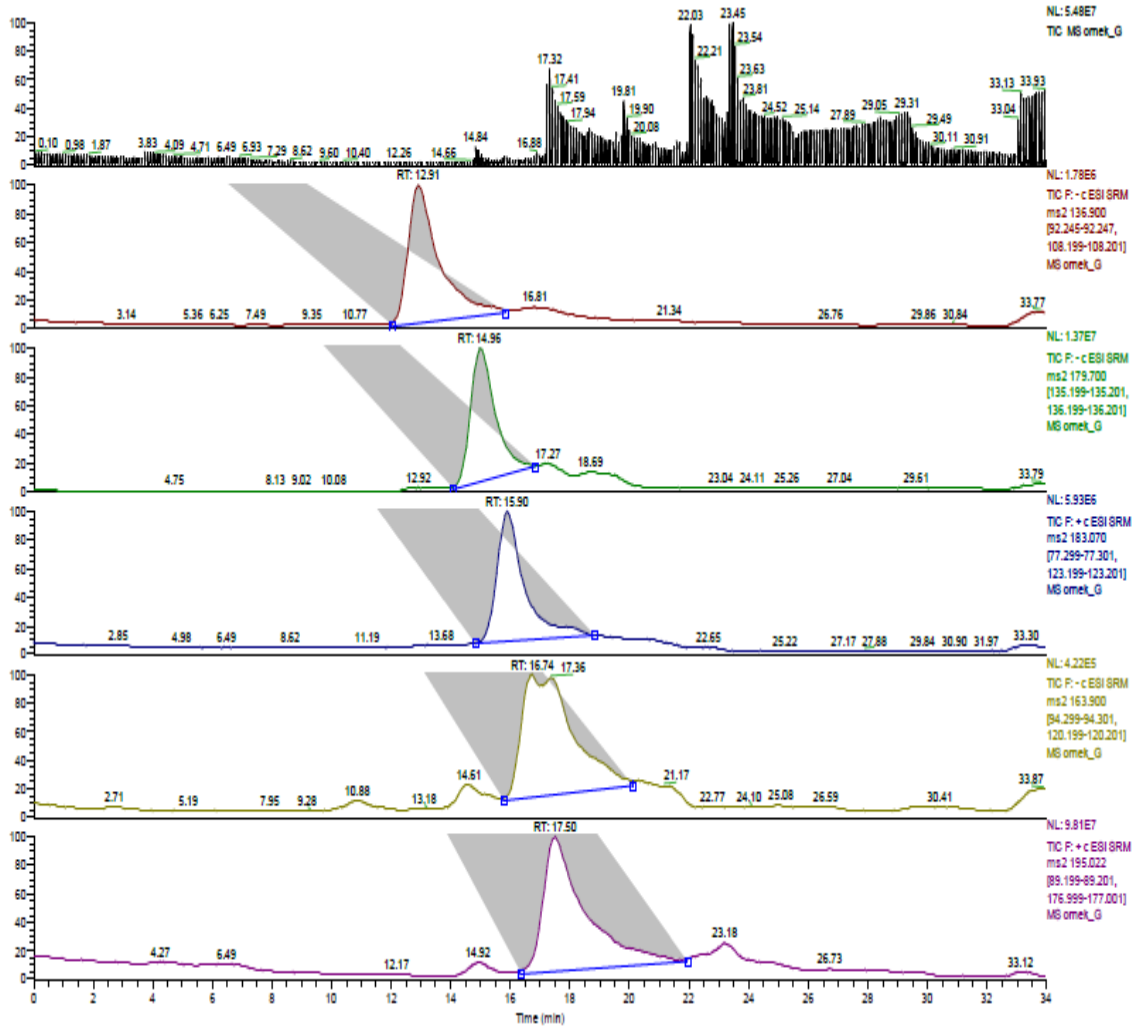
<b>Fenolik Bileşen</b>	<b>Geleneksel Ekstrakt (mg/g propolis)</b>	<b>Ultrasonik Ekstrakt (mg/g propolis)</b>
Protekatekuik Asit	0,0576	0,0510
Protekatekuik Aldehit	0,7045	0,7351
Kateşin	0,0004	0,0003
Epikateşin	TE	0,0008
Kafeik Asit	3,3401	3,7324
Syringic Asit	2,1170	2,2426
Vannilin	0,1662	0,1577
Taxifolin	0,0514	0,0551
p-Kumarik Asit	2,6288	2,9516
Ferulik Asit	5,3123	6,5522
4-OH- Benzoik Asit	TE	TE
Salisilik Asit	0,0006	0,0007
Rozmarinik Asit	TE	TE
Rutin	0,0027	0,0032
Ellagic Asit	TE	TE
Kuersetin	0,1488	0,1442
Kaempferol	TE	TE
Apigenin	TE	TE
Flavone	TE	TE

TE: tespit edilemedi

Ultrasonik ekstrakta tespit edilen protekatekuik aldehit, kafeik asit, syringic asit, p-kumarik asit ve ferulik asitin LC-MS/MS kromatogramı sırasıyla Şekil 3.7.'da gösterilmektedir. Hâkim



fenolik asit olan ferulik asit geleneksel ekstrakta kıyasla ultrasonik ekstrakta %23,32 oranında daha yüksek tespit edilmiştir. Aynı zamanda geleneksel ekstrakta tespit edilen protekatekuik aldehit, kafeik asit, sryngic asit, p-kumarik asit ve ferulik asitin LC-MS/MS kromatogramı sırasıyla Şekil 3.6.'da gösterilmektedir. Ultrasonik ekstrakta; protekatekuik aldehit (%4,32), kafeik asit (%11,72), syringic asit (%5,91), taxifolin (%7,19), p-kumarik asit (%12,26), salisilik asit (%9,68) ve rutin (%17,78) geleneksel ekstrakta tespit edilenden daha fazla miktarda tespit edilmiştir.



