

**T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



**ARI POLENİN VE ELMA SİRKESİNİN KİTOSAN İLE
ENKAPSÜLASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Buse KERESTECİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

TEMMUZ, 2021

T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



ARI POLENİN VE ELMA SİRKESİNİN KİTOSAN İLE
ENKAPSÜLASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Buse KERESTECİ
(Y1913.040007)

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Gülay BAYSAL

TEMMUZ, 2021

ONAYFORMU

ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans / Doktora tezi olarak sunduğum “Arı Polenine Ve Elma Sirkesinin Kitosan İle Enkapsülasyonu.” adlı çalışmanın, tezin proje safhasından sonuçlanmasına kadarki bütün süreçlerde bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurulmaksızın yazıldığını ve yararlandığım eserlerin Kaynakça’da gösterilenlerden oluştuğunu, bunlara atıf yapılarak yararlanılmış olduğunu belirtir ve onurumla beyan ederim. (.../.../20..)

Buse KERESTECİ

ÖNSÖZ

İlk olarak, benden hiçbir zaman desteğini ve rehberliğini esirgemeyen, Doç.Dr. Gülay BAYSAL'a teşekkür etmek istiyorum. Her zaman yanımda olan, sevgilerini ve desteklerini en içten hissettiğim, aileme ve ondan sonra gelen yakın arkadaşım Buket Altınok'a sevgilerimi sunarım.

Temmuz 2021

Buse KERESTECİ

ARI POLENİN VE ELMA SİRKESİNİN KİTOSAN İLE ENKAPSÜLASYONU

ÖZET

Vücudun işlevini yerine getirmesi için gerekli olan temel ve bazı esansiyel besinleri içeren ve bal arıları tarafından üretilen arı poleni, protein, şeker, fenolik bileşikler, lif ve vitaminlerden oluşmaktadır. Son zamanlarda, antifungal, antikanserojenik, antiinflamatuvar, antioksidan, bağışıklık düzenleyici ve yara iyileşmesi dâhil olmak üzere sağlığı pozitif yönde etkileri sebebiyle araştırılmaya başlanmıştır. Antibiyotiklere direnç gösteren patojenlerin artmasıyla, yeni antimikrobiyal ajanlar araştırılmaktadır. Elma sirkesi, yüksek antimikrobiyal aktivitesi sebebiyle çalışmada kullanılmıştır. Kitosan doğal kaynaklı, toksik etkiye sahip olmayan, ekonomik olması, gıdalarda; antioksidan ve antimikrobiyal etkisi, emülsiyon oluşturma, nem tutma gibi özelliklerinden dolayı tercih edilmiştir. Bu çalışmada, bir polisakkarit olan kitosan, arı poleni ve elma sirkesi ile kapsülendi. Kapsülleme işleminde dondurarak kurutma yöntemi kullanıldı. Dondurarak soğutma sıcaklığı $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ olarak belirlendi. Elde edilen kapsüllenmiş kitosan bileşikleri Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analiz edildi ve kriyoskopi yöntemi ile molekül ağırlıkları belirlendi. Sentezlenen bileşiklerin toplam fenol bileşik miktarları ve % antioksidan aktivitesi UV spektrofotometresiyle hesaplandı ve antioksidan bileşiklerin enkapsülasyonda yükleme kapasiteleri belirlendi. Elde edilen CS_x ve CS_y bileşiklerin antibakteriyel analizleri ve yüzey aktivite analizleri *Listeria Monositogenes*, *Staphylococcus aureus*, *E.coli* ve *Salmonella* bakterilerine karşı kuyu difüzyon metodu ve Zeiss mikroskop kullanılarak analiz edildi. Analiz sonuçlarına göre, CS_x ve CS_y bileşiklerinin toplam fenol miktarları sırasıyla 34 ve 35 mg/100x10⁻⁶ mgGAE ve %antioksidan aktivite değerleri sırasıyla ve % 92.4 ve 93 olarak belirlendi. Molekül ağırlıkları kitosan (CS), CS_x ve CS_y bileşikleri için sırasıyla 67, 85 ve 140 kDa olarak hesaplandı. Antioksidan bileşiklerin enkapsülasyonda yükleme kapasiteleri CS_x ve CS_y için sırasıyla %84.8 ve %90.8 olarak analiz edildi. Antibakteriyel analiz sonuçlarına göre en büyük inhibisyon

zonları *L.monocytogenes* bakterisine karşı meydana geldi. Yüzey aktivite analizlerinde ise polen, elma sirkesi, kitosan ve CSy bileşigi dört farklı bakteriye karşı yüksek bir yüzey aktivite gösterirken sadece CSx bileşigi *S.aureus* bakterisine karşı yüzey aktivite göstermemiş olup diğer bakterilere karşı anlamlı aydınlık ve parlak yüzeyler elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Polen, Kitosan, Elma Sirkesi, Enkapsülasyon, Dondurarak-Kurutma

ENCAPSULATION OF BEE POLLEN AND APPLE CIDER VINEGAR WITH CHITOSAN

ABSTRACT

Bee pollen, which is produced by honey bees and contains basic and some essential nutrients necessary for the body to function, consists of protein, sugar, phenolic compounds, fiber and vitamins. Recently, it has been investigated for its positive effects on health, including antifungal, anticarcinogenic, anti-inflammatory, antioxidant, immunomodulatory and wound healing. With the increase of pathogens resistant to antibiotics, new antimicrobial agents are being investigated. Apple cider vinegar was used in the study due to its high antimicrobial activity. Chitosan has been preferred because of being natural origin, non-toxic and economical and it is used in foods for antioxidant and antimicrobial effects, emulsification, and moisture retention. In this study, chitosan, a polysaccharide, was encapsulated with bee pollen and apple cider vinegar. The freeze-drying method was used in the encapsulation process. The freeze cooling temperature was determined as -80°C . The encapsulated chitosan compounds were analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and their molecular weights were determined by cryoscopy method. Total phenol compound amounts and % antioxidant activity of the synthesized compounds were calculated by UV spectrophotometer and the loading capacity of antioxidant compounds in encapsulation was determined. Antibacterial analyzes and surface activity analyzes of the obtained CSx and CS y compounds were analyzed against *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* bacteria using the well diffusion method and Zeiss microscope. According to the results of the analysis, the total phenol amounts of CSx and CSy compounds were determined as 34 and 35 mg/100x10⁻⁶ mgGAE, and the % antioxidant activity values were 92.4% and 93%, molecular weights were calculated as 67, 85 and 140 kDa for chitosan (CS), CSx and CSy compounds, respectively. The encapsulation loading capacities of antioxidant compounds were analyzed as 84.8% and 90.8% for CSx and CSy, respectively. According to the antibacterial analysis results, the biggest inhibition zones occurred against *Listeria monocytogenes*

bacteria. In the surface activity analysis, while pollen, apple cider vinegar, chitosan and CSy compound showed high surface activity against four different bacteria, only CSx compound did not show surface activity against *Staphylococcus aureus* bacteria, and significant bright and bright surfaces were obtained against other bacteria.

Keywords: Pollen, Chitosan, Apple Cider Vinegar, Encapsulation, Freeze-Drying

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ONUR SÖZÜ	i
ÖNSÖZ.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	x
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
I. GİRİŞ	1
A. Dünyada ve Türkiye’de arı yetiştiriciliği.....	3
B. Bal Arılarının Ürünleri	5
1. Bal.....	6
2. Arı Sütü.....	6
3. Bal Mumu	6
4. Propolis	7
5. Arı Zehiri	7
6. Polen	7
C. Polenin Özellikleri.....	8
1. Polenin Sağlığa Faydaları	13
D. Elma Sirkesinin Özellikleri.....	15
1. Elma Sirkesinin Sağlık Üzerine Etkileri	16

E. Enkapsülasyon Yöntemleri.....	17
F. Kitosanın Özellikleri.....	21
G. Amaç.....	22
II. MATERYAL VE METODLAR	24
A. Materyal.....	24
B. Metod.....	24
1. Polen Ekstraktının Hazırlanması.....	24
2. Polen ve Elma Sirkesi Yüklü Kitosan Nanoparçacıklarının Hazırlanması..	24
3. Karakterizasyon	25
4. Polen, Elma Sirkesi ve Nano bileşiklerin Polifenol Bileşiklerinin Analizi .	25
5. Polen, Elma Sirkesi ve Nano Bileşiklerin Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi:	25
6. Polifenol Bileşiklerin Enkapsülasyonda Yükleme Kapasitesinin Belirlenmesi	26
7. Molekül Ağırlıklarının Belirlenmesi.....	26
8. Yüzey Aktivite Analizi	26
9. Antibakteriyel Analiz.....	27
10. İstatistik Analiz	27
III. BULGULAR.....	28
A. FTIR Analizi.....	28
B. Polifenol Miktarının Belirlenmesi	30
C. % Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi.....	32
D. Polifenol Bileşiklerin Enkapsülasyonda Yükleme Kapasitesinin Belirlenmesi	33
E. Molekül Ağırlığının Belirlenmesi.....	34
F. Antibakteriyel Analiz Sonuçları	34
G. Yüzey Aktivite Analiz Sonuçları.....	39
IV. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	61

V. KAYNAKÇA	64
ÖZGEÇMİŞ.....	78

KISALTMALAR

%	: Yüzde
CS	: Kitosan
CSx	: 0,5 Gram Polen, Elma Sirkesi ve Kitosan Enkapsülasyonu bileşiği
CSy	: 1,5 Gram Polen, Elma Sirkesi ve Kitosan Enkapsülasyonu bileşiği
g	: Gram
GAE	: Gallik Asit Eşdeđeri
kg	: Kilogram
mg	: Miligram
nm	: Nanometre

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.	Dünya Kovan varlığı (bin adet)	4
Çizelge 2.	Türkiye illere göre kovan sayısı (adet)	5
Çizelge 3.	Polenin Temel Kimyasal yapısı	9
Çizelge 4.	Polenin içerdiği mineraller, vitaminler ve elementler	10
Çizelge 5.	Polenin en fazla antimikrobiyal aktivite gösterdiği bakteriler ve inhibasyon zonları	13
Çizelge 6.	Elma sirkesinin özellikleri	15
Çizelge 7.	Elma sirkesinin bazı bakterilere karşı inhibasyon zonları	16
Çizelge 8.	Enkapsülasyon tekniklerine bağlı partikül boyutları	19
Çizelge 9.	Sentezlenen bileşiklere ait polifenol miktarları	31
Çizelge 10.	Bileşiklerin % antioksidant aktivitesi	32
Çizelge 11.	Örneklerin inhibasyon zon alanları (mm ²)	35
Çizelge 12.	Örneklerin yüzey aktivite sonuçları	40

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.	Arı Yetiştiriciliği [10].	3
Şekil 2.	2018 yılı ülkelere göre kovan grafiği.....	4
Şekil 3.	Polen görünüşü ve tane farkları (Shubharani vd., 2013: 82–90).	8
Şekil 4.	CSx (a) ve CS (kitosan) bileşiklerinin FTIR spektrumları	29
Şekil 5.	CSy (b) ve CS (kitosan) bileşiklerinin FTIR spektrumları	29
Şekil 6.	CSy (a) ve CS (b) bileşiklerinin FTIR spektrumları.....	30
Şekil 7.	Polen, Elma Sirkesi, Kitosan, CSx (a) ve CSy (b) bileşiklerinin polifenol madde miktarları.....	31
Şekil 8.	Polen, elma sirkesi, kitosan (CS), CSx ve CSy bileşiklerinin % antioksidan aktiviteleri	33
Şekil 9.	Polen, elma sirkesi, Kitosan, CSx ve CSy bileşiklerinin <i>L.monocytogenes</i> (a), <i>Salmonella</i> (b), <i>E.coli</i> (c) ve <i>S.Aureus</i> (d) bakterilerine karşı inhibisyon zonları.....	37
Şekil 10.	Polen (a), elma sirkesi (b), kitosan (c), CSx (d) ve CSy (e) bileşiklerinin <i>Listeria Monocytogenes</i> bakterilerine karşı sıfır ve 1. gün yüzey aktivitesi	45
Şekil 11.	Polen (a), elma sirkesi (b), kitosan (c), CSx (d) ve CSy (e) bileşiklerinin <i>S.Aureus</i> bakterisine karşı sırasıyla sıfır ve 1. gün yüzey aktivitesi	50
Şekil 12.	Polen (a), elma sirkesi (b), kitosan (c), CSx (d) ve CSy (e) bileşiklerinin <i>E.coli</i> bakterisine karşı sırasıyla sıfır ve 1. gün yüzey aktivitesi	55
Şekil 13.	Polen (a), elma sirkesi (b), kitosan (c), CSx (d) ve CSy (e) bileşiklerinin <i>salmonella</i> bakterisine karşı sırasıyla sıfır ve 1. gün yüzey aktivitesi	60

I. GİRİŞ

100 milyon yılı aşkın olarak dünyada yer alan bal arıları, hayvanlar aleminde böcekler sınıfının zar kanatlılar tanımıında bulunan *Apis* cinsi içerisinde kategorize edilmiştir. *Apis* cinsinin içerisinde bulundurduğu 11 tür keşfedilmiştir. *Apis mellifera* dünyada en sık rastlanan bal arısı türüdür. Asya kıtasında rastlanan *Apis florea*, *Apis dorsata* ve *Apis cerana* yetiştiriciliği yapılan bal arıları arasındadır. Farklı ekolojik koşullara ve geniş alana yayılıma bağlı olarak aynı tür bal arıları kendi içlerinde, bir çok alt tür, ırk ve farklı ekosistemlere özgü ayırt edilebilen genetik farklılıklar barındırmaktadır (Rutnerr, 1988: 284)

Apis mellifera ligustica (İtalyan arısı), *Apis mellifera carnica* (Karniyol arısı), ek olarak Türkiye’de de görülen *Apis mellifera anatoliaca* (Anadolu arısı) ve *Apis mellifera caucasica* (Kafkas arısı), *Apis mellifera* türünün yetiştiriciliği en sık yapılan ve en çok bilinen alt türleridir. Türkiye’de *Apis mellifera anatoliaca* (Anadolu arısı)’nın farklı ekosistemlere adapte olmuş Ege arısı, Trakya arısı gibi ekotipleri görülmektedir (Korkmaz, 2017).

Son yıllarda, beslenme ve sağlık yararları konusunda halkın bilinçlenmesi nedeniyle arı ürünlerinin tüketimi artmaktadır. Arı ürünleri, geniş biyolojik aktiviteleri nedeniyle dünya üzerinde uzun süredir fonksiyonel gıdalar olarak kabul edilmektedir. Başlıca arı ürünleri bal, arı sütü, propolis ve arı polenidir. Bal, yaklaşık 5.000 yıldır yara, yanık ve yara izlerinin tedavisinde kullanılan arı ürünlerinden biridir (Yu ve Yen, 1999).

İşçi bal arıları tarafından üretilen arı poleni, şeker, protein, lif, fenolik bileşikler, mineral tuzlar ve vitaminlerden oluşmakta olup, arıların gelişiminin tüm aşamalarında besin kaynağı olarak kullanılmaktadır. Vücudun sağlığı sürdürmesi için gerekli görülen temel ve bazı esansiyel besinleri içerir. Ek olarak, antikanserojenik, antioksidan, antiinflamatuvar, antifungal, hepatoprotektif, bağışıklık düzenleyici ve yara iyileşmesi dahil olmak üzere çok sağlığa faydalı etkilere sahiptir (Olczyk vd., 2006).

Antibiyotiklere direnç gösteren patojenlerin sayısında sürekli bir artış olmasıyla birlikte antibiyotik direnci dünya çapında büyük bir sorun haline gelmiştir ve yeni antimikrobiyal ajanlar üzerine araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. Eski zamanlarda, enfeksiyonla mücadele etmek ve açık cilt yaralarını korumak için bal ile birlikte elma sirkesi kullanıldığı belirlenmiştir. Tarihsel olarak sirke, 5000 yılı aşkın bir süredir ticari bir ürün olarak üretilmekte ve satılmaktadır. Sirke, etil alkolün *Acetobacter* tarafından asetik aside dönüştürülmesiyle ortaya çıkan üründür. Elma sirkesi %5 asetik asit oranıyla, nispeten düşük asitliğe sahip elma şarabından üretilir. Ek olarak, polifenoller, organik asitler, vitaminler, flavonoidler ve mineraller içerir (Delcampo vd., 2008: 63). Elma sirkesinin, hiperkolesteriyemiye, kilo kaybına, hiperlipidemiye, beslenme desteğine, antioksidan kaybını önlemeye, kan basıncını düşürmeye yardımcı olduğu ve zararlıbağırsak kaynaklı bakterileri elimine ettiği tespit edilmiştir (Palaska vd., 2016: 655-664). Elma sirkesi, farklı bakteri türleri üzerinde, büyümeyi etkileyen, mononükleer sitokin ve fagositik tepkileri baskılayan, hücre bütünlüğüne, yapısal ve metabolik proteinlere zarar veren antimikrobiyal özelliklere sahiptir (Yadnik vd., 2018: 1-12).

Gıdalara; depolama ve üretim aşamasında kalitenin uzun zaman muhafaza edilmesi ve tekstürün iyileştirilmesi için eklenen gıda katkı maddelerinden özellikle yapay olan maddeler, eğer izin verilen limitin üzerinde veya izinsiz kullanılırsa tüketicilerin sağığına tehlike arz etmektedir. Bu sebeple; bazı maddelerin kullanımı tamamen yasaklanmış veya izin verilen miktarlar azaltılmıştır. Buna bağılı olarak; endüstri kullanımında bu yapay gıda katkı maddelerinin yerini doğal kaynaklardan elde edilen ve toksik olmayan katkı maddelerinin kullanılması yaygınlaşmıştır. Kitosan bu doğal katkı maddelerinden biri olmakla birlikte, kitinin kısmi deasetilasyonu ile elde edilmektedir (Jayakumar vd., 2006).

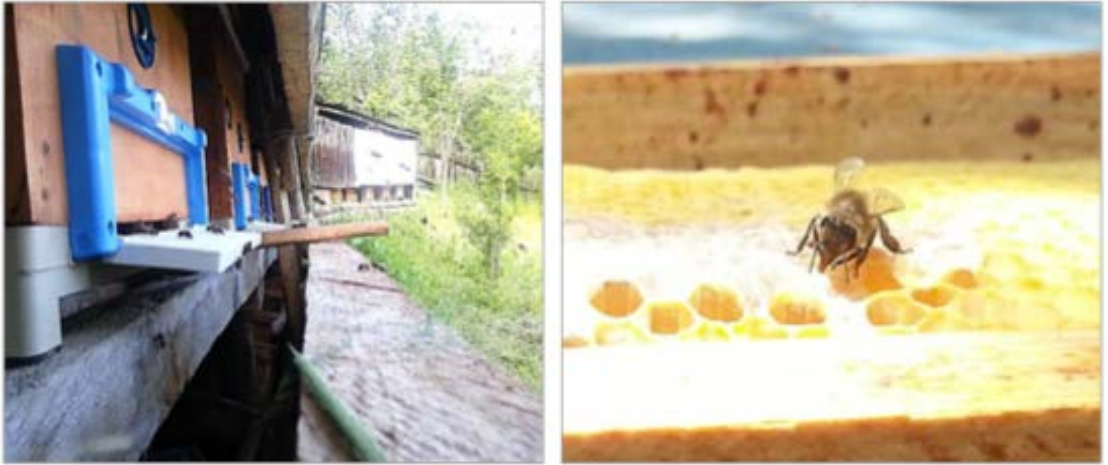
Kitosan nem tutma, çöktürme, film oluşturma, antioksidan aktivite, antimikrobiyel aktivite, enzim immobilizasyonu ve emülgatör gibi birden fazla fonksiyonel özelliğı olmasından dolayı son zamanlarda sıklıkla kullanılmaktadır. Kitosan aynı zamanda , hipokolestolemik ve antitümör gibi biyofonksiyonel etkiler göstermekte ve toksik içeriklerden oluşmamaktadır. Bu yüzden kitosan ilaç, gıda, kozmetik, tarım, tıp ve tekstil gibi alanlarda yaygın olarak

kullanılmaya başlanmıştır. Kitosan ve kitinin kullanımının artmasının bir diğer sebebi ise, son bir kaç yıldır atıkların değerlendirilmesi konusunun gündeme gelmesidir. Kabuklu deniz ürünleri işleyen pek çok firma, üretimden sonra ortaya çıkan kabukları değerlendirmek istemektedir (Koç ve Özkan, 2011).

A. Dünyada ve Türkiye’de arı yetiştiriciliği

Dünyada, ticari veya hobi amacıyla yapılan arı yetiştiriciliği, az bir sermaye gereksinimi, arazi gerektirmemesi, kısa sürede gelir elde edilmesi gibi sebeplerden önemli ve tercih edilebilir bir tarımsal faaliyettir. Ek olarak, doğada tozlaşmaya sağladığı pozitif etkilerden dolayı, sürekliliğin sağlanmasında önemli bir etkisi mevcuttur (Burucu, 2020)

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde farklı hedefler doğrultusunda gerçekleştirilen arıcılık; birbirinden farklı arı ürünlerinin üretilmesi niyetiyle arıyı, kaynakları, iş gücü ve teknikleri haymanlayan sosyo-ekonomik bir çalışma olarak tanımlanmaktadır (Burucu vd., 2018: 23-35)



Şekil 1. Arı Yetiştiriciliği [10].

Arı yetiştiriciliğindeki, başlıca kullanılan malzemelerden birisi, arıların barınmasında rol oynayan; strafor, tahta vb. ürünler kullanılarak belirli standartlara uygun olarak tasarlanmış arı kovanlarıdır (Burucu, 2017: 82)

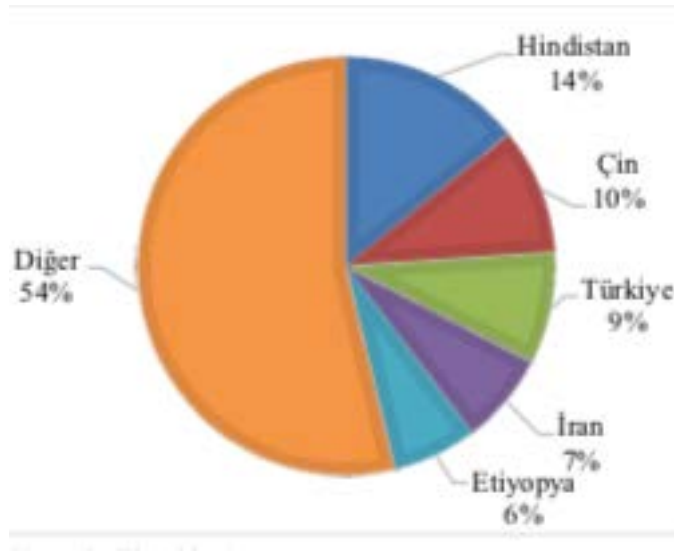
Arı yetiştiriciliğinde, 2013-2018 yılları arasında arı kovanlarının sayısında düzenli bir artış yaşandığı Çizelge 1’de gösterilmektedir. Dünyadaki toplam kovan sayısı, 2018 ve bir önceki yıl karşılaştırıldığında %1,42 artarak, 92,3 milyona ulaşmıştır.

Çizelge 1. Dünya Kovan varlığı (bin adet)

ÜLKELER	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Hindistan	11.600	11.800	12.004	12.482	12.788	13.048
Çin	8.900	8.950	8.998	9.023	9.029	9,049
Türkiye	6.641	7.083	7.748	7.900	7.991	8.108
İran	6.644	6.996	6.418	6.686	6.700	6.601
Etüyopya	5.124	5.885	5.916	6.189	6.066	6.018
Rusya	3.284	3.341	3.474	3.425	3.317	3.182
Arjantin	3.000	2.980	2.957	3.024	3.014	3.020
Tanzanya	2.850	2.900	2.942	2.987	2.996	3.020
İspanya	2.444	2.557	2.730	2.835	2.905	2.966
ABD	2.640	2.740	2.660	2.775	2.683	2.803
Diğer	31.727	32.188	32.419	33.125	33.704	34.636
Dünya	84.855	87.421	88.043	90.232	90.998	92.292

Kaynak: (TUİK,2020).

2018 yılı verilerine bakıldığında, 13,1 milyon kovan sayısı ile dünyada bulunan toplam kovan miktarın %14,1'lik kısmını oluşturup, birinci sırada bulunmaktadır. Çin ise 9,1 milyon kovan sayısı ile %9,8'lik kısmını oluşturup ikinci sırada ek olarak, Türkiye 8,1 milyon kovan ile %8,6 lik kısmını oluşturup üçüncü sırada yer almaktadır.



Şekil 2. 2018 yılı ülkelere göre kovan grafiği

Kaynak (TUİK,2020)

Türkiye’de bulunan kovan sayısı incelendiğinde, 2017 yılında %12’lik bir kısmı oluşturan Muğla 958 bin kovan ile ilk sırada olup, arkasından 562 bin kovan sayısı ile Ordu ve 455 bin kovan sayısı ile Adana gelmektedir. Türkiye’nin illere göre kovan sayısı Çizelge 2’de gösterilmiştir.

Çizelge 2. Türkiye illere göre kovan sayısı (adet)

İLLER	2016	2017	2018	2019	2020
Muğla	982.601	958.328	935.328	918.116	900.583
Ordu	577.858	562.299	568.547	573.358	573.375
Adana	473.919	454.768	461.987	469.938	481.557
Mersin	262.564	273.384	267.251	282.749	290.795
Aydın	210.879	215.743	232.009	244.519	273.949
İzmir	278.210	280.386	281.060	274.826	257.738
Sivas	219.942	215.878	239.575	243.673	256.374
Antalya	238.075	226.592	230.323	217.705	216.423
Trabzon	186.047	159.104	156.764	158.770	172.470
Balıkesir	168.191	167.361	172.881	170.432	168.952
Diğer	4.302.081	4.477.229	4.562.564	4.574.274	4.586.869
Türkiye	7.900.364	7.991.072	8.108.424	8.128.360	8.179.085

Kaynak (TUIK,2020)

B. Bal Arılarının Ürünleri

Dünyada sağlıklı yaşam üzerine yapılan çalışmaların artması ve toplumların bilinçlenmesi, insanların ihtiyacı olan besin maddelerini ve enerjiyi doğal kaynaklardan elde etmesi eğilimini arttırmıştır, arı yetiştiriciliğinin değerlendirilmesine, artmasına ve geliştirilmesinde önemli bir rol oynamıştır (Erkan ve Aşkın, 2001:19-28). İçerdikleri mineral, vitamin ve enzimlerden dolayı antimikrobiyel, antibakteriyel, antiparaziter ve antiviral özelliklerinden dolayı bal ve diğer arı ürünleri sağlıklı bir diyet içerisinde yer almaktadırlar (TKDK, 2016).

Bal arıları; balın yanı sıra; arı sütü, bal mumu, propolis, arı zehiri ve polen gibi insan diyeti bakımından önemli ürünleri oluştururken, aynı zamanda bitkilerde tozlaşmayı sağladıkları için doğada denge ve tarım üretimi bakımından da önemli bir yere sahiptirler (TOB, 2016).

1. Bal

Bal, bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından, bitkilerin çiçek kısmında veya öteki canlı kısımlarında varolan nektar bezlerinden salgılanan nektarın ve maddelerin toplanıp, vücutlarında yapılarının değiştirilip petek gözlerinde saklanması ve olgunlaşması akabinde oluşan tatlı bir üründür (TSE, 2010).

Balın içeriğinde çok sayıda çeşitli bileşenler bulunmaktadır ve içerdiği mineraller vitaminler, flavonoidler, organik asitler, aminoasitler, enzimler ve fenolik asitler sebebiyle besleyici, sindirimi rahat, hastalıklara tedavi edici ve koruyucu özelliği olan fonksiyonel bir gıdadır (Özmen ve Alkın, 2006: 155-160). Kaynağına ve bölgesine göre balın kimyasal bileşimi farklılık göstermekle beraber, genel olarak %82 karbonhidrat, %17 su, %0.7 mineral ve %0.3 protein, organik asitler, vitaminler, fenolik bileşlerden oluşmuştur. Balda bulunan temel şekerler fruktoz ve glikozdur (Karabagias, 2014: 181-190).

2. Arı Sütü

Yavru arıların ve kraliçe arının beslenmesi için salgılanan arı sütü, içeriğinde lipidler, proteinler, vitaminler, şekerler ve biyoaktif bileşikler bulunduran, vizkoz ve beyaz- sarı renkte bir besin maddesidir (Zong, 2014: 399-401; Oršolić, 2012: 173-194).

3. Bal Mumu

Bal arılarında karın bölgesinde mevcut olan dört adet çift bezden salgılanmakta olan kompleks maddelerin üretilmesi sonucu mal mumu oluşmaktadır. Bal mumunun yapısında diesterler (%14), hidroksi esterler (%12), çeşitli monoesterler (%35), uzun zincirli serbest yağ asitleri (%12) ve triesterler (%3) bulunmaktadır. Bal mumu, içinde bulunan bu bileşenlerden dolayı polar çözücülerde(su vb.) çözünmemektedir. Bal mumunu memeliler de sindirememektedir. Arılar, balmumunu; kovanlarında yavru arılar için kuluçka bölgesi olarak veya polenle bal depolamak gibi bir çok amaç ile kullanmaktadır. Sanayi alanına bakıldığında ise, eczacılık ve kozmetik için bir çok farklı amaçla da balmumunun kullanıldığı görülmektedir (Schmidt, 1997: 15-27).

4. Propolis

Propolis, *Apis mellifera*'nın bir çok bitki kaynağından topladığı reçinenin karışımından oluşmaktadır. Propolisin coğrafi kaynak ve fizyokimyasal özellikleri açısından on iki farklı türü bulunmaktadır. α -tokoferol, tiamin, askorbik asit, riboflavin gibi vitaminlerin yanı sıra; kalsiyum, bakır, stronsitum elementleri ile sinamik, kafeik ve miristik asit bileşenlerini de içermektedir (Aksoy ve Dığrak, 2006: 471-478). Arılar, sıklıkla propolis ile balmumunu karıştırmaktadır. Arılar propolisi yuvadaki çatlakları kapatmak, yabancı organizmaları yuva girişlerinden uzak tutmak ve yuvanın iç duvarlarını pürüzsüzleştirmek için kullanmaktadır. Propolis, insanlar tarafından sağlık amacıyla antikanserojen ve antimikrobiyal etkileri için tüketilmektedir. Çalışmalar sonucunda çeşitli propolis ekstraksiyonlarının; kanser hücrelerinin gelişimini durdurduğu, tümör hücrelerinde ise çoğalmayı ve farklılaşmayı indirgediği görülmektedir (Choudhari vd., 2013).

5. Arı Zehiri

Bal arılarının karın boşluğundan bulunan bezlerin, içinde apamin (%2-3), melitin (%50-55), ve adolapin (%1) gibi biyoaktif peptidlerin, dopamin (%0.2-1.5), histamin (%0.7-1.5) ve noradrenalin bileşenlerin yanı sıra, farklı enzimlerin bulunduğu savunma amacıyla üretilen salgı arı zehri olarak tanımlanmaktadır (Kettner vd., 2001: 914-920). Deri hastalıkları, sırt ağrıları ve romatizma gibi hastalıkların tedavisinde geleneksel bir yöntem olarak arı zehri kullanılmaktadır. Yapılan pek çok çalışmada arı zehrinin; karaciğer, prostat ve meme kanserine bile karşı antikanserojenik etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Park vd., 2011: 801-812)

6. Polen

Bal arıları tarafından toplanılan arı poleni; çiçek polenin bir miktar bal, nektar, bal mumu, enzimler ve arıların salgılarının harmanlanmasıyla oluşan, kovadaki tüm gelişim aşamalarında besin kaynağı olarak kullanılmak üzere depolanan bir arı ürünüdür (Pascoal vd., 2014: 233-239).

Son zamanlarda, arı poleni, yüksek miktarda vitamin, antioksidan, yağ ve esansiyel amino asitler gibi sağlığa faydası olan bileşikler içerdiği için, bir fonksiyonel gıda olarak tüketilmeye başlanmıştır (Conte vd., 2017: 12-19).

C. Polenin Özellikleri

Polen taneleri, toplandığı bitki türlerine bağlı olarak renk, şekil, boyut ve ağırlık bakımından farklılık gösterirler. Polenler parlak sarıdan, siyaha kadar değişen renklerde ve şekil olarak ise yuvarlak, silindirik, üçgen veya dikenli şekilde gözlenmiştir. Ağırlıkları bir düzine veya birkaç düzine mikrograma eşittir.



