

Propolis Püskürtülmüş Ambalaj Filmlerin Antibakteriyel Aktiviteleri

Gizem Bayatbalay¹ , Ezgi Karpuz² , İbrahim Palabıyık³  ✉

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Tekirdağ

Geliş Tarihi (Received): 04.04.2020, Kabul Tarihi (Accepted): 04.01.2021

✉ *Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): ipalabiyik@nku.edu.tr (İ. Palabıyık)*

☎ 0 282 250 2117 📠 0 282 250 9929

ÖZ

Yapılan bu çalışmada, farklı çözümler kullanılarak oluşturulan propolis ekstraktlarının, plastik yüzeye tutunma özellikleri ve antibakteriyel aktivitesi belirlenmiştir. Çözgen olarak vaks-yağ, yağ, gliserol, film solüsyonu, etanol, etil asetat ve propilen glikol kullanılmıştır. Belli konsantrasyonlarda hazırlanmış olan propolis ve antibakteriyel solüsyonlar püskürtme metodu uygulanarak düşük yoğunluklu polietilen (LDPE) filmlere entegre edilmiştir. Yağ içeren solüsyonların film yüzeyinde tutunma göstermediği tespit edilmiştir. Propolisli solüsyonlar farklı antibakteriyel solüsyonlar ile kıyaslanarak, istenilen kriterlerde LDPE filme entegre edilebilecek en uygun sıvının etil asetatlı propolis solüsyonu olduğu tespit edilmiştir. Bu solüsyon püskürtülerek elde edilen propolisli LDPE filmlerde ISO 22196:2011 metodu uygulanarak, filmlerin antibakteriyel etkileri tespit edilmiş ve söz konusu bakterileri 24. saat itibari ile 7 kob/g azalttığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Propolis, Antibakteriyel aktivite, Düşük yoğunluklu polietilen, Plastik yüzey

Antibacterial Activities of Propolis-Sprayed Packaging Films

ABSTRACT

In this study, the adhesion properties and antibacterial activity of propolis extracts produced by using different solvents were determined. Wax-oil, oil, glycerol, film solution, ethanol, ethyl acetate and propylene glycol were used as solvents. Propolis and antibacterial solutions prepared at certain concentrations were integrated into low density polyethylene (LDPE) films by a spraying method. It was determined that the oil containing solutions did not adhere on a film surface. By comparing propolis solutions with different antibacterial solutions, it was found that the most suitable liquid that can be integrated onto the LDPE film in desired criteria was propolis solution with ethyl acetate. The antibacterial effects of films were determined by the ISO 22196: 2011 method on propolis-sprayed LDPE films, and it was observed that bacterial count was reduced by 7 cfu/g after 24 hour.

Keywords: Propolis, Antibacterial activity, Low density polyethylene, Plastic surface

GİRİŞ

Propolis insanların dikkatini tıbbi açıdan binlerce yıl önce çekmiş ve ilk kez Yunanlılar tarafından keşfedilerek doğal bir antibiyotik olarak kullanılmıştır [1, 2]. Propolis, çeşitli bitkilerin yaprak, tomurcuk, kabuk ve benzeri kısımlarından işçi arılar tarafından toplanan, reçineli ve mum kıvamında olan, keskin ve güzel kokulu,

suda erimeyen, oda sıcaklığında yarı katı halde bulunan bir maddedir. Arı bu maddeyi, polenle ve başı ile toraksı arasında bulunan bezlerden salgılamış olduğu aktif enzimlerle karıştırmaktadır. Propolisin rengi ve fiziksel özellikleri kaynağına göre değişmekte ve kovanda arılar tarafından çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır [3, 4]. Son otuz yılda propolis ve içeriğine olan talep artmakta; yapısı, farmakolojik özellikleri ve ticari değeri

konusundaki çalışmalar devam etmektedir. Propolisin huş ağacı, diş budak, karaağaç, çam, meşe, okaliptüs, kavak, kestane gibi ağaçların tomurcuklarından, dal ve yapraklarından elde edildiği bildirilmiştir [5, 6]. Propolisin biyolojik aktivitesinden sorumlu bileşiklerin flavonoidler, aromatik asitler ve esterleri olduğu düşünülmektedir. Bu aktivitenin fenolik ve resindeki diğer bileşiklerin sinerjistik etkisi ile oluştuğu belirtilmiştir [7]. Aynı zamanda pinosembirin, galangin ve kafeik asit fenil ester karışımlarının bakteriyel RNA- polimerazı inhibe ederek antibakter etki gösterdiği bildirilmiştir [8]. Gıdalarda mikrobiyel gelişmeyi önleyebilmek ya da kontrol altına alabilmek, dolayısıyla kalitede kayıpları azaltarak raf ömrünü artırabilmek için son yıllarda antibakteriyel ambalajlama sistemlerinden yararlanılmaya başlanmıştır. Antibakteriyel maddelerin kullanılması ile gıda ve ambalaj malzemesinde bulunan mikroorganizmaların gelişmelerinin belirli düzeyde veya tamamen yavaşlatılması ya da durdurulması sağlayabilmektedir [9]. Torlak ve Sert [10] tarafından kitosan-propolis kaplı polipropilen filmlerin gıda kaynaklı patojenlere karşı antibakteriyel etkinliği incelenmiş olup, propolisin etanolik ekstraktı olan EPP'nin kaplamaya %10 (propolis reçinesi / kitosan) dahil edilmesi, *Bacillus cereus*, *Cronobacter sakazakii*, *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* patojenlerine karşı antibakteriyel aktiviteyi arttırdığı görülmüştür. Bu çalışmanın sonuçları, kitosanın film formunda antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu ve propolisin gıda paketleme uygulamaları için umut verici bir antimikrobiyal olduğunu ortaya koymuştur.