**Şekil 3.6.** Geleneksel ekstrakt örneği içerisinde yer alan protekatekuik aldehit, kafeik asit, sryngic asit, p-kumarik asit ve ferulik asitin LC-MS/MS kromatogramı

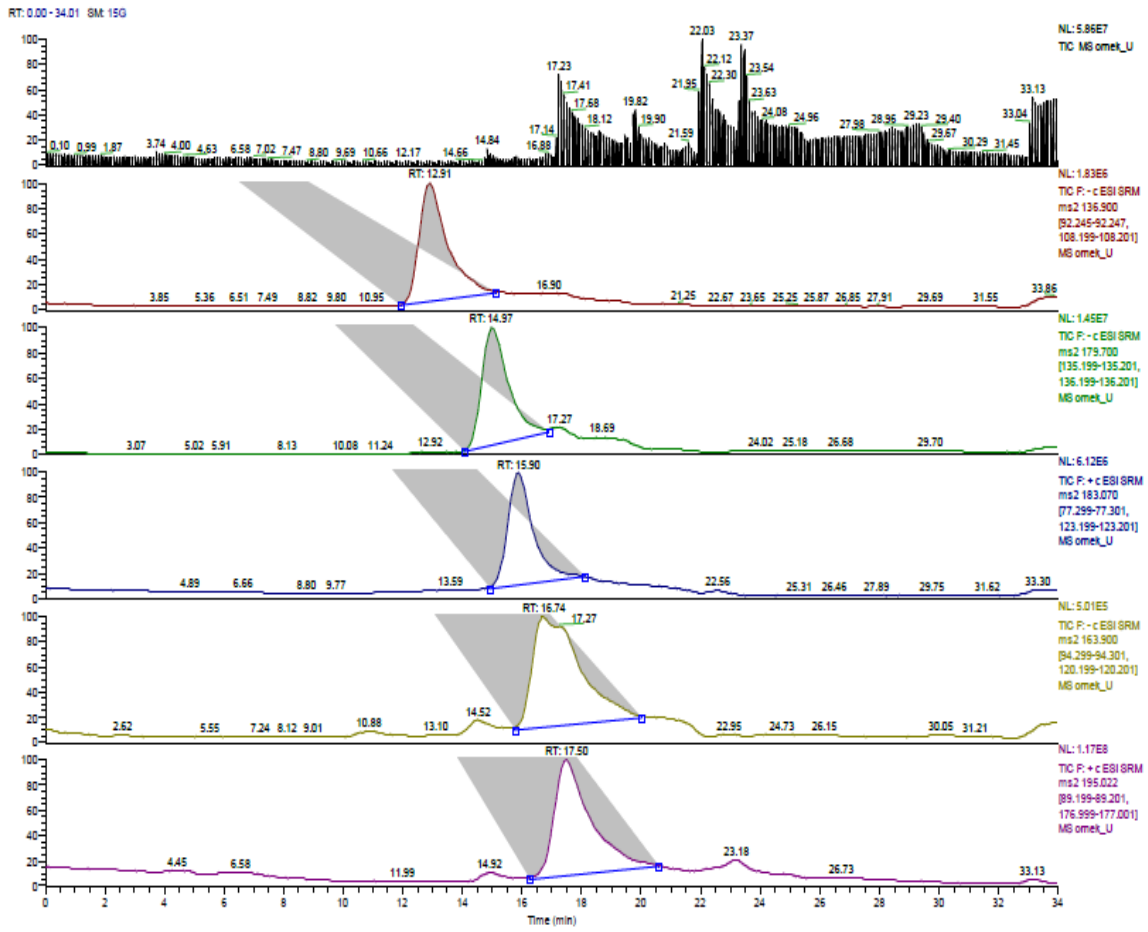
Hu ve ark. 2022 kavak kaynaklı propolisle yaptıkları çalışmada temmuz ayında toplanan propoliste maksimum ferulik asit (0,37 mg/g) tespit ederken, ocak ayında topladıkları propoliste ise minimum ferulik asit (0,11 mg/g) tespit etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada tespit

edilen ferulik asit miktarı (6,5522 mg/g propolis) ise Hu ve ark.'nın yaptıkları çalışmada belirlenen maksimum ferulik asit miktarının yaklaşık olarak 17 katı olarak tespit edilmiştir. Pellati ve ark. 2013 İtalya'da bahar ayında toplanan propolisle yaptıkları çalışmada çalışmamızda da belirtildiği gibi hâkim fenolik asit olarak ferulik asit, p-kumarik asit ve kafeik asiti bulmuşlardır ve ferulik asit miktarını 2,3-8,7 mg/g olarak tespit etmişlerdir. 9 farklı propolis örneğiyle çalışılmış ve 7 propolis örneğinde çalışmamızdan daha düşük sonuç elde edildiği görülmüştür. Rajan ve ark. 2021 Brezilya propolisiyle 50°C'de yaptıkları çalışmada 1,37-1,74 mg/g ferulik asit tespit etmişlerdir ve bu çalışmamızda elde ettiğimiz sonucun 3,7 kat daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Hu ve ark.'nın yaptıkları çalışmada kafeik asit miktarı 0,33-1,73 mg/g olarak belirlenirken, çalışmamızda ultrases destekli ekstrakta kafeik asit miktarı 3,7324 mg/g propolis olarak tespit edilmiştir. Bu değer Hu ve ark.'nın yaptıkları çalışmada elde edilen değer yaklaşık olarak 2 katı şeklindedir. Rajan ve ark. 2021 kahverengi propolisle yaptıkları çalışmada 0,12 mg/g kafeik asit tespit etmişlerdir ve bu değer yaklaşık olarak bizim sonucumuzdan 31 kat daha düşüktür. Hu ve ark. 2022 yaptıkları çalışmada fenolik asitlerden olan p-kumarik asit miktarını 0,29-1 mg/g olarak tespit ederken yaptığımız çalışmada p-kumarik asit miktarı 2,9516 mg/g propolis olarak belirlenmiştir. Buda yapılan çalışmayla Hu ve ark.'nın yaptıkları çalışmada elde edilen sonuçtan yaklaşık olarak 3 kat daha yüksek sonuç eldesi sağlandığının bir göstergesidir.

