

**T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARADENİZ BÖLGESİNDE ÜRETİLEN KESTANE (*Castanea sativa* Mill.) BALLARININ BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

BELDE ÖMÜR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORDU 2015

TEZ ONAY

Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Belde ÖMÜR tarafından hazırlanan ve Yrd. Doç. Dr. Melek ÇOL AYVAZ danışmanlığında yürütülen “Karadeniz Bölgesinde üretilen Kestane (*Castanea sativa* Mill.) Ballarının Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi” adlı bu tez, jürimiz tarafından 07/10/2015 2015 tarihinde oy birliği / oy çokluğu ile Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Melek ÇOL AYVAZ

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Ömer ERTÜRK
Biyoloji Bölümü, Ordu Üniversitesi

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Melek ÇOL AYVAZ
Kimya Bölümü, Ordu Üniversitesi

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Hüseyin ŞAHİN
Mülkiyet Koruma ve Güvenlik Bölümü,
Giresun Üniversitesi Espiye MYO

İmza :

ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 06/11/2015 tarih ve 2015/459 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

06/11/2015

Enstitü Müdürü
Doç Dr. Kürşat KORKMAZ

TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.


Belde ÖMÜR

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

ÖZET

KARADENİZ BÖLGESİNDE ÜRETİLEN KESTANE (*Castanea sativa* Mill.) BALLARININ BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Belde ÖMÜR

Ordu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı, 2015
Yüksek Lisans Tezi, 86s.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Melek ÇOL AYVAZ

Bal insanlığın bilinen en eski gıda ürünlerinden biridir. İnsanlık tarihinin kaydedilebilen başlangıcından bu yana, bal sadece beslenme için değil, aynı zamanda terapötik uygulamalarda da kullanılmıştır. Kestane balı en lezzetli ve yüksek kaliteli ballardan biri olmasının yanı sıra diğer ballara oranla iç piyasada daha fazla alıcı bulabilmektedir. Karadeniz bölgesi hem bal hem de kestane üretiminde önde gelen bölgelerimizdendir. Bu noktadan hareketle bölgemizdeki bu doğal kaynağı değerlendirmek adına bu çalışma kapsamında Karadeniz Bölgesi illerinden temin edilen 49 farklı kestane balı numunesi çeşitli biyokimyasal yönleri açısından değerlendirildi. İncelenen bal numunelerinin tamamının prolin değerlerinin Türk Gıda Kodeksi tarafından belirtilen en düşük değerden yüksek olduğu böylece numunelerin tağşişe maruz kalmadığı saptandı. Ortalama protein değeri ise 1 g bal için 19.5 mg olarak hesaplandı. Balların diastaz sayıları için bulunan değerlerde limit değer olan 8'in üstündedir. Ayrıca invertaz ve katalaz aktiviteleri de sırasıyla 189 Ü/kg bal ve 1600 Ü/g bal olarak hesaplanmıştır. Kestane ballarının toplam fenolik içerikleri ve toplam antioksidan aktiviteleri için bulunan ortalama değerler (sırasıyla 0.774 mg GAE/g bal ve 133.2 mg AAE/g bal) karşılaştırma amacıyla incelenen çiçek ve ormangülü bal numuneleri için hesaplanan değerlerden yüksek bulunmuştur. Aksine flavonoid içerik için bulunan ortalama değer diğer tür ballar için bulunan değerlerin altındadır. Denenen bal numunelerinin DPPH serbest radikalini süpürme etkinlikleri hemen hemen aynı derecede iken FRAP değerleri (268 µmol TE/ 100 g bal) açısından kestane balları üstündür. Denenen tüm bal numunelerinin %28'inin hidroksil radikali ile oluşturulan DNA hasarına karşı koruyucu olduğu da gösterildi.

Böylelikle Karadeniz Bölgesi illerinden temin edilen kestane ballarının tüketicinin ihtiyacını karşılayabilecek niteliklere sahip olduğu ortaya konulmuştur. Bölge balları terapötik amaçla da değerlendirilebilir.

Anahtar Kelimeler: Kestane balı, Prolin, Diastaz, İvertaz, Fenolik içerik, Flavonoid içerik, DPPH, FRAP, DNA hasarı inhibisyonu

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE BIOCHEMICAL PROPERTIES OF THE CHESTNUT (*Castanea sativa* Mill.) HONEYS PRODUCED IN THE BLACK SEA REGION

Belde ÖMÜR

University of Ordu
Institute for Graduate Studies in Natural and Technology
Department of Chemistry, 2015
MSc. Thesis, 86p.

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Melek ÇOL AYVAZ

Honey is one of the oldest food products known to mankind. Since the start of recorded human history, honey has been used not only for nutrition but also in therapeutic applications. Chestnut honey is the most delicious and high quality honey and can find more buyers in the domestic market compared to other honeys. The Black Sea region is one of our leading region both in chestnut and honey production. From this point, to evaluate this natural source in the our region, 49 different chestnut honey samples obtained from the Black Sea Region provinces were evaluated in terms of various biochemical properties. It is detected that all of the honey samples investigated had the proline value greater than the minimum value specified by Turkish Food Codex and did not expose adulteration. The average protein value was calculated as 19.5 mg for 1 g of honey. The found values for diastase number of honey samples were also above the 8 which is the limit value. Furthermore, invertase and catalase activities were calculated as 189 U/kg honey and 1600 U/g honey, respectively. The average values (0.774 mg GAE/g honey and 133.2 mg AAE/g honey, respectively) for total phenolic contents and the total antioxidant activities of the chestnut honey samples were found higher than the calculated values for flower and rhododendron honey samples examined for comparison. On the contrary, the found average value for flavonoid contents was below the values calculated for other kinds of honey. The DPPH free radical scavenging activities of the analyzed honey samples were almost equally, while in terms of FRAP values (268 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g honey}$) chestnut honeys were superior. It was also demonstrated that the 28% of all honey samples tested to be protective against DNA damage generated by hydroxyl radicals.

Thus, it revealed that the chestnut honeys obtained from the Black Sea Region provinces have the properties to meet the needs of consumers. Regional honey can also be evaluated for therapeutic purposes.

Key Words: Chestnut honey, Proline, Diastase, Invertase, Phenolic content, Flavonoid content, DPPH, FRAP, DNA damage inhibition

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında engin hoşgörü ve sabrı ile yardımını esirgemeyen ve bana “Karadeniz Bölgesinde Üretilen Kestane (*Castanea sativa* Mill.) Ballarının Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi” konulu yüksek lisans tezini veren, yapıcı ve yönlendirici fikirleri ile daima yol gösteren Ordu Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü öğretim üyesi, danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Melek ÇOL AYVAZ’a yürekten teşekkür ederim.

Bal numunelerinin temin edilmesini sağlayan Ordu Arıcılık Enstitüsü çalışanı Yük. Ziraat Müh. Dilek KABAKÇI’ya ve bal temininde üreticilerle iletişim kurmamızı sağlayan Arıcılar Birliği Başkanlarına teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım süresince teknik yardımlarından dolayı Kimya Bölümü laboratuvar sorumlusu İlhan İRENDE’ye teşekkür ederim.

Ayrıca bu süreçte beni yalnız bırakmayan ve sıkıntılı anlarımda beni destekleyen arkadaşlarıma ve tüm hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle beni yetiştiren çok sevdiğim aileme teşekkürlerimi bir borç bilir, şükranlarımı sunarım.

Bu araştırma, Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından “TF-1441” numaralı ve “Karadeniz Bölgesinde Üretilen Kestane (*Castanea sativa* Mill.) Ballarının Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi” isimli Yüksek Lisans Tez projesi kapsamında desteklenmiştir. İlgili kurum ve çalışanlarına desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Belde ÖMÜR
2015

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ BİLDİRİMİ	I
ÖZET	II
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	IX
ÇİZELGELER LİSTESİ	XI
SİMGELER VE KISALTMALAR	XII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR (veya GENEL BİLGİLER)	4
2.1. Balın Tanımı ve Kestane Balı.....	4
2.2. Balın Tarihçesi.....	5
2.3. Dünya’da Arıcılık ve Bal Üretimi.....	6
2.4. Türkiye’de Arıcılık ve Bal Üretimi.....	7
2.5. Karadeniz Bölgesinde Bal Üretimi.....	10
2.6. Balın Bileşimi ve Kimyasal Yapısı.....	10
2.6.1. Baldaki Şekerler.....	12
2.6.2. Baldaki Enzimler.....	12
2.6.3. Balın Asitlik ve pH Değeri.....	14
2.6.4. Baldaki Amino Asitler ve Proteinler.....	15
2.6.5. Balda Fenolik Asitler ve Flavonoidler.....	15
2.7. Balın Fiziksel Özellikleri.....	16
2.7.1. Balın Rengi.....	16
2.7.2. Balın Viskozitesi.....	17
2.7.3. Balın Higroskopik Özelliği.....	17
2.7.4. Balın Tadı ve Kokusu.....	17
2.7.5. Balda Granülasyon (Kristallenme)	18

2.8.	Serbest Radikaller.....	18
2.8.1.	Biyolojik Sistemlerde Serbest Oksijen Radikalleri.....	18
2.8.2.	Serbest Radikallerin Etkileri.....	19
2.8.2.1.	Serbest Radikallerin Membran Lipidlerine Etkileri.....	19
2.8.2.2.	Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri.....	20
2.8.2.3.	Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere Etkileri.....	22
2.8.2.4.	Serbest Radikallerin Karbohidratlara Etkileri.....	22
2.9.	Antioksidanlar.....	22
2.9.1.	Antioksidanlar ve Fenolik Bileşikler.....	22
2.9.2.	Antioksidan Savunma Mekanizması.....	24
3.	MATERYAL ve YÖNTEM.....	25
3.1.	Materyal.....	25
3.1.1.	Bal Örneklerinin Toplanması ve Saklanması.....	25
3.1.2.	Kullanılan Cihazlar.....	25
3.1.3.	Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler.....	26
3.1.4.	Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	26
3.1.4.1.	Bal Ekstraktlarının Hazırlanması.....	26
3.1.4.2.	Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler.....	26
3.1.4.3.	Diastaz Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler.....	26
3.1.4.4.	İnvertaz Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler.....	27
3.1.4.5.	Prolin İçeriğinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler.....	28
3.1.4.6.	Protein Miktarının Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler.....	28
3.1.4.7.	Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler.....	29
3.1.4.8.	Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler.....	29
3.1.4.9.	Toplam Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler.....	30
3.1.4.10.	DPPH Radikalinin Etkisinin Giderilmesi ile İlgili Çözeltiler.....	30
3.1.4.11.	FRAP Metodu ile Antioksidan Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	31
3.1.4.12.	DNA Hasarının Önlenmesinin İncelenmesinde Kullanılan Çözeltiler.....	31
3.1.5.	Bal Örneklerinin Renk Yoğunluğunun Belirlenmesi.....	32

3.1.6.	Bal Örneklerinin Enzim İçeriklerinin Belirlenmesi	32
3.1.6.1.	KatalazAktivitesinin Belirlenmesi.....	32
3.1.6.2.	Diastaz Aktivitesinin Belirlenmesi	33
3.1.6.3.	İnvertaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	34
3.1.7.	Protein ve Prolin İçeriğinin Belirlenmesi.....	35
3.1.8.	Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi.....	36
3.1.9.	Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi.....	37
3.1.10.	Antioksidan Etkinliğinin Belirlenmesi.....	38
3.1.10.1.	Toplam Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi.....	38
3.1.10.2.	DPPH* Radikali Temizleme Aktivitesi Tayini	39
3.1.10.3.	FRAP Metodu İle Antioksidan Aktivite Tayini.....	40
3.1.10.4.	Bal Numunelerinin Hidroksil Radikali Tarafından Oluşturulan DNA Hasarını Önleme Etkinliklerini İncelenmesi.....	40
4.	BULGULAR ve TARTIŞMA.....	42
4.1.	Renk Yoğunluğu.....	42
4.2.	Bal Örneklerinin Enzim İçerikleri.....	45
4.2.1.	Katalaz Aktivitesi.....	45
4.2.2.	Diastaz Aktivitesi.....	45
4.2.3.	İnvertaz Aktivitesi.....	46
4.3.	Bal Numunelerinin Protein ve Prolin Miktarları.....	49
4.4.	Bal Numunelerinin Toplam Fenolik İçerikleri.....	52
4.5.	Bal Numunelerinin Toplam Flavonoid İçerikleri.....	55
4.6.	Bal Numunelerinin Antioksidan Etkinlikleri.....	58
4.6.1.	Bal Numunelerinin Toplam Antioksidan Kapasiteleri.....	58
4.6.2.	Bal Numunelerinin DPPH* Radikali Temizleme Aktivitesi.....	60
4.6.3.	Bal Numunelerinin Demir (III) İndirgeme Antioksidan Kuvveti (FRAP).	63
4.6.4.	Bal Numunelerinin Hidroksil Radikali Tarafından Oluşturulan DNA Hasarını Önleme Etkinlikleri.....	69
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER.....	72
6.	KAYNAKLAR.....	75

ÖZGEÇMİŞ.....	86
---------------	----

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1.	TÜİK 2014 yılı verilerine göre iller bazında bal üretimi (kg) dağılımı tematik haritası.....	2
Şekil 3.1.	Bal numunelerinin metanol ve su ekstraktlarının hazırlanışı.....	26
Şekil 4.1.	Ordu iline ait 15 numaralı bal numunesinin diastaz sayısının hesaplanması için çizilen grafik.....	46
Şekil 4.2.	Bal numunelerinin su ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarlarının belirlenmesi için GA kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği.....	53
Şekil 4.3.	Bal numunelerinin metanol ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarlarının belirlenmesi için GA kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği.....	53
Şekil 4.4.	Bal numunelerinin su ekstraktlarının renk yoğunlukları ile toplam fenolik içerikleri arasındaki korelasyon grafiği.....	55
Şekil 4.5.	Bal numunelerinin metanol ekstraktlarının renk yoğunlukları ile toplam fenolik içerikleri arasındaki korelasyon grafiği.....	55
Şekil 4.6.	Bal numunelerinin su ekstraktlarının toplam antioksidan aktivite tayini için AA kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği.....	58
Şekil 4.7.	Bal numunelerinin metanol ekstraktlarının toplam antioksidan aktivite tayini için AA kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği.....	59
Şekil 4.8.	Artvin iline ait 22 numaralı bal numunesinin su ekstraktının DPPH radikali giderme aktivitesinin tespiti amacıyla oluşturulan grafik.....	61
Şekil 4.9.	Artvin iline ait 22 numaralı bal numunesinin metanol ekstraktının DPPH radikali giderme aktivitesinin tespiti amacıyla oluşturulan grafik.....	62
Şekil 4.10.	Bal numunelerinin su ekstraktlarının renk yoğunluğu ile DPPH serbest radikal süpürme aktiviteleri arasındaki korelasyon grafiği.....	63
Şekil 4.11.	Bal numunelerinin metanol ekstraktlarının renk yoğunluğu ile DPPH serbest radikal süpürme aktiviteleri arasındaki korelasyon grafiği.....	63
Şekil 4.12.	Bal numunelerinin su ekstraktlarının FRAP değerlerinin belirlenmesi için Troloks kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği.....	64

Şekil 4.13.	Bal numunelerinin metanol ekstraktlarının FRAP değerlerinin belirlenmesi için Troloks kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği.....	64
Şekil 4.14.	Bal numunelerinin hidroksil radikali tarafından oluşturulan DNA hasarını önleme etkinliklerinin incelenmesi için elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüleri.....	69

ÇİZELGELER LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1.	2011 FAO verilerine Dünya bal üreticileri sıralaması.....	7
Çizelge 2.2.	Türkiye'ye ait arıcılık verilerinin yıllara göre dağılımı.....	8
Çizelge 2.3.	Kestane üretimi yapılan illerimizin meyve veren ağaç sayısı, ağaç başına ortalama verim ve üretim miktarları.....	9
Çizelge 2.4.	Farklı çalışma sonuçlarına göre balın genel bileşiminin değişimi ...	11
Çizelge 2.5.	Farklı çalışma sonuçlarına göre balın şeker kompozisyonu	13
Çizelge 2.6.	En sık karşılaşılan serbest radikaller ve bazı özellikleri.....	21
Çizelge 3.1.	Kullanılan cihazlar.....	25
Çizelge 3.2.	Katalaz aktivitesi tayini için yapılan pipetlemeler.....	32
Çizelge 3.3.	Protein tayini için yapılan pipetlemeler	35
Çizelge 3.4.	Toplam fenolik madde tayini için yapılan pipetlemeler.....	37
Çizelge 3.5.	Toplam falavonoid içerik tayini için yapılan pipetlemeler.....	38
Çizelge 3.6.	Toplam antioksidan kapasitenin tayini için yapılan pipetlemeler.....	38
Çizelge 3.7.	DPPH radikali temizleme aktivitesi tayini için yapılan pipetlemeler.....	40
Çizelge 3.8.	FRAP metodu ile antioksidan aktivite tayini için yapılan pipetlemeler.....	40
Çizelge 4.1.	Bal numunelerinin su ve metanol ekstraktlarının renk yoğunlukları ile ilgili toplu bulgular.....	42
Çizelge 4.2.	Bal örneklerinden elde edilen ekstraktların enzimatik aktivite ile ilgili toplu bulgular.....	47
Çizelge 4.3.	Bal örneklerinden elde edilen ekstraktların prolin ve protein miktarı ile ilgili toplu bulgular.....	50
Çizelge 4.4.	Bal örneklerinden elde edilen su ve metanol ekstraktlarının toplam fenolik içerikleri ve bal örneklerinin flavonoid içerikleri ile ilgili toplu bulgular.....	56
Çizelge 4.5.	Bal örneklerinden elde edilen metanol ekstraktlarının antioksidan çalışmaları ile ilgili toplu bulgular.....	66
Çizelge 4.6.	Bal örneklerinden elde edilen su ekstraktlarının antioksidan çalışmaları ile ilgili toplu bulgular.....	70

SİMGELER ve KISALTMALAR

AA	: Askorbik Asit
AAE	: Askorbik Asit Eşdeğeri
BHA	: Bütilhidroksianisol
BSA	: Sığır Serum Albumin
°C	: Derece Celcius
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPPH	: 1,1-difenil 2-pikril hidrazil
EB	: Etidyum Bromür
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EU	: Avrupa Birliği
FAO	: Food and Agriculture Organization (Gıda ve Tarım Örgütü)
FRAP	: Demir (III) İndirgeme Antioksidan Kapasitesi
g	: Gram
GA	: Gallik Asit
GAE	: Gallik Asit Eşdeğeri
HMF	: Hidroksimetilfurfural
kg	: Kilogram
mL	: Mililitre
PG	: Pirogallol
pNPG	: 4-Nitrophenyl beta-D-glucopyranoside

QT	:	Kuersetin
QTE	:	Kuersetin Eşdeğeri
RNT	:	Reaktif Nitrojen Türleri
ROT	:	Reaktif Oksijen Türleri
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
SOD	:	Süperoksit dismutaz
TAE	:	Tris-Asetik Asit-EDTA
TE	:	Troloks Eşdeğeri
TGK	:	Türk Gıda Kondeksi
TPTZ	:	2,4,6-Tris (2-Piridil)-S-triazin
TÜİK	:	Türk İstatistik Kurumu
Ü	:	Ünite
WHO	:	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

1.GİRİŞ

Asırlar boyunca insanoğlu için önemli bir besin kaynağı olan bal Türk Gıda Kodeksi (TGK) tarafından bitki nektarlarının, bitkilerin canlı kısımlarının salgılarının veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşıyan bitki emici böceklerin salgılarının bal arısı *Apis mellifera* tarafından toplandıktan sonra kendine özgü maddelerle birleştirerek değişikliğe uğrattığı, su içeriğini düşürdüğü ve petekte depolayarak olgunlaştırdığı doğal tatlı ürün olarak tanımlanmıştır (Codex Alimentarius, 2001).

Balın içeriği ve kalitesi, arıların bulunduğu bölgenin bitki örtüsü, bu bitki örtüsünden aldıkları nektar tipi ve miktarı, coğrafik konumu, yükseltisi, ısı değişimleri ve arı kaynaklarının saflığı gibi birçok özelliğe bağlıdır. Ancak yapılan araştırmalar göstermiştir ki insan sağlığı açısından fonksiyonel özelliklere sahip olan balın nektar kaynağı büyük ölçüde çiçeğe bağlıdır (Effem, 1988) ve balın kalitesi esas olarak, bitkisel kaynağı ve kimyasal bileşimi ile değerlendirilmektedir. Böylelikle, farklı bölgelerde üretilen ve farklı bitkisel orijinli balların bileşimi farklıdır (Yıldırım, 2013).

Piyasada saf balların yanında oldukça fazla tağşış edilmiş bal bulunmaktadır. Taklit ve tağşış uluslararası pazarların ve küresel rekabetin açılmasından kaynaklanan ve giderek artan bir olaydır. Bunun başlıca nedeni kolay kazanç sağlanmasıdır. Yasal olmayan bu olaya endüstrinin de göz yumduğu bilinmektedir. Günümüzde, bu sahteciliği sınırlamak ve risklerini azaltmak için gıdaların uygun yöntemlerle etkili bir şekilde kontrol edilmesi zorunludur (Cotte ve ark., 2003). Sanayileşme, tarımda pestisitlerin yaygın kullanımı, meraların tahrip edilmesi ve iklim değişiklikleri, doğal florada önemli zararlara yol açmaktadır. Bu nedenle üreticiler, özellikle ana nektar akımı dönemlerinde doğal floradan yeteri kadar bal alamadıkları durumlarda arılara şeker şurubu vererek bal üretmektedirler (Karkacier ve ark., 2000). Bunun yanı sıra piyasada, farklı çeşitteki balların karıştırılmasından kaynaklanan orijinal adının özelliklerini taşımayan, şeker şuruplarına aroma veya boya ilave edilen ve doğal ballara çeşitli şeker şurupları, su, nişasta gibi maddeler katılmak suretiyle elde edilen ballar bulunmaktadır. Baldaki tağşışın saptanması için bal tiplerinin doğal bileşimlerinin çok iyi tespit edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla; balın bitkisel kaynağının belirlenmesi için polen analizi yapılırken, gerçeklik kontrolü için

kimyasal özellikleri belirlenmektedir (Çınar Bilgen, 2010; Sunay ve ark., 2003; Cotte ve ark., 2003).

Türkiye zengin bitki örtüsü, uygun ekolojisi ve koloni varlığı açısından arıcılıkta önemli bir yere sahiptir. Ülkemizde arıcılık, arılı kovan sayısı bakımından son yıllarda büyük artışlar göstererek dünya sıralamasında üst noktalara gelmiştir (Çınar Bilgen, 2010). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), Türkiye'nin bal haritasına göre 2014 yılı içinde bal üretiminde ilk sırada Muğla, son sırada ise Kilis olmak üzere ülke genelinde 103 bin 539 ton balın üretildiğine ilişkin raporunu sunmuştur. TÜİK verilerine göre, 2014 yılında en fazla bal üretilen iller 15 bin 282, 15 bin 39 ve 9 bin 715 ton ile sırasıyla Muğla, Ordu ve Adana'dır. 2014 yılı verilerine göre en az bal üretimi 14 ton ile Kilis'te gerçekleşmiştir (Anonim, 2015).



Şekil 1.1. TÜİK 2014 yılı verilerine göre iller bazında bal üretimi (kg) dağılımı tematik haritası (Arslanalp, 2015)

Çeşitli çalışmalar, farklı ülkelerden farklı tip balların biyolojik olarak aktif, farklı tür bileşiklerin konsantrasyonuna bağlı olarak antioksidan kapasiteye sahip olduklarını ortaya koymuşlardır (Mariod ve ark., 2009; Vit ve ark., 2009). Antioksidan aktivite flora kaynağına bağlı olduğu kadar mevsimsel ve çevresel faktörlere de bağlıdır. İşleme de balın bileşimini ve antioksidan aktivitesini etkileyebilir. Çok zengin bitki florasına sahip olan ülkemizde değişik türde ballar üretilmektedir. Bu ballardan tek

floralı bal olarak üretilen kestane balları diğer çiçek ballarına göre antioksidan yönden oldukça zengin içeriğe sahiptir (Gürel, 2012).

Bu bilgiler ışığında bu tez çalışması kapsamında kestane üretiminin yaygın olduğu Karadeniz Bölgesi illerinden temin edilen 49 adet kestane balı numunesinin antioksidan aktivitelerini ortaya koyabilmek amacıyla toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriğinin saptanması, toplam antioksidan aktivitesinin tespit edilmesi ve 1,1-difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikalini süpürme aktivitesi ile Fe^{3+} indirgeme antioksidan kuvvveti (FRAP) ve hidroksil radikali tarafından indüklenen DNA hasarını önleyebilme etkinliklerinin belirlenmesini içeren testler yanında, diğer biyokimyasal özelliklerini ortaya koyabilmek için bal numunelerinin protein ve prolin miktarlarının saptanması ve katalaz, diastaz ve invertaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi işlemleri gerçekleştirilmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR (veya GENEL BİLGİLER)

2.1. Balın Tanımı ve Kestane Balı

Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne göre bal; bitki nektarlarının, bitkilerin canlı kısımlarının salgılarının veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin salgılarının bal arısı *Apis mellifera* tarafından toplandıktan sonra kendine özgü maddelerle birleştirilerek değişikliğe uğrattığı, su içeriğini düşürdüğü ve petekte depolayarak olgunlaştırdığı doğal ürün olarak tanımlanmıştır (Anonim, 2005).

Ballar arıların kullandığı kaynağa göre çiçek ve salgı balı olarak sınıflandırılır (Yıldırım, 2013). Ihlamur, meşe, erik ve çam ağaçları gibi bitkilerin yapraklarının sızdırdıkları şekerli sıvı ile yaprak bitkileri, kırmızı böceği ve bazı ufak böceklerin yaprak üzerine salgıladıkları tatlı sıvıdan meydana gelen bala salgı balı, çiçeklerin bal özlükleri tarafından salgılanan nektar (balözü) dan meydana gelen bala da çiçek balı denilmektedir (Keskin, 1982). Ayrıca balların orman gülü ve datura gibi bitkilerden aldıkları zehirli maddelerden meydana getirdikleri bala ise zehirli bal (deli bal) denilmektedir (Şenocak, 1971; Yılmaz, 1994). Üretim veya pazara sunuş şekline göre ise, petekli bal, süzme bal, petekli süzme bal, sızma bal, pres balı ve filtre edilmiş bal gibi sınıflardan söz edilmektedir. Bunların dışında kalan ve kendine özgü doğal koku ve tada sahip olmayan veya fermantasyon başlamış veya fermente olmuş veya yüksek sıcaklıkta işlem görmüş, endüstriyel amaçlı kullanıma uygun veya diğer gıda maddelerinin üretiminde bileşen olarak kullanmaya uygun bala da "fırıncılık balı" denilmektedir (Anonim, 2005; Çınar Bilgen, 2010).

