

**BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİKROENKAPSÜLE VE TAZE ARI SÜTÜNÜN ANTİMİKROBİYAL  
AKTİVİTELERİNİN KIYASLANMASI VE MUHAFAZA SÜRESİNİN  
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Neslihan ORDU**

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**KASIM 2019**



**BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİKROENKAPSÜLE VE TAZE ARI SÜTÜNÜN ANTİMİKROBİYAL  
AKTİVİTELERİNİN KIYASLANMASI VE MUHAFAZA SÜRESİNİN  
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Neslihan ORDU  
(161082704)**

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Aycan CINAR**

**KASIM 2019**

BTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 161082704 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Neslihan ORDU, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "MİKROENKAPSÜLE VE TAZE ARI SÜTÜNÜN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN KIYASLANMASI VE MUHAFAZA SÜRESİNİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Aycan CINAR** .....  
Bursa Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Rasim Alper ORAL** .....  
Bursa Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Sine ÖZMEN TOĞAY** .....  
Bursa Uludağ Üniversitesi

**Savunma Tarihi : 13.11.2019**

**FBE Müdürü : Doç. Dr. Murat ERTAŞ** .....  
Bursa Teknik Üniversitesi ...../...../.....

## İNTİHAL BEYANI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belgelediğimi, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Neslihan ORDU

İmzası

X

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince beni yönlendiren ve her konuda yardımcı olan, öneri ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Aycan CINAR'a,

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmama bilgi ve tecrübeleriyle katkı sağlayan Sayın Doç. Dr. Rasim Alper ORAL ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Neslihan DÜNDAR'a, laboratuvar çalışmaları sırasında yardımlarını esirgemeyen Araştırma Görevlisi Seda ALTUNTAŞ'a, arı sütü temininde yardımlarından dolayı CİVAN ARICILIK A.Ş' ye,

Bana maddi ve manevi olarak destek veren ve her daim yanımda olan aileme teşekkür ederim.

Kasım 2019

Neslihan ORDU

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖNSÖZ .....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
KISALTMALAR .....	vi
SEMBOLLER.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÖZET .....	x
SUMMARY.....	xii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR ÖZETİ .....</b>	<b>3</b>
2.1 Arı Sütü Hakkında Genel Bilgiler ve Önemi.....	3
2.2 Fiziksel ve Kimyasal Yapısı .....	4
2.3 Üretim Aşamaları .....	6
2.4 Ticari şekilleri .....	6
2.5 Muhafaza ve Saklama Koşulları .....	8
2.5.1 Mikroenkapsülasyon.....	8
2.6 Biyolojik Özellikleri ve Sağlık Üzerine Etkileri.....	10
2.6.1 Arı sütünün antimikrobiyal aktivitesi .....	13
2.6.1.1 Depolama koşullarının antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi .....	18
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEMLER .....</b>	<b>20</b>
3.1 Materyal.....	20
3.1.1 Arı sütü .....	20
3.1.1.1 Taze arı sütü .....	20
3.1.1.2 Mikroenkapsüle arı sütü.....	20
3.1.2 Mikroorganizmalar .....	21
3.2 Yöntemler .....	21
3.2.1 Mikroenkapsüle arı sütünün ön hazırlığı .....	21
3.2.2 Arı sütü konsantrasyonları ve inokulumların hazırlanması .....	21
3.2.3 Agar kuyucuk difüzyon yöntemi.....	22
3.2.4 Sıvı mikrodilüsyon yöntemi.....	22
3.2.5 İstatistiksel analizler.....	23
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>24</b>
4.1 Taze ve Mikroenkapsüle Arı Sütünün Başlangıç (0. Gün) ve Farklı Depolama Sürelerindeki Antibakteriyel Aktivitesinin Değerlendirilmesi .....	24
4.2 Taze ve Mikroenkapsüle Arı Sütünün Başlangıç (0. Gün) ve Farklı Depolama Sürelerindeki Antifungal Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	29
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>34</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>37</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>49</b>

## KISALTMALAR

<b>10-HDA</b>	: 10 hidroksi-2 dekonik asit
<b>ADP</b>	: Adenosine diphosphate
<b>AMP</b>	: 2-amino-2- metil-1- propanol
<b>ATCC</b>	: American Type Culture Collection
<b>ATP</b>	: Adenosine triphosphate
<b>CLSI</b>	: Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik asit
<b>DPPH</b>	: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
<b>EUCAST</b>	: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
<b>MAS</b>	: Mikroenkapsüle Arı Sütü
<b>MBK</b>	: Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
<b>MFK</b>	: Minimum Fungisidal Konsantrasyon
<b>MHB</b>	: Mueller Hinton Broth
<b>MİK</b>	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyon
<b>MRJP</b>	: Major Royal Jelly Proteins
<b>MRSA</b>	: Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>NCCLS</b>	: National Committee for Clinical Laboratory Standards
<b>PI</b>	: Percent Inhibition
<b>SDB</b>	: Sabouraud Dekstroz Broth
<b>TAS</b>	: Taze Arı Sütü
<b>TSE</b>	: Türk Standartları Enstitüsü



## SEMBOLLER

<b>°C</b>	: Derece santigrat
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>µM</b>	: Mikromolar
<b>cm<sup>3</sup></b>	: Santimetre küp
<b>g</b>	: Gram
<b>kob</b>	: Koloni oluşturan birim
<b>mg</b>	: Miligram
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>nm</b>	: Dalga boyu
<b>pH</b>	: Asitlik
<b>v</b>	: Hacim
<b>w</b>	: Ağırlık

## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

<b>Çizelge 2.1</b> : Taze ve liyofilize arı sütü kompozisyonu.....	<b>5</b>
<b>Çizelge 2.2</b> : Arı sütünün biyolojik yararlılığına ilişkin literatür çalışmaları .....	<b>12</b>
<b>Çizelge 3.1</b> : Test mikroorganizmaları. ....	<b>21</b>
<b>Çizelge 3.2</b> : Kuyucuk difüzyon yönteminde kullanılan arı sütü konsantrasyonları..	<b>22</b>
<b>Çizelge 3.3</b> : Sıvı mikrodilüsyon yönteminde kullanılan arı sütü konsantrasyonları..	<b>23</b>
<b>Çizelge 3.3</b> : Sıvı mikrodilüsyon yönteminde kullanılan arı sütü konsantrasyonları..	<b>23</b>
<b>Çizelge 4.1</b> : Taze ve mikroenkapsüle arı sütünün farklı depolama sürelerinde test bakterileri üzerinde belirlenmiş MİK/MBK değerleri (mg/mL).....	<b>25</b>
<b>Çizelge 4.2</b> : Taze arı sütünün farklı depolama sürelerinde test bakterileri üzerinde belirlenmiş zon çapları (mm).....	<b>26</b>
<b>Çizelge 4.3</b> : Mikroenkapsüle arı sütünün farklı depolama sürelerinde test bakterileri üzerinde belirlenmiş zon çapları (mm).....	<b>26</b>
<b>Çizelge 4.4</b> : Taze ve mikroenkapsüle arı sütünün farklı depolama sürelerinde test maya ve küfleri üzerinde belirlenmiş MİK/MFK değerleri (mg/mL).....	<b>30</b>
<b>Çizelge 4.5</b> : Taze arı sütünün farklı depolama sürelerinde test küfleri üzerinde belirlenmiş zon çapları (mm).....	<b>32</b>
<b>Çizelge 4.6</b> : Mikroenkapsüle arı sütünün farklı depolama sürelerinde test küfleri üzerinde belirlenmiş zon çapları (mm).....	<b>32</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 : Arılarda kast polifenizmi .....	3
Şekil 2.2 : Arı sütü.....	4
Şekil 2.3 : Arı sütü üretim aşamaları .....	6
Şekil 2.4 : Piyasada bulunan ticari arı sütleri.....	7
Şekil 2.5 : Mikro kapsül tipleri .....	9
Şekil 3.1 : Mikroenkapsüle arı sütü ve mikroskop görüntüsü (8x).....	20
Şekil 4.1 : Taze arı sütünün (1.ay) 500 mg/mL'lik konsantrasyonun test bakterileri üzerinde belirlenmiş inhibisyon zon çapları (mm) .....	27
Şekil 4.2 : Taze arı sütünün depolama sürecinde test bakterilerine ait MİK değişimleri. ....	28
Şekil 4.3 : Mikroenkapsüle arı sütünün depolama sürecinde test bakterilerine ait MİK değişimleri.....	28
Şekil 4.4 : Taze arı sütünün (1.ay) 500 mg/mL'lik konsantrasyonun test küfleri üzerinde belirlenmiş inhibisyon zon çapları (mm) .....	31
Şekil 4.5 : Taze arı sütünün depolama sürecinde test maya ve küflerine ait MİK değişimleri. ....	33
Şekil 4.6 : Mikroenkapsüle arı sütünün depolama sürecinde test maya ve küflerine ait MİK değişimleri.....	33

# MİKROENKAPSÜLE VE TAZE ARI SÜTÜNÜN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN KIYASLANMASI VE MUHAFAZA SÜRESİNİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

## ÖZET

Arı sütü, genç larva döneminde yavru arıların ve kraliçe arının beslenmesinde kullanılan biyoaktif bileşenler yönünden zengin bir gıdadır. Antimikrobiyal, antioksidan, antitümör, immünomodülatör özelliklerinin yanısıra antidiyabetik, antihiperkolesterolemik, hipotansif ve anti-inflamatuar etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

İnsan beslenmesi ve sağlığı için oldukça önemli olan arı sütünün, sezonluk bir ürün olması ve hassas yapısı nedeniyle hasat edilir edilmez soğuk zincir koşullarında taşınması ve depolanması oldukça önemlidir. Genellikle, taze olarak satışa sunulacak ise +4°C’de, uzun dönem depolanacaksa -18°C’de muhafaza edilmektedir. Taşıma ve depolamada soğuk zincirin kırılması ile üründe biyolojik aktivite ve kalite kayıpları meydana gelmektedir.

Son yıllarda, sezon dışı dönemde tüketiciye ürün temin etmede kolaylık sağlaması ve ürünün soğuk zincir gerektirmemesi sebebiyle liyofilizasyon (dondurarak kurutma) yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla piyasada dondurularak-kurutulmuş (liyofilize) toz, tablet ve kapsül arı sütü formları bulunmaktadır.

Mikroenkapsüle arı sütü bugüne dek uygulanmamış bir ürün olup, soğuk zincir zorunluluğunu ortadan kaldırması, daha düşük maliyet ve üretim kolaylığı sağlamasıyla liyofilize ürüne alternatif olarak geliştirilmiştir. Bu çalışmada, mikroenkapsülasyon metodunun arı sütünün biyolojik özelliklerinden biri olan antimikrobiyal aktivitedeki etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, taze (TAS) ve mikroenkapsüle arı sütü (MAS) antimikrobiyal aktiviteleri açısından kıyaslanmış ve bu iki ürünün 1, 3 ve 6. ay depolama sonundaki antimikrobiyal etkileri değerlendirilmiştir. Antimikrobiyal aktivite belirlemede patojen bakterilerden; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Enteritidis, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 kullanılmış, test maya ve küfleri olarak *Candida albicans* ATCC 10351, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Penicillium digitatum*, *Aspergillus flavus* seçilmiştir. Sıvı mikrodilüsyon ve agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivite belirlenmiştir.

Taze ve mikroenkapsüle arı sütüne ait antimikrobiyal aktivitenin, çalışmada yer alan test mikroorganizmaları üzerinde konsantrasyona bağlı olarak artış gösterdiği saptanmıştır. TAS ve MAS’ın bakteriler üzerindeki Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerleri sırasıyla 15,6 - 31,25 mg/mL ve 15,6 -125 mg/mL olarak belirlenmiştir. Kuyucuk difüzyon yönteminde ölçülen zon çaplarına göre *S.epidermidis* duyarlı, *M. luteus* orta derece duyarlı iken; *E. coli* ve *S. Enteritidis*’in TAS ve MAS’a karşı dirençli olduğu görülmüştür.

Taze arı sütü uygulaması test mayaları üzerinde 15,6 mg/mL’lik MİK değerine sahipken mikroenkapsüle arı sütü 62,5 mg/mL’de inhibisyon sağlamıştır. Ayrıca her

iki ürün uygulamasında (TAS/MAS) *C. parapsilosis*'in *C. albicans*'a kıyasla dirençli olduğu tespit edilmiştir. TAS'ın *A. flavus* ve *P. digitatum* üzerindeki etkinliği benzer olmakla birlikte, MAS *P. digitatum* üzerinde daha yüksek MİK değerine sahiptir.

Depolama süresince, TAS ve MAS'ın çalışmada yer alan *Staphylococcus epidermidis* haricindeki tüm bakteri ve mayalar üzerindeki MİK değerlerinde 6 ay süreyle değişime rastlanmamıştır. Test edilen küfler üzerinde TAS ve MAS'a ait MİK değerlerinin 3. ayda arttığı görülmüştür.

TAS ve MAS'ın bakteriler ve küfler üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p < 0,05$ ). Takip eden aylar içerisinde inhibisyon zonlarındaki değişimin, mikroorganizma ve uygulanan konsantrasyonlara göre farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar enkapsülasyon işlemi sonrası arı sütünün antimikrobiyal aktivitesinin korunduğu ve oda sıcaklığında saklanan üründe etkinliğin devam ettiği yönündedir. Bu çalışma sonuçları mikroenkapsüle arı sütünün biyolojik özellikleri hakkında yapılacak diğer araştırmalara ışık tutacaktır. Ayrıca mikroenkapsüle arı sütünde farklı formülasyonlar ile ürünün fonksiyonel gıda olarak değerlendirilebileceği ve gelecek çalışmaların bu ürünlerin tüm özelliklerinin belirlenmesi yönünde planlanması gerektiği düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Arı sütü, Mikroenkapsülasyon, Antibakteriyal, Antifungal, Depolama.

# COMPARISON OF ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF MICROENCAPSULE AND FRESH ROYAL JELLY, AND DETERMINATION OF EFFICACY OF STORAGE PERIODS ON ANTIMICROBIAL ACTIVITY

## SUMMARY

Royal jelly (RJ) is a secretion of the hypopharyngeal and mandibular glands of young worker bees for the nutrition of larvae and the queen bee. Besides being a nutritional product for bees and also humans, it is rich in bioactive components. Due to these components, RJ exhibits different biological properties including antimicrobial, antioxidant, antitumor, immunomodulatory effect as well as antidiabetic, antihypercholesterolemic, hypotensive and antiinflammatory properties.

RJ, which contains valuable ingredients for human nutrition and health, is very sensitive and affected by the improper production and storage conditions. As a result of being a seasonal product and its perishable structure, it should be taken to cold chain as soon as it is harvested, and stored at +4°C for short-term or at -18°C to preserve more.

Lyophilization is the most common method because of elimination of cold chain necessity at the storage period. The microencapsulation method, which has not been tried in royal jelly until today, is thought to be an alternative to lyophilization by being a simple and low cost production method. For this purpose, the antimicrobial activities of fresh and microencapsulated royal jelly were compared and antimicrobial effects of these two products were investigated at 1, 3 and 6 months in the storage period. The microorganisms used in the study were four pathogen bacteria; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Enteritidis, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 and, four species of fungi *Candida albicans* ATCC 10351, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Penicillium digitatum*, *Aspergillus flavus*. Antimicrobial activity was determined by broth microdilution and agar well diffusion method.

Antimicrobial activity of fresh and microencapsulated royal jelly was increased depends on the concentration increase. The MIC against test bacteria was about 15,6 - 31,25 mg/mL for fresh RJ, while 15,6- 125 mg/mL for microencapsulate royal jelly. According to zone diameters; *S. epidermidis* was most sensitive and *M. luteus* was moderately sensitive, *E. coli* and *S. Enteritidis* were found to be resistant to fresh and microencapsulated royal jelly.

Fresh royal jelly had a MIC of 15.6 mg/mL on yeasts and microencapsulated royal jelly inhibited the growth at 62.5 mg/mL. When the MIC and MFC values were compared, *C. parapsilosis* was found to be resistant than *C. albicans*. Although fresh RJ had similar efficacy on *A. flavus* and *P. digitatum*, microencapsulated royal jelly had a higher MIC value on *P. digitatum*.

During storage, no change observed in the MICs of fresh and microencapsulated RJ for 6 months on *M. luteus*, *E. coli*, *S. Enteritidis* and yeasts. For the tested molds, the MIC values of samples were increased in the third month.

There was no statistically significant difference between the inhibition zones of fresh and microencapsule RJ on bacteria and molds ( $p < 0.05$ ). In the following months, it was determined that the change in inhibition zones differed according to microorganism and applied concentrations.

The results indicated that the antimicrobial activity is maintained after the encapsulation process and while stored at room temperature.

In conclusion, it is thought that the data obtained in this study will contribute to the other studies and researches about biological activity of royal jelly and changes on it in the storage period. With improving microencapsulated formulations, it will be possible to maintain biological properties of RJ for longer periods and be considered as functional food.

**Keywords:** Royal Jelly, Microencapsulation, Antibacterial, Antifungal, Storage

## 1. GİRİŞ

Dünyada sağlıklı yaşama karşı duyulan ilgi, beslenmenin yanı sıra takviye gıdalar olarak metabolizma faaliyetlerini iyileştirmek, hastalıklara karşı korunmak ve tedavide doğal yöntemlerin kullanımıyla kendini göstermektedir. Antik çağlardan beri kullanılan ve apiterapi ürünlerinden biri olan arı sütü son yıllarda bu ilgiden payını almaktadır.

Arı sütü, beş ila on beş günlük işçi arıların baş kısmındaki alt çene ve boğaz bezleri tarafından salgılanan, genç larva dönemindeki yavru arıların ve kraliçe arının beslenmesinde kullanılan krem kıvamında, sarı-beyaz, keskin kokulu ve besleyici bir üründür (Lercker ve diğ, 1982). Ülkemizde arı sütü olarak adlandırılmasına rağmen, dünya genelinde kraliyet jölesi anlamına gelen “Royal Jelly” olarak bilinmektedir.

Arı sütü, besleyici özelliğinin yanısıra içeriğinde bulunan proteinler, kendine özgü yağ asitleri ve diğer minör bileşenleri sayesinde biyolojik yararlılığı yüksek ürünlerden biridir (Xue ve diğ, 2017). İçerdiği antioksidanlar sayesinde antitümör, immünomodülatör ve anti alerjik özellik gösterdiği, antimikrobiyal ve anti-enflamatuar olduğu, kan basıncı ve kolesterolü düzenleyerek kardiyovasküler sistem üzerinde olumlu etkiler oluşturduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Pavel ve diğ, 2011; Viuda-Martos ve diğ, 2017)

Dünya arı sütü üretiminde % 90'a yakın üretim payıyla Çin birinci sırada gelmektedir ve bunu Kore, Tayvan gibi Asya ülkeleri izlemektedir (Clarke ve McDonald, 2017). Ülkemizde arı sütü üretimi çoğunlukla Ege ve Marmara bölgesinde yapılmaktadır, en fazla üretim yapılan ilimiz Bursadır (Anonim, 2017). Arıcılığın yaygın olduğu ülkemizde bu faaliyet yüzyıllardır özenle yapılmasına rağmen ürünün ticarileştirilmesinde ve pazarlamasındaki eksiklikler piyasaya ithal ürünlerin hakim olmasına neden olmuştur.

