



**T.C.**

**HİTİT ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**PROPOLİS BİYOAKTİF BİLEŞENLERİNİN ULTRASES  
DESTEKLİ EKSTRAKSİYONUNDA YEŞİL SOLVENTLERİN  
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Şeyma Meryem YILMAZ**

**Çorum - 2023**



**PROPOLİS BİYOAKTİF BİLEŞENLERİNİN ULTRASES  
DESTEKLİ EKSTRAKSİYONUNDA YEŞİL SOLVENTLERİN  
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Şeyma Meryem YILMAZ**

**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü**

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Yüksek Lisans Tezi**

**TEZ DANIŞMANI**

**Dr. Öğr. Üyesi Nihal GÜZEL**

**Çorum 2023**

## KABUL ONAY SAYFASI

Şeyma Meryem YILMAZ tarafından hazırlanan “Propolis Biyoaktif Bileşenlerinin Ultrases Destekli Ekstraksiyonunda Yeşil Solventlerin Etkinliğinin Değerlendirilmesi” adlı tez çalışması 14/02/2023 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.

Dr. Öğr. Üyesi Seçil TÜRSOY

Dr. Öğr. Üyesi Sevgin DİBLAN

Dr. Öğr. Üyesi Nihal GÜZEL

Hitit Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun .../.../..... tarih ve ..... sayılı kararı ile Şeyma Meryem YILMAZ'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.

Şeyma Meryem YILMAZ

# PROPOLİS BİYOAKTİF BİLEŞENLERİNİN ULTRASES DESTEKLİ EKSTRAKSİYONUNDA YEŞİL SOLVENTLERİN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Şeyma Meryem YILMAZ

ORCID:0000-0003-0397-3281

HİTİT ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Yüksek Lisans Tezi

Şubat 2023

## ÖZET

Propolis, zengin biyoaktif bileşen içeriği nedeniyle yüzyıllar boyunca geleneksel tıpta kullanılan bir arı ürünüdür. Ancak, propolis suda az çözünen reçinemsi yapısı, güçlü tat ve koku gibi özelliklerinden dolayı ham haliyle tüketilememektedir. Bu nedenle kullanılabilirliği arttırmak amacıyla propolis etanol gibi çeşitli organik çözücüler kullanılarak ekstrakte edilmelidir. Günümüzde ise çevre dostu ve geri dönüşüm olanağı sağlayan yeşil çözücüler adı verilen derin ötektik çözücülerin özellikle biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda kullanımı artmaya başlamıştır. Yapılan bu çalışmada propolis biyoaktif bileşenleri ultrases destekli derin ötektik çözücü ekstraksiyonu yöntemi kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Ultrases destekli ekstraksiyon 1:300 g/mL katı solvent oranı, 50°C sıcaklık, 45 dakika süre ve %100 genlik koşullarında gerçekleştirilmiştir. Propolis ekstraksiyonu, ekstraksiyon etkinliğini değerlendirmek ve karşılaştırmak amacıyla 12 farklı derin ötektik çözücü ve etanol kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Seçilen farklı çözücülerle gerçekleştirilen propolis ekstraktlarında etkinliğin kıyaslanması amacı ile toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid miktarı, antioksidan aktivite ve antimikrobiyal aktivite değerleri belirlenmiştir. Derin ötektik çözücüler kullanılarak elde edilen ekstraktlar arasında en yüksek toplam fenolik madde miktarı (169,71±5,28 mg GAE/g) ve toplam flavonoid miktarı (129,53±1,50 mg CE/g) sitrik asit-propandiol (1:4) ile ekstrakte edilen propolis örneğinde belirlenmiştir. En yüksek antioksidan aktivite (424,45±11,11 µmol TEAC/g) değerine ise laktik asit-propandiol (1:4) kullanılan ekstraktta ulaşılmıştır. Etanol ile ekstrakte edilen propolis örneğinde ise toplam

fenolik madde miktarı  $228,19 \pm 0,70$  mg GAE/g, toplam flavonoid miktarı  $221,57 \pm 2,86$  mg CE/g ve antioksidan aktivite  $580,34 \pm 23,18$   $\mu$ mol TEAC/g olarak bulunmuştur. Etanol ve laktik asit-propandiol kullanılan ekstraktlarda kafeik asit başat fenolik asit olarak tespit edilirken, sitrik asit-propandiol kullanılan ekstraktta ferulik asit başat fenolik asit olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte sitrik asit-propandiol ve laktik asit-propandiol ile hazırlanan propolis ekstraktlarının *Escherichia coli* (sırasıyla, 15 ve 10 mm/10  $\mu$ L) ve *Staphylococcus aureus* (sırasıyla, 13 ve 11 mm/10  $\mu$ L) üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ekstraksiyonda kullanılan derin ötektik çözücünün antioksidan aktivite, toplam fenolik ve flavonoid miktarı üzerine önemli derecede etkili olduğu göstermektedir ( $p < 0,05$ ). Bu sonuçlar, sitrik asit-propandiol (1:4) ve laktik asit-propandiol (1:4) çözücülerinin propolis ekstraksiyonunda çevreci bir alternatif olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

**Anahtar Kavramlar:** Propolis, Ultrases, Derin ötektik çözücüler, Etanol, Antioksidan aktivite

**Bilim Kodu:** 90808

# **EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF GREEN SOLVENTS IN THE ULTRASES-ASSISTED EXTRACTION OF PROPOLIS BIOACTIVE COMPONENTS**

Şeyma Meryem YILMAZ

ORCID:0000-0003-0397-3281

HITIT UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL

Master of Science of Thesis

February 2023

## **ABSTRACT**

Propolis is bee product that has been used in folk medicine for centuries due to their rich bioactive content. However, propolis is not suitable for raw consumption due to their resinous structure, low water solubility, strong taste, and odor. Thus, propolis must be extracted using different organic solvents, like ethanol, before consumption. Today, deep eutectic solvents, which are called environmentally friendly and recyclable green solvents, have been widely used especially in the extraction of bioactive compounds. In this study, propolis bioactive compounds were extracted using ultrasound assisted deep eutectic solvent extraction method. Ultrasound assisted extraction was carried out at 1:300 g/mL solid solvent ratio, 50°C temperature and 100% amplitude conditions for 45 minutes. The extraction of propolis was carried out 12 different deep eutectic solvents and ethanol (%90) to evaluate and compare extraction efficiency. Total phenolic content, total flavonoid amount, antioxidant activity, and antimicrobial activity values were determined to compare the effectiveness of propolis extractions carried out with different selected solvents. The citric acid-propanediol extract had the greatest total phenolic content (169.71±5.28 mg GAE/g) and total flavonoid content (129.53±1.50 mg CE/g) among the extracts obtained using deep eutectic solvents. The highest antioxidant activity (424.45±11.11 µmol TEAC/g) was obtained in the extract using lactic acid-



propanediol (1:4). The total phenolic content was  $228.19 \pm 0.70$  mg GAE/g, the total flavonoid content was  $221.57 \pm 2.86$  mg CE/g, and the antioxidant activity was  $580.34 \pm 23.18$   $\mu\text{mol TEAC/g}$  in the propolis sample extracted with ethanol. The major phenolic compound was caffeic acid in extracts obtained by ethanol and lactic acid-propanediol extraction, while the major phenolic was ferulic acid in extract obtained by citric acid-propanediol extraction. Furthermore, it was determined that propolis extracts obtained with citric acid-propanediol and lactic acid-propanediol have antimicrobial activity on *Escherichia coli* (15 and 10 mm/10  $\mu\text{L}$ , respectively) and *Staphylococcus aureus* (13 and 11 mm/10  $\mu\text{L}$ , respectively). The results show that the deep eutectic solvents used in the extraction have a significant effect on the antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content ( $p < 0.05$ ). In conclusion, the citric acid-propanediol (1:4) and lactic acid-propanediol (1:4) may be used as an environmentally friendly alternative for propolis extraction.

**Key Terms:** Propolis, Ultrasonund, Deep eutectic solvents, Ethanol, Antioxidant activity

**Science Code:** 90808

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi birikimi ve tecrübeleriyle yardımcı olan, maddi manevi her anlamda desteğini üzerimde hissettiğim değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Nihal GÜZEL'e

Çalışma kapsamında gerçekleştirdiğimiz antimikrobiyal aktivite analizinde bana yardımcı olan Arş. Gör. Dr. Mustafa GÜZEL hocama,

Bakterilerin temininde kültür koleksiyonları ile bana destek olan ODTÜ gıda güvenliği laboratuvarına,

Bilgi ve tecrübeleriyle desteğini esirgemeyen Prof. Dr. K. Savaş BAHÇECİ hocam ve tüm değerli bölüm hocalarıma,

Laboratuvar çalışmalarım ve tez yazım sürecimde bilgileriyle ve destekleriyle bana yardımcı olan çok kıymetli arkadaşım ve meslektaşım Büşra ÇAKIR'a

Eğitim hayatım boyunca tüm desteklerini üzerimde hissettiğim canım ailem ve tüm arkadaşlarıma,

Son olarak tez çalışmam sürecinde, manevi desteği ile her zaman yanımda olan sevgili arkadaşım Sefa Can UÇAK'a sonsuz teşekkür ediyorum.

Şeyma Meryem YILMAZ

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
TABLOLAR DİZİNİ .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xii
RESİMLER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
GİRİŞ.....	1

## 1. BÖLÜM LİTERATÜR ÖZETİ

1.1. Propolis.....	3
1.2. Propolis Ekstraksiyon Yöntemleri.....	5
1.2.1. Mikrodalga destekli ekstraksiyon .....	5
1.2.2. Süper kritik karbondioksit ekstraksiyonu.....	6
1.2.3. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu.....	7
1.2.4. Ultrases destekli ekstraksiyon.....	7
1.2.5. Derin ötektik çözücü ekstraksiyonu.....	9

## 2. BÖLÜM MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal.....	13
2.2. Metot.....	13
2.2.1 Propolisin ultrases destekli ekstraksiyonu .....	13
2.2.2. pH, briks ve elektriksel iletkenlik değerlerinin tayini .....	14
2.2.3. Toplam fenolik madde tayini .....	15
2.2.4. Toplam flavonoid tayini .....	15

2.2.5. Antioksidan aktivite tayini (ABTS).....	16
2.2.6. Antimikrobiyal aktivite .....	17
2.2.7. Fenolik bileşen dağılımının LS-MS/MS ile belirlenmesi .....	17
2.2.8. İstatiksel analiz .....	18

### 3. BÖLÜM

#### ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

3.1. Derin Ötektik Çözücülerde pH, Briks ve Elektriksel İletkenlik Değerleri .....	19
3.2. Toplam Fenolik Madde Miktarı .....	20
3.3. Toplam Flavonoid Miktarı .....	22
3.4. Antioksidan Aktivite (ABTS).....	24
3.4. Antimikrobiyal Aktivite .....	26
3.5. Fenolik Bileşen Kompozisyonu (LS-MS/MS) .....	27
<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	33
<b>KAYNAKÇA</b> .....	34
<b>EKLER</b> .....	41
<b>EK-1. İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları</b> .....	41

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 2. 1.</b> Derin ötektik çözücü bileşimi .....	14
<b>Tablo 2. 2.</b> Elüsyon profili .....	18
<b>Tablo 2. 3.</b> Cihaz koşulları .....	18
<b>Tablo 3. 1.</b> Derin ötektik çözücülerin pH, Briks ve elektriksel iletkenlik değerleri .....	19
<b>Tablo 3. 2.</b> Propolis ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri .....	26
<b>Tablo 3. 3.</b> Propolis ekstraktlarının fenolik bileşen dağılımı .....	28

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2. 1. Gallik asit kalibrasyon eğrisi .....	15
Şekil 2. 2. Kateşin kalibrasyon eğrisi .....	16
Şekil 3. 1. Propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları.....	21
Şekil 3. 2. Propolis ekstraktlarının ekstraksiyon verimleri.....	22
Şekil 3. 3. Propolis ekstraktlarının toplam flavonoid miktarları.....	24
Şekil 3. 4. Propolis ekstraktlarının antioksidan aktivite konsatrasyonları.....	25
Şekil 3. 5. Etanol kullanılarak elde edilen propolis ekstraktının LC-MS/MS iyon kromatogramı.....	30
Şekil 3. 6. Sitrik asit-propandiol kullanılarak elde edilen propolis ekstraktının LC-MS/MS iyon kromatogramı.....	30
Şekil 3. 7. Laktik asit-propandiol kullanılarak elde edilen propolis ekstraktının LC-MS/MS iyon kromatogramı.....	31
Şekil 3. 8. Standartların LC-MS/MS genel iyon kromatogramı.....	32

## RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
<b>Resim 2. 1.</b> Propolis.....	13
<b>Resim 3. 1.</b> E. coli üzerine propolis ekstraktlarının antimikrobiyal etkisi; (a) etanol (%90), (b) sitrik asit-propandiol, (c) laktik asit-propandiol.....	26
<b>Resim 3. 2.</b> S. aureus üzerine propolis ekstraktlarının antimikrobiyal etkisi; (a) etanol (%90), (b) sitrik asit-propandiol, (c) laktik asit-propandiol.....	27



## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

°C	Santigrat derece
mg	Miligram
g	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
MHz	Megahertz
MPa	Megapascal
v	Hacim
Hz	Hertz
kHz	Kilohertz
W	Watt
cm	Santimetre
rpm	Dönüş hızı
µg	Mikrogram
N	Normal
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
nm	Nanometre
µm	Mikrometre
µmol	Mikromol
µS	Mikrosiemens
EtOH	Etanol
H <sub>2</sub> O	Su
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
HCl	Hidroklorik asit
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Sodyum karbonat



NaNO <sub>2</sub>	Sodyum nitrit
AlCl <sub>3</sub>	Alüminyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit

### **Kısaltmalar**

GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
CE	Kateşin Eşdeğeri
TEAC	Trolox Eşdeğer Antioksidan Kapasitesi
DÖÇ	Derin Ötektik Çözücü
HBA	Hidrojen Bağ Alıcısı
HBV	Hidrojen Bağ Verici
ABTS	2,2'-Azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit
TPC	Toplam Fenolik Konsantrasyonu
TFC	Toplam Flavonoid Konsantrasyonu
AOA	Antioksidan Aktivitesi

## GİRİŞ

Kentin savunucusu anlamına gelen propolis, arılar tarafından bitki reçinelerinden toplanarak üretilen yapışkan bir madde olup kovani dış etkenlere karşı korumak ve kovani içi dezenfeksiyonu sağlamak amacıyla kullanılmaktadır (Ghisalberti, 1979; Yıldız, 2020). Bal arıları propolis üretmek için kavak, meşe, kestane ve çam gibi ağaçların ve bazı otsu bitkilerin tomurcuk, yaprak, gövde, kabuk gibi bölümlerinden faydalanmaktadır (Ghisalberti, 1979; Keskin, 2018). Bu durum propolisin başta renk olmak üzere bazı fiziksel özelliklerini etkilediği gibi kimyasal özelliklerini de etkilemektedir. Propolis içeriğini çoğunlukla reçine-zamkısı maddeler (%50) ve bitkisel mumlar (%30) oluştururken, esansiyel yağlar (%10), polen (%5), organik bileşikler ve mineral maddeler (%5) de içeriğinde bulunmaktadır (Kumova ve ark., 2002). Propolisin ana bileşeni olarak aromatik asitler, diterpenoid asitler ve triterpenoidlerin kabul edilmesinin yanı sıra lignin, flavanoidler, sinamik asit ve türevleri gibi çeşitli maddeler açısından zengin bir içeriğe de sahiptir (Rushdi ve ark., 2014; Kumova ve ark., 2002; Doğan ve Hayoğlu, 2012). Propolis zengin bileşen yapısı sebebiyle yüzyıllar boyunca geleneksel tıpta kullanım olanağı bulmuştur. Literatürde tıbbi bir ilaç olarak kabul edilmemiş olmasına rağmen günümüzde başta yaraların tedavisi gibi çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Ayrıca sağlığa olan faydaları (antioksidan etki, bağışıklık uyarıcı, soğuk algınlığını hafifletme vb.) sebebiyle özellikle yaşadığımız pandemi döneminin de etkisiyle daha fazla önem kazanmaktadır. Fakat suda az çözünen reçinemsiz yapısı, güçlü tat ve kokusu gibi özellikleri sebebiyle propolis doğrudan tüketime uygun değildir. Bu nedenle propolisin tüketilmeden önce ekstrakte edilmesi gerekmektedir.

Propolis ekstraksiyonunda maserasyon ve sokslet ekstraksiyonu gibi geleneksel yöntemler kullanılmaktayken gelişen teknoloji, artan sağlık ve çevre bilinci ile birlikte mikrodalga destekli ekstraksiyon, süper kritik karbondioksit ekstraksiyonu, basınçlı sıvı ekstraksiyonu, ultrases destekli ekstraksiyon gibi yenilikçi ekstraksiyon yöntemleri de kullanılmaya başlanmıştır. Propolisden biyoaktif bileşen eldesinde kullanılan bu yenilikçi ekstraksiyon yöntemleri arasında ise en avantajlı olanı ultrases destekli ekstraksiyon yöntemidir. Ultrases destekli ekstraksiyon yönteminde çeşitli frekanslardaki ses dalgaları ekstrakte edilecek hücreye gönderilmekte bu sırada oluşan kavitasyon kabarcıkları ile de hücre yapısı bozulmaktadır. Bu şekilde ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmekte ve biyoaktif bileşenlerin eldesi sağlanmaktadır. Ultrases destekli ekstraksiyon sayesinde daha az miktarda çözücü kullanımı, düşük sıcaklık ve kısa süre gibi avantajlar sağlanarak ekstraksiyon işlemi de etkin bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Seçilen yöntemin yanı sıra ekstraksiyon verimine etki eden bir diğer önemli parametre ise ekstrakte edilmek istenen bileşene en uygun çözücünün seçimidir. Propolis ekstraksiyonunda genel olarak etanol, metanol, aseton, etil asetat, hekzan gibi organik çözücüler kullanılabilir (Sambou ve ark., 2020). Ancak, organik çözücülerin özellikle yüksek konsantrasyonlarda kullanımının sağlığa ve çevreye olan zararları nedeniyle propolis ekstraksiyonunda yeşil çözücülerin kullanımı ön plana çıkmaya başlamıştır.

Bu nedenle, günümüzde yenilikçi ve çevre dostu olarak bilinen derin ötektik çözücülerin kullanım olanakları araştırılmaya başlanmıştır. Derin ötektik çözücüler, hidrojen bağı alıcısı (HBA) ve hidrojen bağı vericisi (HBV) olma özelliğine sahip iki farklı bileşenden oluşmaktadır. Farklı çözücülerin belli oranlarda karıştırılması ile elde edilen derin ötektik çözücüler içeriğindeki bileşenlerden daha düşük erime noktasına sahip homojen karışımlardır (Dai ve ark., 2013). Toksik olmaması ve çevre dostu olması gibi özellikleriyle bilinen bu çözücüler aynı zamanda hazırlanması kolay ve düşük maliyetlidir. Sahip olduğu bu avantajlar ile ön plana çıkan derin ötektik çözücüler genel olarak yenilikçi ekstraksiyon yöntemleriyle beraber kullanılmaktadır.