Han ve Floros [11], potasyum sorbat tozu ve LPDE reçineler kullanılarak sıkıştırmak suretiyle elde edilen antibakteriyel filmlerin, paketleme materyali olarak esneklik, şeffaflık ve antibakteriyel aktivitesini tespit etmişlerdir. Propolisin antibakteriyel aktivitesi ile ilgili çalışmaların bazılarında propolisin yalnızca Gram (+) bakteri ve bazı funguslara karşı aktif olduğu [12, 13], diğerlerinde ise Gram (-) bakterilere karşı aktivitesinin zayıf olduğu belirtilmiştir [14, 15, 16]. Genellikle Gram (+) bakterilerin propolise karşı, Gram (-) bakterilere kıyasla daha hassas olduğu bildirilmiştir [17]. Muğla ilinden toplanan 45 farklı propolisin aseton ve dimetil sülfoksit (DMSO) ekstresinin antibakteriyel özelliklerinin propolis örneğine, dozuna ve ekstraksiyon çözücüsüne göre farklılık gösterdiği kaydedilmiştir [18]. Propolisin etanolü ekstresinin Gram (+) koklara (*Staphylococcus aureus*) karşı yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği, fakat Gram (-) bakteri (*Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*) ve mayalara (*C. albicans*) karşı zayıf aktivite gösterdiği belirtilmiştir [19]. Propolisin *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* *Candida albicans*, *Enterococcus spp.*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *Trichophyton mentaegrophytes* türlerine karşı antibakteriyel etkisinin olduğu belirlenmiştir [20]. Yapılan çalışmalar tıp, kozmetik, ilaç ve gıda gibi farklı sektörlerde katkı sağlamaktadır. Propolis, gıda sektöründe ekstraksiyon işlemleri için farklı çözücülerle birlikte kullanılmaktadır. Propolis ekstraksiyonunda en çok tercih edilen etanolün [21, 22] dışında su [23, 24], metanol [25, 26], diklorometan [27], hegzan [28], etil asetat, aseton [20], zeytinyağı ve β -siklodekstrin [29], dimetilsülfoksit [30], propilen glikol, etil asetat ve

kloroform [31] propolisin ekstraksiyonu için tercih edilen diğer çözücü bileşenlerdir.

Propolis ekstraksiyonda kullanılan çözücülerin çözücü özellikleri, propolisin antioksidan kapasitesi ve antibakteriyel aktivitesi farklı sonuçlar gösterir. Yapılan çalışmada propolisin farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan solüsyonlar arasından istenilen kriterlere göre en uygun solüsyonun seçilmesi hedeflenmiştir. Propolisli solüsyonun plastik yüzeye tutunup, ISO 22196:2011 [32] yöntemi kullanılarak gıda kaynaklı patojenlere (*E. coli* ve *S. aureus*) karşı antibakteriyel etkisi ve farklı antibakteriyel solüsyonlarla kıyaslanarak propolisli solüsyonun üstünlüğü incelenmiştir.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Arı kovanlarından toplanan ham propolis örneği, Kırklareli Meşe bölgesinden temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan mikroorganizma suşları Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı Kültür koleksiyonundan alınmıştır. *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) ve *Escherichia coli* (ATCC 8739) suşları kullanılmıştır. Mikrobiyolojik analizde, solüsyonları antibakteriyel aktivite açısından agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile karşılaştırmak için Müller-Hinton Agar (Merck 105435), bakterilerinin sayımı için Triptik Soy Agar (Merck 105458), bakterilerin sıvı ortamda gelişmesi için Nutrient Broth (Merck 105443), antiseptikleri ve dezenfektanları nötralize etmek ve işlemiden sonra kalan organizmaları tespit etmek için Difco D/E Neutralizing Broth (Becton Dickinson 281910), ISO 22196 metodunda bakterilerin yetiştirilmesi için Brain Heart Infusion Broth (OXOID CM1135) kullanılmıştır.

ISO 22196 metodunda inkübatör ortamının istenilen sıcaklık, nem seviyesinde olması ve test aşlarını hazırlama prosedürüne uyulması oldukça önemlidir. Uygun ortam sağlanmadığı takdirde bakterilerin hem katı hem sıvı besiyerinde gelişmediği gözlemlenmiştir.

Metot

Materyal ve Kaplama Solüsyonlarının Hazırlanması

Ham propolis, her biri %10 olacak şekilde propilen glikol, etil asetat, yağ, gliserin, etil alkol, %5 vaks ve ayçiçek yağı karışımı, film solüsyonu için 495 mL saf su, 5 mL asetik asit, 10 g kitosan ölçülerek içerisinde tartıldı. Çalkalayıcı inkübatörde (Precise Shaking Incubator, BenchTop Type-WIS20R) 60°C'de 150 rpm'de 3-4 saat bekletilmiştir. Bu işlem sonucunda analizde kullanılmak üzere +4°C'de buzdolabında saklanılmıştır.

Antibakteriyel solüsyon kıyaslaması için Dianatura Base (Diatek), Herbal Liquid Extract Mixture (Asatim), Proallium DMC (Diatek), Dianatura Safe (Diatek) kullanılmıştır.