Arı sütü pazarda farklı şekillerde bulunmaktadır. Dondurulmuş ve dondurularak kurutulmuş (liyofilize) arı sütü piyasada yaygın olarak kullanılmakta, ayrıca toz ve tablet formları tüketiciye sunulmaktadır. Dondurulmuş arı sütünün (-18°C'de)



buzdolabı koşullarında (+4°C) saklanan ürüne kıyasla uzun raf ömrüne sahip olduğu görülmüş ve dondurma yönteminin arı sütünün kalite ve tazeliğinin korunmasında daha etkin olduğu belirtilmiştir (Kumova ve Korkmaz, 2000). Dondurulmuş ürünlerin üreticiden tüketiciye ulaşma sürecinde soğuk zincirin kırılma riski olduğu bilinmektedir. Soğuk zincir gerekliliğini ortadan kaldırmak ve piyasada ürün çeşitliliği sağlamak adına, arı sütü diğer arıcılık ürünleri ve gıda maddeleri ile karıştırılarak farklı formülasyonlar geliştirilmiştir (Karaali ve diğ, 1988; Kumova ve Korkmaz, 2000). Dondurularak kurutulmuş arı sütlerinin toz, tablet ve kapsül formları bulunmaktadır. Bu ürünlerin besleyiciliği ve biyolojik özelliklerindeki kayıp kabul edilebilir düzeyde olmakla birlikte, tesis kurulumu ve işletimi için geniş çaplı yatırımlar gerektiği ifade edilmiştir (Sabatini ve diğ, 2009; Bogdanov, 2012). Üretim maliyetlerinin daha düşük olması ve proses kolaylığı sebebiyle liyofilize arı sütüne alternatif olarak mikroenkapsüle arı sütü üretimi önerilmektedir.

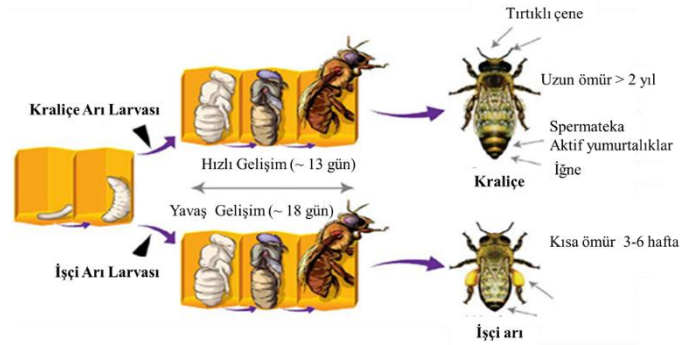
Mikroenkapsülasyon aktif bir maddenin çevresinin bir veya daha fazla kaplama maddesi ile sarılıp kaplanmasını sağlayan bir teknolojidir. Gıda sektöründe genellikle ürünlerin fonksiyonel özelliklerini geliştirmek ve raf ömürlerini artırmak amacıyla kullanılmaktadır (Koç ve diğ, 2010).

Mikroenkapsüle arı sütünün antimikrobiyal etkinliğine ilişkin literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada taze ve mikroenkapsüle edilmiş arı sütleri, antimikrobiyal aktiviteleri açısından kıyaslanmış ve bu iki farklı arı sütü tüketim şeklinin 1, 3 ve 6. ay sonundaki antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. Taze arı sütünün antimikrobiyal aktivitesi incelenerek literatüre katkıda bulunulmasının yanı sıra, arı sütünün farklı bir teknolojik yöntem ile işlendikten sonraki etkinliği ve depolama sürecinde antimikrobiyal aktivitesindeki değişim belirlenmiştir. Farklı muhafaza yöntemleri ve depolama süresinin antimikrobiyal aktiviteye etkisinin tespit edilmesinin, piyasada bulunan ürünlerin biyolojik özellikleri hakkında fikir sahibi olunmasına yardımcı olacağı düşünülmektedir.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1 Arı Sütü Hakkında Genel Bilgiler ve Önemi

Arı sütü, genç larva dönemindeki yavru arıların ve kraliçe arının beslenmesinde kullanılan biyoaktif bileşenler yönünden zengin bir gıdadır (Lercker ve diğ, 1981). Koloniyi oluşturan ana arı, işçi arı ve erkek arının larval dönemde aldıkları arı sütü içeriklerinin farklı olduğu bilinmektedir (Rembold ve Dietz, 1966). Ana arının bu besleme şekli sonucunda 4-5 yıllık yaşam süresine ve yumurtalama yetisine sahip olduğu, hastalık ve zararlılara karşı yüksek direnç gösterdiği ifade edilmiştir (Köseoğlu ve diğ, 2013). Arı sütünün kraliçe arı üzerinde yarattığı bu fizyolojik değişimlerin ürünün bileşiminden kaynaklandığı düşünülmektedir (Wang ve diğ, 2016). Bu nedenle ticari anlamda üretilen ve pazarlanan ürünler, ana arı üretimi için işçi arılar tarafından salgılanan arı sütünden elde edilmektedir. Şekil 2.1’de arı sütü ile beslenme sonucu gerçekleşen morfolojik değişimler gösterilmiştir.



Şekil 2.1: Arılarda kast polifenizmi (Cridge ve diğ, 2015).

Arı sütü; kendine özgü yağ asitleri, yoğun protein içeriği ve biyoaktif bileşenleri nedeniyle besleyici özelliğinin yanısıra çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmakta ve bağışıklığı desteklemektedir. Tedavi amaçlı kullanımı antik çağlara dayanmaktadır (Fratini ve diğ, 2016). Günümüzde arı sütü tüketimi ve bunun fizyolojik etkileri arasındaki sebep sonuç ilişkisi tam aydınlatılmamış olmakla birlikte, gıda ve nutrasötik endüstrisinde insan sağlığını geliştirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Son yıllarda takviye edici gıdalara ve doğal tedavi yöntemlerine karşı artan ilginin, arı sütü üretim ve tüketim miktarlarında artışa sebep olduğu ifade edilmektedir. Ticari arı sütü ve ürünleri hakkında uluslararası standartlar bulunmamasına rağmen, birçok ülkenin kendi standardına sahip olduğu bilinmektedir. Ülkemizde ise arı sütüne ilişkin TS 6666 no'lu standart yayımlanmıştır. Arı sütünün kompozisyonu, saflığı, tazeliği ve coğrafik kökeni hakkındaki verilerin güvenilirliğini sağlamak adına bu standardın genişletilmesi son derece önemlidir.

## 2.2 Fiziksel ve Kimyasal Yapısı

Arı sütü krem kıvamında, sarı-beyaz renklerde, kendine has keskin bir koku ve karakteristik ekşi tada sahip besleyici bir salgıdır (Şekil 2.2). Yoğunluğu yaklaşık olarak  $1.1 \text{ g/cm}^3$ 'tür ve suda kısmen çözünmektedir (Akyol, 2015). Işık ve ısıya karşı duyarlıdır, havayla okside olabilir. Uygun olmayan depolama koşullarında renk, viskozite, asitlik vb. fiziksel ve organoleptik özelliklerinde değişim görülmektedir (Takenaka ve diğ., 1986; Chen ve Chen, 1995; Baggio ve Dainese, 1998).



Şekil 2.2: Arı sütü (Korkmaz ve Öztürk, 2010).

Arı sütü bileşimi makro düzeyde nispeten sabit olmakla birlikte arıların türleri ve beslenmelerine, iklim ve mevsime, arı sütünün üretim ve hasat yöntemlerine bağlı olarak değişmektedir (Mureşan ve diğ., 2016). Beslenme açısından son derece önemli olduğu bilinen bu ürünün temel bileşenleri; proteinler, karbonhidratlar (şekerler) ve lipitlerdir (Takenaka ve Echigo, 1980). Arı sütünün kimyasal kompozisyonu incelendiğinde; nem içeriğinin % 60-70, toplam karbonhidrat oranının % 11-23, protein ve lipit miktarlarının sırasıyla % 9-18 ve % 4-8 arasında değiştiği ve % 0,8-3 oranlarında vitamin, mineraller ile tanımlanmamış bileşenlerden oluştuğu belirtilmiştir (Fratini ve diğ., 2016).

Mikroenkapsüle arı sütünün yeni geliştirilen bir ürün olması nedeniyle kimyasal kompozisyonuna veriler henüz yayınlanmamıştır. Taze ve liyofilize arı sütünün kimyasal bileşimi ise Çizelge 2.1’de verilmiştir.

**Çizelge 2.1 :** Taze ve liyofilize arı sütü kompozisyonu (Sabatini ve diğ, 2009).

Bileşen (%)	Taze	Liyofilize
Su	60-70	<5
Lipid	3-8	8-19
10-HDA	>1,4	>3,5
Protein	9-18	27-41
Fruktoz	3-13	-
Glukoz	4-8	-
Sükroz	0,5-2	-
Kül	0,8-3	2-5
pH	3-4	4-5

Arı sütünün lipit içeriği ve kendine özgü yağ asitleri, ürünün biyolojik yararlılığında önemli rol oynamaktadır (Lercker ve diğ, 1981; Melliou ve Chinou, 2005; Pavel ve diğ, 2011). Arı sütüne özgü bir serbest yağ asidi olan 10 hidroksi-2 dekanolik asit (10-HDA), biyolojik yararının yanı sıra saflık ve kalitenin belirlenmesinde kullanılan en önemli parametrelerden biridir (Genç ve Aslan, 1999; Garcia-Amoedo ve Almeida-Muradian, 2007; Mureşan ve diğ, 2016).

Arı sütünün içerdiği azotlu bileşikler detaylı incelendiğinde sekizi esansiyel olmak üzere toplam on yedi aminoasite rastlanmıştır (Howe, 1985). Kuru ağırlığının yaklaşık % 50’sinin protein olduğu ve bunun % 80’den fazlasının biyolojik yararlılığın atfedildiği “Temel Arı Sütü Proteinleri” (Major Royal Jelly Proteins, MRJP) olarak adlandırılan proteinler ve peptitlerden meydana geldiği bildirilmiştir (Xue ve diğ, 2017). Arı sütünde bulunan diğer önemli protein ve peptitler ise Royalisin, Apisimin, Apalbumin ve Jellin I,II,III,IV olarak tanımlanmıştır (Bărnuțiu ve diğ, 2011).

Arı sütünde ağırlıklı olarak B grubu vitaminler (Melampy ve Jones, 1939; Moreschi ve Almeida-Muradian, 2009) ile potasyum başta olmak üzere, sırasıyla Ca, Na, Mg, Zn, Fe, Cu ve Mn mineralleri bulunmaktadır (Stocker ve diğ, 2005; Sabatini ve diğ, 2009).

Arı sütü minör bileşenler yönünden oldukça zengindir. Bu bileşiklerden bazılarının heterosiklik maddeler, biopterin (25µg/g) ve neopterin (5µg/g), nükleotidler (adenosin, uridin, guanosin, iridin, sitidin), fosfatlar (AMP, ADP, ATP), asetilkolin ve glukonik asit olduğu bildirilmiştir (Korkmaz ve Öztürk, 2010).

### 2.3 Üretim Aşamaları

Arı sütü üretimi ve hasadı Nisan ayında başlayıp en geç Ağustos ayında tamamlanmaktadır. Kraliçe ve yavru arıların beslenmesinde kullanılan arı sütünün ticari olarak üretimi, mevcut kovaların çeşitli yöntemlerle desteklenmesi ve doğal sürece müdahale edilmesini gerektirmektedir. Bunun için arı sütü üretimini başlatmak amacıyla bir günlük arı larvaları yüksük adı verilen gözlere aktarılır. Yüksükler plastik olup, işlem öncesi bir miktar balmumu ile kaplanmaktadır. Larvalar transferden sonra kraliçe arı bulunan kovana yerleştirilir, böylece süt üretimi için gerekli popülasyon elde edilir. Transfer edilen larvaları içeren yüksüklerin kovadaki arılar tarafından yok edilmemesi için kraliçe arının larvalardan uzak tutulması gerekmektedir. Kovana sadece işçi arıların geçebileceği deliklere sahip seperatörler konularak, altta bulunan kraliçe arının yumurtlamaya devam etmesi ve üst katta kalan işçi arıların da gözleri sütle doldurmaları sağlanmaktadır. Transferden üç gün sonra arı sütü dolu yüksükler kovandan alınır. Üstleri balmumu ile kapatılmış olan yüksükler temizlenir, içlerindeki larvalar ayrılır ve arı sütü el değmeden vakum yardımıyla kapta toplanır. Arı sütü üretim aşamaları Şekil 2.3'te özetlenmiştir.



**Şekil 2.3:** Arı sütü üretim aşamaları (Korkmaz ve Öztürk, 2010; Bogdanov, 2012).

### 2.4 Ticari Şekilleri

Arı sütü takviye edici gıda olarak farklı şekillerde tüketilmektedir. İşlenmeden, taze (+4°C) ve dondurulmuş (-18°C) tüketiminin yanısıra diğer ürünlerle karıştırılarak oluşturulmuş formülasyonları, dondurularak-kurutulmuş toz, tablet ve kapsül formları bulunmaktadır (Şekil 2.4). Sağlıklı bir yetişkin için taze arı sütünün günlük tüketim

miktarı 100-250 mg olarak verilmiştir (Bogdanov, 2011). Ticari ürünler taze arı sütünün önerilen günlük tüketim miktarının yaş ağırlığına denk dozlarda hazırlanmaktadır.



Taze (+4°C)

Dondurulmuş

Diğer arıcılık ürünleri ile birlikte

Liyofilize, Toz

Liyofilize, Kapsül

**Şekil 2.4:** Piyasada bulunan ticari arı sütleri (Clarke ve McDonald, 2017).

Arı sütü gıda takviyesi olarak tüketiminin yanısıra ilaç benzeri ürün kategorisinde, özellikle kozmetik ürünlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. İlaç benzeri ürünler içerik olarak gıda takviyelerinden farklı olmamakla birlikte, üretim ve paketleme aşamalarında ileri teknoloji kullanımı ve özel sağlık problemlerinin çözümüne yönelik hedefleriyle gıda takviyelerinden ayrılmaktadır. Arı sütünün ilaç benzeri ürün olarak kullanımının herhangi bir bilimsel temele sahip olmadığı ve uzman hekim tarafından uygun bulunmadığı sürece tedaviye dahil edilemeyeceği unutulmamalıdır (Korkmaz ve Öztürk, 2010).

Günümüzde arı sütü yüz kremleri, göz kremleri, el losyonları, rujlar, fondötenler, ve şampuanlar dahil olmak üzere çok sayıda kozmetik ürünün bileşiminde yer almaktadır. Sahip olduğu antiinflamatuvar etki ve kolajen üretimini destekleyici özelliği, kozmetik ürünler üretiminde tercih edilmesine neden olmaktadır (Koya-Miyata ve diğ, 2004; Park ve diğ, 2011).

## 2.5 Muhafaza ve Saklama Koşulları

İnsan beslenmesi ve sağlığı için değerli bileşenler içeren arı sütü dayanıksız bir yapıya sahip olup, üretim ve muhafaza koşullarındaki uygunsuzluklara karşı oldukça hassastır. Hasat tarihinden itibaren buzdolabı koşullarında 6 ay süreyle, -18°C’de 18 ay süreyle saklanabileceği yönünde görüşler bulunmaktadır (Korkmaz ve Akyol, 2015).

Takenaka ve diğ. (1986) tarafından yapılan bir çalışmada arı sütü -40°C, +5°C ve oda sıcaklığında saklandığında, sıcaklık ve depolama süresinin artışıyla renkte koyulaşma, viskozitede ve asitlikte artış tespit edildiği bildirilmiştir. Arı sütünün antimikrobiyal aktivitesini oluşturduğu düşünülen bileşenlerden Temel Arı Sütü Proteinlerinin oda sıcaklığında otuz gün içinde hidrolize olmaya başlaması ve yetmiş beş günde tamamen yok olması ile protein içeriğinin sıcaklıktaki değişimlerden etkilendiği ifade edilmiştir (Li ve diğ, 2007, 2008; Zhao ve diğ, 2013).

Farklı sıcaklıklarda altı ay saklanan arı sütlerinde, glukozoksidaz enziminin -20°C’de aktifken, +4°C ve oda sıcaklığında saklanan örneklerde tespit edilemediği bildirilmiştir (Zhao ve diğ, 2013). Arı sütünün uzun süreli depolamada asitidesinin, protein içeriğinin, serbest aminoasitlerinin, glukozoksidaz ve diğer benzer bileşenlerinin azalması ile biyolojik aktivitenin depolama koşullarından etkilendiği gösterilmiştir (Kumova ve diğ, 2000).

Depolama sürecinde üründe gerçekleşen değişimlerin en aza indirilmesi için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Dondurma ve soğuk zincirde muhafaza en yaygın yöntemlerden biri olup, soğuk zincir kırılması riskini barındırmaktadır. Bu sebeple birçok ticari üründe liyofilize arı sütü tercih edilmektedir. Liyofilize arı sütünün yüksek üretim maliyeti ve muhafazasında yaşanan zorluklar nedeniyle, mikroenkapsüle arı sütünün liyofilize ürünlere alternatif olabileceği düşünülmektedir.

### 2.5.1 Mikroenkapsülasyon

Mikroenkapsülasyon aktif bir maddenin çevresinin bir veya daha fazla kaplama maddesi ile sarılıp kaplanmasını sağlayan bir teknolojidir (Koç ve diğ, 2010). Bu yöntem ilaç, kozmetik ve gıda gibi birçok sektörde yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda sektöründe genellikle, gıdaları ve gıdalar içinde bulunan biyoaktif bileşenleri yine gıda saflığında kaplama materyalleri ile kaplayarak bu ürünlerin fonksiyonel

özelliklerini geliştirmek ve raf ömürlerini artırmak amaçlanmaktadır. Ayrıca oral kontrollü salım sistemlerinin geliştirilmesinde kullanılan bu yöntem, mikroenkapsüle edilen aktif bileşenlerin gastrointestinal sistemin hedeflenen bölgelerinde yapının açılmasıyla aktif bileşenin salınması sağlamaktadır (Singh ve diğ, 2010).

Mikroenkapsülasyon yöntemi ile enzimler, vitamin ve mineraller, yağlar, esansiyel amino asitler gibi besin öğeleri yanısıra mikroorganizmalar, renklendiriciler, tat ve aroma bileşenleri kaplanmaktadır (Jackson ve Lee, 1991). Bu yöntem ile kaplanan materyalin sahip olduğu özelliklerin korunması amaçlanmaktadır. Doğal fenolik bileşenlerden olan karvakrol'un mikroenkapsülasyonu sonrasında antimikrobiyal aktivitesinin ve antioksidan kapasitesinin incelendiği bir çalışmada, mikroenkapsülasyon sonucunda antimikrobiyal (MİK=0.25mg/mL) ve antioksidan aktivitede (DPPH yüzde inhibisyonu (PI)=% 89.96) önemli bir değişiklik görülmediği belirtilmiştir. Karvakrol mikrokapsül ürününün gıda ve nutrasötik işleme endüstrilerinde kontrollü salıma sahip potansiyel bir ajan olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir (Sun ve diğ, 2019).

Mikroenkapsüllerin üretim biçimi, morfolojileri ve kullanılan kaplama materyalleri kapsülden istenen faydanın sağlanmasında önemli parametrelerdir. Mikro kapsülleme teknikleri püskürtmeli kurutma, püskürtmeli dondurma, akışkan yatakta kaplama, ekstrüzyon, koaservasyon, lipozom dağıtma, ve dondurarak kurutma ve kokristalizasyondur (Gouin, 2004). Mikroenkapsüllerin çapları 1-1000 mikrometre arasında değişmektedir.