Şekil 3. Polen görünümleri ve tane farkları (Shubharani vd., 2013: 82–90).

Polenin kimyasal kompozisyonu, en başta toplandığı bölgeye ve bitki kaynağına olmak üzere; toprak yapısına, iklim koşullarına, arıların cinsine, maruz kaldığı işlemlere ve farklı saklama koşullarına göre değişiklik göstermektedir (Nogueira vd., 2012: 11173–11187)

Biyolojik aktif madde bakımında zengin bir içeriğe sahip olan polenin, temel olarak içerdiği kimyasal bileşenler karbonhidratlar, proteinler, amino asitler, yağlar ve yağ asitleri, fenolik bileşikler, enzimler, biyoelementler ve vitaminlerdir (Campos vd., 2008: 152– 162)

Ortalama olarak polenin %30.8'i sindirilebilir karbonhidratlardan, indirgen şekerlerden olan fruktoz ve glukoz ise %25.7 sini oluştururlar (Roulston ve Cane, 2000: 187–209).

Polen ortalama olarak, %10.4'ü izolösin, lösin, arjinin, metiyonin, lizin, fenilalanin, treonin, valin, triptofan ve histidin gibi vücutta sentezlenmeyen esansiyel amino asitler olmak üzere, %22.7 si proteinlerden oluşmaktadır (Kędzia ve Hołderna, 2005: 103-108).

Polen, %0.4'ü linoleik, γ -linoleik ve araşidonik asit gibi esansiyel yağ asitleri, %1.5'i fosfolipitler ve %1.1'i fitosteroller olmak üzere, yaklaşık olarak %5.1 i yağlardan oluştuğu saptanmıştır (Sorucu, 2006: 81-90)

Çizelge 3. Polenin Temel Kimyasal yapısı

Temel Bileşenler	Minimum(g/100g)	Maksimum(g/100g)
Toplam Karbonhidrat	13	55
Protein	10	40
Yağ	1	13
Kül	2	6
Fibrin	0.3	2.0
Diğer	2	6

Kaynak: (Szcześna, 2006: 1-15)

Fenolik bileşikler, antimikrobiyal, antidiyabetik, anti hiperlipidemi veya anti inflamatuvar etkiler gibi çok çeşitli işlevleri nedeniyle son zamanlarda dikkat çeken konulardan birisi olmasına rağmen, araştırmalarında en önemli neden antioksidan aktiviteleri olmuştur. Fenolikler, basit, düşük moleküler ağırlıklı, tek aromatik halkalı bileşiklerden, büyük ve karmaşık tanenlere veya türetilmiş polifenollere kadar çeşitlilik gösterirler. Karbon atomlarının sayısı ve düzenine bakılarak flavonoidler ve flavonoid olmayanlar olarak katagorize edilmişlerdir (Ares vd., 2013: 78-95). Flavonoidler, insan diyetindeki en yaygın polifenolik bileşik grubudur. Bunlar, in vitro çalışmalarda; anti alerjik, anti inflamatuvar, antioksidan, anti mikrobiyal, anti kanser ve anti ishal gibi belirli farmakolojik aktivite göstermişlerdir. Polen, yaklaşık olarak %1.6 oranında fenolik bileşikler içermektedir. Polende, çoğunluğu kaempferol, isorhamnetin ve kuersetin olan flavonoidler %1.4 oranında, çoğunluk olarak klorojenik asit olan fenolik asitler ise %0.2 oranında bulunur (Asafova vd., 2001: 171–174). Daha önceki bir çalışmaya göre, arılardan toplanan polenin içerisindeki toplam polifenol miktarı, 7.4 ile 9.7 mg/g polen arasında değişmekte olup ortalama olarak 8.2 mg/g polen olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak, polenin alkol ile ekstraksiyonu sonucunda toplam polifenol içeriğinin 21.4 mg/g ile 26.6 mg/g polene kadar arttığı gözlemlenmiştir (Kroyer ve Hegedus, 2001: 171–174). Arı poleninde fenolik bileşiklerin araştırıldığı çalışmaların çoğunda toplam fenolik içeriği, Folin Ciocalteu yöntemi ile belirlenmiştir. Folin Ciocalteu yöntemi; Trolox Eşiti Antioksidan Kapasite Yöntemi, Demir İyon İndirgeyici Antioksidan Güç Yöntemi gibi elektron transfer yöntemlerindedir. Yöntem, fenolik bileşenlerin ilk olarak alkol (etanol veya metanol) ve su karışımı ile ekstraksiyon yoluyla izole edilmesi ve spektrofotometrik olarak (UV-vis) ölçülen renk değişimine ve numunedeki fenoller tarafından indirgenen molibdat-tungstat reaktifinin azalması

ile ilişkilidir. Yöntemin dezavantajı, fenolik olmayan diğer bileşenlerin de molibdat-tungstat reaktifini indirgeyebilmesidir (Magalhães vd., 2008: 1–19).

Ek olarak, vitaminler ve biyoelementler gibi insan sağlığı açısından önemli olan maddeleri içerisinde barındıran polen, hem %0.1'i A, E ve D gibi yağda çözünen, hem de %0.6'sı B1, B2, B6 ve C gibi suda çözünen vitaminlerin ve pantotenik, nikotinik ve folik, biotin, rutin ve inositol gibi asitlerin oldukça önemli bir kaynağıdır. Belirtilen bileşenler polenin yaklaşık olarak %0.7'sine eşittir (Oliveira vd., 2009: 1099-1102).

Makro besinler (kalsiyum, fosfor, magnezyum, sodyum ve potasyum) ve mikro besinler (demir, bakır, çinko, manganez, silikon ve selenyum) gibi biyo elementler ortalama olarak %0.02 oranında bulunduğu tespit edilmiştir (Filipiak vd., 2017).

Çizelge 4. Polenin içerdiği mineraller, vitaminler ve elementler

Mineral, vitamin ve elementler	Minimum(g/100g)	Maksimum(g/100g)
Mangenezyum	200	3000
Fosfor	800	6000
Çinko	30	250
Potasyum	4000	20000
Bakır	2	16
Kalsiyum	200	3000
Manganez	20	110
Demir	11	170
Riboflavin	6	20
Pantotenik asit	5	20
Tiyamin	6	13
Niyasin	40	110
Pridoksin	2	7
Biyotin	0.5	0.7
β-karoten- Provitamin A	10	200
Tokoferol- Vitamin E	40	320
Askorbik Asit-Vitamin C	70	560
Folik asit	3	10

Kaynak: (Sorucu, 2019: 1-15)]

Günümüzde, doğal kaynaklı antioksidanların çok işlevli, hastalıklara karşı koruyucu ve karmaşık gıda sistemlerinin oksidasyonunu önlemek için kullanılabilecekleri düşünülmektedir. Doğal antioksidan aktivite, reaksiyon mekanizması, deney koşulları ve matrisin heterojenliği gibi çeşitli parametrelerle

bağlıdır. Polen ekstraktlarının antioksidan özellikleri, bileşenlerinin karmaşık yapısı nedeniyle tek bir yöntemle değerlendirilemez. Bu sebepten, antioksidan kapasitesini değerlendirmek ve karşılaştırmak için en az iki yöntemin kullanılması önerilmiştir (Sakanaka ve Ishihara, 2008: 739–744). Gıdalarda, antioksidan aktivitesini belirlemek için çok sayıda ve çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (Decker vd., 2005: 4303-4310).

Ürünün, toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesi sağlayan yöntemler, elektron transferine (ET) bağlı yöntemler ve hidrojen atomu transfer (HAT) reaksiyonlarına bağlı yöntemler olmak üzere ikiye ayrılabilir. Hidrojen atomu transferine bağlı yöntemler genellikle, azo bileşiklerin yapısının bozulması ile ortaya çıkan peroksil radikalleri için substratın ve antioksidanın rekabetiyle sonuçlanan, yarışmacı reaksiyonlar ile ilişkilidir. Hidrojen atomu transferi (HAT) yöntemleri başlıca olarak, toplam radikal yakalayıcı antioksidan parametre (TRAP), oksijen radikal absorpsiyon kapasite (ORAC) ve krosin beyazlatma yöntemleri ile kategorize edilebilir. Elektron transferine (ET) bağlı yöntemler ise antioksidanın oksidasyonu indirgediğinde oluşan renk değişimi farkını ölçerek sonuç verir. Renk değişiminin derecesi ve miktarı numunelerin antioksidan konsantrasyonu ile ilişkilidir. Elektron transferine (ET) bağlı yöntemler Troloks eşiti antioksidan kapasite (TEAC), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik içeriği yöntemi (FCR), oksidasyon olarak bakır (II) kullanan toplam antioksidan potansiyel yöntemi (CUPRAC) ve demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP) yöntemleri olarak başlıklandırılabilir (Somogyi vd., 2007: 41-55).

Troloksa eşdeğer antioksidan kapasite (TEAC) tahlili ilk olarak toplam antioksidan kapasite (TAC) tayini için basit ve uygun bir yöntem olarak geliştirilmiştir. Test, antioksidanların kararlı radikal, ABTS⁺ ((2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)), 734 nm'de maksimum absorpsiyona sahip, antioksidanların varlığında yoğunluğu azalan mavi-yeşil bir kromofor olarak tanımlanan, katyonu inhibe etme miktarına bağlıdır. Antioksidanlar radikal katyonu nötralize edebilir. ABTS⁺ den elektron bağışısı yoluyla doğrudan indirgeme veya hidrojen atomu bağışısı yoluyla radikal söndürme yoluyla ABTS üretilir ve bu iki mekanizmanın dengesi genellikle ortamın antioksidan yapısı ve pH değeri ile belirlenir (Magalhães vd., 2008: 1-19)

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali, bir kaç kararlı organik nitrojen serbest radikallerinden biridir; çeşitli numunelerin serbest radikal inhibasyon kabiliyetini belirlemek için yaygın olarak kullanılmıştır (Silva, 2006: 507-511). Spesifik bileşiklerin veya ekstraktların antioksidan aktivitesinin değerlendirilmesi için bir metanol solüsyonunda stabil DPPH radikali ile reaksiyona girmeleri sağlanır. Radikal formundaki DPPH, 515 nm'de bir antioksidan bileşikten gelen hidrojen ile indirildiğinde kaybolan karakteristik bir absorbansa sahiptir. Antiradikal aktivite (PI değerleri - % inhibasyon) cinsinden belirlenir. Aşağıda PI değeri formülü belirtilmiştir.

$$\%PI(\text{antiradikal aktivite})=[A_0-A_t/A_0] \times 100 \quad (1)$$

A₀ DPPH-methanol solüsyonunun absorbansı, A_t ise DPPH-polen ekstraktı absorbansı değeridir. Bir diğer antioksidan hesaplama formülü de;

$$\% \text{Antioksidan} = 100 - [(\text{ürün}]_{\text{abs}} - [\text{blank}]_{\text{abs}}] / [\text{kontrol}]_{\text{abs}}] \times 10 \quad (2)$$

Daha önceki bir çalışmaya göre, arılardan toplanan polen, %35 gibi yüksek bir miktarda antiradikal aktivite (PI) gösterse de, elde edilen polen ekstraktları %39 ile %53 antiradikal aktivite gösterip, DPPH radikalinin azalmasını önemli ölçüde arttırmıştır (Yen ve Duh, 1994: 630-632).

Günümüzde, antibiyotiklere karşı direnç gösteren bakterilerin artması, çok büyük bir sorun haline gelmektedir. Polen, Gram (+) bakterilere daha etkili olmakla birlikte, Gram(-) bakterilere karşı da inhibe edici etkileri olduğu için, yeni bir antimikrobiyal ajan olarak kullanılabilmesi saptanmıştır (Morais vd., 2011: 1097-1100). Polenlerin, *Salmonella*, *Proteus*, *Escherichia coli* ve çeşitli koliform bakterilere karşı, içerisinde barındırdığı Mirisetin, Quercetin, ve Kaempferol maddelerinden dolayı inhibe edici etkisi olduğu görülmüştür (Bayrak, 2005). Çizelge 5'te daha önceki bir çalışmaya göre polenin en fazla antimikrobiyal aktivite gösterdiği bakteriler ve inhibasyon zonları gösterilmiştir.

Çizelge 5. Polenin en fazla antimikrobiyal aktivite gösterdiği bakteriler ve inhibasyon zonları

Bakteri	İnhibasyon Zonları (mm)
<i>E. coli</i>	10,5±0,55
<i>L. monocytogenes</i>	10,0±0,00
<i>S. Enteritidis</i>	7,5±0,55
<i>P. aureginosa</i>	8,5±0,55
<i>E. faecalis</i>	13,5±0,55
<i>B. cereus</i>	-

Kaynak: (Dayan ve Oğur, 2019: 418-434)

Arı polenin biyoaktif kalitesinin ve pozitif etkilerinin zamanla azaldığı ve taze polenin nasıl şartlar altında proses gördüğüne ve depolandığına bağlı olarak önceki besinsel ve fonksiyonel değerinde farklılıklar olmaktadır. Arı polenin yüksek düzeyde nem tutma özelliği sebebiyle, bozulmayı önlemek ve raf ömrünü uzatmak için dehidrasyon işlemi (kurutma) gereklidir (Soares De Arruda, 2013: 143-148).

1. Polenin Sağlığa Faydaları

Polenin elde edildiği kaynağa ve işlenişine bağlı olarak, antifungal, antibakteriyel, antitümoral (meme kanserleri, prostat, kolorektal), immunmodulator, antioksidan, radyoprotektif, antianemi, antiaging, antidiyaretik, hafıza kuvvetlendirici, rejeneratif, afrodizyak ve performans artırıcı gibi biyolojik etkileri saptanmıştır (Bogdanov, 2011: 1-34).

Sıçanlar ve tavşanlar üzerinde yürütülen deneysel farmakolojik çalışmalar, polenin, plazma toplam lipidleri ve triaçilgliserollerin içeriğini azaltan hipolipidemik bir aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Hastalarda kan serumunda belirtilen lipid maddelerinin içeriğinin %35'ten %20'e düşmesini sağlamıştır (Manning, 2001: 60-75).

Polen ve özellikle yağda çözünen ekstraktları, enfarktüs sonrası durumların yanı sıra sistemik dolaşım bozuklukları ve arteriyel hipertansiyonda uygulanmaktadır. Ayrıca, yaşlı insanlara verilen küçük dozlarda polen, hem kan damarlarındaki aterosklerotik değişikliklerin inhibasyonuna hem de beyin kan akışının iyileşmesine izin verir (Wang vd., 1987).

Polenin, meslek hastalıkları, ağır metal kontaminasyonları, endüstriyel gazlar, tozlar ve ilaçlar (antiromatizmal ve antibiyotikler) gibi durumlarda detoksifiye edici aktivitesi de gözlemlenmiştir (Eraslan, 2009: 931-937).

Polenin hipoglisemik aktivitesi doymamış yağ asitleri, fosfolipidler ve fitosterollerin varlığına bağlıdır ve polen alan kişilerde trombosit agregasyonun azaldığı ve fibrinolitik sistem aktivitesinin arttığı doğrulanmıştır. Böylece, kalp hastalıklarından ve beyin felçlerinden koruyan bir etki gösterir (Samochovec ve Wojcicki, 2008: 587-592).

Ayrıca polen-etanol ekstraktlarının, *Staphylococcus aureus* gibi Gram pozitif bakterileri ve *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* gibi Gram negatif patojenler üzerinde hala etkili olan oldukça güçlü bir antibiyotik aktiviteye sahip olduğu da kanıtlanmıştır. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida albicans* gibi mantarlar üzerinde de etkili olduğu gözlemlenmiştir. Belirtilenler üzerinde inhibe edici özellikleri, içerisinde bulunan flavonoidlere ve fenolik asitlerle ilişkilidir (Erkmen ve Özcan, 2008: 587-592).

Polen, etkisi analgin, naproksen, fenilbutazon gibi nonsteroid anti inflamatuvar ilaçlarla karşılaştırılacak kadar yüksek bir anti inflamatuvar aktivite gösterir. Anti inflamatuvar etkinin mekanizması, araşidonik asidi, prostaglandin ve lökotrienler gibi toksik bileşiklere dönüştürmekten sorumlu enzimler olan siklooksijenaz ve lipoksijenazın aktivitesini inhibe ederek, dokularda akut ve kronik inflamatuvar koşulları azaltmasıyla ilgilidir (Pascoal vd., 2014: 233-239).

Polenin prostat bezinin iltihabi durumlarında faydalı etkisi uzun zamandır bilinmektedir. Klinisyenler, bakteriyel olmayan prostat iltihaplarında polenin, ağrıyı etkili bir şekilde giderdiğini ve hastaların durumunu iyileştirdiğini doğrulamaktadır. Polenin, pozitif etkileri olduğu iyi huylu prostat hiperplazisi vakalarında ve prostat kanserinin ilk aşamasında tespit edilmiştir. Bununla birlikte, kemoterapötik ajanlarla birlikte polen verildiğinde, önemli bir terapötik etki hisseden kişilerin sayısı önemli ölçüde artmıştır (Yasumoto vd., 1995: 1995).

Anti depresanlarla birlikte verilen polen, dozlarının düşürülmesini sağlar ve kısa sürede genel durumu iyileştirir. Polen, besleyici ve tonik özelliklerinin yanı sıra sinir dokusuna kan akışını iyileştirmesi nedeniyle zihinsel kapasiteyi artırır ve stres veya aşırı çalışma nedeniyle zayıflamış sinir sistemini güçlendirir. Bu

nedenle polen, fiziksel ve zihinsel aşırı yorgunluk, asteni tedavisinde etkilidir (Wojcicki, 1991: 151).

D. Elma Sirkesinin Özellikleri

Elma sirkesi taze, ezilmiş, organik olarak yetiştirilmiş elmaların tahta fiçılarda olgunlaşmaya bırakılmasıyla gerçekleşen, alkolik ve asetik olmak üzere, çift fermentasyon sonucunda elde edilen bir sirke çeşididir. Asetik fermentasyonun başlamasından önce elma şarabı, maya eklenerek gerçekleştirilen alkollü fermentasyona tabi tutulur, böylece asetik asit üretmek için gerekli alkol miktarı elde edilir (Rocío vd., 2010: 973-978).

Alkolün asetik asitte dönüştürülmesi, alkolün dehidrojenaz ile okside olup asetaldehit olması ile başlar. Asetaldehit, su ilavesiyle, hidrat asetaldehite dönüştürülür, bu da aldehit dehidrojenazın varlığında fermentasyonun ürünü olan asetik aside dönüştürülür. Asetik asit fermentasyonunu optimum koşullarda gerçekleştirmek için belirli bir çözünmüş oksijen konsantrasyonu elde etmek ve bunu korumak gereklidir çünkü; fermentasyon sürecinin hızını ve bitmiş ürünün duyuşsal niteliklerini etkiler (Ordóñez vd., 2013: 2713-2719). Çizelge 6'da elma sirkesinin özellikleri belirtilmiştir.

Çizelge 6. Elma sirkesinin özellikleri

Özellikler	Elma Sirkesi
Yoğunluk, kg/m ³	1013-1024
Kül, g/L	2-4,5
% Toplam asitlik(% asetik asit)	3,9-9
Uçucu olmayan asitler (% asetik asit)	0,1-0,55
Karbonhidratlar g/L	1,4-7
Malik asit g/L	0,47-0,80
Renk	sarı

Kaynak: (Banu, 2000: 306-312)

Sirkelerin kalitesi, sirkenin kimyasal bileşimi ve duyuşsal özellikleri ile ilgilidir. Fenolik ve uçucu bileşikler, sirkelerin duyuşsal ve fonksiyonel özellikleri üzerindeki önemli etkilerinden dolayı ilgi görmektedirler. Daha önceki bir çalışmada, yüksek briksli elma sirkesinde, klorojenik asit, 4-p-kumaroilkinik asit ve kafeik asit gibi başlıca bulunan fenolik bileşikleri belirlemiştir (Nakamura vd., 2010: 10124–10132). Ek olarak, yapılan başka bir çalışmada, elma sirkesinde

bulunan flavonoidler 9.48 - 62.37 mg/L arasına, ardından başlıca klorojenik asit olmak üzere, gallik asit, kafeik asit ve p-kumarik fenolik asitler 3,81- 21,44 mg/L miktarları arasında olduğu tespit edilmiştir. Çeşitli çalışmalar, sirkenin hipertansiyon üzerindeki önleyici etkisi ve karbonhidratlı gıdaların glisemik indeksini düşürmesi vb. ile antimikrobiyal ve antioksidan etkileri sayesinde olduğunu bildirmiştir (Ren vd., 2016: 1-8). Daha önceki yapılan bir çalışmaya göre, elma sirkesinin antioksidan aktivitesi DPPH testine göre 2,65 mMTrolox/L ile 14,69 mMTrolox/L arasında, ABTS testine göre 4,05 mMTrolox/L ile 20,19 mMTrolox/L arasında değişmiştir (Kelebek vd., 2017: 407-416).

Daha önceki çalışmalara göre, elma sirkesinin Gram pozitif ve Gram negatif bakteri suşlarına karşı güçlü antibakteriyel aktivite sergilediği görülmüştür. Gram negatif organizmalar söz konusu olduğunda, *Salmonella paratyphi A*'ya karşı daha az aktivite göstermiştir. Çizelge 7 de elma sirkesinin bazı bakterilere karşı inhibasyon zonları gösterilmiştir.

Çizelge 7. Elma sirkesinin bazı bakterilere karşı inhibasyon zonları

	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.paratyphi A</i>	<i>S.paratyphi B</i>
Elma sirkesi	26,60±0,548	31,60±0,548	15,80±0,447	25,80±0,447

Kaynak: (SAQİB, 2017: 11-15).

1. Elma Sirkesinin Sağlık Üzerine Etkileri

Sirkenin fonksiyonel ve terapötik özellikleri arasında antibakteriyel aktivite, kan basıncını düşürme, antioksidan aktivite, diyabetin etkilerinde azalma, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi sayılabilir. Sirke, tırnak mantarı, saç biti, siğiller ve kulak enfeksiyonlarını temizlemek ve tedavi etmek için kullanılmıştır. Tüketiciler, gıdalarda gıda kaynaklı patojenik mikroorganizmaların büyümesini engellemek için tipik olarak doğal koruyucu yöntemleri tercih ederler. Sirkedeki organik asitler ve esas olarak asetik asit, bakteri hücre ölümüne yol açan mikroorganizmaların hücre zarlarına geçer. Bakteri suşları, sıcaklık, pH, asit konsantrasyonu ve iyonik kuvvet, organik asitlerin antimikrobiyal aktivitesini etkiler. Doğal ürünler arasında asetik asit olarak da bilinen sirke, sanitize edici özellikler içerir (Nascimento vd., 2003: 1697-1700).

Sirke, insan lösemi hücrelerinde apoptozu azaltır ve kanser hücrelerinin çoğalmasını aldığı doza bağlı bir şekilde engeller (Seki vd., 2004: 5-103).

Yapılan bir çalışmada, 6 hafta boyunca günde yaklaşık 0.86 mmol asetik asit içeren sirke ile karıştırılmış standart bir laboratuvar diyeti uygulanan spontan hipertansif sıçanlarda sistolik kan basıncında yaklaşık olarak 20 mmHg gibi önemli bir azalma görülmüştür. Diğer araştırmacılar, elma sirkesi tüketiminin insanlarda kalsiyum emilimine ve kan basıncı düzenlemesine katkısı olduğunu kanıtlamıştır (Kondo vd., 2001).

Elma sirkesi, iltihabı hafifletir, bakterilere karşı inhibe edicidir ve bu nedenle güçlü antimikrobiyal etkilere sahiptir. Enflamasyonun, stresin azalmasını sağlayan ve insan vücudunu güçlü tutmak için sağlıklı bir bağışıklık sistemine katkıda bulunan C vitamini açısından da zengindir (Yagnik vd., 2018: 1-12).

100 g elma sirkesi yaklaşık 22 g kalordir, bu onu düşük kalorili bir içecek yapar. Bir bardak suya bir yemek kaşığı elma sirkesi ekleyip, her gün tüketmek, sayısız başka faydanın yanı sıra potansiyel bir kilo kaybı güçlendiricisi görevi görür. Doygunluğu artırır ve kilo kaybına yardımcı olur. Çalışmalarda, elma sirkesinin hiperglisemi, hiperinsülinemi, hiperlipidemi ve obeziteyi azaltmaya yardımcı olabileceğini göstermiştir. Bu metabolik etkileri açıklamak için, gecikmiş gastrik boşalma ve absorpsiyon, hepatik glukoz üretiminin baskılanması, glukoz kullanımının artması, akış aracılı vazodilatasyonun upregülasyonu, insülin sekresyonunun kolaylaştırılması, lipogeneze azalma, lipolizde artış, stimülasyonu içeren çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. Çalışmalar, insülin almayan tip 2 diyabetli kişilerin, yatmadan önce iki çay kaşığı elma sirkesi aldıklarında sabaha kadar daha düşük glikoz seviyelerine sahip olduklarını ispatlamıştır. Bu nedenle, insüline dirençli kişilerde elma sirkesi kullanımının yararlı olduğu görülmüştür (Pusparatha vd., 2019).

E. Enkapsülasyon Yöntemleri

Doğal antioksidanlar, doymamış yağ asitleri, probiyotikler, biyoaktif bileşikler ve vitaminler içeren gıdalar temel fonksiyonel gıdalardandır. Bu fonksiyonel bileşenler, gıda ürünlerinin besin değerini ve işlevselliğini geliştirmek için kullanılabilir. Bu nedenle gıda endüstrisi, fonksiyonel bileşenler

içeren bu nitelikteki ürünlere yönelik araştırmalarına önem vermiştir. Bununla birlikte, bu bileşiklerin çoğu kararsızdır veya kötü bir tada sahip olabilir, bu sebeple bu bileşenleri korumak, proseslere karşı daha dirençli hale getirmek veya tat ve kötü kokuları maskeleyerek için gıdaya enkapsülasyon işlemi uygulanır (Dias vd., 2017: 31).

Enkapsüle olmayan bileşenlerin, gıdalardaki uygulanmaları zorlaşacak ve fonksiyonlarını yerine getiremeyeceklerdir. Bu nedenle, stabil ürünler elde etmek, işleme ve depolama sırasında tüketime kadar aktif özelliklerini korumak için bu fonksiyonel bileşenlere enkapsülasyon uygulanması, gıda endüstrisi için büyük bir önem teşkil etmektedir. Kapsülleme, aktif maddenin nanometre (nano-enkapsülasyon), mikrometre (mikro-kapsülleme) veya milimetre ölçeği bazında üretilen kabuk malzemesi içerisinde tutulup, korunduğu bir süreçtir. Mikropartiküller, 3 ila 800 µm çapında partiküller ve nanopartiküller, 10 ila 1000 nm arasındaki kolloidal partiküllerdir (Ezhilarasi vd., 2013).

Kapsülleme uygulamasının başlıca nedenleri aşağıdaki gibidir (Ré, 1998: 1195-1211).

- Ürünü çevre koşullarından korumak (sıcaklık, nem, oksijen, vb.).
- Aktif bileşenin bozulma ve uçucu madde kayıplarını sınırlandırılması
- Aktifin tat ve koku gibi istenmeyen özelliklerinin maskelenmesi
- Çevreyi zararlı ve toksik maddelerden korumak ve proses esnasında güvenli işlem olanağı sağlaması

Enkapsülasyon sayesinde, aktif bileşen oksijen, ısı, nem, ışık ve lipid oksidasyonuna karşı korunur, yağ ve aromaların raf ömrünü uzatır (Charve vd., 2009: 2486). Birçok yiyecek türü kapsüllenmeye uygundur. Bunlardan bazıları; doğal olmayan tatlandırıcılar, tatlandırıcı maddeler, antioksidan maddeler, renklendiriciler, asit bazları, koruyucular, mayalar, kokular, tatlar vb.dir. İçecekler, atıştırmalıklar, çorba karışımları, kek karışımları vb. gibi gıdalara sonradan aromalar eklenir. Bu aromaların standart bir tat profili sağlamak amacıyla, teknik özelliklerinin işleme yöntemleri, uygulama ve tüketici ihtiyaçları için özel olarak tasarlanması gerekmektedir. Aroma bileşenlerinin büyük çoğunluğu endüstride ortam sıcaklığında sıvı olarak kullanılmaktadır, bu sebeple aroma bileşiklerini kurutmak amacıyla bazı işlemler uygulanmaktadır.

Endüstriyel olarak iki ana kapsülleme tekniği vardır, bunlar sprey kurutma ve ekstrüzyondur (Santiago ve Castro, 2016: 78-85). Öte yandan, dondurarak kurutma, mum veya yağ enkapsülasyonu, koaservasyon, kristalleşme gibi küçük teknikler de kullanılmaktadır (Beristain vd., 1996: 645-647).

Enkapsülasyon metodları 3 başlık altında incelenebilir. Bunlar; ilk olarak fiziksel prosesler; akışkan yataklı kaplama, püskürtmeyle kurutma, sprey soğutma, dondurarak kurutma, ekstrüzyon ve birlikte kristalleştirme; ikinci olarak fizikokimyasal prosesler; çözücü buharlaştırma (organik faz ayrımı), lipozom sıkışması, basit veya karmaşık koaservasyon; üçüncü olarak; kimyasal prosesler: arayüzey polimerizasyonu ve moleküler inklüzyon (Youngs, 1986: 31-33; Azab vd., 2019: 1167-1184). Daha genel bir bakış açısıyla bakıldığında, fiziksel prosesler, sprey veya akışkan yataklı kaplamayı ve ardından kurutmayı içerir. Diğer yöntemler, enkapsüle edilmek istenen çekirdek malzemenin, çoğunlukla bir polisakarit veya bir protein olan kabuk malzemesi çözeltisi ile emülsifikasyonunu ve ardından kapsüllenmiş malzemeyi rahat kullanım ve saklama için kuru toz haline getirmek için kurutma işlemini içerir (Madene vd., 2006: 1-21). Çizelge 8’de bazı enkapsülasyon tekniklerine bağlı, partikül boyutları gösterilmiştir.

Çizelge 8. Enkapsülasyon tekniklerine bağlı partikül boyutları

Enkapsülasyon tekniği	Partikül boyutu (μm)
Akışkan yatak kaplama	5-5000
Püskürtmeyle kurutma	10-400
Sprey soğutma	20-200
Koaservasyon	10-800
Emülsifikasyon	0.2-5000
Inklüzyon	0.001-0.01

Kaynak: (Reineccius, 1995: 113-131).

Dondurarak kurutma, donmuş bir numunenin süblimleştirilmesi yoluyla dehidrasyonuna dayanan en yaygın olarak kullanılan kapsülleme yöntemidir (Šturm vd., 2019: 196-211). Dondurarak kurutma, hassas biyoaktif bileşikler için uygun bir mikrokapsülleme tekniğidir, çünkü maddeler sprey kurutma tekniğinde kullanıldığı gibi yüksek sıcaklığa maruz kalmazlar (Rezvankhah vd., 2019: 235-258). Dondurarak kurutmanın, termal bozulma reaksiyonlarını en aza indirerek,

ısıya duyarlı maddelerin kurutulması için en uygun yöntem olduğu kanıtlanmıştır (Bhandari ve Howes, 2002: 406-419). Dondurularak kurutulmuş ürünler hızlı ve kolay bir şekilde yeniden oluşturulur, bu durum çabuk uygulanması gereken, aşılarda ve antikorlar gibi durumlarda bir önem teşkil eder. Ayrıca, solvent ekstraksiyonu, koaservasyon, süper kritik sıvı çökeltilme ve diğerlerine kıyasla, dondurarak kurutma tekniği, daha az sayıda işlem gerektirmesi nedeniyle diğer kapsülleme tekniklerinden daha basittir (Pudziuevlyte vd., 2020: 2237).

Kapsülleme işlemlerinin uygulanması sırasında çözücü ve koruyucu görevi görecektir. Kabuk materyalinin genellikle güvenli kabul edilen (GRAS) olması gerekmektedir. Kabuk matrislerinin yapısal ve işlevsel yönleri, çekirdeklerle uyumluluğu, gıda endüstrisinde kullanılmaları bakımından önemlidir. Çözünürlük, jelleşme kapasitesi gibi fonksiyonel özellikler, maliyet ve bulunabilirlik gibi ekonomik faktörler, matris seçimi sürecinde dikkate alınması gereken önemli kriterlerden bazılarıdır. Aynı şekilde, kabuk malzemesinin nihai üründe istenen fonksiyonel özellikleri kazandırma yeteneği de dikkate alınması gereken en önemli faktördür. Gıda endüstrilerinde yaygın olarak kullanılan birkaç protein ve polisakkarit vardır. Genellikle memeli veya balık kaynaklarından elde edilen bir hayvansal protein olan jelatin bunlardan biridir (Karim ve Bhat, 2009: 563-576).

