



**T.C.**

**SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİKROENKAPSÜLASYON İLE KİTOSAN VE PROPOLİS  
KARIŞIMININ KAPLAMA MATERYALİ OLARAK KULLANIMI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Reyhan Şeyda YILMAZ  
(201292071058)**

**Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Danışman: Doç. Dr. Nevcihan GÜRİSOY**

**2019  
SIVAS**

**Reyhan Şeyda YILMAZ**'ın hazırladığı “**MİKRO ENKAPSÜLASYON İLE KİTOSAN VE PROPOLİS KARIŞIMININ KAPLAMA MATERYALİ OLARAK KULLANIMI**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı**

**Doç. Dr. Nevcihan GÜRSOY**  
Sivas Cumhuriyet Üniversitesi



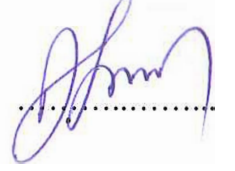
**Jüri Üyesi**

**Dr. Öğr. Üyesi Seçil ERDEN TAYHAN**  
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi



**Jüri Üyesi**

**Dr. Öğr. Üyesi Berna SARAÇOĞLU KAYA**  
Sivas Cumhuriyet Üniversitesi



Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

**Prof. Dr. İsmail ÇELİK**  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazımı Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır.

Bütün hakları saklıdır.  
Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.  
© Reyhan Şeyda YILMAZ, 2019

## TEŐEKKÜR

Tez çalıőmam da bana her zaman destek olan değerli danıőmanım Doç. Dr. Nevcihan GÜRSOY'a, çalıőmamın her aőamasında sevgi ve desteğini esirgemeyen aileme tüm içtenliğimle teőekkür ve saygılarımı sunarım.

Reyhan şeyda YILMAZ

## ÖZET

### MİKRO ENKAPSÜLASYON İLE KİTOSAN VE PROPOLİS KARIŞIMININ KAPLAMA MATERYALİ OLARAK KULLANIMI

**Reyhan Şeyda YILMAZ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nevcihan GÜRSOY**

**2019, 53+ xiv sayfa**

Kitosan, kimyasal yapı olarak selüloza benzeyen ve doğada selülozdan sonra en sık rastlanan biyopolimerdir. Kitosan, çöktürme, nem tutma, film oluşturma, antimikrobiyal etki, enzim immobilizasyonu gibi çok çeşitli fonksiyonları nedeniyle ilaç, kozmetik, tıp, tarım gibi çeşitli endüstrilerde sınırsız kullanım alanlarına sahiptir.

Propolis, bal arıları tarafından ağaçların kozalak ve kabuklarından, bitkilerin tomurcuk ve filizlerinden toplanan çeşitli yağlar, polenler, özel reçine ve mumsu maddelerin karışımından oluşan; çok kuvvetli anti-viral, anti-bakteriyel, anti-fungal özellikleri yanında anti-inflamatör, anti-ülser, lokal anestetik, antitümör, bağışıklığı uyarıcı çok sayıda yararlı biyolojik aktiviteye sahip yapışkan bir maddedir. Bu özellikleri göstermesi nedeniyle tıp, apiterapi sağlık besini ve biyokozmetik alanında kullanımını yaygınlaştırmıştır.

Mikroenkapsülasyon, sıvı, katı veya gaz formundaki değişik mikro boyuttaki maddeleri kapsüller içinde paketleme teknolojisi olarak tanımlanır. Bu teknikte kaplanan materyal belirli şartlar altında kontrollü oranlarda serbest hale geçer. Aynı zamanda mikroenkapsülasyon, kaplanan materyali sıcaklık, nem ve mikroorganizma gibi faktörlerden koruyan bir yöntemdir. Mikroenkapsülasyon tekniğinin kimya, ziraat, gıda ve yem, tıp, eczacılık, veterinerlik, biyoteknoloji, çevre ve tüketici ihtiyaçları gibi çok geniş kullanım alanları vardır. Mikroenkapsülasyon teknolojisinde kullanılan kaplama materyalleri çok çeşitli olup, organik veya inorganik esaslı olabilir. Bu çalışmada, mikroenkapsülasyon teknolojisinde kitosan

ve propolis karışımının kaplama materyali olarak kullanım olanakları irdelenmektedir.

Çalışmada propolis ve kitosan ile mikroenkapsüller elde edilmiş SEM sonuçları ile yüzey özellikleri belirlenmiş anlamlı sonuçlara ulaşılmıştır. Antimikrobiyal çalışmalarda validasyon sonuçları ve istatistiksel veriler anlamlıdır.

**Anahtar Kelimeler:** Propolis, Kitosan, Enkapsülasyon, Kirby-Bauer Disk Testi

## **ABSTRACT**

### **THE USE OF THE MIXTURE OF CHITOSAN AND PROPOLIS AS COATING MATERIAL WITH MICROENCAPSULATION METHOD**

**Reyhan Şeyda YILMAZ**

**Master of Science Thesis**

**Department of Bioengineering**

**Thesis Supervisor: Doç. Dr. Nevcihan GÜRSOY**

**2019, 53+ xiv pages**

Chitosan is a biopolymer that resembles cellulose with its chemical structure, and it is the most frequently encountered one in the nature after cellulose. Chitosan has an unlimited scope of use in various industries such as medication, cosmetics, medicine and agriculture because of its various functions such as precipitation, moisture holding, film-forming, antimicrobial effect and enzyme immobilization.

Propolis is a sticky substance that is formed by the mixture of various lipids, pollens, special resin and waxy substances which are gathered from the cones and barks of trees and buds and sprouts of plants by honeybees, and it has very strong anti-viral, antibacterial, and anti-fungal qualities along with anti-inflammatory, anti-ulcer, local anesthetic, anti-tumor, and a great number of useful biological activities that stimulate immunity. Because of these qualities, propolis' use has become widespread in the fields of medicine, apiteraphy, healthy food and biocosmetics.

Microencapsulation is defined as the technology of packaging substances in the states of liquid, solid or gas with different micro sizes in capsules. The substance that is coated with this method transforms into free state in controlled rates under certain circumstances. Also, microencapsulation is a method that protects the coated substance from factors such as temperature, moisture and microorganism. Microencapsulation method has a vast area of use such as chemistry, agriculture, food and feed, medicine, pharmaceuticals, veterinary medicine, biotechnology, and environment and consumer requirements. The coating substances in the technology of microencapsulation are quite varied and can have organic or inorganic basis. In



this study, the probability of the use of chitosan and propolis' mixture as a material for coating in the microencapsulation technology is examined.

In the study, microencapsules were obtained with the use of propolis and chitosan, surface properties were determined through SEM results, and meaningful results were achieved. Validation results and statistical data are meaningful in antimicrobial studies.

**Key Words:** Propolis, Chitosan, Encapsulation, Kirby-Bauer Disk Test

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	x
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	xi
<b>SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Kitosan.....	1
1.1.1. Kitosan ve Kitin tanımı .....	1
1.1.2. Kitosanın Tarihçesi .....	2
1.1.3. Kitosanın Özellikleri .....	3
1.1.4. Kitosanın Kimyası.....	3
1.1.5. Kitosanın Endüstriyel Uygulamaları .....	4
1.2. Propolis.....	6
1.2.1. Propolis Tanımı ve Tarihçesi .....	6
1.2.2. Propolisin Fiziksel Yapısı .....	7
1.2.3. Propolisin Kimyasal Yapısı.....	8
1.2.4. Propolisin Biyolojik Aktiviteleri .....	9
1.3. Enkapsülasyon.....	12
1.3.1. Enkapsülasyonun Tarihçesi .....	12
1.3.2. Enkapsülasyonun Uygulanması .....	13
1.3.3. Enkapsülasyon Yöntemleri .....	13
1.3.4. Enkapsülasyon Çeşitleri .....	13
1.3.4.1. Mikroenkapsülasyon.....	13
1.3.4.2. Ekstrüzyon ve Emülsiyon Yöntemleriyle Mikroenkapsülasyon. ....	14
1.3.4.3. Mikroenkapsülasyonda Kullanılan Kaplama Materyalleri .....	15
<b>2. MATERYAL VE METOD</b> .....	18
2.1. Materyal.....	18
2.1.1. Kitosan Çözeltilsinin Hazırlanması.....	18

2.1.2. Propolis Çözeltisinin Hazırlanması .....	18
2.1.3. Sodyum Aljinat Çözeltisinin Hazırlanması .....	18
2.1.4. CaCl <sub>2</sub> Çözeltisinin Hazırlanması .....	18
2.1.5. Mikroenkapsülasyon .....	18
2.1.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) .....	19
2.1.7. Bakteri Gelişimi İçin Besi Ortamının Hazırlanması .....	19
2.1.8. Mikroorganizma Kültürlerinin Eldesi .....	19
2.1.9. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Testi .....	19
2.1.10. İstatistiksel Analiz .....	20
2.2. Metod.....	20
2.2.1. Kitosan Çözeltisinin Hazırlanması .....	20
2.2.2. Propolis Çözeltisinin Hazırlanması .....	20
2.2.3. Sodyum Aljinat Çözeltisinin Hazırlanması .....	21
2.2.4. CaCl <sub>2</sub> Çözeltisinin Hazırlanması .....	21
2.2.5. Mikroenkapsülasyon .....	22
2.2.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi .....	22
2.2.7. Bakteri Gelişimi İçin Besi Ortamının Hazırlanması .....	23
2.2.8. Mikroorganizma Kültürlerinin Eldesi .....	23
2.2.9. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Testinin Yapılması .....	23
2.2.10. İstatistiksel Analiz .....	24
<b>3. BULGULAR</b> .....	<b>26</b>
3.1. Mikroenkapsüllerin Eldesi .....	26
3.2. SEM Sonuçları .....	27
3.3. Antimikrobiyal Çalışmaları .....	29
3.4. İstatistiksel Analiz .....	32
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	<b>37</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b> .....	<b>42</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>52</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 1. Selüloz, kitin ve kitosanın kimyasal yapıları.....	4
Şekil 2. Ham propolisin görüntüsü .....	6
Şekil 3. Ekstrüzyonve emülsiyon teknikleri ile mikroenkapsülasyon .....	15
Şekil 4. Propolis özütleri elde edilmiş aşamaları .....	21
Şekil 5. Farklı propolis konsantrasyonlarıyla mikroenkapsüllerin hazırlanması.....	22
Şekil 6. Mikroenkapsüllerin elde edilmesi .....	26
Şekil 7. Mikroenkapsüllerin SEM görüntüleri.....	28
Şekil 8. Kitosan, propolis ve ve farklı propolis konsantrasyonlarında hazırlanan mikroenkapsüller ile yapılan Kirby-Bauer disk difüzyon testi .....	29
Şekil 9. Kirby-Bauer Disk Difüzyon sonuçlarına göre bakteri duyarlılıkları (a) E.coli'nin duyarlılığı, b) K.pneumonia'nın duyarlılığı, c) S. aureus'un duyarlılığı, d) S. mitis'in duyarlılığı.....	31
Şekil 10. Kirby-Bauer disk difüzyon testi ile propolis, kitosan ve mikroenkapsüllerin etkinliği. ....	35

## TABLULAR DİZİNİ

### Sayfa

<b>Tablo 1.</b> Kitosanın endüstrideki kullanım alanları ve uygulamaları. ....	5
<b>Tablo 2.</b> Propolisin temel yapısında bulunan maddelerin oranı. ....	8
<b>Tablo 3.</b> Propoliste belirlenen bileşiklerin grupları ve sayıları. ....	9
<b>Tablo 4.</b> Propolisin biyolojik ve iyileştirici etkileri .....	11
<b>Tablo 5.</b> Kirby-Bauerdisk difüzyon testinin sonuçları .....	24
<b>Tablo 6.</b> Üç paralel çalışılan bakterilerin kitosan, propolis ve farklı propolis konsantrasyonlarında hazırlanan mikroenkapsüller ile yapılan Kirby-Bauer disk difüzyon testi ortalamaları .....	32
<b>Tablo 7.</b> Mikroenkapsüllerin için ortalama zon çapların karşılaştırma sonuçları ...	32
<b>Tablo 8.</b> Mikroenkapsüller için Tukey HSD ikili karşılaştırma sonucu.....	33
<b>Tablo 9.</b> Herbir bakteri türüne göre mikroenkapsüllerin karşılaştırma sonuçları ...	34

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ME</b>	: Mikroenkapsülasyon
<b>DD</b>	: Deasetillenme derecesi
<b>SEM</b>	: Scanning electron microscope
<b>DNA</b>	: Deoksiribo nükleik asit
<b>MHA</b>	: Müller Hinton Agar
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	: Kalsiyum klorür
<b>pH</b>	: Power of Hydrogen
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>µm</b>	: Mikrometre
<b>C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>O<sub>6</sub>Na</b>	: Sodyum-aljinat

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Kitosan

### 1.1.1. Kitosan ve Kitin Tanımı

Kitin Yunanca'da zarf, kılıf anlamına karşılık gelir ve selülozdan sonra doğada en fazla bulunan biyopolimerdir (Beaulieu, 2005). Doğada genellikle; deniz yosunları, bazı protista âlemi protozoa şubesi üyeleri, omurgasızlar şubesi, bakteriler, funguslar, insektalar, bazı bitkilerde bulunur. Kitin bakımından yoğun canlılardan bazıları; Dungeness yengeci, Pasifik karidesi, ıstakoz ve kerevit (tatlısu ıstakozu) kabuklarıdır.

Kitinin deasetillenmiş bir türevi olan kitosan, katyonik bir polisakkarittir ve  $\beta$  (1,4)-2-asetoamido-2-deoksi-D-glikoz ve  $\beta$  (1,4)-2-amino-2-deoksi-D-glikoz ünitelerinin bir kopolimeridir. Kitosan selüloz ile benzerlik gösteren kompozit bir malzemedir. Kitosan açık renklidir, koku ve tat içermez, parçacıklı yapı gösterir ve sindirim enzimlerine dayanıklıdır. Doğada fazla miktarda bulunmasına rağmen suda çözünürlüğünün sınırlı olması kullanımını uzun süre engellemiştir. Asit çözeltilerde çözünerek katyonik karmaşık yapı oluşturmaktadır (Rao vd., 2005-2006).

Deasetilasyon derecesi (DD) ile ilişkili olarak kitosandaki azot içeriği % 5-8 aralığındadır. Kitosan genellikle birincil alifatik amino gruplarına sahiptir. Amino grubunun varlığı, kitosanı kimyasal işlenebilirlik için uygun hale getirir. Kitosan ve selüloz arasındaki tek fark C-2 pozisyonundaki hidroksil grubu (-OH) yerine amin grubunun (-NH<sub>2</sub>) bulunmasıdır. Kitin ile selüloz arasındaki tek fark ise; C-2 pozisyonundaki hidroksil grubu yerine asetamido (NHCH<sub>3</sub>CO) grubunun bulunmasıdır.

Kitosan yapısında bulunan amin grubunun protonlanması ile pozitif yüklendiği belirtilmiştir (Lee vd., 2004). Protonlanabilmesi kitosanı katyonik bir sakkarit yapmaktadır. Kitosan katyonik özelliğinden dolayı negatif yüklü kompleksler ile bağ oluşturabildiği ve vücut ile uyumlu olduğu belirtilmiştir (Janes vd., 2001). Asidik ortamda NH<sub>2</sub> grubu -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> şeklinde bulunmaktadır ve çözeltilerdeki negatif iyonlarla

reaksiyona girmektedir. Porotonlanması ile oluşan pozitif yapı ile viskoz çözelti oluşturur ve negatif yüklerle reaksiyona girebilir. Kitosanın çözünürlüğünün, matriks oluşumu için önemli bir gösterge olduğu bildirilmektedir (Teknolojik araştırmalar, 2009).

Kitosan geniş kullanım alanlarına sahip olma nedeni yenilenebilir olmasıdır. Kitosan doğada fazladır, zehirli değildir, canlı yapısına uyumludur. Asit gidericidir, ülseri ve kanser oluşumunu engellemektedir. Mikroorganizmalara karşı etkilidir. Bunun nedeni antioksidant, mantar karşıtı özellikleridir. Doğada dönüştürölür olmasının yanı sıra çözünmesi için de biyoyumlu maddeler kullanılır. Katyonik özelliği nedeniyle negatif yüklerle kolayca reaksiyona girebilir, bu nedenle film oluşturma özelliği artmaktadır. Kitosan, çöktürme, nem tutma, film oluşturma, antimikrobiyal etki, enzim immobilizasyonu gibi çok çeşitli fonksiyonları nedeniyle ilaç, kozmetik, tıp, tarım gibi alanlarda kullanımını kolaylaştırmaktadır.

Kitinin kısmi deasetasyonu ile meydana gelen kitosan, antimikrobiyal, antifungal ve insektisidal aktiviteye sahip olduğundan biyokontrollerde de kullanılmaktadır. Kitosan karışımları bazik ortamda bozulmakta ve uzun süre oda koşullarında tutulması kimyasal açıdan olumsuz etkilere neden olmaktadır.