Düşük Yoğunluklu Polietilen Filmlerin (LDPE) Kaplanması

LDPE: A4 kağıdı boyutunda kesilerek tek tek boş olarak tartılmıştır. Belli konsantrasyonda hazırlanmış olan propolisli solüsyonlar ve diğer antibakteriyel solüsyonlar filmlere Black&Decker HVL200 püskürtme makinesi ile uygulanıp, tekrar tartıma alınmıştır. 2 gün tamamen kurumaması beklendikten sonra tartılıp, plastik yüzeye tutunabilirliği incelenmiştir.

Antibakteriyel Aktivite Düzeyinin Belirlenmesi (Agar Kuyucuk Difüzyon Metodu ile)

Antibakteriyel aktivite düzeyinin belirlenmesi için Müller-Hinton Agar (MHA) kullanılmıştır. McFarland 0.5 (10^8 mikroorganizma/mL) bulanıklığa eşdeğer bulanıklıkta ayarlanarak standart bir bulanıklık oluşturulmuştur. Bu süspansiyondan 100 mikrolitre alınan örnek steril bir eküvyon yardımıyla Müller-Hinton agar yüzeyine yayılmıştır. Takiben agar yüzeyine otoklavlanmış sarı pipetin arka kısmıyla eşit uzaklıkta olacak şekilde 2 tane kuyucuk açılıp, solüsyonlar farklı petri olacak şekilde 10 µL ve 15 µL enjekte edilir. Bu işlem yapılırken, oluşacak zonların birbiri üzerine gelmemesi için delikler arasında 22 mm, petri kenarından ise 14 mm uzaklık olmasına dikkat edilmiştir. Daha sonra besiyerleri 18-24 saat süreyle 37°C'de inkübe edilip, oluşan inhibisyon zon çapları kumpas ile ölçülmüştür. Bunun ardından, ISO 22196:2011 metodu ile antibakteriyel aktivite incelemesi, plastik yüzeye tutunan ve bu analizde etkili sonuç veren solüsyonlar arasında yapılmıştır.

ISO 22196:2011 Metodu ile Antibakteriyel Aktivite İncelenmesi

Test Aşılarının Hazırlanması

Bu metotta ilk olarak bakteri kültürünün bulanıklığı 0.5 McFarland (10^8 mikroorganizma/mL) bulanıklığa eşdeğer olacak şekilde ayarlanarak standart bir bulanıklık oluşturulmuştur. Bakterilerin geliştirilmesi için hazırlanan 10 mL Brain Heart Infusion Broth çözeltisine (pH'ı sodyum hidroksit veya hidroklorik asit ile 6.8 ile 7.2 arasında bir değere ayarlanmış ve otoklavlanmış) 0.5 McFarland bulanıklıkta bakteri süspansiyonundan 10 mikrolitre eklenerek çözelti hazırlanmıştır.

Düşük Yoğunluklu Polietilen Filmlerin (LDPE) Hazırlanması

Solüsyon entegreli LDPE filmler (50±2) mm × (50±2) mm, boş LDPE filmler (40±2) mm × (40±2) mm kesilerek küçük kareler oluşturulmuştur. Numunelerin birbiriyle temas etmemesine dikkat edilmiştir.

Test Örneklerinin Aşılması

Solüsyon entegreli (50±2) mm × (50±2) mm olarak hazırlanan LDPE filmler, boş bir petri kabına test edilecek yüzey, ürünün açıkta kalan dış yüzeyi olacak şekilde yerleştirilerek, hazırlanan test aşısı 200 µL

olacak şekilde test yüzeyine pipet yardımıyla konulmuştur. Daha sonra (40±2) mm × (40±2) mm olarak hazırlanan boş LDPE filmler, üzerine örtülerek filme hafifçe bastırılıp ve petri kabının kapağı kapatılarak 35°C de belirli süreyle inkübe edilmiştir.

Test Örneklerinden Bakteri Geri Kazanımı

Aşılardan hemen sonra 0. saat için numuneler test edilmiştir. Diğer saatler için petri kabına 10 mL Difco D/E Neutralizing Broth eklenerek test numuneleri işlenmiştir. Bu değer, araştırılan test numunelerinden bakterilerin geri kazanım oranını belirlemek için kullanılmıştır. Bir pipet yardımıyla petrinin içine konmuş olan broth en az 4 kez çekilip bırakılarak karıştırılması sağlanmıştır. Fizyolojik tuzlu su (FTS) ile seyreltme işlemi yapılmış olup bakterilerinin sayımı için Triptik Soy Agar'a (TSA) 100 µL olacak şekilde ekim gerçekleştirilmiştir. 24 saat 35°C de inkübe edildikten sonra bakteri sayımı yapılmıştır. Bu işlem 1. 6. ve 24. saat için tekrarlanmıştır.

İstatistiksel Analiz

Verilerin analizinde çalışılan parametrelerin etkilerinin kıyaslamasında JMP (release 6.0,USA) paket programı kullanılmıştır. Tukey çoklu karşılaştırma testi ile ortalamalar arasındaki önem dereceleri belirlenmiştir (p<0.05). Çalışma 3 tekerrür halinde ve her bir analiz 3 paralel ile yapılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Düşük Yoğunluklu Polietilen Filmlerin (LDPE) Kaplanması

Bu işlemin yapılmasındaki amaç antibakteriyel solüsyonların LDPE filmlere entegre edildiğinde plastik yüzeye tutunup homojen dağılmasını incelemek ve tutunan solüsyonun %propolis miktarını belirlemektir. Bu sayede filmler gıdaya kaplandığında gıdanın yüzeyine eşit miktarda solüsyon temas ederek antibakteriyel etkisinden dolayı gıdanın raf ömrünü uzatmaktadır. Tablo 1'de plastik yüzeye entegre edilen solüsyonların ağırlıkları değerlerle birlikte gösterilmiştir.