Oroian ve ark. (2020b) yaptıkları çalışmada propolisin optimum koşullar altında ekstraksiyonunda kafeik asidi 0,41 mg/g olarak bulurken yaptığımız çalışmada kafeik asit 3,7324 mg/g propolis olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada p-kumarik asit tespit edilemezken rozmarinik asit (8,44 mg/g) ve kaempferol (228,8 mg/g) tespit edilmiştir ve çalışmamızda ise rozmarinik asit ve kaempferol tespit edilemezken 2,9516 mg/g propolis p-kumarik asit tespit edilmiştir. Pellati ve ark. 2013 yaptıkları çalışmada kafeik asit miktarını 3,4 mg/g ve p-kumarik asit miktarını 9,6 mg/g tespit ederken yaptığımız çalışmada ise kafeik asit miktarı 3,7324 mg/g propolis p-kumarik asit miktarı ise 2,9516 mg/g propolis olarak tespit edilmiştir.





**Şekil 3.7.** Ultrasonik ekstrakt örneği içerisinde yer alan protekatekuik aldehit, kafeik asit, sryngic asit, p-kumarik asit ve ferulik asitin LC-MS/MS kromatogramı

Gargouri ve ark. (2019), Tunus propolisiyle yaptıkları çalışmada sırasıyla ferulik asit miktarı 0,103 mg/g propolis, kafeik asit miktarı 0,178 mg/g propolis ve p-kumarik asit miktarı 0,105 mg/g propolis olarak tespit edilirken yaptığımız çalışmada sırasıyla ferulik asit 6,5522 mg/g propolis, kafeik asit 3,7324 mg/g propolis ve p-kumarik asitte 2,9516 mg/g propolis olarak tespit edilmiştir. Gallik asit, rozmanirik asit, kaempferol ve apigenin yaptığımız çalışmada tespit edilemezken Gargouri ve ark.'nın yaptıkları çalışmada tespit edilmiştir. Aynı şekilde çalışmamızda kateşin tespit edilirken onların yaptıkları çalışmada kateşin tespit edilememiştir. Erdoğan ve ark.'nın 2011 Anadolu propolisiyle yaptıkları çalışmada kafeik asit miktarını 466,8 mg/kg ve p-kumarik asit miktarını 17,14 mg/kg tespit etmişler. Yaptığımız çalışmada ise kafeik asit miktarı bu çalışmanın yaklaşık olarak 8 katı ve p-kumarik asit miktarı ise bu çalışmanın yaklaşık olarak 172 katı bulunmuştur.

Taranan literatür sonuçları mg/g, mg/g propolis, mg/mL, mg/100 g propolis, mg/kg, mg/g ekstrakt, mg/g balsam vb. birçok farklı birimle verildiğinden dolayı propolisin sonuçlarını

karşılaştırıp kıyaslamak çok güç bir hale gelmektedir. Bu anlamda propolisin standardizasyonu oldukça zorlaşmaktadır. Bunun dışında propolisin biyoaktif bileşen içeriği kovanın bulunduğu bölgede hakim olan bitki örtüsüne, mevsime ve iklim koşullarına, toplanma zamanı ve şekline benzer birçok faktöre göre değişmektedir. Bu sebeple elde edilen tüm sonuçların birbirinden farklı olması oldukça normal kabul edilmektedir. Her çalışmada farklı renk, farklı ay ve farklı coğrafi özelliklerden propolisler kullanılması sonuçlardaki bu dalgalanmanın ana nedeni olarak gösterilebilmektedir.



## SONUÇ VE ÖNERİLER

Ham haliyle tüketilemeyen bir ürün olan propolisten yüksek fayda sağlanabilmesi amacıyla ekstraksiyon işleminin gerçekleştirilmesi gereklidir. Bugüne kadar kullanılmış olan geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinin zaman ve fazla miktarda çözücü gerektirdiği bilinmektedir. Bu sebeple günümüzde yeşil ekstraksiyon teknikleri giderek popülerlik kazanmaktadır. Daha az çözücü ile daha kısa sürelerde ekstraksiyon işlemini gerçekleştirme kolaylığı sağlayan yeşil tekniklerden birisi olan ultrases destekli ekstraksiyon sistemi, tez çalışmamızda kullanılmış olup, bu ekstraksiyon tekniğini etkileyebilecek olan sıcaklık, çözücü konsantrasyonu, katı solvent oranı ve süre gibi parametrelerin ekstraksiyon verimi üzerine etkisini incelemekte çalışmamızın amaçlarından biri olmuştur.

Biyoaktif bileşenlerin ultrases destekli ekstraksiyonunda, uygulanan parametrelerin verim üzerine etkileri tepki yüzey yanıt yöntemi ile dört değişkenli ve ikinci dereceden merkezi karma tasarım sistemine göre merkez noktada 6 tekrar denemenin bulunduğu 30 adet deney yapılarak belirlenmiştir. İkinci dereceden polinom denklemine göre ultrases destekli ekstraksiyon sonucunda %90 etanol konsantrasyonunda, 51°C'de, 32 dakika süreyle 1:300 katı solvent oranında gerçekleştirilen ekstraksiyonun maksimum verim eldesi için optimum koşul olduğu belirlenmiştir. Belirlenen bu optimum ekstraksiyon koşulları altında toplam fenolik madde miktarı 252,74±5,77 mg GAE/g, toplam flavonoid madde miktarı 222,32±1,27 mg CE/g, antioksidan aktivitesi 1,43±0,004 mmol TEAC/g ve balsam verimi ise %71,99±6,31 olarak tespit edilmiştir. Ekstraksiyon parametrelerinin etkinliğe etkisi kıyaslandığında toplam fenolik bileşen ve toplam flavonoid içeriğin etkin bir şekilde ekstraksiyonunun sağlanabilmesi için solvent konsantrasyonu ve katı solvent oranının önemli derecede etkili olduğu belirlenmiştir. Antioksidan aktivite ve balsam verimi için ise solvent konsantrasyonunun en önemli parametre olduğu belirlenmiştir (p<0.0001).