1960'lı yıllara kadar bazı Avrupa'lı arı yetiştiricileri salgıların böceklerden geldiğine inanmasa da, 1696 yılında Van Leeuwenhoek salgıların böcekler tarafından üretildiğini belirtmiş, 1829'da ise Ehrenfels salgıların bitkilerden kaynaklandığını düşünmüştür. Daha sonra salgıların böceklerden kaynaklandığı Stern (1841), Stoehr (1842), Noerdlinger (1854) ve Buechen (1891) tarafından da belirtilmiştir (Pechhacker, 2008; Çınar Bilgen, 2010).

Çiçek ballarından biri olan kestane balı, Fagaceae familyasının *Castanea* cinsine ait ağaçlardan elde edilmektedir. Kestane ağacının bilinen 13 türü genellikle kuzey yarım kürenin değişik bölgelerine yayılmıştır. Türkiye'de Karadeniz, Marmara ve Ege Bölgelerinin ormanlık alanlarında *Castanea sativa* Mill. türü doğal olarak

yetişmektedir (Subaşı, 2004; Özkarakaş, 2008). Kestane ağacı arılar için yaz aylarının başında nektar ve polen için en iyi kaynaklardan biridir (Yang ve ark., 2012). Haziran ayının başından itibaren kestane çiçeklerine çalışmaya başlayan arılar tüm güçlerini ortaya koyarlar. Asıl bal akımı budur. Geceleri de kovan önlerinde kanat çırparak taşıdıkları balı olgunlaştırırlar. Gece sessizliğinde uğultu arılıktan gelmektedir. Ortaya çıkan kestane balı koyu renkli, ağır ağır akan, tatlı sert bir bal olur. Tadına alışanların devamlı aradıkları bir mucize olarak ortaya çıkmıştır (Gürel, 2012).

Kestane balı en lezzetli ve yüksek kaliteli ballardan biri olmasının yanı sıra (Castro-Vázquez ve ark., 2010) diğer ballara oranla iç piyasada çok kısa sürede alıcı bulabilmektedir. Ayrıca, kestane balı yüksek fruktoz ve düşük glukoz içeriği sayesinde, yüksek glukoz içeriğine sahip olan bu nedenle hızlı kristalleşen ayçiçeği balının aksine sıvı halde daha uzun süre kalabilmektedir (Persano-Oddo ve Piro, 2004). Kestane balının astım ve solunum hastalıkları için iyi bir etnik tedavi edici olduğuna inanılmaktadır (Orhan ve ark., 2003). B ve C vitaminleri açısından zengin olan kestane balı kasları kuvvetlendirici, kan dolaşımını düzenleyici, mide ve karaciğer yorgunluğunu giderici, bağışıklık sistemini güçlendirici etki yapar. Özellikle tadı, rengi ve aromasından dolayı diğer ballardan daha kolay ayırt edilebilmektedir (Kolaylı ve ark., 2006). Bütün koyu renkli ballar gibi antioksidan olması sebebiyle kansere karşı koruyucudur. Araştırmalarda antibiyotik özelliğiyle Beta Hemolotik streptococ'lara karşı etkili olduğu tespit edilmiştir (Gürel, 2012). Koku ve aromasına göre kestane balları kompleks bir aroma tanımını ile odunsu, kimyasal, çürümüş ve bitkisel olacak şekilde kokulu ve aromalı ürünlerdir. Kestane balı acı tadı ve ağızda kalan lezzeti ile bilinmektedir (Yang ve ark., 2012).

2.2. Balın Tarihiçesi

Arıların dünyamızda milyonlarca yıldır, geniş düzlüklerin bitki örtüsüyle kaplanmaya başladığı üçüncü jeolojik çağdan beri görüldüğü belirtilmektedir. Çok eski çağlarda insanların ağaç ve kayalarda yuvalanan oğul arıları öldürerek, bunların ballarından yararlandıkları bilinmektedir (Sarıöz, 2010). Ama insanoğlunun balıdan ciddi olarak faydalanabilmesi için uzun bir süre geçmiştir. İlk olarak ticari anlamda bal toplayıcılığının başlamasının ancak M.. 7000 dolaylarına denk geldiği,

Valensia'daki LaAranas Mağarasındaki duvar resimlerinden anlaşılmaktadır. İnsanların yerleşik hayat düzenine geçip, çiftçilikle uğraşmaya başlaması ile birlikte çok zor şartlarda topladıkları balı üretme isteği ile kovan yapımı başlamıştır. Bunlar yöresel yaşayışa göre içi oyulmuş ağaç kütükleri, saz ve samandan örme sepet şeklinde veya killi topraktan yapılmış özel çömlükler olarak ağaçlara asmak sureti ile M.Ö. 6000 dolaylarında bugünkü arıcılığın öncülüğünü oluşturmuşlardır. Zamanla birçok toplumda sadece şeker ihtiyacı dışında sağlık, güzellik ve zenginlik kaynağı olarak görülen balın yüceltilmesi ile ilgili en güzel örnekler M.Ö. 3200 dolaylarında eski Mısır hierogliflerinde rastlanmaktadır. Bu yapılarda arı sembolü firavunları temsil ederken, bal Güneş Tanrısı Ra'nın "dünyadaki gözyaşları" olarak görülmektedir. Bal bu kadar çok sevildiğinden, memurlar sürekli, Suriye ve Yunanistan'dan bal getirmek zorunda kalmışlardır. II. Ramses dönemindeki memurların maaşlarının bir kısmı bal ile ödenmiştir ve bal çok değerli bir para birimi olarak kullanılmıştır. Bir kavanoz bal karşılığında bir eşek veya inek alınabilmekteymiş (Anonim, 2015).

Balın tek başına tüketilmesinin yanında başka yiyeceklerin hazırlanmasında kullanıldığı ve hastalıkları tedavi edici özelliğinden faydalandığı anlaşılmış olup (Sarıöz, 2010) arıcılıkta ekonomik değeri bulunan arı sütü, propolis, polen, bal mumu ve arı zehiri gibi diğer ürünlerin üretimi ve bu ürünler üzerine tedavi amaçlı olarak tıp dünyasında apiterapi adı altında çalışmalar yapılmaktadır (Öztürk, 2001; Parlakay ve ark., 2008; Sarıöz, 2010; Kartal, 2012). Ayrıca gıda endüstrisinde geniş bir uygulama alanı vardır (Güler, 2005).

2.3. Dünya'da Arıcılık ve Bal Üretimi

Günümüzde arıcılık, bütün dünyada yapılan en yaygın ve önemli miktarda ekonomik değeri bulunan, doğa ve çevreye zarar vermeden yapılabilen ender bir tarımsal faaliyettir. Bugün dünyada 65 milyon koloni ile 1.5 milyon ton bal üretimi yapılmaktadır (Kayral, 2015).

Dünyada en önemli bal üreticisi ülkeler Çin, Arjantin, Türkiye, Ukrayna, ABD, Meksika ve Rusya'dır (Gökdemir, 2014). En çok bal ithal eden ülkeler ise, Almanya, ABD, Japonya, İngiltere, İtalya, İsviçre, Fransa, Avusturya ve diğer Avrupa ülkeleridir (Arslanalp, 2015).

Balın yanında; arı sütü, propolis, polen ve balmumu gibi arı ürünlerinin de dünya ticaretinde yer aldığı görülmektedir (Öztürk, 2001; Usal, 2007; Kartal, 2012). Diğer yandan tarımı gelişmiş ülkelerde arıcılık, arı ürünleri üretiminin yanında, bitkisel üretimde miktar ve kalitenin artırılması amacıyla da yapılmaktadır (Anonim, 2013).

Çizelge 2.1. FAO 2011 verilerine göre Dünya bal üreticileri sıralaması (Anonim, 2013)

Ülkeler	Üretim Miktarı (ton)
Çin	446.089
Türkiye	94.245
Ukrayna	70.300
ABD	67.000
Rusya	60.010
Hindistan	60.000
Arjantin	59.000
Meksika	57.783
Etiyopya	53.675
İran	47.00

2.4. Türkiye’de Arıcılık ve Bal Üretimi

Türkiye’de arıcılık geçmişten bu yana geleneksel olarak yapılan sosyo-ekonomik tarımsal bir faaliyettir. Türkiye’nin ekolojik ve sosyo-ekonomik yapısı gereği, tüm bölgelerinde arıcılık yapılabilirken sırasıyla Ege, Karadeniz ve Akdeniz Bölgeleri üretim ve kovan yönünden en zengin bölgelerimizdir. Türkiye bal üretiminin yaklaşık yarısı bu üç bölgemizden sağlanmaktadır. Bal üretiminde ilk on ilimiz; Muğla, Ordu, Adana, Aydın, Sivas, Antalya, İzmir, İçel, Erzincan ve Samsun olarak sıralanmaktadır (Öztürk, 2001).

Türkiye yılda 94.245 ton bal üretimi ve 6.01 milyon koloni varlığıyla Çin’den sonra dünya ikincisi olmasına rağmen ülkemizde arıcılık yeterince verimli değildir, ülkemizde kovan başına bal verimi ortalama 15.68 kg’dır (GTHB, 2012). Bu değer Çin’de 46.4 kg iken Dünya ortalaması 23.5 kg’dır (MTO, 2012). Türkiye yıllık olarak ürettiği balın yaklaşık 87.000 tonunu iç pazarda tüketmektedir. Buna rağmen

kişi başına bal tüketimi sadece 1200 gr kadardır (Çizelge 2.2). Bu yönüyle düşünüldüğünde ülke iç pazarının oldukça yüksek bir pazar potansiyeline sahip olduğu görülmektedir (Anonim, 2013).

Çizelge 2.2. Türkiye’ye ait arıcılık verilerinin yıllara göre dağılımı (Anonim, 2011; Kartal, 2012; Anonim, 2013)

Yıl	Arılı Kovan (adet)	Bal Üretimi (ton)	Bal Verimi (kg/kovan)	Balmumu (ton)	Kişi Başına Düşen Bal Tüketimi (kg/kişi)
2002	4.160.892	74.554	18	3.448	1.1
2003	4.288.853	69.540	16	3.130	1.0
2004	4.399.725	73.929	17	3.471	1.1
2005	4.590.013	82.336	18	4.178	1.2
2006	4.851.683	83.842	17	3.484	1.2
2007	4.825.596	73.935	15	3.837	1.0
2008	4.886.316	81.364	17	4.539	1.1
2009	5.339.224	82.003	15	4.385	1.1
2010	5.602.669	81.115	15	4.148	1.1
2011	5.862.312	94.245	16	4.235	1.1
2012	6.191.232	89.162	15	4.222	1.1

Türkiye, 2013 yılı TÜİK verilerine göre 6.641.000 adet toplam kovana sahip olup, %20’si Ege, %17’si Akdeniz, %14’ü Doğu Karadeniz ve %9.6’sı Ortadoğu Anadolu Bölgesi’nde bulunmaktadır. Bal üretiminin ise %21’i Ege, %18’i Doğu Karadeniz, %19’u Akdeniz ve %7’si Ortadoğu Anadolu Bölgesi’nden sağlanmaktadır. Ege ve Karadeniz Bölgeleri gerek koloni varlığı gerekse bal üretimi açısından diğer bölgelere oranla daha stratejik bir öneme sahiptir. Bu iki bölge kestane üretiminde de benzer bir misyon yüklenmiştir. 2012 yılı TÜİK verilerine göre 57.881 ton kestane üretiminin % 59.1’i Ege Bölgesi’nde, % 31.45’i Karadeniz Bölgesi’nde, %9.25’i Marmara Bölgesi’nde ve geriye kalan % 0.20’lik dilim ise Akdeniz ve Doğu Anadolu Bölgesi’nden sağlanmaktadır (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Kestane üretimi yapılan illerimizin meyve veren ağaç sayısı, ağaç başına ortalama verim ve üretim miktarları (TÜİK, 2013)

	Üretim (ton)	Ağaç başına ortalama verim (kg)	Meyve veren ağaç sayısı (adet)
İzmir	9.617	28	342.675
Aydın	19.782	31	629.809
Denizli	1.545	24	63.625
Muğla	46	53	875
Manisa	2.573	45	57.700
Afyon	86	48	1.800
Kütahya	558	16	34.550
Ege Bölgesi	34.207	30.24	1.131.034
Tokat	2	14	140
Düzce	563	33	16.907
Kastamonu	6.836	42	162.505
Zonguldak	1.206	24	49.585
Bartın	2.865	34	85.020
Sinop	4.240	28	151.800
Samsun	464	18	26.050
Trabzon	100	24	4.087
Ordu	861	22	38.850
Giresun	328	7	44.650
Rize	469	13	36.595
Artvin	272	21	12.950
Karadeniz Bölgesi	18.236	28.98	629.139
İstanbul	50	10	5.000
Balıkesir	1.354	30	45.813
Çanakkale	740	29	25.620
Bursa	1.702	31	54.170
Kocaeli	300	32	9.495
Sakarya	69	27	2.600
Yalova	1.138	33	34.040
Marmara Bölgesi	5.353	30.28	176.738
Bitlis	14	20	700
Antalya	73	90	810
Isparta	28	41	680
Diğer	115	52.11	2.190

Kestane dışında ülkemizde akasya, çam, köknar, ladin, ıhlamur gibi bal veren meyve ağaçları, kekik, geven gibi mera bitkileri ve ayçiçeği, pamuk, narenciye, pürem,

korunga, yabancı çilek türleri bulunmaktadır. Dünya'daki bal verimi yüksek olan bitkilerden 3000'i endemik tür olmak üzere 12.000 çeşidi ülkemizde bulunmaktadır. Bu yönüyle üretilecek arı ürünlerinin çeşit ve kalitesi rekabet üstünlüğü sağlamaktadır (Çakal, 2013).

2.5. Karadeniz Bölgesinde Bal Üretimi

Karadeniz Bölgesi sahilden 3376 m yükseltiye kadar değişen yükselti farklılığı, dağların denize paralel uzanması, kuzey sınırı Karadeniz'in oluşturması, çok sayıda dereleri, irili ufaklı gölleri, toprak ve iklim özellikleri nedeniyle çeşitli ekolojik birimleri bünyesinde barındırdığından zengin bir flora ve vejetasyona sahiptir. Bölgede doğal olarak yetiştiği bildirilen 2239 bitki taksonundan 514'ünün endemik olma olasılığından söz edilmektedir (Anşin, 1980).

2014 yılında Doğu Karadeniz'de bal üretimi bir önceki yıla göre yüzde 12.6 oranında artarak 19 bin 794 ton olmuştur. Aynı süre içerisinde Trabzon, Giresun, Rize ve Artvin'de sırasıyla %9.9, 6.8, 12.8 ve 4.6 oranında azalma ile birlikte 1007, 1253, 692 ve 850 ton bal üretilmiştir. Ordu, Karadeniz Bölgesi'nde bal üretiminde ilk sırada yer alırken aynı zamanda Muğla'dan sonra Türkiye'de en fazla bal üretiminin gerçekleştiği 2. ildir (Anonim, 2013).

2.6. Balın Bileşimi ve Kimyasal Yapısı

Balın yaklaşık olarak % 80'i değişik yapıdaki şekerlerden, %17'si sudan meydana gelmektedir. Geriye kalan %3'lük kısmı ise başta enzimler olmak üzere, bala bal özelliği kazandıran ve balı değerli kılan maddelerden oluşmaktadır (Korkmaz, 2006). Ayrıca % 0.3 oranında protein ihtiva etmekte olup bunun yanı sıra potasyum, kalsiyum, magnezyum, alüminyum, fosfor, silisyum, demir, bakır, kobalt, nikel ve krom gibi mineral maddeleri de içermektedir (Yıldırım, 2013).

Gelişen teknoloji sayesinde balların nitelikleri detaylı bir biçimde belirlenmektedir (Güler, 2005) Balın kimyasal bileşimi ve özellikleri arıların ziyaret ettiği bitkilere, dolaylı olarak toprağa ve iklim koşullarına da bağlıdır (Perez ve ark., 2008). Bu nedenle piyasaya sunulan balların kalitesi Anupama ve ark. (2003)'na göre coğrafik bölgeye, iklim koşullarına, nektar kaynağına, uygulanan prosese, ambalajlama

teknikğine ve depolama süresine bağılı olarak farklılık göstermektedir (Çınar Bilgen, 2010).

Balın tanımlanmasında kullanılan başlıca kimyasal özellikler; nem içeriğı, pH değeri ve asitlik, kül içeriğı ve mineral madde profili, protein ve prolin miktarı, karbon izotop oranı, enzim aktivitesi, hidroksi metil furfural (HMF) içeriğı ve antioksidan aktivitesidir (Çınar Bilgen, 2010).

Farklı çalışmalarda çeşitli bal örnekleri üzerinde yapılan incelemeler sonucunda belirlenen bal bileşimleri çizelge 2.4’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.4. Farklı çalışma sonuçlarına göre balın genel bileşiminin değışimi (Bulut, 2007; Bakan, 2009; Yıldırım, 2013)

Bileşen (%)	White (2003)	Ötleş (1995)	Şahinler ve ark., (2001)	Bentabol Manzanares ve ark.,(2014)	Değişim sınırları (Min-mak)
Nem	17.2	17.2	17.2	16.38	12.2 – 22.9
Diastaz Sayısı ¹	20.8	20.8	-	14.5	2.1 – 61.2
Glukoz	30.3	30.3	-	30.22	22.9 – 40.8
Sakkaroz	1.3	1.3	-	1.43	0.3 – 7.6
Yüksek şekerler	1.4	1.4	-	-	0.1 – 3.9
Serbest asit (Glukonik)	0.43	0.43	-	-	-
Toplam asit (Glukonik)	0.57	0.50	0.57	-	0.17 – 1.17
Kül	0.169	0.169	0.17	-	0.02 – 1.03
Azot	0.041	0.041	-	-	-
Maltoz ²	7.3	7.3	-	5.54	3.3 – 18.2
Fruktoz	38.4	38.4	-	38.43	30.9 – 44.3
Ph	3.91	3.91	-	4.71	0.13 – 8.49

¹:Diastaz sayısı: 1 g bal içindeki enzimin 40°C’de hidrolize edebildiğı %1 nişasta çözeltisinin mL olarak miktarıdır (AOAC, 1995).

²:İndirgen disakkaritler maltoz olarak hesaplanmıştır.

2.6.1. Baldaki Şekerler

Şekerler balların kuru maddesinin %95-%99'unu oluşturan ana bileşenlerdir. Bu oranın büyük miktarı fruktoz ve glukoz monosakkaritlerine aittir. Balda bulunan diğer şekerlerin dağılımı şu şekildedir:

Disakkaritler: Sakkaroz, maltoz, izomaltoz, tiranoz

Yüksek Şekerler: Maltotrioz, izomaltosil glukoz, izomaltosilpentaoz, 1-ketoz, melizitoz, erloz, panoz, izomaltosil trioz, theandroz, sentoz, izopanoz, izomaltosil tetroz, ve rafinoz'dur (Yıldırım, 2013).

Bu şekerlerin bir kısmı nektarda bulunurken büyük bir kısmı ise nektarda bulunmaz. Bu şekerler balın olgunlaşması ve depolanması gibi aşamalarda enzimler ve asitlerin etkisiyle meydana gelmektedir (White, 1979, 2003;Yıldırım,2013).

Bal, TGK Şeker Tebliği'nde belirtilen bazı tür şekerleri içermemelidir. Tebliğe göre bu şekerler; beyaz şeker, yarı beyaz şeker, rafine şeker, şeker ve invert şeker çözültisi, invert şeker şurubu, glukoz şurubu veya glukoz-fruktoz şurubu veya fruktoz-glukoz şurubu (ve bunların kurutulmuş formları), pudra şekeri, dekstroz veya dekstroz monohidrat ve fruktoz (saflaştırılmış ve kristallendirilmiş D-fruktoz) dur (Anonim, 2005; Anonim, 2006; Kartal, 2012).

Baldaki şeker kompozisyonu balın gerçekliği konusunda önemli bir indikatördür. Ballarda az miktarda bulunan disakkaritler ve trisakkaritler çiçek ve salgı ballarını karakterize etmektedirler. Şeker oranlarından özellikle fruktoz/glukoz, maltoz/isomaltoz, maltoz/turanoz, sakkaroz/turanoz oranları balın gerçekliğinin ispatlanmasında kullanılan bazı parametrelerdir (Hışıl ve Börekçioğlu, 1986; Anklam, 1998; Kaskoniene ve ark., 2010; Kartal,2012).

2.6.2. Baldaki Enzimler

Balda bulunan enzimlerin bir kısmı bitkilerin oluşturmuş oldukları bitki enzimleri olmasına rağmen büyük bir kısmı arılar tarafından bala ilave edilmektedir (Yıldırım, 2013; White, 2003). İnvertz baldaki en aktif enzimdir. Baldaki sakkaroz, invertz enzimi yardımıyla daha basit şekerlere (fruktoz+glukoz) yani invert şekerlere dönüştürülmektedir. İnvertz genellikle arı tarafından bala ilave edilen bir enzimdir ancak çok az miktarda bitki kaynaklı da olabilmektedir (Kartal, 2012; Hışıl ve

Börekçioğlu, 1986; Yeygel ve Kara, 2007). Baldaki sakkaroz enziminin izole edilip sakkarozu etkilediğinde pek çok oligosakkaritler oluşturduğu görülmüştür. Bu enzimin aktivitesi devam ettirildiği zaman bütün bu şekerler glukoz ve fruktoza kadar ayrışabilmektedir. Isı ile zarar görmediği takdirde baldaki invertaz enzimi aktivitesini ekstraksiyondan sonra da sürdürmeye ve sakkarozu parçalamaya devam eder (White, 1979, 2003; Yıldırım, 2013).

Çizelge 2.5. Farklı çalışma sonuçlarına göre balın şeker kompozisyonu (Lazaridou ve ark., 2003; Yıldırım,2013)

Karbohidratlar (%)	White ve ark., (1962)	Lazaridou ve ark., (2003)	Yanniotis ve ark., (2006)	Habib ve ark.,(2014)
Fruktoz	38.2	22.1- 41.3	29.9- 44.1	32.26-42.42
Glukoz	31.3	13.5- 36.3	20.1- 34.9	27.78-32.35
Sakkaroz	1.3	0.2-2.7	0.3- 0.8	0.56-1.66
Maltoz	7.3	1.9-6.7	2.7- 4.0	0.31-2.09
Melezitoz	-	9.1- 14.4	0.3	-
Raffinoz	-	0.2- 1.0	1.7	0.0010-0.0079

Arı tarafından nektara ilave edilen bir başka enzim diastaz enzimidir. Nektarlar nişasta içermediğinden dolayı bu enzimin fonksiyonu tam anlamıyla bilinmemektedir (White, 2003). Arıların diastaz enzimini polen taneciklerinde bulunan nişastayı sindirmek için kullandıkları düşünülmektedir (White,1979). Bu enzimde diğer enzimler gibi ısıdan etkilenmekte yüksek sıcaklıklarda inaktive olmaktadır (White, 1975; Yıldırım, 2013). Bu enzimin diastaz aktivitesi bulunan iki farklı formu bulunur. Bunlar α -amilaz ve β -amilazdır. α -amilaz nişasta moleküllerinin iç kısımlarındaki α -1,4- glukozidik bağlarını parçalarken, β -amilaz nişastayı indirgen olmayan uç kısımlarından maltoz şekerlerini ayıracak şekilde α -1,4- glukozidik bağları üzerinden parçalar. Bu şekilde nişastanın iyotla verdiği renk azalır. Ballarda diastaz tayini de bu esasa dayanılarak yapılmaktadır. (Saldamlı, 1998; Yeygel ve Kara, 2007; Tosi ve ark., 2008; Kartal, 2012).

Önemli bal enzimlerinden olan ve arıların yutak üstü salgı bezlerinden salgılanan glukoz oksidaz enzimi ise glukoz üzerine etki ederek balın içerisinde bala antibakteriyel özellik kazandıran hidrojen peroksit ve glukonik asit oluşturmaktadır. Reaksiyon sonucunda meydana gelen hidrojen peroksit, olgunlaşan nektarın mikroorganizmalar tarafından bozulmasına engel olurken yine bu enzimin aktivitesi sonucu meydana gelen asitli ortam nektarın fermente olmasını engeller (White, 2003). Glukoz oksidaz enzimi akışkanlığı fazla olan veya olgunlaşmamış ballarda aktiftir ve şeker konsantrasyonu %23-30 iken en aktif durumdadır (Crane, 1990). Tam olgunlaşmış ballarda glukoz oksidaz enziminin aktivitesi yok denecek kadar azdır (White, 2003; Yıldırım, 2013).

Bazı araştırmalarda balda katalaz enziminin de bulunduğu rapor edilmiştir. Katalaz enzimi glukoz oksidaz aktivitesini düzenleyerek hidrojen peroksit dengesini sağlar. Ayrıca organik fosfatlardan fosfatları uzaklaştıran bir asit fosfataz enzimine de rastlanıldığı bildirilmiştir (Crane, 1990; White, 2003; Yıldırım, 2013).

İnvertaz, glukoz oksidaz ve amilaz (diastaz) enzimlerinin kaynağı işçi arıların salgılarıdır. Bir miktar amilaz enzimin bitki kaynaklı olduğu bilinmektedir. Katalaz ve asit fosfataz enzimleri ise tamamen bitki kaynaklıdır (Crane, 1990; Yıldırım, 2013).

2.6.3. Balın Asitlik ve pH değeri

Bütün ballar asidik karakter göstermekte olup, pH'ları 3.5-5.5 arasında değişmektedir. Kestane ve çam ballarında pH, çiçek ballarına göre karakteristik olarak daha yüksektir. Toplam asitliği baldaki serbest asitlik ve lakton içeriği meydana getirmektedir. (Bogdanov ve ark., 2004; Güler, 2005; Kartal, 2012). Balda düşük pH değeri ise balın antibakteriyel özellik göstermesi üzerinde etkili olmaktadır (Aydın ve ark., 2008; Kartal, 2012). Mikroorganizmaların gelişebilmesi için en iyi pH derecesi, 7.2-7.4 aralığıdır (Yıldırım, 2013).

2.6.4. Baldaki Amino Asitler ve Proteinler

Ballarda azot miktarı %0.04'lük gibi oranlarda çok düşük seviyededir. Balda bulunan serbest amino asitlerin büyük bir kısmını nektarda ve özellikle polenlerde bulunan prolin amino asiti oluşturmaktadır (Kartal, 2012).

Prolin, nektarın bala dönüşmesi sırasında arı tarafından bala katılan tek aminoasittir. Von der Ohe ve ark., (1991)'na göre baldaki prolin miktarı arıya bağlı olan diğer bileşenlerle birlikte, sakkaraz ve glikoz oksidaz aktiviteleri gibi balın olgunluk düzeyini yansıtan bir diğer indikatördür (Hermosin ve ark., 2003). Prolin ayrıca balda gerçeklik kriteri olarak da önemlidir. Amino asitlerinin esas kaynağı polen olduğu için, balın aminoasit profili botanik kaynağının da bir karakteristiğidir (Hermosin ve ark., 2003; Çınar Bilgen, 2010).