Çekirdekte yer alan biyoaktif bileşenin bir membran tarafından sarıldığı "Kabuk Tipi" ve biyoaktif bileşenin kaplama materyalinin matrisine dağıtıldığı "Matriks Tipi" olmak üzere iki yaygın biçimi bulunmaktadır (Dias ve diğ, 2015). Çalışmamızda matriks tipi mikroenkapsüller kullanılmıştır (Şekil 2.5).



**Şekil 2.5:** Mikrokapsül tipleri (Krishna Sailaja ve Jyothika, 2014).



Kaplama materyali olarak nişasta ve selüloz türevleri, gamlar, bitkisel ve hayvansal ekstratlar, çeşitli protein ve lipitler kullanılmaktadır (2015 El-Abbasi ve diğ, 2015). Son yıllarda mikroenkapsülasyon uygulamalarında aljinat ve türevlerinin tercih edildiği görülmektedir. Aljinatın biyolojik olarak geri dönüşümlü, biyo-uyumlu ve ucuz olması, bağırsaklarda tamamen çözünebilir olması kaplama materyali olarak kullanım kolaylığı sağlamaktadır (Gökbulut ve Öztürk, 2018). Kaplama materyallerinin gastrointestinal koşullara dayanıklılıkları açısından değerlendirildiği bir çalışmada probiyotiklerin mikroenkapsülasyonunda en uygun kombinasyonun % 1 peptit ve % 3 fruktooligosakkarit ile karıştırılmış olan %3'lük sodyum aljinat olduğu bulunmuştur (Gökmen ve diğ, 2012).

Arı sütünün mikroenkapsülasyonuna ilişkin literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Propolisin mikroenkapsülasyonu ve bunun antioksidan kapasite ile antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Mikroenkapsüle propolis ile yapılan bir çalışmada fenolik madde kaybının kabul edilebilir düzeyde olduğu belirtilmiştir (Silva ve diğ, 2009). Yapılan bir başka çalışmada, kırmızı propolis etanol ekstraktının mikroenkapsülasyonu sonucunda fenolik ve toplam flavonoid içeriğinin kalitesi ve miktarında önemli bir değişiklik olmadığı ve bu çalışmada kullanılan biyopolimer karışımının, bileşiklerin bütünlüğünü ve antioksidan potansiyelini koruduğu gösterilmiştir (Do Nascimento ve diğ, 2019). Mikroenkapsüle arı sütünün antimikrobiyal aktivitesinin *Streptococcus mutans* üzerinde, işlenmemiş propolise göre on kat düşük konsantrasyonda benzer etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Durán ve diğ, 2007).

## **2.6 Biyolojik özellikleri ve sağlık üzerine etkileri**

Arı sütü antik çağlardan günümüze kadar birçok geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamasında kullanılmıştır. Biyolojik özelliklerinin keşfedilmesi ve bunların sağlık üzerine olumlu etkilerinin yapılan çalışmalarla desteklenmesi ile bilinirliği ve tüketimi son yıllarda artmıştır. Sağlıklı yaşam ve koruyucu tıp kavramlarının benimsendiği günümüzde arı sütünün biyolojik faydaları ve sağlık üzerine etkileri konulu çalışmalar hız kazanmıştır.

Arı sütünün içerdiği kısa zincirli serbest yağ asitlerinin antimikrobiyal, antitümör özellik gösterdiği ve bağışıklık sistemi üzerinde olumlu etkisi bulunduğu belirtilmiştir (Fratini ve diğ, 2016; Zhang ve diğ, 2017). Antioksidan etkisiyle oksidatif stresi azalttığı, *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalarda DNA hasarının önlenmesine yardımcı olduğu ifade edilmiştir (Inoue ve diğ, 2003; Teixeira ve diğ, 2017; Almeer ve diğ, 2018). Arı sütünün sinir kök hücrelerinin farklılaşmasını uyararak beyin hücreleri oluşumunu ve içeriğinde bulunan 10-hidroksi-trans-2-dekanoik asit ile nöron üretimini desteklediği bilinmektedir (Hattori ve diğ, 2007; 2011). Yapısındaki insülin benzeri peptitler sayesinde kan şekeri seviyesini düşürücü etki gösterdiği, içeriğinde bulunan proteinlerin kolesterol ve trigliseritlerin kan plazma düzeylerini azalttığını ve böylece damar sertleşmesini önleyerek kardiyovasküler sistemin sağlıklı çalışmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Guo ve diğ, 2008; Münstedt ve diğ, 2009; Yoshida ve diğ, 2016; Chiu ve diğ, 2017).

Arı sütünün açık yaraların tedavisinde inflamasyon bölgesindeki sıvı birikimini azaltarak yaranın iyileşme kapasitesini arttırdığı, kolajen ve benzeri doku yenileyici yapıların oluşumunu destekleyerek yaraların daha hızlı kapanmasını sağladığı ifade edilmiştir (Taniguchi ve diğ, 2003; Park ve diğ, 2011). Kadınlarda hormonal denge ile doğurganlığın, erkeklerde sperm kalitesinin artırılmasında etkili olduğu bildirilmiştir (Ahmed ve diğ, 2108; Ghanbari ve diğ, 2018). Arı sütünün biyolojik özellikleri Çizelge 2.2’de ilgili referanslar ile birlikte özetlenmiştir.

**Çizelge 2.2 :** Arı sütünün biyolojik yararlılığına ilişkin literatür çalışmaları.

Biyolojik Etki	Hücre/Sistem	Referanslar
Anti-hipertansif, Hipotansif etki	Kardiyovasküler	Matsui ve diğ, 2002 Tokunaga ve diğ, 2004 Takaki-Doi ve diğ, 2009 Feng ve diğ, 2015 Fan ve diğ, 2016
Kolestrol düşürücü etki	Kardiyovasküler	Cho, 1977 Vitteck,1995 Kashima ve diğ, 2014 Chiu ve diğ, 2017 Pan ve diğ, 2018 Hadi ve diğ, 2018
Anti-diyabetik etki	Endokrin	O’Connor ve Baxter, 1985 Nomura ve diğ, 2007 Münstedt ve diğ, 2009 Pourmoradian ve diğ, 2014 Yoneshiro ve diğ, 2018

**Çizelge 2.2 (devam):** Arı sütünün biyolojik yararlılığına ilişkin literatür çalışmaları.

Biyolojik Etki	Hücre/Sistem	Referanslar
Nörotropik	Beyin/Sinir	Hashimoo ve diğ, 2005 Hattori ve diğ, 2007 Hattori ve diğ, 2011 Zamani ve diğ, 2012 Mohamed ve diğ, 2015
Biyostimülatör	Sinir Sistemi	Fossati, 1972 Balch ve Balch, 2000 Kamakura ve diğ, 2001 Seven ve diğ, 2014
Otoimmünsistem	Genel	Kurkue ve diğ, 2000 Okamoto ve diğ, 2003 Gasic ve diğ, 2007 Vucevic ve diğ, 2007 Dzopalic ve diğ, 2011
Antiinflamatuvar etki	Genel	Abdelatif ve diğ, 2008 Karaca ve diğ, 2010 Barnutiu ve diğ, 2011 Aslan ve Aksoy, 2015 Arzi ve diğ, 2015 Wan ve Wang, 2018 You ve diğ, 2018 Chen ve diğ, 2018
Antitümör- antikanser etki	Genel	Nakaya ve diğ, 2007 Kimura, 2008 Shirzad ve diğ, 2013 Galaly ve diğ, 2014 Zhang ve diğ, 2017 Wang, 2017
Üremeyi destekleyici etki	Endokrin	Guo ve diğ, 2008 Ahmadnia ve diğ, 2015 Shahzad ve diğ, 2016 Ghanbari ve diğ, 2018 Azad ve diğ, 2018 Amirshahi ve diğ, 2014 Veshkini ve diğ, 2018
Antioksidan etki	Genel	Nagai ve diğ, 2006 Liu ve diğ, 2008 Guo ve diğ, 2009 Çavuşoğlu ve diğ, 2009 Kanbur ve diğ, 2009 Silici ve diğ, 2009 Karadeniz ve diğ, 2011 Watanabe ve diğ, 2013 Nabas ve diğ, 2014 Pavel ve diğ, 2014 Ghanbari ve diğ, 2016 Özkök ve Silici, 2017 Al-Kushi ve diğ, 2018 Gu ve diğ, 2018 Caixeta ve diğ, 2018 Rafieian-Kopaei ve diğ, 2018

### 2.6.1 Arı sütünün antimikrobiyal aktivitesi

Arı sütünün antimikrobiyal etkinliği bilimsel olarak ilk defa McCleskey ve Melampy (1939) tarafından gösterilmiştir. Sonraki yıllarda, Hinglais ve diğ. (1955), Butenandt ve Rembold (1957) tarafından arı sütünün Gram pozitif ve negatif bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkinliği araştırılmıştır. Bu araştırmaları arı sütünün çeşitli ekstaktları ve izole dileyen bileşenlerinin antimikrobiyal etkisi konulu çalışmalar izlemiştir. Arı sütünė özgü yağ asidi olan 10-HDA'nın *Escherichia coli* ve *Micrococcus pyogenes* üzerindeki antibakteriyel etkinliğinin incelediği bir çalışmada, antimikrobiyal aktivitenin penisilinin (*M. pyogenes*) dörtte biri ile klorotetrasiklinin (*E. coli*) beşte birine yakın olduğu bildirilmiştir (Blum ve diğ, 1959). Arı sütünde bulunan royalisinin *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* gibi Gram pozitif bakteriler üzerine 1 µM ve daha düşük konsantrasyonlarda seçici antibakteriyel etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Fujiwara ve diğ, 1990).

Arı sütünün yağ ve protein fraksiyonlarının farklı ekstraksiyon yöntemleri ile özütlendiği ve antimikrobiyal aktivite yönünden kıyaslandığı çalışmalarda taze arı sütünün daha geniş spektrumda antimikrobiyal aktivite gösterdiği ifade edilmiştir. Suda özünür arı sütünün fraksiyonunun, proteinler ve peptidler yönünden zengin olduğu ayrıca Gram pozitif bakteriler üzerinde güçlü inhibisyon aktivite gösterdiği açıklanmıştır (Sauerwald, 1998). Bu proteinlerden biri olan royalisinin, arılardaki yavru çürüğü hastalığı etmeni olan *Paenibacillus larvae* ile *Bacillus subtilis* ve *Sarcina lutea* gibi diğer Gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyel etkisinin bulunduğu gösterilmiştir (Bíliková ve diğ, 2001).

Ratanavalachai ve Wongchai (2002) tarafından lipid fraksiyonunun incelendiği bir çalışmada arı sütünün Gram negatif bakterilerde yüksek antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu, benzer etkinin lipid dışı fraksiyonlarda görülmediği belirtilmiştir. Arı sütünün eterde çözünür-çözünmez fraksiyonları üzerine yapılan bir başka araştırmada ise, eter çözünür fraksiyonun *E. coli*, *S. aureus* ve *Streptomyces* cinsi bakteriler üzerinde diğer ekstrata oranla daha güçlü antibakteriyel etki gösterdiği bildirilmiş ve bu etki 10-HDA'ya atfedilmiştir. Eterde özünür fraksiyona ait minimum inhibisyon (MİK) değerinin (30 mg/mL), taze arı sütünün (200 mg/mL) ve royalisin içeren eterde çözünmeyen fraksiyonun (300 mg/mL) değerlerinden daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Eshraghi ve Seifollahi, 2003).

Fontana ve diğ. (2004) kütle spektroskopisi yöntemiyle arı sütünde bulunan peptitlerden “Jellin I-II-III-IV ” isimli dört peptiti saflaştırarak tanımlamış ve bunların *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* ve *Staphylococcus* cinsi bakteriler üzerine antimikrobiyal etkisini incelemişlerdir. Jellin I ve II'nin yüksek aktiviteye sahip olduğu, Jellin III'te bu etkinliğin azaldığı ve Jellin IV'ün herhangi bir antibakteriyel aktivite göstermediği ifade edilmiştir.

Arı sütünden diklorometan ve metanol kullanılarak ile izole edilen serbest yağ asitlerinin antimikrobiyal etkisinin incelendiği bir çalışmada, 3-Hidroksidodekanedioik asit ve 10-HDA'nın diğer yağ asitlerine kıyasla daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir ( Melliou ve Chinou, 2005).

Arı sütünün *P. aeruginosa* ve *S. aureus* üzerinde gentamisin ve seftriaksona eş değer antibakteriyel etkiye sahip olduğu, *E. coli* üzerinde antibiyotiklerin MİK değerine yakın konsantrasyonda inhibisyon sağladığı görülmüştür (Shirzad ve diğ, 2007). Benzer çalışmalarda arı sütünün *P. aeruginosa* ve *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı antibakteriyel etkisi incelenmiş ve test edilen tüm bakteri suşlarının arı sütüne duyarlı olduğu bildirilmiştir (Boukraa, 2008; Boukraa ve diğ, 2009).

Son yıllarda arı sütü yanısıra içeriğinde bulunan protein ve peptitlerinin sahip olduğu antimikrobiyal aktivite, etkinlik mekanizmaları ve rekombinantlarına dair çalışmaların sayısı artmıştır. Rekombinant apalbumin ve royalisinin antimikrobiyal aktivitesi ve etki mekanizmaları araştırılmıştır. Antimikrobiyal etkinliğini sağlamada intramoleküler disülfid bağları ve C-terminusundaki 11 amino asidin gerekli olduğu ve royalisinin bakteriyel hücre hidrofobikliğini azaltarak hücre zarı geçirgenliğini bozduğu ifade edilmiştir (Bíliková ve diğ, 2009; 2015). Shen ve diğ. (2010, 2012) royalisin ve rekombinantlarının antimikrobiyal aktivitesi üzerine yaptıkları çalışmalarda, royalisinin *S. aureus*, *B. subtilis* ve *Micrococcus luteus* üzerinde nisin ile eş değer antibakteriyel etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Rekombinant royalisinin *B. subtilis*, *Micrococcus flavus* ve *S.aureus*'a karşı minimum inhibitör konsantrasyonlarının sırasıyla 62.5 mg/mL, 125 mg/mL ve 250 mg/mL olduğu, gram pozitif bakterilerde gelişmeyi inhibe ederken Gram negatif bakteriler üzerinde etkinliği bulunmadığı belirtilmiştir.

Diğer antimikrobiyal peptitler ile yapılan çalışmalarda; Jellin I, II ve III'ün bakteriyel gelişimi inhibe ettiği, bu peptidlerin C ve N terminallerindeki yapı modifikasyonu

sonucu aktivitenin azaldığı belirlenmiştir (Romanelli ve diğ, 2011). Buna karşın C terminali modifiye edilmiş Jellin peptitlerinin, 30-300 µg/mL konsantrasyon aralığında *Staphylococcus epidermidis* gelişimini inhibe ettiği bildirilmiştir (Capparelli ve diğ, 2012). C ve N terminallerinde yapılan modifikasyonların, jellinlerin farklı antimikrobiyal etkinliğine sahip olmasına sebep olduğu düşünülmektedir.

Arı sütü ve bileşenlerinin, cilt enfeksiyonuna neden olan bakterilerden; *S. epidermidis*, *S. aureus*, *M. luteus*, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus faecalis*, *P.aeruginosa*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* üzerinde de antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Kuyucuk difüzyon ve sıvı dilüsyon yöntemlerinin kullanıldığı bu araştırmada; test edilen tüm bakterilerde düşük konsantrasyonlarda inhibisyon sağlanmasına rağmen MBK değerinin, MİK değerlerinden yaklaşık yirmi kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Garcia ve diğ, 2010). Bu çalışmanın devamında; arı sütünün lipid fraksiyonu ve 10-HDA aynı bakteriler üzerine test edilmiştir. İnhibisyon sonuçlarının bir önceki çalışma ile benzerlik gösterdiği, *K. pneumoniae*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* gibi Gram negatif bakterilerin Gram pozitif bakterilere kıyasla daha dirençli olduğu belirtilmiştir (Garcia ve diğ, 2013). Benzer çalışmalar ile Gram pozitif bakterilerin Gram negatif bakterilere göre daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (Moselhy ve diğ, 2013).

Arı sütünün Gram pozitif bakterilerden *S. aureus* suşlarına karşı etkinliği, Gunaldi ve diğ. (2014) tarafından sıçanlar üzerinde yapılan *in-vivo* bir çalışma ile incelenmiştir. Sıçanlar; sadece spinal implant uygulananlar, implantı bakteri ile aşılana ve implanta enfeksiyon ile arı sütü eklenenler olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Spinal implantı bakteri ile aşılana ve arı sütü ilave edilmiş farelerde, implantına arı sütü eklenmeyen farelere kıyasla enfeksiyonun azaldığı bildirilmiştir.

Arı sütü ve bileşenleri üzerine yapılan *in-vitro* çalışmalarda; 10-HDA'nın, bakteri hücresinin membran iyonik iletkenliğini değiştirmesi sonucunda hücre bütünlüğünü bozarak antibakteriyel etki gösterdiği ifade edilmiştir (Yang ve diğ, 2014). 10-HDA'nın antimikrobiyal aktivitesi ve etki mekanizması *B. subtilis* üzerinde incelenmiş (MİK, 0.62 mg/mL), 10-HDA'nın bakterilerin DNA sentezi sürecini önleyici etkisi olduğu gösterilmiştir (Yang ve diğ, 2015).

Arı sütü; amoksisilin, lincospectin vb. antibiyotiklere dirençli *E. coli* suşu üzerinde denenmiş, uygulanan tüm konsantrasyonlarda (% 10, % 20, % 30, % 40 ve % 45 v/v) inhibe edici etkisi görülmüştür (Dinkov ve diğ, 2014). Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) üzerine yapılan çalışmalarda benzer sonuçlar alınmış, fakat daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç duyulduğu vurgulanmıştır (Dinkov ve diğ, 2016). Arı sütünün *P. aeruginosa*'nın sebep olduğu solunum yolu enfeksiyonlarında patojenin tutunmasını engelleyerek enfeksiyonun hafiflemesine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Susilowati ve diğ, 2017).

Arı sütünün dental uygulamalarda ortaya çıkabilecek mikrobiyal üremenin baskılanmasında kullanılabileceği, özellikle klorheksidine yakın antimikrobiyal etkinlik gösterdiği ifade edilmiştir (Meto ve diğ, 2017). Periodontal patojenler kullanılarak yapılan *in-vitro* çalışma sonucunda, test edilen patojenlerin (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* ve *Fusobacterium nucleatum*) arı sütüne duyarlı olduğu belirtilmiştir (Coutinho ve diğ, 2018).

Yang ve diğ. (2018) 10-HDA'nın insan ve hayvan patojenleri *S. aureus*, *Streptococcus alactolyticus*, *S. intermedius*, *S. xylosum*, *Salmonella Choleraesuis*, *Vibrio parahaemolyticus* ve hemolitik *E. coli* üzerinde 23-44 µM arasında değişen konsantrasyonlarda inhibisyon sağladığını ve Gram pozitif bakteriler üzerindeki etkinliğin yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Arı sütünün antibakteriyel etki mekanizmaları tam aydınlatılamamış olmasına rağmen, yapılan çalışmalar bu yolda önemli adımlar atılmasını sağlamıştır. Rekombinant MRJP-4'ün antibakteriyel etkinliğinin *P. larvae* ve *P. aeruginosa* üzerinde denendiği bir çalışmada, sırasıyla  $15.6 \pm 0.7$  µM ve  $32.3 \pm 1.4$  µM MİK değerleri tespit edilmiş, MRJP-4'ün antimikrobiyal peptid benzeri bir etki oluşturduğu bildirilmiştir (Kim ve diğ, 2019). Park ve diğ. (2019a) rekombinant MRJP-2 ile benzer mikroorganizmalar üzerinde yaptıkları çalışmada, daha düşük konsantrasyonlarda antimikrobiyal aktiviteye rastlanmış ve MRJP'lerin hücrede membran hasarına sebep olduğu belirtilmiştir. Park ve diğ. (2019b) tarafından yapılan bir başka çalışma ile rekombinant MRJP 2, 5 ve 7'inin *E. coli* üzerinde benzer etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Arı sütünün antimikrobiyal aktivitesinin sadece MRJP'lere bağlı olmadığı, diğer bileşenlerin de antimikrobiyal aktiviteye katkı sağladığı bilinmektedir (Feng ve diğ., 2015; Bucekova ve diğ, 2016; Vezetu ve diğ, 2017).