### **1.1.2. Kitosanın Tarihçesi**

Kitin ilk olarak 1811 yılında Prof. Henri Braconnot tarafından mantar hücre duvarında tanımlanmıştır. Ardından 1823 yılında Odier bu yapıyı böceklerin hücre duvarında tanımlamıştır (Beaulieu, 2005).

1843 yılında Lassaigne kitinde azot varlığını tespitmiştir. 1859 yılında Rouget kitini çözmeyi başarmıştır. 1878'de yapıdaki glikozaminler şeklinde Ledderhose tarafından tanımlanmıştır.

1960'lar da nanoteknolojide kullanılabilir hale gelmiştir. Zamanla kitosan atık suların temizlenmesinde kullanıldığı bildirilmiştir (Newton, 2006).

Bunun yanı sıra günümüzde antimikrobiyal ajan olarak kullanılmaktadır. Yenebilir filmlerin yapımında, meyve sularının durultulması ve asiditesinin kontrolünde,



oksidasyonun önlenmesinde, enkapsülasyon ve enzim immobilizasyonu gibi birçok alanda kullanılmaya devam etmektedir. Zehirli içeriği olmadığı ve kanser oluşumunu engellediği bu nedenle insan sağlığı açısından önemli bir kullanılma sebebi olduğu bildirilmektedir (Newton, 2006).

### **1.1.3. Kitosanın Özellikleri**

Kitosanın molekül ağırlığı 50-2000 kiloDalton (kDa) aralığındadır ve buna göre gruplandırılmaktadır. Suda çözünmediği, bu nedenle çözünmesinde asit çözeltilerin kullanıldığı belirtilmiştir. Bazik ortamda bozulma gösterdiği de belirtilmiştir (Janes, ve ark., 2001).

Kitosan içerdiği amin grubu ile çözünürken protonlandığı bu nedenle pozitif yüklendiği ifade edilir (Lee ve ark., 2004). Bu durum da kitosanı katyonik, hidrolitik bir polisakkarit yapmaktadır. Kitosanın pozitif özelliğinin, negatif yüklü polimerlerle kimyasal etkileşimini artırdığı belirtilmiştir (Lopez-Leon ve ark., 2005).

Kitosan; yağlar ve proteinlerle bağlanabilir, negatif yüklü polimerlerle matris oluşturmaktadır. Ayrıca vücuttaki önemli karbonhidratlarla uyum gösterdiği bildirilmiştir (Janes ve ark., 2001).

Su ve yağlarla bağlanma potansiyelinin yüksek olması film oluşturma yeteneğini artırmaktadır. Endüstriyel uygulamalarda: yenilenebilir olması, doğada fazla bulunması, toksik özellik göstermemesi, biyouyumlu ve biyobozunur olması, asit giderici olması, ülser, tümör, mikrobiyal, bakteriyel ve fungal olmaması tercih edilmesinde önemli bir neden oluşturmaktadır.

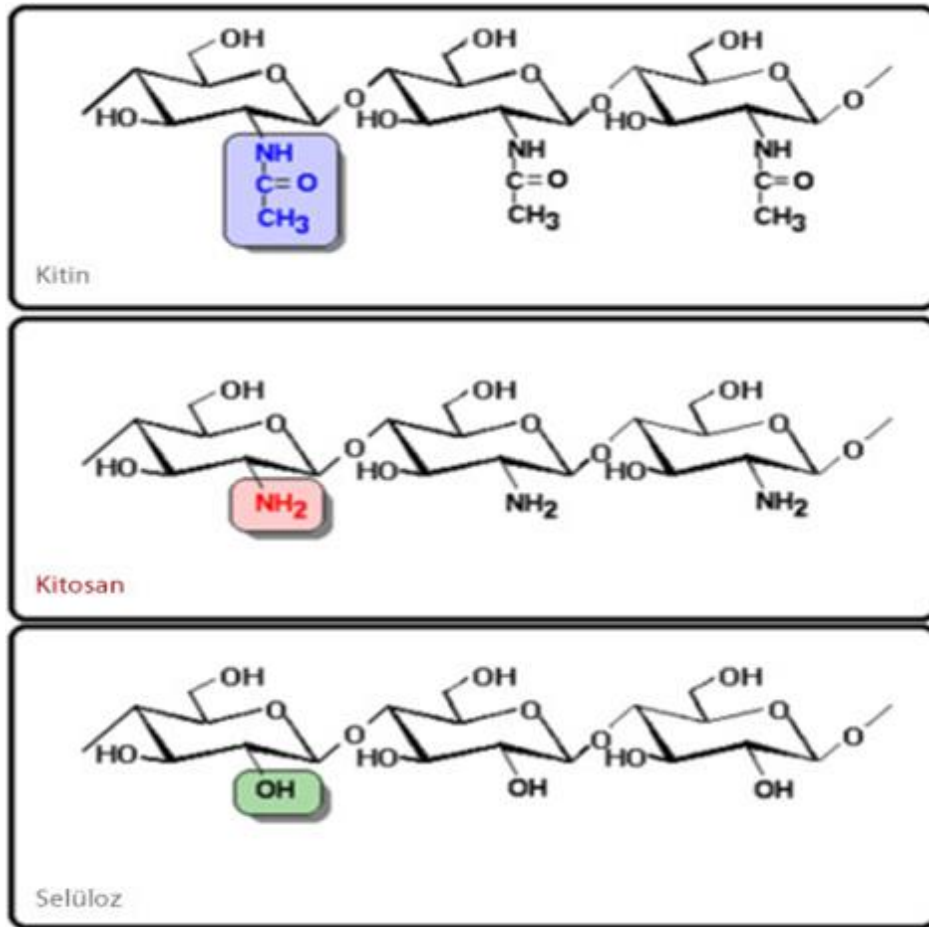
Ayrıca kolay çözünmesi kitosan mikro ve nanoparçacıklarını hazırlamayı kolaylaştırmaktadır. Nano boyuttaki kitosan partikülleri kitosan etkinliğini artırmaktadır (Qi ve ark., 2004a). Kitosanın toksik olmaması, nano boyuta indirgenmesi ilaç salınımı ve absorpsiyon kapasitesi için önem taşımaktadır. Nano boyut arttıkça bu kapasitede artış olmaktadır.

### **1.1.4. Kitosanın Kimyası**

Deasetilasyon derecesine (DD) bağlı olarak içeriği azot değişim göstermektedir. Bu

oran genellikle % 5-8 arasında değişim göstermektedir. Kitosanda bulunan alifatik amino kimyasal modifikasyon için önemli bir kullanım olanağı sağlamaktadır. Şekil 1.1’de görüldüğü gibi kitosan selülozdan farklı olarak C-2’dehidroksil (-OH) yerine amin (-NH<sub>2</sub>) grubu taşımasıdır, kitinden farkı ise; C-2’de hidroksil yerine asetamido (NHCH<sub>3</sub>CO) taşımasıdır.

Kitosan eldesinde 4 temel aşama deproteinizasyon, demineralizasyon, ağartma, deasetilasyon olduğu belirtilmiştir (Janes ve ark., 2001).



Şekil 1. Selüloz, kitin ve kitosanın kimyasal yapıları

### 1.1.5. Kitosanın Endüstriyel Uygulamaları

Kitosanın 20. yy’a kadar kullanımı arıtma ve bitki büyümesi iken sonraki yıllarda kullanım alanları artış göstermiştir. Biyobozunur ve biyoyumluluğu ile ilaç sanayinde kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra mikrobiyal, kanserojen ve bakteriyel

olmaması endüstrideki kullanımını artırmaktadır. Özellikle katyonik olması ve nanoteknolojik uygulamalara uygunluğu; biyomedikal, kozmetik, gıda ve ilaç sektöründeki işlevini artırmaktadır (Qi ve ark., 2004a).

**Tablo.1.** Kitosanın endüstrideki bazı kullanım alanları ve uygulamaları

Endüstriyel Alan	Uygulama
Atık su iyileştirme	Metal iyonlarının uzaklaştırılması Protein, boya, aminoasit, organik bileşiklerin tutulması
Su arıtma	Gıda prosesleri Meşrubat, içme suyu
Çevresel temizleme	Radyo aktif atıkların uzaklaştırılması
Tarım	Tohum kaplama Gübre Kontrollü toprak kimyasal salınımı Böcek öldürücüler Parazit öldürücüler
Kağıt kağıt hamuru	Yüzey iyileştirme Fotoğrafik kağıt Kaplama ve fiber
Gıda endüstrisi	Besleyici ilaçlar Boyar maddelerin uzaklaştırılması İçeceklerin temizlenmesi Besin korunması Renk dengesi Koku ve tat dengesi Besin dengesi Yiyecek katkıları Besin zar dokusu yapısı
Biyoteknoloji	Enzim immobilizasyonu Protein ayrılması Hücreleri kazanımı Kromatografi Hücre immobilizasyonu
Kozmetik	Nemlendirici Saç bakımı Cilt bakımı Ağız bakımı Banyo losyonu
Membran	Geçirgenlik kontrolü Ters osmoz
Ürün ayrımı ve geri kazanım	Membran ayrımı Koagülasyon Kromatografik kolonları Kapsülleme adsorbentleri
Biyomedikal	İhtihap tedavisi Kanser tedavileri Kemik iyileştirici Ameliyat iplikleri İlaç salınım sistemleri Göz içi ve kontrak lensler Pıhtılaşma etkeni Eczacılık

## 1.2. Propolis

### 1.2.1. Propolis Tanımı ve Tarihçesi

Propolis arıların bölge florasından topladıkları bileşenleri ve ürettikleri salgıları karıştırarak oluşturdukları mumsu, yapışkan özellikli reçinemsî bir madde olarak tanımlanmıştır. Toplandığı kaynağa göre renk ve diğer özelliklerinde farklılık göstermektedir (Azza ve ark., 2009).



Şekil 2. Ham propolisin görüntüsü

Geçmiş yıllardan günümüze kadar arı ürünleri dikkat çekmektedir. Arı sütü, arı zehri, polen gibi arı ürünlerinin en fazla kullanılan arı ürünleri olduğu belirtilmiştir. Özellikle arı sütü tıp uygulamalarını desteklemektedir. Bu nedenle günlük diyetle alınması önemlidir (Ghisalbert, 1988).

Arı ürünlerinden propolis ilk kez Yunanlılar tarafından tanımlanmıştır. Adını pro (ön, giriş) ve polis (şehir)'den almaktadır. Yunanlılar propolisi antibiyotik olarak kullandığı ifade edilmektedir (Kumova ve ark., 2002). Günümüzde ise sağlık ve kozmetikte kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Yaygın kullanılma nedeni, bakteri, fungus ve virüslerin propolise karşı duyarlılık göstermesidir. Bunun yanı sıra inflamator, ülser ve tümör önleyici olduğu belirtilmiştir. Bağışıklığı güçlendirdiği ve anestetik etkisinin yüksek olduğu bilinmektedir. Bu özellikleri propolise yapısında bulunan bitki kabukları, tomurcukları ve filizlerinden toplanan; lipitler, polenler ve salgı maddeleri kazandırmaktadır. Bu karışımın içinde vücuda alınması gereken yirmi iki elzem besin bulunmaktadır (Bogdanov, 2012).

Arılar propolisi yaşam alanlarının etrafını kapatmak için kullanmaktadır. Böylece kovan içi bakteri ve mantar gibi hastalık etkenlerine karşı korunmaktadır. Bunun

yanı sıra kovan içindeki her türlü onarımda yapışkan içeriğinden dolayı propolis ile yapılmaktadır (Krell, 1998).

1960'lı yıllarda propolise olan ilgi artmıştır. 1988 yılında Ghisalbert tarafından kimyasal yapısı, ilaç yapımındaki etkisi üzerinde yayınlar ortaya atılmıştır ve 20. yy itibarıyla biyolojik aktivitesi ve kimyasal yapısı ile ilgili bilgiler netlik kazanmıştır.

Batı balarısı (Avrupa balarısı) türü *Apis mellifera* kolonilerinin topladığı propolisi, Asya balarısı türleri toplamamaktadır. Meliponine (iğnesiz) cinsi arılarda yaşam alanlarının korunmasında, arı ürünlerinin üretiminde *Apis mellifera*'ya benzer yapıda hammadde biriktirmektedir. Bu durumun temel nedeni propolisin kimyasal bileşiminin toplandığı bölgenin ekolojik yapısı ile değişiklik göstermesi olarak ifade edilir. Bölge florası bu nedenle oldukça önemlidir ve bölge florasının değişkenliği nedeniyle propolisin kimyasal standardizasyonu henüz gerçekleşmemiştir. Arıcılığın gelişmesi ve arı ürünlerinin değer kazanması, propolisin toplanma isteği bal hasadını zorlaştırmakta, petekli balın değerini düşürmektedir. Ancak propolisin tıp, veteriner hekimlik, dişçilik, kozmetik ve bitkisel üretim alanlarında insanlara son derece yararlı yönleri ortaya konulduktan sonra bazı ülkelerde propolis üretimi son derece önem kazanmıştır (Doğaroğlu, 1999).

Günümüzde propolis kullanımındaki en büyük sorun, bölge florasına göre kimyasal kompozisyonu değiştiğinden bir standardın olmaması olarak ifade edilmiştir. Ayrıca arıcılık alanında da propolis toplama eğilimi bal hasadını zorlaştırmakta ve balın kalitesini düşürmektedir (Tutkun, 2002).

### **1.2.2. Propolisin Fiziksel Yapısı**

Propolis, arılar tarafından toplanan bitki özlerinin enzimler ile işlenmesi ile oluşan özel bir madde olarak tanımlanır. Propolis mumlarında bitkisel protein bulunduğundan bitkisel mumlar arasında yer almaktadır (Bianchi, 1995).

Propolisin fiziksel kombinasyonunda ortam sıcaklığı oldukça önem göstermektedir. 15-20°C'de düşük elastik yapı göstermekte ve kırılğan bir hal almaktadır. 30-40 °C'de ise yumuşak ve yapışkan iken, 80 °C' de kısmen erime göstermektedir (Ghisalberti, 1979).

Propolis bölge florasından etkilendiğinden renginde stabilite göstermemektedir. Sarı yeşilden koyu kahverengine kadar geniş bir skalada dağılmaktadır (Özkök ve Sorkun, 2001).

Bu mumsu madde eter, kloroform gibi organik çözücülerde iz miktarda çözünme gösterirken %75'lik ve üzerindeki konsantrasyonlarda alkolde çözünmektedir. Su ile reaksiyonun olmadığı ifade edilmektedir (Krell, 1998).

### 1.2.3. Propolisin Kimyasal Yapısı

Propolis içeriği bölgenin florasına, arıların ırkına ve bölgenin iklim koşullarına göre değişiklik gösterdiğinden tam bir standart göstermemektedir. Fakat yaklaşık olarak 150 kimyasal ve 20'den fazla mineral madde yanında bal mumu, reçine ve polen bulunmaktadır (Gençay ve Sorkun, 2002b).

**Tablo 2.** Propolisin genel yapısında bulunan maddelerin oranı

Maddeler	(%)
Reçine ve zamksı maddeler	50
Bitkisel mumlar	30
Esansiyel yağlar	10
Polen	5
Organik bileşikler ve mineral maddeler	5

Propolisin içeriğinde, Krizin, Apigenin, Acacetin, Quercetin, Kaempferide, Kaemperol-7,4'-dimethyl ether, Galangin, Pinochembrin, Pinobanksin, Pinobanksin-3-acetate, Pinostrobin, 3',4'- dihydroxyflavanoids, Flavan-3-ols, Pectolinarinenin, Luteolin, 3, 4-dimethyl ether- luteolin, Artepillin C, Eriodictyol, Pinosylvin (3,5-dihydroxystilbene), flavonoidler, Ferulic asit, Isoferulic asit, Benzoik asit, Cinnamic asit, Isopentyl ferulate, p- Coumaric asit benzyl ester, Caffeic asit, Prenyl caffeate, 3-methyl-but-2-enyl caffeate, Caffeic asit phenetyl ester, Methyl caffeate, Diterpenoid-clerodan, Ermanin, Volatile compounds (etheric oils) bulunduğu bildirilmiştir (Kumova ve ark., 2002).

Propolisin kimyasal içeriği bulunduğu bölgenin florasına göre değiştiği bildirilmektedir (Kumova ve ark., 2002).

**Tablo 3.** Propoliste belirlenen bileşik grupları ve sayıları

<b>Bileşikler</b>	<b>Tanımlanan Bileşik Sayısı</b>
Flavonoidler	38
Hidroksiflavonlar	27
Hidroksiflavononlar	11
Kalkonlar	2
Benzoik Asit ve Türevleri	12
Asitler	8
Esterler	4
Benzaldehit Türevleri	2
Sinamil ve Sinamik Asit İle Türevleri	14
Alkoller, Ketonlar, Fenoller	8
Heteroaromatik Bileşikler	12
Terpen ve Sekuterpen ve Türevler	7
Alifatik Hidrokarbonlar	6
Sekuterpen ve Triterpen Hidrokarbonlar	11
Steroller ve Steroic Hidrokarbonlar	6
Mineraller	22
Şeker	7
Aminoasit	24

#### **1.2.4. Propolisin Biyolojik Aktiviteleri**

İlk olarak Yunanlılar tarafından eski çağlarda tanımlanan propolis tedavi amacı ile kullanılmaya devam etmektedir. Geçmiş yıllarda ameliyatlarda, yaralı dokuların dezenfeksiyonu ve onarımında kullanılmıştır (Kumova ve ark., 2002).