Yapılan çeşitli araştırmalarda balın botanik orjinine göre prolinden başka, lisin, glutamik asit, treonin, serin, alanin, valin, glisin, metiyonin, arjinin, triptofan, sistein, aspartik asit, fenilalanin, lösin, histidin gibi amino asitler de tespit edilmiştir (Ulusoy, 2010).

Amino asitlerin; balların polen özellikleri, botanik orjinleri ve olgunlaşma durumları hakkında yardımcı olduğu belirtilmiştir (Hışıl ve Börekçioğlu, 1986; Başoğlu ve ark., 1996; Anklam, 1998; Bogdanov ve ark., 2004; Kartal, 2012).

TGK (Anonim, 2005)'ne göre balda prolin miktarının, en az 180 mg/kg olması gerekmektedir. Hermosin ve ark., (2003) ise balın prolin miktarının 200 mg/kg'dan fazla ve toplam serbest aminoasitlerin en az % 66'sı (genellikle %80-90 arasında) olması gerektiğini belirtmektedir (Çınar Bilgen, 2010).

2.6.5. Baldaki Fenolik Asitler ve Flavonoidler

Fenolik bileşikler; bitkilerde aromatik amino asitlerin metabolizması sonucu sentezlenen yan bileşiklerden oluşan ikincil metabolit ürünleridir ve gıdalara karakteristik renk ve tat özellikleri katarlar. Bu metabolit ürünleri özellikle hidroksibenzoik asit ve hidroksisinamik asitlerin türevlerinden meydana gelmektedir (Kartal, 2012).

Ballarda fenolik bileşikler ve flavonoidler botanik orjin tespitinde indikatör olarak kullanılmaktadır. Örneğin narenciye ballarında karakteristik olarak tespit edilen

flavonoid bileşimi hesperetindir. Ballarda fenolik asit miktarlarının belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, 0.1-10 ppm aralığında tespit edilmiştir. Koyu renkli ballarda fenolik asit ve türevleri, daha açık renkli ballarda ise flavonoidler rapor edilmiştir (Anklam, 1998; Saldamlı, 1998; Bogdanov ve ark., 2004; Kartal, 2012).

Ballarda bulunan başlıca flavonoid bileşikler; trisetin, pinokembrin, pinobanksın, luteolin, kaemferol, hesperetin, mirisetin, genkvanin, kuersetin, izorhamnetin olarak bildirilmiştir. Ballarda bulunan başlıca fenolik bileşikler ise; elajik asit, protokateşik asit, kafeik asit, sirinjik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, metil sirinjik asit, mirisetin, kuersetin, luteolin, apigenin, kamferol, pinokembrin, krisin, akasetin olarak bildirilmiştir (Bogdanov ve ark., 2004; Yeygel ve Kara, 2007; Kartal, 2012).

2.7. Balın Fiziksel Özellikleri

Balın kalite düzeyini tanımlamada kullanılan başlıca fiziksel özellikleri; renk, granülasyon ya da kristalleşme, viskozite, özgül ağırlık ve elektriksel iletkenliktir.

2.7.1. Balın Rengi

Balın renginden sorumlu olan maddeler tam olarak bilinmemekle birlikte balın rengi, elde edildiği bitkisel kaynağa, depolanma süresine ve koşullarına göre su beyazından, koyu kahverengiye kadar değişebilmektedir (Krell, 2001) Bala renk veren başlıca maddeler klorofil, karoten, ksantofildir (Yurtsever ve Sorkun, 2002; Yıldırım, 2013).

Açık renkli balda, suda çözünen renk pigment miktarı, yağda çözünenlerden daha fazladır. Koyu renkli bal da ise durum tamamen tersinedir. Yağda çözünen renk maddeleri karotenoidlerden oluşmaktadır. Ayrıca polenden ekstrakte edilen flavonoidler pigment ve karbonil-amino reaksiyonu sonucunda oluşan melanoidinler de balın rengine katılmaktadır (Ötleş, 1995; Çınar Bilgen, 2010).

Balın depolanması sırasında renk değişikliklerinin hasattaki ilk rengi ve bileşimindeki maddeler ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Örneğin, depolama sırasında rengin koyulaşmasının; Maillard reaksiyonundan, fruktozun karamelizasyonundan ve polifenollerin tepkimelerinden kaynaklandığı belirtilmektedir (Gonzales ve ark. 1999; Çınar Bilgen, 2010).

2.7.2. Balın Viskozitesi

Viskozite balın ihtiva ettiği su oranı ve sıcaklık ile ilgilidir. Koyu renkli yavaş akan bir balın viskozitesi yüksek, açık renkli ve gevşek yapılı ballarda ise viskozite düşüktür (Krell, 1996; Yıldırım, 2013). Viskozitesi yüksek olan balların süzülmesi sırasında petek gözlerinden ayrılması oldukça güçtür. Balın yüksek viskoziteye sahip olması, şeker konsantrasyonu yüksek bir çözelti olmasından kaynaklanmaktadır (Azeredo ve ark., 2003; Çınar Bilgen, 2010).

2.7.3. Balın Higroskopik Özelliği

Bal nem tutucu bir yapıda olup havadan nem alma özelliğine sahiptir. Ayrıca bal nem kaybederek de kristalleşebilir (White, 1980; Yıldırım, 2013). Balların kalite kriterlerinden olan nem içeriği balın olgunluğu ve raf ömrü üzerinde etkilidir. Ballardaki nem içeriği mevsimsel faktörlerden etkilenmekte olup, diğer fiziksel özelliklerinden balın viskozite ve kristalizasyonunu da etkilemektedir (Kartal, 2012). Balda rutubet, refraktometre ile kırılma indisi belirlenerek tayin edilir (Anonim, 2009). Ballarda nem miktarı Abbe refraktometresi ile ölçülmektedir (Hışıl ve Börekçioğlu, 1986; Bogdanov ve ark., 2004; Kartal, 2012).

Ballarda nem miktarının %15 ila %25 ve su aktivitesinin 0.59-0.63 aralığında bulunması, mikroorganizmaların faaliyetini kısıtlayan bir durumdur (Aydın ve ark., 2008). Balın yapısında gereğinden fazla nem olması, maya fermentasyonu, bozulma, tat ve aroma kaybı gibi olumsuzluklara neden olmaktadır (Güler, 2005; Kartal, 2012).

2.7.4. Balın Tadı ve Kokusu

Balın tat ve koku özellikleri elde edildiği bitki türüne göre doğrudan etkilenmektedir. Balın tadı; içerdiği şeker miktarı, şeker türü ve şekerlerin birbirlerine oranlarına göre oluşur. Balın tatlı bir besin olmasını yapısındaki fruktoz, glukoz, glukonik asit kombinasyonundan kaynaklanan şekerler sağlamaktadır (Öder, 1981; Güler, 2005). İhlamur, akasya, yonca, kestane, kolza, portakal ve lavanta gibi ballarda bu bitkilere ait karakteristik tat ve koku özellikleri bulunmaktadır (Silici, 2005; Kartal, 2012).

2.7.5 Balda Granülasyon (Kristallenme)

Balın kristalizasyonu ve kristallerin büyüklüğü ısıl işlem uygulanıp uygulanmadığına, sıcaklık dalgalanmasına, su içeriğine ve fruktoz/glukoz oranına bağlıdır (Tosi ve ark., 2002; Çınar Bilgen, 2010).

Ülkemizde balın genellikle yeteri kadar olgunlaşmadan hasat edilmesi çok su içermesine, dolayısıyla erken kristalleşmesine ve fermantasyonuna neden olmaktadır (Tolon, 1999). Kristalizasyon, kristal tanesinin inceliği ve sağlamlığı ile tanımlanır. Isıtılmamış bir bal, genelde doğal olarak içerdiği kristal yapıların sayısına bağlı olarak ince tanelidir. Fermantasyondan ve granülasyondan korunmak için ısıtılan balda daha az fakat daha büyük kristal oluşmaktadır (Ötleş, 1995). Balın granül yapısı ticarete önemli bir kalite kriteridir ve kristalizasyonun birçok dezavantajı vardır. En önemli dezavantajı balın işlenmesindeki ve akışkanlığındaki güçlüktür. Bu nedenle dolun ve ambalajlama makinelerinin verimli çalışması engellenmekte ve ayrıca balın görünüşü de değişmektedir. Tüketicilerin çoğu kristallenmiş baldan hoşlanmamaktadır (Tosi ve ark., 2002; Çınar Bilgen, 2010).

2.8. Serbest Radikaller

Kimyasal bileşikler iki veya daha fazla sayıda elementin kimyasal bağlar ile birbirlerine bağlanması sonucu oluşmaktadır. Meydana gelen bu bileşikler hem kararlı halde hem de sahip olduğu elektronlar çiftleşmiş halde bulunur. Şayet elektron çiftleşmemiş ise bileşik reaktif ve kararsız duruma geçer. Dış orbitallerinde bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektron içeren element veya bileşiklere “serbest radikaller” denir. Serbest radikaller dış orbitallerinde bulunan ortaklanmamış elektronları kararlı hale getirmek için etrafında bulunan moleküllere saldırarak onların elektronlarını çalarlar bunun sonucunda kendileri kararlı duruma geçerken elektronlarını çaldıkları molekülleri serbest radikal haline dönüştürürler. Bu reaksiyonlar bir antioksidan molekül tarafından durduruluncaya kadar zincirleme şeklinde devam eder (Gökpınar ve ark., 2006; Yıldırım, 2013).

2.8.1 Biyolojik Sistemlerde Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest radikaller organizmada hem metabolik faaliyetler sonucu doğal olarak meydana gelmektedir hem de radyasyon, sigara kullanımı, yağlı diyetler, sağlıksız

beslenme, alkol tüketimi, böcek ilaçları, pestisitler, petrokimyasal ürünler, ilaçlar ve diğer zararlı kimyasalların etkisi ile artmaktadır. Metabolik faaliyetler sonucunda oksijenli solunum yapan hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucunda organizmada mutasyonlara neden olabilen süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), süperoksitin süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenmesiyle yani dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksit (H_2O_2), ve moleküler oksijenin üç elektron almasıyla meydana gelen hidroksil (OH^{\cdot}) gibi radikaller meydana gelmektedir (Winston, 1991; Mates ve ark.,1999; Yıldırım, 2013). Solunum reaksiyonları sırasında NADPH oksidaz gibi bazı solunum enzimleri mitokondrinin iç membranlarında Reaktif Oksijen Türleri (ROT)'ni üretirler (Wei ve Pang, 2005). ROT, az üretildiği durumlarda çeşitli stres tepkilerinde arabulucu gibi rol oynarken, yüksek miktarlarda üretildiği zaman (oksidatif stres gibi) organizmada onarılması güç hasarlara neden olmaktadır (Martin ve Barret, 2002; Yıldırım, 2013). Serbest radikaller, ROT, reaktif nitrojen türleri (RNT), karbon merkezli radikaller ve sülfür-merkezli radikalleri içermektedir (Çizelge 2.6). Canlı sistemlerde reaktif nitrojen türleri, özellikle nitrik oksit (NO) ve nitrojen dioksit içermektedir. Nitrik oksitte kendi eşleşmemiş elektronları tarafından bir serbest radikal olan hidroksil radikali ve azotdioksit radikali üretebilir.

Süperoksit radikali oksijenli solunum yapan hücrelerde sık sık oluşmaktadır. Fakat daha çok mitokondrideki enerji üretimi sırasında elektron transfer sistemlerinde elektron sızıntısı sonucu meydana gelir. Bunun yanı sıra enzimatik ve enzimatik olmayan yollarla da meydana gelebilir (Halliwell ve ark., 1992; Yıldırım, 2013). Süperoksit radikali, diğer radikallerle kıyaslandığında daha az zararlı etkiye sahiptir. Bu radikal asıl zararlı etkiyi protonlanarak vermektedir. Protonlanma sonucunda süperoksit radikalinden daha zararlı perhidroksil radikali (HO_2^{\cdot}) meydana gelir. Süperoksit radikali ile perhidroksil radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olurken diğeri indirgenir.

2.8.2. Serbest Radikallerin Etkileri

Organizmada meydana gelen serbest radikallerin yan ürünleri organik moleküllere (DNA, proteinler, lipitler, proteinler) hücrede geri dönüşü olmayan reaksiyonlara neden olabilmektedirler (Kazanç, 1997; Yıldırım, 2013).

2.8.2.1. Serbest Radikallerin Membran Lipidlerine Etkileri

Lipitlerin serbest radikaller tarafından oksidasyonuna lipid peroksidasyonu denilmektedir. Lipid peroksidasyonun substratı doymamış yağ asitleridir (Konukoğlu, 2000; Yıldırım, 2013). Membrandaki çoklu doymamış yağ asitleri serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksitler, alkoller, etan ve pentan gibi peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı oldukça zararlıdır. Çünkü bu yağ asitlerinin peroksidasyonu zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Zincir reaksiyonu şeklinde olan bu lipid peroksidasyonu, yağ asiti zincirindeki metilen karbonundan H atomunun çıkarılması ile başlar. Bunun sonucunda yağ asidi zinciri bir lipid radikali niteliği kazanır. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen hasarlar geri dönüşümsüzdür (Akkuş, 1995). Beyin dokusu doymamış yağ asitlerinden zengin olduğu için serbest radikallerden en çok etkilenen organdır (Konukoğlu, 2000; Yıldırım, 2013).

2.8.2.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Proteinler, lipitlere nazaran serbest radikallerden daha az etkilenirler. Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme dereceleri aminoasit dizilişlerine ve kompozisyonlarına bağlı olarak değişmektedir. Özellikle doymamış bağ ve kükürt ihtiva eden moleküller serbest radikallerle reaksiyona girerler.

Bu nedenle triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitler içeren proteinler serbest radikallerden kolayca etkilenecek sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller oluşmasına neden olurlar.

Serbest radikallerin etkileri sonucu immünglobülin G (IgG) ve albümin gibi fazla sayıda disülfüd bağı bulunduran proteinlerin tersiyer yapıları bozular. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Hemoglobinin prostetik grubu olan “Hem” proteinleri de serbest radikallerden büyük oranda zarar görürler (Akkuş, 1995; Yıldırım, 2013).

Çizelge 2.6. En sık karşılaşılan serbest radikaller ve bazı özellikleri (Halliwell, 1994; Yıldırım, 2013)

Adı	Simgesi	Kimliği
Hidrojen atomu	H [•]	En basit radikal
Süperoksit radikali	O ₂ ^{•-}	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil radikali	OH [•]	En toksik (reaktif) oksijen metaboliti insan vücudundaki tüm moleküllere saldırır.
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂	Reaktivitesi çok düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf
Singlet oksijen	¹ O ₂	Yarılanma ömrü kısa, güçlü oksidatif form
Perhidroksil radikali	HO ₂	Lipidlerde hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu artırmaktadır.
Peroksil radikali	ROO ^{•-}	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipidlere lokalize olma yeteneği
Triklorometil radikali	CCl ₃	CCl ₄ metabolizması ürünü, karaciğerde üretilen bir radikal
Tiyil radikali	RS [•]	Kükürt üzerinde çiftlenmemiş elektron içeren türlerin genel adı
Alkoksil radikali	RO [•]	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti
Azot monoksit	NO [•]	L – argininden <i>in vivo</i> üretilir.
Azot dioksit	NO ₂	NO [•] 'nun O ₂ ile reaksiyonunda oluşur.

Bu nedenle triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitler içeren proteinler serbest radikallerden kolayca etkilenecek şekilde sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller oluşmasına neden olurlar.

Serbest radikallerin etkileri sonucu immünglobülin G (IgG) ve albümin gibi fazla sayıda disülfüd bağı bulunduran proteinlerin tersiyer yapıları bozulur. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Hemoglobinin prostetik grubu olan “Hem” proteinleri de serbest radikallerden büyük oranda zarar görürler (Akkuş, 1995; Yıldırım, 2013).

2.8.2.3. Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere Etkileri

DNA serbest radikallerden kolay etkilenen bir hedefdir. Radyasyon ile hücre içinde meydana gelen serbest radikaller DNA'yı etkileyerek mutasyona ve hücrenin ölümüne yol açabilirler. Sitotoksik etki, nükleik asitleri oluşturan bazların modifikasyonlarından kaynaklanan kromozom değişimlerine veya DNA'da meydana gelen diğer bozukluklara bağlıdır.

Nötrofillerden salınan hidrojen peroksit zarlardan kolayca geçip hücre çekirdeğine kadar ulaşarak burada hidroksil radikaline dönüşür oluşan bu hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek DNA hasarına, hücre modifikasyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Bu yüzden DNA, serbest radikallerden kolay zarar gören önemli bir hedefdir. Süperoksit üretimi ise özellikle mitokondride daha fazla olduğundan mitokondrial DNA daha fazla hasar görür (Akkuş, 1995; Yıldırım, 2013).

2.8.2.4. Serbest Radikallerin Karbohidratlara Etkileri

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucunda hidrojen peroksit, peroksitler ve oksoaldehitler oluşurlar. Monosakkaritlerin yükseltgenmesi ile oluşan çeşitli peroksit türevleri ve oksoaldehitler DNA, RNA, proteinler ve nükleik asitler gibi diğer biyomoleküllere bağlanırlar. Serbest radikaller bu moleküller üzerinde antimitotik etki göstererek, bunların yapısını bozarak hücre yaşlanması veya kanser olaylarına neden olabilirler (Akkuş, 1995; Yıldırım, 2013).

2.9. Antioksidanlar

2.9.1. Antioksidanlar ve Fenolik Bileşikler

Antioksidanlar, serbest radikallerin organizmada zarar veren etkisine karşı hayati bir rol oynamaktadır. Antioksidanların canlı organizmada eksikliği durumunda oksidatif stres ortaya çıkar. Antioksidanlarca zengin doğal ürünler bilim adamları için büyük önem taşır (Amarowicz ve ark., 2010; Chan ve ark., 2013; Craft ve ark., 2010). Balın antioksidan aktivitesi ve toplam fenolik içeriği arasında anlamlı bir ilişki bulunmaktadır ve antioksidan aktivite esas olarak fenolik bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Koyu renkli ballarda bol miktarda bulunan fenolik bileşiklerin,

askorbik asit ya da E vitaminine göre daha güçlü antioksidan olduğu anlaşılmaktadır (Aljadi ve Kamaruddin, 2004; Haroun, 2006; Çınar Bilgen, 2010). Isıl işlem uygulanan ballarda B1, B2 ve C vitaminlerinin parçalanırken katalaz ve peroksidaz enzimlerinin yıkımı ile antioksidan aktivitesi hızla azalmaktadır (Nagai ve ark., 2001).

Balın, yaraların, diyabetik ülserin, mide ülseri ve mide-bağırsak ülseri gibi birçok hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bilinmekte ve balın tedavi edici işlevi antimikrobiyal etkisinden ve antioksidan madde içermesinden kaynaklanmaktadır. Çünkü bu hastalıkların bir kısmının, serbest radikallerin verdiği zarar sonucu ortaya çıktığı bilinmektedir (Aljadi ve Kamaruddin, 2004). Ayrıca endüstride meyve ve sebzelerin işlenmesi sırasında oluşan enzimatik esmerleşmenin olumsuz etkilerini azaltmak için balın doğal antioksidan olarak kullanılabilceğini belirtilmektedir (Chen ve ark., 2000; Perez ve ark., 2008). İspanya'daki salgı ballarının nektar ballarına göre daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği ve salgı balının orjinini belirlemede polifenol içeriğinden yararlanılabileceği belirtilmiştir. Sanz ve ark. (2005)'na göre İspanya ballarında toplam polifenol içeriği ortalama 0.78 mg/kg'dır. Nagai ve ark. (2001)'na göre ise kara buğday balları ve genel olarak koyu renkli ballar, açık renkli ballara göre daha yüksek antioksidan aktivite göstermektedir. Haroun (2006) tarafından çam ballarında belirlenen antioksidan aktivite 20.94-35.87 Askorbik Asit Eşdeğeri (AAE)/100 g arasında bulunmaktadır (Çınar Bilgen, 2010).

Antioksidanlar doğal antioksidanlar ve yapay antioksidanlar olmak üzere iki grupta incelenebilir (Akyüz, 2007; Yıldırım, 2013).

Fenolik bileşikler bitkilerin meyve, yaprak, kök ve kabuk gibi değişik kısımlarında bulunabilirler (Roginsky ve Lissi, 2005) Gıdalardaki fenolik maddeler gıda maddesinin kendine has tadını, renklerin oluşumunu ve değişmesini, antioksidan ve antimikrobiyal etkinliğini, enzim inhibitörü potansiyelini belirlerken saflık kontrol kriteri olarak da önem taşımaktadır (Ekşi ve Karadeniz, 2002; Yıldırım, 2013).

Bitki fenolikleri, basit fenoller, fenolik asitler (benzoik ve sinamik asit türevleri), flavonoidler, kumarinler, stilbenler, hidrolize ve kondense tanenler, lignan ve ligninler ile küçük moleküllü ve çoğunlukla uçucu olan bileşiklerden oluşmaktadır

(Yıldırım, 2013; Naczk ve Shahidi, 2004; Ulusoy, 2010). Bitki fenoliklerinin büyük kısmı flavonoidlerden oluşmaktadır. Flavonoid bileşikler adı altında 8000'den fazla bileşik mevcuttur (Pietta ve Gardana, 2003). Flavonoidlerin güçlü antioksidan özellik göstermelerinin nedenlerinden biri aromatik halka yapılarında bulunan hidroksil grupları sayesinde hidrojen vererek indirgeme reaksiyonlarına girerek serbest radikalleri yok edebilmeleridir. Metal şelatlama kapasitesine sahip yapısal grupları vasıtasıyla OH^- ve $\text{O}_2^{\cdot-}$ gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyebilirler. Flavonoidleri yapılarına bağlı olarak 6 grupta toplamak mümkündür. Bunlar antosiyanidinler, flavanonlar, flavonlar, flavonoller, flavan-3-oller, izoflavonlardır (Cam ve Hışıl, 2003; Yıldırım, 2013).

2.9.2. Antioksidan Savunma Mekanizması

Antioksidanlar başlıca dört yolla oksidanları etkisiz hale getirirler (Gökpınar ve ark., 2006; Yıldırım, 2013).

- i. Süpürme etkisi (Scavenging): Radikalleri daha zayıf moleküllere çevirerek onları etkisizleştirir. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller bu yolla etki eder.
- ii. Söndürme etkisi (Quenching): Antioksidanların radikallere bir hidrojen vererek onları inaktive etmesine denir. Vitaminler, flavanoidler, timetazidin ve mannitol bu şekilde etki eder.
- iii. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking): Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır mineraller radikalleri kendilerine bağlayarak inaktive ederler.
- iv. Onarma etkisi (Repair): Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarırlar.

Mitokondri sahip olduğu sitokrom sistemi sayesinde sitozoldaki organelleri radikallerin zararlı etkilerinden korur. Bu sisteminin yetersiz kaldığı durumlarda süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz, glutatyon transferaz ve glutatyon redüktaz gibi doğal enzimler devreye girer. Doğal enzimlerce etkisiz hale getirilemeyen reaktif maddeler ilk olarak hücre membranındaki lipidlere etki ederek lipid peroksidasyonunu başlatır (Benzer ve Ozan, 2003; Yıldırım, 2013).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bal Örneklerinin Toplanması ve Saklanması

Kestane balı örnekleri, Karadeniz Bölgesi Sinop, Zonguldak, Kastamonu, Trabzon, Rize, Giresun, Bartın, Düzce, Artvin ve Ordu illerinde gezici arıcılık yapmayan arıcılardan Ordu Arıcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü aracılığıyla 2014 yılı Ağustos-Ekim aylarında temin edildi. Temin edilen 49 farklı kestane balı numunesinin yanı sıra çalışma boyunca karşılaştırma yapmak amacıyla birer adet çiçek balı, orman gülü balı ve ticari olarak satın alınan kestane balı bulunmaktadır. Laboratuvara ulaştırılan bal numuneleri analiz edilinceye kadar +4 °C’de muhafaza edildi.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 3.1.’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Model	Firma
Manyetik Karıştırıcı	MS-H-Pro	DragonLab
Spektrofometre	UV-1800	Shimadzu-Corporation
Agaroz DNA Elektroforez	Wide Mini-Sub Cell GT System	Bio-Rad
Güç Kaynağı	PowerPacBasic	BIORAD
Jel Görüntüleme Sistemi		Prizma
Saf Su Cihazı	Arium 61316	Sartorius
Isıtıcı Sallayıcı Kuru Blok	MS-100	Allsheng
Su Banyolu Çalkalayıcı	WNB7-45	Memmert
pH Metre	Starter 2000	Ohaus
Vorteks	SA8	Stuart
Mikrodalga Fırın	MD1610	Beko
Buzdolabı	B9459NMN	Beko
Terazi	AS 220/C/2	Roadwag

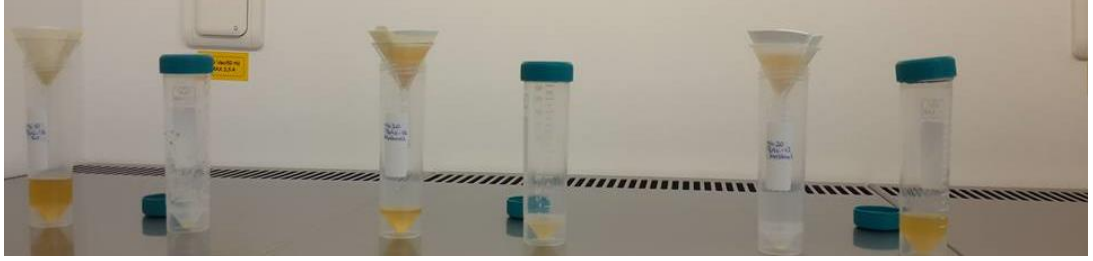
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve çözücüler Sigma-Aldrich, Merck ve Supelco'dan temin edildi.

3.1.4. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

3.1.4.1. Bal Ekstraktlarının Hazırlanması

Bal numunelerinin metanol ve su ekstraktları %50 (w/v)'lik olacak şekilde ayrı ayrı hazırlandı ve Whatman 1 filtre kağıdından süzüldü. Hazırlanan ekstraktlar +4 °C'da saklandı (Serem ve Bester, 2012).



Şekil 3.1. Bal numunelerinin metanol ve su ekstraktlarının hazırlanışı

3.1.4.2. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

Bal Çözeltisi: Daha evvel hazırlanmış olan bal numunelerinin %50'lik su ekstraktları 1:100 oranında seyreltilerek kullanıldı.

10 mM Hidrojen Peroksit Çözeltisi: Yoğunluğu 1.13 g/mL olan %35'lik derişik hidrojen peroksit çözeltisinden 86 µL alınarak su ile karıştırılarak son hacim 100 mL olacak şekilde hazırlandı.