Literatürde, arı sütünün antibakteriyel aktivitesinin yanı sıra antifungal özelliklerinin araştırıldığı çalışmalar da yer almaktadır. Sauerwald ve diğ. (1998) arı sütünün suda çözünen fraksiyonunun, küf gelişimini inhibe ettiğini ve bu etkinin belirtilen fraksiyonda yer alan protein ve peptitlerinden kaynaklandığını bildirmiştir. Arı sütündeki önemli proteinlerinden olan royalisin, bitkilerde yaygın olarak görülen *Botrytis cinerea* üzerinde denenmiş ve güçlü antifungal etkisi olduğu belirtilmiştir (Bíliková ve Šimúth, 2001). Arı sütünde bulunan antimikrobiyal peptitlerden “Jellin-I” ve “Jellin-II”nin *C. albicans* üzerindeki etkinliği, arı sütünün antifungal özellik gösterdiği yönündeki görüşleri destekler niteliktedir (Fontana ve diğ, 2004).

Arı sütünün mayalar üzerindeki antifungal aktivitesinin lipid fraksiyonda bulunan çeşitli yağ asitlerinden kaynaklandığı, 10-HDA'nın ve bazı serbest yağ asitlerinin *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* üzerinde antifungal etkileri olduğu gösterilmiştir. Melliou ve Chinou (2005), disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemlerini kullanarak arı sütünün metanol ve diklorometan ekstraktları ile arı sütüne özgü yağ asitlerinin antimikrobiyal aktivitelerini incelemiştir. Lipid ekstraktı ve 10-HDA'nın uygulandığı örneklerde 10 mm ila 14mm arasında değişen zon çapları belirlenmiş olup, 0.98-1.25 mg/mL aralığında değişen MİK değerleri bildirilmiştir. *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* ve *Trichosporon* cinsleri üzerinde arı sütünün antifungal aktivitesinin değerlendirildiği bir diğer çalışmada; 0.0625 µg/mL minimum inhibisyon konsantrasyonu ile en hassas suşun *Trichosporon* cinsi mayalara ait olduğu belirtilmiştir (Koç ve diğ, 2011). Gunalp ve diğ. (2018) tarafından arı sütünün % 100, % 75, % 50, % 25, % 10, % 5 ve % 1'lik konsantrasyonları *C. albicans* üzerinde denendiğinde; % 10 ve üzeri konsantrasyonlarda inhibisyon sağlandığı ifade edilmiştir.

Asidik arı sütü fraksiyonunun, farklı pH değerlerinde antimikrobiyal aktivitesindeki değişimi belirlemek üzere yapılan bir çalışmada; pH 7'de 125 µg/mL doz uygulaması ile *C. albicans* üzerinde inhibisyon sağlanırken, pH 5.1'de minimum inhibisyon konsantrasyonu 62,5 µg/mL olarak tespit edilmiştir (Isidorow ve diğ, 2018).

Literatürde arı sütünün küfler üzerindeki etkilerine dair az sayıda yayın bulunmaktadır. Mısır ve Çin orijinli arı sütlerinin *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* gibi küf türleri üzerinde denendiği bir çalışmada, seçilen üç farklı konsantrasyonun (5-10-15 mg/mL) oluşturduğu inhibisyon zonları ölçülmüştür. Mısır ve Çin orijinli arı sütlerinde antimikrobiyal etkinliğin farklı olduğu görülmüştür.



Gözlenen farklılığın, coğrafi koşullar ile arı kolonileri arasındaki genetik değişiklik nedeniyle olabileceği düşünülmektedir (Moselhy ve diğ, 2013).

İran orijinli arı sütünün *Rhizopus oryzae* üzerinde denendiği bir başka çalışmada, MİK değeri  $100 \pm 34$  mg/mL, MFK değeri ise  $133 \pm 46$  mg/mL olarak bildirilmiştir (Moghim ve diğ, 2015).

### **2.6.1.1 Depolama koşullarının antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi**

Arı sütünün ısı ve ışığa karşı duyarlı olduğu, ayrıca havayla okside olabildiği bilinmektedir. Bu sebeple kalitesinin ve bioaktif bileşenlerinin korunmasında, depolama koşulları önemli parametrelerin başında gelmektedir. Taze arı sütünün muhafazasında; buzdolabı koşulları ( $+4$  °C) ve dondurarak ( $-18$  °C) muhafaza yaygın olarak kullanılmakta, liyofilizasyon benzeri teknolojiler ile arı sütünün depolama süresi arttırılmaktadır.

Buzdolabı sıcaklığında 12 ay süre ile depolanan arı sütünün, antimikrobiyal aktivitesindeki olası değişim incelenmiştir. Bu çalışmada; % 5, % 25, % 75 ve % 100'lük arı sütü konsantrasyonlarının *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* ve *S. Typhi* üzerinde denendiği bildirilmiştir. Test dozları arasından; en düşük konsantrasyonun (% 5) haricindeki tüm konsantrasyonların, etkin bir antibakteriyel aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Bu etkinin çalışma süresi boyunca korunduğu, buzdolabı koşullarının arı sütünün antibakteriyel etkinliğinde bir azalışa neden olmadığı saptanmıştır (Ragab ve Ibrahim, 1999).

Farklı sıcaklık ve sürelerin antimikrobiyal aktiviteye etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise, antimikrobiyal özelliğin uygulanan sıcaklık ve süreye bağlı olarak azaldığı ifade edilmiştir. Ratanavalachai ve Wongchai (2002) dondurulmuş, buzdolabı ve oda koşullarında muhaza edilmiş arı sütlerini on iki saat ile yedi gün arasında değişen sürelerde Gram pozitif (*S. lutia*, *B. cereus*, *S. aureus*), Gram negatif bakteriler (*Shigella flexneri*, *S. Typhi*, *E. coli*, *Proteus vulgaris* ve *P. aeruginosa*) üzerinde denemiş, üç gün sonunda antibakteriyel etkinlikte düşüş tespit edildiği bildirilmiştir. Bunun yanısıra 12 ay depolama boyunca, 10-HDA içeriğindeki değişim incelendiğinde;  $-18^{\circ}\text{C}$ 'de % 0.1,  $4^{\circ}\text{C}$ 'de ise % 0.2 azalış olduğu belirtilmiştir. 10-HDA içeriği ile depolama süresi arasında bir ilişki bulunamadığı ifade edilmiştir (Antinelli ve diğ, 2003). Li ve diğ. (2007;2008) tarafından MRJP1'in yüksek sıcaklık ve uzun depolama sürelerine karşı en dayanıklı, MRJP4 ve MRJP5'in ise en hassas proteinler

olduğu ve hatta tazelik parametresi olarak kullanılabilecekleri bildirilmiştir. Sonuçlar depolama süresi ve sıcaklık değişimlerinden arı sütü içinde bulunan her bileşenin farklı etkilendiğini göstermektedir.

Antibakteriyel etkinin dondurarak muhafaza ile değişiminin incelendiği bir başka araştırmada; +4°C’de taze ve -40°C’de dondurulmuş olarak 12 ay depolanan arı sütünün antimikrobiyal aktiviteleri kıyaslanmıştır. Taze olarak buzdolabı koşullarında muhafaza edilen ürünün başlangıçta daha iyi antimikrobiyal etki gösterdiği, ancak antimikrobiyal aktivitedeki azalış göze alındığında dondurarak muhafazanın ön plana çıktığı belirtilmiştir (Maksimoviç ve Rifatbegovi, 2009).

Arı sütünde liyofilizasyon yöntemi sonrası gerçekleşen değişimlere ilişkin çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bununla birlikte yapılan çalışmalar liyofilizasyon işleminin antimikrobiyal aktiviteyi muhafaza ettiği yönündedir. Taze ve liyofilize arı sütünün 10-HDA içerikleri ile antimikrobiyal etkilerinin kıyaslandığı araştırmada; liyofilizasyon işlemi sonrasında 10-HDA miktarında dikkate değer azalış tespit edilememiştir. Antibakteriyel etkinliğini belirlemede, her iki ürün *in-vitro* ortamda Gram pozitif ve negatif bakteriler (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *S. Enteritidis*, ve *P. aeruginosa*) zerinde test edilmiş, antimikrobiyal aktivitede değişikliğe rastlanmadığı bildirilmiştir (Nascimento ve diğ, 2015).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Arı sütü

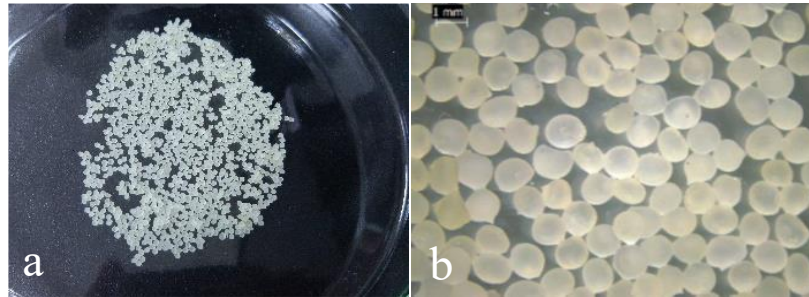
Arı sütü 2018 yılı Ağustos ayı hasadına ait olup, Civan Arıcılık Ltd. Şti. (Bursa)'den temin edilmiştir. Soğuk zincir koşullarında (+4°C) laboratuvara getirilen arı sütü mikroenkapsüle edilecek kısım ayrıldıktan sonra analizlerin başlama süresine kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

##### 3.1.1.1 Taze arı sütü

Saklama koşulların arı sütünün mikrobiyolojik aktivitesi üzerindeki etkilerinin tespiti için taze arı sütü (TAS) üzerinde yapılan 0. gün analizleri sonrasında 1, 3 ve 6. ay analizleri için buzdolabı koşullarında (+4°C) depolanmıştır.

##### 3.1.1.2 Mikroenkapsüle arı sütü

Mikroenkapsüle arı sütü, TAGEM-18/AR-GE/25'nolu "Mikroenkapsüle Arı Sütü Üretimi; Kapsüllerin, Taze ve Liyofilize Arı Sütü ile Fizikokimyasal Özellikleri ve Biyolojik Aktiviteleri Yönünden Kıyaslanması ve Depolama Stabilitésinin Belirlenmesi" konulu proje için üretilmiş olan kapsüllerden temin edilmiştir. Çapraz bağlama tekniği ile sodyum aljinat kullanılarak üretilen kapsüllerin görüntüleri Şekil 3.1'de verilmiştir. Mikroenkapsüle arı sütü (MAS) 0. gün analizleri sonrasında 1, 3 ve 6. ay analizleri için oda sıcaklığında depolanmıştır.



Şekil 3.1: (a) Mikroenkapsüle arı sütü (b) MAS Mikroskop görüntüsü (x8).

### 3.1.2 Mikroorganizmalar

Arı sütünün antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi amacıyla Çizelge 3.1’de bulunan mikroorganizmalar kullanılmıştır.

**Çizelge 3.1** : Test mikroorganizmaları.

Bakteri	Maya	Küf
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Candida albicans</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Salmonella</i> Enteritidis <sup>a</sup>	ATCC 10351	<i>digitatum</i> <sup>b</sup>
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	ATCC 22019	<i>flavus</i> <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Klinik izolat. <sup>b</sup> Gıda orijinli izolat.

Referans suşlar dışındaki mikroorganizmalar Bursa Teknik Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, mikrobiyoloji laboratuvarı kültür koleksiyonundan sağlanmıştır.

### 3.2 Yöntemler

#### 3.2.1 Mikroenkapsüle arı sütünün ön hazırlığı

Mikroenkapsüle arı sütünün (MAS) salınımı sağlamak amacıyla; bakteriler için steril Mueller Hinton Broth (MHB; 25°C’de pH 7.3 ±0.2), maya ve küf için Sabouraud Dekstroz Broth (SDB; 25°C’de pH 5.6±0.2) kullanılmıştır. Kapsüllerin besiyerinde uygun pH’da açılmasını sağlamak amacıyla MHB, fosfat tamponu ile hazırlanmış olup; SDB, % 10’luk steril (soğuk sterilizasyon) sodyum hidroksit çözeltisi ile pH 7.3’e ayarlanmıştır. Besiyerleri 37 °C’de 2 saat karıştırılarak (250 rpm) stok çözelti elde edilmiştir (Wang ve diğ, 2010).

#### 3.2.2 Arı sütü konsantrasyonları ve inokulumların hazırlanması

Taze ve mikroenkapsüle arı sütlerinin mikrobiyolojik etkinliklerinin karşılaştırılabilmesi için, tartımı yapılacak MAS miktarının belirlenmesinde taze arı sütünün 10-HDA içeriği baz alınmıştır. Mikroenkapsüle arı sütünün 10-HDA içeriğini taze arı sütüne eşit miktarda olacak şekilde hesaplanmıştır. Yapılan ön denemeler sonucunda TAS ve MAS’ın çözünürlükleri dikkate alınarak, taze arı sütü için 500 mg/mL, mikroenkapsüle arı sütü için 125 mg/mL’lik stok çözeltisi hazırlanmıştır. Belirtilen stok çözeltilerinden iki kat seyreltme yöntemi uygulanarak çalışmada kullanılan dozlar belirlenmiştir (Çizelge 3.2, Çizelge 3.3).

Test edilen bakteri ve mayalar sırasıyla 37°C ve 25°C’de 24 saatlik inkübasyon sonrasında, uygun besiyeri ile 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanmıştır (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI M07-A10, 2015; National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS M27-A2, 2002),

Çalışmada yer alan küflerin, Sabouraud Dekstroz Agarda (SDA) 25°C’de 3-5 gün gelişimi ile sporlanması sağlanmıştır. Küf sporlarının yüzeyden toplanması amacıyla; steril % 0,1’lik Tween 80 çözeltisi (yaklaşık 5 mL) ile petri yüzeyi yıkanarak sporlar steril tüpe aktarılmıştır. Daha sonraki aşamada; elde edilen spor süspansiyonu 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanmıştır (Rodriguez-Tudela ve diğ, 2003; Arendrup ve diğ, 2014; The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST; 2015).

### 3.2.3 Agar kuyucuk difüzyon yöntemi

0.5 McFarland’a ayarlanan kültürlerden 100µL inokulum, bakteriler için Mueller Hinton Agara (MHA), mayalar ve küfler için SDA besiyeri yüzeyine drigalski spatülü ile yayılmıştır. 5 mm çapındaki bir uç ile steril olarak açılan kuyucuklara, Çizelge 3.2’de verilen konsantrasyonlardaki arı sütü 50µL ilave edilmiştir (Magaldi ve diğ, 2004; Valgas ve diğ, 2007). Bakteriler 37°C’de 24 saat, mayalar ve küfler 25°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmış ve oluşan inhibisyon zon çapları (mm) ölçülmüştür. Negatif Kontrol olarak taze arı sütü için steril su, mikroenkapsüle ürün için arı sütü içermeyen boş kapsül (besiyerinde salınımı yapılmış) kullanılmıştır.

**Çizelge 3.2 :** Kuyucuk difüzyon yönteminde kullanılan arı sütü konsantrasyonları.

Arı Sütü	Konsantrasyon(mg/mL)		
TAS	500	250	125
MAS	125*	62,5	31,25

\* >125 mg/mL dozlarında yaşanan çözünürlük problem nedeniyle MAS için max. doz 125 mg/mL denenmiştir.

### 3.2.4 Sıvı mikrodilüsyon yöntemi

TAS ve MAS’ın test suşları üzerindeki minimum inhibitör konsantrasyon değerleri mikrodilüsyon yöntemiyle CLSI (2008, 2015) ve NCCLS (2002) referans yöntemlere göre belirlenmiştir. İki kat seyreltme yöntemi ile uygun besiyerinde hazırlanan, Çizelge 3.3’te verilen konsantrasyonlara sahip TAS ve MAS örnekleri steril 96 kuyucuklu plakaya 180 µL olarak aktarılmıştır.

**Çizelge 3.3 : Sıvı mikrodilüsyon yönteminde kullanılan arı sütü konsantrasyonları.**

Arı Sütü	Konsantrasyon (mg/mL)							
TAS	500	250	125	62,5	31,25	15,6	7,8	3,9
MAS	125*	62,5	31,25	15,6	7,8	3,9	1,95	0,98

\* >125 mg/mL dozlarında yaşanan çözünürlük problem nedeniyle MAS için max. doz 125 mg/mL olarak denenmiştir.

Bakteriler için mikropalakada istenen final inokulum konsantrasyonu  $5 \times 10^5$  kob/mL, mayalar için  $(0.5-2.5) \times 10^3$  kob/mL ve küfler için  $(0.4-5) \times 10^4$  kob/mL olup, bu konsantrasyonların sağlanması için 0,5 McFarland bulanıklık standardında hazırlanan inokulumlar 1:20 oranında seyreltilmiştir (Balouiri ve diğ, 2016). Hazırlanan son inokulum konsantrasyonlarından mikropalakaya 20 µL inokulum aktarılmıştır. (Wiegand ve diğ, 2008). Mikropalaklar 37°C 18-24 saat (bakteri) ya da 46-72 saat (maya) inkübasyona bırakılmıştır. Her mikropalakada bir sterilite kontrol kuyucuğu (seyreltilmelerde kullanılan besiyeri, 200 µL) ve bir üreme kontrol kuyucuğu (sadece inokulum eklenmiş besiyeri; 180µL+20µL) bulunmaktadır. Mikroorganizma yoğunluğu 600 nm de mikropalak okuyucu (BioTek Instruments, Inc. EPOCH SN 15062915) ile belirlenmiştir. Bulanıklıkta artışın görülmediği, üremenin tamamen inhibe edildiği en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak belirlenmiştir (Bilikova ve diğ, 2015).

Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK) ve Minimum Fungisidal Konsantrasyon (MFK)'nın belirlenmesi amacıyla MİK ve üst konsantrasyonlarına sahip kuyucuklardan alınan 10 µL inokulum, SDA (maya ve küf) ve MHA (bakteri) yüzeyine yayılmıştır. Petriler, bakteriler için 37°C'de 24 saat, mayalar ve küfler için 25°C'de 48 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır (Moghim ve diğ, 2015). Gelişmenin olmadığı konsantrasyon MBK ve MFK olarak değerlendirilmiştir.

### 3.2.5 İstatistiksel Analizler

Çalışmada TAS ve MAS'a ait farklı dozların 0. günde ve depolama süresi boyunca seçilen mikroorganizmalar üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları SPSS version 22.0 programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Veri setlerinde öncelikle normallik dağılımına bakılmış, normal dağılıma uyan veriler için parametrik bir test olan Oneway-ANOVA ile Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak % 5 güven aralığında gruplar arasında anlamlı fark olup olmadığı belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ).