İlerleyen teknoloji ve tekniklerle propolis, bakteri, virüs, mantar gibi patojenlerin üzerinde etkili olduğunu kanıtlamıştır. Kimyasal bileşimlerinde bulunan flavonoidler ve terpenler antioksidan ve steril özelliğini güçlendirmektedir. Son dönemde işlem görmeyen propolis kullanımı artmıştır (Ergün, 1987).

Oral yol ile alınan propolis gastroendostiroil sistemde kontrollü çözünerek kana difüze edilmektedir. Böylelikle dolaşıma katılan propolis içeriği doku ve organlarda yenilenme sağlamakta ve enfeksiyon direncini artırmaktadır. Oral alım dışında travmatize olmuş bölgelerde doğrudan kullanımının da mümkün olduğu ifade edilmiştir.

Flavonoidler propolis kimyasal içeriğindeki en önemli maddeler arasında yer almaktadır. Propolis tükrükte bulunan enzimler ile karşılaştığında değişikliğe uğramaktadır. Bu değişiklikler ile etkisi artan flavanoidlerin dolaşım sistemi üzerindeki etkiside artmaktadır. Flavonoidlerin etkisi ile kan basıncını düzenlenir, endoderm hasarları onarılır, sindirim sistemi epitelleri yenilenir, endokrin sistem düzenlenir (Fearnley, 1998).

Organik çözücülerde açığa çıkan sinomik asit trombositler üzerinde etkili olarak pıhtılaşma mekanizmasını artırmaktadır. Bunun yanı sıra dermatolojide verimli kullanım sağlamaktadır (Kumova ve ark., 2002).

Propoliste bulunan önemli kimyasallardan birinin de kafeik asit olduğu bildirilmiştir. Kafeik asit özellikle virüsler üzerinde etkinlik göstermektedir. Propolisin tümör önleyici özelliğini kafeik asit güçlendirmektedir (Ergün, 1987).

Propolisin alkolde çözünmesinin daha iyi olmasına rağmen kimyasal kompozisyonunda kayıplar oluşturmaktadır. Bu nedenle farmakolojik kullanımında antibiyotikler ile kullanımının uygun olduğu belirtilmiştir (Kumova ve ark., 2002).

Biyoflavonoidlerde kafeik asit gibi gastrol epitellerin de onarıcı etki göstermektedir. Bu konudaki en önemli özelliği ise doğal bağırsak florasına zarar vermeden bu rejenarasyonu gerçekleştirilmesidir (Fearnley, 1998).

Uzak Doğu Ülkelerinde yapılan çalışmalarda düzenli alınan propolisin kronik ve onkolojik semptomları azalttığı gözlenmiştir.

Sovyetler döneminde yapılan çalışmalarda solunum yolu bakteriyel enfeksiyonlarında da propolisin kullanılabilceğini göstermektedir. Romanya ve Rusya'da propolis doku yenilenmesi ve iltihap önleyici özelliğini çalışmalarında



kullanmıştır. Tüm bunların yanı sıra propolisin histamin ve serotonin salgısı üzerindeki olumlu etkisi ile alerjik reaksiyonların gelişmesini engellemektedir, kendi alerjik etkisinin de düşük olduğu belirtilmiştir (Gençay ve Sorkun, 2002b).

**Tablo 4.** Propolis biyolojik ve iyileştirici etkileri (Bogdanov, 2012)

<b>Etki</b>	<b>Test Edilen Propolis Türü</b>
Antibakteriyel	Propolis çeşitlerinin tamamı
Antiviral	Propolis çeşitlerinin tamamı
Antifungal	Propolis çeşitlerinin tamamı
Anti parazit	Kavak, Baccharis, Küba
Anti ülser	Baccharis, Hindistan
Antioksidan	Propolis çeşitlerinin tamamı
Radyasyon koruyucu	Kavak, Baccharis
Karaciğer koruyucu	Propolis çeşitlerinin tamamı
Antitümör, antimutajenik	Kavak, Baccharis, Küba Taylan
Anti inflamatuvar	Kavak, Baccharis, Küba, Mısır
Bağışıklığı düzenleyici	Kavak, Baccharis
Düşük dozda kas kasılmasına karşı, Yüksek dozda kas gevşetici olarak	Kavak, Baccharis
Anti diabetik	Kavak, Baccharis
Lokal anestezi	Kavak, Baccharis
Kıkırdak ve kemik dokusu, dş eti ve yara izinin iyileşmesi	Kavak, Baccharis
Anti osteoporoz	Kavak, Mısır
Östrojenik	Kavak
Burun iltihabına karşı	Baccharis
Kolite karşı	Kavak, Türkiye
Anti alerjik	Kavak, Baccharis
Anti aging, yaşam süresini uzatma	Kavak
Cilt yaşlanmasına karşı	Cezayir, Kavak
Gıda koruyucu	Kavak, Baccharis, Arjantin, Mısır

### **1.3. Enkapsülasyon**

Enkapsülasyon; farklı fazlardaki gıda ürünleri, biyolojik katalizörler, mikroskobik canlıların karbonhidrat ya da protein içerikli bir kaplayıcı ile paketlenmesi olarak tanımlanmaktadır (Madene, 2003). Enkapsülasyon tekniği, biyoteknoloji, sağlık, tarım, hayvancılık, farmakoloji, kimya gibi alanlar da kullanımının uygun olduğu ifade edilmiştir. En yaygın kullanım alanının gıda olduğu görülmektedir (Kınık ve ark., 2003).

Enkapsülasyonun gıda ve ilaç sektöründe fazlaca kullanılma nedenlerinin başında bu iki sektörde kullanılacak olan materyallerin stabilitelerinin hızlı değişimi olduğu bildirilmiştir. PH değişimleri, sıcaklık değişimleri, nem gibi olumsuz faktörlere karşı enkapsülasyon tekniği önemli bir koruma sağlamaktadır. Enkapsülasyon, kararlı ve uyumlu ortamlar oluşturulması, kaplanan ajanların kontrollü salınımlarını sağlaması nedeniyle önem taşımaktadır (Ivanova ve ark., 2011).

Mikroenkapsülasyon ise çok daha küçük kaplama materyallerinin kullanılması olarak tanımlanmıştır (Madene, 2003). Mikroenkapsülasyon; kaplanacak olan malzemenin etrafının bir duvar ile çevrelenmesi olarak tanımlanmaktadır. Bu teknikte kapsüllerde tam bir standart tanımlanmamaktadır. Tanecikler genellikle kaplanacak olan materyalin özelliklerine göre değişim göstermektedir. Bunun yanı sıra mikro taneciklerin küçülmesinin kapsüle edilen maddenin etkinliğini artırdığı bilinmektedir. Kapsülasyonda kaplama materyali duvar, kabuk, membran olarak adlandırılırken; kaplanan materyal iç faz, dolgu ya da öz olarak tanımlanabilir (Kınık ve ark., 2006).

#### **1.3.1. Enkapsülasyonun Tarihçesi**

1932 tarihinde İngiliz şirketi A. Boake, Roberts vd. Co Ltd püskürterek kurutma tekniği kullanarak üretim yapmıştır. Bu tekniğin kullanımı zamanla gıda sektörü için oldukça önemli bir yer almıştır (Barbosa ve ark., 2005). Yaklaşık 50 yıllık geçmişi olan enkapsülasyon tekniğine devlet teşvikleride artmıştır. İsrail bu teknik açısından ABD ve İngiltereden önce gelir fakat ABD ve İngiltere sistemin kökenini oluşturmaktadır (Chen ve ark., 2007).

### **1.3.2. Enkapsülasyonun Uygulanması**

Enkapsülasyon uygulamalarında kapsüle edilecek maddenin özelliği, yöntem uygunluğu, işleme ve saklanma koşulları gibi faktörler önem taşımaktadır. Bu nedenle yöntem rastgele uygulanmamalıdır.

Enkapsülasyon tekniğinde genellikle; materyalin saklanma süresi ve koşulları, depolanma koşulları, maliyet, işleme koşulları, fiziksel ve kimyasal özellikleri incelenmektedir. Farklı alanlarda uygulanmasında da kaplanacak materyalin özellikleri, kullanım alanı, işlem durumu, dolgunun fiziksel ve kimyasal özellikleri önem taşımaktadır.

Kaplanacak özün özellikleri değerlendirildikten sonra; kullanılacak olan kabuk materyali ve yöntemi değerlendirilmelidir (Zuidam ve ark., 2010).

### **1.3.3. Enkapsülasyon Yöntemleri**

Yaygın olarak kullanılan enkapsülasyon yöntemleri; mikroenkapsülasyon, döner süspansiyon, dondurarak kurutma, kaplama yöntemi, faz ayrımı, ekstrüzyon-emülsiyon, nanoenkapsülasyon, püskürterek kurutma, moleküler kompleks oluşturmaktır (Barbosa ve ark., 2005).

### **1.3.4. Enkapsülasyon Çeşitleri**

Enkapsülasyonda; 200 nm=0.2  $\mu$ m'den küçük partiküller nanoenkapsülasyon, 0.2-5,000  $\mu$ m aralığındaki partiküller mikroenkapsülasyon, 5,000  $\mu$ m'den büyük partiküller ise makroenkapsülasyon olarak çeşitlendirilmektedir (King ve ark., 1995).

#### **1.3.4.1. Mikroenkapsülasyon**

Enkapsülasyon işlemi genel anlamıyla hapsedme, bir yere sabitleme işlemi olarak ifade edilir. Mikroenkapsülasyon (ME) da ise bu işlem daha küçük tanecikler ile yapılmaktadır. ME farklı fazlardaki maddelerin (organik maddeler ve hücrelerin) mikrokapsüllerde hapsedilmesi şeklinde de tanımlanmaktadır. ME genel tutuklama (immobilizasyon) yöntemlerinden biridir ve enkapsülasyon ile aynı anlamda kullanılmaması gerektiği ifade edilmiştir (Hsieh ve ark., 2006).

Yöntemin temel amacı; oluşturulacak kapsüle stabiliteyi ve kontrollü salınımı sağlamaktır. Bunun yanı sıra kaplanan maddenin uygun olmayan bileşiklerden ayrımı sağlanmıştır ve dolgunun kontaminasyonu engellenmiştir. Böylece hem dolgu hem çevre için koruma sağlanmıştır (Uyan ve ark., 2004).

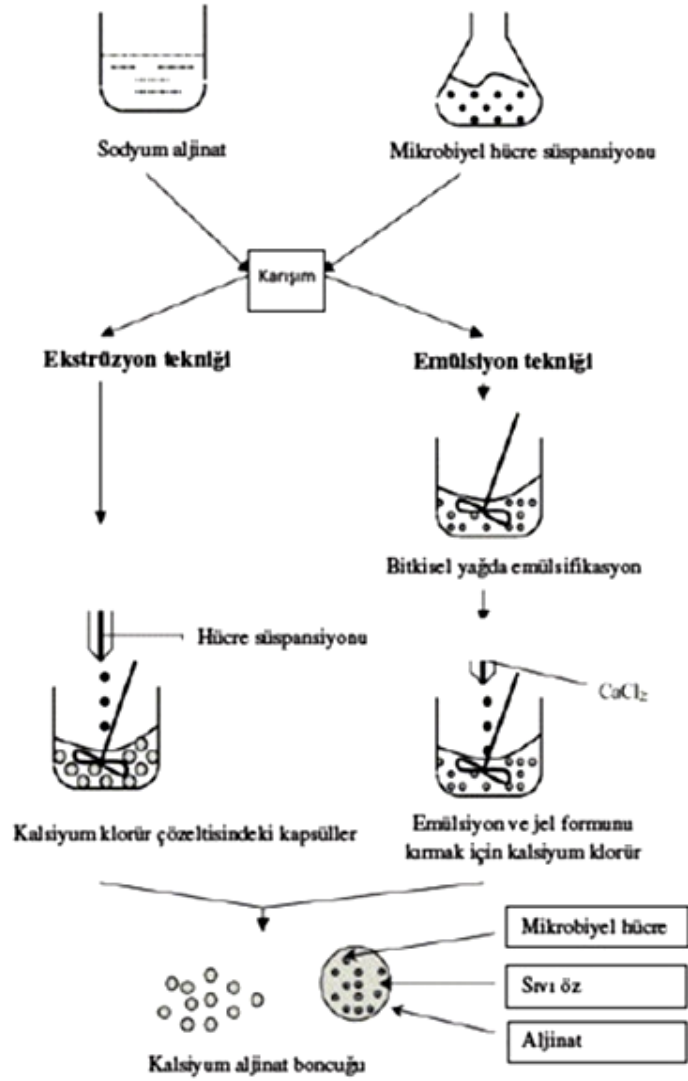
Bu temel amaçlarda, yüksek verim elde edilebilmesi için ME’de yapılması gerek öncelikli iş kabuk materyalini belirlemektir. Kabuk için; proteinler, karbonhidratlar, gamlar, yağlar gibi film oluşturabilen maddelerin kullanımı tercih edilmiştir (Hsieh ve ark., 2006).

Dolgu maddesi ME yönteminde, yarı geçirgen bir kabuk içerisinde hapsedilmektedir. Oluşturulan kabukta yaklaşık olarak çap 5 ile 300 pm arasında değişmektedir ve kabukta oluşan gözenekler 0.45 pm’den büyük olmaması gerekmektedir (Dubey ve ark., 2004).

#### **1.3.4.2. Ekstrüzyon ve Emülsiyon Yöntemleriyle Mikroenkapsülasyon**

ME’ de kullanılan ekstrüzyon ve emülsiyon teknikleri temel de benzerlik göstermektedir. Bu yöntemlerde ekstrüzyon ve emülsiyon farklılık göstermektedir. Ekstrüzyon yönteminde kaplanması istenen materyal katılaştırıcı içine damlatılırken; emülsiyon tekniğinde, kaplanması istenen materyal sodyum aljinat çözeltisine ilave edilerek üzerine katılaştırıcı damlatılmaktadır. Yöntemler sonun da ortak olan durum mikroenkapsüllerin oluşturulmasıdır. Yapılan çalışmalarda mikroenkapsülasyonun etkinliğini artırmak için kapsüllerin daha küçük olması gerektiği gözlenmiştir. Emülsiyon tekniğinde daha küçük partiküller elde edildiğinden etkinliğinin ve kullanımının ekstrüzyona göre fazla olduğu ifade edilmiştir (Park ve ark., 2000).

Bu iki yaygın yöntemde de, homojenizasyon üzerinde dikkatle durulması gerektiği ifade edilir. Çünkü kapsüle edilecek maddenin etkinliği buna bağlanmaktadır. Bu durum homojenizatörün yöntemler üzerinde oldukça etkili olduğunu göstermektedir (Capela ve ark., 2009).



**Kaynak:** Champagne C, Fustier P. 2007; 21. Park JK, Chang HN. 2000; Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. 2003

**Şekil 3.** Ekstrüzyonve emülsiyon teknikleri ile mikroenkapsülasyon

### 1.3.4.3. Mikroenkapsülasyonda Kullanılan Kaplama Materyalleri

ME'de kapsül matriksi tek duvarlı, çok duvarlı, düzensiz duvarlı ve fazla çekirdekli şeklinde çeşitlilik göstermektedir. ME çapı 5 ile 300pm arasında olması gerektiği belirtilmiştir. ME kapsül materyali; pahalı ve zehirli olmamalıdır, aynı zamanda koruması güçlü olmalı ve kolay uygulanabilmelidir (Qi ve ark., 2000). Tüm bu özellikleri tek bir kaplama materyalinde bulmanın zor olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bazı tamamlayıcılardan destek alınmaktadır (Kailasapathy ve ark., 2006).

Yapılan çalışmalarda ME'da genel olarak biyogam aljinat kaplama materyali olarak kullanılmaktadır. ME'de tamamlayıcı olarak aljinat kullanımını, kolay ulaşma, stabil jel oluşturma, zehirli olmama, tampon çözelti oluşturma, kalsiyum klorür gibi katılaştırıcılara olumlu cevap verme özelliklerinden dolayı tercih sebebi olduğu belirtilmiştir (Chandramoulia ve ark., 2004). Ayrıca dolgu maddesi olarak bakterilerin (probiyotik) kullanıldığı çalışmalarda bakterilerin canlılığını olumlu etkilediği ve gastrointestinal yolda dayanıklı olduğu saptanmıştır (Chen ve ark., 2006).