3.1.4.3. Diastaz Aktivitesinde Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

Stok İyot Çözeltisi: 4.4 g potasyum iyodür (KI) tartılarak 100 mL'lik balonda bir miktar destile su ile çözüldü. Üzerine 2.2 g iyot (I₂) ilave edilerek çözünmesi sağlandı. Son hacim 100 mL olacak şekilde balonun işaret çizgisine destile su ilave edildi.

İyot Çözeltisi: 4 g potasyum iyodür (KI) tartılarak bir miktar suda çözüldükten sonra üzerine 400 µL stok iyot çözeltisi eklendi ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı. Bu şekilde hazırlanan iyot çözeltisi hazırlandığı gün kullanılır.

0.1 N NaCl Çözeltisi: 2.9 g sodyum klorür (NaCl), 100 mL'lik ölçülü bir balonda destile su içinde çözüldü.

Asetat Tamponu (pH:5.3): 17.4 g $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$ (sodyum asetat trihidrat) bir miktar saf su içerisinde çözüldükten sonra pH'sı glasiyal asetik asit ile 5.3'e ayarlanıp, hacim destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Bal Numunesi: Her bir bal numunesinden 10 g alınarak, 15 mL su ve 5 mL asetat tamponu ile tamamen çözüldü. 50 mL'lik erlene alınıp, 3 mL NaCl eklendi ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı. NaCl ilavesinden önce bal mutlaka tamponlanmış olmalıdır. Çünkü pH 4'ün altında NaCl diastaz aktivitesini azaltır. Ayrıca balın çözülmesi sırasında herhangi bir ısıtma işlemi yapılmamalıdır.

%2'lik Nişasta Çözeltisi: Bu amaçla 130 °C'da 90 dakika süreyle kurutulmuş olan suda çözünebilir nişastadan 2 g alınarak bir erlen içerisinde yaklaşık 95 mL destile su ile karıştırıldı. Karışım kaynatıldıktan sonra bu noktada 3 dakika süreyle kaynamaya devam ettirildi. Erlenin ağzı kapatılarak, oda sıcaklığında soğuması sağlandı. Karışım 100 mL'lik ölçülü balona alınıp, destile su ile işaret çizgisine kadar tamamlanarak karıştırıldı. Bu çözelti sadece hazırlandığı gün kullanılır.

3.1.4.4. İvertaz Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

Tampon Çözelti (0.1M, pH:6): 1.166 g KH_2PO_4 ve 0.256 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ destile suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

0.02 M Substrat (4-Nitrofenil β -D-glukopiranosid) Çözeltisi: 0.6025 g 4-Nitrofenil β -D-glukopiranosid (pNPG) tampon çözelti ile son hacim 100 mL olacak şekilde çözüldü.

pNPG suda çözünür fakat kararlı değildir. Bu nedenle tampon çözelti 60°C'nin üzerine çıkılmayacak şekilde ısıtıldı ve çözünme gerçekleştiğinde hemen soğutuldu. Bu şekilde hazırlanan çözelti karanlıkta buzdolabında 1 ay süreyle saklanarak kullanılabilir.

Reaksiyon Sonlandırma Çözeltisi (3M, pH:9.5): 36.342 g tris(hidroksimetil)aminometan suda çözümlenerek hacim 100 mL'ye tamamlandıktan sonra 3M HCl ile pH'sı 9.5'a ayarlandı.

Bal Numunesi: 5 g bal, tampon çözelti ile 25 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti ancak 1 gün süreyle buzdolabında saklanarak kullanılabilir.

3.1.4.5. Prolin İçeriğinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

Stok Prolin Çözeltisi: 40mg/50mL olacak şekilde hazırlandı.

Prolin Referans Çözeltisi: Stok çözeltinin 1 mL'sinin su ile 0.8mg/25mL olacak şekilde 25 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

Ninhidrin Çözeltisi: %3'lük ninhidrin, 3 g ninhidrinin 100 mL etilen glikol monometileter içinde çözülmesiyle hazırlandı.

Bal Numunesi: 0.5 gr bal tartılarak son hacim 10 mL olacak şekilde destile suda çözüldü.

3.1.4.6. Protein Miktarının Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

Lowry A Çözeltisi (0.1N NaOH içinde %2 (w/v) Na_2CO_3): 0.4 g NaOH ve 2.0 g Na_2CO_3 saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4°C'de saklandı.

Lowry B Çözeltisi (%1 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi): 1.0 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4°C'de saklandı.

Lowry C Çözeltisi (%2 Na-K tartarat çözeltisi): 2.0 g Na-K tartarat saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4°C'de saklandı.

Lowry D Çözeltisi: Eşit miktarlarda (1:1) Lowry B ve Lowry C karıştırılarak hazırlandı.

Lowry E Çözeltisi: 1 mL Lowry D ile 50 mL Lowry A karıştırılarak hazırlandı.

Sığır Serum Albumin (BSA) Çözeltisi (1 mg/mL): 5.0 mg BSA saf su ile çözülüp hacmi 5 mL'ye tamamlandı ve 4°C'de saklandı.

0.1 N NaOH içinde %1 (w/v) SDS Çözeltisi: 0.4 g NaOH ve 0.1g sodyum dodesil sülfat (SDS) saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4°C'de saklandı.

Bal Numunesi: 0.5 gr bal tartılarak son hacim 10 mL olacak şekilde destile suda çözüldü.

3.1.4.7. Toplam Fenolik İçeriğın Belirlenmesinde Kullanılan özeltiler

1:10 (v/v)'luk Folin-Ciocalteu Reaktifi: 10 ml Folin-Ciocalteu Fenol Reaktifi alınarak toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

% 2'lik Na₂CO₃ özeltisi: 2 gr Na₂CO₃ alınarak saf su ile çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

0.05 mg/mL Gallik Asit (GA) özeltisi: Standart olarak kullanılan gallik asit çözeltisi 0.05 mg GA 1 mL suda/metanol de çözülerek hazırlandı.

3.1.4.8. Flavonoid İeriğının Belirlenmesinde Kullanılan özeltiler

Ham ekstraktlarda flavonoid içerik tespit edilememiştir. Bu sebeple toplam fenolik içeriğı yüksek olan bal numunelerinin belirlenmesiyle bu örneklerin fenolik bileşenlerinin HPLC analizi için Gómez-Caravaca ve ark. (2006) tarafından modifiye edilen Martos ve ark. (1997)'nin önerdiği metoda göre ekstrakte edilmesiyle ele geçen ekstrakt flavonoid içeriğın belirlenmesi amacıyla kullanılmıştir. Bu ekstrakt şu şekilde hazırlanmıştir.

-30 g bal örneğı 150 mL asitlendirilmiş su (HCl ile pH'sı 2'ye ayarlanmış) içinde tamamen sıvı oluncaya kadar oda sıcaklığında karıştırıldı.

-Bu karışım içerisine 40 g Amberlite XAD-2 ilave edildi ve baldaki fenolikleri yeteri kadar absorbladığına inanılacak süre boyunca (30 dakika) karıştırıldı.

-Elde edilen karışım cam kolona (30 cm x 3 cm) yüklendi ve önce 100 mL asitlendirilmiş su daha sonra da 300 mL destile su ile yıkandı.

Bu aşamanın sonucunda fenolik bileşenler kolon üzerine tutunmuş, şekerler ve diğerk polar bileşiklerin ise sulu çözücü ile elüe olması sağlanmıştir (Ferrerres ve ark., 1991).

-Kolona tutulmuş olan fenolik fraksiyon 300 mL metanol ile elüe edildi ve evaporatör yardımıyla düşük basınç altında 40°C'da kurutuldu.

-Kurutulmuş kalıntı 5 mL destile su içerisinde çözülerek 3 kez 5'er mL dietil eter ile ekstrakte edildi.

-Eter ekstraktları birleştirilerek evaporatör yardımıyla düşük basınç altında 30°C'da kurutuldu.

-Kurutulmuş kısım HPLC saflıkta su ve metanol kullanılarak 1 mL metanol:su (1:1) karışımında çözüldü.

1 M Amonyum Asetat Çözeltisi: 7.708 g amonyum asetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) alınarak son hacim 100 mL olacak şekilde suda çözülerek hazırlandı.

%10'luk Alüminyum Nitrat Çözeltisi: 10 g alüminyum nitrat nonahidrat ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$) alınarak saf su ile çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Kuersetin çözeltisi (0.25 mg/mL): Standart olarak kullanılan kuersetin çözeltisi 0.25 mg kuersetin 1 mL metanolde çözülerek hazırlandı.

3.1.4.9. Toplam Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

2 M H_2SO_4 çözeltisi: 18 M'lık derişik H_2SO_4 çözeltisinden 11.11 mL alınarak son hacim destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

100 mM (sodyum fosfat) çözeltisi: 1.56 g sodyum fosfat monobazik dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) alındı, son hacim 100 mL olacak şekilde suda çözülerek hazırlandı.

10 mM amonyum molibdat çözeltisi: 1.24 g Amonyum molibdat tetrahidrat ($\text{H}_{24}\text{Mo}_7\text{N}_6\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) alındı, son hacim 100 mL olacak şekilde destile su ile çözüldü.

Reaktif Çözeltisi: 30 mL 2 M H_2SO_4 çözeltisi, 28 mL sodyum fosfat çözeltisi ve 40 mL amonyum molibdat çözeltisi karıştırılıp 100 mL'ye tamamlandı ve taze olarak kullanıldı.

3.1.4.10. DPPH Radikalinin Etkisinin Giderilmesi ile İlgili Çözeltiler

100 μM DPPH çözeltisi: 515 nm'deki absorbandsı 1.00'in altında olabilecek şekilde 3.9432 mg 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$) tartılarak 100 mL metanolde çözüldü. +4°C'da saklandı.

3.1.4.11. FRAP Metodu ile Antioksidan Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

0.3 M Asetat Tamponu (pH: 3.6): 4 g sodyum asetat tri hidrat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) bir miktar destile suda çözülüp, pH metre kullanılarak asetik asit ile pH'sı 3.6'ya ayarlandı ve toplam hacim destile suyla 100 mL'ye tamamlandı.

40 mM HCl çözeltisi: 12 M'lık derişik HCl çözeltisinden 0.33 mL alınarak son hacim destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM TPTZ (2,4,6-Tris (2-Piridil)-S-triazin) çözeltisi: 0.312 g TPTZ alınarak 40 mM HCl içinde son hacim 100 mL olacak şekilde çözülerek hazırlandı.

20 mM FeCl₃.6H₂O çözeltisi: 0.54 g FeCl₃.6H₂O alınarak son hacim 100 mL olacak şekilde suda çözülerek hazırlandı.

FRAP Reaktifinin Hazırlanması: Daha evvel hazırlanmış olan 2.5 mL FeCl₃.6H₂O, 2.5 mL TPTZ ve 25 mL 0.3 M asetat tamponu (pH=3.6) karıştırılarak taze olarak hazırlandı.

25 mM Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) çözeltisi: Standart olarak kullanılan troloksun 25 mM'lık stok çözeltisi 0.626 g troloksun son hacim 100 mL olacak şekilde etanol içerisinde çözülmesiyle hazırlandı. Kalibrasyon eğrisinin oluşturulması sırasında metanol/su ile uygun konsantrasyona seyreltilerek kullanıldı.

3.1.4.12. DNA Hasarının Önlenmesinin İncelenmesinde Kullanılan Çözeltiler

1 mM FeSO₄. 7H₂O çözeltisi: 27.8 mg demir (II) sülfat heptahidrat tartılarak son hacim 100 mL olacak şekilde destile su içerisinde çözüldü.

1 mM EDTA çözeltisi: 37.2 mg etilendiamin tetraasetik asit disodyum tuzu alınarak son hacim 100 mL olacak şekilde destile su içerisinde çözüldü.

%1'lik H₂O₂ Çözeltisi: % 35'lik hidrojen peroksit çözeltisinden 1 mL alınarak 100 mL'ye tamamlandı.

%1'lik Etidyum Bromür (EB) Çözeltisi: 1 g etidyum bromür alınarak 100 mL su içerisinde çözüldü.

Jel Yükleme Boyası: 25 mg bromofenol mavisi ve 40 g sukroz saf su ile karıştırılarak son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

0.5 M EDTA Çözeltisi (pH=8): 46.53 g etilendiamin tetraasetik asit disodyum tuzu (EDTA) alınarak 200 mL su ilavesiyle çözüldü. 5 g NaOH eklenip pH sı 8'e ayarlandıktan sonra son hacmi 250 mL'ye tamamlandı.

Yürütme Tamponu (Tris-Asetik Asit-EDTA Çözeltisi) (10X TAE): 48.4 g Tris, 11.2 mL glasiyal asetik asit ve 20 mL 0.5 M EDTA çözeltisinin saf su ile iyice karıştırılarak hacminin 1000 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

3.1.5. Bal Örneklerinin Renk Yoğunluğunun Belirlenmesi

Bal örneklerinin net absorbansı Beretta ve ark.,2005 tarafından geliştirilen metod ile belirlendi . Daha önce %50 (w/v)'lik olacak şekilde ayrı ayrı hazırlanmış olan bal numunelerinin metanol ve su ekstraktları Whatman 1 filtre kağıdından süzöldükten sonra 450 ve 720 nm'de spektrofotometre kullanılarak absorbansları ölçöldü. Absorbanslar arasındaki farktan aşğıdaki formöl kullanılarak renk yoğunluğu mAU hesaplandı.

$$\text{Renk Yoğunluğu (mAU)} = (\text{ABS}_{450} - \text{ABS}_{720}) \times 1000$$

3.1.6. Bal Örneklerinin Enzim İçeriklerinin Belirlenmesi

3.1.6.1. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz aktivitesi H₂O₂'nin parçalanmasının spektrofotometrik olarak 240 nm'de izlenmesiyle ortaya koyuldu. 10 µL bal numunesi 50 µL'ye seyreltildikten sonra üzerine 1.45 mL hidrojen peroksit çözeltisi ilave edildi. Karışım 30 dakika 25°C'de bekletildi. Absorbans okundu. Her defasında ortamdaki hidrojen peroksitin konsantrasyonunu tam olarak belirleyebilmek için 1.45 mL hidrojen peroksit çözeltisi, 50 µL su ile karıştırılarak aynı şartlara tabii tutuldu ve absorbans değeri ile molar absorblama katsayısı (43.6 M⁻¹ cm⁻¹) kullanılarak konsantrasyon hesaplandı. Ayrıca her bir bal numunesi için numune körü de 10 µL balın 1.49 mL su ile karıştırılmasıyla hazırlandı ve bu karışım için okunan absorbans hesaplamalarda dikkate alındı.

Çizelge 3.2. Katalaz aktivitesi tayini için yapılan pipetlemeler

	H ₂ O ₂ (I)	Numune Körü (II)	Numune (III)
H ₂ O ₂	1.45 mL	-	1.45 mL
Bal numunesi	-	10 µL	10 µL
Su	50 µL	1.49 mL	40 µL

1Ünite katalaz 1 µmol hidrojen peroksiti 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarıdır. Buna göre 1 g balın katalaz aktivitesinin hesaplanması için aşğıdaki eşitlik kullanıldı.

$$\frac{ABS_I - ABS_{III} + ABS_{II}}{43.6} \times (1500/30)$$

$$0.00005$$

3.1.6.2. Diastaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Bal numunelerinin diastaz aktivitelerinin belirlenebilmesi için 3.1.4.3.başlığında anlatılmış olan %2'lik taze hazırlanmış nişasta çözeltisinin kalibre edilmesi sağlanır. Bu işlem reaksiyon karışımına eklenmesi gereken su miktarını belirlemek ve böylece 0.745-0.770 arasında absorbans elde etmek için uygulanmaktadır. Bu amaçla şöyle bir yol izlendi:

- i. 11 tane deney tüpü alınır ve sırasıyla her birine 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5 mL su koyuldu.
- ii. Her birine 0.5 mL seyreltilmiş iyot çözeltisi eklendi.
- iii. Taze hazırlanmış nişasta çözeltisi kullanılarak 10 mL su + 5 mL nişasta çözeltisi karışımı hazırlandı.
- iv. Hazırlanan nişasta çözeltisi-su karışımından 50 µL'lik kısımlar ilk tüpten itibaren teker teker ilave edildi.
- v. Hızlıca karıştırılıp ve 660 nm'de suya karşı vakit kaybetmeden absorbans okundu.
- vi. Hangi tüpte absorbans 0.770-0.745 arasında ise o tüp için kullandığımız su miktarı kaydedilir ve seyreltme suyu miktarı olarak kullanılır.

Asetat tamponu ve NaCl ilavesi ile hazırlanmış olan bal numunelerinin diastaz aktivitesinin belirlenmesi için şöyle bir yol izlendi:

- i. İki ayrı ependorf tüpe 1'er mL bal numunesi koyuldu.
- ii. Bir ependorfa da 1 mL nişasta çözeltisi koyuldu.
- iii. 3 ependorfta aynı anda 40 °C'da 15 dakika süreyle bekletildi.
- iv. Sürenin sonunda bal içeren tüplerden birine 40 °C'da bekletilmiş olan nişasta çözeltisinden 0.5 mL ilave edildi. Kronometre çalıştırılarak 5. dakikada bu karışımdan 50 µL alınarak bu süre içerisinde hazırlanmış olan 0.5 mL seyreltilmiş iyot çözeltisi + seyreltme suyu miktarınca su

içeren tüplere eklendi ve vakit kaybetmeden 660 nm de absorbans okundu.

- v. Bu işleme belirli aralıklarla absorbans değeri 0.456-0.155 aralığında oluncaya kadar devam edildi.
- vi. 40 °C’da 15 dakika süreyle bekletilen diğer ependorftaki bal numunesi kullanılarak da numune körü hazırlandı. Bu amaçla bu tüpteki 1 mL bal çözeltisi üzerine 0.5 mL su eklenip oluşan karışımdan 50 µL alınarak bu süre içerisinde hazırlanmış olan 0.5 mL seyreltilmiş iyot çözeltisi + seyreltme suyu miktarınca su içeren tüplere eklendi ve 660 nm de absorbans okundu.
- vii. Numune körü için okunan absorbans değerleri numune için okunan absorbans değerinden çıkarıldı.

Yapılan bu işlemler sonrasında diastaz aktivitesi 1 g bal için 0.01 g nişastayı 1 saat içinde 40 °C’de belirlenen son noktaya çeviren enzim miktarı olarak Gothe birimi ile ifade edildi ve Diastaz sayısı olarak belirtildi. Diastaz sayısı şu şekilde hesaplandı:

- i. Elde edilen absorbanslar kullanılarak zaman-absorbans grafiği çizildi.
- ii. Bu grafiğin denklemini kullanarak absorbansın 0.235 olduğu zaman belirlendi.
- iii. Bu değer aşağıdaki formülde yerine konuldu:
$$DS = \frac{300}{\text{zaman}}$$

3.1.6.3. İvertaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Bal numunelerinin invertaz aktivitesi, bal invertazının substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosid ile reaksiyonu sonucu oluşan *p*-nitrofenolün spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanan Siegenthaler metoduna (1977) göre belirlendi. 1 Ünite invertaz, 1 kg bal tarafından dakika da parçalanmış *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosidin µmol miktarı olarak ifade edildi.

5 mL substrat çözeltisi test tüpünde 40°C’de 5 dakika bekletildi. 5 dakikanın bitiminde 0.5 mL bal çözeltisi ilave ederek 40°C’de inkübasyona devam edildi. 20 dakika sonra 0.5 mL sonlandırma çözeltisi eklendi ve karıştırıldı. Böylelikle pH

değeri 9.5 olduğunda enzimatik reaksiyon durmakta ve o anda nitrofenol, nitrofenolat anyonuna dönüşmektedir. Buda parçalanmış substratın miktarına denktir ve bu miktar 400 nm’de absorban ölçülerek belirlendi.

Kör deneme için ise 5 mL substrat çözeltisi yine aynı şekilde 40°C’de 5 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda önce 0.5 mL sonlandırma çözeltisi ilave edildi ve karıştırıldıktan sonra bal numunesi ilave edilip aynı yol izlendi. Denenen her bal numunesi için kör yapıldı. Tüpler oda sıcaklığında soğutulduktan sonra 400 nm’de absorban okundu.

3.1.7. Protein ve Prolin İçeriğinin Belirlenmesi

Bal numunelerinin toplam protein içeriğinin belirlenmesi bakır-protein kompleksinin oluşumuna ve bu sırada Folin-Ciocalteu reaktifi içerisindeki fosfomolibdat ve fosfotungstatın sırasıyla polimolibdenyum ve tungsten mavisine indirgenmesine dayanan Lowry yöntemi (1951) ile tespit edildi. BSA, kalibrasyon eğrisinin hazırlanması amacıyla protein standardı olarak kullanıldı (Saxena ve ark., 2010).

Çizelge 3.3. Protein tayini için yapılan pipetlemeler (Tüm hacimler mikrolitre birimindedir)

	Kör	Standart	Numune
BSA (1mg/ml)	0	25-100	-
0.1 N NaOH içinde %1 (w/v) SDS Çözeltisi	200	175-100	160
Lowry E Reaktifi	1000	1000	1000
Numune	-	-	40
Folin Reaktifi (1:1)	100	100	100

Çizelge 3.3’de verilen pipetlemeler yapılırken şöyle bir yol izlendi: Bal numunesi yada standart üzerine NaOH içindeki SDS çözeltisinin uygun miktarda ilavesinin ardından tüm tüplere E karışımı ilave edildi ve hemen karıştırılıp 10 dakika bekletildikten sonra yine tüm tüplere Folin reaktifi eklenip 30 dakika karanlıkta inkübe edildi. Bu sürenin bitiminde 650 nm’de absorban değerleri okundu. Kalibrasyon grafiğinin çizilmesi sonrası örnek için elde edilen konsantrasyon değeri seyreltme faktörü ile çarpılarak bal numunelerinin bir gramında bulunan protein içeriği g cinsinden hesaplanmıştır.

Bal örneklerinin prolin miktarlarını tespit etmek için de spektrofotometrik yöntem kullanıldı (Anonymous, 2002). Reaksiyon tüplerine sırasıyla 100 µL bal çözeltisi,

100 µL destile su, 100 µL prolin standart çözeltisi (0.8mg/25 mL) konuldu. Her bir tüpe 200 µL formik asit ve 200 µL %3'lük ninhidrin çözeltisi ilave edilip tüplerin kapakları kapatılarak vorteks yardımı ile hızlı bir şekilde 15 dakika karıştırıldı. Homojen hale gelen tüpler kaynar su banyosunda 15 dakika bekletildi. Daha sonra tüpler 70 °C 'lik su banyosunda 10 dakika bekletildi. Su banyosundan alınan her bir tüpe 1 mL %50'lik 2-propanol ilave edilip 45 dakika karanlıkta bekletildi. Süre sonunda her bir tüpün absorbans değeri 510 nm dalga boyunda ölçüldü.

$$\frac{\text{mg prolin}}{\text{g bal}} = \frac{E_s}{E_a} \times E_1 / E_2$$

Bu bağtıda;

E_s = Örnek çözeltisinin absorbansı

E_a = Prolin standart çözeltisinin absorbansı

E_1 = Standart çözeltideki mg olarak prolin miktarı

E_2 = g olarak bal çözeltisi

3.1.8. Toplam Fenolik İçeriğın Belirlenmesi

Bal numunelerinin su ve metanol ekstraktlarının toplam fenolik içeriğı Singleton ve Rossi (1965) tarafından geliştirilen metodun modifiye edilmesiyle Folin-Ciocalteu reaktifine dayanan yöntemle göre belirlendi. Bu yöntem, fenolik maddelerin Folin-Ciocalteu reaktifinin içerdiği fosfomolibdik-fosfotungistik çözeltisini indirgeyerek mavi bir kompleks oluşturmaları ve bu mavi rengin spektrofotometrik olarak ölçülmesi ilkesine dayanmaktadır. Numunelerin toplam fenolik madde içerikleri GA kullanılarak hazırlanan standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak GA eşdeğeri olarak belirlendi. Bu amaçla öncelikle GA'in 0.05 mg/mL'lik çözeltisi su/metanol içinde hazırlandı. Uygun konsantrasyonlarda olacak şekilde (0.002-0.012 mg/mL) bu stok çözeltiden alınarak deneme koşullarında gerçekleştirilen işlem sonucunda konsantrasyon-absorbans grafiğı çizilerek kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Bu denemede "kullanılan çözeltiler ve hazırlanması" kısmında bahsedilmiş olan %50'lik bal numuneleri kullanıldı. Her bir örnek ve değışen konsantrasyonlarda GA

standartı için uygulanan pipetleme işlemleri çizelge 3.4’de özetlenmiştir. Pipetlemeler şu sırayla yapıldı. GA ya da numune üzerine önce her bir tüpteki son hacmi eşitleyecek kadar su/metanol ilavesi gerçekleştirildikten sonra 1:10 (v/v)’luk Folin-Ciocalteu Reaktifi ilave edilip karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyonun ardından %2’lik Na₂CO₃ ilave edilip 2 saat süreyle oda sıcaklığında karanlıkta bekletildikten sonra absorbanslar 760 nm de su numuneleri için suya karşı, metanol numuneleri için ise metanol+su karışımına karşı okundu. Standart grafiğe ait grafik denklemi kullanılarak tüm numunelerin toplam fenolik madde miktarları gallik asit eşdeğeri (GAE) cinsinden mg GAE/g bal olarak hesaplandı (Ulusoy, 2010).

Çizelge 3.4. Toplam fenolik madde tayini için yapılan pipetlemeler (Tüm hacimler mikrolitre birimindedir).

	Kör	Numune Körü	Standart	Numune
%50’lik Bal ekstraktı	-	25	-	25
Su/Metanol	500	475	450-200	475
Gallik asit	-	-	50-300	-
1:10 (v/v)’luk Folin-Ciocalteu Reaktifi	250	-	250	250
%2’lik Na ₂ CO ₃	500	-	500	500
Su	-	750	-	-

3.1.9. Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi

Fenolik ekstraktların flavonoid içeriği Fukumoto ve Mazza (2000)’ya göre yapıldı. Kuersetin standart olarak kullanıldı. Çalışmada numune ve standartlara ait pipetlemeler aşağıdaki gibi yapıldı.

Pipetlemeler yapıldıktan sonra tüpler 40 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi ve 415 nm’de saf suya karşı absorbanslar okundu.

Kuersetin konsantrasyonuna karşılık bulunan absorbans değerleri ile grafik çizildi. Çizilen grafiğe göre bal numunelerinin toplam flavonol miktarı bulundu, seyreltme faktörleri de dikkate alınarak numunelerin flavonoid miktarı kuersetin (QT) eşdeğeri cinsinden mg QTE/g bal olarak hesaplandı.

Çizelge 3.5. Toplam flavonoid içerik tayini için yapılan pipetlemeler (Tüm hacimler mikrolitre birimindedir).