Bu çalışmada ise propolisten biyoaktif bileşen eldesi için çevreci bir yöntem olan ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi yeşil solventler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Seçilen bu yöntem ile düşük sıcaklık, kısa süre, az miktarda ve toksik olmayan çözücü kullanımı ile daha yenilikçi ve çevreci bir ekstraksiyon hedeflenmiştir. Böylece, sağlık üzerine faydası olan fakat suda az çözünme özelliği nedeniyle tüketimi sınırlı olan propolisin kullanım olanakları arttırılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla çalışmamızda propolisten biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunda ön denemeler sonucu belirlenen 12 farklı derin ötektik çözücü kullanılmıştır. Derin ötektik çözücülerin ekstraksiyon etkinliğinin kıyaslanması için en sık kullanılan çözücü olan etanol (%90) ile de ekstraksiyon işlemi aynı koşullarda gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda etanol ve derin ötektik çözücülerle elde edilen propopolis ekstraktları toplam fenolik madde (TPC), ekstraksiyon verimi, toplam flavonoid miktarı (TFC), antioksidan aktivite (AOA, ABTS), antimikrobiyal aktivite ve fenolik dağılım (LC-MS/MS) açısından incelenmiştir. Yapılan bu çalışma ile sağlık üzerine çeşitli faydaları bulunan propolisin toksik olmayan çözücülerle ekstraksiyonu gerçekleştirilerek tüketiciler için daha çevreci ve güvenli propolis ekstraktları elde edilmeye çalışılmıştır. Bununla birlikte yapılan bu çalışmanın ileride yapılacak çalışmalar için literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

# 1. BÖLÜM

## LİTERATÜR ÖZETİ

### 1.1. Propolis

Geçmişten günümüze bal, polen, arı sütü, propolis gibi pek çok arı ürünü sağlığın korunması ve hastalıkların geleneksel yöntemlerle tedavisi alanlarında rağbet görmektedir (Kumova ve ark., 2002; Bakkaloğlu ve Arıcı, 2019; Yıldız, 2020). Arı ürünleri doğrudan tüketilebilen, işlenerek tüketilebilen ve insan gıdası olarak tüketilemeyenler olarak gruplandırılmaktadır (Bakkaloğlu ve Arıcı, 2019). İşlenerek tüketilebilenler sınıfında yer alan propolis ise ilk olarak Yunanlılar tarafından keşfedilip antibiyotik olarak kullanılmıştır (Kutluca ve ark., 2006). Yunanlıların yanı sıra Mısırlılar ve Romalılar tarafından da dezenfeksiyon ve yaraların iyileştirilmesinde kullanılmıştır (Sforcin, 2007). Mısır tarihine bakıldığında propolisin mumyalamada kullanılan koruyucu maddelerden biri olduğu görülmektedir (Kuropatnicki ve ark., 2013). Aynı zamanda Çin, Hint ve Arap gibi birçok eski uygarlıkta propolisin iyileştirici etkisi olduğu düşünülerek çeşitli tedavilerde kullanılmıştır. Propolis günümüzde de tıbbi bir ilaç olarak geçmese de yara tedavileri başta olmak üzere pek çok tedavi için kullanılmaktadır.

Pro (ön, giriş) ve polis (şehir) kelimelerinin birleşiminden doğan propolis adı kentin savunucusu anlamına gelmektedir (Ghisalberti, 1979). Propolis, arılar tarafından bitki reçinelerinden toplanarak üretilen yapışkan bir madde olup kovanları dış etkenlere karşı korumak ve kovan içi dezenfeksiyonu sağlamak amacıyla kullanılmaktadır (Yıldız, 2020). Bal arıları propolis kaynağı olarak genellikle çam ağaçlarının reçineleri ve bunun yanı sıra çeşitli kavak türleri, söğüt, huş, at kestanesi, köknar gibi ağaçları da kaynak olarak kullanmaktadır. Propolisin toplandığı bitkiler bölgeye ve mevsimlere göre çeşitlilik göstermektedir (Kumova ve ark., 2002). Bu çeşitlilik reçinenin rengine yansımaktadır. Propolisin rengi, açık sarıdan koyu kahverengiye kadar değişiklik gösterebilir. Reçine kaynağının yanı sıra iklim koşulları ve sıcaklık da propolisin özellikleri üzerine etkili olmaktadır. Örneğin, 15°C'den az sıcaklıklarda genellikle donuk, kırılğan ve sert bir yapıda olan propolis 25-45°C'de, oldukça yapışkan ve elastik bir yapıya sahiptir. 45°C'nin üzerine çıkıldıkça yapışkanlığında artış olmaktadır. Bazı örneklerde erime noktası 100°C'ye kadar çıkabilse de genel olarak 60-70°C'de sıvı halde bulunmaktadır (Krell, 1996). Fiziksel özelliklerin yanı sıra propolisin kimyasal yapısı da toplandığı bitkiye, arı ırkına ve çevre koşullarına göre farklılık göstermektedir. Yapısında yaklaşık olarak 150 farklı kimyasal bileşik bulunduran propolis, içeriğinde %50 oranında reçine ve zamksı madde, %30 oranında bitkisel mumlar gibi kimyasal maddeleri barındırmaktadır (Kumova ve ark., 2002).

Propolisin ana bileşeni olarak aromatik asitler, diterpenoid asitler, triterpenoidler ve fenolik bileşikler kabul edilmektedir (Rushdi ve ark., 2014). Yapılan çalışmalarda propolisin toplam fenolik içeriği 79,17-174,51 mg GAE/g, toplam flavonoid miktarı 117-559 mg CE/100 g ve

antioksidan aktivitesi 1868,5-2913,5 µmol TEAC/g aralığında belirlenmiştir (Andrade ve ark., 2017, Al-Juhaimi ve ark., 2021). İçeriğindeki bileşenlerin konsantrasyonu iklim şartlarına göre değişiklik göstermektedir. Örneğin, ılıman bölgelerde toplanan propolisler flavonoid ve sinamik asit türevlerini daha yüksek konsantrasyonlarda içermekteyken tropikal bölgelerden toplanan propolisler lignin ve flavanoidler açısından zengin kaynaklardır (Kumova ve ark 2002; Doğan ve Hayoğlu, 2012). Propolisin biyoaktif kompozisyonu incelendiğinde içerisinde 4-OH benzoik asit (43,17 mg/kg), kafeik asit (0,05-6,84 mg/g), kafeik asit fenil ester (2,3-13,1 mg /g), kateşin (0,04-2,33 mg/g), klorojenik asit (0,07-19,35 mg/g), epigallokateşin (0,33-3,39 mg/g), ferulik asit (0,90-56,44 mg/g), isoferulik asit (0,39-1,47 mg/g), gallik asit (0,03-0,30 mg/g), protokateşik asit (0,06-0,52 mg/g), m-kumarik asit (1,33-13,57 mg/kg), p-kumarik asit (1,21-45,78 mg/g), transsinamik asit (37,35 mg/L), vanilik asit (12,67-26,81 mg/kg) başta olmak üzere çok sayıda fenolik asit bulunduğu bildirilmiştir (Hu ve ark., 2022; Sağdıç ve ark., 2020; Shahbaz ve ark., 2021; Rajan ve ark., 2021; Pellati ve ark., 2013). Fenolik maddeler içerisinde propoliste tanımlanan en büyük bileşik grubunun flavonoidler olduğu belirlenmiştir. Çeşitli ülkelerde propoliste yapılan analizler sonucunda yaklaşık olarak 40 çeşit flavonoid madde tespit edilmiştir (Maciejewicz ve ark., 2001). Propoliste bulunan flavonoid maddelerin başlıcaları apigenin (0,4-3 mg/g), chrisin (4,2-33 mg/g), galangin (1,1-16,3 mg/g), ısıorhamnetin (0,5-3,8 mg/g), kaempferol (0,9-2,5 mg/g), myristin (2-295 mg/L), naringenin (2-959 mg/L), pinobanksin (0,9-7,8 mg/g), pinocembrin (4,2-25 mg/g), kuersetin (0,5-2,5 mg/g) ve rutin (0,11-1,62 mg/g) dir (Sağdıç ve ark., 2020; Pellati ve ark., 2013; Rajan ve ark., 2021). Propolisin yapısında bulunan flavonoid maddelerin biyolojik ve farmakolojik olarak antimikrobiyal, antioksidan, anti-inflamatuvar, antitümör, bağışıklık uyarıcı, antikarsinojenik, gastrik ülser iyileştirici, antiviral, antimikotik (mantar gelişimini engelleyen) ve lokal anestetik etkileri bulunmaktadır (Yonar, 2017). Bu özellikleri sebebiyle bal kadar değerli bir besin olduğu düşünülmektedir. Örneğin, propolisin yapısında bulunan kuersetin metal iyonlarını şelatlayarak ve serbest radikalleri temizleyerek antioksidan aktivite göstermektedir (Memmedov ve ark., 2017; Cui ve ark., 2021). Propolisin antioksidan aktivitesinin C vitamininden daha güçlü olduğu bulunmuştur (Ünal ve ark., 2020). Aynı zamanda, yüksek antioksidan aktiviteye sahip olan propolislerin yüksek polen içeriğine de sahip olduğu gözlemlenmiştir (Çalışkol, 2013).

Propolis yukarıda açıklanan zengin içeriği ve özellikle sahip olduğu fenolik bileşikler nedeniyle farmakoloji de kullanım alanı bulmuştur. Yapılan araştırmalarda propolisin antibakteriyel, antifungal, antiviral, anti-tümör, anti-inflamatuvar, lokal-anestezik, antioksidan, bağışıklık uyarıcı ve hepatoprotektif (karaciğer sağlığına destek olan) aktiviteleri olduğu da belirtilmiştir (Siheri ve ark., 2017). Propolis anti-inflamatuvar özelliği sayesinde soğuk algınlığı, yaralar, ülserler, romatizma, kalp hastalıkları, diyabet ve diş çürüklerini önleme gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Huang ve ark., 2014). Fakat propolisin en çok araştırılan özelliği antimikrobiyal aktivitesi olup konu üzerinde çok sayıda yayın yapılmıştır. Propolisin içeriğindeki antimikrobiyal aktiviteyi sağlayan çok çeşitli biyoaktif bileşen olduğu

bilinmekle beraber en önemlilerinin flavonoidler ve fenolik asitlerin esterleri olduğu kabul edilmiştir (Fokt ve ark., 2010). Antimikrobiyal özelliğinin içeriğindeki bileşenlerin bir arada olmasından da kaynaklandığı düşünülmektedir (Kujumgiev ve ark., 1999). Propolisin içeriğinde bulunan maddelerin çeşitliliği ve sağlık açısından faydaları sebebiyle tüketimi artmaktadır. Fakat suda az çözünen reçinemsiz yapısı, güçlü tat ve kokusu gibi özellikleri nedeniyle ham olarak tüketilememektedir (Keskin, 2018). Bu özelliklerinden dolayı propolis ekstrakte edilerek kullanılmaktadır.

## **1.2. Propolis Ekstraksiyon Yöntemleri**

Propolisin yapışkan ve yapışkan dokusu sebebiyle apolar özellikteki yapıdan biyoaktif kısmın ayrılması oldukça zordur (Yıldız, 2020). Bu sebeple propolis ekstraksiyonunda çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Geçmişte yaygın olarak oda sıcaklığında, maserasyon ve sıcak geri akış ekstraksiyonu kullanılmıştır (Trusheva ve ark., 2007). Günümüzde ise geleneksel çalkalama yöntemi dışında daha ileri teknikler kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemler; basınçlı sıvı ekstraksiyonu (Erdoğan ve ark., 2011), mikrodalga destekli ekstraksiyon (Pellati ve ark., 2013), ultrases destekli ekstraksiyon (Yeo ve ark., 2015), süper kritik karbondioksit ekstraksiyonu (De Zordi ve ark., 2014), sonikasyon destekli ekstraksiyondur (Zhang ve ark., 2018). Propolis ekstraksiyonunda kullanılan yenilikçi yaklaşımlardan bazıları ilerleyen bölümlerde detaylıca açıklanmıştır.

### **1.2.1. Mikrodalga destekli ekstraksiyon**

Mikrodalgalar yüksek frekanslı elektromanyetik dalgalar (300-300000 MHz) olarak tanımlanmıştır (Büyüktuncel, 2012). Mikrodalga tekniği molekül üzerine iyonların iletilerek dipol rotasyon yoluyla mikrodalga'nın etki etmesi prensibine dayanmaktadır. Bu iki sistem çoğu uygulamada birlikte kullanılmakta olup uygulamayla çözücü ve dolayısıyla örnek ısıtılarak ekstraksiyon gerçekleştirilmektedir. İyonların hareketi sayesinde molekül içerisine çözücü geçişi artarak ekstraksiyon işlemi kolaylaşmaktadır (Aydın ve ark., 2021). Mikrodalga destekli ekstraksiyon üç basamaktan oluşmaktadır. İlk basamak, artan sıcaklık ve basıncın etkisiyle aktifleşen bölümlerden çözünen bileşenlerin ayrılmasıdır. İkinci basamakta, çözücünün materyal boyunca difüzyonu gerçekleşmektedir. Son aşama ise materyal içerisinden çözünen bileşenlerin çözücüye doğru salınımıdır (Şengül ve Topdaş, 2019).

Mikrodalga işleminin başarıyla uygulanması için çözücü seçimi oldukça önemlidir. Çözücü seçimi yapılırken, mikrodalga ışınmasını absorblaması, analitin çözücüdeki çözünürlüğü ve çözücünün materyalin içeriğindeki bileşenlerle etkileşimi dikkate alınmalıdır (Büyüktuncel, 2012). Seçilen çözücü daha büyük dipol momente sahip olduğunda mikrodalga ışınmasıyla daha hızlı ısınmaya neden olur. Yüksek ısınma durumunda bileşiklerin degradasyonu gerçekleşmektedir. Bu sebepten uygulamalarda yaygın olarak biri mikrodalgayı absorblayan ikili karışımlar kullanılmaktadır. Mikrodalga destekli ekstraksiyon biyoaktif bileşenlerin

ekstraksiyonunda klasik yöntemlere göre daha hızlı ısıtma, artan ekstraksiyon verimi ve ekipmanların küçüklüğü gibi avantajlara sahiptir (Cravotto ve ark., 2008).

Pellati ve arkadaşları (2013), yaptıkları çalışmada propolis ekstraksiyonunda yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile birlikte mikrodalga destekli ekstraksiyonu kullanmışlardır. En iyi sonuçlara 106°C ekstraksiyon sıcaklığı, 15 dakikalık ekstraksiyon süresi ve çözücü olarak EtOH:H<sub>2</sub>O (80:20) bileşimi kullanıldığında ulaşılmıştır. Kullanılan yöntem maserasyon, sıcak geri akış ekstraksiyonu ve ultrases destekli ekstraksiyon yöntemlerine kıyasla daha düşük süre ve daha düşük solvent ile gerçekleştirilmiştir. Fakat çalışmada maserasyon, sıcak geri akış ve ultrases destekli ekstraksiyonda 70°C sıcaklık kullanılırken mikrodalga destekli ekstraksiyonda 106°C sıcaklığa çıkmıştır. Çalışmada elde edilen fenolik asit ve toplam flavonoid miktarları sırasıyla 5,0-120,8 mg /g ve 2,5-168,0 mg /g aralıklarında bulunmuştur. Hamzah ve Leo (2015), mikrodalga yöntemini kullanarak farklı sıcaklık, süre ve solvent parametrelerinin etkisini inceleyerek propolis ekstraksiyonu gerçekleştirmişlerdir. Sıcaklık kontrolü olmadan, düşük mikrodalga gücünde ve süreyi uzatarak gerçekleşen propolis ekstraksiyonunda kalitede ve verimde iyileşme gözlemlenmiştir. Aynı zamanda basınç ve etanolik çözücü artırıldığında verimde düşüş tespit edilmiştir.

Mikrodalga destekli ekstraksiyon gıda proseslerinde düşük maliyetli olması, ekstraksiyon süresini ve çözücü kullanımını azaltması gibi avantajları nedeniyle tercih edilmektedir (Bakkaloğlu, 2020). Fakat çözücünün apolar ya da uçucu olması mikrodalga etkinliğini azalttığı için yüksek sıcaklıklar (110-150°C) kullanılarak etkinliğin artırılması sağlanmaktadır. Uygulanan yüksek sıcaklıklar dolayısıyla ürünün çeşitli bileşenlerinin denatürasyona uğraması kaçınılmazdır. Aynı zamanda ön işlem (filtreleme ve santrifüjleme) gerektirdiği için mikrodalga destekli ekstraksiyonun kullanım alanı kısıtlı kalmıştır.

### **1.2.2. Süper kritik karbondioksit ekstraksiyonu**

Süper kritik akışkan, kendi kritik sıcaklığı ve basıncı üzerinde sıcaklık ve basınç uygulanan element veya karışım olarak tanımlanmaktadır (Büyüktünel, 2012). Süper kritik akışkan tek bir faz halinde bulunup gaz ya da sıvı formda bulunmamaktadır. Bu sebepten basınç veya sıcaklık artırılarak sıvılaştırılıp buharlaştırılmaz. Süper kritik akışkan bir gaz ve sıvı arasındaki maddenin ara formunda bulunmaktadır. Sıvılar gibi yoğunluk ve çözünme gücü özelliğine ve gazlar gibi difüzyon, viskozite ve yüzey gerilimi özelliklerine sahiptir (Azmir ve ark., 2013). Bu özellikleri ekstraksiyon işleminde verimin daha yüksek olmasını sağlamaktadır (Sihvonen ve ark., 1999). Aynı zamanda sıvıların tersine süper kritik akışkanlar sıkıştırılabilmekte ve yoğunlukları geniş bir aralıkta değiştirilebilmektedir (Büyüktünel, 2012). Bu sayede de iyi bir çözücü olma özelliği taşımaktadır. Süper kritik akışkanlı ekstraksiyon sistemi; mobil fazlı bir tank, genelde akışkan olarak CO<sub>2</sub>, gazın basınçlandırılması için bir pompa, yardımcı çözücü, çözücü kap, ekstraksiyon kabının içerisine konulduğu bir fırın, fırın içerisindeki yüksek basıncın ölçülmesi ve korunması için bir kontrol cihazı ve bir toplama ünitesinden oluşmaktadır (Şengül ve Topdaş, 2019). Süper kritik akışkan olarak düşük kritik

sıcaklığı ve basıncı olması (31°C, 74 bar) nedeniyle genellikle karbondioksit kullanılır (Temelli ve Güçlü-Üstündağ, 2005). Ayrıca karbondioksitin alev almaması, ucuz olması ve toksik olmaması önemli özellikleridir. Karbondioksit polar olmayan yapıda olduğundan polar olan analitiklerin ekstraksiyonunda modifikatör eklemesi yapılmaktadır (Büyüktünel, 2012). Bu modifikatörler genellikle metanol ve diklorometan olmaktadır.

Machado ve arkadaşları (2015), propolis ekstraksiyonunda süper kritik karbondioksit ekstraksiyonu yöntemini kullanmışlardır. Yapılan çalışmada bu yöntemin ekstraksiyon veriminde artışa neden olmadığı fakat katma değeri yüksek olan ekstraktlar elde edildiği gözlenmiştir. Çalışmada en iyi ekstraktlara 50°C'de, 350 barda ve karbondioksite ek olarak %1 etanol varlığında ulaşılmıştır. Devequi ve arkadaşları (2018), propolis ekstraksiyonunda süper kritik karbondioksit ekstraksiyonu ve geleneksel bir yöntem olan etanol ile ekstraksiyonu karşılaştırmışlardır. Süper kritik karbondioksit ekstraksiyonu için koşullar; 350 bar basınç, 50°C sıcaklık, 60 dakika ekstraksiyon süresi ve yardımcı çözücü olarak %1 etanol seçilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda ekstraksiyon verimi açısından süper kritik karbondioksit yönteminin etanole göre daha düşük olduğu gözlenmiştir.