Tablo 1'den anlaşıldığı üzere, yağ içeriğinden dolayı vaks-yağ, yağ, gliserol içeren propolisli solüsyonlar, filme tutunan propolis oranının yüksek olmasına karşı yüzeyde kuruma göstermemiş, damla şeklinde kalmıştır. Film solüsyonu, %3 oranında yüzeye tutunmuş fakat koyu lekeler olarak gözlenmiştir. Etanol, propilen glikol, etil asetat sırasıyla %3, %15, %4.5 oranında plastik yüzeyde kalarak homojen bir şekilde tutunma göstermiştir. Propolisli solüsyonlar ile karşılaştırma yapmak üzere belirlenen solüsyonlar arasından sadece Asatim yüzeyde tutunma göstermiş olup Proallium DMC, Dianatura Base, Dianatura Safe yüzeye tutunma göstermemiştir. Yapılan çalışma incelendiğinde yağ içeren solüsyonların plastik yüzeye tutunma özelliğinde olmadığı tespit edilmiştir.

Tablo 1. Plastik yüzeye entegre edilen solüsyonların ağırlıkları

Table 1. The weight of the solutions integrated into the plastic surface

Solüsyonlar	Normal (g)	Solüsyonlu (g)	Kuruduktan sonra (g)	Propolis oranı (g propolis/g film)
Vaks-Yağ	0.68	1.90	1.62	%14
Yağ	0.64	1.81	1.52	%14
Gliserol	0.69	1.55	1.21	%7
Film Solüsyonu	0.59	1.9	0.78	%3
Etanol	0.64	1.18	0.86	%3
Etil Asetat	0.57	1.59	1.44	%15
Propilen Glikol	0.64	1.18	0.93	%4.5
Dianatura Base	0.58	1.31	1.01	-
Dianatura Safe	0.65	1.43	0.79	-
Proallium DMC	0.6	1.58	0.78	-
Asatim	0.72	1.88	1.37	-

Ağırlıklar gram (g), propolis oranları % propolis olarak ifade edilmiştir.

Antibakteriyel Aktivite Düzeyinin Belirlenmesi

Tablo 2'de solüsyonların antibakteriyel aktivite düzeyleri, oluşan inhibisyon zonları ile birlikte gösterilmiştir. Agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktivite kıyaslaması yapılmıştır. *S.aureus* için Proallium DMC solüsyonunun, 85 mm inhibisyon zonu oluşturarak petri kabındaki tüm bakteriyi inaktif ettiği görülmüştür. Film solüsyonu ise diğer solüsyonlara kıyasla en az zonu oluşturarak düşük etki gösterdiği tespit edilmiştir. Propolis ekstraktlarının antibakteriyel aktivite düzeylerinin belirlenmesinde oluşan inhibisyon zon çaplarına göre vaks-yağ ve yağ içeren solüsyonların *E.coli* gelişimini engellemediği görülmüştür. Agar kuyucuk difüzyon yöntemi için en etkili antibakteriyel solüsyon olarak tespit edilen Proallium DMC, plastik yüzeye tutunmadığından dolayı LPDE filmlerde uygun olmadığı anlaşılmıştır. *S.aureus* 10 µL için oluşan inhibisyon zonu propilen glikol solüsyonunda 19.1 mm, etanol solüsyonunda 15.5 mm, etil asetat solüsyonunda 31.6 mm olarak görülmüştür. Kontrol örneklerinde *S.aureus* 10 µL için oluşan inhibisyon zonu etil asetat 9.6 mm olarak görülmüş, propilen glikolde görülmemiştir. *E.coli* 10 µL için oluşan inhibisyon zonu propilen glikol solüsyonunda 9.1 mm, etanol solüsyonunda 8.6 mm, etil asetat solüsyonunda 16.8 mm olarak görülmüştür. Kontrol örneklerinde *E.coli* 10 µL için oluşan inhibisyon zonu etil asetat 13.6 mm olarak görülmüş, propilen glikolde görülmemiştir. Burada ulaşılan bulgular ışığında *S.aureus* ve *E.coli* inaktif edilmesinde propilen glikollü propolis ekstraktının etanollü propolis ekstraktına göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. %10 ve %15 olarak belirlenen solüsyon oranlarında inhibisyon zonlarının, solüsyon miktarlarına bağlı olarak artış gösterdiği belirlenmiştir. Uğur ve Aslan tarafından yapılan çalışmada [18] Muğla ilinden toplanan 45 farklı propolis aseton ve dimetil sülfoksit (DMSO) ekstresinin antibakteriyel özelliklerinin propolis örneğine, dozuna ve ekstraksiyon çözücüsüne göre farklılık gösterdiği kaydedilmiştir. Bakkaloğlu ve Arıcı [33] tarafından yapılan çalışmada sulu ve zeytinyağlı ekstraktların antibakteriyel aktiviteye sahip olmadığı fakat etanollü propolis ekstraktların, önemli antibakteriyel aktivite

gösterdiği belirtilmiştir. Bu çalışmada ise etil asetat ve propilen glikol ile hazırlanan propolisli solüsyonların, etanollü propolis ekstraktına göre antibakteriyel aktivitesinin daha yüksek olduğu oluşan inhibisyon zonları ile tespit edilmiştir. Aynı zamanda belirtildiği gibi yağ içeren solüsyonların antibakteriyel etki göstermediği kanıtlanmıştır. Yapılan bu çalışmada, propolisli solüsyonların, Gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyel etkinliğinin, Gram negatif bakterilere kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Propolisin antibakteriyel aktivitesi ile ilgili çalışmaların bazılarında propolisin yalnızca Gram (+) bakteri ve bazı funguslara karşı aktif olduğu [12, 13], diğerlerinde ise Gram (-) bakterilere karşı aktivitesinin zayıf olduğu belirtilmiştir [14-16].