Çalışmamızın bir diğer amacı ise propolisin geleneksel ekstraksiyonu ve ultrasonik ekstraksiyonu ile elde edilme parametrelerinin karşılaştırılmasıdır. Bu amaçla, %75 etanol konsantrasyonunda, 50 °C'de, 1:200 katı solvent oranında, 1 gün süre ile gerçekleştirilen geleneksel ekstraksiyon yönteminde ise toplam fenolik madde miktarı 231,48±2,48 mg GAE/g, toplam flavonoid madde miktarı 240,13±4,39 mg CE/g, antioksidan aktivitesi 1,50±0,04 mmol TEAC/g ve balsam verimi ise %58,87 olarak belirlenmiştir. Çalışma sonuçları propolisteki biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu için ultrases destekli ekstraksiyon yönteminin geleneksel ekstraksiyon yöntemiyle kıyaslandığında toplam fenolik madde, balsam verimi, ekstraksiyon etkinliği ve süre açısından daha avantajlı bir ekstraksiyon yöntemi olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızın bir diğer amacı ise ülkemiz kahverengi propolisinin fenolik dağılımının belirlenmesidir. Bu amaçla optimum koşullarda ultrases yardımıyla gerçekleştirilen propolis ekstraktlarında ve geleneksel yolla elde edilen propolis ekstraktlarında LC-MS/MS ile fenolik dağılımları belirlenmiştir. Optimum koşullar altında propoliste ferulik asit (6,5522 mg/g propolis), kafeik asit (3,7324 mg/g propolis), p-kumarik asit (2,9516 mg/g propolis), syringic asit (2,2426 mg/g propolis), protekatekuik aldehit (0,7351 mg/g propolis), vannilin (0,1577 mg/g propolis), kuersetin (0,1442 mg/g propolis) tespit edilen fenolik bileşenler arasında yer almaktadır. Aynı zamanda geleneksel ekstraksiyon koşulları altında propoliste ferulik asit (5,3123 mg/g propolis), kafeik asit (3,3401 mg/g propolis), p-kumarik asit (2,6288 mg/g propolis), syringic asit (2,1170 mg/g propolis), protekatekuik aldehit (0,7045 mg/g propolis), vannilin (0,1662 mg/g propolis), kuersetin (0,1488 mg/g propolis) gibi fenoliklerde tespit edilmiştir.

Tez çalışmasında ulaşılan tüm bu sonuçlar doğrultusunda faydalı bir ürün olan ham propolisin kovanlarda üretiminin artırılması için arıcılık eğitimlerinin sıklaştırılması gerekmektedir. Çağımız problemleri haline gelen çevre kirliliği ve fazla tüketim gibi sorunlar için kimyasal kullanımının minimize edildiği, enerji tasarrufu sağlayan yeşil tekniklerden olan ultrases destekli ekstraksiyon ile gerçekleştirilen çalışmamızın kaynakların verimli kullanılması ve sürdürülebilirliğin sağlanması açısından önem taşıdığı düşünülmektedir. Propolisin ultrases destekli ekstraksiyonunun ve içerdiği biyoaktif bileşen içeriğinin belli bir standarda uygun olabilmesi açısından yapılan çalışmaların sıklaştırılıp iyileştirilmesi gerekmektedir. Maksimum verim eldesi için optimum koşul olarak belirlenen %90 etanol konsantrasyonu, 51°C sıcaklık, 32 dakika süre ve 1:300 katı solvent oranında ekstraksiyon işlemi yapılacak olan bu çalışmalara öncü ve yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Bilimsel anlamda propolisin ultrases destekli ekstraksiyonunda özellikle farklı solventlerle ekstraksiyonunun gerçekleştirildiği ve en iyi propolis çözücü kombinasyonunun net bir şekilde görülmesine katkı sağlayabilecek yeni çalışmaların yapılması ve desteklenmesi önerilmektedir.

## KAYNAKÇA

- Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Munro, H. L., Rasheed, R. K. ve Tambyrajah, V. (2001). Preparation of Novel, Moisture Stable, Lewis Acidic Ionic Liquids Containing Quaternary Ammonium Salts with Functional Side Chains. *Electronic Supplementary Information (ESI) Available: Plot of Conductivity vs. Temperature for the Ionic Liquid Formed from Zinc Chloride and Choline Chloride (2: 1)*. *Chemical Communications*, (19), 2010-2011.
- Aboulghazi, A., Bakour, M., Fadil, M. ve Lyoussi, B. (2022). Simultaneous Optimization of Extraction Yield, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Moroccan Propolis Extracts: Improvement of Ultrasound-Assisted Technique Using Response Surface Methodology. *Processes*, 10(2), 297.
- Acun, S. ve Gül, H. (2021). Mikroenkapsüle Çam Propolisinin Top Kek Üretiminde Kullanılması. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11(2), 1205-1217.
- Ahn, M. R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F. ve Nakayama, T. (2007). Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of China. *Food Chemistry*, 101, 1383-1392.
- Ahuja, A. ve Ahuja, V. (2010). Apitherapy a Sweet Approach to Dental Diseases Part I: Honey. *Journal of Advanced Dental Research I*, 1(1), 81-86.
- Aliyazıcıoğlu, R., Şahin, H., Ertürk, O., Ulusoy, E. ve Kolaylı, S. (2013). Properties of Phenolic Composition and Biological Activity of Propolis from Turkey. *International Journal of Food Properties*, 16, 277-287.
- Al-Juhaimi, F. Y., Özcan, M. M., Ahmed, I. A. M., Alsawmahia, O. N., Özcan, M. M., Ghafoor, K. ve Babiker, E. E. (2021). Bioactive Compounds, Antioxidant Activity, Fatty Acid Composition, and Antimicrobial Activity of Propolis from Different Locations in Turkey. *Journal of Apicultural Research*, 1-9.
- Andrade, J. K. S., Denadai, M., de Oliveira, C. S., Nunes, M. L. ve Narain, N. (2017). Evaluation of Bioactive Compounds Potential and Antioxidant Activity of Brown, Green and Red Propolis from Brazilian Northeast Region. *Food Research International*, 101, 129-138.
- Arentz, S., Hunter, J., Khamba, B., Mravunac, M., Lee, Z., Alexander, K., Lauche, R., Goldenberg, J. ve Myers, S. P. (2021). Honeybee Products for the Treatment and Recovery from Viral Respiratory Infections Including SARS-COV-2: A Rapid Systematic. *Integrative Medicine Research*, 100779.
- Arts, M. J. T. J., Haenen, G. R. M. M., Voss, H. P. ve Bast, A. (2001). Masking of Antioxidant Capacity by the Interaction of Flavonoids with Protein. *Food and Chemical Toxicology*, 39(8), 787-791.
- Aybastier, Ö., Işık, E., Şahin, S. C. ve Demir, C. (2013). Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Antioxidant Compounds from Blackberry Leaves Using Response Surface Methodology. *Industrial Crops and Products*, 44, 558-565.
- Aydın, Y. ve Tekeoğlu, İ. (2018). Tamamlayıcı Tıp ve Güncel Apiterapi Uygulamaları. *Journal Of Biotechnology and Strategic Health Research*, 2(2), 64-73.

