

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROPOLİS VE BAL İÇERİKLİ LOLİPOP FORMÜLASYONUNUN
GELİŞTİRİLMESİ VE BİYOLOJİK ETKİNLİKLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Zeynep DEMİRKAN

ARI VE ARI ÜRÜNLERİ ANA BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Bülent KAYA

BİNGÖL-2025



T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROPOLİS VE BAL İÇERİKLİ LOLİPOP FORMÜLASYONUNUN
GELİŞTİRİLMESİ VE BİYOLOJİK ETKİNLİKLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Doç. Dr. Bülent KAYA danışmanlığında, Zeynep DEMİRKAN tarafından hazırlanan bu çalışma 12/06/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Arı ve Arı Ürünleri Anabilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak **oy birliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof.Dr.Serpil OĞUZTÜZÜN	İmza	:
Üye	: Doç.Dr.Bülent KAYA	İmza	:
Üye	: Doç.Dr.Mehlika BENLİ	İmza	:
Üye	: Doç.Dr.Fatma CAF	İmza	:
Üye	: Dr.Ögr.Üyesi Duygu Nur ÇOBANOĞLU	İmza	:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun// tarih ve/ nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zafer ŞİAR
Enstitü Müdürü

Bu çalışma YÖK 100/2000 Öncelikli Alan Doktora Programı kapsamında desteklenmiştir.

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirışlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince meslek sevgisi ve sabrıyla bana örnek olan, her konuda bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, değerleri ve fikirleri ile öncülük eden, öğrencisi olduğum için onur ve mutluluk duyduğum saygıdeğer tez danışman hocam Doç. Dr. Bülent KAYA'ya, gerek tez çalışmalarım gerek proje çalışmalarımda çok değerli fikirleri ve önerileri ile destekte bulunan, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen saygıdeğer hocam Doç. Dr. Fatma CAF' a, tez çalışmamın her aşamasında desteğini esirgemeyen, deneyimlerini paylaşan tezime bilgi ve deneyimleriyle yön veren sevgili hocalarım Doç. Dr. Mehlika BENLİ ve Dr. Öğr. Üyesi Duygu Nur ÇOBANOĞLU' na, ilgisi, yönlendirmeleri ve nazik desteği bu süreci benim için daha verimli kılan Prof. Dr. Sibel DUMAN'a,

Bu tez sürecinde yanımda olan, bana ilham veren ve desteklerini esirgemeyen başta annem, babam ve tüm aileme en içten teşekkürlerimi sunuyorum. Hayat arkadaşım Burak DEMİRKAN ve kızım Derin Su DEMİRKAN; desteğiniz bu süreci benim için kolaylaştırdı, varlığınız için minnettarım. Laboratuvar içerisinde yapılan çalışmalarda bilgisini, tecrübesini her daim paylaşan, içten ve samimi tavrıyla örnek olan arkadaşlarım Arş. Gör. Büşra BILDIR ve Esra BALKİS' e, ve her daim yanımda olan sevgili arkadaşlarım Meral YANIK, Tuba YAVAŞ ve Sema URCAN' a gönülden teşekkür ederim. Varlığınız bu yolculuğu güçlendirdi.

Ayrıca süreç boyunca bursiyeri olduğum YÖK 100/2000 Burs Programı'na verdikleri destekten ötürü şükranlarımı iletmek isterim.

Zeynep DEMİRKAN

Bingöl-2025

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	ix
ÖZET.....	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. Propolis.....	4
2.2. Propolisin Fiziko-kimyasal Özellikleri.....	4
2.3. Propolisin Etkinlik Değerlendirmeleri	6
2.3.1. Antioksidan Etkinliği	6
2.3.2. Antibakteriyal Etkinliği	6
2.3.3. Antifungal Etkinliği.....	7
2.3.4. Antiinflamatuvar Aktivitesi.....	8
2.3.5. Antikarsinojenik Aktivitesi	9
2.3.6. Propolis ve Yara İyileşmesi.....	9
2.4. Propolis ve Ağız Sağlığı	10
2.5. Propolisin Kullanımı	12
2.6. Oral Mikrobiyal Flora.....	13
2.6.1. Oral Mikrobiyotanın Sebep Olduğu Bazı Oral Hastalıklar	17
2.7. Şekerlemeler	21
2.7.1. İzomalt.....	22

3. MATERYAL VE YÖNTEM	24
3.1. Kullanılan Mikroorganizmalar, Hücre Hatları ve Propolis	24
3.2. Kullanılan Kimyasal ve Hammaddeler	24
3.3. Propolis Ekstraksiyonu	25
3.4. Fenolik Bileşenlerinin LC-MS/MS Orbitrap Kütle Spektrometresi ile Analizi	26
3.4.1. Sıvı Kromatografisi-Yüksek Çözünürlük Kütle Spektrometresi Cihazı	26
3.4.2. Kromatografi ve Yüksek Çözünürlüklü MS Koşulları	27
3.5. Antioksidan Analizler	28
3.5.1. Toplam Fenolik Madde İçeriği	28
3.5.2. Toplam Flavonoid Madde İçeriği	29
3.5.3. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite	31
3.5.4. Metal Şelatlama Aktivitesi	32
3.5.5. Toplam Antioksidan Kapasitesi	33
3.6. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri	35
3.6.1. Disk Difüzyon Yöntemiyle Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesi	36
3.6.2. Minimal İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) Belirlenmesi	37
3.6.3. Minimal Bakterisidal Konsantrasyonunun (MBC) Belirlenmesi	37
3.7. Sitotoksik Çalışmaları	38
3.7.1. Propolis ve Model Ürünün Fibroblast Hücrelerine Sitotoksik Etkisi	38
3.8. Model Ürün (Sert Şekerleme)	42
3.8.1. Model Ürün Formülasyonları	42
3.8.2. Model Ürün Analizleri	43
3.9. İstatistiksel Değerlendirme	49
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	51
4.1. Fenolik Bileşenlerinin LC-MS/MS Orbitrap Kütle Spektrometresi ile Analizi	51
4.2. Antioksidan Analizler	58
4.2.1. Toplam Fenolik Madde İçeriği	58

4.2.2. Toplam Flavonoid Madde İçeriği.....	60
4.2.3. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite.....	61
4.2.4. Metal Şelatlama Aktivitesi	62
4.2.5. Toplam Antioksidan Kapasitesi	64
4.3. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri.....	64
4.3.1. Disk Difüzyon Yöntemiyle Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesi.....	65
4.3.2. MİK ve MBC ile Antimikrobiyal Aktivite Değerlendirmesi	79
4.4. Sitoksite	91
4.4.1. Propolisin Fibroblast Hücrelerine Sitotoksik Etkisi.....	91
4.4.2. Model Ürünün Fibroblast Hücrelerine Sitotoksik Etkisi.....	94
4.5. Model Ürün Analizleri	96
4.5.1. HMF Analizi.....	96
4.5.2. pH Değeri	97
4.5.3. Renk Analizi.....	99
4.5.4. Titre Edilebilir Asitlik Tayini.....	101
4.5.5. Suda Çözünür Kuru Madde Tayini	102
4.5.6. Enzimatik Olmayan Esmerleşme Analizi.....	104
4.5.7. Kuru Madde Analizi.....	106
4.5.8. Camsı Geçiş Sıcaklığı	107
4.5.9. Tekstür Profili Analizi.....	112
4.5.10. Raf Ömrü Analizleri.....	114
4.5.11. Model Üründe Antioksidan Analizler	116
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	120
KAYNAKLAR	121
EKLER.....	156

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil	: DPPH solüsyonu
2,3-Bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid	: XTT
°	: Derece
°C	: Santigrat derece
%	: Yüzde
AlCl ₃	: Alüminyum klorür
BHT	: Butillenmiş hidroksi tolüen
Ca	: Kalsiyum
CFU/mL	: Koloni oluşturan birim/ mililitre
cm	: Santimetre
C ₂ H ₅ OH	: Etil alkol
CH ₃ OH	: Metil alkol
C ₂₀ H ₁₂ N ₄ Na ₂ O ₆ S ₂	: Ferrosin solüsyonu
C ₁₁ H ₁₆ O ₂	: BHA
C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	: EDTA
C ₂₉ H ₅₀ O ₂	: α-tokoferol
Cu	: Bakır
C ₇ H ₆ O ₅	: Gallik asit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Media
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
dk	: Dakika
FBS	: Fetal Bovine Serum
Fe	: Demir
FeCl ₂	: Demir (II) klorür
FCR	: Folin-ciocalteu reaktifi
GRAS	: Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen
Gallik Asit Eşleneği	: GAE

H ₂ SO ₄	: Sulfürik asit
HDF	: İnsan dermal fibroblastları
HMF	: (5-hidroksimetilfurfural)
HGF	: İnsan dişeti fibroblastları
I	: İyot
K	: Potasyum
Kuersetin Eşleniği	: KE
Mg	: Magnezyum
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
Mn	: Manganez
Na	: Sodyum
NaOH	: Sodyum hidroksit
NaH ₂ PO ₄	: Sodyum fosfat
Na ₂ CO ₃	: Sodyum karbonat
NaNO ₂	: Sodyum Nitrit
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ H ₂ O	: Amonyum molibdat
Od	: Optik Dansite
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı
RAS	: Aftöz stomatit
TSE	: Türk Standartları Enstitüsü
UV-Vis	: UV-Görünür Spektrofotometri
Zn	: Çinko

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Diş çürüğüne sebep olan etmenler	18
Şekil 2.2. İzomalt molekülleri (Ergün ve Tekgül, 2021).	23
Şekil 3.3. Propolis Ekstraksiyonun Basamakları	25
Şekil 3.4. Elüsyonda takip eden gradiyent koşulları	27
Şekil 3.5. Toplam fenolik madde içeriğinin deney basamakları	28
Şekil 3.6. Gallik asit standardı ile hazırlanan standart kalibrasyon eğrisi	29
Şekil 3.7. Toplam flavonoid madde deney basamakları	30
Şekil 3.8. Kuersetin standardı ile hazırlanan standart kalibrasyon eğrisi.....	30
Şekil 3.9. DPPH radikal süpürücü aktivite deney basamakları.....	31
Şekil 3.10. Troloks standardı ile hazırlanan standart kalibrasyon eğrisi.....	32
Şekil 3.11. Metal şelatlama aktivitesi deney basamakları.....	33
Şekil 3.12. Toplam antioksidan kapasitesi deney basamakları	34
Şekil 3.13. α - tokoferol standardı ile hazırlanan standart kalibrasyon eğrisi	34
Şekil 3.14. HDF (a) ve HGF (b) hücre hatlarının mikroskop görüntüleri (x10).....	38
Şekil 3.15. Model ürünlerin oluşum basamakları	42
Şekil 3.16. Antioksidan analizler öncesi hazırlık basamakları	43
Şekil 3.17. Şeker analizleri için kullanılacak çözeltilerin hazırlanma basamakları	44
Şekil 4.18. Propolisin <i>S. mutans</i> ' a karşı zon çapı	67
Şekil 4.19. Propolisin <i>S. sanguinis</i> ' e karşı zon çapı	68
Şekil 4.20. Propolisin <i>P. gingivalis</i> ' e karşı zon çapı	69
Şekil 4.21. Propolisin <i>L. acidophilus</i> ' a karşı zon çapı	70
Şekil 4.22. Propolisin <i>S. aureus</i> ' a karşı zon çapı	71
Şekil 4.23. Propolisin <i>E.coli</i> ' ye karşı zon çapı.	73
Şekil 4.24. Propolisin <i>C. albicans</i> ' a karşı zon çapı.....	75
Şekil 4.25. Propolisin <i>S. cerevisiae</i> ' e karşı zon çapı.....	75
Şekil 4.26. Şekerlerin mikroorganizmalara karşı göstermiş zon çapı görüntüleri	78
Şekil 4.27. Propolis ekstraktlarının mikroorganizmalara karşı MBC görüntüleri	83
Şekil 4.28. Kontrol şekerlerinin çalışılan mikroorganizmalara karşı MBC görüntüleri ...	86
Şekil 4.29. %2,5 Propolisli şekerlerin mikroorganizmalara karşı MBC görüntüleri	88

Şekil 4.30. %7,5 Propolisli şekerlerin mikroorganizmalara karşı MBC görüntüleri	89
Şekil 4.31. %12,5 Propolisli şekerlerin mikroorganizmalara karşı MBC görüntüleri	91
Şekil 4.32. Propolis ekstraktlarının HDF hücre hattında canlılık üzerine etkisi	92
Şekil 4.33. Propolis ekstraktlarının HGF hücre hattında canlılık üzerine etkisi	92
Şekil 4.34. Propolisli şekerlerin HDF hücre canlılığına etkisi	94
Şekil 4.35. Propolisli şekerlerin HGF hücre canlılığına etkisi	95
Şekil 4.36. Şekerleme örneklerinin zamanla suda çözünür kuru madde tayini	104
Şekil 4.37. Şekerleme örneklerinin zamanla enzimatik olmayan esmerleşme verileri ...	105
Şekil 4.38. %2,5 propolisli şeker örneğinin DSC grafiği	108
Şekil 4.39. %7,5 propolisli şeker örneğinin DSC grafiği	109
Şekil 4.40. % 12,5 propolisli şeker örneğinin DSC grafiği	109
Şekil 4.41. Kontrol şeker örneğinin DSC grafiği	110
Şekil 4.42. Şeker örneklerinin toplam fenolik (a) ve flavonoid (b) miktarları	118
Şekil 4.43. Şeker örneklerinin DPPH serbest radikal giderim yüzdeleri	118

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2.1. İnsan oral mikrobiyaya (How vd., 2016).....	14
Tablo 3.2. Model ürün formülasyonları	42
Tablo 4.3. Propolisin LC-MS/MS ile fenolik içerikleri	53
Tablo 4.4. Propolisin LC-MS/MS analizi ile belirlenen fenolik bileşikleri.....	57
Tablo 4.5. Propolis Ekstraktının Antioksidan Aktivite Sonuçları.....	64
Tablo 4.6. Propolisin mikroorganizmalara karşı göstermiş oldukları zon çapları	76
Tablo 4.7. Şekerlerin mikroorganizmalara karşı göstermiş oldukları zon çapları	78
Tablo 4.8. MİK değerlerinin mikroorganizmalar bazında karşılaştırılması.....	80
Tablo 4.9. MBC değerlerinin mikroorganizmalar bazında karşılaştırılması.....	81
Tablo 4.10. Şeker örneklerinin pH analizi verileri.....	98
Tablo 4.11. Şeker örneklerinin renk analizi sonuçları	99
Tablo 4.12. Şeker örneklerinin titre edilebilir asitlik sonuçları.....	101
Tablo 4.13. Şekerleme örneklerinin zamanla suda çözünür kuru madde (%)	103
Tablo 4.14. Şekerleme örneklerinin zamanla enzimatik olmayan esmerleşme verileri..	105
Tablo 4.15. Şekerleme örneklerinin kuru madde miktarları	107
Tablo 4.16. Şekerleme örneklerinin tekstür analizi verileri	113
Tablo 4.17. Şekerleme örneklerinin raf ömrü analiz sonuçları	114
Tablo 4.18. Şeker örneklerinin antioksidan analiz sonuçları	116

PROPOLİS VE BAL İÇERİKLİ LOLİPOP FORMÜLASYONUNUN GELİŞTİRİLMESİ VE BİYOLOJİK ETKİNLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Bu tez çalışmasında, bal ve propolis fonksiyonel özelliklerinden yararlanılarak propolis içeren fonksiyonel şeker formülasyonları geliştirilmiş; bu formülasyonların biyolojik aktiviteleri ile fizyokimyasal özellikleri değerlendirilmiştir. Kullanılan propolisin %70'lik etil alkol ekstraktı üzerinden yapılan analizler sonucunda; toplam fenolik içeriği $497,5 \pm 0,83$ mg GAE/g, toplam flavonoid içeriği $389,44 \pm 1,92$ mg KE/g kuru ekstrakt olarak belirlenmiştir. Antioksidan kapasite analizlerinde, DPPH radikal süpürme aktivitesi $\%84,08 \pm 0,08$ inhibisyon oranı ile yüksek bir etki göstermiştir. Metal şelatlama kapasitesi $\%38,11 \pm 0,9$, toplam antioksidan kapasitesi ise $336,96 \pm 3,2$ mg α -tokoferol eşdeğeri/g olarak saptanmıştır.

Ayrıca, propolis ve propolisli şeker formülasyonlarının antimikrobiyal etkileri de çeşitli mikroorganizmalar (*S. mutans*, *S. sanguinis*, *P. gingivalis*, *S. aureus*, *E. coli*, *L. acidophilus*, *C. albicans* ve *S. cerevisiae*) üzerinde değerlendirilmiştir. Yapılan analizlerde, patojen mikroorganizmalar üzerinde doza bağlı inhibisyon etkisi gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, propolisli şekerlerin yalnızca fonksiyonel ve antioksidan özelliklere değil, aynı zamanda güçlü bir antimikrobiyal potansiyele de sahip olduğunu göstermektedir.

Formülasyonlar arasında, %12,5 propolis içeren şeker örneği; yüksek antioksidan kapasitesi, mikrobiyal inhibisyon etkisi, pH stabilitesi ve düşük asitlik özellikleriyle en güçlü biyolojik aktiviteyi göstermiştir. Renk ve kuru madde analizleri de bu formülasyonun en doğal ve yoğun yapıya sahip olduğunu ortaya koymuştur. Diğer yandan, %7,5 propolis içeren şekerin termal stabilite açısından daha dengeli bir erime profiline sahip olduğu ve üretim açısından optimum formülasyon olarak değerlendirilebileceği belirlenmiştir. Genel olarak, %7,5 ve %12,5 oranında propolis içeren fonksiyonel şekerlerin hem biyolojik etkinlik hem de formülasyon kararlılığı açısından en uygun yapılar olduğu saptanmıştır. Bu bulgular, propolisin doğrudan tüketilebilecek fonksiyonel bir şeker formuna entegre edilmesinin mümkün olduğunu göstermekte ve özellikle çocuklara yönelik sağlıklı, ulaşılabilir bir alternatif ürün geliştirilmesine katkı sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Propolis, Apiterapi, İzomalt, Sert Şekerleme.

DEVELOPMENT OF PROPOLIS AND HONEY CONTENTS LOLLIPOP FORMULATION AND EVALUATION OF ITS BIOLOGICAL EFFECTIVENESS

ABSTRACT

In this thesis study, functional candy formulations containing propolis were developed by utilizing the functional properties of honey and propolis, and their biological activities and physicochemical properties were evaluated. Analyses conducted on the %70 ethanol extract of propolis showed that the total phenolic content was 497.5 ± 0.83 mg GAE/g, and the total flavonoid content was 389.44 ± 1.92 mg KE/g dry extract. In antioxidant capacity analyses, the DPPH radical scavenging activity was determined to be 84.08 ± 0.08 , indicating a high antioxidant effect. The metal chelating activity was found to be 38.11 ± 0.9 , and the total antioxidant capacity was calculated as 336.96 ± 3.2 mg α -tocopherol equivalent/g.

In addition, the antimicrobial effects of propolis and propolis-enriched candy formulations were evaluated against various microorganisms (*S. mutans*, *S. sanguinis*, *P. gingivalis*, *S. aureus*, *E. coli*, *L. acidophilus*, *C. albicans*, and *S. cerevisiae*). The analyses demonstrated a dose-dependent inhibition effect on pathogenic microorganisms. These results show that propolis-based candies not only offer functional and antioxidant benefits but also exhibit significant antimicrobial potential.

Among the formulations, the candy containing %12.5 propolis exhibited the highest biological activity, with strong antioxidant capacity, microbial inhibition, pH stability, and low acidity. Color and dry matter analyses supported that this formulation had the most natural and concentrated structure. On the other hand, the %7.5 propolis-containing candy showed a more balanced thermal melting profile and was considered the optimum formulation in terms of production. Overall, both %7.5 and %12.5 propolis-enriched functional candies were found to be the most suitable in terms of biological activity and formulation stability. These findings indicate that propolis can be effectively incorporated into a directly consumable functional candy form and offers a healthy and accessible product alternative, especially for children.

Keywords: Propolis, Apitherapy, Isomalt, Hard Candy.

1. GİRİŞ

Apiterapi, "Apis" ve "terapi" kelimelerinin birleşiminden türetilmiş olup, arı ürünlerinin yalnızca oral yolla değil, aynı zamanda subkutan ve intramüsküler yollarla da uygulanmasını içeren bir tedavi yöntemidir. Bu uygulama; bal, polen, arı sütü, bal mumu, arı zehri ve propolis gibi arı ürünlerinin çeşitli hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde kullanılmasını ifade etmektedir (Atayoğlu, 2019; Özdemir vd., 2021). Bal, arı ekmeği, propolis, polen, apılarnil, arı sütü ve bal mumu arıların ürettiği çeşitli doğal ürünleridir (Arslan ve Kızıltan, 2024). Bilimsel araştırmalar, arı ürünlerinin antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antitümör ve antiviral gibi sağlık açısından faydalı birçok biyolojik özelliğe sahip olduğunu ortaya koymuştur (Vazquez-Revuelta ve Madrigal-Burgaleta, 2018).

Türk Standartları Enstitüsü'ne (TSE) göre bal, çiçeklerin ya da bitkilerin diğer canlı kısımlarında bulunan nektarın bal arıları tarafından toplanması, vücutlarında bileşimlerinin değiştirilmesi, petek gözlerine depo edilmesi ve burada olgunlaşması sonucunda meydana gelen bir üründür (Ulusoy, 2012). Dünya'nın en eski tıp literatürlerinde balın tıbbi önemi belgelenmiş ve antik çağlardan beri yara iyileştirme etkisinin yanı sıra antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Mandal ve Mandal, 2011). Balın enerji değerinin yüksek ve sindiriminin kolay olması sebebiyle başta çocuklar, sporcular ve yaşlılar olmak üzere tüm bireylerin beslenmesinde yer almaktadır (Korkmaz, 2011).

Propolis, bal arılarının ağaç tomurcuklarından, bitki nektarlarından ve diğer botanik kaynaklardan topladıkları, kovani dış etmenlere karşı koruyan reçinemsi, açık sarıdan koyu kahverengiye kadar farklı renkte olan arı ürünüdür (Parolia vd., 2010). Arıların salgıladığı maddeler ile bitki özlerinin bir çeşit karışımı olan propolisi arılar savunma ve korunma amacıyla ürettikleri bilinmektedir (Santos vd., 2020). Propolis; %50-%70 reçine, %30-%50 yağ ve balmumu, %5-%10 polen ile amino asitler, mineraller, şekerler, B, C ve E vitaminleri, flavonoidler, fenol ve aromatik bileşikler içermektedir (Ahangari vd., 2018). Propolisin botanik ve coğrafi kökenine göre biyoaktif içeriği değişkenlik

göstermekle birlikte antioksidan, antiinflamatuvar, antikanser ve antimikrobiyal etkileriyle ön plana çıkmaktadır. Ayrıca propolis önemli hücresel süreçlerin düzenlenmesinde rol alan çok sayıda aktif bileşiklerince de zengindir. Propolis üzerine yapılan çalışmalar, bu doğal bileşiğin kanser hücrelerinin proliferasyonunu, anjiyogenezini ve metastazını engelleyebildiğini; apoptozu indükleyebildiğini ve tümör mikroçevresi ile çoklu ilaç direnci üzerinde etkili olabildiğini ortaya koymuştur (Forma ve Bryś, 2021; Šuran vd., 2021). Yunan ve Romen doktorlar propolisin deri ve mukozal yaraların tedavisinde, antiseptik ve iyileştirici bir madde olarak kullanıldığını bildirmişlerdir (Sforzin ve Bankova, 2011). Propolis diş macunlarında, diş çürümelerinin önüne geçmek ve diş etlerinde meydana gelen iltihabı tedavi etmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Patel, 2016). Propolis içeren gargara ve diş macunları, diş eti iltihabı ve periodontit patojenlerinin büyümesini durdurduğundan, sadece koruyucu değil aynı zamanda terapötik ajan olarak tanımlanmaktadır (Więckiewicz vd., 2013).

Ağız, besinler açısından zengin içeriği, 35–36 °C sıcaklık ve 6,75–7,25 pH aralığıyla bakterilerin çeşitli bölgelerde koloni oluşturmalarına elverişli bir ortam sağlamaktadır (Jenkinson ve Lappin-Scott, 2001; Marsh, 2003). Ağız florası, çürükler ve periodontal hastalıklara neden olabilen bakteriler bakımından oldukça zengindir (Socransky ve Haffajee, 2005; Seneviratne vd., 2011).

Diş çürüklüğü oral flora içerisinde karyojenik bakterilerin diş yüzeyindeki karbonhidratları parçalayarak açığa çıkardıkları asitlerin diş sert dokularında meydana getirdikleri yıkımla oluşan multifaktöriyel ve bulaşıcı ağız hastalığı olarak tanımlanmaktadır (Özcan, 2016). Diş çürüğünün oluşumunda diş yapısı, karyojenik mikroorganizmalar, fermente olabilen karbonhidratlar ve zaman gibi dört ana faktör etkilidir (Nezir ve Özcan, 2024). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, diş çürüğü ve periodontal rahatsızlıklar en sık görülen hastalıklar arasındadır (Harris vd., 2004). Karbonhidrat ağırlıklı besinlerin sık tüketimi, bu besinlerin bakteriler tarafından fermente edilmesine ve sonuç olarak asit üretilmesine yol açarak diş çürüğünün oluşumunda temel bir etken teşkil eder. Asidojenik (asit üretebilen) ve asidürik (asit ortamında yaşayabilen) özelliklere sahip olan bakteriler, ağızda pH seviyesini düşürerek diş minesinin demineralizasyonuna dolayısıyla diş çürükleri oluşumuna zemin hazırlar (Ulusoy, 2010).

Diş çürüğü oluşumunda başlıca rol oynayan bakteri *Streptococcus mutans* olup, daha az oranda *Lactobacillus* türleri de bu süreçte etkili olmaktadır (Tanzer vd., 2001). *S. mutans*'ın virülansı, güçlü yapışma yeteneği, asit üretme özellikleri ve düşük pH'lı ortamlara karşı toleransı ile belirginleşir. Bu özellikler, onun diş çürüğü oluşumunda etkili bir patojen olmasına olanak sağlamaktadır (Banas, 2004).

Şeker yerine tatlandırıcı olarak kullanılan şeker alkollerini kan şekerini hemen yükseltmemesi ve diş çürüğüne neden olmaması gibi özellikleri yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Özdemir vd., 2014; Osama, 2016; Petković, 2019).

Apiterapide kullanılan arı ürünlerinin antibakteriyel, antioksidan, antiinflamatuvar ve antitümör etki gibi çok önemli etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Özellikle propolisin biyoaktif maddelerce zengin olması, antimikrobiyal etkinliklerin yüksek ve bağışıklık üzerindeki olumlu etkileri dikkat çekicidir. Sentetik ağız ürünlerinin toksik yan etkileri sebebiyle ağız hijyeni için bitki ve arı ürünleri kullanımına ilgi her geçen gün artmaktadır. Güvenilir ve doğal kaynaklardan elde edilen arı ürünlerinin kullanımının sağlık üzerine yararlı etkileri bulunmaktadır. Yüksek antimikrobiyal aktivite ve düşük toksisite gibi olumlu özellikleri göz önünde alındığında ağız içi patojenlerinin tedavisinde klasik tedavi yöntemleri yerine propolis içerikli ürünler tercih edilmelidir. Propolisin oral mikroorganizmalara karşı etkinlikleri, daha önceki çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bu bağlamda, propolisin etil alkol ekstraksiyonu yapılmıştır ve LC/MS-MS orbitrap analiziyle fenolik içerik tayini, antioksidan aktivite, antimikrobiyal etkinlik, sitotoksisite ve model ürün analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar propolisin gıda alanında ki potansiyelini daha iyi anlamamıza yardımcı olacaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Propolis

Propolis, işçi arıların bitkilerin çeşitli kısımlarından topladığı, farklı oranlarda reçine içeren, mum kıvamında, suda erimeyen ve oda sıcaklığında yarı katı formda bulunan keskin bir kokuya sahip arı ürünüdür. Arılar, baş bölgesinde bulunan bezlerden salgıladığı aktif enzimlerle birlikte poleni karıştırarak propolisi üretmektedir (Şahinler, 2000). Propolis, farklı bitki türlerinden arıların biriktirdiği reçineli maddeye atıfta bulunan “arı tutkalı” olarak da isimlendirilir. Propolis, Yunanca “pro” ve “polis” kelimelerinden türetilmiştir ve şehir ya da topluluğun savunulması anlamına gelmektedir (Castaldo ve Capasso, 2002).

Arılar kovanlarını fiziksel ve kimyasal tehlikelere karşı savunma, kovan içerisindeki çatlakları sıvama, kovan ağzını daraltarak yağmacı arıların girişini engelleme, zarar gören peteklerin tamir edilmesi, ölümlerin mumyalanması ve kovan iç sıcaklığını 35 °C civarında tutma gibi birçok amaçla bal arıları propolisi üretmektedir (Sohaimy ve Masry, 2014). Propolis içerdiği biyoaktif maddeler sayesinde yüksek antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antitumoral özellikler barındırmaktadır. Eski çağlardan beri vücudun enfeksiyonlara karşı savunmasında ve yaraları kapatarak tedavi etmekte doğal bir ilaç olarak propolis kullanılmaktadır (Ahn vd., 2007; Li vd., 2008; Aliyazıcıoğlu vd., 2013)

Her yıl ve her koloni için propolis üretim miktarı ortalama 10 g ile 300 g arasında değişiklik göstermektedir ve bu farklılık arının ırkına, iklim şartlarına, bitki florasına ve tuzaklama mekanizmalarına göre değişmektedir (M. P. Popova vd., 2009; Usman vd., 2016).

2.2. Propolisin Fiziko-kimyasal Özellikleri

Propolisin rengi, fiziksel ve kimyasal bileşimi elde edildiği kaynağa göre değişmektedir. Ham propolisin içeriğinde 300’den fazla bileşen tespit edilmiştir (Şahinler, 2000; Graikou

vd., 2016). Propolisin fiziksel yapısı sıcaklığa bağılı olarak değişiklik göstermektedir. 10 °C'nin altında sert ve kırılğan bir hale gelirken, -20 °C ve daha düşük sıcaklıklarda zamanla katılaşılarak kolayca toz haline gelebilir. Yaklaşık 80 °C'de kısmen eriyen propolis, 30-40 °C arasında ise yumuşak ve yapışkan bir kıvam almaktadır (Mizrahi ve Lensky, 2013).

Arıların propolis toplamak amacıyla en sık ziyaret ettikleri bitki kaynakları arasında kestane, dişbudak, kavak, huş, bazı erik türleri ve söğüt ağaçları yer almaktadır (Doğan ve Hayoğlu, 2014). Propolis bileşimi temelde yaklaşık %50 reçine, %30 balmumu, %10 uçucu yağ, %5 polen ve %5 diğer organik bileşenlerden oluşmaktadır. Ayrıca yapısında Mg, Ca, I, K, Na, Cu, Zn, Mn ve Fe gibi minerallerin yanı sıra B1, B2, B6, C ve E vitaminleri ile çeşitli yağ asitleri de bulunmaktadır (Gómez-Caravaca vd., 2006; Doğan ve Hayoğlu, 2014). Propolis, glukoz, fruktoz ve sukroz gibi bazı şekerler ile birlikte çeşitli enzimler ve amino asitleri de içermektedir (Mehmetoğlu vd., 2017). Polifenoller, fenolik asitler ve esterleri, fenolik aldehitler, ketonlar ve flavonoidler propolisin en önemli biyoaktif bileşenleridir (Castaldo ve Capasso, 2002). Propoliste yer alan başlıca flavonoid ve fenolik bileşikler arasında pinosembrin, asacetin, chrysin, rutin, luteolin, kaempferol, apigenin, myricetin, catechin, naringenin, galangin, quercetin, caffeic acid ve cinnamic acid bulunmaktadır. Ayrıca, elektroforez yöntemiyle yapılan analizlerde propolis ekstraktlarında resveratrol türevlerine de rastlanmıştır (Volpi, 2004).

Ham formda tüketilmesi önerilmeyen propolis, çeşitli ekstraksiyon yöntemleri ile işlenerek biyoyararlanımı artırılmış hale getirilir. Yaygın olarak kullanılan bu yöntemler arasında evaporasyon, liyofilizasyon, vakum distilasyonu ve membran konsantrasyonu yer almaktadır (Mello vd., 2010). Propolisin ekstraksiyonu ile elde edilen özütün fenolik madde miktarı ve bileşimi kullanılan yöntem ve çözücüye bağılı olarak değişiklik göstermektedir. Cunha ve ark. (2004) yaptığı bir çalışmada, altı farklı Brezilya propolisi değerlendirilmiş; en yüksek özüt verimi maserasyon yöntemiyle ve en zengin fenolik içerik ise %70 etanol kullanılarak elde edilmiştir (Cunha vd., 2004). Yapılan çalışmalar, etanolik ekstraktların su bazlı ekstraktlara kıyasla daha yüksek düzeyde fenolik asit ve diğer polar bileşenler içerdiğini göstermektedir (Pietta vd., 2002).

2.3. Propolisin Etkinlik Değerlendirmeleri

2.3.1. Antioksidan Etkinliği

Propolisin serbest radikalleri yakalama özelliği, antioksidan potansiyelinin hücre içi mekanizmalarda etkili olduğunu göstermektedir (Anjaly ve Tiku, 2018). Değerli bir arı ürünü olan propolisin yüksek antioksidan etkiye sahip olduğu antioksidatif etkiye bağlanmaktadır (Graikou vd., 2016). Propolisin diğer arı ürünlerine göre daha fazla fenolik madde içermesi antioksidan ve antiradikal etkinliklerini ortaya çıkarmaktadır (Viuda-Martos vd., 2008). Arı ürünleri arasında antioksidan aktiviteleri bakımından kıyas yapıldığı çalışmalarda propolisin diğer arı ürünlerine göre antioksidan aktivitesi daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Buratti vd., 2007; Mouhoubi-Tafnine vd., 2016). Propolis oksidatif stres ürünlerinin artışını azaltabilmektedir. Özellikle endojen antioksidan sistemindeki süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz ve katalaz (CAT) enzimlerinin etkinliğini arttırmaktadır (Park vd., 2002). Propolisin ana bileşeni olarak kafeik asit fenetil ester (CAPE) olup güçlü antioksidan özelliğe sahiptir (Doğan ve Hayoğlu, 2014).

2.3.2. Antibakteriyel Etkinliği

Propolisin en yaygın ve en çok araştırılan özellikleri arasında antimikrobiyal aktivite yer almaktadır (Noronha vd., 2014). Propolisin antibakteriyel etki mekanizmaları; hücre zarının geçirgenliğini artırmak, hücre bölünmesini engellemek, nükleik asit ve protein sentezini durdurmak, enerji (ATP) üretimini engellemek, bakterilerin hareketliliğini kısıtlamak ve hücre zarı tahribatıyla patojenik potansiyellerine etki etmeleri şeklinde sıralanabilir (Przybyłek ve Karpiński, 2019; Almuhayawi, 2020; Zulhendri vd., 2021; Bouchelaghem, 2022).

Propolisin sahip olduğu flavonoidlerden galangin, pinosembrin, pinobanksin, sinnamiliden asetik asit ve kafeik asit esterlerinin bakteriyel membran geçirgenliğini arttırdığı ve antimikrobiyal etkinlik sağlama konusunda önemli bir rol oynadıkları bilinmektedir (Stepanović vd., 2003; Dezmirean vd., 2017). Farklı propolis örnekleri ile yapılan çalışmada, propolisin antimikrobiyal aktivitesinin içerdiği kafeik asit ve

esterlerden kaynaklandığı bildirilmiştir (Kartal vd., 2003). Muğla ilinden toplanan 45 çeşit propolisin farklı çözücü kullanılarak yapılan çalışma da antimikrobiyal etkinlik; propolis örneğine, dozuna ve ekstraksiyon çözücüsüne göre değiştiği bildirilmiştir (Ugur ve Arslan, 2004). Propolisin sahip olduğu antimikrobiyal aktivitenin değiştiği diğer etkenler arasında arıların dolaştığı coğrafi konum ve içerdiği bileşikler yer almaktadır (Dezmirean vd., 2017).

Propolis birçok mikroorganizmaya karşı etkinliği bilimsel çalışmalarla *in vivo* ve *in vitro* olarak gösterilmiş ve gram pozitif ve gram negatif suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesi olduğu bildirilmiştir (Noronha vd., 2014). Ancak literatürdeki araştırma verilerine göre propolisin gram negatif bakterilere kıyasla gram pozitif bakterilere karşı daha etkili bir antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Bu durumun nedeni olarak gram negatif bakteriler tarafından salgılanan hidrolitik enzimlerin propolis aktif bileşenleri ile etkileşime girerek direnç göstermesi şeklinde açıklanmıştır (Bouchelaghem, 2022).

2.3.3. Antifungal Etkinliği

Propolisin antifungal etkinliğinin, metakaspaz ve Ras sinyalleme yolları aracılığıyla apoptozu indüklemeye kabiliyetinden kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Ayrıca propolis biyofilm oluşumu, patogeneze, hücre adezyonu, filamentli büyüme ve fenotipik geçişte mevcut olan çeşitli genlerin ifadesini bozabilmektedir (Castro vd., 2013).

Brezilya propolisinde α -pinen, β -pinen ve δ -kadinen, Türk propolisinde fenil, etil ve benzil alkol içeriğine bağlı olarak antifungal aktivitesi değişmektedir (Ioshida ve Marx Young, 2010). Propolis tırnak enfeksiyona sebep olan mayalara karşı yapılan *in vitro* testlerde etkinlikleri ortaya koyulmuş ve düşük konsantrasyonlarda bile fungistatik ve fungisidal etki ettiği gözlemlenmiştir (Zulhendri vd., 2021). Propolisin içeriğinde yer alan pinocembrin, enerji homeostazı ve misel büyümesi gibi kritik hücresel döngülere etki etmektedir. Yapılan bir çalışma da pinocembrinin bileşiğinin *Penicillium italicum* türünde yer alan hif içerisindeki fosforlanmış adenosin nükleotid seviyelerini azalttığı, hücre zarının yapısına zarar vererek iyonik sızıntıya ve çözünür proteine neden olduğu bildirilmiştir (Peng vd., 2012).

Propolisin antifungal etkinliği sayesinde dişlerdeki mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılabileceği düşünölmektedir (Siqueira vd., 2015).

Fusarium, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Penicillium* ve *Colletotrichum* gibi gıda bozulmalarında önemli rol oynayan küflere karşı propolisin etkili antifungal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Gniewosz vd., 2022). Wagh (2013), tarafından yapılan çalışma da propolisin içerdiği fenolik bileşikler sayesinde *C. pelliculosa*, *C. parapsilosis*, *C. famata*, *C. glabrata* ve *Pichia ohmeri* fungusitlerine antifungal etkinlik gösterdiği rapor edilmiştir (Wagh, 2013). Ota ve ark. (2001), Brezilya propolisinin farklı *Candida* suşlarına karşı antifungal aktivitelerinin inceledikleri çalışmada, propolisin net bir antifungal aktivite gösterdiği ve duyarlılık sırasına göre *C. albicans* > *C. tropicalis* > *C. krusei* > *C. guilliermondii*, *C. albicans* en duyarlı ve *C. guilliermondii* en dirençli olduklarını bildirmiştir (Ota vd., 2001). Yapılan farklı bir çalışma da benzer şekilde propolisin *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* gibi mantar türlerine karşı antifungal aktivite gösterdiği bilinmektedir (AL-Waili vd., 2012; Sariguzel vd., 2016).

2.3.4. Antiinflatuar Aktivitesi

İnflamasyon; fagosit migrasyonu, nötrofil, monosit ve makrofaj birikimiyle oluşan doku kayıpları bütününe denir (Memmedov vd., 2017). Propolis trombosit agregasyonu, prostaglandin ve lökotrienler gibi ekazonoidlerin sentezini inhibe ederek ve histamin gibi inflamasyonda rol oynayan mediyatörlerin salınımını engelleyerek infalamasyonu önleme de etkili olmaktadır (Yang vd., 2018). Yüksek fenolik içeriği propolisin kronik ve akut inflamasyonlarda da önemli rol oynamaktadır (Saad vd., 2015). Ağız ürünlerinde anti-inflatuar ve anti-gingivitis aktivitesinden dolayı kullanılan propolisin, içeriğinde ihtiva ettiği fenolik bileşiklerinden CAPE' ye atfedilmiştir (Li vd., 2017). Galangin ve kuersetin bileşikleri infalamasyonu önlemede etkili olan ve propolis içeriğinde yer alan flavanoidlerdir. Bu bileşikler uyarılmış COX-2 izoformu ekspresyonunu ve PGE-2 düzeylerini azaltmak suretiyle siklooksijenaz ve lipooksijenaz aktivitesini inhibe ederek anti-iflatuar etki gösterirler (Yang vd., 2018). Aynı şekilde propolis içeriğinde bulunan kafeik asit, COX-1 ve COX-2'nin enzimatik aktivitelerini inhibe ederek, araşidonik asit sentezini durdurarak antienflatuvar etkinliklik göstermesini sağlamaktadır (Araujo vd.,

2012). Ilıman bölgelerden toplanan propolisler de bolca bulunan kafeik asit, fenil ester lenfokin üretimi ve T hücre proliferasyonu ile sitokin ve kemokin üretimini inhibe ederek enflamasyonu azaltmaktadır (Viuda-Martos vd., 2008; Araujo vd., 2012).

2.3.5. Antikarsinojenik Aktivitesi

Kanser; vücuttaki hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile gelişen, anormal ve kontrolsüzce büyüyen, çevresel faktörlerden bağımsız olarak büyümeyi durdurma yeteneklerini kaybetmiş hücrelerin oluşturduğu hastalıktır (Roy ve Saikia, 2016; Serin vd., 2018). Tedavi edilmediğinde ölümle sonuçlanan ciddi bir hastalıktır. İnsanların kansere yakalanmalarının kalıtsal farklılık, genetik hatalar ve bağışıklık koşulları gibi farklı birçok etmenlerle birlikte sigara, alkol ve aşırı kilo gibi kansere yakalanma riskini artırmaktadır (Dogan vd., 2022).

Brezilya propolisinin sahip olduğu aktif bileşiklerin karaciğer tümör hücrelerinin büyümesini S fazında durdurduğu bildirilmiştir (Huleihel ve Isanu, 2002). Propolisin su ekstraksiyonunun insan karaciğer ve akciğer kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Matsuno, 1995). Propolisin diyetle düzenli bir şekilde kullanımı kansere neden olan mutasyona karşı koruyucu etki sağlayacağı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Bogdanov, 2020).

2.3.6. Propolis ve Yara İyileşmesi

Doku bütünlüğü ve işlevinin bozulması 'yara' olarak tanımlanır; bu bozulmanın onarılması ve doku yapısının yeniden kazanılması ise 'yara iyileşmesi' olarak adlandırılır (Aktaş, 2012). Propolis yara iyileşmelerini destekleyen aktif bileşenler içerir ve alternatif tıp uygulamalarında sıklıkla kullanılır. Doku rejenerasyonu ve yara onarımında ki biyolojik aktivitesi içermiş olduğu polifenolik flavonoidlerinin biyolojik aktivitelerinden kaynaklanmaktadır (El-Sakhawy vd., 2023). Propolisin yara onarımındaki aktivitesi zengin bitki örtüsünün immünomodülatör, antioksidan ve antiseptik etkileriyle desteklenmektedir (Martinotti ve Ranzato, 2015). Ayrıca propolis zararlı ışınların sebep olduğu (güneş yanığı gibi) hasarları azaltmakta ve derin cilt yaralarında tamir mekanizmalarını bozmadan inflamasyonu azaltabildiği gösterilmiştir (Cole vd., 2010; de

Moura vd., 2019). Yapılan çalışmalarda propolisin yanıklarda fibronektin ekspresyonunu ve kollajen I-III birikimini desteklediği ortaya koyulmuştur (Cole vd., 2010). Mevcut yara iyileştirici kremlere göre propolisin %50' lik solusyonu daha iyi etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Eröksüz vd., 2008). 2003 yılında yapılan bu çalışma da Wistar albino fareleri üzerinde oluşturulan yara modelinde propolisin etkisi incelenmiş ve kontrol grubuna göre propolis verilen grupta propolisin epitelizasyonu hızlandığı ve yara iyileşmesini hızını arttırdığı belirlenmiştir (Baktır, 2019). Ameliyatta sonrası ağız boşluğuna propolisin uygulaması verilerine göre propolisin yaraların iyileşmesine yardımcı olduğu, iltihabı azalttığı ve analjezik etki gösterdiği belirtilmiştir. Propolis özütünün iltihabı azalttığı, granülasyon dokusunun oluşumunu desteklediği belirlenmiştir (Magro-Filho ve Carvalho, 1994; Lopes vd., 2012).

2.4. Propolis ve Ağız Sağlığı

DSÖ, bireyin ısırma, çiğneme, gülme ve konuşmayı sınırlandıran durumlarla birlikte ağız ve yüz ağrısı, ağız enfeksiyonu, diş çürümesi ve diş kaybı gibi durumların görülmemesini ağız ve diş sağlığı olarak tanımlamaktadır (Mohanta, 2017).

Propolis içeren tıbbi preparatların çürük, ağız ve boğaz enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanımının ilk kayıtları 12. yüzyılda yapılmıştır (Kuropatnicki vd., 2013). Propolisin sahip olduğu biyolojik etkinlikleri sayesinde diş hekimliği ve ağız sağlığının korunmasında yüksek potansiyele sahiptir (Khurshid vd., 2017). Propolis özellikle antibakteriyel etkinliği sayesinde ağız sağlığında sıklıkla kullanılmaktadır (Özdemir vd., 2021).

Klorheksidinin ağız içi temizliğinde kullanıldığında, insan diş eti fibroblast hücreleri üzerinde propolis bazlı solüsyonlara kıyasla daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği, bu nedenle propolis bazlı solüsyonların ağız gargarası bileşeni olarak kullanılmaya daha uygun olduğu ortaya konulmuştur (Ozan vd., 2007). Ağız boşluğunda meydana gelen aftöz stomatit (RAS) ülserlerini azaltmada propolisin etkisini araştırıldığı çalışma da sonuç olarak propolisin RAS hastalarında nüks sayısını azalttığı ve yaşam kalitesini artırdığı bildirilmiştir (Samet vd., 2007). Brezilya yeşil propolisi içeren gargara ürünleri

diş eti iltihabını, setilpiridinyum klorür ve klorheksidin içeren gargara ürünlerine benzer şekilde diş eti iltihabını hafiflettiği bildirilmiştir (Bretz vd., 2014).

Diş çürümelerinden sorumlu mekanizmalardan en önemlisi *S. mutans*, *S. sabrinus* ve *Lactobasiller* gibi patojenlerin sebep olduğu enfeksiyonlardır. Propolis etkisini hem direkt bakteriler üzerine hem de glikozil transferaz enzim inhibisyonu ile göstermektedir (Koo vd., 2002; Hayacibara vd., 2005). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, propolisin diş çürüğü oluşumunu başlangıç aşamasında durdurabildiği ve bu özelliği sayesinde diş çürüklerine karşı koruma amacıyla kullanılabileceği saptanmıştır (Doğan ve Hayoğlu, 2014).

Propolis, diş hekimliğinde diş macunu, gargara, diş ipi ve sakızlara katılmak suretiyle diş çürüğü ve periodontal hastalıklar için koruyucu olarak kullanılmaktadır (Kırzioğlu ve Önel, 2015). Diş çürümesini önlemenin yanı sıra diş eti iltihabını tedavi etmek amacıyla diş macunlarında sıklıkla kullanılmaktadır (Patel, 2016). Propolis ekstraktlarının diş çürükleri, periodontal bozukluklar ve *Candida* enfeksiyonlarına sebep olan oral bakterilere karşı etkinlikleri bildirilmiştir (Stähli vd., 2021).

Propolisin ağız gargarası olarak kullanıldığında diş çürümesine neden olan plak ve patojenlerin azaltılmasında klorheksidin kadar etkili olduğunu bildirilmiştir (Bapat vd., 2021). Propolis solusyonlarının insan diş minesinin sertliğine etkisinin araştırıldığı çalışmada solusyondaki propolis oranı arttıkça Vickers sertlik katsayısının da arttığı gözlemlenmiştir (Giamalia vd., 1999). Propolis ilaveli gargara ve diş macunları periodontit patojenleri inhibe ettikleri için sadece koruyucu değil terapötik ajan olarak tanımlanmaktadır (Wiğckiewicz vd., 2013). Propolis ilaveli gargaranın kullanıldığı çalışmada kullanımdan önce ve sonra alınan tükürük örneklerinde, *S. mutans* miktarının %49 oranında azaldığı gözlemlenmiştir (Duailibe vd., 2007). Propolisin periodontal dokular üzerindeki koruyucu etkisi, kalsiyum fosfat çökeltilerinin oluşumunu yavaşlatmayı da kapsar. Bu özelliği sayesinde, diş plağı birikimini sınırlamak amacıyla ağız gargaraları ve diş macunları gibi ürünlerin bileşeni olarak kullanılabilir (Hidaka vd., 2008).

Bir ürünün çürük önleyici (oral antiseptik) olarak kabul edilebilmesi için,

- (1) çürük gelişiminin bir veya daha fazla aşamasına müdahale etmesi,
- (2) konak hücrelerde toksik olmaması ve
- (3) uygulandıktan sonra bir süre boyunca etkili olması gerekmektedir.

Ayrıca, ürünün oral mikrobiyotada önemli bir dengesizliğe yol açmaması da esastır. Yapılan çalışmalarda propolis özütünün (1) ve (2) maddelerde etkinlik gösterebileceğini ortaya koymuştur (Libério vd., 2009).

Almeida ve ark. (2006), çalışmalarında propolis ve klorheksidin çözeltilerinin oral biyofilm birikimi ve tükürükteki *S. mutans* sayısı üzerindeki antiseptik etkileri incelenmiş ve propolisin, klorheksidine benzer antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Almeida vd., 2006). Brezilya propolisi içeren bir jelin gingivitis ve kronik periodontitis hastalarındaki etkinliğini değerlendirildiği çalışmada her iki durumda belirgin bir iyileşme gözlemlenmiş ve jelin bu tür periodontal hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği bildirilmiştir (Cairo vd., 2006).

2.5. Propolisin Kullanımı

Propolisin gıda uygulamalarında kullanılabilmesi için öncelikle saflaştırma işlemi gereklidir. Bu süreçte, propolisin içeriğindeki balmumu (vaks) uzaklaştırılırken, biyoaktif özelliklerini sağlayan polifenollerin korunması büyük önem taşımaktadır. Propolis ekstraksiyonunda en yaygın kullanılan yöntem, aktif bileşenlerin kolaylıkla çözünbildiği etil alkol ekstraksiyonudur (Pietta vd., 2002).

Propolisin sahip olduğu antioksidan, antibakteriyel ve antifungal aktivitelerinden dolayı gıda teknolojisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Propolisin içeriğinde yer alan bileşenler, tipik gıda bileşenleri, gıda katkıları ve genel olarak güvenli maddeler (GRAS) olarak değerlendirilmektedir (Burdock, 1998).

Propolis kozmetik sektöründe, geleneksel tedavilerde (soğuk algınlığı, yaraların iyileşmesi, akne, yanıklar, nörodermatit gibi) ve ticari olarak diş macunu, ağız suyu, boğaz pastili, krem ve toz şeklinde satılmaktadır (Ishida vd., 2018).

Gıda ürünlerinde kullanılan miktarı çok önemlidir, çünkü yüksek konsantrasyonda eklenmesi tat acılık ve burukluğa dolayısı ile istenmeyen bir tada sebep olmakla beraber ürünün karakteristik tat-aromasında değişikliğe sebep olmaktadır (Banskota vd., 2001; Naczki ve Shahidi, 2004).

2.6. Oral Mikrobiyal Flora

Ağız boşluğu bakteri, ark, fungus ve virüslerin bulunduğu ve içerik olarak insan vücudunun en çok mikrobiyal yaşam alanlarından birini oluşturmaktadır (Collins ve Dawes, 1987). Dişler, insan vücudundaki tek doğal dökülmeyen yüzey olup biyofilm ve mikrobiyal kalıcılık için güvenli alanlardır (Marsh vd., 2011). Ağız içi sürekli olarak kıvamlı bir sıvı olan tükürük ve dişeti oluşu adı verilen sıvıların etkisindedir (D. Yılmaz ve Altındış, 2018). Tükürük sıvısı konuşmayı, çiğnemeyi, yutmayı ve sindirime yardımcı olmakla birlikte mikrobiyotayı korumaya yardımcı olan hayati enzim ve proteinleri içermektedir. Tükürük içeriği mikroorganizmaların birincil besin kaynağı olup dengeli bir mikrobiyom gelişimi için önemlidir. Ağız ortamı birçok mikroorganizmanın üremesine uygun olmakla birlikte bu mikroorganizmalar tükürük proteinleri ve glikoproteinleri besin kaynağı olarak kullanırlar (Van 't Hof vd., 2014).

Oral mikrobiyota olarak da isimlendirilen bu topluluk içerisinde yaklaşık olarak 280 bakteri türü kültürüne rastlanılmıştır (Dewhirst vd., 2010). Oral mikrobiyota, kişiden kişiye bazen aynı bireyin farklı ağız bölgelerinde değişiklikler göstermektedir. Farklı birçok etmene bağlı olarak oral mikrobiyota da bazı mikroorganizma grupları daha baskın bulunmaktadır. Oral mikrobiyotanın habitatı seçmesindeki en net özellik seçecekleri yüzey dokusunun; oral mukoza gibi yumuşak dokular veya diş minesi gibi sert dokulardan oluşup oluşmadığıdır (Yılmaz ve Altındış, 2018).

Oral bakteriler, genel olarak hücre duvarlarının boyanma özelliklerine göre gram-pozitif (+) ve gram-negatif (-) bakteriler olarak iki kategoriye ayrılabilirler (How vd., 2016).

Tablo 2.1. İnsan oral mikrobiyata (How vd., 2016)

Mikroorganizma Grubu	Mikroorganizma Türü
Gram pozitif (+)	
Aerobik veya fakültatif anaerobik	<i>Streptococcus</i> (<i>S. gordonii</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. auralis</i> , <i>S. salivarius</i>), <i>Staphylococcus</i> (<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>), <i>Enterococcus</i> (<i>E. faecalis</i>), <i>Lactobacillus</i> (<i>L. casei</i> , <i>L. fermentum</i>), <i>Corynebacterium</i> (<i>C. matruchotii</i>), <i>Actinomyces</i> (<i>A. naeslundii</i> , <i>A. israeli</i> , <i>A. viscosus</i>), <i>Arachnia</i> (<i>A. propionica</i>), <i>Rothia</i> (<i>R. dentocariosa</i>)
Zorunlu anaerob	<i>Bacillus</i> (<i>B. cereus</i>), <i>Propionibacterium</i> (<i>P. acnes</i>), <i>Peptostreptococcus</i> (<i>P. micros</i> , <i>P. anaerobius</i>).
Gram Negatif (-)	
Aerobik veya fakültatif anaerobik	<i>Campylobacter</i> (<i>C. rectus</i> , <i>C. concisus</i> , <i>C. gracilis</i>), <i>Actinobacillus</i> (<i>A. actinomycetemcomitans</i>).
Zorunlu anaerob	<i>Fusobacterium</i> (<i>F. nucleatum</i>), <i>Porphyromonas</i> (<i>P. gingivalis</i>), <i>Prevotella</i> (<i>P. melaninogenica</i> , <i>P. oralis</i> , <i>P. intermedia</i>)

Streptokoklar, insan ağız florasında diş çürüğü oluşumunda önemli rol oynayan, gram-pozitif, fakültatif anaerobik bakterilerdir, farenjit, bakteriyel endokardit, idrar yolu enfeksiyonları, akut romatik ateş, romatik kalp hastalığı, akut glomerulonefrit, pnömoni, menenjit, kulak enfeksiyonları ve diş çürükleri gibi rahatsızlıklarda rol oynamaktadır (Loesche, 1996; Oppegard vd., 2015).

1924 yılında Clarke tarafından teşhisi yapılan *S. mutans*, çürük lezyonlarından izole edilen, değişken koloni morfolojilerine sahip kapsülsüz kokobasillerdir (Clarke, 1924). Asit üretimi (asidojeniz) ve proton ATPaz enzim aktivitesi gibi başlıca virülans özellikleri sayesinde asidik ortamlarda yaşamını sürdürebilmekte ve bu özellikleri aracılığıyla ağız mikrobiyotasındaki diğer mikroorganizmalara karşı üstünlük sağlamaktadır (Zhu vd., 2017). Ortamdaki sakkaroz varlığı, *S. mutans*'ın diş yüzeyine yapışma kapasitesini artıran ekstrasellüler polisakkarit üretimini teşvik etmektedir (Gibbons, 1984). Duarte ve ark. (2006), propolisin etil alkol fraksiyonunun *S. mutans*'ın propolis özütünün biyofilm üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını, fakat biyofilm tabakasının asit oluşumunu belirgin miktarda azalttığını bildirmişlerdir (Duarte vd., 2006). Ikeno ve ark. (1991), yaptıkları çalışmada, propolisin ağız ortamı ve bakteri florasında, özellikle *S. mutans* üzerinde diş çürüğünü önleyici etkisini analiz etmiş ve

propolisin bakteri florası üzerindeki çok yönlü etkisi nedeniyle sıçanlarda diş çürüğünü önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir (Ikeno vd., 2009).

Gram pozitif bir bakteri olan *S. sanguinis*, diş plağında yer alan spor oluşturmeyen, fakültatif anaerobdur. Diğer streptokoklar gibi, *S. sanguinis*' in hücre bölünmesi tek bir eksen boyunca gerçekleşmektedir (Gurung vd., 2017). *S. mutans*'ın kolonizasyonunu engelleyerek diş sağlığına fayda sağladığı bilinse de, *S. sanguinis* aynı zamanda enfektif endokarditin en yaygın nedenlerinden biri olan önemli bir fırsatçı patojendir (Caufield vd., 2000; Que ve Moreillon, 2011).