	Kör	Numune Körü	Standart	Numune
Fenolik bal ekstraktı	-	50	-	50
Kuersetin (0.25 mg/mL)	-	-	5-100	-
Metanol	1100	1150	1095-1000	1050
%10 Al (NO ₃) ₃	50	-	50	50
1 M CH ₃ COONH ₄	50	-	50	50

3.1.10. Antioksidan Etkinliğin Belirlenmesi

3.1.10.1. Toplam Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi

Bal numunelerinin toplam antioksidan kapasitesi Silici ve arkadaşları (2010) tarafından tanımlanan metoda göre belirlendi. %50'lik su/metanol ekstraktları kullanıldı. Bal numunesi üzerine “kullanılan çözeltiler ve hazırlanması” 3.1.4.9. başlığında anlatılmış olan reaktif çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı ve hazırlanan karışımlar 90 dakika 95 °C’de inkübe edildikten sonra tüpler hızlı bir şekilde suda soğutuldu ve Su/Metanol+su karışımına karşı 415 nm’de absorbansları okundu.

Çizelge 3.6. Toplam antioksidan kapasitenin tayini için yapılan pipetlemeler (Tüm hacimler mikrolitre birimindedir)

	Kör	Numune Körü	Standart	Numune
1:100 oranında seyreltilen %50’lik Bal ekstraktı	-	20	-	20
Su/Metanol	100	80	90-0	80
Su	-	1300	-	-
Askorbik asit	-	-	10-100	-
Reaktif Çözelti	130	-	1300	1300
	0			

Aynı deneme şartlarında farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde 0.25 mg/mL stok askorbik asit (AA) çözeltisi kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiğinden yararlanarak bal numunelerinin toplam antioksidan aktivitesi askorbik asit eşdeğeri (mg AAE/g bal) şeklinde ifade edildi (Tornuk ve ark., 2013). Her bir örnek ve

değişen konsantrasyonlarda AA standardı için uygulanan pipetleme işlemleri çizelge 3.6.'da özetlenmiştir.

3.1.10.2. DPPH[•] Radikali Temizleme Aktivitesi Tayini

Serbest radikal yakalama yönteminde, kararlı ve sentetik bir radikal olan DPPH[•] kullanılır ve antioksidanın bu serbest radikali yakalama yeteneği ölçülerek antioksidan aktivite tanımlanır (Pokorny ve ark., 2001). Bu yöntemde göre; kararlı bir serbest radikal olan DPPH[•], antioksidandan bir proton alarak indirgenir, renksiz α,α -difenil- β -pikrilhidrazil molekülüne dönüşür (Pokorny ve ark., 2001; Huang ve ark., 2005).

DPPH, ticari olarak satın alınabilen mor renkli bir radikaldir. Çalışmada bu radikalin 100 μ M'lık metanolik çözeltisi kullanıldı. DPPH[•] radikali bir antioksidan madde ile reaksiyona girdiği zaman indirgenme sonucu mor rengin şiddeti azalarak absorbansın düşüşüne sebep olmaktadır. Absorbsiyon gücü azalması yakalanan elektron sayısı ile doğru orantılıdır. İzlenen deneysel yöntemde eşit hacimde (700 μ L) olacak şekilde DPPH çözeltisi ve numune çözeltileri (farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde ayarlanan) karıştırılıp oda sıcaklığında 50 dakika karanlıkta bırakıldı. Süre sonunda DPPH[•]'in maksimum absorbans verdiği 517 nm'de absorbans değerleri okundu. Kör olarak DPPH[•] çözeltisi ve numunenin çözüldüğü çözücü kullanıldı. Absorbans sulu bal ekstraktları durumunda metanol-su karışımı (1:1), metanol ekstraktları durumunda ise metanole karşı okundu.

Farklı numune konsantrasyonlarıyla muamele edilen DPPH[•]'nin absorbansındaki değişim ölçülerek konsantrasyon/absorbans grafiği çizilerek, grafik denkleminde DPPH[•] konsantrasyonunu yarıya düşüren numune konsantrasyonu belirlendi ve bu değer SC₅₀ değeri (g/mL) olarak ifade edildi. SC₅₀ değeri ne kadar düşükse antioksidan kapasite o kadar yüksektir. Aynı işlemler bilinen standart antioksidanlar (AA (0.1 mg/mL), butillenmiş hidroksianisol (BHA, 0.1 mg/mL), GA (0.05 mg/mL), QT(0.05 mg/mL) pirogallol (PG, 0.05 mg/mL), kateşin (0.1 mg/mL)) ile de tekrarlanarak karşılaştırma yapıldı.

Çizelge 3.7. DPPH' radikali temizleme aktivitesi tayini için yapılan pipetlemeler (Tüm hacimler mikrolitre birimindedir).

	Kör	Numune Körü	Standart	Numune
100 µM metanolik DPPH çözeltisi	700	-	700	700
Su/Metanol	700	670-580	690-650	670-580
Metanol	-	700	-	-
Numune	-	30-120	-	30-120
Standart çözeltileri			10-50	-

3.1.10.3. FRAP Metodu ile Antioksidan Aktivite Tayini

Demir indirgeme antioksidan kapasitesi yöntemi ucuz, tekrarlanabilir ve basit bir antioksidan aktivite tayin yöntemi olup çalışmada Habib ve arkadaşları (2013)'nın, geliştirdiği yöntem takip edildi. FRAP metodu Fe(III)-TPTZ kompleksinin antioksidanlar varlığında indirgenerek mavi renkli kompleks Fe(II)-TPTZ oluşturması ve bu kompleksin 595 nm'de maksimum absorbans vermesi esasına dayanır (Oyaizu, 1986). Bu amaçla 1.2 mL FRAP reaktifi daha evvel hazırlanmış olan % 50'lik bal numunelerinin (su ve metanol ekstraktları) 100 µL'si ile karıştırıldı ve 37 °C'da 30 dakika inkübasyonun sonrasında 595 nm'de absorbans su/su+metanol'e karşı okundu. Sonuçlar standart antioksidan troloksun kullanılmasıyla aynı deneme şartlarında elde edilen standart kalibrasyon grafiğinden yararlanarak troloks eşdeğeri (µmol TE/100 g bal) olarak hesaplandı.

Çizelge 3.8. FRAP metodu ile antioksidan aktivite tayini için yapılan pipetlemeler (tüm hacimler mikrolitre birimindedir)

	Kör	Numune Körü	Standart	Numune
FRAP Reaktifi	1200	-	1200	1200
Su/Metanol	100	-	90-20	-
Su	-	1200	-	-
Numune	-	100	-	100
Troloks	-	-	10-80	-

3.1.10.4. Bal Numunelerinin Hidroksil Radikali Tarafından Oluşturulan DNA Hasarını Önleme Etkinliklerinin İncelenmesi

İncelenen bal numunelerinin hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) ile indüklenen DNA hasarına etkisini araştırmak amacıyla *in vitro* olarak denemeler gerçekleştirildi. Bu amaçla 0.25 µg pBR 322 plazmid DNA'sı, 2µL 1.0 mM EDTA-FeSO₄, 1 µL %1'lik H₂O₂ ve

2 µL 0.2 g/mL bal numunesi ile son hacim 12 µL olacak şekilde 50 mM fosfat tamponu (pH=7) içinde karıştırıldı ve karışım 37 °C'da 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra karışımların üzerine agaroz jel yükleme boyası eklenerek her biri %1'lik agaroz (0.5 µg/mL EB içeren) üzerinde elektroforeze tabii tutuldu. Elektroforez işlemi 1 saat süreyle 100 voltluk akım uygulanarak yürütme tamponu (1X TAE) içerisinde gerçekleştirildi. Elektroforez işleminin bitiminde jel UV ışığı altında görüntülendi ve fotoğrafı kaydedildi.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Renk Yoğunluğu

Renk yoğunluğunun, antioksidan özelliklere sahip olduğu bilinen karotenoidler, flavanoidler gibi pigmentlerle ilişkili olduğu tahmin edilmektedir (Frankel ve ark., 1998). Ayrıca çalışma meteryalimiz olan kestane ballarının koyu renkli ve acı tada sahip olduğu da bilinmektedir (Alissandrakis ve ark., 2011). Koyu renkli balların antioksidan kapasitelerinin ve fenolik bileşik içeriklerinin açık renkli ballara göre yüksek olması beklenmektedir (McKibben ve Engeseth, 2002). Bu nedenle ilk olarak incelenen bal numunelerinin %50'lik konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanmış olan su ve metanol ekstraktlarının renk yoğunlukları spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. 450 ve 720 nm deki absorbans değerlerinin ölçülmesi ve mAU olarak renk yoğunluğunun ifade edilmesiyle incelenen bal numunelerinin hem su hem de metanol ekstraktları durumunda en yoğun renge (1442/1364 mAU) sahip olan bal numunesinin Düzce ilinden elde edilen 11 numaralı bal numunesi, en açık renge (201/270 mAU) sahip olan bal numunesinin ise Ordu ilinden temin edilen 16 numaralı bal numunesi olduğu tespit edilmiştir. Literatürle uyumlu olacak şekilde çalışmada incelenen kestane ballarının renk yoğunlukları ortalama olarak su ekstraktları için 761 mAU değerinde iken, metanol ekstraktları için 634.24 mAU'dur. Oysa karşılaştırma amacıyla incelenen ormangülü ve çiçek balı numunelerinin renk yoğunlukları su ekstraktları için sırasıyla 374 ve 181 mAU, metanol ekstraktları için ise 325 ve 553 mAU olarak hesaplanmış olup kestane balları için hesaplanan ortalama değer altındadır. Çiçek balının su ekstraktının renk yoğunluğu 181 mAU değeri ile çalışılan örnekler için hesaplanan en düşük değerdir. Literatürde Kanada'dan elde edilmiş farklı bitki kaynaklı balların renk yoğunlukları belirlenmiş olup 10-1160 mAU arasında değerler saptanmıştır. En yüksek değer karabuğday balı için saptanmıştır. Bunun dışında Habib ve ark., (2014a) tarafından yapılan çalışmada kurak ve kurak olmayan bölgeden temin edilen 16 farklı monofloral ve heterofloral bal numuneleri renk yoğunluğu açısından incelendiğinde ise bulunan değerler 273.90-2874.80 mAU aralığındadır. Literatürdeki bu çalışmada en yüksek değer Yemen'den elde edilen heterofloral bir açık sarı bal numunesi için gözlenmiştir. Bunun dışında incelenen kestane balı numunelerinin su ekstraktlarının renk

yoğunluğunun genel olarak metanol ekstraktlarına göre daha fazla olduğunu söylemek de mümkündür.

Çizelge 4.1. Bal numunelerinin su ve metanol ekstraktlarının renk yoğunlukları ile ilgili toplu bulgular

Yerleşim	SU EKSTRAKTLARI (mAU)	METANOL EKSTRAKTLARI (mAU)
Bartın 1	687	551
Bartın 2	657	535
Bartın 3	856	686
Bartın 4	826	656
Bartın 5	791	690
Bartın 6	969	774
Bartın 7	790	629
Düzce 8	1118	884
Düzce 9	704	506
Düzce 10	890	742
Düzce 11	1442	1364
Düzce 12	805	612
Ordu 13	546	488
Ordu 14	492	357
Ordu 15	357	296
Ordu 16	201	270
Kastamonu 17	710	583
Kastamonu 18	659	453
Kastamonu 19	834	722
Artvin 20	1203	1168
Artvin 21	868	635
Artvin 22	380	907
Artvin 23	816	683
Artvin 24	1135	973
Artvin 25	878	714
Artvin 26	766	696
Trabzon 33	624	578

Çizelge 4.1. Bal numunelerinin su ve metanol ekstraktlarının renk yoğunlukları ile ilgili toplu bulgular (devamı)

Yerleşim	SU EKSTARKTLARI (mAU)	METANOL EKSTRAKTLARI (mAU)
Trabzon 34	831	683
Trabzon 35	817	835
Trabzon 36	627	419
Trabzon 37	793	655
Giresun 38	862	845
Giresun 39	976	941
Giresun 40	708	617
Giresun 41	689	666
Zonguldak 42	595	436
Zonguldak 43	851	490
Zonguldak 44	620	345
Zonguldak 45	427	332
Sinop 46	743	573
Sinop 47	717	707
Sinop 48	518	342
Sinop 49	741	408
Sinop 50	824	577
Sinop 51	840	726
Sinop 52	812	598
Rize 53	833	536
Rize 54	649	571
Rize 55	899	797
Kastamonu Orman Gülü	374	325
Kastamonu 27(çiçek balı)	181	553
Ticari Kestane Balı	661	461

4.2. Bal Örneklerinin Enzim İçerikleri

4.2.1. Katalaz Aktivitesi

Bal enzimlerinden katalazın enzimatik antioksidan aktiviteye katkısı olduğu bilinmektedir (Serem ve Bester, 2012). Çalışmanın diğer kısmında bal örneklerinin antioksidan aktiviteleri araştırılmış ve etkin olduğu saptanmıştır. Bu da katalaz aktivitesinin oldukça yüksek değere sahip olmasının açıklaması niteliğindedir.

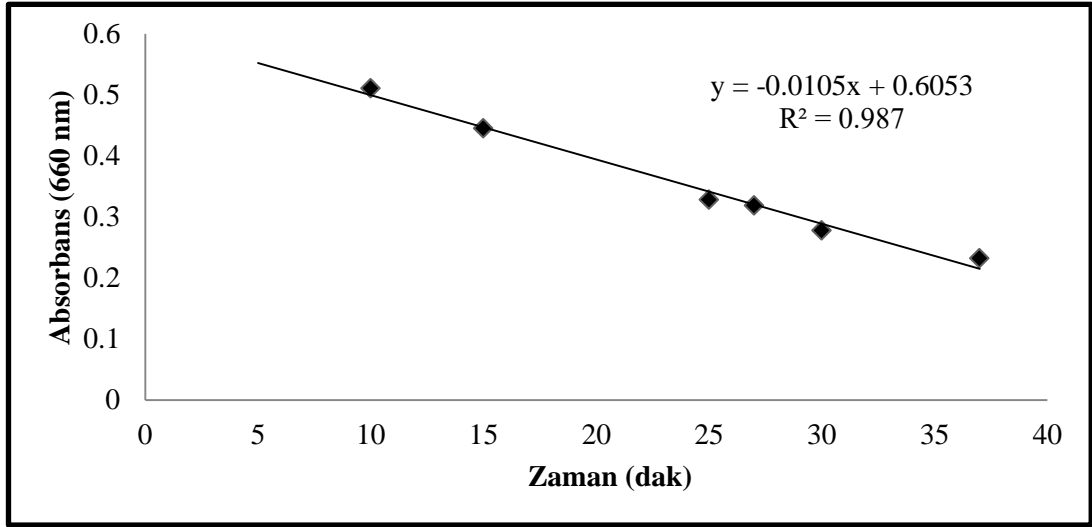
Çalışmamızda temin edilen kestane ballarının 1 g'ında bulunan katalaz aktivite içeriği 5642.2-114.6 Ü arasında değişmektedir. Katalaz aktivitesi Artvin iline ait 23 numaralı numunede en yüksek bulunurken, Düzce iline ait 9 numaralı numunede ise en düşük bulunmuştur.

Kestane balı numuneleri için ortalama olarak bulunan değere göre 1 dakikada 1 g bal tarafından 1600 µmol H₂O₂'nin hidrolizlenebildiği anlaşılmaktadır. Bu da oldukça yüksek bir değerdir. Literatürde balların katalaz içeriği ile ilgili yeterli çalışma mevcut olmayıp elde ettiğimiz bu veriler literatüre önemli katkı sağlamaktadır.

4.2.2. Diastaz Aktivitesi

Diastaz balda bulunan doğal bir enzimdir. Seviyesi balın coğrafik ve flora orijinine bağlı olduğu kadar tazeliğine de bağlıdır. Diastaz ve invertaz aktiviteleri uzun süre bekletilmiş veya ısıtılmış ballarda düşüktür, bu yüzden diastaz ve invertaz sayıları balın tazeliği hakkında bilgi verir (European Economic Community, 1974; Sancho ve ark.,1992). Ulusal düzenlemeler Gothe derecesinde diastaz aktivitesi için minimum değer olarak 8'i belirlemişlerdir (Çınar Bilgen, 2010). Karadeniz bölgesi illerinden temin edilmiş olan 49 farklı kestane balı numunesinin diastaz sayılarını belirlemek amacıyla materyal ve yöntem kısmında (3.1.6.2) ayrıntılı şekilde izah edilen yöntemin takip edilmesi ve aşağıda bir numune için verilen örnek grafiğin (Şekil 4.1) tüm numuneler için çizilip grafikten elde edilen değer ve gerekli formülün kullanılmasıyla diastaz sayıları hesaplandı. Tüm sonuçlar incelendiğinde numunelerin diastaz sayılarının 9.5 ile 35.00 arasında değiştiği saptandı (Çizelge 4.2). İncelenen tüm bal numunelerinin diastaz sayıları ile ilgili sonuçlar FAO- WHO CODEX, TGK ve Avrupa Birliği (EU) Gıda Kodeksinin belirlediği en az limit olan 8

değerinin üzerindedir. Buna göre incelenen balların tamamı için hesaplanan değerler yasal olarak geçerlidir.



Şekil 4.1. Ordu iline ait 15 numaralı bal numunesinin diastaz sayısının hesaplanması için çizilen grafik

İncelenen bal numuneleri arasında diastaz sayısının en yüksek değeri Bartın 3 (34.904 DS), en düşük değeri ise Ordu 15 (9.585 DS) kodlu bal numunelerinde gözlenmiştir. Çalışmanın diastaz verileri Fallico ve ark.(2004), Aydoğan ve ark.(1991)'nin bildirdiği 7.6 ve 7.79 değerlerinden yüksek belirlenirken, buna karşılık White (1975), Crane (1975), Şahinler ve Gül (2004), Sunay (2006) ve Gül (2009)'ün bildirdiği 20.8, 20.8, 17.9, 21.43 ve 22.81 değerleriyle paralellik göstermektedir. Balda diastaz aktivitesinin azalması gibi, yüksek düzeyde bulunması da istenmeyen bir durumdur. Balda yüksek düzeyde diastaz bulunması yüksek asit oluşumuna ve dolayısıyla fermantasyona yol açabilmektedir (Tolon, 1999; Crane, 1975).

4.2.3. İnvvertaz Aktivitesi

Çalışmamızda kestane ballarının invertaz aktivitelerinin bir kg bal başına 407.2-56.1 Ü arasında değiştiği belirlenmiştir. İnvvertaz aktivitesinin Düzce iline ait 8 nolu numunede en yüksek, Ordu iline ait 15 nolu numunede ise en düşük değerde olduğu saptanmıştır. Serrano ve ark. (2007) invertaz ve diastaz değerleri arasında önemli bir korelasyon bulunduğunu belirtmişlerdir. İncelenen kestane balları durumunda bu tür bir korelasyon grafiği çizildiğinde R² değeri 0.53 olarak hesaplanmaktadır. Bentabol Manzanares ve ark. (2014) tarafından yapılan İspanya

balları ile ilgili bir çalışmada diastaz ve invertaz arasındaki korelasyon değeri çok küçük olup 0.254'tür.

Çizelge 4.2. Bal örneklerinden elde edilen ekstraktların enzimatik aktivite ile ilgili toplu bulguları

Yerleşim	Diastaz Sayısı (Gothe birimi)	Invertaz (U/kg bal)	Katalaz (U/g bal)
Bartın 1	33.6	317.6	321.1
Bartın 2	23.7	220.7	688.1
Bartın 3	34.9	348.2	1100.0
Bartın 4	29.2	212.7	229.3
Bartın 5	26.4	281.9	1123.8
Bartın 6	19.8	218.5	1146.8
Bartın 7	26.5	173.4	412.9
Düzce 8	24.6	407.2	23.0
Düzce 9	24.6	126.8	114.7
Düzce 10	23.5	233.8	2821.1
Düzce 11	14.9	119.5	2431.1
Düzce 12	32.0	301.6	229.4
Ordu 13	15.9	227.3	642.2
Ordu 14	9.8	137.0	2339.5
Ordu 15	9.5	56.1	986.3
Ordu 16	16.1	120.9	45.9
Kastamonu 17	21.0	127.5	1169.7
Kastamonu 18	24.6	130.4	68.807
Kastamonu 19	16.3	107.8	458.7
Artvin 20	25.0	240.4	504.6
Artvin 21	16.2	177.7	1195.4
Artvin 22	22.4	161.7	756.881
Artvin 23	13.1	110.7	5642.2
Artvin 24	15.8	94.0	848.6
Artvin 25	15.0	149.3	389.9

Çizelge 4.2. Bal örneklerinden elde edilen ekstraktların enzimatik aktivite ile ilgili toplu bulguları (devamı)

Yerleşim	Diastaz Sayısı (Gothe birimi)	Invertaz (U/ kg bal)	Katalaz (U/g bal)
Artvin 26	22.4	233.1	1215.1
Trabzon 33	17.1	230.9	1100.9
Trabzon 34	24.6	241.9	1238.6
Trabzon 35	23.9	222.9	0.000
Trabzon 36	9.5	56.1	412.8
Trabzon 37	17.0	166.1	1743.1
Giresun 38	25.2	306.7	1628.4
Giresun 39	21.6	265.2	137.6
Giresun 40	16.5	190.9	23.0
Giresun 41	18.6	251.3	802.8
Zonguldak 42	13.5	94.7	2385.3
Zonguldak 43	16.7	78.7	1100.9
Zonguldak 44	16.8	96.2	275.2
Zonguldak 45	22.8	153.7	321.1
Sinop 46	15.1	179.9	367
Sinop 47	14.6	110.0	504.6
Sinop 48	19.6	142.8	16284.4
Sinop 49	22.3	222.9	160.6
Sinop 50	17.5	233.1	1238.5
Sinop 51	25.6	219.3	527.5
Sinop 52	23.3	292.8	206.4
Rize 53	15.3	186.5	802.7
Rize 54	13.8	134.0	18578
Rize 55	13.2	168.3	825.7
Kastamonu Orman Gülü	13.7	125.3	19036.7
Kastamonu 27(çiçek balı)	30.3	214.9	160.6
Ticari Kestane Balı	11.8	47.4	367

4.3. Bal Numunelerinin Protein ve Prolin Miktarları

Bal, çok az da olsa protein içermektedir. Balın protein içeriği genellikle prolin miktarı ile belirtilmektedir. Baldaki protein miktarı bazıları arının kendisi tarafından sağlanan diğerleri ise nektar tarafından üretilen enzimlerin varlığına atfedilebilir. Protein seviyesi flora tipine bağlı olup değişkendir (Saxena ve ark., 2010). Proteinin ayrıca etkili bir antioksidan olarak da görev yaptığı rapor edilmiştir (Sivapriya ve Srinivas, 2007). Kestane balı numunelerinin protein içerikleri Lowry yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Protein içeriği, balın doğal veya yapay olup olmadığının saptanması açısından olduğu kadar beslenme yönünden de önemlidir (Tolon, 1999). İncelediğimiz balların protein içeriği literatürde verilen değerlerden oldukça yüksek bulunmuştur. Anklam (1998)'e göre 1 g baldaki protein içeriği normal olarak 5 mg'dan azdır. Oysa mevcut çalışmada incelenen bal numuneleri için protein miktarı belirtilen bu değerden çok yüksek bir değer olarak hesaplanmış olup ortalama değer 1 g bal için 19.5 mg olarak bulunmuştur. Bu derece yüksek protein miktarı ihtiva eden ballarda rapor edilmiştir. Saxena ve ark. (2010) tarafından Hindistan balları üzerinde yapılan çalışmada protein içeriği için en yüksek değer 100 g bal için 2.29 g protein olarak hesaplanmıştır. Mevcut çalışmada hesaplanan en düşük değer (9.4 mg protein/g bal) ise Ordu iline ait 16 numaralı numune için hesaplanmıştır.

Prolin, nektarın bala dönüşmesi sırasında temel olarak arı tarafından bala katılan tek aminoasittir ve toplam aminoasitlerin % 50-85'ini oluşturmaktadır (Hermosin ve ark., 2003). Literatürdeki yayınlanmış analizler balların prolin baskın olmak üzere 11-21 serbest aminoasit içerdiğini ortaya koymuştur (White ve Doner, 1980). Balda en bol bulunan aminoasit olması sebebiyle prolin balın aminoasit içeriğini belirlemek amacıyla standart olarak kullanılır. Prolin içeriği balın kalitesinin ve 183 mg/kg değerinin altına düştüğünde ise tağşişin bir göstergesidir (Bogdanov ve ark., 1995; Bogdanov, 1999). Prolin içeriği bal çeşitleri arasında oldukça farklılık gösterebilmektedir (Meda ve ark., 2005). Von der Ohe ve ark. (1991)'na göre baldaki prolin miktarı arıya bağlı olan diğer bileşenlerle birlikte, sakkaraz ve glikozoksidaz aktiviteleri gibi balın olgunluk düzeyini yansıtan bir indikatördür (Hermosin ve ark., 2003).

Bu araştırmada saptanan prolin içeriği 286-1539 mg/kg arasında değişmektedir. İncelenen ballar arasında prolin için hesaplanan en düşük değer (286 mg/kg) Ordu iline ait 15 numaralı numune için hesaplanmıştır. Böylelikle tüm balların prolin değerlerinin limit değerin üstünde olduğunu söyleyebilmekteyiz. Ayrıca protein içeriği genellikle prolin miktarı ile belirtilmektedir (Bogdanov, 2002). İncelenen balların prolin değerleri ile protein içerikleri arasında pozitif korelasyon bulunmaktadır ($R^2 = 0.61$).

Ayrıca aminoasitlerin antioksidan özellikler sergilediğini gösteren raporlarda mevcuttur. Meda ve ark., (2005) tarafından yapılan bir çalışmada prolin seviyesinin radikal süpürme aktivitesinden sorumlu başlıca faktör olduğu gösterilmiştir. Ancak mevcut çalışmada DPPH radikal süpürme aktivitesi ile prolin miktarı arasında belirgin bir ilişki saptanamamıştır. İncelenen kestane balı numuneleri için hesaplanan prolin miktarı değerleri ortalama olarak 0.82 mg prolin/g bal olarak belirlenmiş olup bu değer literatürdeki Güney Afrika bölgesinden temin edilen balların tespit edilen en yüksek prolin içeriği (45.24 mg/100 g) değerinden oldukça yüksektir (Serem ve Bester, 2012). Bunun dışında literatürde farklı aralıklarda prolin ihtiva eden bal numuneleri üzerine yapılmış mevcut çalışmadaki sonuçlarla uyumlu pek çok çalışma mevcuttur (Yılmaz, 2000; Oddo ve ark. 2004; Meda ve ark., 2005).