- Azahar, N. F., Gani, S. S. A. ve Mohd Mokhtar, N. F. (2017). Optimization of Phenolics and Flavonoids Extraction Conditions of Curcuma Zedoaria Leaves Using Response Surface Methodology. *Chemistry Central Journal*, 11(1), 1-10.
- Bakkaloglu, Z., Arici, M. ve Karasu, S. (2021). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Turkish Propolis and Characterization of Phenolic Profile, Antioxidant and Antimicrobial Activity. *Food Science and Technology*, 41, 687-695.
- Bankova, V. (2005). Chemical Diversity of Propolis and the Problem of Standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 114-117.
- Bayatbalay, G., Karpuz, E. ve Palabıyık, İ. (2021). Propolis Püskürtülmüş Ambalaj Filmlerin Antibakteriyel Aktiviteleri. *Akademik Gıda*, 19(1), 21-27.
- Bianchi, E. M. (1995). The Preparation of the Tincture, the Soft Extract, the Ointment, the Soap and Other Propolis Based Products. *Apiacta*, 2, 121-127.
- Bonvehı, J. S. ve Gutiérrez, A. L. (2011). Antioxidant Activity and Total Phenolics of Propolis from the Basque Country (Northeastern Spain). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(9), 1387-1395.
- Bouchelaghem, S., Das, S., Naorem, R. S., Czuni, L., Papp, G. ve Kocsis, M. (2022). Evaluation of Total Phenolic and Flavonoid Contents, Antibacterial and Antibiofilm Activities of Hungarian Propolis Ethanolic Extract against Staphylococcus aureus. *Molecules*, 27(2), 574.
- Bozkuş, T. N., Değer, O. ve Yaşar, A. (2021). Chemical Characterization of Water and Ethanolic Extracts of Turkish Propolis by HPLC-DAD and GC-MS. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 44(1-2), 77-86.
- Brown, R. (1989). Hive Products: Pollen, Propolis and Royal Jelly. *Bee World*, 70, 109-117.
- Büyüktuncel, E. (2012). Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri I. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, (2), 209-242.
- Can, Z., Yıldız, O., Şahin, H., Asadov, A. ve Kolaylı, S. (2015). Phenolic Profile and Antioxidant Potential of Propolis from Azerbaijan. *Mellifera*, 15(1), 16-28.
- Castaldo, S. ve Capasso, F. (2002). Propolis, an Old Remedy Used in Modern Medicine. *Fitoterapia*, 73, S1-S6.
- Cavalaro, R. I., da Cruz, R. G., Dupont, S., de Moura, J. M. L. N., ve de Souza Vieira, T. M. F. (2019). In Vitro and in Vivo Antioxidant Properties of Bioactive Compounds from Green Propolis Obtained by Ultrasound Assisted Extraction. *Food Chemistry: X*, 4, 100054.
- Cavalaro, R. I., Fabricio, L. F. D. F. ve Vieira, T. M. F. D. S. (2020). Ultrasound Assisted Extraction of Antioxidants from Baccharis Dracunculifolia and Green Propolis. *Processes*, 8(12), 1530.
- Cavuldak, Ö. A., Vural, N. ve Anlı, R. E. (2016). Bitki Kaynaklı Fenolik Bileşiklerin Ultrasonik Dalga Destekli Ekstraksiyonu. *Gıda*, 41(1), 53-61.

- Cedeno-Pinos, C., Marcucci, M. C. ve Bañón, S. (2021). Contribution of Green Propolis to the Antioxidant, Physical, and Sensory Properties of Fruity Jelly Candies Made with Sugars or Fructans. *Foods*, *10*(11), 2586.
- Cunha, G. F., Soares, J. C., Sousa, T. L. ve Buranelo, M. (2020). Cassava Starch Based Films Supplemented with Propolis Extract: Physical, Chemical and Microstructure Characterization. *Biointerface Research In Applied Chemistry*, *11*(4), 12149-12158.
- Cunha, S. C. ve Fernandes, J. O. (2018). Extraction Techniques With Deep Eutectic Solvents. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *105*, 225-239.
- De Moraes, D. V., Rosalen, P. L., Ikegaki, M., De Souza Silva, A. P., Massarioli, A. P. ve Alencar, S. M. D. (2021). Active Antioxidant Phenolics from Brazilian Red Propolis: An Optimization Study for Their Recovery and Identification by LC-ESI-QTOF-MS/MS. *Antioxidants*, *10*(2), 297.
- Deblock-Bostyn, G. (1982). L'Abeille et Ses Produits. *Bull Soc Pharm Lille*, *38*, 181- 203.
- Dezmirean, D. S., Marghitaş, L. A., Chirila, F., Copaciu, F., Simonca, V., Bobiş, O. ve Erler, S. (2017). Influence of Geographic Origin, Plant Source and Polyphenolic Substances on Antimicrobial Properties of Propolis Against Human and Honey Bee Pathogens. *Journal of Apicultural Research*, *56*(5), 588–597.
- Doğan, N. ve Hayoğlu, İ. (2012). Propolis ve Kullanım Alanları. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, *16*(3), 39-48.
- Dos Santos, C. M., de Souza Mesquita, L. M., Braga, A. R. C. ve de Rosso, V. V. (2021). Red Propolis as a Source of Antimicrobial Phytochemicals: Extraction Using High-Performance Alternative Solvents. *Frontiers in Microbiology*, 1166.
- Erdem, G.B. (2002). Propolisin Diş Çürüklüğü Oluşumuna Etkisinin Sıçan Dişlerinde Araştırılması. *Teknik Arıcılık*, *77*, 27-28.
- Erdoğan, S., Ateş, B., Durmaz, G., Yılmaz, I. ve Seekin, T. (2011). Pressurized Liquid Extraction of Phenolic Compounds from Anatolia Propolis and Their Radical Scavenging Capacities. *Food and Chemical Toxicology*, *49*(7), 1592-1597.
- Escriche, I. ve Borrás, M. J. (2018). Standardizing the Analysis of Phenolic Profile in Propolis. *Food Research International*, *106*, 834-841.
- Gargouri, W., Osés, S. M., Fernández-Muiño, M. A., Sancho, M. T. ve Kechaou, N. (2019). Evaluation of Bioactive Compounds and Biological Activities of Tunisian Propolis. *Lwt*, *111*, 328-336.
- Ghisalberti, E.L. (1979). Propolis: A Review. *Bee World*, *60*, 59–84.
- Gong, Y., Hou, Z., Gao, Y., Xue, Y., Liu, X. ve Liu, G. (2012). Optimization of Extraction Parameters of Bioactive Components from Defatted Marigold (*Tagetes Erecta* L.) Residue Using Response Surface Methodology. *Food and Bioproducts Processing*, *90*(1), 9-16.
- Gonsales, G. Z., Orsi, R. O., Fernandes, J. A., Rodrigues, P. ve Funari, S. R. C. (2006). Antibacterial Activity of Propolis Collected in Different Regions of Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, *12*(2), 276-284.