### **1.2.3. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu**

Gelişmiş çözücü ekstraksiyonu, yüksek basınçlı çözgen ve hızlandırılmış sıvı ekstraksiyonu olarak da adlandırılmaktadır (Nieto ve ark., 2010). Materyal yüksek basınç ortamında tutularak, çözücüler için daha yüksek sıcaklıkları sağlayan malzemeler kullanılır (Büyüktünel, 2012). Yükseltilmiş basınç sayesinde çözücünün çok yüksek sıcaklıklarda sıvı halde kalması sağlanmaktadır. Basınçlı sıvı ekstraksiyonunda yüksek basınç (4-20 MPa) ve yüksek sıcaklıklarda (50-200°C) bile ekstraksiyon gerçekleştirilmektedir (Nakilcioğlu ve Ötleş, 2014). Kullanılan yüksek sıcaklık; van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı ve dipol çekim gibi analit-örnek matriksi etkileşimlerinin bozulmasına neden olarak ekstraksiyon veriminin artmasını sağlamaktadır (Richter ve ark., 1996). Sıcaklık kullanımı moleküller arasındaki adhezyon ve kohezyon kuvvetleri ile desorpsiyon için gerekli olan aktivasyon enerjisinin azaltılmasını sağlar (Büyüktünel, 2012). Sıcaklığın yüksek olması sayesinde çözücünün, çözünenin ve materyalin yüzey gerilimi düşürülerek materyalin ıslanması artırılır. Bu şekilde ekstraksiyonun daha hızlı gerçekleşmesi sağlanır.

Erdoğan ve arkadaşları (2011), yaptıkları çalışmada 4 farklı bölgeden aldıkları propolis örneklerinde basınçlı sıvı ekstraksiyonu yöntemini kullanarak fenolik maddelerin geri kazanımını araştırmışlardır. Yöntemde 40°C sıcaklık, 1500 psi basınç, çözücü olarak ise etanol:su:HCl (70:25:5 v/v/v) ve 15 dakika işlem süresini kullanmışlardır. Ekstraksiyon sonunda geri kazanımın %97,2 ile %99,7 arasında olduğu bildirilmiştir.

### **1.2.4. Ultrases destekli ekstraksiyon**

Elastik özelliklere sahip fiziksel bir ortamda basınç dalgalarının yayılması sonucunda ultrases etkisi oluşmaktadır (Tavman ve ark., 2009). Mekanik titreşimler mekanik basınç dalgalarına



dönüşmektedir. Bu dönüşüm ile enerji ortama ve ortamda dalgayla temas eden maddeye aktarılmaktadır. Ses dalgaları insanların algılayabildiği 16 Hz ile 20 kHz arasında iken salınımlı ses dalgaları olan ultrasonik ses dalgalarının frekans aralığı insanların duyma eşiğinin üzerinde olup 20 kHz ile 10 MHz aralığındadır (Şengül ve Topdaş, 2019). Ultrasonik dalgalar frekans ve yoğunluklarına göre yüksek frekanslı ve yüksek yoğunluklu ses dalgaları olarak ikiye ayrılırlar. Yüksek frekanslı olan ses dalgaları 100 kHz'in üzerinde olup düşük yoğunluğa sahiptirler.

Ultrasenin gıda endüstrisinde çeşitli kullanım uygulamaları bulunmaktadır. Gaz giderme, kristalizasyon, emülsifikasyon, ekstraksiyon, temizleme, mikrobiyal inaktivasyon ve dekontaminasyon bu uygulamaların başlıcalarıdır (Tavman ve ark., 2009). Aynı zamanda gıdaların fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde ve gıda kalite kontrolünde de kullanılır. Yüksek enerjili ultrasonik ses dalgaları ise yüksek yoğunlukta olup 20 kHz ile 40 kHz aralığındaki düşük frekanslı ultrasonik ses dalgalarıdır. Ortama ses salınımlıyla birlikte salınan yüksek enerji sayesinde mekanik enerji artırılarak ısı ve kütle transferi hızlandırılmaktadır. Bu sayede gıda endüstrisinde daha çok uygulama alanı bulmaktadır.

Ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi, çeşitli frekanslardaki ses dalgalarının ekstrakte edilecek hücreye gönderilip kavitasyon kabarcıkları yapma prensibine dayanmaktadır (Aydın ve ark., 2021). Bu prensiple hücre yapısı bozularak bileşenler açığa çıkarılmaktadır. Aynı zamanda hücre gözeneklerinin genişletilip ses dalgalarının daha fazla alana nüfus etmesiyle ekstraksiyon işleminin hızlanması sağlanmaktadır (Pobiega ve ark., 2019). Ayrıca bu işlemler malzeme ve çözücü arasındaki kütle alışverişini hızlandırdığından ekstraksiyon verimini de arttırmaktadır (Mason ve Vinatoru, 2017).

Ultrases destekli ekstraksiyonun etkili bir şekilde uygulanması için ekstraksiyonu etkileyen parametrelerin doğru düzenlenmesi gerekmektedir. Ultrases destekli ekstraksiyonda verimi etkileyen başlıca parametreler; güç, sıcaklık, yoğunluk ve çözgendir (Şengül ve Topdaş, 2019).

Güç ve sıcaklıkla ilgili yapılan çalışmalar yüksek ultrasonik gücün kesme kuvvetini artırarak materyalde değişikliklere neden olduğunu göstermiştir. Genel olarak, ultrases destekli ekstraksiyonda en yüksek verimliliği elde etmek ultrases gücünün artırılmasıyla birlikte çözücü-katı temasını arttırarak da sağlanmaktadır. Bunun için ise nem içeriğinin azaltılması ve ekstraksiyon süresini kısaltacak şekilde sıcaklık ayarlamasının yapılması gerekmektedir (Chemat ve ark., 2017). Ultrases destekli ekstraksiyon işleminde ekstraksiyon verimine çözücünün viskozite, yüzey gerilimi ve buhar basıncı gibi özellikleride etki etmektedir (Mason ve Lorimer, 2002). Örneğin, viskozite ve yüzey geriliminde artış olması moleküler arası etkileşimi artırarak kavitasyon eşiğinde artış sağlamaktadır. Kavitasyon eşiğindeki bu yükselme materyalin ultrasonik hareketlere karşı direncini arttırmaktadır. Ayrıca düşük buhar basıncına sahip çözücülerde kavitasyon kabarcıklarının çöküşü daha yoğun gerçekleşmektedir (Santos ve ark., 2009). Bu nedenle yüksek buhar basıncına sahip çözücüler yerine düşük buhar basıncına sahip çözücüler daha çok kullanılmaktadır.

Yapılan bir çalışmada propolisin etanol ile ekstraksiyonunda ultrases uygulanmasının ekstraksiyon süresini ve kullanılan etanol miktarını azalttığı gözlemlenmiştir (Yeo ve ark., 2015). Kayabaşı (2019), yaptığı çalışmada propolis ekstraksiyonunda maserasyon yöntemi, ultrases destekli ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyonu kullanarak toplam fenolik ve flavonoid madde miktarında en yüksek değerleri maserasyon ve ultrases destekli ekstraksiyon yöntemlerinde bulmuştur. Başka bir çalışmada ise propolisten yüksek oranda fenolik bileşik elde etmek için farklı teknikler karşılaştırılmıştır (Oroian ve ark., 2020). Bu teknikler %70 etanol kullanılarak, çift maserasyon (oda sıcaklığında, 24 saat, 250 rpm'de sürekli çalkalama), çift mikrodalga uygulaması (140 W'da, 1 dakika) ve çift ultrases destekli ekstraksiyon (20 kHz'de, 15 dakika) olarak uygulanmıştır. Ekstraksiyon verimliliği; toplam fenolik içerik, flavonlar, flavanol, flavanon ve dihidroflavonol içeriğine göre ölçülmüştür. Çalışmada ultrasonik ekstraksiyonun mikrodalga ekstraksiyonu ve maserasyona göre daha yüksek bir ekstraksiyon verimine sahip olduğu bulunmuştur. Propolis ekstraksiyonunun etkin bir şekilde yapılabilmesinde kullanılan yöntem kadar çözücüde önemli bir parametredir. Ekstraksiyon işleminde genel olarak etanol kullanılsa da ilerleyen teknolojiyle beraber yeşil çözücüler kullanılmaya başlanmıştır (Aydın ve ark., 2021).

#### **1.2.5. Derin ötektik çözücü ekstraksiyonu**

Ekstraksiyon işlemi için çok çeşitli çözücülerden faydalanılmaktadır. Bu çözücüler sayesinde propolisin ekstraksiyon etkinliğinin artması sağlanmaktadır. Bu sebeple en uygun çözücülerin seçilmesi büyük önem taşımaktadır. Ekstraksiyon sonucunda propolis endüstride kullanıma kazandırılmaktadır. Bu sayede gıda, ilaç gibi bir çok sektörde kullanılabilir. Bu sayede gıda, ilaç gibi bir çok sektörde kullanılabilir.

Ekstraksiyon işleminde hıza etki eden en önemli parametrelerden biri çözücü seçimidir (Li ve ark., 2011). Propolis suda çok az çözünür. Bu nedenle ekstraksiyon işleminde sıklıkla kullanılan çözücü yüksek çözünürlük sağladığı için genellikle etanoldür (Şuran ve ark., 2021). Etanol, ekstraksiyon işleminde tek başına kullanılabilirdiği gibi etanol-su karışımı şeklinde de kullanılmaktadır (Taddeo ve ark., 2016). Etanol dışında kullanılan diğer çözücüler ise gliserin, propilen glikol, zeytinyağı, metilen klorür, etil asetat, aseton, diklorometan, hegzandır (Tosi ve ark., 1996; Segueni ve ark., 2017; Ghamdi ve ark., 2017; Ertürk ve ark., 2014; Mohtar ve ark., 2017).

Gelişen teknolojiyle beraber kimyasal kullanımında azalmaya gidilip çevre dostu, geri dönüşüm olanaklı ve yenilenebilir çözücü arayışı artmıştır. Bu alanda sürdürülen çalışmalarda derin ötektik çözücüler (DÖÇ) ön plana çıkmıştır. Derin ötektik çözücüler, belli oranlarda karıştırılan çözücülere ve kendi bileşenlerinden daha düşük erime noktasına sahip homojen karışımlardır (Dai ve ark., 2013). Bu çözücüler toksik olmayan hidrojen bağ alıcısı (HBA) (kuaterner amonyum, tetrakilamonyum ve fosfonyum tuzları) olma potansiyeline sahip ve hidrojen bağı verici (HBV) (asitler, alkoller, aminler ve karbonhidratlar) özelliğe sahip iki bileşenden oluşmaktadır (Zhang ve ark., 2012). DÖÇ'ler saflaştırma gerektirmediğinden hazırlanması kolay, düşük maliyetli ve düşük toksisiteye sahip çözücülerdir (Palos ve ark.,

2022). Aynı zamanda düşük buhar basıncına, yanmazlık ve suya karşı tepkisizlik gibi kimyasal özelliklere de sahiptirler (Smith ve ark., 2014). DÖÇ'lerin kolay hazırlanması, düşük maliyette olması ve çevre dostu olması çeşitli alanlarda (organik ekstraksiyonlar, elektrokimya gibi) kullanılmak için ilgi görmesine sebep olmuştur (Dai ve ark., 2013). DÖÇ'ün etkinliğindeki en önemli parametreler kullanılan bileşenlerin yanı sıra su miktarı, viskozite ve yoğunluktur (Palos ve ark., 2022). Bazı çalışmalar, suyun DÖÇ'lerin kimyasal yapısı için önemli bir etken olduğunu ve hidrojen bağı alıcısı ile hidrojen bağı vericisinin etkileşimini güçlendirdiğini bildirmektedir (Ma ve ark., 2018). Diğer yandan su miktarındaki artış DÖÇ'ün yoğunluğunda ve viskozitesinde azalmaya neden olmakta ve böylece bağların etkisini azaltıp DÖÇ'ün etkinliğini düşürebildiği de yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Bi ve ark., 2020; Mbous ve ark., 2017). Dolayısıyla DÖÇ hazırlamada kullanılacak su miktarı büyük önem teşkil etmektedir.

Koutsoukos ve arkadaşları (2019), derin ötektik çözücü kullanarak propolis ve bazı gıda atıklarında (kayısı posası, karides başları) ultrases ve mikrodalga destekli ekstraksiyon gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada derin ötektik çözücü olarak kolin klorür-tartarik asit (2:1) kullanılmıştır. Derin ötektik çözücü kullanılan ultrases destekli ekstraksiyon sonucunda propoliste toplam flavonoid içeriği, kondense tanen içeriği ve antioksidan kapasitesi açısından mikrodalga destekli ekstraksiyona göre daha iyi sonuçlara ulaşılırken mikrodalga destekli ekstraksiyonun gıda atıklarında daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmada derin ötektik çözücülerin propolis ekstraksiyonu için uygun olduğu ve geleneksel yöntemlere kıyasla kullanılabilecek daha çevreci bir yöntem olduğu bildirilmiştir. Funari ve arkadaşları (2019), propolis ekstraksiyonu için farklı derin ötektik çözücüler kullanarak etanole alternatif bir çözücü araştırmışlardır. Bu amaçla kullanılan DÖÇ'ler kolin klorür-propilen glikol (1:1), kolin klorür-propilen glikol (1:2), kolin klorür-laktik asit-su (1:2:2), laktik asit-su (85:15), kolin klorür-laktik asit-su (1:1:1), L-lizin-su (1:10), kolin klorür-gliserol-su (1:2:1) şeklindedir. Ekstraksiyon 50°C'de su banyosunda ve bir karıştırma çubuğu kullanarak 3 saatlik çalkalama işlemiyle gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada derin ötektik çözücülerin propolis ekstraksiyonuna uygun olduğu gözlenmiştir. Ayrıca hem ekstraksiyon verimi hemde 17 ay boyunca stabilite incelendiğinde kolin klorür-propilen glikol (1:2) ve kolin klorür-laktik asit-su (1:1:1) çözücülerinin hidroetanol ve propilen glikol çözücülerinin yerini alabilecek en iyi adaylar olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmalar incelendiğinde propolis ekstraksiyonu için derin ötektik çözücülerin kullanımının uygun olduğunu ve uygun çözücüler kullanıldığında piyasada satılan etanol bazlı propolis ekstraktlarına alternatif yeni ekstraktlar elde edilebileceği tespit edilmiştir. Fakat derin ötektik çözücülerle yapılan çalışmalar arasında propolis ekstraksiyonu üzerine sınırlı çalışma bulunmaktadır.

Günümüzde ekstraksiyonda DÖÇ kullanımının artmasıyla beraber farklı DÖÇ kombinasyonları ön plana çıkmış ve yeni formülasyonlar denenmeye başlanmıştır. Bu formülasyonda kullanılan kimyasallardan biri ise propilen glikol/propandioldür. Propilen glikol renksiz ve tatsız bir sıvı olup çok az miktarda toksik madde içermektedir (Altuntop, 2005). Vücuda alındığı durumda bir zararı bulunmamaktadır. Sağlık açısından bir zararı bulunmadığından kozmetik, gıda ve

ilaç sanayinde sıklıkla kullanılmaktadır. Propilen glikol, propolis ekstraksiyonunda sulu çözelti olarak kullanılabilirdiği gibi etkinliğini arttırmak amacıyla farklı çözücülerle birleştirerek DÖÇ olarak kullanılmaktadır (Sönmez ve ark., 2005; Funari ve ark., 2019).

Sönmez ve arkadaşları (2005), yapmış oldukları çalışmada propolisin etanol ve propilen glikol kullanarak ekstrakte edilen propolisin diş eti sağlığındaki etkilerini incelemiş ve propilen glikolünde alkollü örnekler gibi kullanılabilirdiğini gözlemlemişlerdir. Başka bir çalışmada su bazlı propilen glikol çözücüsüne ek olarak farklı su bazlı çözücülerde kullanılarak mikrodalga destekli propolis ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve bu çalışmalarda fenolik madde miktarında artış olduğu saptanmıştır (Juodeikait ve ark., 2022). Funari ve arkadaşları (2019), propolis ekstraksiyonunda farklı DÖÇ'lerle birlikte kolin klorür-propilen glikol (1:1) çözücüsünü de denemişlerdir. Bu çalışmada kolin klorür-propilen glikol çözücüsü diğer çözücülere kıyasla en iyi çözücü özelliği göstermiştir.

Literatürde propolis ekstraksiyonunda derin ötektik çözücülerin kullanıldığı sınırlı sayıda çalışma yapılmış olmakla birlikte fenolik madde eldesi üzerine farklı materyaller kullanılan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, Barbieri ve arkadaşları (2020), biberiyeden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu işleminde derin ötektik çözücülerini kullanmışlardır. Bu çalışmada derin ötektik çözücü olarak gliserol:kolin klorür, laktik asit:kolin klorür, propandiol:kolin klorür, oksalik asit:kolin klorür ve karşılaştırma için etanol (%100) kullanmışlardır. DÖÇ karışımlarına yüksek viskoziteyi düşürmek için saf su ilavesi yapmışlardır. Çalışmada DÖÇ kullanılan ekstraktların antioksidan kapasitelerinin etanol kullanılan ekstrakttan daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Tarımsal gıda sanayi yan ürünlerinden fenolik bileşikler elde etmek için yapılan çalışmada ise yeşil çözücü olarak laktik asit, glikoz ve %15 su kombinasyonu ve ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır (Cunha ve Fernandes, 2018). Kullanılan yeşil çözücü, geleneksel çözücüler (metanol ve su) ile ekstraksiyon verimi açısından karşılaştırılmış ve kullanılan yeşil çözücünün daha yüksek bir ekstrakte edebilirlik gösterdiği belirlenmiştir. Chanioti ve Tzia (2018), zeytin pirinasından fenolik bileşiklerin eldesinde farklı ekstraksiyon yöntemleri ve çözücüler kullanılarak bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Ekstraksiyon yöntemi olarak yüksek hidrostatik basınç, mikrodalga ve ultrases destekli ekstraksiyon yöntemlerini kullanmışlardır. Çözücü olarak sitrik asit:kolin klorür:su, laktik asit:kolin klorür:su, maltoz:kolin klorür:su ve gliserol:kolin klorür:su kullanılmıştır. En iyi sonuçlara sitrik asit:kolin klorür:su ve laktik asit:kolin klorür:su çözücülerini ve yüksek hidrostatik basınç ve mikrodalga destekli ekstraksiyon ile ulaşılmıştır. Başka bir çalışmada ötektik çözücüler kullanılarak ladin kabuğundan fenolik madde ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir (Jablonsky ve ark., 2020). Ekstraksiyon için laktik asit, 1,3-propandiol, 1,3-bütandiol, 1,4-bütandiol ve 1,5-bütandiol içeren kolin bazlı derin ötektik çözücüler farklı molar oranlarda su eklenerek kullanılmıştır. Kullanılan DÖÇ'lerin yoğunluk, viskozite, iletkenlik ve kırılma indisleri incelenmiş ve tüm DÖÇ'lerin Newton sıvıları gibi davrandığı gözlemlenmiştir. Elde edilen ekstraktların fenolik madde içeriği ve antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. En yüksek antioksidan aktiviteye (%95) kolin klorür, laktik asit, 1,3-bütandiol ve su (1:5:1:1)

kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon ile ulaşılmıştır. Ayrıca çalışma sonucunda antioksidanların etkin bir şekilde ekstraksiyonu için DÖÇ kullanımının uygun olduğu bildirilmiştir. Domates posasının kozmetik emülsiyon formülasyonlarına dönüştürülmesinde derin ötektik çözücülerle ekstraksiyon işlemi kullanılmıştır (Vasyliiev ve ark., 2022). Çalışmada kolin bazlı DÖÇ'ler kullanılarak ultrases destekli ekstraksiyon yapılmıştır. Kullanılan DÖÇ formülasyonları kolin klorür:1,2-propandiol (1:2 v/w):su (%10 w/w), kolin klorür:laktik asit (1:2 v/w):su (%10 w/w) şeklindedir. Ekstraktların fenolik bileşik içeriği 37,23 ile 52,33 µg/g arasında değişmektedir. Antioksidan aktiviteleri ise 408 ile 511,18 µg/g arasında olup, antioksidan içeriğinin laktik asit içeren kolin bazlı DÖÇ'ün propandiol içeren kolin bazlı DÖÇ'e göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca kullanılan DÖÇ'lerin düşük oksidasyon potansiyeli değerine sahip oldukları gözlenmiştir. Çalışma sonucunda kullanılan DÖÇ'lerin domates posasından yüksek fenolik içeriğine sahip kozmetik formülasyon elde etmek için kullanılabilceği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda ise artan çevre ve sağlık bilincine ilaveten gelişen teknolojik uygulamalar göz önünde bulundurularak piyasada satılan etanol bazlı propolis ekstraktlarına alternatif oluşturabilecek yenilikçi ve çevreci uygulamalar ile üretilen propolis ekstraktları araştırılmıştır. Bu amaçla literatür verileri ve yapılan ön denemeler sonucunda 12 farklı derin ötektik çözücü seçilerek propolisin ultrases destekli ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon etkinliğinin belirlenmesi amacıyla propolis ekstraktlarında toplam fenolik miktarı, toplam flavonoid miktarı ve antioksidan aktivite belirlenmiştir. Ekstraksiyon etkinliğinin kıyaslanması için ise propolis aynı şartlarda etanol (%90) ile de ekstrakte edilerek analizlerden elde edilen veriler karşılaştırılmıştır. Bununla birlikte fenolik miktarı, flavonoid miktarı ve antioksidan aktivite açısından en yüksek değerlere ulaşılan çözücüler kullanılan ekstraktlarda antimikrobiyal aktivite değerleri de incelenmiştir. Yapılan bu çalışma ile propolis ekstraksiyonunda geleneksel çözücüler yerine kullanılabilcek derin ötektik çözücü formülasyonları geliştirilip yapılan analizler ile kullanım olanakları incelenmiştir. Böylece daha sağlıklı ve çevreci bir yaklaşım ile çözücü kaynaklı olası toksik kaygı azaltılarak sağlığa bir çok faydası bulunan propolisin tüketiminin arttırılması hedeflenmiştir. Aynı zamanda literatürde propolis ekstraksiyonu için yapılan çalışmalarda kullanılan derin ötektik çözücülere alternatif çözücüler araştırılarak farklı derin ötektik çözücülerin etkinliği değerlendirilmiş böylece literatüre katkıda bulunulması hedeflenmiştir.