Porphyromonas gingivalis, protein parçalanma ürünlerinden enerji sağlayan, gram-negatif, çubuk şeklinde zorunlu anaerobik bir bakteridir. Ağız boşluğunda bir patobiyont olarak bulunur ve periodontitisin önde gelen etkenlerinden biridir. Ayrıca kardiyovasküler hastalık, alzheimer ve romatoid artrit gibi sistemik hastalıklarla ilişkilidir (Reyes, 2021). *P. gingivalis*, çeşitli virülans faktörleri repertuvarına sahip siyah pigmentli bakteridir (Lamont vd., 2020). Propolisin en çok kullanılan etanollü ekstraktlarının antimikrobiyal etkilerine bakıldığında, periodontal hastalıkların temel patojeni olan *P. gingivalis* 'e karşı etkili olduğu ve periodontal hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için birincil hedef olarak kabul edilmektedir (Yoshimasu vd., 2018).

Lactobacillus acidophilus, insan sağlığıyla ilişkili öne çıkan probiyotiklerden biridir. Lactobacillaceae familyasına ait bu spor oluşturmeyen gram-pozitif basil, 2–10 µm uzunluğunda, dairesel uçlu ince çubuklar şeklindedir. Probiyotik özellikleri arasında düşük pH toleransı, safra direnci ve kolon hücrelerine yapışma kabiliyeti bulunmaktadır (Azcarate-Peril vd., 2004; Shah, 2007). *Lactobacillus* türleri, fakültatif anaerobik laktik asit üretici bakteriler olarak bilinir ve insan sağlığı üzerinde birçok yararlı etkiye sahiptir. Bu etkiler arasında patojenik bakterilere karşı antagonistik özellikler önemli bir yer tutar (Prabhurajeshwar ve Chandrakanth, 2017). Özellikle Lactobacilli ailesinden probiyotiklerin patojenik oral bakterilerin biyofilm oluşumunu engelleyebildiği gösterilmiştir (Bohora ve Kokate, 2017; Wasfi vd., 2018; Widyarman ve Theodorea, 2021).

Enterobacteriaceae familyasında yer alan *Escherichia coli* (*E. coli*), insanların ve

sıcakkanlı hayvanların gastrointestinal sistemlerinde en yaygın bulunan kommensal bakterilerden olup çeşitli enfeksiyonlara neden olabilen önemli bir patojendir (Kaper vd., 2004). *E. coli*, kolay işlenebilirliği, tam genom dizisinin bulunabilirliği, hem aerobik hem de anaerobik koşullarda büyüme kapasitesi gibi özelliklerinden dolayı biyoteknoloji alanında araştırma ve endüstriyel uygulamalarda da önemli bir mikroorganizma haline getirmektedir. Özellikle rekombinant DNA teknolojisinde çok sık kullanılan mikroorganizma olarak, hem tıbbi hem de endüstriyel alanda geniş kullanım alanı vardır (Yoon vd., 2009).

Staphylococcus aureus, gıda zehirlenmesi, zatürre, menenjit, endokardit, sepsisemi veya toksik şok sendromu gibi daha ciddi hastalıklara kadar geniş bir enfeksiyon yelpazesinden sorumlu gram pozitif fırsatçı patojendir. İnsanlarda bulaşıcı hastalıkların önde gelen nedenlerinden biri olarak görülmektedir. Besin eksikliği, geniş pH ve büyüme sıcaklık aralığı, metal iyonlarının sınırlı olduğu ortamlar, kuruma ve yüksek tuz konsantrasyonları gibi çeşitli çevresel zorluklara karşı hayatta kalma yetenekleri sayesinde, *S. aureus* her yerde bulunabilmektedir (Wilson vd., 1995; Clements ve Foster, 1999; Laupland vd., 2003; Qiu vd., 2021). Ağız boşluğu, *S. aureus* için bir rezervuar görevi görerek alt solunum yolu enfeksiyonları ve diğer hastalıklar arasında çapraz enfeksiyonların taşınmasına zemin hazırlayabilmektedir (Lam vd., 2012).

Candida albicans, oval şekilli tomurcuklanan maya, septalarda daralmalar içeren uzun elipsoid hücreler (psödohif) veya paralel duvarlı gerçek hifler şeklinde büyüeyebilen polimorfik bir mantardır (Berman ve Sudbery, 2002). Sağlıklı bireylerde *C. albicans* ömür boyu zararsız bir komensal olarak bulunur. Fakat belirli koşullar altında ciltte yüzeysel enfeksiyonlardan yaşamı tehdit eden sistemik enfeksiyonlara kadar geniş bir yelpazede sorunlara sebep olabilmektedir. *C. albicans* kaynaklı enfeksiyonlar, oral ve vajinal yüzeysel enfeksiyonlar ile yaşamı tehdit eden sistemik enfeksiyonlar olmak üzere iki ana kategoriye ayrılmaktadır (Mayer vd., 2013). Ağız boşluğunda, popülasyonun yaklaşık %75'inde *C. albicans* ve daha düşük oranlarda diğer *Candida* türleri bulunmaktadır (Brandt, 2002).

Saccharomyces cerevisiae, 16 kromozomlu nükleer genomik DNA'ya sahip, tek hücreli, ökaryot ve ökaryotik organizmalar üzerindeki temel araştırmaların için değerli bir bir

mantardır (Goffeau vd., 1996; Parapouli vd., 2020). *S. cerevisiae*'nin tek hücreli yapısının, ökaryotlarda bulunan neredeyse tüm biyolojik işlevleri barındırması ve iyi şekilde koruması, bu organizmanın bilimsel çalışmalarda yaygın olarak kullanılmasını sağlamaktadır (Parapouli vd., 2020). Probiyotik olarak antibiyotiklerin yerine tıbbi tedavide, gıda endüstrisinde ve hayvancılıkta yaygın olarak kullanılmaktadır (Tan vd., 2022).

Propolis, periodontopatik bakterilere karşı gösterdiği antibakteriyel aktivite sayesinde, periodontal dokulardaki mikrobiyolojik ve klinik parametrelerde iyileşme sağlar (F. A. Santos vd., 2002; Coutinho, 2012; Wojtyczka vd., 2013; Sanghani vd., 2014; Kalia vd., 2016). Ayrıca propolis özütlerinin diş çürüğü ve periodontal hastalıklara karşı kullanabilirliği bu hastalıklarda rol oynayan mikroorganizmalara karşı önemli antimikrobiyal aktivite göstermesi ve *in vitro* koşullarda diş plağı oluşumunu engellemesine bağlanmaktadır (Koo vd., 2000).

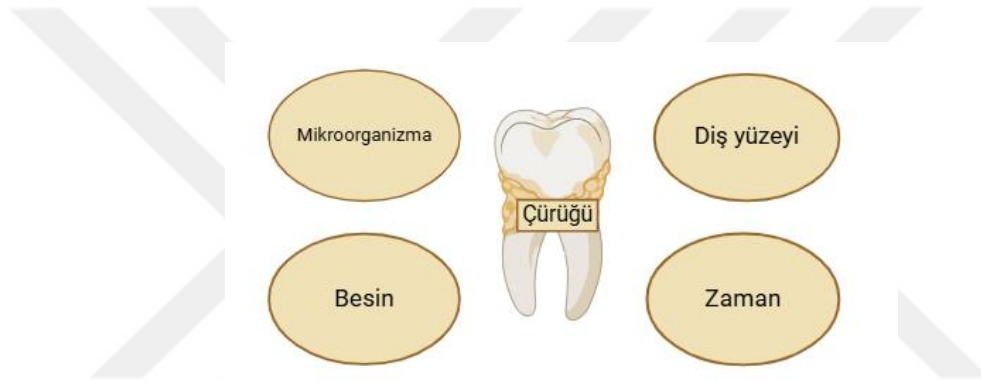
2.6.1. Oral Mikrobiyotanın Sebep Olduğu Bazı Oral Hastalıklar

2.6.1.1. Diş Çürüğü

"Çürük" kelimesi, Latince "kokuşmuş" veya "bozuk" anlamına gelen bir kelimedenden türetilmiştir ve birçok kültürde başlangıçta diş çürüğünün sebebi olarak diş kurdu kavramı öne sürülmüştür. 21.yüzyıla gelindiğinde, çürük, dişlerde deliklerin (boşlukların) bulunması olarak tanımlanmaya başlanmıştır (Health and Services, 2000). Diş çürüğü ağızda var olan bazı bakterilerin ve belirli etmenlerin varlığında dişin sert yapısının bozulması olarak adlandırılmaktadır. Diş çürüğünün oluşmasındaki etmenler; karyojenik (çürük yapıcı) bakteri varlığı, bu bakterilerin beslenmesi için gereken şeker gibi maddeler, bakterilerin beslenmesi sonucu oluşan asitler ve bu asitlerin diş sert dokularına etki etmesi için geçen zaman temel etmenlerdir (Larsen vd., 1991). Diş çürüğü oluşumunda karyojenik bakterilerle beraber biyolojik, genetik, sosyoekonomik, kültürel ve çevresel konuları içeren çok faktörlü diş sert dokusunda mineral kaybına sebep olan davranışla değiştirilebilen enfeksiyon hastalığıdır (Bader vd., 2004). Biyofilm içerisindeki başta *S. mutans* olmak üzere bakterilerin şekerleri organik asitlere metabolize

etmekte ve bu asitler dişin kristal yapısının çözünmesine dolayısıyla çürük başlangıcına sebebiyet vermektedir (Paes Leme vd., 2006).

Mine ya da dentin dokusundan kalsiyum fosfat kaybı ile gerçekleşen süreçte demineralizasyon, demineralizasyona uğramış bölgelerdeki mineral kaybının tekrar yerine konulmasına ise remineralizasyon denir. Demineralizasyon süreci durdurulmaz ya da remineralizasyon yönünde çevrilmezse, çürük oluşumu başlar. Çürüğün ilerlemesini durdurmak için bakteri kaynaklı asit saldırısının engellenmesi ve demineralizasyonun önlenmesi dolayısıyla remineralizasyonun teşvik edilmesi birbirleriyle önemli ölçüde ilişkilidir (Featherstone, 1999).



Şekil 1.1. Diş çürüğüne sebep olan etmenler

En yaygın ağız hastalıklarından biri olan diş çürüğü, her yaşta görülebilir ve yalnızca diş yapısında yıkıma veya diş kaybına yol açmakla kalmaz; aynı zamanda periapikal enfeksiyonlar ve bakteriyemi gibi diğer ağız hastalıklarını ve sistemik durumları da tetikleyebilir (Selwitz vd., 2007). Diş çürüğünün gelişip ilerlemesiyle, mikrobiyal topluluk değişmektedir. Klinik olarak başlangıç çürüğü olarak tanımlanan beyaz lezyonlarda; *Streptococcus* ve *Actinomyces* grubu bakteriler oldukça fazla iken, çürük lezyonu geliştikçe kavite florasında; *S. mutans*, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* grubu bakteriler baskın hale geçmektedir. Süt dişlerinde *S. salivarius*, *S. parasanguis*, *Corynebacterium* ve *Actinomyces gerencseriae* baskın olarak tespit edilirken. *S. salivarius*, *S. parasanguis*, *Campylobacter* ve *Selenomonas* daimi dentisyonda derin kavitasyonlarda baskın bakteri türleridir (Aas vd., 2008). Diş çürüğü, dişin sert dokularının karyojenik mikroorganizmalar tarafından lokalize olarak yıkılması ile karakterize edilen bir patolojik süreçtir. Birçok gelişmiş ülkede diş çürüğü geçmiş yıllara

göre azalma göstersede, günümüzde hala temel sağlık sorunlarından biri olarak önemini korumaktadır (Goswami vd., 2012). Propolis fraksiyonlarının, bakteri plağı miktarını azaltma etkinliği diş çürüğü oluşumunu engellediği bildirilmiştir (Giamalia vd., 1999; Koo vd., 2000; Sato vd., 2001; Botushanov vd., 2001; Koo vd., 2002; Jeon vd., 2011; Kashi vd., 2011).

2.6.1.2. Periodontitis (Diş İltihabı)

Periodontitis diş destekleyen, periodonsiyum adı verilen periodontal ligament, sement, dişeti ve kemikten oluşan dokuların bakteriyel tahribatıyla karakterize kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Periodontitisin temel etkeninin mikrobiyal dental plak olduğu bilinse de konak yanıtını etkileyen çeşitli sistemik, metabolik ve çevresel faktörlerin de hastalık riskini artırdığı bilinmektedir (Acıpınar vd., 2017). Bu hastalıklar gingivitis ile başlar, tedavi edilmezse periodontitise ilerleyerek dişeti ve dişleri destekleyen alveol kemiğinde geriye dönüşsüz hasarlar meydana getirir ve diş kaybına kadar yol açabilir (Newman vd., 2006). Subgingival mikrofloranın baskılanması veya ortadan kaldırılmasıyla periodontal hastalıkların tedavisi mümkündür (Herrera vd., 2002).

Diş iltihabı rahatsızlıklarından genellikle gram negatif bakteriler sorumludur. Bu bakteriler lipopolisakkarit gibi endotoksinler ile interlökin-1 beta (IL-1 β), tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α), prostaglandin E2 (PGE2) gibi periodontal doku yıkımında merkezi rol oynayan sitokin üreten makrofajları uyarırlar (Acıpınar vd., 2017). Yoshimasu ve ark. (2018), Propolisin etil alkol özütünün, periodontal hastalıklara karşı etkili bir antibakteriyel ajan olarak profilaktik ve terapötik potansiyele sahip olduğunu bildirmişlerdir (Yoshimasu vd., 2018). Dodwad ve Kukreja (2011), 18 ila 50 yaşları arasındaki bireylerin, %0,2 CHX, tuzlu su ve günde iki kez kullanılan propolisin alkollü solüsyonunun etkilerini değerlendirdiği çalışmada, propolis ve CHX ile tedavi edilen gruplarda diş eti iltihabında iyileşme gözlendiğini bildirmişlerdir (Dodwad ve Kukreja, 2011).

Propolisli sakız ve gargaranın dişeti iltihabı ve plak birikimi üzerindeki etkilerini değerlendirildiği çalışmada, propolisli gargara grubunun hem plak hem de dişeti indekslerinin propolisli sakız grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu, ayrıca

propolisli gargaranın plak inhibisyonu ve dişeti iltihabı üzerinde sakızdan daha etkili olduğu gösterilmiştir (Ercan vd., 2019). Bhat ve ark. (2015), propolisin plak birikimini azaltmada güvenli ve etkili olduğunu ve propolisin odontolojik alanda potansiyeline işaret ettiğini belirtmişlerdir (Bhat vd., 2015).

2.6.1.3. Ağız Kokusu (Halitozis)

Ağız kokusu bir diğer adıyla halitozis, Latince *halitus* (solunabilir hava) ve *osis* (patolojik değişiklik) kelimelerinden türetilmiş bir kelimedir (Lee ve Hong, 2023) Halitozis kişinin soluk verme sırasında ortaya çıkardığı hoş olmayan kokudur (Murata vd., 2002). Halitozis esas olarak patolojik veya patolojik olmayan nedenlerle oluşan uçucu organik bileşiklerden oluşur. Bu uçucu organik bileşikler kükürt bileşikler, aromatik bileşikler, azot içeren bileşikler, aminler, kısa zincirli yağ asitleri, alifatik bileşikler ve ketonlardır (Thorn ve Greenman, 2012). Halitozisde dil kaplaması (yiyecek artıkları, dökülmüş epitel hücreleri ve kan hücreleri) önemli bir faktördür. Bu ortam uçucu kükürt bileşikler üreten bakterilerin beslenmesi için mükemmel bir ortam yaratır (Kamaraj vd., 2014).

Ağız içerisinde bulunan bakterilerin çoğu kötü nefes kokusuna neden olan kötü kokulu bileşikler üretirler (Aas vd., 2005; Chattopadhyay vd., 2019). Ağız kokusuyla en çok ilişkili olan oral bakteri türleri *Actinomyces spp.*, *Bacteroides spp.*, *Dialister spp.*, *Eubacterium spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Leptotrichia spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*, *Selenomonas spp.*, *Solobacterium spp.*, *Veillonella spp.* ve *Tannerella forsythia'* dır (Eribe ve Olsen, 2017; Ye vd., 2019; Hampelska vd., 2020).

Propolis özleri kötü ağız hijyeni nedeniyle oluşan halitozisi önlediği için ağız bakım ürünlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca propolis diş eti iltihabına ve periodontite neden olan bakteri plağı ve patojenik mikrofloranın büyümesini azaltma yeteneğinden dolayı terapötik bir ajan olarak rol oynamaktadır (Pereira vd., 2011).

2.7. Şekerlemeler

Şeker ve glikozun yada sadece şekerin pişirilmesinden sonra sitrik asit, tartarik asit ya da potasyum bitartarat ilavesiyle oluşan hamura süt, süt tozu, jelatin ve aroma maddelerinin de eklenmesiyle elde edilen gıda maddeleri şekerleme olarak adlandırılmaktadır (Altınok vd., 2020). Başka bir ifadeyle şekerleme; su, şeker ve asitin karıştırılıp, kaynatılıp, soğutulması sonucu elde edilen gıda ürünüdür (Hayoğlu vd., 2010).

Şekerleme formülasyonlarında şeker kaynağı olarak genellikle glikoz ve fruktoz şuruplarıyla dekstroz ve sakkaroz kullanılmaktadır (Utomo vd., 2014; Charoen vd., 2015).

Şekerleme ürünlerinin tüketici tercihinine göre sert şekerlemeler (akide, mevlana), yumuşak şekerlemeler (jöle ve karamel), karışık şekerlemeler (dolgulu, kaplamalı), helva, çiklet, lokum, çikolata gibi şekerleme ürünleri bulunmaktadır (Yılmaz vd., 2019). Genellikle şekerlemeler sert ve yumuşak olmak üzere olarak iki alt gruba ayrılmaktadır (Altınok vd., 2020). Jelatin ve nişastanın jel oluşturucu ve su bağlayıcı maddeler olarak en yaygın şekilde kullanıldığı biyopolimer jel sistemleri olan yumuşak şekerlemelerin içeriğinde esas olarak şeker, nişasta, jelatin ve su bulunmaktadır (Burey vd., 2009). Sert şekerler, yüksek sıcaklıkta suyun büyük ölçüde uzaklaştırılmasıyla elde edilen, katı, parlak, aşırı soğutulmuş ve kristal olmayan camsı yapıdaki gıda ürünleridir. %1' den az su içerirler ve amorf bir yapıya sahiptirler (Cardoso ve Abreu, 2004; Demir vd., 2010; Hayoğlu vd., 2010; Netramai vd., 2018).

Tüketiciler geleneksel muadilleriyle aynı doku ve lezzette daha sağlıklı ve daha az şeker içeren ürünleri talep etmektedir (Periche vd., 2014). Şekerleme üretiminde kullanılan sentetik boya maddelerin kullanımı çocuklar tarafından çekici olsa da sağlık üzerinde olumsuz etkileri olduğu saptanmıştır. Bu nedenle, sentetik boyar maddeler yerine doğal renklendiricilere olan ilgi artmış; hatta doğal renk maddesi kullanımının son yıllarda %10–15 oranında arttığı bildirilmiştir (Kovács vd., 2019).

Rizk ve ark. (2008), kadife çiçeğinden elde ettikleri karotenoit pigmentinin %0,30- %0,35 oranında katıldığı şekerlerin duyusal analizde en çok tercih edilen örnek olduğu tespit

etmişlerdir (Rizk vd., 2008). Nesreen ve ark. (2017), yaptıkları çalışmada, marshmallow tipi yumuşak şekerlerde pancar ve altın çilek suyunun yalnızca doğal renk maddesi sağlamadığı, aynı zamanda antioksidan aktivite ve mineral madde açısından zengin olmaları nedeniyle de tercih edilmesi gereken kaynaklar olduğunu belirtmişlerdir (Nesreen vd., 2017).

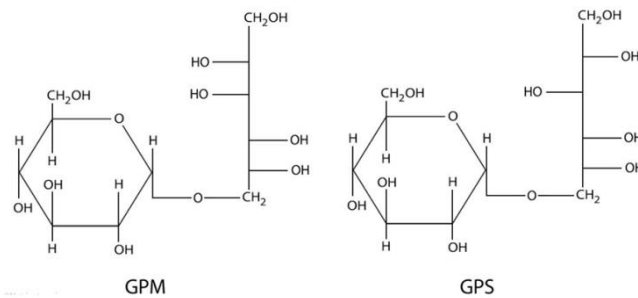
Tatlandırıcılar; doğal-yapay tatlandırıcılar, şeker alkoller ve tatlı proteinler olarak sınıflandırılmaktadır (O'Brien-Nabors, 2016). Şeker alkoller, şekerlerin bir aldehit grubunun veya bazen bir keton grubunun, bir hidroksil grubu ($-OH$) ile ikame edilmesiyle elde edilen bileşiklerdir. Bu kimyasal değişiklik, şeker alkollerinin kolay sindirilebilen karbonhidratlar olmasını sağlamaktadır. Şeker alkollerinin çoğu aldoz şekerlerinden üretildiğinden alditoller olarak isimlendirilirler. Şeker alkoller, kimyasal yapılarına göre farklı gruplara ayrılabilir. Bu gruplar arasında hidrojene monosakkaritler (sorbitol, mannitol), hidrojene disakkaritler (izomalt, maltitol, laktitol) ve hidrojene mono-, di- ve/veya oligosakkaritlerin karışımları yer almaktadır (Ellwood, 1995; Livesey, 2003; Mäkinen, 2011; Shankar vd., 2013). AB mevzuatına göre besleyici tatlandırıcılar olarak tanımlanan yedi şeker alkolü vardır, yani sorbitol (E420), mannitol (E421), izomalt (E953), maltitol (E965), laktitol (E966), ksilitol (E967) ve eritritol (E968) (Mäkinen, 2011). Şeker alkollerinin; nemlendirici, lezzet arttırıcı, stabilize edici, kristalleşmeyi önleyici, emülgatör, hacim arttırıcı, yüksek sıcaklıklarda kararlı olma ve prebiyotik olarak kullanımı gibi özellikleri bulunmaktadır (Petković, 2019). Düşük kalori değerine sahip olan şeker alkoller, bireylerin enerji alımını azaltmalarına ve dolayısıyla kilo kaybı sağlamalarına katkıda bulunmaktadır (Livesey, 2003; Grabitske ve Slavin, 2008).

2.7.1. İzomalt

İzomalt 1960' lı yıllarda keşfedilen iki izomerik disakkarit alkolün karışımından oluşmaktadır (Mäkinen, 2011). 6-Od-lukopiranoz-d-sorbitol (1,6-GPS) ve 1-Od-glukopiranosil-d mannitol (1,1-GPM) moleküllerinden oluşmaktadır (Ünal, 2021). İzomalt fiziksel olarak sakkaroz benzemesinin yanı sıra hafif higroskopiktir ve iki aşamalı bir işlemle sakkarozdan üretilmiş olsa da kimyasal ve enzimatik olarak sakkarozdan daha kararlı yapıdadır (Sentko ve Willibald-Ettle, 2012; Grembecka, 2015).

Prebiyotik olarak kullanılan izomaltlar beyaz, kokusuz ve kristal bir yapıya sahiptir. İzomaltlar indirgenmeyen şekerler olduğu için herhangi bir esmerleşme reaksiyonu görülmemektedir (Wilson, 2007). İzomaltın kalori değeri 1.94 kcal/g olup sakkarozu göre tatlılık derecesi %45-%60' dır (Varzakas vd., 2012). 20 °C' de 100 g çözeltide çözünürlüğü 24 gramdır, sıcaklık yükseldikçe çözünürlükleri de artmaktadır (Wilson, 2007). İzomalt tatlandırıcı olarak kullanımının yanı sıra hacim artırıcı ve topaklanma önleyici olarak da kullanılmaktadır (Grembecka, 2015). İzomalt çabuk kristalleşmediği için şeker heykelleri ve dekoratif yenilebilir ürünlerde kullanılabilir ve yüksek ısı stabilitesinden dolayı pişirme gibi yüksek ısı işlemlerinde tercih edilmektedir (Sentko ve Willibald-Ettle, 2012; Barbieri vd., 2014).

Düşük glisemik indekse sahip olan izomalt, karyojenik değildir, diş çürüklerini önlemeye yardımcı olur ve kan glikozu ile insülin seviyelerini artırmaz, bu nedenle şeker hastaları için uygundur. Ayrıca tek başına veya istenen tatlılığı elde etmek için diğer tatlandırıcılarla birlikte de kullanılabilir. Diğer tatlandırıcılarla, özellikle yoğun olanlarla sinerjik etki göstermektedir (Takatsuka vd., 2008; Sentko ve Willibald-Ettle, 2012; Efe vd., 2019). İzomalt sert şekerler, sakızlar, şekerlemeler, çikolatalar, fırınlanmış gıdalar, gıda takviyeleri ve pastil gibi çok farklı gıda ürünlerinde tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır (Mäkinen, 2011). Sentetik tatlandırıcıların aksine şeker alkollerini mikrobiyotayı olumlu yöne etkilemektedir, eritritol gibi istisnaları bir kenara koyarsak mikrobiyota açısından şeker alkollerinin kullanılması olumlu bir etki yapmaktadır (Gültekin vd., 2017). İzomalt, oral mikroorganizmalara karşı *in vitro* test edilmiş, asit ve çürük oluşturmeyen şeker alkolü olarak sınıflandırılmıştır (Canada, 2005). Ayrıca izomalt içeren diş macunlarının dişlerin remineralizasyonunu artırdığı bildirilmiştir (Takatsuka vd., 2008).



Şekil 2.2. İzomalt molekülleri (Ergün ve Tekgül, 2021).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Mikroorganizmalar, Hücre Hatları ve Propolis

Streptococcus mutans (ATCC 35688), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 9224), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Escherichia coli* (ATCC-25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923), *Saccharomyces cereviceae* (ATCC 9763), *Candida albicans* (ATCC 10231) mikroorganizmaları kullanılmıştır.

HDF hücre hattı: İnsan dermal fibroblastları

HGF hücre hattı: İnsan dişeti fibroblastları kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan propolis örnekleri 2023 yılı Eylül ayında Bingöl Karlıova bölgesinden temin edilmiş -18 °C’ de muhafaza edilmiştir.

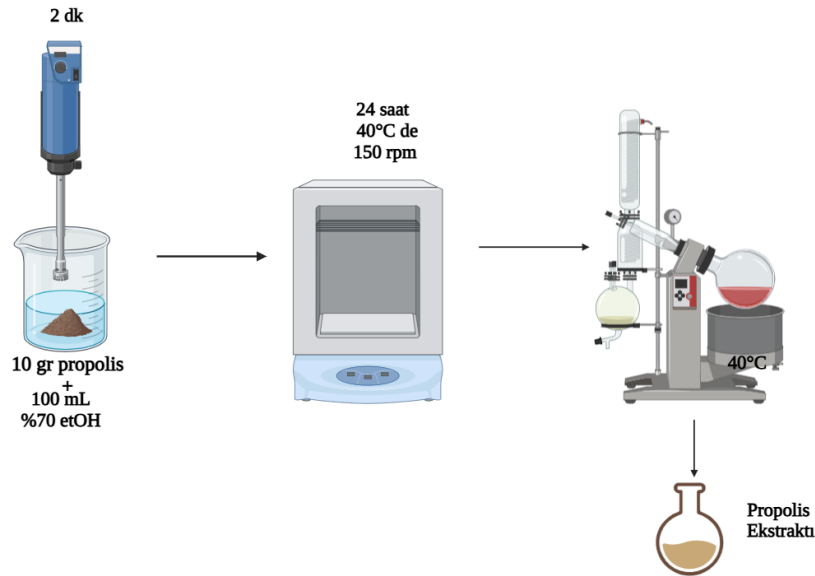
3.2. Kullanılan Kimyasal ve Hammaddeler

Etil alkol (C_2H_5OH), Metil alkol (CH_3OH), Sodyum hidroksit ($NaOH$), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) solüsyonu, Demir (II) klorür ($FeCl_2$), Ferrosin solüsyonu ($C_{20}H_{12}N_4Na_2O_6S_2$), Sodyum fosfat (NaH_2PO_4), Sülfürik asit (H_2SO_4), Amonyum molibdat ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}H_2O$), Folin-ciocalteu reaktifi (FCR), Sodyum karbonat (Na_2CO_3), Alüminyum klorür ($AlCl_3$), Sodyum Nitrit ($NaNO_2$), Gallik asit ($C_7H_6O_5$), Kuercetin ($C_{15}H_{10}O_7$), Butillenmiş hidroksi toluen (BHT), Beta hydroxy acid (BHA), Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA), α - tokoferol ($C_{29}H_{50}O_2$), Müller Hinton Broth, Mueller Hinton Agar, Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), Penicilin-Streptomycin, Trypsin-EDTA Solüsyonu, 2,3-Bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid (XTT).

3.3. Propolis Ekstraksiyonu

Sun ve ark. (2015), propolis ekstraksiyonunda tercih edilen çözücünün, fenolik bileşiklerin çeşitliliği ve verimi üzerinde belirleyici bir rol oynadığını rapor etmiştir (Sun vd., 2015). Cunha ve ark. (2004), çalışmalarında %70 etanol/su karışımının, propolis ekstraksiyonunda en yüksek fenolik bileşik miktarını ve en verimli özütü elde etmek için en uygun çözücü olduğunu belirtmişlerdir (Cunha vd., 2004).

Bu çalışmalar doğrultusunda propolis ekstraksiyonu için %70' lik etil alkol çözücü olarak tercih edilmiştir. Keskin ve ark.(2020) metodunda bazı değişiklikler yapılarak temin edilen ve ekstraksiyon öncesinde öğütülerek -18°C ' de muhafaza edilen propolisten 10 g alınmıştır. Ve 100 mL n-heksan ile IKA T 10 Basic Ultra Turrax marka homojenizatör kullanılarak 2 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Elde edilen homojen süspansiyon, 40°C ' de 150 rpm hızında çalışan çalkalayıcıda 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Ardından, süspansiyon filtre kağıdından süzülüş ve kalan pelet üzerine 100 mL %70 etanol eklenerek aynı koşullarda (40°C , 150 rpm, 24 saat) ikinci bir ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Elde edilen etanolik ekstrakt, filtre kağıdından süzildükten sonra rotary evaporatörde çözücüsü uzaklaştırılarak ham ekstrakt formunda elde edilmiştir (Keskin vd., 2020)



Şekil 3.3. Propolis ekstraksiyonun basamakları

3.4. Fenolik Bileşenlerinin LC-MS/MS Orbitrap Kütle Spektrometresi ile Analizi

Fenolik bileşikler, bir hidroksil (OH) grubunun bir benzen (aromatik halka) halkasına bağlanmasıyla oluşan organik bileşikler olup, besinlerin renk ve lezzetinde rol alırlar (Inui vd., 2014). Bu bileşikler, bitkilerin birçok zararlı etmen ve patojene karşı, ayrıca UV ışınlarına karşı korunmasında rol oynayan sekonder metabolitlerdir (Harborne ve Williams, 2000; Ullah vd., 2020). Koruma özelliklerinin yanı sıra, fenolik maddeler bitkiye kazandırdığı çeşitli renklerle polinatör böcekleri çekerek tozlaşmayı teşvik eder. Ayrıca, bitkilerde enerji transferi, fotosentez, bitki büyüme hormonlarının aktive edilmesi ve düzenlenmesi gibi pek çok önemli fonksiyonlara da sahiptirler (Shirley, 1996; Gómez-Caravaca vd., 2006).

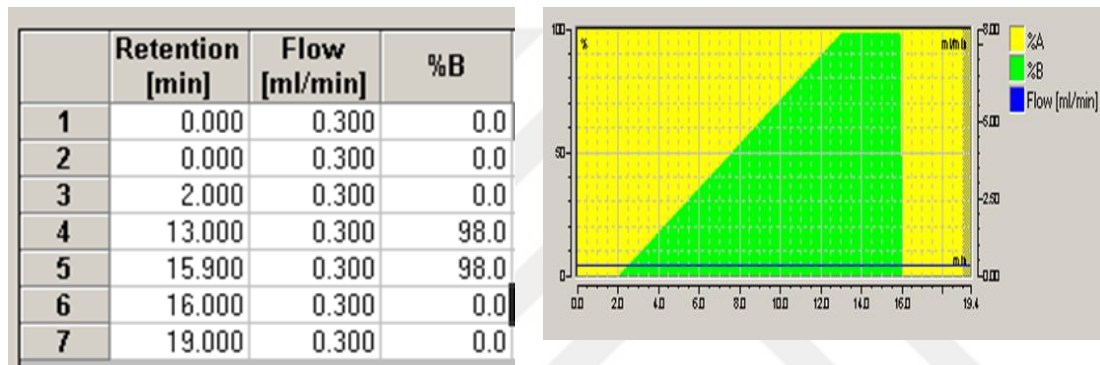
Propolisin koruyucu etkileri, biyolojik aktivitesinden sorumlu en önemli bileşik gruplarından biri olan fenolik bileşikler sayesinde ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, propolisin biyolojik etkinliğini ve fenolik bileşik çeşitliliğini belirlemek amacıyla LC-MS/MS analizi gerçekleştirilmiştir. Analizde kullanılan cihazın model ve teknik özellikleri aşağıda verilmiştir.

3.4.1. Sıvı Kromatografisi-Yüksek Çözünürlük Kütle Spektrometrisi Cihazı

LC-HRMS analizleri, DIONEX UltiMate 3000 RS pompası, DIONEX UltiMate 3000 RS otomatik numune alıcısı ve DIONEX UltiMate 3000 RS kolon firmı içeren LC sistemi ve ısıtılmalı elektrosprey iyonlaşma arayüzüne sahip Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) yüksek çözünürlüklü MS bileşimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Orbitrap-MS cihazı, bir otomatik şırınga enjektörü (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak pozitif (Pierce™ LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution) ve negatif kalibrasyon (Pierce™ Negative Ion Calibration Solution) solüsyonları ile kalibre edildi. Yapılan LC-HRMS analizlerinde LC ve MS kısmı sistem bilgisayarına yüklenmiş olan TraceFinder 3.2 (Thermo Scientific) programı ile eş zamanlı olarak çalıştırılmış, veriler Xcalibur software version 2.1.0.1140 (Thermo Fisher Scientific) programı ile toplanılarak kaydedilmiştir.

3.4.2. Kromatografi ve Yüksek Çözünürlüklü MS Koşulları

Gerçekleştirilen analizlerde Phenomenex® Gemini® 3µm NX-C18 110 Å (100 mm × 2mm) kolonu kullanıldı. Kolon fırın sıcaklığı 30 °C, elüsyon gradiyentinde hareketli A fazında Ultrapure su sistemi (GFL 2004/ Human power 1) ile elde edilen ultra safsu da hazırlanmış %2 (v/v) glasiyel asedik asit, hareketli B fazında %99,9 saflıkta LC-MS derecede metanol (Sigma) kullanılmıştır. Ayırım, numune enjeksiyon hacmi 20,0 µL ve 0,3 mL/dk akış hızında gradiyent elüsyon koşulları Şekil 3.4.' de belirtilen durumlara göre gerçekleştirildi. Analiz süresi toplam 20 dakika olarak ayarlanmıştır.



Şekil 3.4. Elüsyonda takip eden gradiyent koşulları

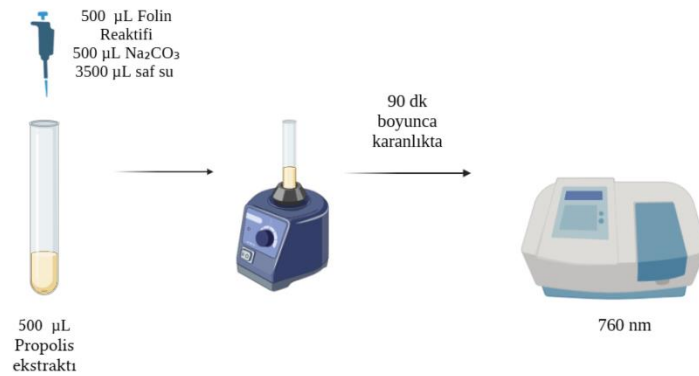
Isıtılmış bir elektrosprey iyonlaşma ara yüzü ile donatılmış Orbitrap HRMS hem pozitif (Full MS/AIF) hem de negatif (Full MS/AIF) modda çalıştırıldı. İyonlaştırma ara yüzü kılıf gaz (sheath gas) akış oranı 35; yardımcı gaz (auxiliarygas) akış oranı 7; sprej voltaj 3,5 kV; kapiler sıcaklığı 350 °C; yardımcı gaz (auxiliarygas) sıcaklığı 350 °C; S-lens RF seviyesi 50 olarak ayarlandı. MS tarama aralığı 60-800 m/z; resolution 17500; ACG target 3. 10⁶; maximum IT 2 ms; CE (çarpışma enerjisi, collision energy)/ step CE 25 V koşullarında gerçekleştirildi. LC-Orbitrap HRMS analiz metoduna ait fitokimyasal bileşikler için Apigenin standart konsantrasyonu 10ppb- 20ppb- 40ppb- 60ppb- 80ppb- 100ppb- 200ppb- 300ppb- 400ppb- 500ppb hazırlanarak her birinin üç tekrarlı şekilde enjeksiyonu yapıldı. Propolis stok çözeltisinden konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde 5 mL HPLC derecede etanol ve 5 mL %2 asedik asit-safsu karışımında hazırlandı. 10 mL şırınga yardımı ile gözenek büyüklüğü 0,22 mikrometre 25 mm çaplı PTFE şırınga filtreden süzülerek 1.5 mL vial içersinde cihaza enjeksiyonu yapıldı.

3.5. Antioksidan Analizler

Biyoaktif bileşiklerin sağlık üzerinde olumlu etkileri bitkisel kaynaklarda yaygın olarak bulunan kimyasal bileşenlerce sağlanmaktadır. Fenolik ve flavonoid bileşikler bu gruba dahil olup, antioksidan özellikleriyle dikkat çeker. Propolisin etil alkol ekstraktının biyoaktif özelliklerini belirlemek amacıyla toplam fenolik/ flavonoid içeriği ve içerdiği biyoaktif bileşiklerin antioksidan kapasitesini değerlendirmek için serbest radikal giderimi (DPPH), metal şelatlama ve toplam antioksidan kapasitesi analizleri uygulanmıştır. Antioksidan analizler için %70' lik etil alkol ekstraksiyonu sonunda elde edilen ham ekstreden 1 mg/mL olacak şekilde solüsyon hazırlanmış ve antioksidan analizlerde kullanılmıştır.

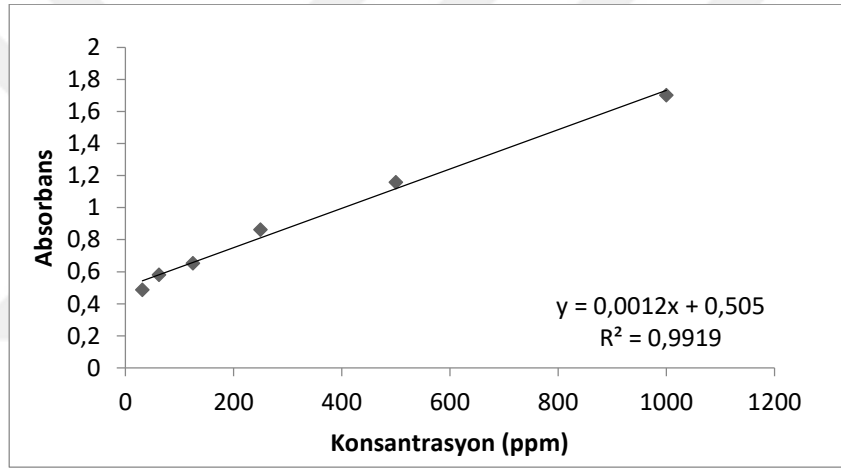
3.5.1. Toplam Fenolik Madde İçeriği

Hajji vd. (2010) yöntemine göre; propolis örneklerinin toplam fenolik madde analizleri yapılmıştır. 500 µL numunelerden deney tüplerine alınarak, üzerlerine 500 µL Folin reaktifi eklenmiştir. Daha sonra 500 µL Na₂CO₃ ve 3500 µL saf su eklenerek her bir deney tüpü vortekslenmiş ve karanlık laboratuvar şartlarında 90 dk boyunca bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda örnekler UV spektrofotometre (Shimadzu UV-1800 Spectrophotometer) de 760 nm absorbansta ölçülmüş ve sonuçlar gallik asit eşleniği olarak verilmiştir (Hajji vd., 2010).



Şekil 3.5. Toplam fenolik madde içeriğinin deney basamakları

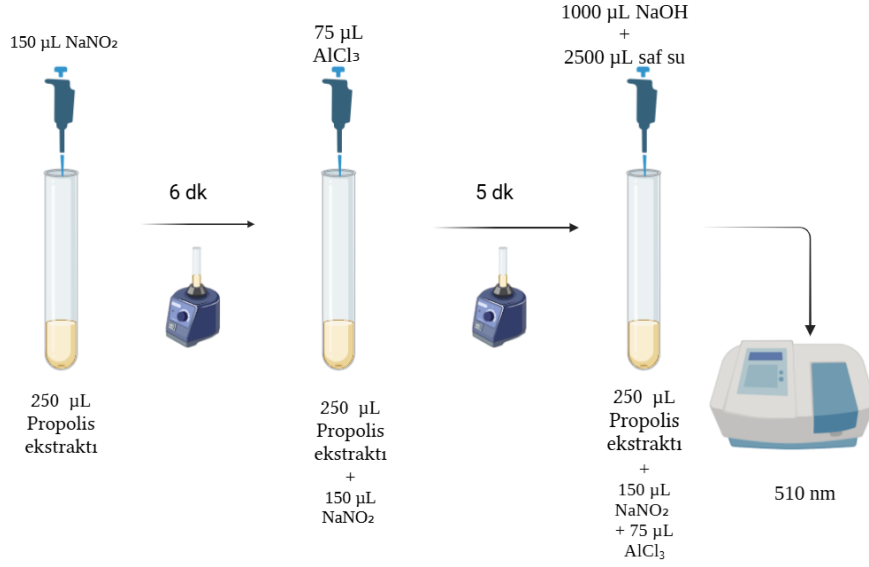
Toplam fenolik madde tayini, organik bir çözücünde çözünmüş fenolik bileşiklerin, alkali ortamda Folin-Ciocalteu reaktifi ile renkli kompleks oluşturması prensibine dayanır ve bu kompleksin absorbansı 760 nm dalga boyunda absorbans vermektedir. Fenolik bir madde olan gallik asit standart eğrinin hazırlanmasında kullanılmıştır (Slinkard ve Singleton, 1977). Gallik asitin 31,25-1000 ppm aralığında farklı konsantrasyonları hazırlanarak, 760 nm' deki absorbans değerleri y ekseninde ve konsantrasyon değerleri ise x ekseninde gösterilmiş ve bir standart çalışma grafiği hazırlanmıştır. Elde edilen standart çalışma grafiğinde absorbans (Şekil 3.6) konsantrasyonla doğru orantılı olup, elde edilen doğru denklemi $y = 0,0012x + 0,505$ olarak tespit edilmiş, propolis ekstraktlarındaki toplam fenolik madde $\mu\text{g GAE/mg}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.6. Gallik asit standardı ile hazırlanan standart kalibrasyon eğrisi

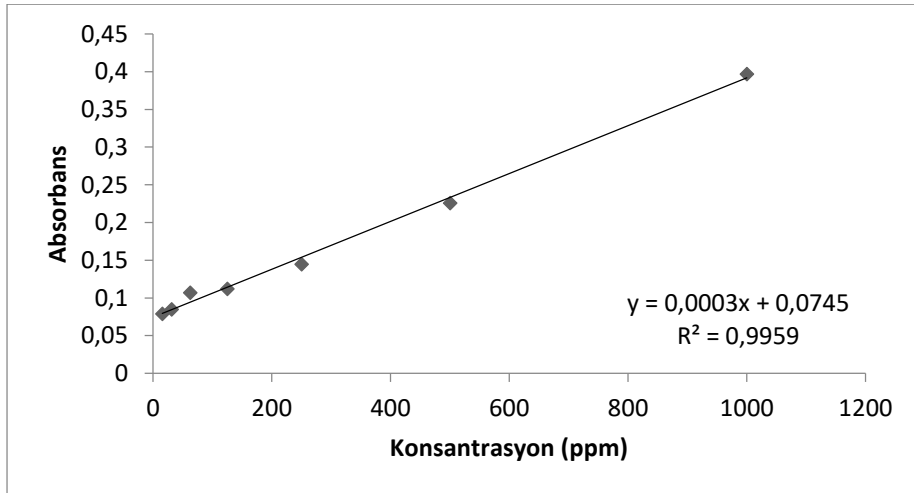
3.5.2. Toplam Flavonoid Madde İçeriği

Zhishen vd., (1999) metoduna göre propolis örneklerinin toplam flavonoid madde analizleri yapılmıştır. 250 μL numuneler deney tüplerine alınmış üzerlerine 150 μL NaNO_2 eklenmiş ve 6 dk bekletildikten sonra 75 μL AlCl_3 eklendi. 5 dk boyunca laboratuvar ortamında bekletilen deney tüplerine 1000 μL NaOH ve 2500 μL saf su eklenmiş ve her ekleme sonunda numuneler vortekslenmiş ve UV spektrofotometre (Shimadzu UV-1800 Spectrophotometer) de 510 nm de ölçümler alınarak sonuçlar kuercetin eşleniği olarak verilmiştir (Zhishen vd., 1999; Chang vd., 2002).



Şekil 3.7. Toplam flavonoid madde deney basamakları

Kuercetin 31,25-1000 ppm aralığında konsantrasyonları hazırlanmış, 510 nm' deki absorbans değerleri y ekseninde, konsantrasyon değerleri ise x ekseninde gösterilerek bir standart çalışma grafiği hazırlanmıştır. Elde edilen standart çalışma grafiğinde absorbans (Şekil 3.8) konsantrasyonla doğru orantılı olup, elde edilen doğru denklemi $y = 0,0003x + 0,0745$ olarak tespit edilmiş, propolis ekstraktlarındaki toplam flavonoid madde miktarı µg KE/mg olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.8. Kuercetin standardı ile hazırlanan standart kalibrasyon eğrisi

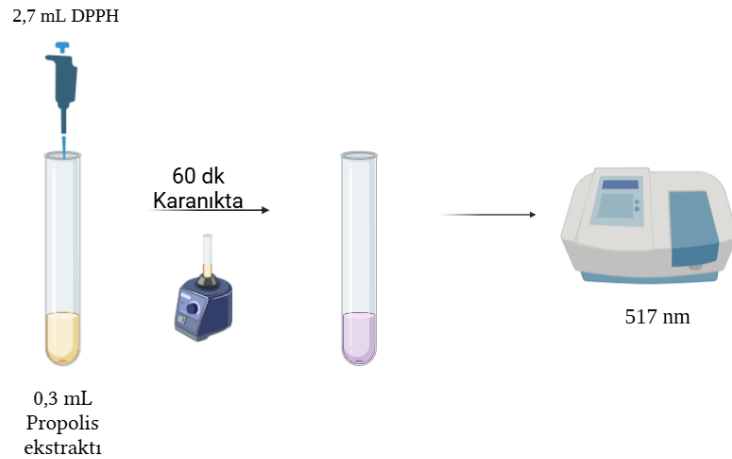
3.5.3. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite

Stabil ve ticari olarak temin edilebilen bir radikal olan DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), bir elektron veya hidrojen aldığı anda 517 nm dalga boyunda karakteristik bir absorban değişimi gösterir (Huang vd., 2005). Çeşitli doğal ürünlerin serbest radikal temizleme yeteneğinin ölçülmesi sıklıkla kullanılan bir metottur (Ahn vd., 2007). Hatano vd. (1998) yöntemine göre; 0.3 mL numunelerin üzerine 2.7 mL taze hazırlanan DPPH solüsyonu deney tüplerine eklenip vortekslendikten sonra 60 dk boyunca karanlık ortamda bekletilmiştir. Her örnek için 3 tekerrürlü ve bekleme süresi sonunda 517 nm'lik absorbansta UV spektrofotometresinde (Shimadzu UV-1800 Spectrophotometer) ölçümler alınmıştır (Hatano vd., 1988). Elde edilen sonuçlar % inhibisyon formülüne göre ve troloks eşleniği olarak sentetik antioksidanlardan BHA ve BHT ile kıyaslanarak sonuçlar verilmiştir.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{A_k - A_n}{A_k} * 100 \quad (3.1)$$

A_k : Kontrol numunesinin absorbanı

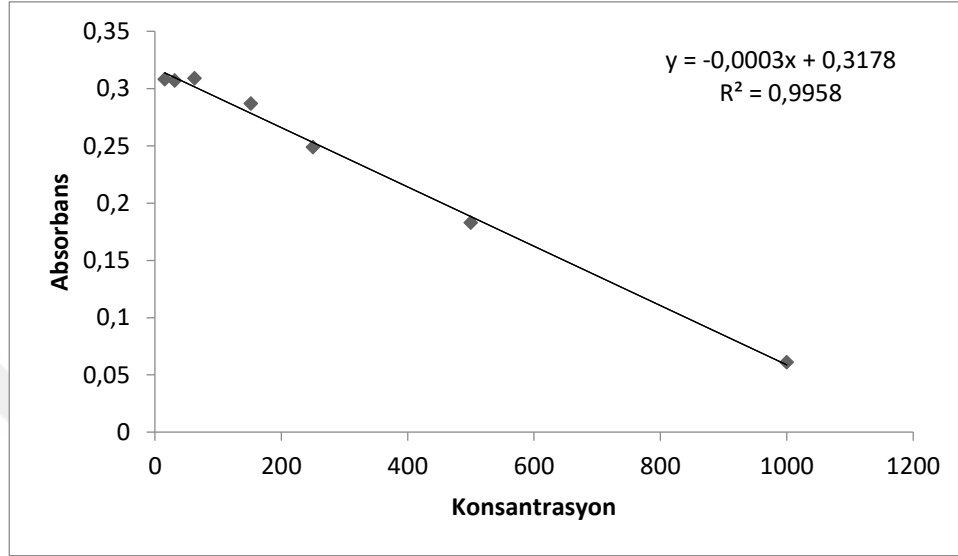
A_n : Örnek numunesinin absorbanı.



Şekil 3.9. DPPH radikal süpürücü aktivite deney basamakları

Troloks 31.25-1000 ppm aralığında konsantrasyonları hazırlanmış, 517 nm'deki absorban değerleri y ekseninde, konsantrasyon değerleri ise x ekseninde gösterilerek bir

standart çalışma grafiği hazırlanmıştır. Elde edilen standart çalışma grafiğinde absorban (Şekil 3.10) konsantrasyonla doğru orantılı olup, elde edilen doğru denklemi $y = -0,0003x + 0,3178$ olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3.10. Troloks standardı ile hazırlanan standart kalibrasyon eğrisi

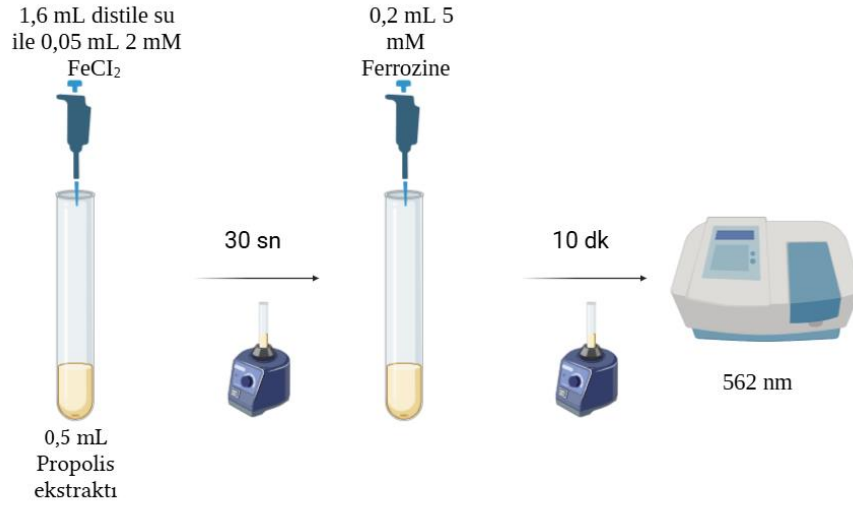
3.5.4. Metal Şelatlama Aktivitesi

Yöntemin genel prensibi ferrik 2,4,6-tripiridyl-s-triazin kompleksinin (Fe^{+3} -TPTZ) antioksidan madde varlığında mavi ferrous formuna (Fe^{+2} -TPTZ) indirgenmesi esasına dayanmaktadır (Benzie ve Szeto, 1999). Metal şelatlama aktivitesinin belirlenmesi için Dinis vd. (1994) metolarında ufak modifikasyonlarla; 0,5 mL propolis ekstratı örneklerinden deney tüplerine alınmış ve üzerine 1,6 mL distile su ile 0,05 mL 2 mM FeCl_2 eklenerek hızlıca vortekslenmiştir. 30 saniye sonra 0,2 mL 5 mM Ferrozine eklenerek tekrar vortekslenmiş ve 10 dk boyunca oda sıcaklığında bekletildikten sonra 562 nm' lik absorbansta Shimadzu UV-1800 Spectrophotometer cihazıyla ölçümler alınmıştır. Elde edilen sonuçlar % inhibisyon formülüne göre hesaplanmıştır (Dinis vd., 1994).

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{A_k - A_n}{A_k} * 100 \quad (3.2)$$

A_k : Kontrol numunesinin absorbanı

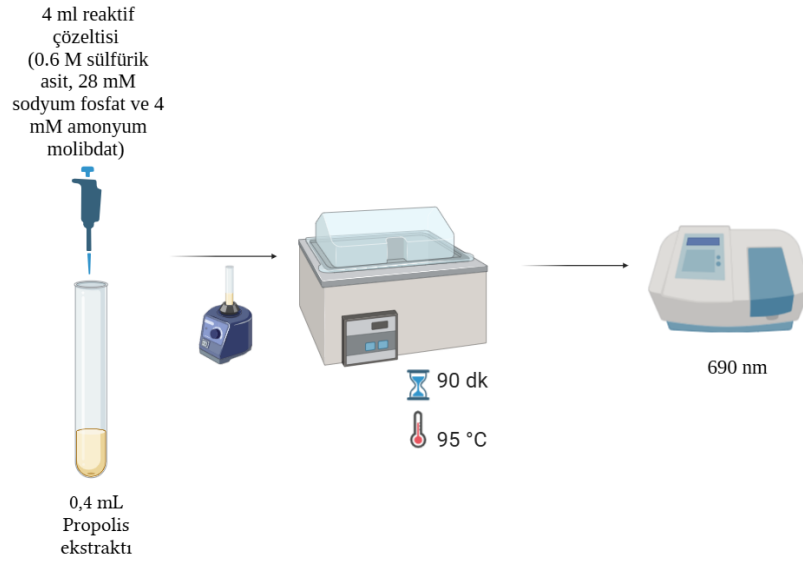
A_n : Örnek numunesinin absorbanı



Şekil 3.11. Metal şelatlama aktivitesi deney basamakları

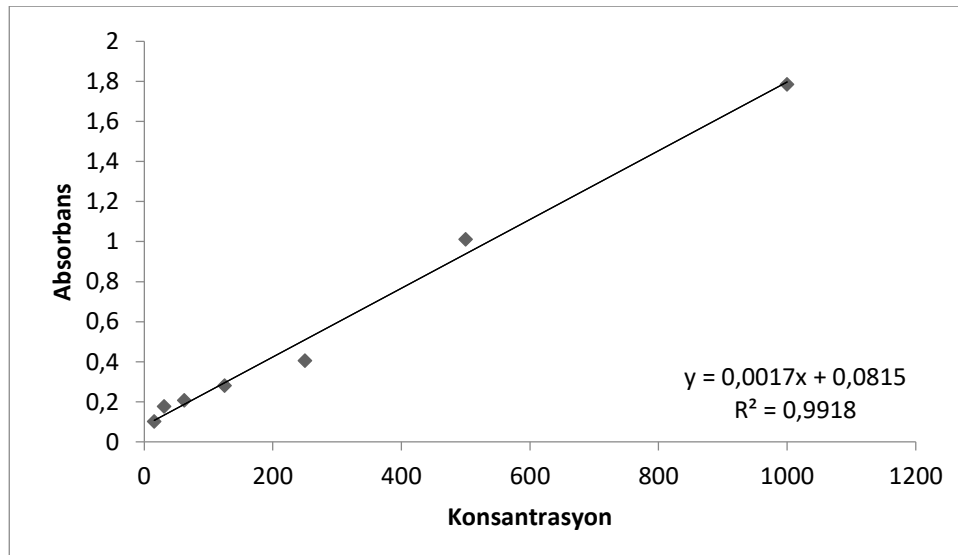
3.5.5. Toplam Antioksidan Kapasitesi

Propolis ekstraktının toplam antioksidan kapasitesi fosfomolibden metodula belirlenmiştir. Bu metodunun temel prensibi, ekstraktlar tarafından Mo (VI)'nın Mo (V)'e indirgenerek asidik ortamda yeşil fosfat Mo (V) bileşiğinin oluşmasıdır (Özden vd., 2017). Prieto ve arkadaşları (1999), çalışmalarına göre değerlendirilmiş ve α - tokoferol eşdeğeri olarak ifade edilmiş, kısaca, 0,4 mL etanolde çözdürülmüş ekstraktlar ile 4 mL reaktif çözeltisi (0,6 M sülfürik asit, 28 mM sodyum fosfat ve 4 mM amonyum molibdat) vorteks ile karıştırıldıktan sonra su banyosunda 90 dk. süreyle 95°C' de bekletilmiş ve 695 nm' lik absorbansta Shimadzu UV-1800 Spectrophotometer cihazıyla ölçümleri yapılmıştır. Toplam antioksidan kapasitesi α - tokoferol eşleniği olarak hesaplanmıştır (Prieto vd., 1999).