- Graikou, K., Popova, M., Gortzi, O., Bankova, V. ve Chinou, I. (2016). Characterization and Biological Evaluation of Selected Mediterranean Propolis Samples. Is it a New Type?. *LWT Food Science and Technology*, 65, 261-267.
- Güzel, N. (2021). Morphometric and Physico-chemical Properties of Cornelian Cherry (*Cornus mas* L.) Grown in Çorum, Turkey. *Akademik Gıda*, 19(4), 373-380.
- Hamzah, N. ve Leo, C. P. (2015). Microwave Assisted Extraction of Trigona Propolis: The Effects of Processing Parameters. *International Journal of Food Engineering*, 11(6), 861-870.
- Hao, R., Jiang, Y., Li, F., Waterhouse, D.S. ve Li, D. (2021). Mir-182-5p/TLR4/NF-Kb Axis Contributes to Caffeic Acid Phenethyl Ester's Protective Effect Against Cadmium Induced Spleen Toxicity and Associated Injury in Mice. *Food and Chemical Toxicology*, 112654.
- Hu, H., Wang, Y., Zhu, H., Dong, J., Qiao, J., Kong, L. ve Zhang, H. (2022). Two Novel Markers to Discriminate Poplar Type Propolis from Poplar Bud Extracts: 9-Oxo-ODE and 9-Oxo-ODA. *Journal of Food Composition and Analysis*, 105, 104196.
- Irigoiti, Y., Navarro, A., Yamul, D., Libonatti, C., Tabera, A. ve Basualdo, M. (2021). The Use of Propolis as a Functional Food Ingredient: A Review. *Trends in Food Science & Technology*, 115, 297-306.
- Jing, C. L., Dong, X. F. ve Tong, J. M. (2015). Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Flavonoid Compounds and Antioxidants from Alfalfa Using Response Surface Method. *Molecules*, 20(9), 15550-15571
- Kantar, N. K., Yılmaz, M. S., Yakan, A. İ. ve Demirkol, Ö. Ş. (2021). Gıdalardan Biyoaktif Bileşiklerin Ekstraksiyonunda Derin Ötektik Çözücülerin Kullanımı. *Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 10(2).
- Karacaoğlu, M. (1997). Propolisin Yapısı ve Kullanımı. *Teknik Arıcılık*, 57, 18-25.
- Karlıdağ, S. K. ve Genç, F. (2007). Farklı Balarısı (*Apis Mellifera*) Irk ve Yöntemleri ile Üretilen Propolis Örneklerinin Reçine Miktarları. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 7(2), 52-58.
- Kashmoola, M. ve Qasim, A. A. (2021). The Synergistic Effect of Aqueous Extracts of Iraqi Propolis and CPP-ACPF Paste on Enamel Microhardness after Demineralization Challenge. *Al-Rafidain Dental Journal*, 21(2), 292-306.
- Kekeçoğlu, M. (2021). Apiterapi Ürünlerindeki Üretim Sorunları. *Türkiye Klinikleri*, 257-63.
- Keskin, M. (2018). Propoliste Standardizasyon Mümkün mü? *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 18(2), 101-110.
- Keskin, M. (2019). Ticari Propolis Ekstraktlarının Kalite Parametreleri Açısından Karşılaştırılması. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 19(1), 43-49.
- Keskin, Ş., Yatanaslan, L. ve Karlıdağ, S. (2020). Farklı İllerden Toplanan Propolis Örneklerinin Kimyasal Karakterizasyonu. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 20(1), 81-88.
- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V. ve Lee, D. U. (2004). Applications and Potential of Ultrasonics in Food Processing. *Trends in Food Science & Technology*, 15(5), 261-266.