Çizelge 4.3. Bal rneklerinin prolin ve protein miktarları ile ilgili toplu bulgular

Yerleşim	Protein İçeriği (g protein/g bal)	Prolin İçeriği (mg prolin/g bal)
Bartın 1	0.019	1.098
Bartın 2	0.019	1.055
Bartın 3	0.020	1.195
Bartın 4	0.021	0.558
Bartın 5	0.022	1.307
Bartın 6	0.021	0.733
Bartın 7	0.018	1.057
Düzce 8	0.027	1.386
Düzce 9	0.025	1.192
Düzce 10	0.021	1.105

Çizelge 4.3. Bal örneklerininprolin ve protein miktarı ile ilgili toplu bulgular (devamı)

Yerleşim	Protein İçeriği (g protein/g bal)	Prolin İçeriği (mg prolin/g bal)
Düzce 11	0.023	0.521
Düzce 12	0.026	1.346
Ordu 13	0.016	0.578
Ordu 14	0.017	0.408
Ordu 15	0.012	0.286
Ordu 16	0.009	0.308
Kastamonu 17	0.016	1.031
Kastamonu 18	0.016	0.921
Kastamonu 19	0.018	0.610
Artvin 20	0.014	0.335
Artvin 21	0.021	0.704
Artvin 22	0.018	0.690
Artvin 23	0.018	0.465
Artvin 24	0.019	0.512
Artvin 25	0.018	0.653
Artvin 26	0.030	0.934
Trabzon 33	0.019	0.594
Trabzon 34	0.021	1.031
Trabzon 35	0.022	0.948
Trabzon 36	0.019	0.566
Trabzon 37	0.020	0.803
Giresun 38	0.016	0.748
Giresun 39	0.021	0.845
Giresun 40	0.020	0.760
Giresun 41	0.018	0.774
Zonguldak 42	0.016	0.742
Zonguldak 43	0.019	1.066
Zonguldak 44	0.018	1.365
Zonguldak 45	0.018	1.539

Çizelge 4.3. Bal örneklerinin prolin ve protein miktarı ile ilgili toplu bulgular (devamı)

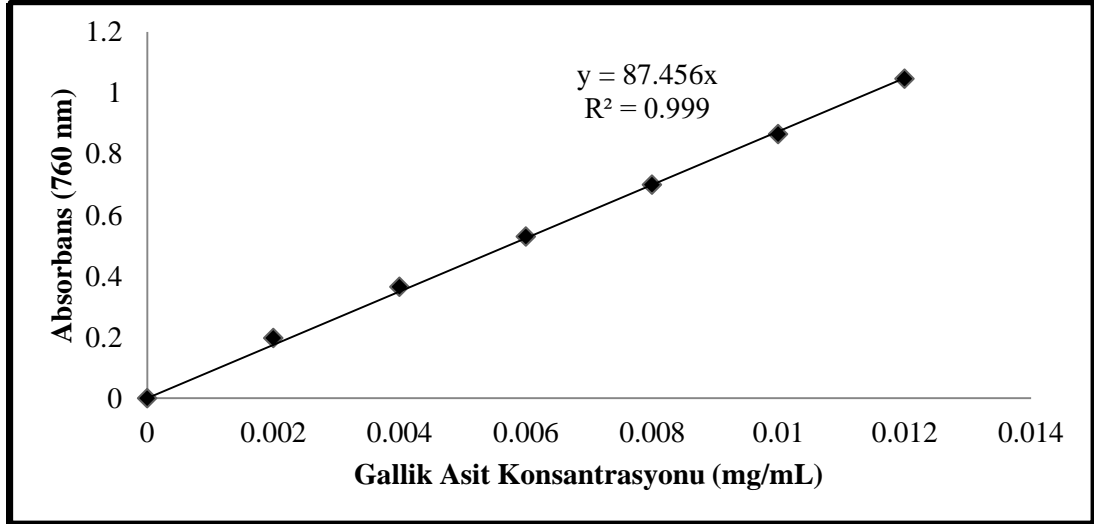
Yerleşim	Protein İçeriği (g protein/g bal)	Prolin İçeriği (mg prolin/g bal)
Sinop 46	0.021	0.632
Sinop 47	0.020	0.635
Sinop 48	0.019	0.837
Sinop 49	0.020	1.195
Sinop 50	0.023	0.892
Sinop 51	0.021	0.949
Sinop 52	0.022	0.872
Rize 53	0.016	0.811
Rize 54	0.019	0.482
Rize 55	0.018	0.541
Kastmonu Orman Gülü	0.010	0.461
Kastamonu 27(çiçek balı)	0.017	1.211
Ticari Kestane Balı	0.017	0.043

4.4. Bal Numunelerinin Toplam Fenolik İçerikleri

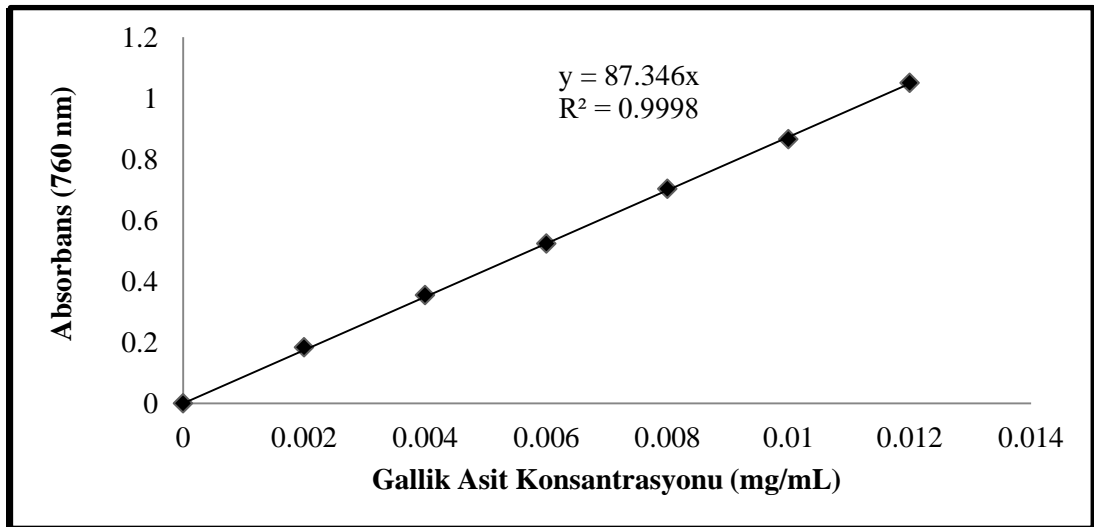
Metanol ve su ile hazırlanmış olan bal ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak belirlendi. Değişen konsantrasyonlarda hazırlanan (0.002-0.012 mg/mL'lik) GA çözeltileri ile bölüm 3.1.8'de anlatılan metoda göre toplam fenolik madde miktarları tayin edildi. 760 nm'deki absorbans değerleri y-ekseninde ve gallik asit konsantrasyon değerleri ise x ekseninde olacak şekilde bir standart çalışma grafiği hazırlandı. Elde edilen standart çalışma grafiğinde absorbans konsantrasyonla doğru orantılı olup, elde edilen doğru denklemi su ile hazırlanan GA kullanıldığında $y = 87.456x$ (şekil 4.2) olarak, metanol ile hazırlanan GA kullanıldığında ise $y = 94.187x$ (şekil 4.3) olarak hesaplandı. Bu doğru denklemlerinden yararlanarak bal numunelerinin toplam fenolik madde miktarları mg GAE/g bal olarak belirlendi

Bal numunelerinin toplam fenolik madde miktarlarının su ekstraktlarında 1.013-0.463 mg GAE/g bal, metanol ekstraktlarında ise 1.025-0.399 mg GAE/g bal aralığında olduğu bulundu. Su ekstraktları arasında en yüksek toplam fenolik içerik

Düzce ilinden temin edilmiş olan 11 ve 8 ile Giresun ilinden temin edilen 39 ile kodlanmış bal numuneleri için hesaplandı. En düşük fenolik içeriğin ise Ordu iline ait 14, 15 ve 16 ile kodlanan ballar durumunda hesaplandığı tespit edildi.



Şekil 4.2. Bal numunelerinin su ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarlarının belirlenmesi için GA kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği.



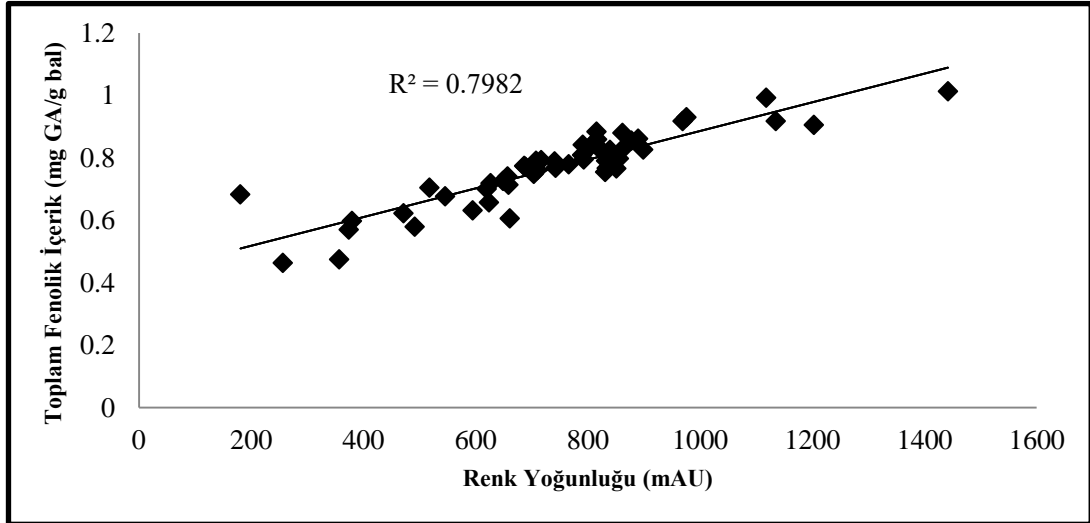
Şekil 4.3. Bal numunelerinin metanol ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarlarının belirlenmesi için GA kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği

Metanol ekstraktlarında ise yine Düzce ilinden temin edilen 11 ve 8 numaralı numuneler başta olmak üzere 35 ile kodlanan Trabzon ilinden temin edilmiş bal numunesi en yüksek fenolik içeriğe sahiptir. Zonguldak ilinden temin edilen 44 ve

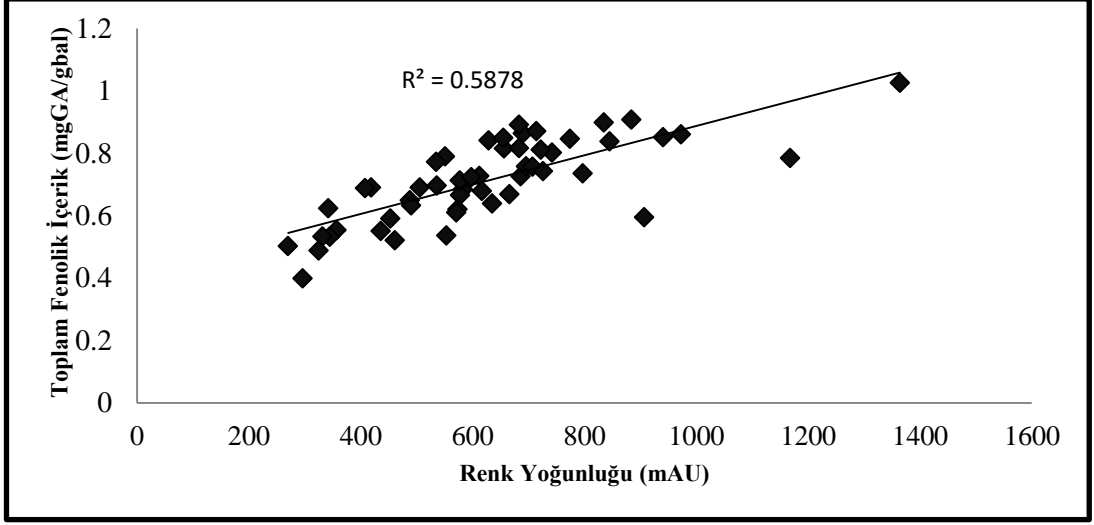
Ordu ilinden temin edilmiş olan 16 ve 15 numaralı numuneler ise fenolik içerik bakımından en fakir metanolik ekstraktlardır.

Çalışılan tüm kestane balı numunelerinin %28'inde metanol ekstraktlarının fenolik içeriği su ekstraktı için hesaplanan değerden daha yüksek bulunmuştur. Karşılaştırma yapmak amacıyla çalışılan birer adet çiçek ve orman gülü balı numunelerinin su ekstraktlarının fenolik içeriği metanolik ekstraktlarına oranla daha yüksek bulunmuştur.

Koyu renkli balların fenolik içeriğinin ve radikal süpürücü etkinliğinin yüksek olması (Brudzynski ve Miotto, 2011) beklentisiyle yapılan çalışmada daha önceki çalışmalarla uyumlu sonuçlar bulunmuştur. Düzce ilinden temin edilen 11 numaralı bal numunesi incelenen ballar arasındaki en koyu (1442 mAU) bal olarak belirlenmiş olup aynı numunenin fenolik içeriği de en yüksek değere (1.013 mg GAE/g bal) sahiptir. Benzer şekilde en açık renkli (201 mAU) bal olarak belirlediğimiz Ordu ilinden temin edilen 16 numaralı bal numunesinin fenolik içeriği de saptanan en düşük (0.463 mg GAE/g bal) değerdir. Şekil 4.4 ve 4.5 de sırasıyla bal numunelerinin su ve metanol ekstraktlarının renk yoğunlukları ile fenolik içerikleri arasındaki korelasyon grafiği verilmiştir.



Şekil 4.4. Bal numunelerinin su ekstraktlarının renk yoğunlukları ile toplam fenolik içerikleri arasındaki korelasyon eğrisi



Şekil 4.5. Bal numunelerinin metanol ekstraktlarının renk yoğunlukları ile toplam fenolik içerikleri arasındaki korelasyon grafiği

4.5. Bal Numunelerinin Toplam Flavonoid İçerikleri

Literatürde bazı ballar için yapılan çalışmalarda flavonoidlerin varlığının antioksidan etkiye katkıda bulunabildiği gösterilmiştir (Al-Mamary ve ark., 2002; Aljadi ve Kamaruddin, 2004; Küçük ve ark., 2007). Bazı çalışmalar flavonoidlerin oto-oksidasyon reaksiyonlarını inhibe ettiğini ve farklı mekanizmalar sayesinde serbest radikalleri süpürme gücüne sahip olduğunu göstermektedir (Cos ve ark., 1998). Hatta Devasagayam ve ark., (1995) flavonoidlerin reaktif oksijen türlerinin hasarına karşı pBR 322 plazmid DNA'sını koruduğunu belirtmişlerdir.

Kestane balının flavonoid profili ile ilgili oldukça az bilgi bulunmaktadır. Andrade ve ark. (1997) yapmış oldukları çalışmanın sonuçlarına göre kestane ballarının fenolik asitler açısından çok zengin ancak flavonoidler açısından oldukça fakir olduğunu belirtmişlerdir.

İncelenen bal numunelerinin flavonoid içerikleri ham ekstraktlarda tespit edilememiştir. Bu nedenle fenolik içeriği, antioksidan aktivitesi ve DNA hasarını önleme kabiliyeti en yüksek olduğu düşünülen 17 bal numunesinden fenolik bileşenlerin ekstrakte edilmesiyle elde edilen ekstrakt kullanılarak flavonoid tayini Fukumoto ve Mazza (2000)'ya göre yapıldı. Sonuçlar QTE olarak hesaplandı.

Çizelge 4.4.Bal örneklerinden elde edilen su ve metanol ekstraktlarının toplam fenolik içerikleri ve bal örneklerinin flavonoid içerikleri ile ilgili toplu bulgular

Yerleşim	Su Ekstratlarının Toplam Fenolik Birleşik Miktarı (mg GAE/g bal)	Metanol Ekstratlarının Toplam Fenolik Birleşik Miktarı (mg GAE/g bal)	Toplam flavonoid bileşik miktarı (QE/mg bal)	Toplam flavonoid bileşik miktarı (QE/fenolik ekstrakt)
Bartın 1	0.7741	0.7900		
Bartın 2	0.7398	0.7726		
Bartın 3	0.7970	0.7259		
Bartın 4	0.8198	0.8156		
Bartın 5	0.8416	0.8631		
Bartın 6	0.9170	0.8458	0.0009	0.8668
Bartın 7	0.8084	0.8404		
Düzce 8	0.9925	0.9074		
Düzce 9	0.7475	0.6897		
Düzce 10	0.8617	0.8020		
Düzce 11	1.0126	1.0254	0.0009	0.7809
Düzce 12	0.8367	0.7221		
Ordu 13	0.6767	0.6490	0.0010	0.8695
Ordu 14	0.5784	0.5539		
Ordu 15	0.4743	0.3988	0.0011	1.3627
Ordu 16	0.4629	0.5026		
Kastamonu 17	0.7598	0.6842		
Kastamonu 18	0.7131	0.5904	0.0013	0.7214
Kastamonu 19	0.7669	0.8109	0.0005	1.1671
Artvin 20	0.9048	0.7843		
Artvin 21	0.8382	0.6394		
Artvin 22	0.5974	0.5946		
Artvin 23	0.8838	0.8163		
Artvin 24	0.9176	0.8600	0.0014	1.2357
Artvin 25	0.8544	0.8709		
Artvin 26	0.7785	0.77580		
Trabzon 33	0.6571	0.660		

Çizelge 4.4. Bal örneklerinden elde edilen su ve metanol ekstraktlarının toplam fenolik içerikleri ve bal örneklerinin flavonoid içerikleri ile ilgili toplu bulgular (devamı)

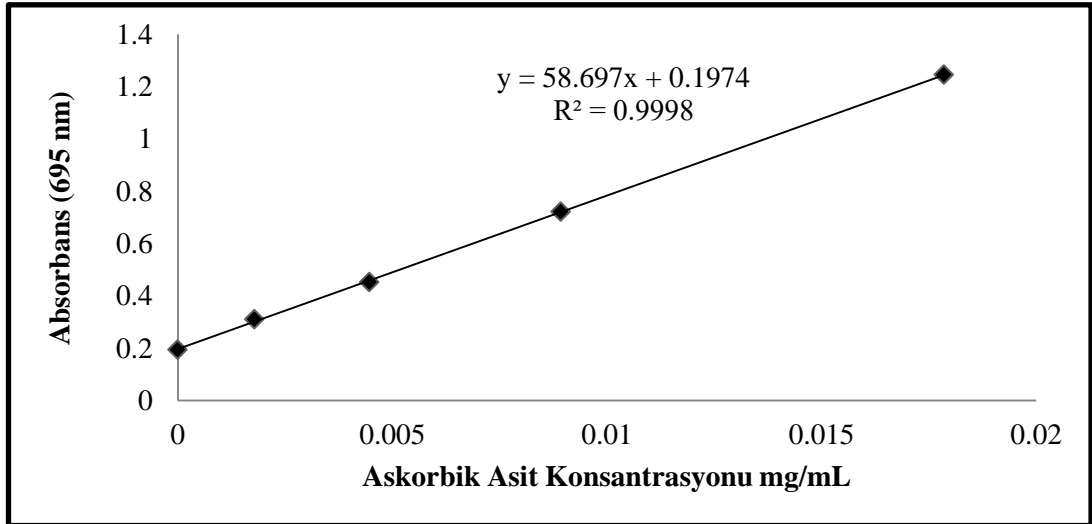
Yerleşim	Su Ekstratlarının Toplam Fenolik Birleşik Miktarı (mg GAE/g bal)	Metanol Ekstratlarının Toplam Fenolik Birleşik Miktarı (mg GAE/g bal)	Toplam flavonoid bileşik miktarı (QE/mg bal)	Toplam flavonoid bileşik miktarı (QE/fenolik ekstrakt)
Trabzon 34	0.7254	0.8907	0.0014	1.0117
Trabzon 35	0.8587	0.8983	0.0006	0.5035
Trabzon 36	0.7178	0.6905		
Trabzon 37	0.7945	0.8496		
Giresun 38	0.8793	0.8377		
Giresun 39	0.9296	0.8514	0.0013	1.1539
Giresun 40	0.7899	0.6786		
Giresun 41	0.7702	0.6691		
Zonguldak 42	0.6310	0.5511		
Zonguldak 43	0.7656	0.6323	0.0017	1.2685
Zonguldak 44	0.6995	0.5319		
Zonguldak 45	0.6217	0.5332		
Sinop 46	0.7679	0.6209		
Sinop 47	0.7923	0.7572		
Sinop 48	0.7041	0.6239		
Sinop 49	0.7879	0.6885	0.0016	1.3170
Sinop 50	0.8251	0.7123		
Sinop 51	0.8251	0.7420		
Sinop 52	0.8455	0.7229	0.0016	1.2040
Rize 53	0.7903	0.6966		
Rize 54	0.7254	0.6098		
Rize 55	0.8263	0.7350	0.00095	1.6219
Kastamonu Orman Gülü	0.5693	0.4876	0.0020	2.5494
Kastamonu 27(çiçek balı)	0.6823	0.5367	0.0027	5.4038
Ticari Kestane Balı	0.6053	0.5209	0.0013	1.3025

4.6. Bal Numunelerinin Antioksidan Etkinlikleri

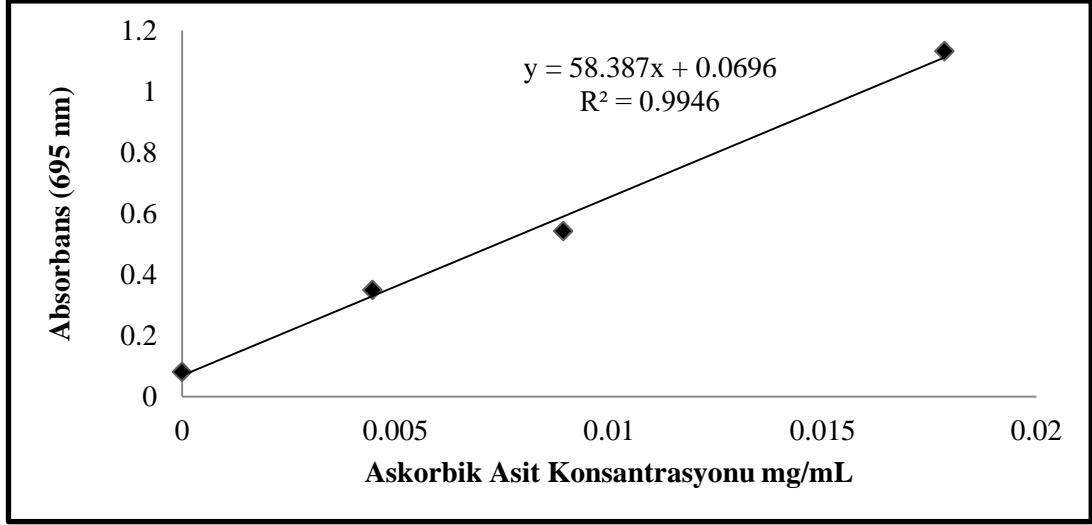
Antioksidan aktivite, polifenollerin varlığıyla enzimatik olmayan ve katalaz aktivitesi nedeniyle enzimatik bileşenler ile ya enzimattır ya da enzimatik değildir (Cowling, 1983).

4.6.1. Bal Numunelerinin Toplam Antioksidan Kapasiteleri

Metanol ve su ile hazırlanmış olan bal ekstraktlarının toplam antioksidan kapasitesi spektrofotometrik olarak fosfomolibden yöntemine göre belirlendi. Bu yöntem Mo(VI)-Mo(V)'in indirgenmesiyle antioksidan bileşenler varlığında yeşil renkli bir fosfat/Mo(V) kompleksinin oluşumuna dayanmaktadır. Bu değişime 695 nm'de maksimum bir absorbans oluşumu eşlik eder. Uygulanan test basit ve yaygın olarak uygulanan antioksidan ölçümlerden bağımsızdır (Habib ve ark., 2014b). Sonuçlar mg AAE/g bal şeklinde ifade edildi. Bu amaçla ilk olarak standart olarak kullanılan askorbik asitin su ve metanolde hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri ile denemeler gerçekleştirilmiş ve çalışma grafiği hem su (Şekil 4.6.) hem de metanol (Şekil 4.7.) ile hazırlanan ekstraktlar için ayrı ayrı olacak şekilde çizilmiştir. Grafiklerin doğru denklemlerinden yararlanarak tüm numunelerin toplam antioksidan içerikleri hesaplanmıştır.



Şekil 4.6. Bal numunelerinin su ekstraktlarının toplam antioksidan aktivite tayini için AA kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği



Şekil 4.7. Bal numunelerinin metanol ekstraktlarının toplam antioksidan aktivite tayini için AA kullanılarak hazırlanılan standart çalışma grafiği

Bal numunelerinin toplam antioksidan içerik miktarlarının su ekstraktlarında 193.765-77.187 mg AAE /g bal aralığında, metanol ekstraktlarında ise 173.216-31.385 mg AAE /g bal aralığında olduğu bulundu. Su ekstraktları arasında en yüksek toplam antioksidan içeriğin Ordu 16, Artvin 21, Düzce 11, en düşük içeriğin ise Artvin 24, Rize 53, Trabzon 33 ile kodlanan ballarda hesaplandığı tespit edildi.

Metanol ekstraktlarında ise Trabzon 34 başta olmak üzere Zonguldak 44 ve Rize 53 ile kodlanan bal numuneleri en yüksek toplam antioksidan içeriğe sahiptir. Sinop ilinden temin edilen 52 ve Artvin ilinden temin edilmiş olan 20 ve 21 numaralı numuneler ise toplan antioksidan içerik bakımından en fakir metanolik ekstraktlardır. İncelenen bal numunelerinin %32 sinde toplam antioksidan aktivite metanol ekstraktlarında daha yüksek bulunmuştur. Çiçek balında metanol, orman gülü balında ise su ekstraktı daha yüksek oranda antioksidan aktivite içermektedir.

Saxena ve ark., (2010)'nın yaptıkları çalışmada farklı bir yol izlenerek Hindistan'da ticari olarak satılan bal numunelerinin askorbik asit türünden antioksidan aktiviteleri mevcut çalışmada elde edilene oranla oldukça düşük bulunmuştur. Çalışmada ilginç bir sonuçla karşılaşılmıştır. En açık renge ve en düşük fenolik içeriğe sahip olduğu tespit edilen 16 numaralı bal numunesinin en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu şaşırtıcı bir şekilde ortaya konulmuştur. Bu durumu açıklayabilecek ifadeler literatür de de mevcuttur. Çünkü her ne kadar fenolik yapılı bileşikler baskın olsa

bile balda antioksidan aktiviteden sorumlu çok sayıda bileşik bulunmaktadır. Bu nedenle toplam fenolik bileşik içerik çoğu zaman antioksidan aktivitenin bir ölçüsü gibi düşünülse de bu konuda net bir ilişki yoktur. Bu durum antioksidan aktiviteden sorumlu tek faktörün fenolik bileşik miktarının olmadığını göstermektedir. Fenolik maddelerin molekül yapısı, oksidasyonun olduğu ortamdaki çözünürlükleri gibi faktörler maddenin antioksidan özelliğini etkileyebilmektedir (Heim ve ark., 2002; Yıldırım, 2013).