Bununla birlikte, kapsülasyon alanında yapılan son araştırmalar jelatine uygun bir alternatif bulmaya odaklanmıştır, çünkü jelatin hayvansal kaynaklardan elde edilir, diyet tercihleri ve dini inançlara dayalı olarak belirli tüketici grupları tarafından kabul edilmemektedir. Sonuç olarak süt proteinleri, peynir altı suyu proteini, kazein ve bitki, mikrobiyal kaynaklı çeşitli proteinler ve polisakaritler, gıda kapsülasyonunda uygulanabilirlikleri açısından araştırılmıştır. Omega-3 yağlarının çeşitli türleri, vitaminler, aromalar, oleoresinler, fenolik bileşikler, antioksidanlar, yapay tatlandırıcılar, enzimler, probiyotik mikroorganizmalar, asit düzenleyiciler, mineraller ve renklendiriciler çeşitli kapsülleme yöntemleri ve kombinasyonları kullanılarak başarıyla kapsüllenmiştir (Morrison vd., 1999: 127-131).

F. Kitosanın Özellikleri

Kitosan, böceklerden, kabuklulardan ve bazı mantarlardan ekstrakte edilen doğal bir polisakkarit olan Kitin'in (β -1,4-N-asetil-D-glukozamin) kısmen deasetillenmiş bir türevidir. Biyoyumluluk, biyobozunurluk, biyolojik aktivite ve anyonik polielektrolitlerle poliel-ektrolit kompleksi oluşturma kapasitesi gibi benzersiz özellikleri nedeniyle kitosan, biyomedikal alanın yanı sıra gıda ve kozmetik endüstrisinde de yaygın olarak uygulanmaktadır (Abdou vd., 2008: 1359-1367).

Kitosan bir mukopolisakkarittir ve 1,4- β glikozidik olarak bağlı doğrusal bir glukozamin (2-amino-2-deoksi- β -d-glukopiranoz), polimeridir, ek olarak, genellikle asetilglukozamin (2-asetamido-2-deoksi- β -d-glikopiranoz) kalıntıları da barındırır. Bu asetilglukozaminlerin içeriği %50'den düşükse, madde kitosan, aksi takdirde kitin olarak sınıflandırılır. Kitin, selülozdan sonra yeryüzünde en bol bulunan polimer olarak bilinir (Furusaki vd., 1996: 29-34).

Çeşitli yöntemlerle elde edilen bir bileşik olan kitosanın, gıda endüstrisinde tercih edilmesinin en önemli özellikleri antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Gıdaların raf ömrünü artırmak için yenilebilir bir film olan kitosan kullanımına yönelik yapılan araştırmalar her geçen gün artmaktadır (Singh vd., 2015: 2530-2543). Kitosan, gıdaların dış yüzeyine uygulanan bir kabuk görevi görüp, gıdalardaki fizyolojik, fizikokimyasal ve morfolojik değişiklikleri kontrol altında tutan polisakkarit esaslı bir filmidir. Kitosan filmleri oksijen ve nem geçirgenliğini kontrol edebilir ve uygulandıkları gıda üzerinde antioksidan ve antimikrobiyal etkilere sahip olduğu saptanmıştır (Coma vd., 2002: 1162-1169). Kitosanın antimikrobiyal etkisi tam olarak anlaşılacakla beraber, en çok kabul edilen hipotez, polikasyonik yapısından dolayı negatif yüklü bileşenlerle etkileşim halinde olması sebebiyle maya, bakteriler ve küflere karşı etkili olmasıdır (Liu vd., 2004: 147-155).

Kitosan, katı halindeyken beyazımsı-sarı renkte, tatsız ve kokusuzdur (Bostan vd., 2007: 118-127). İnorganik asit solüsyonlarında sınırlı bir çözünebilirlik gösteren kitosan, pH'nın 6 dan düşük olduğu organik asit solüsyonlarında çözüldüğü tespit edilmiştir. Kitosanın çözünürlüğü, asetil

gruplarının dağılımına, moleküler ağırlığına, elde ediş yöntemi ve kaynağına, asetilasyon derecesine, pH ve sıcaklığa bağlıdır (Rinaudo, 2006: 603-632).

Kitosan; antioksidan, antitümör, hipokolesterolemik, antibakteriyel ve antifungal etkileri sebebiyle, gıda endüstrisinde fonksiyonel gıdaların etkilerinin artırılıp geliştirilmesinde önemli bir rol oynayan bir ingrediyentdir (Jayakumar vd., 2005: 142-158). Ek olarak, doğal kaynaklı olup, toksik etkiye sahip olmaması, ekonomik olarak uygun olması, gıdalarda; durultma, antioksidan ve antimikrobiyal etkisi, esmerleşme engellemesi, kıvam arttırma, emülsiyon oluşturma, nem tutma, , absorpsiyon gibi hedeflerle bir gıda takviyesi olarak kullanımı günden güne artmaktadır (Pez-Caballero vd., 2005: 303-311; Zivanovic vd., 2005: 45-51).

Kimyasal koruyucular içermeyen gıda ürünlerine olan talebin artmasıyla *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgari*, *Bacillus cereus* ve *Escherichia coli* gibi bakteriler, *Zygomycetes* küfleri, *Rhodotorula glutensis* ve *Saccharomyces cerevisiae* gibi mayalara karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği saptanan kitosan, kitin ve türevleri gibi doğal kaynaklı olan polimerler dikkat kazanmıştır. Yapılan başka bir çalışmaya göre, kitosanın, *Clostridium perfringens* bakterisine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Juneja vd., 2006: 236-240). Kitosanın, duyarlı Gram negatif bakteririleri minimum elimine etme konsantrasyonu, 100 ppm ile 10.000 ppm arasında farklılık göstermektedir. Genellikle, %0.1 konsantrasyondaki kitosanın, Gram (+) bakterileri üzerindeki antimikrobiyal etkisi, Gram (-) bakterileri üzerindeki etkisinden daha fazla olduğu saptanmıştır (Kurt ve Zorba, 2005: 371-378).

Süt, et gibi doymamış yağ içeriği yüksek gıdalarda, lipid oksidasyonu sonucu ransidite ve aroma kaybı olması kaçınılmazdır. Antioksidan aktivitesine sahip kitosanın, bu gibi ürünlerde kullanılması, işleme ve depolama süresince, oksidasyonu önlediği veya ertelediği görülmüştür (Jo vd., 2001: 369-375).

G. Amaç

Bu çalışmada, içerisinde insan diyetinde yer alması gereken çeşitli ve fonksiyonel aktif bileşenleri içeren arı polenin, yüksek antimikrobiyal aktivitesi ve sağlığa faydaları kanıtlanmış elma sirkesiyle, doğal kaynaklı biyoyumlu bir

polimer olan kitosan kabuk malzemesiyle kaplanıp, ısıya hassas bileşenleri korumak adına dondurarak kurutma yöntemiyle enkapsülasyonunu gerçekleştirmek ve yapılanların etkisini görmektir.

II. MATERYAL VE METODLAR

A. Materyal

Folin, sodyum karbonat, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), metanol, gallik asit, etanol, trolox, nutrient agar, nutrient broth, trishcl (buffer), Hidroklorik asit, sodyum tripolifosfat, hidroklorik asit, sodyum hidroksit, asetik asit ve kitosan Sigma-Aldrich'ten satın alındı. Polen Türkiye'nin Marmara Bölgesinden temin edildi.

B. Metod

1. Polen Ekstraktının Hazırlanması

Polen numunesi öncelikle toz haline getirildi. Elde edilen toz numunesi (10 g) 100 mL metanol ile karıştırıldı. Karışım, manyetik bir karıştırıcıda 60 dakika karıştırılarak homojen hale getirildi ve stok çözümden çözücü evaporatör yardımıyla uzaklaştırıldı (Baysal, 2020: 1-7).

2. Polen ve Elma Sirkesi Yüklü Kitosan Nanoparçacıklarının Hazırlanması

Kitosan 5 gr tartıldı ve 200 mL distile su ile tamamlanarak 25 mL asetik asit ilave edildikten sonra manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında 30 dk karıştırıldı. Daha sonra karışma devam ederken 1 g polen ekstaktını ve 1 g elma sirkesi tartıldı ve pastör pipetle damla damla ilave edilerek 15 dk boyunca karıştırma işlemine devam edildi. 15 dakika sonra kitosan/TPP 3/1 oranında sodyum tripoli fosfat bileşiği (% 0.5 lik) damla damla pastör pipetle karışma devam ederken ilave edildi ve 0.1 N HCl çözeltisi ile pH değeri 4.0'e ayarlandı ve 24 saat karıştırma işlemi gerçekleştirildi. 24 saat karıştırdıktan soğutma programı 0 °C'de 18 saat ve -35 °C'de 24 saat, ardından -80 °C'de 24 saat olmuştur. Son olarak kitosan solüsyonu -80 °C'de 72 saat boyunca dondurularak kurutma ile tamamen liyofilize edildi.

Elde edilen son ürün CSx olarak adlandırıldı. Aynı işlemler 1500 mgr polen ve 1000 mg elma sirkesi için tekrarlandı ve elde edilen son ürün CSy olarak adlandırıldı (Baysal vd., 20201: 1-9).

3. Karakterizasyon

Nanokompozit filmler üzerindeki organik grupları belirlemek için FTIR kullanıldı. FTIR spektrumları (Mattson 1000 kızılötesi spektrofotometre) 4000–400 cm⁻¹ dalga boyu aralığında 4 cm⁻¹ çözünürlükte ölçülmüştür. Dondurarak kurutma makinesi olarak LABCONCO Freezone 4.5 kullanılmıştır. UV spektrometre olarak ise PG Instruments T60 kullanılmıştır.

4. Polen, Elma Sirkesi ve Nano bileşiklerin Polifenol Bileşiklerinin Analizi

Toplam fenol analizi için folin çözeltisi, gallik asit çözeltisi ve kör çözelti hazırlandı. Stok folin çözeltisi hazırlamak için 1:10 oranında folin çözeltisi hazırlandı. Stok folin çözeltisinden (1:3 oranı) alınarak balon jöje içerisinde saf su ile 25 mL'ye tamamlandı. %2'lik Na₂CO₃ (sodyum karbonat) çözeltisi kullanıldı. %3'lük gallik asit stok çözeltisinden 1/3 oranında seyreltme yapılarak kalibrasyon denklemi elde edildi. Hazırlanmış stok folin çözeltisinden 1/3 oranında seyreltme yapılarak 0.1 mL folin çözeltisi, %3 gallik asit çözeltisinden 1/3 oranında seyreltme yapılarak 0.1 mL ve 4.5 mL saf su ve 0.3 mL Na₂CO₃ eklendi. Kalibrasyon eğrisi çizimi hazırlanan çözeltiler vorteks yardımıyla 3 dk süreyle karıştırıldı. Her bir ekstrakt için yukarıdaki deney prosesi gallik asit yerine ekstrakt numunesi olmak üzere aynı ölçülerle uygulanarak 2 saat süreyle karanlık ortamda bekletildi ve absorbans değerleri 765 nm' de UV spektrofotometresinde analiz edildi.

5. Polen, Elma Sirkesi ve Nano Bileşiklerin Antioksidan Kapasitesinin

Belirlenmesi:

60 µM DPPH ve 10 uM Trolox çözeltisi hazırlandı. Çözücü olarak metanol kullanıldı (Reboredo vd., 2018: 73–85). Kontrol çözeltisi 3.9 mL DPPH ve 0.1 mL metanol ile hazırlandı. Kalibrasyon eğrisinin grafiğini hazırlamak için, stok Trolox çözeltisi 0.2 uM, 0.25 uM, 0.4 uM, 0.5 uM ve 0.7 uM konsantrasyonlarında seyreltildi. Öncelikle, stok Trolox çözeltisi dâhil olmak üzere Trolox çözeltileri ile toplam altı test tüpünün her birinden 100 µL çözelti

altı ayrı test tüpüne aktarıldı. Tüplerin her birine 3.9 mL stok DPPH çözeltisi ilave edildi ve vortex kullanılarak homojen bir karışım elde edildi. Kontrol çözeltisi ve bu preparatlar 60 dakika boyunca karanlıkta tutuldu. Absorbans değerleri UV spektrofotometrede 517 nm'de okundu ve kalibrasyon eğrisi çizildi. Her bir ekstraktan 1.5 mL ve 3.9 mL stok DPPH çözeltisi test tüplerine ilave edildi. Hazırlanan karışımlar karanlıkta 2 saat süreyle bekletildi ve absorbans değerleri UV spektrofotometrede 517 nm'de okundu. Antioksidan değerler (%) bu absorbans değerleri aşağıdaki denklem 2'ye uygulanarak hesaplanmıştır (Czerwinska vd., 2012: 940-947; Deleonardis vd., 2007: 998-1004).

6. Polifenol Bileşiklerin Enkapsülasyonda Yükleme Kapasitesinin Belirlenmesi

Polifenol bileşiklerin Kapsülleme verimliliği (PFYK) arı polenindeki polifenol bileşik miktarının 765 nm absorpsiyonda UV spektrofotometre ile ölçülerek belirlendi. Hesaplama için aşağıdaki formül kullanıldı (Pulicharla vd., 2016: 171-178).

$$\%PFYK = \frac{\text{Toplam polifenol miktarı} - \text{kitosanın polifenol miktarı}}{\text{Toplam fenol miktarı}} \times 100$$

Toplam fenol miktarı

7. Molekül Ağırlıklarının Belirlenmesi

Sentezlenen kapsüllenmiş polimerlerin molekül ağırlığının belirlenmesinde Kriyoskopi metodu (donma noktası alçalması) kullanıldı. Saf kitosan ve sentezlenen CSx ve CSy bileşikleri 0.5 gr tartılarak 25 ml çözücüde 1 saat boyunca karıştırıldı ve dondurularak donma noktaları tespit edildi. Aşağıda yer alan 2 nolu eşitlik yardımıyla molekül ağırlıkları dalton birimine göre hesaplandı. Td= donma noktası alçalması, Kd=molal donma noktası düşme sabiti 1.86 olarak hesaplandı, m=molalite)

$$\Delta T_d = - K_d \times m_{\text{çözünen}} \quad (3)$$

8. Yüzey Aktivite Analizi

Listeria monocytogenes, Salmonella, E. coli ve S. aureus bakterileri agar üzerine aşılandı ve 37° C'de 24 saat inkübe edildi. Agar çözeltisi olarak Nutrient Agar kullanıldı. Solüsyonlar petri kabının içine yayıldı ve 24 saat süreyle canlandırma yapıldıktan sonra sentezlenen bileşikler inhibisyon

konsantrasyonlarında uygulandı. Mikroskop altında görüntülenen bakteri sayımları yapılarak karşılaştırıldı. Elde edilen bileşiklerin bakterilere karşı yüzey aktivite performansları Zeiss Mikroskobu kullanılarak X40 büyütme ölçeğinde incelenmiştir.

9. Antibakteriyel Analiz

Listeria monocytogenes, *Salmonella*, *E. coli* ve *S. aureus* bakterileri Nutrient agarına aşılandı ve aerobik ortamda 24 saat 37 ° C'de inkübe edildi. Antibakteriyel analizler için kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır. 24 saat sonra sentezlenen bileşiklerin disk çevresinde inhibisyon bölgeleri oluşturup oluşturmadığı kontrol edildi. İnhibisyon bölgelerinin alanları mm² birimleri cinsinden ölçüldü ve mikroorganizmaların antibakteriyel maddelere duyarlılığı belirlendi. Antibakteriyel analiz sonuçlarına istatistik analiz uygulandı (Baysal ve Çelik, 2019: 88-79; Ren vd., 2017: 1636-1643).

10. İstatistik Analiz

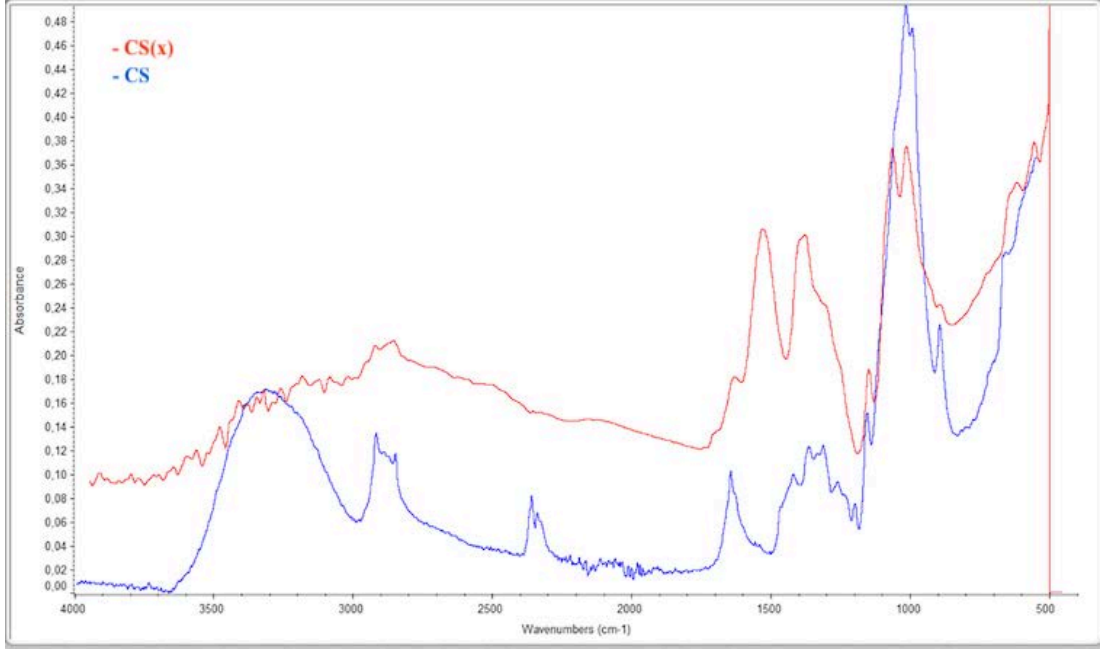
Araştırmada istatistiksel analiz için Minitab 16 yazılımı kullanılmıştır. Ortalama değerler arasındaki anlamlı farkın belirlenmesi için, tek yönlü bir ANOVA ve % 95 güven düzeyinde Tukey testi kullanıldı (Peighambardoust vd., 2019).

III. BULGULAR

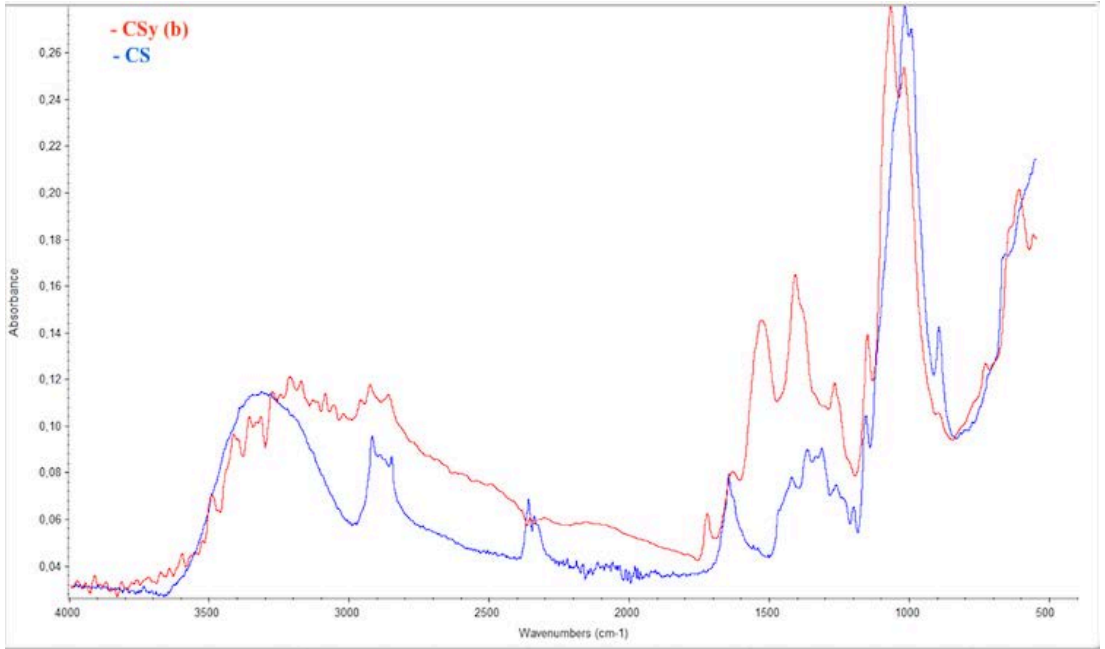
A. FTIR Analizi

Şekil 4 ve 5'te kitosan (CS), polen ve elma sirkesiyle kapsüllenen kitosanın CSx ve CSy bileşiklerinin FTIR spektrumları görülmektedir. Spektrumlarda 3300-3500 cm^{-1} 'de görülen keskin pik kitosanın karakteristik piki olarak belirmekte ve OH bantlarına karşılık gelmektedir. Kitosanın 1650 cm^{-1} civarında gözlenen Amid II karbonil bağları CSx ve CSy bileşiklerin spektrumunda ufak bir esneme olarak görülmektedir. 1650 ce 1420 cm^{-1} 'de görülen soğurma bandı (amid I) asetamid gruplarının karbonil bağlarının gerilmesi ve C-H bağlarının deformasyonundan kaynaklanmaktadır (Hafsa vd., 2016: 3-27; Mudhakira vd., 2014: 92-100).

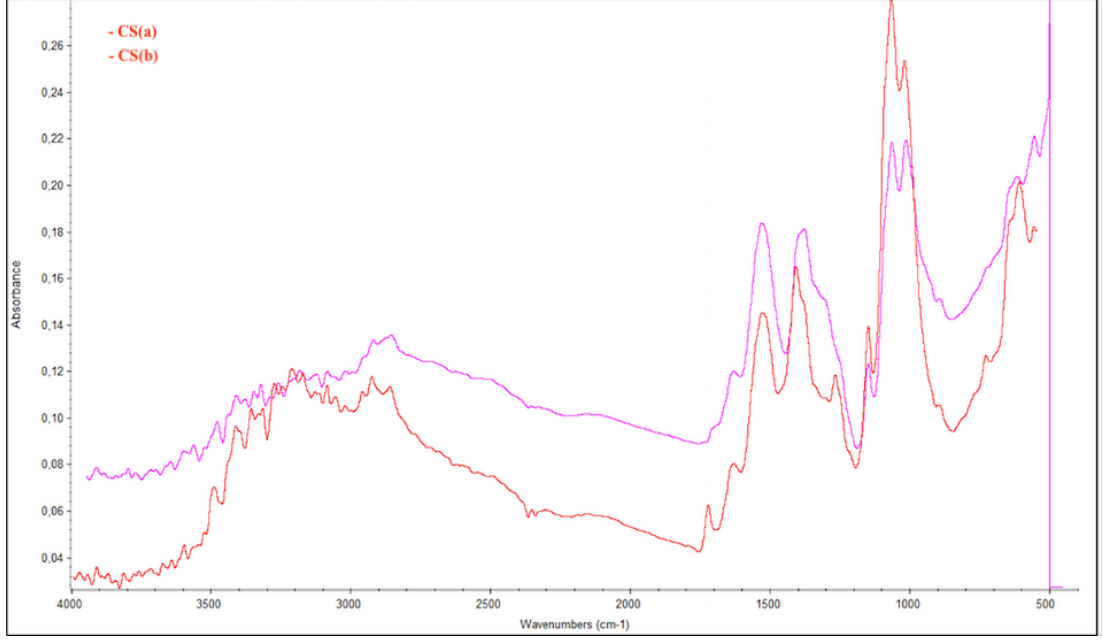
1340 cm^{-1} 'deki bant C-NH deformasyonuna (amid II) karşılık gelir ve 1580 cm^{-1} civarı gözlenen pik ise amino grubunun (amid II) N-H deformasyonudur. 550 ve 700 cm^{-1} 'de görülen pikler kitosanın düzlem dışı bükülmelerini (NH) temsil etmektedir. Kitosanın kapsüllemesi için kullanılan polen ve elma sirkesinin varlığı ise 2800-2900 cm^{-1} 'de alifatik CH_2 gerilme bağları ikili pik şeklinde gözlenmektedir (Pulicharla vd., 2016: 171-178).



Şekil 4. CSx (a) ve CS (kitosan) bileşiklerinin FTIR spektrumları



Şekil 5. CSy (b) ve CS (kitosan) bileşiklerinin FTIR spektrumları



Şekil 6. CSy (a) ve CS (b) bileşiklerinin FTIR spektrumları

B. Polifenol Miktarının Belirlenmesi

Çizelge 9 ve şekil 7 sentezlenen bileşiklere ait polifenol madde miktarının analiz sonuçlarını göstermektedir. Fenolikler olarak adlandırılan bileşikler, antioksidan, antikanser ve antimikrobiyal aktivite gibi oldukça geniş bir alanda biyolojik potansiyele sahip olmaları sebebiyle oldukça ilgi çeken bir bileşik grubudur. Polen örneğine ait ekstraktın toplam fenolik içeriği spektrofotometrik Folin metoduyla tespit edilmiştir. Elde edilen kalibrasyon denklemi $y=0.00056x + 0.0166$ olup R^2 değeri 0,9982 olarak hesaplanmıştır.

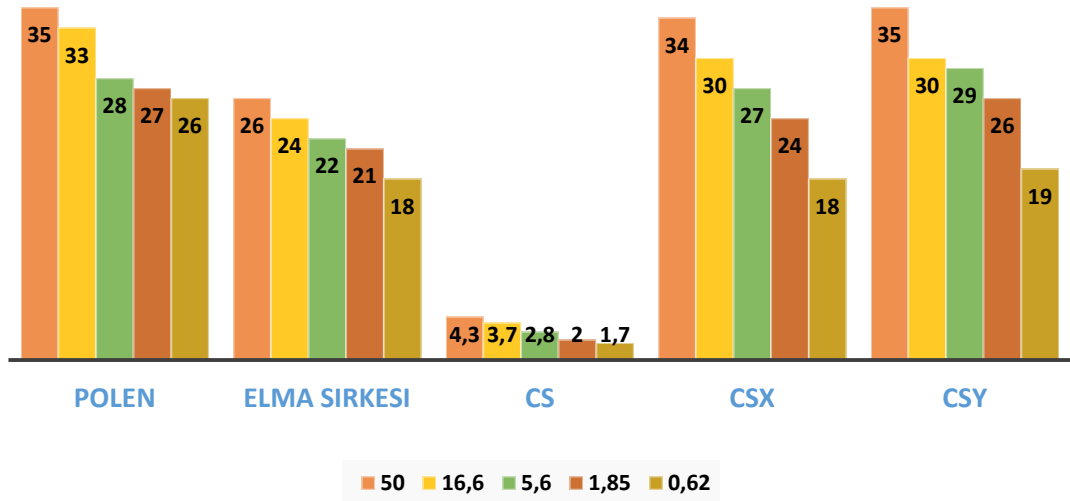
Kitosan, CSx ve CSy bileşiklerinin fenolik içeriği gallik aside eşdeğer hesaplanmıştır ve toplam fenolik içerik sırasıyla 4,3 34 ve 35 mgGAE/g olarak belirlenmiştir. CSx ve CSy kapsüllenmiş bileşiklerinin polifenol madde miktarları karşılaştırıldığında CSy bileşiğinin polifenol madde miktarı daha yüksek oranlarda tespit edilmiş olup 35 mgGAE/g değerindedir.

CSx ve CSy bileşikleri arasında meydana gelen bu farklılığın nedeni enkapsülasyon reaksiyonunda CSy bileşiğinin kapsüllendiği polen miktarı 1,5 gr iken CSx bileşiğinin kapsüllendiği polen miktarının 1 gr olmasından kaynakladığı sonucuna varılmaktadır.

Çizelge 9. Sentezlenen bileşiklere ait polifenol miktarları

Numune	Polifenol miktarları (mg/100x10 ⁻⁶)				
	% 50	% 16,6	% 5,6	% 1,85	% 0,62
Elma sirkesi	26±0,01	24±0,02	22±0,008	21±0,05	18±0,05
Polen	35±0,05	33±0,02	28±0,01	27±0,04	26±0,06
CS	4,3±0,025	3,7±0,008	2,8±0,018	2±0,006	1,7±0,002
CSx	34 ± 0,007	30±0,006	27±0,004	24±0,06	18±0,014
CSy	35 ± 0,004	30±0,001	29±0,03	26±0,03	19±0,026

polifenol madde miktarı (mg/100x10⁻⁶ mg/GAE)



Şekil 7. Polen, Elma Sirkesi, Kitosan, CSx (a) ve CSy (b) bileşiklerinin polifenol madde miktarları

Literatür ile karşılaştırıldığında, polenin ortalama olarak 8.2 mg/g fenolik madde içerdiği tespit edilmiştir. Ek olarak, polenin alkol ile ekstraksiyonlarının, fenolik madde miktarını 26.6 mg/g'a kadar arttırdığı gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmada, polenin içerdiği polenin toplam fenolik madde miktarı 35 mgGAE/g olarak ölçülmüştür ve daha önceki yapılan çalışmalara göre yüksek bir değer elde edilmiştir. Bunun nedeni, ekstraksiyon için kullanılan alkole ve konsantrasyonuna bağlı olmakla beraber; polenin, elde edildiği kaynak, coğrafya, işleniş şekli ve saklama koşulları gibi faktörlere bağlı olması, farklı deney koşulları ve uygulanan metodlar sonucunda saptanan değerlerde değişiklik olmasına sebebiyet vermiştir. Elma sirkesine bakıldığında, içerdiği toplam fenolik madde miktarı 26 mgGAE/g

olup, daha önceki yapılan çalışmalara paralel bir değer olarak ölçülmüştür (Czerwinska vd., 2012: 940-947).

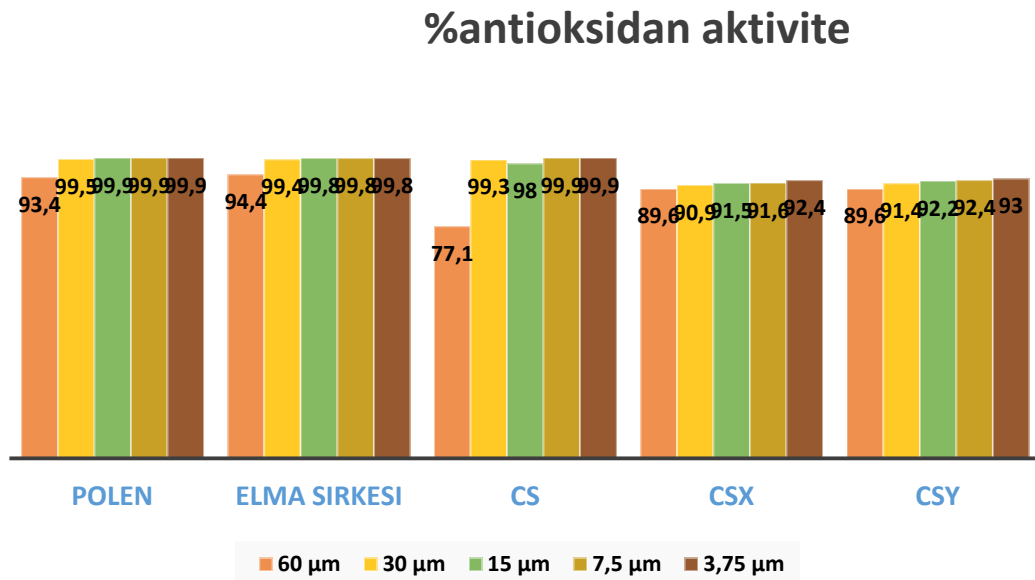
C. % Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

Antioksidan analizlerinde referans çözelti olarak trolox antioksidan materyali kullanılmış ve 6 seri çözeltisi hazırlanarak bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Kalibrasyon denkleminde trolox için r^2 değeri 0,9974 olarak hesaplandı. Kalibrasyon denklemi $y = 0,2246x + 0,1385$ ' dir. Çizelge 10 ve Şekil 8'de, polen ekstraktı ve elma sirkesi ile kapsüllenmiş kitosan örneklerinin yüzde antioksidan aktivitesini gösterir.

