

FARKLI ÇÖZÜCÜLER KULLANILARAK ULTRASON DESTEKLİ PROPOLİS EKSTRAKSİYONU: ANTİMİKROBİYEL AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ



Muhammet ARICI¹, Zeynep BAKKALOĞLU, Salih KARASU

Yıldız Teknik Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul

¹Sorumlu yazar: muarici@yildiz.edu.tr



Giriş

Son zamanlarda propolis sağlıklı gıdaların temel bir bileşeni olarak kullanılmaktadır. Propolisin antimikrobiyel etkisi nedeniyle hastalıkları önlediği ve gıdaları koruduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, geleneksel ekstraksiyonun uzun süre, yüksek maliyet ve biyoaktif bileşiklerin bozunması gibi etkilerinden dolayı bazı dezavantajları olduğu ifade edilmektedir. Bu çalışmanın amacı ultrasonik ekstraksiyon kullanarak ekstrakte edilen propolisin antimikrobiyel aktivitesini belirlemektir.

Materyal ve Metot

Klasik Çözücü Ekstraksiyon Metodu ile Propolis Ekstraktlarının Hazırlanması

Propolis numuneleri öğütülmüş ve 5 g'lık kısımlara ayrılmıştır. Her bir kısım, 50 mL etanol (% 70 w/v), dimetilsülfoksit (DMSO) (% 100 w/v), propilen glikol (PG) (% 100 w/v) ve damıtık su (% 100 w/v) içinde 20 C'de 150 rpm'de 24 saat boyunca çözündürülmüştür. Çözündürülen propolisler 4.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip, Whatmann A4 filtre kağıdı kullanılarak süzümüştür (1).

Ultrases Destekli Ekstraksiyon Metodu ile Propolis Ekstraktlarının Hazırlanması

Ultrases teknolojisinden (Hielscher, Almanya) faydalanarak ekstrakte edilecek örnekler öğütüldükten sonra, 5 g'lık kısımlara ayrılmıştır. Her bir kısım, 50 mL etanol (% 70 w/v), DMSO (% 100 w/v), PG (% 100 w/v) ve distile su (% 100 w/v) içinde yüzey tepki metodundan çıkartılan optimum şartlara göre ekstrakte edilmiştir (2,3).

Tablo 1. Yüzey yanıt metodu kullanılan ultrases destekli optimum propolis ekstraksiyonunun deneysel tasarımı

Kullanılan Çözücü	Ekstraksiyon süresi (dak)	Ekstraksiyon sıcaklığı(°C)	Ultrases Gücü (Watt)
Etanol	2,95	58,61	615,26
DMSO	3,00	60,00	580,00
PG	3,00	59,00	591,00
DS	2,70	59,19	591,73

Antimikrobiyel Aktivitenin Belirlenmesi

Bu maksatla agar difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Mikroorganizma kültürleri ve besiyerleri: *Escherichia coli* O157H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* UA159 için steril Nutrient Agar (NA), *Candida albicans* için DRBC Agar ve *Penicillium carneum* IBT14 042, *Aspergillus flavus* ATCC 15517 ve *Aspergillus niger* (ATCC 9642) için PDA.

Mikroorganizma kültürlerinden 100 µL alınıp uygun besiyerlerine ekim yapılarak kurumaya bırakılmış, besiyerleri üzerine 1 numaralı korkbor ile delik açılarak, deliklere 10'ar µL propolis ekstraktları ve kontrol olarak propolis ekstraksiyonunda kullanılan çözücüler ilave edildikten sonra inkübe edilmiştir.

Minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi için propolis ekstraktları her bir çözücü ve kullanılan yöntem olmak üzere ayrı ayrı 10, 100, 1000 ve 10000 kat seyreltilmiş, ekstraktlardan 10'ar µL alınarak uygun besi yerlerinde korkbor ile açılmış deliklere aktararak inkübasyona bırakılmıştır.

Inkübasyon sonrasında, deliklerin çevresinde oluşan inhibisyon zonları mm olarak kumpasla ölçülmüştür. Propolis ekstraksiyonunda optimum şartlarda ekstraktların elde edilmesi için yüzey tepki metodunu (RSM) içeren Design-Expert 7.0.0 yazılımında Box-Behnken dizaynı kullanılmıştır. Sonuçlara varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır.