4.6.2. Bal Numunelerinin DPPH' Radikali Süpürme Aktivitesi

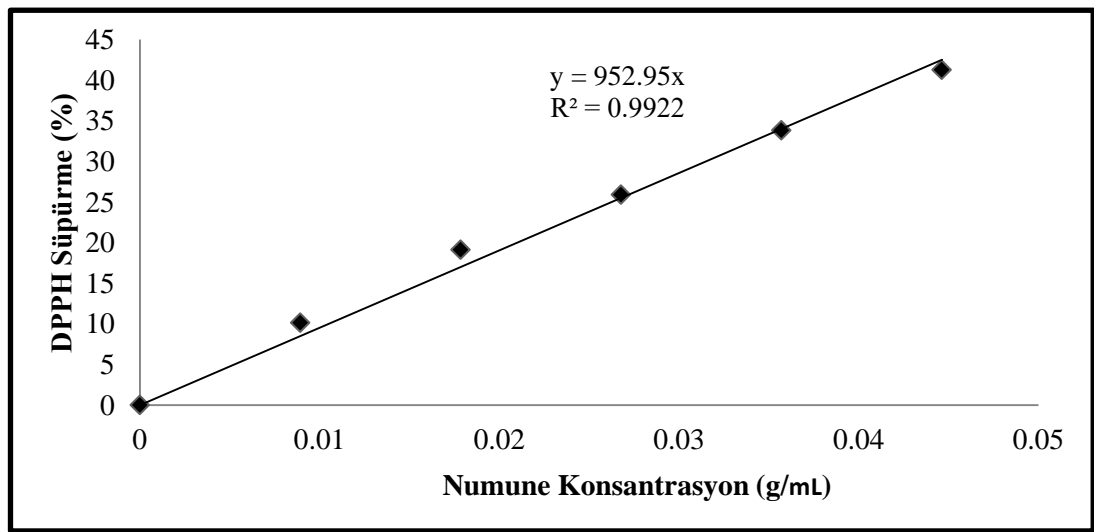
DPPH ticari olarak üretilen bir radikal olup radikal süpürme aktivitesinin belirlenmesinde çok yaygın olarak kullanılmaktadır (Ulusoy, 2010). DPPH' radikali temizleme aktivitesi genellikle başlangıçtaki DPPH konsantrasyonunun %50 oranında azalması için gerekli olan antioksidan miktarı anlamına gelen SC₅₀ ile ifade edilir. Bu ise numunenin SC₅₀ değeri ne kadar düşükse antioksidan aktivitesinin o kadar yüksek olduğu anlamına gelmektedir (Molyneux, 2004).Yapılan çalışma sonucunda bal numunelerinin su ve metanol ekstraktlarının konsantrasyona bağımlı bir şekilde DPPH radikallerini süpürme etkinliği gösterdiği ortaya konuldu. Aşağıdaki eşitlik kullanılarak her bir farklı numune konsantrasyonu için hesaplanan % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi ve DPPH radikallerinin %50'sini süpüren ekstrakt konsantrasyonu grafik doğru denkleminde hesaplandı.

$$\%S = (ABS_{k\ddot{o}r} - ABS_{\ddot{o}rnek})100/ABS_{k\ddot{o}r}$$

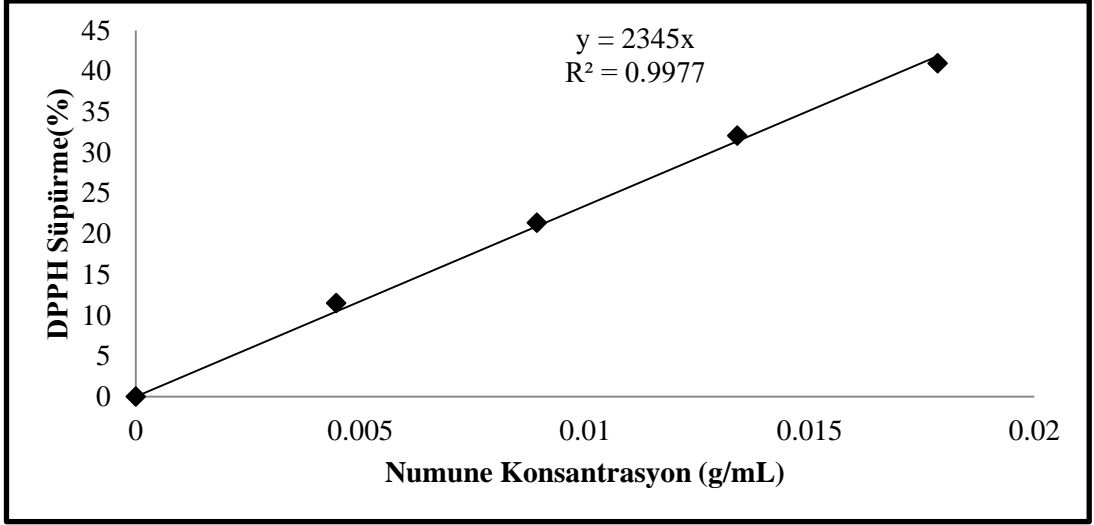
Şekil 4.8 ve 4.9'da Artvin ilinden temin edilmiş olan 22 numaralı bala ait su ve metanol ekstraktlarının ortamdaki serbest radikallerinin %50'sini süpüren miktarlarının (g/mL) tespiti için çizilen grafikler verilmiştir. Bu şekilde tüm numuneler için çizilen grafiklerin doğru denklemlerinden yararlanarak bütün numunelerin hem su hem de metanol ekstraktlarının DPPH süpürme etkinlikleri hesaplandı. DPPH serbest radikalini süpürme aktivitesi kestane ballarının %18'inde su ile hazırlanan ekstraktlarda daha etkindir. Orman gülü balında su, çiçek balında ise metanol ekstraktı bu açıdan daha etkindir. İncelenen bal örneklerinin su ekstraktları arasında en düşük SC₅₀ değerine yani en yüksek DPPH serbest radikali süpürme aktivitesine sahip olan bal numunesi 11 numaralı baldır. Metanol ekstraktları durumunda en düşük SC₅₀ değerine sahip bal numunesi 0.0079 g/mL

değeri ile 8 numaralı yine Düzce ilinden temin edilmiş olan bal numunesidir. Bu numuneyi 0.0080 g/mL değeri ile 11 numaralı bal numunesi izlemektedir. En yüksek SC₅₀ değerine yani en düşük aktiviteye sahip bal numuneleri ise su ekstraktları durumunda Ordu iline ait 15 numaralı numune (0.0443 g/mL) iken, metanol ekstraktı (0.0498 g/mL) durumunda ise aynı ile ait 16 numaralı baldır. Aynı deneme koşullarında bilinen standart antioksidan maddeler kullanılarak ortamdaki DPPH radikallerinin %50'sini süpüren miktarları hesaplandığında AA için 0.00306 mg/mL, BHA için 0.0012 mg/mL ve kateşin için ise 0.0010 mg/mL olarak bulunmuştur. Bu değerler bal numuneleri için hesaplanarlardan oldukça düşük olduğu için bal numunelerinin DPPH süpürme aktivitelerinin bu standart maddelerle kıyaslandığında daha düşük olduğunu söyleyebiliriz. Sarıkaya ve ark., (2009) tarafından incelenen Zonguldak ilinden temin edilen iki farklı kestane balı numunesi için bulunan ortalama değerin (SC₅₀= 7.35 mg/mL) mevcut çalışmada elde edilen ballar için hesaplanan ortalama değerden (SC₅₀=17.2 mg/mL) yüksek olduğu ancak kateşin, BHT ve troloks gibi bilinen standart antioksidan maddelerden oldukça düşük olduğu görülmektedir.

Ayrıca literatürde yapılan çalışmalarda Slovenya (Bertoncelj ve ark., 2007) ve Portekiz (Ferreira ve ark., 2009)'den temin edilen bal numunelerinin DPPH serbest radikalini süpürme aktiviteleri için hesaplanan SC₅₀ değerleri sırasıyla 7.2-53.8 mg/mL ve 106.67-168.94 mg/mL aralıklarında bulunmuştur.

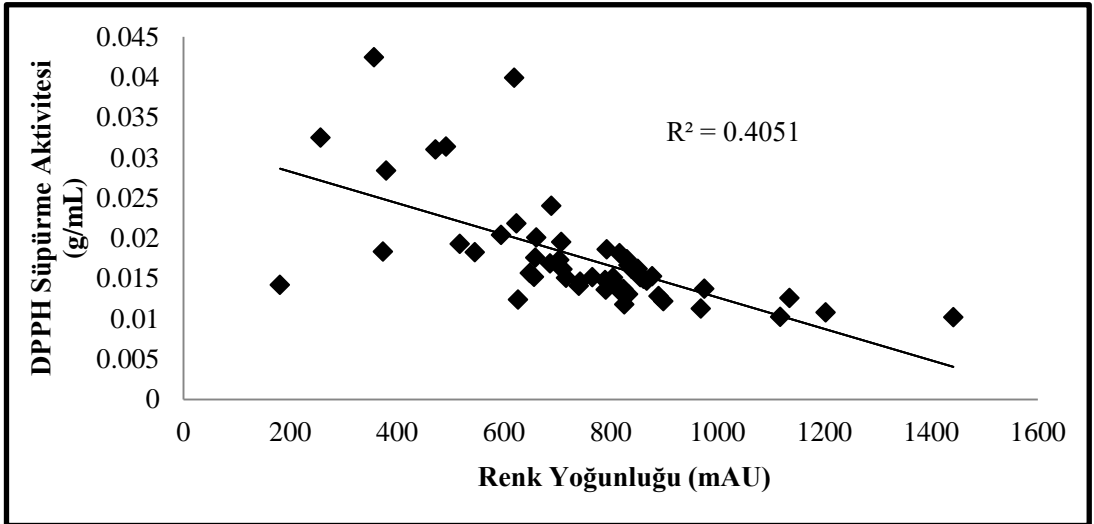


Şekil 4.8. Artvin iline ait 22 numaralı bal numunesinin su ekstraktının DPPH radikali giderme aktivitesinin tespiti amacıyla oluşturulan grafik

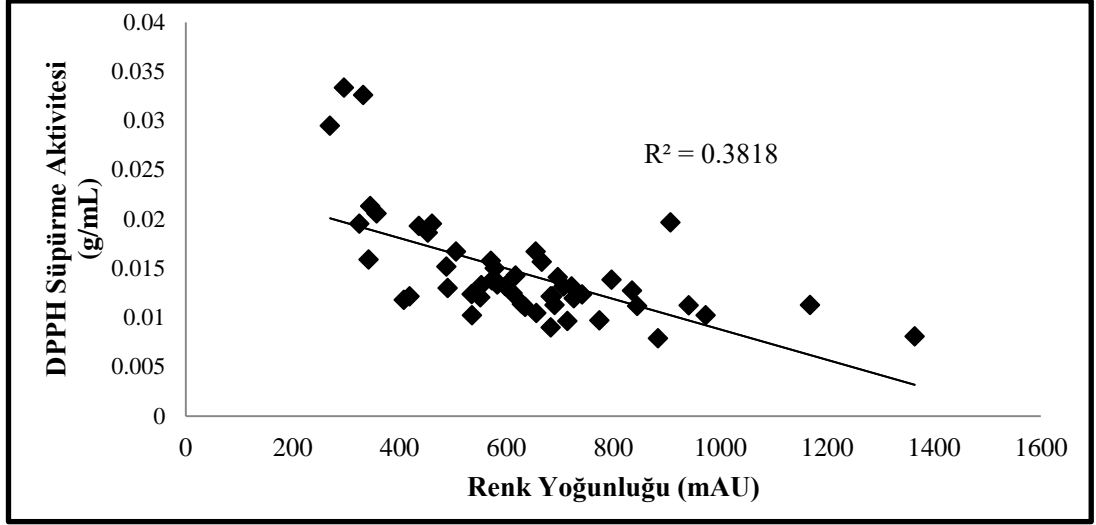


Şekil 4.9. Artvin iline ait 22 numaralı bal numunesinin metanol ekstraktının DPPH radikali giderme aktivitesinin tespiti amacıyla oluşturulan grafik

Ferreira ve ark., (2009)'nın yaptığı çalışmada açık, amber ve koyu renkli 3 farklı bal örneği incelenmiş ve en koyu renkli balın en yüksek fenolik içeriğe ve en düşük SC_{50} değerine sahip olduğu sonucu vurgulanmıştır. Benzer durum bizim çalışmamızda da gözlenmektedir. Şekil 4.10 ve 4.11 de bal numunelerinin renk yoğunlukları ile DPPH süpürme aktiviteleri arasındaki ilişki gösterilmiştir. Ancak Karadeniz illerinin kestane ballarının DPPH serbest radikalini süpürme aktivitesi için hesaplanan SC_{50} değeri Portekiz'den temin edilen biberiye, engerekotu ve funda balları için hesaplanan SC_{50} değerlerinden oldukça yüksektir (Leticia Estevinho ve ark., 2008).



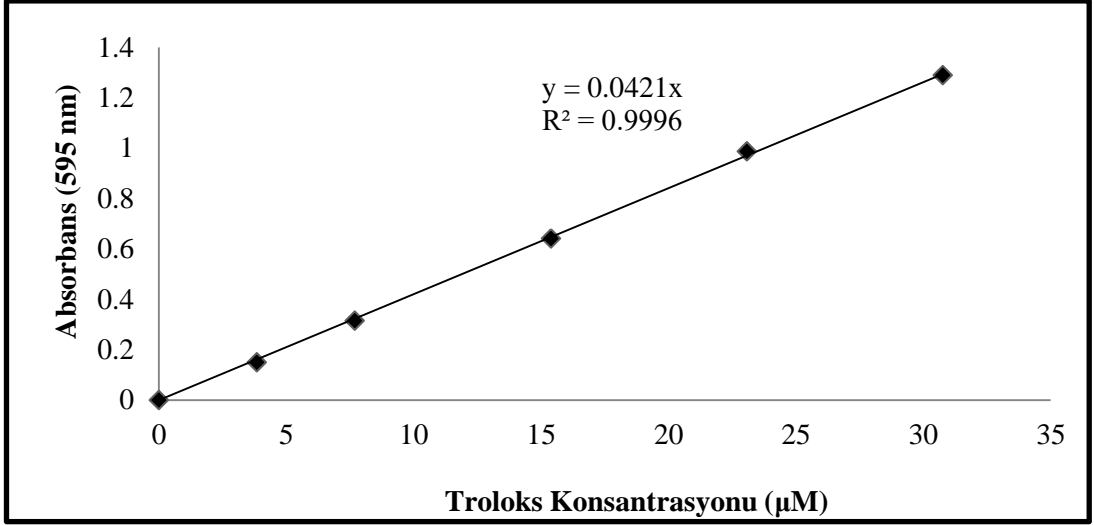
Şekil 4.10. Bal numunelerinin su ekstraktlarının renk yoğunlukları ile DPPH serbest radikal süpürme aktiviteleri arasındaki korelasyon grafiği



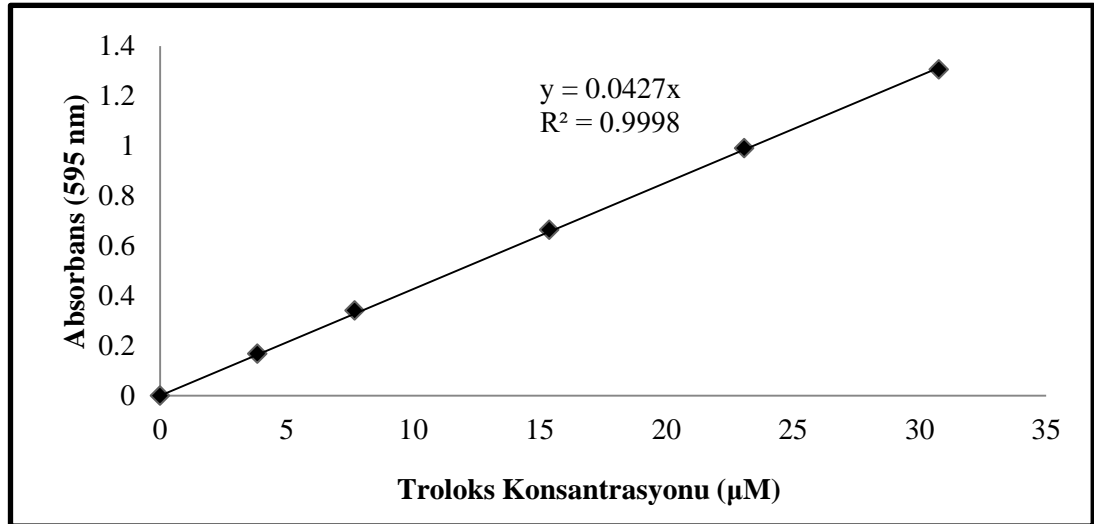
Şekil 4.11. Bal numunelerinin metanol ekstraktlarının renk yoğunlukları ile DPPH serbest radikal süpürme aktiviteleri arasındaki korelasyon grafiği

4.6.3 Bal Numunelerinin Demir (III) İndirgeme Antioksidan Kuvveti (FRAP)

Radikal zincir reaksiyonlarının kırılma kapasitesini yansıtan Fe (III) indirgeme kuvveti testi, antioksidan kapasitenin iyi bir göstergesidir (Ulusoy, 2010). FRAP metodu Fe(III)-TPTZ kompleksinin antioksidanlar varlığında indirgenerek mavi renkli kompleks Fe(II)-TPTZ oluşturması ve bu kompleksin 595 nm’de maksimum absorbanı vermesi esasına dayanır (Oyaizu, 1986). Bal numunelerinin FRAP değerleri Troloks eşdeğeri olarak $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$ bal cinsinden hesaplandı. Değişen konsantrasyonlarda hazırlanan Troloks ($3.84 \mu\text{M} - 30.769 \mu\text{M}$) kullanılarak bölüm 3.1.10.3 anlatılan metoda göre FRAP değerleri tespit edildi. Troloks konsantrasyonları x ekseninde ve 595 nm de okunan absorbanı değerleri y ekseninde olacak şekilde standart çalışma grafiği çizildi (Şekil 4.12 ve 4.13). Elde edilen standart çalışma grafiklerinin doğru denklemlerinden yararlanarak bal numunelerinin su ve metanol ekstraktlarının her biri için FRAP değeri $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$ bal olarak hesaplandı.



Şekil 4.12. Bal numunelerin su ekstraktlarının FRAP değerlerinin belirlenmesi için Troloks kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği



Şekil 4.13. Bal numunelerin metanol ekstraktlarının FRAP değerlerinin belirlenmesi için Troloks kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği

Sonuçlar değerlendirildiğinde elde edilen yüksek değerler yüksek Fe^{+3} indirgeme kuvvetini göstermektedir. Bal numunelerinin %12'si durumunda su ekstraktlarının FRAP değeri yüksek bulunmuştur. Çiçek ve orman gülü dahil diğer bütün ballarda metanol ekstraktlarının FRAP değerleri daha yüksektir. FRAP değeri için bulunan en yüksek değer hem su (363.53 µmol TE/100 g bal) hem de metanol (394.57 µmol TE/100 g bal) ekstraktları durumunda aynı illere ait bal numunelerinde gözlenmiştir. Artvin ilinden temin edilen 20 ve 25 numaralı numuneler başta olmak üzere 11 ile kodlanan Düzce ilinden temin edilmiş bal numunesi en yüksek FRAP

değerine sahiptir. Aynı durum en düşük FRAP değeri içinde geçerli olup 45 ile kodlanan Zonguldak ilinden temin edilmiş olan bal numunesi ile Ordu ilinden temin edilen 14 ve 15 numaralı balların hem su (87.15 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g bal}$) hem de metanol (102.29 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g bal}$) ekstraktlarının FRAP değerlerinin en düşük olduğu tespit edildi.

Çalışmada incelenen 50 adet kestane balı için ortalama FRAP değeri su ekstraktları durumunda 228.2265 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g bal}$, metanol ekstraktları durumunda ise 267.6192 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g bal}$ olarak hesaplanmıştır. Her iki durumda da hesaplanan ortalama değerler karşılaştırma amacıyla çalışılan çiçek (189.3827/199.5485 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g bal}$) ve ormangülü (199.5485/191.7287 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g bal}$) bal numuneleri için hesaplanan değerden yüksek bulunmuştur. Benzer durumlara literatürde de rastlanmaktadır. Küçük ve ark., (2007)'nin Trabzon ve Erzincan'dan temin edilmiş olan 3 farklı tür (kestane, heterofloral ve orman gülü) bal numunesi ile yaptıkları çalışmada en yüksek FRAP değerini kestane balı numunesi için bulmuşlardır. Bunun dışında başka bir çalışmada farklı bir sonuçta mevcuttur. Bertonecjl ve ark., (2007)'nin yaptıkları çalışmada aralarında kestane balı da olmak üzere Slovenya'dan elde edilen farklı tür bal numunelerinin antioksidan aktiviteleri FRAP metoduna göre karşılaştırıldığında en yüksek değer köknar balı için en düşük değer ise akasya balı için hesaplanmıştır. Ayrıca bilinen standart antioksidan maddelerle (BHA, AA, GA, PG, QT ve kateşin) yapılan deneme sonucunda da bu maddelerin hepsinin bal numunelerine oranla çok yüksek oranda demir indirgeme gücüne sahip oldukları tespit edilmiştir. 14 farklı anzer balı ile yapılan çalışmada numunelerin FRAP değerleri troloks eşdeğeri olarak 1.17-0.20 $\mu\text{mol Troloks/g bal}$ aralığında bulunmuş (Ulusoy, 2010) olup bu değer mevcut çalışmada incelenen kestane balları için bulunan değerlerden oldukça düşüktür.

Çizelge 4.5. Bal örneklerinden elde edilen metanol ekstraktlarının antioksidan çalışmaları ile ilgili toplu bulgular

Yerleşim	Toplam antioksidan aktivite (mg AAE/g bal)	DPPH'süpürme aktivitesi SC ₅₀ (g/mL)	FRAP (µmol TE/100 g bal)
Bartın 1	132.245	0.012	251.006
Bartın 2	119.720	0.012	255.167
Bartın 3	100.810	0.012	237.098
Bartın 4	71.586	0.010	275.119
Bartın 5	87.058	0.011	278.280
Bartın 6	152.628	0.001	295.964
Bartın 7	102.775	0.011	241.134
Düzce 8	81.164	0.008	322.494
Düzce 9	135.497	0.017	191.905
Düzce 10	120.855	0.012	262.063
Düzce 11	93.732	0.008	394.567
Düzce 12	122.055	0.012	246.909
Ordu 13	82.930	0.015	203.068
Ordu 14	83.410	0.020	153.138
Ordu 15	84.611	0.033	102.295
Ordu 16	151.579	0.029	183.748
Kastamonu 17	136.937	0.013	245.691
Kastamonu 18	80.530	0.019	284.549
Kastamonu 19	66.634	0.013	301.101
Artvin 20	33.360	0.011	392.046
Artvin 21	31.386	0.011	251.817
Artvin 22	78.760	0.020	169.614
Artvin 23	63.815	0.009	339.819
Artvin 24	112.317	0.010	380.023
Artvin 25	60.713	0.001	329.928

Çizelge 4.5. Bal örneklerinden elde edilen metanol ekstraktlarının antioksidan çalışmaları ile ilgili toplu bulgular (devamı)

Yerleşim	Toplam antioksidan aktivite (mg AAE/g bal)	DPPH süpürme aktivitesi SC ₅₀ (g/mL)	FRAP (μmolTE/100 g bal)
Artvin 26	122.469	0.001	254.424
Trabzon 33	124.443	0.015	233.883
Trabzon 34	173.217	0.012	299.029
Trabzon 35	132.627	0.013	312.528
Trabzon 36	127.589	0.012	311.941
Trabzon 37	92.284	0.017	244.982
Giresun 38	55.508	0.011	363.589
Giresun 39	99.639	0.011	364.470
Giresun 40	76.838	0.014	239.532
Giresun 41	119.703	0.016	217.681
Zonguldak 42	157.391	0.020	178.957
Zonguldak 43	94.809	0.013	244.787
Zonguldak 44	169.620	0.021	193.047
Zonguldak 45	112.552	0.032	117.718
Sinop 46	120.418	0.014	233.170
Sinop 47	117.190	0.013	327.602
Sinop 48	145.035	0.016	211.754
Sinop 49	103.669	0.011	276.290
Sinop 50	128.539	0.14	338.512
Sinop 51	131.077	0.012	396.234
Sinop 52	54.689	0.013	327.418
Rize 53	166.352	0.010	315.470
Rize 54	80.321	0.016	224.664
Rize 55	141.736	0.014	323.720
Kastamonu Orman Gülü	133.173	0.012	191.729
Kastamonu 27(çiçek balı)	54.509	0.013	199.549
Ticari Kestane Balı	155.430	0.012	267.965

4.6.4 Bal Numunelerinin Hidroksil Radikali Tarafından Oluşturulan DNA Hasarını Önleme Etkinlikleri

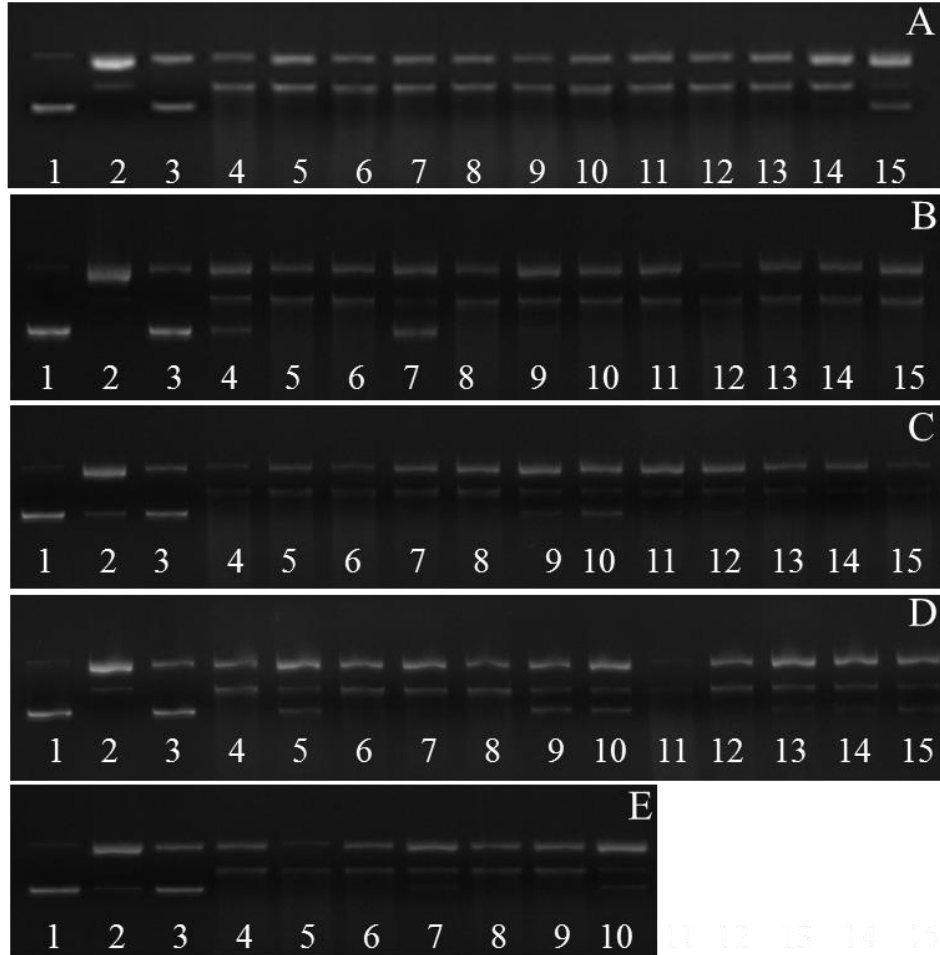
Yürütülen tez çalışmasında literatürde şu ana kadar pek mevcut olmayan bir çalışmada yapılmış ve bal numunelerinin hidroksil radikali tarafından indüklenen DNA hasarını önleyip önlemedikleri pBR322 plazmid DNA'sının serbest radikal ile indüklenmiş kırıklarının onarımının *in vitro* olarak incelenmesiyle agaroz jel elektroforezi tekniği ile incelenmiştir.