Çizelge 10. Bileşiklerin % antioksidant aktivitesi

	(517 nm)				
	60 μ M	30 μ M	15 μ M	7.5 μ M	3.75 μ M
Polen	93.36±0.02	99.5±0.009	99.89±0.001	99.89±0.001	99.89±0.001
Elma sirkesi	94.44±0.002	99.40±0.001	99.84±0.004	99.79±0.001	99.79±0.001
CS	77.12±0.015	93.32±0.002	98.04±0.001	99.88±0.01	99.88±0.001
CSx	89.56±0.002	90.96±0.002	91.48±0.006	91.64±0.005	92.40±0.011
CSy	89.6±0.009	91.4±0.008	92.2±0.008	92.44±0.005	93.04±0.007

* Bulgular 3 kere gerçekleştirilen ölçümlerin ortalamasıdır \pm Standart sapmayı göstermektedir.



Şekil 8. Polen, elma sirkesi, kitosan (CS), CSx ve CSy bileşiklerinin % antioksidan aktiviteleri

Çizelge 10 ve şekil 8’de görüldüğü gibi bileşiklerin % antioksidan aktivite değerleri DPPH çözeltilsinin konsantrasyonu düştükçe daha yüksek aktivite göstermektedir. Çizelgede yer alan veriler karşılaştırıldığında kitosanın % antioksidan aktivitesi 60µM dpph çözeltilsinde %77,1 iken 3,75 µM dpph çözeltilsinde %99,9 değerine ulaşmıştır. Benzer şekilde CSx bileşiğinin %antioksidan aktivitesi %89,6 değerinden %92,4’e, CSy bileşiğinde %89,6’dan %93 değerine artış göstermiştir. CSx ve CSy bileşiklerinin antioksidan aktiviteleri karşılaştırıldığında CSy bileşiğinde polen ekstrakt miktarının daha yüksek değerde olması nedeniyle %antioksidan aktivitesinde de daha yüksek bir verim elde edilmiştir. CSy ve CSx bileşiklerinin, yüksek antioksidan özelliğine sahip olmasının sebepleri içerdikleri, polen, elma sirkesi ve kitosanın yüksek antioksidan etkiye sahip olmasından kaynaklanmaktadır.

Literatüre bakıldığında, yapılan çalışmanın, kitosanın en çok tercih edilme nedenlerinden biri olan antioksidan özelliğini desteklediği görülmektedir. Polenin antioksidan kapasitesine bakıldığında, 60µM dpph çözeltilsinde %93,42’i iken 3,75 µM dpph çözeltilsinde %99,89 değerine ulaşmıştır. Bulunan değer, diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında, yüksek bir değerdir. Bunun sebebi, polen-alkol ekstraktının içerisinde bulunan fenolik madde miktarının fazlalığına, çözücü olarak kullanılan alkole ve konsantrasyonuna, polenin kaynağına, işlenişine ve saklama koşullarına bağlı olarak değiştiği düşünülmektedir. Elma sirkesinin antioksidan aktivitesi 60µM dpph çözeltilsinde %94,4 gibi bir değere sahipken, 7,5 µM dpph çözeltilsinde %99,8 gibi daha yüksek bir değerindedir. Elma sirkesinin, antioksidan özelliğinin yüksek olması içeriğindeki fenolik madde miktarının yüksek olmasıyla ilişkilendirilir. Ek olarak, literatür ile karşılaştırıldığında, ölçülen değer, bulunan bulgulardan biraz daha yüksektir. Bunun sebebi, elma sirkesinin üretimi, işleniş, saklanması ve farklı laboratuvar koşulları altında, farklı ekipmanlardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

D. Polifenol Bileşiklerin Enkapsülasyonda Yükleme Kapasitesinin Belirlenmesi

Yükleme verimliliği kullanılan polimerin özelliklerine ve antioksidan bileşenlerin fizikokimyasal özellikleriyle doğrudan ilişki içindedir. Hidrojen bağı,

elektrostatik etkileşim ve hidrofobik kuvvetler etkileşimi etkileyen ana faktörlerdir. Antioksidan bileşenlerin hidroksil grupları ve kitosanın amin grupları asidik ortamda (pH<4) hidrojen bağları ile birbirine bağlanırlar. Aşağıdaki 1 nolu eşitliğe göre CSx ve CSy bileşiklerinin kitosan bileşiğine yüklenme kapasitesi hesaplanmıştır. Elde edilen verilere göre CSx bileşiğinin polifenol yükleme kapasitesi %87,2'dir. Polen ve elma sirkesinden olmak üzere %87,2 polifenol bileşikleriyle yüklenme gerçekleştirilmiştir. CSy bileşiği için yapılan hesaplama göre polifenol bileşiği yükleme kapasitesi %87,8 olup polen ve elma sirkesinden olmak üzere %87,8 polifenol bileşiği yüklenmesi gerçekleşmiştir [112].

$$\%PFYK = \frac{\text{Toplam fenolik madde} - \text{kitosanın fenol miktarı}}{\text{Toplam fenolik madde miktarı}} \times 100$$

Toplam fenolik madde miktarı

E. Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

Molekül ağırlığı hesaplama yöntemi olarak donma noktası alçalması adı verilen Kriyoskopi metodu kullanılmıştır. Ham ve sentezlenen numuneler 0.5 g tartılarak çözücüde hidroklorik asit yardımıyla ortam asidik pH değerine getirildikten sonra 1 saat süreyle karıştırıldıktan sonra soğutma kabiniinde donma noktası termometre yardımıyla ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre ham kitosanın molekül ağırlığı 67 kDa olarak hesaplanmıştır. Sentezlenen CSx ve CSy bileşiklerinin molekül ağırlıkları ise sırasıyla 85 kDa ve 140 kDa olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda kapsülleme metodunun kitosanın molekül ağırlığına etkisinin oldukça yüksek olduğu ve kapsülleme veriminin etkili olduğu tespit edilmiştir.

F. Antibakteriyel Analiz Sonuçları

Polen, elma sirkesi, kitosan ve kapsüllenen CSx ve CSy bileşiklerinin antibakteriyel analizleri için 4 farklı bakteri kullanıldı. Gram negatif bakteriler olarak, *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* bakterileri, gram pozitif bakteriler olarak *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes* kültürleri kullanıldı. Analizler için kuyu difüzyon metodu kullanıldı ve bakteri kültürleri 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra meydana gelen inhibisyon

zonları mm² olarak ölçüldü. Elde edilen sonuçlar Şekil 9 ve Çizelge 11’de gösterilmektedir (Baysal ve Doğan, 2020: 1127-1143).

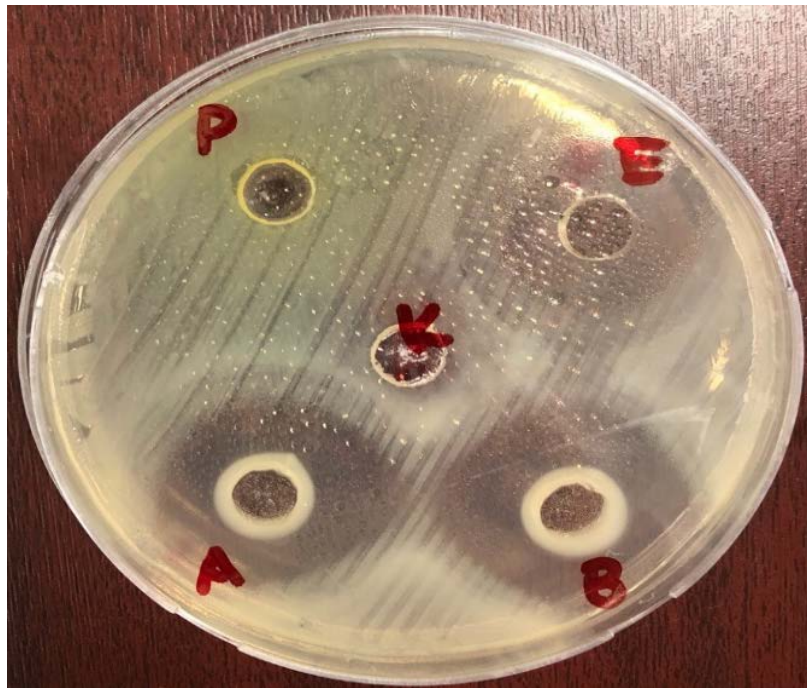
Çizelge 11. Örneklerin inhibisyon zon alanları (mm²)

	<i>L.monocytogenes</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Salmonella</i>
<i>Polen</i>	51±0.002	13±0.001	13±0.001	13±0.000
<i>Elma sirkesi</i>	908±0.004	314±0.001	201±0.001	314±0.000
<i>CS</i>	0	3.14±0.001	0	0
<i>CS_X</i>	804±0.001	531±0.003	255±0.000	452±0.001
<i>CS_Y</i>	1134±0.003	707±0.001	314±0.000	616±0.001

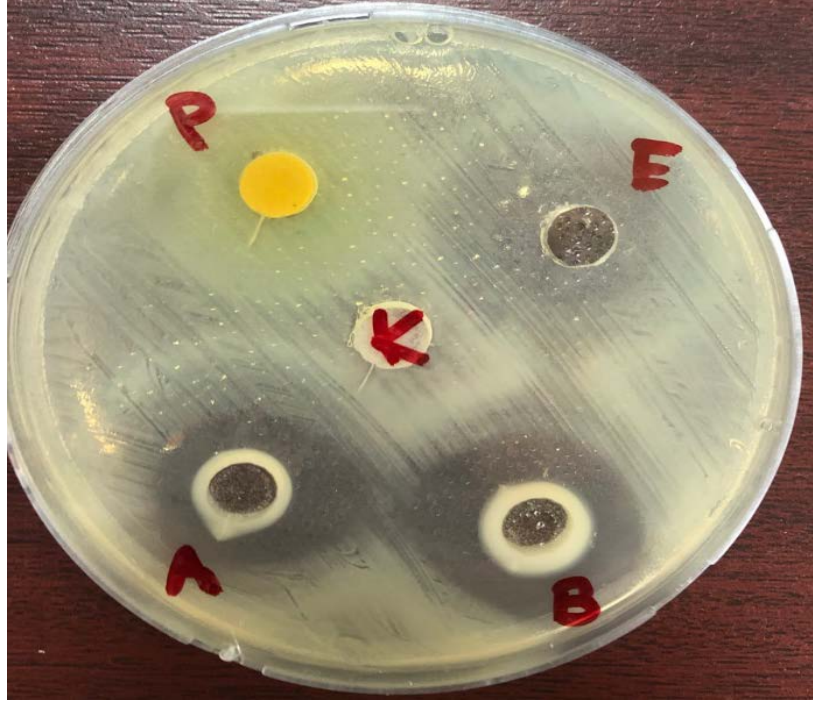
∞ Veriler, üçlü ölçümlerin ortalamasıdır±SD. Sütunlardaki farklı alfabetik harfler Tukey testinde ortalamalar arasında anlamlı ($p<0.05$) fark olduğunu göstermektedir.



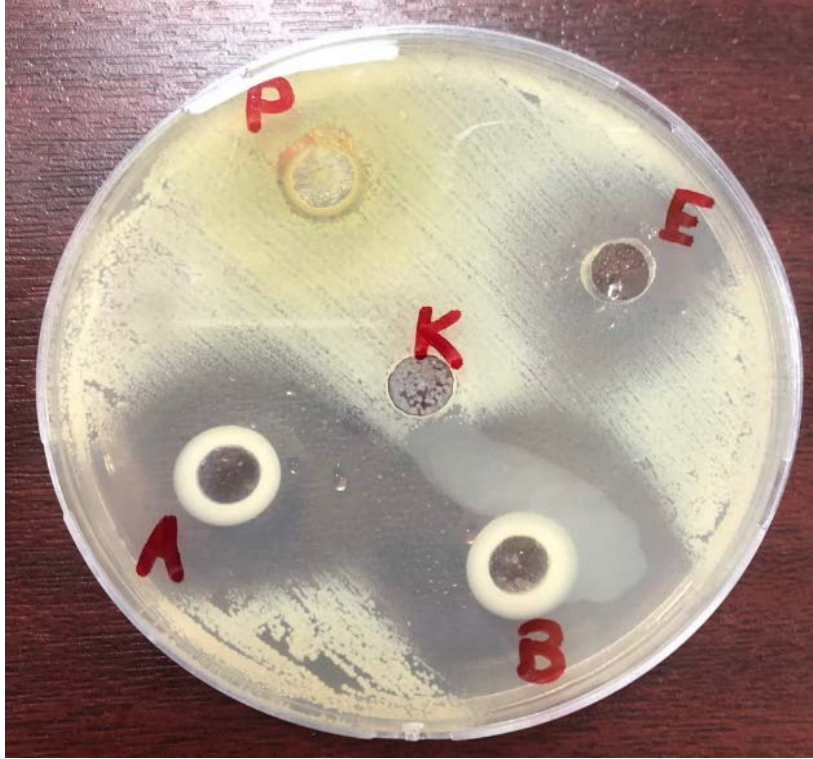
a



b



c



d

Şekil 9. Polen, elma sirkesi, Kitosan, CSx ve CSy bileşiklerinin *L.monocytogenes* (a), *Salmonella* (b), *E.coli* (c) ve *S.Aureus* (d) bakterilerine karşı inhibisyon zonları

Bulunan bulgulara göre, polen, *Listeria monocytogenes* (Gram pozitif), bakterisine karşı 51 mm² ile en fazla antimikrobiyal aktivite göstererek, *Staphylococcus aureus* (Gram pozitif), *Escherichia coli* (Gram negatif) ve *Salmonella typhimurium* (Gram negatif) bakterilerine 13 mm² ile daha az bir antimikrobiyal etki göstermiştir. Literatüre göre, polenin gram pozitif bakterilere, gram negatiflere oranda daha fazla etki ettiği bilinmektedir ve bu yapılan çalışma sonuçlarına bu düşünce destenlenmektedir. Daha önceki yapılan bir çalışmada, polenin, *Escherichia coli* ve *Listeria monocytogenes* üzerinde yapılan sonuçlar sırasıyla, 10,5 ve 10 mm² olarak gösterilmiştir [51]. Bu çalışmada, elde edilen bulgulara göre, polenin en fazla antimikrobiyal etki gösterdiği bakteri *Listeria monocytogenes* olmuştur. Sonuç farklılıkları, polene, polen-alkol ekstraktın polen miktarına, alkolünün türü ve saflığına bağlı olarak değişiklik gösterdiği düşünülmektedir. Ek olarak, polenin diğer bakterilere daha fazla etki etmemesinin sebebi, kullanılan besiyerin, eklenen solüsyonları emmesi olabilmektedir.

Antimikrobiyal özelliği sebebiyle kullanılan elma sirkesi, en yüksek aktivite *Listeria monocytogenes*'e olmak üzere, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* bakterilerine karşı sırasıyla; 908, 314, 201, 314 mm² olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre, elma sirkesinin, gram pozitif bakterilere, gram negatiflere oranda daha fazla antimikrobial özellik gösterdiği gözlemlenmiştir. Ek olarak, bulunan bulgular, daha önceki bir çalışmada *Staphylococcus aureus* için 31.60 mm² ve *Escherichia coli* için 26.60 mm² olarak bulunan inhibasyon zonlarından daha fazladır. Bunun sebebi elma sirkesine, nasıl üretildiğine ve saklandığına bağlı olarak farklılık gösterdiği düşünülmektedir.

Bir polisakkarit olan kitosan, sadece, gram pozitif bir bakteri olan *Staphylococcus aureus* üzerinde, 3.14 mm² kadar inhibasyon zonuyla antimikrobiyal etki göstermiştir. Literatüre göre, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus* ve *Escherichia coli* gibi bakterilere karşı aktive gösterdiği belirtilen, kitosan, yapılan çalışmada *Escherichia coli* bakterisine karşı antimikrobiyal etki göstermemiştir. Bunun sebebi, kitosanın cinsine ve elde edildiği kaynağa göre veya konsantrasyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir.

Elde edilen CSx bileşiminde, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* bakterilerine karşı sırasıyla

804, 531, 255, 452 mm² kadar inhibasyon zonu gözlemlenmiştir. CSx bileşiği, en çok *Listeria monocytogenes* bakterisine karşı etkili olduğu gözlemlenmiştir. Gram pozitif bakterilerine, gram negatif bakterilerine oranda daha çok antimikrobiyal etki saptanmıştır. En düşük aktivite *Escherichia coli* bakterisine karşı görülmüştür. İçeriğinde bulunan, polen, sirke ve kitosanın antimikrobiyal özelliklerinden dolayı, bu ürünün antimikrobiyal aktivitesinin yüksek olduğu düşünülmüştür.

CSy bileşiğine bakıldığında, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* bakterilerine karşı inhibasyon zonları sırasıyla 1134, 707, 314, 616 mm² olarak tespit edilmiştir. En yüksek mikrobiyal etki

Listeria monocytogenes'e karşı olmuştur. Bunun sebebi, içeriğindeki polen ve elma sirkesinin de *Listeria monocytogenes*'e karşı etkili olmasıdır. CSy bileşiğinin, en az olmakla birlikte, yine de etkili olduğu bakteri *Escherichia coli*'dir. Yapılan çalışmada en yüksek antimikrobiyal aktivite CSy bileşiğinde gözlemlenmiştir. Bunun sebebi, içeriğindeki polen miktarının daha fazla olmasıyla açıklanmaktadır.

G. Yüzey Aktivite Analiz Sonuçları

Listeria monocytogenes, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* bakterileri, Nutrient agar üzerine aşılandı ve aerobik bir ortamda 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Hücreler aynı ortamda dağıtıldı ve 24 saat sonra, polen, elma sirkesi, kitosan, CSx ve CSy bileşiklerinin inhibitör konsantrasyonlarının uygulandığı disk etrafında bakteri sayılarında anlamlı azalmalar görüldü. Mikroorganizma sayısındaki anlamlı azalmalar, mikroorganizmaların sentezlenen bileşik numunelerine ne kadar duyarlı olduklarını ve yüzey aktivite gösterdikleri belirlenmiştir.

Çizelge 12. Örneklerin yüzey aktivite sonuçları

	<i>L.monocytogenes</i>	<i>s.aureus</i>	E.coli	<i>Salmonella</i>
Polen	+	+	+	+
Elma sirkesi	+	+	+	+
CS	+	+	+	+
CS _x	+	-	+	+
CS _y	+	-	+	+

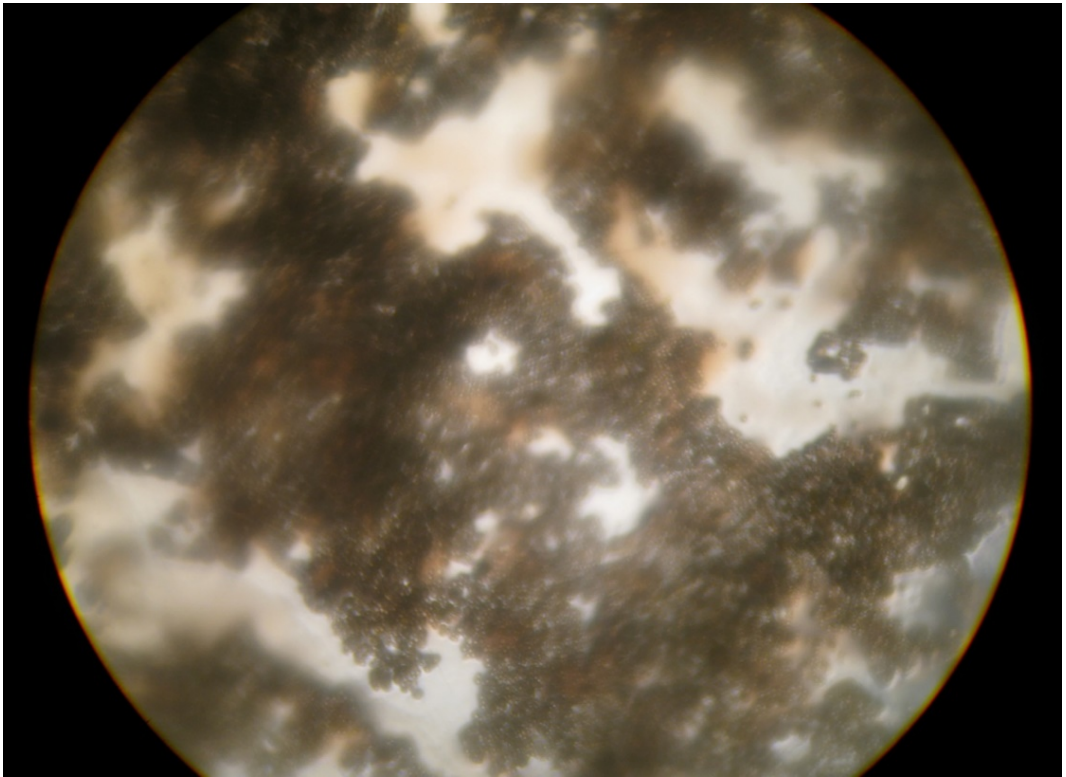
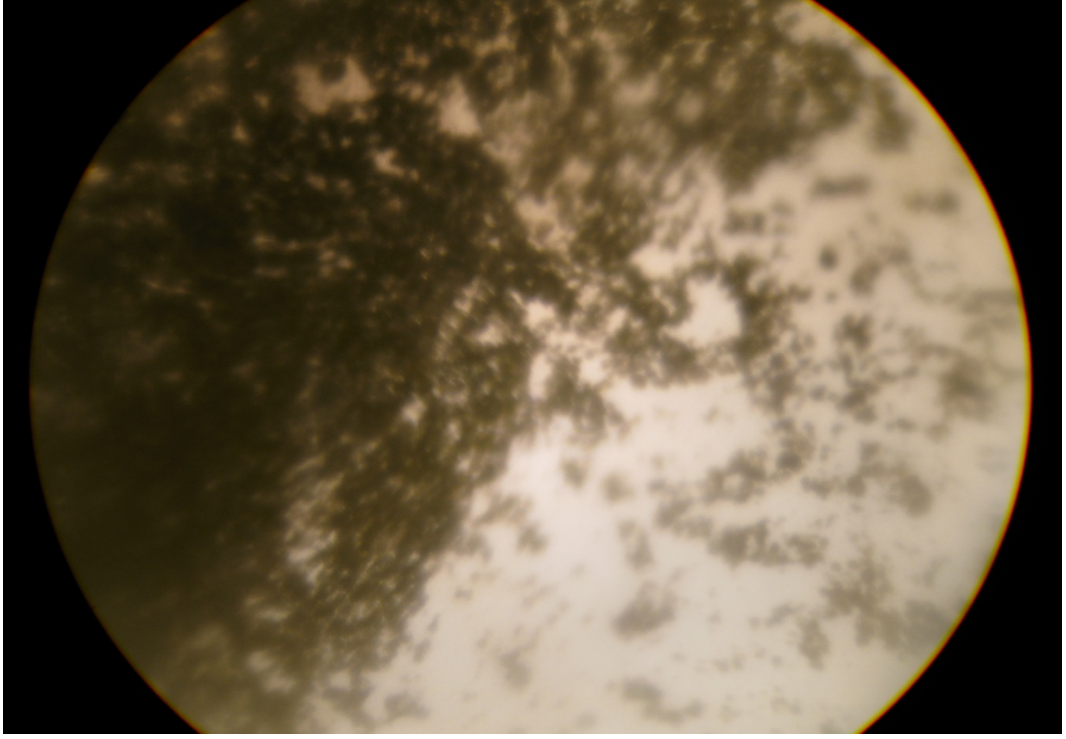
Polen, elma sirkesi, kitosan ve sentezlenen CSx ve CSy bileşiklerinin sırasıyla *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* bakterilerine karşı yüzey aktiflik analiz sonuçları şekil 10, 11, 12, 13’de görülmektedir. Deney sonuçları birinci gün ve ikinci güne ait mikroskopik görüntüleri karşılaştırma yapılarak yorumlandı.

CSx bileşiğine uygulanan yüzey aktiflik analiz sonuçları sırasıyla *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* bakterileri için şekil 10’ da gösterilmektedir. CSy bileşiğine uygulanan yüzey aktiflik analiz sonuçları *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* bakterileri için şekil 10’ da gösterilmektedir.

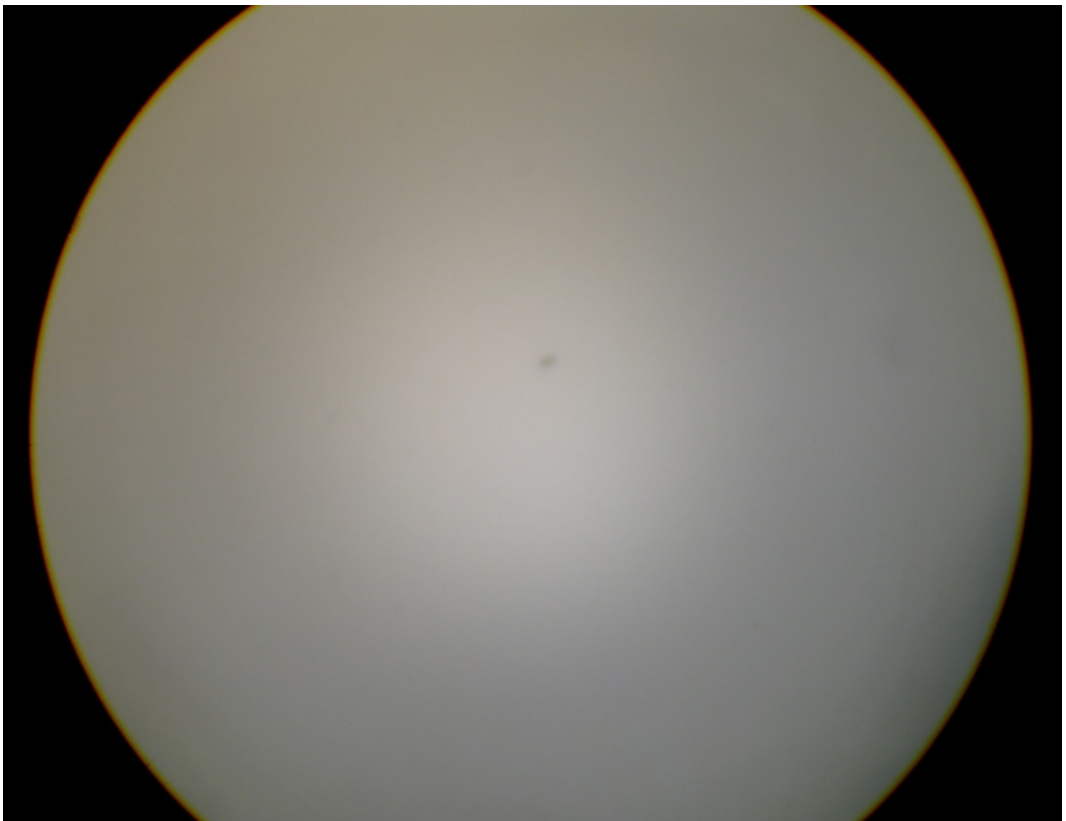
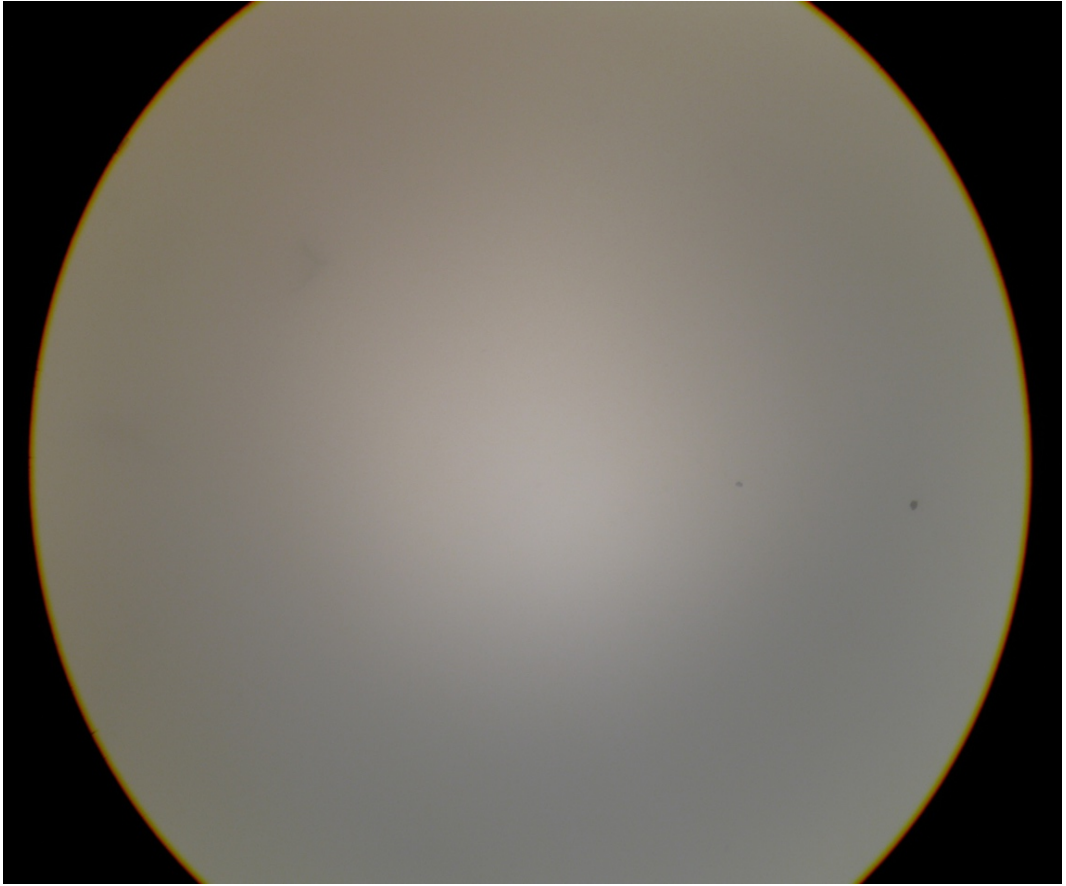
Şekil 10, 11, 12, 13’e bakıldığında, bileşiklerin sıfıncı günde elde edilen mikroskop görüntüleri ikinci güne ait mikroskopik görüntülerle karşılaştırıldığında daha aydınlık ve temiz bir görüntü elde edilmiştir. CSx ve CSy bileşikleri neredeyse 4 farklı bakteriye karşı anlamlı bir direnç oluştuğu ve ikinci gün yüzeylerinin daha aydınlık ve temiz olduğu sonucuna varıldı. Ancak CSx bileşiği *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı pek bariz bir aydınlanma ve temizlenme görüntüsü vermedi. Bunun anlamı CSx bileşiğinin *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı yüzey aktif bir özellik göstermemesinden kaynaklanmaktadır.

Polen, yüzey aktif analizinin 1. Gün sonucunda, test edilen tüm bakterilerin, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium*, sayılarında azalma ve yüzeylerin ise daha parlak ve temiz olduğu gözlemlenmiştir. Mikroorganizmaların polene duyarlı olduklarını ve yüzey aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir.