- Kumova, Ü., Korkmaz, A., Avcı, B.C. ve Ceyran G. (2002). Önemli Bir Arı Ürünü: Propolis. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 2(2), 10-24.
- Li, F., Awale, S., Tezuka, Y. ve Kadota, S. (2008). Cytotoxic Constituents from Brazilian Red Propolis and Their Structure Activity Relationship. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 16, 5434–5440.
- Magnavacca, A., Sangiovanni, E., Racagni, G. ve Dell'Agli, M. (2021). The Antiviral and Immunomodulatory Activities of Propolis: An Update and Future Perspectives for Respiratory Diseases. *Medicinal Research Reviews*, 42(2), 897-945.
- Marcucci, M.C. (1994). Propolis: Chemical Composition, Biological Properties and Therapeutic Activity. *Apidologie*, 26, 83-99.
- Mitu, A. (2021). The Influence of Beekeeping Products on the Health of the Population of the Republic of Moldova. *One Health- Risk Management*, 2(4S), 57-57.
- Nyandwi, R. (2017). *Farklı Ülkelerden Sağlanan Ham Propolislerin Biyolojik Aktiviteye Sahip Fenolik Bileşik İçeriklerinin Karşılaştırılması*, (Doktora Tezi), Bursa: Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Oroian, M., Dranca, F. ve Ursachi, F. (2020a). Comparative Evaluation of Maceration, Microwave and Ultrasonic-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Propolis. *Journal of Food Science and Technology*, 57(1), 70-78.
- Oroian, M., Ursachi, F. ve Dranca, F. (2020b). Influence of Ultrasonic Amplitude, Temperature, Time and Solvent Concentration on Bioactive Compounds Extraction From Propolis. *Ultrasonics Sonochemistry*, 64, 105021.
- Özdal, T., Ceylan, F. D., Eroğlu, N., Kaplan, M., Olgun, E. O. ve Çapanoğlu, E. (2019). Investigation of Antioxidant Capacity, Bioaccessibility and LC-MS/MS Phenolic Profile of Turkish Propolis. *Food Research International*, 122, 528-536.
- Özgür, A. (2021). *Bazı Organik Kirleticilerin Derin Ötektik Çözücülerle Ekstraksiyonu ve Kromatografik Analizleri*, (Yüksek Lisans Tezi), Denizli: Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Öztürk, O., Ünal, M. ve Göktepe, M.E. (2021). Apiterapi ve Klinik Çalışmalar. *Türkiye Klinikleri*, 164-7.
- Park, E.H., Kim, S.H. ve Park, S.S. (1996). Antiinflammatory Activity of Propolis. *Archives of Pharmacal Research*, 19(5), 337-341.
- Pellati, F., Prencipe, F. P., Bertelli, D. ve Benvenuti, S. (2013). An Efficient Chemical Analysis of Phenolic Acids and Flavonoids in Raw Propolis by Microwave Assisted Extraction Combined with High Performance Liquid Chromatography Using the Fused Core Technology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 81, 126-132.
- Pobiega, K., Kraśniewska, K., Derewiaka, D. ve Gniewosz, M. (2019). Comparison of the Antimicrobial Activity of Propolis Extracts Obtained by Means of Various Extraction Methods. *Journal of Food Science and Technology*, 56(12), 5386-5395.

- Pobiega, K., Przybył, J. L., Żubernik, J. ve Gniewosz, M. (2020). Prolonging the Shelf Life of Cherry Tomatoes by Pullulan Coating with Ethanol Extract of Propolis During Refrigerated Storage. *Food and Bioprocess Technology*, 13(8), 1447-1461.
- Popova, M. P., Bankova, V. S., Bogdanov, S., Tsvetkova, I., Naydenski, C., Marcazzan, G. L. ve Sabatini, A. G. (2007). Chemical Characteristics of Poplar Type Propolis of Different Geographic Origin. *Apidologie*, 38(3), 306-311.
- Popova, M., Trusheva, B., Khismatullin, R., Gavrilova, N., Legotkina, G., Lyapunov, J. ve Bankova, V. (2013). The Triple Botanical Origin of Russian Propolis from the Perm Region, Its Phenolic Content and Antimicrobial Activity. *Natural Product Communications*, 8(5), 1934578X1300800519.
- Prasad, K. N., Kong, K. W., Ramanan, R. N., Azlan, A. ve Ismail, A. (2012). Determination and Optimization of Flavonoid and Extract Yield from Brown Mango Using Response Surface Methodology. *Separation Science and Technology*, 47(1), 73-80.
- Rahman, M. S. (Ed.). (2007). Handbook of Food Preservation. CRC press.
- Rajan, M., Batista, T. C., Oliveira, C. S., Oliveira, D. G. ve Narain, N. (2021). Optimization of Solvent Extraction and HPLC-DAD Method Parameters for Determination of Phenolic Compounds in Various Brazilian Propolis. *Journal of Apicultural Research*, 1-14.
- Rebiai, A., Seghir, B. B., Hemmami, H., Zeghoud, S., Belfar, M. L. ve Kouadri, I. (2021). Determination of Some Phenolic Acids in Algerian Propolis. *Ovidius University Annals of Chemistry*, 32(2), 120-124.
- Reis, J. H. D. O., Barreto, G. D. A., Cerqueira, J. C., Anjos, J. P. D., Andrade, L. N., Padilha, F. F., Druzian, J. I. ve Machado, B. A. S. (2019). Evaluation of the Antioxidant Profile and Cytotoxic Activity of Red Propolis Extracts from Different Regions of Northeastern Brazil Obtained by Conventional and Ultrasound Assisted Extraction. *Plos One*, 14(7), e0219063.
- Riciputi, Y., Diaz-de-Cerio, E., Akyol, H., Capanoglu, E., Cerretani, L., Caboni, M. F. ve Verardo, V. (2018). Establishment of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Industrial Potato by-Products Using Response Surface Methodology. *Food Chemistry*, 269, 258-263.
- Roy, S. ve Rhim, J. W. (2020). Preparation of Gelatin Carrageenan Based Color Indicator Film Integrated with Shikonin and Propolis for Smart Food Packaging Applications. *ACS Applied Bio Materials*, 4(1), 770-779.
- Ruß, C. ve König, B. (2012). Low Melting Mixtures in Organic Synthesis an Alternative to Ionic Liquids?. *Green Chemistry*, 14(11), 2969-2982.
- Sağdıç, O., Karasu, S., ve Göktaş, H. (2020). Piyasada Satılan Ticari Propolis Örneklerinin Biyoaktif Bileşenlerinin Belirlenmesi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (19), 19-31.
- Sambou, M., Jean-François, J., Ndongou Moutombi, F. J., Doiron, J. A., Hebert, M., Joy, A. P. ve Touaibia, M. (2020). Extraction, Antioxidant Capacity, 5-Lipoxygenase Inhibition and Phytochemical Composition of Propolis from Eastern Canada. *Molecules*, 25(10), 2397.