Şekil 3.12. Toplam antioksidan kapasitesi deney basamakları

α - tokoferol 31,25-1000 ppm aralığında konsantrasyonları hazırlanmış, 690 nm' deki absorbans değerleri y ekseninde, konsantrasyon değerleri ise x ekseninde gösterilerek bir standart çalışma grafiği hazırlanmıştır. Elde edilen standart çalışma grafiğinde absorbans (Şekil 3.13) konsantrasyonla doğru orantılı olup, elde edilen doğru denklemi $y = 0,0017x + 0,0815$ olarak tespit edilmiştir. Propolis ekstraktlarındaki toplam antioksidan kapasite $\mu\text{g } \alpha\text{-tokoferol/mg}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.13. α -tokoferol standardı ile hazırlanan standart kalibrasyon eğrisi

3.6. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Mikroorganizmaların antimikrobiyallere karşı hassasiyetlerini belirlemek amacıyla farklı antibiyotik duyarlılık testleri bulunmaktadır. Antibiyotik duyarlılık testleri arasında en çok kullanılan testler;

1. Disk difüzyon testleri
2. Dilüsyon testleri
 - A. Agar dilüsyon testleri
 - B. Broth dilüsyon testleri
 1. Makrodilüsyon
 2. Mikrodilüsyon
3. Gradient strip testleri (E-test)
4. Otomatize yöntemler (Vitec) olarak farklı yöntemler bulunmaktadır (Başustaoğlu vd., 2020).

Propolis özütlerinin antimikrobiyal etkileri; ilk çağlardan günümüze kadar bilinmiş, kullanılmış ve araştırma konusu olmuştur. Propolisin çeşitli bakteri, mantar, virüs ve diğer mikroorganizmalara karşı etkilerine ilişkin çok sayıda bilimsel çalışma bulunmakta ve bu çalışmalar tıp, diş hekimliği ve eczacılık gibi alanlarda kullanıma uygun propolis üretimine olanak sağlamaktadır (Bakkaloğlu ve Arici, 2019). Propolisin antimikrobiyal aktivitesi, yüksek flavonoid içeriğine atfedilmiş; ayrıca içerdiği bileşiklerin sinerjik etkilerinin de bu aktivitede önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Santos vd., 2002; Trusheva vd., 2007; Silva vd., 2008). Propolis, sitoplazmik membranı etkileyerek bakterilerin hareketliliğini yavaşlatmakta ve enzim aktivitesini inhibe ederek antimikrobiyal etkinlik göstermektedir (Mirzoeva vd., 1997). Güçlü bakteriyostatik ve bakterisidal etkileri, hücre bölünmesini önlemesi, protein sentezini ve bakteri büyümesini inhibe etmesi gibi birleşik mekanizmalarla ilişkilendirilmiştir (Havsteen, 1983; Oksuz vd., 2005). *In vitro* ortamda propolis, mikroorganizmalara doğrudan etki edebilirken, *in vivo* bağışıklık sistemini uyararak mikroorganizmaların yok edilmesinde rol oynayan mekanizmaları aktive edebilmektedir (Sforcin ve Bankova, 2011).

Propolis özütlerinin gram (+) bakterilere karşı gram (-) bakterilere oranla daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu doğrulanmıştır (Przybyłek ve Karpiński, 2019).

Gram-negatif bakterilerin dış zarının türlere özgü yapısı ve propolisin aktif bileşenlerini parçalayan hidrolitik enzimlerin üretimi, bu farklılığın sebebi olarak bildirilmektedir (Sforcin, 2016).

Streptococcus, *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *Corynebacterium* ve *Staphylococcus* cinsi bakterilerin ağızın normal florasında bulunduğu ve diş çürüklerine neden olabileceği bildirilmiştir (Rowe vd., 1976; Slots, 1977; Park vd., 1998; Leistevo vd., 2000; Yabao vd., 2005; Adekoya-Sofowora vd., 2006). Özellikle *Streptococcus*, *Lactobacillus* ve *Staphylococcus* cinsine ait mikroorganizmalara karşı propolisin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi, diş çürüklerinin tedavisinde propolisin kullanımına yönelik yeni olanaklar sunacaktır.

3.6.1. Disk Difüzyon Yöntemiyle Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesi

Müller hinton broth ve Müller hinton agar besiyerleri prosedürlerine uygun şekilde hazırlandıktan sonra kullanılacak tüm malzemeler ile birlikte sterilizasyonu yapılmıştır. Biyogüvenlik kabini içerisinde stok bakterilerden ekimleri gerçekleştirilen *Streptococcus mutans* (ATCC 35688), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 9224), *Porphyromonas gingivalis*, (ATCC 33277), *Saccharomyces cereviceae* (ATCC 9763), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Escherichia coli* (ATCC-25922) ve *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) suşları, 24 saatlik inkübasyonun ardından, yaklaşık $1,5 \times 10^8$ cfu/mL bakteri yoğunluğuna karşılık gelen 0.5 McFarland standardına göre hazırlanarak testlerde kullanılmak üzere standartlaştırılmıştır. Konsantrasyonu ayarlanan bakterilerin stoklarından tek kullanımlık steril petrilere 100 µL bakteri olacak şekilde ekimleri gerçekleştirilmiştir (Andrews, 2001). Bakteri ekimi yapılan petri kaplarına propolis ekstresinin 2 mg, 4 mg, 8 mg ve 16 mg konsantrasyonlarından her birinden 20 µL olacak şekilde disklere emdirildikten sonra petri kaplarına yerleştirilmiştir. 24 saat boyunca 37.5 °C’ de etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda elde edilen inhibisyon zon çapları, bakterilerin pozitif kontrol olarak kullanılan penisilin-streptomycin antibiyotiğine karşı ve negatif kontrol olarak DMSO' nun antimikrobiyal duyarlılıkları ile kıyaslanmıştır (Ozturk vd., 2015).

3.6.2. Minimal İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) Belirlenmesi

Bakteri üremesinin gözlenmediği en düşük konsantrasyon ‘MİK’ (Minimum İnhibitör Konsantrasyon) değeri olarak tanımlanır (Ozkan vd., 2009). Bu çalışmada, propolis ekstresi ve propolis içeren şekerlerin; *Streptococcus mutans* (ATCC 35688), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 9224), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Escherichia coli* (ATCC 25922) ve *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) suşlarına karşı minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri, sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Propolis ekstresi için 15,625– 800 µg/mL, propolisli şekerler için ise 0,097– 50 mg/mL konsantrasyon aralığında seri dilüsyonlar, Mueller-Hinton sıvı besiyeri kullanılarak hazırlanmış ve mikrodilüsyon plakalarına aktarılmıştır. Daha sonra, 0,5 McFarland standardında hazırlanan mikrobiyal süspansiyonlar, her bir kuyucuktaki son bakteri konsantrasyonu 5×10^5 CFU/mL olacak şekilde plaklara eklenmiştir. Mikroplaklar, 37 °C’ de 24 saat inkübe edilmiş; inkübasyon süresi sonunda mikroorganizma üremesini inhibe eden en düşük konsantrasyon, ilgili maddenin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) olarak kaydedilmiştir (Tanrıverdi vd., 2020; Balkan vd., 2021).

3.6.3. Minimal Bakterisidal Konsantrasyonunun (MBC) Belirlenmesi

Minimal bakterisidal konsantrasyon (MBC), canlı mikroorganizmaların %99,9’ unu öldürmek için gerekli en düşük bakterisidal konsantrasyon olarak tanımlanır. MBC testi, MİK testinin devamı niteliğinde gerçekleştirilir (Aamer vd., 2014). Test materyallerinin MBC değerlerini belirlemek amacıyla, 96 kuyucuklu mikrodilüsyon plakasında belirlenen MİK değerine karşılık gelen kuyucuktan bir önceki ve iki sonraki kuyucuklardan 10’ ar µL örnek alınarak Müller-Hinton agar besiyerine inoküle edilmiştir. Agar plakları 37 °C’ de 18-24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bakteri üremesinin gözlenmediği, yani koloni oluşumunun olmadığı agar plağı MBC olarak kabul edilmiştir. MİK konsantrasyonları dikkate alınarak, MBC değerleri mg/mL ve µg/mL cinsinden belirlenmiştir. Üreme görülmeyen ilk agar plağı MBC değeri olarak kaydedilmiştir.

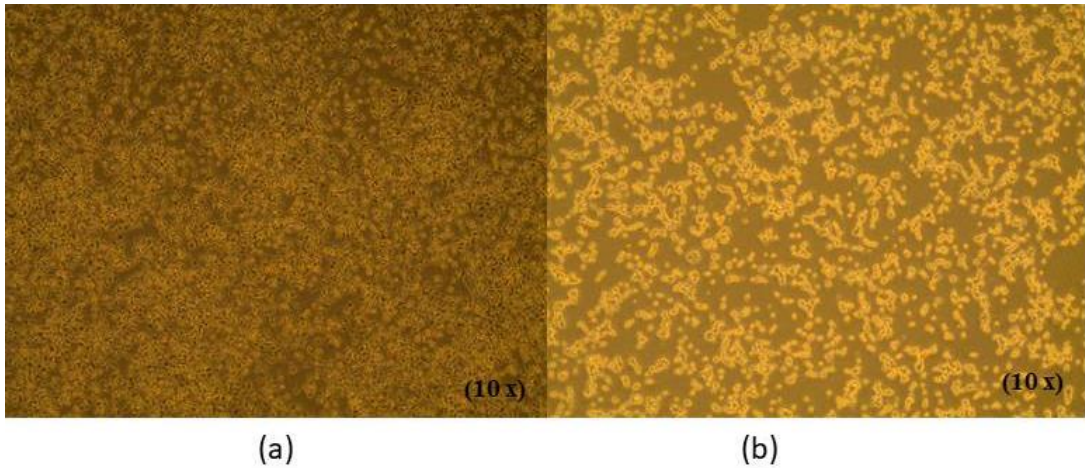
3.7. Sitotoksisite Çalışmaları

Sitotoksik terimi, hücre ölümüne veya hücrelerin zarar görmesine neden olan anlamına gelmektedir. Sitotoksisite araştırmaları ise belirlen bir maddenin belirli konsantrasyonlarda sitotoksik potansiyelinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılan araştırmalardır (Riss ve Moravec, 2004). Sitotoksisite kullanılan maddenin konsantrasyonuna ve maruziyet süresine göre hücrelere değişik derecelerde zarar veren bir olaydır. Hücreler, sitotoksik maddelere maruz bırakıldıklarında apoptoz, otofaji ve nekroza uğrayıp ölebilir ya da sitostazis nedeniyle proliferasyon özelliklerini kaybedebilirler (Galluzzi vd., 2009). Hücre bazlı sitotoksisite çalışmalarıyla kullanılan maddenin sitotoksik etkileri hakkında bilgi edinilebilir (Riss ve Moravec, 2006). Sitotoksite çalışmalarının önemli basamağı deneysel olarak farklı bir çok etkenlere maruz bırakılan hücrelerin, maruziyet sonrasında hücre canlılıklarının belirlenmesidir (Niles vd., 2007).

3.7.1. Propolis ve Model Ürünün Fibroblast Hücrelerine Sitotoksik Etkisi

3.7.1.1. Hücrelerin temini

İnsan Gingival Fibroblastları (HGF) ve Human Dermal Fibroblast (HDF) hücreleri Gülhane Sağlık Bilim Enstitüsünden temin edilmiş ve hücreler pasajlanarak çalışmalarda kullanılacağı zamana kadar -80 °C’ de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.14. HDF (a) ve HGF (b) hücre hatlarının mikroskop görüntüleri (x10)

3.7.1.2. Besiyeri Hazırlama

Hücrelerin büyüme, çoğalma ve canlılıklarını sürdürebilmesi için laboratuvar ortamında hazırlanmış besiyerlerine ihtiyaç duyulmaktadır. 500 mL DMEM (Dulbecco's Modified High Medium) üzerine %10 Fetal Bovine Serum (FBS) ve %1 Penicillin-Streptomycin ilave edilmiştir. Hazırlanan besiyeri hücrelerin pasajlanması ve ekimi gibi işlemlerde kullanılmak üzere +4 °C' de saklanmıştır.

3.7.1.3. Hücre Kültürü

Steril bir çalışma ortamı sağlamak için biyogüvenlik kabini açılmış ve yüzeyler %70 etil alkol ile dezenfekte edildikten sonra kullanılacak tüm malzemeler, %70 etil alkol ile sterilize edilerek kabin içerisine yerleştirilmiştir. HGF ve HDF hücre hatları, -80 °C'den çıkarılarak oda sıcaklığında çözünmeye bırakılmış, ardından 37 °C'de bir su banyosunda 1-2 dakika boyunca çözümleri sağlanmıştır. Çözülen hücreler streil biyogüvenlik kabininde falcon tüpüne aktarılmış ve pipetaj yapılarak karışım homojenleştirildikten sonra 4500 rpm' de 5 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminden sonra tüp tabanında toplanan hücre pelletine temas etmeden üstteki sıvı kısım dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti üzerine 2 mL taze besiyeri eklendikten sonra ve tekrardan pipetaj yapılarak homojen bir karışım elde edilmiştir. Bu karışım, 75 cm²' lik havalandırılmalı kültür flasklarına aktarılmış ve 37 °C'ye kadar önceden ısıtılmış tam besiyeri ile desteklenmiştir. Flasklar, %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş bir inkübatöre yerleştirilmiştir. Hücreler, yaklaşık %80-90 konfluense ulaştıklarında deneylerde kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

3.7.1.4. Hücrelerin Pasajlanması (Çoğaltılması)

Hücreler plato fazına ulaştığında, besiyerinin yetersiz hale gelmesi ve yapışma yüzeyinin sınırlı olması nedeniyle hücre ölümleri gözlenmeye başlar. Bu durumun önüne geçmek için hücrelerin, büyüme ve bölünme hızlarının en yüksek olduğu geç logaritmik fazda pasajlanmaları gerekmektedir. Konfluens seviyesi yaklaşık %80-90'a ulaştığında, hücreler ya pasajlanmalı ya da uzun süreli saklama için uygun koşullarda dondurularak stoklanmalıdır (Phelan ve May, 2015). Trypsin enzimi, proteinlerin parçalanmasının da

görev alan bir proteaz enzimidir. Besiyeri içerisinde yer alan FBS tripsinin inhibitörlerini içermektedir. Tripsinizasyon işleminde, tripsin enzimi yüzeye yapışan hücrelerin flask tabanından ayrılması sağlanmaktadır (Sandell ve Sakai, 2011). Hücreler yeterli konfluense ulaştıklarında flask içerisindeki besiyeri uzaklaştırıldı 6 mL tripsin eklenmiş ve CO₂ inkübatör de 4-5 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra flask mikroskopta bakılarak hücrelerin çoğunluğunun yüzeyden ayrıldığı görülmüş ve yapışık halde olan hücreler için de flask tabanına hafifçe vurularak tabandan hücrelerin ayrılması sağlanmıştır. Sonrasında flask içerisine tripsinin 2 katı besiyeri eklenmiş ve pipetaj yapılarak tabandaki tüm hücre toplanmıştır. Bu karışım 15 mL' lik falkon tüpe alınmış ve 4500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstte kalan süpernatant atılmış ve pellet içerisine taze besiyerinden 2 mL eklenip homojenize edilmiştir. Bu aşamadan sonra hücrelerin miktarını belirlemek için sayım yapılmıştır.

3.7.1.5. Hücre Sayımı

Hücre kültürü çalışmaların en önemli basamaklarından biride hücre sayımı basamağıdır. Trypan blue boyası kullanarak canlı hücreleri saymak, canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için hücre biyolojisinde yaygın bir yöntemdir. Tripsin kullanarak hücreleri kaldırdıktan sonra, 1:1 oranında trypan blue boyası ve hücre süspansiyonu dikkatlice karıştırılmıştır. Thoma lamı üzerinde lamel yerleştirilir. Santrifüj tüpü içerisinde hazırlanan boya ve hücre karışımından 10 µL alınır. Thoma lamına dikkatlice yüklemesi yapılır ve mikroskop yardımıyla hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Sayımda hücrelerin ortalamaları alınmış ve hücre süspansiyonunun mL'sinde kaç hücre olduğu formül kullanılarak hesaplanmıştır. Yapılacak çalışmadaki kullanılacak hücre sayısı göz önüne alınarak hücre süspansiyonundan kaç mL'ye ihtiyaç olduğu hesaplanmış ve uygulamaya geçilmiştir.

3.7.1.6. Hücre Canlılığı

Hücre canlılığını ölçmek için birçok farklı test yöntemi kullanılmaktadır ve bu testler, biyolojik ve ilaç araştırmalarında önemli bir rol oynar (Scudiero vd., 1988). Sitotoksosite çalışmalarında önemli olan çalışma sonundaki canlı/ölü hücre miktarının belirlenmesidir (Riss ve Moravec, 2006). Hücre canlılığı testleri, hücre sağlığı ve işlevselliği hakkında bilgi sağlar. Sitotoksosite çalışmalarında yaygın olarak kullanılan yöntemler arasında

kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik ölçümler bulunur (Crouch vd., 1993; Fan ve Wood, 2007; Longo-Sorbello vd., 2006). Kolorimetrik yöntemlerde, tetrazolyum tuzları (ör. MTT, MTS, XTT, WST) kullanılarak renk değişimi veya boya maddeleri (ör. kristal viyole, nötral kırmızısı) ile spesifik boyanması esasına dayalı ölçüm yapılır (Borenfreund ve Puerner, 1985; O'Connor vd., 1998; Riss ve Moravec, 2006; Feoktistova vd., 2016). XTT testi, metabolik olarak aktif hücrelerde mitokondriyal dehidrojenaz enzimlerinin XTT'yi indirgemesiyle gerçekleşir. Bu reaksiyon sonucu suda çözünebilen bir formazan boya oluşur ve bu boya spektrofotometre ile ölçülebilir. Üretilen formazan miktarı, hücre canlılığı ile doğru orantılıdır ve bu nedenle hücre canlılığını ölçmek için güvenilir bir yöntemdir (Scudiero vd., 1988). Çalışmamızda kullanılan XTT testi, güvenilirliği yüksek, tekrarlanabilirliği kolay ve sitotoksisite değerlendirmelerinde sıkça tercih edilen bir kolorimetrik yöntemdir (Tokur ve Aksoy, 2017). 96'lık well plakalarının her bir kuyucuğuna 1×10^4 hücre ekimi yapıldıktan sonra plakalar, 37 °C ve %5 CO₂ içeren bir inkübatöre yerleştirilmiştir. Hücreler 24 saat boyunca inkübatörde bekletilmiş, ardından plakadaki besiyeri çekilip atılmış ve tedavi dozları hesaplanarak her kuyucuğa 100 µL besiyeri + numune karışımı eklenmiştir. Kullanılan konsantrasyonlar, propolis ekstraktı için 31,25-1000 µg/mL, şeker numuneleri için ise 15,625-50 mg/mL aralığında kullanılmıştır.

Seri dilüsyon işlemi şu şekilde gerçekleştirildi; ilk kuyucuğa 200 µL numune diğer kuyucuklara ise 100 µL besiyeri eklenmiştir. Daha sonra, ilk kuyucuktan 100 µL numune alınıp ikinci kuyucuğa aktarılmış ve bu işlem pipetaj yapılarak son kuyucuğa kadar tekrarlanmıştır. Hücrelere ilaç uygulandıktan sonra well plakalar, 37 °C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat daha bekletilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, XTT çözeltisi aktivasyon çözeltisiyle karıştırılarak XTT'nin aktif hale gelmesi sağlanmıştır. Aktifleşmiş XTT'den 50 µL alınarak, 100 µL kültür ortamı içeren hücrelerle kaplı kuyucuklara eklenmiş ve plakalar 4 saat boyunca inkübatörde bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda, plakalar ELISA mikrolaka okuyucu cihazı kullanılarak 450 ve 630 nm dalga boylarında ölçülmüştür. Alınan absorbans değerlerinin ortalamaları hesaplanmış ve buna dayanarak % hücre canlılık oranları belirlenmiştir.

$$\% \text{ Hücre Canlılık} = \frac{A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} * 100 \text{ formülüyle hesaplanmıştır.} \quad (3.3)$$

3.8. Model Ürün (Sert Şekerleme)

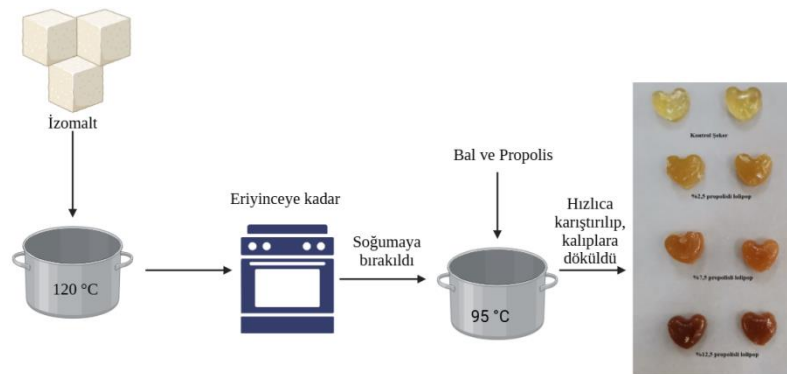
Yüksek miktarda şeker tüketimi, üretim sürecinde ısı ile işlemle oluşan akrilamid ve 5-hidroksimetil-2-furaldehit gibi kirletici maddeler ile yapay gıda katkı maddelerinin kullanımı, özellikle çocuklar başta olmak üzere halk sağlığını olumsuz etkilemektedir (Mutlu et al., 2018). Bu nedenlerle, bal ile tatlandırılmış ve şeker alkollerinden biri olan izomalt kullanılarak, üç farklı konsantrasyon da propolis içeren sert şekerlemeler üretilmiştir.

3.8.1. Model Ürün Formülasyonları

Tablo 2’ de belirtilen miktarlardaki izomalt, yapışmaz bir tava içinde ısıtılarak sıvı hale getirilmiştir. Eriyen izomaltın ilk sıcaklığı 117 °C olarak ölçülmüş, sıcaklığın 95 °C’ ye düşmesinin ardından bal ve propolis eklenmiştir. Karışım iyice homojen hale gelene kadar karıştırıldıktan sonra lolipop kalıplarına dökülmüş ve soğumaya bırakılmıştır.

Tablo 3.2. Model ürün formülasyonları

Numune Adı	İzomalt	Bal	Propolis
%2,5 propolisli şeker	30 gr izomalt	10 gr bal	1 mg propolis
%7,5 propolisli şeker	30 gr izomalt	10 gr bal	3 mg propolis
%12,5 propolisli şeker	30 gr izomalt	10 gr bal	5 mg propolis
Kontrol şeker	30 gr izomalt	10 gr bal	----

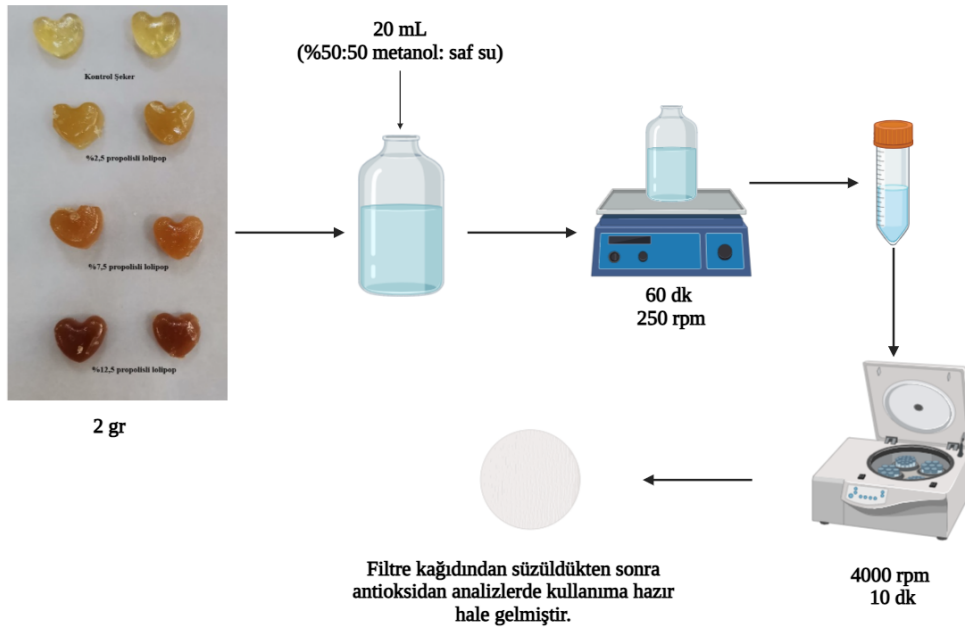


Şekil 3.15. Model ürünlerin oluşum basamakları

3.8.2. Model Ürün Analizleri

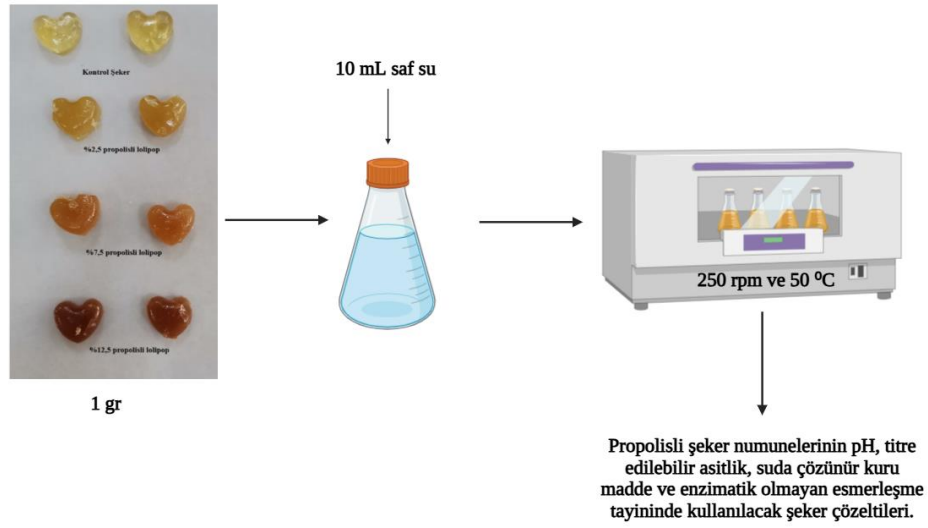
3.8.2.1. Analizler İçin Ön Hazırlıklar

Güldane (2014) ve Muzzaffar ve ark. (2016) metotları uyarlanarak toplam fenolik ve flavonoid madde içeriği ve DPPH serbest radikal tutucu aktivite analizleri için şekerleme ekstraktları elde edilmiştir. 2 ± 0.08 g şekerleme örneği tartılarak 50 mL' lik santrifüj tüplerine alınmıştır. Örneklerin üzerine 20 mL (%50:50 metanol: saf su) çözelti eklenerek çalkalayıcı inkübatörde 250 rpm' de şekerler eriyene kadar çalkalanmıştır. Örnekler 1 saat çalkalayıcı inkübatörde 250 rpm' de çalkalandıktan sonra santrifüjde 4000 rpm' de 10 dk santrifüj edildikten sonra filtre kağıdından santrifüj tüplerine süzölmüştür. Elde edilen şekerleme ekstraktları $+4$ °C buzdolabında saklanmıştır (Güldane, 2014; Muzzaffar vd., 2016).



Şekil 3.16. Antioksidan analizler öncesi hazırlık basamakları

Propolisli şeker numunelerinin pH, titre edilebilir asitlik, suda çözünür kuru madde ve enzimatik olmayan esmerleşme tayini deneyleri için lolipop numuneleri 1:10 (g/ml) oranında saf su ilave edilmiş ve çalkalayıcı inkübatörde 250 rpm ve 50 °C sıcaklıkta şekerler tamamen çözünene kadar bekletilmiştir ve deneylerde kullanılmıştır.



Şekil 3.17. Şeker analizleri için kullanılacak çözeltilerin hazırlanma basamakları

3.8.2.2. HMF Analizi

HMF (5-Hidroksimetilfurfural), nişasta, glikoz, süktroz, inülin, selüloz gibi monomerik ve polimerik karbonhidratlardan türeyen heksozların (C6), asit ve ısı katalizörlü dehidrasyonu sonucunda meydana gelmektedir. Ayrıca, enzimatik olmayan esmerleşme (Maillard reaksiyonlarının) bir ara ürünü olarak da ortaya çıkmaktadır (Kuster, 1990; Teong vd., 2014).

Sert şekerleme ürünlerinde, özellikle yüksek sıcaklıkta pişirme veya erime işlemleri sırasında şekerlerin termal bozunması sonucu HMF oluşumu artabilmektedir. Bu çalışmada, sert şeker örneklerinin HMF miktarları Pikom Arge-Ürge Merkezi'nde, Agilent 1260 Infinity II LC Sistemi kullanılarak yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) yöntemiyle belirlenmiş; analizlerde dörtlü pompa, UV-DAD dedektör, otomatik örnekleyici, gaz giderici ve kolon fırını gibi sistem bileşenlerinden faydalanılmıştır

3.8.2.3. pH Değeri

Şekerleme örneklerinde pH ölçümü yapılmadan önce, pH metre gerekli tampon çözeltisiyle kalibre edilmiştir. Farklı propolis miktarlarına sahip şeker numunelerinin çözeltileri ön hazırlık kısmında belirtilen yöntemle hazırlandıktan sonra, Ohaus marka pH

metre ile 25°C' de ölçülmüştür. Her bir örnek için üç tekrar olacak şekilde ölçüm alınmıştır (Tireki, 2017).

3.8.2.3. Renk Analizi

Hazırlanan propolisli şeker örneklerinin renk analizleri Konica Minolta renk tayin cihazı (Chroma meter CR-5, Konica Minolta, Japonya) kullanılarak ölçülmüştür. Ölçülen değerlerde L* [beyaz (100) / siyah (0)], a* [kırmızılık (+) / yeşillik (-)], b* [sarılık (+) / mavilik (-)] değerlerini vermektedir. Ölçümler 3 tekerrürlü olacak şekilde yapılmıştır. Ürünler cihazın başlığının üzerine koyulan kolorimetre kabının içine birer birer yerleştirmek sureti ile ölçüm yapılmıştır. Her ürün için 3 ayrı ölçümde de örnekler değiştirilmiş ve böylece her bir örnekte farklı alanların renk ölçümü gerçekleştirilmiştir (Yılmaz vd., 2019).

3.8.2.4. Titre Edilebilir Asitlik Tayini

Gıdada asitlerin; renk, tat, aroma ve tekstür oluşumu üzerindeki etkilerini ve ayrıca gıdaların depolanmaya dayanıklılıklarını belirlemek amacıyla asitlik tayini yapılmaktadır (Ünal, 2021). Farklı propolis miktarlarına sahip şeker numunelerinin ekstreleri, 3.8.2.1. Analizler İçin Ön Hazırlıklar kısmında belirtilen yöntemle hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerden 5 mL alınarak üzerlerine 5 damla fenolftalein indikatörü eklenmiştir. Çözeltiye, 0.1 N NaOH çözeltisi pembe renk oluşana kadar damlatılarak, harcanan NaOH miktarı kaydedilmiştir. Şekerlemenin titre edilebilir asitliğini belirlemek için aşağıdaki formül kullanılmıştır (Kaya vd., 2018).

$$\text{Titre Edilebilir Asitlik} = \frac{(\text{Harcanan NaOH}) \times (0.75)}{\text{Örnek miktarı}} \quad (3.4)$$

3.8.2.5. Suda Çözünür Kuru Madde Tayini

Gıda ürünleri, içerik bakımından su ve kuru madde olmak üzere iki temel bileşene ayrılmaktadır. Gıdadan su uzaklaştırıldıktan sonra geriye kalan kısım, toplam kuru madde olarak adlandırılmaktadır (Bayram ve Soylu, 2020). Refraktometrenin çalışma prensibi,

optik yoğunluğu farklı ortamlarda ışığın bir ortamdan diğerine geçerken kırılması ve kırılma yasasına dayanır (Rheims vd., 1997). Sulu bir örnek içerisinde ki şeker, tuz ve proteinler de dahil olmak üzere çözünebilir katıların yüzdesini brix (%) olarak tanımlanmaktadır (Sáiz-Abajo vd., 2004). Refraktometre skalasında okunan % çözünür kuru madde, °briks olarak adlandırılır (Magwaza ve Opara, 2015). Farklı propolis miktarlarına sahip şeker numunelerinin çözeltileri, 3.8.2.1. Analizler İçin Ön Hazırlıklar kısmında belirtilen yöntemle hazırlanmış ve ATC marka refraktometre el refraktometresi yardımıyla ölçülmüştür ve hesaplamalar formüle göre yapılmıştır.

$$\% \text{ Suda Çözünür Kuru Madde Miktarı } \left(\frac{\text{g}}{100 \text{ mL}} \right) = \frac{B \times V}{\ddot{O}} \quad (3.5)$$

B: Seyreltilmiş örnekte saptanan °briks derecesi

V: Örneğin seyreltildiği hacim (mL)

Ö: Örnek miktarı (g) (Dönmez, 2015).

3.8.2.6. Enzimatik Olmayan Esmerleşme Analizi (Karamelizasyon)

Enzim kullanılmadan indirgen şeker ve aminoasit olan ortamda özellikle oksijen, sıcaklık, süre, su aktivitesi, fenolik maddeler, metal iyonu ve ortamın pH'sı gibi etkenlerden etkilenecek oluşturduğu reaksiyonlara enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları denir (Ibarz vd., 1999). Çalışmada enzimatik olmayan esmerleşme analizi Lee ve ark. (1991) ile Iwe ve ark. (2004)' nın metotları uyarlanarak yapılmıştır. Farklı propolis miktarlarına sahip şeker numunelerinin çözeltileri, 3.8.2.1. Analizler İçin Ön Hazırlıklar kısmında belirtilen yöntemle hazırlanmış Shimadzu Spectrometer Uv marka spektrofotometrede 420 nm'de okunmuştur. Elde edilen veriler 1 gram örneğe göre optik yoğunluk (OD/g) türünden değerlendirilmiştir (Lee vd., 1991; Iwe vd., 2004).

3.8.2.7. Kuru Madde Analizi

Çalışma da üretilen şekerlemelerin her biri için kuru madde analizi yapılmıştır. Sabit tartım için 135 °C'de 30 dakika bekletilen tartım kapları, desikatöre alınarak yaklaşık 45 dk boyunca soğuması beklenmiştir. Sabit tartıma gelen kapların daraları tartılarak kaydedilmiştir. Tartım kaplarına 2,5±0,08 gram şekerleme örneği tartılarak 24 saat

süresince 105 °C' ye ayarlanmış etüvde kurutulmuştur. Etüvden çıkarılan kaplar desikatöre alınarak yaklaşık 45 dk soğumaya bırakılmıştır (Prakash ve Priya, 2016). Soğuyan örnekler tekrar tartılarak not edilmiş ve kuru madde miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Çam, 2010).

$$\% \text{ Kurumadde} = \left[\frac{[\text{Kurutma sonrası tartım (Örnek miktarı + Kabin darası)} - (\text{Kabin darası})]}{(\text{Kurutma öncesi tartım (Örnek miktarı + Kabin darası)})} \right] * 100 \quad (3.6)$$

3.8.2.8. Camsı Geçiş Sıcaklığı

Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC), malzemelerin erime noktası (T_m), cam geçiş sıcaklığı (T_g), kristalleşme sıcaklıkları ve kristalleşme derecesi gibi termal geçişlerini analiz etmek için kullanılan bir tekniktir. Cam geçiş sıcaklığı (T_g), malzemenin camsı durumdan (sert ve kırılğan) kauçuksu duruma (yumuşak ve esnek) geçtiği fiziksel bir dönüşümdür. Bu sıcaklığın altında, sert şekerlemeler katı, aşırı soğutulmuş ve kristal olmayan sıvılar olarak davranır. Sert şekerler, sakkaroz, glukoz, fruktoz ve maltoz şurubundan oluşan camsı yapıda amorf ürünlerdir (Y. H. Roos ve Drusch, 2015). Cam geçiş sıcaklığı, şekerlemelerin fiziksel özelliklerini tanımlamada önemli bir parametredir ve şekerlerin şeffaf, sert ve kırılğan bir yapıda kalmasını sağlar (Ergun et al., 2010; Tan ve Kerr, 2017). Şekerleme T_g' nin altında depolandığında stabil kalabilir; ancak T_g' nin üzerinde depolandığında camsı yapısını kaybederek yapışkan bir form alır. Bu durum, ürünün fiziksel, kimyasal ve duyu kalitesini olumsuz etkiler. Sert şekerlerin T_g' si genellikle oda sıcaklığının hemen üzerinde olmalıdır, bu sayede parlaklık ve sertliklerini koruyabilirler (Ergun vd., 2010). DSC, numunelerin ve referans malzemelerin bağıl ısı akışını doğrusal bir sıcaklık taraması sırasında karşılaştırarak çalışır (Y. H. Roos ve Drusch, 2015). Cam geçişi, genellikle sıcaklık ve/veya nem değişimlerine bağlı olarak, camsı halden kauçuksu hale (veya tersi) geçiş sürecini ifade eder (Roudaut vd., 2004). Geçiş, malzemenin heterojenliğiyle ilişkilidir; heterojenlik arttıkça geçiş sıcaklık aralığı genişler (Bosma vd., 1988). Sert şekerlerin stabilitesi cam geçişleriyle ilgilidir (Ruiz-Cabrera ve Schmidt, 2015; J. Tan ve Kerr, 2017). DSC, şeker çözeltileri ve şeker açısından zengin gıdaların T_g analizinde yaygın olarak kullanılır. Örnekler genellikle oda sıcaklığından -100 °C'ye soğutulur ve ardından bileşimlerine ve su içeriklerine bağlı olarak seçilen bir sıcaklığa kadar 10 °C/dakika hızında ısıtılır (Schmidt, 2004; Rahman, 2010; Sablani vd., 2010). Sert şekerlerin camsı geçiş sıcaklıkları Perkin Elmer DSC 4000

cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Örnekler toz haline getirilip alüminyum örnek kaplarına tartılmış ve hermetik olarak kapatılmıştır. İşlem öncesinde oda sıcaklığında 30 dakika bekletilen cihaz, boş alüminyum kap ile kalibre edilmiştir. Numuneler, 10 °C/dakika ısıtma hızıyla -40 °C'den 120 °C'ye kadar ısıtılmış ve termogramlar elde edilmiştir. Bu süreçte, camsı geçiş sıcaklıkları (Tg) belirlenmiştir (Šmídová vd., 2003).

3.8.2.9. Tekstür Profili Analizi

Tekstür analizleri şekerleme ürünleri kalitesinin belirlenmesi için oldukça önemli analizlerdendir (DeMars ve Ziegler, 2001). Tekstürel olarak sertlik; deformasyon için gerekli olan kuvvet olarak tanımlanır. İlk sıkıştırma çevrimi esnasında pik kuvvetidir (N). Tekstür analizinde ise ilk sıkıştırmanın bitip geri çekilmenin başladığı noktaya karşılık gelmektedir (Gerçekaslan vd., 2007).

Çalışmada şekerleme örneklerine TA-XT plus-2 tekstür analiz cihazıyla, TPA (texture profile analyse) yöntemiyle yapılmıştır. Numuneler, 36 mm çapında bir silindirik prob kullanılarak 3 mm/sn hızında ve sıkıştırmalar arasında 5 saniyelik bir gecikme olacak şekilde, yüksekliklerinin %50'sine kadar iki kez sıkıştırıldı. Sertlik, kohezyon, yaylılık ve esneklik değerleri, elde edilen kuvvet/mesafe eğrilerinden hesaplanırken, çiğnenebilirlik değeri, cihaz yazılımı aracılığıyla sertlik, kohezyon ve yaylılık değerlerinin çarpımı olarak belirlendi (Delgado et al., 2011).

3.8.2.10. Raf Ömrü Analizi

Raf ömrü, bir gıda ürününün kabul edilebilir bir kalite seviyesini koruduğu süre olarak tanımlanır. Gıda ürünlerinin raf ömrü, istenmeyen fiziksel ve kimyasal değişiklikler ya da mikrobiyal gelişim seviyeleriyle sınırlandırılabilir (Ergun vd., 2010). Tan ve William'a (2017) göre, sert şekerlemeler gibi düşük nem içeriğine sahip ürünlerin raf ömrü gıda ürününün nem içeriği, bozulan kimyasal reaksiyonlar, depolama koşulları ve ambalaj malzemesinin bariyer özellikleri arasındaki ilişkiler üzerine kuruludur. Bu modellerin doğru bir şekilde oluşturulması için, ürünün bozulma mekanizmasının ve raf ömrünü sınırlayan kritik nem içeriğinin bilinmesi gereklidir (Tan & Kerr, 2017). Sert şekerlemelerin raf ömrü, nem göç oranı ve su içeriğinin ürün dokusu üzerindeki etkisiyle

doğrudan ilişkilidir (Gabarra ve Hartel, 1998). Ayrıca, ürün kalitesinin raf ömrü boyunca korunması için nem migrasyon oranı ve su içeriği de temel kriterler arasında yer alır (Spanemberg vd., 2019). Sert şekerlemelerin stabilitesinde, erime, camsı geçiş ve kristalizasyon sıcaklıkları gibi fiziksel özellikler önemli bir rol oynamaktadır (Hurttta vd., 2004). Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan propolisli şeker numuneleri, kapağı kapalı cam kavanozlarda laboratuvar koşullarında saklanarak 60. ve 90. günlerde yapılan tekrarlanan analizlerle süreye bağlı olarak şekerleme üzerinde meydana gelen değişimler incelenmiştir.

3.8.2.11. Model Üründe Antioksidan Analizler

Hazırlanan propolisli şeker numunelerinin antioksidan analizleri 3.8.2.1. Analizler İçin Ön Hazırlıklar basamasığında belirtilen şekilde hazırlandı. Toplam fenolik madde analizi için cam deney tüplerine 0.2 mL alınarak üzerine 4,8 mL saf su ve 0,5 mL Folin-Ciocalteu ayırıcı (FCR) (1 folin/3 saf su) ilave edilmiştir. Vortekste 10 sn karıştırılarak karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dk bekletilmiştir. Sonrasında üzerine 1 mL %35' lik sodyum karbonat (Na_2CO_3) ile tamamlanarak tekrar karanlıkta ve oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiştir. Bu aşamalar tamamlandıktan sonra Shimadzu Spectrometer Uv spektrofotometrede 725 nm dalga boyunda absorbanslar elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar gallik asit standart grafiğine göre numunelerin toplam fenolik madde içerikleri hesaplanmıştır (Singleton ve Rossi, 1965). 2.4.2. Toplam Flavonoid Madde İçeriği basamağında yer alan Zhishen et al., (1999) metoduna göre analizler için ön hazırlık metoduna göre, 2.4.3. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite basamağında yer alan Hatano vd. yöntemine göre 3.8.2.1. Analizler İçin Ön Hazırlıklar basamasığında belirtilen şeker ekstrlerinin toplam flavonoid ve DPPH serbest radikal tutucu etkileri % inhibisyon formülüne göre hesaplandı.

3.9. İstatistiksel Değerlendirme

Deneyler iki kez tekrarlandı ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata (SD) olarak ifade edildi. Farklı grupların parametrelerini değerlendirmek için GraphPad Prism (sürüm 8.3.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, ABD) kullanılarak çift yönlü varyans analizi (ANOVA) yapıldı. Gruplar arasındaki farkların karşılaştırılmasında Tukey çoklu

karşılaştırma testi uygulandı ve $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri aşağıdaki şekilde gösterildi: ns (anlamlı değil) $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Fenolik Bileşenlerinin LC-MS/MS Orbitrap Kütle Spektrometresi ile Analizi

Bilimsel çalışmalarda fenolik bileşenlerin antioksidan özellik gösterdiği, bu nedenle, doğal ürünlerin antioksidan özellikleri araştırılırken fenolik bileşenler de LC-MS/MS gibi ileri analiz yöntemleriyle incelenmektedir (Izol vd., 2021; Çelik vd., 2024). Propolis örneklerinin botanik kökeni HPLC-DAD, LC-MS ve GC/MS gibi histolojik ve kimyasal yöntemler kullanılarak belirlenmektedir (Salas vd., 2016).

Propolisin kimyasal bileşimi oldukça karmaşık olup toplandığı bölgenin florasına göre değişkenlik göstermektedir (Bankova vd., 2000). Fenolik maddeler bakımından zengin olan bal ve propolisin, antioksidan kapasitesinden sorumlu başlıca bileşikler arasında yer aldığı bildirilmektedir. Bu doğrultuda, fenolik madde içeriği yüksek olan doğal ürünlerin antioksidan kapasitelerinin de yüksek olduğu birçok bilimsel çalışmada belirtilmiştir (Al-Mamary vd., 2002; Küçük vd., 2007; Kolaylı vd., 2008).

Propolisin kimyasal yapısını oluşturan temel bileşenler fenolik bileşikler olup propolise biyolojik etkilerini arttırmaktadır. Flavonoller ve glikozitler grubunda galangin, kuersetin, rutin, mirisetin ve kaempferol, flavononlar grubunda naringenin, pinokembrin, hesperidin ve soforaflavanone G, flavonlar grubunda apigenin, krisin, luteolin ve türevleri, flavanoller grubunda ise epigallokateşin yer aldığı bildirilmiştir. Bu bileşikler, propolisin biyolojik aktivitesine olumlu katkıda bulunmaktadır (Oruç, 2014). Propolis içeriğinde teşhis edilen bileşiklerin (pinobanksin, pinocombrin, chisin vb.) güçlü antioksidan ve antiradikal aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir (Sun vd., 2015).

Propolisin antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri, özellikle gıda endüstrisi açısından oldukça önemlidir. Bu özellikler, kafeik asit, flavonlar ve flavonoid esterler gibi bileşiklerin varlığı ile ilişkilidir. Propolis, aynı zamanda bakteriyel RNA polimerazını inhibe ederek etkisini gösteren galangin gibi bileşenler içerir (Funari ve Ferro, 2006).

Propoliste fenolik bileşikler, aromatik asitler, uçucu yağlar, mumlar ve amino asitler gibi 300' den fazla bileşik tanımlanmıştır (Anjum vd., 2019).

Bulgaristan, İtalya ve İsviçre gibi farklı bölgelerden toplanan propolis örneklerinin fenolik asitler, fenolik asit esterleri ve flavonoidler içerdiğini ve bazı bileşiklerin (pinobanksin, galangin, pinocembrin, ferulik ve kafeik asit) daha yüksek konsantrasyonlarda olduğu bildirilmiştir (Bankova vd., 2002). Popova ve ark. (2017), Polonya' dan gelen propolis örneğinde 13 fenolik asit (benzoik asit, p-kumarik asit ve ferulik asit gibi); 28 fenolik ester (butil p-kumarat, pentil p-kumarat ve pentenil p-kumarat gibi) ve 30 flavonoid (pinocembrin, pinobanksin, krisin, galangin ve kaempferol gibi) olmak üzere çok sayıda fenolik bileşik tanımlamıştır (Popova vd., 2017). Velikova vd. (2000), Bulgaristan, Türkiye, Yunanistan ve Cezayir' den gelen propolis örneklerinin genellikle başlıca flavonoidler, kafeik ve ferulik asit esterleri içerdiğini belirtmiştir (Velikova vd., 2000). Ayrıca, Dausch vd. (2008)' in çalışmasında, propolisin alkollü ekstresinin kimyasal bileşiminde rutin, liquiritigenin, daidzein, pinobanksin, kuersetin, luteolin, dalbergin, izolikuriitigenin, pinokembrin, pinobanksin-3-asetat, biokanın A ve formononetin gibi flavonoidlerin baskın olduğunu, formononetin' in ise en yüksek konsantrasyona sahip bileşik olduğunu bulmuştur (Dausch vd., 2008). Propolisin kimyasal içeriği üzerine yapılan diğer bir çalışmada, 38 fenolik bileşik tespit edilmiştir ve bunlar arasında ferulik asit, floridzin ve myrisetin en yüksek konsantrasyonlara sahip bileşikler olarak belirlenmiştir (Silva vd., 2024). Kalogeropoulos vd. (2009)' a göre, etanol propolis özütlerinde sinamik asit konsantrasyonu 50,0–4000,0 µg/g aralığında olduğu bildirilmiştir (Kalogeropoulos vd., 2009). Bunun yanı sıra, Bankova vd. (1992) ve Greenaway vd. (1990) gibi çalışmalar, propolisin oral patojenler üzerinde inhibe edici etkiler gösterdiğini ve bu etkinin flavonoidler ve fenolik asitlerin varlığına atfedilebileceğini vurgulamaktadır (Greenaway vd., 1990; V. Bankova vd., 1992). Toreti vd. (2013), propolisin antimikrobiyal aktivitesinin içeriğinde belirlenen apigenin, kafeik asit, krizin, moronik asit, protokatekuik asit, p-kumarik asit ve uçucu bileşiklerden kaynaklanabileceğini bildirmiştir (Toreti vd., 2013).

Erdogan ve ark. (2011), Bingöl, Rize, Tekirdağ ve Van illerinden toplanan propolis örneklerinin fenolik içeriklerini ve antiradikal kapasitesini incelemiştir. Bu çalışmada, örneklerin gallokateşin, catechin, epicatechin gallate, kafeik asit, klorojenik asit ve

myrisetin gibi başlıca fenolik bileşiklere sahip olduğu belirlenmiştir. Bingöl propolisi, klorojenik asit açısından diğer illere göre çok daha yüksek konsantrasyonlar gösterdiği bildirilmiştir (Erdogan vd., 2011). Ayrıca, Gülçin ve ark. (2010), Türkiye' nin Erzurum bölgesinden elde edilen liyofilize edilmiş propolisin su ekstraktını analiz etmiş ve kafeik asit, ferulik asit, siringik asit, ellagik asit, kuersetin, α - tokoferol, pyrogallol, p- hidroksibenzoik asit, vanilin, p-kumarik asit, gallik asit ve askorbik asit gibi bileşiklerin varlığını tespit etmiştir (Gülçin vd., 2010). Türk propolisi üzerinde yapılan bir diğer çalışmada, pinokembrin, krizin, galangin, pinobanksin ve pinostrobin gibi flavonoidlerin başlıca fenolik bileşikler olarak sıralandığı ve kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit gibi fenolik asitlerin de bu örneklerde bulunduğu belirtilmiştir (Ozdal vd., 2018). İzol vd. (2024), Anadolu' nun dört farklı coğrafi bölgesinden elde edilen propolis ekstraktlarını LC-MS/MS ile tarayarak, ferulik asit' in en yüksek konsantrasyonda (7.052 mg/g ekstrakt) Ordu propolisinde bulunduğunu belirlemiştir (İzol vd., 2024). Kahraman vd. (2022), propolis etanol ekstraktlarında benzoik asit ve sinamik asit'in bol miktarda bulunduğunu, bu bileşiklerin propolisin kimyasal yapısındaki aromatik maddeler olduğunu belirtmiştir (Kahraman vd., 2022). Katircioğlu ve Mercan (2006)' ın yaptığı bir çalışmada, propolisin etanolik özütlerinde flavonoidler, özellikle apigenin, krizin, flavononlar ve naringenin gibi bileşiklerin baskın olduğu belirlenmiştir (Katircioğlu ve Mercan, 2006).

Tablo 4.3. Propolisin LC-MS/MS ile fenolik içerikleri

No	Bileşik Adı	RT	Quan Peak (mz)	R ²	µg / g ekstrakt
1.	4-Hydroxybenzoic acid	7,69	137,02442	0,9994	52,180 ±0,36
2.	Salicylic acid	N/F	137,02442	0,9969	N/F
3.	3-hydroxybenzoic acid (3-HBA)	N/F	137,02442	0,9999	N/F
4.	3-hydroxyphenylacetic acid (3-HPA)	N/F	107,05053	0,9998	N/F
5.	Syringic acid	8,83	197,04555	0,9977	21,030±0,37
6.	Gallic acid(3,4,5-trihydroxybenzoic acid)	N/F	169,01425	0,9996	N/F
7.	Protocatechuic acid (3,4-Dihydroxybenzoic acid)	6,32	153,01933	0,9997	22,96±1,35
8.	Protocatechuic acid ethyl ester (Ethyl 3,4-Dihydroxybenzoate)	N/F	181,05063	0,9994	N/F
9.	3,4-dihydroxybenzaldehyde (Protocatechuic aldehyde)	7,13	137,02442	0,9985	13,84±0,32
10.	2,4-dihydroxybenzoic acid	N/F	153,01933	0,9995	N/F
11.	Vanillic acid	8,43	167,03498	0,9978	14,945±0,79
12.	Homovanillic acid((4-Hydroxy-3-methoxyphenylacetic acid)	N/F	181,05063	0,9974	N/F

Tablo 4.3. (Devamı) Propolisin LC-MS/MS ile fenolik içerikleri

13.	Vanillin	N/F	153,01933	0,9991	N/F
14.	Gentisic acid	N/F	167,03498	0,9970	N/F
15.	3,4-Dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC, Homoprotocatechuic acid)	N/F	147,04515	0,9989	N/F
16.	trans Cinnamic acid	11,79	163,04007	0,9918	396,81±0,42
17.	coumaric acid (trans-3-Hydroxycinnamic acid)	9,69	179,03498	0,9981	364,21±10,00
18.	Caffeic acid	8,63	283,09758	0,9978	772,17±14,02
19.	Caffeic acid phenhyl ester (CAPE)	13,97	193,05063	0,9909	2358,847±67
20.	Ferulic acid	9,95	223,06120	0,9983	577,08±15,72
21.	Sinapic acid	N/F	353,08781	0,9976	N/F
22.	Chlorogenic acid	8,19	191,05611	0,9995	4,35±2,93
23.	Quinic acid	0,84	165,05572	0,9944	175,37±5,62
24.	3-(4-Hydroxyphenyl) propionic acid	N/F	188,03532	0,9995	N/F
25.	α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid	N/F	289,07176	0,9979	N/F
26.	Catechin (Cianidanol)-p	N/F	305,06668	0,9993	N/F
27.	Epigallocatechin	N/F	457,07763	0,9989	N/F
28.	Epigallocatechin gallate	N/F	253,05063	0,9976	N/F
29.	Chrysin (5,7-Dihydroxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one)	14,22	269,04555	0,9879	1930,73±42,63
30.	Apigenin (5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-chromen-4-one)	13,23	283,06120	0,9325	633,29±8,68
31.	Acacetin	14,52	431,09891	0,9767	3806,76±315,
32.	Rhoifolin (Apigenin 7-O-neohesperidoside)	N/F	593,15119	0,9993	N/F
33.	Vicenin 2	N/F	445,07763	0,9995	N/F
34.	Apigenin 7-glucuronide	N/F	431,09837	0,9796	N/F
35.	Apigenin 7-glucoside	11,36	283,06120	0,9954	1119,62±40,9
36.	Genkwanin	14,88	563,14063	0,9939	N/F
37.	Apiin (Apigenin-7-(2-O-apiosylglucoside)	N/F	431,09837	0,9997	N/F
38.	Vitexin (Apigenin 8-C-glucoside)	10,44	563,14063	0,9950	7,66±2,15
39.	Schaftoside	N/F	609,14611	0,9949	N/F
40.	Rutin hydrate M-OH2	10,91	285,04046	0,9958	78,98±45,63
41.	Luteolin	13,06	461,07255	0,9981	799,73±2,63
42.	Luteolin-7-O-glucuronide (Luteolin-7-O-β-D-glucuronide)	N/F	299,05611	0,9821	N/F
43.	Diosmetin (Luteolin 4'-methyl ether)	13,37	447,09328	0,9982	1528,96±28,48
44.	Orientin	N/F	447,09328	0,9989	N/F
45.	Isoorientin	N/F	447,09328	0,9968	N/F
46.	Luteoloside (Luteolin 7-glucoside)	N/F	593,15119	0,9970	N/F
47.	Luteolin 7-rutinoside	N/F	269,04555	0,9906	N/F
48.	Galangin (3,5,7-Trihydroxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one)	14,37667	301,03538	0,9963	1314,183±25,36
49.	Quercetin	12,29	463,08820	0,9995	360,30±61,35
50.	İsoquercitrin (Quercetin 3-glucoside)	10,89	623,16176	0,9962	99,62±9,80
51.	Narcissin	11,58	447,09296	0,9970	10,59±3,08
52.	Quercetin 3-rutinoside 7-glucoside	N/F	315,05103	0,9936	N/F

Tablo 4.3. (Devamı) Propolisin LC-MS/MS ile fenolik içerikleri

53	Isorhamnetin (Quercetin 3'-methyl ether)	13,22	285,04046	0,9910	1054,61±16,3
54	Kaempferol	13,06	299,05611	0,9978	571,18±3,24
55	Afzelin (Kaempferol 3-rhamnoside)	N/F	593,15119	0,9970	N/F
56	Kaempferide	14,52	447,09328	0,9937	228,12±15,43
57	Nicotiflorin	N/F	317,03029	0,9965	N/F
58	Astragalin (Kaempferol 3-glucoside)	N/F	285,04046	0,9991	N/F
59	Myricetin	N/F	271,06120	0,9919	N/F
60	Fisetin hydrate	N/F	285,07685	0,9986	N/F
61	Naringenin	12,18	579,17193	0,9987	4443,50±108
62	Sakuranetin (Naringenin 7-O-methyl ether)	N/F	539,17633	0,9975	N/F
63	Narirutin (Narirutinsa, Naringenin rutinoside)	N/F	609,18249	0,9564	N/F
64	Oleuropein	10,93	609,18396	0,9471	4,72±2,72
65	Hesperidin	N/F	287,05501	0,9904	N/F
66	Neohesperidin	N/F	255,06628	0,9472	N/F
67	Eriodictyol (3,4,5,7-Tetrahydroxyflavanone)	N/F	269,04555	0,9962	N/F
68	Liquiritigenin	11,7	415,10346	0,9973	N/F
69	Genistein	N/F	267,06628	0,9923	N/F
70	Daidzin	N/F	300,99899	0,9939	N/F
71	Formononetin (Neochanin)	N/F	339,07216	0,9978	N/F
72	Ellagic acid	11,30	359,07724	0,9920	69,90±5,40
73	Esculin hydrate	N/F	323,12888	0,9996	N/F
74	Rosmarinic acid	N/F	271,08233	0,9546	N/F
75	Glabridin	N/F	269,04555	0,9913	N/F
76	Arbutin	N/F	611,17351	0,9610	N/F
77	emodin	N/F	255,06694	0,9878	N/F
78	Etoposide	N/F	544,18109	0,9670	N/F
79	Pinocembrin	13,82	197,04555	0,9989	1813,80±55,4
80	Doxorubicin Hydrchloride	N/F	137,02442	0,9994	N/F
81	Ethylgallate	N/F	137,02442	0,9969	N/F

Propolisin etanol ekstraktındaki 96 fenolik bileşiğin profillerini belirlemek için LC-MS/MS analizleri yapılmıştır. Analiz edilecek fenolik bileşikler için, kalibrasyon eğrilerinin tutulma süresi (RT), ana iyonlar (m/z), korelasyon katsayısı (R^2), doğrusal aralık ($\mu\text{g/g}$) ve propolis etanol ekstraktının fenolik bileşik profili Tablo 3' de verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre, propolis ekstraktında en yüksek oranda bulunan bileşikler naringenin (4443,508 $\mu\text{g/g}$), acacetin (3806,769 $\mu\text{g/g}$) ve CAPE (2358,847 $\mu\text{g/g}$) olarak tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra chrysin, pinocembrin, diosmetin ve galangin gibi flavonoidler de önemli miktarlarda saptanmıştır. Propolis ekstraktı, aynı zamanda caffeic acid, ferulic acid, kaempferol, kuercetin ve luteolin gibi güçlü antioksidan özelliklere sahip fenolik asitler içermektedir.