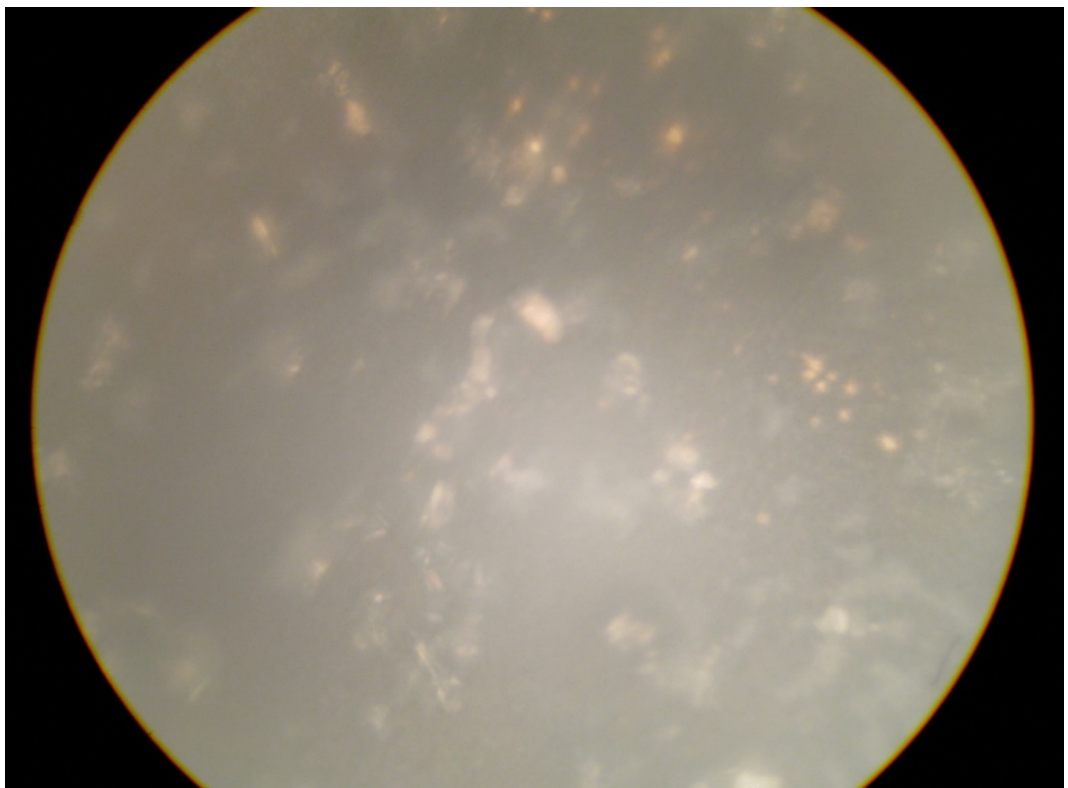
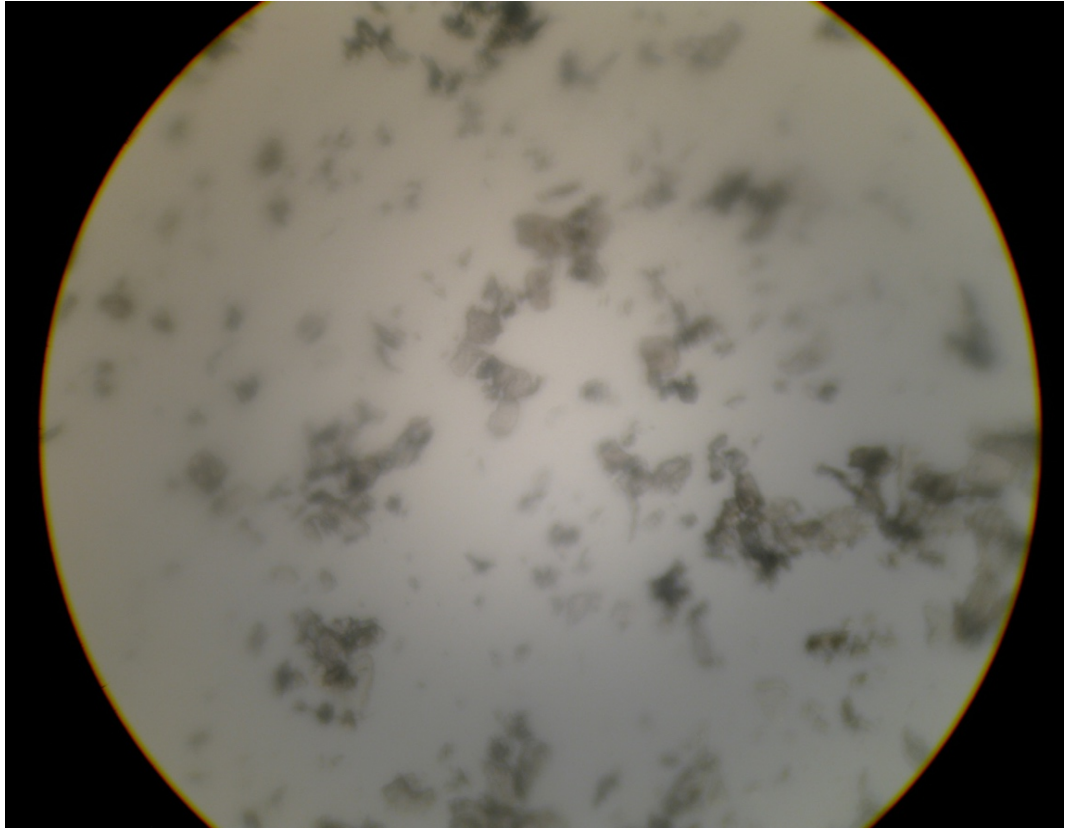
Yüzey aktivite analizine bakıldığında, elma sirkesinin, bakterileri elimine ettiği ve 1. Günün sonundaki mikroskop görüntülerinin, temiz ve parlak olduğu gözlemlenmiştir.



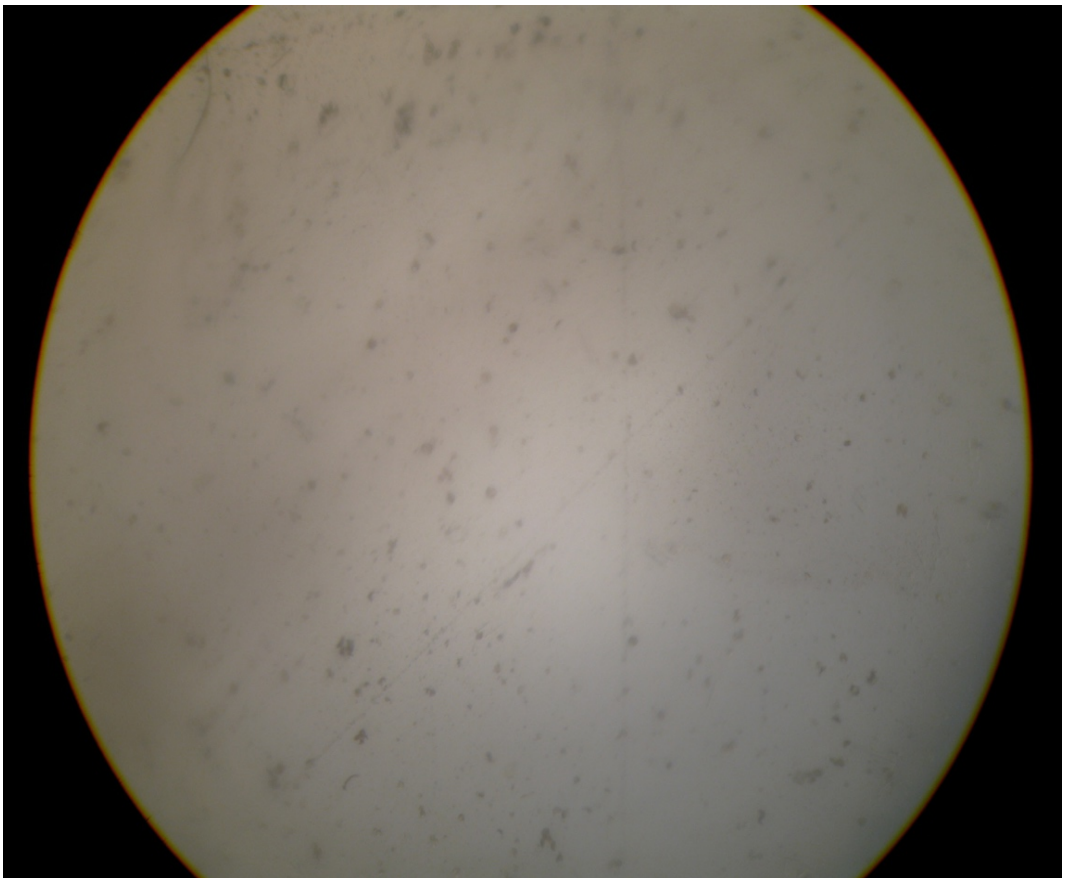
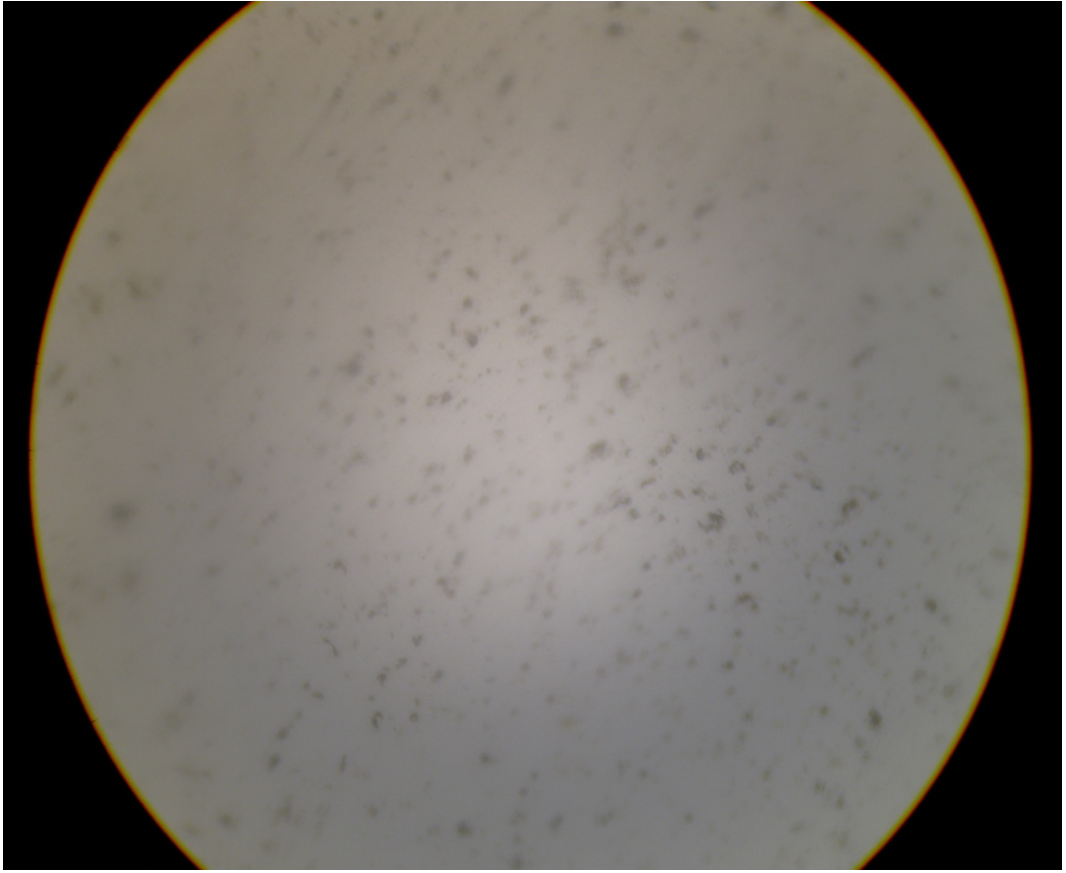
a



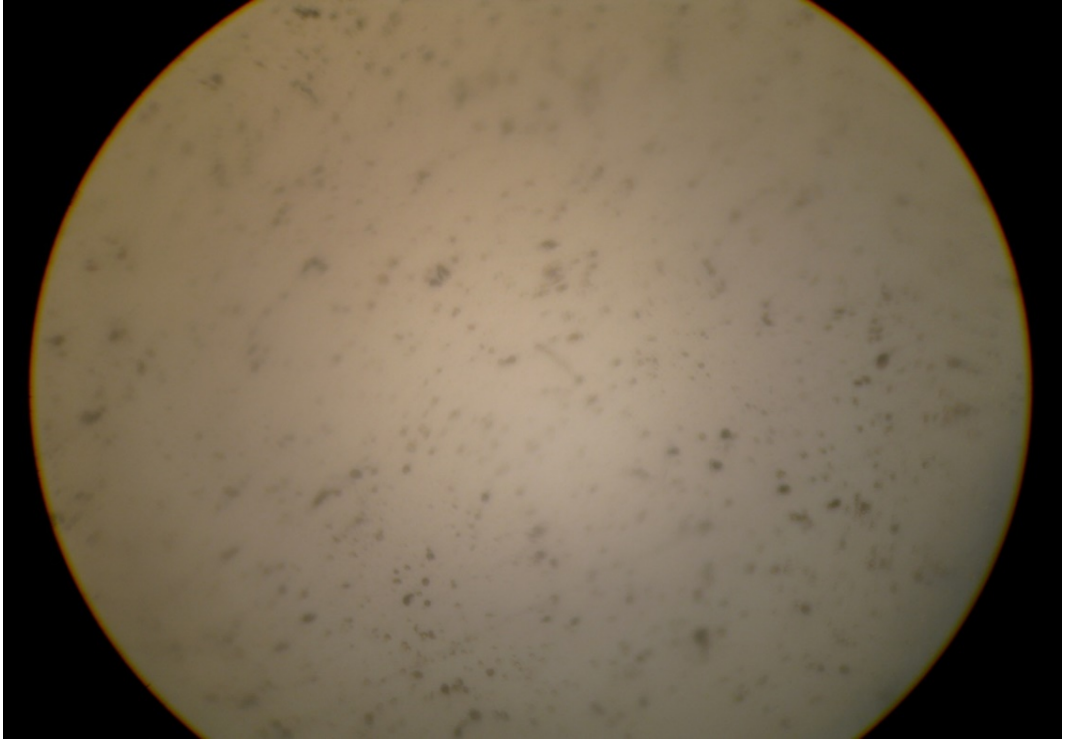
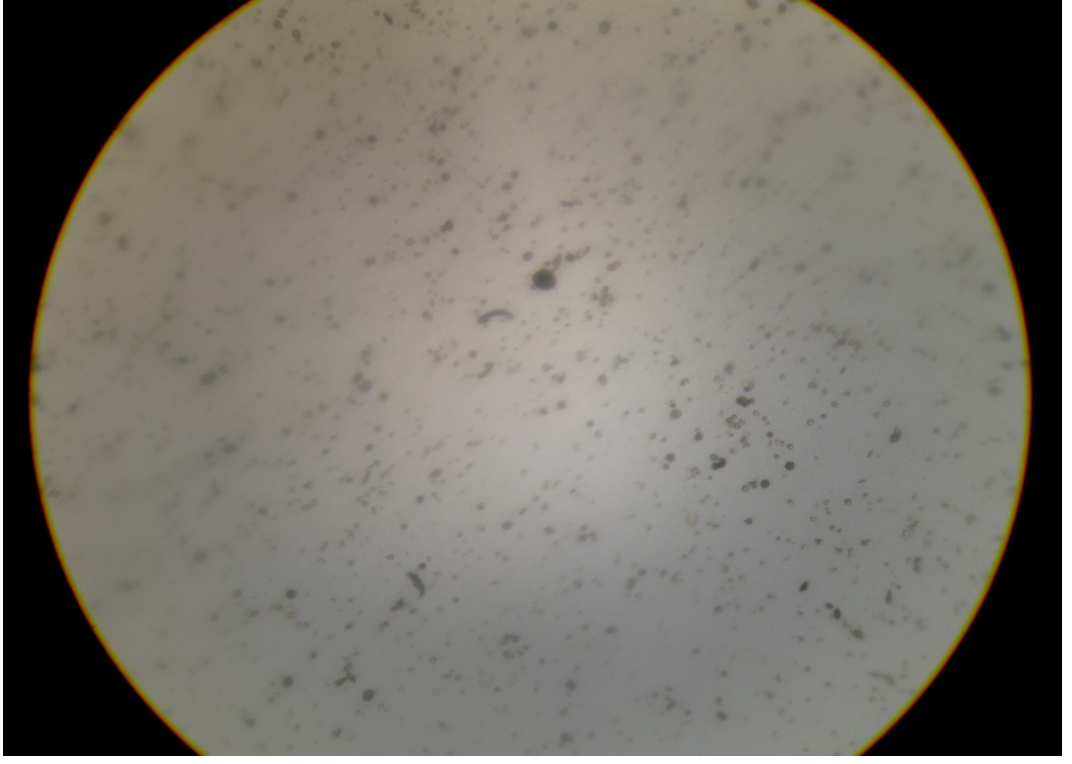
b



c

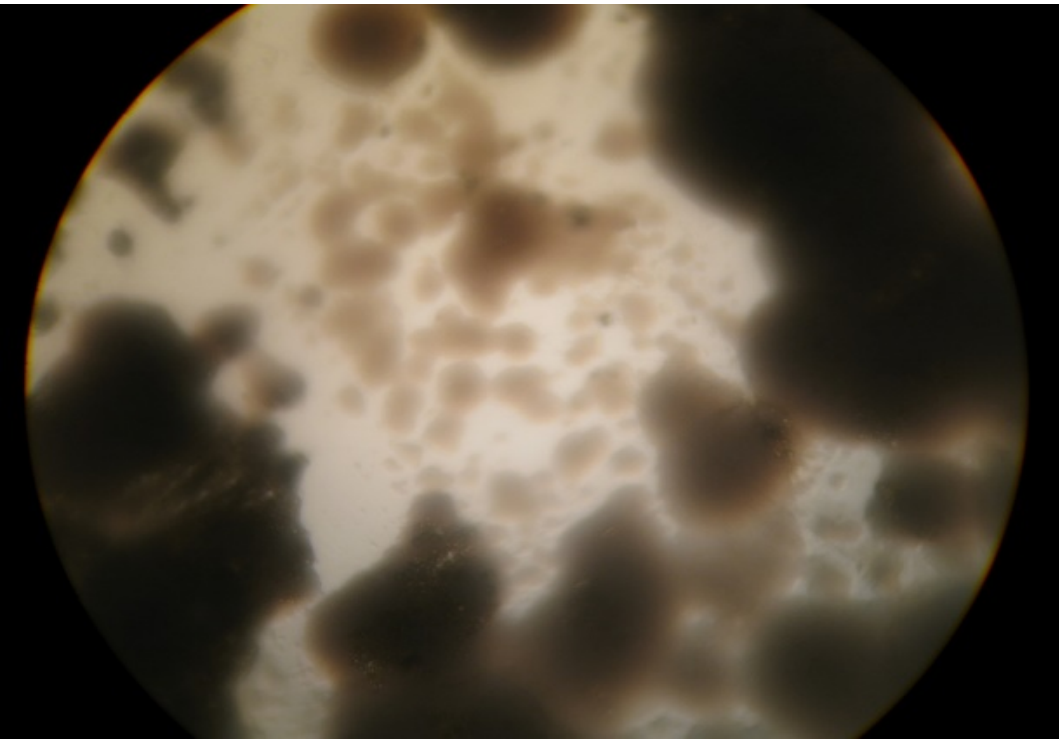
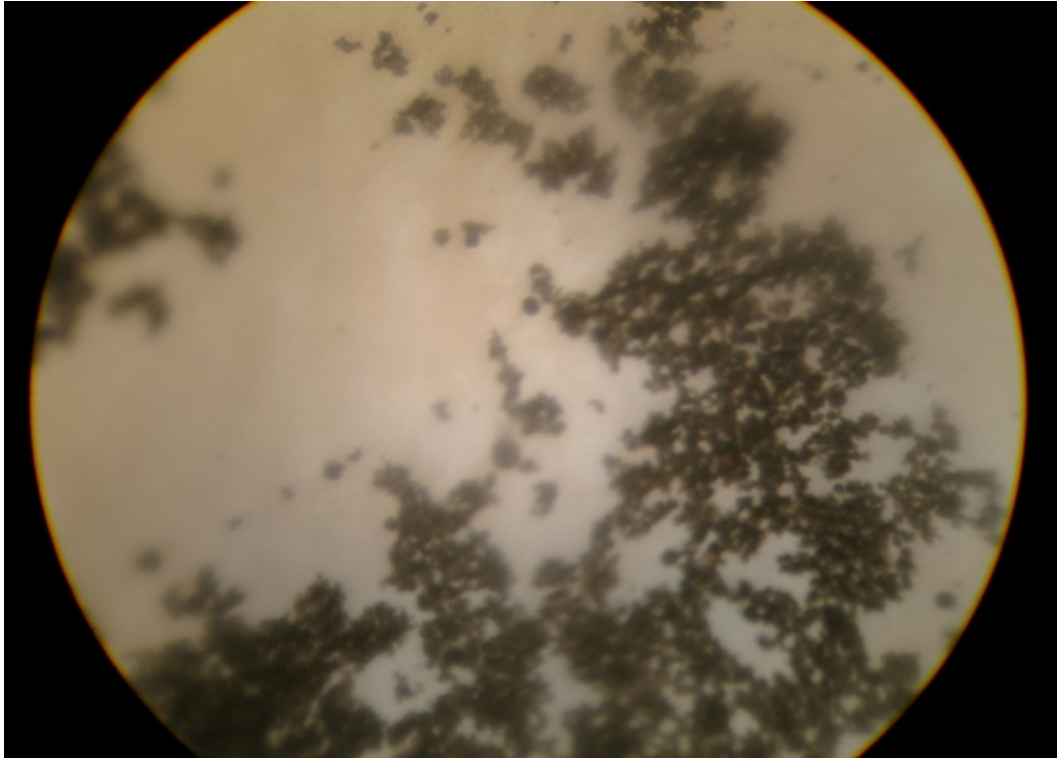


d

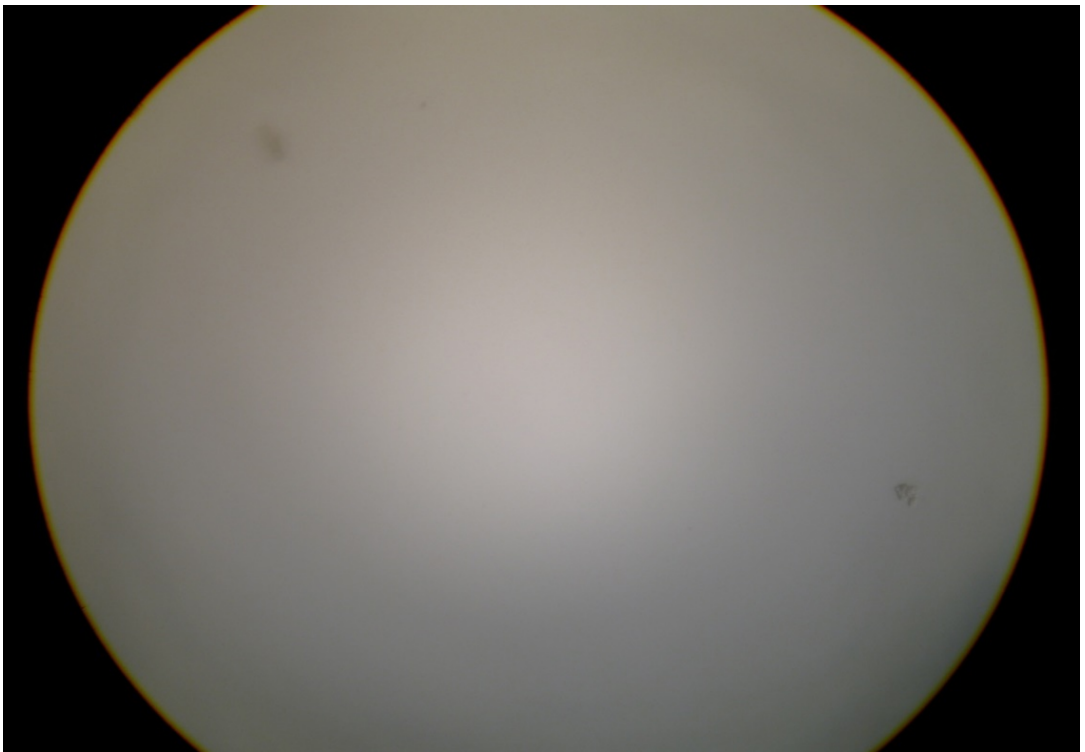
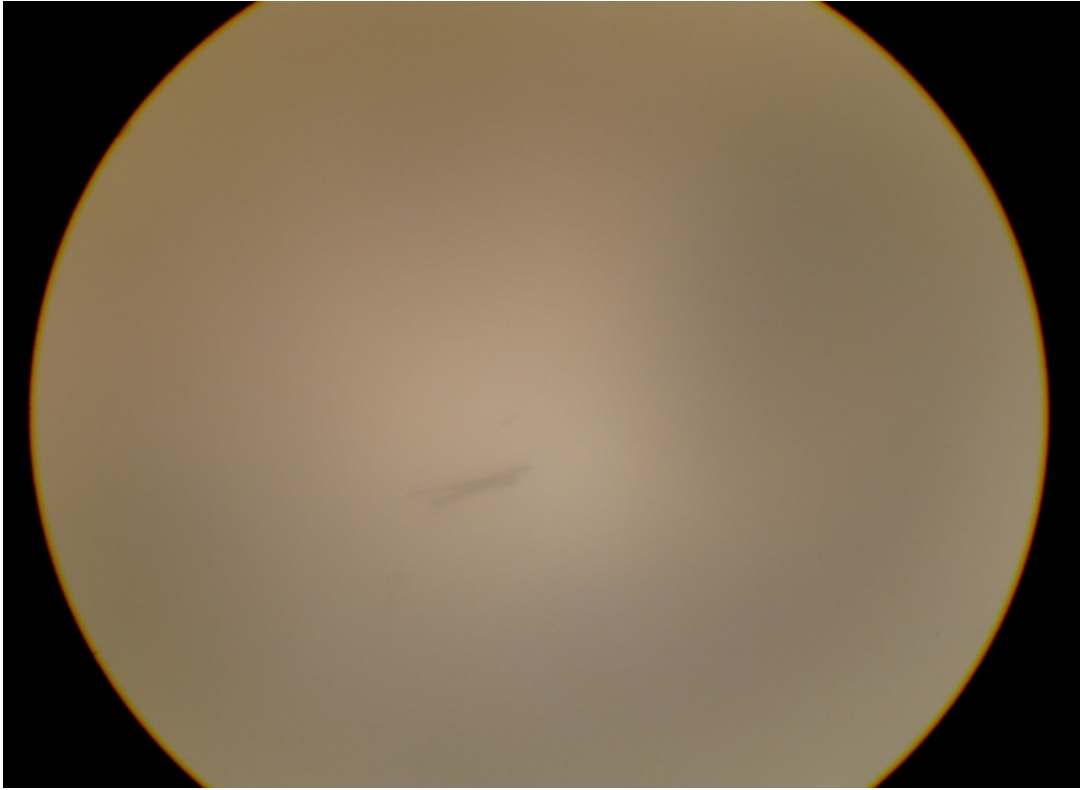


e

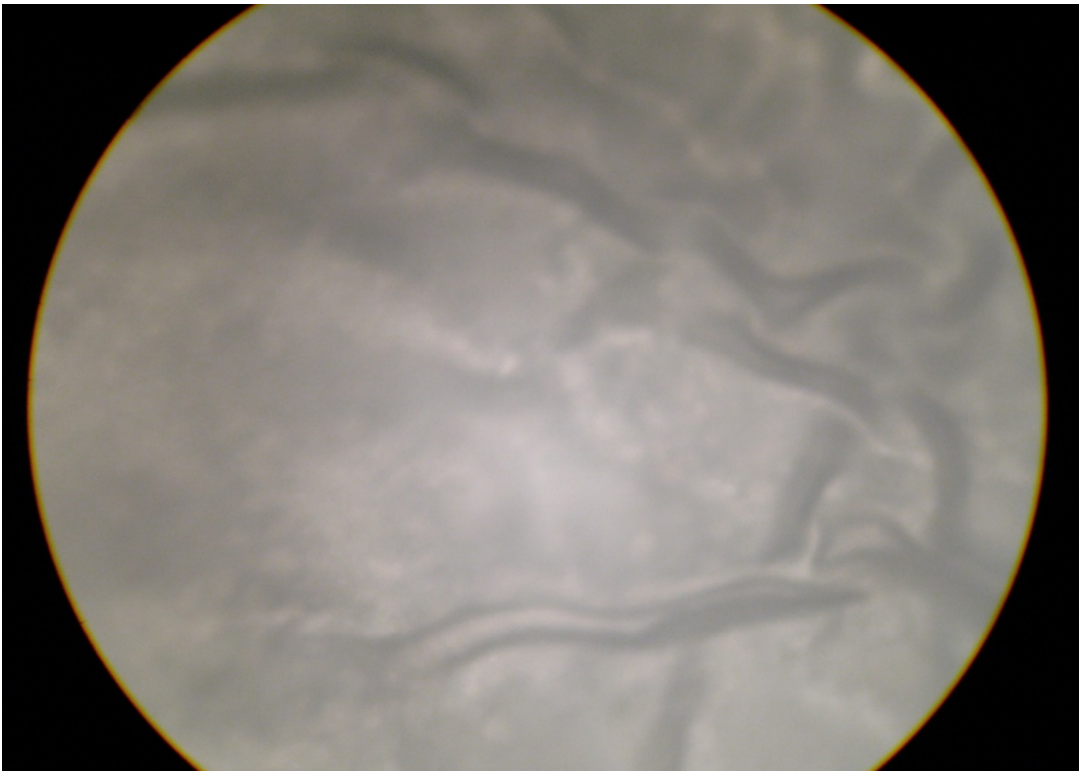
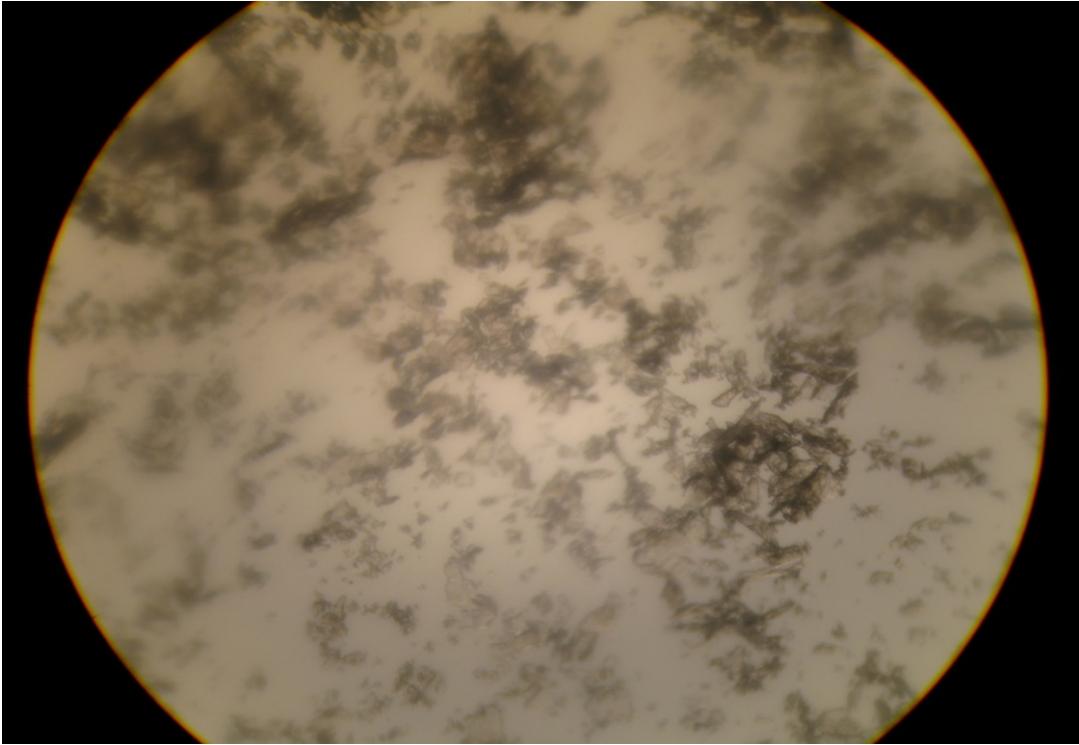
Şekil 10. Polen (a), elma sirkesi (b), kitosan (c), CSx (d) ve CSy (e) bileşiklerinin *Listeria Monocytogenes* bakterilerine karşı sıfır ve 1. gün yüzey aktivitesi