Mikroenkapsülasyon çalışmalarında amacın oksidasyonu önlemek, aromanın korunmasını sağlamak, depolamada oluşabilecek hasara karşı direnci artırmak olduğu ifade edilmiştir (Koç ve ark., 2010).

Kaplama materyali olarak peynir altı suyu (Young ve ark., 1993; Rosenberg ve ark., 2006), bazı gamlar (Soottitantawat ve ark., 2005; Shaikh ve ark., 2006; Minemoto ve ark., 1997; Kaushik ve Roos, 2007), bazı karbonhidrat türevlerinin kullanıldığı bildirilmiştir (Shu ve ark., 2006; Edris ve Bergnstahl, 2001; Klinkesor ve ark., 2005).

Çekirdek materyali olarak bazı yağların (Young ve ark., 1993; Edris ve Bergnstahl, 2001; Baik ve ark., 2004; Klinkesor ve ark., 2005), antosiyaninlerin (Ersus ve ark., 2007), karotenoidlerin (Selim ve ark., 2000), probiyotik mikroorganizmaların (Ünal ve ark., 2010) kullanıldığı belirtilmiştir.

Propolis ekstraktlarının ise aljinat biyopolimeri ile kapsüle edildiği bildirilmiştir (Keskin ve ark., 2018; Keskin, 2018). Bunun yanı sıra propolis poli- $\epsilon$  kaprolakton (Duran, ve ark., 2007),  $\beta$ -siklodekstrin (Kalogeropoulos, 2009), kitosan (Liu ve ark., 2007) kullanarak mikrokapsüllerin elde edildiği bildirilmiştir.

Literatürde kitosan kullanılarak elde edilen propolisli enkapsüller ile ilgili yeterince çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmalarda genellikle propolis yüklü enkapsüllerin salınımının incelendiği görülmüştür (Keskin ve ark., 2018; Keskin, 2018; Duran ve ark., 2007; Kalogeropoulos ve ark., 2009; Liu ve ark., 2007).

Bu alışma ile elde edilen verilerde göstermektedir ki propolis yüklü kitosan mikroenkapsllerinin antimikrobiyal etkisi artmış, salınımı kontrollü gerçekleşmiştir. Çalışmanın amacı propolis yüklü kitosan mikroenkapsllerinin kontrollü salınımı ile sindirim kanalından bozulmadan geçebilecek ve bağışıklığı destekleyebilecek takviye ürünleri elde edebilmektir.

## **2. MATERYAL VE METOD**

Bu çalışma Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Gıda Mikrobiyolojisi Araştırma Laboratuvar'ında yapılmıştır.

### **2.1. Materyal**

#### **2.1.1. Kitosan Çözeltisinin Hazırlanması**

Sigma-Aldrich Firmasından temin edilen orta molekül ağırlıklı kitosan %1'lik asetik asit (Merk) çözeltisinde çözülmüştür.

#### **2.1.2. Propolis Çözeltisinin Hazırlanması**

Propolis Sivas Tarım Müdürlüğü aracılığı ile ticari olarak elde edilmiştir. Derin dondurucuda (Bosch KGU40622NE) saklanmıştır. Havanda dövülen propolis tartılarak (KERN PLS 1200 3A D-72336) % 96'lık etanol ile (Merk 100983) çözülmüştür. Çalkalamalı inkübatörde (SI-600) 1 hafta bekletilmiştir.

#### **2.1.3. Sodyum Aljinat (C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>O<sub>6</sub>Na) Çözeltisinin Hazırlanması**

Sodyum aljinat (C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>O<sub>6</sub>Na) (düşük viskoziteli-Merk) MP Biomedicals, Illkirch, Fransa'dan temin edilmiştir. C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>O<sub>6</sub>Na çözeltisinin eldesi için distile su (Direnc-Q 3 UV) kullanılmıştır. Hazırlanan çözelti manyetik karıştırıcıda (RT 15 Pover IKA-Werke) karıştırılmıştır.

#### **2.1.4. Kalsiyum Klorür (CaCl<sub>2</sub>) Çözeltisinin Hazırlanması**

Kalsiyum klorür (CaCl<sub>2</sub>) (Merk) çözeltisi distile su (Direnc-Q 3 UV) kullanılarak hazırlanmıştır.

#### **2.1.5. Mikroenkapsülasyon (ME)**

Manyetik karıştırıcıda (IKA-Werke RT 15 Pover) karışır durumdaki C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>O<sub>6</sub>Na çözeltisine kitosan çözeltisi eklenerek 30 dk karıştırılmıştır. Karışır durumdaki aljinat-kitosan çözeltisine propolis çözeltisi eklenmiştir (Bu işlem farklı propolis çözeltileri için tekrarlanmıştır). Elde edilen çözeltilere CaCl<sub>2</sub> çözeltisi steril damla



ayar seti (dosi flow) ile damlatılmıştır. Bu işlem 50 dk da sonlandırılmıştır.

#### **2.1.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)**

Üretilen mikroenkapsüllerin görüntüleri TETCAN MİRA-3 XMU taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak elde edilmiştir.

#### **2.1.7. Bakteri Gelişimi İçin Besi Ortamının Hazırlanması**

Müller Hinton Agar (MHA) (Merk 1,05437) kullanılarak besi ortamı hazırlanmıştır. Çözeltinin ısıtılarak (Wisestir MSH-20A) homojen karışması sağlanmıştır. Otoklavda (Hirayama Hıclave HV-85L) sterilize edilmiştir. Steril edilen MHA 90 mm'lik steril cam petrilere, steril kabin (2000, ClasII, Microbiological Sfety Cabinet Herasafe KS ) içerisinde paylaştırılmıştır.

#### **2.1.8. Mikroorganizma Kültürlerinin Eldesi**

Bakteri türleri S. C. Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Hazırlanan MHA besiyerlerine Gram (-) *Escherichia coli* ve *Klepsiella pneumonia*; Gram (+) *Staphylococcus auerus* ve *Streptococcus mitis* olmak üzere toplam 2 Gram (-) ve 2 Gram (+) bakteri türünün ekimi yapılmıştır. Bulanıklığı McFarland 0.5 ( $10^8$  mikroorganizma / ml)'e göre ayarlanan bakterilerin steril swaplar kullanılarak yayma tekniği ile ekimleri yapılmıştır.

#### **2.1.9. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Testi**

Kirby Bauer tarafından geliştirilmiş steril kağıt disklere antimikrobiyal etkinliğinin test edilmesi istenen ajan emdirilerek duyarlılık tayini yapılan testtir. Steril boş disklere emdirilen antimikrobiyal ajan bir süre sonra katı besiyerine difüze olup, bakteri duyarlılığına bağlı olarak inkübasyon süresi sonunda etrafında inkübasyon zonu oluşması beklenir. Oluşan inkübasyon zonunun oluşumu ve çap büyüklüğünün bakterinin duyarlılığı hakkında bilgi verdiği belirtilmiştir (Lee ve ark., 1976). Oluşan zon mm cinsinden ölçülerek gerekli değerlendirmelerin yapılabileceği ifade edilmiştir (L'Antibiogramme, 1985; Lee ve ark., 1976).

Hazırlanan kitosan çözeltisi, propolis çözeltisi ve farklı propolis

konsantrasyonlarındaki mikroenkapsüller steril boş diskler yaklaşık 20 µl yüklenmiştir. Elde edilen diskler Kirby-Bauer test yöntemiyle besi ortamına yerleştirilmiştir. İnkübasyon için etüvde (Binder) 18-24 saat bekletilmiştir.

#### **2.1.10. İstatistiksel Analiz**

Kirby-Bauer disk difüzyon testinde elde edilen bu sonuçlarda yerleştirilen diskler arasında istatistiksel anlamda farklılık olup olmadığını belirlemek için Anova Varyans Analizi Testi uygulanmıştır. Bu farklılığın nedenini incelemek için Tukey HSD ikili karşılaştırma testi kullanılmıştır.

Propolis, kitosan ve kitosan ile mikroenkapsülenmiş %10, %20 ve %30'luk propolis çözeltilerinin bakteri duyarlılıklarını yorumlamak üzere non parametrik testlerden Kruskal Wallis Testi kullanılmıştır.

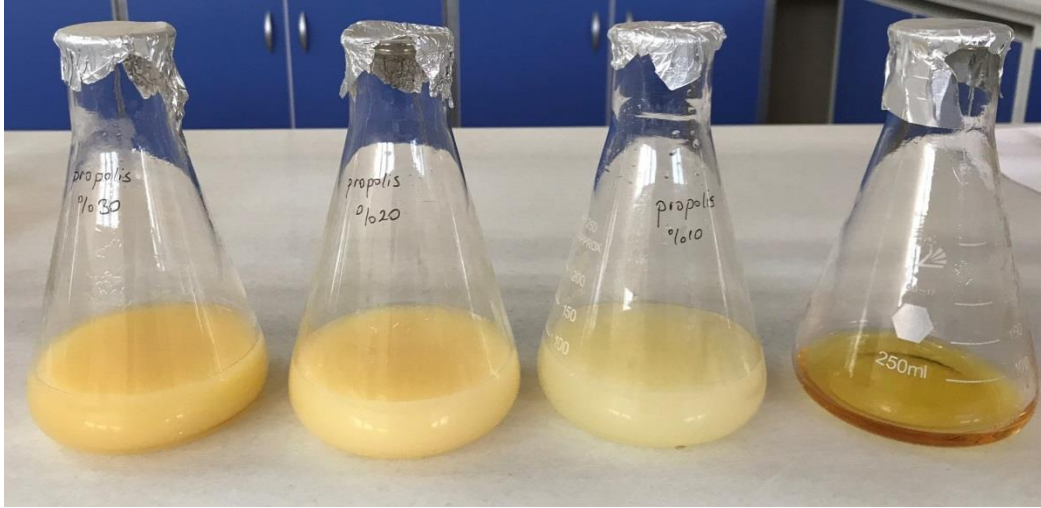
### **2.2. Metod**

#### **2.2.1. Kitosan Çözeltisinin Hazırlanması**

1 mL asetik asit 99 mL distile su kullanılmış, %1'lik asetik asit çözeltisi hazırlanmıştır. 0,05 g kitosan tartılmış ve 50 mL asetik asite (%1'lik) çözülmüştür.

#### **2.2.2. Propolis Çözeltisinin Hazırlanması**

Dondurucuda bekletilen propolis örnekleri ahşap havanda dövülerek toz haline getirilmiş ve elekten geçirilmiştir. Toz haline gelen 10 g propolis % 96'lık etanol çözeltisinde (10 g propolis;100mL etanol) oda sıcaklığında bir hafta shakerda 26 °C'de 130 rpm'de sürekli karıştırılmıştır. Bu süre sonunda elde edilen ekstraksiyon filtre kâğıdından geçirilerek filtre edilmiştir. Bu özüte, serum fizyolojik eklenerek %30'luk (30 mL propolis; 70 mL serum fizyolojik), %20'lik (20 mL propolis; 80 mL serum fizyolojik) ve %10'luk (10 mL propolis; 90 mL serum fizyolojik) konsantrasyonlarda propolis ekstraktı elde edilmiştir.



**Şekil 4.** Propolis özütlerinin elde edilmiş aşamaları

### **2.2.3. Sodyum Aljinat ( $C_6H_7O_6Na$ ) Çözeltisinin Hazırlanması**

0,075 g  $C_6H_7O_6Na$  tartılmış, 120 mL suda çözülmüştür. Manyetik karıştırıcı da 30 dk karıştır durumda bekletilmiştir. %10, %20 ve %30'luk propolis çözeltileri için üç ayrı örnek hazırlanmıştır.

### **2.2.4. Kalsiyum Klorür ( $CaCl_2$ ) Çözeltisinin Hazırlanması**

0,1 g  $CaCl_2$  50 mL distile suda çözülmüştür. Hazırlanan propolis ve kitosan karışımına 20 sn'de bir damla olacak şekilde damlatılmıştır.

### 2.2.5. Mikroenkapsülasyon

Karışır durumdaki 25 mL  $C_6H_7O_6Na$  çözeltisine 5 mL kitosan çözeltisi eklenmiştir. 1000 rpm'de 30 dk karıştırılmıştır. Karışır durumdaki 30 mL  $C_6H_7O_6Na$  kitosan çözeltisine, 10 mL propolis çözeltisi eklenmiştir (Bu işlem farklı propolis çözeltileri için tekrarlanmıştır). Elde edilen çözeltiler  $CaCl_2$  çözeltisi içine 20 sn 1 damla olacak şekilde damlatılmıştır ve işlem 50 dk da tamamlanmıştır. Çözelti içindeki mikroenkapsüller ışık mikroskobunda incelenmiş ve karşılaştırılmıştır. Elde edilen mikroenkapsüller SEM analizi ile karakterize edilmiştir.



Şekil 5. Farklı propolis konsantrasyonları ile mikroenkapsüllerin hazırlanması

### 2.2.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

SEM çalışma prensibi elektron kaynağından çıkan elektronların görüntülenecek olan materyal ile etkileşmeleri sonucunda elde edilen verilerin algılayıcılar tarafından görüntü oluşturmalarıdır. Elektron kaynağı olarak kullanılan elektron tabancası içerisinde yüksek ısı ile elektron salınımı gerçekleştiren vofram tellerin yer aldığı belirtilmiştir. Salınımı sağlanan elektronların çalışılan materyal üzerine düşüşünü hızlandırmak için anot plakaların kullanıldığı, ayrıca elektron demetini çalışma materyalinin üzerine odaklamak için sırası ile kondansör merceği ve objektif merceği kullanıldığı ifade edilmiştir (Erdin, 1987).

Çalışma materyali üzerine odaklanarak düşürülen elektronların çarpışma sonucunda geri saçılarak daha düşük enerjili Auger elektronları oluşturduğu bu elektronlarında materyal yüzeyi hakkında bilgi verdiği belirtilmiştir. Ayrıca uyarılan elektronlar X-ışınları yaydığı ve bu ışınların numuneyi oluşturan elementler hakkında bilgi verebileceği bildirilmiştir (Yıldırım, 2013).

İlk olarak propolis yüklü kitosan mikroenkapsüller santrifüjlenmiştir. 1000 rpm'de 10 dk santrifüjleme işlemi sonrası oluşan süpernatant uzaklaştırılmış pellet alınmıştır. Alınan pellet steril su ile yıkanmış ve yıkama işlemi sonucunda 1000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme sonucunda oluşan pellet alınır ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Yıkama işleminin amacı çözelti hazırlama sırasında kullanılan alkol ve tuzun uzaklaştırılmasıdır. 3. yıkama sonunda elde edilen son pellet saf su ile dilüe edilerek bakır kaplamalı gridler üzerine yerleştirilmiş ve kurutularak SEM için hazırlanmıştır.

#### **2.2.7. Bakteri Gelişimi İçin Besi Ortamının Hazırlanması**

Bakteri gelişimi için 34,0 g/L MHA konsantrasyonda damıtık su içinde ısıtılarak eritilmiştir. Besi ortamının sterilizasyonu için otoklavda 115 °C'da 10 dakika sterilize edilmiştir. Hazırlanan besiyeri steril kabinde, steril petri kutularına dökülerek oda sıcaklığında katılaşması beklenmiştir.

#### **2.2.8. Mikroorganizma Kültürlerinin Eldesi**

Hazırlanan besiyerlerine kitosan, propolis ve mikroenkapsüllerin bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkisinin saptanması için *E. coli*, *S. aureus*, *S. mitis*, *K.pneumonia* bakteri türlerinin yayma yöntem ile ekimi yapılmıştır. 18-24 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir.

#### **2.2.9. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Testinin Yapılması**

Çalışmalarda MHA besiyeri kullanılmıştır. Patojen bakteri türleri *E. coli*, *S. aureus*, *S. mitis*, *K. pneumonia* üzerine in vitro antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Hazırlanan besiyerine bakteriler 0,5 MacFarland ( $10^8$  mikroorganizma/ml) yayma yöntemi ile petri yüzeyine ekilmiştir. Oluşumu sağlanan mikroenkapsüller eppendorf

tüplerine aktarılarak 1000 rpm de 10 dk santrifüjlenmiştir. Karışımdan süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet alınmıştır. Pellette bulunan mikroenkapsüller, kitosan ve propolisin boş diskler yaklaşık 20 µl kadar emdirilmesi sağlanmıştır. Ekim yapılan petriyer üzerine elde edilen kitosan çözeltisi, propolis çözeltisi ve mikroenkapsüllerin (kitosan-propolis) emdirildiği diskler ayrı ayrı yerleştirilmiştir.

Negatif kontrol olarak standart steril boş diskler kullanılmıştır. Potitif kontrol için sadece propolis ve kitosan emdirilmiş diskler kullanılmıştır. Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi ile hazırlanan bakteri aşılama petriyer 37±0.1 °C de 18-24±2 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda besi ortamı üzerinde oluşan inkübasyon zonları mm olarak ölçümleri yapılmıştır. Oluşan zonlar kitosan, propolis ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan mikroenkapsüller için karşılaştırılmıştır. Bu işlem 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır.