- Sánchez Camargo, A. P., Mendiola, J. A., Valdés, A., Castro Puyana, M., García Cañas, V., Cifuentes, A. ve Ibáñez, E. (2016). Supercritical Antisolvent Fractionation of Rosemary Extracts Obtained by Pressurized Liquid Extraction to Enhance Their Antiproliferative Activity. *The Journal of Supercritical Fluids*, 107, 581-589.
- Saral, Ö. (2018). Determination of Antioxidant Activities of the Chestnut and Flower Honeys Collected From Eastern Black Sea Region in Turkey. *Journal of Apitherapy and Nature*, 1(1), 28-32.
- Sariyev, R., Çaycı, M. ve Oruç, H. H. (2019). Azerbaycan Propolislerinin Fenolik Madde İçerikleri ve Kalite Açısından Değerlendirilmesi. *Journal of Research in Veterinary Medicine*, 38(2), 44-51.
- Sawicka, D., Car, H., Borawska, M.H. ve Nikliński, J. (2012). The Anticancer Activity of Propolis. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 50(1), 25-37.
- Shahbaz, M., Zahoor, T., Arshad, R., Rafiq, S., Qaisrani, T. B., Liaqat, A. ve Umer, M. (2021). Chemical Profiling, HPLC Characterization and in Vitro Antioxidant Potential of Pakistani Propolis Collected from Peripheral Region of Faisalabad. *Cellular and Molecular Biology*, 67(1), 40-44.
- Sheng, Z. L., Wan, P. F., Dong, C. L. ve Li, Y. H. (2013). Optimization of Total Flavonoids Content Extracted from Flos Populi Using Response Surface Methodology. *Industrial Crops and Products*, 43, 778-786.
- Shirzad, H., Niknam, V., Taheri, M. ve Ebrahimzadeh, H. (2017). Ultrasound-Assisted Extraction Process of Phenolic Antioxidants from Olive Leaves: A Nutraceutical Study Using RSM and LC-ESI-DAD-MS. *Journal of Food Science and Technology*, 54(8), 2361-2371.
- Soós, Á., Bódi, É., Várallyay, S., Molnár, S. ve Kovács, B. (2021). Element Composition of Propolis Tinctures Prepared from Hungarian Raw Propolis. *LWT*, 112762.
- Sorucu, A. (2015). *Marmara Bölgesindeki Propolislerde Biyolojik Etkisi Olan Fenolik Madde ve Miktarlarının Mevsim ve Rakım Farkına Bağlı Olarak Belirlenmesi*, (Yayınlanmamış Doktora Tezi), Bursa: Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Şengül, M. ve Topdaş, E. F. (2019). Katı Sıvı Ekstraksiyonunda Kullanılan Modern Teknikler ve bu Teknikler Arasında Ultrason Yardımlı Ekstraksiyonun Yeri. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 50(2), 201-216.
- Talla, E., Tamfu, A. N., Biyanzi, P., Sakava, P., Asobo, F. P., Mbafor, J. T., Tchuenguem, N. F. F. ve Ndjouenkeu, R. (2014). Phytochemical Screening, Antioxidant Activity, Total Polyphenols and Flavonoids Content of Different Extracts of Propolis from Tekel. *The Journal of Phytopharmacology*, 3(5), 321-329.
- Tosi, E.A., Ré, E., Ortega, M.E. ve Cazzoli, A.F. (2007). Propolis Based Food Preservative: Bacteriostatic Activity of Propolis Polyphenols and Flavonoids on Escherichia Coli. *Food Chemistry*, 104(3), 1025-1029.
- TSE (2003). Türk Standartları Enstitüsü. TS12910, Arıcılık-Arı Tutkalı (Propolis).
- Türkçen, S., Karakelle, S. B. ve Toprakkaya, D. K. (2021). Mikrokapsül Aplikasyonu Sonrası Multifonksiyonel Havlu Eldesi. *İleri Mühendislik Çalışmaları ve Teknolojileri Dergisi*, 2(1), 30-38.

- Türkez, H., Arslan, M. E., Yılmaz, A., Doru, F., Çağlar, Ö., Arslan, E., Tatarcası, A., Hacımuftuoğlu, A., El-Aty, A.A. ve Mardinoğlu, A. (2021). In Vitro Transcriptome Response to Propolis in Differentiated SH-SY5Y Neurons. *Journal of Food Biochemistry*, E13990.
- Uçak, İ. (2018). Propolis Ekstraktı ile Zenginleştirilmiş Balık Yağında Lipit Oksidasyonu Düzeyinin Belirlenmesi. *Gıda/Gıda Dergisi*, 43(3).
- Uğur, İ., Temelli, S. ve Eyigör, A. (2021). Bazı Hastalıkların Tedavisinin Desteklenmesinde Propolis Kullanımının Önemi. *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, 12(2), 118-140.
- Ulusoy, E. (2012). Bal ve apiterapi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 12(3), 89-97.
- Wang, X., Wu, Y., Chen, G., Yue, W., Liang, Q. Ve Wu, Q. (2013). Optimisation of Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Sparganii Rhizoma with Response Surface Methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(3), 846-854.
- Yaman, T. ve Kuleaşan, Ş. (2016). Uçucu Yağ Elde Etmede Gelişmiş Ekstraksiyon Yöntemleri. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7(Özel 1), 78-83.
- Yavuz C., Ertürk Ö. ve Sarıkaya A. (2012). Propolisin Biyolojik Önemi. *Arıcılık Araştırma Dergisi*. 8, 32-33.
- Yıldız, O. (2020). Tüketilebilir Propolis Ekstrelerinde Kullanılan Çözücülerin (Menstrumların) Değerlendirilmesi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 20(1), 24-37.
- Yonar, M. E. (2017). General Properties of Propolis and Usage in Fish. *Turkish Journal of Agriculture Food Science and Technology*, 5(9), 1015-1023.
- Yucel, B., Topal, E. ve Kosoğlu, M. (2017). Bee Products as Functional Food. *Superfood and Functional Food-An Overview of Their Processing and Utilization*, 15-33.
- Zainal, W. N. H. W., Azian, N. A. A. M., Albar, S. S. ve Rusli, A. S. (2021). Effects of Extraction Method, Solvent and Time on the Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Tetrigona Apicalis Malaysian Propolis. *Journal of Apicultural Research*, 1-7.
- Zarrin, R. ve Sabzi, R. E. (2022). A Sensitive Electrochemical Sensor Due to Novel Bionanocomposite to Determine Tartrazine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry Research*, 9(1), 113-121.