Bulgular ve Sonuç

Farklı Çözücüler Kullanılan Ultrason Destekli Propolis Ekstraktlarının Antimikrobiyel Aktivitesi

Tüm propolis ekstraktlarının test edilen mikroorganizmalara karşı antibakteriyel ve antifungal aktivite gösterdiği ve inhibisyon zonlarının 4-19 mm arasında olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2). Elde edilen sonuçlara göre:

- Ekstraksiyon yöntemi ve çözücü tipinin etkisinin antimikrobiyel aktiviteyi önemli ölçüde etkilediği (p<0,05),
- UAE'nin, tüm numuneler için KE'ye kıyasla inhibisyon bölgesi çapını önemli ölçüde arttırdığı,
- Aynı yöntemler arasında, etanollü ekstraktların diğerlerine göre daha yüksek antimikrobiyel aktivite gösterdiği (p <0,05),
- Propolis ekstraktlarının antifungal aktivitesinin antibakteriyel aktiviteden daha güçlü olduğu,
- Propolis ekstraktlarının Gram-pozitif bakteriler üzerinde Gram-negatif bakterilere göre daha güçlü bir antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Tablo 2. Propolis ekstraktlarının test mikroorganizmaları üzerine antimikrobiyel aktivitesi*

Mikroorganizmalar	Etanol		DMSO		PG		DS	
	KE	UDE	KE	UDE	KE	UDE	KE	UDE
<i>Escherichia coli</i> 0157H7 ATCC 43888	7,60 ^{Ba}	9,20 ^{Aa}	7,20 ^{Bb}	8,00 ^{Ab}	6,40 ^{Bc}	8,20 ^{Ab}	5,00 ^{Bd}	6,20 ^{Ac}
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13932	10,25 ^{Ba}	12,50 ^{Aa}	10,20 ^{Ba}	12,40 ^{Aa}	9,60 ^{Bb}	11,00 ^{Ab}	6,00 ^{Bc}	7,00 ^{Ac}
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC14028	7,25 ^{Ba}	8,30 ^{Aa}	7,50 ^{Ba}	8,20 ^{Aa}	6,20 ^{Bb}	7,40 ^{Ab}	4,20 ^{Bc}	5,00 ^{Ac}
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	8,50 ^{Ba}	10,00 ^{Aa}	8,80 ^{Ba}	10,00 ^{Aa}	7,00 ^{Bb}	8,50 ^{Ab}	6,40 ^{Bc}	7,50 ^{Ac}
<i>Streptococcus mutans</i> UA159 (ATCC 700610)	10,20 ^{Ba}	11,50 ^{Aa}	9,20 ^{Bb}	10,80 ^{Ab}	8,20 ^{Bc}	9,40 ^{Ac}	7,10 ^{Bd}	7,80 ^{Aa}
<i>Candida albicans</i> 10251	9,30 ^{Ba}	11,20 ^{Aa}	9,20 ^{Ba}	10,40 ^{Ab}	9,00 ^{Bb}	10,40 ^{Ab}	4,40 ^{Bc}	4,90 ^{Ac}
<i>Penicillium carneum</i> IBT14 042	19,50 ^{Ba}	21,50 ^{Aa}	14,40 ^{Bb}	16,80 ^{Ab}	13,20 ^{Bc}	15,80 ^{Ab}	6,20 ^{Bd}	7,20 ^{Ac}
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 15517	12,20 ^{Ba}	15,20 ^{Aa}	11,50 ^{Bb}	12,70 ^{Ab}	11,00 ^{Bc}	12,30 ^{Ac}	6,00 ^{Bd}	8,50 ^{Ad}
<i>Aspergillus niger</i> ATCC9642	11,50 ^{Ba}	12,50 ^{Aa}	11,20 ^{Ba}	11,50 ^{Ab}	10,00 ^{Bb}	10,80 ^{Ac}	7,50 ^{Bc}	7,20 ^{Ad}