## 2. BÖLÜM

### MATERYAL VE METOT

#### 2.1. Materyal

Çalışmamızda yerel bir üreticiden temin edilen ham propolis örnekleri etüvde (Memmert, UN 55, Almanya) düşük sıcaklıkta (40°C'de) 2 gün boyunca kurutulmuştur. Kurutulan ham propolis boyutu 420 mikron olacak şekilde kahve öğütücüsünden geçirilerek (Resim 2.1.) çalışmamızda kullanılacak deney materyali hazırlanmıştır. Homojen propolis materyalinin nem miktarı hızlı nem tayin cihazıyla (Shimadzu Moisture Analyzer, TypeMOC634) ölçülüp,  $1,38 \pm 0,11$  olarak belirlenmiştir. Hazırlanan örnekler analize kadar kahverengi şişelerde  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir. Analizlerde kullanılan 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, Almanya) temin edilmiştir.



Resim 2. 1. Propolis

#### 2.2. Metot

##### 2.2.1 Propolisin ultrases destekli ekstraksiyonu

**Derin ötektik çözücü ekstraksiyonu** Propolisden biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunda öncelikle kullanılacak derin ötektik çözücüler hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılan derin ötektik solventler yapılan ön denemeler sonucu belirlenmiş olup belirlenen 12 adet DÖÇ'ün bileşimi Tablo 2.1.' de sunulmuştur. DÖÇ'ler Tablo 2.1.'de verilen molar konsantrasyonlarda hazırlanan karışımların 60°C'de, 90 dakika süresince ve %100 genlik ile ultrasonik su banyosunda (37 kHz, Sonorex DigiPlus DL 255 H Bandelin) ultrasese tabi tutulması ile hazırlanmıştır. Hazırlanan derin ötektik çözücüler Hikmawanti ve arkadaşlarının (2021)

çalışmasında en iyi muhafaza yöntemi olarak belirtilen koşullarda analizlere kadar (-20±2°C) muhafaza edilmiştir.

Hazırlanan derin ötektik çözücüler 1:300 (g/mL) katı solvent oranında propolis ile karıştırıldıktan sonra ekstraksiyon işlemi 50°C sıcaklıkta, 45 dakika ve %100 genlikte ultrasonik su banyosunda gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 2. 1.** Derin ötektik çözücü bileşimi

	<b>Bileşen 1</b>	<b>Bileşen 2</b>	<b>Bileşen 3</b>	<b>Molar Oran</b>
<b>DÖÇ 1</b>	Oksalik asit	Fruktoz	-	2:1
<b>DÖÇ 2</b>	Oksalik asit	Propandiol	-	1:4
<b>DÖÇ 3</b>	Oksalik asit	Kolin Klorür	Gliserol	1:1:1
<b>DÖÇ 4</b>	Tartarik asit	Fruktoz	-	2:1
<b>DÖÇ 5</b>	Tartarik asit	Propandiol	-	1:4
<b>DÖÇ 6</b>	Tartarik asit	Kolin Klorür	Gliserol	1:1:1
<b>DÖÇ 7</b>	Sitrik asit	Fruktoz	-	2:1
<b>DÖÇ 8</b>	Sitrik asit	Propandiol	-	1:4
<b>DÖÇ 9</b>	Sitrik asit	Kolin Klorür	Gliserol	1:1:1
<b>DÖÇ 10</b>	Laktik asit	Fruktoz	-	2:1
<b>DÖÇ 11</b>	Laktik asit	Propandiol	-	1:4
<b>DÖÇ 12</b>	Laktik asit	Kolin Klorür	Gliserol	1:1:1

**Etanol ekstraksiyonu** Propolis biyoaktif bileşenlerinin ekstraksiyonunda derin ötektik çözücülerin kullanılmasının yanı sıra ekstraksiyon etkinliğinin geleneksel çözücülerle kıyaslanması amacıyla ekstraksiyon işlemi %90 (v/v) etanol kullanılarak da gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 0,1 g propolis örneği 30 mL etanol ile karıştırılarak 50°C sıcaklıkta, 45 dakika ve %100 genlikte ultrasonik su banyosunda ekstrakte edilmiştir.

Ekstraksiyon işleminin ardından 5000 rpm'de 15 dakika süresince santrifüjlenen (Sigma, 3-30K, Almanya) örneklerin süpernatant kısmı uygun şekilde seyreltilerek biyoaktif bileşen analizinde kullanılmıştır.

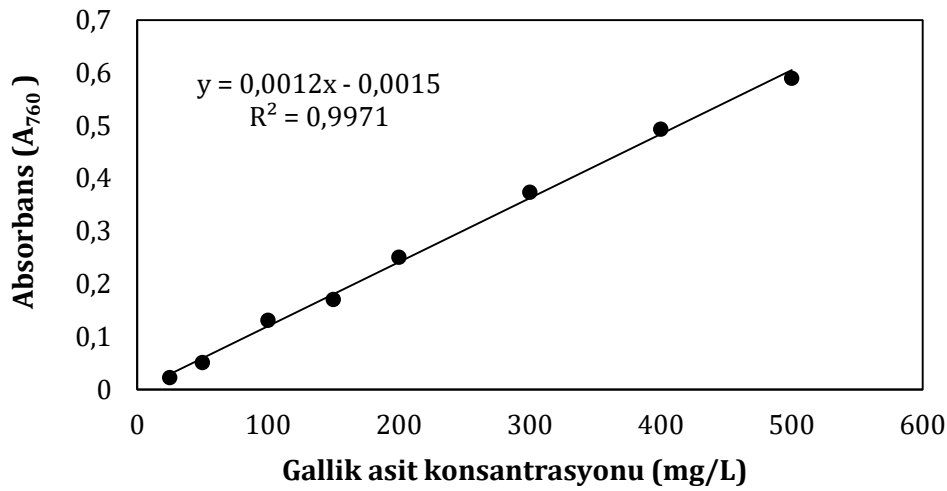
### 2.2.2. pH, briks ve elektriksel iletkenlik değerlerinin tayini

Tablo 2.1.'de belirlenen oranlarda hazırlanan derin ötektik çözücülerin suda çözünür kuru madde (briks) değerleri refraktometre (ATAGO Pocket Refractometer PAL-3, Almanya), pH değerleri pH metre (Adwa AD1000, Macaristan), elektriksel iletkenlik değerleri ise iletkenlik

ölçme cihazı (Combo by HANNA Ph &EC waterproof, HI 98129, Romanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### 2.2.3. Toplam fenolik madde tayini

Propolis ekstraktlarında toplam fenolik madde miktarı, Folin Ciocalteu metodu ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Çakır, 2022). Analiz için öncelikle bir deney tüpüne 50 µL seyreltilmiş örnek koyulmuş ve üzerine 2,5 mL folin ayracı (0,2 N) eklenmiştir. Karışım vortexlenerek 3 dakika beklenmiş ve sonrasında 2 mL %7,5'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi ilave edilerek tekrar karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım 1 saat karanlık ortamda bekletildikten sonra 760 nm'de şahide karşı absorbansı ölçülmüştür. Örneklerin toplam fenolik madde miktarları gallik asit kullanılarak (25-500 mg/L) hazırlanan standart eğri denkleminde hesaplanmıştır (R<sup>2</sup>=0,9971). Sonuçların hesaplanmasında kullanılan standart eğri grafiği Şekil 2.1.' de verilmiş olup sonuçlar "mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g propolis" olarak sunulmuştur.



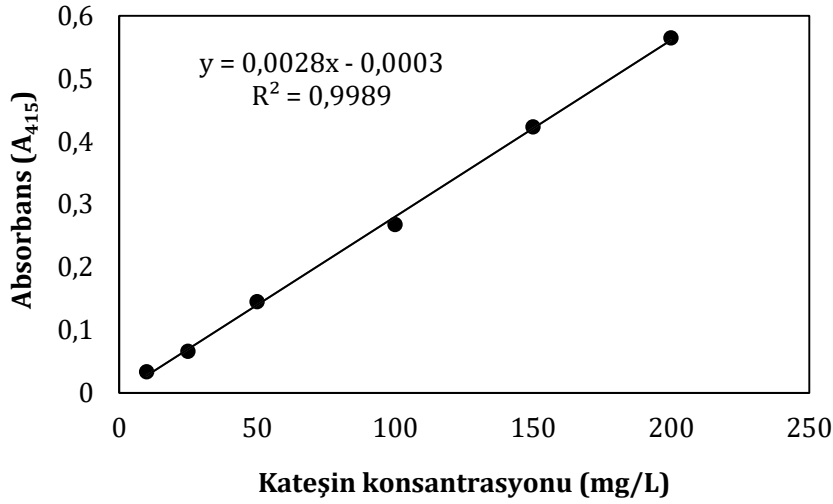
Şekil 2. 1. Gallik asit kalibrasyon eğrisi

### 2.2.4. Toplam flavonoid tayini

Propolis ekstraktlarının toplam flavonoid içerikleri spektrofotometrik (Shimadzu, UV-1800, Japonya) olarak 415 nm'de yapılan ölçüm ile belirlenmiştir (Popova ve ark., 2007). Analiz için seyreltilmiş örnek ekstraktlarından 1 mL alınarak deney tüpüne koyulmuş ve üzerine 300 µL NaNO<sub>2</sub> (%5) eklenerek karıştırılmıştır. 5 dakika bekletilen karışıma 300 µL AlCl<sub>3</sub> (%10) eklenip karıştırma ve bekletme işlemi tekrarlanmıştır. Daha sonra karışıma 2 mL NaOH (1M) eklenerek tüp hacmi 10 mL'ye tamamlanmıştır. Tüp içeriği 30 dakika süresince karanlıkta bekletildikten sonra absorbans ölçümleri yapılmıştır. Propolis örneklerindeki toplam flavonoid miktarı kateşin standart eğrisi kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla 10-200 mg/L konsantrasyon



aralığında kateşin çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan kateşin çözeltileri de propolis ekstraktlarıyla aynı deney prosedürüne tabi tutularak absorbanları 415 nm’de ölçülmüştür. Elde edilen değerler ile kateşin kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 2.2.). Örneklerin toplam flavonoid miktarları elde edilen kalibrasyon denkleminde hesaplanmış olup sonuçlar “mg kateşin eşdeğeri (CE)/g” olarak sunulmuştur.



Şekil 2. 2. Kateşin kalibrasyon eğrisi

### 2.2.5. Antioksidan aktivite tayini (ABTS)

Çalışmamızda antioksidan aktivitenin belirlenmesi amacıyla yaygın olarak kullanılan yöntemlerden bir olan ABTS yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, mavi/yeşil renkli ABTS<sup>•+</sup> radikal katyonu tarafından tutulan antioksidatif bileşiklerin etkisiyle meydana gelen renk değişiminin spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır. Propolis ekstraktlarında antioksidan aktivitenin belirlenmesinde uygulanan analiz basamakları Çakır (2022) tarafından açıklandığı şekilde yapılmıştır. Analiz için öncelikle propolis ekstraktları PBS ile uygun oranda seyreltilerek hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan ABTS<sup>•+</sup> radikal çözeltisinin başlangıç absorbans değeri (0,700±0,02) spektrofotometrede (Shimadzu, UV-1800, Japonya) PBS çözeltisine karşı 734 nm’de ölçülmüştür. Ekstraktların ölçümü için ise küvete 1900 µL seyreltik ABTS<sup>•+</sup> çözeltisinden koyularak üzerine 100 µL örnek ilave edilmiştir. Bu işlemle birlikte kronometre başlatılarak 6 dakika beklenmiştir. Süre sonunda karışımın absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrede 6 dakika sonra okunan bu değer ve ABTS<sup>•+</sup> radikal çözeltisinin başlangıç değeri baz alınarak % inhibisyon oranı hesaplanmıştır. % inhibisyon oranının hesaplanmasına ilişkin formül Eşitlik 2.1.’de sunulmuştur.

$$\text{Inhibisyon oranı (\%)} = [(A_0 - A_6) / A_0] \times 100$$

(Eşitlik 2.1.)

$A_0$ =Başlangıç absorbans değeri

$A_6$ =Son Absorbans değeri

Propolis ekstraktlarında antioksidan aktivitelerinin hesaplanması için 30-250  $\mu$ M konsantrasyon aralığında Trolox standart çözeltisi kullanılmıştır. Hazırlanan Trolox standart çözeltilerine örneklerle aynı spektrofotometrik analiz aşamaları uygulanmıştır. İnhibisyon değerleri ile Trolox konsantrasyonuna karşı grafik oluşturulmuş ve Trolox standart eğrisi ( $R^2 = 0,998$ ) ve eğriyi tanımlayan eşitlik ( $y=488,11x+7,5061$ ) elde edilmiştir. Sonuçlar “ $\mu$ mol TEAC (Trolox eşdeğeri antioksidan kapasitesi)/g” cinsinden verilmiştir.

### 2.2.6. Antimikrobiyal aktivite

Propolis ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesinde biyoaktif bileşen içeriği bakımından maksimum düzeyde sonuçların elde edildiği DÖÇ 8, DÖÇ 11 ve etanol (%90) ile hazırlanan ekstraktlar kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite Hesieh ve ark. (2001) tarafından önerilen disk difüzyon yöntemi kullanılarak Escherichia coli ATCC 25922 (Gram-negatif) ve Staphylococcus aureus ATCC 25923 (Gram-pozitif) üzerinde test edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan bakteriler Ortadoğu Teknik Üniversitesi Gıda Güvenliği Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Ekstraktlar 1:300 g/mL katı solvent oranı, 50°C sıcaklık, 45 dakika süre ve %100 genlik koşullarında hazırlandıktan sonra 0,1 g/10 mL konsantrasyona erişinceye kadar 50°C’de rotary evaporatörde (IKA HB10) konsantre edilmiştir. Bakteriler Mueller-Hinton sıvı besi yerinde 20 saat 30°C ve pH 7’de geliştirildikten sonra her bir kültürün optik yoğunlukları 660 nm’de belirlenerek toplam sayı  $1 \times 10^8$  hücre/ml olacak şekilde ayarlanıp Mueller-Hinton agar besi yerine aktarılmıştır. Daha sonra 6 mm çapındaki steril antimikrobiyal disklerine 10  $\mu$ L ekstrakt enjekte edilmiş, ardından diskler agar besiyerinin merkezine hafifçe bastırılarak yerleştirilmiştir. Negatif kontrol olması amacıyla aynı işlem saf etanol ile de gerçekleştirildikten sonra hazırlanan petriyeler 35°C’de 1 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan inhibisyon zonları mm cinsinden ölçülmüştür.

### 2.2.7. Fenolik bileşen dağılımının LS-MS/MS ile belirlenmesi

Propolis ekstraktlarında fenolik dağılımın belirlenmesi LC-MS/MS (Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi, Thermo Scientific) kullanılarak Hitit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Merkezi’nde (HÜBTÜAM) gerçekleştirilmiştir. Bölüm 2.2.1.’de belirtilen koşullarda ekstrakte edilen propolis örnekleri 0,45  $\mu$ m’lik filtreden süzülerek viallere alınmış ve bekletilmeden analiz edilmiştir. Fenolik bileşenlerin LC-MS/MS kullanılarak kantitatif olarak belirlenmesinde %0,1 asitlendirilmiş su (%A) ile metanol (%B) çözücü olarak seçilmiştir. Çözücü akış hızı 0,7 mL/dk ve kolon (ODS HYPERSİL 4,6\*250 mm 5 $\mu$ m kolon) fırını sıcaklığı 30 °C, enjeksiyon hacmi 20  $\mu$ L olarak belirlenmiştir. Kullanılan yönteme ait elüsyon profili Tablo 2.2.’de ve cihaz koşulları Tablo 2.3.’de verilmiştir.

**Tablo 2. 2.** Elüsyon profili

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

**Tablo 2. 3.** Cihaz koşulları

Cappilary 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 ( $\mu$ A)	4,0

### **2.2.8. İstatiksel analiz**

Tüm analizler 2 tekerrürlü ve 2 paralelli olarak yürütülmüş olup verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS 20.0 programından yararlanılmıştır. Değişkenler tek yönlü varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. Ortalamalar arasındaki istatistiksel farklılıklar, Duncan'ın çoklu karşılaştırma testleri kullanılarak %5 anlamlılık düzeyinde belirlenmiştir.

### 3. BÖLÜM

#### ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

##### 3.1. Derin Ötektik Çözücülerde pH, Briks ve Elektriksel İletkenlik Değerleri

Propolis ekstraksiyonundaki etkinliklerini incelemek amacıyla kullanılan çözümlere ait pH, briks ve elektriksel iletkenlik değerleri ekstraksiyon sıcaklığı olan 50°C'de ölçülmüş ve sonuçlar Tablo 3.1.'de sunulmuştur. Kullanılan çözümlerin pH değerleri 0,30 ile 3,91, briks değerleri %19,60-%42 ve elektriksel iletkenlik değerleri 177,50-456,50  $\mu\text{S/cm}$  aralığında değişmektedir. Elde edilen veriler istatistiksel olarak incelendiğinde en yüksek elektriksel iletkenlik değeri laktik asit-kolin klorür-glisero1 çözücüsünde tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). Hidrojen bağı vericisi olarak laktik asidin kullanıldığı derin ötektik çözümlerin diğerkombinasyonlara göre genellikle daha yüksek elektriksel iletkenlik değeri gösterdiği belirlenmiştir. İlaveten tartarik asit-kolin klorür-glisero1 (1:1:1) ile hazırlanan derin ötektik çözücüsünde de yüksek elektriksel iletkenlik değeri saptanmıştır. Propolis ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılan etanolün elektriksel iletkenlik değeri ile kıyaslandığında ise laktik asit-propandiol ve laktik asit-kolin klorür-glisero1 derin ötektik çözümlerinin daha yüksek elektriksel iletkenlik değerlerine sahip olduğu belirlenirken diğerközümlerin genellikle etanole yakın elektriksel iletkenlik gösterdiği belirlenmiştir.