Aga ve ark. (1994) tarafından yapılan çalışmada, propolis içeriğinde bulunan p-Coumaric acid'in yüksek antimikrobiyal aktivite ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Aga vd., 1994). Benzer şekilde, Kekeçoğlu ve ark. (2022) tarafından yapılan başka bir çalışmada, p-Coumaric acid bakımından zengin propolis numunelerinin düşük minimum inhibitör konsantrasyon değerlerine sahip olduğu bildirilmiştir (Kekeçoğlu vd., 2022). Çalışmamızda da coumaric acid (trans-3-hydroxycinnamic acid) 364,219 µg/g olarak tespit edilmiştir. Bu doğrultuda, elde edilen propolisin antimikrobiyal etkinliğinin, içeriğinde bulunan coumaric acid ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Farklı ülkelerden elde edilen propolis örneklerinin, Türkiye orijinli propolis örneklerinin LC-MS/MS analizi sonucunda, incelenen 24 fenolik bileşiğin toplam konsantrasyonu bakımından en yüksek değere sahip olduğu belirlenmiş, majör bileşik olarak ferulik asit tespit edilmiştir. Ayrıca, Türkiye propolisinde ki ferulik asit miktarının Çin propolisine kıyasla oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (Ecem Bayram, 2020). Çalışmamızda da kafeik asit (CAPE) 2358,847 µg/g ve ferulic acid 577,086 µg/g olarak oldukça yüksek seviyelerde tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, Türkiye propolisinin fenolik bileşik içeriği açısından zengin olduğunu ve biyolojik aktivite potansiyelinin yüksek olabileceğini desteklemektedir.

Tablo 4.4. Propolisin LC-MS/MS analizi ile belirlenen fenolik bileşikler

	Bileşik Adı	µg / g ekstrakt
1.	Naringenin	4443,50
2.	Acacetin (5,7-Dihydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-4H-chromen-4-one)	3806,769
3.	Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)	2358,847
4.	Chrysin (5,7-Dihydroxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one)	1930,735
5.	Pinocembrin	1813,801
6.	Diosmetin (Luteolin 4'-methyl ether)	1528,964
7.	Galangin (3,5,7-Trihydroxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one)	1314,183
8.	Apigenin 7-glucoside	1119,620
9.	Isorhamnetin (Quercetin 3'-methyl ether)	1054,614
10.	Luteolin	799,732
11.	Caffeic acid	772,176
12.	Apigenin (5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-chromen-4-one)	633,291
13.	Ferulic acid	577,086
14.	Kaempferol	571,189
15.	Trans Cinnamic acid	396,814
16.	Coumaric acid (trans-3-Hydroxycinnamic acid)	364,219
17.	Quercetin	360,307
18.	Kaempferide	228,120
19.	Quinic acid	175,377
20.	Ellagic acid	69,907
21.	4-Hydroxybenzoic acid	52,181
22.	Protocatechuic acid (3,4-Dihydroxybenzoic acid)	22,960
23.	Syringic acid	21,030
24.	Vanillic acid	14,946
25.	3,4-dihydroxybenzaldehyde (Protocatechuic aldehyde)	13,847
26.	Narcissin (Narcissoside, Isorhamnetin 3-rutinoside)	10,593
27.	Vitexin (Apigenin 8-C-glucoside)	7,667
28.	Chlorogenic acid	4,352

Türk propolis örneklerinde kuersetin, benzoik asit, ferulik asit, kafeik asit ve kumarik asidin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu, klorojenik asit, vanilik asit, siringik asit, epikateşin, rutin ve okumarik asidin düşük seviyelerde olduğu, kateşinin ise tespit edilmediği bildirilmiştir (Aliyazıcıoğlu vd., 2013). Çalışmamızda da naringenin (4443,508 µg/g), acacetin (3806,769 µg/g), CAPE (2358,847 µg/g), chrysin (1930,735 µg/g) ve pinocembrin (1813,801 µg/g) en yüksek konsantrasyona sahip bileşikler olarak belirlenmiş olup, benzer şekilde kateşin tespit edilmemiştir.

Elde edilen verilere göre, ekstraktta en yüksek oranda bulunan fenolik bileşikler sırasıyla naringenin (4443,51 µg/g), acacetin (3806,77 µg/g), caffeic acid phenethyl ester (CAPE)

(2358,85 µg/g), chrysin (1930,74 µg/g) ve pinocembrin (1813,80 µg/g) olarak tespit edilmiştir. Bu bileşikler diosmetin, galangin, apigenin 7-glukozit ve isorhamnetin gibi diğer flavonoid türevleri takip etmektedir.

Propolis ekstraktında bulunan bu fenolik bileşikler, özellikle antioksidan, antienflamatuvar, antimikrobiyal ve enzim inhibitörü özellikleri ile literatürde dikkat çekmektedir. Ekstraktın içeriğinde başlıca flavonoidlerin (naringenin, chrysin, galangin, luteolin, apigenin, kaempferol, quercetin) yanı sıra fenolik asit türevleri (caffeic acid, ferulic acid, p-coumaric acid, chlorogenic acid, vb.) de yer almaktadır. Bu bileşik çeşitliliği, propolisin potansiyel biyolojik aktivitelerine önemli ölçüde katkı sağlamaktadır. Propolisin fenolik bileşikler yönünden zengin bir doğal kaynak olduğunu ortaya koymakta ve bu bileşiklerin çeşitli biyolojik etkilere aracılık edebileceği yönündeki hipotezleri desteklemektedir.

4.2. Antioksidan Analizler

4.2.1. Toplam Fenolik Madde İçeriği

Fenolik bileşikler; çoğu doğal üründe bulunan bitkisel kaynaklı sekonder metabolitler olup ürünün antioksidan kapasitesinden sorumlu ajanlardır (do Nascimento vd., 2019). Propolis örneklerinin toplam fenolik madde miktarının tayin edilmesi ürünün antioksidan aktivitesi hakkında bilgi sunmaktadır. Propolisin %70'lik etil alkol ekstraktlarının toplam fenolik içeriği $497,5 \pm 0,834$ mg GAE/g kuru ekstrakt olarak bulunmuş olup literatür ile uyumlu olmasına karşın propolis içeriklerinin toplanan bölge florası, çözücü ve ekstraksiyon yöntemine göre sonuçlar değişebilmektedir.

Brezilya' nın kuzeydoğu bölgesinden toplanan farklı propolis örneklerinin etanol çözeltilerindeki fenolik içerikleri 55,74, 90,55 ve 91,32 mg GAE/g; Brezilya'nın güneybatısından alınan propolis örneklerinin etil alkol ekstraktlarında toplam fenolik içerikleri 52.94-50.41 mg GAE/g aralığında olduğu belirlenmiştir (Andrade vd., 2017; Da Silva vd., 2018). Meksika bölgesinden toplanan propolis örneklerinin fenolik içeriğinin 314 mg GAE/g olduğu bildirilmiştir (Rivera-Yañez vd., 2018). Hindistan bölgesinden temin edilen propolislerin etanol ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriği ise 0,1591 g

GAE/g olarak rapor edilmiştir (Laskar vd., 2010). Litvanya bölgesinden toplanan propolislerin farklı çözücülerden elde edilen ekstraktlarının fenolik içerik tayinin yapıldığı çalışma da etanol 12,7 mg/ GAE mL, su 1,6 mg/ GAE mL ve zeytinyağı 0,5 mg/ GAE mL olarak bildirilmiştir (Kubiliene vd., 2015). Ahn vd., (2007) yaptıkları çalışmada farklı bölgelerden temin edilen propolis örneklerinin etanolik ekstraktlarındaki fenolik içerik miktarları 200-300 mg GAE/g olarak belirlemişlerdir (Ahn vd., 2007). Türkiye bölgesinden toplanan propolislerin etanol ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı $124,6 \pm 1,5$ mg GAE/g olarak bulunmuştur (Turan vd., 2015). Doğru vd. (2021), propolis ve perganın etil alkol ekstraktındaki toplam fenolik madde miktarı $28,0 \pm 0,02$ mg GAE/mL ve $7,6 \pm 0,05$ mg GAE/mL olarak bulunmuştur (Doğru vd., 2021). Zonguldak ilinden temin edilen propolis örneklerinin maserasyon yöntemi kullanarak elde edilen ekstraktının toplam fenolik madde içeriği 313-476 mg GAE/g aralığında elde edilmiştir (Sarıkaya vd., 2009). Propolisin 7 günlük süre ile %70'lik etil alkol ile maserasyonu sonucunda total fenolik madde miktarının %0,33 olduğu belirlenmiştir (Mello vd., 2010). Anadolu' nun farklı illerinden toplanan propolis örneklerin %70' lik etil alkol ekstraksiyonundaki toplam fenolik madde miktarının 28 mg GAE/mL ile 80 mg GAE/mL arasında olduğu tespit edilmiştir (Keskin vd., 2020). Türk propolisinin antioksidan kapasitesinin belirlendiği çalışmada, farklı bölgelerden elde edilen propolis örneklerinin etil alkol ekstraksiyonunda toplam fenolik madde miktarı 2748 mg GAE/100 g -19969 mg GAE/100 g arasında değiştiği bildirilmiştir (Ozdağ vd., 2019). Türk propolisinin toplam fenolik madde içeriklerinin incelendiği çalışmalarda, 314,36 mg GAE/g ve 313 mg GAE/g gibi birbirine oldukça yakın ve yüksek değerler bulunmuştur (Sarıkaya vd., 2009; Ozdağ vd., 2019). Propolisin standardizasyonun araştırıldığı çalışmada etanolik ekstraktların toplam fenolik madde miktarı 16,13- 178,34 mg GAE/g ile arasında olduğu bildirilmiştir (Keskin, 2018). Iğdır, Manisa, Muş ve Ordu illerinden elde edilen propolis ekstraktlarının toplam fenolik içerikleri sırasıyla $330,7 \pm 9,2$, $298,0 \pm 7,4$, $184,6 \pm 2,7$ ve $492,3 \pm 5,8$ mg GAE/g olarak belirlenmiştir (İzol vd., 2024). Yedi farklı coğrafi bölgeden 40 farklı ham propolis örneğinin etil alkol ekstraktlarının incelendiği çalışmada toplam fenolik madde miktarı ortalama $147,28 \pm 43,96$ mg GAE/g olarak bildirilmiştir (Kolaylı vd., 2023). Anadolu' dan toplanan ham propolis örneklerinin toplam fenolik içeriğinin 16,13-178,34 mg GA/g arasında olduğunu bildirmişlerdir (Kolaylı vd., 2020).

4.2.2. Toplam Flavonoid Madde İçeriği

Polifenol ailesinin en büyük üyesi olan flavonoidler sekonder metabolitlerdir, doğal ürünlerin biyolojik özelliklerinden sorumlu ajanlardır (Panche vd., 2016). Propolisin %70' lik etil alkoldeki toplam flavonoid içeriği $389,44 \pm 1,92$ mg KE/g kuru ekstrakt olarak bulunmuştur. Tıpkı fenolik madde içeriği gibi flavonoid madde içeriğinde de bir standart yoktur ve toplanma zamanına bölge seçimine ve ekstraksiyon yöntemlerine göre içerikleri ve miktarları değişmektedir.

Arjantin bölgesindeki 13 farklı propolis örneklerinin %80 etanol ekstraktlarının toplam flavonoid madde miktarının 13,3 ile 62,0 mg KE/g arasında olduğu bildirmiştir (Isla vd., 2001). Fas' ın sekiz farklı bölgesinden 14 propolis örneğinin incelendiği çalışma da flavonoid içeriğini 0,20 ile 34,27 mg KE/g arasında oldukça değişken miktarlarda olduğu tespit edilmiştir (Miguel vd., 2014). Propolisin %70' lik etil alkol kullanılarak 1 gün boyunca maserasyon yöntemiyle hazırlanan özütünde toplam flavonoid içeriği, 0.23 mg KE/g olarak rapor edilmiştir (Mello vd., 2010). Brezilya' nın kuzeydoğusundaki farklı bölgelerden toplanan propolis örneklerinin geleneksel ve ultrason destekli ekstraksiyonla elde edilen etanol ekstraktlarının flavonoid madde içeriği 0,0420-0,10802 g KE/g olarak rapor edilmiştir (Reis vd., 2019). Arjantin' den alınan propolis örneklerinin toplam flavonoid içeriğini 13,3–42,6 mg KE/g, Cezayir propolis ekstraktlarının toplam flavonoid madde içeriğinin 0.57 ± 0.01 - 3.53 ± 0.84 g KE/g arasında değiştiğini bildirmişlerdir (Moreno vd., 2000; Narimane vd., 2017). Endonezya' nın Sulawesi bölgesinde elde edilen propolislerin farklı çözücülerle elde edilen ekstraktların flavonoid madde içeriğinin belirlendiği çalışma da sonuçların 14.06- 18.33 mg KE/100 g arasında olduğu tespit edilmiştir (Pujirahayu, 2014). Türkiye bölgesinden toplanan propolis örneklerin etanol ekstraktlarının toplam flavonoid madde miktarı $42,0 \pm 0,8$ mg KE/g olarak bildirilmiştir (Turan vd., 2015). Anadolu' nun farklı bölgelerinden toplanan propolis örneklerinin toplam flavonoid içerikleri 3073 ± 198 mg KE/100 g – $29,175,0 \pm 394$ mg KE/100 g arasında olduğu bildirilmiştir (Ozdal vd., 2019). Türkiye' nin değişik bölgelerindeki arıcılardan temin edilen propolis örneklerinin etanol ekstraktlarının toplam flavonoid miktarı 1,24- 51,23 mg KE/g arasında değiştiği bildirilmiştir (Keskin, 2018). Türkiye'nin 4 farklı ilinden temin edilen propolis örneklerinin etil alkol ekstraktlarının toplam flavonoid içerikleri sırasıyla $46,1 \pm 1,2$ ila $96,1 \pm 2,1$ mg KE/g arasında olduğu

rapor edilmiştir (İzol vd., 2024). Anadolu propolisinin araştırıldığı çalışmada, 20 farklı propolis örneğinde toplam flavonoid madde ortalama 30,58 mg KE/g olduğu sonuçların 11,46 mg KE/g ile 61,64 mg KE/g arasında değiştiği bildirilmiştir. Ayrıca ham propolisteki polifenollerin yaklaşık beşte biri flavonoidlerin oluşturduğu rapor edilmiştir (Kolaylı vd., 2023). Türk propolisinin kimyasal bileşimi, antioksidan kapasitesi, çeşitli insan meme kanseri hücre dizileri üzerindeki anti-proliferatif etkisinin incelendiği çalışmada propolis örneğinin toplam flavonoid içeriği 522,71 mg KE/g olduğu tespit edilmiştir (Ozdal vd., 2018). Bu sonuçlar farklı coğrafyalardan alınan propolis örneklerinin toplam fenolik-flavonoid içerikleri ve miktarlarının farklı olabileceğini bir kez daha ortaya koymaktadır. Bu farklılığın nedenleri arasında habitat, coğrafi konum, iklim, arı türü gibi farklı parametreler rol oynamaktadır (İzol vd., 2024). Aktif bileşenler bakımından zengin olan propolisin flavonoid içeriğindeki değişiklikler, esas olarak bal arılarının ziyaret ettiği bitkilerin bölgesel farklılığına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Ertürk vd., 2016). Farklı coğrafik bölgelerden propolislerin farklı kimyasal içeriğe sahip olduğu göz önüne alındığında değerler arasındaki farklılıklar beklenmektedir (Böke Sarıkahya vd., 2021).

4.2.3. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite

DPPH ve ORAC testlerinde, pinobanksin-3-asetat en güçlü antioksidan bileşen olarak tanımlanmıştır (Boisard vd., 2015). Doğal antioksidanların reaktif oksijen türlerini (ROS) yakalama aktivitelerini değerlendirmek için DPPH radikali kullanılmaktadır. DPPH çözeltisi, antioksidan bir madde ile karşılaştığında yapısal bir değişim geçirir ve mor rengini sarı renkli bir bileşiğe dönüştürür. Oluşan sarı renk ile antioksidan konsantrasyonu arasında doğru bir orantı vardır (Misir, 2013).

Propolisin %70' lik etil alkol ekstraktlarının DPPH radikal süpürücü aktivitesi $84,08 \pm 0,08$ inhibisyon değeri ile ölçülmüş, antiradikal kapasitesi ise $64,04 \pm 1,01$ mg Trolox eşdeğeri/g olarak belirlenmiştir. Karşılaştırmalı olarak, BHA ve BHT'nin radikal süpürücü aktiviteleri sırasıyla $85,43 \pm 0,36$ ve $84,51 \pm 0,47$; antiradikal kapasiteleri ise BHA için 71,6 mg Trolox /g ve BHT için 68,04 mg Trolox /g olarak tespit edilmiştir.

Tayland' dan temin edilen propolisin, %30, %40, %50 ve %70 etanol çözeltileri ile ekstrakte edildiği bir çalışmada, DPPH serbest radikal süpürme aktivitesinin $65,52 \pm 1,18$ ile $94,21 \pm 2,06$ arasında değiştiği bildirilmiştir (Siripatrawan vd., 2013). Türk propolisinin farklı çözücülerde (etanol, metanol ve DMSO) hazırlanan ekstraktlarının DPPH radikal süpürücü etkisini inceleyen bir başka çalışmada, en yüksek aktivitenin 0,5 mg/mL konsantrasyonunda $72 \pm 1,4$ ile $95 \pm 0,3$ arasında olduğu rapor edilmiştir (Misir, 2013). 39 propolis örneğinin DPPH yöntemi kullanılarak incelendiği bir çalışmada, özütlerin çoğunun %80' den fazla DPPH temizleme aktivitesi gösterdiği ve pozitif kontrollerle neredeyse aynı veya daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Çalışmada, propolis örneklerinin antioksidan kapasiteleri $55,98 \pm 0,02$ ile $86,17 \pm 0,16$ arasında değişmiştir. En yüksek antioksidan kapasite, İzmir-Bergama' dan alınan örnekte ($86,17 \pm 0,16$) ölçülmüş; bunu sırasıyla Artvin-Aksu ($85,76 \pm 0,01$), Artvin-Borçka ($85,56 \pm 0,07$), Bingöl-Kığı ($85,27 \pm 0,02$), Artvin şehir merkezi ($84,87 \pm 0,03$) ve Aydın şehir merkezi ($84,77 \pm 0,02$) örnekleri izlemiştir (Böke Sarıkahya vd., 2021). Brezilya kırmızı propolisinin etanol ekstraktlarının antioksidan aktivite değerleri, 80,0 µg/mL konsantrasyonda yaklaşık %80 olarak belirlenmiştir (do Nascimento vd., 2019). Propolis özütünün 10, 100 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarındaki DPPH süpürücü aktiviteleri ise sırasıyla $34,92 \pm 0,01$, $70,80 \pm 0,02$ ve $89,57 \pm 0,01$ olarak tespit edilmiştir (Kahraman vd., 2022). 4 farklı ilden toplanan propolis örneklerinin radikal süpürme kapasiteleri (DPPH) karşılaştırıldığında, Bingöl ve Rize yörelerinin sırasıyla $497,8 \pm 10,7$ ve $503,7 \pm 1,6$ mg Trolox/g propolis ile en yüksek değerleri gösterdiği belirlenmiştir. Bu iki yörenin toplam fenolik madde içerikleri de, radikal süpürme kapasitesi ile paralellik gösterdiği bildirilmiştir (Erdogan vd., 2011).

4.2.4. Metal Şelatlama Aktivitesi

Şelatlayıcı terimi, "yengeç pençesi" anlamına gelen Yunanca "chele" kelimesinden türemiştir. Bu terim, bir ligandın (en az iki donör grubuyla) substratlarıyla (iyonlarla) oluşturduğu kompleksleri tanımlar ve böylece bir "halka" sisteminin, daha kararlı bir kompleksin oluşumuyla yakından ilişkilidir (May ve Bulman, 1983). Ağır metaller, hücrelerin büyümesi ve çoğalması, biyomoleküllerin sentezi gibi birçok enzimatik reaksiyon ve biyolojik süreçler için gereklidir ama bu metallerin aşırı birikimi zararlıdır. Özellikle oksidatif strese (OS) neden olabilir ve metabolizmada serbest radikaller ile

reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini tetikleyebilir. Metal şelasyon tedavisi, biyolojik olarak genellikle metal toksisitesini tedavi etmek için kullanılır. Metaller uygun şelatlayıcı ajanlarla şelatlandıktan sonra, metabolizmadaki hasarların önüne geçilebilir ve bu metaller vücuttan etkili bir şekilde uzaklaştırılabilir. Metallerin optimum seviyeden daha yüksek seviyelerde birikmesi durumunda toksik hale gelerek biyomoleküllere zarar verebileceği bilinmektedir (Gulcin ve Alwasel, 2022). Örneğin, demir (Fe), fazla miktarda alındığında zararlı etkileri olan metallerin çarpıcı bir örneğidir. Ortalama bir kişi, vücudunda yaklaşık 4-5 g elementer demir bulundurur. Bu miktarın üçte ikisi hemoglobinde oksijen taşıyıcı protein olarak yer alırken, geri kalanı hemosiderin veya ferritin gibi demir depolayan proteinlerde bulunur (Vacca vd., 2004). Metal iyonlarının şelatlanması, biyomoleküllere zarar verebilecek ROS oluşumu ve radikal üretimini önlemek için kritik bir öneme sahiptir. Doğal metal şelatlama bileşikleri, özellikle fenolikler ve flavonoidler, toksisite sorunlarıyla ilişkilendirilen sentetik şelatlama ajanlarına göre daha fazla tercih edilmektedir (Malacaria vd., 2022). Metal şelatlama tedavisi, ağır metal zehirlenmesi durumunda en önemli ve birincil klinik tedavi yöntemidir (Flora vd., 2007; Kim vd., 2019). Şelasyon kapasitesini tahmin etme stratejilerinden biri, ferrozin veya 2,2'-bipiridin gibi şelat oluşturuşu maddeler kullanarak serbest demir iyonlarını (Fe^{2+}) ölçmektir. Bu maddeler, spektroskopik analiz yoluyla kolayca tespit edilebilen kompleksler oluşturur ve demir gibi metallerin reaktifliğini azaltarak etkisiz hale getirir (Almhjell ve Mills, 2018). Propolisin farklı çözücülerde ki ekstraktlarının metal şelatlama aktivitesi incelendiği çalışma da etanollü ekstraktların $92 \pm 0,5$, metanollü ekstraktlar için $95 \pm 1,1$, DMSO' lu ekstraktlar için $92,6 \pm 0,5$, standart olarak kullanılan EDTA için ise $98 \pm 1,7$ olarak bulunmuştur (Misir, 2013). Wang ve ark. (2004), propolisle yaptıkları çalışmada, 2 mg/mL' lik etanolik ekstraktın 50 düzeyinde metal şelatlama aktivitesi gösterdiğini belirtmiştir (Wang et al., 2004). Geckil ve ark. (2005), yaptığı çalışmada ise propolisin etanolik ekstraktlarının 2 mg/mL konsantrasyonda 70 metal şelatlama aktivitesi sergilediği bulunmuştur (Geckil vd., 2005). Propolisin 70 ' lik etil alkol ekstraktının metal şelatlama aktivitesi, $38,11 \pm 0,9$ olarak hesaplanırken, sentetik antioksidan olan EDTA' nın $84,12 \pm 0,8$ olarak bulunmuştur.

4.2.5. Toplam Antioksidan Kapasitesi

Propolis ekstraktının toplam antioksidan kapasitesi fosfomolibden metoduyla belirlenmiştir (Prieto vd., 1999). Ve %70' lik etil alkol ekstraksiyonunda toplam antioksidan kapasitesi $336,96 \pm 3,2$ mg α -tok /g olarak bulundu.

Bonvehí ve Gutiérrez (2011) yapmış oldukları çalışmada, 2 farklı çözücü kullanılarak elde edilen propolis ekstraktların antioksidan kapasitelerini etanollü ekstraktının 148–291 mg AsA/g ve propilen glikollü ekstraktının antioksidan kapasitesi 108– 210 mg AsA/g olarak tespit etmişlerdir (Bonvehí ve Gutiérrez, 2011). Elde edilen bu verilere göre propolis ekstraktında kullanılan farklı çözücüler propolisin antioksidan kapasitesi üzerinde etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

Tablo 4.5. Propolis Ekstraktının Antioksidan Aktivite Sonuçları

	Toplam Fenolik Madde İçeriği (mg GAE/g)	Toplam Flavonoid Madde İçeriği (mg KE/g)	DPPH (% Giderim/ mg Trolox /g)	Metal Şelatlama Aktivitesi (% Giderim)	Toplam Antioksidan Kapasitesi (mg α -tok /g)
Propolis (1mg/mL)	$497,5 \pm 0,83$	$389,44 \pm 1,92$	$\%84,08 \pm 0,08 / 64,04 \pm 1,01$	$\%38,11 \pm 0,9$	$336,96 \pm 3,2$
BHA	---	---	$\%85,43 \pm 0,36 / 71,6 \pm 1,01$	---	---
BHT	---	---	$\%84,51 \pm 0,47 / 68,04 \pm 1,01$	---	---
EDTA	---	---	---	$\%84,12 \pm 0,8$	---

4.3. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Geleneksel antimikrobiyal ajanlara karşı gelişen bakteri direnci ve antibiyotik kullanımının ardından sıkça ortaya çıkan yan etkiler nedeniyle, antimikrobiyal aktiviteye sahip doğal ürünlerin araştırılması her geçen gün daha fazla önem kazanmaktadır (Cragg vd., 1997; Gleckman ve Czachor, 2000; Normark ve Normark, 2002; Sheldon, 2003). Propolisin nispeten toksik olmaması ve birçok bakteri, mantar, parazit ve virüse karşı

geniş bir antimikrobiyal aktivite göstermesi araştırılan doğal ürünler arasında propolisi öne çıkarmaktadır.

Propolisin antimikrobiyal özellikleri birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuş olsa da, içeriğindeki farklı bileşimler ve/veya antibakteriyel aktivitelerinin değerlendirilmesinde kullanılan yöntem farklılıkları çeşitli çalışmaların sonuçlarını karşılaştırmayı zorlaştırmaktadır (Drago vd., 2000). Ancak, propolisin gram (+) bakterilere karşı, gram (-) bakterilerin daha büyük aktivitesi olduğu bildirilmiştir (Drago vd., 2000; Marcucci vd., 2001; Stepanović vd., 2003). Velikova vd. (2000), yaptıkları çalışmada farklı ülkelerden topladıkları propolis örneklerinin güçlü antibakteriyel, zayıf ve orta derecede antifungal aktivite gösterdiklerini tespit etmişlerdir (Velikova vd., 2000). Tablo 6'da, propolis ekstraktının farklı konsantrasyonlarındaki antimikrobiyal inhibisyon zon çapları gösterilmektedir.

4.3.1. Disk Difüzyon Yöntemiyle Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesi

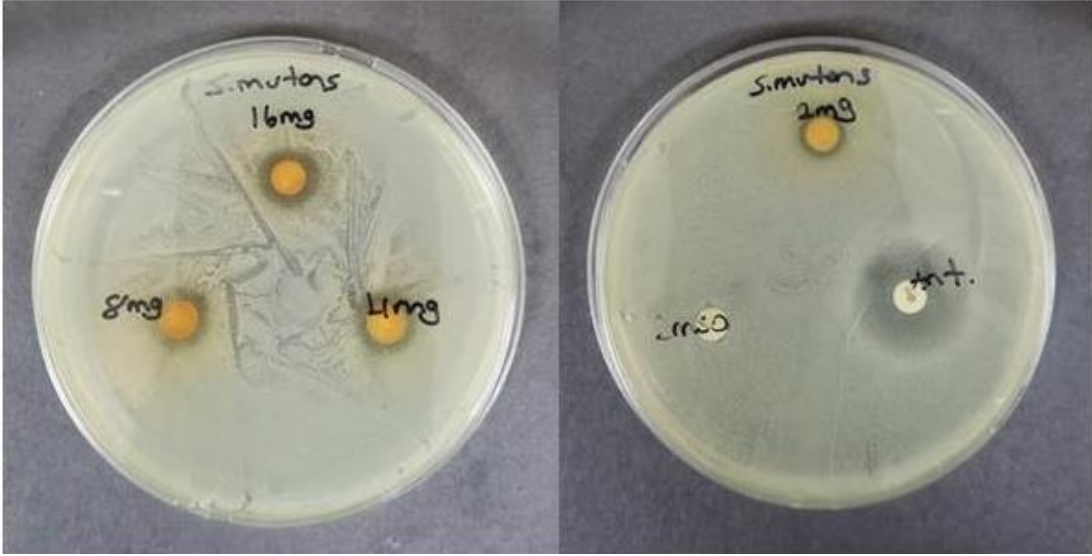
4.3.1.1. Propolisin Disk Difüzyon Yöntemiyle Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesi

Propolisin etil alkol ekstraktının *S. mutans* üzerinde antimikrobiyal etkinlik gösterdiği ve bu etkinliğin, plak oluşumuna ve diş çürümelerine neden olan glukoziltransferaz enziminin inhibisyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Bosio vd., 2000). Propolisle tedavi edilen gönüllüler üzerinde yapılan bir çalışmada, %0,2 propolis solüsyonu ile 1,5 dakika boyunca ağız çalkalandıktan sonra, 10 gönüllünün tükürüğündeki toplam bakteri sayısında %38, *S. mutans* sayısında ise %42 oranında azalma gözlemlenmiştir (Steinberg vd., 1996).

Propolis ekstraktlarının *S. mutans* üzerindeki inhibisyon etkileri de çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. Libério ve ark. (2009), propolis ekstraktlarının *S. mutans* üzerinde 9,0 ile 13,0 mm arasında değişen inhibitör zon çapları oluşturduklarını bildirmişlerdir (Libério vd., 2009). Popova vd. (2009), Girit propolisinin *S. mutans* üzerindeki etkilerini incelediklerinde etanolik propolis özütünün 20 mm'lik bir inhibitör zon oluşturduğunu rapor etmiştir (Popova vd., 2009). Ayrıca, %70 etil alkolle yapılan ekstraksiyonun *S. mutans* üzerinde $22,6 \pm 0,66$ mm, Brezilya bölgesinden elde edilen yeşil propolis oral patojenlere karşı yapılan bir çalışmada ise $18,3 \pm 1,15$ mm büyüklüğünde bir inhibitör zon

elde edilmiştir (Paula vd., 2006; De Luca vd., 2014). Ophori vd. (2010) ise 4, 8, 16 ve 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonlarında hazırlanan propolis ekstraktlarının *S. mutans* üzerindeki inhibitör zon çaplarını sırasıyla 10 ± 4 mm, 12 ± 4 mm, 20 ± 2 mm ve 24 ± 2 mm olarak rapor etmiştir (Ophori vd., 2010). Kashi vd. (2011), Tahran'ın kuzeydoğusundan toplanan İran propolisinin etanol ekstraktının *S. mutans* üzerinde $16,00 \pm 0,00$ mm büyüklüğünde bir inhibitör zon oluşturduğunu belirtmiştir (Kashi vd., 2011). Airen vd. (2018), %5 ve %20 etil alkol oranlarıyla hazırlanan propolis ekstraktlarının sırasıyla 10,4 mm ($\pm 1,32$ mm) ve 12,4 mm ($\pm 1,46$ mm) inhibitör zonlarını oluşturduğunu bildirmişlerdir (Airen vd., 2018). Yazdanian vd. (2022) ise İran'ın dokuz farklı bölgesinden temin edilen %70 etil alkol ekstraktlarının *S. mutans*'a karşı 9-16 mm arasında değişen zon çapları oluşturduğunu rapor etmiştir (Yazdanian vd., 2022).

Çalışmamızda, propolisin etil alkol ekstraktının antimikrobiyal etkinliği değerlendirilmiş ve elde edilen bulgular doğrultusunda ekstraktın *S. mutans*'a karşı hem bakteriyostatik (durdurucu) hem de bakterisidal (öldürücü) özellikler gösterdiği belirlenmiştir. Disk difüzyon analizleri sonucunda, *S. mutans* suşu üzerinde sırasıyla 2, 4, 8 ve 16 mg/mL konsantrasyonlarında $8,66 \pm 0,57$ mm, $10,66 \pm 0,57$ mm, $11,66 \pm 0,57$ mm ve $14,33 \pm 0,57$ mm çapında inhibitör zonlar oluşturduğu belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan streptomisin antibiyotiği ise $22,33 \pm 0,57$ mm çapında inhibisyon zonu meydana getirmiştir. Durdurucu etkinliğin yanı sıra, konsantrasyon arttıkça inhibitör zon çaplarında da artış gözlenmiş ve en yüksek inhibisyon zonu 16 mg/mL konsantrasyonunda gerçekleşmiştir. Elde edilen bu bulgular, literatürde yer alan verilerle karşılaştırıldığında bazı farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıkların, propolisin elde edildiği coğrafi bölge, bitki kaynağı, ekstraksiyon yöntemi, çözücü tipi ve kullanılan test mikroorganizmalarına bağlı olarak değişebileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.18. Propolisin *S. mutans* 'a karşı zon çapı

Brezilya'dan elde edilen farklı propolis örneklerinin etanol özütü arasındaki sinerjik etki *in vitro* olarak değerlendirildiğinde, yeşil propolisin *S. sanguinis*'e karşı $16,67 \pm 1,09$ mm, kırmızı propolisin $19,33 \pm 0,94$ mm ve kahverengi propolisin ise $15,67 \pm 0,19$ mm inhibitör zonları oluşturduğu tespit edilmiştir (Joatilde vd., 2013). Propolisin karyojenik bakterilere karşı antimikrobiyal özellikleri üzerine yapılan bir çalışmada, *S. sanguinis* için $21,3 \pm 0,31$ mm büyüklüğünde bir inhibitör zon gözlemlenmiştir (De Luca vd., 2014). Ayrıca, diş minesinin remineralizasyonu için propolis bazlı biyopolimer üretimi üzerine yapılan bir çalışmada, antibakteriyel test sonuçları *S. mutans* için $22 \pm 0,2$ mm, *S. sanguinis* için ise $22 \pm 0,3$ mm inhibitör zon çapları göstermiştir (Nisa vd., 2022).

Çalışmamızda, propolisin etil alkol ekstraktının *S. sanguinis* üzerindeki antimikrobiyal etkinliği değerlendirilmiş; 2, 4, 8 ve 16 mg/mL konsantrasyonlarında renk değişimi gözlemlenmesine rağmen inhibisyon zonu oluşmadığı için yalnızca bakteriyostatik (durdurucu) bir etki tespit edilmiştir. Bu durum, ilgili konsantrasyonların bakterisidal etki oluşturmak için yetersiz kaldığını göstermekte olup, daha yüksek konsantrasyonlarla tekrar test edilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Buna karşın, pozitif kontrol olarak kullanılan streptomisin antibiyotigi, *S. sanguinis* suşu üzerinde $20,66 \pm 0,57$ mm çapında belirgin bir inhibitör zon oluşturmuştur.

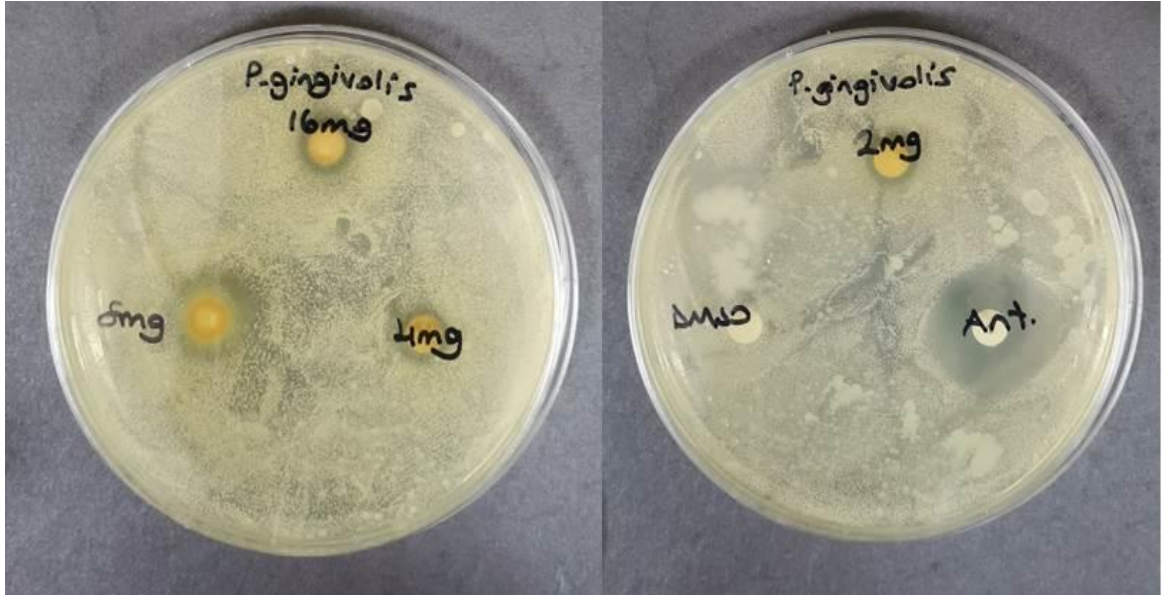


Şekil 4.19. Propolisin *S. sanguinis* ' e karşı zon çapı

Porphyromonas gingivalis, iyi huylu bir mikrobiyal topluluğu disbiyotik bir topluluğa dönüştürerek periodontal hastalıkların gelişimine olanak sağlayan bir "anahtar patojen" olarak kabul edilmektedir (Hajishengallis vd., 2012). Brezilya' dan elde edilen yeşil propolis, düşük konsantrasyonda dahi periodontitiste rol oynayan patojen *P. gingivalis*' in büyümesini engellediği bildirilmiştir. Bu bulgu, yeşil propolisin periodontal hastalıklarla mücadelede potansiyel bir antimikrobiyal ajan olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir (Oda vd., 2016). Brezilya' nın yeşil propolisinin *P. gingivalis* üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmada, $14,0 \pm 0,00$ mm büyüklüğünde bir inhibitör zon elde edilmiştir (Paula vd., 2006). Çin propolisi özütünün *P. gingivalis* ve *A. actinomycetemcomitans* üzerindeki kimyasal bileşimi ve etkinliği değerlendirilen bir çalışmada ise, *P. gingivalis* için inhibitör zon çapları 18-25 mm arasında tespit edilmiştir (Agarwal vd., 2012). Propolisin etil alkol ekstraktının dirençli periodontal patojenlere karşı yapılan bir çalışmada ise, *P. gingivalis*' in $15,7 \pm 0,37$ mm büyüklüğünde bir inhibitör zon oluşturduğu bildirilmiştir (Shabbir vd., 2016).

Çalışmamızda, propolisin etil alkol ekstraktının *P. gingivalis* üzerindeki antimikrobiyal etkinliği değerlendirilmiş ve etkinliğin konsantrasyona bağlı olarak arttığı gözlemlenmiştir. Hem bakteriyostatik (durdurucu) hem de bakterisidal (öldürücü) etkinlik sergileyen propolis ekstraktı, 2, 4, 8 ve 16 mg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla $8,33 \pm 0,57$ mm, $10,66 \pm 0,57$ mm, $13,00 \pm 0,00$ mm ve $15,00 \pm 0,00$ mm çapında inhibitör

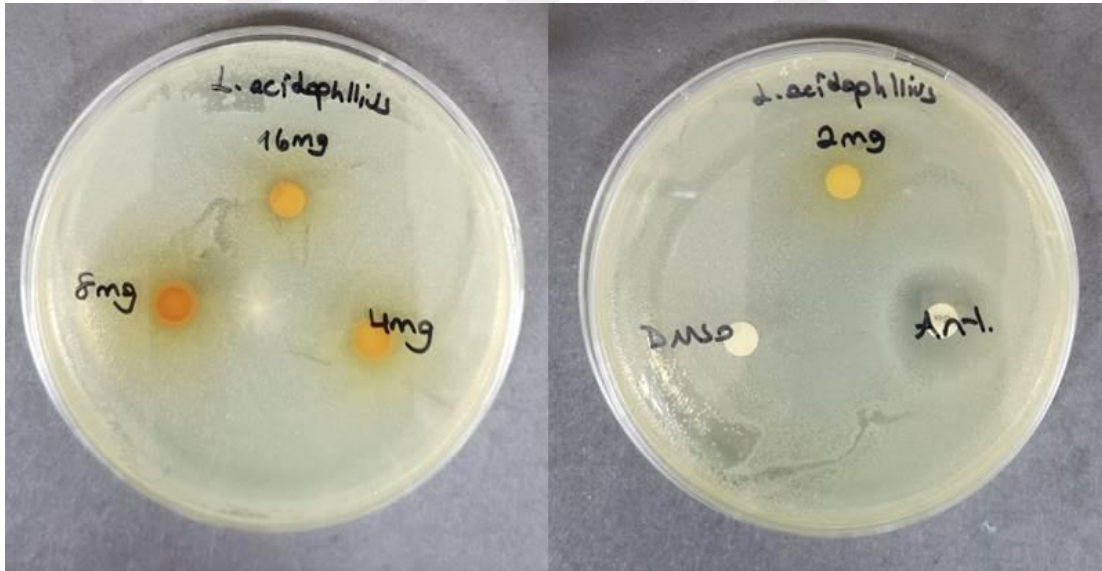
zonlar oluşturmıştır. Bu sonuçlar, propolis ekstraktının düşük konsantrasyonlarda sınırlı bir etki gösterdiğini, ancak konsantrasyon arttıkça hem bakteriyostatik hem de bakterisidal etkinliğinin belirgin biçimde arttığını ortaya koymaktadır. Pozitif kontrol olarak kullanılan streptomisin antibiyotiği *P. gingivalis* üzerinde $20,33 \pm 0,57$ mm büyüklüğünde bir inhibitör zon oluşturmıştır.



Şekil 4.20. Propolisin *P. gingivalis*' e karşı zon çapı

%5 ve %20 konsantrasyonlarındaki propolis etanol ekstraktlarının *L. acidophilus*' a karşı sırasıyla 12,7 mm ($\pm 2,08$ mm) ve 14,65 mm ($\pm 1,65$ mm) büyüklüğünde inhibitör zonlar oluşturduğuna dair sonuçlar rapor edilmiştir. Ayrıca, alkol oranı arttıkça inhibitör zon çaplarının da doğru orantılı olarak arttığı gözlemlenmiştir (Airen vd., 2018). Propolis bazlı diş minesini remineralizasyonu için biyopolimer üretimi üzerine yapılan bir çalışmada, *L.acidophilus*' un bakteriyel test sonuçları, farklı jel formülasyonlarıyla değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, hidroksiapatit (HA) jeli ile yapılan testte $12,08 \pm 0,10$ mm, propolis jeliyle yapılan testte $18,8 \pm 0,18$ mm ve HA-propolis jeli kombinasyonunda ise $22,35 \pm 0,22$ mm büyüklüğünde inhibitör zonlar elde edilmiştir (Nisa vd., 2022). İran' ın dokuz farklı bölgesinden temin edilen propolis örneklerinin %70' lik etil alkol ekstraktlarının *L. acidophilus*' a karşı oluşturduğu inhibitör zon çapları 9-15 mm arasında değişmiştir (Yazdanian vd., 2022).

Çalışmamızda, propolisin etil alkol ekstraktının *L. acidophilus* üzerindeki antimikrobiyal etkinliği değerlendirilmiş ve 2, 4, 8 ve 16 mg/mL konsantrasyonlarında renk değişimi gözlemlenmesine rağmen inhibisyon zonu oluşmamıştır. Bu bulgu, propolisin etil alkol ekstraktının *L. acidophilus* üzerinde yalnızca bakteriyostatik (durdurucu) etki gösterdiğini ve bakterisidal (öldürücü) etkinliğinin sınırlı olduğunu göstermektedir. Bu durum, propolisin etil alkol ekstraktının bazı bakteri türlerine karşı etkili olmadığını ve etki spektrumunun dar olabileceğini düşündürmektedir. Buna karşın, kontrol grubu olarak kullanılan streptomisin antibiyotiği, *L. acidophilus* üzerinde $20,33 \pm 0,57$ mm büyüklüğünde bir inhibitör zon oluşturmuş olup, streptomisin bu bakteri üzerindeki etkinliğini açıkça ortaya koymaktadır.



Şekil 4.21. Propolisin *L. acidophilus*' a karşı zon çapı

İran propolisinin oral mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisinin incelendiği bir çalışmada, propolis ekstresinin *Staphylococcus aureus* üzerindeki etkinliği $17 \pm 0,00$ mm büyüklüğünde inhibitör zon ile tespit edilmiştir (Jafarzadeh Kashi vd., 2011). Türkiye'den temin edilen arı poleni ve propolisinin etanolik özütlerinin incelendiği bir başka çalışmada ise, propolisin 6,25-100 mg/mL konsantrasyonlarında yapılan agar kuyusu difüzyon testlerinde *S. aureus*' a karşı $12,6 \pm 1,0$ mm ile $19,9 \pm 0,6$ mm arasında değişen inhibitör zonlar gösterdiği, yani belirli konsantrasyonlarda güçlü antibakteriyel aktivite

sergilediği belirtilmiştir (Kahraman vd., 2022). Türkiye' nin 24 farklı ilinden elde edilen propolis örneklerinin etanolik ekstraktları, *S. aureus*' a karşı ortalama 11,40 mm büyüklüğünde inhibitör zon oluşturmuş ve antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Altuntaş vd., 2023). Ayrıca, dokuz farklı propolis örneğinin %70' lik etil alkol ekstraktlarının *S. aureus*' a karşı 8-16 mm arasında değişen inhibitör zon çapları bildirilmiştir (Yazdanian vd., 2022).

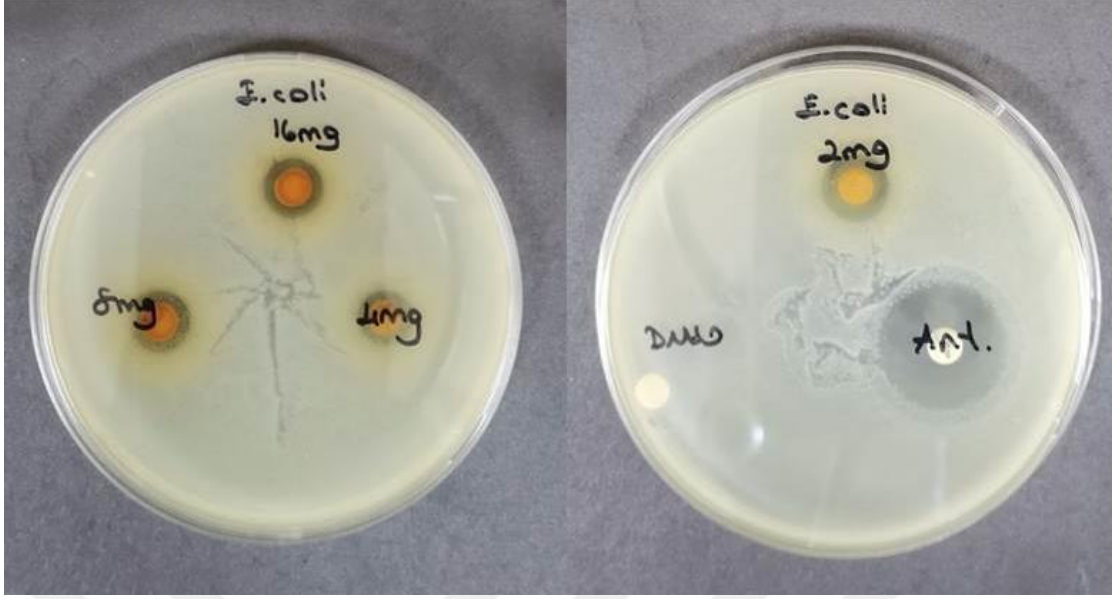
Çalışmamızda, propolisin etil alkol ekstraktının *S. aureus* üzerindeki antimikrobiyal etkinliği 16, 8, 4 ve 2 mg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla $19,66 \pm 5,50$ mm, $14,00 \pm 0,00$ mm, $12,66 \pm 0,57$ mm ve $9,66 \pm 0,57$ mm büyüklüğünde inhibitör zonlar oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, propolisin *S. aureus* üzerinde konsantrasyona bağlı olarak etkinlik gösterdiğini ve inhibitör zonların büyüklüğünün konsantrasyon arttıkça belirgin bir şekilde arttığını ortaya koymaktadır. Pozitif kontrol olarak kullanılan streptomisin antibiyotiği ise $22,00 \pm 0,00$ mm büyüklüğünde bir inhibitör zon oluşturmuştur. Bu bulgu, propolisin antibiyotiklere kıyasla daha düşük etkinlik gösterdiğini, ancak yine de önemli bir antimikrobiyal potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.22. Propolisin *S. aureus* 'a karşı zon çapı

Propolisin *B. subtilis*, *E. coli* ve *R. sphaeroides* üzerinde yaptığı fizyolojik etki araştırmalarında, etanollü ekstraktlarının antibakteriyel etkiye sahip olduğu vurgulanmıştır (Mirzoeva vd., 1997). Anadolu' nun 24 farklı ilinden toplanan propolis örnekleri üzerinde yapılan çalışma da, Kırklareli ve Bartın illerinden alınan örneklerin *E. coli* üzerinde sırasıyla 12,5 mm ve 10,28 mm büyüklüğünde inhibisyon zonları oluşturduğu, bu örneklerin yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Altuntaş vd., 2023). Propolisin *E. coli* üzerindeki antibakteriyel etkilerinin incelendiği bir başka çalışmada ise, 6,25-100 mg/mL konsantrasyonlarında propolisin *E. coli* üzerinde sırasıyla $11,8 \pm 0,5$ mm ile $17,3 \pm 1,1$ mm arasında değişen inhibisyon bölgeleri gösterdiği belirlenmiştir (Kahraman vd., 2022). İran' ın dokuz farklı bölgesinden elde edilen propolis örneklerinin %70' lik etil alkol ekstraktlarının *E. coli*' ye karşı gösterdiği inhibitör zon çaplarının 9,5- 15,5 mm arasında değiştiği bildirilmiştir (Yazdanian vd., 2022). Türkiye' nin Erzurum, Tekirdağ ve Trabzon illerinden toplanan propolisin etanolik özütünün *E. coli* üzerindeki antimikrobiyal aktivitesinin ve kimyasal bileşenlerinin incelendiği bir çalışmada ise, propolisin etanol özütünün *E. coli* büyümesini güçlü bir şekilde inhibe ettiği rapor edilmiştir (Katircioğlu ve Mercan, 2006).

Çalışmamızda, propolisin %70' lik etil alkol ekstraktının *E. coli*' ye karşı antibakteriyel etkisi, disk difüzyon yöntemiyle incelenmiştir. Propolisin farklı konsantrasyonlarının *E. coli* üzerindeki etkileri sırasıyla 16 mg, 8 mg, 4 mg ve 2 mg konsantrasyonlarında değerlendirilmiş ve inhibitör zon çapları belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, 16 mg konsantrasyonunda en büyük inhibitör zon çapı olan $15,33 \pm 0,57$ mm gözlemlenirken, 8 mg'lık konsantrasyon için $13,66 \pm 0,57$ mm, 4 mg'lık konsantrasyon için $13,33 \pm 2,08$ mm ve 2 mg'lık konsantrasyon için ise $10,0 \pm 0,0$ mm çapında inhibitör zonlar oluşmuştur. Bu bulgular, propolisin konsantrasyon arttıkça *E. coli* üzerindeki antibakteriyel etkisinin güçlendiğini göstermektedir. Kontrol grubu olarak kullanılan Streptomisin antibiyotiği ise $23,0 \pm 0,0$ mm büyüklüğünde bir inhibitör zon oluşturmuştur. Ancak, propolisin özellikle yüksek konsantrasyonlarda önemli bir antibakteriyel aktivite gösterdiği, bu bulguların propolisin doğal bir antimikrobiyal ajan olarak potansiyelini desteklediği söylenebilir.

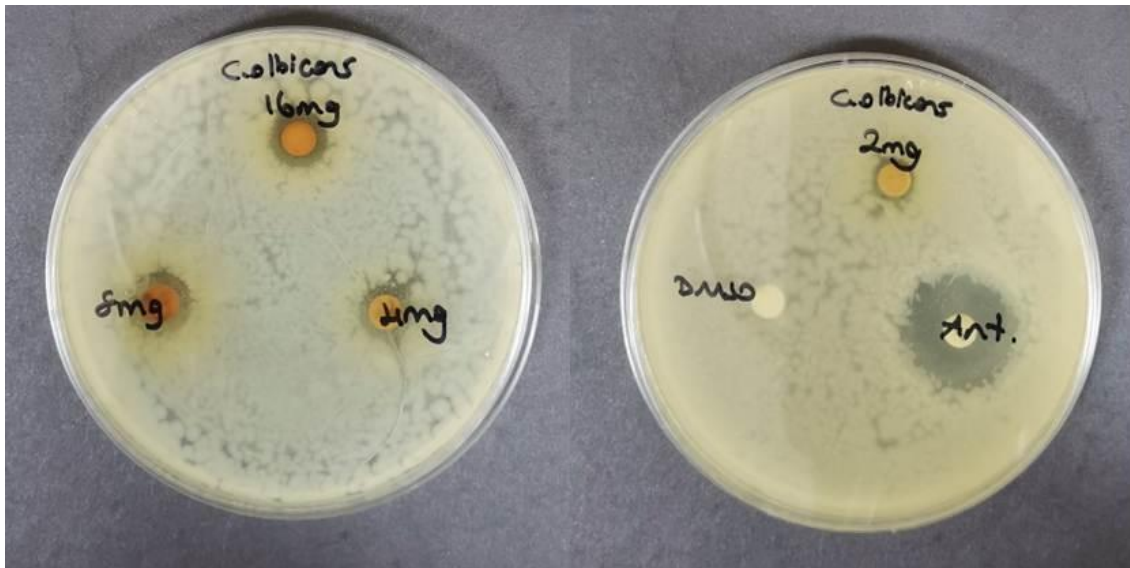


Şekil 4.23. Propolisin *E.coli* 'ye karşı zon çapı.

Propolis özütlerinin çeşitli *Candida* türleri de dahil olmak üzere patojenik mayalara karşı antifungal bir ajan olarak etkili olduğu çalışmalarda rapor edilmiştir (AL-Waili vd., 2012; Sariguzel vd., 2016). Boisard ve ark. (2015), propolis örneklerinin patojenik mantarlar üzerindeki antifungal aktivitesini incelemiş ve *C. albicans* ile *C. glabrata* 'ya karşı gözlenen antifungal etkinliği propolisin yüksek flavonoid içeriğine bağlanmıştır (Boisard vd., 2015). Koo ve ark. (2000), Brezilya' nın güneydoğusundaki kırmızı propolisin alkollü özütünün *C. albicans* ' a karşı antifungal aktivitesini değerlendirerek, propolisin *C. albicans* ve biyofilm oluşumunu engelleyici etkisi nedeniyle periodontal hastalıklar üzerinde terapötik potansiyele sahip olabileceğini rapor etmiştir (Koo vd., 2000). Tükürükten izole edilen *Candida* türleri üzerinde yapılan çalışmalarda, Brezilya propolisinin fungisidal aktivite gösterdiği ve hidroalkolik propolis özütünün ağız gargarası olarak kullanıldığı tam protezli hastalarda *Candida* sayısının azaldığı tespit edilmiştir (Ota vd., 2001). Ayrıca, *C. albicans* ve *C. tropicalis* ' in Brezilya propolisine duyarlı olduğunu doğrulamışlardır (Sforzin vd., 2000). Litvanya propolisinin zeytinyağı ekstraktının *C. albicans* ve *B.cereus* ' a karşı antimikrobiyal etki gösterdiğini bildirmiştir (Ramanauskienė ve Inkėnienė, 2011). 24 farklı ilden temin edilen propolis örneklerinin coğrafi kökenlerine göre karakterizasyonu ve sınıflandırılması amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, propolisin etil alkol ekstraktlarının *C. albicans* ' a karşı ortalama inhibisyon zon çapı 10,58 mm olarak belirlenmiştir. 12,50 mm zon çapı ile en yüksek antifungal

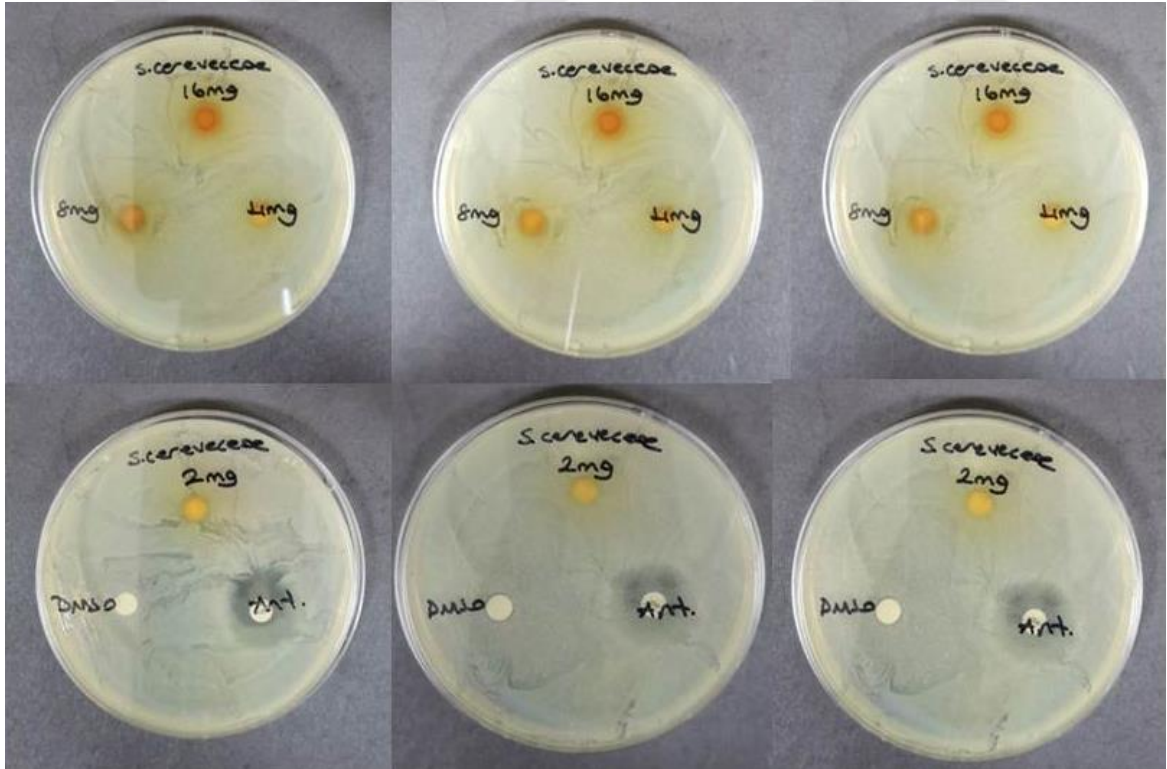
aktivitelerin Amasya ve Mersin örneklerinde olduğu bildirilmiştir (Altuntaş vd., 2023). Brezilya yeşil propolis ekstraktının ağız patojenik bakteri ve mantarlara karşı etkisini inceleyen bir çalışmada, etanol ekstraktının *C. albicans*' a karşı $16,3 \pm 0,52$ mm' lik inhibisyon zonu oluşturduğu rapor edilmiştir (Paula vd., 2006). Anadolu propolisinden elde edilen etanolik özütlerin *C. albicans* üzerindeki inhibisyon etkisi literatürde farklı araştırmacılar tarafından şu şekilde bildirilmiştir: Kujumgiev ve ark. (1999) 14–18 mm, Kartal ve ark. (2003) 8–14 mm, Aliyazıcıoğlu ve ark. (2013) 13–24 mm ve Silva ve ark. (2019) 10,0–12,5 mm olarak rapor edilmiştir (Kujumgiev vd., 1999; Kartal vd., 2003; F. R. G. Silva vd., 2019; Turan vd., 2015).