ISO 22196:2011 Metodu ile Antibakteriyel Aktivite İncelenmesi

Kaplanmış plastik filmlerin 24 saatlik bakterilere maruziyet döneminin *S.aureus* gelişimi üzerine etkisi Şekil 1'de gösterilmiştir. Propolis kaplı filmler üzerinde yapılan antibakteriyel aktivite incelemesinde, *S.aureus* için propilen glikol, etanol ve etil asetat çözücülerin 1. saat itibarı ile 7 kob/g düşüş gösterdiği görülmüştür. Kontrol filminde ise 1. saatte 4 kob/g düşüş yaşanmış ve 6. saatte ise tekrar 7 kob/g bakteri sayısına ulaşarak 24. saatte de artmaya devam etmiştir. Asatim solüsyonu kaplı filmler incelendiğinde 1. saat itibarı ile 4.30 kob/g düşüş göstermiş ve 6. saatte 5.48 kob/g, 24. Saatte 6.78 kob/g bakteri sayısına ulaşmıştır.

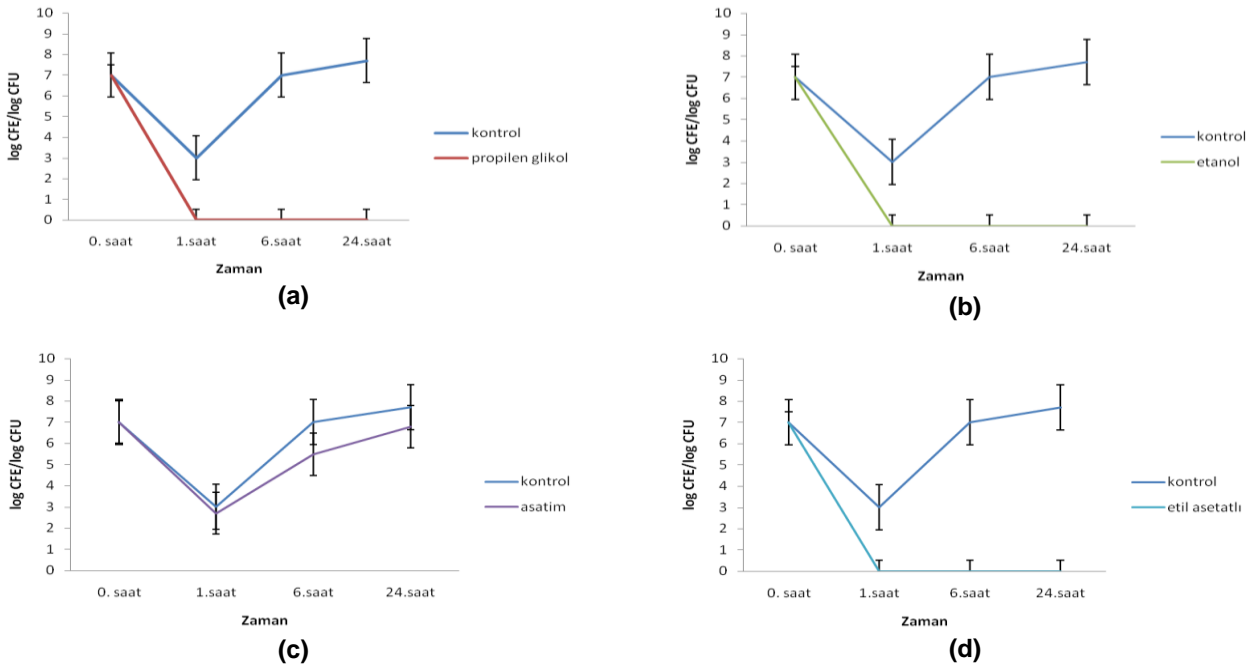
Kaplanmış plastik filmlerin 24 saatlik maruziyet döneminde *E.coli* gelişimi üzerine etkisi Şekil 2'de gösterilmiştir. Propilen glikol, etanol ve etil asetat içeren propolis ekstraktlarının kaplandığı filmler incelendiğinde *E.coli* için 1. saat sonunda 7 kob/g azalma gözlemlenmiş olup 24 saat maruziyet döneminde herhangi bir bakteri artışı görülmemiştir. Kontrol filminde *E.coli* sayısının 1. saat 4 kob/g, 6. saat tekrar 7 kob/g seviyesine ulaştığı ve 24 saatlik maruziyet sonucunda 7.48 kob/g seviyesinde bakteri artışı gözlemlenmiştir.