**Tablo 3. 1.** Derin ötektik çözümlerin pH, Briks ve elektriksel iletkenlik değerleri

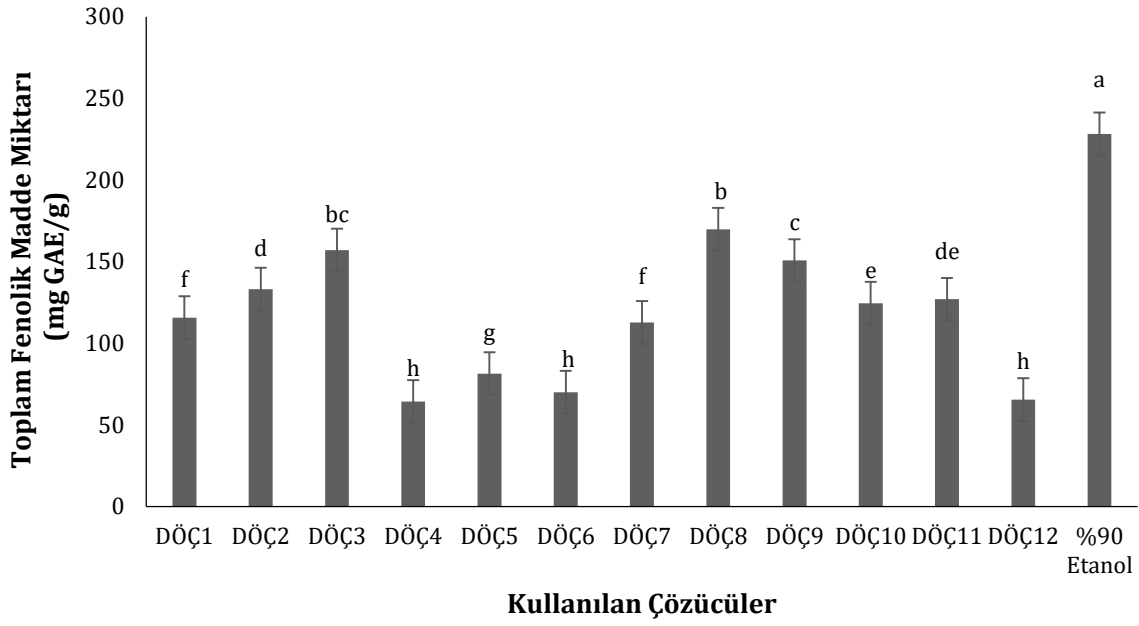
KOD	pH	BRIKS (%)	ELEKTRİKSEL İLETKENLİK ( $\mu\text{S/cm}$ )
DÖÇ 1	0,30±0,01 <sup>ı</sup>	24,60±0,14 <sup>ı</sup>	195,50±2,12 <sup>ı</sup>
DÖÇ 2	0,64±0,01 <sup>h</sup>	25,95±0,07 <sup>fg</sup>	218,00±1,41 <sup>ı</sup>
DÖÇ 3	0,11±0,01 <sup>i</sup>	25,75±0,07 <sup>g</sup>	287,50±0,71 <sup>e</sup>
DÖÇ 4	0,75±0,01 <sup>g</sup>	32,25±0,07 <sup>d</sup>	224,00±1,41 <sup>h</sup>
DÖÇ 5	1,03±0,03 <sup>d</sup>	28,25±0,21 <sup>e</sup>	232,00±1,41 <sup>g</sup>
DÖÇ 6	0,73±0,01 <sup>g</sup>	31,95±0,35 <sup>d</sup>	357,50±0,71 <sup>b</sup>
DÖÇ 7	0,84±0,01 <sup>f</sup>	42,00±0,14 <sup>a</sup>	198,50±0,71 <sup>ı</sup>
DÖÇ 8	0,95±0,01 <sup>e</sup>	35,75±0,07 <sup>b</sup>	177,50±0,71 <sup>k</sup>
DÖÇ 9	0,67±0,01 <sup>h</sup>	35,40±0,00 <sup>c</sup>	269,50±0,71 <sup>f</sup>
DÖÇ 10	0,96±0,01 <sup>e</sup>	26,10±0,14 <sup>f</sup>	306,00±1,41 <sup>d</sup>
DÖÇ 11	1,62±0,04 <sup>b</sup>	26,15±0,07 <sup>f</sup>	320,50±0,71 <sup>c</sup>
DÖÇ 12	1,40±0,02 <sup>c</sup>	25,15±0,07 <sup>h</sup>	456,50±0,71 <sup>a</sup>
%90 Etanol	3,91±0,04 <sup>a</sup>	19,60±0,14 <sup>i</sup>	318,00±1,41 <sup>c</sup>

a-k:Aynı sütunda değişik harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir. ( $p<0,05$ ).

Li ve ark. (2022), tarafından yapılan çalışmada 18 farklı DÖÇ kullanılarak fenolik bileşenlerin geri kazanımı gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışmada derin ötektik solventlerin su ile seyreltilmesi ile elektriksel iletkenlik değerlerinin arttığı buna karşın stabilitenin azaldığı bildirilmiştir. Kantar (2022), 6 farklı derin ötektik çözücüyle yaptığı çalışmada çözücülerin yüksek elektriksel iletkenliğin ısı transferi üzerine doğrudan etkili olduğunu ve yüksek elektriksel iletkenliğe sahip çözücülerin elektrik enerjisini ısı enerjisine çevirerek gıdaların işlenmesine yardımcı olabilecekleri bildirilmiştir. Başka bir çalışmada kolin klorür-etilen gliserol ile farklı molar konsantrasyonlarda (1:1, 1:2, 1:4) hazırlanan derin ötektik çözücülerin elektriksel iletkenlik değerleri incelenmiştir (Zhong ve ark., 2020). Artan sıcaklıkla doğru orantılı olarak artan elektriksel iletkenlik değerleri tespit edilmiştir. Çalışmada elektriksel iletkenlikteki artışın viskoziteye bağlı olduğu ve sıcaklıkla azalan viskoziteden kaynaklandığı bildirilmiştir. Diğer yandan yüksek viskoziteye sahip derin ötektik çözücülerin kullanıldığı ekstraksiyon işlemlerinde kütle transferinin engellenebileceği belirtilip, çözücülere belirli oranlarda su eklenmesi önerilmiştir. Bu şekilde viskozitede düşüş gözlenerek elektriksel iletkenliği artması beklenmiştir.

### **3.2. Toplam Fenolik Madde Miktarı**

Propolisin ultrases destekli ekstraksiyonunda çözücü etkinliğinin değerlendirilmesi için seçilen 12 farklı derin ötektik çözücü ve etanol ile gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucunda belirlenen toplam fenolik madde miktarları Ek-1.2. ve Şekil 3.1.' de sunulmuştur. Elde edilen veriler incelendiğinde propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarının 64,33-228,19 mg GAE/g konsantrasyonları arasında değiştiği belirlenmiştir (Şekil 3.1.). Propolis ekstraksiyonunda kullanılan derin ötektik çözücüler toplam fenolik bileşen açısından karşılaştırıldığında en yüksek konsantrasyona (169,71 mg GAE/g) sitrik asit-propandiol (DÖÇ 8) kullanılan ekstraktta ulaşılmıştır ( $p < 0,05$ ). Tartarik asit-fruktoz (DÖÇ 4), laktik asit-kolin klorür-gliserol (DÖÇ 12) ve tartarik asit-kolin klorür-gliserol (DÖÇ 6) çözücülerinin kullanıldığı ekstraksiyonda ise en düşük toplam fenolik madde içeriği (sırasıyla, 64,33 mg GAE/g, 65,44 mg GAE/g ve 69,92 mg GAE/g) saptanmıştır. Aynı zamanda oksalik asit-kolin klorür-gliserol (DÖÇ 3) çözücüsü ekstraksiyon etkinliği bakımından sitrik asit-propandiol (DÖÇ 8) ile kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı gözlenmiştir ( $p > 0,05$ ). Ayrıca, oksalik asit-kolin klorür-gliserol (DÖÇ 3) ve sitrik asit-kolin klorür-gliserol (DÖÇ 9) çözücülerini ile gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucunda benzer toplam fenolik madde miktarına ulaşılmıştır ( $p > 0,05$ ). Bu bulgular sonucunda fenolik bileşen eldesi amacıyla propolis ekstraksiyonunda kullanılan derin ötektik çözücüler arasında sitrik asit-propandiol ile hazırlanan derin ötektik çözücünün ekstraksiyon etkinliği açısından öncelikle tercih edilebileceği belirlenmiştir.



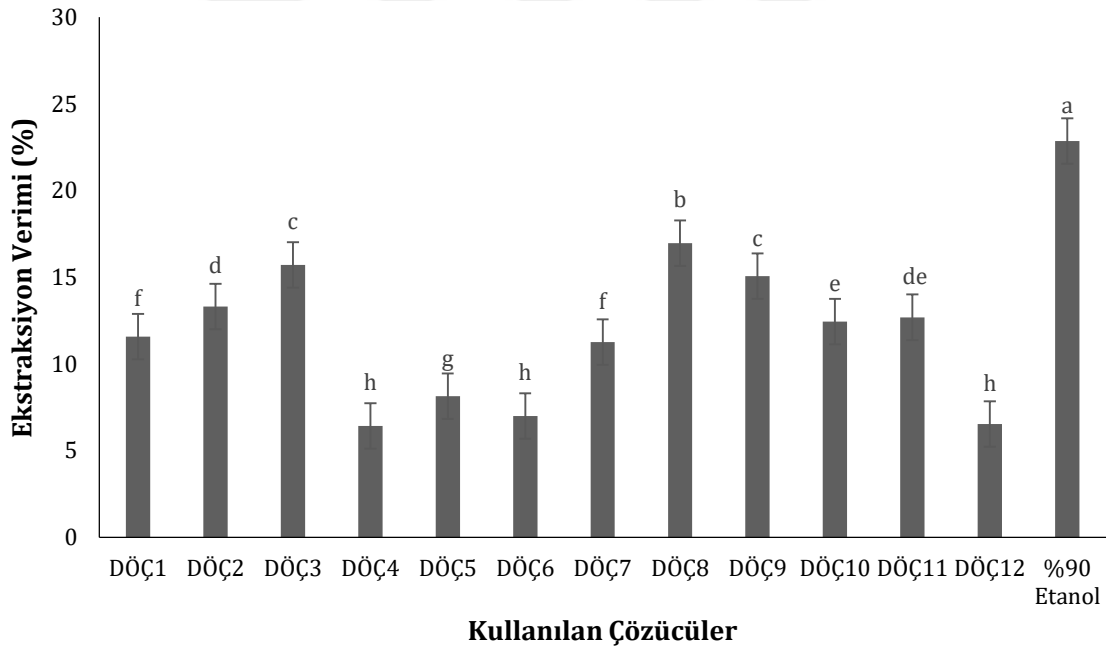
**Şekil 3. 1.** Propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları

Petkov ve ark (2022), yaptıkları çalışmada propolisten fenolik maddelerin ultrasonik ekstraksiyonunda 10 farklı derin ötektik çözücü formülasyonu ve etanol (%70) kullanmışlardır. Çalışmada fenolik madde içeriği sitrik asit-propandiol (1:4) ile hazırlanan propolis ekstraktlarında %36,7 bulunurken laktik asit-propandiol (1:1) ile hazırlanan propolis ekstraktlarında %38,3 bulunmuştur. Çalışmamızda ise sitrik asit-propandiol (1:4) kullanılan ekstraktın fenolik madde içeriği laktik asit-propandiol (1:4) kullanılan ekstrakttan daha yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda kullanılan derin ötektik çözücüler bu çalışmada kullanılanlar ile benzer bileşenlere sahip olsa da bileşenlerin molar konsantrasyonlarında farklılıklar olduğu görülmektedir. Bu durum derin ötektik çözücülerin hazırlanmasında seçilen bileşenlerin yanı sıra karışımın molar konsantrasyon oranlarının da ekstraksiyon etkinliği üzerine etkili olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda geleneksel çözücü olarak yaygın bir şekilde kullanılan etanol (%90) ile gerçekleştirilen ekstraksiyonda toplam fenolik bileşen içeriği 228,19 mg GAE/g bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde propolisden fenolik bileşen ekstraksiyonunda etanol (%90) en etkili çözücü olarak belirlenmiştir. Propolisin etanol ile gerçekleştirilen ekstraksiyonunda verim %23 olarak belirlenirken, ekstraksiyon verimi açısından sitrik asit-propandiol (%17) ile hazırlanan derin ötektik çözücü (DÖÇ 8) etanole en yakın çözücü olarak belirlenmiştir (Ek-1.4. ve Şekil 3.2.). Oksalik asit-kolin klorür-gliserol (DÖÇ 3) ve sitrik asit-kolin klorür-gliserol (DÖÇ 9) çözücülerini kullanarak elde edilen ekstraktların verimleri ise sırasıyla %15,70, %15,06 olarak belirlenmiş olup ekstraksiyon verimi açısından aralarında önemli bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir ( $p>0,05$ ). Derin ötektik çözücüler arasında

tartarik asit-fruktoz (%6,43), laktik asit- kolin klorür-glisero ( %6,54) ve tartarik asit-kolin klorür-glisero ( %6,99) ile gerçekleştirilen ekstraksiyonlar sonucunda en düşük ekstraksiyon verimi değerlerine ulaşmıştır (p<0,05). Sonuç olarak, sitrik asit-propandiol'ün propolisten biyoaktif bileşen elde etmekte ekstraksiyon verimi bakımından %90'lık etanole alternatif olarak kullanılabilir yeşil çözücü olduğu belirlenmiştir.

Trusheva ve arkadaşları (2019), propolis ekstraksiyonunda farklı yeşil çözücülerin etkinliğini incelemek için bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada derin ötektik çözücü olarak kolin klorür-glisero (1:2), kolin klorür-üre (1:1), kolin klorür-glukoz-su (5:2:%30), kolin klorür-ksilitol (4:1), sitrik asit-1,2 propandiol (1:4) ve etanol (%70) kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde etanol (%70) kullanılarak elde edilen ekstraktta en yüksek toplam fenolik madde miktarlarına (%37,1) ulaşmıştır. Çalışmamıza benzer şekilde, sitrik asit-propandiol ile gerçekleştirilen ekstraksiyon ile etanole en yakın toplam fenolik bileşen konsantrasyonuna (%36,7) ulaşmıştır. Gerek literatür verileri gerekse de çalışmamızdan elde edilen verilere göre, geleneksel bir çözücü olan etanolün çevreci alternatifi olarak derin ötektik çözücülerin propolis ekstraksiyonunda kullanılabilirliği belirlenmiştir.



Şekil 3. 2. Propolis ekstraktlarının ekstraksiyon verimleri

### 3.3. Toplam Flavonoid Miktarı

Propolis ekstraktlarında belirlenen toplam flavonoid miktarına ilişkin veriler Ek-1.6. ve Şekil 3.3.'de sunulmuştur. Elde edilen veriler incelendiğinde propolis ekstraktlarında toplam flavonoid miktarının 18,12-129,53 mg CE/g konsantrasyonları arasında değiştiği

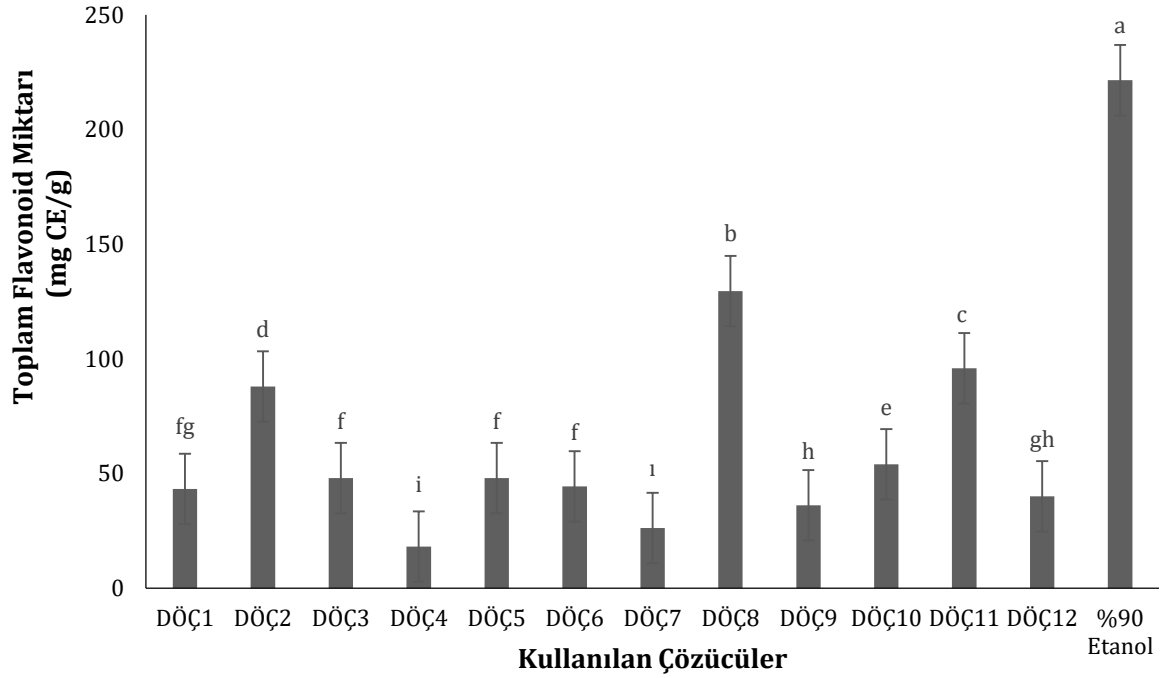
belirlenmiştir. Derin ötektik çözücülerle elde edilen propolis ekstraktları kıyaslandığında en yüksek toplam flavonoid içeriği (129,53 mg CE/g) sitrik asit-propandiol (DÖÇ 8) kullanılan ekstraktta, en düşük toplam flavonoid içeriği ise (18,12 mg CE/g) tartarik asit-fruktoz (DÖÇ 4) kullanılan ekstraktta belirlenmiştir. Toplam flavonoid miktarı açısından oksalik asit-kolin klorür-gliserol (DÖÇ 3), tartarik asit-propandiol (DÖÇ 5) ve tartarik asit-kolin klorür-gliserol (DÖÇ 6) çözücülerıyla elde edilen ekstraktlar arasında istatistiksel olarak bir farklılığın olmadığı belirlenmiştir ( $p>0,05$ ). Sonuç olarak daha yüksek flavonoid miktarının elde edilebilmesi için propolis ekstraksiyonunda sitrik asit-propandiol çözücüsünün kullanılması önerilmektedir.