#### 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada taze ve mikroenkapsüle arı sütünün antimikrobiyal etkinliği çeşitli bakteri, maya ve küfler üzerinde denenmiştir. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile MİK ve MBK/MFK değerleri belirlenirken, agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile zon çapları ölçülerek mikroorganizmalar dirençli, orta derece duyarlı ve duyarlı olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, taze arı sütünün buzdolabı koşullarında (+4°C), mikroenkapsüle arı sütünün oda sıcaklığında (20°C) belli depolama süreleri sonundaki (0, 1, 3 ve 6 ay) antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Böylece muhafaza şekli (taze veya mikroenkapsüle), sıcaklık ve sürenin arı sütün antimikrobiyal aktivitesi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

##### 4.1 Taze ve Mikroenkapsüle Arı Sütünün Başlangıç (0. Gün) ve Farklı Depolama Sürelerindeki Antibakteriyel Aktivitesinin Değerlendirilmesi

TAS ve MAS örneklerine ait 0.gün sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Taze ve mikroenkapsüle arı sütünün çalışmada yer alan bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkisinin konsantrasyona bağlı olarak artış gösterdiği saptanmıştır. *S. epidermidis*’in 15,6 mg/mL’lik MİK değeri ile TAS ve MAS’a karşı en duyarlı bakteri olduğu belirlenmiştir. Her iki arı sütü örneği için *M. luteus*’un MİK değeri 31,25 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Taze arı sütü *E.coli* ve *S. Enteritidis* üzerinde 31,25 mg/mL’de inhibisyon sağlamasına rağmen, mikroenkapsüle arı sütünün daha yüksek konsantrasyonlarda inhibisyon sağladığı gözlenmiştir.

Farklı arı sütlerinin antimikrobiyal etkinliğinin incelendiği benzer bir çalışmada, arı sütünün *S. epidermidis* ve *M. luteus* üzerinde *E. coli*’ye kıyasla daha düşük konsantrasyonlarda inhibisyon sağladığı belirtilmiştir. Elde edilen MİK değerleri, sırasıyla % 55±17,32 w/w; % 52,5±9,57 w/w; % 77,5 ±17,08 w/w olarak bildirilmiştir (Garcia ve diğ, 2013). Bu çalışmada aynı test mikroorganizmaları için belirlenen antibakteriyel aktivite, Garcia ve diğ. (2013) ile uyumluluk göstermiştir.

**Çizelge 4.1 :** Taze ve mikroenkapsüle arı sütünün farklı depolama sürelerinde test bakterileri üzerinde belirlenmiş MİK/MBK değerleri (mg/mL).

Süre	Bakteri	TAS		MAS	
		MİK	MBK	MİK	MBK
0.gün	<i>E. coli</i>	31,25	62,5	125	125
	<i>S. epidermidis</i>	15,6	62,5	15,6	125
	<i>S. Enteritidis</i>	31,25	62,5	125	125
	<i>M. luteus</i>	31,25	125	31,25	125
1. ay	<i>E. coli</i>	31,25	62,5	125	125
	<i>S. epidermidis</i>	15,6	62,5	15,6	125
	<i>S. Enteritidis</i>	31,25	62,5	125	125
	<i>M. luteus</i>	31,25	125	31,25	125
3.ay	<i>E. coli</i>	31,25	62,5	125	125
	<i>S. epidermidis</i>	15,6	62,5	15,6	125
	<i>S. Enteritidis</i>	31,25	62,5	125	>125*
	<i>M. luteus</i>	31,25	125	31,25	125
6. ay	<i>E. coli</i>	31,25	125	125	>125
	<i>S. epidermidis</i>	15,6	62,5	31,25	>125
	<i>S. Enteritidis</i>	31,25	62,5	125	>125
	<i>M. luteus</i>	31,25	125	31,25	125

\* >125 mg/mL dozlarında yaşanan çözünürlük problem nedeniyle MAS için max. doz 125 mg/mL olarak denemiştir.

Çizelge 4.1'den 0. gün sonuçları incelendiğinde; test mikroorganizmalarının genelinde MBK değerinin MİK değerinden yüksek olduğu görülmekle birlikte, mikroenkapsüle arı sütü uygulanan *E. coli* ve *S. Enteritidis*'de aynı MİK ve MBK değerleri tespit edilmiştir. Garcia ve diğ. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada arı sütleri 3,3 ila 14,5 mg/mL arası değişen MİK değerlerine sahipken, MBK konsantrasyonlarının 125 mg/mL ve üzerinde olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda MİK ve MBK değerleri arasındaki farkın daha az olduğu görülmektedir.

Kuyucuk difüzyon yönteminde, ön denemeler ile TAS ve MAS çözünürlükleri dikkate alınarak başlangıç konsantrasyonları taze arı sütü için 500 mg/mL, mikroenkapsüle arı sütü için 125 mg/mL olarak hazırlanmıştır. Taze ve mikroenkapsüle arı sütlerinin farklı konsantrasyonlarına ait zon çapları (mm) Çizelge 4.2 ve 4.3'te verilmiştir.

TAS ve MAS'ın bazı bakteriler üzerinde sekonder zon oluşturduğu gözlenmiştir. Sekonder zon oluşumunun gözlemlendiği bir başka çalışmada, bu durum arı sütünün yoğun besin içeriği nedeniyle test mikroorganizmaları tarafından bir süre sonra besiyeri olarak kullanılmış olabileceği şeklinde açıklanmıştır (Karakoç, 2018).



**Çizelge 4.2 :** Taze arı sütünün farklı depolama sürelerinde test bakterileri üzerinde belirlenmiş zon çapları (mm).

Süre / Konsantrasyon (mg/mL)	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>M. luteus</i>	
0.gün	500	13,42±0,20 <sup>Ac</sup>	25,23±0,03 <sup>Aa</sup>	13,18±0,23 <sup>Ca</sup>	17,71±0,32 <sup>Ba</sup>
	250	11,95±0,33 <sup>Ba</sup>	21,81±0,05 <sup>Aa</sup>	11,70±0,40 <sup>Ba</sup>	13,98±0,07 <sup>Ba</sup>
	125	8,60±0,81 <sup>Ca</sup>	15,24±0,22 <sup>Aa</sup>	8,39±0,08 <sup>Ca</sup>	10,99±0,60 <sup>Ba</sup>
1.ay	500	11,53±0,36 <sup>Ca</sup>	21,12±0,21 <sup>Ab</sup>	12,51±0,54 <sup>Ca</sup>	15,16±0,62 <sup>Ba</sup>
	250	10,83±0,15 <sup>Ba</sup>	14,83±1,11 <sup>Ab</sup>	12,09±0,45 <sup>Ba</sup>	12,45±0,43 <sup>Bab</sup>
	125	-	11,23±0,39 <sup>Ab</sup>	8,37±0,58 <sup>Ba</sup>	8,77±0,07 <sup>Ab</sup>
3.ay	500	8,41±0,23 <sup>*Cb</sup>	19,63±0,28 <sup>Ac</sup>	13,49±0,12 <sup>*Aa</sup>	14,12±0,90 <sup>Bab</sup>
	250	8,74±0,49 <sup>*Dab</sup>	12,89±1,35 <sup>Ab</sup>	10,79±0,12 <sup>Ba</sup>	10,21±0,18 <sup>Cb</sup>
	125	8,07±0,41 <sup>*Ba</sup>	9,41±0,08 <sup>*Abc</sup>	7,89±0,06 <sup>Da</sup>	7,92±0,40 <sup>Ca</sup>
6.ay	500	7,76±0,98 <sup>Cb</sup>	18,31±0,42 <sup>Ac</sup>	11,12±0,24 <sup>Ba</sup>	11,88±0,62 <sup>Bb</sup>
	250	6,94±0,54 <sup>C</sup>	15,55±0,33 <sup>Ab</sup>	9,89±0,47 <sup>Ba</sup>	10,22±0,98 <sup>Bb</sup>
	125	8,60±0,81 <sup>Ca</sup>	8,21±0,27 <sup>Ac</sup>	-	-

Dirençli ≤ 14, Orta derecede duyarlı 15-18, Duyarlı ≥ 19 (NCCLS, 1991).

Büyük harfler, m.organizmalar; küçük harfler aylar arası istatistiki olarak farklılığı göstermektedir (p≤0,05).

\*Sekonder zon çapları hesaplamaya dahil edilmiştir. (-) Zon oluşumu gözlenmedi.

**Çizelge 4.3 :** Mikroenkapsüle arı sütünün farklı depolama sürelerinde test bakterileri üzerinde belirlenmiş zon çapları (mm).

Süre / Konsantrasyon (mg/mL)	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>M. luteus</i>	
0.gün	125	8,58±0,72 <sup>*Ca</sup>	16,06±0,57 <sup>*Aa</sup>	8,60±0,67 <sup>*Ca</sup>	11,68±1,52 <sup>Ba</sup>
	62,5	7,51±0,24	-	-	-
	31,25	8,60±0,81	-	-	-
1.ay	125	8,27±0,23 <sup>Ba</sup>	15,20±0,45 <sup>*Aa</sup>	7,81±0,27 <sup>BCa</sup>	7,55±0,13 <sup>Cb</sup>
	62,5	-	-	-	7,27±0,14
	31,25	-	-	-	-
3.ay	125	7,33±0,08 <sup>Bab</sup>	-	8,37±0,00 <sup>*Aa</sup>	7,23±0,59 <sup>Bb</sup>
	62,5	-	-	-	7,12±0,03
	31,25	-	-	-	-
6.ay	125	6,91±0,02 <sup>Ab</sup>	7,32±0,01 <sup>Ab</sup>	-	7,37±0,75 <sup>Ab</sup>
	62,5	6,51±0,00 <sup>*B</sup>	-	-	7,37±0,19 <sup>B</sup>
	31,25	-	-	-	-

Dirençli ≤ 14, Orta derecede duyarlı 15-18, Duyarlı ≥ 19 (NCCLS, 1991).

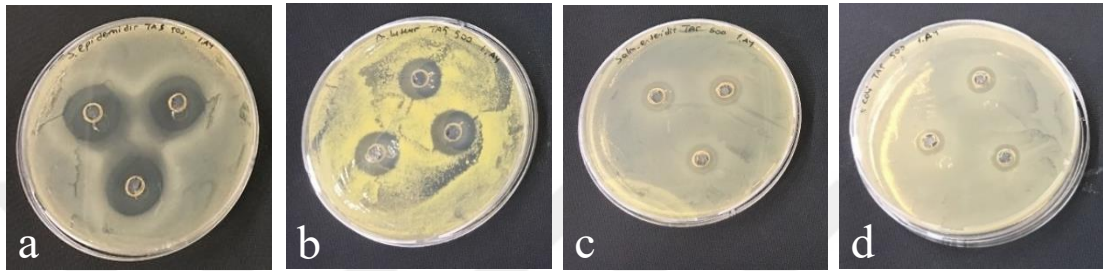
Büyük harfler, m.organizmalar; küçük harfler aylar arası istatistiki olarak farklılığı göstermektedir (p≤0,05).

\*Sekonder zon çapları hesaplamaya dahil edilmiştir. (-) Zon oluşumu gözlenmedi.

*S. epidermidis*'in taze arı sütüne duyarlı olduğu, *E. coli* ve *S. Enteritidis*'in tüm örnekler ve konsantrasyonlara direnç gösterdiği belirlenmiştir (NCCL, 1991). Çizelge 4.2 ve 4.3'de test bakterilerine ait zon çapları incelendiğinde Gram pozitif bakterilerin,

Gram negatif bakterilere göre daha duyarlı olduğu görülmüştür. Taze arı sütünün oluşturduğu zonlara ait görseller Şekil 4.1’de verilmiştir.

Moselhy ve diğ. (2013) tarafından Gram pozitif (*S. aureus*, *B. subtilis*) ve Gram negatif (*P. aeruginosa*, *E. coli*) bakteriler üzerinde farklı orijine sahip arı sütlerinin kıyaslandığı bir çalışmada, Gram pozitif bakterilerin duyarlı ve orta derece duyarlı oldukları görülürken Gram negatif bakterilerin direnç gösterdiği ve birçok konsantrasyonda inhibisyon zonlarının oluşmadığı bildirilmiştir.



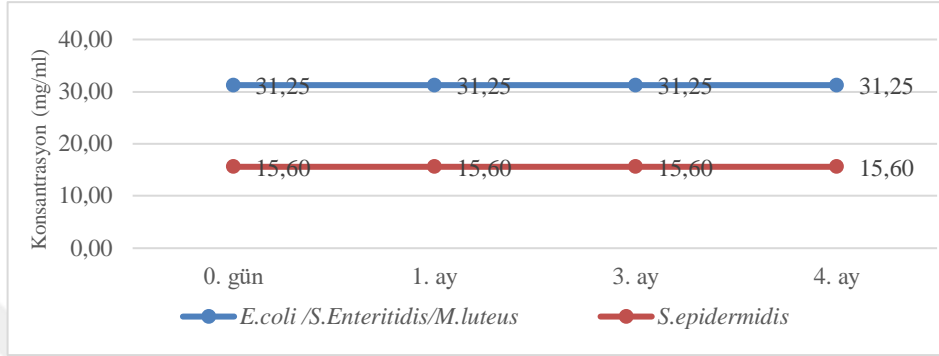
**Şekil 4.1:** Taze arı sütünün (1.ay) 500 mg/mL’lik konsantrasyonun test bakterileri üzerinde belirlenmiş inhibisyon zon çapları (mm).

(a: *S.epidermidis*, b: *M.luteus*, c: *S. Enteritidis*, d: *E.coli*)

TAS ve MAS’ın 125 mg/mL’lik konsantrasyonlarının meydana getirdiği zonlar kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p<0,05$ ). *S. epidermidis* ve *M. luteus*’a ait MİK değerlerinin mikroenkapsülasyon sonrası değişmediği belirlenmiştir. Duyarlı bakteriler üzerinde antimikrobiyal aktivitenin korunduğu, dirençli bakterilerde etkinliğin bir miktar azaldığı tespit edilmiştir. Dirençli bakteriler üzerindeki bu etki azalışının, enkapsülasyon sonrası 10-HDA dışındaki antimikrobiyal bileşenlerin araştırılması ve olası değişimlerinin belirlenmesi ile net olarak açıklanabileceği düşünülmektedir. Her iki test yöntemine ait sonuçlar değerlendirildiğinde, mikroenkapsülasyon sonrası antimikrobiyal aktivitenin genel olarak korunduğu görülmektedir.

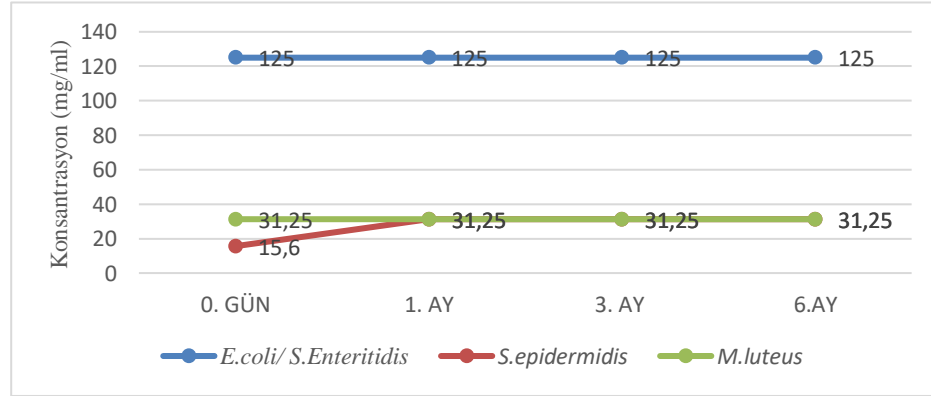
Bu çalışmanın arı sütünün mikroenkapsüle edildiği ilk çalışma olması sebebiyle; antimikrobiyal aktivite ve depolama süresine bağlı muhtemel değişimlerin belirlenmesi literatüre önemli katkı sağlamaktadır.

Depolama sürecinde antimikrobiyal aktivitedeki olası değişiminin takip edilmesi amacıyla; taze arı sütü buzdolabı koşullarında, mikroenkapsüle arı sütü oda koşullarında altı ay süre ile muhafaza edilmiştir. Antimikrobiyal aktivitedeki değişim Çizelge 4.1’te verilmiştir. Taze arı sütünün minimum inhibisyon konsantrasyonunun *S. epidermidis* için 15,6 mg/mL, diğer bakteriler için 31,25 mg/mL olduğu ve depolama süresince bu değerlerin korunduğu görülmüştür (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2:** Taze arı sütünün depolama sürecinde test bakterilerine ait MİK değişimleri.

Taze ve mikroenkapsüle arı sütleri kıyaslandığında, mikroenkapsüle arı sütünün *E. coli* ve *S. Enteritidis* gibi Gram negatif bakteriler üzerinde daha yüksek konsantrasyonlarda inhibisyon sağladığı, bununla birlikte oda sıcaklığında depolama sürecinde mevcut antimikrobiyal aktiviteyi muhafaza ettiği saptanmıştır (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3:** Mikroenkapsüle arı sütünün depolama sürecinde test bakterilerine ait MİK değişimleri.

Mikroenkapsüle arı sütünün *S. epidermidis* üzerindeki inhibisyon etkisi birinci ayda azalırken, diğer bakteriler üzerindeki etkinlikte değişim gözlenmemiştir. *S. epidermidis* üzerine etkisi olan arı sütü bileşenlerinin mikroenkapsülasyon işlemi ve depolama süresi sonunda değişim göstermiş olabileceği, bu nedenle antimikrobiyal aktivitenin azaldığı düşünülmektedir.

TAS ve MAS'ın depolama sürecinde antimikrobiyal aktivitesinin karşılaştırılması amacıyla 125 mg/mL'lik konsantrasyonlar incelendiğinde; 0. gün sonuçlarında TAS ve MAS'ın bakteriler üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p < 0,05$ ). *S. epidermidis* ve *M. luteus*'a ait inhibisyon zon çapları 1. ay sonunda değişiklik gösterirken, *E. coli* üzerinde TAS ve MAS'ın 3. ay sonunda farklı inhibisyon zonları oluşturduğu saptanmıştır. *S. Enteritidis*'te başlangıç ve takip eden aylarda her iki ürün için benzer zon çapları ölçülürken, 6. ayda inhibisyon zonu oluşmadığı görülmüştür. Farklı depolama sürelerinde TAS ve MAS'ın inhibisyon zon çaplarının aylara ve uygulanan konsantrasyonlara bağlı olarak azaldığı, bununla birlikte inhibisyon zonlarındaki değişimin gerçekleştiği aylar ve zon çaplarındaki azalış miktarının bakterilere göre değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3).

Ragab ve Ibrahim (1999) tarafından buzdolabı koşullarında 12 ay süreyle muhafaza edilen arı sütünün antimikrobiyal aktivitesinde önemli bir azalma olmadığı belirtilmiştir. Bununla birlikte; taze arı sütünün buzdolabı koşullarında ve  $-40^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilerek antimikrobiyal aktivitesinin incelediği bir diğer çalışmada, her iki saklama yönteminde de etkinliğin azaldığı bildirilmiştir (Maksimović ve Rifatbegović, 2009). Ratanavalachai ve Wongchai (2002) on iki saat ile yedi gün arasında değişen sürelerde; dondurulmuş, buzdolabı ve oda koşullarında muhafaza edilmiş arı sütlerinin tamamında üçüncü gün sonunda antibakteriyel etkinlikte düşüş tespit edildiğini bildirmişlerdir. Araştırma sonuçları arasındaki farklılıkların arı sütü örnekleri ve kullanılan yöntemlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

#### **4.2 Taze ve Mikroenkapsüle Arı Sütünün Başlangıç (0. Gün) ve Farklı Depolama Sürelerindeki Antifungal Aktivitesinin Değerlendirilmesi**

TAS ve MAS örneklerine ait 0. gün sonuçları Çizelge 4.4'de verilmiştir. Taze arı sütünün minimum inhibisyon konsantrasyonu, her iki maya türünde 15,6 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Mikroenkapsüle arı sütünün MİK değeri ise 62,5 mg/mL'dir. Taze arı sütünün 0. güne ait minimum inhibisyon konsantrasyonu her iki küf için 31,25 mg/mL bulunmuştur. Arı sütünün mikroenkapsülasyonu sonucu *A. flavus*'a ait MİK değerinin değişmediği, buna karşın *P. digitatum* üzerinde etkinliğin bir miktar azaldığı görülmüştür.