Çalışmamız da propolisin *C. albicans*' a karşı doza bağlı bir antifungal aktivite gösterdiğini ortaya koymaktadır. En yüksek konsantrasyonda (16 mg) elde edilen $14,33 \pm 0,57$ mm' lik inhibisyon zon çapı, propolisin belirgin bir antifungal etki gösterdiğini kanıtlamaktadır. En düşük konsantrasyonda (2 mg) $8,66 \pm 0,57$ mm inhibisyon zon çapı ölçülmüş olup, 4 mg konsantrasyonunda $10,66 \pm 0,57$ mm, 8 mg konsantrasyonunda ise $12,33 \pm 0,57$ mm zon çapları elde edilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan streptomisin antibiyotiği için inhibisyon zon çapı $22,0 \pm 0,0$ mm olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, propolisin *C. albicans*' a karşı doza bağımlı bir şekilde etkili olduğu ve yüksek konsantrasyonlarda belirgin antifungal aktivite sergilediği gözlemlenmiştir. Bu bulgular, propolisin antifungal ajan olarak potansiyelini destekleyen literatürdeki diğer çalışmalarla uyumludur.



Şekil 4.24. Propolisin *C. albicans*' a karşı zon çapı.

Farklı bal ve propolis örneklerinin antibakteriyel ve antifungal etkilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, *S. cerevisiae*' e karşı antimikrobiyal etkinliğin inhibisyon zon çaplarının 8-20 mm arasında değiştiği bildirilmiştir (Kolaylı vd., 2020). Çalışmamızda, propolisin %70' lik etil alkol ekstraktının *Saccharomyces cerevisiae*' ye karşı farklı konsantrasyonlardaki antifungal etkinliği değerlendirilmiştir. Uygulanan 16, 8 ve 4 mg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla $11,66 \pm 0,57$ mm, $8,66 \pm 0,57$ mm ve $7,00 \pm 0,00$ mm büyüklüğünde inhibisyon zonları gözlemlenmiştir. En düşük konsantrasyon olan 2 mg/mL için ise inhibisyon zonu tespit edilememiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan streptomisin antibiyotiği, *S. cerevisiae* üzerinde $20,33 \pm 0,57$ mm büyüklüğünde bir inhibisyon zonu oluşturmuştur. Bu bulgular, propolisin *S. cerevisiae*' ye karşı antifungal aktivite gösterdiğini ve bu etkinliğin uygulanan konsantrasyona bağlı olarak değiştiğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, en düşük konsantrasyonda herhangi bir inhibisyon gözlemlenmemesi, düşük dozlarda propolisin bu maya türü üzerinde yeterli antifungal etki göstermediğini düşündürmektedir.



Şekil 4.25. Propolisin *S. cerevisiae*' e karşı zon çapı

(Sunulan antimikrobiyal etkinlik çalışmaları, üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde ifade edilmiştir.)

Tablo 6 incelendiğinde, antimikrobiyal test sonuçları doğrultusunda streptomisin ve farklı konsantrasyonlarda uygulanan propolis etil alkol ekstraktının çeşitli mikroorganizmalara karşı etkileri ortaya konmuştur. Streptomisin, test edilen tüm mikroorganizmalara karşı belirgin bir bakterisidal aktivite göstermiştir. Buna karşın, propolis etil alkol ekstraktı uygulanan *S. sanguinis* ve *L. acidophilus* suşlarında, tüm konsantrasyonlarda bakterisidal etki gözlenmemiştir. Bu bulgu, propolis ekstraktının bu bakteriler üzerinde bakteriyostatik, yani büyümeyi inhibe edici ancak bakterileri öldürücü olmayan bir etki mekanizması ile hareket ettiğini göstermektedir. Ancak, propolis ekstraktının artan dozlarda bakteriyostatik etkisinin yanı sıra bakterisidal etki de yapabileceği düşünülmektedir. Diğer mikroorganizmalarda, propolis ekstraktı konsantrasyon artışıyla birlikte artan inhibisyon zon çapları ile kısmi bakterisidal aktivite sergilemiştir. Bu sonuçlar, propolisin antibakteriyel etkinliğinin hem mikroorganizma türüne hem de uygulanan dozaja bağlı olarak değiştiğini ortaya koymakta olup, bakteriyostatik ve bakterisidal mekanizmaların tür ve konsantrasyon özelinde farklılık gösterebileceğini desteklemektedir.

Tablo 4.6. Propolisin mikroorganizmalara karşı göstermiş oldukları zon çapları

Mikroorganizma Adı	Strepto- nycin (mm)	16 mg (mm)	8 mg (mm)	4 mg (mm)	2 mg (mm)
<i>S. mutans</i>	22,33 $\pm$ 0,57	14,33 $\pm$ 0,57	11,66 $\pm$ 0,57	10,66 $\pm$ 0,57	8,66 $\pm$ 0,57
<i>S. sanguinis</i>	20,66 $\pm$ 0,57	---	---	---	---
<i>P. gingivalis</i>	20,33 $\pm$ 0,57	15,0 $\pm$ 0,00	13,0 $\pm$ 0,00	10,66 $\pm$ 0,57	8,33 $\pm$ 0,57
<i>L. acidophilus</i>	20,33 $\pm$ 0,57	--	--	--	--
<i>S. aureus</i>	22,0 $\pm$ 0,00	19,66 $\pm$ 5,50	14,00 $\pm$ 0,0	12,66 $\pm$ 0,57	9,66 $\pm$ 0,57
<i>E. coli</i>	23,0 $\pm$ 0,0	15,33 $\pm$ 0,57	13,66 $\pm$ 0,57	13,33 $\pm$ 2,08	10 $\pm$ 0,00
<i>C.albicans</i>	22,0 $\pm$ 0,00	14,33 $\pm$ 0,57	12,33 $\pm$ 0,57	10,66 $\pm$ 0,57	8,66 $\pm$ 0,57
<i>S.cereviceae</i>	20,33 $\pm$ 0,57	11,66 $\pm$ 0,57	8,66 $\pm$ 0,57	7,0 $\pm$ 0,00	---

Farklı propolis orijinlerinin ve propolis özütlerinin elde edilmesinde kullanılan çözücüler, propolisin antimikrobiyal aktivitesini etkileyebilmektedir. Bu bağlamda yapılan araştırmalar, propolisin antimikrobiyal etkinliğinin, propolis türlerine, dozlarına ve kullanılan ekstraksiyon çözücülerine bağlı olarak değişiklik gösterdiğini ortaya koymuştur (Bakkaloğlu ve Arici, 2019). Uzel ve ark. (2005), 4 farklı Anadolu propolisi örneğinin içerikleri üzerinde yaptıkları çalışmada; propolis örneklerinin esas içeriklerinin flavonoidler (pinokembrin, pinostropin, isalpinin, pinobanksin, kuarsetin, naringenin, galangin ve krisin) olduğunu ve tüm propolis örneklerinin gram pozitif bakteriler ve mayalara karşı güçlü antimikrobiyal etki gösterdiğini rapor etmişlerdir (Uzel vd., 2005). Grange ve Davey (1990), propolisin gram pozitif bakterilere karşı aktif olduğunu, ancak gram negatif bakterilere karşı sınırlı bir etkinlik sergilediğini bildirmişlerdir (Grange ve Davey, 1990). Libério ve ark. (2009) propolisin *S. mutans*' a karşı kariostatik ajanlar olarak potansiyeli ve çürük önleyici etkinliğini inceledikleri çalışma da propolis bileşiklerinin biyoteknolojik ürünlerin geliştirilmesinde kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir (Libério vd., 2009). Propolisin etanollü ekstresinin gram (+) koklara (*S. aureus*) karşı yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği, fakat gram (-) bakteri (*E. coli* ve *P. aeruginosa*) ve mayalara (*C. albicans*) karşı zayıf aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Silici and Kutluca 2005).

4.3.1.2. Şekerlerin Agar Kuyucuk Metodu ile Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesi

Ticari propolis damlalarının oral patojen üzerinde antimikrobiyal etkisinin incelendiği çalışma da *E. faecalis* ile karşılaştırıldığında, *S. mutans*' ları daha fazla etkili olduğu, ve propolis ekstrelerinin özellikle diş çürüğünü önlemek için kullanılabileceği bildirilmiştir (Ozan et al., 2021). Propolisli şekerli ve şekersiz sakızların elde edilen verilere göre; şekerli propolisli optimum sakızlarda çiğneme süresinin *S. mutans*' a karşı antibakteriyel aktivitede istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur (Palabiyik vd., 2019).

Tablo 4.7. Şekerlerin mikroorganizmalara karşı göstermiş oldukları zon çapları

Mikroorganizma Adı	Streptomycin (mm)	%12,5 şeker (mm)	%7,5 şeker (mm)	%2,5 şeker (mm)	Kontrol şeker (mm)
<i>S. mutans</i>	30	8	7	6	6
<i>S.sanguinis</i>	35	6	6	6	6
<i>P. gingivalis</i>	42	9	7	6	6
<i>L. acidophilus</i>	40	7	6	6	6
<i>S. aureus</i>	35	7	6	6	6
<i>E. coli</i>	25	6	6	6	6
<i>C. albicans</i>	26	8	7	6	6
<i>S. cereviceae</i>	24	11	9	7	6



Şekil 4.26. Şekerlerin mikroorganizmalara karşı göstermiş zon çapı görüntüleri

%12,5, %7,5 ve %2,5 oranlarında propolis içeren şekerlerin antimikrobiyal etkileri, yaygın ağız mikroorganizmaları üzerinde incelenmiş; elde edilen sonuçlar, çaptaki büyüklük artışı (mm) dikkate alınarak değerlendirilmiştir. En yüksek antimikrobiyal etki, %12,5 oranında propolis içeren şeker örneklerinde gözlenmiştir. Bu grupta, özellikle *P. gingivalis* (9 mm), *C. albicans* (8 mm) ve *S. cerevisiae* (11 mm)' ye karşı belirgin inhibisyon zonları oluşmuştur. Ağız florasında önemli bir patojen olan *S. mutans*' a karşı

da 8 mm' lik bir inhibisyon gözlenmiş, bu etkinin propolis konsantrasyonu azaldıkça anlamlı şekilde düştüğü görülmüştür. Öte yandan, *S. sanguinis*' te tüm şeker gruplarında inhibisyon çeperi benzer düzeyde (6 mm) kalmış ve kontrol grubundan farklılık göstermemiştir. Bu durum, propolisin seçici antimikrobiyal etkisinin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Kontrol şeker grubunda (propolis içermeyen) tüm mikroorganizmalarda inhibisyon gözlenmemiştir. Propolisli şekerlerin özellikle maya türü *S. cerevisiae* ve gram-negatif anaerob *P. gingivalis*' e karşı gösterdiği etkili inhibisyon, propolisin potansiyel antimikrobiyal ajan olarak kullanılabilirliğini desteklemektedir. Ayrıca, elde edilen inhibisyon zonlarının çapları, pozitif kontrol olarak kullanılan Streptomisin ile kıyaslandığında daha düşük olmakla birlikte, doğal bir ürün olan propolisin düşük konsantrasyonlarda dahi anlamlı etki gösterdiği anlaşılmıştır.

4.3.2. MİK ve MBC ile Antimikrobiyal Aktivite Değerlendirmesi

MİK, mililitre başına mikrogram [$\mu\text{g/mL}$] olarak ifade edilir (Przybyłek ve Karpiński, 2019). Propolisin ekstraktının minimum inhibitör konsantrasyon değerini (MİK) 8-12 mg/mL aralığında olduğunu bildirmişler ayrıca diş protezine sahip hastaların propolisin ekstraktının kullanımında tükürüklerinde ki *Candida* türlerin de azalma olduğu gözlemlenmiştir (Ota vd., 2001). Bu çalışmada, propolisin yanı sıra farklı konsantrasyonlardaki (%2,5, %7,5 ve %12,5) şeker çözeltilerinin çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkileri değerlendirilmiştir. Propolisin, test edilen tüm mikroorganizmalar üzerinde anlamlı düzeyde antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Tablo 4.8. MİK değerlerinin mikroorganizmalar bazında karşılaştırılması

Mikroorganizma	Propolis (µg/mL)	Kontrol Şeker (mg/mL)	%2,5 Şeker (mg/mL)	%7,5 Şeker (mg/mL)	%12,5 Şeker (mg/mL)
<i>S.mutans</i>	100	12,5	3,125	3,125	6,25
<i>S.sanguvalis</i>	100	3,125	6,25	50	6,25
<i>P.gingivalis</i>	100	0,039	3,125	3,125	3,125
<i>L.acidophilus</i>	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
<i>S.aureus</i>	50	12,5	3,125	6,25	50
<i>E. coli</i>	50	6,25	6,25	6,25	12,5
<i>C.albicans</i>	100	0,078	1,562	6,25	12,5
<i>S. cerevisiae</i>	200	12,5	12,5	12,5	50

Propolis, test edilen mikroorganizmalar arasında en düşük MİK değerini *L. acidophilus* suşuna karşı göstermiştir (12,5 µg/mL). Bu sonuç, propolisin bu bakteriye karşı oldukça güçlü bir inhibisyon kapasitesine sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Diğer mikroorganizmalara karşı MİK değerleri ise genel olarak 50–200 µg/mL aralığında değişmekte olup, bu durum propolisin geniş spektrumlu antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu desteklemektedir. *S. cerevisiae* gibi bazı maya türlerine karşı ise daha yüksek MİK değerleri (200 µg/mL) gözlemlenmiş olup, bu durum fungal hücrelerin propolisin fenolik bileşenlerine karşı daha dirençli olabileceğini düşündürmektedir.

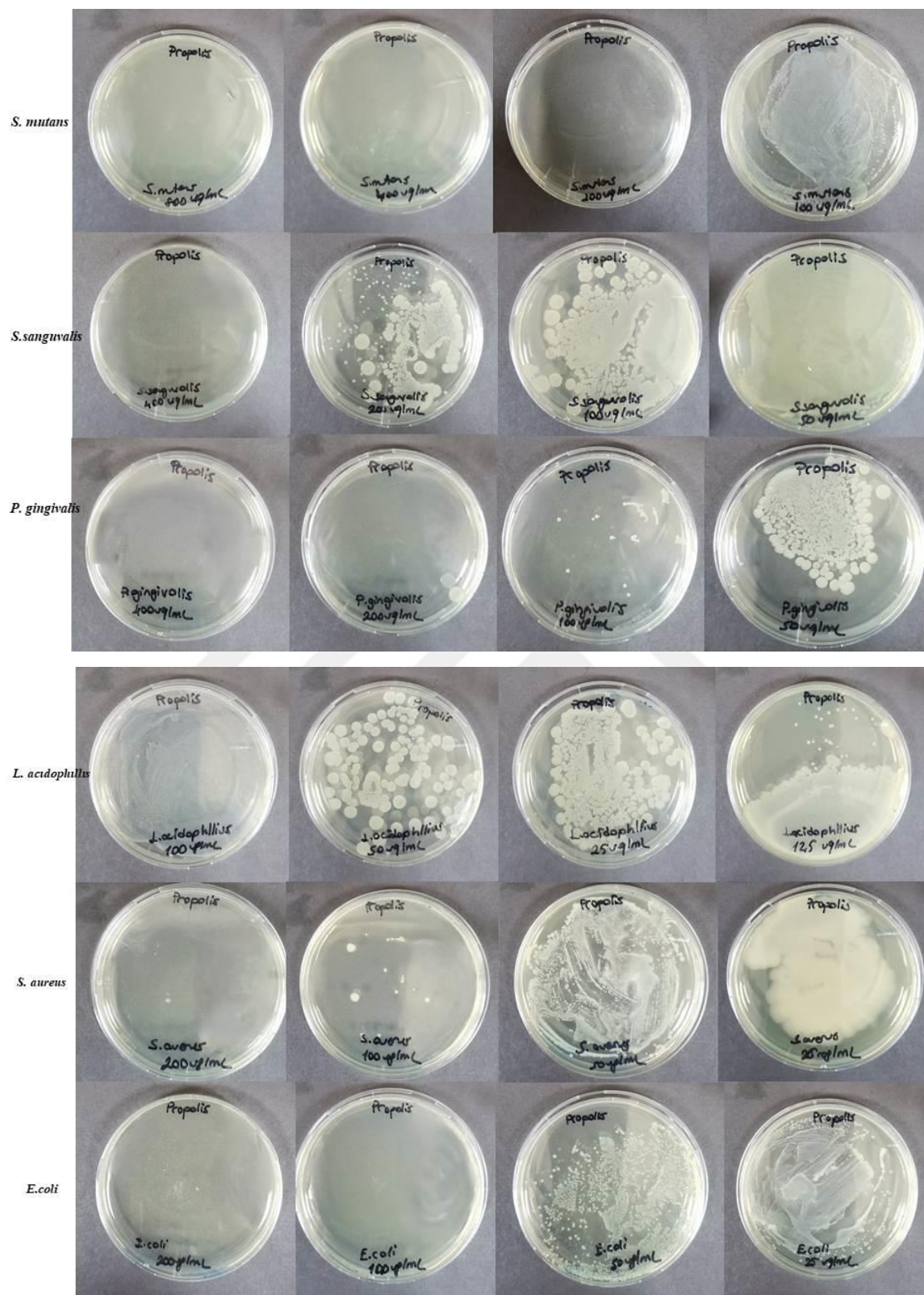
Şeker çözeltileri incelendiğinde, özellikle %2,5 konsantrasyonundaki şeker çözeltisinin bazı mikroorganizmalara karşı MİK değerlerini önemli ölçüde düşürdüğü gözlemlenmiştir. *S. mutans*, *S. aureus* ve *P. gingivalis* gibi bakterilerde MİK değerleri %2,5 şeker çözeltisinde 3,125 mg/mL' ye kadar düşmüştür. Ancak şeker konsantrasyonu arttıkça (özellikle %7,5 ve %12,5), bazı mikroorganizmalarda MİK değerlerinin tekrar yükseldiği gözlemlenmiştir. Bu durum, şekerin antimikrobiyal etkisinin konsantrasyona bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Sonuç olarak, MİK verileri propolisin düşük konsantrasyonlarda dahi çok sayıda mikroorganizma üzerinde baskılayıcı etkiye sahip olduğunu göstermekte; buna karşın şeker çözeltilerinin antimikrobiyal etkisinin mikroorganizma türüne ve şekerin konsantrasyonuna bağlı olarak önemli ölçüde değişkenlik gösterdiği anlaşılmaktadır.

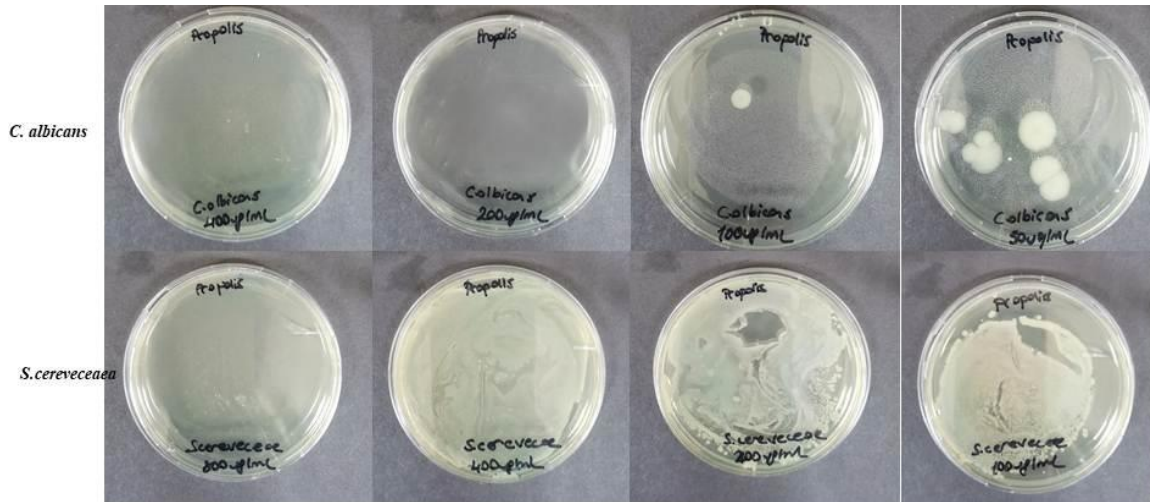
Tablo 4.9. MBC değerlerinin mikroorganizmalar bazında karşılaştırılması

Mikroorganizma	Propolis (µg/mL)	Kontrol Şeker (mg/mL)	%2,5 Şeker (mg/mL)	%7,5 Şeker (mg/mL)	%12,5 Şeker (mg/mL)
<i>S.mutans</i>	200	25	6,25	6,25	25
<i>S.sanguvalis</i>	400	12,5	12,5	50	12,5
<i>P.gingivalis</i>	200	—	6,25	12,5	12,5
<i>L.acidophilus</i>	100	—	50	25	50
<i>S.aureus</i>	100	50	12,5	12,5	50
<i>E. coli</i>	100	—	12,5	12,5	25
<i>C.albicans</i>	200	—	3,125	12,5	25
<i>S. cerevisiae</i>	800	—	25	25	50

Propolis örnekleri genel olarak test edilen mikroorganizmalar üzerinde düşük MBC değerleri ile etkili olmuş, özellikle *L. acidophilus* ve *S. aureus* gibi Gram-pozitif bakteriler ile *E. coli* gibi Gram-negatif bakterilere karşı 100 µg/mL düzeyinde bakterisidal etki göstermiştir. *P.gingivalis* ve *C.albicans* gibi önemli patojenlere karşı ise 200 µg/mL gibi orta düzeyde etkili MBC değerleri tespit edilmiştir. Bununla birlikte, *S. cerevisiae* gibi maya türlerine karşı daha yüksek MBC değeri (800 µg/mL) gözlemlenmiş olup, bu durum maya hücrelerinin propolisin aktif bileşenlerine karşı daha dirençli olduğunu göstermektedir. MBC verileri, uygulanan ajanların yalnızca mikrobiyal büyümeyi baskılamakla kalmayıp aynı zamanda mikroorganizmaların öldürülmesini sağlayıp sağlamadığını ortaya koymasından önemlidir.

Şeker çözeltilerine ait MBC değerleri ise konsantrasyona bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Özellikle %2,5 şeker çözeltisi bazı mikroorganizmalara karşı anlamlı bakterisidal etki göstermiştir. *S. mutans* ve *P. gingivalis*’ te %2,5 şeker grubunda MBC değeri 6,25 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Ancak, şeker konsantrasyonu arttıkça bu etki her türde artmamış, bazı suşlarda etkinlikte azalma veya stabil seyir gözlemlenmiştir. Özellikle *S. sanguvalis* ve *S. cerevisiae* gibi türlerde %7,5 ve %12,5 şeker çözeltilerinde MBC değerleri 50 mg/mL seviyesine kadar çıkmıştır. *P. gingivalis*, *E. coli*, *C. albicans* ve *S. cerevisiae* mikroorganizmalarında kontrol grubunda (şeker çözeltisi) bakterisidal etkinliğin tespit edilemediği, bu gruplarda MBC değerlerinin belirlenemediği kaydedilmiştir.





Şekil 4.27. Propolis ekstraktlarının mikroorganizmalara karşı MBC görüntüleri

Propolisin antimikrobiyal etkileri üzerine yapılan çeşitli çalışmalar, farklı coğrafi kökenlere sahip propolis örneklerinin antimikrobiyal etkinliklerinde belirgin farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. De Luca ve ark. (2014), propolis özütünün minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBC) değerlerini 0,6–1,2 mg/mL aralığında tespit etmiştir (De Luca vd., 2014). Dziedzic ve ark. (2013) ise farklı coğrafyalardan elde edilen propolis örneklerinin bazı oral patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitelerini incelemiş; etanol ile hazırlanan propolis özütlerinin mutans streptokoklar için MİK değerini $1,10 \pm 0,45$ mg/mL, laktobasiller için ise $0,7 \pm 0,29$ mg/mL olarak belirlemiştir. Aynı çalışmada, MBC değerleri sırasıyla $9,01 \pm 3,85$ mg/mL ve $5,91 \pm 3,62$ mg/mL olarak rapor edilmiştir (Dziedzic vd., 2013).

Serra ve Escola (1995), 12 farklı propolis örneğinin antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmiş ve *S. aureus*'un inhibisyonu için en az 60–80 µg/mL, *E. coli* için ise 600–800 µg/mL propolis özütü gerektiğini bildirmiştir (Serra ve Escola, 1995). Regueira ve ark. (2017), Brezilya propolisinin *E. coli* suşlarına karşı MİK değerlerini 128–512 µg/mL, *S. aureus* suşlarına karşı ise 64–1024 µg/mL olarak bildirmiştir (Regueira vd., 2017).

Agarwal ve ark. (2012), Çin propolisinin etil alkol ekstraktının *P. gingivalis*' e karşı MİK aralığını 0,1–0,0125 µg/mL olarak bildirirken, Yoshimasu ve ark. (2018) propolisin *P. gingivalis*' e karşı 100 µg/mL MİK değerine sahip olduğunu belirtmiştir (Agarwal vd., 2012; Yoshimasu vd., 2018). *P. gingivalis*' in propolise ve fenol açısından zengin

fraksiyonlara duyarlılığı yüksek olup, MİK değerinin 128-256 µg/mL arasında değiştiği belirlenmiştir (Santos vd., 2002).

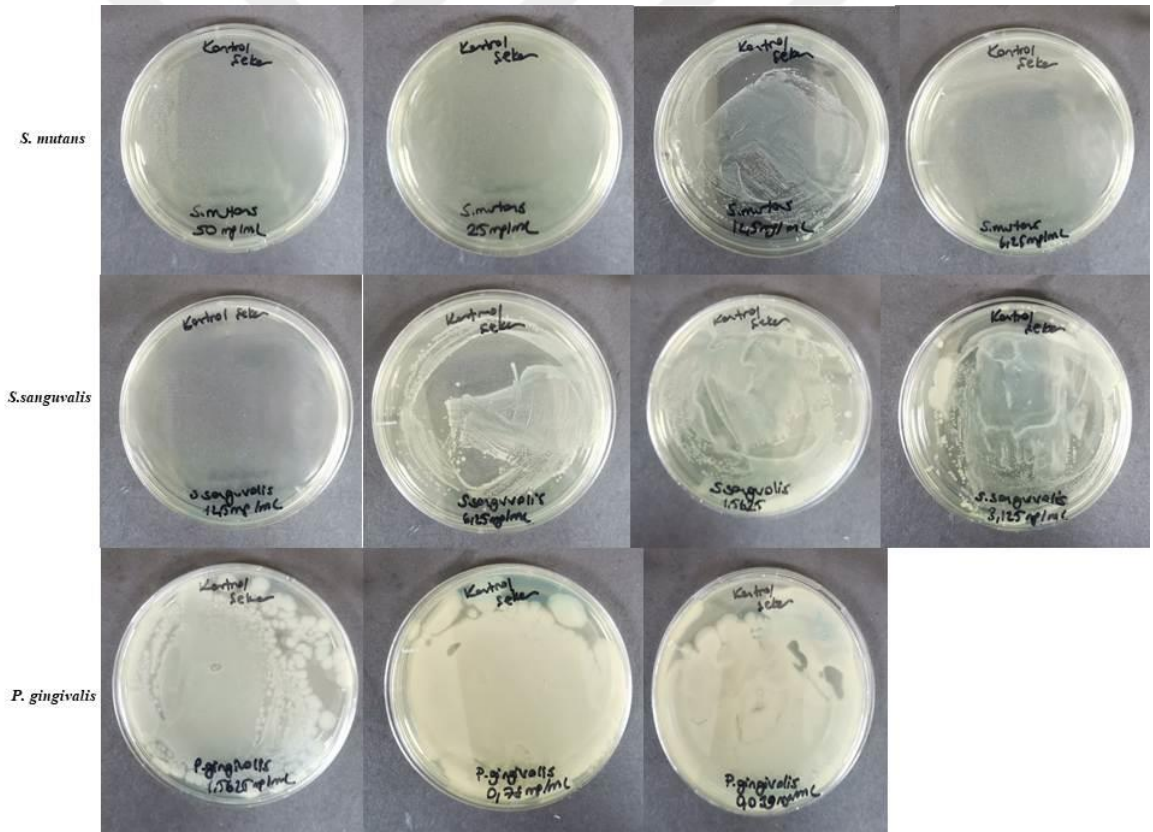
Brezilya kırmızı propolisinin incelendiği bir çalışmada, *S. mutans* için MİK değerleri 31,2–62,5 µg/mL, MBC değerleri ise 62,5–250 µg/mL arasında bulunmuştur. Aynı çalışmada *S. aureus* için MİK 31,2–125 µg/mL, MBC ise 62,5–125 µg/mL olarak belirlenmiştir (Bueno-Silva vd., 2017). Navarro-Pérez ve ark. (2021), İspanyol propolisinin etil alkol ekstraktının oral *Streptococcus* türlerine karşı antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmiştir. Çalışmada, *S. mutans*' a karşı MİK değeri 240 µg/mL ve MBC değeri 480 µg/mL, *S. sanguinis* için ise MİK 60 µg/mL ve MBC 120 µg/mL olarak ölçülmüştür (Navarro-Pérez vd., 2021).

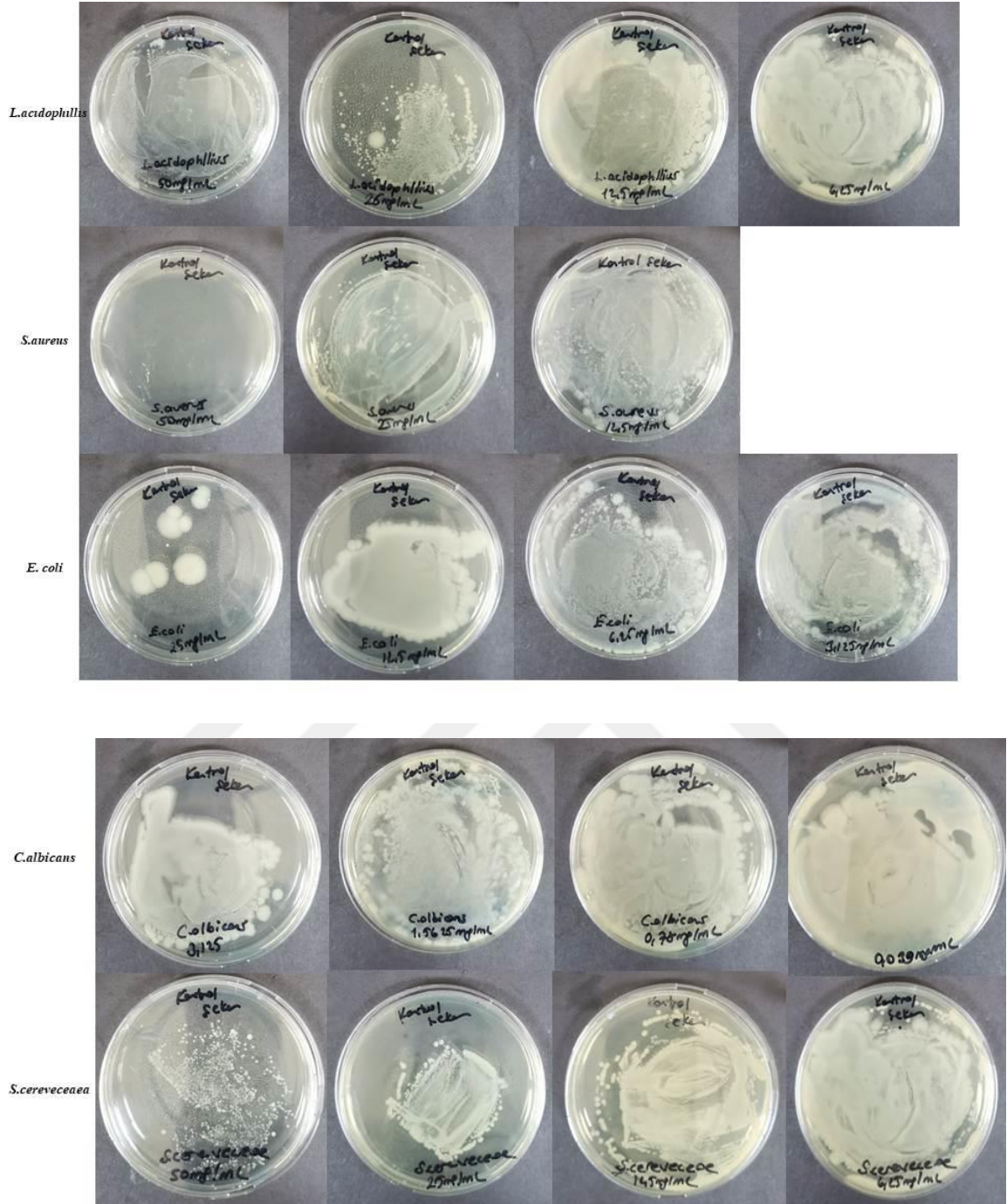
Zeighampour ve ark. (2014) çalışmasında, propolis etanol ekstraktının *S. aureus*' a karşı MİK değeri 11,7 µg/mL, MBC değeri ise 23,4 µg/mL olarak tespit edilmiştir (Zeighampou vd., 2014). Kronik periodontitis vakalarından izole edilen farklı *Candida* türlerine karşı propolisin fungistatik ve fungisidal aktivitelerinin değerlendirildiği bir çalışmada, kırmızı propolisin alkollü özütünün *C. albicans* için fungistatik aktivitesinin 32-64 µg/mL arasında değiştiği belirlenmiştir (Siqueira vd., 2015). Bursa-Orhangazi bölgesinden elde edilen propolisin *C. albicans* için MİK değeri 4 µg/mL, *E. coli* için 16 µg/mL, *S. mutans* ve *S. aureus* için ise 8 µg/mL olarak tespit edilmiştir (Uzel vd., 2005). Kayseri' den elde edilen propolisin etanol ekstraktının antimikrobiyal aktivitesinin değerlendirildiği bir çalışmada, MİK değerleri *S. aureus* için 64 µg/mL, *E. coli* için 1024 µg/mL ve *C. albicans* için 128 µg/mL olarak rapor edilmiştir (Kaya, 2012). Türk propolisinin antimikrobiyal etkisini inceleyen çalışmalardan biri olan Topcuoglu ve ark. (2019) araştırmasında, etanolik propolis özütünün *S. mutans*' a karşı MİK değeri 25 µg/mL olarak rapor edilmiştir (Topcuoglu vd., 2019). Türk arı poleni ve propolisinin etanolik özütlerinin incelendiği bir çalışmada, propolisin *S. aureus* ve *E. coli*' ye karşı MİK değerinin 6,25 mg/mL, MBC değerlerinin ise 12,5 mg/mL olduğu rapor edilmiştir (Kahraman vd., 2022).

Akça vd. (2016) yaptığı çalışmada, etanolik propolis ekstraktının çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisi incelenmiş ve MİK ile MBC değerleri sırasıyla *S. mutans* için 1024 µg/mL, *L. acidophilus* için 512 µg/mL, *P. gingivalis* için

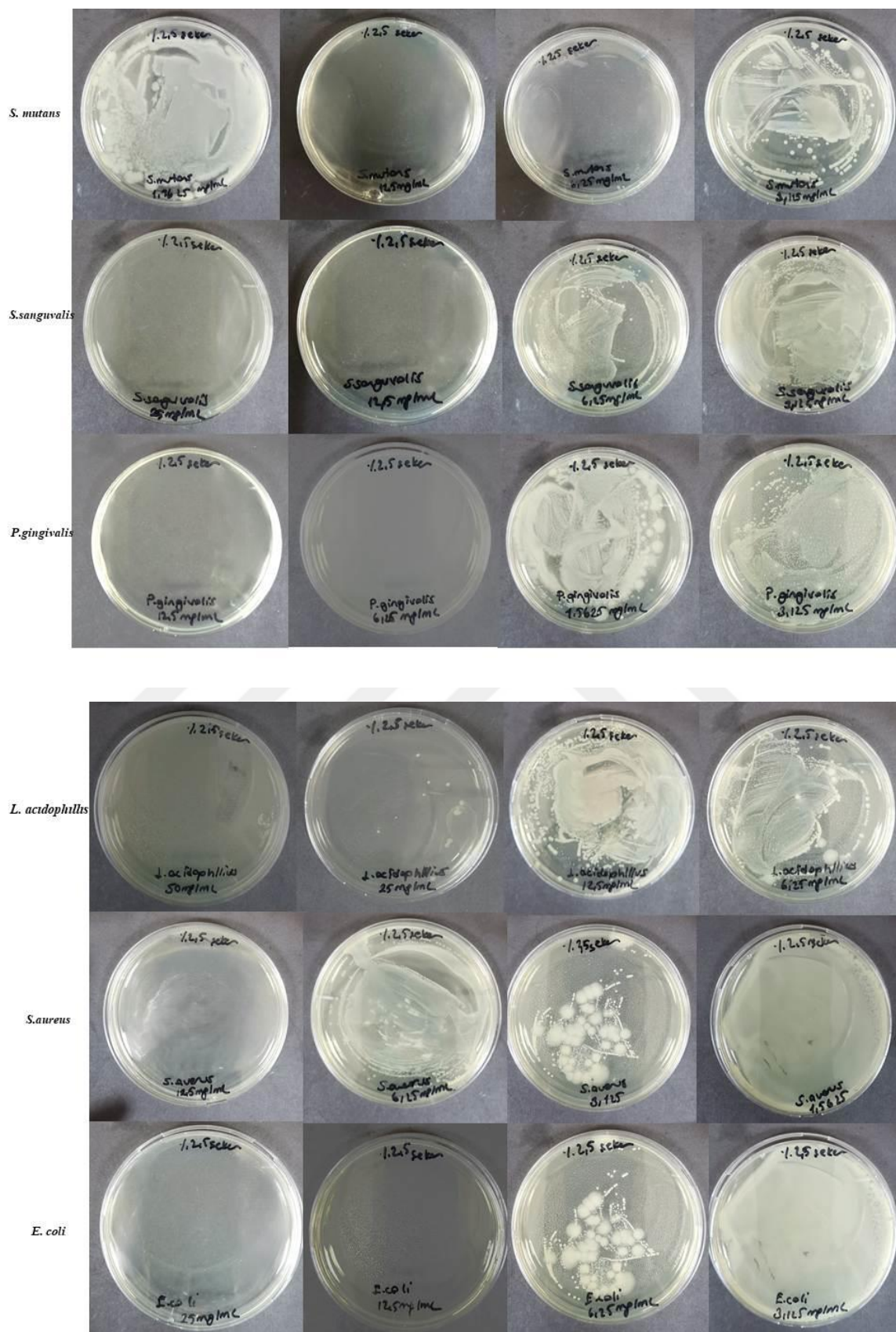
128 µg/mL ve 256 µg/mL, *C. albicans* için 64 µg/mL ve 128 µg/mL, *S. aureus* için ise 128 µg/mL ve 256 µg/mL olarak belirlenmiştir (Akca vd., 2016).

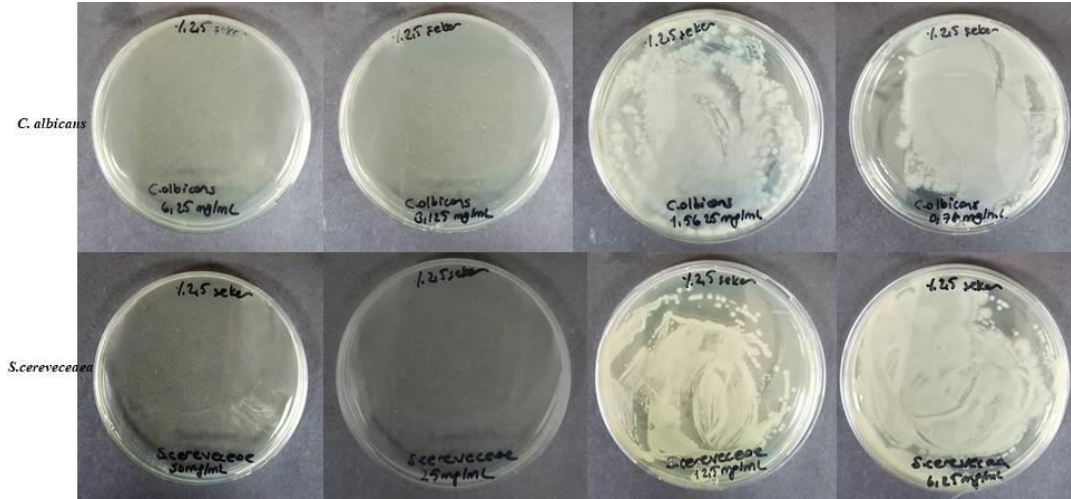
Literatürde bildirilen çalışmalar ile karşılaştırıldığında, bu çalışmada elde edilen MİK ve MBC değerlerinin bazı mikroorganizmalar için benzer aralıklarda olduğu, bazılarında ise farklılık gösterdiği görülmektedir. Bu farklılıkların, propolisin kimyasal bileşenlerindeki bölgesel değişimlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Özellikle propolisin fenolik ve flavonoid içeriği, antimikrobiyal aktivite üzerinde belirleyici bir rol oynamaktadır. Sonuç olarak, propolisin doğal bir antimikrobiyal ajan olarak değerlendirilmesi ve farklı mikroorganizmalara karşı etkinliğinin ayrıntılı olarak incelenmesi, fit kozmetik ve farmasötik alanlarda yeni uygulamalara ışık tutabilir.



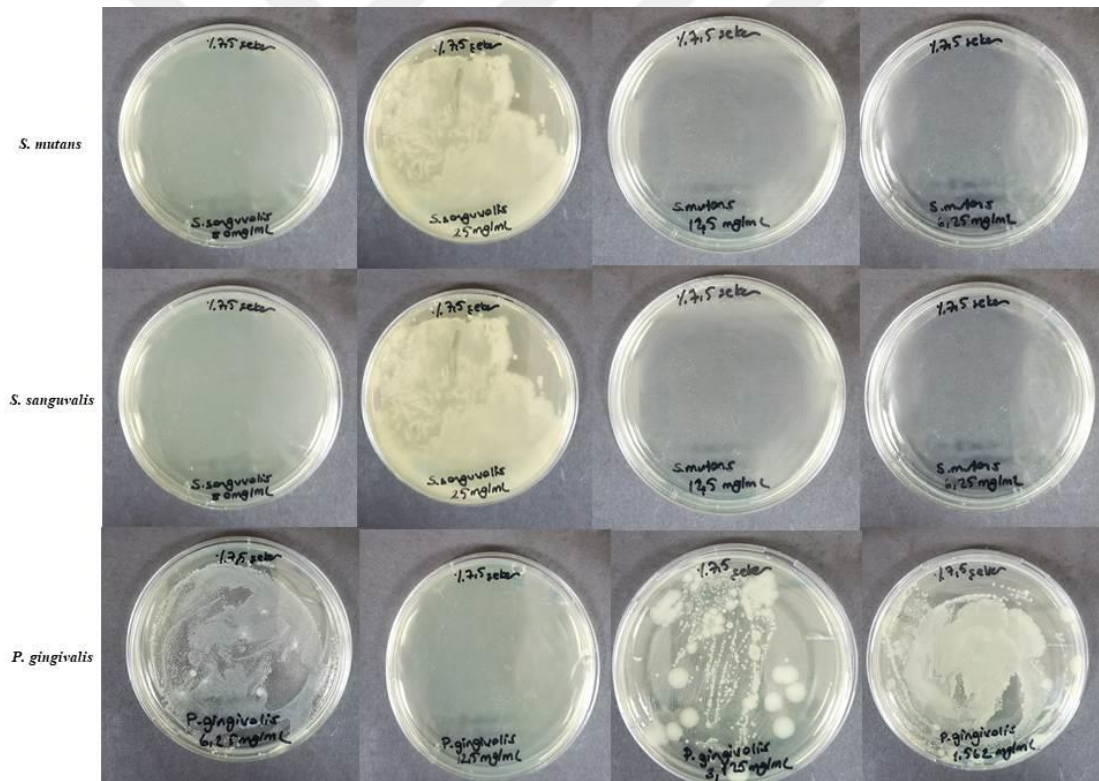


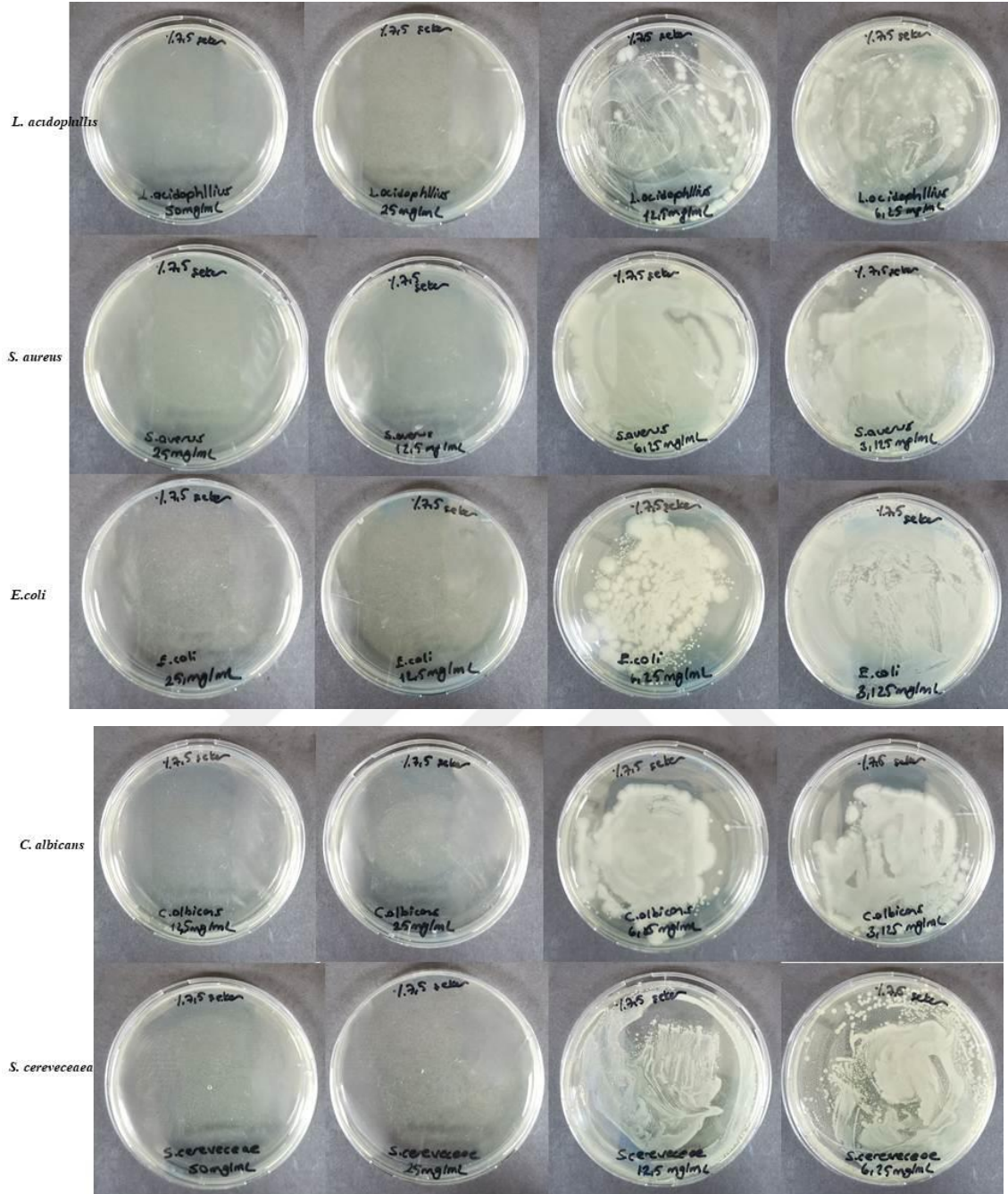
Şekil 4.28. Kontrol şekerlerinin çalışılan mikroorganizmalara karşı MBC görüntüleri



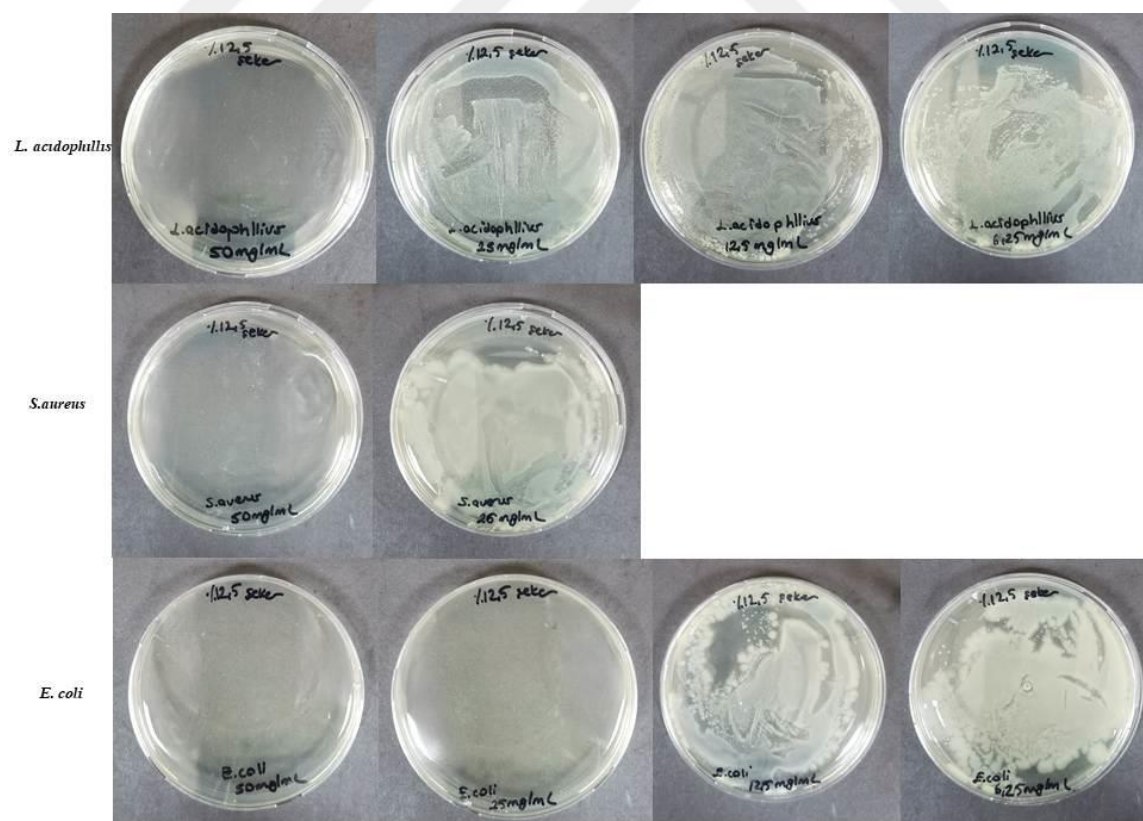
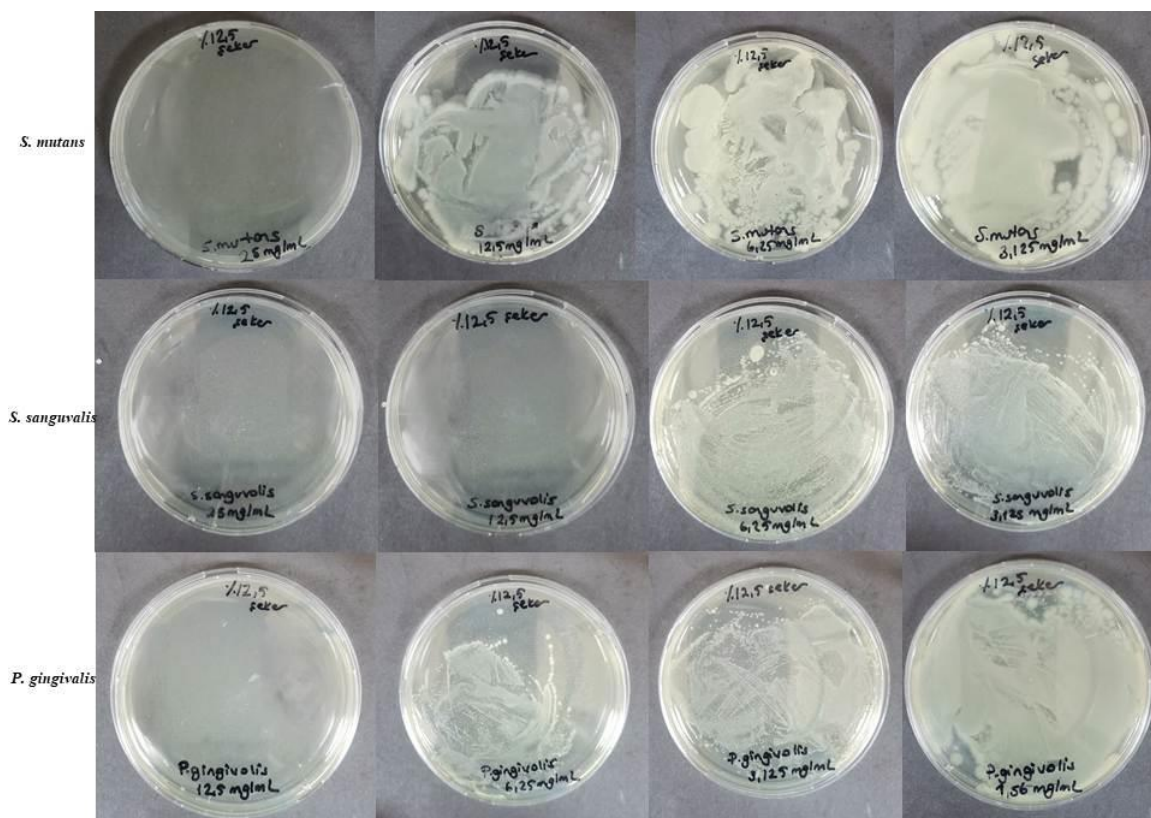


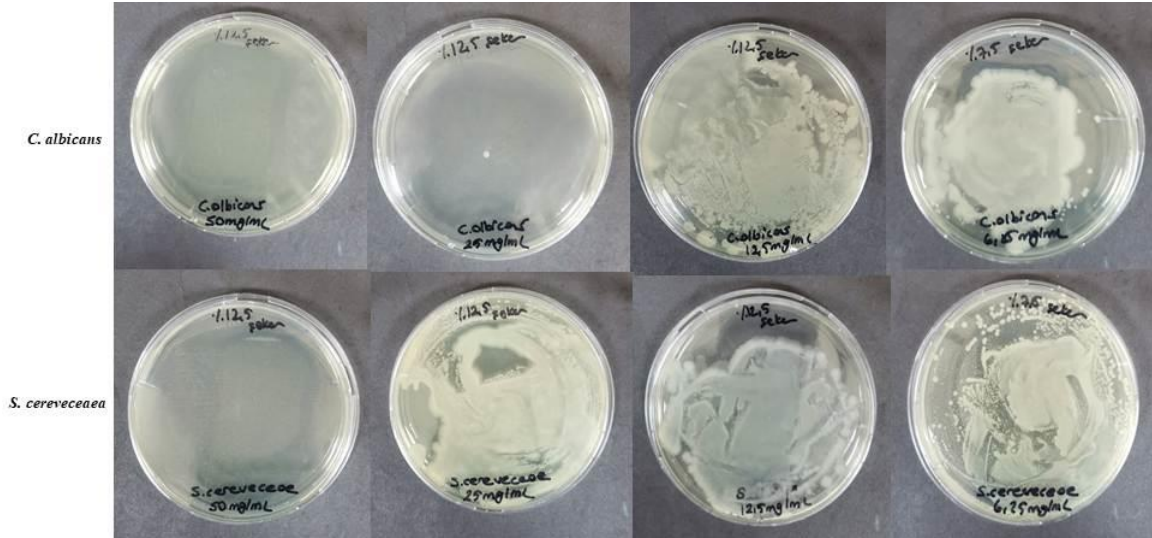
Şekil 4.29. %2,5 Propolisli şekerlerin mikroorganizmalara karşı MBC görüntüleri





Şekil 4.30. %7,5 Propolisli şekerlerin mikroorganizmalara karşı MBC görüntüleri





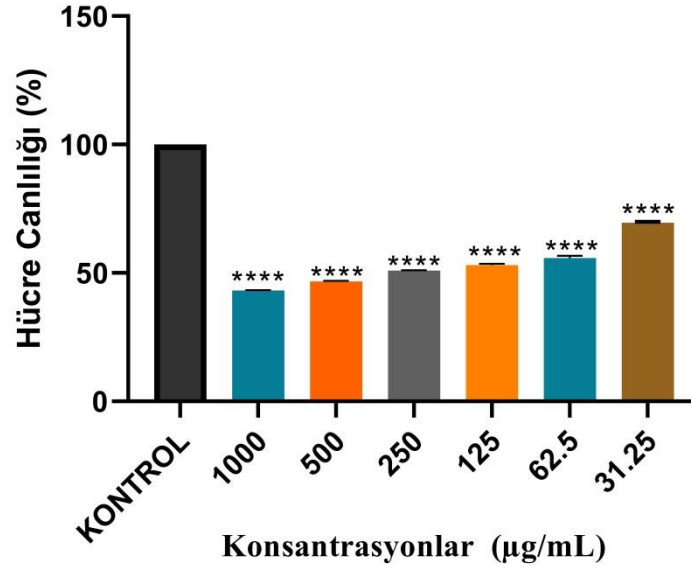
Şekil 4.31. %12,5 Propolisli şekerlerin mikroorganizmalara karşı MBC görüntüleri

4.4. Sitoksite

HGF' ler (insan dişeti fibroblastları), periodontal bağ dokusunun ana hücre popülasyonunu oluşturur ve bu nedenle dişeti doku fizyolojisini, yara iyileşmesini ve inflamatuvar yanıtları in vitro ortamda değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan model hücrelerdir (I. Lee vd., 2013). Bu çalışmada, propolis ekstraktı ve propolis içeren şeker formülasyonlarının insan dermal fibroblastları (HDF) ve insan diş eti fibroblastları (HGF) üzerindeki etkileri XTT testi ile değerlendirilmiş olup, sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (n=3) şeklinde sunulmuştur.