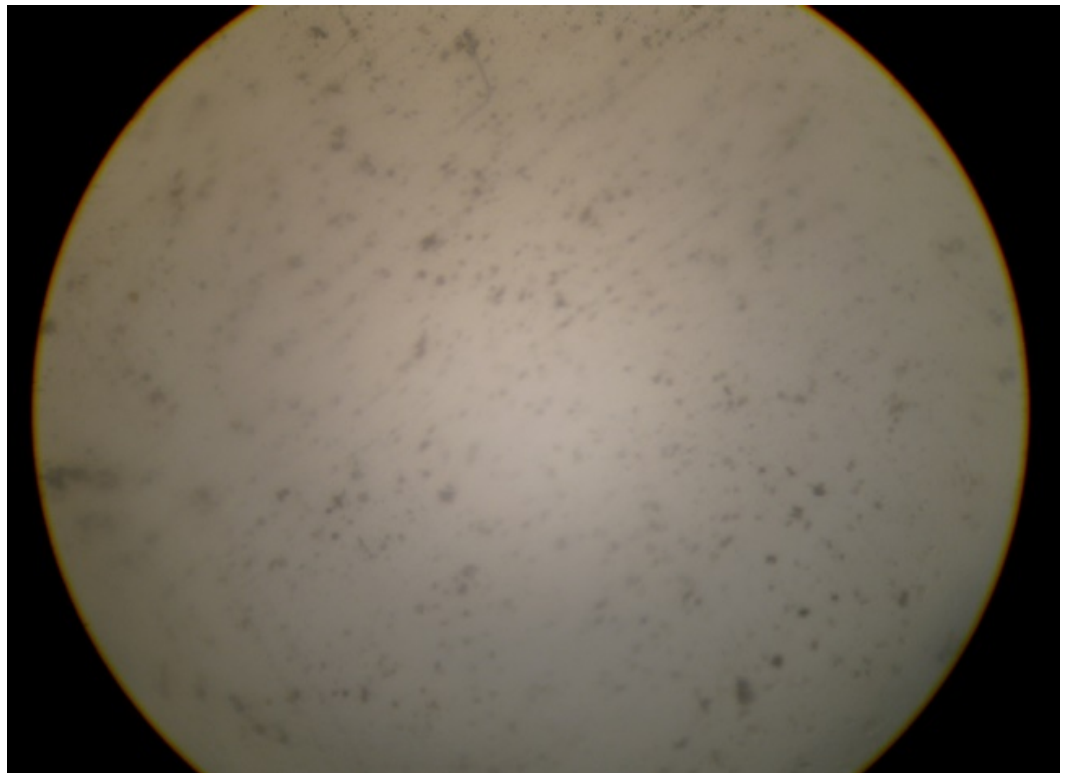
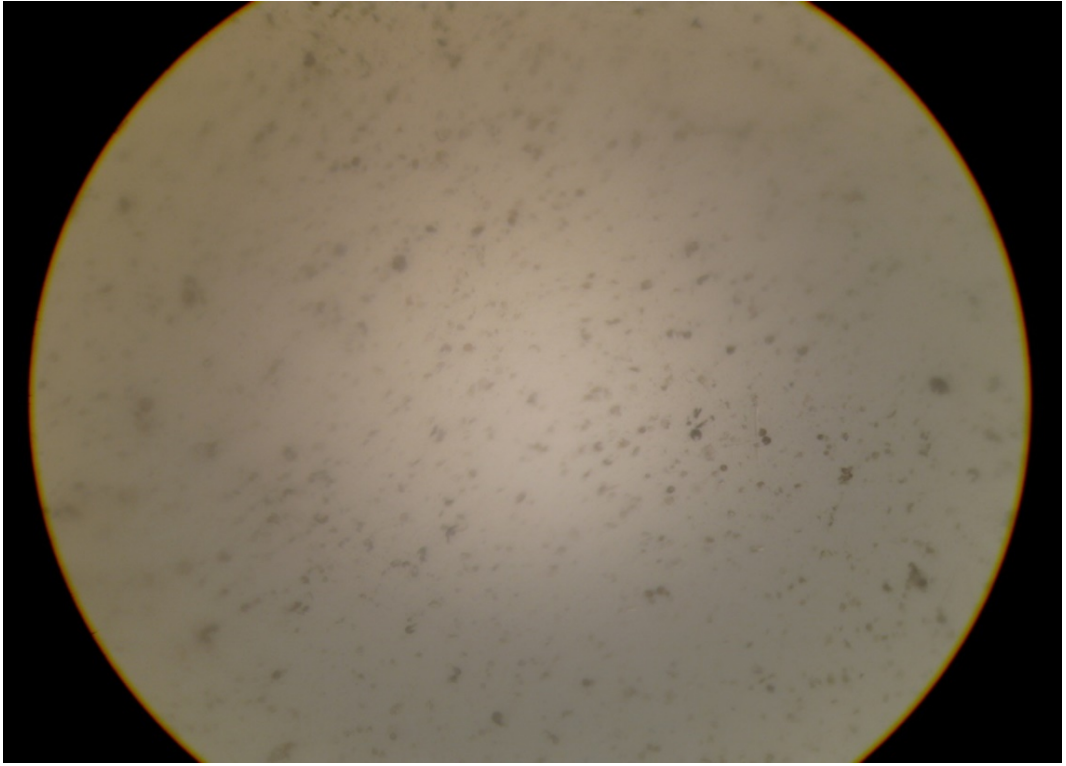
a



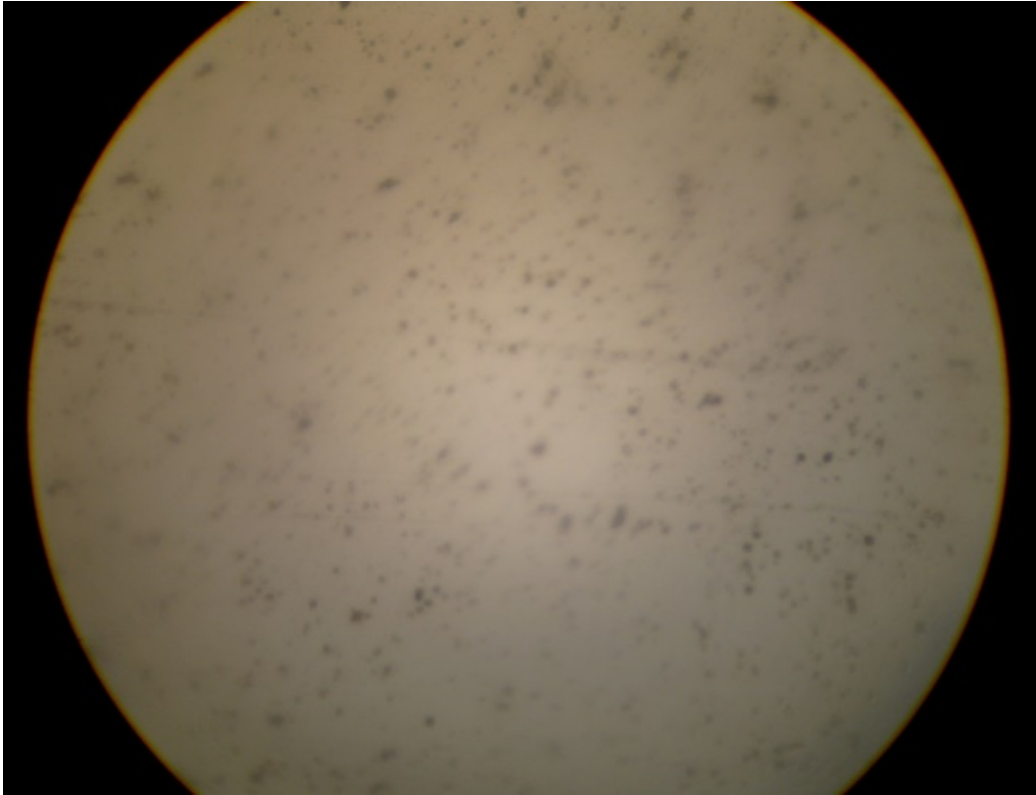
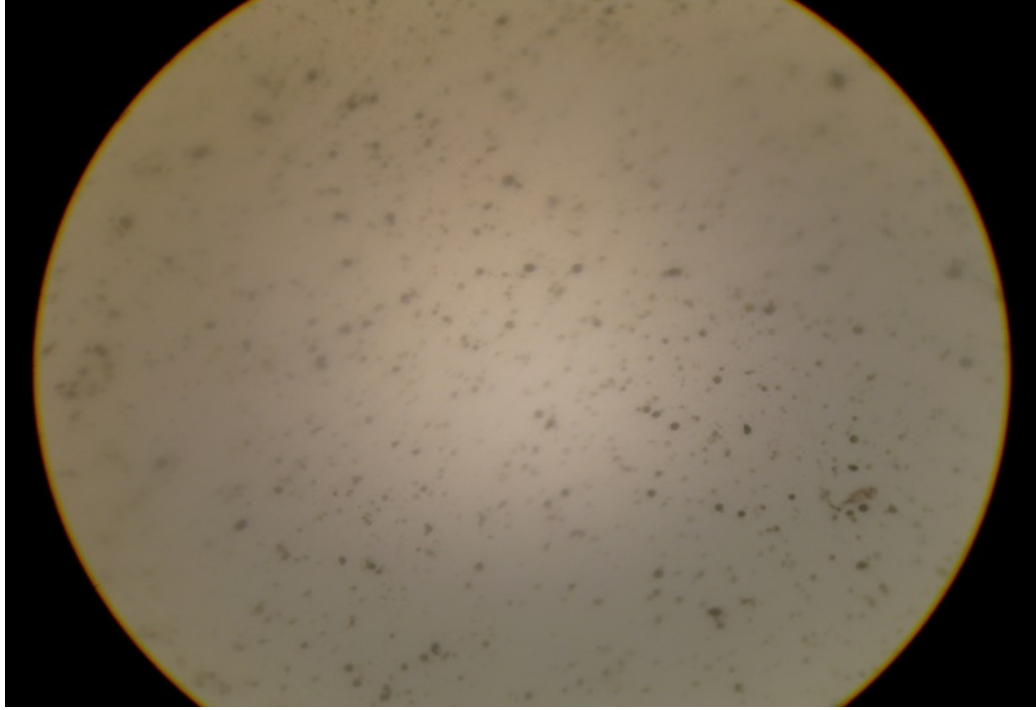
b



c

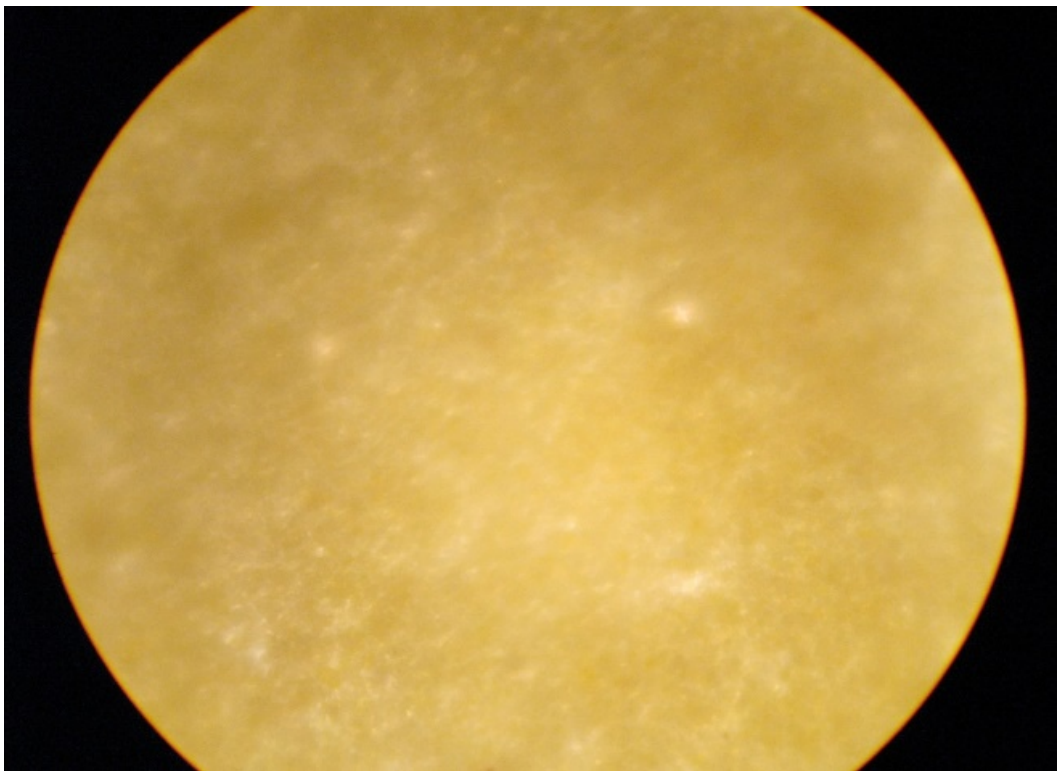
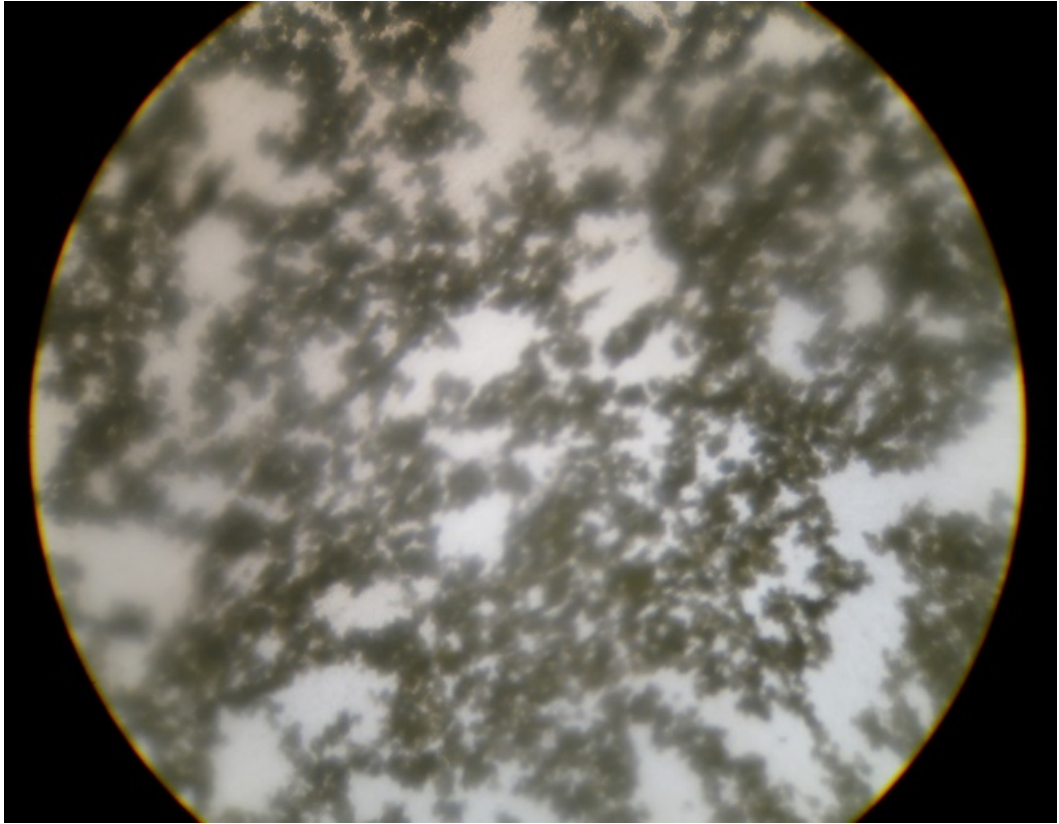


d

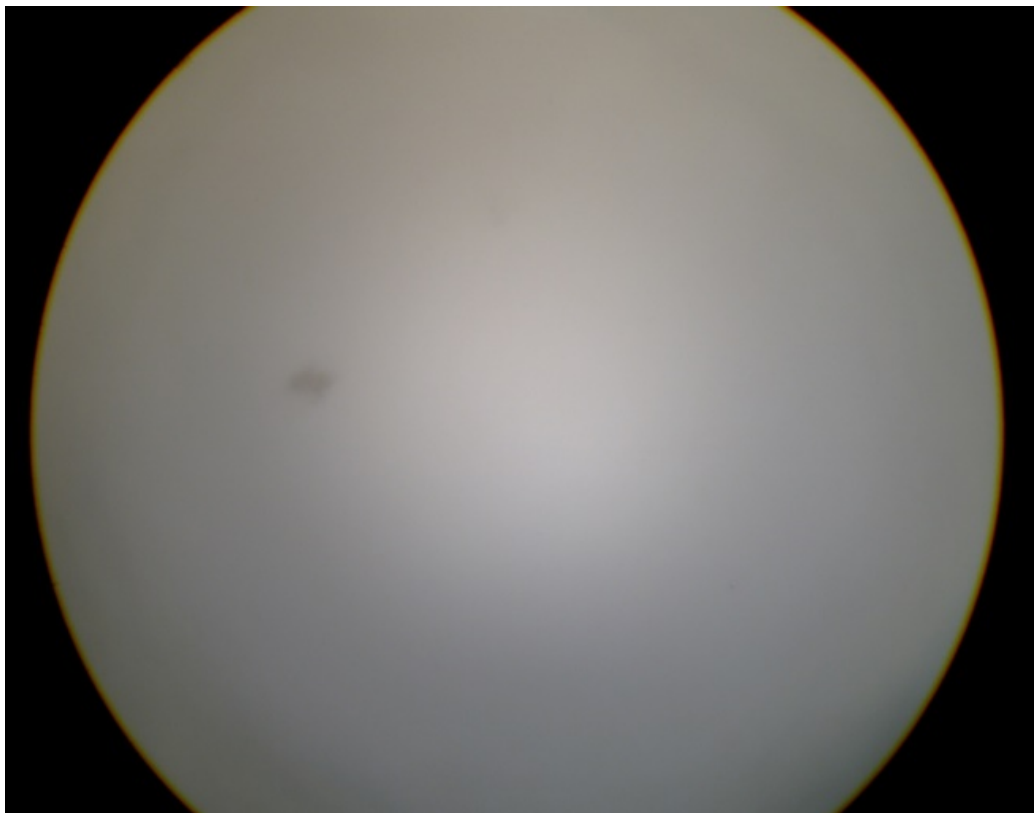
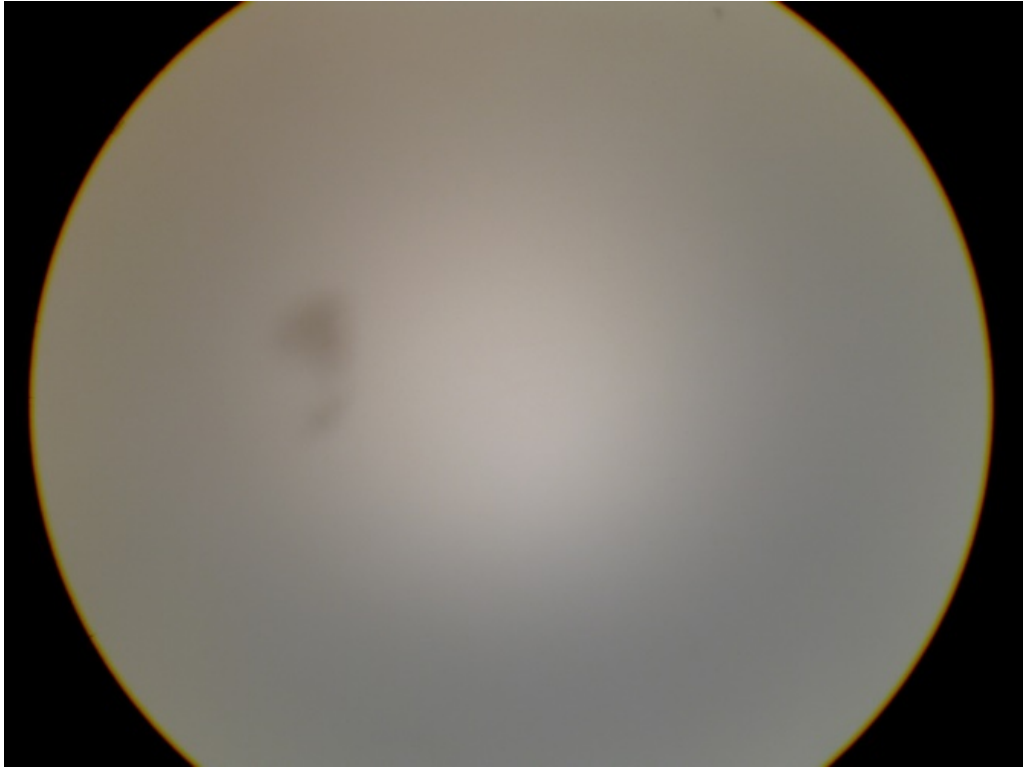


e

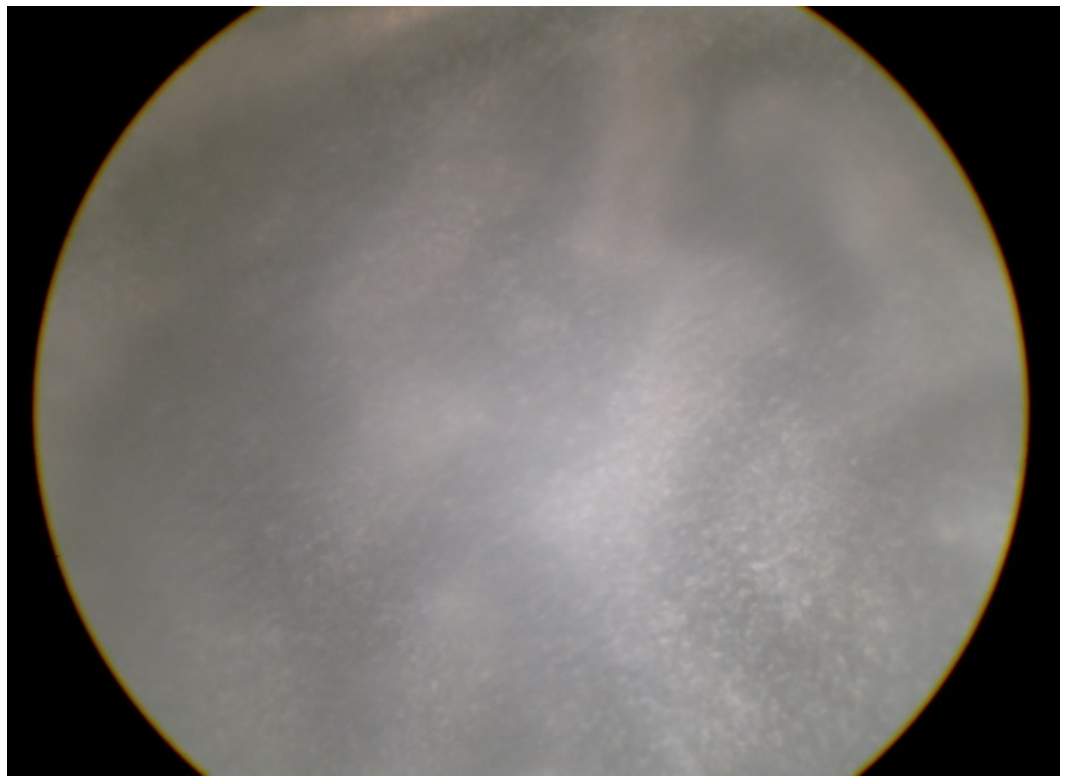
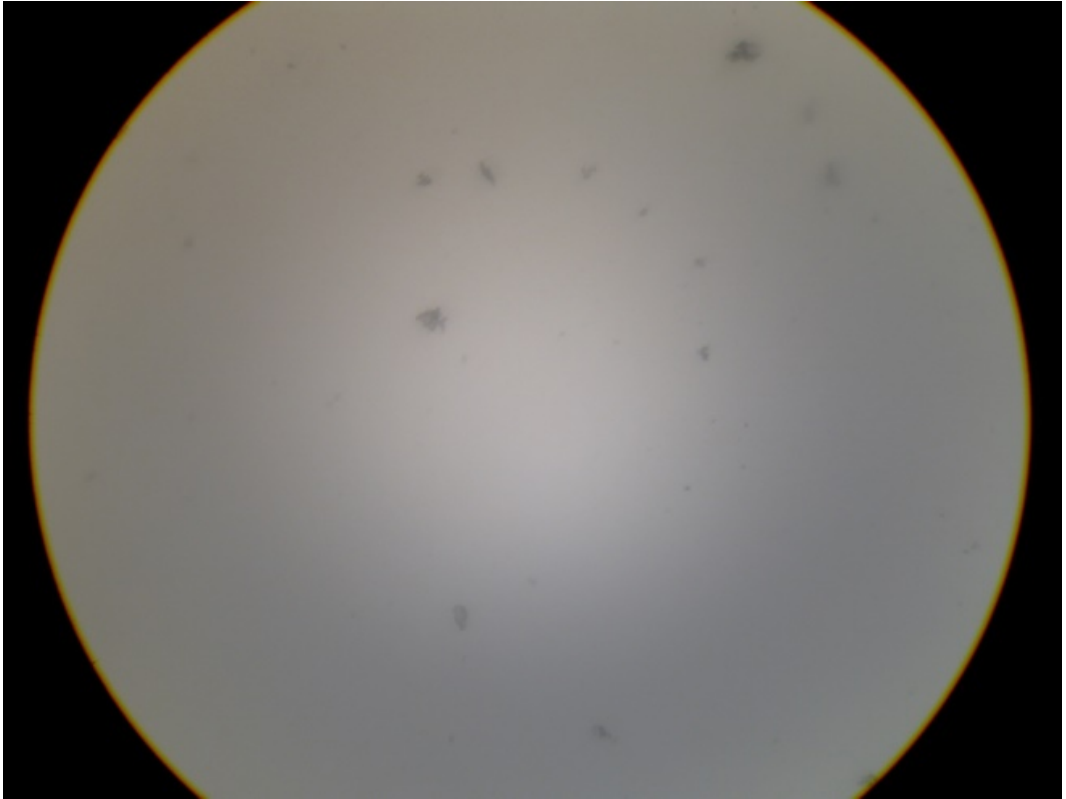
Şekil 11. Polen (a), elma sirkesi (b), kitosan (c), CSx (d) ve CSy (e) bileşiklerinin *S.Aureus* bakterisine karşı sırasıyla sıfır ve 1. gün yüzey aktivitesi



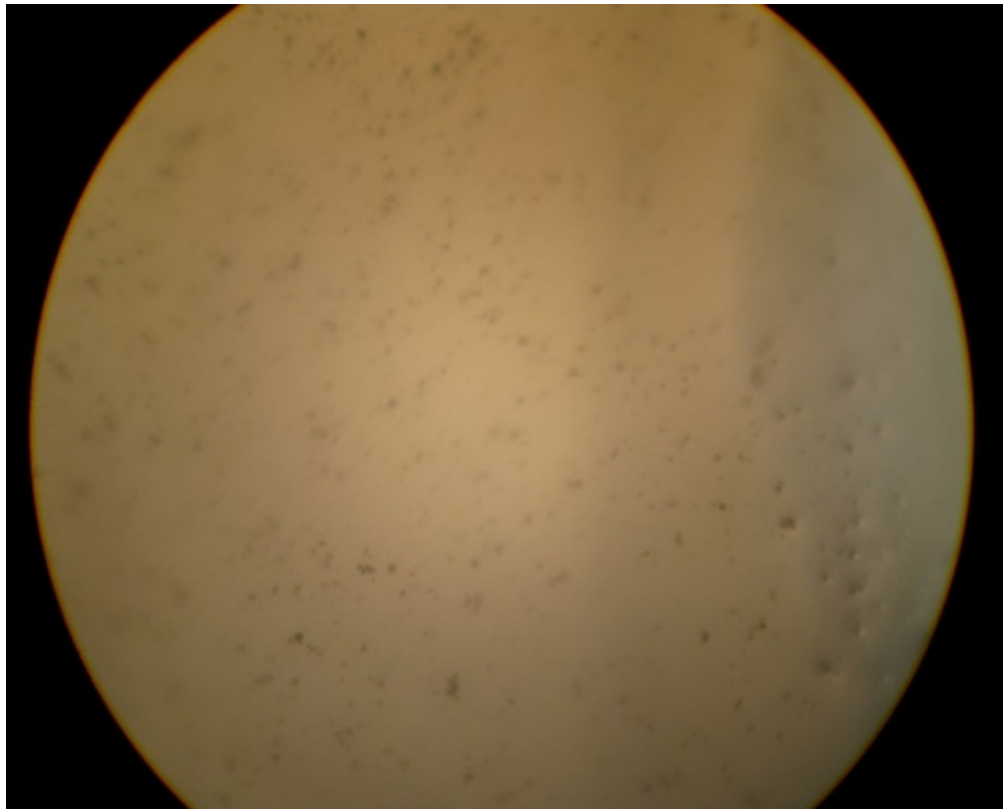
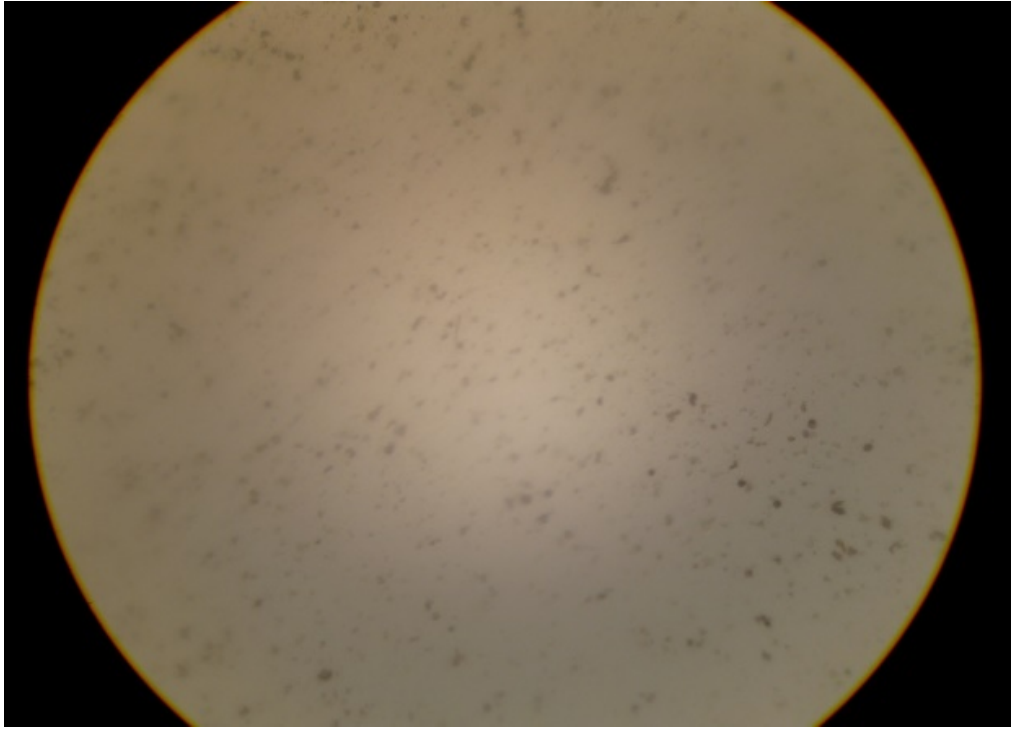
a