**Tablo 5.** Kirby-Bauer disk difüzyon testinin sonuçları

	E.coli (mm)			K. pneumoniae (mm)			S.aureus (mm)			S.mitis (mm)		
<b>Propolis</b>	4	2	3	5	5	6	10	9	9	11	10	8
<b>Kitosan</b>	9	6	5	10	9	11	5	2	4	3	4	4
<b>10%</b>	11	10	10	12	14	11	13	15	14	13	14	18
<b>20%</b>	13	14	14	14	16	15	14	16	16	20	20	21
<b>30%</b>	17	16	17	16	17	16	17	17	18	21	23	22

#### 2.2.10. İstatistiksel Analiz

Kirby-Bauer disk difüzyon testinde elde edilen bu sonuçlarda yerleştirilen diskler arasında istatistiksel anlamda farklılık olup olmadığını belirlemek için Anova Varyans Analizi Testi uygulanmıştır. Bu farklılığın nedenini incelemek için Tukey HSD ikili karşılaştırma testi kullanılmıştır.

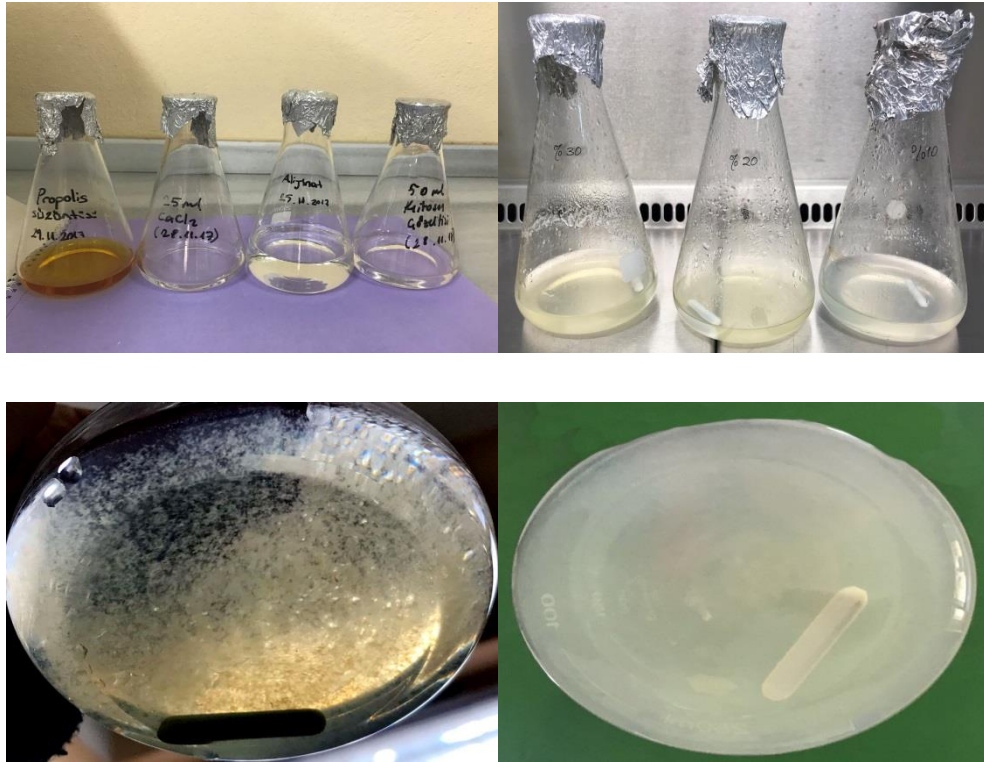
Kruskall Wallis Testi ile elde edilen inkübasyon zonlarının ortalama değerleri ve p değerleri ölçülmüştür. Kruskall Wallis Testi ile *E. coli*, *S. aureus*, *S. mitis*, *K.pneumonia* bakterilerinin propolis, kitosan ve kitosan ile mikroenkapsülenmiş

%10, %20 ve %30'luk propolis çözeltilerine verdikleri tepki karşılaştırılmıştır. Bunun yanı sıra bir bakteri örneğinin propolis, kitosan ve kitosan ile mikroenkapsülenmiş %10, %20 ve %30'luk propolis çözeltilerine verdiği duyarlılık karşılaştırılmıştır.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Mikroenkapsüllerin Eldesi

Aljinat doğal polimerleri ile propolis mikroenkapsüllemesi ilk kez çalışıldığından, kullanılacak aljinat/propolis oranı kitosan ile birlikte farklı konsantrasyonlarda denendi. Çalışmada polianyonik aljinat polimerleri, polikasyonik kitosan ile kaplanarak oluşturulan mikroenkapsüllere propolis mikroenkapsüle edildi. Mikroenkapsüllerin çöktürülmesi amacıyla  $CaCl_2$  çözeltisi kullanıldı. Bu işlem 20 sn bir damla olacak şekilde 50 dk tamamlanmıştır. Bu çalışmanın başlangıçtaki amacı kitosan ve propolisin birlikte kullanımı ile antimikrobiyal etkisini artırmaktır. Etkinin güçlendirilmesi için oluşması beklenen mikroenkapsüllerin hacimleri küçültülmüştür. Elde edilen mikroenkapsüller ile kaplama materyalinin yüzey alanı artırılmıştır. Bunun yanı sıra kitosan ve kalsiyum aljinat polimerleri içerisine tutuklanan propolisin kontrollü salınımı sağlanarak, etki süresi artırılmıştır.



Şekil 6. Mikroenkapsüllerin elde edilmesi

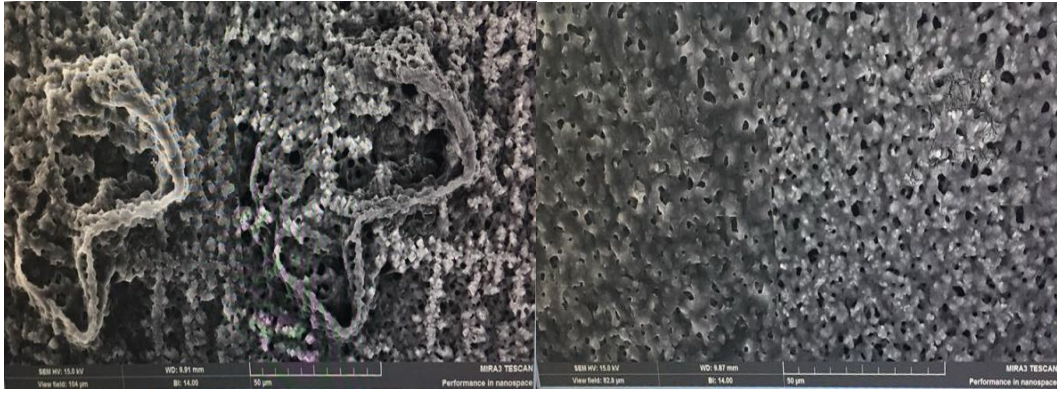
Şekil 6'da görüldüğü gibi karışır durumdaki aljinat-kitosan ve propolis



mikroenkapsüllere  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi ilavesi ile jelleşme gözlenmeye başlanmıştır. İşlemin tamamlanması ile mikroenkapsüller gözlenmiştir.

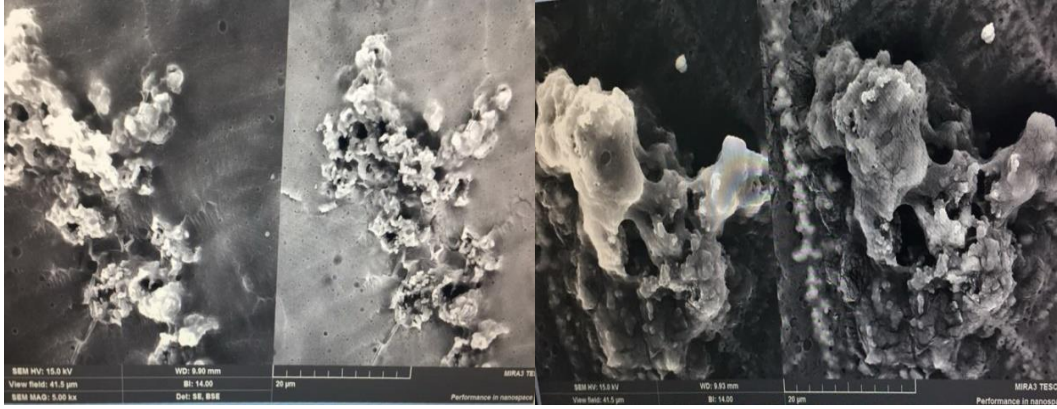
### 3.2. SEM Sonuçları

Kitosan ile mikroenkapsüle edilmiş propolis mikroenkapsüller ışık mikroskobu ile incelenmiş ve mikroenkapsüllerin olduğu gözlenmiştir. Elde edilen karışım santrifüjlenerek pellet alınmış ve yıkanarak yeniden santrifüjlenmiştir. Bu işlem üç kez tekrarlanarak mikroenkapsüller üzerinde bulunan tuz ve alkolün uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ayrıca oluşan mikroenkapsüllerin homojen dağılması amaçlanmıştır.



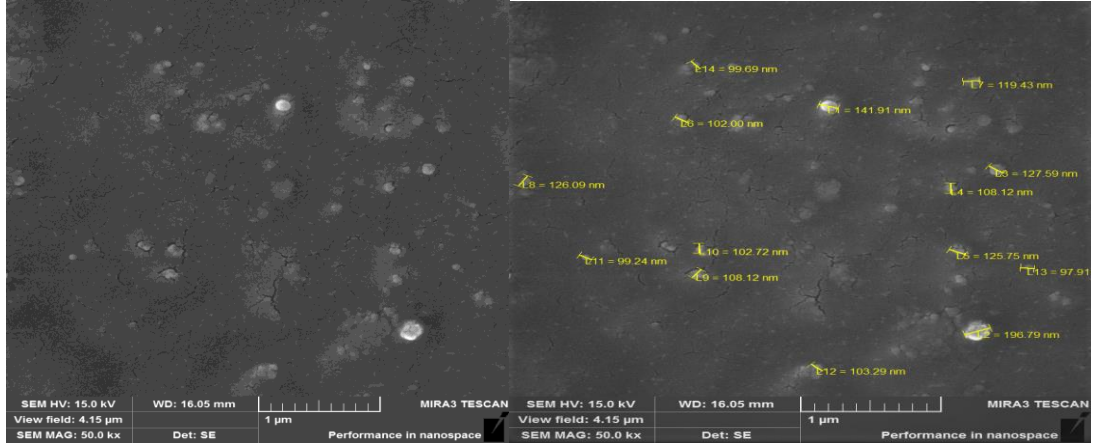
a)

b)



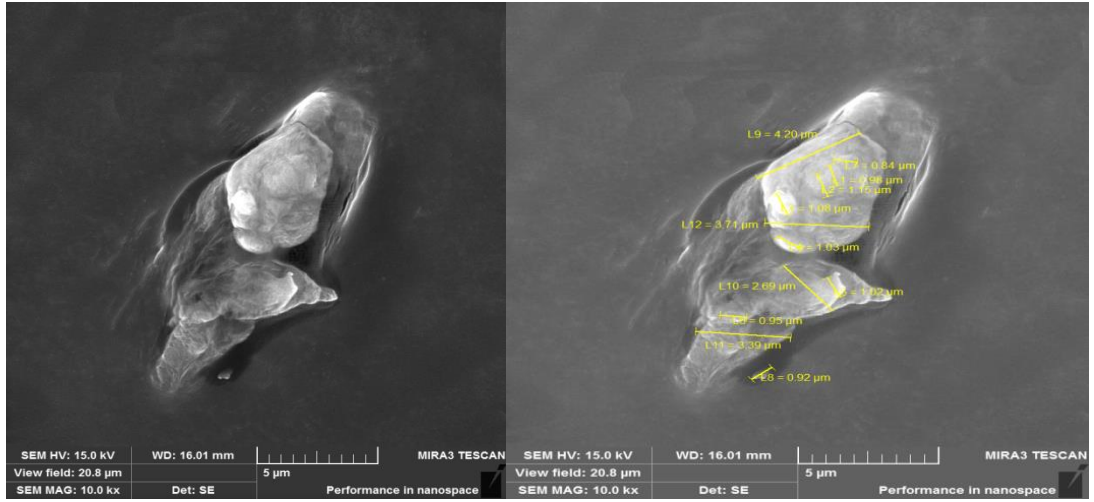
c)

d)



e)

f)



g)

h)

**Şekil 7.** Mikroenkapsüllerin SEM görüntüleri

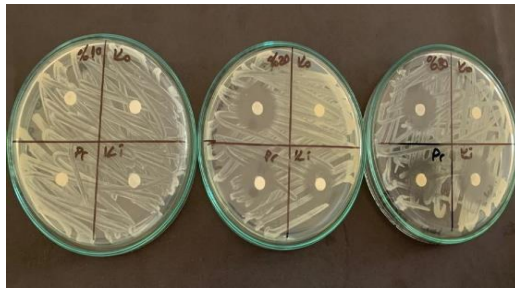
Çalışmamız da kitosan içerisine mikroenkapsüle edilmiş propolisin SEM sonuçlarına göre mikroenkapsülasyonu başarılı şekilde gerçekleştirilmiştir. Fakat kümelenmenin ve aglütasyonun fazla olduğu, tek tek elde edilmesi gereken mikroenkapsüllerin homojen dağılmadığı gözlenmiştir (Şekil 7a,b). Kitosan ile mikroenkapsüle edilmiş propolislerde homojen dağılımın gerçekleştirilmesi konusunda başarı elde edilememiştir. Aglütasyon fazlalığının katılaştırıcı ajan olarak kullanılan  $CaCl_2$  tuzunun miktarı ve/veya mikroenkapsülleme aşamasındaki karıştırıcının hızından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Aglütasyon nedeni ile toplu ölçümler yapılabilmektedir. Bu da gerçek ölçümlerin elde edilmesini engellemiştir. Fakat Şekil 7e ve Şekil 7f'de mikroenkapsüle edilemeyen

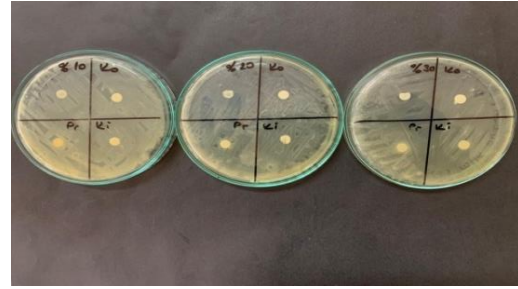
propolisin, Şekil 7g, Şekil 7h'da mikroenkapsüle edilmiş propolisin ölçümü açısından bilgi vermektedir. Mikroenkapsüle edilemeyen propolisin ortalama değeri 0,9 µm boyutunda, kitosan ile mikroenkapsüle edilmiş propoliste ise ortalama 3-4µm boyutunda olduğu gözlenmiştir. İki ölçüm arasındaki hacimsel fark yaklaşık 1 µm'lik propolisin yaklaşık 2 µm'lik kitosan ile mikroenkapsüle edildiğini göstermektedir.

### 3.3. Antimikrobiyal Çalışmaları

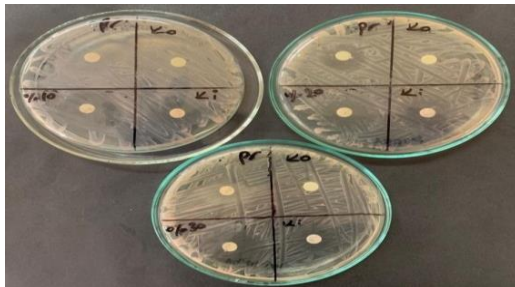
*S. aureus*, *S. mitis* (Gram (+)), *E. coli* ve *K. pneumonia* (Gram (-)) bakterilerinin antimikrobiyal çalışmalarında, negatif kontrol için boş disk; pozitif kontrol için sadece propolis ve kitosan yüklenen diskler ve deney grubu olarak kitosan-propolis mikroenkapsülleri (%10, %20, %30 propolis konsantrasyonların da hazırlanan) kullanılmıştır. Yapılan Kirby-Bauer disk difüzyon testi sonuçlarına göre Gram (+) bakterilerde Gram (-) bakterilere göre daha fazla antimikrobiyal etkinlik gözlenmiştir (Şekil 8).