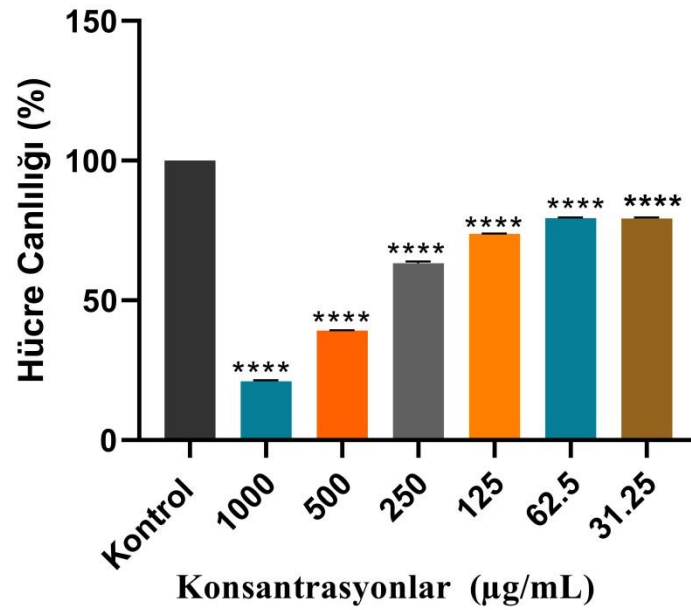
4.4.1. Propolisin Fibroblast Hücrelerine Sitotoksik Etkisi

Gerçekleştirilen XTT testi sonuçlarına göre, propolis ekstraktının HDF hücreleri üzerindeki etkisi konsantrasyona bağlı olarak değişiklik göstermiştir. 1000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda hücre canlılığı %45' in altına düşerken, bu oran azalan konsantrasyonlarla birlikte artmış ve 31,25 $\mu\text{g/mL}$ seviyesinde %75 civarına ulaşmıştır.



Şekil 4.32. Propolis ekstraktlarının HDF hücre hattında canlılık üzerine etkisi

Tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Bu veriler, yüksek doz propolisin HDF hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterebileceğini, ancak düşük dozlarda hücre canlılığının büyük ölçüde korunduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.33. Propolis ekstraktlarının HGF hücre hattında canlılık üzerine etkisi

Farklı konsantrasyonlardaki propolis ekstraktının HGF hücreleri üzerindeki etkisi XTT testi ile değerlendirilmiş kontrol grubunda hücre canlılığı %100 olarak alınmıştır. Propolis ekstraktının yüksek konsantrasyonları (1000 ve 500 µg/mL) hücre canlılığında kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşüşe neden olmuştur. Konsantrasyon azaldıkça hücre canlılığı artmış ve 31,25 µg/mL konsantrasyonunda canlılık %75-80 seviyelerine kadar yükselmiştir. Tüm konsantrasyonlarda ise hücre canlılığı %20' nin altına düşmemiştir, bu da propolis ekstraktının yüksek konsantrasyonlarda bile hücreler üzerinde ciddi sitotoksik etki oluşturmadığını göstermektedir. Bu sonuçlar, propolis ekstraktının doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttığını ancak biyoyumlu olduğunu desteklemektedir.

Literatürle karşılaştırıldığında, Al-Shaher ve ark. (2004) propolisin farklı çözücülerde çözünmüş hallerinde PDL fibroblastlarında %44-75 arasında canlılık sağladığını rapor edilmiştir (Al-Shaher vd., 2004). Khayyal ve ark. (2003) propolisin kloreksidine göre daha az sitotoksik olduğunu belirtmiştir (Khayyal vd., 2003). Oda ve ark. (2016) ile Ozan ve ark. (2007) çalışmalarında da propolisin oral fibroblastlarda biyoyumlu olduğu, hücre canlılığını yüksek düzeyde koruduğu teyit edilmiştir (Ozan vd., 2007; Oda vd., 2016). Yazdanian ve ark. (2022) propolisin konsantrasyonun azalmasıyla hücre canlılığının arttığını göstermiştir (Yazdanian vd., 2022). Bu veriler, çalışmamızdaki sonuçlarla paralellik göstermekte ve propolis içeren formülasyonların uygun konsantrasyonlarda fibroblast hücrelerinde güvenle kullanılabileceğini desteklemektedir. Ancak, propolisin yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığında düşüşe neden olduğu ve dikkatli dozajın önemli olduğu literatürde de vurgulanmıştır (Sonmez vd., 2005).

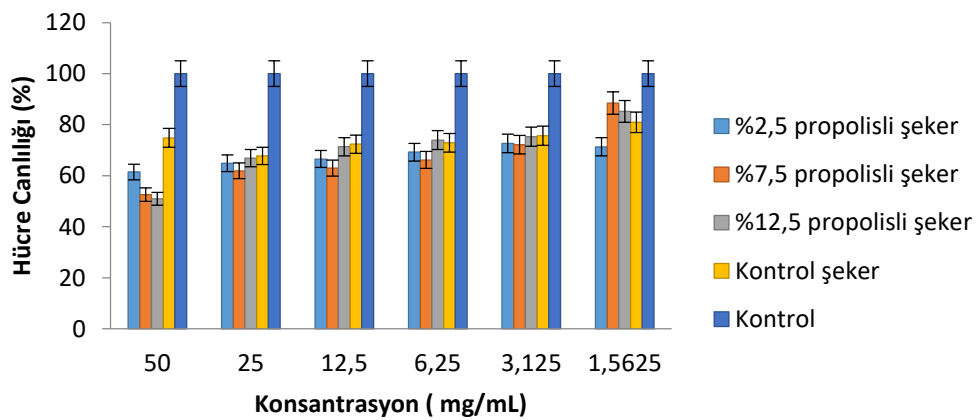
Propolis ekstraktının HDF ve HGF hücreleri üzerindeki etkileri XTT testi ile karşılaştırıldığında, her iki hücre tipinde de hücre canlılığının doz bağımlı olarak azaldığı görülmüştür. Ancak, HGF hücreleri, özellikle yüksek konsantrasyonlarda (1000 ve 500 µg/mL) HDF'ye kıyasla daha fazla sitotoksikiteye maruz kalmıştır; HGF'de hücre canlılığı %30'un altına kadar düşerken, HDF'de bu oran %45 civarında kalmıştır. Düşük konsantrasyonlarda (31.25–125 µg/mL) ise her iki hücre hattında da hücre canlılığının %70' in üzerinde seyrettiği ve bu düzeylerde propolisin hücrelerce daha iyi tolere edildiği anlaşılmıştır. Bu sonuçlar, dermal fibroblastlara kıyasla gingival fibroblastların propolis

ekstraktına karşı daha hassas olduğunu göstermekte ve formülasyon geliştirme sürecinde hücre tipi bazında doz ayarlamasının önemine işaret etmektedir.

4.4.2. Model Ürünün Fibroblast Hücrelerine Sitotoksik Etkisi

Propolis içeren şeker formülasyonlarının insan diş eti fibroblastları (HGF) ve insan dermal fibroblast hücreleri (HDF) üzerindeki etkileri XTT testi ile değerlendirilmiş olup, sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma ($n = 3$) olarak sunulmuştur.

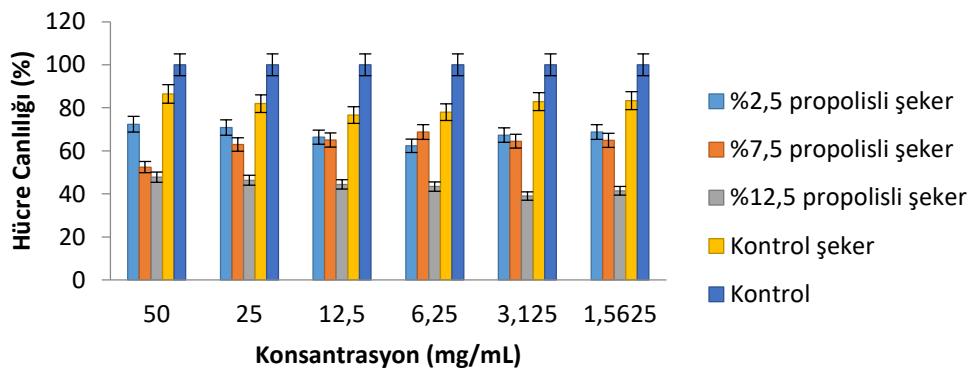
Bu çalışmada, HDF hücreleri üzerinde farklı oranlarda propolis içeren şekerlerin (%2,5, %7,5 ve %12,5) ve kontrol şekerin etkileri incelenmiştir. Elde edilen bulgular, propolis içeriğinin artmasıyla birlikte hücre canlılığında belirgin bir azalma olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle %12,5 propolisli şeker grubunda hücre canlılığı en düşük seviyelerde gözlemlenmiş, bu durum yüksek propolis oranlarının sitotoksik etkiler oluşturabileceğini düşündürmüştür. Diğer yandan, %2,5 oranındaki propolisli şeker grubu, hem hücre canlılığını büyük ölçüde korumuş hem de kontrol şeker grubuna en yakın sonuçları vermiştir. Bu veriler, propolisin hücreler üzerindeki etkisinin doza bağlı olduğunu ve düşük oranlarda kullanımının HDF hücre canlılığı açısından daha uygun olabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla, propolisin fonksiyonel gıda ya da takviye ürün formülasyonlarında kullanılmasında uygun doz aralığının dikkatle belirlenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.34. Propolisli şekerlerin HDF hücre canlılığına etkisi

Propolis içermeyen kontrol şeker formülasyonunda hücre canlılığı yaklaşık %70 seviyesinde olup, bu da formülasyonda bulunan izomalt ve balın HDF hücre canlılığı üzerinde bir miktar etkisi olduğunu göstermektedir. Propolis içeren şeker formülasyonlarında ise hücre canlılığı, kontrol şekere kıyasla anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur ve %60-65 civarında seyretmektedir. Bu sonuç, propolisin formülasyona eklenmesiyle hücre canlılığında hafif bir azalma olduğunu göstermektedir. Ancak canlılık oranlarının %50'nin altına düşmemesi, bu formülasyonların hâlâ büyük ölçüde biyouyumlu olduğunu ve sitotoksik olmadığını ortaya koymaktadır.

Propolis içeren şeker formülasyonlarının insan diş eti fibroblastları (HGF) hücre hattındaki canlılık etkisi XTT testi ile değerlendirilmiştir. Kontrol grubunda hücre canlılığı %100 olarak belirlenmiş olup, bu grup referans olarak alınmıştır. %2,5, %7,5 ve %12,5 oranlarında propolis içeren şeker gruplarında hücre canlılığında anlamlı düzeyde azalma gözlenmiştir.



Şekil 4.35. Propolisli şekerlerin HGF hücre canlılığına etkisi

Bu çalışmada, kontrol şeker grubu ile farklı oranlarda propolis içeren şeker gruplarının (%2,5, %7,5 ve %12,5) çeşitli konsantrasyonlardaki etkileri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, kontrol şeker grubu genel olarak tüm konsantrasyonlarda propolisli şeker gruplarına kıyasla daha yüksek değerlere sahiptir. Bu durum, şekerin tek başına herhangi bir baskılayıcı etki göstermediğini düşündürmektedir. Propolis içeren şeker gruplarında ise propolis oranı arttıkça ölçülen değerlerin belirgin şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. Özellikle %12,5 propolisli şeker grubunda bu düşüş daha dikkat çekici olup, yüksek orandaki propolisin potansiyel olarak baskılayıcı ya da

toksik etki gösterebileceğini düşündürmektedir. %2,5 propolisli şeker grubu, tüm propolisli gruplar içinde en yüksek değerlere sahip olmuş ve bu grup, kontrol şeker grubuna en yakın sonuçları vermiştir. Bu bulgular, propolisin biyolojik etkilerinin doza bağlı olduğunu, düşük oranlarda olumlu etkiler sağlarken yüksek oranlarda ters etkilere yol açabileceğini ortaya koymaktadır.

Şekerleme içeriğinde *R.mucilaginosa* kaynaklı pigmentin biyofonksiyonel katkı maddesi olarak değerlendirilmesinde, pigment dört farklı konsantrasyonda (10, 20, 30 ve 40 µg) MCF-7 hücre hattına uygulanmıştır. Sonuçlar, pigmentin kanser hücrelerinin canlılığını azalttığını göstermiştir. 10 µg'da %12,05 canlılık artışı gözlenmiş, 20 µg'da bu oran %12,34 azalmış, 40 µg'da ise %21,21'lik hücre inhibisyonu gerçekleşmiştir (Sharma ve Ghoshal, 2021).

4.5. Model Ürün Analizleri

4.5.1. HMF Analizi

HMF (5-hidroksimetilfurfural) miktarının belirlenmesi, gıda ürünlerine uygulanan ısıl işlemin derecesini ve depolama koşullarını değerlendirmek için bir gösterge olarak kullanılmaktadır (Tüfekci ve Fenercioğlu, 2010). HMF, bazı gıda ürünlerinde kötü kalite göstergesi olarak kabul edilmektedir (Gökmen ve Senyuva, 2006). Depolama süresi veya uygulama sıcaklığı arttıkça HMF miktarı da artmaktadır. Sıcaklık dışında, gıdalardaki HMF oluşumu şeker tipi, pH, su aktivitesi ve pozitif yüklü iyon konsantrasyonuna da bağlı olarak değişmektedir (Capuano ve Fogliano, 2011). HMF analizi, genellikle şekerlemelerde ısıya bağlı bozunmaları ve şekerin karamelizasyon sürecini değerlendirmek için kullanılır. HMF, özellikle yüksek sıcaklıkta ve uzun süreli işlem süreçlerinde şekerlerin dönüşümünden kaynaklanır ve yüksek seviyeleri ürünün kalitesizleştiğini veya bozulduğunu gösterebilir. Şekerleme örneğimizde ölçülen HMF seviyesi 14.538 mg/kg olup, genellikle şekerlemelerde HMF miktarının 15 mg/kg'ı geçmemesi beklenir. Bu sonuç, limitin hemen altında kalmaktadır ve dolayısıyla kabul edilebilir bir değer olarak değerlendirilebilir. Yapılan analiz sonucu **(Ek 1)** verilmiştir.

Üzüm, dut ve keçiboynuzu pekmezi jeli şekerlerinin HMF değerleri sırasıyla $3,61 \pm 0,01$, $4,20 \pm 0,03$ ve $2,54 \pm 0,01$ mg HMF/100 g kuru madde olarak belirlenmiştir (Özçelik vd., 2022). Şekerleme örneğimizde ölçülen HMF seviyesi ise yaklaşık 2,23 mg/100 g kuru madde olarak hesaplanmış olup, bu değer üzüm, dut ve keçiboynuzu pekmezi jeli şekerlerinde bildirilen HMF seviyelerine kıyasla daha düşük veya benzer düzeydedir. Bu durum, şekerleme örneğinin HMF içeriğinin pekmezli jeli şekerlerle karşılaştırıldığında uygun aralıkta olduğunu göstermektedir.

4.5.2. pH Değeri

Şekerlemelerde pişirme sırasında ve şekillendirilmeden önce stabilitesi için pH çok önemlidir (Lees ve Jackson, 1995). pH ve su aktivitesi, gıda maddelerinde istenmeyen mikroorganizmaların gelişmesini kontrol eden en önemli faktörlerdir (Gibson ve Hocking, 1997).

3 farklı konsantrasyon ve kontrol şekerleme örneklerimizde zamanla pH değerleri artış göstermektedir. Bu artışın sebebi olarak zamanla propolisin etkisiyle asidik bileşiklerin kaybolması veya alkali bileşiklerin artması nedeniyle pH yükselmektedir. Bu artış, özellikle %2,5 ve %7,5 propolisli şekerlerde daha belirgin, %12,5' lik propolisli şekerlerde daha sınırlı kalmıştır.

Kontrol Grubu: pH değeri, 90. güne kadar sürekli bir artış göstermektedir. Bu, şekerin içeriğinde doğal olarak asidik bileşiklerin azalması veya alkali bileşiklerin birikmesiyle ilgili olabilir.

%2,5 Propolisli Şeker: kontrol grubuna benzer şekilde, pH değerinde belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Başlangıçta daha düşük olsa da, zamanla artan pH değeri, propolisin etkisinin zamanla dengeye oturduğunu gösteriyor.

%7,5 Propolisli Şeker: bu grup da kontrol grubuna benzer şekilde pH artışı göstermektedir, ancak başlangıçtaki pH değeri biraz daha yüksek olduğu için, artış daha belirgin ve daha hızlı gerçekleşiyor.

%12,5 Propolisli Şeker: Bu grupta pH artışı en düşük seviyededir. Başlangıçtaki asidik bileşiklerin etkisi daha uzun süre devam etmiş olabilir ve bu nedenle pH artışı sınırlı kalmıştır. Propolis oranının yüksek olması, asidik bileşiklerin etkisini daha fazla korumasına yol açmış olabilir.

Propolisin asidik bileşenleri, şekerin ilk günlerinde pH'ı düşürür. Zamanla, propolisin içerdiği asidik bileşiklerin bazıları bozulabilir veya çözünerek ortamdan kaybolabilir. Bu da pH'ın artmasına neden olur. Asidik bileşiklerin azalmasıyla şekerin pH'ı yükselir, çünkü daha az asidik bileşik mevcut olur ve bu durum şekerin daha alkali olmasına yol açmaktadır.

Tablo 4.10. Şeker örneklerinin pH analizi verileri.

Numune Adı	0. Gün	60.Gün	90.Gün
%2,5 propolisli şeker	4,06±0,01	4,13±0,02	5,38±0,05
%7,5 propolisli şeker	4,20 ±0,05	4,33±0,03	5,35±0,01
%12,5 propolisli şeker	4,18±0,01	4,24±0,02	4,32±0,02
Kontrol Şeker	4,14±0,01	4,22±0,01	5,39±0,01

Elde edilen bu sonuçlar literatürde bildirilen çeşitli verilerle karşılaştırıldığında, genel anlamda benzerlik göstermektedir. Mutlu ve ark. (2018), bal kullanılarak üretilen jöleli şekerlerde pH değerlerinin $4,26 \pm 0,24$ ile $5,03 \pm 0,02$ arasında değiştiğini rapor etmişlerdir (Mutlu vd., 2018). Khouryieh ve ark. (2005) ise şekerlerin pH değerlerini 3,35–3,39 arasında bildirmiştir (Khouryieh vd., 2005). Ventura ve ark. (2013) ise 3,65–4,29 aralığında değerler elde etmişlerdir (Ventura vd., 2013). Aydın (2019) tarafından yapılan bir başka çalışmada, propolis ilaveli yumuşak şekerin pH değeri $4,02 \pm 0,05$ olarak verilmiştir (Aydın, 2019). Ayrıca, Shen ve ark. (2017), formülasyonunda gıda asitleri içeren şekerlemelerin pH değerlerini 4,5'in altında bulmuş ve en düşük pH'ı $2,99 \pm 0,49$ olarak raporlamıştır (Shen vd., 2017). Farklı pekmezlerin şeker formülasyonunda kullanıldığı çalışma da şekerlerin pH değerleri 5.65 ± 0.05 , 6.36 ± 0.04 ve 5.52 ± 0.08 arasında olduğu rapor edilmiştir (Özçelik vd., 2022).

Çalışmamızda elde edilen pH değerlerinin çoğunlukla literatürdeki aralıklarla uyumlu olduğu, ancak depolama süresine bağlı olarak özellikle düşük konsantrasyonlu propolis

içeren örneklerde pH artışının daha belirgin olduğu gözlenmiştir. Bu artış, formülasyonda kullanılan bileşenlerin zamanla asidik karakterini kaybetmesiyle açıklanabilir.

4.5.3. Renk Analizi

Sert şeker ürünlerinde kalite parametrelerinden biri de renktir (Šmídová vd., 2003). Gıda ürünlerinin tercih edilirliliğini etkileyen önemli bir kriter olan renk ürün geliştirme süreçlerinde büyük önem taşımaktadır (Sukkwai vd., 2018). Son yıllarda, tüketicilerin gıdalarda kullanılan sentetik renklendiricilerin güvenilirliğine dair kaygıları ve yasal düzenlemeler nedeniyle, yaygın olarak kullanılan sentetik boyalara alternatif olarak doğal pigmentlerin kullanımında da bir artış gözlemlenmektedir (Koç vd., 2012). Propolis özütlerinin formülasyonlara eklenmesi, eklendiği gıdaya rengini vermektedir (Gonçalves vd., 2011). Bu durum, tüketici kabul edilebilirliğini önemli ölçüde etkilemektedir. Doğal renk maddeleri, üründe istenilen rengi sağlamalarının yanı sıra, biyoaktif özellikleri sayesinde serbest radikallerin neden olduğu sağlık problemlerini önleyici etkileriyle tercih edilmektedir. Bal ve propolis, yüksek biyoaktif özellikleriyle birçok gıda maddesi içeriğinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Tablo 4.11. Şeker örneklerinin renk analizi sonuçları

Numune Adı	L*	a*	b*
%2,5 propolisli şeker	40,03	1,51	17,24
%7,5 propolisli şeker	46,60	4,23	24,14
%12,5 propolisli şeker	37,88	6,51	26,53
Kontrol şeker	53,44	-0,47	10,92

Çalışmamız da propolisin farklı konsantrasyonlarda kullanılmasıyla hazırlanan şeker numunelerinde farklı renkler gözlemlenmiştir. Propolis konsantrasyonunun artması, şekerin renginde belirgin değişikliklere yol açmış: L* değeri (açıklık) düşerken, a* (kırmızı) ve b* (sarı) değerleri artmaktadır. Propolis ilavesiyle şekerlemelerin parlaklık (L*) değerlerinin genelde azaldığı bu durum propolisin doğal yapısının şekerleme yüzeyinde opaklık oluşturarak parlaklığı azaltabileceğini göstermektedir. %12,5 propolis konsantrasyonuna sahip şekerlemelerde en düşük L* değeri (37,88) ölçülürken, kontrol grubunda ise en yüksek L* değeri (53,44) elde edilmiştir. Bu durum, propolisin

şekerlemelerin parlaklık değerini düşürdüğünü ve eklenen propolis miktarının, şekerlemenin daha mat bir görünüme sahip olmasına yol açtığını göstermektedir.

Kontrol grubunun a^* değeri -0,47 ile yeşil tonlarına yakınken, propolis konsantrasyonu arttıkça a^* değeri de artmış ve şekerlemelerde kırmızıya doğru bir kayma gözlemlenmiştir. Propolis miktarı arttıkça şekerin daha kırmızımsı bir ton aldığı, bu durumun da propolisin renk özelliklerinin şekerin rengini değiştirdiğini gösterdiği söylenebilir. Kontrol grubunun b^* değeri 10,92 ile sarı tonlarına yakın bir değerdedir. Propolis miktarının artmasıyla şekerin sarı tonunda belirgin bir artış gözlemlenmektedir. Sarılıktaki bu artış, propolisin yapısındaki sarı-kahverengi pigmentlerin şekerin yüzey renklenmesine etkisini açıkça ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, propolisin renk özelliklerinin şekerin renk profili üzerinde güçlü bir etkisi olduğunu göstermektedir.

Şekerleme ürünlerinde biyofonksiyonel katkı maddesi olarak değerlendirilen *R. mucilaginosa* kaynaklı pigmentin karakterizasyonunda, karotenoid içeriğindeki artışla birlikte L^* değerinde azalma gözlemlendiği, kırmızılığı ifade eden a^* değeri 0,24–1,39 arasında değişmiş ve karotenoid konsantrasyonu arttıkça bu değer artmıştır. Sarılığı temsil eden b^* değeri ise 0,07–1,55 aralığında olduğu bildirilmiştir (Sharma ve Ghoshal, 2021). Jeon ve ark. (2011) tarafından yürütülen çalışmada, izomalt içeren sakkarozsuz sert şeker formülasyonlarında izomalt kullanımının renk özellikleri üzerinde belirgin etkiler oluşturduğu; sarılık (b) ve kırmızılık (a) değerlerinde artışa, parlaklık (L^*) değerinde ise düşüşe neden olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde, yürütülen çalışmamızda şeker formülasyonuna eklenen bitki özütünün, şekerlemenin parlaklık (L^*) değerini azaltırken, kırmızılık (a) ve sarılık (b) değerlerini artırdığı gözlemlenmiştir (J.-G. Jeon vd., 2011). Farklı pekmez türlerinden hazırlanan jeli şekerlerin renk özelliklerinin bildirildiği bu çalışma da dut jeli şekeri, yüksek a^* (8,42) ve b^* (1,96) değerleriyle kırmızımsı ve hafif sarımsı bir renge sahipken, üzüm jeli şekeri daha düşük a^* (3,87) ve b^* (0,59) değerleriyle daha soluk ve nötr bir renk profili göstermiştir. Keçiboynuzu jeli şekeri ise en düşük L^* (24,09) değeri ile daha koyu bir ton sergilemiş, orta düzeyde a^* (6,25) ve b^* (2,70) değerleriyle kahverengimsi bir renk karakteristiği ortaya koymuştur. Jeli şekerlerin renk yapısının kullanılan pekmez çeşidine bağlı olarak farklılık gösterdiği rapor edilmiştir (Özçelik vd., 2022).

4.5.4. Titre Edilebilir Asitlik Tayini

Propolisin varlığı ve farklı konsantrasyonları şekerlerde titre edilebilir asitlik üzerinde etkili olmuştur. Hazırlanan tüm şekerlerde titre edilebilir asitlik zamanla azalmaktadır. Ph değerlerinde ki artış titre edilebilir asitlikte azalma birbirini tamamlar niteliktedir. Kontrol grubunda titre edilebilir asitlik, zamanla belirgin şekilde azalmaktadır.

%2,5 propolis içeren şekerin titre edilebilir asitliği kontrol grubundan düşük başlamış ve zamanla benzer bir azalma eğilimi göstermiştir. Bu, düşük propolis oranının asitlik üzerindeki etkisinin sınırlı olduğunu gösterebilir.

%7,5 propolis içeren şekerin titre edilebilir asitlik zamanla daha yavaş bir azalma göstermiştir. Propolisin artan konsantrasyonu, asidik bileşiklerin korunmasına veya yavaş bozulmasına katkıda bulunmuş olabilir.

%12,5 propolis içeren şekerin başlangıç titre edilebilir asitliği en düşük seviyededir. Ancak, 60. günde hafif bir artış gösterdikten sonra 90. gün itibarıyla tekrar düşmüştür. Bu artış, propolisin bileşimindeki asidik bileşiklerin zamanla daha etkin hale gelmesiyle açıklanabilir.

Propolisli şekerler, kontrol grubuna göre titre edilebilir asitlik açısından daha düşük başlangıç değerlerine sahiptir. Kontrol grubunda titre edilebilir asitlik zamanla daha hızlı azalmış, propolisli şekerlerde bu azalma daha yavaş olmuştur. Zamanla şekerlerdeki asidik bileşiklerin kaybolması, hem titre edilebilir asitliğin düşmesine hem de pH'nın yükselmesine neden olmaktadır.

Tablo 4.12. Şeker örneklerinin titre edilebilir asitlik sonuçları

Numune Adı	0. Gün (g/mL)	60. gün (g/mL)	90. gün (g/mL)
%2,5 propolisli şeker	0,031±0,00	0,025±0,00	0,017±0,00
%7,5 propolisli şeker	0,021±0,00	0,018±0,00	0,014±0,00
%12,5 propolisli şeker	0,019±0,00	0,016±0,00	0,012±0,00
Kontrol Şeker	0,040±0,00	0,034±0,00	0,021±0,00

Bu çalışmada sert şeker örneklerinin titre edilebilir asitlik değerleri zamanla azalma eğilimi göstermiştir. 0. gün verilerine göre, en yüksek titre edilebilir asitlik değeri kontrol grubunda ($0,040 \pm 0,00$ g/mL), en düşük değer ise %12,5 propolis içeren örnekte ($0,019 \pm 0,00$ g/mL) gözlemlenmiştir. Depolama süresi boyunca (60. ve 90. gün) tüm örneklerde belirgin bir azalma izlenmiş; 90. gün sonunda bu değerler sırasıyla %2,5 propolisli şeker için $0,017 \pm 0,00$ g/mL, %7,5 propolisli için $0,014 \pm 0,00$ g/mL, %12,5 propolisli için $0,012 \pm 0,00$ g/mL ve kontrol şeker için $0,021 \pm 0,00$ g/mL olarak ölçülmüştür. Bu düşüş, asidik bileşiklerin zamanla parçalanması veya şeker matrisine bağlanarak titrasyona katılamamasından kaynaklanıyor olabilir.

Literatürde, özellikle yumuşak jöle tipi şekerlemeler üzerine yapılan çalışmalarda daha yüksek titre edilebilir asitlik değerleri rapor edilmiştir. Ünal (2021), jöle tipi şekerlemelerde bu değeri 0,21–0,43 g/mL aralığında bildirmiştir (Ünal, 2021). Aydın (2019), tarafından propolis ilaveli yumuşak şekerleme için bildirilen $0,26 \pm 0,00$ g/mL’lik asitlik değeri de bu çalışmadaki sert şeker örneklerine kıyasla oldukça yüksektir (Aydın, 2019). Organik pekmezlerden elde edilen jeli şekerlerde asitlik değerleri pekmez türüne göre değişiklik gösterdiği; üzüm ve dut pekmezinden yapılan jeli şekerlerin asitliği düşük (%1,88 ve %1,48) iken, keçiboynuzu pekmezi jeli şekerinde (%3,00) asitlik daha yüksek rapor edilmiştir (Özçelik vd., 2022). Prakash ve Priya (2016) ise, yaban mersini oranının artmasıyla birlikte titre edilebilir asitlikte de artış gözlemlendiğini ve bunun antioksidan içerikle bağlantılı olabileceğini vurgulamıştır (Prakash ve Priya, 2016).

Bu farklılık, çalışmamızda kullanılan ürün formunun, kullanılan propolis konsantrasyonlarının düşük olması ve formülasyonda sitrik asit gibi dış kaynaklı asidik bileşiklerin kullanılmaması ile açıklanabilir.

4.5.5. Suda Çözünür Kuru Madde Tayini

Propolisli ve kontrol grubu şekerleme örneklerinin zamanla suda çözünür kuru madde (%) içerikleri değerlendirildiğinde, tüm gruplarda belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Özellikle propolis içeren şekerleme örneklerinde bu artış daha belirgin olup, propolis oranı arttıkça başlangıçtan itibaren daha yüksek kuru madde değerleri elde edilmiştir.

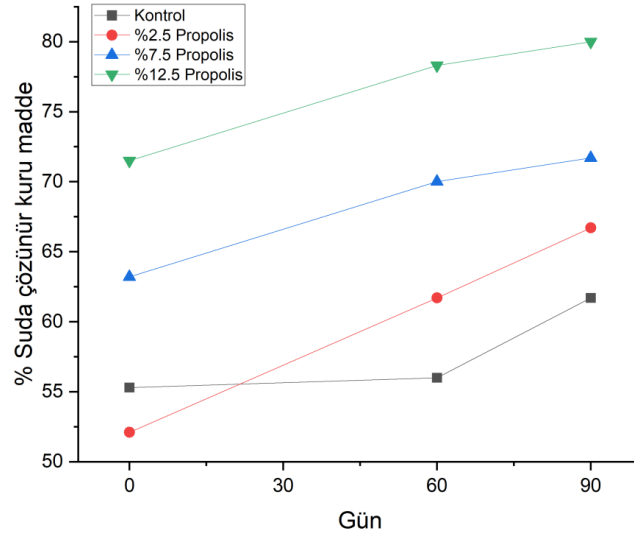
İlk gün yapılan ölçümlerde %2,5 propolis içeren şekerleme %52,1, %7,5 oranında propolis içeren şekerleme %63,2 ve %12,5 propolisli şekerleme ise %71,5 oranında suda çözünür kuru madde içeriğine sahipken, kontrol grubunda bu değer % 55,3 olarak belirlenmiştir.

Depolamanın 60. gününde, tüm gruplarda kuru madde oranları artış göstermiş ve sırasıyla %61,7, %70,0 ve %78,3 değerlerine ulaşmıştır. Kontrol grubunda ise bu artış oldukça sınırlı kalmış ve yalnızca %56,0 olarak ölçülmüştür.

Depolama süresi 90 güne ulaştığında en yüksek kuru madde oranı %12,5 propolisli şekerlemede %80,0 olarak tespit edilirken, diğer propolisli gruplarda da artış devam etmiş ve sırasıyla %66,7 ve %71,7 değerleri kaydedilmiştir. Kontrol grubundaki artış ise yine sınırlı kalmış ve % 61,7’de sabitlenmiştir. Bu bulgular, propolis ilavesinin şekerleme ürünlerinde suda çözünür kuru madde miktarını hem başlangıçta hem de zamanla artırdığını göstermektedir. Propolis içeriğindeki fenolik ve diğer çözünür aktif bileşiklerin bu artışta etkili olabileceği düşünülmektedir.

Tablo 4.13. Şekerleme örneklerinin zamanla suda çözünür kuru madde (%)

Numune Adı	0.Gün (%)	60. gün (%)	90. gün (%)
%2,5 propolisli şeker	52,1±0,00	61,7±0,00	66,7±0,00
%7,5 propolisli şeker	63,2±0,00	70±0,00	71,7±0,00
%12,5 propolisli şeker	71,5±0,00	78,3±0,00	80±0,00
Kontrol Şeker	55,3±0,00	56±0,00	61,7±0,00



Şekil 4.36. Şekerleme örneklerinin zamanla suda çözünür kuru madde tayini

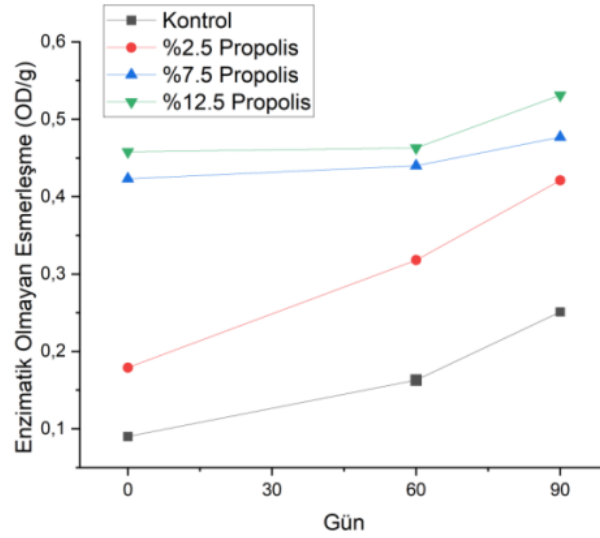
Jelatin kullanılarak hazırlanan şekerleme örneklerinin su çözünebilir katı değerleri 80° Brix' in üzerinde oldukları bildirilmiştir (Delgado ve Bañón, 2018). Farklı pekmez türleri kullanılarak hazırlanan jeli şekerlemelerin suda çözünür madde miktarları üzüm pekmezli jeli şekeri $32,30 \pm 0,34$, dut pekmezi jeli şekeri $32,10 \pm 0,31$ ve keçiyoynuzu pekmezi jeli şekeri $31,72 \pm 0,21$ olarak bildirilmiştir (Özçelik vd., 2022). Propolis içeren şekerleme örneklerimizde suda çözünür kuru madde oranları, propolis konsantrasyonu ve depolama süresi arttıkça belirgin bir artış göstermiştir. Bu bulgular, propolis eklenmesinin şekerlemelerde suda çözünür kuru madde miktarını artırarak ürünün kimyasal stabilitesine ve muhtemelen raf ömrüne olumlu katkı sağladığını göstermektedir. Ayrıca, propolis konsantrasyonunun yükselmesi ile suda çözünür madde oranındaki artış, ürün formülasyonunda propolisin işlevsel bir bileşen olarak kullanılabileceğine işaret etmektedir.

4.5.6. Enzimatik Olmayan Esmerleşme Analizi

Maillard reaksiyonu, amino grupları ile indirgen şekerler arasında gerçekleşen bir kimyasal tepkimedir. Bu reaksiyon, özellikle yüksek sıcaklıklarda hızlanarak gıdaların renk, tat ve aroma özelliklerinde önemli değişikliklere neden olmaktadır (Martins vd., 2000). Enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları, şekerlemelerin hem görsel hem de

lezzet kalitesini belirleyen temel süreçlerden biridir (Bağdatlıoğlu ve Hışıl, 1993).

Kontrol grubu ve diğer tüm şeker örneklerinde suda çözünür kuru madde oranı zamanla artış göstermektedir. Bu artış şekerin zamanla daha fazla su kaybetmesi ve kimyasal reaksiyonların devam etmesiyle daha yoğun hale geldiğini ve esmerleşme sürecinin devam ettiğini göstermektedir. Şekerlemeye propolis ekstraktının ilavesinin enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonunu artırdığı gözlenmiştir.



Şekil 4.37. Şekerleme örneklerinin zamanla enzimatik olmayan esmerleşme verileri

Yumuşak jöle tipi şekerlemelerin yer aldığı çalışma da enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonu sonuçları 0.197-0.880 OD/g aralığında değişkenlik gösterdiği belirtilmiştir (Aydın, 2019). Şekerleme örneklerimizin enzimatik olmayan esmerleşme verileri 0,09 ila 0,531 OD/g aralığında tespit edilmiştir.

Tablo 4.14. Şekerleme örneklerinin zamanla enzimatik olmayan esmerleşme verileri

Numune Adı	0. gün (OD/g)	60. gün (OD/g)	90. gün (OD/g)
%2,5 propolisli şeker	0,179±0,00	0,318±0,00	0,421±0,00
%7,5 propolisli şeker	0,423±0,00	0,44±0,01	0,477±0,00
%12,5 propolisli şeker	0,458±0,00	0,463±0,00	0,531±0,00
Kontrol Şeker	0,09±0,00	0,163±0,00	0,251±0,01

Tüm şekerleme örneklerinde depolama süresi boyunca absorbans değerlerinde artış gözlemlenmiştir. Bu artış, özellikle propolis içeren gruplarda başlangıç değerinden itibaren daha yüksek düzeydedir. Depolamanın 0. gününde %2,5 propolis içeren şekerleme örneği 0,179 değerinde absorbans gösterirken, bu değer %7,5 propolisli örnekte 0,423, %12,5 propolisli örnekte ise 0,458 olarak ölçülmüştür. Aynı gün kontrol grubunun absorbans değeri 0,090 ile en düşük seviyede kalmıştır. Depolamanın 60. gününde %2,5' lik grupta anlamlı bir artış görülmüş (0,318), diğer gruplarda ise daha sınırlı bir yükselme gerçekleşmiştir. 90. gün itibarıyla esmerleşme reaksiyonu tüm gruplarda devam etmiş ve en yüksek absorbans değeri %12,5 propolisli şekerleme örneğinde 0,531 olarak belirlenmiştir. Bu örnekleri sırasıyla %7,5 (0,477) ve %2,5 (0,421) propolisli şekerler takip etmiştir. Kontrol grubundaki değer ise 90. gün sonunda 0,251'e ulaşarak diğer grupların gerisinde kalmıştır. Bu sonuçlar, propolis ilavesinin şekerleme ürünlerinde esmerleşme reaksiyonunu artırdığını, bunun da muhtemelen propoliste bulunan bazı fenolik bileşiklerin Maillard reaksiyonuna katkı sağlamasından kaynaklandığını göstermektedir. Ayrıca depolama süresinin uzamasıyla birlikte bu reaksiyonun daha da ilerlediği ve renk değişiminin zamanla daha belirgin hale geldiği anlaşılmaktadır.

4.5.7. Kuru Madde Analizi

Kontrol grubundaki kuru madde yalnızca şeker alkolü ve baldan kaynaklanmaktadır. Bu grupta propolis ilavesi olmadığından kuru madde oranı diğer gruplara göre daha düşüktür. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan şeker örneklerinde artan konsantrasyon örneklerin de kuru madde miktarı artış göstermiştir. Propolis konsantrasyonu arttıkça şeker örnekleri içerisinde ki kuru madde miktarları da artış göstermiştir. Bu durum, propolisin bileşenlerinin şekerin çözünür madde içeriğini zenginleştirdiğini ve esmerleşme süreçlerini etkilediğini ortaya koymaktadır. Enzimatik olmayan esmerleşme sonuçlarında en yüksek oran, %12,5 propolisli şeker örneklerinde belirlenmiştir ve bu örnek aynı zamanda en yüksek kuru madde içeriğine sahiptir.

Tablo 4.15. Şekerleme örneklerinin kuru madde miktarları

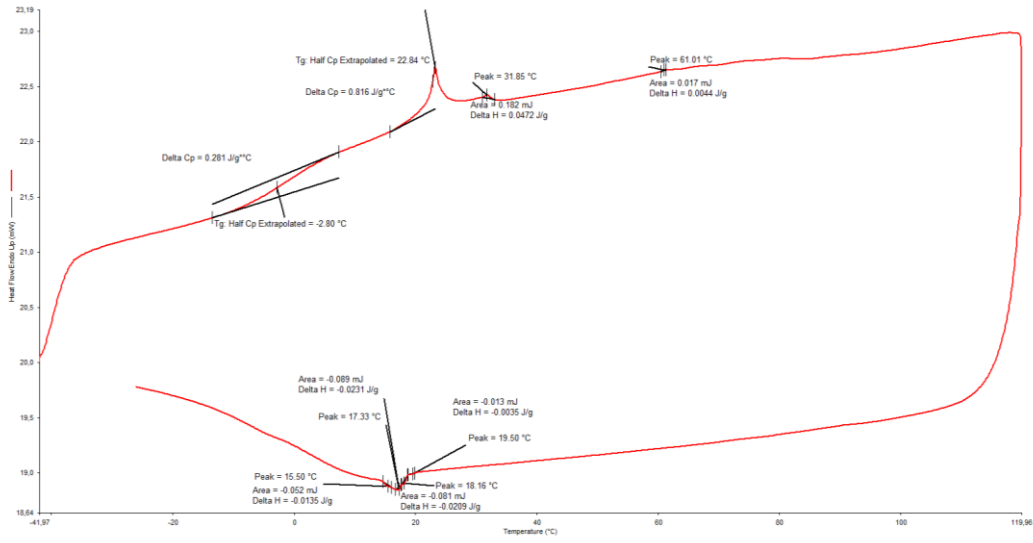
Numune Adı	%
Kontrol Şeker	81
%2,5 propolisli şeker	94
%7,5 propolisli şeker	95
%12,5 propolisli şeker	97

Şekerleme örneklerinde elde edilen kuru madde miktarları incelendiğinde, kontrol grubunda %81, %2,5 propolisli şekerde %94, %7,5 propolisli şekerde %95 ve %12,5 propolisli şeker örneğinde %97 olarak belirlenmiştir. Bu değerler, literatürde propolis ilaveli şeker örneği için bildirilen $82,80 \pm 0,46$ (Aydın, 2019) değerinden anlamlı şekilde yüksektir. Bu farklılık, propolis ilavesiyle birlikte şekerleme matrisinde su içeriğinin azalması ve formülasyondaki bileşen yoğunluğunun artmasına bağlı olabilir. Öte yandan, Özçelik ve ark. (2022) tarafından yapılan çalışmada pekmez bazlı jeli şekerleme örneklerinde toplam kuru madde miktarları üzüm pekmezli jeli şeker için $63,63 \pm 0,29$, dut pekmezli jeli şeker için $61,30 \pm 0,38$ ve keçiyoynuzu pekmezli jeli şeker için $63,52 \pm 0,37$ olarak bildirilmiştir (Özçelik vd., 2022). Bu değerler, hem bizim kontrol şekerimize hem de propolis ilaveli gruplara kıyasla oldukça düşüktür. Bu durum, pekmezlerin yüksek su içeriğine sahip olması ve jeli formülasyonların farklı yapısal bileşenler içermesiyle ilişkilendirilebilir. Sonuç olarak, bu çalışma propolis ilavesinin şekerlemelerde kuru madde miktarını artırdığına ve bu artışın literatürdeki benzer ürünlerle kıyaslandığında belirgin olduğuna işaret etmektedir.

4.5.8. Camsı Geçiş Sıcaklığı

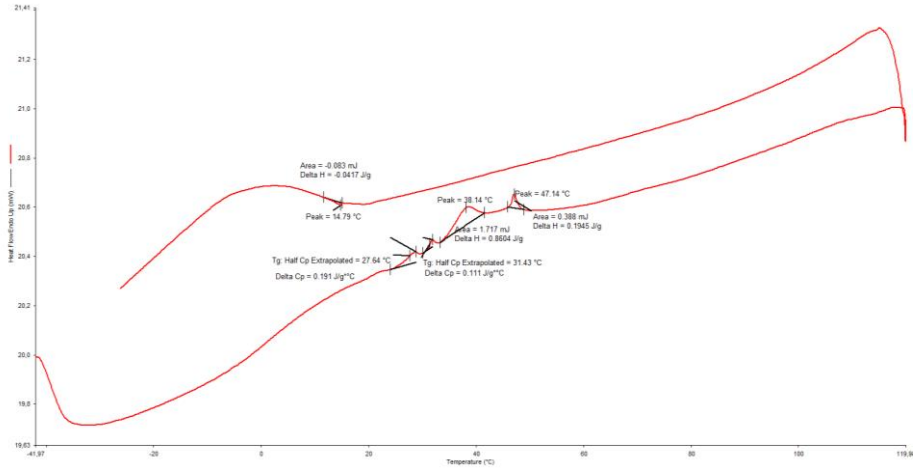
Isıtma sonrasında camsı katının lastiksi bir yapıya dönüştüğü noktaya da camsı geçiş sıcaklığı denilmektedir (Tan ve Kerr, 2017). Amorf bileşen içeren gıdalar camsı geçiş sıcaklıklarının (Tg) üzerindeki sıcaklıklarda muhafaza edildiklerinde moleküllerdeki mobilite artmakta ve bozulmalar hızlanmaktadır (Kılıç ve Evranuz, 2006). Camsı geçiş sıcaklığı, sert şekerler gibi amorf bileşenler içeren ürünlerin dayanıklılıkları üzerine etki eden bir parametredir (Ergün ve Tekgül, 2021). Sert şekerlerin nem içeriği genellikle %5'in altındadır. Sert şeker gibi düşük nem içeriğine sahip olan ürünlerde şekerler camsı - amorf yapıda bulunmaktadır. Camsı geçiş sıcaklığı (Tg)'nin altında depolanan sert

şeker, depolama esnasında uzun süre stabil kalabilmekte; ancak depolama sıcaklığı Tg'nin üzerinde olursa şeker camsı yapısını kaybedip yapışkan bir form almakta ve bu durum ürünün fiziksel, kimyasal ve duyuşsal kalitesini olumsuz etkilemektedir (Yılmaz vd., 2019). Sert şekerlerin camsı geçiş sıcaklığının oda sıcaklığının hemen üzerinde olması gerektiğini ve böylelikle parlaklıklarını ve sert yapılarını koruyabilecekleri belirtilmiştir (Ergun vd., 2010).



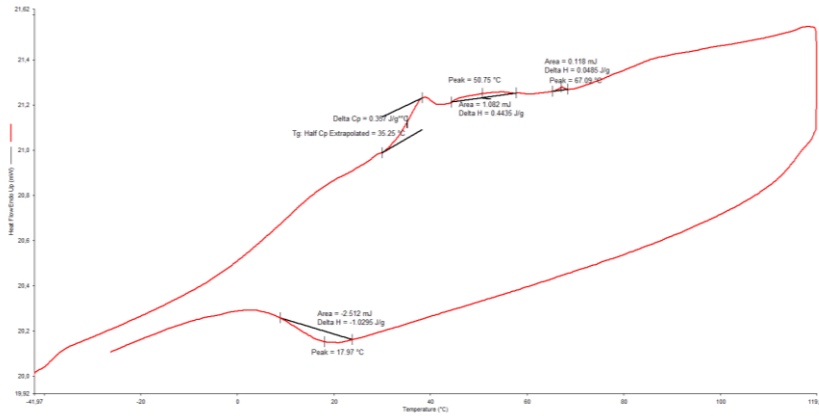
Şekil 4.38. %2,5 propolisli şeker örneğinin DSC grafiği.

DSC analizi sonucunda, %2,5 oranında propolis içeren sert şekerleme örneğinde iki farklı cam geçiş sıcaklığı (Tg) gözlemlenmiştir (2,80 °C ve 22,84 °C). Bu durum, ürün matrisinde amorf yapının yanı sıra heterojen fazların da bulunduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, 17,33 °C, 18,16 °C, 19,50 °C ve 31,85 °C sıcaklıklarında endotermik pikler kaydedilmiştir. Özellikle 31,85 °C'deki endotermik olay, düşük entalpi ($\Delta H = 0,0412$ J/g) değeri ile propolis bileşenlerinin kısmi erimesine işaret etmektedir. Bu veriler, propolis ilavesinin ürünün ısı özelliklerini etkilediğini, düşük sıcaklıklarda cam halini koruyabilen ve kısmen kristalin yapılar içeren bir şekerleme matrisi oluşturduğunu göstermektedir.



Şekil 4.39. %7,5 propolisli şeker örneğinin DSC grafiği

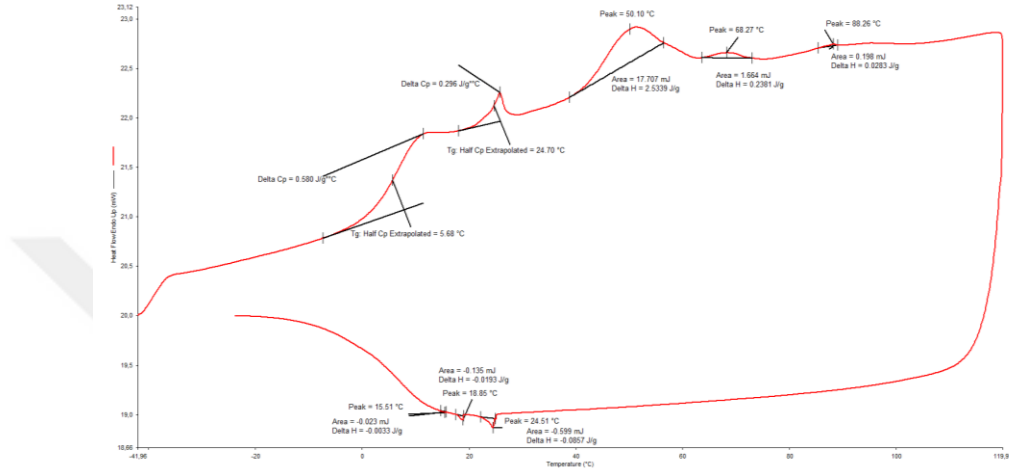
%7,5 oranında propolis ilave edilmiş sert şekerleme örneğinde gerçekleştirilen DSC analizi sonucunda iki belirgin cam geçiş sıcaklığı (T_g) belirlenmiştir: 27,64 °C ve 31,43 °C. Ayrıca 14,79 °C, 38,14 °C ve 47,14 °C sıcaklıklarında endotermik pikler gözlemlenmiştir. En belirgin endotermik geçiş, 47,14 °C’de olup, 0,1945 J/g entalpi (ΔH) değeriyle propolisin fenolik bileşenlerinden kaynaklanabilecek düşük erime olayına işaret etmektedir. Bu sonuçlar, artan propolis konsantrasyonunun ısıl davranış üzerinde etkili olduğunu, ürünün cam geçiş sıcaklığını artırarak termal stabilitesini kısmen iyileştirdiğini göstermektedir.



Şekil 4.40. % 12,5 propolisli şeker örneğinin DSC grafiği

%12,5 oranında propolis içeren sert şekerleme örneğinin DSC analizi sonucunda tek bir cam geçiş sıcaklığı (T_g) 35,25 °C’de gözlemlenmiştir. Cam geçiş sıcaklığındaki bu artış, propolisin yapıya entegre olarak ürün matrisinin amorf yapısını stabilize ettiğini ve termal

dayanımı artırdığını göstermektedir. Özellikle 50,75 °C'deki belirgin endotermik pik, formülasyondaki bazı bileşenlerin erime ya da yeniden düzenlenme davranışına işaret etmektedir. Bu sonuçlar, artan propolis oranının şekerleme yapısında daha belirgin termal olaylara neden olduğunu ve ürünün cam geçiş davranışını olumlu yönde etkilediğini göstermektedir.



Şekil 4.41. Kontrol şeker örneğinin DSC grafiği

Kontrol şekerinde Tg değerleri 5.68 °C ve 24.70 °C olarak belirlenmiştir. Bu durum, şekerleme matrisinin çok bileşenli bir yapıya sahip olduğunu ve matris içinde amorf fazların birden fazla termal geçiş sergileyebileceğini göstermektedir. 15,51 °C, 18,85 °C, 24,51 °C, 50,10 °C, 68,27 °C ve 88,26 °C sıcaklıklarında endotermik pikler tespit edilmiştir. 50,10 °C'deki yüksek enerjili endotermik geçiş, şekerleme yapısındaki kristal bileşenlerin erimesine veya faz değişimlerine işaret etmektedir. Bu sonuçlar, kontrol örneğinin termal olarak daha dengesiz bir yapıya sahip olduğunu ve propolis ilavesinin termal davranış üzerinde yapısal bir düzenleyici etkisi olduğunu düşündürmektedir.

DSC analiz sonuçları, propolis ilavesinin sert şekerleme formülasyonlarının ısı davranışları üzerinde önemli değişimlere yol açtığını ortaya koymuştur. Kontrol şekerde, cam geçiş sıcaklıkları (Tg) oldukça düşük (5,68 °C ve 24,70 °C) bulunmuş ve geniş bir sıcaklık aralığında çok sayıda endotermik geçiş gözlenmiştir. Bu durum, izomalt bazlı yapının amorf ve kristalin bölgelerden oluşan çok fazlı, düzensiz bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. %2,5 propolisli örnekte, cam geçiş sıcaklığının 22,84 °C'ye yükselmesi ve endotermik geçiş sayısının azalması, daha homojen bir yapı oluştuğuna

işaret etmektedir. %7,5 propolis içeren örnekte ise T_g 'nin $27,64\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve $31,43\text{ }^{\circ}\text{C}$ gibi daha yüksek değerlere çıktığı görülmüş, ayrıca endotermik piklerin daha net ve belirgin olması, propolisin şekerleme matrisinde yapısal dengeyi artırdığını göstermektedir. %12,5 propolisli örnekte ise cam geçiş sıcaklığının $34,67\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye ulaştığı ve $50,65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'deki endotermik pikle birlikte daha kararlı bir ısı davranış sergilendiği tespit edilmiştir. Artan propolis oranıyla birlikte cam geçiş sıcaklıklarındaki yükseliş ve endotermik olayların entalpi değerlerindeki azalma, şekerleme yapısının daha stabil hale geldiğini ve propolisin fiziksel-mekanik bütünlüğü desteklediğini göstermektedir. Sonuç olarak, propolis ilavesi hem cam geçiş sıcaklıklarını yükselterek şekerlemenin ısıl stabilitesini artırmış, hem de yapının daha düzenli ve homojen hale gelmesini sağlamıştır. Bu da ürünün depolama sürecinde yapısal bozulmalara karşı daha dirençli olabileceğini göstermektedir.

DSC analizinde elde edilen $27,64\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve $31,43\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'lik cam geçiş sıcaklıkları, sert şekerleme matrisinde düşük oranlı propolis ilavesinin cam geçiş davranışı üzerinde sınırlı etkisi olduğunu, ancak amorf yapının varlığını sürdürdüğünü göstermektedir. Literatürde belirtildiği gibi, sert şeker ürünleri genellikle tek bir T_g yerine bir cam geçiş aralığı gösterebilecek kompleks bileşen karışımlarıdır (Saavedra-Leos vd., 2012). Bu bağlamda çalışmada gözlenen iki ayrı T_g değeri, ürün matrisindeki farklı bileşenlerin cam geçiş davranışına farklı katkılar sunduğunu göstermektedir.