**Çizelge 4.4:** Taze ve mikroenkapsüle arı sütünün farklı depolama sürelerinde test maya ve küfleri üzerinde belirlenmiş MİK/MFK değerleri (mg/mL).

Süre	Maya/Küf	TAS		MAS	
		MİK	MFK	MİK	MFK
0.gün	<i>C. albicans</i>	15,6	31,25	62,5	125
	<i>C. parapsilosis</i>	15,6	250	62,5	>125*
	<i>A. flavus</i>	31,25	125	31,25	>125
	<i>P. digitatum</i>	31,25	125	62,5	>125
1. ay	<i>C. albicans</i>	15,6	62,5	62,5	125
	<i>C. parapsilosis</i>	15,6	125	62,5	>125
	<i>A. flavus</i>	31,25	125	31,25	>125
	<i>P. digitatum</i>	31,25	125	62,5	>125
3.ay	<i>C. albicans</i>	15,6	62,5	62,5	125
	<i>C. parapsilosis</i>	15,6	250	125	>125
	<i>A. flavus</i>	62,5	500	125	>125
	<i>P. digitatum</i>	62,5	125	62,5	>125
6. ay	<i>C. albicans</i>	15,6	62,5	62,5	>125
	<i>C. parapsilosis</i>	15,6	250	125	>125
	<i>A. flavus</i>	62,5	500	125	>125
	<i>P. digitatum</i>	62,5	250	62,5	>125

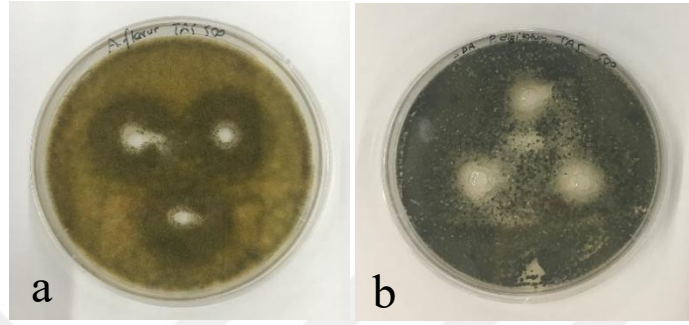
\* >125 mg/mL dozlarında yaşanan çözünürlük problem nedeniyle MAS için max. doz 125 mg/mL olarak denemiştir.

Arı sütünün metanol ve diklorometan ekstraktlarının *C. albicans* üzerindeki antifungal aktivitesinin incelendiği bir çalışmada, minimum inhibisyon konsantrasyonu sırasıyla 1,25 mg/mL ve 1,34 mg/mL olarak belirlenmiştir (Melliou ve Chinou, 2005).

Koç ve diğ. (2011) tarafından, *C. albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* ve *Trichosporon* cinsi mayalara ait 40 farklı suşun antifungal aktivitesinin incelendiği bir diğer araştırmada; liyofilize edilmiş arı sütünün belirtilen mikroorganizmalar üzerinde 0.06–1 µg/mL konsantrasyonlarda inhibisyon sağladığı bildirilmiştir.

İki farklı orijine sahip arı sütünün antifungal aktivitesinin incelendiği bir çalışmada, arı sütünün *C. albicans* üzerindeki MİK değerleri sırasıyla 125 µg/mL ve 62,5 µg/mL bulunmuştur (Moselhy ve diğ, 2013). Aynı çalışmada, *A. fumigatus* ve *A. niger* üzerinde arı sütünün 31,25 ile 62,5 µg/mL'lik konsantrasyonlarının inhibisyon sağladığı belirtilmiştir. Mevcut çalışmalarda tespit edilen MİK değerlerinin, çalışmamızda elde edilen minimum inhibisyon konsantrasyonlarından düşük olduğu görülmüştür. Bu durumun, arı sütü orijini farklılığından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

Kuyucuk difüzyon yöntemi kullanılarak yapılan antifungal aktivite testlerinde, arı sütünün maya ve küf oluşumunu inhibe etmede yetersiz kaldığı görülmüştür. Bununla birlikte kuyucuk etrafından alınan preparatlara yapılan mikroskopik incelemede, petrinin diğer bölgelerine kıyasla arı sütü uygulanan kısımlarda küflerin sporlanmaya teşvik edildiği belirlenmiştir ve sporlanmanın gerçekleştiği bu bölgelere ait zonlar ölçülmüştür (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4:** Taze arı sütünün (1. ay) 500 mg/mL'lik konsantrasyonunun test küfleri üzerinde belirlenmiş inhibisyon zon çapları (mm). (a: *A. flavus*, b: *P. digitatum* )

Taze ve mikroenkapsüle arı sütlerinin inhibisyon zonları Çizelge 4.5 ve 4.6'da verilmiştir. 0. Gün sonuçlarında TAS ve MAS'ın küfler üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları arasında, istatikselsel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p < 0,05$ ). TAS ve MAS'ın 125 mg/mL'lik konsantrasyonlarına ait inhibisyon zonları kıyaslandığında, mikroenkapsülasyon işlemi sonrasında antifungal aktivitenin korunduğu görülmüştür.

Taze arı sütünün 125 ve 250 mg/mL'lik konsantrasyonları, 3. ve 6. ayda *P. digitatum* üzerinde sporlanma zonu oluşturmada yetersiz kalmıştır. *A. flavus* üzerinde tüm konsantrasyonlarda zon oluşumu görülmüştür. Mikroenkapsüle arı sütünün depolama süresi boyunca *A. flavus* üzerinde etkinliği devam ederken, *P. digitatum*' ait petrilere 1. ay sonunda sporlanma zonu oluşmamıştır.

**Çizelge 4.5 :** Taze arı sütünün faklı depolama sürelerinde test küfleri üzerinde belirlenmiş zon çapları (mm).

Konsantrasyon (mg/mL)		<i>A. flavus</i>	<i>P. digitatum</i>
0.gün	500	28,93±1,01 <sup>Aa</sup>	16,69±0,26 <sup>Ba</sup>
	250	27,92±0,23 <sup>Aa</sup>	15,01±0,73 <sup>Ba</sup>
	125	27,30±0,28 <sup>Aa</sup>	14,92±0,44 <sup>Ba</sup>
1.ay	500	28,71±0,39 <sup>Aa</sup>	14,35±0,48 <sup>Bb</sup>
	250	25,92±1,00 <sup>Aab</sup>	14,38±0,64 <sup>Ba</sup>
	125	25,67±1,61 <sup>Aab</sup>	14,64±1,28 <sup>Ba</sup>
3.ay	500	27,99±0,47 <sup>Aa</sup>	13,40±0,33 <sup>*Bb</sup>
	250	25,54±0,19 <sup>b</sup>	-
	125	24,62±0,37 <sup>b</sup>	-
6.ay	500	24,93±0,37 <sup>Ab</sup>	13,05±0,35 <sup>B</sup>
	250	25,28±0,26 <sup>b</sup>	-
	125	22,56±0,42 <sup>c</sup>	-

Dirençli ≤ 14, Orta derecede duyarlı 15-18, Duyarlı ≥ 19 (NCCLS, 1991).

Büyük harfler, m.organizmalar; küçük harfler aylar arası istatistiki olarak farklılığı göstermektedir (p≤0,05).

\*Sekonder zon çapları hesaplamaya dahil edilmiştir. (-) Zon oluşumu gözlenmedi.

**Çizelge 4.6 :** Mikroenkapsüle arı sütünün faklı depolama sürelerinde test küfleri üzerinde belirlenmiş zon çapları (mm).

Konsantrasyon (mg/mL)		<i>A. flavus</i>	<i>P. digitatum</i>
0.gün	125	25,19±0,45 <sup>Aa</sup>	14,83±0,15 <sup>Ba</sup>
	62,5	22,34±0,28 <sup>a</sup>	-
	31,25	-	-
1.ay	125	21,70±0,81 <sup>ab</sup>	-
	62,5	20,03±0,89 <sup>ab</sup>	-
	31,25	13,08±1,04 <sup>*</sup>	-
3.ay	125	22,14±3,44 <sup>*b</sup>	-
	62,5	22,14±0,00 <sup>a</sup>	-
	31,25	-	-
6.ay	125	25,41±1,25 <sup>a</sup>	-
	62,5	19,41±0,64 <sup>b</sup>	-
	31,25	16,85±0,69	-

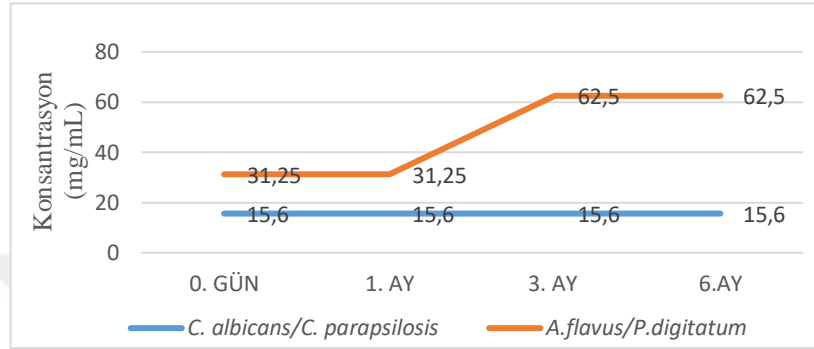
Dirençli ≤ 14, Orta derecede duyarlı 15-18, Duyarlı ≥ 19 (NCCLS, 1991).

Büyük harfler, m.organizmalar; küçük harfler aylar arası istatistiki olarak farklılığı göstermektedir (p≤0,05).

\*Sekonder zon çapları hesaplamaya dahil edilmiştir. (-) Zon oluşumu gözlenmedi.

Literatürde arı sütünün antifungal aktivitesi üzerine araştırmalar bulunmasına rağmen, depolama sürecinde antifungal aktivitenin değişimine dair çalışma bulunmamaktadır. Bu sebeple taze ve mikroenkapsüle arı sütünün depolama sürecinde antifungal aktivitesindeki değişimin izlenmesi önem kazanmaktadır.

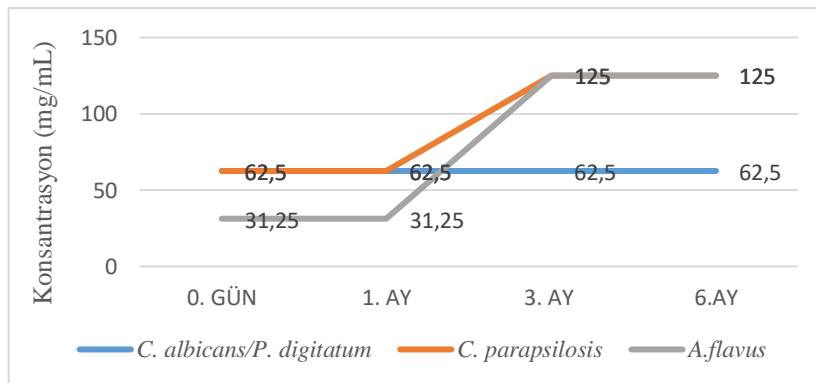
Çalışmada, her iki arı sütü örneğinin *C. albicans* üzerindeki antimikrobiyal etkinliği (MİK: 15,6 mg/mL) 6 ay süre ile korunmuştur. Taze arı sütünün *C. parapsilosis* üzerindeki etkinliği (MİK: 62,5 mg/mL) çalışma sonuna kadar devam etmesine rağmen, mikroenkaspüle arı sütünün 3. ay'da MİK değerinin artarak 125 mg/mL olduğu saptanmıştır. Test edilen her iki küf örneğinde TAS ve MAS'a ait MİK değerlerinin 3. ayda arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).



**Şekil 4.5:** Taze arı sütünün depolama sürecinde test maya ve küflerine ait MİK değişimleri.

Elde edilen MİK sonuçları mayaların taze arı sütüne karşı küflerden hassas olduğunu göstermiştir. Depolama süresi boyunca mayalar üzerindeki etkinlik devam ederken, küflerde minimum inhibisyon değerinin 31,25 mg/mL'den 62,5 mg/mL'ye artış gösterdiği saptanmıştır.

Mikroenkaspüle arı sütünde *C. albicans* ve *P. digitatum*'un aynı MİK değerlerine sahip olduğu ve depolama sürecinde MİK değerlerinin değişmediği belirlenmiştir. MAS'ın depolama süresi boyunca antifungal aktivite kaybı en fazla *A. flavus* üzerinde tespit edilmiştir.



**Şekil 4.6:** Mikroenkaspüle arı sütünün depolama sürecinde test maya ve küflerine ait MİK değişimleri.



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada taze ve mikroenkapsüle arı sütünün antimikrobiyal etkinliği depolama süresi boyunca çeşitli bakteri, maya ve küfler üzerinde denenmiştir. Buna göre;

- Her iki ürünün antimikrobiyal etkisinin konsantrasyon artışına bağlı olarak artış gösterdiği saptanmıştır. Test edilen bakteriler arasında, arı sütüne karşı en hassas bakterinin *S. epidermidis* olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan, her iki ürünün, çalışmada yer alan bakteriler üzerindeki MİK ve zon çapları dikkate alındığında; Gram pozitif bakterilerin, Gram negatif bakterilere kıyasla daha duyarlı olduğu görülmüştür.
- Arı sütünün antifungal özellikleri, MİK konsantrasyonları üzerinden incelendiğinde; mayaların her iki ürüne karşı küflerden daha hassas olduğu gözlenmiştir.
- Çalışmada test mikroorganizmalarının genelinde MBK/MFK değerlerinin MİK değerinden yüksek olduğu görülmüştür. Bununla birlikte; literatürde bulunan diğer çalışmalara kıyasla, MİK ve MBK/MFK değerleri arasındaki farklılığın çok geniş aralıkta olmadığı gözlenmiştir. Minimum inhibisyon ve bakterisidal konsantrasyonlar arasındaki farklılık, test edilen mikroorganizmaya göre değişmektedir. Mayalar ve küfler üzerinde MİK ve MFK değerleri arasındaki fark bakterilere kıyasla fazladır.
- Arı sütünün mikroenkapsülasyon işlemi sonrasında; duyarlı mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal aktivitesinde herhangi bir azalış gözlenmezken, dirençli bakteri, maya ve küflerde ise etkinliğin bir miktar azaldığı tespit edilmiştir.
- MAS'ın antimikrobiyal aktivitesi, mikroorganizmanın tür ve yapısal özelliklerine göre farklılık göstermektedir. Mikroenkapsüle ürün, 10-HDA'nın korunması esasıyla formüle edilmiş olup, bu üründeki diğer antimikrobiyal bileşiklerin takibi ve olası değişimlerinin izlenmesi gelecek çalışmalar için önem arz etmektedir.

- Depolama süresi boyunca; taze ve mikroenkapsüle arı sütünün test mayaları ve bazı bakteriler (*M. luteus*, *E. coli*, *S. Enteritidis*) üzerindeki antimikrobiyal etkisi aynı kalmıştır. Ancak test edilen küfler üzerinde TAS ve MAS'a ait MİK değerlerinin 3. ayda arttığı görülmüştür.
- TAS ve MAS'ın bakteriler ve küfler üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p < 0,05$ ). Takip eden aylar içerisinde inhibisyon zonlarındaki değişimin mikroorganizma ve uygulanan konsantrasyonlara göre her iki üründe de farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.
- *A. flavus* üzerinde tüm konsantrasyonlarda sporlanma zonu olduğu görülmüştür. Mikroenkapsüle arı sütünün depolama süresi boyunca *A. flavus* üzerinde etkinliği devam ederken, *P. digitatum* üzerinde benzer etki görülememiştir.
- Depolama süresince TAS'ın buzdolabı koşullarında mevcut aktiviteyi devam ettirdiği, MAS'ın oda sıcaklığında antimikrobiyal aktiviteyi koruduğu görülmüştür. Ancak mikroenkapsüle ürünü ön plana çıkaran en önemli noktanın ürünün oda sıcaklığında 6 ay boyunca depolanarak antimikrobiyal özelliğini halen korumasıdır. Böylece arı sütü soğuk zincir zorunluluğundan kurtarılarak, ürüne taşıma ve depolama kolaylığı sağlanmıştır. İlave olarak depolama maliyetlerinin düşürülmesi ile arı sütü üreticilerine önemli katkı sağlayacak nitelikte bir ürün olduğu düşünülmektedir.

Çalışmada, TAS ve MAS antimikrobiyal aktiviteleri açısından kıyaslanmış ve bu iki ürünün 1., 3. ve 6. ay depolama sonundaki antimikrobiyal etkileri değerlendirilmiştir. Mikroenkapsülasyon sonrasında antimikrobiyal aktivitenin devam ettiği görülmüştür. Bazı mikroorganizmalarda görülen etkinlik kaybının; enkapsülasyon sonrası, ürün içeriğindeki antimikrobiyal bileşen miktarının değişiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Mikroenkapsüle ürünün tüm bileşenlerinin kapsamlı olarak incelenerek, taze ürüne kıyasla varsa farklılıklarının belirlenmesi son derece önemlidir. Ayrıca gelecek çalışmalarda; test mikroorganizmalarının sayısı ve çeşitliliği artırılarak, antimikrobiyal aktivitenin incelenmesi ürün hakkında daha kapsamlı bilgi elde edilmesini sağlayacaktır.

Elde edilen sonuçlar ışığında; mikroenkapsüle ürünün farklı materyal ve yöntemler ile yeni formülasyonlarının geliştirilmesi ve hatta antimikrobiyal aktivitenin artırılması yönünde olası formülasyonların hazırlanması mümkündür.

Mikroenkapsüle arı sütü; piyasada bulunan ürünlere alternatif olması, soğuk zincirde muhafaza gerektirmemesi ve kullanım kolaylığı açısından yüksek potansiyele sahip bir üründür. Bu yöntem ile arı sütünün su miktarı azaltılmış ve ürüne daha kararlı bir yapı kazandırılmıştır. Arı sütünün gerek insan vücudunda, gerekse kullanımı hedeflenen gıdaların içerisinde kontrollü salımına olanak sağlanmıştır.

Mikroenkapsüle arı sütünün antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesi, ürünün biyolojik aktivitesi hakkında önemli bilgiler vermektedir. Ancak bu çalışmanın devamında, tüketim ve muhafaza koşullarını iyileştiren bu yöntem ile üretilen arı sütünün, diğer tüm biyolojik özellikleri ve kimyasal profilinin de incelenmesi gerektiği düşünülmektedir.

Elde edilen sonuçlar enkapsülasyon işlemi sonrası antimikrobiyal aktivitenin korunduğu ve oda sıcaklığında saklanan üründe bu aktivitenin devam ettiği yönündedir. Ürünün tüm yönleriyle irdelendiği gelecek çalışmalar ile mikroenkapsüle arı sütünün ticari üretimi ve pazarlamasını mümkün kılacaktır. Çalışmada elde edilen veriler bu araştırmaların artmasına öncülük edecektir.