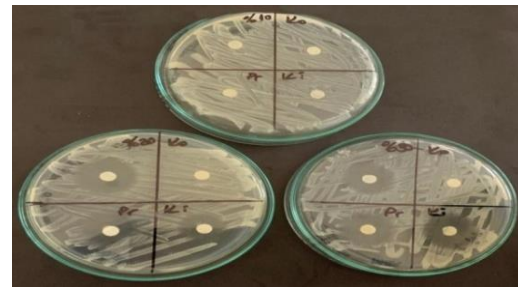
a) *K. pneumonia*



b) *S. mitis*



c) *S. aureus*

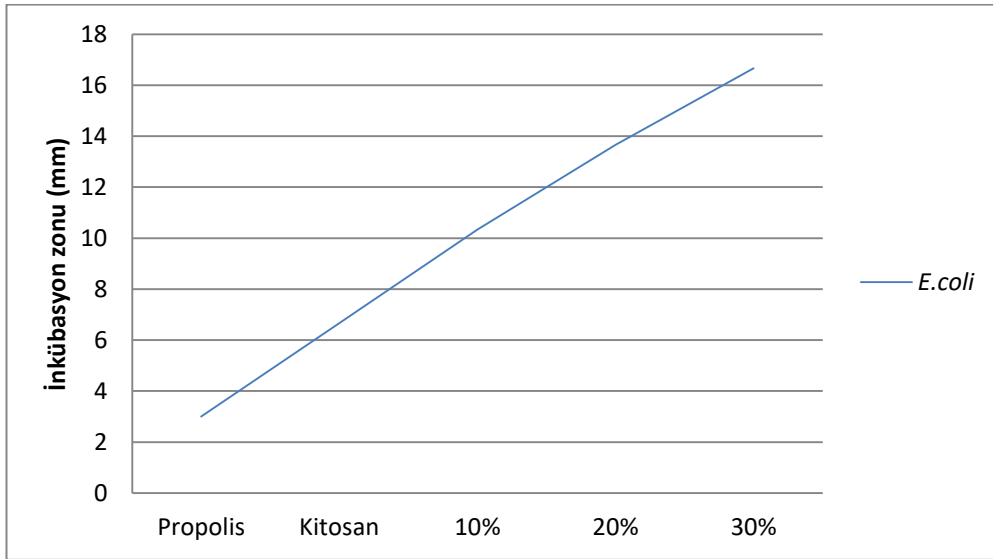


d) *E. coli*

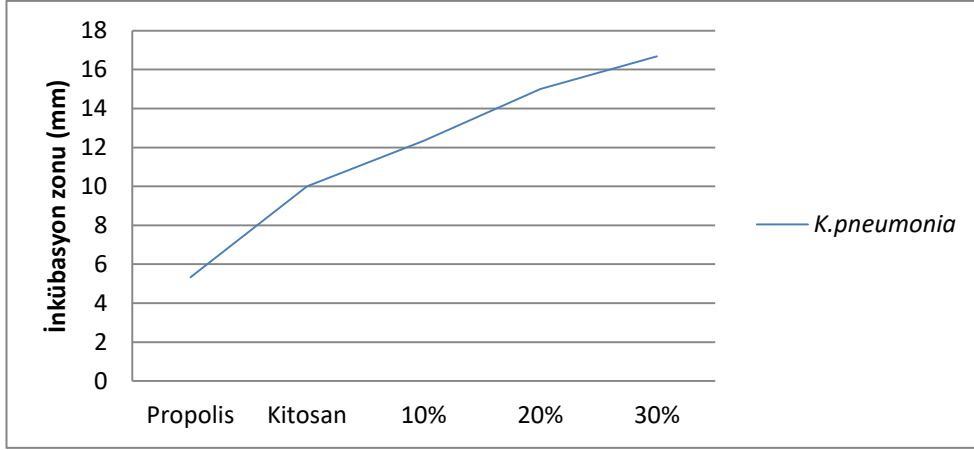
**Şekil 8.** Kitosan, propolis ve farklı propolis konsantrasyonlarında hazırlanan mikroenkapsüller ile yapılan Kirby-Bauer disk difüzyon testi

Sadece propolis yüklenen disklerin Gram (-) *E. coli* ve *K. pneumonia* bakterileri üzerinde etkinliğinin düşük olduğu, sadece kitosan emdirilen disklerde ise Gram (+) *S. aureus*, *S. mitis* bakterilerde etkinliğin düşük olduğu gözlenmiştir. Propolis yüklü disklerde Gram (-) bakterilerde ortalama zon çapları 4 mm iken, Gram (+) bakterilerde 9 mm civarındadır. Kitosan yüklü disklerde Gram (-) bakterilerde ortalama zon çapı 8 mm iken, Gram (+) bakterilerde 3 mm'dir. Elde edilen mikroenkapsüllerin ortalama zon çapları 10 mm kadardır. Farklı propolis konsantrasyonların da hazırlanan mikroenkapsüllerde ise propolis konsantrasyonu arttıkça antimikrobiyal etkinliğin arttığı gözlenmiştir.

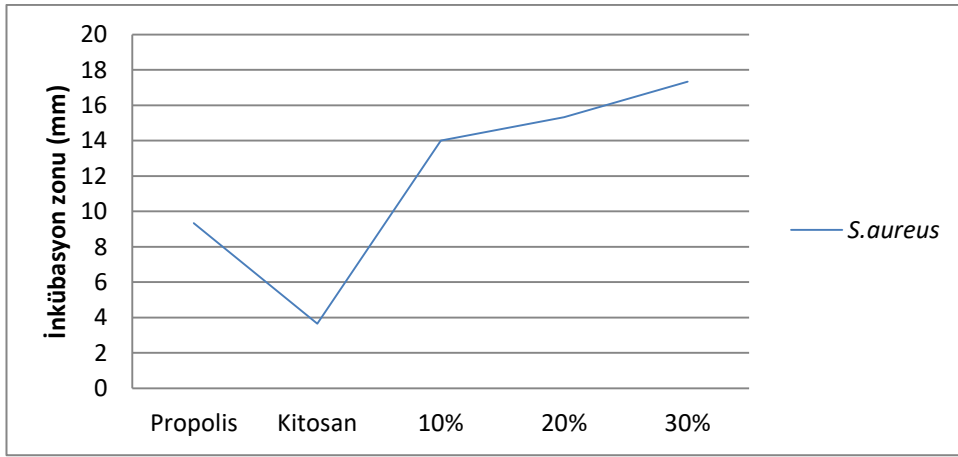
Propolis, kitosan ve %10, %20, %30 propolis konsantrasyonları ile elde edilen mikroenkapsüller steril disklerle yüklenerek yapılan Kirby- Bauer disk difüzyon testi sonuçlarına göre; *E. coli* ve *K. pneumonia*'nın propolise dirençli kitosan ile mikroenkapsüle edilmiş %30 propolis mikroenkapsüllerine ise duyarlı olduğu görülmüştür (Şekil 9a, 9b). *S. aureus* ve *S. mitis*'in ise kitosana dirençli kitosan ile mikroenkapsüle edilmiş %30'luk propolis mikroenkapsüllerine dirençli olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 9c, 9d).



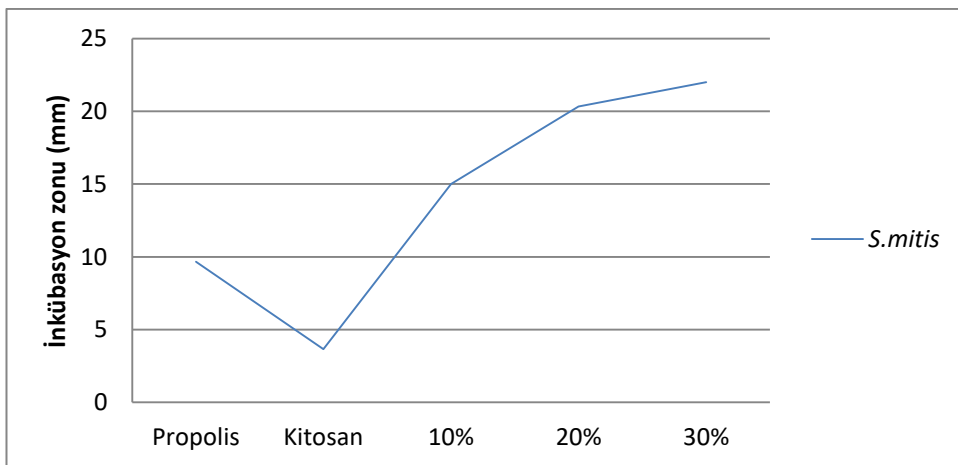
a) *E.coli*'nin duyarlılığı



b) *K.pneumonia* 'nın duyarlılığı



c) *S. aureus* 'un duyarlılığı



d) *S.mitis* 'in duyarlılığı

Şekil 9. Kirby-Bauer disk difüzyon sonuçlarına göre bakteri duyarlılıkları

### 3.4. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda 2 Gram (-) *E.coli*, *K.pneumonia* ve 2 Gram (+) *S. aureus* ve *S. mitis* bakteri ile inkübasyon yapılarak zon çapları ölçülmüştür. Bakteri türü dikkate alınmadan elde edilen inkübasyon zonlarının ortalama değerleri ve standart sapma ve minimum maksimum değerleri istatistikleri Tablo 6’de verilmiştir.

**Tablo 6.** Üç paralel çalışılan bakterilerin kitosan, propolis ve farklı propolis konsantrasyonlarında hazırlanan mikroenkapsüller ile yapılan Kirby-Bauer disk difüzyon testi ortalamaları

Mikroenkapsül	N	Ortalama	Std. Sapma	Minimum	Maksimum
Propolis	12	6,8333	3,04014	2,00	11,00
Kitosan	12	6,0000	2,98481	2,00	11,00
% 10	12	12,9167	2,31432	10,00	18,00
% 20	12	16,0833	2,74552	13,00	21,00
% 30	12	18,0833	2,46644	16,00	23,00
Toplam	60	11,9833	5,54639	2,00	23,00

Tablo 6’ye göre en yüksek zon çapı % 20 ve % 30 propolis derişimine sahip mikroenkapsüller emdirilen disklerde görülürken en düşük zon çapı sadece kitosan ve propolis emdirilmiş disklerde görülmüştür. Propolis, kitosan ve farklı propolis konsantrasyonlarında hazırlanan her bir mikroenkapsülde 4 farklı bakteri için 3 tekrarlı ölçüm yapılmıştır. Kirby-Bauer disk difüzyon testinde elde edilen bu sonuçlarda yerleştirilen diskler arasında istatistiksel anlamda farklılık olup olmadığını belirlemek için Anova Varyans Analizi Testi uygulanmıştır. Test sonuçları Tablo 7’de verilmiştir.

**Tablo 7.** Mikroenkapsüller için ortalama zon çapların karşılaştırma sonuçları

	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	Sig.
Gruplar Arası	1406,567	4	351,642	47,354	0,000
Gruplar İçi	408,417	55	7,426		
Toplam	1814,983	59			

Tablo 7'e göre zon çapları ortalamasına göre mikroenkapsüller arasında istatistiksel anlamda farklılık belirlenmiştir ( $p:0,000<0,05$ ). Bu farklılığın nedenini incelemek için Tukey HSD ikili karşılaştırma testi kullanılmıştır ve sonuçlar Tablo 8'da verilmiştir.

**Tablo 8.** Mikroenkapsüller için Tukey HSD ikili karşılaştırma sonucu

Mikroenkapsül	N	Subset for alpha =0 ,05		
		1	2	3
<b>Kitosan</b>	12	6,000		
<b>Propolis</b>	12	6,833		
<b>%10</b>	12		12,917	
<b>%20</b>	12			16,083
<b>%30</b>	12			18,083
<b>Sig.</b>		0,944	1,000	0,385

Tablo 8'e göre, ölçülen zon çaplarına göre yerleştirilen diskler 3 gruba ayrılmıştır. En düşük zon çaplarının ölçüldüğü 1. grupta kitosan ve propolis bulunurken, daha yüksek zon çaplarının ölçüldüğü 2. grupta % 10'luk propolis derişimine sahip mikroenkapsüller yer almıştır. En yüksek zon çaplarının ölçüldüğü 3. grupta ise % 20'lik ve % 30'luk propolis derişime sahip mikroenkapsüller bulunmaktadır.

Herbir bakteri türü için kitosan, propolis ve farklı propolis konsantrasyonlarındaki mikroenkapsüllerin inkübasyon zon çapları incelenmiştir. Kitosan, propolis ve farklı propolis konsantrasyonlarındaki mikroenkapsüllerin 4 ayrı bakteri türü için 3'er tekrar alınmıştır. Gözlem değerlerinin az olması nedeniyle mikroenkapsüllerin karşılaştırılması non-parametrik bir test olan Kruskal-Wallis Testi ile yapılmıştır. Elde edilen verilerin bakterilere göre ortalama değerleri, standart sapması ve minimum- maksimum değerleri ve test sonuçları Tablo 9'da verilmiştir.

**Tablo 9.** Herbir bakteri türüne göre mikroenkapsüllerin karşılaştırma sonuçları

	Mikroenkapsül	N	Ortalama	Std. Sapma	Minimum	Maksimum	P
<i>E. Coli</i>	Propolis	3	3,000	1,000	2,000	4,000	0,009
	Kitosan	3	6,667	2,082	5,000	9,000	
	% 10	3	10,333	0,577	10,000	11,000	
	% 20	3	13,667	0,577	13,000	14,000	
	% 30	3	16,667	0,577	16,000	17,000	
<i>K. Pneumonia</i>	Propolis	3	5,333	0,577	5,000	6,000	0,011
	Kitosan	3	10,000	1,000	9,000	11,000	
	% 10	3	12,333	1,527	11,000	14,000	
	% 20	3	15,000	1,000	14,000	16,000	
	% 30	3	16,333	0,577	16,000	17,000	
<i>S. Aureus</i>	Propolis	3	9,333	0,577	9,000	10,00	0,010
	Kitosan	3	3,667	1,527	2,000	5,000	
	% 10	3	14,000	1,000	13,000	15,000	
	% 20	3	15,333	1,155	14,000	16,000	
	% 30	3	17,333	0,577	17,000	18,000	
<i>S. Mitis</i>	Propolis	3	9,667	1,527	8,000	11,000	0,009
	Kitosan	3	3,667	0,577	3,000	4,000	
	% 10	3	15,000	2,646	13,00	18,000	
	% 20	3	20,333	0,577	20,000	21,000	
	% 30	3	22,000	1,000	21,000	23,000	

Tablo 9'a göre; kullanılan Gram (-) ve Gram (+) bakterilerinin türlerinin tamamı için kitosan, propolis ve farklı konsantrasyonlardaki propolis mikroenkapsülleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmiştir ( $p:0,009<0,05$ ). Bakteri türlerinde en yüksek zon çapları % 20'lik ve % 30'luk propolis derişimlerine sahip mikroenkapsüller de görülürken, en düşük zon çapları propolis ve kitosanda görülmüştür.

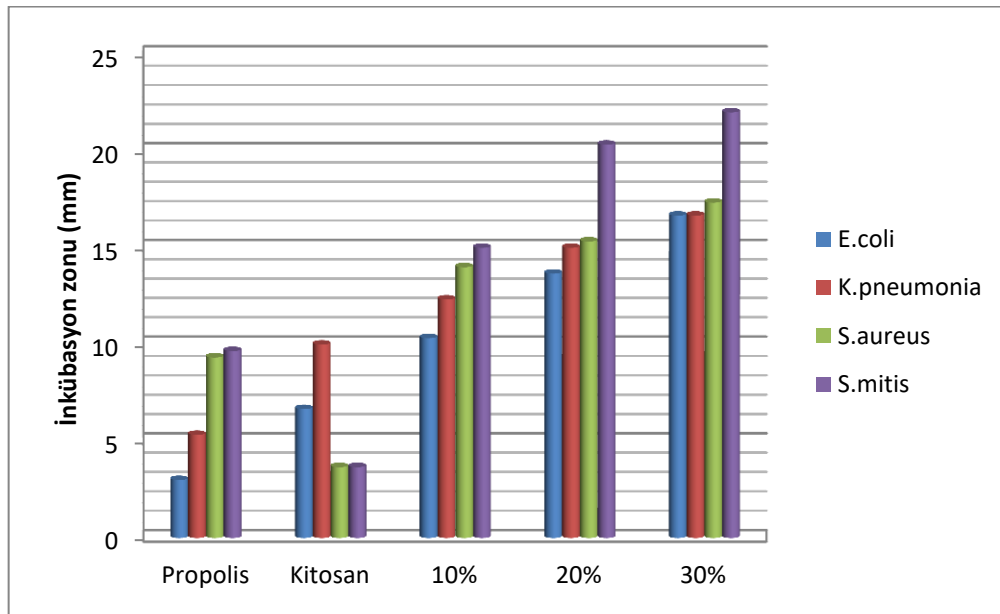
Kirby-Bauer disk difüzyon testi ortalamalarına bakıldığında propolisin Gram (-) *E.coli* ve *K.pneumonia* bakterileri üzerinde ortalama 3-5 mm'lik inkübasyon zonu oluşturduğu, Gram (+) *S. aureus*, ve *S. mitis* bakterilerinde ise bu oranın 9 mm'ye çıktığı gözlenmiştir. Kitosanda ise Gram (-) *E. coli* ve *K.pneumonia* bakterileri üzerinde ortalama 8 mm'lik inkübasyon zonu oluştuğu, Gram (+) *S. aureus* ve *S.*



*mitis* bakterilerinde ise bu oranın 3 mm'ye indiği gözlenmiştir (Tablo 9).