Tablo 2. Solüsyonların antibakteriyel aktivite düzeyleri

Table 2. Antibacterial activity levels of solutions

Solüsyonlar	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	10 µL	15 µL	10 µL	15 µL
Vaks-Yağ	10.83±2.20 ^{cd}	10.14±0.4 ^e	5.8±0.0 ^c	5.8±0.0 ^e
Yağ	9.5±0.35 ^d	10.05±2.0 ^e	5.8±0.0 ^c	5.8±0.0 ^e
Gliserol	10.5±0.03 ^{cd}	14.05±3.6 ^{de}	7.3±1.5 ^{bc}	6.55±0.3 ^{de}
Film Solüsyonu	7.1±0.03 ^d	7.9±0.5 ^e	6.4±0.01 ^{bc}	7.59±0.4 ^{de}
Etanol	15.5±2.50 ^{cd}	18.8±0.5 ^{cde}	8.6±1.3 ^{bc}	11.9±2.3 ^{cde}
Etil Asetat	31.6±3.00 ^b	38.8±2.1 ^b	16.8±0.7 ^{bc}	20.8±4.5 ^b
Propilen Glikol	19.1±7.50 ^{bcd}	24.9±6.1 ^{cd}	9.1±2.6 ^{bc}	14.27±2.3 ^{bcdde}
Dianatura Base	17.9±0.60 ^{cd}	22.0±2.8 ^{cd}	18.1±1.45 ^b	16.92±2.0 ^{bc}
Dianatura Safe	22.8±6.00 ^{bc}	29.15±0.5 ^{bc}	16.9±0.4 ^{bc}	22.17±1.2 ^b
Proallium DMC	85.0±0.00 ^a	85.0±0.0 ^a	36.69±10.0 ^a	45.82±0.8 ^a
Asatim	12.15±1.60 ^{cd}	17.0±4.0 ^{de}	12.89±0.7 ^{bc}	14.88±4.0 ^{bcd}

Her bir değer üç tekrarın ortalaması ± standart sapma olarak gösterilmiştir (n=3). Her bir sütunda farklı harflerle gösterilen değerler birbirinden istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıdır (p<0.05). İnhibisyon zon çapları mm olarak ifade edilmiştir.

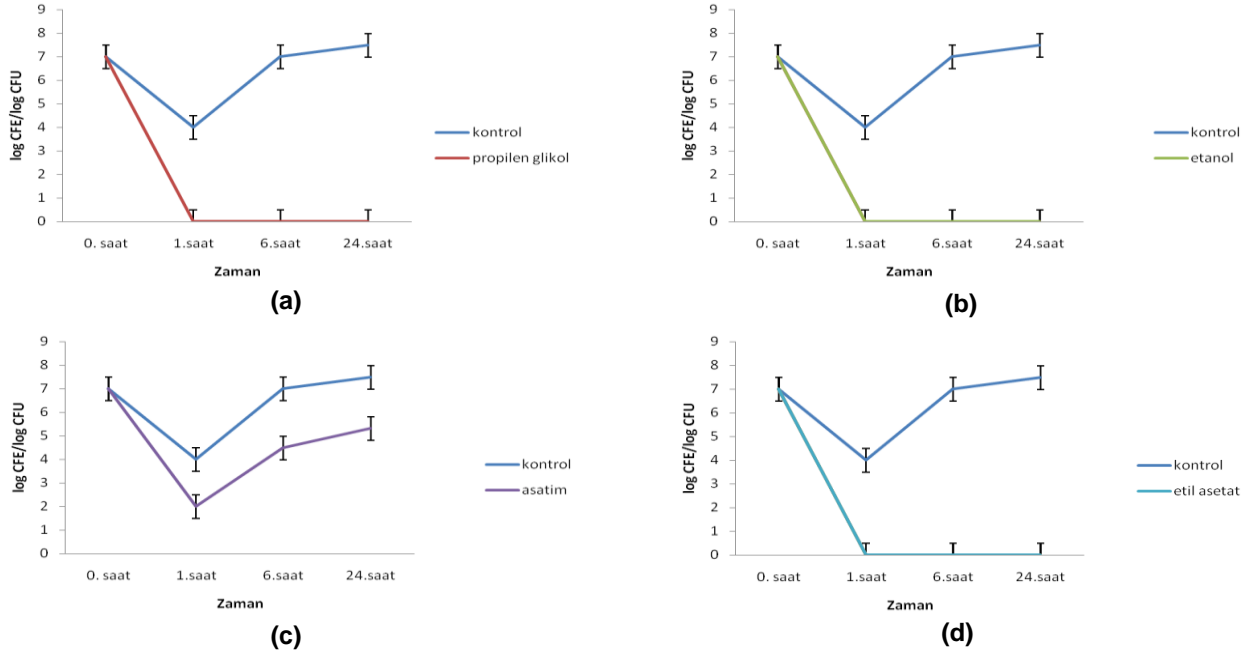


Şekil 1. Kaplanmış plastik filmlerin 24 saatlik maruziyet döneminde *S.aureus* gelişimi üzerine etkisi; (a) Propilen glikol, (b) Etanol, (c) Asatim, (d) Etil asetat

Figure 1. Effect of coated plastic films on *S.aureus* growth during 24 hours exposure; (a) Propylene glycol, (b) Ethanol, (c) Asatim, (d) Ethyl acetate