## KAYNAKLAR

- Abdelatif, M., Yakoot, M. ve Etmaan, M. (2008).** *Safety and efficacy of a new honey ointment on diabetic foot ulcers: a prospective pilot study.* Journal of Wound Care, 17 (3), 108-110.
- Ahmadnia, H., Sharifi, N., Alizadeh, S., Roohani, Z., Kamalati, A. ve Marjan, S. S. (2015).** *Wonderful effects of royal jelly on treatment of male-factor related infertility.* Austin Journal of Reproductive Medicine & Infertility, 2 (6), 1031.
- Ahmed, M. M., El-Shazly, S. A., Alkafafy, M. E., Mohamed, A. A., & Mousa, A. A. (2018).** *Protective potential of royal jelly against cadmium-induced infertility in male rats.* Andrologia, 50 (5).
- Akyol, E. (2015).** *Arı sütünün yapısı, insanlar ve arılar için önemi.* Uludağ Arıcılık Dergisi, 15(1), 16-21.
- Al-Kushi, A. G., Header, E. A., ElSawy, N. A., Moustafa, R. A., & Alfky, N. A. A. (2018).** *Antioxidant effect of royal jelly on immune status of hyperglycemic rats.* Pharmacognosy Magazine, 14(58), 528.
- Almeer, R. S., Alarifi, S., Alkahtani, S., Ibrahim, S. R., Ali, D., & Moneim, A. (2018).** *The potential hepatoprotective effect of royal jelly against cadmium chloride-induced hepatotoxicity in mice is mediated by suppression of oxidative stress and upregulation of Nrf2 expression.* Biomedicine & Pharmacotherapy, 106, 1490-1498.
- Amirshahi, T., Najafi, G., & Nejati, V. (2014).** *Protective effect of royal jelly on fertility and biochemical parameters in bleomycin- induced male rats.* Iranian journal of reproductive medicine, 12(3), 209.
- Anonim, 2017.** Civan Arıcılık LTD. ŞTİ.
- Antinelli, J. F., Zeggane, S., Davico, R., Rognone, C., Faucon, J. P., & Lizzani, L. (2003).** *Evaluation of (E)-10-hydroxydec-2-enoic acid as a freshness parameter for royal jelly.* Food chemistry, 80(1), 85-89.
- Arendrup M.C., Howard S., Lass-Florl C., Mouton J.W., Meletiadis J., Cuenca-Estrella M. (2014).** *EUCAST testing of isavuconazole susceptibility in Aspergillus: Comparison of results for inoculum standardization using conidium counting versus optical density.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 58: 6432-6436.
- Azad, F., Najati, V., Najafi, G., & Rahmani, F. (2018).** *The protective effect of royal jelly on testicular tissue and sperm parameters in adult mice treated with nicotine.* Journal of Babol University of Medical Sciences, 20(3), 50-58.
- Baggio, N., & Dainese, N. (1998).** Royal jelly quality during storage [bee products]. Industrie Alimentari (Italy).
- Balch, P. A. ve Balch, J. F. 2000.** Prescription for Nutritional Healing. Avery, New York.

- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016).** *Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review.* Journal of pharmaceutical analysis, 6(2), 71-79.
- Barnuti, L. I., Marghitas, L. A., Dezmirean, D. S., Bobis, O., Mihai, C. M. & Pavel, C. (2011).** *Antimicrobial compounds of royal jelly, bulletin of university of agricultural sciences and veterinary medicine cluj- napoca.* Animal Science and Biotechnologies, 68 (1-2).
- Bărnăuțiu, L. I., Mărghitaș, L. A., Dezmirean, D. S., Mihai, C. M., & Bobiș, O. (2011).** *Chemical composition and antimicrobial activity of royal jelly-review.* Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies, 44(2), 67-72.
- Bíliková, K., Huang, S. C., Lin, I. P., Šimůth, J., & Peng, C. C. (2015).** *Structure and antimicrobial activity relationship of royalisin, an antimicrobial peptide from royal jelly of Apis mellifera.* Peptides, 68, 190-196.
- Bíliková, K., Mirgorodskaya, E., Bukovská, G., Gobom, J., Lehrach, H., & Šimůth, J. (2009).** *Towards functional proteomics of minority component of honeybee royal jelly: The effect of post-translational modifications on the antimicrobial activity of apalbumin 2.* Proteomics, 9(8), 2131-2138.
- Bíliková, K., Wu, G., & Šimůth, J. (2001).** *Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoulbrood factor.* Apidologie, 32(3), 275-283.
- Blum, M. S., Novak, A. F., & Taber, S. (1959).** *10-hydroxy- $\Delta$ 2-decenoic acid, an antibiotic found in royal jelly.* Science, 130(3373), 452-453.
- Bogdanov, S. (2011).** *Royal jelly, bee brood: composition, health, medicine: a review.* Lipids, 3(8), 8-19.
- Bogdanov, S. (2012).** *The Royal Jelly Book, Bee Product Science,* 1-14.
- Boukraa, L. (2008).** *Additive activity of royal jelly and honey against Pseudomonas aeruginosa.* Altern Med Rev, 13(4), 330-3.
- Boukraâ, L., Meslem, A., Benhanifia, M., & Hammoudi, S. M. (2009).** *Synergistic effect of starch and royal jelly against Staphylococcus aureus and Escherichia coli.* The Journal of Alternative and Complementary Medicine, 15(7), 755-757.
- Bucekova, M., & Majtan, J. (2016).** *The MRJP1 honey glycoprotein does not contribute to the overall antibacterial activity of natural honey.* European Food Research and Technology, 242(4), 625-629.
- Butenandt, A., & Rembold, H. (1957).** *Über den Weiselzellenfuttersaft der Honigbiene I. Isolierung, Konstitutionsermittlung und Vorkommen der 10-hydroxy- $\Delta$ 2-decensäure.* Hoppe-Seyler' s Zeitschrift für physiologische Chemie, 308(1), 284-289.
- Caixeta, D. C., Teixeira, R. R., Peixoto, L. G., Machado, H. L., Baptista, N. B., de Souza, A. V., ... & Espindola, F. S. (2018).** *Adaptogenic potential of royal jelly in liver of rats exposed to chronic stress.* PloS one, 13(1).
- Capparelli, R., De Chiara, F., Nocerino, N., Montella, R. C., Iannaccone, M., Fulgione, A., ... & Capuano, F. (2012).** *New perspectives for natural antimicrobial peptides: application as antiinflammatory drugs in a murine model.* BMC immunology, 13(1), 61.
- Chen, C., & Chen, S. Y. (1995).** *Changes in protein components and storage stability of royal jelly under various conditions.* Food chemistry, 54(2), 195-200.

- Chen, Y. F., You, M. M., Liu, Y. C., Shi, Y. Z., Wang, K., Lu, Y. Y., & Hu, F. L. (2018).** *Potential protective effect of Trans-10-hydroxy-2-decenoic acid on the inflammation induced by Lipoteichoic acid.* Journal of functional foods, 45, 491-498.
- Chiu, H. F., Chen, B. K., Lu, Y. Y., Han, Y. C., Shen, Y. C., Venkatakrisnan, K., ... & Wang, C. K. (2017).** *Hypocholesterolemic efficacy of royal jelly in healthy mild hypercholesterolemic adults.* Pharmaceutical biology, 55(1), 497-502.
- Cho, Y. T. (1977).** *Studies on royal jelly [from honey-bees] and abnormal cholesterol and triglycerides [in relation to treating heart disease with diet regulation].* American Bee Journal.
- Clarke, M. ve McDonald, P., (2017).** Market Opportunity Australian Royal Jelly produced with New Labour Saving Technology, Publication No. 17/017, Project No. PRJ-010167. Rural Industries Research and Development Corporation.
- CLSI. (2015).** Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI document M07-A10. Wayne, PA.
- CLSI. (2008).** Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing Filamentous Fungi, Approved Standard, 2nded., CLSI document M38-A2, 950 West Valley Roadn Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA.
- Cridge, A., Leask, M., Duncan, E., & Dearden, P. (2015).** *What do studies of insect polyphenisms tell us about nutritionally-triggered epigenomic changes and their consequences?.* Nutrients, 7(3), 1787-1797.
- Çavuşoğlu, K., Yapar, K. ve Yalçın, E. (2009).** *Royal jelly (honey bee) is a potential antioxidant against cadmium-induced genotoxicity and oxidative stress in albino mice.* Journal of medicinal food, 12 (6), 1286-1292.
- Dias, M. I., Ferreira, I. C., & Barreiro, M. F. (2015).** *Microencapsulation of bioactives for food applications.* Food & function, 6(4), 1035-1052.
- Dinkov, D., Stratev, D., & Balkanska, R. (2014).** *In vitro antibacterial activity of royal gelly against pathogen escherichia coli.* Veterinary Journal of Republic of Srpska/Veterinarski Zurnal Republika Srpske, 14(2).
- Dinkov, D., Stratev, D., Balkanska, R., & Sergelidis, D. (2016).** *Antibacterial activity of royal jelly and rape honey against methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains.* Journal of Food and Health Science, 2, 67-73.
- Do Nascimento, T. G., Redondo, G. D., de Araújo Abreu, C. T., Silva, V. C., Lira, G. M., Grillo, L. A. M., ... & Basílio-Júnior, I. D. (2019).** *Modified release microcapsules loaded with red propolis extract obtained by spray-dryer technique.* Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 1-11.
- El-Abbasi, A., El Fadeli, S. A. N. A., El-Bouzidi, L. A. I. L. A., Lahrouni, M. A. J. I. D. A., & Nauman, K. H. A. L. I. D. (2015).** *Recent advances in microencapsulation of bioactive compounds.* Analytical and Processing Techniques, 41, 129-146.
- Eshraghi, S., & Seifollahi, F. (2003).** *Antibacterial effects of royal jelly on different strains of bacteria.* Iranian journal of public health, 25-30.
- EUCAST. (2015).** Method for susceptibility testing of moulds; For the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. Copenhagen, Denmark.

- Fan, P., Han, B., Feng, M., Fang, Y., Zhang, L., Hu, H., ... & Li, J. (2016).** *Functional and proteomic investigations reveal major royal jelly protein 1 associated with anti-hypertension activity in mouse vascular smooth muscle cells.* Scientific reports, 6, 30230.
- Feng, M., Fang, Y., Han, B., Xu, X., Fan, P., Hao, Y., ... & Wu, B. (2015).** *In-depth N-glycosylation reveals species-specific modifications and functions of the royal jelly protein from Western (*Apis mellifera*) and Eastern Honeybees (*Apis cerana*).* Journal of proteome research, 14(12), 5327-5340.
- Fontana, R., Mendes, M. A., De Souza, B. M., Konno, K., César, L. M. M., Malaspina, O., & Palma, M. S. (2004).** *Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*).* Peptides, 25(6), 919-928.
- Fossati, C. (1972).** *Therapeutic possibilities of royal jelly.* La Clinica terapeutica, 62 (4), 377-387.
- Fratini, F., Cilia, G., Mancini, S. ve Felicioli, A. (2016).** *Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties.* Microbiological research, 192, 130-141.
- Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., & Kobayashi, K. (1990).** *A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin.* Journal of biological chemistry, 265(19), 11333-11337.
- García, M. C., Finola, M. S., & Marioli, J. M. (2010).** *Antibacterial activity of royal jelly against bacteria capable of infecting cutaneous wounds.* Journal of Apiproduct and Apimedical Science, 2(3), 93-99.
- Garcia, M. C., Finola, M. S., & Marioli, J. M. (2013).** *Bioassay directed identification of royal jelly's active compounds against the growth of bacteria capable of infecting cutaneous wounds.* Advances in Microbiology, 3(02), 138.
- Garcia-Amoedo, L. H., & Almeida-Muradian, L. B. D. (2007).** *Physicochemical composition of pure and adulterated royal jelly.* Química Nova, 30(2), 257-259.
- Gasic, S., Vucevic, D., Vasilijic, S., Antunovic, M., Chinou, I. ve Colic, M. (2007).** *Evaluation of the immunomodulatory activities of royal jelly components in vitro.* Immunopharmacology and Immunotoxicology, 29 (3-4), 521-536.
- Ghanbari, E., Khazaei, M. R., Khazaei, M., & Nejati, V. (2018).** *Royal jelly promotes ovarian follicles growth and increases steroid hormones in immature rats.* International Journal of Fertility & Sterility, 11(4), 263.
- Ghanbari, E., Nejati, V., & Khazaei, M. (2016).** *Improvement in serum biochemical alterations and oxidative stress of liver and pancreas following use of royal jelly in streptozotocin-induced diabetic rats.* Cell Journal (Yakhteh), 18(3), 362.
- Gouin, S. (2004).** *Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends.* Trends in Food Science & Technology, 15(7-8), 330-347.
- Gökbulut, İ., & Öztürk, F. S. (2018).** *Gıda Mikrokapsülasyonunda Aljinat Kullanımı.* Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi, 8(1/2), 16-28.
- Gökmen, S., Palamutoğlu, R., & Sarıçoban, C. (2012).** *Gıda endüstrisinde enkapsülasyon uygulamaları.* Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 7(1), 36-50.

- Gu, H., Song, I. B., Han, H. J., Lee, N. Y., Cha, J. Y., Son, Y. K., & Kwon, J. (2018).** *Antioxidant Activity of Royal Jelly Hydrolysates Obtained by Enzymatic Treatment.* Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 38(1), 135.
- Gunaldi, O., Daglioglu, Y. K., Tugcu, B., Kizilyildirim, S., Postalci, L., Ofluoglu, E., & Koksal, F. (2014).** *Antibacterial effect of royal jelly for preservation of implant-related spinal infection in rat.* Turkish Neurosurgery, 24(2), 249-252.
- Gunalp, R., Ulusoy, M., Celebier, I., & Keskin, N. (2018).** *Antifungal effect of royal jelly on Candida albicans.* Journal of Biotechnology, 280, S70-S71.
- Guo, H., Ekusa, A., Iwai, K., Yonekura, M., Takahata, Y. ve Morimatsu, F. (2008).** *Royal jelly peptides inhibit lipid peroxidation in vitro and in vivo.* Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 54 (3), 191-195.
- Guo, H., Kouzuma, Y. ve Yonekura, M. (2009).** *Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein.* Food Chemistry, 113 (1), 238-245.
- Hadi, A., Najafgholizadeh, A., Aydenlu, E. S., Shafiei, Z., Pirivand, F., Golpour, S., & Pourmasoumi, M. (2018).** *Royal jelly is an effective and relatively safe alternative approach to blood lipid modulation: A meta-analysis.* Journal of Functional Foods, 41, 202-209.
- Hashimoto, M., Kanda, M., Ikeno, K., Hayashi, Y., Nakamura, T., Ogawa, Y., Fukumitsu, H., Nomoto, H. ve Furukawa, S. (2005).** *Oral administration of royal jelly facilitates mRNA expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurofilament H in the hippocampus of the adult mouse brain.* Bioscience, biotechnology and biochemistry, 69 (4), 800-805.
- Hattori, N., Nomoto, H., Fukumitsu, H., Mishima, S. ve Furukawa, S. (2007).** *Royal jelly and its unique fatty acid, 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, promote neurogenesis by neural stem/progenitor cells in vitro.* Biomedical Research, 28 (5), 261-266.
- Hattori, N., Ohta, S., Sakamoto, T., Mishima, S. ve Furukawa, S. (2011).** *Royal jelly facilitates restoration of the cognitive ability in trimethyltin-intoxicated mice.* Evidence-based Complementary and Alternative Medicine.
- Hinglais, H., Hinglais, M., & Gautherie, J. (1956).** *Study of bactericidal and antibiotic power of royal jelly.* In Annales de l'Institut Pasteur (Vol. 91, No. 1, pp. 127-129).
- Howe, S. R., Dimick, P. S., & Benton, A. W. (1985).** *Composition of freshly harvested and commercial royal jelly.* Journal of Apicultural Research, 24(1), 52-61.
- Inoue, S. I., Koya-Miyata, S., Ushio, S., Iwaki, K., Ikeda, M., & Kurimoto, M. (2003).** *Royal jelly prolongs the life span of C3H/HeJ mice: correlation with reduced DNA damage.* Experimental Gerontology, 38(9), 965-969.
- Isidorow, W., Witkowski, S., Iwaniuk, P., Zambrzycka, M., & Swiecicka, I. (2018).** *Royal jelly aliphatic acids contribute to antimicrobial activity of honey.* Journal of Apicultural Science, 62(1), 111-123.
- Jackson, L. S., & Lee, K. (1991).** *Microencapsulation and the food industry.* Lebensm. Wiss. Technol, 24(4), 289-297.



**Kamakura, M., Mitani, N., Fukuda, T. ve Fukushima, M. (2001).** *Antifatigue effect of fresh royal jelly in mice.* Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 47 (6), 394-401.

**Kanbur, M., Eraslan, G., Beyaz, L., Silici, S., Liman, B. C., Altnordulu, Ş., & Atasever, A. (2009).** *The effects of royal jelly on liver damage induced by paracetamol in mice.* Experimental and Toxicologic Pathology, 61(2), 123-132.

**Karaali, A., Meydanoğlu, F. ve Eke, D. (1988).** *Studies on composition, freeze-drying and storage of Turkish royal jelly.* Journal of apicultural research, 27 (3), 182-185.

**Karaca, T., Bayiroglu, F., Yoruk, M., Kaya, M. S., Uslu, S., Comba, B. ve Mis, L. (2010).** *Effect of royal jelly on experimental colitis induced by acetic acid and alteration of mast cell distribution in the colon of rats.* European Journal of Histochemistry: EJH, 54 (4).

**Karadeniz A, Simsek N, Karakus E, Yildirim S, Kara A, Can I, Kisa F, Emre H, Turkeli M. 2011.** *Royal jelly modulates oxidative stress and apoptosis in liver and kidneys of rats treated with cisplatin.* OxidMed Cell Longev. 2011:981793. doi:10.1155/2011/981793.

**Karakoç B. R. (2018)** *Plastik ve doğal balmumu yükseklerde üretilen arı sütlerinin mikrobiyal yüklerinin, protein içeriklerinin ve antimikrobiyal etkinliklerinin araştırılması.* (Yükseklisans Tezi). Hacettepe Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Ankara.

**Kashima, Y., Kanematsu, S., Asai, S., Kusada, M., Watanabe, S., Kawashima, T., Nakamura, T., Shimada, M., Goto, T. ve Nagaoka, S. (2014).** *Identification of a novel hypocholesterolemic protein, major royal jelly protein 1, derived from royal jelly.* PloS one, 9 (8).

**Kim, B. Y., Lee, K. S., Jung, B., Choi, Y. S., Kim, H. K., Yoon, H. J., ... & Jin, B. R. (2019).** *Honeybee (Apis cerana) major royal jelly protein 4 exhibits antimicrobial activity.* Journal of Asia-Pacific Entomology, 22(1), 175-182.

**Kimura, Y. (2008).** *Antitumor and antimetastatic actions of various natural products.* In Studies in Natural Products Chemistry (pp. 35-76): Elsevier.

**Koç, M., Sakin, M., Ertekin, F. K. (2010).** *Mikroenkapsülasyon ve gıda teknolojisinde kullanımı.* Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 16 (1), 77-86.

**Korkmaz, A. ve Akyol, E. (2015).** *Arı Sütü Üretimi.* ISBN: 978-605-65564-0-1, Samsun.

**Korkmaz, A. ve Öztürk, C. (2010).** *Arı Sütü,* Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Samsun İl Tarım Müdürlüğü, Çiftçi Eğitimi ve Yayım Şubesi Yayınları.