Koutsoukos ve arkadaşları (2019), yaptıkları çalışmada propolisden fenolik bileşiklerin mikrodalga ve ultrases destekli ekstraksiyonunda kolin klorür-tartarik asit-su ile hazırladıkları derin ötektik çözücülerini kullanmışlardır. Ekstraksiyon işlemi farklı süre (15, 30 dakika), farklı derin ötektik çözücü:su oranları (70:30, 80:20), ve farklı sıcaklıklarda (40°C, 65°C) gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda ultrases destekli ekstraksiyonun propolisten flavonoid bileşik eldesinde mikrodalga destekli ekstraksiyona göre daha etkin bir yöntem olduğu belirlenirken en yüksek toplam flavonoid madde miktarına (35,4 mg CE/g) ultrases destekli ekstraksiyon ile ulaşılmıştır. Yapılan bu çalışma ile çalışmamızdan elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında çalışmamızda ultrases destekli derin ötektik çözücülerle ekstraksiyonu ile elde edilen propolis ekstraktlarının genel olarak daha yüksek flavonoid içeriğine sahip olduğu görülmektedir. Bilindiği üzere propolisin orijini sahip olduğu flavonoid konsantrasyonu üzerine etkili olmaktadır. Bununla birlikte gerek literatür çalışmaları gerekse de çalışmamızdan elde edilen veriler, ekstraksiyon yönteminin ve özellikle ekstraksiyon için seçilen çözücünün flavonoid içeriği yüksek propolis ekstraktı elde etmek için önemli olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda ayrıca kullanılan derin ötektik çözücülerin etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla ekstraksiyon işlemi propolis ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılan etanol ile de gerçekleştirilmiştir. Etanol (%90) ile elde edilen propolis ekstraktlarında toplam flavonoid bileşen içeriği 221,57 mg CE/g olarak bulunmuştur. Toplam flavonoid içeriği açısından en yüksek konsantrasyona ulaşılan bu ekstraktta (etanol) en yakın sonuçlara sitrik asit-propandiol (129,53 mg CE/g) ile ulaşılmıştır (Şekil. 3.3.). Çalışmamıza benzer şekilde Trusheva ve arkadaşları (2019), tarafından yapılan çalışmada da propolis ekstraksiyonunda yeşil çözücülerin etkinliği etanol (%70) ile kıyaslanmıştır. Yapılan bu çalışmada da ekstraktların toplam flavonoid madde miktarları incelendiğinde en yüksek flavonoid madde miktarı (%11,3) etanol kullanılarak elde edilen ekstraktta bulunmuştur. Aynı zamanda çalışmamızda da olduğu gibi etanole en yakın flavonoid içeriği (%9,7) sitrik asit-propandiol kullanılan ekstraktta tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, flavonoid konsantrasyonu bakımından sitrik asit-propandiol'ün etanole alternatif yeşil çözücü olabileceğini göstermektedir.



Çalışmamızda sitrik asit-propandiol (DÖÇ 8) ile elde edilen ekstraktlardan sonra toplam flavonoid içeriği en yüksek (sırasıyla 95,89 mg CE/g ve 87,93 mg CE/g) ekstraktların laktik asit-propandiol (DÖÇ 11) ve oksalik asit-propandiol (DÖÇ 2) ile hazırlandığı görülmektedir.



Şekil 3. 3. Propolis ekstraktlarının toplam flavonoid miktarları

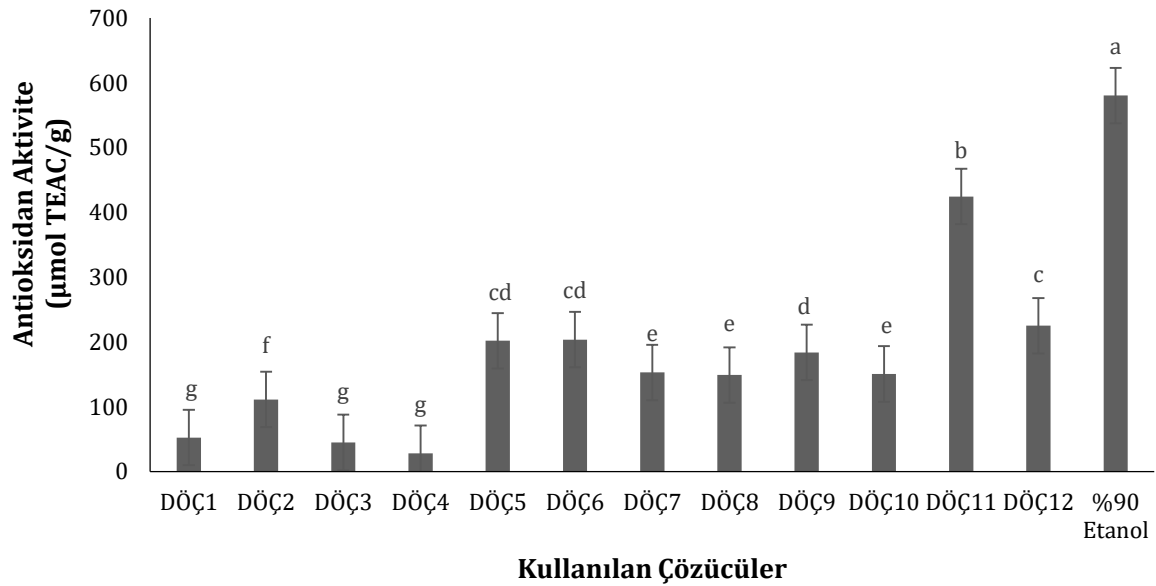
En düşük toplam flavonoid madde içeriğine ise tartarik asit-fruktoz (DÖÇ 4), sitrik asit-fruktoz (DÖÇ 7), sitrik asit-kolin klorür-gliserol (DÖÇ 9) çözücülerinde ulaşılmıştır ( $p<0,05$ ). Bu sonuçlar, bileşiminde propandiol içeren çözücülerin diğer derin ötektik çözücülere kıyasla flavonoid miktarı açısından zengin propolis ekstraktlarının elde edilebilmesi için daha etkin bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir.

### 3.4. Antioksidan Aktivite (ABTS)

Propolis ekstraktlarında belirlenen antioksidan aktivite miktarları Ek-1.8. ve Şekil 3.4.'de sunulmuştur. Veriler incelendiğinde antioksidan aktivite sonuçlarının 28,12-580,34  $\mu\text{mol TEAC/g}$  konsantrasyonları arasında değiştiği belirlenmiştir (Şekil 3.4.). Yeşil çözücülerle elde edilen ekstraktların antioksidan aktiviteleri karşılaştırıldığında en yüksek konsantrasyona (424,45  $\mu\text{mol TEAC/g}$ ) laktik asit-propandiol kullanılan ekstraktta ulaşılmıştır ( $p<0,05$ ). Tartarik asit-fruktoz (28,12  $\mu\text{mol TEAC/g}$ ), oksalik asit-kolin klorür-gliserol (44,92  $\mu\text{mol TEAC/g}$ ) ve oksalik asit-fruktoz (52,44  $\mu\text{mol TEAC/g}$ ) çözücülerinin kullanıldığı propolis ekstraktlarında ise en düşük antioksidan aktivite değerleri belirlenmiştir.

Bununla birlikte toplam fenolik ve flavonoid miktarında olduğu gibi en yüksek antioksidan aktivitenin (580,34  $\mu\text{mol TEAC/g}$ ) belirlendiği propolis ekstraktı %90 etanol kullanılarak elde edilmiştir. Bakkaloğlu (2020), propolis ekstraksiyonunu %50 etanol ve propandiol ile gerçekleştirerek antioksidan aktivitelerini karşılaştırmıştır. Çalışmamıza benzer şekilde yapılan bu çalışmada da en yüksek antioksidan aktivite (835,34 mg TEAC/100g propolis) etanol ile elde edilen propolis ekstraktlarında belirlenmiştir.

Çalışmamızda sitrik asit-propandiol ile ekstrakte edilen örnekler laktik asit-propandiol ile elde edilen ekstraktlara kıyasla daha yüksek toplam fenolik madde içermekteyken bu ekstraktlarda antioksidan aktivitenin daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Meyve suları, reçel, jöle, sürülebilir yağlar, soslar ve bebek mamaları gibi ürün formülasyonlarına antioksidan olarak katılmakta olan laktik asit aynı zamanda gıdalarda bulunan antioksidanlarla sinerjistik etki göstererek de antioksidan aktiviteyi artırabilmektedir (Manuela ve Cebola, 2016). Bu durumun laktik asit-propandiol ekstraktlarında da etkili olmuş olabileceği düşünülmektedir. Diğer yandan Socha ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada propolis ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin kıyaslanmasında ekstraktta bulunan fenolik çeşidinin miktardan daha önemli bir etken olduğu vurgulanmaktadır. Örneğin bu çalışmada antioksidan aktivitenin kafeik asidin fenil esteri, kuarsetin ve kaempferol ile ilgili olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda LCMS/MS ile belirlenen sonuçlarda bu durumu doğrular niteliktedir.



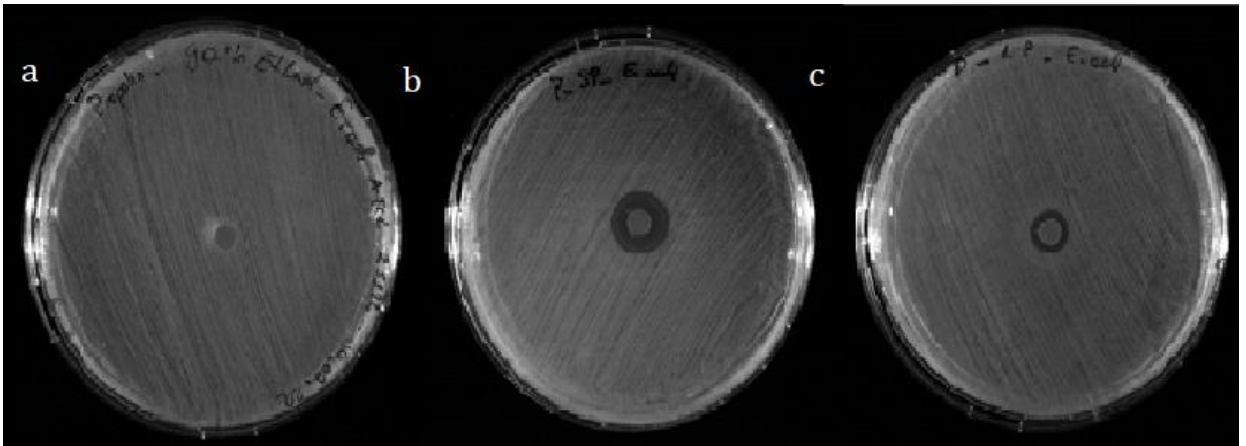
**Şekil 3. 4.** Propolis ekstraktlarının antioksidan aktivite konsantrasyonları

### 3.4. Antimikrobiyal Aktivite

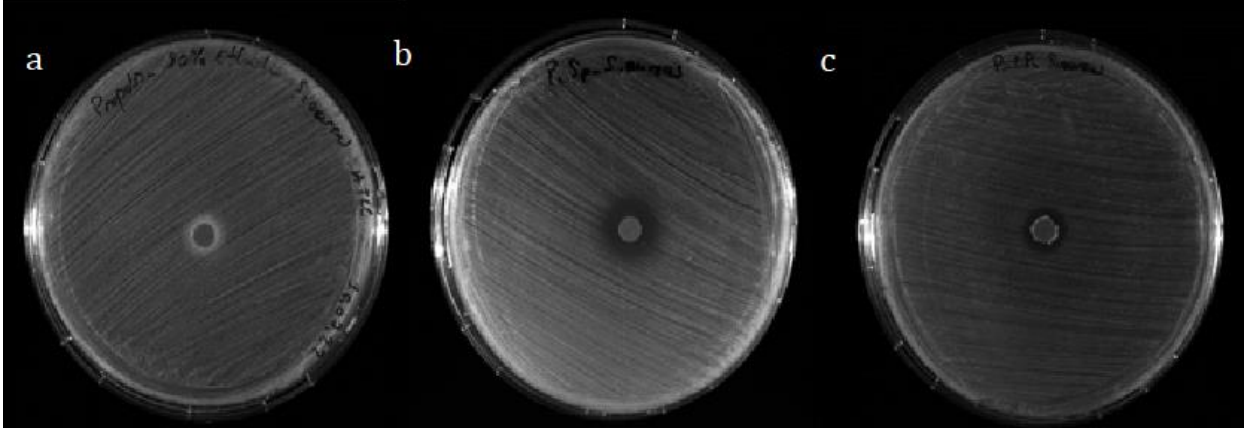
Propolis ekstraksiyonunda kullanılan sitrik asit-propandiol, laktik asit propandiol ve etanol (%90) çözücülerinde gerçekleştirilen antimikrobiyal aktivite sonuçları Tablo 3.2. , Resim 3.1. ve Resim 3.2.'de sunulmuştur. Ulaşılan sonuçlar incelendiğinde toplam fenolik madde miktarı ve toplam flavonoid miktarı bakımından en yüksek sonuçların elde edildiği etanol ile elde edilen ekstraktın antimikrobiyal aktivite göstermediği ( $6 < \text{mm}/10 \mu\text{L}$ ) tespit edilmiştir. Bununla birlikte sitrik asit-propandiol (DÖÇ 8) ile hazırlanan ekstraktların *E. coli* (15 mm/10  $\mu\text{L}$ ) ve *S. Aureus* (13 mm/10  $\mu\text{L}$ ) üzerine antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde laktik asit-propandiol (DÖÇ 11) kullanılarak hazırlanan propolis ekstraktlarının da yine *E. coli* (10 mm/10  $\mu\text{L}$ ) ve *S. Aureus* (11 mm/10  $\mu\text{L}$ ) üzerine antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmekle birlikte, DÖÇ 8'in antimikrobiyal aktivitesinin DÖÇ 11'e kıyasla daha fazla olduğu görülmektedir. Literatürde yapılan çalışmalarda da propolis ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesinin yüksek fenolik ve flavonoid içeriğinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Takaisi ve Schilcher, 1994).

**Tablo 3. 2.** Propolis ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri

Mikroorganizma	İnhibisyon zon çapı (mm/10 $\mu\text{L}$ )		
	Sitrik asit-propandiol	Laktik asit-propandiol	Etanol (%90)
<i>Staphylacoccus aureus</i>	13	11	<6
<i>Esscherichia coli</i>	15	10	<6



**Resim 3. 1.** *E. coli* üzerine propolis ekstraktlarının antimikrobiyal etkisi; (a) etanol (%90), (b) sitrik asit-propandiol, (c) laktik asit-propandiol



**Resim 3. 2.** *S. aureus* üzerine propolis ekstraktlarının antimikrobiyal etkisi; (a) etanol (%90), (b) sitrik asit-propandiol, (c) laktik asit-propandiol

Bakkaloğlu (2020), farklı çözücüler kullanarak (dimetil sülfoksit, propilen glikol, distile su, %50 etanol) elde edilen propolis ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerini belirlemiştir. Bu çalışmada etanol (%50) ile elde edilen ekstraktların *E. coli* (9,20 mm/10µL) ve *S. aureus* üzerine (10 mm/10µL) antimikrobiyal etkisinin olduğu belirlenmiştir. Propilen glikol ile elde edilen ekstraktların ise *E. coli* (8,20 mm/10µL) ve *S. aureus* (8,50 mm/10µL) üzerine antimikrobiyal aktivitesinin daha düşük olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, Kubiline ve ark. (2015), etanolik olmayan çözücüler (polietilen glikol 400, su, zeytinyağı-su) ve etanol kullanılarak elde edilen propolis ekstraktlarında antimikrobiyal aktivite analizi gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonuçlarında su ve zeytinyağı-su çözücülerinin *E. coli* ve *S. aureus* üzerine antimikrobiyal etkisi belirlenmemiştir. Polietilen glikol 400-zeytinyağı-su çözücüsünün ise *E. coli* (16,6 mm/120 µL) ve *S. aureus* (16,2 mm/120 µL) üzerine antimikrobiyal aktivitesi olduğu belirlenmiştir. Literatürde propolis ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi üzerine yapılan çalışmalar ve çalışmamız kapsamında yapılan analizler sonucunda propolisin Gram negatif *E. coli* ve Gram pozitif *S. aureus* bakterilerine karşı aktif bir inhibitör etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. Aynı zamanda sitrik asit-propandiol ile hazırlanan propolis ekstraktının daha üstün inhibe etkilerinin olduğu belirlenmiştir.

### 3.5. Fenolik Bileşen Kompozisyonu (LS-MS/MS)

Propolis ekstraksiyonunda kullanılan sitrik asit-propandiol, laktik asit-propandiol ve etanol (%90) çözücülerinin fenolik dağılımları Tablo 3.3.'de sunulmuştur. Elde edilen veriler incelendiğinde etanol ve laktik asit-propandiol kullanılan ekstraktta kafeik asit başat fenolik bileşen olarak tespit edilmiştir. Bu ekstraktlarda ferulik asit, p-kumarik asit ve protekatekuik aldehit, syringic asit, kuersetin, kaempferol ve ellagic asit ise belirlenen diğer fenolik bileşenler arasında yer almaktadır. Sitrik asit-propanidol kullanılarak elde edilen ekstraktta ise başat fenolik bileşenin ferulik asit olduğu bulunmuştur. Bu ekstraktta ferulik asidin yanı sıra kafeik asit, syringic asit, p-kumarik asit ve kaempferol bulunan diğer fenolik bileşenlerdir.

Propolis ekstraktlarına ait LC-MS/MS iyon kromatogramları Şekil 3.5.-3.8.'de gösterilmiştir. Çalışmamızda laktik asit-propandiol (DÖÇ 11) ile elde edilen propolis ekstraktının etanole göre daha yüksek oranda kafeik asit (%35,22) ve prokatekuik aldehit (%52,68) içerdiği bulunmuştur. Diğer yandan p-kumarik asit; etanol (%90) ve sitrik asit-propandiol kullanılarak elde edilen ekstraktlarda belirlenirken, laktik asit-propandiol kullanılarak elde edilen ekstraktta saptanmamıştır.

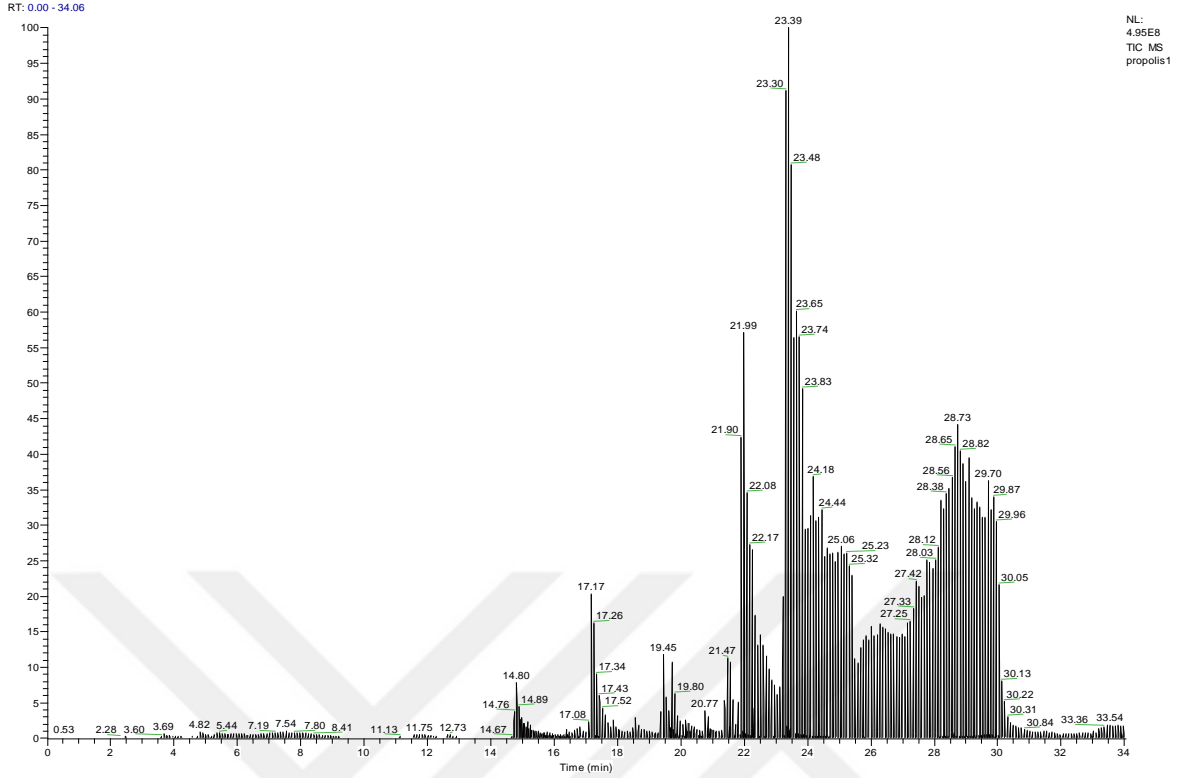
Pellati ve ark (2013), İtalyan propolisi kullanarak yaptıkları çalışmada farklı sıcaklık, farklı süre ve farklı oranlardaki etanol-su çözücülerini kullanarak elde ettikleri propolis ekstraktlarındaki fenolik bileşen içeriğini incelemişlerdir. Çalışmada hakim fenolik asitlerin p-kumarik asit, ferulik asit ve kafeik asit olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada elde edilen kafeik asit miktarının 2,3-6,7 mg/g aralığında değiştiğini belirlemişlerdir. Bu çalışmada elde edilen maksimum kafeik asit miktarlarının çalışmamızda laktik asit-propandiol kullanılarak elde edilen propolis ekstraktında belirlenen kafeik asit (7,1131 mg/g) miktarına yakın olduğu gözlenmiştir.