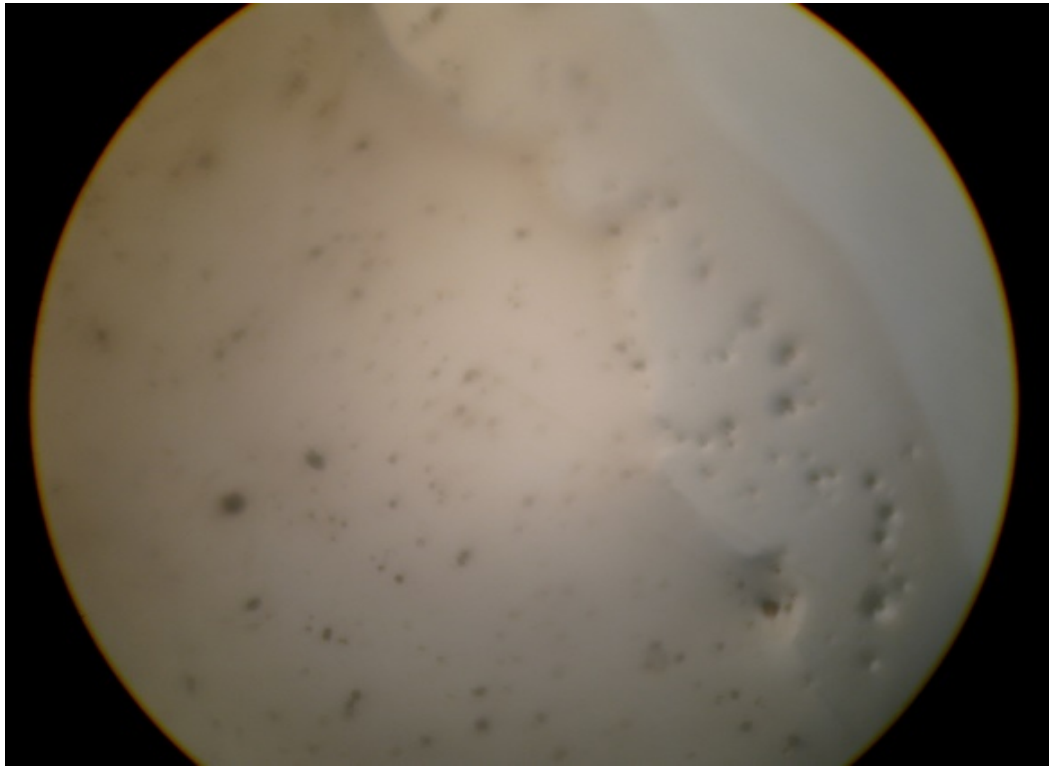
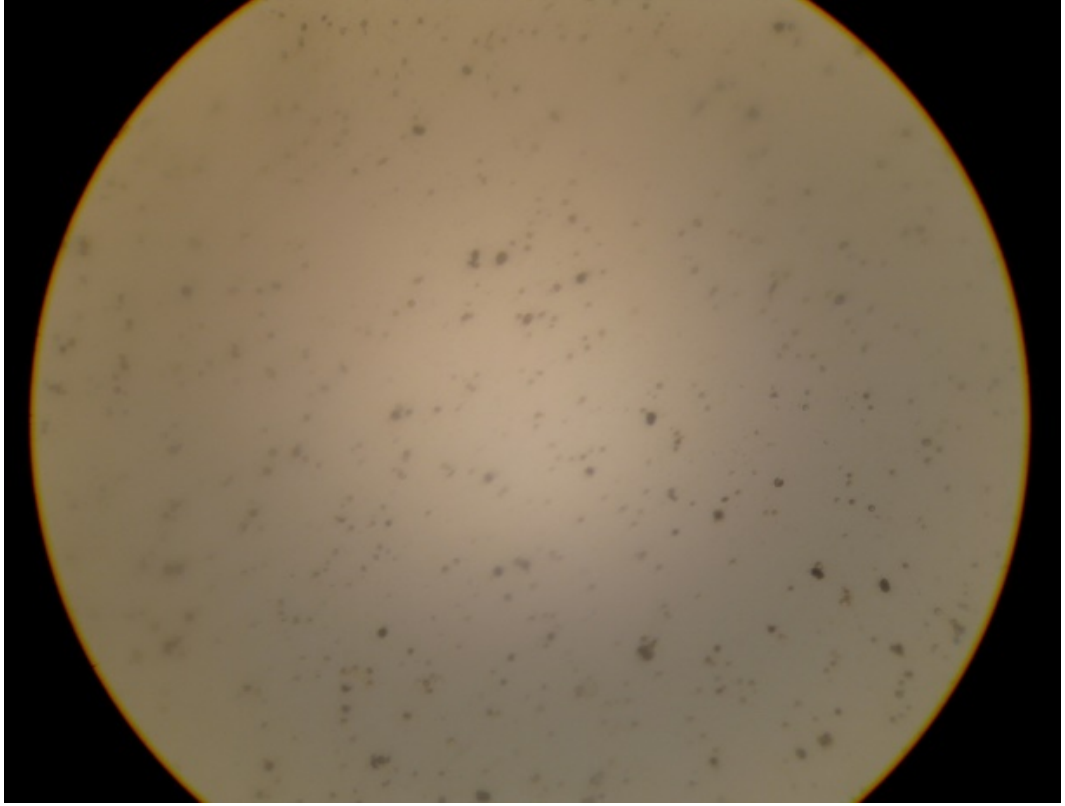
b



c

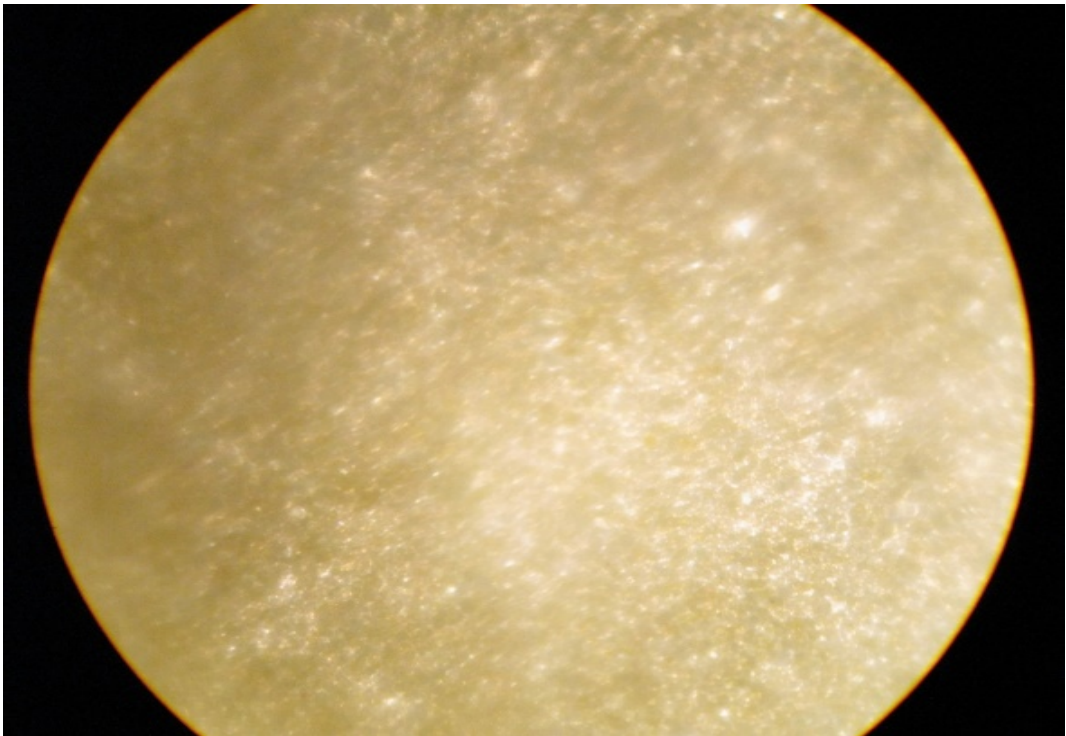
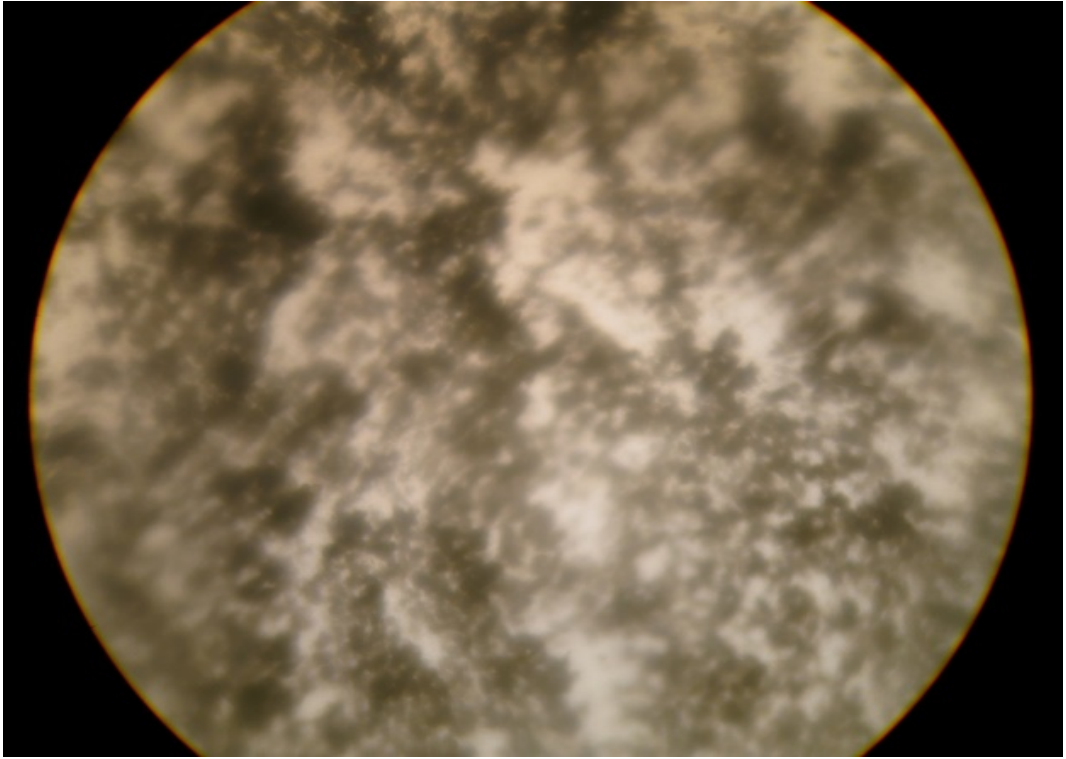


d

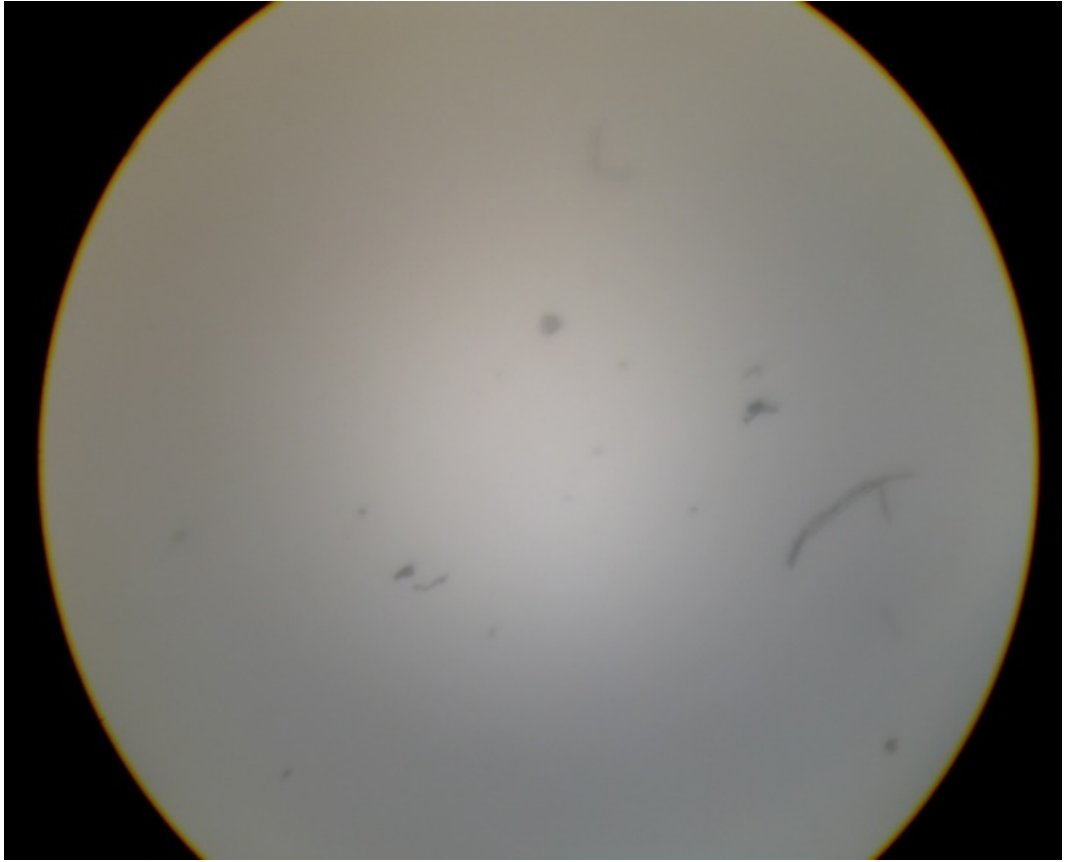


e

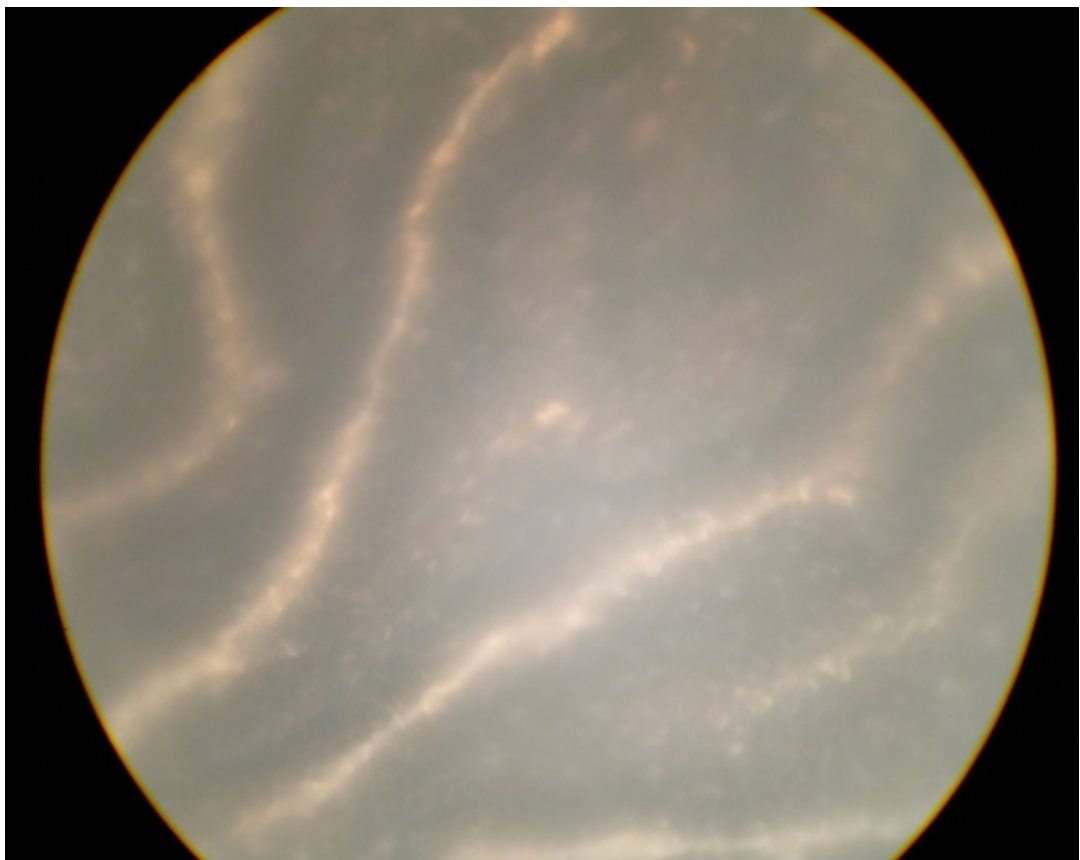
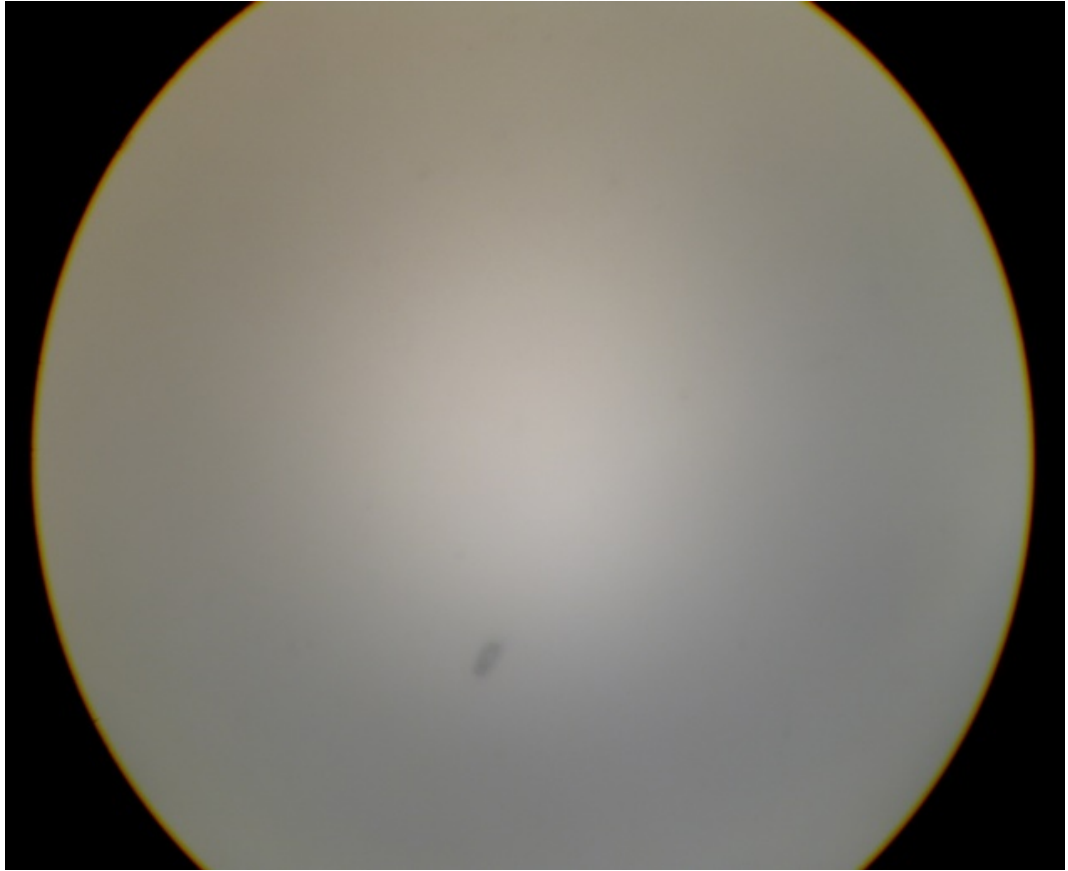
Şekil 12. Polen (a), elma sirkesi (b), kitosan (c), CSx (d) ve CSy (e) bileşiklerinin *E.coli* bakterisine karşı sırasıyca sıfır ve 1. gün yüzey aktivitesi



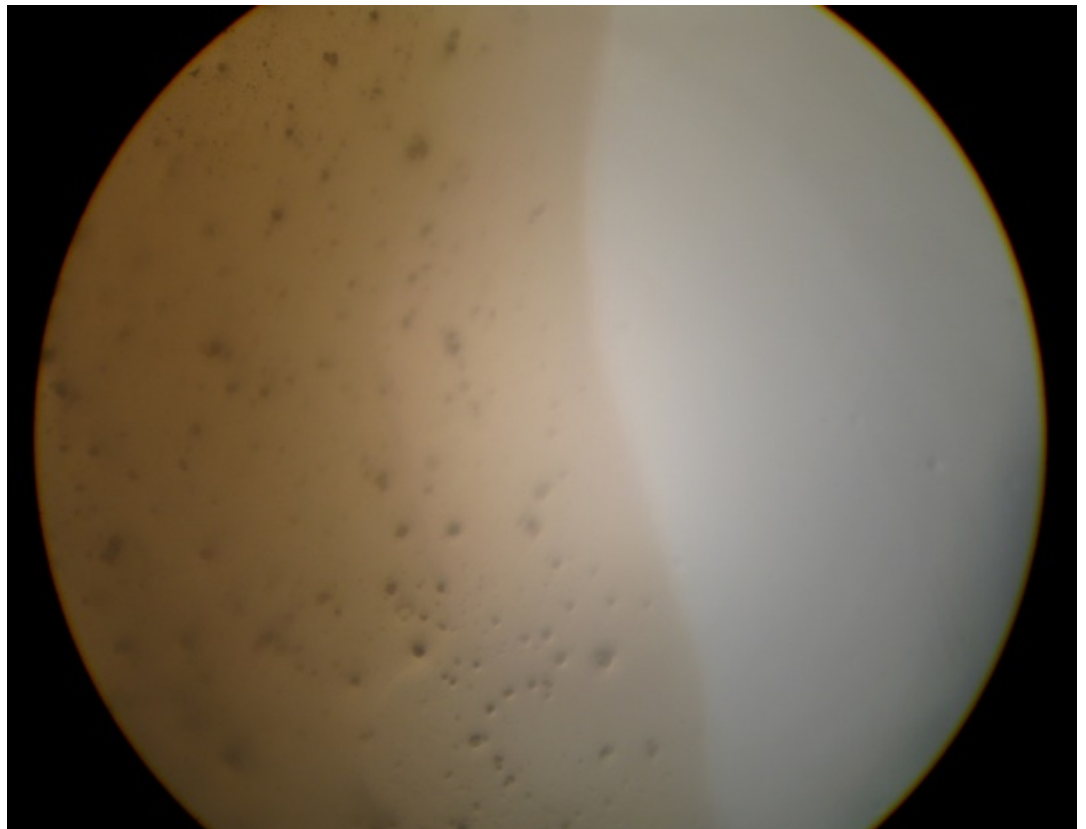
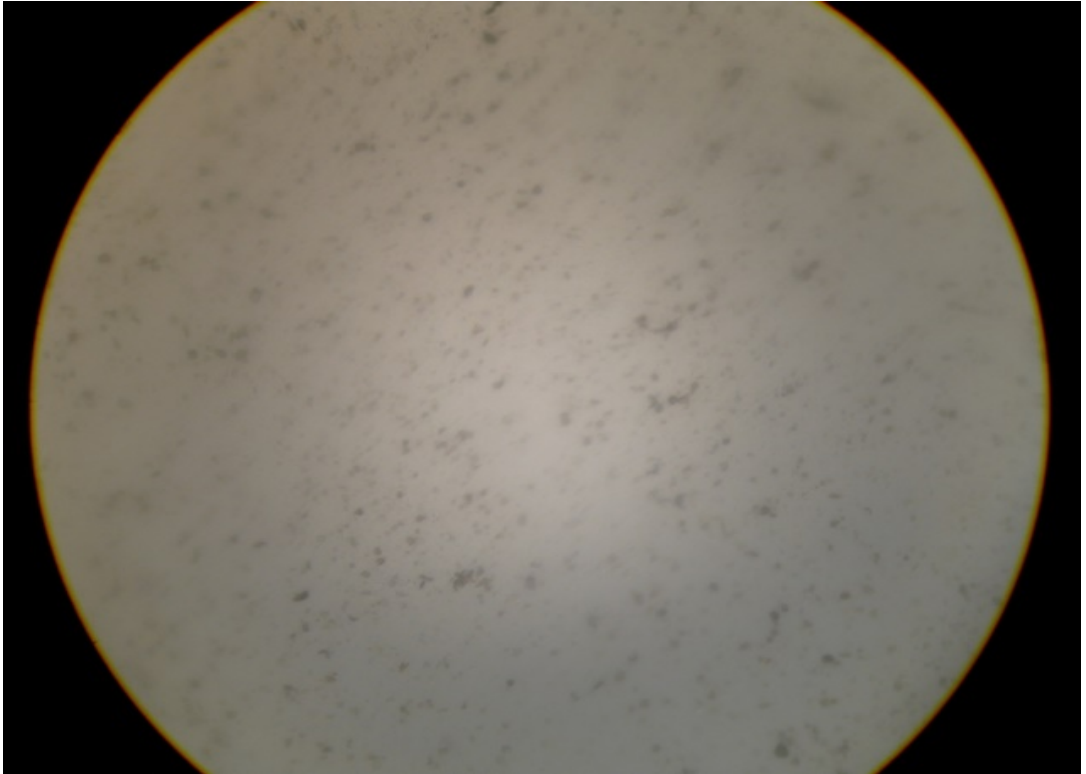
a



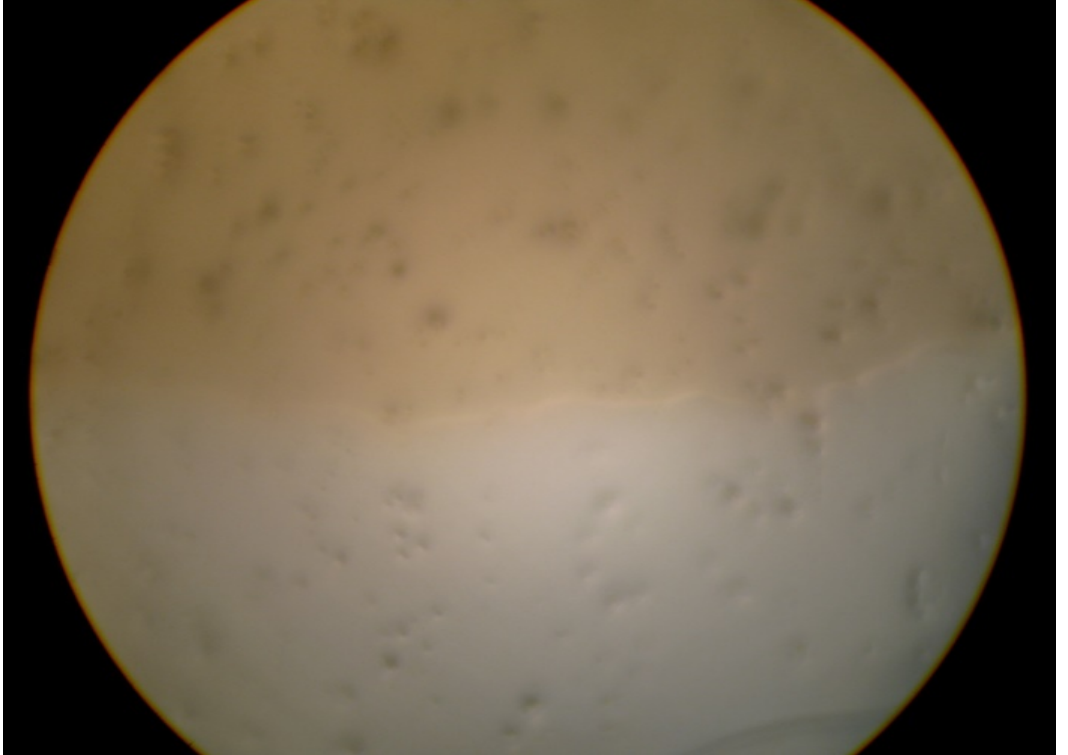
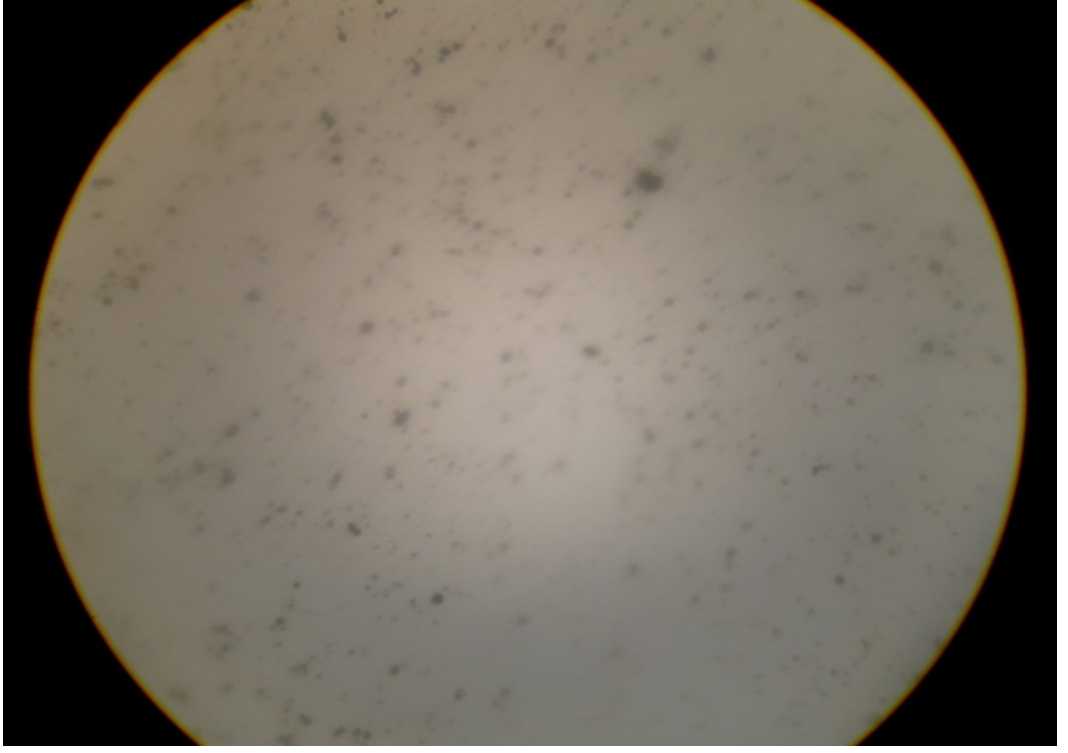
b



c



d



e

Şekil 13. Polen (a), elma sirkesi (b), kitosan (c), CSx (d) ve CSy (e) bileşiklerinin *salmonella* bakterisine karşı sırasıyla sıfır ve 1. gün yüzey aktivitesi

IV. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Polen, bal arıları tarafından üretilen, insan diyetinde yer alması gereken gerekli temel ve bazı esansiyel gıda bileşenlere sahip, biyolojik aktif madde bakımında zengin, amino asitler, karbonhidratlar, proteinler, yağlar, fenolik bileşikler, yağ asitleri enzimler, biyoelementler ve vitaminlerden oluşur. Son zamanlarda, insanların doğal olana yönelmesi ve sağlık üzerine olan pozitif etkilerinin öğrenilmesi sayesinde, tüketilmeye başlanmıştır. Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen bulgulara göre, polen-metanol ekstraktının, toplam polifenol miktarı 34 ve 35 mgGAE/g olarak ölçülmüştür ve bu diğer çalışmalarda bulunan değerlerden yüksektir. Bu bulgu değerlendirilerek, polenin bir polifenol kaynağı olduğu varsayılabılır. % Antioksidan değerlerine bakıldığında, 60µM dpph çözeltisinde %93,42'iken 3,75 µM dpph çözeltisinde %99,89 olduğu görülmektedir. Polen-alkol ekstraktının içerisinde bulunan fenolik madde miktarının fazlalığı, antioksidan kapasitesinin yüksekliğiyle örtüşmektedir ve bir antioksidan olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Elde edilen bulgulara göre, polen, *Listeria monocytogenes* (Gram pozitif), bakterisine karşı 51 mm² inhibasyon zonuyla en fazla antimikrobiyal aktivite göstererek, *Staphylococcus aureus* (Gram pozitif), *Escherichia coli* (Gram negatif) ve *Salmonella typhimurium* (Gram negatif) bakterilerine 13 mm² inhibasyon zonuyla daha az bir antimikrobiyal etki göstermiştir. Bu bilgiye dayanarak, Polenin, *Listeria monocytogenes* bakterisi karşısında etkili olduğu, polen-alkol konsantrasyonları değiştirilip, antimikrobiyal olarak daha etkili olabileceği anlaşılmaktadır. Polen, yüzey aktif analizinin 1. Gün sonucunda, test edilen tüm bakterilerin, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium*, sayılarında azalma ve yüzeylerin ise daha parlak ve temiz olduğu gözlemlenmiştir. Bu bulgu, mikroorganizmaların polene duyarlı olduklarını ve yüzey aktivite gösterdiklerini anlatmaktadır.

Antibiyotiklere direnç gösteren patojenlerin sayısının artması, giderek büyük bir problem olmaya başlaması sebebiyle yeni antimikrobiyal maddeler

araştırılmaktadır. Elma sirkesi, yüksek antimikrobiyal aktivitesi sebebiyle, yeni bir antimikrobiyal ajan olarak düşünülebilir. Elma sirkesine bakıldığında, içerdiği toplam fenolik madde miktarı 26 mgGAE/g olarak ölçülmüştür. Polenden daha az polifenol içerdiği tespit edilmiştir. Antioksidan aktivitesi 60µM dpph çözeltisinde %94,4 gibi bir değere sahipken, 7,5 µM dpph çözeltisinde %99,8 gibi daha yüksek bir değerdedir. Bu, elma sirkesinin antioksidan kaynağı olabileceğini göstermektedir. Yapılan çalışmada, elma sirkesi, en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi *Listeria monocytogenes*'e olmak üzere, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* bakterilerine karşı sırasıyla; 908, 314, 201, 314 mm² inhibasyon zonuyla gösterdiği saptanmıştır. Yüzey aktivite analizine bakıldığında, elma sirkesinin, bakterileri elimine ettiği ve 1. Günün sonundaki mikroskop görüntülerinin, temiz ve parlak olduğu gözlemlenmiştir.

Bu sonuçlara göre, elma sirkesinin, gram pozitif bakterilere, gram negatiflere oranda daha fazla antimikrobiyal özellik gösterdiği gözlemlenmiştir ve Elma sirkesinin güçlü bir antimikrobiyal ajan olduğunu anlatmaktadır.

Kitosan doğal kaynaklı, toksik etkiye sahip olmayan, ekonomik olması, gıdalarda; antioksidan ve antimikrobiyal etkisi, nem tutma gibi özelliklerinden dolayı son zamanlarda tercih edilmeye başlanmıştır. Kitosanın, fenolik içeriği 4.3 mgGAE/g olarak belirlenmiştir. Ek olarak, kitosanın % antioksidan aktivitesi 60µM dpph çözeltisinde %77,1 iken 3,75 µM dpph çözeltisinde %99,9 değerindedir. Bu bulgu, kitosanın en çok tercih edilme nedenlerinden biri olan antioksidan özelliğini kanıtlamaktadır. Bu çalışmada, kitosan, sadece, gram pozitif bir bakteri olan *Staphylococcus aureus* üzerinde, 3.14 mm² inhibasyon zonuyla antimikrobiyal etki göstermiştir. Formülasyonu ve kullanılan kitosan konsantrasyonu değiştirilirse, daha etkili bir antimikrobiyal aktivitenin gözlemlenebileceği düşünülmüştür.