Kontrol filminde, 1. saat itibari ile *E.coli* 4 kob/g düşüş, *S.aureus* 3 kob/g düşüş göstermiş ve ardından tekrar 7 kob/g bakteri sayısına ulaşılmıştır. Bunun nedeni olarak her iki bakterinin polietilen filme adaptasyon sürecinin etki gösterdiği düşünülmektedir. Silici ve Kutluca [19] tarafından propolisin Gram pozitif bakterilere karşı güçlü aktiviteye sahip olduğu fakat Gram negatif bakterilere karşı sadece sınırlı aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada antibakteriyel aktivite incelemesi için 24 saatin ardından sayılan mikroorganizmalarda, etil asetat, etanol ve propilen glikol içeren propolisli solüsyonların hem Gram pozitif hem Gram negatif bakterilere karşı önemli ölçüde etki ettiği tespit edilmiştir. Torlak ve Sert [10] kitosan-propolis kaplı polipropilen filmlerin gıda kaynaklı patojenlere karşı antibakteriyel etkinliğini incelemişlerdir. 24 saat maruziyetten sonra

etanolik propolis ekstraktı, *E.coli* için ≥ 2 log, *S.aureus* için ise ≥ 3 log düşüş göstermiştir. Bu çalışmada ise LDPE filmler için etanolik propolis ekstraktı her iki suş için de 1. saat itibari sonunda 7 log düşüş göstermiştir. Mascheroni ve ark. [34] propolisin biyopolimer bazlı filmlerden gıda simüle edici sıvıya göçünü incelemiş ve polifenollerin film matrisinden belirli miktarda salınacağını tespit etmişlerdir. Marti ve ark. [35] tarafından antibakteriyel biyomühendislik uygulamalar için gelişmiş malzeme karakterizasyonu yapılmış ve birbirini tamamlayan disk difüzyon yöntemi ile ISO 22196:2011 kullanılarak bir protokol hazırlanmıştır. Bu çalışmada, plastik yüzeylerde detaylı antibakteriyel aktivite incelenmesinde, agar kuyucuk difüzyon testi ve ISO 22196:2011 birlikte kullanılmıştır.



Şekil 2. Kaplanmış plastik filmlerin 24 saatlik maruziyet döneminde *E.coli* gelişimi üzerine etkisi; (a) Propilen glikol, (b) Etanol, (c) Asatim, (d) Etil asetat

Figure 2. Effect of coated plastic films on *E.coli* growth during 24 hours exposure; (a) Propylene glycol, (b) Ethanol, (c) Asatim, (d) Ethyl acetate

SONUÇ

S.aureus ve *E.coli* için hücre sayısı, etil asetatlı, etanollü ve propilen glikollü solüsyonlarda 1. saat sonunda 7 kob/g düşüş göstererek tamamen inaktif olmuştur. Şekillerde gösterilen indirgeme değerleri, ISO 22196 ile aynı olan Japon standardı JIS Z 2801 [36] 'da tanımlanan kritere (≥ 2 log) göre propolisli solüsyonların antibakteriyel etkisinin olduğunu net olarak ifade etmiştir.

Yapılan uygulamalar doğrultusunda plastik yüzeye homojen bir şekilde tutunan ve seçilen solüsyonlar arasında antibakteriyel etkisi en yüksek olan solüsyonun etil asetat içeren propolis ekstraktı olduğu görülmüştür. Propilen glikol ve etanol ekstraktlarının etil asetata kıyasla *E.coli* ve *S.aureus* için antibakteriyel etkinliğinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca propolisli solüsyonların geniş bir antibakteriyel aktivite spektrumuna sahip olduğu ortaya konulmuştur.

Tüm bu sonuçların ışığında, LDPE filmlere entegre edilmesi en uygun propolisli antibakteriyel solüsyonun etil asetat içerdiği görülmüştür. Bu çalışma, propolis püskürtülmüş filmlerin propolisin doğal antibakteriyel etkisinden dolayı gıdaların raf ömrünün uzatılmasında umut verici olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, diğer antibakteriyel ürünlere kıyasla propolisli solüsyonların, gıdaların saklanması için kullanılan filmlere entegre edilmesinin daha uygun olduğu, bakteri gelişimini daha etkili bir şekilde durdurup, yok ettiği görülmüştür.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince

NKUBAP.03.YL.19.225 Proje Numarası ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Castolda, S., Capasso, F. (2009). Propolis an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73, 51-56.
- [2] Kutluca, S., Genç, F., Korkmaz, A. (2006). Propolis. Samsun Tarım İl Müdürlüğü Çiftçi Eğitimi ve Yayım Şubesi, Samsun, p. 57.
- [3] Şahinler, N. (2000). Arı ürünleri ve insan sağlığı açısından önemi. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 5(1-2), 139-148.
- [4] Hepşen, İ.F., Tilgen, F., Hamdi E. (1996). Propolis: Tıbbi özellikleri ve oftalmolojik kullanımı. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 3(4), 386-391.
- [5] Markham, K.R., Mitchell, K.A., Wilkins, A.L., Daldy, J.A., Lu, Y. (1996). HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry*, 42, 205-211.
- [6] Kartal, M., Kaya, S., Kurucu, S. (2002). GC-MS analysis of propolis samples from two different regions of Turkey. *Zeitschrift für Naturforsch*, 57, 905-909.
- [7] Burdock, G.A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 36, 347-363.
- [8] Takaisi-Kikuni, N.B., Schilcher, H. (1994). Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Medica*, 60, 222-227.
- [9] Üçüncü, M. (2007). Food Packing Technology (in Turkish), Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, İzmir, 896s.