Kitosan ile mikroenkapsüle edilmiş propolis mikroenkapsüllerinde ise bu ortalamaların %10'luk propolis mikroenkapsülünde Gram (+) *S. aureus* ve *S. mitis* bakterilerinde 14,5 mm, Gram (-) *E. coli* ve *K. pneumonia* bakterilerinde 11,3 mm; % 20 propolis mikroenkapsüllerinde Gram (+) *S. aureus* ve *S. mitis* bakterilerinde 17,8 mm, Gram (-) *E. coli* ve *K. pneumonia* bakterilerinde 14,3 mm; %30 propolis mikroenkapsüllerinde ise Gram (+) *S. aureus* ve *S. mitis* bakterilerinde 19,7 mm, Gram (-) *E.coli* ve *K.pneumonia* bakterilerinde 16,5 mm olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen verilere göre mikroenkapsüllerin Gram (+) bakteriler üzerindeki etkinliğinin daha fazla olduğu görülmüştür (Tablo 7).

Şekil 10'da verilen grafikte üç paralel çalışılan 2 Gram (-) 2 Gram (+) bakterinin ortalama etkinlikleri gösterilmiştir.



**Şekil 10.** Kirby-Bauer disk difüzyon testi ile propolis, kitosan ve mikroenkapsüllerin etkinliği

Şekil 10'de de görüldüğü gibi propolis Gram (-), kitosan ise Gram (+) bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkinlik bakımından yetersiz kalmıştır. Elde edilen mikroenkapsüller ise çalışılan bakterilerin tamamı üzerinde olumlu sonuç vermiştir.

Verilere göre %10 propolis içeren mikroenkapsüller de ortalama inkübasyon zonu 12,91 mm iken %20 propolis içeren mikroenkapsüllerde 16,08 mm, %30 propolis içeren mikroenkapsüllerde 18,16 mm olarak hesaplanmıştır (Tablo 9). Elde edilen mikroenkapsüllerin propolis konsantrasyonlarında ki artışın antimikrobiyal etkinliği de artırdığı görülmüştür. Gram (-) ve Gram (+) bakteri türlerinin tamamı için kitosan, propolis ve farklı konsantrasyonlarda kitosan ile mikroenkapsüle edilmiş propolis arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmiştir ( $p:0,009<0,05$ ). Kitosan içerisine mikroenkapsüle edilmiş propolis ile elde edilen mikroenkapsüllerin gram (+) *S. aureus* ve *S. mitis* bakterileri üzerindeki antimikrobiyal etkinliğinin daha fazla olduğu bilgisine ulaşılmıştır.

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda, kitosan ile mikroenkapsüle edilmiş farklı konsantrasyonlardaki propolis çözeltilerinin (% 10, %20 ve %30 propolis konsantrasyonları) antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Elde edilen mikroenkapsüllerin yüzey karakterizasyonu SEM ile belirlenmiştir.

Çalışmada elde edilen mikroenkapsüllerin SEM değerlendirmelerine göre mikroenkapsüllerde boyut büyük olmasına rağmen yoğunlukların düşük olduğu belirlenmiştir. Propolis yüklü mikroenkapsüllerin yoğunluklarının 1,2-1,3; propolisin yoğunluğunun 0,9 olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu da mikroenkapsüllerin suda yüzebilecek kapasitede olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda kullanılan Kirby Bauer disk difüzyon testi sonuçlarına göre sadece kitosanın Gram (-) bakteriler üzerinde ki etkinliğinin Gram (+) bakterilerile oranla daha yüksek olduğu görülmüştür.

Bostan ve ark., 2007’de yapmış oldukları çalışmada benzer sonuçlar alınmıştır. Kitosanın yüksek konsantrasyonlarda in vitro olarak yapılan çalışmalarında *S. aureus* ve *E. coli* de anlamlı zonlar gözlenmiştir (Zheng ve ark., 2003). Kitosanın çalışma prensibi düşük molekül ağırlığında hücre zarından geçerek beslenme mekanizmasını bozması esasına dayandırılmıştır (Darmadji ve ark., 1994). Bu durum özellikle yüksek konsantrasyonlar da kitosan etkinliğini artırmaktadır (Jumaa ve ark., 2002). Ayrıca düşük molekül ağırlığında antimikrobiyal etkinin arttığını tespit etmiştir (Jeon ve ark., 2001).

Yapılan literatür çalışmasında kitosanın Gram (+) olan bakterilerde Gram (-) bakterilere göre antibakteriyel etkisinin düşük olduğu tespit edilmiştir (Omura ve ark., 2003; Jeon ve ark., 2001). Choi ve ark., 2001’ de yaptığı çalışmada farklı molekül ağırlığındaki kitosanların antimikrobiyal etkinliği değiştirdiğini ifade etmiştir.

Kitosanın antimikrobiyal etkisi üzerinde pH değişimlerinin de önemli olduğu belirtilmiştir. Asitlik artışının kitosanın inhibitör etkinliğini arttığı saptanmıştır (Liu ve ark., 2001). Bunun yanı sıra kitosanın deasetilasyon derecesi de *S. aureus* ve *E. coli* de duyarlılığın arttığını göstermiştir. Gram (-) bakterilerde zon çapları artarken

Gram (+) ise değişken olduğu ifade edilmiştir (Gerasimenko ve ark., 2004). Araştırmalarda farklı antimikrobiyal ajan kullanımları ile kitosanın etkinliğinin artırıldığı da rapor edilmiştir (Pranoto ve ark., 2005).

Çalışmamızda saf kitosan ile hazırlanan disklerde *S. aureus* ve *S. mitis*'de zon gözlenmiş ( $p>0,05$ ) fakat anlamlı bulunmamıştır. Bu durumun kitosanın farklı moleköl ağırlıkları ve pH derecelerine göre antimikrobiyal etkinliğinin değişmesine bağlı gerçekteştiği düşünölmektedir. *E. coli*'de oluşan inkübasyon zonunun ise *K. pneumonia* zonuna göre daha düşük olmakla birlikte yüksek zon çapı yani antimikrobiyal etkinlik belirlenmiştir. Veriler anlamlıdır ( $P<0,05$ ). Elde edilen sonuçların literatür bilgileriyle benzer olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızda sadece propolis yüklenmiş disklerin antimikrobiyal değelendirmesinde Gram (-) bakterilerin propolis duyarlılığının Gram(+) bakterilere göre düşük olduğu gözlenmiştir.

Propolisin yoğun olarak toplandığı ve kimyasal analizlerinin yapıldığı ölkelerin başında Çin, İngiltere, Brezilya ve Bulgaristan gelmektedir. Yapılan çalışmalarda Brezilyadan toplanan örneklerin antibakteriyel ve koruyucu aktiviteleri tespit edilmiş, Bulgaristan örneklerinin antibakteriyel, antifungal etkileri, Türkiye örneklerinin ise antibakteriyel, antifungal, antioksidan, kanser önleyici, iltihap giderici, hücre yenileyici gibi etkileri üzerinde bilgiler elde edilmiştir (Kutluca ve ark., 2006).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda propolisin ortama 180 farklı kimyasal bileşimi tespit edilmiştir (Crane, 1990). Yapılan literatür çalışmalarında propolisin bakteriler üzerindeki etkisinin değişkenlik gösterdiği görölmüştür. Çünkü propolisin toplandığı bölgenin florası ve toplanma zamanına göre kimyasal içeriği değişmektedir (Sforcin ve ark., 2000; Bankova ve ark., 2000). Bunun yanı sıra propolisin genellikle Gram (+) bakteriler üzerindeki etkinliğinin, Gram (-) bakteriler üzerindeki etkinliğinden daha fazla olduğu belirtilmiştir (Albayrak, 2008). Marcucci ve ark., 1991'de elde ettiği sonuçlara göre propolisin Gram (+) bakteri ve funguslarda antimikrobiyal etki gösterdiği, Gram (-) bakterilerde ise antimikrobiyal aktivitesinin düşük olduğu ifade edilmiştir.

Türkiye’de farklı bölgelerden toplanan propolis örneklerinin de etanol ile hazırlanan çözeltilerinde Gram (+) bakterilerin Gram (-) bakterilere oranla önemli oranda antibiyotik etki gösterdiği gözlenmiştir (Uzel ve ark., 2005).

Propolisin bakteriler üzerindeki etkileri *in vitro* çalışmalara konu olmuştur. Brezilya’dan elde edilen propolis örnekleri etanol özütü hazırlandığında streptokoklar üzerinde yüksek etki göstermiştir. Fakat hekzan özütünde olumsuz sonuç alınmıştır (Alencar ve ark., 2007). Yine yapılan çalışmalar *S. aureus* gibi Gram (+) bakteriler üzerinde olumlu antibakteriyel etki göstermesine rağmen, *E. coli* gibi Gram (-) bakterilerde etkisinin olmadığı gözlenmiştir (Kujumgiev ve ark., 1999). Benzer sonuçlar Türkiye’den toplanan propolisler içinde tanımlanmıştır (Koru ve ark., 2005). Muş ve Bitlis yöresinde toplanan propolisler ile yapılan antimikrobiyal çalışmalarda *E. coli* ve *K. pneumonia* üzerinde düşük aktivite, *S. aureus*’da ise yüksek aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Alan ve ark., 2014).

Propolis ile yapılan bir diğer çalışmada *S. aureus*, *S. aureus*, *K. pneumonia* etanolik propolis çözeltilerinde antimikrobiyal etkisi tespit edilmiştir (Tosi ve ark., 2007).

Çalışmada *S. aureus*, *S. mitis* bakterilerinin sadece propolis ile yüklenmiş disklerin etrafında oluşan inkübasyon zonunun literatürdeki bu çalışmalarla paralellik gösterdiği gözlenmiştir. Propolis yüklü disk difüzyon testi sonucunda ise *E. coli* ve *K. pneumonia* ekimi yapılan petrielerde anlamlı zonlar gözlenmemiştir. Bu durum literatürdeki bazı çalışmalarla farklılık gösterirken bazı çalışmalarla paraleldir. Bu sonucun temel nedeninin propolisin standart bir kimyasal kompozisyona sahip olmaması olduğu düşünülmektedir. Propolisin toplandığı bölgenin florası ve toplanma döneminin farklı olması propolisin kimyasal kompozisyonunda farklılıklara neden olmaktadır.

Bunun yanı sıra *S. aureus*, *S. mitis*, *E. coli* ve *K. pneumonia* bakterilerine %10, %20 ve %30 propolis ile hazırlanan mikroenkapsüllerin antimikrobiyal çalışmaları yapılmıştır. Kitosan ile oluşturulan mikroenkapsüller de propolis konsantrasyonları arttıkça Gram (-) ve Gram (+) bakterilerde antimikrobiyal zon çaplarının da arttığı gözlenmiştir.

Literatür çalışmalarında kitosanla mikroenkapsüle propolislerin antimikrobiyal etkinliği konusunda çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle farklı çalışmalarla

karşılaştırılması mümkün olmamış veriler direk sunulmuştur. Çalışmamızda propolis kullanımının amacı kitosanın duyarlılığının düşük olduğu Gram (+) bakteriler üzerinde daha güçlü bir etki oluşturmaktır. *K. Pneumonia*, *E. Coli*, *S. aureus* ve *S. mitis*'de kitosan ve propolis ile oluşturulan mikroenkapsüllerin emdirildiği disklerin etrafında oluşan zonlar anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Çalışma sonucunda *S. aureus*, *S. mitis* bakterilerinde saf kitosanın etkinliğinin saf propolise oranla düşük olduğu, farklı konsantrasyonlar da hazırlanan mikroenkapsüllerin etkinliğinin ise propolis konsantrasyonu arttıkça ve inkübasyon süresi uzadıkça arttığı gözlenmiştir. İnkübasyon süresine bağlı değişimin mikroenkapsüllerde propolisin kontrollü salınımı ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

*E. coli* ve *K. pneumonia*'da ise saf kitosan ve saf propolis yüklü disklerin etrafında zonlar elde edilmiş. Fakat ölçümleri sonucunda mikroenkapsül yüklenmiş disklerin zon çaplarının daha büyük olduğu gözlenmiştir. Literatürde propolisin *E. coli* ve *K. pneumonia* gibi Gram (-) bakterilerde genellikle düşük etkiye sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Çalışmamızdaki bu sapmanın propolisin bölge iklim ve florasına göre standardının olmayışı olduğu düşünülmektedir. Kitosan ve propolis ile hazırlanan mikroenkapsüllerde ise zon çapındaki artışın birlikte kullanımı ile antibakteriyel etkinin güçlendirilmiş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışmada elde edilen verilere göre propolisin kitosan ile mikroenkapsüle edilmesi sonucunda tek olarak kitosan ve propolisin antimikrobiyal etkinliklerinin düşük kitosan ile mikroenkapsüle edilmiş propolisin etkinliğinin hem Gram (-) hem de Gram (+) fazla olduğu gözlenmiştir. Mikroenkapsüllerde propolisin derişimindeki artışın antimikrobiyal etkiliği artırdığı gözlenmiştir. Bu artışın aynı zamanda propolisin biyolojik etkinliğinde de artışa neden olduğu sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak çalışmada elde edilen propolis yüklü kitosan Mikroenkapsüllerin antimikrobiyal etkinliklerinin arttığı, çekirdek materyali olarak kullanılan propolis konsantrasyonları artışının antimikrobiyal etkiyi güçlendirdiği, inkübasyon süresi arttığında kontrollü salınımın gerçekleştiği tespit edilmiştir. Buna göre zaten yenilebilir ve biyo bozunur organik bir karbonhidrat olan propolisin kitosanla mikroenkapsüle edilmesinde kullanımı, propolisin kontrollü salınımını sağlayarak sindirim sisteminde biyolojik bozunumunu geciktireceği ve etkinliğinin korunmasına

yardımcı olacağı düşünülmektedir. Bu durumun en fazla çocuklar, hasta bireyler ve yaşlılarda gıda takviyesi veya tablet şeklinde kullanımı ile bağışıklık sisteminin desteklenmesinde önemli olacağı da düşünülmektedir.

## 5. KAYNAKLAR

- Alan, Y., Atalan, E.,** (2014). Muş ve Bitlis Yöresinde Toplanan Bal ve Propolisin Antimikrobiyal Aktivitesinin Araştırılması, Cilt 2, 221-229
- Albayrak, S.,** (2008). Propolis: Doğal Antimikrobiyal Madde. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi.* 37 (3): 201-215.
- Alencar, SM., Oldoni, TLC., Castro, ML.,**(2007). et al Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *J Ethnopharmacol*, 113: 278-283.
- Allan-Wojtas, P., Truelstrup, Hansen, L., Paulson, AT.,**(2008). Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using Standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation, *LWT-Food Sci Technol*, 41, 101-108.
- Anal, A.K., Singh, H.,** (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Sci Tech*, 18, 240-251.
- Azza, M.M., Abd-El-Rhman,** (2009): antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. In *Fish Shellfish Immunology* 27 (3), pp. 454-459.
- Baik, M.Y., Shuendro, E.L., Nawar, W.W., McClements, D.J., Decker, E.A., Chinachoti, P.,** (2004). Effects of antioxidant and humidity on oxidative stability of microencapsulated fish oil. *Jam. Oil Chem. Soc.* (81), 355-360.
- Bankova, V., Marcucci, M., Castro, S.,** (2000). Propolis recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31:3-15
- Barbosa-Canovas, G.V., Ortega-Rivas, E., Juliano, P., Yan, H.,** (2005). *Food Powders; Physical Properties, Processing and Functionality*, Kluwer Academic, New York, pp.199-219.
- Beaulieu, C.,** (2005). Chitin and Chitosan, <http://www.plasticstrends.net>. Erişim Tarihi: 11/11/2006.



- Bianchi, E. M.,** (1995). The preparation of the tincture, the soft extract, the ointment, the soap and other propolis-based products. *Apiacta* 3-4, 56-62.
- Bogdanov, S.,** (2012). Propolis: Composition, Health, Medicine: A Riview. Bee Product Science, [www.bee-hexagon.net](http://www.bee-hexagon.net),.
- Bostan, K., Aldemir, T., Aydın A.,** (2007). Kitosan ve Antimikrobiyal Aktivitesi. *Türk Mikrobiyal Cem Dergisi*. 37(2):118-127.
- Capela, P., Hay, B., Shah, NP.,**(2007). Effect of homogeni- sation on bead size and survival of encapsulated probio- tic bacteria. *Food Res Int*, 40, 1261-1269.
- Champagne, C., Fustier, P.,** (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Curr Opin Biotech*, 18, 184-190.
- Chandramoulia, V., Kailasapathya, K., Peiris, P., Jones, M.,**(2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *J Microbiol Meth*, 56, 27- 35. Chen KN, Chen MJ, Lin CW. 2006. Optimal combi- nation of the encapsulating materials for probiotic mic- rocapsules and its experimental verification (R1). *J Food Eng*, 76, 313-320.
- Chen, M.J., Chen, K.N.,** (2007). Applications of probiotic encapsulation in Dairy Products. In: *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*, Ed: Lakkis, M., Blacwell Publishing, U.S.A., pp. 83-112
- Cho, Y.H., Shim, H.K., Park, J.,** (2003). Encapsulation of fish oil by an enzymatic gelation process using transglutaminase cross-linked proteins. *Journal Of Food Science: Food Engineering and Physical Properties*, 68(9), 2717-2723.
- Choi, BK., Kim, KY., Yoo, YJ., Oh, SJ., Choi, JH., Kim, CY.,** (2001). In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *Int J Antimic Agents* 18: 553-557
- Crane, E.,** (1990). *Bees and Beekeeping*. Science, Praticce and World Resources. New York: Cornell University Pres,593 pp.