Analiz sonuçlarına göre, CSx ve CSy bileşiklerinin toplam fenol miktarları sırasıyla 34 ve 35 mg/100x10⁻⁶ mgGAE olarak hesaplandı. İçerdikleri, polen, kitosan ve elma sirkesinin, fenol miktarlarına bakılınca, elde edilen sonucun bu değerlere paralel olduğu anlaşılmıştır. Sentezlenen CSx ve CSy bileşikleri fenolik madde bakımından zengindir. Sadece polen miktarının arttırılmasıyla, fenol miktarında da az da olsa bir artış görülmüştür. Daha sonraki uygulanan farklı formülasyonlarla, fenolik madde miktarlarının arttırılabileceği düşünülmüştür.

CSx ve CSy bileşiklerinin % antioksidan aktivite değerleri sırasıyla ve % 92.4 ve 93 olarak belirlenmiştir. CSx ve CSy bileşiklerinin antioksidan aktiviteleri karşılaştırıldığında CSy bileşiminde polen ekstrakt miktarının daha fazla olması sebebiyle %antioksidan aktivitesinde de daha fazla bir değer saptanmıştır. CSy ve CSx bileşiklerinin, yüksek antioksidan özelliğine sahip olmasının nedenleri içerdikleri, polen, elma sirkesi ve kitosanın yüksek antioksidan etkiye sahip olmasındandır. Sentezlenen bileşikler, antioksidan kaynağı olarak düşünülebilir. Molekül ağırlıkları CSx ve CSy bileşiklerinin molekül ağırlıkları sırasıyla 85 ve 140 kDa olarak hesaplanmıştır. Antioksidan bileşiklerin enkapsülasyonda yükleme kapasiteleri CSx ve CSy için sırasıyla %87,2 ve %87,8 olarak analiz edilmiştir. Antibakteriyel analiz sonuçlarına göre CSx bileşiği, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* bakterilerine karşı sırasıyla 804, 531, 255, 452 mm² inhibasyon zonu ölçülmüştür. CSx bileşiminin, en çok etki ettiği bakteri *Listeria monocytogenes* olduğu gözlemlenmiştir. Ek olarak, gram pozitif bakterilerine, gram negatif bakterilerinden daha çok antimikrobiyal etki saptanmıştır. En düşük antimikrobiyal aktivite *Escherichia coli* bakterisine karşı gözlemlenmiştir. İçeriğinde bulunan, polen, sirke ve kitosanın antimikrobiyal özelliklerinden dolayı, bu ürünün antimikrobiyal aktivitesinin yüksek olduğu düşünülmektedir.

CSy bileşimine bakıldığında, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* bakterilerine karşı sırasıyla 1134, 707, 314, 616 mm² inhibasyon zonları elde edilmiştir. En yüksek mikrobiyal etki *Listeria monocytogenes*'e karşı olmuştur. Bunun sebebi, içeriğindeki polen ve elma sirkesinin de *Listeria monocytogenes*'e karşı etkili olmasıdır. CSy bileşiminin, en az olmakla birlikte, yine de etkili olduğu bakteri *Escherichia coli*'dir. Yapılan çalışmada en yüksek antimikrobiyal aktivite CSy bileşiminde gözlemlenmiştir. Bunun sebebi, içeriğindeki polen miktarının daha fazla olmasıyla açıklanmaktadır. Yüzey aktive analizine ve antimikrobiyal özelliklere bakıldığında, oluşturulan bileşiklerin, süt ve süt ürünlerinde görülen *Listeria monocytogenes* bakterisine karşı etkili olduğu için ambalaj malzemesi olarak kullanılabilir.

V.KAYNAKÇA

KİTAPLAR

Asafova, N., Orlov, B., And Kozin, R., **Physiologically Active Bee Products**, Y. A.

Nikolaev, Nizhny Novgorod, Russia, 2001, edited by: Y. A. Nikolaev.

KORKMAZ, A., 2017. **Anlaşılabilir Arıcılık**. Ceylan Ofset. Samsun

RUTTNER, F. (1988). **Biogeography and taxonomy of honeybees**. Springer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York, 284 pp.

YU, Y.C. (1999). **Synopsis of Chinese herbal compendium**. Peking, PRC: Scientific and Technical Documents Publishing House Press.

MAKALELER

A. PASCOAL, S. RODRÍGUES, A. TEIXEIRA, X. FEÁS, L.M. ESTEVINHO, Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory, **Food Chem. Toxicol.** 63 (2014) 233–239.

ABDOU, E.S., NAGY, K.S.A., ELSABEE, M.Z (2008). Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. **Bioresour Technol.** 99 (5), 1359–1367, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.051>.

AKSOY, Z., DIĞRAK, M., 2006. Bingöl yöresinde toplanan bal ve propolisin antimikrobiyal etkisi üzerinde in vitro araştırmalar. **Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi** 18(4): 471-478.

ARES, A.M., NOZAL, M.J., BERNAL, J., Extraction, chemical characterization and biological activity determination of broccoli health promoting compounds, **J. Chromatogr. A** 1313 (2013) 78–95.

- AZAB, D. E. S. H., HEİKAL, Y. A., SALAHELDIN, T., HASSAN, A. A. & ABU-SALEM, F. M. Nano formulated soy proteins for improvement of beef Burgers quality. **Egypt. J. Chem.** 62, 1167–1184 (2019).
- Banu, C., coord., *Biotehnologii in industria alimentara*, **Editura Tehnica**, Bucuresti, 2000, 306-312
- BAYSAL, G. Antibacterial Properties and Synthesis of Organoclay with Goji Berry, **Journal of Nutrition and Health Sciences**, 2020, Volume 7 | Issue 1, syf 1-7
- BAYSAL, G., ÇELİK, B.Y. Synthesis and characterization of antibacterial bio-nano films for food packaging. **J Environ Sci Heal Part B Pestic Food ContamAgric Wastes**. 2019; 54(2):79–88.
- BAYSAL, G., DOĞAN, F. (2020) Investigation and preparation of biodegradable starch-based nanofilms for potential use of curcumin and garlic in food packaging applications. **J Biomater Sci Polym Ed** 2020, 31(9), 1127-1143
- BAYSAL, G., KASAPBAŞI, E.E., YAVUZ, N., HÜR, Z., GENÇ, K., GENÇ, M. (2020). Determination Of Theoretical Calculations By Dft Method and Investigation Of Antioxidant, Antimicrobial Properties Of Oliveleaf Extracts From Different Regions. **J Food Sci Technol**, 2020, 1-9
- BERISTAIN, C. I., VAZQUEZ, A., GARCÍA, H. S. & VERNON-CARTER, E. J. Encapsulation of orange peel oil by co-crystallization. **LWT - Food Sci. Technology** 29, 645–647 (1996).
- BHANDARİ, B. R. & HOWES, T. (2002). Glass transition relation to stickiness during spray drying. **V.K. Jindal, Proceedings of the International Conference on Innovations in Food Processing Technology and Engineering of the International Conference on Innovations in Food Processing Tech & Eng, AIT, Bangkok**, 406–419. 11–13.
- Bogdanov, S. (2011a). Pollen: nutrition, functional properties, health: a review. **Bee Product Science**, 1-34.
- BOSTAN, K., ALDEMİR, T., AYDIN, A. 2007. Kitosan ve antimikrobiyal aktivitesi. **Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi**, 37(2), 118-127.

- BURUCU, V. VE GÜLSE BAL, H.S., 2018. Arıcılık İşletmelerinin Pazarlama Olanakları: Kastamonu İli Azdavay İlçesi Örneği, **Tarım Ekonomisi Araştırmaları Dergisi** (2018) 4(1): 23-35, Ankara.
- CAMPOS, M. G. R., BOGDANOV, S., DE ALMEIDA-MURADIAN, L. B. et al., "Pollen composition and standardisation of analytical methods," **Journal of Apicultural Research**, vol. 47, no. 2, pp. 152– 162, 2008
- CHARVE, J. and REINECCIUS, G.A., AGRIC, J.. **Food Chem.** 57, 2486 (2009).
- CHOUDHARI, M.K., HAGHNAZ, R., RAJWADE, J.M., PAKNIKAR K.M., (2013). Anticancer activity of Indian stingless bee propolis: an in vitro study. Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine <http://dx.doi.org/10.1155/2012/410406>.
- COMA, V., MARTIAL-GROS, A., GARREAU, S., COPINET, A., SALIN, F., DESCHAMPS, A. (2002). Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. **Journal of Food Sci**, 67(3), 1162-1169, <https://doi.org/10.1111/j.13652621.2002.tb09470.x>.
- CONTE, G., BENELLI, G., SERRA, A., SIGNORINI, F., BIENTINESI, M., NICOLELLA, C., MELE, M., CANALE, A. Lipid characterization of chestnut and willow honeybee-collected pollen: impact of freeze-drying and microwave-assisted drying, **J. Food Compos. Anal.** 55 (2017) 12–19.
- CZERWINSKA, M., KISS, A.K., NARUSZEWCZ, M.A. (2012) Comparison of antioxidant activities of oleuropein and its dialdehydic derivative from olive oil, oleacein. **Food Chem** 131:940–947
- CZERWINSKA, M., KISS, A.K., NARUSZEWCZ, M.A. (2012) Comparison of antioxidant activities of oleuropein and its dialdehydic derivative from olive oil, oleacein. **Food Chem.** 131:940–947
- DAYAN, Y., & OĞUR, S., 2019 Bitlis Yöresine Ait Polen ve Propolislerin Bazı Patojen Bakteriler Üzerindeki Antimikrobiyal Aktiviteleri. **Mühendislik Alanında Araştırma ve Değerlendirmeler**, 418-434

- DECKER, E.A., WAGNER, K., RICHARDS, M.P. AND SHAHIDI, F.,
Measuring Antioxidant Effectiveness in Food, *J. Agric. Food Chem.*,
53, 4303-4310, 2005.
- DEL CAMPO, G., BERREGÍ, I., SANTOS, J. I., DUEÑAS, M., & IRASTORZA,
A. (2008). Development of alcoholic and malolactic fermentations in
highly acidic and phenolic apple musts. *Bioresource
technology*, 99(8), 2857-2863.
- DELEONARDIS, A., MACCIOLA, V., LEMBO, G., ARETINI, A., NAG, A.
(2007) Studies on oxidative stabilisation of lard by natural
antioxidants recovered from olive-oil mill wastewater. *Food Chem*
100(3):998–1004
- DIAS, D.R., BOTREL, D.A., FERNANDES, R.V.D.B. and BORGES, S.V.,
Curr. Opin. Food Sci. 13, 31 (2017).
- ERASLAN, G, KANBUR, M., SİLİCİ, S., LİMAN, B., ALTINORDULU, S.,
AND SARICA, Z. S., “Evaluation of protective effect of bee pollen
against propoxur toxicity in rat,” **Ecotoxicology and Environmental
Safety**, vol. 72, no. 3, pp. 931–937, 2009.
- ERKAN, C. VE AŞKIN, Y., 2001. Van İli Bahçesaray İlçesinde Arıcılığın Yapısı
ve Arıcılık Faaliyetleri. **Yüzüncü Yıl Üniv. Zir Fak Tarım Bil.
Derg.** (J. Agric. Sci.), 2001, 11(1):19-28, Van
- ERKMEN, O. AND OZCAN, M. M., “Antimicrobial effects of Turkish propolis,
pollen, and laurel on spoilage and pathogenic food- related
microorganisms,” **Journal of Medicinal Food**, vol. 11, no. 3, pp.
587–592, 2008.
- EZHILARASI, P.N., KARTHIK, P., CHHANWAL, N., and
ANANDHARAMAKRISHNAN, C., “Food Bioprocess Technol”. 6,
628 (2013).
- FIGUEIREDO-GONZALEZ, M., REBOREDO-RODRÍGUEZ, P., GONZALEZ-
BARREIRO, C., SİMAL-GANDARA, J., VALENTAO, P.,
CARRASCO-PANCORBO, A., ANDRADE, P.B., CANCHO-
GRANDE, B. (2018a) Evaluation of the neuroprotective and

antidiabetic potential of phenol-rich extracts from virgin olive oils by in vitro assays. **Food Res Int** 106:558–567

FILIPIAK, M., KUSZEWSKA, K., ASSELMAN, M., DENISOW, B., STAWIARZ, E., WOYCIECHOWSKI, M., & WEINER, J. (2017). Ecological stoichiometry of the honeybee: Pollen diversity and adequate species composition are needed to mitigate limitations imposed on the growth and development of bees by pollen quality. **PLoS One**, 12(8), e0183236.

FURUSAKI, E., UENO, Y., SAKAIRI, N., NISHI, N., TOKURA, S. 1996. Facile preparation and inclusion ability of a chitosan derivative bearing carboxymethyl-E- cyclodextrin. **Carbohydr. Polym.**, 9, 29-34.

HAFSAA, J., SMACHA, M.A., CHARFEDDINEA, B., LIMEMA, K., MAJDOUB, H., S. Rouatbi, Antioxidant and antimicrobial proprieties of chitin and chitosan extracted from Parapenaeus Longirostris shrimp shell waste, **Annales Pharmaceutiques Françaises** Volume 74, Issue 1, January 2016, Pages 27-3

JAYAKUMAR, R., PRABAHARAN, M., REIS, R.L., MANO, J.F. 2005. Graft copolymerized chitosan-present status and applications. **Carbohydr. Polym.**, 62, 142-158.

Jayakumar, R., Reis, R. L., & Mano, J. F. (2006). Chemistry and applications of phosphorylated chitin and chitosan. **e-Polymers**, 6(1).

JO, C., LEE, J.W., LEE, K.H., BYUN, M.W. 2001. Quality properties of pork sausage prepared with water- soluble chitosan oligomer. **Meat Sci.**, 59, 369-375.

JUNEJA, VK., THIPPAREDDI, H., BARI, L., INATSU, Y., KAWAMOTO, S., FRIEDMAN, M. (2006). Chitosan protects cooked ground beef and turkey against *Clostridium perfringens* spores during chilling. **J. Food Sci.**, 71(6),236-240.

KARABAGIAS, I.K., BADEKA, A.V., KONTAKOS, S., KARABOURNIOTI, S., KONTOMINAS, M.G., (2014). Botanical discrimination of Greek

unifloral honeys with physico-chemical and chemometric analyses. **Food Chemistry** 165: 181-190.

- KARIM, A.A. and BHAT, R. (2009) Fish Gelatin: Properties, Challenges, and Prospects as an Alternative to Mammalian Gelatins. **Food Hydrocolloids**, 23, 563-576
- KĘDZIA, B. AND HOŁDERNA-KĘDZIA, E., “Biological properties and therapeutic action of bee pollen,” **Postępy Fitoterapii**, vol. 3-4, pp. 103–108, 2005.
- KELEBEK, H., KADIROĞLU, P., DEMİRCAN, N. B., & SELLİ, S. (2017). Screening of bioactive components in grape and apple vinegars: Antioxidant and antimicrobial potential. **Journal of the Institute of Brewing**, 123(3), 407-416.
- KETTNER, A., HUGHES, G. J., FRUTIGER, S., ASTORI, M., ROGGERO, M., SPERTINI, F., & CORRADIN, G. (2001). Apim 6: a new bee venom allergen. **Journal of allergy and clinical immunology**, 107(5), 914-920.
- KOÇ, B. E., & ÖZKAN, M. (2011). Gıda Endüstrisinde Kitosanın Kullanımı. **Gıda/The Journal Of Food**, 36(3).
- KONDO, S., TAYAMA, K., TSUKAMOTO, Y., IKEDA, K., YAMORİ, Y. Antihypertensive effects of acetic acid and vinegar on spontaneously hypertensive rats. **Biosci Biotechnol Biochem** 2001;65:2690-4.
- KROYER, G., HEGEDUS, N., 2001. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. **Innovative Food Science and Emerging Technologies** 2, 171–174.
- KURT, Ş. & ZORBA, Ö. Kitin (Chitin), Kitosan (Chitosan) ve Türevlerinin Gıdalarda Kullanım Olanakları. **Gıda**, 30(6).
- LIU, H., DU, Y., WANG, X., SUN, L. (2004). Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. **Int J Food Microbiol**, 95(2), 147-155, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.022>.

- MADENE, A., JACQUOT, M., SCHER, J. and DESOBRY, S. (2006) Flavour Encapsulation and Controlled Release—A Review. **International Journal of Food Science & Technology**, 41, 1-21.
- MAGALHÃES, L.M., SEGUNDO, M.A., REIS, S., LÍMA, J.L.F.C., Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties, **Anal. Chim. Acta**, 613, 1–19, 2008.
- MANNING, R., “Fatty acids in pollen: a review of their importance for honey bees,” **Bee World**, vol. 82, no. 2, pp. 60–75, 2001.
- MORAIS, M., MOREIRA, L., FEAS, X. & ESTEVINHO, L.M. (2011). Honeybee-collected pollen from Portuguese naturel Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. **Food and Chemical Toxicology**, 49(5), 1097-1100
- MORRISON, N., CLARK, R., CHEN, Y., TALASHEK, T. and SWORN, G. (1999) Gelatin Alternatives for the Food Industry. In: Nishinari, K., Ed., *Physical Chemistry and Industrial Application of Gellan Gum*, Springer, Berlin, 127-131.
- MUDHAKIRA, D., WİBİSONO, C., RACHMAWATİ, H., Encapsulation of risperidone into chitosan-based nanocarrier via ionic binding interaction, **Procedia Chemistry** 13 (2014) 92 – 100
- NAFCHI, A.M., ALÍAS, A.K., MAHMUD, S., et al. Antimicrobial, rheological, and physicochemical properties of sago starch films filled with nanorod-rich zinc oxide. **J Food Eng.** 2012;13(4):511–519.
- NAKAMURA, K., OGASAWARA, Y., ENDOU, K., FUJİMORİ, S., KOYAMA, M., AND AKANO, H. (2010) Phenolic compounds responsible for the superoxide dismutase-like activity in high-brix apple vinegar, *J. Agric. Food Chem.* 58, 10124–10132.
- NASCIMENTO, M.S.N., SİLVA, CATANOZİ, M.P. and SİLVA, K.C., “Effects of different disinfection treatments on the natural microbiota of lettuce,” **J Food Prot**, vol.66, no. 9, pp. 1697-1700, Sep 2003

- NOGUEIRA, C., IGLESIAS, A., FEA, X. S, AND L ESTEVINHO, M.,
 “Commercial bee pollen with different geographical origins: a
 comprehensive approach,” **International Journal of Molecular
 Sciences**, vol. 13, no. 9, pp. 11173–11187, 2012.
- OLCZYK, P., KOPROWSKI, R., KAŻMIERCZAK, J., MENCNER, L.,
 WOJTYCZKA, R., STOJKO, J., KOMOSIŃSKA-VASSEV, K.
 (2016). Bee pollen as a promising agent in the burn wounds
 treatment. **Evidence-Based Complementary and Alternative
 Medicine**, 2016.
- OLIVEIRA, K. C., MORIYA, M., AZEDO, R. A., ALMEIDA-MURADIAN, L.
 B. D., TEIXEIRA, E. W., ALVES, M. L., & MORETI, A. C. (2009).
 Relationship between botanical origin and antioxidants vitamins of
 bee-collected pollen. **Química Nova**, 32(5), 1099-1102.
- ORDÓÑEZ, J.L., CALLEJÓN, J.L., MORALES, R.M., GARCÍA-PARRILLA,
 M.L. M.C., A Survey Of Biogenic Amines In Vinegars, **Food
 Chemistry**, 2013, 141(3), 2713-2719
- ORŠOLIĆ, N., (2012). Bee venom in cancer therapy. **Cancer and Metastasis
 Reviews** 31(1-2): 173-194
- ÖZMEN, N., ALKIN, E., 2006. Balın antimikrobiyel özellikleri ve insan sağlığı
 üzerine etkileri. **Uludağ Arıcılık Dergisi** 2006(4): 155-160
- PALASKA, I., GAGARİ, E., & THEOHARIDES, T. C. (2016). The effects of P.
 gingivalis and E. coli LPS on the expression of proinflammatory
 mediators in human mast cells and their relevance to periodontal
 disease. **Journal of biological regulators and homeostatic
 agents**, 30(3), 655-664.
- Park, M.H., Choi, M.S., Kwak, D.H., Oh, K.W., Yoon, D.Y., Han, S.B., Song,
 H.S., Song, M.J., Hong, J.T., (2011). Anti-cancer effect of bee venom
 in prostate cancer cells through activation of caspase pathway via
 inactivation of NF-κB. **The Prostate** 71(8): 801-812.
- PASCOAL, A., RODRIGUES, S., TEIXEIRA, A., FEAS, X., AND
 ESTEVINHO, L. M., “Biological activities of commercial bee

pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory,” **Food and Chemical Toxicology**, vol. 63, pp. 233–239, 2014.

PEÏGHAMBARDOUST, S.J., PEÏGHAMBARDOUST, S.H., MOHAMMADZADEH POURNASÏR, N., et al. Properties of active starch-based films incorporating a combination of Ag, ZnO and CuO nanoparticles for potential use in food packaging applications. **Food Packag Shelf Life**.2019;22:100420.

PEZ-CABALLERO ME, G., MEZ-GUILLÉN, M.C., PÉREZ-MATEOS, M., MONTERO, P. 2005. A chitosan- gelatin blend as a coating for fish patties. **Food Hydrocolloid.**, 19, 303-311.

PUDZIUVELYTE, L., MARKSA, M., SOSNOWSKA, K., WINNICKA, K., MORKUNIENE, R., & BERNATONIENE, J. (2020). Freeze-drying technique for microencapsulation of *Elsholtzia ciliata* ethanolic extract using different coating materials. **Molecules**, 25(9), 2237

PULÍCHARLA, R., MARQUES, C., DAS, R.K., ROUSSÌ, T., BRA, S.K. Encapsulation And Release Studies Of Strawberry Polyphenols In Biodegradable Chitosan Nanoformulation, **International Journal Of Biological Macromolecules**, Volume 88, July 2016, Pages 171-178

PUSPARATHA, S. B., DEVÌ, R. G., & JYOTHÌPRIYA, A. (2019). Effects of apple cider vinegar on diabetic and obese patients. **Drug Invention Today**, 12(5).

RÉ, M.I. Drying Technology Microencapsulation By Spray Drying.,**Dry. Technol.** 16, 1195–1236 (1998).

REBOREDO-RODRÍGUEZ, P., GONZALEZ-BARREIRO, C., CANCHO-GRANDE, B., FORBES-HERNANDEZ, T.Y., GASPARRINÌ, M., AFRINA, S., CIANCIOSÌ, D., CARRASCO-PANCORBO, A., Simal-GANDARA, J., GIAMPÌERIA, F., BATTÌNO, M. (2018) Characterization of phenolic extracts from Brava extra virgin olive oils and their cytotoxic effects on MCF-7 breast cancer cell. **Food Chem Toxicol** 119:73–85

- REINECCIUS, G. A. Liposomes for Controlled Release in the Food Industry. in 113–131 (1995).
- REN, L., YAN, X.O, ZHOU, J., et al. Influence of chitosan concentration on mechanical and barrier properties of corn starch/chitosan films. **Int J BiolMacromol.** 2017; 105: 1636–1643.
- REN, M., WANG, X., TIAN, C., LI, X., ZHANG, B., SONG, X., AND ZHANG, J. (2016) Characterization of organic acids and phenolic compounds of cereal vinegars and fruit vinegars in **China, J. Food Process. Preserv.** 1–8.
- REZVANKHAH, A., EMAM-DJOMEH, Z., ASKARI, G. Encapsulation and delivery of bioactive compounds using spray and freeze-drying techniques: A review. **Dry. Technol.** 2019;38:235–258. doi: 10.1080/07373937.2019.1653906
- RINAUDO, M. 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Prog. Polym. Sci.**, 31, 603-632.
- ROCÍO FERNÁNDEZ-PÉREZ, P; CARMEN TORRES, C.; SANZ, S.; RUIZ-LARREA, F., Strain typing of acetic acid bacteria responsible for vinegar production by the submerged elaboration method **Microbiology**, 2010, 27(8), 973-978
- ROULSTON, T. H. AND CANE, J. H., “Pollen nutritional content and digestibility for animals,” **Plant Systematics and Evolution**, vol. 222, no. 1–4, pp. 187–209, 2000.
- SAKANAKA, S., ISHIIHARA, Y., 2008. Comparison of antioxidant properties of persimmon vinegar and some other commercial vinegars in radical-scavenging assays and on lipid oxidation tuna homogenates. **Food Chemistry** 107, 739–744.
- SAMOCHOWIEC, L. AND WOJCICKI, J., “Effect of pollen on serum and liver lipids in rats fed on a high-lipid diet,” **Herba Polonica**, vol. 27, p. 333, 1981.

- SANTIAGO, L. G. & CASTRO, G. R. Novel Technologies for the encapsulation of bioactive food compounds. **Current Opinion in Food Science** vol. 7,78–85(2016).
- SAQĪB, A. (2017). Antimicrobial activity of apple cider vinegar. **Mapana Journal of sciences**, 16(2), 11-15.
- SCHMIDT, J.O., (1997). Chemical composition and application: Bee Products: Properties, Applications, and Apitherapy, Edited by Mizrahi, A., Lensky, Y., **Springer Science & Business Media** 15-27 p.
- SEKĪ, T., MORĪMURA, S., SHĪGEMATSU, T., MAEDA, H., KĪDA, K. Antitumor activity of rice-shochu post-distillation slurry and vinegar produced from the post-distillation slurry via oral administration in a mouse model. **Biofactors** 2004(22),103-5
- SHOSKES, D. A. AND MANĪCKAM, K., “Herbal and complementary medicine in chronic prostatitis,” **World Journal of Urology**, vol. 21, no. 2, pp. 108–113, 2003.
- SHUBHARANĪ, R., ROOPA, P., AND SĪVARAM, V., “Pollen morphology of selected bee forage plants”, **Global Journal of Bio-Science and Biotechnology**, vol. 2, no. 1, pp. 82–90, 2013.
- SĪLVA, T.M.S., CĀMARA, C.A., LĪNS, A.C., BARBOSA-FĪLHO, J.M., SĪLVA, E.M.S., FREĪTAS, B.M., SANTOS, F.A.R., (2006). Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and Analysis** 19, 507–511
- SĪNGH, T.P., CHATLĪ, M.K., SAHOO, J. (2015). Development of chitosan based edible films: process optimization using response surface methodology, **J Food Sci Technol**, 52(5): 2530–2543, <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1318-6>.
- SOARES DE ARRUDA, V.A., SANTOS PEREĪRA, A.A., ESTEVĪNHO, L.M., DE ALMEĪDA-MURADĪAN, L.B., Presence and stability of B complex vitamins in bee pollen using different storage conditions, **Food Chem. Toxicol.** 51 (2013) 143–148.

- SOMOGYI, A., ROSTA, K., PUSZTAI, P., TULASSAY Z. AND NAGY, G.,
Antioxidant measurements, **Physiol. Meas.**, 28, R41–R55, 2007.
- SORUCU, A. (2019). ARI ÜRÜNLERİ ve APİTERAPİ. **Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni**, 10(1), 1-15.
- ŠTURM, L., OSOJNIK ČRNIVEC, I.G., ISTENIČ, K., OTA, A., MEGUŠAR, P.,
SLUKAN, A., HUMAR, M., LEVIĆ, S., NEDOVIĆ, V., KOPINČ, R.,
et al. Encapsulation of non-dewaxed propolis by freeze-drying and
spray-drying using gum Arabic, maltodextrin and inulin as coating
materials. **Food Bioprod. Process.** 2019;116:196–211. doi:
10.1016/j.fbp.2019.05.008.
- SZCZÊSNA, T. (2006). Protein content and amino acid composition of bee-
collected pollen from selected botanical origins. **Journal of
Apicultural Science**, 50(2), 81-90.
- WANG, W., HU, J., AND CHENG, J., “Biological effect of pollen from beehives
radioprotective effect on hematopoietic tissues of irradiated mice,” in
**Proceedings of the 31st International Apicultural Congress
Apimondia**, p. 176, Warsaw, Poland, 1987.
- WOJCICKI, J., “The effect of pollen extracts on the endocrine function in
rabbits,” **Herba Polonica**, vol. 27, p. 151, 1991.
- YAGNIK, D., SERAFIN, V., & SHAH, A. J. (2018). Antimicrobial activity of
apple cider vinegar against Escherichia coli, Staphylococcus aureus
and Candida albicans; downregulating cytokine and microbial protein
expression. **Scientific reports**, 8(1), 1-12.
- YASUMOTO, R., KAWANISHI, H., TSUJINO, T. Et Al., “Clinical evalu-
ation of long-term treatment using cernitin pollen extract in patients with
benign prostatic hyperplasia,” **Clinical Therapeutics**, vol. 17, no. 1,
pp. 82–87, 1995
- YEN, G. C., & DUH, P. D. Z 1994.. Scavenging effect of methanolic extracts of
peanut hulls on free-radical and active-oxygen species. **Journal of
Agricultural and Food Chemistry**, 42, 630-632.

YOUNGS, R. A. Spray drying encapsulation-today's view. **Food Flavor Ingred. Proc. Pack.** 8, 31–33 (1986).

ZIVANOVIĆ, S., CHI, S., DRAUGHON, A.F. 2005. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. **J. Food Sci.**, 70(1), 45-51.

ZONG, Q.S., WU, J.Y., (2014). A new approach to the synthesis of royal jelly acid. **Chemistry of Natural Compounds** 50(3): 399-401

ELEKTRONİK KAYNAKLAR

Apple Cider Vinegar Relieves Inflammation, Fights Bacteria. n.d. Consultant 360. Available from: <https://www.consultant360.com/exclusives/apple-cider-vinegar-relieves-inflammation-fights-bacteria>. [Last accessed on 2021 May 25].

Reader's Digest Editors. n.d. 15 Ways Apple Cider Vinegar Benefits Your Health. Reader's Digest. Available from: <https://www.rd.com/health/wellness/apple-cider-vinegar-benefits>. [Last accessed on 2021 May 25].

TKDK, 2016. Arıcılık Sektör Toplantısı Sonuç Raporu 2016. Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumu, TKDK <https://www.tkd.gov.tr/Content/File/Yayin/Rapor/Arıcılık2.pdf>, Erişim: 11.06.2021.

TOB, 2016. Arı Yetiştiriciliği. Tarım ve Orman Bakanlığı, TOB <http://www.tarim.gov.tr/HAYGEM/Belgeler/Hayvancılık/KüçükEvcilYetiştiriciliği/Arıcılık/ArıYetiştiriciliği.docx>

TUİK, 2020. Dünya Arıcılık FAO verileri, <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/arıcılık/Belgeler/istatistik/2018%20YILI%20DÜNYA%20ARICILIK%20VERİLERİ%2002.03.2020.pdf>

TEZLER

BAYRAK, N., 2005. ‘‘Arı ÜRÜNlerinin (Bal, Arı Sütü, Polen Ve Propolis) Mikrofloralarının Ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi’’, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniv. Fbe, Elazığ.

BURUCU, V. 2017. “Kastamonu İli Azdavay İlçesinde Arıcılık Faaliyetleri ve Bal Üretimi”. (Yüksek Lisans Tezi), G.O.P.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarım Ekonomisi Anabilim Dalı, 82 sayfa, Tokat.

DiĞER KAYNAKLAR

TSE 3036 Bal Standardı (2010), 19 Ocak 2010 Kabul Tarihli Bal Standardı, Ankara.

VOLKAN BURUCU, “Arıcılık Raporu”, TEPGE YAYIN NO: 318 ISBN: 978-605-7599-45-2, TEPGE yayınları, Ekim 2020.

ÖZGEÇMİŞ

- **İsim / Soyisim** : Buse KERESTECİ

Öğrenim Durumu

- 2012, Edirne Anadolu Öğretmen Lisesi
- 2018, Yeditepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği (İngilizce)
- 2021, İstanbul Aydın Üniv Gıda Müh. Tezli Yüksek Lisans Programı

İş Tecrübeleri

- 2017-Mey Üretim Mühendisi

Yabancı Dil ve Düzeyi

- İngilizce – Advanced
- Almanca– Intermediate