- [10] Torlak, E., Sert, D. (2013). Antibacterial effectiveness of chitosan–propolis coated polypropylene films against foodborne pathogens. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 52-55.
- [11] Han, J.H., and J.D. Floros. (1997). Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. *Journal of Plastic Film and Sheeting*, 13(4), 287-298.
- [12] Marcucci, M.C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26, 83-89.
- [13] Nieva, M.M.I., Isla, M.I., Cudmani, N.G., Vattuone, M.A., Sampietro, A.R. (1999). Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucuman, Argentina) propolis. *Journal of Ethnopharmacol*, 68, 97-102.
- [14] Sforcin, J.M., Fernandes, Jr., A., Lopes, C.A.M., Bankova, V., Funari, S.R.C. (2000). Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacol*, 73, 243-249.
- [15] Grange, J.M., Davey, R.W. (1990). Antibacterial properties of propolis (bee glue). *Journal of the Royal Society of Medicine*, 83, 159-161.
- [16] Dobrowolski, J.W., Vohora, S.B., Sharma, K., Shah, S.A., Naqvi, S.A.H., Dandiya, P.C. (1991). Antibacterial, antifungal, antiamoebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *Journal of Ethnopharmacol*, 35, 77-82.
- [17] Mirzoeva, O. K., Grishanin, R. N., Calder, P. C. (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological Research*, 152, 239-246.
- [18] Uğur, A., Arslan, T. (2004). An in vitro study on antimicrobial activity of propolis from Mugla province of Turkey. *Journal of Medicinal Food*, 7 (1), 90-94.
- [19] 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 Ethnopharmacol*, 99, 69-73.
- [20] Dığrak M, Yılmaz Ö, Çelik S, Yıldız S. (1995). Propolisteki yağ asitleri ve antimikrobiyal etkisi üzerinde in vitro araştırmalar. *Gıda*, 20(4), 249-255.
- [21] Noureddine, H., Hage-Sleiman, R., Wehbi, B., Fayyad-Kazan, A.H., Hayar, S., Traboulssi, M., ElMakhour, Y. (2017). Chemical characterization and cytotoxic activity evaluation of Lebanese propolis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 298-307.
- [22] Silva, C., Prasniewski, A., Calegari, M.A., de Lima, V.A., Oldoni, T.L. (2018). Determination of total phenolic compounds and antioxidant activity of ethanolic extracts of propolis using ATR–FT-IR. *Food Analytical Methods*, 11, 2013–2021.
- [23] Cottica, S.M., Sabik, H., Antoine, C., Fortin, J., Graveline, N., Visentainer, J.V., Britten, M. (2015). Characterization of Canadian propolis fractions obtained from two-step sequential extraction. *Food Science and Technology*, 60(1), 609-614.
- [24] Ertürk, Ö., Yavuz, C., Sıralı, R. (2014). The antimicrobial activity of propolis from Ordu province of Turkey. *Mellifera*, 14(27-28), 11-16.
- [25] Segueni, N., Khadraoui, F., Rhouati, S. (2017). Volatile compounds as propolis characterization markers. In Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration. *Springer*, 16(4), 1271-1273.
- [26] Bakdash, A., Almohammadi, O.H., Taha, N.A., Abu-Rumman, A., Kumar, S. (2018). Chemical composition of propolis from the Baha Region in Saudi Arabia. *Czech Journal of Food Science*, 36(2), 00-10.
- [27] Ghamdi, A.A., Bayaqoob, N.I., Rushdi, A.I., Alattal, Y., Simoneit, B.R., El-Mubarak, A.H., Al-Mutlaq, K.F. (2017). Chemical compositions and characteristics of organic compounds in propolis from Yemen. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(5), 1094-1103.
- [28] Mohtar, L.G., Rodríguez, S.A., Nazareno, M.A. (2017). Comparative analysis of volatile compound profiles of propolis from different provenances. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(9), 3409-3415.
- [29] Taddeo, V.A., Epifano, F., Fiorito, S., Genovese, S. (2016). Comparison of different extraction methods and HPLC quantification of prenylated and unprenylated phenylpropanoids in raw Italian propolis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 129, 219-223.
- [30] Netiková, L., Bogusch, P., Heneberg, P. (2013). Czech ethanol-free propolis extract displays inhibitory activity against a broad spectrum of bacterial and fungal pathogens. *Journal of Food Science*, 78(9), 1421-1429.
- [31] Arslan, S., Perçin, D., Silici, S., Er, Ö. (2010). Farklı çözücülerle hazırlanan propolis özütlerinin mutans streptokoklar üzerine *in vitro* antimikrobiyal etkisi. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 19(1), 68.
- [32] ISO 22196:2011, Plastics-Measurement of Antibacterial Activity on Plastics and Other Non-porous Surfaces, Geneva, Switzerland
- [33] Bakkaloğlu, Z., Arıcı M. (2019). Farklı çözücülerle propolis ekstraksiyonunun toplam fenolik içeriği, antioksidan kapasite ve antimikrobiyal aktivite üzerine etkileri. *Akademik Gıda*, 17(4) 538-545.
- [34] Mascheroni, E., Guillard, V., Nalin, F., Mora, L., Piergiovanni, L. (2010). Diffusivity of propolis compounds in Poly(lactic acid) polymer for the development of anti-microbial packaging films. *Journal of Food Engineering*, 98, 294-301.
- [35] Martí, M., Frígols, B., Serrano-Aroca, A. (2018). Antimicrobial characterization of advanced materials for bioengineering applications. *The Journal of Visualized Experiments*, 28(4), 138.
- [36] Japanese Standards Association (2000). Japanese Industrial Standard JIS Z 2801:2000. Antimicrobial products-test for antimicrobial activity and efficacy. Tokyo, Japan.