- Çakır, İ.,** (2007). Fonksiyonel Gıda Bileşenleri ve Probiyotiklerde Mikroenkapsülasyon Uygulamaları. 5. Gıda Mühendisliği Kongresi, 08-10 Kasım, Ankara, Türkiye.
- Darmadji, P., Izumimoto, M.,** (1994). Effect of chitosan in meat preservation. *Meat Sci* 38: 243-254.
- Dobrowolski, J.M., Vohora, S.B., Sharma, K., Shah, S.A., Naqvi, S.A.H., Dandiya, P.C.,** (1991). Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *Journal of Ethnopharmacology* 35: 77-82.
- Doğaroğlu, M.,** (1999). Modern Arıcılık Teknikleri. Anadolu Matbaa ve Ambalaj San. Tic. Ltd. Şti., 296 s, İstanbul.
- Dubey, R., Shami, TC., Bhasker, Rao, KU.,**(2009). Microencapsulation Technology and Applications. *Defence Sci J*, 59(1), 82-95.
- Edris, A. and Bergnstahl, B.,** (2001). Encapsulaton of orange oil in a spray drier double emulsion. *Nahrung*. (45), 133-137.
- Erdin, N.,** (1987). Tarama Elektron Mikroskobunun Temel Prensipleri ve Numune Hazırlama, İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, B-36-2 (1987)
- Ergün, İ. Ve Ergün, H.,**(1987). Teknik Arıcılıkla İlgili Genel Bilgiler. Repta Reklam Yayın Organizasyon A.Ş., 212s, Bursa.
- Ersus, S. and Yurdagel, U.,** (2007). Microencapsulaton of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota L.*) by spray drier. *J. Food Eng.* (80), 805-812.
- Fang, X., Watanabe, Y., Adachi, S., Maturama, Y., Mori, T., Maeda, H., Nakamura,, A. and Matsuno, R.,** (2003). Microencapsulaton of linoleic acid with low and highmolecular weight components of soluble soybean polysaccharide and its oxidation process. *Biosci. Biotech. Bioch.* (67), 1864-1869.
- Fearnley, J.,** (1998). Beeswax and Propolis (For Pleasure and Profit). International Bee Research Association, 18 north Road, Cardiff CFI 3DY, 30p, U.K.

- Gençay, Ö. Ve Sorkun, K.,** (2002b). Propolsin kullanım alanları. *Teknik Arıcılık*, 76, 11-14.
- Gerasimenko, DV., Avdienko, ID., Bannikova, GE., Zueva, OYu, Varlamov, VP.,** (2004) Antibacterial effects of water-soluble low-molecular-weight chitosans on different microorganisms. *Appl Biochem Microb*; 40: 253-257
- Ghisalberti, E.L.,** (1979). Propolis: a Review. *Bee World* 60, 59-84.
- Ghisalberti, E.L.,** (1999). Propolis:a Review. *Bee World* 60, 59-84.
- Hsieh, CW., Lu, WC., Hsieh, WC., Huang, YP., Lai, CH., Ko, WC.,** (2009). Improvement of the stability of nattokinase using g-polyglutamic acid as a coating material for microencapsulation. *LWT-Food Sci Technol*, 42, 144-149.
- <http://www-g.eng.cam.ac.uk/125/achievements/mcmullan/mcm.htm>- 04.04.2017
- Ivanova, E., Tenou, E. and Poncelet D.,** (2005). Encapsulation of water sensitive products: effectiveness and assessment of fluid bed dry coating. *Journal of Food Engineering*, 71, 223-230.
- İmamoğlu, Ö.,** (2011) “Biyokontrolde doğal ürünlerin kullanılması; Kitosan” *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2011; 68(4): 215 – 222
- Janes, K.A., Calvo, P. and Alonso, M.J.,**(2001). Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47, 83-97.
- Jeon, Y-J., Park, P-J., Kim, S-K.,**(2001) Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydr. Polym*; 44:11, 71-76
- Jumaa, M., Furkert, FH., Müller, BW.,** (2002) A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan, *European J Pharmaceutics and Biopharmaceutics*; 53: 115-123.
- Kabaharnup, Y.,** (2004). İmmobilize *Saccharomyces cerevisiae* mayasıyla şarap üretimi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Adana, Türkiye, 47s.

- Kailasapathy, K.,** (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and Potential Applications. *Curr Iss Intest Microbiol*, 3, 39-48.
- Kailasapathy, K.,** (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT-Food Sci Technol*, 39, 1221-1227.
- Kaushik, V. and Roos, Y.H.,** (2007). Limonene encapsulation in freeze drying of gum arabic sucrose gelatin system. *Lebensm. –Wiss. Technol.* (40), 1381-1391.
- Keskin, M.,** (2018). Propolis ve özütlerinin kalite parametrelerinin belirlenmesi ve enkapsülasyonu, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Keskin, M., Keskin, Ş., Kolaylı, S.,** (2018). Alginat-propolis mikrokapsüllerin in vitro sindirim sisteminde salınımının ham propolis ile kıyaslanması. *U. Arı D., U. Bee J.* 2018, 18 (2): 94-100
- Kınık, Ö., Kavas, G., Yılmaz, E.,** (2003). Mikroenkapsülasyon tekniği ve süt teknolojisindeki kullanım olanakları. *Gıda* 28 (4): 401-407.
- King, A.H.,** (1995). Encapsulation of Food Ingredients; A Review of Available Technology, Focusing on Hydrocolloids. In: *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*, Eds; Risch, S.J., Reineccius, G.A., American Chemical Society.
- Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., McClements, D. and Decker, E.A.,** (2005). Stability of spray-drier tuna oil emulsion encapsulated with two-layered interfacial membranes. *J. Agric. Food Chem.* (53), 8365-8371.
- Kolanowski, W., Ziolkowski, M., Weissbrodt, J., Kunz, B. and Laufenberg, G.,** (2006). Microencapsulation of fish oil by spray drying impact on oxidative stability. Part 1. *Eur. Food Res. Technol.* (222), 336-342.
- Koru, O., Toksoy, F., Acikel, CH.,**(2005). et al. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different anatolian propolis samples. *Microbiol Res*, 160: 189-195

- Krell, R.**, (1998). Beeswax and Propolis (For Pleasure and Profit). International Bee Research Association, 18 Nort Road, Cardiff CFI 3DY, 30p, UK.
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Yu.**, (1999). et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol*, 64: 235-240.
- Kumova, U., Korkmaz, A., Avci, B.C., Ceyran, G.**, (2002). “Önemli Bir Arı Ürünü: Propolis” *Uludağ Bee Journal* May 2002
- Kutluca, S., Genç, F. and Korkmaz, A.**, (2006). Propolis. *Samsun Tarım İl Müdürlüğü Çiftçi Eğitimi ve Yayım Şubesi*, Samsun, p. 57.
- L’Antibiogramme**, (1985). Courvalin P, Goldstain F, Philippon A, Sirot J. Edition MPC Brüksel.
- Lee, D.W., Powers, K., and Baney, R.**, (2004). Physicochemical properties and blood compatibility of acylated chitosan nanoparticles, *Carbohydrate Polymers*, 58, 371-377.
- Lee, WS, Kommarty, L.** (1976). New method for detecting in vitro inactivation of penicillins by *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 10:664-656
- Liu, XF., Guan, YL., Yang, DZ., Li, Z., Yao, KD.**, (2001). Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *J Appl Polym Sci*; 79: 1324-1335
- Lopez-Caballero, M., E., Gomez-Guillen, M., C., Perez-Mateos, M., Montero, P.**, (2005). A Chitosan-Gelatin Blend as a Coating for Fish Patties, *Food Hydrocolloids*, 19: 303311. doi: 10.1016/j.foodhyd.2004.06.006
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., Desobry, S.**, (2006). Flavour encapsulation and controlled release- A review. *International Journal of Science and Technology*, 41: 1-21.
- Marcucci, M.C.**, (1995). Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 26: 83-89.
- Minemoto, Y., Adachi, S. and Matsuno, R.**, (1997). Comparison of oxidation of methyl linoleate encapsulated with gum arabic by hot hair drying and freeze drying. *J. Agric. Food Chem.* (45), 4530-4534.

- Newton, T.**,(2006). The History of Chitosan, <http://ezinearticles.com/?The-History-Of-Chitosan&id=208039>. Erişim Tarihi: 26/10/2006.
- Omura, Y., Shigemoto, M., Akiyama, T., Saimoto, H., Shigemasa, Y., Nakamura, I., Tsuchido, T.**,(2003). Antimicrobial activity of chitosan with different degrees of acetylation and molecular weights. *Biocont Sci*; 8: 25-30.
- Özkök, A. ve Sorkun,K.**, (2001). Apiterapi’de kullanılan önemli arı ürünlerinden: Bal, polen ve propolis. *Teknik Arıcılık*, 72, 4-10.
- Öztürk, N.**, (2006). Hidrofobik nanoyapılarda *Candida rugosa* lipaz immobilizasyonu. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü Yüksek Lisans Tezi, Aydın, Türkiye, 116s.
- Park, JK., Chang, HN.**, (2000). Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnol Adv*, 18, 303-319.
- Poncelet, D.**, (2006). Microencapsulation: Fundamentals, Methods and Applications. In: *Surface Chemistry in Biomedical and Environmental Science*, Eds: Blitz, J.P., Gun’ko, V.M., Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 23-34.
- Pranoto, Y., Rakshit, SK., Salokhe, VM.**, (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT- Food Sci Technol*; 38: 859-865
- Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C. and Zou, X.**, (2004). a. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles, *Carbohydrate Research*, 339, 2693-2700.
- Qi, WT., Ma, J., Yu, WT., Xie, YB., Wang, W., Ma, X.**, (2006). Behavior of microbial growth and metabolism in algi- nate-chitosan-alginate (ACA) microcapsules. *Enzyme Microb Tech*, 38, 697-704.
- Rao, M.S., Kanat, S.R., Chander, R. and Sharma, A.**, (2006). What makes radiation processed chitosan a novel food preservative, *Times Food Processing Journal*.

- Rosenberg, M. and Sheu, T.Y.,** (1996). Microencapsulation of volatiles by spray drying in whey protein based wall systems. *Int. Dairy J.* (6), 273-284.
- Selim, K., Tsimidou, M. and Biliaderis, C.G.,** (2000). Kinetic studies of degradation of saffron carotenoids encapsulated in amorphous polymer matrices. *Food Chem.* (71), 199-206.
- Shaikh, J., Bhosale, R. and Singhal, R.,** (2006). Microencapsulation of black pepper oleoresin. *Food Chem.* (94), 105-110.
- Shu, B., Yu, W., Zhao, Y. and Liu, X.,** (2006). Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *J. Food Eng.* (76), 664-669.
- Silici, S., Kutluca, S.,** (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology* 99:69-73.
- Sootitawat, A., Bigeard, F., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M. and Linko, P.,** (2005). Influence of emulsion and powder size on stability of encapsulated D-limonene by spray drying. *Innov. Food Sci. Emerg.* (6), 107-114.
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., Kailasapathya, K.,** (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int J Food Microbiol*, 62, 47-55.
- Tosi, E.A., Re, E., Ortega, M.E., Cazzoli, A.F.,** (2007). Food preservative based on propolis: bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. *Food Chemistry* 104: 1025-1029)
- Tutkun, E.,** (2002). Bal arısı ürünlerinin insan sağlığındaki önemi. *Tekni Arıcılık*, 75, 11-16.
- Uchi, T.,** (1978). Benzaldehyde as a carcinogenic principle in figs. *Agric. Biol Chem.* 42, 7, 1449- 1451.
- Uyan, Ersus, S.,** (2004). Kara havuç antsiyanin ekstrak- tının püskürtmeli kurutucu kullanılarak mikroenkapsülasyonu, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi, İzmir, Türkiye, 167s.

- Uzel, A., Sorkun, K., Onçağ, O.,** (2005). et al. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different anatolian propolis samples. *Mikrobiol Res*, 160: 189-195.
- Ünal, E., Erginkaya, Z.,** (2010) “Probiyotik Mikroorganizmaların Mikroenkapsülasyonu” Derleme, Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Adana
- Wang, S., F.,** (2005). et al., Biopolymer Chitosan/Montmorillonite Nanocomposites, Preparation and Characterization. *Polymer Degradation and Stability*, 90, 123-131,.
- WK., Shah, NP.,** (2009). Effect of homogenization techniques on reducing the size of microcapsules and the survival of probiotic bacteria therein. *J Food Sci*, 74(6), 231-236.
- Xu, Y., Ren, X., Hana, M., A.,** (2006).Chitosan/Clay Nanocomposite Film Preparation and Characterization, *Journal of Applied Polymer Science*, 99: 1684-1691. doi:10.1002/app.22664
- Yavuz, M.,** (2009). et al., Electrorheological behavior of biodegradable modified corn starch/corn oil suspensions, *Carbohydrate Polymers*, 79, 2, 318-324,.
- Yıldırım, E.,** (2013). ZnSe Yarıiletken İnce Filmlerinin Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
- Yılmaz, E., Tekinay, A., Çevik, N.,** (2006). Deniz Ürünleri Kaynaklı Fonksiyonel Gıda Maddeleri, *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 23(1/1): 523-527.
- Young, S.L., Sarda, X. and Rosenberg, M.,** (1993). Microencapsulating properties of whey proteins 1. Microencapsulating of anhydrous milk fat. *J. Dairy Sci.* (76), 2868-2877
- Yu, L., Dean, K., Li, Lin,** (2006). Polymer Blends and Composites from Renewable Resources, *Progress in Polymer Science*, 31: 576-602.doi:10.1016/j.progpolymsci.2006.03.002
- Zheng, LY., Zhu, JF.,** (2003). Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbonhy Polym*; 54: 527-530.



**Zuidam, N.J., Shimoni, E.,** (2010). Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them. In: Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing, Eds.: Zuidam, N.J., Nedovic, V.A., Springer, London, pp. 7-29.

## ÖZGEÇMİŞ

### **Kişisel bilgiler**

Adı Soyadı: Reyhan Şeyda YILMAZ

Doğum Yeri ve Tarihi: Sivas; 03/09/1984

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dil: İngilizce



### **İletişim Adresi**

Sivas Özel Batı Anadolu/Fen Lisesi

E-posta Adresi: seydayilmazsvs@gmail.com

### **Eğitim ve Akademik Durumu:**

Lise: Sivas Kongre Lisesi, 2002

Ön Lisans: Cumhuriyet Üniversitesi-Gıda Teknolojisi, 2007

Lisans: Cumhuriyet Üniversitesi-Biyoloji Bölümü, 2012

Lisans: Anadolu Üniversitesi- Kamu Yönetimi,(devam ediyor)

Yüksek Lisans: Cumhuriyet Üniversitesi - Fen Bilimleri Enstitüsü.-  
Biyomühendislik, (devam ediyor)

### **İş Tecrübesi:**

Aydın Köşk Çok Programlı Lisesi: Öğretmen, (2006-2008)

Sivas Anadolu Hastanesi: Biyolog, (2012-2013)

Sivas Rota Dershanesi: Biyoloji Öğretmeni,(2013-2015)

Sivas Özel Batı Fen/Anadolu Lisesi: Biyoloji Öğretmeni, (2015- devam ediyor)

### **Yabancı Dil**

İngilizce: Başlangıç

### **Projeler-Bitirme Tezi :**

Süt İşleme Tesisi İncelemesi Ve Raporlanması (Gıda Teknolojisi)

Lyme Hastalığı Bulaşma Yolları Ve Tedavi Süreci (Biyoloji Bölümü)

Mikroenkapsülasyon İle Kitosan Ve Propolis Karışımının Kaplama Materyali Olarak Kullanımı (Biyomühendislik)

### **Sertifikalar**

Eğitim Fakültesi; Öğretmenlik Sertifikası

MEB Bilgisayar; İşletmenlik Sertifikası

TS EN ISO 15189 Tıbbi Laboratuvarlar Standardı Temel ve İç Tetkik Eğitimi

ISO 22000 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi Temel ve İç Tetkik Eğitimi

ISO 9001:2008 Kalite Yönetim Sistemi Temel ve İç Tetkik Eğitimi

Sedimentasyon Cihazları Eğitimi Sertifikası