**Tablo 3. 3.** Propolis ekstraktlarının fenolik bileşen dağılımı

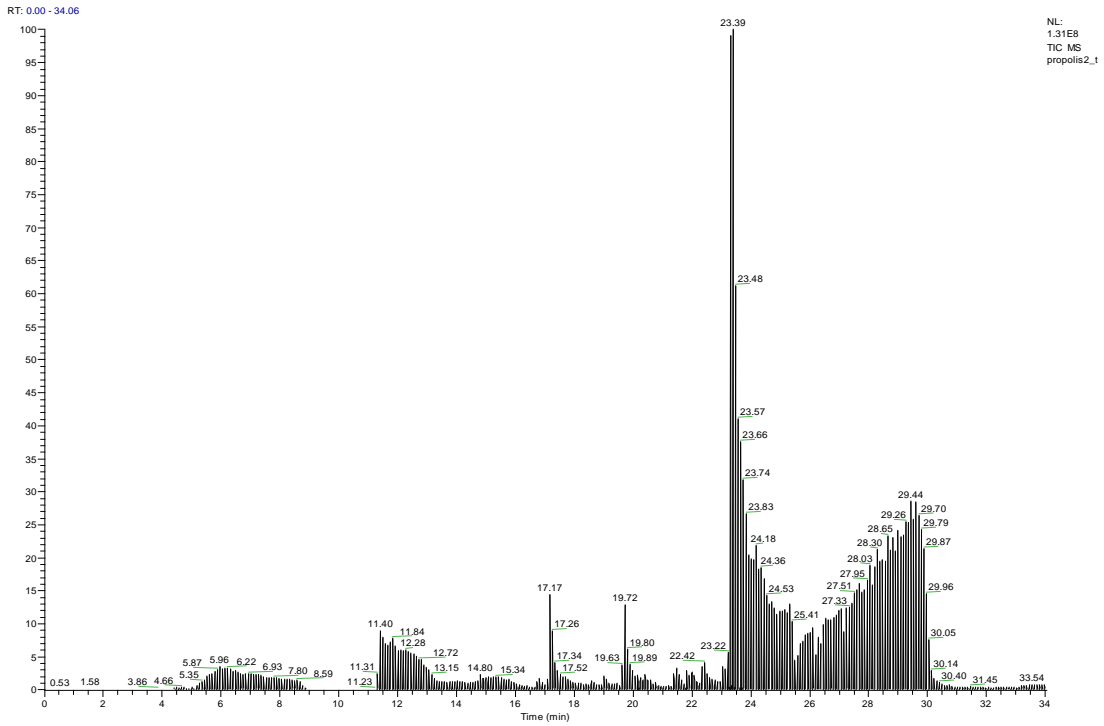
<b>Fenolik Bileşikler</b>	<b>Etanol (%90) Ekstraktı (mg/g propolis)</b>	<b>Sitrik asit-propandiol Ekstraktı (mg/g propolis)</b>	<b>Laktik asit-propandiol Ekstraktı (mg/g propolis)</b>
Gallik Asit	TE	TE	TE
Protekatekuik Asit	0,0296	TE	0,0115
Protekatekuik Aldehit	0,4102	TE	0,8669
Kateşin	TE	TE	0,1155
Epikateşin	TE	TE	TE
Kafeik Asit	4,6075	0,0680	7,1131
Syringic Asit	0,1299	0,0233	0,0104
Vannilin	TE	TE	TE
Taxifolin	0,0753	TE	0,0829
p-kumarik Asit	0,9227	0,0361	TE
Ferulik Asit	1,7860	0,7421	0,6915
4-OH Benzoik Asit	0,0014	TE	TE
Salisilik Asit	0,0012	TE	TE
Rutin	TE	TE	TE
Ellagic Asit	0,0047	TE	0,1813
Kuersetin	0,2709	TE	0,2933
Kaempferol	0,2241	0,0397	0,2582
Flavone	TE	TE	TE

TE: tespit edilemedi

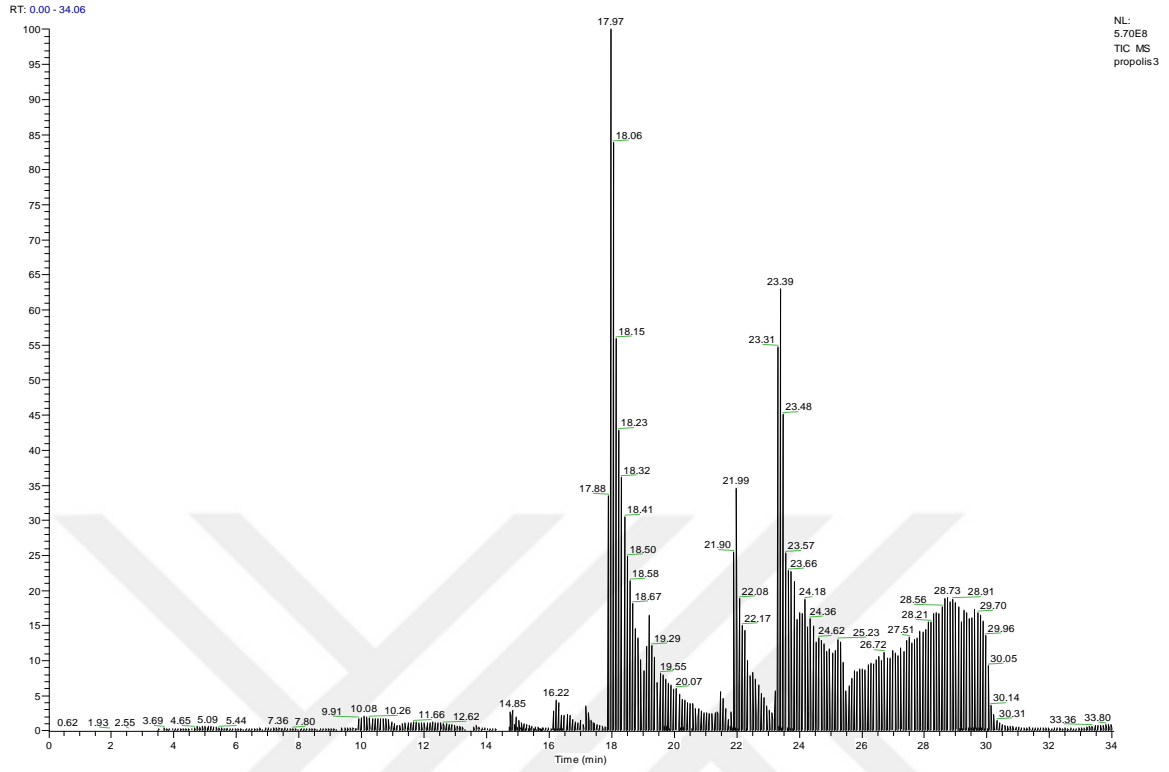
Hu ve ark (2022), yaptıkları çalışmada farklı aylarda toplanan propolis örneklerinin fenolik bileşen içeriklerini belirlemişlerdir. Kafeik asit ve ferulik asit miktarları sırasıyla 0,33-1,73 mg/g ve 0,11-0,70 mg/g aralığında bulunmuştur. Çalışmamızda ise kafeik asit miktarının propolis ekstraktlarında 0,0680-7,1131 mg/g propolis, ferulik asit konsantrasyonunun ise 0,6915-1,7860 mg/g propolis olarak tespit edilmiştir. Gargouri ve ark. (2019), çalışmasında Tunus propolisindeki fenolik bileşenlerin miktarlarını incelemişlerdir. Yapılan bu çalışmada kafeik asit miktarı 0,078-0,398 mg/g, ferulik asit miktarı 0,072-0,103 mg/g olarak bulunmuştur. Çalışmamızdan elde edilen verilerin literatür verileriyle uyumlu olduğu görülmektedir. Çalışmamıza benzer şekilde, Oroian ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmada da propolis örneklerinde gallik asit tespit edilmemiştir. Diğer yandan bu çalışmada propolis örneklerinde p-kumarik asit tespit edilemezken, çalışmamızda etanol (%90) ve sitrik asit-propandiol kullanılan ekstraktlarda p-kumarik asit tespit edilmiştir. Sönmez ve ark. (2016), yaptıkları çalışmada çalışmamızın aksine gallik asit (0,72 mg/g) tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada propolis örneklerinde ferulik asit tespit edilemezken, p-kumarik asit miktarı 2,99 mg/g olarak belirlenmiştir. Literatürde propolis ekstraktların fenolik bileşimlerine ilişkin farklı sonuçlara ulaşılrken, bu farklılıkların propolisin yetiştirildiği bölge, propolis kaynağı, propolisin toplandığı mevsim gibi propolisin karakteristik yapısını etkileyen faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı zamanda çalışmamızda elde edilen veriler, sayılan bu özelliklerin yanı sıra propolisin ekstrakte edildiği çözgenin ve ekstraksiyon koşullarının da fenolik dağılımı üzerine etkili olabileceğini göstermiştir.



**Şekil 3. 5.** Etanol kullanılarak elde edilen propolis ekstraktının LC-MS/MS iyon kromatogramı



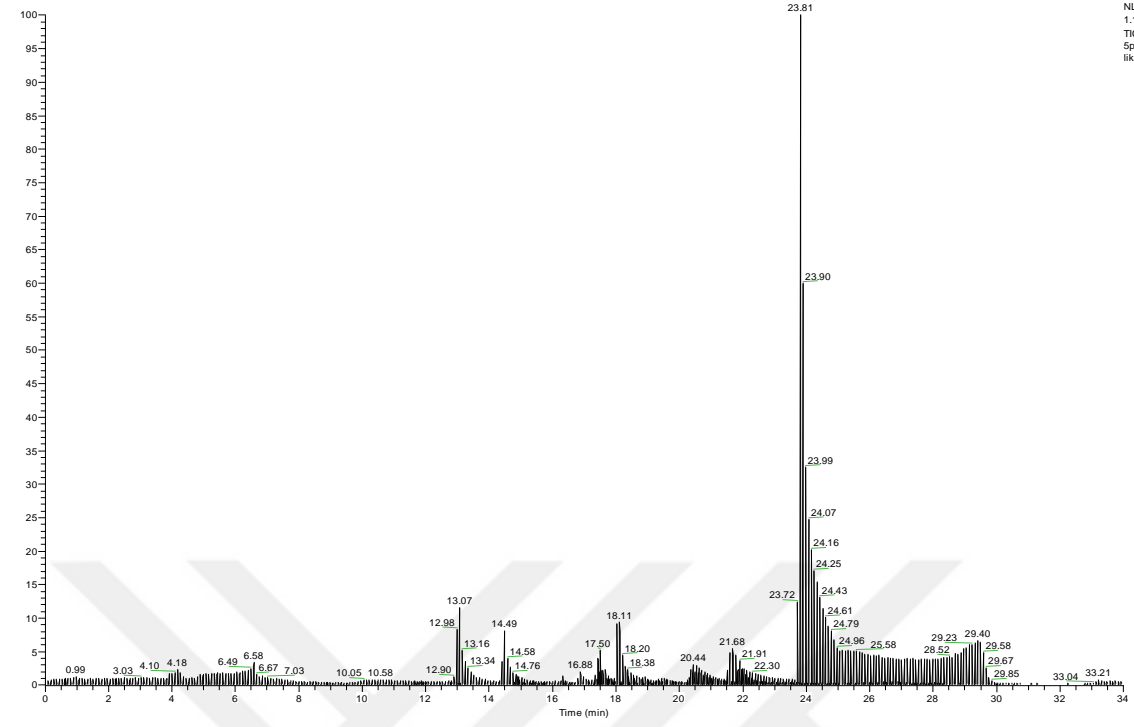
**Şekil 3. 6.** Sitrik asit-propandiol kullanılarak elde edilen propolis ekstraktının LC-MS/MS iyon kromatogramı



**Şekil 3. 7.** Laktik asit-propandiol kullanılarak elde edilen propolis ekstraktının LC-MS/MS iyon kromatogramı



RT: 0.00 - 34.01



NL:  
1.10E8  
TIC MS  
5ppm\_feno  
ikmix

Şekil 3. 8. Standartların LC-MS/MS genel iyon kromatogramı

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Geçmişte ve günümüzde özellikle alternatif tıp alanında önemli yere sahip olan propolis ham haliyle tüketilemediği için çeşitli yöntemlerle ekstrakte edilerek kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan geleneksel yöntemler fazla miktarda çözücü (etanol, metanol) kullanımı, yüksek sıcaklık ve uzun süre gibi dezavantajlar içermektedir. Gelişen teknoloji ile birlikte az miktarda çözücü kullanımı, düşük sıcaklık ve kısa ekstraksiyon süresi gibi avantajlara sahip yeni yöntemler geliştirilmektedir. Çalışmamızda ise gelişen teknolojik uygulamalara ilaveten artan çevre ve sağlık bilinci göz önünde bulundurularak etanol bazlı propolis ekstraktlarına alternatif oluşturabilecek propolis ekstraktlarının yenilikçi ve çevreci uygulamalar ile elde edilebilirliği araştırılmıştır.

Çalışmamızda yapılan ön denemeler sonucunda propolis ekstraksiyonunda kullanılacak 12 farklı derin ötektik çözücü belirlenmiş ve bu çözücülerle gerçekleştirilen ultrases destekli ekstraksiyonların etkinlikleri etanol ile kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde;

- Toplam fenolik ve flavonoid konsantrasyonu açısından propolis ekstraksiyonda etanol (%90) yerine kullanılabilinecek derin ötektik çözücünün sitrik asit-propandiol (1:4) olduğu belirlenmiştir.
- Laktik asit-propandiol (1:4) derin ötektik çözücüsünün antioksidan aktivite bakımından etanole (%90) alternatif olabileceği tespit edilmiştir.
- Sitrik asit-propandiol (1:4) ve laktik asit-propandiol (1:4) çözücülerinden elde edilen ekstraktların yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.
- Kafeik asit etanol (%90) ve laktik asit-propandiol çözücüsüyle elde edilen ekstraktta başat fenolik asit olarak bulunmuştur.
- Sitrik asit-propandiol çözücüsüyle elde edilen ekstraktta ise başat fenolik bileşen ferulik asit olarak belirlenmiştir.

Bu bulgular ışığında propolisin ultrases destekli ekstraksiyonunda derin ötektik çözücülerin kullanılabilinecek yenilikçi çözümler arasında yer aldığı tespit edilmiştir. Literatürde propolis ekstraksiyonunda çevreci ve yenilikçi ekstraksiyon yöntemlerine daha fazla yer verilmesi ve bu alandaki çalışmaların artırılması önerilmektedir. Bu anlamda çalışmamızın literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKÇA

- 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.
- Altuntop, N. (2005). Güneş Eerjisi Tesisatlarında Antifriz Olarak Etilen ve Propilen Glikol Kullanımının İncelenmesi. *Tesisat Mühendisliği Dergisi*, 86, 31-38.
- 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.
- Aydın, M., Danacıoğlu, D. A., ve Türker, S. (2021). Propolisin Genel Özellikleri ve Kullanımı. *Gıda*, 46(1), 69-81.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ve Omar, A. K. M. (2013). Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials: A Review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436.
- Bakkaloğlu, Z. (2020). *Farklı Çözücü ve Yöntemler Kullanılarak Elde Edilen Propolis Ekstraktlarının Karakterizasyonu*. (Doktora Tezi), İstanbul: Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Bakkaloğlu, Z., ve Arıcı, M. (2019). Farklı Çözücülerle Propolis Ekstraksiyonunun Toplam Fenolik İçeriği, Antioksidan Kapasite ve Antimikrobiyal Aktivite Üzerine Etkileri. *Akademik Gıda*, 17(4), 538-545.
- Barbieri, J. B., Goltz, C., Cavalheiro, F. B., Toci, A. T., Igarashi-Mafra, L., ve Mafra, M. R. (2020). Deep Eutectic Solvents Applied in the Extraction and Stabilization of Rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) Phenolic Compounds. *Industrial Crops and Products*, 144, 112049.
- Bi, Y., Chi, X., Zhang, R., Lu, Y., Wang, Z., Dong, Q., ve Jiang, L. (2020). Highly Efficient Extraction of Mulberry Anthocyanins in Deep Eutectic Solvents: Insights of Degradation Kinetics and Stability Evaluation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 66, 102512.
- Büyüktuncel, E. (2012). Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri I. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, (2), 209-242.
- Çakır, B. (2022). *Propolis Biyoaktif Bileşenlerinin Ultrasonik Ekstraksiyonunda Sıcaklık, Süre ve Solvent Konsantrasyonunun Etkisinin Belirlenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi), Çorum: Hitit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Çalışkol, M. M. (2013). *Azerbaycan Yöresine Ait Propolis Örneklerinin Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi*. (Doktora Tezi), Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Chanioti, S., ve Tzia, C. (2018). Extraction of Phenolic Compounds from Olive Pomace by Using Natural Deep Eutectic Solvents and Innovative Extraction Techniques. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 48, 228-239.

- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., ve Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound Assisted Extraction of Food and Natural Products. Mechanisms, Techniques, Combinations, Protocols and Applications. A Review. *Ultrasonics sonochemistry*, 34, 540-560.
- Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M., ve Cintas, P. (2008). Improved Extraction of Vegetable Oils Under High-Intensity Ultrasound and/or Microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(5), 898-902.
- Cui, J., Duan, X., Ke, L., Pan, X., Liu, J., Song, X., ve Fan, Y. (2021). Extraction, Purification, Structural Character and Biological Properties of Propolis Flavonoids: A Review. *Fitoterapia*, 105106.
- Cunha, S. C., ve Fernandes, J. O. (2018). Extraction Techniques with Deep Eutectic Solvents. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 105, 225-239.
- Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., ve Choi, Y. H. (2013). Natural Deep Eutectic Solvents as New Potential Media for Green Technology. *Analytica Chimica Acta*, 766, 61-68.
- De Zordi, N., Cortesi, A., Kikic, I., Moneghini, M., Solinas, D., Innocenti, G., ve Dall'Acqua, S. (2014). The Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Polyphenols from Propolis: a Central Composite Design Approach. *The Journal of Supercritical Fluids*, 95, 491-498.
- Devequi-Nunes, D., Machado, B. A. S., Barreto, G. D. A., Rebouças Silva, J., da Silva, D. F., da Rocha, J. L. C., ve Umsza-Guez, M. A. (2018). Chemical Characterization and Biological Activity of Six Different Extracts of Propolis Through Conventional Methods and Supercritical Extraction. *PLoS One*, 13(12), e0207676.
- Doğan, N., ve Hayoğlu, İ. (2012). Propolis ve Kullanım Alanları. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 16(3), 39-48.
- Erdoğan, S., Ateş, B., Durmaz, G., Yılmaz, I., ve Seckin, T. (2011). Pressurized Liquid Extraction of Phenolic Compounds from Anatolia Propolis and Their Radical Scavenging Capacities. *Food and Chemical Toxicology*, 49(7), 1592-1597.
- Ertürk, Ö., Yavuz, C., Sıralı, R. (2014). The Antimicrobial Activity of Propolis from Ordu Province of Turkey. *Mellifera*, 14(27-28), 11-16.
- Fokt, H., Pereira, A., Ferreira, A. M., Cunha, A., ve Aguiar, C. (2010). How do Bees Prevent Hive Infections? The Antimicrobial Properties of Propolis. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1, 481-493.
- Funari, C. S., Sutton, A. T., Carneiro, R. L., Fraige, K., Cavalheiro, A. J., da Silva Bolzani, V., ve Arrua, R. D. (2019). Natural Deep Eutectic Solvents and Aqueous Solutions as an Alternative Extraction Media for Propolis. *Food Research International*, 125, 108559.
- 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.
- Ghamdi, A.A., Bayaqoob, N.I., Rushdi, A.I., Alattal, Y., Simoneit, B.R., El-Mubarak, A.H., ve Al-Mutlaq, K.F. (2017). Chemical Compositions and Characteristics of Organic Compounds in Propolis from Yemen. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(5), 1094-1103.