Ayrıca, su içeriğinin bir plastikleştirici gibi davranarak T_g değerini düşürebileceği bilinmektedir (Y. Roos ve Karel, 1991). Bu nedenle, düşük oranda propolis ilavesiyle elde edilen şekerlemede gözlenen cam geçiş sıcaklıklarının oda sıcaklığına yakın olması, muhtemelen ürünün düşük nem içeriğine bağlı olarak şekillenen termal özellikleriyle ilişkilendirilebilir.

Dranca ve ark. (2022) ayçiçeği balı içeren numunelerde gözlemlediği $-51,88\text{ }^{\circ}\text{C}$ ile $-33,94\text{ }^{\circ}\text{C}$ arasında değişen T_g değerleri, bal gibi yüksek oranda plastikleştirici içeren bileşenlerin matris içinde T_g değerlerini ne denli düşürebildiğini göstermektedir (Dranca vd., 2022). Çalışmamızda ise T_g 'nin çok daha yüksek değerlerde seyretmesi, şekerleme matrisinin nispeten daha kuru ve amorf faz açısından daha stabil olduğunu desteklemektedir.

Raudonus ve ark. (2000), çalışmasında da vurgulandığı gibi, su içeriği arttıkça Tg değerinde azalma, buna karşın oligomerik veya polimerik katkı maddelerinin artışıyla Tg'de yükselme gözlenmiştir. Bu bağlamda, ürününüzde düşük oranlı propolis katkısına rağmen Tg'nin 30 °C civarında seyretmesi, matrisin nispeten kuru ve termal olarak stabil bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir (Raudonus vd., 2000).

Çalışmada elde edilen Tg değerlerinin literatürde yer alan benzer ürünlerle karşılaştırıldığında oldukça yüksek olması, çalışmada geliştirilen sert şeker matrisinin nem açısından daha düşük, yapısal olarak ise daha stabil bir sistem olduğunu ortaya koymaktadır.

4.5.9. Tekstür Profili Analizi

Sertlik, deformasyona karşı direnç olarak tanımlanmakta ve ürüne başlangıçta uygulanan sıkıştırma sırasında ölçülen maksimum kuvvetle ifade edilmektedir (Siegwein vd., 2011). Esneklik ise özellikle jöle türü ürünlerin geliştirilmesinde önemli bir parametre olarak öne çıkmaktadır (Tireki, 2017). Sertlik ve yaylanma, tüketici algısında önemli parametrelerdir, çünkü bu özellikler yeme sırasında ürünün kalitesini doğrudan etkiler. Sertlik, bir ürünü ağızda kırmak veya ısırarak için gereken kuvvet olarak tanımlanırken, yaylanma, ürünün ağızdaki ilk ısırıktan sonra kendini toparlama özelliği olarak ifade edilir (McKenna ve Kilcast, 2004). Şekerlemelerde bu özellikler, ürün kalitesinin belirlenmesinde kritik rol oynar (DeMars ve Ziegler, 2001). Şekerleme formülasyonlarında jelatin veya nişasta konsantrasyonunda bir azalma meydana geldiğinde, jel gücünün azaldığı ve moleküller arası etkileşimlerin zayıfladığı görülmektedir (Schwenke, 1997). Efe ve ark.(2019) çalışmasında, jelatin bazlı, maltitol, sorbitol ve izomalt içeren düşük kalorili yumuşak şekerlemelerde esneklik değerinin 68,57–96,25 arasında değiştiği bulunmuştur (Efe vd., 2019).

Tablo 4.16. Şekerleme örneklerinin tekstür analizi verileri

Numune Adı	Sertlik (g)	Esneklik
Kontrol Şeker	25803,18	4,928
%2,5 propolisli şeker	22664,87	6,6095
%7,5 propolisli şeker	43304,93	5,9535
%12,5 propolisli şeker	51751,57	6,901

TPA analizinde elde edilen bulgular, propolis oranı arttıkça şeker örneklerinin hem sertlik hem de esneklik değerlerinde artış olduğunu göstermektedir. Bu durum, propolisin şeker matrisinde hem fiziksel hem de kimyasal olarak yapıyı güçlendirici bir rol oynadığını ortaya koymaktadır. Propolis, doğal reçineler, balmumu, flavonoidler ve polifenoller içeren kompleks bir yapıya sahiptir. Bu bileşenler, şekerleme matrisinde ağ benzeri bir yapı oluşturarak yapısal sıkılığı artırabilir. Sertliğin artması, bu bileşenlerin şeker matrisinde daha kompakt ve yoğun bir yapı oluşturmaya bağlanabilir. Propolis, matrise katıldığında su aktivitesini azaltarak kristalleşme davranışını değiştirebilir ve sonuçta daha rijit bir yapı oluşturabilir. Bununla birlikte esneklik değerindeki artış, matrise eklenen propolisin aynı zamanda plastikleştirici veya elastikiyeti destekleyici özellikler taşıyan bazı bileşenler içermesinden kaynaklanabilir. Bu sonuçlar, propolisin şekerlemenin hem sertlik hem de esneklik özelliklerini etkileyen önemli bir bileşen olduğunu ortaya koymaktadır.

Suyun numune içindeki dağılımı, sert şekerlerde artan nemin genellikle azalan sertlikle ilişkilendirilmesi nedeniyle dokusal özellikler açısından kritiktir (Sahlan vd., 2019). Sert şeker örneklerinin dokusal özellikleri, ağızda kalma süresi, oral davranış ve tat ile aromatik bileşenlerin salınımını etkileyerek tüketici algısını şekillendirmektedir (Choi ve Regenstein, 2000). Salatino ve ark. (2005), propolisin sertliğinin içeriğinde yer alan triterpenoid miktarına göre değişkenlik gösterdiğini belirtmiştir (Salatino vd., 2005). Benzer şekilde, *Cudrania tricuspidata* ekstresi ile güçlendirilmiş sakkarozsuz sert şekerlerin formülasyon çalışmalarında, şekerleme sertliğinin izomalt seviyesindeki artışla yükseldiği, ancak maltitol şurubu ve ksilitol seviyesindeki artışla azaldığı rapor edilmiştir (Jeon et al., 2021). Şekerleme örneklerinin sertlik analizi sonuçlarını 231,17-719,99 g aralığında olduğunu bildirmiştir (Aydın, 2019). Üzüm, dut ve keçiyoynuzu pekmezi jeli

şekerlerinin elastikiyet değerleri sırasıyla $11,26 \pm 0,01$, $12,56 \pm 0,40$ ve $11,96 \pm 0,83$ olarak tespit edilmiştir (Özçelik vd., 2022).

4.5.10. Raf Ömrü Analizleri

Tablo 4.17. Şekerleme örneklerinin raf ömrü analiz sonuçları

Analiz	Kontrol Şeker	%2,5 Propolisli Şeker	%7,5 Propolisli Şeker	%12,5 Propolisli Şeker
0.Gün				
pH	4,14	4,06	4,20	4,18
Titrasyon Asitliği	0,04	0,03	0,02	0,01
Esmerleşme	0,09	0,179	0,423	0,458
Brix	%5,53	%5,21	%6,30	%7,15
60. Gün				
pH	4,22	4,13	4,33	4,24
Titrasyon Asitliği	0,034	0,025	0,0187	0,0163
Esmerleşme	0,1633	0,318	0,44	0,463
Brix	%5,60	%6,17	%7,00	%7,83
90. Gün				
pH	5,39	5,38	5,35	4,32
Titrasyon Asitliği	0,0217	0,0177	0,0147	0,0123
Esmerleşme	0,2513	0,421	0,477	0,5317
Brix	%6,17	%6,67	%7,17	%8,00

Propolis ilavesinin şeker örneklerinin bazı kimyasal özellikleri üzerindeki etkisi 0, 60 ve 90. günlerde değerlendirilmiş ve veriler Tablo 23’de verilmiştir.

Yapılan analizler sonucunda, sert şekerleme örneklerinde farklı oranlarda (%2,5, %7,5 ve %12,5) propolis ilavesinin pH değerine etkisi 0., 60. ve 90. günlerde incelenmiştir. Tüm gruplarda zamanla pH artışı gözlenmiş olmakla birlikte, en belirgin artış %2,5 propolisli şeker ($4,06 \rightarrow 5,38$) ve kontrol grubunda ($4,14 \rightarrow 5,40$) kaydedilmiştir. Buna karşılık,

%12,5 propolisli şekerleme örneği yalnızca 0,15 birimlik bir artış göstermiş (4,18 → 4,33) ve pH bakımından en stabil formülasyon olmuştur. Bu durum, yüksek konsantrasyonda propolisin içerdiği fenolik bileşiklerin tamponlayıcı etkisiyle ortam pH'ını dengelediğini düşündürmektedir. Düşük propolis oranı ve propolis içermeyen kontrol grubunda gözlenen ani pH artışları, şekerleme matrisinde kimyasal bozunmalar veya mikrobiyal gelişme riskine işaret edebilir. Elde edilen veriler, raf ömrü açısından en uygun ve kararlı formülasyonun %12,5 oranında propolis içeren şekerleme olduğunu ortaya koymaktadır.

Brix analiz sonuçları, sert şekerleme örneklerinde propolis ilavesinin ürün stabilitesi ve dolayısıyla raf ömrü üzerinde olumlu etkileri olduğunu ortaya koymuştur. Raf ömrü değerlendirmelerinde, Brix değerinin zamanla artması genellikle ürün içerisindeki su miktarının azalması ve şeker konsantrasyonunun artmasıyla ilişkilidir; bu durum mikrobiyal gelişimi baskılayarak bozulma riskini azaltır. Çalışmada kontrol grubunda Brix değeri 90. gün sonunda 61,7' ye ulaşırken, %12,5 propolis içeren şekerleme örneğinde bu değer 80,0 olarak belirlenmiştir. Bu bulgu, yüksek propolis oranının su aktivitesini düşürerek ürünün daha konsantre ve mikrobiyal açıdan daha dirençli hale geldiğini göstermektedir. Ayrıca propolisin doğal antimikrobiyal bileşenler içermesi de bu koruyucu etkiye katkı sağlamaktadır. Özellikle %7,5 ve %12,5 oranındaki propolis ilavesi, Brix değerlerindeki istikrarlı artış ile raf ömrü açısından daha avantajlı ve dayanıklı formülasyonlar olarak öne çıkmaktadır. Sonuç olarak, propolis katkısı sert şekerlemelerin nem içeriğini kontrol altına alarak ürünün fizikokimyasal stabilitesini korumakta ve raf ömrünü uzatmada potansiyel bir katkı maddesi olarak değerlendirilebilmektedir.

Enzimatik olmayan esmerleşme değerleri, zamanla tüm şekerleme gruplarında artış göstermiştir. Kontrol grubunda bu artış sınırlı düzeyde gerçekleşmişken (0,09 → 0,25), propolisli gruplarda özellikle başlangıç düzeyleri daha yüksek bulunmuştur. Bu durum, propolisin bileşiminde bulunan fenolik ve şeker türevlerinin Maillard reaksiyonlarına katkı sağlayarak esmerleşmeyi hızlandırabileceğini düşündürmektedir. Özellikle %12,5 propolis içeren örnekte en yüksek absorban değer (0,532) kaydedilmiş, bu da yoğun propolis varlığının renk değişimi üzerinde belirgin etkili olduğunu göstermektedir.

Titrasyon asitliği verilerine bakıldığında, tüm formülasyonlarda belirgin bir azalma gözlenmiştir. Kontrol grubunda titrasyon asitliği 0. günde 0,04 iken, 90. günde 0,0217'ye düşmüştür. Diğer propolisli şeker gruplarında da benzer bir azalma söz konusudur, ancak %2,5, %7,5 ve %12,5 propolisli şeker formülasyonlarında titrasyon asitliği daha düşük seviyelere inmiştir. Özellikle %12,5 propolisli şeker grubunda titrasyon asitliği 0,0147'ye düşmüştür. Bu, propolisin şekerli formülasyonlardaki asidik özellikleri artırabileceğini ve zamanla asidik ortamın daha belirgin hale geldiğini göstermektedir.

Sonuç olarak, propolisli şeker formülasyonlarının pH, titrasyon asitliği, esmerleşme ve Brix değerleri üzerinde belirgin etkileri olduğu gözlemlenmiştir. Zamanla artan asidik ortam, esmerleşme ve Brix değerlerinin yükselmesi, propolisin bu formülasyonlar üzerindeki kimyasal ve fiziksel etkilerini ortaya koymaktadır. Özellikle propolisin yüksek konsantrasyonları, şekerli bileşiklerin asidik özelliklerini artırarak, esmerleşme ve tat yoğunluğunu artırmıştır. Bu veriler, propolisli şekerlerin formülasyonlarının zamanla daha asidik, tatlı ve esmerleşmiş bir yapıya büründüğünü göstermektedir.

4.5.11. Model Üründe Antioksidan Analizler

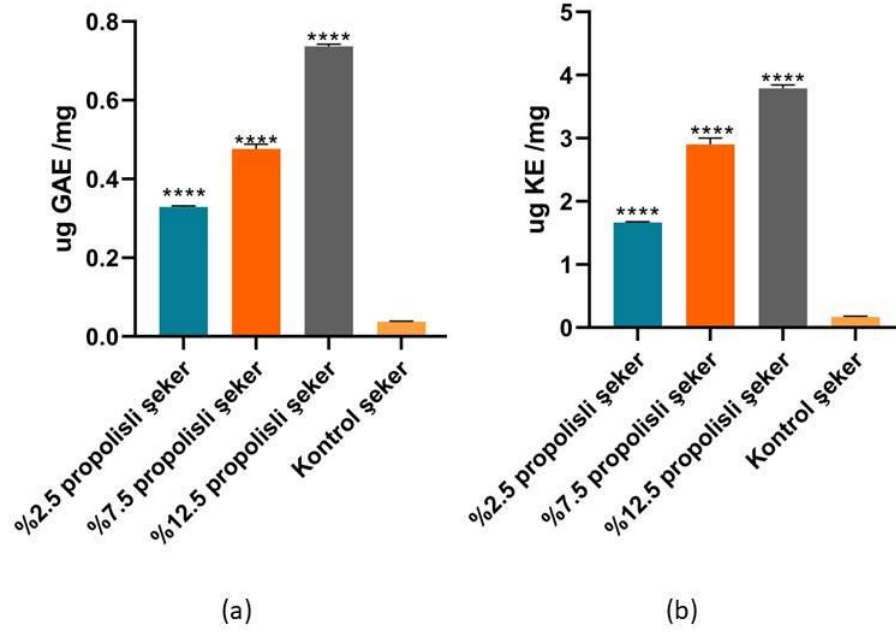
Gıdalarda bulunan fenolik bileşikler biyoaktif bileşenler olup ve sağlık açısından faydalı özelliklerden sorumludurlar (Sehwag ve Das, 2016). Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan şeker örneklerinin antioksidan aktiviteleri Tablo 24' da verilmiştir.

Tablo 4.18. Şeker örneklerinin antioksidan analiz sonuçları

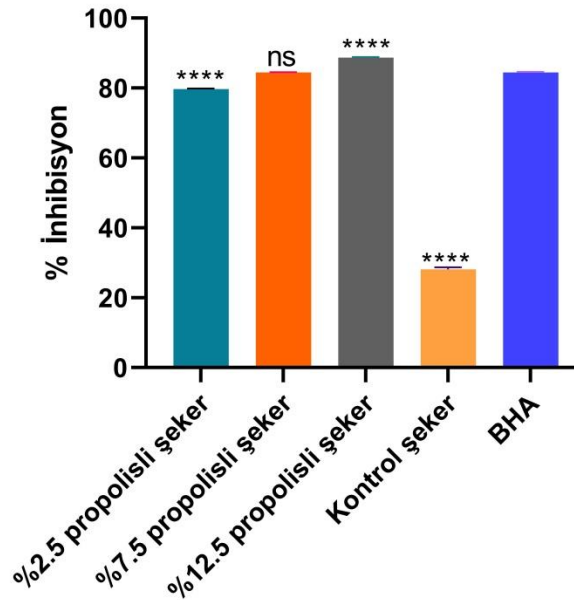
	Toplam Fenolik Madde (mg GAE/g)	Toplam Flavonoid Madde (mg KE/g)	DPPH (%)
Kontrol Şeker	0,037 ± 0,002	0,18 ± 0,009	27,85±0,18
%2,5 propolisli şeker	0,333± 0,001	1,68 ± 0,009	49,68±0,07
%7,5 propolisli şeker	0,477 ± 0,003	2,97 ± 0,02	54,46±0,07
%12,5 propolisli şeker	0,741 ± 0,004	3,82±0,015	62,58±0,07
BHA	---	---	84,46±0,18

Besinsel olarak, zencefil takviyeli jel şekerlerin toplam fenol içeriğinin 6,98-10,32 mg/100 g ve antioksidan aktivitesinin %37,31-43,12 arasında değiştiği, meyve suyu

takviyeli jel şekerlerde ise maksimum antioksidan aktivitenin $43,12 \pm 0,17$ olduğu tespit edilmiştir (Suman vd., 2021). Martiş ve ark. (2020), guarana tozu antioksidanları içeren doğal içeriklerle birleştirilmiş yeni bir işlevsel bitkisel jel şeker geliştirmeyi ve bu ürünü karakterize etmeyi amaçlamıştır. Çalışmada, yumuşak şeker formülasyonunda $2,66$ guarana tozu kullanılmış ve guarana tozu ilavesinin antioksidan aktivitesini ve dolaylı olarak polifenol içeriğini artırarak ürünün işlevselliğini maksimize ettiği, ayrıca renk özelliklerini iyileştirdiği belirlenmiştir (Martiş vd., 2020). Ibrahim ve ark. (2020), keçiboynuzu tozunun fizikokimyasal ve antioksidan aktivitelerini araştırmış ve keçiboynuzunun fonksiyonel içecekler ve şekerleme ürünleri hazırlamada kullanımına yönelik bir çalışma gerçekleştirmiştir. Çalışma sonucunda, 5 keçiboynuzu konsantresi ilavesinin, tofi ürünlerinde polifenol içeriğini $6,59$ kat, DPPH inhibisyonunu $3,80$ kat ve FRAP antioksidan aktivitesini $6,76$ kat artırdığı tespit edilmiştir (Ibrahim vd., 2020). Sehwag ve Das (2016), jamun bazlı fonksiyonel şekerleme' nin incelendiği çalışma da fenolik içeriğinin $1,62 \pm 0,01$ ile $3,72 \pm 0,03$ mg GAE/g kuru madde arasında değiştiğini rapor etmiştir (Sehwag ve Das, 2016). Formüle edilmiş sert şekerlere bitkisel özüt karışımının ilavesi, ürünün toplam fenolik madde, flavonoid ve kül içeriğini anlamlı düzeyde artırmıştır. Bu kapsamda, elde edilen değerler sırasıyla $10,90 \pm 0,50$ mg GAE/g, $0,054 \pm 0,02$ mg CE/g ve $0,018 \pm 0,009$ olarak belirlenmiştir. Ayrıca, DPPH serbest radikal giderme aktivitesi $26,4$ olarak ölçülmüş ve bu da formülasyona eklenen bitkisel özütlerin iyi düzeyde antioksidan kapasite kazandırdığını ortaya koymuştur (Souiy vd., 2023).



Şekil 4.42. Şeker örneklerinin toplam fenolik (a) ve flavonoid (b) miktarları



Şekil 4.43. Şeker örneklerinin DPPH serbest radikal giderim yüzdeleri

Ramakrishna ve ark. (2015), %0,5, 1 ve 1,5 oranlarında *Coleus aromaticus* ve şeker yerine fruktooligosakarit ekleyerek hazırladıkları jel şekerlerin toplam polifenol içeriğini 66,7-107,6 mg/kg arasında belirlemiştir (Jeon et al., 2021). Wijayanti (2017), 20 mL, 30

mL, 40 mL, 50 mL ve 60 mL kahve yaprağı ekstraktı kullanarak hazırladığı sert şekerlerin polifenol içeriğini 720-1423,33 mg GAE/g olarak, DPPH radikal tutucu aktivitesini ise %40,61-78,52 olarak tespit etmiştir (Wijayanti, 2017). Hooda (2015), çeşitli içerik ve formülasyonlarla hazırladığı sert şekerlerin ön denemelerine dayanarak %5 tarçın, %10 zencefil, çay ve Ginkgo biloba ekstraktlarını kullanmayı uygun bulmuş ve bu çalışmada DPPH radikal tutucu aktiviteyi %59,62 olarak belirlemiştir (Hooda, 2015). Üzüm, dut ve keçiboynuzu pekmezi jeli şekerlerinin toplam fenolik madde miktarları sırasıyla 886,37; 1065,81 ve 3171,29 µg GAE/g KM, DPPH değerleri 132,29; 157,61 ve 331,45 mg TE/100 g KM, toplam flavonoid miktarları ise 37,07; 67,70 ve 67,73 mg Rutin/100 g KM olarak bildirilmiştir (Özçelik vd., 2022).

Propolis içeriğinin artmasıyla şekerlerin fenolik ve flavonoid madde içeriği ile antioksidan aktivitesinin arttığını göstermektedir. Propolisli şekerlerin doğal bir antioksidan kaynağı olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bal, propolis ve diğer arı ürünleri yalnızca besleyici özellikleriyle değil, aynı zamanda işlevsel ve biyolojik aktiviteleriyle de sağlık açısından önemli faydalar sunan doğal ürünlerdir. Bu ürünlerin insan vücudu üzerinde sunduğu çok sayıda faydalı etki, onları çeşitli gıdalarda potansiyel içerikler olarak değerlendirme olanağı sunmaktadır. Son yıllarda bu ürünlerin kullanımı geleneksel ve modern tıpta yaygınlaşmaktadır.

Şekerlemeler, farklı yaş grupları tarafından geniş bir yelpazede tüketilen bir ürün grubudur. Ancak aşırı şekerleme tüketimi sağlık problemlerine yol açabilmektedir. Bu durum, fonksiyonel şekerleme üretimine yönelik eğilimleri artırmıştır. Fonksiyonel şekerlemeler, vitamin ve mineral, şeker yerine şeker alkolüleri, bal, bitkisel ekstraktların eklenmesiyle sağlık yararı sağlayan özelliklere sahip ürünlerdir. Yapılan ürün geliştirme çalışmaları sonucunda, propolisin fonksiyonel bir şeker formülasyonuna entegre edilmesiyle şekerlemelere doğal renk ve lezzet oluşumunu desteklediğini ve sağlık açısından çeşitli yararlar sunduğunu ortaya koymaktadır. Propolisli şeker, doğrudan tüketim imkânı, taşıma ve muhafaza kolaylığı gibi pratik avantajlarının yanı sıra; özellikle çocuklar için fonksiyonel ve ulaşılabilir bir alternatif sunmaktadır. Propolisli şekerin tüketimi, kullanıcı açısından çeşitli kolaylıklar sağlamaktadır. Sıvı formülasyonlara kıyasla doğrudan ağız yoluyla tüketilebilmesi, pratiklik kazandırmakta ve saklama/taşıma kolaylığı sunmaktadır. Ayrıca şekerin ağızda yavaş çözünmesi, propolisin faydalı bileşenlerinin oral mukozadan emilimini artırmakta ve etki potansiyelini güçlendirileceği düşünülmektedir.

%12,5 propolis içeren şeker, antioksidan ve antimikrobiyal aktivite, pH stabilitesi ve düşük asidite açısından en iyi performansı göstermiştir. Renk ve kuru madde analizleri de bu formülasyonun en doğal ve yoğun yapıya sahip olduğunu desteklemiştir. Ama %7,5 propolisli şeker ise termal olarak daha dengeli ve kontrollü erime davranışı sergileyerek formülasyon açısından optimum düzeyde olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar %7,5 ve %12,5 propolisli şekerin hem kalite hem de raf ömrü açısından en uygun formülasyon olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

Aamer, A., Abdul-Hafeez, M. M. and Sayed, S. M. (2014). Minimum Inhibitory and Bactericidal Concentrations (MIC and MBC) of Honey and Bee Propolis against Multi-Drug Resistant (MDR) Staphylococcus sp. Isolated from Bovine Clinical Mastitis. *Global Journal of Science Frontier Research*, 15(D2), 21–28.

Aas, J. A., Griffen, A. L., Dardis, S. R., Lee, A. M., Olsen, I., Dewhirst, F. E., Leys, E. J. and Paster, B. J. (2008). Bacteria of Dental Caries in Primary and Permanent Teeth in Children and Young Adults. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(4), 1407–1417.

Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I. and Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5721–5732. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005>.

Acıpinar, Ş., Karşıyaka Hendek, M. ve Olgun Erdemir, E. (2017). Periodontitis Ve Diabetes Mellitus: Çift Yönlü İlişki. *Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 103–113. <https://doi.org/10.24938/kutfd.321684>.

Adekoya-Sofowora, C. A., Nasir, W. O., Oginni, A. O. and Taiwo, M. (2006). Dental caries in 12-year-old suburban Nigerian school children. *African Health Sciences*, 6(3), 145–150. <https://doi.org/10.5555/afhs.2006.6.3.145>

Aga, H., Shibuya, T., Sugimoto, T., Kurimoto, M. and Nakajima, S. (1994). Isolation and Identification of Antimicrobial Compounds in Brazilian Propolis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(5), 945–946. <https://doi.org/10.1271/bbb.58.945>.

Agarwal, G., Vemanaradhya, G. G. and Mehta, D. S. (2012). Evaluation of chemical composition and efficacy of Chinese propolis extract on Porphyromonas gingivalis and Aggregatibacter actinomycetemcomitans: An: in vitro: study. *Contemporary Clinical Dentistry*, 3(3), 256. <https://doi.org/10.4103/0976-237X.103614>.

Ahangari, Z., Naseri, M. and Vatandoost, F. (2018). Propolis: Chemical Composition and Its Applications in Endodontics. *Iranian Endodontic Journal*, 13(3), 285–292.

Ahn, M.R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F. and Nakayama, T. (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*, 101(4), 1383–1392.

Airen, B., Sarkar, P. A., Tomar, U. and Bishen, K. A. (2018). Antibacterial effect of propolis derived from tribal region on Streptococcus mutans and Lactobacillus acidophilus: An: in vitro: study. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 36(1), 48. https://doi.org/10.4103/JISPPD.JISPPD_1128_17.

Akca, A. E., Akca, G., Topçu, F. T., Macit, E., Pıkdöken, L. and Özgen, I. Ş. (2016). The Comparative Evaluation of the Antimicrobial Effect of Propolis with Chlorhexidine

against Oral Pathogens: An In Vitro Study. *BioMed Research International*, 2016(1), 3627463. <https://doi.org/10.1155/2016/3627463>.

Aktaş, Ş. (2012). Kronik Yarada Lokal Faktörler ve Yardımcı Tedaviler. *Ankem*, 26, 217–222.

Aliyazıcıoğlu, R., Şahin, H., Ertürk, O., Ulusoy, E. and Kolaylı, S. (2013). Properties of Phenolic Composition and Biological Activity of Propolis from Turkey. *International Journal of Food Properties*, 16(2), 277–287.

Al-Mamary, M., Al-Meer, A. and Al-Habori, M. (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*, 22(9), 1041–1047.

Almeida, R. V. D. de, Castro, R. D. de, Pereira, M. do S. V., Paulo, M. Q. de, Santos, J. P. and Padilha, W. W. N. (2006). Efeito clínico de solução anti-septica à base de própolis em crianças cáries ativa. *Pesqui. bras. odontopediatria clín. integr.*, 87–92.

Almhjell, P. J. and Mills, J. H. (2018). Metal-chelating non-canonical amino acids in metalloprotein engineering and design. *Current Opinion in Structural Biology*, 51, 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.06.001>.

Almuhayawi, M. S. (2020). Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(11), 3079–3086. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.016>.

Al-Shaher, A., Wallace, J., Agarwal, S., Bretz, W. and Baugh, D. (2004). Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. *Journal of Endodontics*, 30(5), 359–361. <https://doi.org/10.1097/00004770-200405000-00012>.

Altınok, E., Palabiyik, I., Gunes, R., Toker, O. S., Konar, N. and Kurultay, S. (2020). Valorisation of grape by-products as a bulking agent in soft candies: Effect of particle size. *LWT*, 118, 108776. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108776>.

Altuntaş, Ü., Güzel, İ. and Özçelik, B. (2023). Phenolic Constituents, Antioxidant and Antimicrobial Activity and Clustering Analysis of Propolis Samples Based on PCA from Different Regions of Anatolia. *Molecules*, 28(3), 1121.

AL-Waili, N., Al-Ghamdi, A., Ansari, M. J., Al-Attal, Y. and Salom, K. (2012). Synergistic Effects of Honey and Propolis toward Drug Multi-Resistant Staphylococcus Aureus, Escherichia Coli and Candida Albicans Isolates in Single and Polymicrobial Cultures. *International Journal of Medical Sciences*, 9(9), 793–800.

Andrade, J. K. S., Denadai, M., de Oliveira, C. S., Nunes, M. L. and Narain, N. (2017). Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 101, 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.066>.

Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl_1), 5–16.

Anjaly, K. and Tiku, A. B. (2018). Radio-Modulatory Potential of Caffeic Acid Phenethyl Ester: A Therapeutic Perspective. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 18(4), 468–475. <https://doi.org/10.2174/1871520617666171113143945>.

Anjum, S. I., Ullah, A., Khan, K. A., Attaullah, M., Khan, H., Ali, H., Bashir, M. A., Tahir, M., Ansari, M. J., Ghramh, H. A., Adgaba, N. and Dash, C. K. (2019). Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1695–1703. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.08.013>.

Araujo, M. A. R., Libério, S. A., Guerra, R. N. M., Ribeiro, M. N. S. and Nascimento, F. R. F. (2012). Mechanisms of action underlying the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of propolis: A brief review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22, 208–219. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000167>.

Arslan, Ş. and Kızıltan, G. (2024). Oral Yolla Tüketilebilen Apiterapi Ürünlerine Genel Bakış. *Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 9(2), Article 2.

Atayoğlu, A. (2019). Apiterapiye Genel Bakış. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 3. <https://doi.org/10.34084/bshr.593566>.

Aydın, M. (2019). *Doğal Bitki Ekstraktlarının Yumuşak Jöle Tipi Şekerlemede Fizikokimyasal ve Duyusal Özellikler Üzerine Etkileri* [Yüksek Lisans Tezi, Necmettin Erbakan Üniversitesi].

Azcarate-Peril, M. A., Altermann, E., Hoover-Fitzula, R. L., Cano, R. J. and Klaenhammer, T. R. (2004). Identification and Inactivation of Genetic Loci Involved with *Lactobacillus acidophilus* Acid Tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), 5315–5322. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5315-5322.2004>.

Bader, J. D., Rozier, R. G., Lohr, K. N. and Frame, P. S. (2004). Physicians' roles in preventing dental caries in preschool children: A summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *American Journal of Preventive Medicine*, 26(4), 315–325. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2003.12.001>.

Bağdatlıoğlu, N. and Hışıl, Y. (1993). Enzimatik Olmayan Esmerleşme Reaksiyonları Sırasında Oluşan Lezzet Bileşikleri. *Gıda*, 18(2), Article 2.

Bakkaloğlu, Z. and Arici, M. (2019). Farklı Çözücülerle Propolis Ekstraksiyonunun Toplam Fenolik İçeriği, Antioksidan Kapasite ve Antimikrobiyal Aktivite Üzerine Etkileri. *Akademik Gıda*, 17(4), 538–545. <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.667272>
Baktır, G. (2019). Wound Repair and Experimental Wound Models. *Experimed*, 9(3), Article 3.

Balkan, Ç. E., Bozhüyük, A. U., Kordalı, Ş. and Bozkurt, H. B. (2021). Onsekiz Uçucu Yağın Bazı Maya ve Bakterilere Karşı Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun Resazurin Yöntemi ile Belirlenmesi. *Abant Medical Journal*, 10(1), Article 1.

Banas, J. A. (2004). Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 9(2), Article 2. <https://doi.org/10.2741/1305>.

- Bankova, V., Christoy, R., Stoev, G. and Popov, S. (1992). Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 607(1), 150–153. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)87067-I](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)87067-I).
- Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S. and Sabatini, A. G. (2002). Chemical Composition of European Propolis: Expected and Unexpected Results. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 57(5–6), 530–533. <https://doi.org/10.1515/znc-2002-5-622>.
- Bankova, V. S., Castro, S. L. and Marcucci, M. C. (2000). Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3–15.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y. and Kadota, S. (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*, 15(7), 561–571.
- Bapat, S., Nagarajappa, R., Ramesh, G. and Bapat, K. (2021). Effect of propolis mouth rinse on oral microorganisms randomized controlled trial. *Clinical Oral Investigations*, 25(11), 6139–6146.
- Barbieri, G., Barone, C., Bhagat, A., Caruso, G., Conley, Z. R. and Parisi, S. (2014). Sweet Compounds in Foods: Sugar Alcohols. In G. Barbieri, C. Barone, A. Bhagat, G. Caruso, Z. R. Conley, and S. Parisi (Eds.), *The Influence of Chemistry on New Foods and Traditional Products* (pp. 51–59). Springer International Publishing.
- Başustaoğlu, A. C., Yıldırım, R. V. and İnce, G. (2020). Antibiotic Susceptibility Tests from Past to Present. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 50(1), 1–9.
- Bayram, B. and Soylu, P. (2020). Bal, Propolis, Arı Sütü, Çivanperçemi (*Achillea millefolium*) ve Ekinezya (*Echinacea paradoxa*) Karışımından Fonksiyonel Gıda Üretimi, Ürünün Fizikokimyasal ve Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi. *Bahri Dağdaş Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 9(1).
- Benzie, I. F. and Szeto, Y. T. (1999). Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 633–636. <https://doi.org/10.1021/jf9807768>.
- Berman, J. and Sudbery, P. E. (2002). *Candida albicans*: A molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nature Reviews Genetics*, 3(12), 918–931.
- Bhat, N., Bapat, S., Asawa, K., Tak, M., Chaturvedi, P., Gupta, V. V. and George, P. P. (2015). The antiplaque efficacy of propolis-based herbal toothpaste: A crossover clinical study. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*, 6(2), 364–368.
- Bogdanov, S. (2020). Antiviral properties of the bee products: A review. *Bee Product Science* 1, 1–15.
- Bohora, A. and Kokate, S. (2017). Evaluation of the Role of Probiotics in Endodontic Treatment: A Preliminary Study. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*, 7(1), 46. <https://doi.org/10.4103/2231-0762.200710>.

- Boisard, S., Le Ray, A. M., Landreau, A., Kempf, M., Cassisa, V., Flurin, C. and Richomme, P. (2015). Antifungal and Antibacterial Metabolites from a French Poplar Type Propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015(1), 319240. <https://doi.org/10.1155/2015/319240>.
- Böke Sarıkahya, N., Gören, A. C., Sümer Okkalı, G., Çöven, F. O., Orman, B., Kırıcı, D., Yücel, B., Kışla, D., Demirci, B., Altun, M., Önem, A. N. and Nalbantsoy, A. (2021). Chemical composition and biological activities of propolis samples from different geographical regions of Turkey. *Phytochemistry Letters*, 44, 129–136.
- Bonvehí, J. S. and Gutiérrez, A. L. (2011). Antioxidant Activity and Total Phenolics of Propolis from the Basque Country (Northeastern Spain). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(9), 1387–1395. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1792-1>.
- Borenfreund, E. and Puerner, J. A. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*, 24(2), 119–124.
- Bosio, K., Avanzini, C., D'Avolio, A., Ozino, O. and Savoia, D. (2000). In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 31(2), 174–177. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00785>.
- Bosma, M., Ten Brinke, G. and Ellis, T. S. (1988). Polymer-polymer miscibility and enthalpy relaxations. *Macromolecules*, 21(5), 1465–1470.
- Botushanov, P. I., Grigorov, G. I. and Aleksandrov, G. A. (2001). A clinical study of a silicate toothpaste with extract from propolis. *Folia Medica*, 43(1–2), 28–30.
- Bouchelaghem, S. (2022). Propolis characterization and antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*: A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(4), 1936–1946. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.11.063>.
- Brandt, M. E. (2002). *Candida* and *Candidiasis*. *Emerging Infectious Diseases*, 8(8), 876.
- Bretz, W. A., Paulino, N., Nör, J. E. and Moreira, A. (2014). The Effectiveness of Propolis on Gingivitis: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 20(12), 943–948. <https://doi.org/10.1089/acm.2013.0431>.
- Bueno-Silva, B., Marsola, A., Ikegaki, M., Alencar, S. M. and Rosalen, P. L. (2017). The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source: Chemical composition and antibacterial activity. *Natural Product Research*, 31(11), 1318–1324.
- Buratti, S., Benedetti, S. and Cosio, M. S. (2007). Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis. *Talanta*, 71(3), 1387–1392. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.07.006>.
- Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 36(4), 347–363.

- Burey, P., Bhandari, B. R., Rutgers, R. P. G., Halley, P. J. and Torley, P. J. (2009). Confectionery Gels: A Review on Formulation, Rheological and Structural Aspects. *International Journal of Food Properties*, 12(1), 176–210.
- Cairo, R., Gomes, R., Márcio, W., Rocha, S., Lemos, S., Abreu, R. and Rodrigues, V. (2006). *Periodontitis Treatment With Brazilian Green Propolis Gel*. 3, 336–341.
- Çam, İ. B. (2010). *Helva ve lokum üretimi amaçlı çöven konsantresi ve çöven tozu üretimi* [Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi].
- Capuano, E. and Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 44(4), 793–810. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.002>.
- Cardoso, A. V. and Abreu, W. M. (2004). Water and the glass transition temperature of organic (caramel) glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 348, 51–58.
- Castaldo, S. and Capasso, F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73 Suppl 1, S1-6. [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(02\)00185-5](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(02)00185-5)
- Castro, P. A., Bom, V. L. P., Brown, N. A., de Almeida, R. S. C., Ramalho, L. N. Z., Savoldi, M., Goldman, M. H. S., Berretta, A. A. and Goldman, G. H. (2013). Identification of the cell targets important for propolis-induced cell death in *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 60, 74–86.
- Caufield, P. W., Dasanayake, A. P., Li, Y., Pan, Y., Hsu, J. and Hardin, J. M. (2000). Natural History of *Streptococcus sanguinis* in the Oral Cavity of Infants: Evidence for a Discrete Window of Infectivity. *Infection and Immunity*, 68(7), 4018–4023.
- Çelik, Ş., Dervişoğlu, G., İzol, E., Sęczyk, Ł., Özdemir, F. A., Yilmaz, M. E., Yilmaz, M. A., Gülçin, İ., Al-Anazi, K. M., Farah, M. A., Zafar, M., Makhkamov, T. and Khan, M. A. (2024). Comprehensive phytochemical analysis of *L. callus* extracts using LC–MS/MS. *Biomedical Chromatography*, 38(10), e5975. <https://doi.org/10.1002/bmc.5975>.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M. and Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3). <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>.
- Charoen, R., Savedboworn, W., Phuditcharnchnakun, S. and Khuntaweetap, T. (2015). *Development of Antioxidant Gummy Jelly Candy Supplemented with Psidium guajava Leaf Extract*. 8(2). <https://ojs.kmutnb.ac.th/index.php/ijst/article/view/266>.
- Chattopadhyay, I., Verma, M. and Panda, M. (2019). Role of Oral Microbiome Signatures in Diagnosis and Prognosis of Oral Cancer. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 18, 1533033819867354. <https://doi.org/10.1177/1533033819867354>.
- Choi, S. S. and Regenstein, J. M. (2000). Physicochemical and Sensory Characteristics of Fish Gelatin. *Journal of Food Science*, 65(2), 194–199.

Clarke, J. K. (1924). On the Bacterial Factor in the Aetiology of Dental Caries. *British Journal of Experimental Pathology*, 5(3), 141.

Clements, M. O. and Foster, S. J. (1999). Stress resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 7(11), 458–462.

Cole, N., Sou, P. W., Ngo, A., Tsang, K. H., Severino, J. A. J., Arun, S. J., Duke, C. C. and Reeve, V. E. (2010). Topical ‘Sydney’ propolis protects against UV-radiation-induced inflammation, lipid peroxidation and immune suppression in mouse skin. *International Archives of Allergy and Immunology*, 152(2), 87–97.

Collins, L. M. and Dawes, C. (1987). The surface area of the adult human mouth and thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa. *Journal of Dental Research*, 66(8), 1300–1302. <https://doi.org/10.1177/00220345870660080201>.

Coutinho, A. (2012). Honeybee propolis extract in periodontal treatment: A clinical and microbiological study of propolis in periodontal treatment. *Indian Journal of Dental Research*, 23(2), 294. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.100449>.

Cragg, G. M., Newman, D. J. and Snader, K. M. (1997). Natural Products in Drug Discovery and Development. *Journal of Natural Products*, 60(1), 52–60.

Crouch, S. P. M., Kozlowski, R., Slater, K. J. and Fletcher, J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, 160(1), 81–88. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90011-U](https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90011-U).

Cunha, I. B. S., Sawaya, A. C. H. F., Caetano, F. M., Shimizu, M. T., Marcucci, M. C., Drezza, F. T., Povia, G. S. and Carvalho, P. de O. (2004). Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 15, 964–970. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532004000600026>.

Da Silva, C., Prasniewski, A., Calegari, M. A., De Lima, V. A. and Oldoni, T. L. C. (2018). Determination of Total Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Ethanolic Extracts of Propolis Using ATR–FT-IR Spectroscopy and Chemometrics. *Food Analytical Methods*, 11(7), 2013–2021. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1161-x>.

Daugusch, A., Moraes, C. S., Fort, P. and Park, Y. K. (2008). Brazilian red propolis—Chemical composition and botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 5(4), 435–441. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem057>.

De Luca, M. P., Franca, J. R., Macedo, F. A. F. F., Grenho, L., Cortes, M. E., Faraco, A. A. G., Moreira, A. N. and Santos, V. R. (2014). Propolis Varnish: Antimicrobial Properties against Cariogenic Bacteria, Cytotoxicity, and Sustained-Release Profile. *BioMed Research International*, 2014(1), 348647. <https://doi.org/10.1155/2014/348647>.

De Moura, S. C. S. R., Berling, C. L., Garcia, A. O., Queiroz, M. B., Alvim, I. D. and Hubinger, M. D. (2019). Release of anthocyanins from the hibiscus extract encapsulated

by ionic gelation and application of microparticles in jelly candy. *Food Research International*, 121, 542–552. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.010>.

Delgado, F. J., González-Crespo, J., Cava, R. and Ramírez, R. (2011). Proteolysis, texture and colour of a raw goat milk cheese throughout the maturation. *European Food Research and Technology*, 233(3), 483–488. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1536-3>.

Delgado, P. and Bañón, S. (2018). Effects of replacing starch by inulin on the physicochemical, texture and sensory characteristics of gummy jellies. *CyTA - Journal of Food*, 16(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1327462>.

DeMars, L. L. and Ziegler, G. R. (2001). Texture and structure of gelatin/pectin-based gummy confections. *Food Hydrocolloids*, 15(4), 643–653.

Demir, M. K., Elgün, A. ve Avcı, A. (2010). Klasik ve Vakum Altında Spreylenerek Pişirme Yöntemlerinin Akide Şekerinin bazı Kalite Kriterleri ve Raf Ömrü Üzerine Etkisi. *Gıda*, 35(6), Article 6.

Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C. R., Yu, W. H., Lakshmanan, A. and Wade, W. G. (2010). The human oral microbiome. *Journal of Bacteriology*, 192(19), 5002–5017. <https://doi.org/10.1128/JB.00542-10>.

Dezmirean, D. S., Mărghițaș, L. A., Chirilă, F., Copaciu, F., Simonca, V., Bobiș, O. and Erler, S. (2017). Influence of geographic origin, plant source and polyphenolic substances on antimicrobial properties of propolis against human and honey bee pathogens. *Journal of Apicultural Research*, 56(5), 588–597.

Dinis, T. C., Maderia, V. M. and Almeida, L. M. (1994). Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315(1), 161–169. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1485>.

Do Nascimento, T. G., dos Santos Arruda, R. E., da Cruz Almeida, E. T., dos Santos Oliveira, J. M., Basílio-Júnior, I. D., Celerino de Moraes Porto, et al. (2019). Comprehensive multivariate correlations between climatic effect, metabolite-profile, antioxidant capacity and antibacterial activity of Brazilian red propolis metabolites during seasonal study. *Scientific Reports*, 9(1), 18293.

Dodwad, V. and Kukreja, B. J. (2011). Propolis mouthwash: A new beginning. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 15(2), 121.

Doğan, N. ve Hayoğlu, İ. (2014). Propolis ve Kullanım Alanları. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 16(3), Article 3.

Dogan, N., Nasirli, F., Kart, N. N. B. and Kuzucu, V. (2022). Propolisin Antikanser Aktivitesine Genel Bir Bakış. *Bartın University International Journal of Natural and Applied Sciences*, 5(2), Article 2. <https://doi.org/10.55930/jonas.1190050>.

Doğru, F., Parlakpınar, H., Duman, Y., Özhan, O., Keskin, M. ve Polat, A. (2021). Propolis ve perganın antimikrobiyal etkilerinin in-vitro olarak araştırılması. *İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Dergisi*, 9(3), Article 3.

Dönmez, A. (2015). *Denizli Bölgesinde Yetiştirilen Bazı Üzüm Çeşitlerinin Resveratrol Ve Suda Çözünen Vitaminlerinin Kuruma Kinetiği*. [Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi].

Drago, L., Mombelli, B., Vecchi, E. D., Tocalli, M. C. F. L. and Gismondo, M. R. (2000). In Vitro Antimicrobial Activity of Propolis Dry Extract. *Journal of Chemotherapy*, 12(5), 390–395. <https://doi.org/10.1179/joc.2000.12.5.390>.

Dranca, F., Ropciuc, S., Pauliuc, D. and Oroian, M. (2022). Honey adulteration detection based on composition and differential scanning calorimetry (DSC) parameters. *LWT*, 168, 113910. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113910>.

Duailibe, S. A. C., Gonçalves, A. G. and Ahid, F. J. M. (2007). Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts in vivo. *Journal of Applied Oral Science: Revista FOB*, 15(5), 420–423. <https://doi.org/10.1590/s1678-77572007000500009>.

Duarte, S., Rosalen, P. L., Hayacibara, M. F., Cury, J. A., Bowen, W. H., Marquis, R. E., Rehder, V. L. G., Sartoratto, A., Ikegaki, M. and Koo, H. (2006). The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. *Archives of Oral Biology*, 51(1), 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2005.06.002>.

Dziedzic, A., Kubina, R., Wojtyczka, R. D., Kabała-Dzik, A., Tanasiewicz, M. and Morawiec, T. (2013). The Antibacterial Effect of Ethanol Extract of Polish Propolis on Mutans Streptococci and Lactobacilli Isolated from Saliva. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(1), 681891.

Ecem Bayram, N. (2020). A Study On Free-Radical Scavenging Activity, Individual Phenolic Compounds And Element Concentration Of Propolis. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 20(2), 145–156. <https://doi.org/10.31467/uluaricilik.778751>.

Efe, N., Bielejewski, M., Tritt-Goc, J., Mert, B. and Oztop, M. H. (2019). NMR relaxometry study of gelatin based low-calorie soft candies. *Molecular Physics*, 117(7–8), 1034–1045. Scopus. <https://doi.org/10.1080/00268976.2018.1564392>.

Ellwood, K. (1995). Methods available to estimate the energy values of sugar alcohols. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62(5), 1169S–1174S.

El-Sakhawy, M., Salama, A. and Tohamy, H. A. S. (2023). Applications of propolis-based materials in wound healing. *Archives of Dermatological Research*, 316(1), 61.

Ercan, N., Erdemir, E. O., Ozkan, S. Y. and Hendek, M. K. (2019). The comparative effect of propolis in two different vehicles; mouthwash and chewing-gum on plaque accumulation and gingival inflammation. *European Journal of Dentistry*, 09, 272–276.

Erdogan, S., Ates, B., Durmaz, G., Yilmaz, I. and Seckin, T. (2011). Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from Anatolia propolis and their radical scavenging capacities. *Food and Chemical Toxicology*, 49(7), 1592–1597.

Ergün, A. R. ve Tekgül, Y. (2021). Farklı Karbonhidrat Formülasyonları İle Üretilmiş Ayva Suyu Konsantresi Katkılı Sert Şekerlerin Kalite Özelliklerinin İncelenmesi. *Gıda*, 46(3), Article 3. <https://doi.org/10.15237/gida.GD21027>.

Ergun, R., Lietha, R. and Hartel, R. W. (2010). Moisture and Shelf Life in Sugar Confections. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(2), 162–192.

Eribe, E. R. K. and Olsen, I. (2017). Leptotrichia species in human infections II. *Journal of Oral Microbiology*, 9(1), 1368848. <https://doi.org/10.1080/20002297.2017.1368848>.

Eröksüz, Y., Canpolat, İ. and Silici, S. (2008). *Comparison of healing effects of propolis to silver sulfadiazine on full thickness skin wounds in rabbits* (No. 1). 22(1), Article 1.

Ertürk, Ö., Çil, E., Yoloğlu, N. and Yavuz, C. (2016). An In vitro Study on Antimicrobial and Antioxidant Activity of Propolis from Rize Province of Turkey. *Mellifera*, 16(1), Article 1.

Fan, F. and Wood, K. V. (2007). Bioluminescent Assays for High-Throughput Screening. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 5(1), 127–136.

Featherstone, J. D. (1999). Prevention and reversal of dental caries: Role of low level fluoride. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 27(1), 31–40.

Feoktistova, M., Geserick, P. and Leverkus, M. (2016). Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(4).

Flora, S. J. S., Flora, G., Saxena, G. and Mishra, M. (2007). Arsenic and lead induced free radical generation and their reversibility following chelation. *Cellular and Molecular Biology*, 53(1), Article 1. <https://doi.org/10.14715/cmb/23>.

Forma, E. and Bryś, M. (2021). Anticancer Activity of Propolis and Its Compounds. *Nutrients*, 13(8), 2594. <https://doi.org/10.3390/nu13082594>.

Funari, C. S. and Ferro, V. O. (2006). Análise de própolis. *Food Science and Technology*, 26, 171–178. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000100028>.

Gabarra, P. and Hartel, R. W. (1998). Corn Syrup Solids and Their Saccharide Fractions Affect Crystallization of Amorphous Sucrose. *Journal of Food Science*, 63(3), 523–528.

Galluzzi, L., Aaronson, S. A., Abrams, J., Alnemri, E. S., Andrews, D. W., Baehrecke, E. H., Bazan, N. G., Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D. E., Brenner, C., Castedo, M., Cidlowski, J. A., et al. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death and Differentiation*, 16(8), 1093–1107. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.44>.

- Geckil, H., Ates, B., Durmaz, G., Erdogan, S. and Yilmaz, I. (2005). Antioxidant, Free Radical Scavenging and Metal Chelating Characteristics of Propolis. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 1(1), 27–31. <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2005.27.31>.
- Gerçekaslan, K. E., Kotancılar, H. G. and Karaoğlu, M. M. (2007). Ekmek Bayatlaması ve Bayatlama Derecesini Ölçmede Kullanılan Yöntemler: I. *Gıda*, 32(6), Article 6.
- Giamalia, I., Steinberg, D., Grobler, S. and Gedalia, I. (1999). The effect of propolis exposure on microhardness of human enamel in vitro. *Journal of Oral Rehabilitation*, 26(12), 941–943. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2842.1999.00472.x>.
- Gibbons, R. J. (1984). Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. *Journal of Dental Research*, 63(3), 378–385.
- Gibson, A. M. and Hocking, A.D. (1997). Advances in the predictive modelling of fungal growth in food. *Trends in Food Science & Technology*, 8(11), 353–358.
- Gleckman, R.A. and Czachor, J.S. (2000). Antibiotic Side Effects. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 21, 61–70. <https://doi.org/10.1055/s-2000-9928>.
- Gniewosz, M., Pobiega, K., Kraśniewska, K., Synowiec, A., Chaberek, M. and Galus, S. (2022). Characterization and Antifungal Activity of Pullulan Edible Films Enriched with Propolis Extract for Active Packaging. *Foods*, 11(15), Article 15.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., et al. (1996). Life with 6000 Genes. *Science*, 274(5287), 546–567. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>.
- Gökmen, V. and Senyuva, H. Z. (2006). Improved method for the determination of hydroxymethylfurfural in baby foods using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8), 2845–2849.
- Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(4), 1220–1234. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.03.002>.
- Gonçalves, G. M. S., Srebernick, S. M. and Souza, J. A. M. (2011). Stability and sensory assessment of emulsions containing propolis extract and/or tocopheryl acetate. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47, 585–592.
- Goswami, M., Saha, S. and Chaitra, T. R. (2012). Latest developments in non-fluoridated remineralizing technologies. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 30(1), 2. <https://doi.org/10.4103/0970-4388.95561>.
- Grabitske, H. A. and Slavin, J. L. (2008). Low-Digestible Carbohydrates in Practice. *Journal of the American Dietetic Association*, 108(10), 1677–1681.

Graikou, K., Popova, M., Gortzi, O., Bankova, V. and Chinou, I. (2016). Characterization and biological evaluation of selected Mediterranean propolis samples. Is it a new type? *LWT*, 65, 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.025>.

Grange, J. M. and Davey, R. W. (1990). Antibacterial Properties of Propolis (Bee Glue). *Journal of the Royal Society of Medicine*, 83(3), 159–160.

Greenaway, W., Scaysbrook, T. and Whatley, F. R. (1990). The Composition and Plant Origins of Propolis: A Report of Work at Oxford. *Bee World*. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0005772X.1990.11099047>.

Grembecka, M. (2015). Sugar alcohols—their role in the modern world of sweeteners: A review. *European Food Research and Technology*, 241(1), 1–14.

Gulcin, İ. and Alwasel, S. H. (2022). Metal Ions, Metal Chelators and Metal Chelating Assay as Antioxidant Method. *Processes*, 10(1), Article 1.

Gülçin, İ., Bursal, E., Şehitoğlu, M. H., Bilsel, M. and Gören, A. C. (2010). Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8), 2227–2238.

Güldane, M. (2014). *Şeker alkolleri ve yeni nesil antioksidan etkili tatlandırıcıların bisküvi kalite özelliklerine etkileri* [Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü].

Gültekin, F., Öner, M. E., Savaş, H. B. and Doğan, B. (2017). *Tatlandırıcılar, Glikoz İntoleransı ve Mikrobiyota*. 1, 34–38.

Gurung, I., Berry, J. L., Hall, A. M. J. and Pelicic, V. (2017). Cloning-independent markerless gene editing in *Streptococcus sanguinis*: Novel insights in type IV pilus biology. *Nucleic Acids Research*, 45(6), e40. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1177>.

Hajishengallis, G., Darveau, R. P. and Curtis, M. A. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nature Reviews Microbiology*, 10(10), 717–725.

Hajji, M., Jarraya, R., Lassoued, I., Masmoudi, O., Damak, M. and Nasri, M. (2010). GC/MS and LC/MS analysis, and antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts from *Mirabilis jalapa* tubers. *Process Biochemistry*, 45(9), 1486–1493.

Hampelska, K., Jaworska, M. M., Babalska, Z. Ł. and Karpiński, T. M. (2020). The Role of Oral Microbiota in Intra-Oral Halitosis. *Journal of Clinical Medicine*, 9(8), Article 8.

Harborne, J. B., and Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481–504. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00235-1).

Harris, R., Nicoll, A. D., Adair, P. M. and Pine, C. M. (2004). Risk factors for dental caries in young children: A systematic review of the literature. *Community Dental Health*, 21(1 Suppl), 71–85.

Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T. and Okuda, T. (1988). Two new flavonoids and other constituents in licorice root: Their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 36(6), 2090–2097.

Havsteen, B. (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*, 32(7), 1141–1148.

Hayacibara, M. F., Koo, H., Rosalen, P. L., Duarte, S., Franco, E. M., Bowen, W. H., Ikegaki, M. and Cury, J. A. (2005). In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. *Journal of Ethnopharmacology*, 101(1), 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.001>.

Hayoğlu, İ., İzol, G., Gümüş, A., Göncü, B. and Çevik, G. B. (2010). Menengicin Şekerleme Üretiminde Kullanım Olanakları. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*.

Herrera, D., Sanz, M., Jepsen, S., Needleman, I., and Roldán, S. (2002). A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(s3), 136–159.

Hidaka, S., Okamoto, Y., Ishiyama, K. and Hashimoto, K. (2008). Inhibition of the formation of oral calcium phosphate precipitates: The possible effects of certain honeybee products. *Journal of Periodontal Research*, 43(4), 450–458.

Hooda, R. (2015). Formulation development of an Herbal Candy for Altitude Health Problems. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(4).

How, K. Y., Song, K. P. and Chan, K. G. (2016). *Porphyromonas gingivalis*: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Frontiers in Microbiology*, 7, 53.

Huang, D., Ou, B. and Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856.

Huleihel, M. and Isanu, V. (2002). Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. *The Israel Medical Association Journal*, 4(11 Suppl), 923–927.

Hurtta, M., Pitkänen, I. and Knuutinen, J. (2004). Melting behaviour of D-sucrose, D-glucose and D-fructose. *Carbohydrate Research*, 339(13), 2267–2273.

Ibarz, A., Pagán, J. and Garza, S. (1999). Kinetic models for colour changes in pear puree during heating at relatively high temperatures. *Journal of Food Engineering*, 39(4), 415–422. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(99\)00032-1](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(99)00032-1).

Ibrahim, R. M., Abdel-Salam, F. F. and Farahat, E. (2020). Utilization of Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Extract as Functional Ingredient in Some Confectionery Products. *Food and Nutrition Sciences*, 11(8), Article 8. <https://doi.org/10.4236/fns.2020.118054>.

Ikeno, K., Ikeno, T. and Miyazawa, C. (2009). Effects of Propolis on Dental Caries in Rats. *Caries Research*, 25(5), 347–351. <https://doi.org/10.1159/000261390>.

Inui, S., Hatano, A., Yoshino, M., Hosoya, T., Shimamura, Y., Masuda, S., Ahn, M.-R., Tazawa, S., Araki, Y. and Kumazawa, S. (2014). Identification of the phenolic compounds contributing to antibacterial activity in ethanol extracts of Brazilian red propolis. *Natural Product Research*, 28(16), 1293–1296.