**Koya-Miyata, S., Okamoto, I., Ushio, S., Iwaki, K., Ikeda, M., & Kurimoto, M. (2004).** *Identification of a collagen production-promoting factor from an extract of royal jelly and its possible mechanism.* Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 68(4), 767-773.

**Köseoğlu, M., Yücel, B., Gökbulut, C., Konak, R., & Bircan, C. (2013).** *Hasat zamanının arı sütünün kimi biyokimyasal ve iz element kompozisyonları üzerine etkisi.* Kafkas Üni. Vet. Fak. Dergisi, 19(2), 233-237.

- Krishna Sailaja, A., & Jyothika, M. (2014).** *A review on microcapsules.* CIBTech Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 4.
- Kumova, U. ve Korkmaz, A. (2000).** *Doğanın harika ürünü arı sütü.* Bilim ve Teknik, 395, 96-101.
- Kurkure, N. V., Kognole, S. M., Pawar, S. P., Ganorkar, A. G., Bhandarkar, A. G., Ingle, V. C. ve Kalorey, D. R. (2000).** *Effect of royal jelly as immunomodulator in chicks.* Journal of Immunology & Immunopathology, 2 (1/2), 84-87.
- Lercker, G., Capella, P., Conte, L. S., Ruini, F., & Giordani, G. (1981).** *Components of royal jelly: I. Identification of the organic acids.* Lipids, 16(12), 912-919.
- Lercker, G., Capella, P., Conte, L. S., Ruini, F., & Giordani, G. (1982).** *Components of royal jelly II. The lipid fraction, hydrocarbons and sterols.* Journal of Apicultural Research, 21(3), 178-184.
- Li, J. K., Feng, M., Zhang, L., Zhang, Z. H. ve Pan, Y. H. (2008).** *Proteomics analysis of major royal jelly protein changes under different storage conditions.* Journal of proteome research, 7 (8), 3339-3353.
- Li, J. K., Wang, T. ve Peng, W. J. (2007).** *Comparative analysis of the effects of different storage conditions on major royal jelly proteins.* Journal of apicultural research, 46 (2), 73-80.
- Liang, Y., Kagota, S., Maruyama, K., Oonishi, Y., Miyauchi-Wakuda, S., Ito, Y., ... & Shinozuka, K. (2018).** *Royal jelly increases peripheral circulation by inducing vasorelaxation through nitric oxide production under healthy conditions.* Biomedicine & Pharmacotherapy, 106, 1210-1219.
- Liu, J. R., Yang, Y. C., Shi, L. S. ve Peng, C. C. (2008).** *Antioxidant properties of royal jelly associated with larval age and time of harvest.* Journal of agricultural and food chemistry, 56 (23), 11447-11452.
- Magaldi, S., Mata-Essayag, S., De Capriles, C. H., Perez, C., Colella, M. T., Olaizola, C., & Ontiveros, Y. (2004).** *Well diffusion for antifungal susceptibility testing.* International Journal of Infectious Diseases, 8(1), 39-45.
- Maksimović, Z., & Rifatbegović, M. (2009).** *Antibacterial effects of fresh and preserved royal jelly.* Veterinaria, 58(1-2), 11-16.
- Matsui, T., Yukiyoishi, A., Doi, S., Sugimoto, H., Yamada, H. ve Matsumoto, K. (2002).** *Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR.* The Journal of Nutritional Biochemistry, 13 (2), 80-86.
- Melampy, R. M. ve Jones, D. B. (1939).** *Chemical composition and vitamin content of royal jelly.* Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 41 (2), 382-388.
- Melliou, E. ve Chinou, I. (2005).** *Chemistry and bioactivity of royal jelly from Greece.* Journal of agricultural and food chemistry, 53 (23), 8987-8992.
- Meto, A., Meto, A., Xhajanka, E., Özcan, M., & Tragaj, E. (2017).** *Microbiological Comparison of Royal Jelly and Chlorhexidine 0.2%.* European Journal of Interdisciplinary Studies, 3(2), 123-126.

- Moghim, H., Taghipoor, S., Shahinfard, N., Kheiri, S., & Khabbazi, H. (2015).** *Comparative study on the antifungal activity of hydroalcoholic extract of Iranian propolis and royal jelly against Rhizopus oryzae.* Journal of Herbmec Pharmacology, 4.
- Moreschi, E. C. P. ve Almeida-Muradian, L. B. D. (2009).** *Vitamins B1, B2, B6 and PP contents in royal jelly.* Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso), 68 (2), 187-191.
- Moselhy, W. A., Fawzy, A. M., & Kamel, A. A. (2013).** *An evaluation of the potent antimicrobial effects and unsaponifiable matter analysis of the royal jelly.* Life Science Journal, 2(10), 290-296.
- Mureşan, C. I., Mărghitaş, L. A., Dezmirean, D. S., Bobiş, O., Bonta, V., Zacharias, I., ... & Paşca, C. (2016).** *Quality parameters for commercialized royal jelly.* Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies, 73(1), 37-44.
- Münstedt, K., Bargello, M., & Hauenschild, A. (2009).** *Royal jelly reduces the serum glucose levels in healthy subjects.* Journal of Medicinal food, 12(5), 1170-1172.
- Nabas, Z., Haddadin, M. S. Y., Haddadin, J. ve Nazer, I. K. (2014).** *Chemical composition of royal jelly and effects of synbiotic with two different locally isolated probiotic strains on antioxidant activities.* Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 64 (3), 171-180.
- Nagai, T., Inoue, R., Suzuki, N. ve Nagashima, T. (2006).** *Antioxidant properties of enzymatic hydrolysates from royal jelly.* Journal of medicinal food, 9 (3), 363-367.
- Nakaya, M., Onda, H., Sasaki, K., Yukiyoshi, A., Tachibana, H. ve Yamada, K. (2007).** *Effect of royal jelly on bisphenol A-induced proliferation of human breast cancer cells.* Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 71 (1), 253-255.
- Nascimento, A. P., Moraes, L. A. R., Ferreira, N. U., Moreno, G. D. P., Uahib, F. G. M., Barizon, E. A., & Berretta, A. A. (2015).** *The lyophilization process maintains the chemical and biological characteristics of royal jelly.* Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015.
- NCCLS. (1991).** 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
- NCCLS.(2002).** Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Second Edition. NCCLS document M27-A2 (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
- Nomura, M., Maruo, N., Zamami, Y., Takatori, S., Doi, S. ve Kawasaki, H. (2007).** *Effect of long-term treatment with royal jelly on insulin resistance in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF).* Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 127 (11), 1877-1882.
- O'Connor, K. J. ve Baxter, D. (1985).** *The demonstration of insulin-like material in the honey bee, Apis mellifera.* Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 81 (3), 755-760.
- Okamoto, I., Taniguchi, Y., Kunikata, T., Kohno, K., Iwaki, K., Ikeda, M. ve Kurimoto, M. (2003).** *Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo.* Life Sciences, 73 (16), 2029-2045.

- Özkök, D. ve Silici, S. (2017).** *Antioxidant activities of honeybee products and their mixtures.* Food Science and Biotechnology, 26 (1), 201-206.
- Pan, Y., Xu, J., Chen, C., Chen, F., Jin, P., Zhu, K., ... & Hu, F. (2018).** *Royal jelly reduces cholesterol levels, ameliorates A $\beta$  pathology and enhances neuronal metabolic activities in a rabbit model of Alzheimer's disease.* Frontiers in aging neuroscience, 10, 50.
- Park, H. G., Kim, B. Y., Park, M. J., Deng, Y., Choi, Y. S., Lee, K. S., & Jin, B. R. (2019a).** *Antibacterial activity of major royal jelly proteins of the honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly.* Journal of Asia-Pacific Entomology.
- Park, H. M., Hwang, E., Lee, K. G., Han, S. M., Cho, Y., & Kim, S. Y. (2011).** *Royal jelly protects against ultraviolet b-induced photoaging in human skin fibroblasts via enhancing collagen production.* Journal of medicinal food, 14(9), 899-906.
- Park, M. J., Kim, B. Y., Park, H. G., Deng, Y., Yoon, H. J., Choi, Y. S., ... & Jin, B. R. (2019b).** *Major royal jelly protein 2 acts as an antimicrobial agent and antioxidant in royal jelly.* Journal of Asia-Pacific Entomology, 22(3), 684-689.
- Pavel, C. I., Mărghitaş, L. A., Bobiş, O., Dezmirean, D. S., Şapcaliu, A., Radoi, I., & Mădaş, M. N. (2011).** *Biological activities of royal jelly-review.* Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies, 44(2), 108-118.
- Pavel, C. I., Mărghitaş, L. A., Dezmirean, D. S., Tomoş, L. I., Bonta, V., Şapcaliu, A. ve Buttstedt, A. (2014).** *Comparison between local and commercial royal jelly use of antioxidant activity and 10-hydroxy-2-decenoic acid as quality parameter.* Journal of Apicultural Research, 53 (1), 116-123.
- Pourmoradian, S., Mahdavi, R., Mobasseri, M., Faramarzi, E. ve Mobasseri, M. (2014).** *Effects of royal jelly supplementation on glycemic control and oxidative stress factors in type 2 diabetic female: a randomized clinical trial.* Chinese Journal of Integrative Medicine, 20 (5), 347-352.
- Rafieian-Kopaei, M., Asgharzadeh, S., Tamadon, M. R., & Yalameha, B. (2018).** *Ameliorative effect of royal jelly against nephrotoxicity induced by gentamicin.* Annals of Research in Antioxidants, 3(1).
- Ragab, S. S., & Ibrahim, M. K. (1999).** *Evaluation of some chemical, antibacterial and biological properties of fresh and refrigerated royal jelly.* Egyptian Journal of Microbiology, 34(1), 115-128.
- Ratanavalachai, T., & Wongchai, V. (2002).** *Antibacterial activity of intact royal jelly, its lipid extract and its defatted extract.* Thammasat Int. J. Sc. Tech, 7(1).
- Rembold, H., & Dietz, A. (1966).** *Biologically active substances in royal jelly.* In Vitamins & Hormones (Vol. 23, pp. 359-382). Academic Press.
- Rodriguez-Tudela J.L., Chryssanthou E., Petrikkou E., Mosquera J., Denning D.W., Cuenca-Estrella M., (2003).** *Interlaboratory evaluation of hemacytometer method of inoculum preparation for testing antifungal susceptibilities of filamentous fungi.* J. Clinic Microbiology. 2003; 41: 5236-5237.
- Romanelli, A., Moggio, L., Montella, R. C., Campiglia, P., Iannaccone, M., Capuano, F., ... & Capparelli, R. (2011).** *Peptides from royal Jelly: studies on the antimicrobial activity of jelleins, jelleins analogs and synergy with temporins.* Journal of Peptide Science, 17(5), 348-352.

- Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L., Caboni, M. F., Bogdanov, S. ve Almeida-Muradian, L. B. D. (2009).** *Quality and standardisation of royal jelly.* Journal of Apiprodukt and Apimedical Science, 1 (1), 1-6.
- Sauerwald, N. (1998).** *Combined antibacterial and antifungal properties of water-soluble fraction of royal jelly.* Adv. Food Sci., 20, 46-52.
- Seven, I., Şimşek, Ü. G., Gökçe, Z., Seven, P. T., Arslan, A. ve Yılmaz, Ö. (2014).** *The effects of royal jelly on performance and fatty acid profiles of different tissues in quail (Coturnix coturnix japonica) reared under high stocking density.* Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 38 (3), 271-277.
- Shahzad, Q., Mehmood, M. U., Khan, H., ul Husna, A., Qadeer, S., Azam, A., ... & Ahmad, M. (2016).** *Royal jelly supplementation in semen extender enhances post-thaw quality and fertility of Nili-Ravi buffalo bull sperm.* Animal Reproduction Science, 167, 83-88.
- Shen, L., Ding, M., Zhang, L., Jin, F., Zhang, W., & Li, D. (2010).** *Expression of Acc-royalysin gene from royal jelly of Chinese honeybee in Escherichia coli and its antibacterial activity.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(4), 2266-2273.
- Shen, L., Liu, D., Li, M., Jin, F., Din, M., Parnell, L. D., & Lai, C. Q. (2012).** *Mechanism of action of recombinant acc-royalysin from royal jelly of Asian honeybee against gram-positive bacteria.* PloS one, 7(10).
- Shirzad, H., Shahinfard, N., Naficy, M. R., & Karami, M. (2007).** *Comparison of royal jelly effects with Gentamicin and Ceftriaxone on the growth of Escherichia coli, Bacillus cereus, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, in a laboratory environment.* Tropical Medicine & International Health, 12(1), 159.
- Shirzad, M., Kordyazdi, R., Shahinfard, N. ve Nikokar, M. (2013).** *Does royal jelly affect tumor cells?.* Journal of HerbMed Pharmacology, 2 (2).
- Silici, S., Ekmekcioglu, O., Eraslan, G. ve Demirtas, A. (2009).** *Antioxidative effect of royal jelly in cisplatin-induced testes damage.* Urology, 74 (3), 545-551.
- Silva, F. C., Thomazini, M., Alencar, S. M. D., & Fávaro-Trindade, C. S. (2009).** *Properties of propolis microencapsulated.* In Proceedings.
- Singh, M. N., Hemant, K. S. Y., Ram, M., & Shivakumar, H. G. (2010).** *Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery.* Research in pharmaceutical sciences, 5(2), 65.
- Stocker, A., Schramel, P., Kettrup, A., & Bengsch, E. (2005).** *Trace and mineral elements in royal jelly and homeostatic effects.* Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 19(2-3), 183-189.
- Sun, X., Cameron, R. G., & Bai, J. (2019).** *Microencapsulation and antimicrobial activity of carvacrol in a pectin-alginate matrix.* Food Hydrocolloids, 92, 69-73.
- Takaki-Doi, S., Hashimoto, K., Yamamura, M. ve Kamei, C. (2009).** *Antihypertensive activities of royal jelly protein hydrolysate and its fractions in spontaneously hypertensive rats.* Acta Medical Okayama, 63.
- Takenaka, T. ve Echigo, T. (1980).** *Chemical composition of royal jelly.* Bulletin of the Faculty of Agriculture, Tamagawa University (20), 71-78.
- Takenaka, T., Yatsunami, K. ve Echigo, T. (1986).** *Changes in quality of royal jelly during storage.* Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 33 (1), 1-7.

**Taniguchi, Y., Kohno, K., Inoue, S. I., Koya-Miyata, S., Okamoto, I., Arai, N., ... & Kurimoto, M. (2003).** *Oral administration of royal jelly inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice.* *International Immunopharmacology*, 3(9), 1313-1324.

**Teixeira, R. R., de Souza, A. V., Peixoto, L. G., Machado, H. L., Caixeta, D. C., Vilela, D. D., ... & Espindola, F. S. (2017).** *Royal jelly decreases corticosterone levels and improves the brain antioxidant system in restraint and cold stressed rats.* *Neuroscience Letters*, 655, 179-185.

**Tokunaga, K. H., Yoshida, C., Suzuki, K. M., Maruyama, H., Futamura, Y., Araki, Y., & Mishima, S. (2004).** *Antihypertensive effect of peptides from royal jelly in spontaneously hypertensive rats.* *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(2), 189-192.

**Valgas, C., Souza, S. M. D., Smânia, E. F., & Smânia Jr, A. (2007).** *Screening methods to determine antibacterial activity of natural products.* *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 369-380.

**Vezetu, T. V., Bobiş, O., Moritz, R. F., & Buttstedt, A. (2017).** *Food to some, poison to others-honeybee royal jelly and its growth inhibiting effect on European Foulbrood bacteria.* *MicrobiologyOpen*, 6(1), e00397.

**Vittek, J. (1995).** *Effect of royal jelly on serum lipids in experimental animals and humans with atherosclerosis.* *Experientia*, 51 (9-10), 927-935.

**Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2017).** *Royal jelly: health benefits and uses in medicine.* In *Bee Products-Chemical and Biological Properties* (pp. 199-218). Springer, Cham.

**Wan, D. C., & Wang, K. C. (2018).** *Maintenance of mammalian stem cell states and enhanced wound healing by honey bee royal jelly.* *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open*, 6(4 Suppl).

**Wang, M. (2017).** *Effects of fresh royal jelly on the proliferation of human hepatoma cell line SMMC-7721.* *Proceedings of Anticancer Research*, 1(2).

**Wang, Q., Gong, J., Huang, X., Yu, H. ve Xue, F. (2009).** *In vitro evaluation of the activity of microencapsulated carvacrol against Escherichia coli with K88 pili.* *Journal of applied microbiology*, 107 (6), 1781-1788.

**Wang, Y., Ma, L., Zhang, W., Cui, X., Wang, H. ve Xu, B. (2016).** *Comparison of the nutrient composition of royal jelly and worker jelly of honey bees (Apis mellifera).* *Apidologie*, 47 (1), 48-56.

**Watanabe, S., Suemaru, K., Takechi, K., Kaji, H., Imai, K., & Araki, H. (2013).** *Oral mucosal adhesive films containing royal jelly accelerate recovery from 5-fluorouracil-induced oral mucositis.* *Journal of pharmacological sciences*, 12181FP.

**Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. (2008).** *Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances.* *Nature protocols*, 3(2), 163.

**Xue, X., Wu, L., & Wang, K. (2017).** *Chemical composition of royal jelly.* In *Bee Products-Chemical and Biological Properties* (pp. 181-190). Springer, Cham.

**Yang, X., Li, J., & Wang, R. (2015).** *Antibacterial mechanism of 10-HDA against Bacillus subtilis.* In *Advances in Applied Biotechnology* (pp. 317-324). Springer, Berlin, Heidelberg.

**Yang, X., Wang, T., & Wang, R. (2014).** Antibacterial activity and mechanism of action of 10-hda against Escherichia coli. In *Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2012)* (pp. 585-595). Springer, Berlin, Heidelberg.

**Yang, Y. C., Chou, W. M., Widowati, D. A., Lin, I. P., & Peng, C. C. (2018).** *10-hydroxy-2-decenoic acid of royal jelly exhibits bactericide and anti-inflammatory activity in human colon cancer cells.* *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 202.

**Yoshida, M., Hayashi, K., Watadani, R., Okano, Y., Tanimura, K., Kotoh, J., & Maeda, A. (2016).** *Royal jelly improves hyperglycemia in obese/diabetic KK-Ay mice.* *Journal of Veterinary Medical Science*, 16-0458.

**Zhang, S., Nie, H., Shao, Q., Kalkan Hassanyar, A., & Su, S. (2017).** *RNA-Seq analysis on effects of royal jelly on tumour growth in 4T1-bearing mice.* *Journal of Functional Foods*, 36, 459-466.

**Zhang, S., Shao, Q., Geng, H., & Su, S. (2017).** *The effect of royal jelly on the growth of breast cancer in mice.* *Oncology letters*, 14(6), 7615-7621.

**Zhao, F., Wu, Y., Guo, L., Li, X., Han, J., Chen, Y. & Ge, Y. (2013).** *European Food Research and Technology*, 236 (5), 799-815.

## ÖZGEÇMİŞ

**Ad-Soyad** : Neslihan ORDU  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : 13.11.1986 BURSA  
**E-posta** : neslihan-ordu@hotmail.com

### ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** :2005, Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği
- **Yüksek Lisans** : 2019, Bursa Teknik Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

### MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- Gıda Mühendisi; Mendika Yemek & Catering, Tat Gıda Sanayi A.Ş - Sek Süt İşletmesi.
- Satış ve Teknik Destek Mühendisi; Hypred Duraner.
- Öğretmen; TMGD Akademi A.Ş.
- Öğretim Görevlisi; Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Altıntaş MYO.
- Yardımcı Araştırmacı; TAGEM-18/AR-GE/25'nolu proje.