*İnhibisyon zonlarının çaplarının değerleri mm cinsinden verilmiştir. Aynı satırdaki farklı büyük harfler ekstraksiyon yönteminin antimikrobiyel aktivite üzerindeki önemini (p <0.05), aynı satırdaki farklı küçük harfler ise, solvent tipinin antimikrobiyel aktivite üzerindeki önemini göstermektedir (p <0,05). KE: Klasik çözücü ekstraksiyonu, UDE: Ultrases destekli ekstraksiyon, DS: Damıtılmış su, DMSO: Dimetilsülfoksit, PG: propilen glikol

Tablo 3'de propolis ekstraktlarının 10⁻² konsantrasyonuna kadar antimikrobiyel etkiye sahip olduğu görülmektedir. DS'li ekstraktlar hariç diğer çözücülerde 10⁻³ ve DMSO'lu ultraseste çözülmüş ekstraktlarda 10⁻⁴ konsantrasyonunda propolisin inhibisyon etkisine rastlanmaktadır. Propolis ekstraktlarının elde edilmesinde farklı çözücülerin ve ultrases teknolojisinin kullanılması propolisin antimikrobiyel aktivitesini etkilemektedir. Ancak bu etkilerin mikroorganizmanın türüne göre değiştiği de unutulmamalıdır. Bu çalışmada kullanılan mikroorganizmaların gıdalarda olumsuz etkiler oluşturabilecek etkilere sahip olması, propolisin antimikrobiyel aktivitesinin etkinliğinin gıda sanayi için ne kadar yüksek olduğunu ortaya koymuştur.

Tablo 3. Propolis ekstraktlarının test mikroorganizmaları* üzerine minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerleri (mm)

Mikroorganizma	Etanol			DMSO				PG			DS												
	KE		UDE	KE		UDE		KE		UDE		KE		UDE									
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
E.c.	4	4	3	5	4	4	3	3	3	4	4	4	3	3	3	3	4	4	4	2	2	3	3
L.m.	5	4	3	7	5	3	6	6	4	7	4	4	3	6	4	3	7	5	4	-	-	3	2
S.T.	4	3	3	5	5	3	4	4	4	5	4	3	-	3	3	3	5	5	4	2	2	3	3
S.a.	4	4	3	4	4	3	4	4	3	5	4	4	3	4	4	3	4	4	3	-	-	3	-
S.m.	6	5	3	7	5	3	5	4	3	5	4	3	-	4	4	-	5	4	3	3	-	3	3
C.a.	5	5	4	8	8	4	7	4	3	7	6	4	-	5	5	-	6	4	4	2	-	-	-
P.c.	10	7	3	15	8	4	10	7	-	12	8	-	-	9	6	-	11	8	-	-	-	4	-
A.f.	7	4	-	8	5	-	8	5	-	11	8	-	-	6	-	-	10	5	-	-	-	-	-
A.n.	4	4	-	5	5	4	4	4	-	6	3	-	-	4	3	-	5	4	-	-	-	-	-

*E.c.: *Escherichia coli*, L.m.: *Listeria monocytogenes*, S.T.: *Salmonella Typhimurium*, S.a.: *Staphylococcus aureus*, S.m.: *Streptococcus mutans*, C.a.: *Candida albicans*, P.c.: *Penicillium carneum*, A.f.: *Aspergillus flavus*, A.n.: *Aspergillus niger*

Kaynaklar

- Netíková, 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), M1421-M1429.
- Dang, T. T., Van Vuong, Q., Schreider, M. J., Bowyer, M. C., Van Altena, I. A., & Scarlett, C. J. (2017). Optimisation of ultrasound-assisted extraction conditions for phenolic content and antioxidant activities of the alga *Hormosira banksii* using response surface methodology. *Journal of Applied Phycology*, 29(6), 3161-3173.
- Sanpa, S., Sutjarittangtham, K., Tunkasiri, T., Eitssayeam, S., & Chantawannakul, P. (2012). Ultrasonic extraction of Thai propolis for antimicrobial and antioxidant properties. In: *Advanced Materials Research*, (506 pp. 371-374). Trans Tech Publications Ltd.

Bu çalışma YTÜ BAP tarafından desteklenmiştir (Proje No: FDK-2018-3467).