Ioshida, M. and Marx Young, M. C. (2010). Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil from Brazilian Propolis. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13, 633–637. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2010.10643873>.

Ishida, Y., Gao, R., Shah, N., Bhargava, P., Furune, T., Kaul, S. C., Terao, K. and Wadhwa, R. (2018). Anticancer Activity in Honeybee Propolis: Functional Insights to the Role of Caffeic Acid Phenethyl Ester and Its Complex With γ -Cyclodextrin. *Integrative Cancer Therapies*, 17(3), 867–873. <https://doi.org/10.1177/1534735417753545>.

Isla, M. I., Nieva Moreno, M. I., Sampietro, A. R. and Vattuone, M. A. (2001). Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 76(2), 165–170. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(01\)00231-8](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(01)00231-8).

Iwe, M. O., van Zuilichem, D. J., Stolp, W. and Ngoddy, P. O. (2004). Effect of extrusion cooking of soy–sweet potato mixtures on available lysine content and browning index of extrudates. *Journal of Food Engineering*, 62(2), 143–150.

İzol, E., Bursal, E., Yapıcı, İ., Abdullah Yilmaz, M., Yilmaz, İ. and Gülçin, İ. (2024). Chemical Content by LC–MS/MS, Antiglaucoma, and Antioxidant Activity of Propolis Samples From Different Regions of Türkiye. *Journal of Food Biochemistry*, 2024(1), 7488590.

Izol, E., Temel, H., Yilmaz, M. A., Yener, I., Olmez, O. T., Kaplaner, E., Fırat, M., Hasimi, N., Ozturk, M. and Ertas, A. (2021). A Detailed Chemical and Biological Investigation of Twelve Allium Species from Eastern Anatolia with Chemometric Studies. *Chemistry & Biodiversity*, 18(1), e2000560.

Jafarzadeh Kashi, T. S., Kasra Kermanshahi, R., Erfan, M., Vahid Dastjerdi, E., Rezaei, Y. and Tabatabaei, F. S. (2011). Evaluating the In-vitro Antibacterial Effect of Iranian Propolis on Oral Microorganisms. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 10(2), 363–368.

Jenkinson, H. F. and Lappin-Scott, H. M. (2001). Biofilms adhere to stay. *Trends in Microbiology*, 9(1), 9–10.

Jeon, J.G., Rosalen, P. L., Falsetta, M. L. and Koo, H. (2011). Natural products in caries research: Current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Research*, 45(3), 243–263.

Jeon, Y., Oh, J. and Cho, M. S. (2021). Formulation Optimization of Sucrose-Free Hard Candy Fortified with Cudrania tricuspidata Extract. *Foods*, 10(10), Article 10.

Joatilde, C. L. D., Silva, N. D., Fern, F., Fern, T., Souza, M., Generoso, W. G., Noronha, V. R. S., Pereira, E. M. R., Luca, M. P. D., Abreu, S. L. R. and Santos, V. R. (2013). Synergic effect of associated green, red and brown Brazilian propolis extract onto *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(29), 2006–2010.

Kahraman, H. A., Tutun, H., Kaya, M. M., Usluer, M. S., Tutun, S., Yaman, C., Sevin, S. and Keyvan, E. (2022). Ethanolic extract of Turkish bee pollen and propolis: Phenolic composition, antiradical, antiproliferative and antibacterial activities. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 36(1).

Kalia, P., Kumar, N. R. and Harjai, K. (2016). Studies on the therapeutic effect of propolis along with standard antibacterial drug in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infected BALB/c mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 485.

Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Troullidou, E., Mourtzinis, I. and Karathanos, V. T. (2009). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, 116(2), 452–461.

Kamaraj, D., Bhushan, K. S. and K. L., V. (2014). An Evaluation of Microbial Profile in Halitosis with Tongue Coating Using PCR (Polymerase Chain Reaction)-A Clinical and Microbiological Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 8(1), 263–267.

Kaper, J. B., Nataro, J. P. and Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123–140.

Kartal, M., Yıldız, S., Kaya, S., Kurucu, S. and Topçu, G. (2003). Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 86(1), 69–73.

Kashi, T. S. J., Kermanshahi, R. K., Erfan, M., Dastjerdi, E. V., Rezaei, Y. and Tabatabaei, F. S. (2011). Evaluating the In-vitro Antibacterial Effect of Iranian Propolis on Oral Microorganisms. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 10(2), 363.

Katırcıoğlu, H. and Mercan, N. (2006). Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different regions. 5(11), 1151–1153.

Kaya. (2012). Kayseri Propolisinin Etanolik Ekstraktının Antimikrobiyal Aktivitesi. *Selçuk Tıp Dergisi*, 28(4), 209–212.

Kaya, C., Güldane, M., Topuz, S. and Bayram, M. (2018). Nar Suyu İlavesiyle Üretilen Lokumların Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi. 6(11), 1814–1819.

Kekeçoğlu, M., Sönmez, E., Dorkaç, P. ve Eroğlu, N. (2022). Düzce-Yığılca Bölgesine Ait Farklı Propolis Örneklerinin Oral Mikroorganizmalar Üzerindeki in Vitro

Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 25(2), Article 2.

Keskin, M. (2018). Propoliste Standardizasyon Mümkün Mü? *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 18(2), 101–110.

Keskin, Ş., Yatanaslan, L. ve Karlıdağ, S. (2020). Farklı İllerden Toplanan Propolis Örneklerinin Kimyasal Karakterizasyonu. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 20(1), 81–88.

Khayyal, M. T., El-Ghazaly, M. A., El-Khatib, A. S., Hatem, A. M., De Vries, P. J. F., El-Shafei, S. and Khattab, M. M. (2003). A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 17(1), 93–102.

Khouryieh, H. A., Aramouni, F. M. and Herald, T. J. (2005). Physical, Chemical and Sensory Properties of Sugar-Free Jelly. *Journal of Food Quality*, 28(2), 179–190.

Khurshid, Z., Naseem, M., Zafar, M. S., Najeeb, S. and Zohaib, S. (2017). Propolis: A natural biomaterial for dental and oral healthcare. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*, 11(4), 265–274. <https://doi.org/10.15171/joddd.2017.046>.

Kim, J. J., Kim, Y. S. and Kumar, V. (2019). Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 54, 226–231. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.05.003>.

Kılıç, M. ve Evranuz, E. Ö. (2006). Gıdalarda Camsılığa Geçiş ve Kalite İlişkisi. *Gıda*, 31(5), Article 5.

Kırzioğlu, Z. ve Önel, S. Ö. (2015). Diş Çürüklerini Önlemede Kullanılan Alternatif Materyaller. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 24(3), Article 3.

Koç, B. E., Türkyılmaz, M. and Özkan, M. (2012). Siyah Havuç Suyu Konsantresinin Akide Şekerlerinde Renklendirici Olarak Kullanılması ve Monomerik Antosiyaninlerin Depolama Stabilitésinin Belirlenmesi. *Akademik Gıda*, 10(1), Article 1.

Kolaylı, S., Palabiyik, I., Atik, D. S., Keskin, M., Bozdeveci, A. and Karaoglu, S. A. (2020). *Comparison of Antibacterial and Antifungal Effects of Different Varieties of Honey and Propolis Samples*. <https://doi.org/10.1556/066.2020.49.4.18>.

Kolaylı, S., Aliyazıcıoğlu, R. and Ulusoy, E. (2008). *Antioxidant and Antimicrobial Activities of Selected Turkish Honeys*. 36(2), 163–172.

Kolaylı, S., Birinci, C., Kara, Y., Ozkok, A., Samancı, A. E. T., Sahin, H. and Yildiz, O. (2023). A melissopalynological and chemical characterization of Anatolian propolis and an assessment of its antioxidant potential. *European Food Research and Technology*, 249(5), 1213–1233. <https://doi.org/10.1007/s00217-023-04208-x>.

- Koo, H., Cury, J. A., Rosalen, P. L., Ambrosano, G. M. B., Ikegaki, M. and Park, Y. K. (2002). Effect of a Mouthrinse Containing Selected Propolis on 3-Day Dental Plaque Accumulation and Polysaccharide Formation. *Caries Research*, 36(6), 445–448.
- Koo, H., Gomes, B. P. F. A., Rosalen, P. L., Ambrosano, G. M. B., Park, Y. K. and Cury, J. A. (2000). In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Archives of Oral Biology*, 45(2), 141–148.
- Korkmaz, N. (2011). *Kültürel Farklılıkların Dondurulmuş Gıda Tüketim Kalıplarına Etkisi: Polonya-türkiye Karşılaştırması* [Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi].
- Kovács, M., Dóka, O. and Richfield, D. (2019). Determination Of Two Color Agents In Hard Boiled Candy By Laser-Based Photoacoustic Spectroscopy And Colorimetry. *Arpathian Journal Of Food Science And Technology*, 11(4), 126–132.
- Kubiliene, L., Laugaliene, V., Pavilonis, A., Maruska, A., Majiene, D., Barauskaite, K., Kubilius, R., Kasparaviciene, G. and Savickas, A. (2015). Alternative preparation of propolis extracts: Comparison of their composition and biological activities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 156.
- Küçük, M., Kolaylı, S., Karaoğlu, Ş., Ulusoy, E., Baltacı, C. and Candan, F. (2007). Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, 100(2), 526–534.
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R. and Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(3), 235–240.
- Kuropatnicki, A. K., Szliszka, E. and Krol, W. (2013). Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(1), 964149. <https://doi.org/10.1155/2013/964149>.
- Kuster, B. F. M. (1990). 5-Hydroxymethylfurfural (HMF). A Review Focussing on its Manufacture. *Starch - Stärke*, 42(8), 314–321. <https://doi.org/10.1002/star.19900420808>
- Lam, O. L., McGrath, C., Bandara, H., Li, L. S. and Samaranayake, L. P. (2012). Oral health promotion interventions on oral reservoirs of staphylococcus aureus: A systematic review. *Oral Diseases*, 18(3), 244–254.
- Lamont, R. J., Hajishengallis, G. N., Koo, H. and Jenkinson, H. F. (2020). *Oral Microbiology and Immunology*. John Wiley & Sons.
- Larsen, C. S., Shavit, R. and Griffin, M. (1991). Dental caries evidence for dietary change: An archaeological context. *Advances in Dental Anthropology*, 179–202.
- Laskar, R. A., Sk, I., Roy, N. and Begum, N. A. (2010). Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chemistry*, 122(1), 233–237.

- Laupland, K. B., Church, D. L., Mucenski, M., Sutherland, L. R. and Davies, H. D. (2003). Population-Based Study of the Epidemiology of and the Risk Factors for Invasive *Staphylococcus aureus* Infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 187(9), 1452–1459.
- Lee, D. S., Chung, S. K., Kim, H. K. and Yam, K. L. (1991). Nonenzymatic Browning in Dried Red Pepper Products. *Journal of Food Quality*, 14(2), 153–163.
- Lee, I., Lee, M. and Jang, H.S. (2013). The interrelationship between human gingival fibroblast differentiation and cultivating time. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 10(2), 60–64. <https://doi.org/10.1007/s13770-013-0371-y>
- Lee, Y. H. and Hong, J. Y. (2023). Oral microbiome as a co-mediator of halitosis and periodontitis: A narrative review. *Frontiers in Oral Health*, 4. <https://doi.org/10.3389/froh.2023.1229145>.
- Lees, R., and Jackson, E. B. (1995). *Sugar Confectionery and Chocolate Manufacture*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4684-1495-0>.
- Leistevuo, J., Järvinen, H., Österblad, M., Leistevuo, T., Huovinen, P. and Tenovu, J. (2000). Resistance to Mercury and Antimicrobial Agents in *Streptococcus mutans* Isolates from Human Subjects in Relation to Exposure to Dental Amalgam Fillings. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(2), 456–457.
- Li, F., Awale, S., Tezuka, Y. and Kadota, S. (2008). Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(10), 5434–5440. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.04.016>.
- Li, L., Sun, W., Wu, T., Lu, R. and Shi, B. (2017). Caffeic acid phenethyl ester attenuates lipopolysaccharide-stimulated proinflammatory responses in human gingival fibroblasts via NF- κ B and PI3K/Akt signaling pathway. *European Journal of Pharmacology*, 794, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.11.003>.
- Libério, S. A., Pereira, A. L. A., Araújo, M. J. A. M., Dutra, R. P., Nascimento, F. R. F., Monteiro-Neto, V., Ribeiro, M. N. S., Gonçalves, A. G. and Guerra, R. N. M. (2009). The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. *Journal of Ethnopharmacology*, 125(1), 1–9.
- Livesey, G. (2003). Health potential of polyols as sugar replacers, with emphasis on low glycaemic properties. *Nutrition Research Reviews*, 16(2), 163–191.
- Loesche, W. J. (1996). *Microbiology of Dental Decay and Periodontal Diseases*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8259>.
- Longo-Sorbello, G. S. A., Saydam, G., Banerjee, D. and Bertino, J. R. (2006). Chapter 38—Cytotoxicity and Cell Growth Assays. In J. E. Celis (Ed.), *Cell Biology (Third Edition)* (pp. 315–324). Academic Press.

Lopes, R. R., Miranda, J. L., Lima, N. L., Ferreira, F. O., Santos, A. S., Verli, F. D., and Marinho, S. A. (2012). Effect of topical propolis and dexamethasone on the healing of oral surgical wounds: Original research. *Wound Healing Southern Africa*, 5(1), 25–30.

Magro-Filho, O. and Carvalho, A. C. P. de. (1994). Topical Effect of Propolis in the Repair of Sulcoplasties by the Modified Kazanjian Technique. *The Journal of Nihon University School of Dentistry*, 36(2), 102–111.

Magwaza, L. S. and Opara, U. L. (2015). Analytical methods for determination of sugars and sweetness of horticultural products—A review. *Scientia Horticulturae*, 184, 179–192. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.01.001>.

Mäkinen, K. K. (2011). Sugar Alcohol Sweeteners as Alternatives to Sugar with Special Consideration of Xylitol. *Medical Principles and Practice*, 20(4), 303–320.

Malacaria, L., La Torre, C., Furia, E., Fazio, A., Caroleo, M. C., Cione, E., Gallelli, L., Marino, T. and Plastina, P. (2022). Aluminum(III), iron(III) and copper(II) complexes of luteolin: Stability, antioxidant, and anti-inflammatory properties. *Journal of Molecular Liquids*, 345, 117895. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117895>.

Mandal, M. D. and Mandal, S. (2011). Honey: Its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(2), 154–160.

Marcucci, M. C., Ferreres, F., García-Viguera, C., Bankova, V. S., De Castro, S. L., Dantas, A. P., Valente, P. H. M. and Paulino, N. (2001). Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 74(2), 105–112. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00326-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00326-3).

Marsh, P. D. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*, 149(2), 279–294. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26082-0>.

Marsh, P. D., Moter, A. and Devine, D. A. (2011). Dental plaque biofilms: Communities, conflict and control. *Periodontology 2000*, 55(1), 16–35.

Martinotti, S. and Ranzato, E. (2015). Propolis: A new frontier for wound healing? *Burns & Trauma*, 3(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s41038-015-0010-z>.

Martins, S. I. F. S., Jongen, W. M. F. and van Boekel, M. A. J. S. (2000). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science & Technology*, 11(9), 364–373. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00022-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00022-X).

Marţiş, G., Muste, S., Mureşan, A., Vlaic, R., Pop, A., Ungur, R., Puşcaş, A., Bordean, M. E. and Mureşan, V. (2020). Gelled Confectionery Product Supplemented With Guarana (Paullinia Cupana Kunth) Powder. Development And Characterization. *Hop and Medicinal Plants*, 28(1–2), 202–210. <https://doi.org/10.15835/hpm.v28i1-2.13999>.

Matsuno, T. (1995). A New Clerodane Diterpenoid Isolated from Propolis. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 50(1–2), 93–97. <https://doi.org/10.1515/znc-1995-1-214>.

- May, P. M. and Bulman, R. A. (1983). 5 The Present Status of Chelating Agents in Medicine. In G. P. Ellis and G. B. West (Eds.), *Progress in Medicinal Chemistry* (Vol. 20, pp. 225–336). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6468\(08\)70220-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6468(08)70220-0).
- Mayer, F. L., Wilson, D. and Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119–128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>.
- McKenna, B. M. and Kilcast, D. (2004). *Texture in Food* (1st edition). Woodhead Publishing.
- Mehmetoğlu, S., Tarakçı, Z., Demirkol, M., Çakıcı, N. and Güney, F. (2017). Gıda Katkı Maddesi Olarak Propolis. *Aricılık Araştırma Dergisi*, 9(1), Article 1.
- Mello, B. C. B. S., Petrus, J. C. C. and Hubinger, M. D. (2010). Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. *Journal of Food Engineering*, 96(4), 533–539.
- Memmedov, H., Aldemir, O. and Aliyev, E. (2017). Propolisin Antioksidan Ve Antiinflamatuvar Etkisi. *Aricılık Araştırma Dergisi*, 9(2), 56–62.
- Miguel, M. D. G., Doughmi, O., Aazza, S., Antunes, D. and Lyoussi, B. (2014). Antioxidant, anti-inflammatory and acetylcholinesterase inhibitory activities of propolis from different regions of Morocco. *Food Science and Biotechnology*, 23(1), 313–322.
- Mirzoeva, O. K., Grishanin, R. N. and Calder, P. C. (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: The effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological Research*, 152(3), 239–246.
- Misir, S. (2013). *Türk propolisinin farklı çözücülerdeki ekstraktlarının radikal yakalama ve demir şelatlama aktivitesinin incelenmesi* [Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü].
- Mizrahi, A. and Lensky, Y. (2013). *Bee Products: Properties, Applications, and Apitherapy*. Springer Science & Business Media.
- Mohanta, A. (2017). Oral Health in 21st Century—An Emerging Challenge. *EC Dental Science*, 8, 12–14.
- Moreno, M. I. N., Isla, M. I., Sampietro, A. R. and Vattuone, M. A. (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(1), 109–114.
- Mouhoubi-Tafnine, Z., Ouchemoukh, S. and Tamendjari, A. (2016). Antioxydant activity of some algerian honey and propolis. *Industrial Crops and Products*, 88, 85–90.
- Murata, T., Yamaga, T., Iida, T., Miyazaki, H. and Yaegaki, K. (2002). Classification and examination of halitosis. *International Dental Journal*, 52 Suppl 3, 181–186.

- Mutlu, C., Tontul, S. A. and Erbaş, M. (2018). Production of a minimally processed jelly candy for children using honey instead of sugar. *LWT*, 93, 499–505.
- Muzzaffar, S., Baba, W. N., Nazir, N., Masoodi, F. A., Bhat, M. M. and Bazaz, R. (2016). Effect of storage on physicochemical, microbial and antioxidant properties of pumpkin (*Cucurbita moschata*) candy. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1163650.
- Naczki, M. and Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1), 95–111. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.059>.
- Narimane, S., Demircan, E., Salah, A., Ozcelik, B. Ö. and Salah, R. (2017). Correlation between antioxidant activity and phenolic acids profile and content of Algerian propolis: Influence of solvent. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30(4), 1417–1423.
- Navarro-Pérez, M. L., Vadillo-Rodríguez, V., Fernández-Babiano, I., Pérez-Giraldo, C. and Fernández-Calderón, M. C. (2021). Antimicrobial activity of a novel Spanish propolis against planktonic and sessile oral *Streptococcus* spp. *Scientific Reports*, 11, 23860. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03202-1>.
- Nesreen, A., Al-Askalany, S. and Ghandor, H. (2017). Evaluation of Sensory, Physicochemical Changes of Marshmallow (Children Candy) by Addition Natural colors. *Bulletin of the National Nutrition Institute of the Arab Republic of Egypt*, 50(1), 219–243.
- Netramai, S., Kijchavengkul, T., Sompoo, P. and Kungnimit, W. (2018). The effect of intrinsic and extrinsic factors on moisture sorption characteristics of hard candy. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(5), 13599. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13599>.
- Newman, M. G., Takei, H. H. and Klokkevold, P. R. (2006). Carranza's clinical periodontology. *Text with Continually Updated Online Reference*, 1, 120–122.
- Nezir, M. and Özcan, S. (2024). Definition, Etiology, Risk Factors and Classification of Dental Caries. *Journal of Ege University School of Dentistry*, 45(1), 45–52.
- Niles, A. L., Moravec, R. A., Eric Hesselberth, P., Scurria, M. A., Daily, W. J. and Riss, T. L. (2007). A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Analytical Biochemistry*, 366(2), 197–206.
- Nisa, A., Sari, M. and Yusuf, Y. (2022). Fabrication and characterization of HA-oyster shell based on biopolymer Propolis as an agent of dental enamel remineralization material. *Materials Research Express*, 9, 115401.
- Normark, B. H. and Normark, S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, 252(2), 91–106.
- Noronha, V., Araujo, G., Gomes, R., Iwanaga, S., Barbosa, M., Abdo, E., Ferreira, E., Viana, A., Souza, A., Abreu, S. and R. Santos, V. (2014). Mucoadhesive Propolis Gel for Prevention of Radiation-Induced Oral Mucositis. *Current Clinical Pharmacology*, 9(4), 359–364.

O'Brien-Nabors, L. (2016). *Alternative Sweeteners*. CRC Press.

O'Connor, R., Heenan, M., Duffy, C. and Clynes, M. (1998). Miniaturized In Vitro Methods in Toxicity Testing. In M. Clynes (Ed.), *Animal Cell Culture Techniques* (pp. 423–433). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-80412-0_22

Oda, H., Nakagawa, T., Maruyama, K., Dono, Y., Katsuragi, H. and Sato, S. (2016). Effect of Brazilian green propolis on oral pathogens and human periodontal fibroblasts. *Journal of Oral Biosciences*, 58(2), 50–54. <https://doi.org/10.1016/j.job.2015.11.001>

Oksuz, H., Duran, N., Tamer, C., Cetin, M. and Silici, S. (2005). Effect of Propolis in the Treatment of Experimental Staphylococcus aureus Keratitis in Rabbits. *Ophthalmic Research*, 37(6), 328–334. <https://doi.org/10.1159/000087943>

Ophori, E. A., Eriagbonye, B. N. and Ugbodaga, P. (2010). Antimicrobial activity of propolis against Streptococcus mutans. *African Journal of Biotechnology*, 9(31), Article 31.

Oppegaard, O., Mylvaganam, H. and Kittang, B. R. (2015). Beta-haemolytic group A, C and G streptococcal infections in Western Norway: A 15-year retrospective survey. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21(2), 171–178.

Oruç, H. H. (2014). Propolisin Sağlık Açısından Önemi, Kalitesinin Belirlenmesi Ve Türkiye Açısından İrdelenmesi. *Uludag Bee Journal*, 14(1), Article 1.

Osama, İ. (2016). Sugar alcohols: Chemical structures, manufacturing, properties and applications. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 06(05).

Ota, C., Unterkircher, C., Fantinato, V. and Shimizu, M. T. (2001). Antifungal activity of propolis on different species of Candida. *Mycoses*, 44(9–10), 375–378.

Ozan, F., Sümer, Z., Polat, Z. A., Er, K., Ozan, U. and Deger, O. (2007). Effect of mouthrinse containing propolis on oral microorganisms and human gingival fibroblasts. *European Journal of Dentistry*, 1(4), 195–201.

Ozan, G., Mert Eren, M. and Vatansever, C. (2021). Antimicrobial Effect Of Propolis Drops On Oral Pathogens In Vitro. *Selcuk Dental Journal*, 8(3), 673–678.

Özcan, S. (2016). Diş Çürüğünün Tanımı, Etiyolojisi ve İlerlemesi. *Türkiye Klinikleri Restorative Dentistry - Special Topics*, 2(1), 1–4.

Özçelik, M. M., Duman, B. ve Özkan, G. (2022). Organik Pekmezlerden Jeli Şeker Üretimi. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, 10(2), 371–379.

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

Ozdal, T., Sari-Kaplan, G., Mutlu-Altundag, E., Boyacioglu, D. and Capanoglu, E. (2018). Evaluation of Turkish propolis for its chemical composition, antioxidant capacity, anti-proliferative effect on several human breast cancer cell lines and proliferative effect on fibroblasts and mouse mesenchymal stem cell line. *Journal of Apicultural Research*, 57(5), 627–638.

Özdemir, D., Başer, H. and Çakır, B. (2014). Tatlandırıcılar. *Türkiye Klinikleri Endokrinoloji Dergisi*, 9(2), 60–70.

Özdemir, G., Ersöz, E. and Dilek, N. (2021). Apitherapy and Health. *Black Sea Journal of Health Science*, 4(2), Article 2. <https://doi.org/10.19127/bshealthscience.816036>.

Özden, A. N., Ak, B. E. and Özden, M. (2017). Farklı Nar (*Punica granatum* L.) Çeşitlerinin Pomolojik, Fitokimyasal Özellikleri ve Antioksidan Kapasiteleri. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 21(2), Article 2.

Ozkan, O., Vural, H. and Bağcigil, A. (2009). *Salvia verticillata* ve *Phlomis pungens*'in in vitro Antibakteriyel Etkinliğinin Değerlendirilmesi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15.

Ozturk, I., Caliskan, O., Törnük, F., Ozcan, N., Yalçın, H., Baslar, M. and Sağdıç, O. (2015). Antioxidant, antimicrobial, mineral, volatile, physicochemical and microbiological characteristics of traditional home-made Turkish vinegars. *Lwt-Food Science And Technology*, 63(1). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.003>.

Paes Leme, A. F., Koo, H., Bellato, C. M., Bedi, G. and Cury, J. A. (2006). The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation—New insight. *Journal of Dental Research*, 85(10), 878–887. <https://doi.org/10.1177/154405910608501002>.

Palabiyik, I., Kolayli, S., Şükrü Demirci, A. and Bölük, E. (2019). *Şekerli Ve Şekersiz Propolisli Sakız Formülasyonu Ve Tekstürel, Antioksidan Ve Antibakteriyel Özelliklerinin Araştırılması*. Tübitak Proje No:1170869.

Panche, A. N., Diwan, A. D. and Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, 47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>.

Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S. and Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiology*, 6(1), 1–31.

Park, Y. K., Alencar, S. M. and Aguiar, C. L. (2002). Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2502–2506. <https://doi.org/10.1021/jf011432>.

Park, Y. K., Koo, M. H., Abreu, J. A., Ikegaki, M., Cury, J. A. and Rosalen, P. L. (1998). Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Current Microbiology*, 36(1), 24–28. <https://doi.org/10.1007/s002849900274>.

Parolia, A., Thomas, M., Mala, K. and Mohan, M. (2010). Propolis and its potential uses in oral health. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*, 2, 210–215.

- Patel, S. (2016). Emerging Adjuvant Therapy for Cancer: Propolis and its Constituents. *Journal of Dietary Supplements*, 13(3), 245–268.
- Paula, R., Tomaz, G. and Warner, K. S. (2006). Susceptibility Of Oral Pathogenic Bacteria And Fungi To Brazilian Green Propolis Extract. *Pharmacologyonline*, 3, 467–473.
- Peng, L., Yang, S., Cheng, Y. J., Chen, F., Pan, S. and Fan, G. (2012). Antifungal activity and action mode of pinocembrin from propolis against *Penicillium italicum*. *Food Science and Biotechnology*, 21(6), 1533–1539.
- Pereira, E. M. R., da Silva, J. L. D. C., Silva, F. F., De Luca, M. P., Ferreira, E. F., Lorentz, T. C. M., and Santos, V. R. (2011). Clinical Evidence of the Efficacy of a Mouthwash Containing Propolis for the Control of Plaque and Gingivitis: A Phase II Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011(1), 750249.
- Periche, A., Heredia, A., Escriche, I., Andrés, A. and Castelló, M. L. (2014). Optical, mechanical and sensory properties of based-isomaltulose gummy confections. *Food Bioscience*, 7, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2014.05.006>.
- Petković, M. (2019). Alternatives for Sugar Replacement in Food Technology: Formulating and Processing Key Aspects. *Food Engineering*, 2, 23-27. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82251>
- Phelan, K. and May, K. M. (2015). Basic techniques in mammalian cell tissue culture. *Current Protocols in Cell Biology*, 66, 111-122.
- Pietta, P. G., Gardana, C. and Pietta, A. M. (2002). Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia*, 73 (1), 7-20.
- Popova, M., Giannopoulou, E., Skalicka-Woźniak, K., Graikou, K., Widelski, J., Bankova, V., Kalofonos, H., Sivolapenko, G., Gawel-Bęben, K., Antosiewicz, B. and Chinou, I. (2017). Characterization and Biological Evaluation of Propolis from Poland. *Molecules*, 22(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/molecules22071159>
- Popova, M. P., Chinou, I. B., Marekov, I. N. and Bankova, V. S. (2009). Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry*, 70(10), 1262–1271.
- Prabhurajeshwar, C. and Chandrakanth, R. K. (2017). Probiotic potential of *Lactobacilli* with antagonistic activity against pathogenic strains: An *in vitro* validation for the production of inhibitory substances. *Biomedical Journal*, 40(5), 270–283.
- Prakash, N. and Priya, S. (2016). Development Of Novel Functional Confectionery Using Low Reduced Sugar. *Agricultural and Food Sciences*.
- Prieto, P., Pineda, M. and Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex:

Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337–341. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>.

Przybyłek, I. and Karpiński, T. M. (2019). Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules*, 24(11), 2047. <https://doi.org/10.3390/molecules24112047>.

Pujirahayu, N. (2014). Properties and Flavonoids Content in Propolis of Some Extraction Method of Raw Propolis. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(6).

Qiu, Y., Xu, D., Xia, X., Zhang, K., Aadil, R. M., Batool, Z. and Wang, J. (2021). Five major two components systems of *Staphylococcus aureus* for adaptation in diverse hostile environment. *Microbial Pathogenesis*, 159, 105119.

Que, Y. A. and Moreillon, P. (2011). Infective endocarditis. *Nature Reviews. Cardiology*, 8(6), 322–336. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2011.43>.

Rahman, M. S. (2010). Food stability determination by macro–micro region concept in the state diagram and by defining a critical temperature. *Journal of Food Engineering*, 99(4), 402–416. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.07.011>.

Ramanauskienė, K. and Inkėnienė, A. M. (2011). Propolis oil extract: Quality analysis and evaluation of its antimicrobial activity. *Natural Product Research*, 25(15), 1463–1468. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.529440>.

Raudonus, J., Bernard, J., Janßen, H., Kowalczyk, J. and Carle, R. (2000). Effect of oligomeric or polymeric additives on glass transition, viscosity and crystallization of amorphous isomalt. *Food Research International*, 33(1), 41–51.

Regueira, M. S., Tintino, S. R., da Silva, A. R. P., Costa, M. S., Boligon, A. A., Matias, E. F. F., de Queiroz Balbino, V., Menezes, I. R. A. and Melo Coutinho, H. D. (2017). Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. *Food and Chemical Toxicology*, 107, 572–580.

Reis, J. H. O., Barreto, G. A., Cerqueira, J. C., Anjos, J. P. D., Andrade, L. N., Padilha, F. F., Druzian, J. I. and Machado, B. A. S. (2019). Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts from different regions of northeastern Brazil obtained by conventional and ultrasound-assisted extraction. *PloS One*, 14(7), e0219063.

Reyes, L. (2021). Porphyromonas gingivalis. *Trends in Microbiology*, 29(4), 376–377.

Rheims, J., Köser, J. and Wriedt, T. (1997). Refractive-index measurements in the near-IR using an Abbe refractometer. *Measurement Science and Technology*, 8(6), 601.

Riss, T. L. and Moravec, R. A. (2004). Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay and Drug Development Technologies*, 2(1), 51–62.

Rivera-Yañez, N., Rodriguez-Canales, M., Nieto-Yañez, O., Jimenez-Estrada, M., Ibarra-Barajas, M., Canales-Martinez, M. M. and Rodriguez-Monroy, M. A. (2018). Hypoglycaemic and Antioxidant Effects of Propolis of Chihuahua in a Model of Experimental Diabetes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018(1), 4360356. <https://doi.org/10.1155/2018/4360356>.

Rizk, E. M., Tolba, K. H. and El-Gharably, A. M. (2008). Carotenoid Pigments Composition Of Calendula Flower And Its Potential Uses As Antioxidant And Natural Colorant In Manufacturing Of Hard Candy. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*, 16(2), 407–417. <https://doi.org/10.21608/ajs.2008.14976>.

Roos, Y. H. and Drusch, S. (2015). *Phase Transitions in Foods*. Academic Press.

Roos, Y. and Karel, M. (1991). Plasticizing Effect of Water on Thermal Behavior and Crystallization of Amorphous Food Models. *Journal of Food Science*, 56(1), 38–43.

Roudaut, G., Simatos, D., Champion, D., Contreras-Lopez, E. and Le Meste, M. (2004). Molecular mobility around the glass transition temperature: A mini review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(2), 127–134.

Rowe, N. H., Garn, S. M., Clark, D. C. and Guire, K. E. (1976). The effect of age, sex, race, and economic status on dental caries experience of the permanent dentition. Committee to Review the Ten-State Nutrition Survey of 1968-1970. *Pediatrics*, 57(4), 457–461.

Roy, P. S. and Saikia, B. J. (2016). Cancer and cure: A critical analysis. *Indian Journal of Cancer*, 53(3), 441. <https://doi.org/10.4103/0019-509X.200658>.

Ruiz-Cabrera, M. A. and Schmidt, S. J. (2015). Determination of glass transition temperatures during cooling and heating of low-moisture amorphous sugar mixtures. *Journal of Food Engineering*, 146, 36–43.

Saad, M. A., Abdel Salam, R. M., Kenawy, S. A. and Attia, A. S. (2015). Pinocembrin attenuates hippocampal inflammation, oxidative perturbations and apoptosis in a rat model of global cerebral ischemia reperfusion. *Pharmacological Reports*, 67(1), 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.08.014>.

Saavedra-Leos, M., Grajales-Lagunes, A., González-García, R., Toxqui-Terán, A., Pérez-García, S., Abud-Archila, M. and Ruiz-Cabrera, M. (2012). Glass Transition Study in Model Food Systems Prepared with Mixtures of Fructose, Glucose, and Sucrose. *Journal of Food Science*, 77(5), E118–E126.

Sablani, S. S., Syamaladevi, R. M. and Swanson, B. G. (2010). A Review of Methods, Data and Applications of State Diagrams of Food Systems. *Food Engineering Reviews*, 2(3), 168–203. <https://doi.org/10.1007/s12393-010-9020-6>.

Şahinler, N. (2000). Arı Ürünleri ve İnsan Sağlığı Açısından Önemi. *M.K.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 5(1–2).

Sahlan, M., Ridhowati, A., Hermansyah, H., Wijanarko, A., Rahmawati, O. and Pratami, D. K. (2019). Formulation of hard candy contains pure honey as functional food. *AIP Conference Proceedings*, 2092(1), 040010. <https://doi.org/10.1063/1.5096743>.

Sáiz-Abajo, M. J., González-Sáiz, J. M. and Pizarro, C. (2004). Classification of Wine and Alcohol Vinegar Samples Based on Near-Infrared Spectroscopy. Feasibility Study on the Detection of Adulterated Vinegar Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(25), 7711–7719. <https://doi.org/10.1021/jf049098h>.

Salas, A., Mercado, M. I., Zampini, I. C., Ponessa, G. I. and Isla, M. I. (2016). Determination of Botanical Origin of Propolis from Monte Region of Argentina by Histological and Chemical Methods. *Natural Product Communications*, 11(5), 1934578X1601100518. <https://doi.org/10.1177/1934578X1601100518>.

Salatino, A., Teixeira, É.W., Negri, G. and Message, D. (2005). Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1), 33–38. <https://doi.org/10.1093/ecam/neh060>.

Samet, N., Laurent, C., Susarla, S.M. and Samet-Rubinstein, N. (2007). The effect of bee propolis on recurrent aphthous stomatitis: A pilot study. *Clinical Oral Investigations*, 11(2), 143–147. <https://doi.org/10.1007/s00784-006-0090-z>.

Sandell, L. and Sakai, D. (2011). Mammalian Cell Culture. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 5(1), 431–432.

Sanghani, N. N., Shivaprasad, B. M. and Savita S. (2014). Health from the Hive: Propolis as an Adjuvant in the Treatment of Chronic Periodontitis - A Clinicomicrobiologic Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 20(9),41–44.

Santos, E. M. A., Uzeda, M., Carvalho, M. A. R., Farias, L. M., Moreira, E. S. A. and Braga, F. C. (2002). Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 80(1), 1–7.

Santos, F. A., Bastos, E. M. A., Rodrigues, P. H., Uzeda, M., Carvalho, M. A. R., Macedo Farias, L. and Andrade Moreira, E. S. (2002). Susceptibility of *Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens* (and *Porphyromonas gingivalis*) to Propolis (Bee Glue) and other Antimicrobial Agents. *Anaerobe*, 8(1), 9–15.

Santos, L. M., Fonseca, M. S., Sokolonski, A. R., Deegan, K. R., Araújo, R. P., Umsza-Guez, M. A., Barbosa, J. D., Portela, R. D. and Machado, B. A. (2020). Propolis: Types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(4), 1369–1382.

Sariguzel, F. M., Berk, E., Koc, A. N., Sav, H. and Demir, G. (2016). Antifungal Activity of Propolis Against Yeasts Isolated From Blood Culture: In Vitro Evaluation. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 30(5), 513–516.

Sarikaya, A. O., Ulusoy, E., Öztürk, N., Tunçel, M. and Kolayli, S. (2009). Antioxidant Activity and Phenolic Acid Constituents of Chestnut (*castania Sativa* Mill.) Honey and Propolis. *Journal of Food Biochemistry*, 33(4), 470–481.

Sato, M., Fujiwara, S., Nagayama, M., Yamaguchi, R., Tokuda, C., Takeuchi, H., Yamada, H., Sugimoto, H. and Okihara, K. (2001). *Effect of propolis and propolis-containing toothpaste on the formation of dental plaque in vitro*. 20, 5–10.

Schmidt, S. J. (2004). Water and Solids Mobility in Foods. *Advances in Food and Nutrition Research Volume 48*, 1–101. [https://doi.org/10.1016/s1043-4526\(04\)48001-2](https://doi.org/10.1016/s1043-4526(04)48001-2).

Schwenke, K. D. (1997). Functionality of Proteins in Food. *Food / Nahrung*, 41(5), 319–319. <https://doi.org/10.1002/food.19970410529>.

Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D. and Boyd, M. R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*, 48(17), 4827–4833.

Sehwag, S. and Das, M. (2016). Composition and functionality of whole jamun based functional confection. *Journal of Food Science and Technology*, 53(6), 2569–2579.

Selwitz, R. H., Ismail, A. I. and Pitts, N. B. (2007). Dental caries. *The Lancet*, 369(9555), 51–59. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60031-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60031-2).

Seneviratne, C. J., Zhang, C. F. and Samaranayake, L. P. (2011). Dental plaque biofilm in oral health and disease. *The Chinese Journal of Dental Research*, 14(2), 87–94.

Sentko, A. and Willibald-Ettle, I. (2012). Isomalt. In *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology* (pp. 243–274).

Serin, E. K., Ozdemir, A. and Savas, M. (2018). Cancer Risk Factors And Prevention In

Serra, J. and Escola, R. (1995). A Study of the Bacteriostatic Activity of Propolis. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau : DLR ; Analytik, Forschung, Prozesse, Recht*, 91(8).

Sforcin, J. M. (2016). Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytotherapy Research*, 30(6), 894–905. <https://doi.org/10.1002/ptr.5605>.

Sforcin, J. M. and Bankova, V. (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 253–260.

Sforcin, J. M., Fernandes, A., Lopes, C. A. M., Bankova, V. and Funari, S. R. C. (2000). Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 73(1), 243–249.

Shabbir, A., Rashid, M. and Tipu, H. N. (2016). Propolis, A Hope for the Future in Treating Resistant Periodontal Pathogens. *Cureus*, 8(7), e682.

Shah, N. P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17(11), 1262–1277. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.01.014>.

Shankar, P., Ahuja, S. and Sriram, K. (2013). Non-nutritive sweeteners: Review and update. *Nutrition*, 29(11), 1293–1299. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.03.024>.

Sharma, R. and Ghoshal, G. (2021). Characterization and cytotoxic activity of pigment extracted from *Rhodotorula mucilaginosa* to assess its potential as bio-functional additive in confectionary products. *Journal of Food Science and Technology*, 58(7), 2688–2698.

Sheldon, A. T. (2003). Antibiotic Resistance: Who Is Winning the War? Introductory Remarks. *International Journal of Toxicology*, 22(2), 129–130.

Shen, P., Walker, G. D., Yuan, Y., Reynolds, C., Stacey, M. A. and Reynolds, E. C. (2017). Food acid content and erosive potential of sugar-free confections. *Australian Dental Journal*, 62(2), 215–222. <https://doi.org/10.1111/adj.12498>.

Shirley, B. W. (1996). Flavonoid biosynthesis: ‘New’ functions for an ‘old’ pathway. *Trends in Plant Science*, 1(11), 377–382.

Siegwein, A. M., Vodovotz, Y. and Fisher, E. L. (2011). Concentration of soy protein isolate affects starch-based confections’ texture, sensory, and storage properties. *Journal of Food Science*, 76(6), E422–428. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02241.x>.

Silva, A. M., Rocha, B., Moreira, M. M., Delerue-Matos, C., Neves, J. and Rodrigues, F. (2024). Biological Activity and Chemical Composition of Propolis Extracts with Potential Use in Vulvovaginal Candidiasis Management. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/ijms25052478>.

Silva, B. B., Rosalen, P. L., Cury, J. A., Ikegaki, M., Souza, V. C., Esteves, A. and Alencar, S. M. (2008). Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 5(3), 313–316. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem059>

Silva, F. R. G., Matias, T. M. S., Souza, L. I. O., Matos-Rocha, T. J., Fonseca, S. A., Mousinho, K.C. and Santos, A. F. (2019). Phytochemical screening and in vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and antitumor activities of the red propolis Alagoas. *Brazilian Journal of Biology*, 79(3), 452–459.

Singleton, V. L. and Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>.

Siqueira, A. B. S., Rodriguez, L. R. N. A., Santos, R. K. B., Marinho, R. R. B., Abreu, S., Peixoto, R. F. and Gurgel, B. C. de V. (2015). Antifungal activity of propolis against *Candida* species isolated from cases of chronic periodontitis. *Brazilian Oral Research*, 29, 1–6. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2015.vol29.0083>.

- Siripatrawan, U., Vitchayakitti, W. and Sanguandeekul, R. (2013). Antioxidant and antimicrobial properties of Thai propolis extracted using ethanol aqueous solution. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(1), 22–27.
- Slinkard, K. and Singleton, V. L. (1977). Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49–55. <https://doi.org/10.5344/ajev.1977.28.1.49>.
- Slots, J. (1977). The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 85(2), 114–121.
- Šmídová, I., Čopíková, J., Maryška, M. and Coimbra, M. A. (2003). Crystals in hard candies. *Czech Journal of Food Sciences*, 21(5), 185–191.
- Socransky, S. S., and Haffajee, A. D. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000*, 38, 135–187. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x>.
- Sohaimy, S. A. E. and Masry, S. H. D. (2014). Phenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Egyptian and Chinese Propolis. *Environ. Sci.*
- Sonmez, S., Kirilmaz, L., Yucesoy, M., Yücel, B. and Yilmaz, B. (2005). The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(3), 371–376. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.06.035>.
- Souiy, Z., Amri, Z., Sharif, H., Souiy, A., Cheraief, I., Hamden, K. and Hammami, M. (2023). The Use of D-Optimal Mixture Design in Optimizing Formulation of a Nutraceutical Hard Candy. *International Journal of Food Science*, 2023, 7510452.
- Spanemberg, F. E. M., Korzenowski, A. L. and Sellitto, M. A. (2019). Effects of sugar composition on shelf life of hard candy: Optimization study using D-optimal mixture design of experiments. *Journal of Food Process Engineering*, 42(6), e13213.
- Stähli, A., Schröter, H., Bullitta, S., Serralutzu, F., Dore, A., Nietzsche, S., Milia, E., Sculean, A. and Eick, S. (2021). In Vitro Activity of Propolis on Oral Microorganisms and Biofilms. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(9), 1045.
- Steinberg, D., Kaine, G. and Gedalia, I. (1996). Antibacterial effect of propolis and honey on oral bacteria. *American Journal of Dentistry*, 9(6), 236–239.
- Stepanović, S., Antić, N., Dakić, I. and Švabić-Vlahović, M. (2003). In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiological Research*, 158(4), 353–357.
- Sukkwai, S., Kijroongrojana, K., Chonpracha, P., Pujols, K. D., Alonso-Marengo, J. R., Ardoin, R. and Prinyawiwatukul, W. (2018). Effects of colorant concentration and ‘natural colour’ or ‘sodium content’ claim on saltiness perception, consumer liking and emotion, and purchase intent of dipping sauces. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(5), 1246–1254. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13704>.

- Suman, Kaushal, M., Gupta, A., Vaidya, D. and Kaushik, R. (2021). Standardization of formulation for the preparation of ginger supplemented jelly candies. *The Pharma Innovation Journal*, 10(2), 608–613.
- Sun, C., Wu, Z., Wang, Z. and Zhang, H. (2015). Effect of Ethanol/Water Solvents on Phenolic Profiles and Antioxidant Properties of Beijing Propolis Extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015(1), 595393.
- Šuran, J., Ceganec, I., Mašek, T., Radić, B., Radić, S., Tlak Gajger, I. and Vlajnić, J. (2021). Propolis Extract and Its Bioactive Compounds-From Traditional to Modern Extraction Technologies. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(10), 2930.
- Takatsuka, T., Exterkate, R. A. M. and Cate, J. M. (2008). Effects of Isomalt on enamel de- and remineralization, a combined in vitro pH-cycling model and in situ study. *Clinical Oral Investigations*, 12(2), 173–177. <https://doi.org/10.1007/s00784-007-0155-7>.
- Tan, J. and Kerr, W. L. (2017). Determination of glass transitions in boiled candies by capacitance based thermal analysis (CTA) and genetic algorithm (GA). *Journal of Food Engineering*, 193, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.08.010>.
- Tan, Y., Chen, L., Li, K., Lou, B., Liu, Y. and Liu, Z. (2022). Yeast as carrier for drug delivery and vaccine construction. *Journal of Controlled Release*, 346, 358–379.
- Tanrıverdi, Y., Çınar, C., Bilgin, K., Vural, D. G. ve Birinci, A. (2020). Kolistin Direncinin Saptanmasında Sıvı Mikrodilüsyon ve Otomatize Sistem Sonuçlarının Karşılaştırılması. *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10(3), Article 3.
- Tanzer, J. M., Livingston, J. and Thompson, A. M. (2001). The microbiology of primary dental caries in humans. *Journal of Dental Education*, 65(10), 1028–1037.
- Teong, S. P., Yi, G. and Zhang, Y. (2014). Hydroxymethylfurfural production from bioresources: Past, present and future. *Green Chemistry*, 16(4), 2015–2026.
- Thorn, R. M. S. and Greenman, J. (2012). Microbial volatile compounds in health and disease conditions. *Journal of Breath Research*, 6(2), 024001.
- Tireki, S. (2017). *Investigation of sensory and instrumental methods to predict shelf-life of jelly gums*. <https://open.metu.edu.tr/handle/11511/26538>.
- Tokur, O. ve Aksoy, A. (2017). In Vitro Sitotoksikite Testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1), 112–118. <https://doi.org/10.31196/huvfd.325794>.
- Topcuoglu, N., Ozan, F., Ozyurt, M. and Kulekci, G. (2019). In vitro antibacterial effects of glassionomer cement containing ethanolic extract of propolis on *Streptococcus mutans*. *European Journal of Dentistry*, 06, 428–433. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1698983>.
- Toreti, V. C., Sato, H. H., Pastore, G. M. and Park, Y. K. (2013). Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(1), 697390.

Trusheva, B., Trunkova, D. and Bankova, V. (2007). Different extraction methods of biologically active components from propolis: A preliminary study. *Chemistry Central Journal*, 1, 13. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-1-13>.

Tüfekci, H.B. ve Fenercioğlu, H. (2010). Türkiye’de Üretilen Bazı Ticari Meyve Sularının Kimyasal Özellikler Açısından Gıda Mevzuatına Uygunluğu. *Akademik Gıda*, 8(2), Article 2.

Turan, I., Demir, S., Misir, S., Kilinc, K., Mentese, A., Aliyazicioglu, Y. and Deger, O. (2015). Cytotoxic Effect of Turkish Propolis on Liver, Colon, Breast, Cervix and Prostate Cancer Cell Lines. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 14(5), Article 5.

Ugur, A. and Arslan, T. (2004). An In Vitro Study on Antimicrobial Activity of Propolis from Mugla Province of Turkey. *Journal of Medicinal Food*, 7(1), 90–94.

Ullah, A., Munir, S., Badshah, S. L., Khan, N., Ghani, L., Poulson, B. G., Emwas, A. H., and Jaremko, M. (2020). Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules*, 25(22), 5243. <https://doi.org/10.3390/molecules25225243>.

Ulusoy, E. (2012). Bal ve Apiterapi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 12(13), 89–97.

Ulusoy, Y. D. (2010). Pedodontide Güncel Koruyucu Yaklaşımlar. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2010(3), Article 3.

Ünal, M.H. (2021). *Yumuşak Jöle Tipi Şekerleme Üretiminde Farklı Prebiyotik Kaynaklarının Kullanımı*. [Yüksek Lisans Tezi, Necmettin Erbakan Üniversitesi].

Usman, U. Z., Abu Bakar, A. and Mohamed, M. (2016). *Phytochemical screening and comparison of antioxidant activity of water and ethanol extract propolis from malaysia*. 8, 413–415.

Utomo, B. S. B., Darmawan, M., Hakim, A. R. and Ardi, D. T. (2014). Physicochemical Properties And Sensory Evaluation Of Jelly Candy Made From Different Ratio Of K-Carrageenan And Konjac. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.15578/squalen.93>.

Uzel, A., Sorkun, K., Önçag, Ö., Coğulu, D., Gençay, Ö. and Salih, B. (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research*, 160(2), 189–195.

Vacca, A., Nativi, C., Cacciarini, M., Pergoli, R. and Roelens, S. (2004). A New Tripodal Receptor for Molecular Recognition of Monosaccharides. A Paradigm for Assessing Glycoside Binding Affinities and Selectivities by ¹H NMR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 126(50), 16456–16465.

Van’t Hof, W., Veerman, E. C. I., Nieuw Amerongen, A.V. and Ligtenberg, A. J. M. (2014). Antimicrobial defense systems in saliva. *Monographs in Oral Science*, 24, 40–51.

Varzakas, T., Labropoulos, A. and Anestis, S. (2012). *Sweeteners: Nutritional Aspects, Applications, and Production Technology*. CRC Press.

Vazquez-Revuelta, P. and Madrigal-Burgaleta, R. (2018). Death due to Live Bee Acupuncture Apitherapy. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, 28(1), 45–46. <https://doi.org/10.18176/jiaci.0202>.

Velikova, M., Bankova, V., Sorkun, K., Houcine, S., Tsvetkova, I. and Kujumgiev, A. (2000). Propolis from the Mediterranean Region: Chemical Composition and Antimicrobial Activity. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 55(9–10), 790–793.

Ventura, J., Alarcón-Aguilar, F., Roman-Ramos, R., Campos-Sepulveda, E., Reyes-Vega, M. L., Daniel Boone-Villa, V., Jasso-Villagómez, E. I. and Aguilar, C. N. (2013). Quality and antioxidant properties of a reduced-sugar pomegranate juice jelly with an aqueous extract of pomegranate peels. *Food Chemistry*, 136(1), 109–115.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J. and Pérez-Alvarez, J.A. (2008). Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science*, 73(9), R117–124. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00966.x>.

Volpi, N. (2004). Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, 25(12), 1872–1878.

Wagh, V. D. (2013). Propolis: A wonder bees product and its pharmacological potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2013, 308249.

Wasfi, R., Abd El-Rahman, O. A., Zafer, M. M. and Ashour, H. M. (2018). Probiotic *Lactobacillus* sp. Inhibit growth, biofilm formation and gene expression of caries-inducing *Streptococcus mutans*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(3), 1972–1983. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13496>.

Widyarman, A. S. and Theodorea, C. F. (2021). Novel Indigenous Probiotic *Lactobacillus reuteri* Strain Produces Anti-biofilm Reuterin against Pathogenic Periodontal Bacteria. *European Journal of Dentistry*, 16, 96–101.

Wiğckiewicz, W., Miernik, M., Wiğckiewicz, M. and Morawiec, T. (2013). Does Propolis Help to Maintain Oral Health? *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(1), 351062. <https://doi.org/10.1155/2013/351062>.

Wijayanti, R. (2017). *Quality of Kahwa's Leaves Hard Candy in Terms of Food Chemistry*.

Wilson, G. J., Talkington, D. F., Gruber, W., Edwards, K. and Dermody, T. S. (1995). Group A Streptococcal Necrotizing Fasciitis Following Varicella in Children: Case Reports and Review. *Clinical Infectious Diseases*, 20(5), 1333–1338.

Wilson, R. (2007). *Ingredients handbook sweeteners* (3rd ed). Leatherhead Pub. and Blackwell Publishing. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1130282270983588864>.

- Wojtyczka, R. D., Dziedzic, A., Idzik, D., Kępa, M., Kubina, R., Kabała-Dzik, A., Smoleń-Dzirba, J., Stojko, J., Sajewicz, M. and Wąsik, T. J. (2013). Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates to Propolis Extract Alone or in Combination with Antimicrobial Drugs. *Molecules*, 18(8), Article 8.
- Yabao, R. N., Duante, C. A., Velandria, F. V., Lucas, M., Kassu, A., Nakamori, M. and Yamamoto, S. (2005). Prevalence of dental caries and sugar consumption among 6-12-y-old schoolchildren in La Trinidad, Benguet, Philippines. *European Journal of Clinical Nutrition*, 59(12), 1429–1438. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602258>.
- Yang, Y., Zhang, X., Xu, M., Wu, X., Zhao, F. and Zhao, C. (2018). Quercetin attenuates collagen-induced arthritis by restoration of Th17/Treg balance and activation of Heme Oxygenase 1-mediated anti-inflammatory effect. *International Immunopharmacology*, 54, 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.11.013>.
- Yazdanian, M., Motallaei, M. N., Tahmasebi, E., Tebyaniyan, H., Alam, M., Abbasi, K., Seifalian, A., Ranjbar, R., Yazdanian, A., Hosseini, H. M. and Moghaddam, M. M. (2022). Chemical Characterization and Cytotoxic/Antibacterial Effects of Nine Iranian Propolis Extracts on Human Fibroblast Cells and Oral Bacteria. *BioMed Research International*, 2022, 6574997. <https://doi.org/10.1155/2022/6574997>
- Ye, W., Zhang, Y., He, M., Zhu, C. and Feng, X. P. (2019). Relationship of tongue coating microbiome on volatile sulfur compounds in healthy and halitosis adults. *Journal of Breath Research*, 14(1), 016005. <https://doi.org/10.1088/1752-7163/ab47b4>.
- Yılmaz, D. ve Altındış, M. (2018). Sağlık ve Hastalıkta Oral Kavite Mikrobiyotası. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 2(1), Article 1.
- Yılmaz, F. M., Yıldırım, E. ve Karakuş, M. (2019). Doğal Renk Maddesi Katkılı Sert Şekerleme Üretimi: Farklı Karbonhidrat Formülasyonlarının Renk, Camsı Geçiş, Higroskopite, Karbonhidrat Kompozisyonu Ve Duyusal Özellikler Üzerine Etkileri. *Gıda*, 44(2).
- Yoon, S. H., Jeong, H., Kwon, S. K. and Kim, J. F. (2009). Genomics, Biological Features, and Biotechnological Applications of *Escherichia coli* B: “Is B for better?!” In S. Y. Lee (Ed.), *Systems Biology and Biotechnology of Escherichia coli* (pp. 1–17). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9394-4_1.
- Yoshimasu, Y., Ikeda, T., Sakai, N., Yagi, A., Hirayama, S., Morinaga, Y., Furukawa, S. and Nakao, R. (2018). Rapid Bactericidal Action of Propolis against *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Dental Research*, 97(8), 928–936.
- Zeighampou, F., Mohammadi-Sichani, M., Shams, E. and Naghavi, N.S. (2014). Antibacterial Activity of Propolis Ethanol Extract against Antibiotic Resistance Bacteria Isolated from Burn Wound Infections. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 16(3), Article 3.

Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2).

Zhu, W., Liu, S., Zhuang, P., Liu, J., Wang, Y. and Lin, H. (2017). Characterization of acid-tolerance-associated small RNAs in clinical isolates of *Streptococcus mutans*: Potential biomarkers for caries prevention. *Molecular Medicine Reports*, 16(6), 9242–9250. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7751>.

Zulhendri, F., Chandrasekaran, K., Kowacz, M., Ravalia, M., Kripal, K., Fearnley, J. and Perera, C. O. (2021). Antiviral, Antibacterial, Antifungal, and Antiparasitic Properties of Propolis: A Review. *Foods*, 10(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/foods10061360>.



EKLER

	ARI VE DOĞAL ÜRÜNLER AR-GE VE ÜR-GE UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ	2024-004
DENEY RAPORU		
Numuneyi Gönderen / Adres	Rapor Yayınlanma Tarihi : 28.03.2024	
Numunenin	Zeynep DEMİRKAN / BİNGÖL Tel: 05374869099	
Cinsi	:	
Seri No / Parti No / Mühür No	:	
Üretici-Firma Adı / Kodu	:	
Marka	:	
Analiz Başlama ve Bitiş Tarihi	: 15.03.2024-27.03.2024	
Geliş Şekli ve Kabul Tarihi	: Elden/15.03.2024	
Yapılan Analizler	Sonuç/Ölçüm Belirsizliği ²	Ölçüm Limiti
HMF	14,538	
		Birim
		mgkg ⁻¹
		Analiz Metodu
		TS_13356

¹Bu analiz akreditasyon kapsamındadır.

²Ölçüm Belirsizliği, % 95 güven aralığında genişletilmiş belirsizlik (k=2) kullanılarak hesaplanmıştır.

Yapılan analiz sonucunda yukarıda belirtilen değerler tespit edilmiştir.

Bu analiz raporu adli-idari işlemlerde ve reklam amacıyla kullanılamaz. Yazılı iznimiz alınmadan raporlarımız çoğaltılamaz ve yayımlanamaz. İmzasız ve mühürsüz.