- Ghisalberti, E. L. (1979). Propolis: a review. *Bee world*, 60(2), 59-84.
- 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.
- Hikmawanti, N. P. E., Ramadon, D., Jantan, I., ve Mun'im, A. (2021). Natural Deep Eutectic Solvents (Nades): Phytochemical Extraction Performance Enhancer for Pharmaceutical and Nutraceutical Product Development. *Plants*, 10(10), 2091.
- 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.
- Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G. Q., ve Hu, F. L. (2014). Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules*, 19(12), 19610-19632.
- Jablonsky, M., Majova, V., Strizincova, P., Sima, J., ve Jablonsky, J. (2020). Investigation of Total Phenolic Content and Antioxidant Activities of Spruce Bark Extracts Isolated by Deep Eutectic Solvents. *Crystals*, 10(5), 402.
- Juodeikaitė, D., Žilius, M., ve Briedis, V. (2022). Preparation of Aqueous Propolis Extracts Applying Microwave-Assisted Extraction. *Processes*, 10(7), 1330.
- Kantar, N. K. (2022). Farklı Derin Ötektik Çözücülerin pH ve Elektriksel İletkenlik Değerlerinin Sıcaklık ile Değişimi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (38), 240-246.
- Kayabaşı, S. (2019). *Yeni Nesil Teknikler Kullanılarak Hazırlanan Propolis Ekstraktlarının Fitokimyasal Özelliklerinin ve Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması*. (Yüksek Lisans Tezi), Bayburt: Bayburt Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü.
- Keskin, M. (2018). Alginat-Propolis Mikrokapsüllerin in vitro Sindirim Sisteminde Salımının Ham Propolis ile Kıyaslanması. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 18(2), 94-100.
- Koutsoukos, S., Tsiaka, T., Tzani, A., Zoumpoulakis, P., ve Detsi, A. (2019). Choline Chloride and Tartaric Acid, a Natural Deep Eutectic Solvent for the Efficient Extraction of Phenolic and Carotenoid Compounds. *Journal of Cleaner Production*, 241, 118384.
- Krell, R. (1996). Value-Added Products from Beekeeping (No. 124). *Food and Agriculture Org.*
- Kubiliene, L., Laugaliene, V., Pavilonis, A., Maruska, A., Majiene, D., Barcauskaite, K., ve Savickas, A. (2015). Alternative Preparation of Propolis Extracts: Comparison of Their Composition and Biological Activities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 1-7.
- Kujungiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., ve Popov, S. (1999). Antibacterial, Antifungal and Antiviral Activity of Propolis of Different Geographic Origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(3), 235-240.
- Kumova, U. (2002). Önemli Bir Arı Ürünü: Propolis. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 2(2), 10-24

- Kuropatnicki, A. K., Szliszka, E., ve Krol, W. (2013). Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Kutluca, S., Genç, F., ve Korkmaz, A. (2006). Propolis. *Samsun Tarım İl Müdürlüğü Çiftçi Eğitimi ve Yayım Şubesi, Samsun*, 57.
- Li, Y., Skouroumounis, G. K., Elsey, G. M., ve Taylor, D. K. (2011). Microwave-Assistance Provides Very Rapid and Efficient Extraction of Grape Seed Polyphenols. *Food Chemistry*, 129(2), 570-576.
- Ma, C., Laaksonen, A., Liu, C., Lu, X., ve Ji, X. (2018). The Peculiar Effect of Water on Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents. *Chemical Society Reviews*, 47(23), 8685-8720.
- Machado, B. A. S., Barreto, G. D. A., Costa, A. S., Costa, S. S., Silva, R. P. D., da Silva, D. F., ve Padilha, F. F. (2015). Determination of Parameters for the Supercritical Extraction of Antioxidant Compounds from Green Propolis Using Carbon Dioxide and Ethanol as Co-Solvent. *PLoS One*, 10(8), e0134489.
- Maciejewicz, W. (2001). Isolation of Flavonoid Aglycones from Propolis by a Column Chromatography Method and Their Identification by GC-MS and TLC Methods. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 24(8), 1171-1179.
- Manuela Silva, M., & Cebola Lidon, F. (2016). Food preservatives-An overview on applications and side effects. *Emirates Journal of Food & Agriculture (EJFA)*, 28(6).
- Mason, T. J., ve Lorimer, J. P. (2002). Applied Sonochemistry: the Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing (Vol. 10). *Weinheim: Wiley-Vch*.
- Mason, T. J., ve Vinatoru, M. (2017). Ultrasonically Assisted Extraction in Food Processing and the Challenges of Integrating Ultrasound Into the food Industry. *Ultrasound in Food Processing: Recent Advances*, 329-353.
- Mbous, Y. P., Hayyan, M., Hayyan, A., Wong, W. F., Hashim, M. A., ve Looi, C. Y. (2017). Applications of Deep Eutectic Solvents in Biotechnology and Bioengineering—Promises and Challenges. *Biotechnology Advances*, 35(2), 105-134.
- Memmedov, H., Aldemir, O., ve Aliyev, E. (2017). Propolisin Antioksidan ve Antiinflamatuvar Etkisi. *Arıcılık Araştırma Dergisi*, 9(2), 56-62.
- Mohtar, L.G., Rodríguez, S.A., ve Nazareno, M.A. (2017). Comparative Analysis of Volatile Compound Profiles of Propolis from Different Provenances. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(9), 3409-3415
- Nakilcioğlu, E., ve Ötleş, S. (2014). Basınçlı Çözgen Ekstraksiyonu ve Gıda Sanayindeki Uygulamaları. *Akademik Gıda*, 12(2), 88-94.
- Nieto, A., Borrell, F., Pocurull, E., ve Marcé, R. M. (2010). Pressurized Liquid Extraction: A Useful Technique to Extract Pharmaceuticals and Personal-Care Products from Sewage Sludge. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(7), 752-764.

- Oroian, M., Ursachi, F., ve Dranca, F. (2020). Influence of Ultrasonic Amplitude, Temperature, Time and Solvent Concentration on Bioactive Compounds Extraction from Propolis. *Ultrasonics Sonochemistry*, 64, 105021.
- Palos-Hernández, A., Fernández, M. Y. G., Burrieza, J. E., Pérez-Iglesias, J. L., ve González-Paramás, A. M. (2022). Obtaining Green Extracts Rich in Phenolic Compounds from Underexploited Food by-Products Using Natural Deep Eutectic Solvents. Opportunities and Challenges. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 29, 100773.
- 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.
- Petkov, H., Trusheva, B., Krustanova, S., Grozdanova, T., Popova, M., Alipieva, K., ve Bankova, V. (2022, August). Green Extraction of Antioxidants from Natural Sources with Natural Deep Eutectic Solvents. *In Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences*, Vol. 75, No. 8, pp. 1129-1137.
- 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.
- Popova, M. P., Bankova, V. S., Bogdanov, S., Tsvetkova, I., Naydenski, C., Marcuzzan, G. L. ve Sabatini, A. G. (2007). Chemical Characteristics of Poplar Type Propolis of Different Geographic Origin. *Apidologie*, 38(3), 306-311.
- 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.
- Richter, B. E., Jones, B. A., Ezzell, J. L., Porter, N. L., Avdalovic, N., ve Pohl, C. (1996). Accelerated Solvent Extraction: a Technique for Sample Preparation. *Analytical Chemistry*, 68(6), 1033-1039.
- Rushdi, A. I., Adgaba, N., Bayaqaob, N. I., Al-Khazim, A., Simoneit, B. R., El-Mubarak, A. H., ve Al-Mutlaq, K. F. (2014). Characteristics and Chemical Compositions of Propolis from Ethiopia. *SpringerPlus*, 3(1), 1-9.
- 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.
- Santos, F. F., Rodrigues, S., ve Fernandes, F. A. (2009). Optimization of the Production of Biodiesel from Soybean Oil by Ultrasound Assisted Methanolysis. *Fuel Processing Technology*, 90(2), 312-316.
- Segueni, N., Khadraoui, F., ve Rhouati, S. (2017). Volatile Compounds as Propolis Characterization Markers. *In Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration, November, Springer*, 1271-1273.

- 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.
- Sforcin, J. M. (2007). Propolis and the Immune System: A Review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(1), 1-14.
- 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.
- Siheri, W., Alenezi, S., Tusiimire, J., ve Watson, D. G. (2017). The Chemical and Biological Properties of Propolis. In *Bee Products-Chemical and Biological Properties* (pp. 137-178).
- Sihvonen, M., Järvenpää, E., Hietaniemi, V., ve Huopalahti, R. (1999). Advances in Supercritical Carbon Dioxide Technologies. *Trends in Food Science & Technology*, 10(6-7), 217-222.
- Smith, E. L., Abbott, A. P., ve Ryder, K. S. (2014). Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chemical Reviews*, 114(21), 11060-11082.
- Socha, R., Gałkowska, D., Bugaj, M., ve Juszcak, L. (2015). Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Propolis from Various Regions of Poland. *Natural Product Research*, 29(5), 416-422.
- Sönmez, S., Kirilmaz, L., Yucesoy, M., Yücel, B., ve Yilmaz, B. (2005). The Effect of Bee Propolis on Oral Pathogens and Human Gingival Fibroblasts. *Journal of ethnopharmacology*, 102(3), 371-376.
- Şuran, J., Capanec, I., Mašek, T., Radić, B., Radić, S., Tlak Gajger, I., ve Vlainić, J. (2021). Propolis Extract and its Bioactive Compounds—From Traditional to Modern Extraction Technologies. *Molecules*, 26(10), 2930
- Taddeo, V. A., Epifano, F., Fiorito, S., ve Genovese, S. (2016). Comparison of Different Extraction Methods and HPLC Quantification of Prenylated and Unprenylated Phenylpropanoids in Raw Italian Propolis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 129, 219-223.
- Takaisi-Kikuni, N. B., ve Schilcher, H. (1994). Electron Microscopic and Microcalorimetric Investigations of the Possible Mechanism of the Antibacterial Action of a Defined Propolis Provenance. *Planta Medica*, 60(03), 222-227.
- Tavman, Ş., Kumcuoğlu, S., ve Akkaya, Z. (2009). Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidant Materials from by-Products of Plant Food Processing. *GIDA-Journal of Food*, 34(3), 175-182.
- Temelli, F., ve Güçlü-Üstündağ, Ö. (2005). Supercritical Technologies for Further Processing of Edible Oils. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*.
- Tosi, B., Donini, A., Romagnoli, C., ve Bruni, A. (1996). Antimicrobial Activity of Some Commercial Extracts of Propolis Prepared with Different Solvents. *Phytotherapy Research*, 10(4), 335-336.
- Trusheva, B., Petkov, H., Popova, M., Dimitrova, L., Zaharieva, M., Tsvetkova, I., ve Bankova, V. (2019). "Green" Approach to Propolis Extraction: Natural Deep Eutectic Solvents. *Comptes Rendus de l'Académie Bulgare Des Sciences*, 72(7).



- Trusheva, B., Trunkova, D., ve Bankova, V. (2007). Different Extraction Methods of Biologically Active Components from Propolis: A Preliminary Study. *Chemistry Central Journal*, 1(1), 1-4.
- Ünal, M., Öztürk, O., Selçuk, M. Y., ve Oruç, M. A. (2020). Propolis-Literatür Ne Diyor. *Bozok Tıp Dergisi*, 10, 215-223.
- Vasyliiev, G., Lyudmyla, K., Hladun, K., Skiba, M., ve Vorobyova, V. (2022). Valorization of Tomato Pomace: Extraction of Value-Added Components by Deep Eutectic Solvents and Their Application in the Formulation of Cosmetic Emulsions. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-17.
- Yeo, K. L., Leo, C. P., ve Chan, D. J. C. (2015). Ultrasonic Enhancement on Propolis Extraction at Varied pH and Alcohol Content. *Journal of Food Process Engineering*, 38(6), 562-570.
- 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.
- Zhang, H., Fu, Y., Niu, F., Li, Z., Ba, C., Jin, B., ve Li, X. (2018). Enhanced Antioxidant Activity and in Vitro Release of Propolis by Acid-Induced Aggregation Using Heat-Denatured Zein and Carboxymethyl Chitosan. *Food Hydrocolloids*, 81, 104-112.
- Zhong, M., Tang, Q. F., Zhu, Y. W., Chen, X. Y., ve Zhang, Z. J. (2020). An Alternative Electrolyte of Deep Eutectic Solvent by Choline Chloride and Ethylene Glycol for Wide Temperature Range Supercapacitors. *Journal of Power Sources*, 452, 227847.

## EKLER

### Ek-1. İstatistiksel değerlendirme sonuçları

#### Ek-1.1 Toplam fenolik madde miktarındaki değişime ilişkin varyans analiz çizelgesi

		Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	P
Propolis Ekstraktı	Gruplar Arası	12	53505,013	4458,751	425,123	<,001*
	Gruplar İçi	13	136,346	10,488		
	Toplam	25	53641,359			

\*p<0,05

#### Ek-1.2. Propolis ekstraktlarında toplam fenolik madde miktarlarının Duncan testi ile karşılaştırılması

Ekstraksiyon Çözücüsü	Toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/g)
DÖÇ 1	115,67±0,70 <sup>f</sup>
DÖÇ 2	133,17±4,60 <sup>d</sup>
DÖÇ 3	156,96±2,12 <sup>bc</sup>
DÖÇ 4	64,33±0,35 <sup>h</sup>
DÖÇ 5	81,37±2,81 <sup>g</sup>
DÖÇ 6	69,92±2,11 <sup>h</sup>
DÖÇ 7	112,65±3,18 <sup>f</sup>
DÖÇ 8	169,71±5,28 <sup>b</sup>
DÖÇ 9	150,65±6,36 <sup>c</sup>
DÖÇ 10	124,41±2,83 <sup>e</sup>
DÖÇ 11	126,92±2,47 <sup>de</sup>
DÖÇ 12	65,44±2,11 <sup>h</sup>
%90 Etanol	228,19±0,70 <sup>a</sup>

a-h:Aynı sütunda değişik harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (p<0,05).

**Ek-1.3** Ekstraksiyon verimindeki değişime ilişkin varyans analiz çizelgesi

		<b>Serbestlik Derecesi</b>	<b>Kareler Toplamı</b>	<b>Kareler Ortalaması</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Propolis Ekstraktı	Gruplar Arası	12	536,292	44,691	431,348	<,001*
	Gruplar İçi	13	1,347	0,104		
	Toplam	25	537,639			

\*p&lt;0,05

**Ek-1.4.** Propolis ekstraktlarında ekstraksiyon veriminin Duncan testi ile karşılaştırılması

<b>Ekstraksiyon Çözücüsü</b>	<b>Ekstraksiyon verimi (%)</b>
DÖÇ 1	11,57±0,07 <sup>f</sup>
DÖÇ 2	13,31±0,45 <sup>d</sup>
DÖÇ 3	15,70±0,21 <sup>c</sup>
DÖÇ 4	6,43±0,03 <sup>h</sup>
DÖÇ 5	8,14±0,28 <sup>g</sup>
DÖÇ 6	6,99±0,21 <sup>h</sup>
DÖÇ 7	11,26±0,31 <sup>f</sup>
DÖÇ 8	16,97±0,52 <sup>b</sup>
DÖÇ 9	15,06±0,62 <sup>c</sup>
DÖÇ 10	12,44±0,28 <sup>e</sup>
DÖÇ 11	12,69±0,24 <sup>de</sup>
DÖÇ 12	6,54±0,20 <sup>h</sup>
%90 Etanol	22,85±0,07 <sup>a</sup>

a-h:Aynı sütunda değişik harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (p&lt;0,05).

**Ek-1.5.** Toplam flavonoid madde miktarındaki değişime ilişkin varyans analiz çizelgesi

		<b>Serbestlik Derecesi</b>	<b>Kareler Toplamı</b>	<b>Kareler Ortalaması</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Propolis Ekstraktı	Gruplar Arası	12	73476,345	6123,029	1839,604	<,001*
	Gruplar İçi	13	43,27	3,328		
	Toplam	25	73519,615			

\*p<0,05

**Ek-1.6.** Propolis ekstraktlarında toplam flavonoid madde miktarının Duncan testi ile karşılaştırılması

<b>Ekstraksiyon Çözücüsü</b>	<b>Propolis Ekstraktı (mg CE/g)</b>
DÖÇ 1	43,21±1,05 <sup>fg</sup>
DÖÇ 2	87,93±1,06 <sup>d</sup>
DÖÇ 3	48,02±1,97 <sup>f</sup>
DÖÇ 4	18,12±1,05 <sup>i</sup>
DÖÇ 5	47,95±1,65 <sup>f</sup>
DÖÇ 6	44,32±1,05 <sup>f</sup>
DÖÇ 7	26,24±0,30 <sup>i</sup>
DÖÇ 8	129,53±1,50 <sup>b</sup>
DÖÇ 9	36,15±1,06 <sup>h</sup>
DÖÇ 10	54,03±2,88 <sup>e</sup>
DÖÇ 11	95,89±3,48 <sup>c</sup>
DÖÇ 12	40,05±0,14 <sup>gh</sup>
%90 Etanol	221,57±2,86 <sup>a</sup>

a-i: Aynı sütunda değişik harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (p<0,05).

**Ek-1.7.** Antioksidan aktivitedeki değişime ilişkin varyans analiz çizelgesi

		<b>Serbestlik Derecesi</b>	<b>Kareler Toplamı</b>	<b>Kareler Ortalaması</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Propolis Ekstraktı	Gruplar Arası	12	571570,956	47630,913	256,819	<,001*
	Gruplar İçi	13	2411,04	183,465		
	Toplam	25	573981,995			

\*p<0,05

**Ek-1.8.** Propolis ekstraktlarında antioksidan aktivitenin Duncan testi ile karşılaştırılması

<b>Ekstraksiyon Çözücüsü</b>	<b>Propolis Ekstraktı (µmol TEAC/g)</b>
DÖÇ 1	52,44±7,42 <sup>g</sup>
DÖÇ 2	111,33±2,41 <sup>f</sup>
DÖÇ 3	44,92±9,17 <sup>g</sup>
DÖÇ 4	28,12±7,60 <sup>g</sup>
DÖÇ 5	201,88±20,23 <sup>cd</sup>
DÖÇ 6	203,61±17,76 <sup>cd</sup>
DÖÇ 7	152,93±3,66 <sup>e</sup>
DÖÇ 8	148,96±15,34 <sup>e</sup>
DÖÇ 9	183,91±8,72 <sup>d</sup>
DÖÇ 10	150,68±6,85 <sup>e</sup>
DÖÇ 11	424,45±11,11 <sup>b</sup>
DÖÇ 12	225,15±21,21 <sup>c</sup>
%90 Etanol	580,34±23,18 <sup>a</sup>

a-g:Aynı sütunda değişik harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir. (p<0,05).