Fenton reaksiyonu ile üretilen $\cdot\text{OH}$ 'in saldırısı ile süper sarmal plazmit DNA kırılarak süper sarmal (SC), açık dairesel (OC) ve doğrusal form (Lineer) olmak üzere üç forma dönüştü. Hidroksil radikal kaynaklı DNA hasarı üzerine, kestane ballarının etkileri şekil 4.14' de gösterildiği gibidir.

Bölgeye özgü olmayan sistemde EDTA demir iyonu ile bir kompleks oluşturmakta ve çözeltide hidroksil radikalleri oluşmaktadır. Oluşan bu hidroksil radikalleri Şekil 4.14'de görülebileceği gibi süper sarmal haldeki DNA (1. sıra)'da hasar oluşturarak süper sarmal DNA'nın daha yavaş göç eden kırık ve lineer forma dönüşmesine sebep olmuştur (2. sıra). Aynı ortama incelenen bal numuneleri ilave edildiğinde ise bazı bal numuneleri durumunda oluşturulan bu hasarın giderilerek tekrar süper sarmal forma dönüşüm olduğu gözlenmiştir.

Bal numuneleri arasında en yüksek renk yoğunluğuna sahip bal 11 numaralı Düzce ilinden temin edilen bal olup bu balın toplam fenolik içeriği de diğerleri arasında en yüksektir. Ayrıca aynı numune için toplam antioksidan ve serbest radikal süpürme aktivitesi ile demir indirgeme gücünün de yüksek değerler arasında bulunduğu saptanmıştır. Bu bal numunesinin aynı zamanda hidroksil radikali tarafından indüklenen DNA hasarını da önleyebildiği gözlenmiştir. Ancak incelediğimiz bal numuneleri arasında en açık renkli bal olarak tanımladığımız Ordu ilinden temin edilen 16 numaralı bal örneğinin toplam fenolik içeriği de oldukça düşük bulunmuştur. Buna rağmen sözü edilen bal numunesinin toplam antioksidan aktivitesi en yüksek değer olarak saptanmış ve buna ilaveten aynı örneğin DNA hasarına karşıda baskılayıcı olduğu saptanmıştır. Böylece toplam antioksidan aktivitenin sadece fenolik içeriğe bağlı olmadığını baldaki diğer bileşenlerinde

antioksidan aktivite de etkin olduğunu söyleyebiliriz. Zhou ve ark. (2012)'nın yaptıkları çalışmada da karabuğday balının benzer şekilde oluşturulan DNA hasarını önleyebildiği ortaya konulmuştur.



Şekil 4.14. Bal numunelerinin hidroksil radikali tarafından oluşturulan DNA hasarını önleme etkinliklerinin incelenmesi için elde edilen agaroz jel elektropherez görüntüleri

(A-1:DNA, 2:DNA+EDTA+H₂O₂, 3: DNA+EDTA+H₂O₂+Troloks, 4-8: DNA+EDTA+H₂O₂+ 1-5 Numaralı Ballar, 9-12: 7-10 Numaralı Ballar, 13: 12 Numaralı Bal, 14-15: 14-15 Numaralı Ballar; B-1:DNA, 2: DNA+EDTA+H₂O₂, 3: DNA+EDTA+H₂O₂+Troloks, 4-6: DNA+EDTA+H₂O₂+ 16-18 Numaralı Ballar, 7-10: 20-23 Numaralı Ballar, 11-12: 25-26 Numaralı Ballar, 13-15: 33-35 Numaralı Ballar; C-1:DNA, 2:DNA+EDTA+H₂O₂, 3: DNA+EDTA+H₂O₂+ Troloks, 4-6: DNA+EDTA+H₂O₂+ 37-39 Numaralı Ballar, 7: 41 Numaralı Bal, 8-15: 43-50 Numaralı Ballar; D-1:DNA, 2:DNA+EDTA+H₂O₂, 3: DNA+EDTA+H₂O₂+Troloks, 4-15: DNA+EDTA+H₂O₂+6 (tekrar), 11, 13, 19, 24, 27, 36, 40, 42, 51, 53 Numaralı Ballar ve Ormangülü Balı; E-1:DNA, 2:DNA+EDTA+H₂O₂, 3: DNA+EDTA+H₂O₂+Troloks, 4: DNA+EDTA+H₂O₂+ 6 Numaralı Bal, 5: 18(tekrar)Numaralı Bal, 6-9: 52-55 Numaralı Ballar,10: Ticari Olarak Satın Alınan Bal.)

Çizelge 4.6. Bal örneklerinden elde edilen su ekstraktlarının antioksidan çalışmaları ile ilgili toplu bulgular.

Yerleşim	Toplam antioksidan aktivite (mg AAE/g bal)	DPPH [•] giderme aktivitesi (SC ₅₀ , g/mL)	FRAP (μmol TE/100 g bal)	DNA hasarını önleme etkisi
Bartın 1	153.127	0.017	193.701	
Bartın 2	148.096	0.015	193.493	
Bartın 3	160.144	0.015	203.469	
Bartın 4	145.353	0.011	222.590	
Bartın 5	165.474	0.014	198.481	
Bartın 6	163.416	0.011	256.336	
Bartın 7	144.438	0.015	205.548	
Düzce 8	134.378	0.010	293.809	
Düzce 9	157.928	0.018	184.972	
Düzce 10	153.584	0.013	230.392	
Düzce 11	173.369	0.010	318.689	***
Düzce 12	153.708	0.015	203.835	
Ordu 13	164.654	0.018	172.913	
Ordu 14	152.078	0.031	147.670	***
Ordu 15	152.078	0.042	87.146	***
Ordu 16	193.765	0.032	175.567	***
Kastamonu 17	133.679	0.016	214.879	
Kastamonu 18	147.187	0.018	247.491	
Kastamonu 19	143.461	0.017	234.126	
Artvin 20	122.035	0.010	363.527	***
Artvin 21	183.321	0.015	233.549	**
Artvin 22	134.187	0.029	150.856	
Artvin 23	135.619	0.013	256.790	
Artvin 24	93.163	0.012	305.259	
Artvin 25	108.254	0.015	320.414	
Artvin 26	153.746	0.015	216.667	
Trabzon 33	77.1837	0.022	162.741	

Çizelge 4.6. Bal örneklerinden elde edilen su ekstraktlarının antioksidan çalışmaları ile ilgili toplu bulgular (devamı)

Yerleşim	Toplam antioksidan aktivite (mg AAE/g bal)	DPPH [*] giderme aktivitesi (SC ₅₀ , g/mL)	FRAP (μmol TE/100 g bal)	DNA hasarını önleme etkisi
Trabzon 35	126.568	0.018	254.543	
Trabzon 36	126.025	0.012	281.185	***
Trabzon 37	104.549	0.019	261.143	
Giresun 38	134.724	0.015	236.392	
Giresun 39	140.160	0.013	270.387	
Giresun 40	105.909	0.012	223.172	
Giresun 41	118.413	0.024	208.063	
Zonguldak 42	132.821	0.020	167.143	
Zonguldak 43	120.588	0.016	230.726	
Zonguldak 44	125.619	0.040	177.801	***
Zonguldak 45	113.908	0.031	134.241	***
Sinop 46	93.593	0.015	266.925	**
Sinop 47	115.581	0.015	269.320	**
Sinop 48	133.028	0.012	220.761	
Sinop 49	135.896	0.014	285.642	
Sinop 50	106.021	0.014	227.879	
Sinop 51	108.411	0.016	249.091	***
Sinop 52	133.745	0.014	234.242	
Rize 53	84.512	0.013	226.970	***
Rize 54	112.295	0.015	256.873	
Rize 55	97.646	0.012	284.552	
Kastamonu Orman Gülü	103.960	0.190	184.455	***
Kastamonu 27 (çiçek balı)	170.606	0.014	189.383	***
Ticari Kestane Balı	102.697	0.020	212.155	***

*** DNA koruma aktivitesi belirgin bir şekilde gözlemlenen ballar.

** DNA koruma aktivitesi belirgin hafif bir şekilde gözlemlenen ballar.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Genellikle gıdalardaki doğal antioksidanların etkileri üzerinde artan bir ilgi vardır (Gašić ve ark., 2014). Ballar son zamanlarda yüksek derecede bilimsel ve terapötik ilgi gören doğal bileşikler sınıfının bir üyesidir (Habib ve ark., 2014b). Farklı bal türleri diğer gıda maddeleriyle karşılaştırıldığında antioksidan aktivite testlerinde önemli bir potansiyel göstermiştir (Schramm ve ark., 2003). Antioksidanlar, kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve diyabette dahil olmak üzere belirli hastalıkların önlenmesinde katkı sağlayarak, oksidatif hasara karşı hücre savunma sistemlerini korur (Viuda-Martos ve ark., 2008). Gıda antioksidanlarında, metabolizmanın veya enflamatuar süreçlerin yan ürünü olarak *in vivo* oluşan serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif hasarı önler (Gorelik ve ark., 2008). Birçok araştırmacı balın, kalp hastalığı, kanser, bağışıklık sistemi zayıflaması, katarakt ve farklı enflamatuar süreçlerin oluşma potansiyelini düşürmede etkili olan doğal bir antioksidan kaynağı olarak hizmet verdiğini ortaya koymuştur (Bertoncelj ve ark., 2007). Balın antioksidan aktivitesi ile toplam fenolik içeriği ve rengi arasında güçlü bir korelasyon bulunmaktadır (Al ve ark., 2009; Bertoncelj ve ark., 2007; Gheldof ve ark., 2002). Spektroskopik teknikler ile kemometrik yöntemlerin kombinasyonu bal numunelerinin antioksidan özelliklerinin standardizasyonu için kullanılmıştır ve sonuçlar bal antioksidanlarının kesin karakterizasyonu için farklı antioksidan testleri ve denemeleri kullanmak gerektiğini göstermiştir (Beretta ve ark., 2005; Zalibera ve ark., 2008).

Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında Karadeniz Bölgesi illerinden temin edilen kestane ballarının biyokimyasal özelliklerini incelemek amacıyla ilk olarak antioksidan etkinlikleri çeşitli metodlarla araştırılmıştır. Bu amaçla 49 farklı kestane balı numunesi ve karşılaştırma yapmak amacıyla birer adet çiçek balı ve ormagülü balının yanı sıra bir adet de ticari olarak satın alınan kestane balı incelenmiştir. Tüm bal numunelerinin su ve metanol ekstraktlarının hazırlanıp, renk yoğunluklarının belirlenmesinden sonra gallik asit eşdeğeri olarak toplam fenolik içeriği, askorbik asit eşdeğeri olarak toplam antioksidan aktiviteleri, DPPH serbest radikalini temizleme aktiviteleri, hidroksil radikali tarafından oluşturulan DNA hasarını önleme etkinlikleri, Fe^{+3} - Fe^{+2} dönüşüm metoduna göre indirgeme kapasitesi belirlendi. Son olarak ise incelenen bu parametreler açısından en zengin olduğu düşünülen 17 bal

numunesinin fenolik bileşenlerinin ekstrakte edilmesinin ardından bu ekstraktlar flavonoid miktarı açısından da incelendi. Ayrıca temin edilen numunelerin diastaz, invertaz, katalaz aktiviteleri, prolin ve protein miktarlarının da analizleri yapıldı.

Literatüre (Al ve ark., 2009; Gheldof ve ark., 2002) göre farklı çiçek kaynaklarından elde edilen ballar indirgenme gücünde ve DPPH radikal temizleme yeteneğini azaltmada anlamlı farklılıklar göstermektedir, antioksidan aktivite ile toplam fenolik içerik arasındaki yüksek pozitif korelasyon olması ise, fenolik bileşiklerin balların koruyucu etkileri için sorumlu olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca balların radikal süpürücü etkisi ile yüksek fenolik içeriği daha koyu renkli ballarda en yüksektir (Brudzynski ve Miotto,2011). Aynı zamanda daha koyu renkli balların antioksidan kapasitesitelerinin ve fenolik bileşik içeriklerinin en yüksek olması da beklenir (McKibben ve Engeseth, 2002). Bu nedenle, fenolik bileşikler balların antioksidan etkileri için kısmen sorumlu olmalıdır, ancak diğer faktörler de göz ardı edilmemelidir (Vela ve ark., 2007). Koyu renkli ballarda bol miktarda bulunan fenolik bileşiklerin, askorbik asit ya da E vitaminine göre daha güçlü antioksidan aktivite gösterdiği bilinmektedir (Sarıkaya, 2009).

Çalışmada incelenen kestane balı numunelerinin literatürle uyumlu olacak şekilde etkin düzeyde antioksidan aktivite içerdiği tespit edilmiştir.

Bu çalışmanın diğer bir kısmında ise incelenen bal numunelerinin tazeliğini, olgunluğunu ve taklitten uzak olduğunu gösterebilecek parametrelerin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu nedenle diastaz ve invertaz aktiviteleri belirlenmiş olup elde edilen değerlerin izin verilen yasal sınırlara uygunluk gösterdiği ortaya konulmuştur. Öte yandan protein değerinin yüksek olması balın besleyici özelliğini ön plana çıkarırken prolin değerlerinin belirtilen alt sınırdan yukarıda olması da bal numunelerinin taklit ve tağşişe maruz kalmadığının göstergesidir.

Hidrojen peroksit baldaki glikoz oksit veya onun fraksiyonları tarafından üretilirken ortamdaki katalaz enzimi hidrojen peroksiti parçalamaktadır. Böylece hidrojen peroksitten kaynaklanan antibakteriyel etkinin azalmasına neden olmaktadır (Snow ve Manley-Harris, 2004). Mevcut çalışmada katalaz aktivitesi değerlerinin oldukça yüksek bulunması numunelerimizin antibakteriyel aktivite açısından da zengin olduğunu düşündürmüştür. Bu nedenle çalışmanın bundan sonraki aşamalarında bu

bal numunelerinin antimikrobiyal etkinlikleri de incelenecektir. Ayrıca sözü geçen bu antioksidan etkinliklerden sorumlu olduğu düşünölen fenolik ve flavonoid bileşenlerde HPLC tekniği ile analiz edilecektir.

6. KAYNAKLAR

- Akkuş, İ.1995. Serbest radikaller ve fizyolojik etkileri, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Konya.
- Akyüz, E. 2007. *Polygonum bistorta* ssp. *carneum* Bitki ekstraktlarının kromatografik yöntemlerle kimyasal bileşiminin belirlenmesi ve antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri, Yüksek Lisans Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü.
- Al, L.M., Daniel, D., Moise, D., Bobis, O., Laslo, L., Bogdanov, S. 2009. Physicochemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry*, 112:863–867.
- Alissandrakis, E., Tarantilis, P.A., Pappas, C., Harizanis, P.C. 2011. Investigation of organic extractives from unifloral chestnut (*Castanea sativa* L.) and eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill.) honeys and flowers to identification of botanical marker compounds. *LWT-Food Science and Technology*, 44: 1042–1051.
- Aljadi, A.M., Kamaruddin, M.Y. 2004. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two malaysion floral honeys. *Food Chemistry*, 85: 513–518.
- Al-Mamary, M., Al-Meer, A., Al-Habori, M. 2002. Antioxidant Activities and Total Phenolics of Different Types of Honey, *Nutrition Research*, 22: 1041–1047.
- Amarowicz, R., Estrella, I., Hernandez, T., Robredo, S., Troszynska, A., Pegg, A.K.R.B. 2010. Free radical-scavenging capacity, antioxidant activity, and phenolic composition of green lentil (*Lens culinaris*). *Food Chemistry*, 3: 705–711.
- Andrade, P., Ferreres, F., Amaral, M.T. 1997. Analysis of Honey Phenolic Acids by HPLC, Its Application to Honey Botanical Characterization. *Journal of Liquid Chromatography ve Related Technologies*, 20: 2281–2288.
- Anklam, E. 1998. A Review of the Analytical Methods to Determine the Geographical and Botanical Origin of Honey, *Food Chemistry*, 63: 549-562.
- Anonim, 2005. Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği. Tebliğ No: 2005/49, Ankara.
- Anonim, 2006. Türk Gıda Kodeksi Şeker Tebliği. Tebliğ No: 2006/40, Ankara.
- Anonim, 2009. Gıda Teknolojisi ve Bal Analizleri. Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi (MEGEB). T.C. Milli Eğitim Bakanlığı. <http://hbogm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/kursprogramlari/gida/moduller/BalAnalizleri1.pdf>-(Erişim tarihi 19.09.2015)
- Anonim, 2011. http://www.tarim.gov.tr/Files/BirimFaliyetleri/HGM_eylul_2011.pdf (Erişim tarihi: 28 Eylül 2011).
- Anonim, 2013. Arıcılık. Ordu Ticaret Odası. [http://www.ordutb.org.tr/admin/dosya/aricilik_son\(_2013\)\(1\).pdf](http://www.ordutb.org.tr/admin/dosya/aricilik_son(_2013)(1).pdf)-(Erişim tarihi 19.09.2015).
- Anonim, 2015. Güneş Bal Kaçkar Dağlarından. Güneş Kaçkar Bal Hakkında. <http://www.gunesbal.com/kackarbal/kackarbal-hikayesi.html>-(Erişimtarihi: 19.09.2015).

- Anonim, 2015. Türkiye'nin Bal Haritası Çıktı: En Bal'lı İller Muğla, Ordu ve Adana. [http://www.haberler.com/ozel-haber-iste-en-balli-iller-6982559-haberi-\(Erişim-tarihi: 19.09.2015\)](http://www.haberler.com/ozel-haber-iste-en-balli-iller-6982559-haberi-(Erişim-tarihi:19.09.2015)).
- Codex Alimentarius. 2001. Revised Codex Standard for Honey. Codex Stan 12-1981. Codex Alimentarius Commission. Rev. 1(1987). Rev. 2(2001).
- Anonymous, 2002. Determination of Proline. Harmonised Methods of International Honey Commission, 58 p, Bern, Switzerland.
- Anşın, R, 1980. Doğu Karadeniz Bölgesi Florası ve Asal Vejetasyon Tiplerinin Floristik İçerikleri. Doçentlik Tezi. KTÜ Orman Fakültesi. Trabzon.
- Anupama, D., Bhat, K.K., Sapna, V.K. 2003. Sensory and physico-chemical properties of commercial samples of honey. Food Research International, 36: 183-191.
- AOAC.1998. Official Method of Analysis. 15. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.
- Arslanalp, A. Kestane Balı - Çiçek Balı Karşılaştırılması. Şile Kestane Balı. [http://silekestanebali.com/KestaneCicek.aspx-\(Erişim-tarihi: 19.09.2015\)](http://silekestanebali.com/KestaneCicek.aspx-(Erişim-tarihi:19.09.2015)).
- Aydın, B.D., Sezer, Ç., Oral, N.B. 2008. Kars'ta Satışa Sunulan Süzme Balların Kalite Niteliklerinin Araştırılması. Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dergisi, 14 (1): 89-94.
- Aydoğan, A., Özalp, E., Bozkurt, M. 1991.Yerli Ballarımızın Kimyasal Yapıları Üzerinde Araştırmalar.Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 48: 55-83.
- Azeredo, L.C., Azeredo, M.A.A., De Souza, S.R., Dutra, V.M.L. 2003. Protein contents and physicochemical properties in honey samples of Apis Mellifera of different floral origins. Food Chemistry, 80: 249-254.
- Bakan, A. 2009. TÜBİTAK, MAM Gıda Enstitüsü yıldız takımı bilim teknik dergisi eki sayı 10.
- Başoğlu, F.N., Sorkun, K., Löker, M., Doğan, C., Wetherilt, H. 1996. Saf ve Sahte Balların Ayırt Edilmesinde Fiziksel, Kimyasal ve Palinolojik Kriterlerin Saptanması. Gıda, 21, 67-73.
- Bentabol Manzanares, A., Hernández García, Z., Rodríguez Galdón, B., Rodríguez Rodríguez, E., Romero, D. 2014. Physicochemical characteristics of minor monofloral honeys from Tenerife, Spain. Food Science and Technology, 55: 572-578.
- Benzer F., Ozan. S.T. 2003. Fasciola hepaticae Enfekte Koyunlarda Lipit Peroksidasyonu, Antioksidant Enzimler ve Nitrik Oksit Düzeyleri, Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 27: 657-661.
- Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., Facino, R.M. 2005. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. Analytica Chimica Acta, 533: 185-191.

- Bertoncelj, J., Doberšek, U., Jamnik, M., Golob, T. 2007. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, 105: 822-828.
- Bogdanov, S., Bieri, K., Figar, M., Figueiredo, V., Iff, D., Kanzig, A., Stöckli, H and K, Zurcher. 1995. Miel: de'finition et directives pour l'analyse et l'ap'pre'ciation. Centre Suisse de recherche Apicole; Station derecherches laitie`res, Liebefeld, CH-3003 Berne.
- Bogdanov, S. 1999. Harmonised methods of the international honey commission. Swiss Bee Research Center, FAM, Liebefeld, CH-3003 Bern, Switzerland.
- Bogdanov, S. 2002. Swiss Bee Research Center, FAM, Liebefeld, CH-3003 Beren, Switzerland.
- Bogdanov, S., Ruoff, K., Oddo, L.P. 2004. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys. *Apidologie*, 35: 4-17.
- Brudzynski, K., Miotto, D. 2011. The relationship between the Maillard reaction-like products and bioactivity of Canadian honeys. *Food Chemistry*, 124: 869-874.
- Bulut, L., 2007. Balda depolama sırasında esmerleşme reaksiyonu kinetiğinin belirlenmesi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.
- Cam, M., Hışıl, Y. 2003. Gıdalardaki flavonoidler ve önemleri, 3. Gıda Mühendisliği Kongresi, Ankara, 2-4 Ekim, s.67-82.
- Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M.C., de Torres, C., Pérez-Coello, M.S. 2010. Effect of geographical origin on the chemical and sensory characteristics of chestnut honeys. *Food Research International* 43: 2335–2340.
- Chan, K., Khong, N., Iqbal, S., Mansor, S. M., Ismail, M. 2013. Defatted kenaf seed meal (DKSM): Prospective edible flour from agricultural waste with high antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 48(10), 1–6.
- Chen, I., Mehta, A., Berembaum, M. Zangeri, A.R., Engeseth, N.J. 2000. Honeys from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit and vegetable homogenates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 4997-5000.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., van Poel, B. 1998. Structure activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Product*, 61: 71-76.
- Cotte, J.F., Casabianca, H., Chardon, S., Lheritier, J., Grenier-Loustalot, M.F. 2003. Application of carbohydrate analysis to verify honey authenticity. *Journal of Chromatography A*, 1021:145-155.
- Cowling, R.M. 1983. Phytochrology and vegetation history in the South-eastern Cape. South Africa. *Journal of Biogeography*, 10: 393–419.
- Craft, B.D., Kosinska, A., Amarowicz, R., Pegg, R.B. 2010. Antioxidant properties of extracts obtained from raw, dry-roasted, and oil-roasted US peanuts of commercial importance. *Plant Foods for Human Nutrition*, 8: 311–318.
- Crane, E. 1975. Honey: A comprehensive survey. Heineman ,608 pp,London ,UK.

- Crane, E. 1990. Bees And Beekeeping, Heinemann Newnes, London.
- Çakal, M.A., 2013.Kuzey Doğu Anadolu Bölgesi Arıcılık ve Arı Ürünleri Sektörü. Kuzeydoğu Anadolu Kalkınma Projesi. [http://www.google.com.tr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CBsQFjAAahUK EwjW68eYj9vHAhXE1ywKHY5MDDI&url=http%3A%2F%2Fkudaka.org.tr%2Fapb%2Ftarim_raporlari%2Ftral_bolgesi_ari_aricilik_urunleri_sektoru_strateji_dokumani.pdf&usg=AFQjCNGpD0IJLpFkxdQ_BdJ7AVVQU4gHgQ&bv=bv.101800829, d.bGg-\(Erişim tarihi 19.09.2015\).](http://www.google.com.tr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CBsQFjAAahUK EwjW68eYj9vHAhXE1ywKHY5MDDI&url=http%3A%2F%2Fkudaka.org.tr%2Fapb%2Ftarim_raporlari%2Ftral_bolgesi_ari_aricilik_urunleri_sektoru_strateji_dokumani.pdf&usg=AFQjCNGpD0IJLpFkxdQ_BdJ7AVVQU4gHgQ&bv=bv.101800829, d.bGg-(Erişim tarihi 19.09.2015).)
- Çınar Bilgen, S. 2010. Türk çam balının analitik özelliklerinin incelenmesi üzerine araştırma. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Devasagayam, T.P.A., Subramanian, M., Singh, B.B., Ramanathan, R., Das, N.P. 1995. Protection of plasmid pBR322 DNA by flavonoids against single strand breaks induced by singlet molecular oxygen. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 30: 97–103.
- Effem, S.E.1988. Clinical Observations on the Wound Healing Properties of Honey. *British Journal of Surgery*, 75: 679-681.
- Ekşi, A., Karadeniz, F. 2002. Fenoliklerin gıda bileşeni olarak önemi, *Dünya Gıda*, 2002-4, 64 70.
- Estevinho,L., Pereira, A.P., Moreira,L., Dias,L.D., Pereira, E., 2008. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 3774-3779.
- European Economic Community, 1974. EEC Council directive of 22 July 1974 on the harmonisation of the laws of the members states relating to honey. *Official Journal of the European Communities*, L221: 10-14.
- Fallico, B., Zappala, M., Arena E., Verzea, A. 2004.Effect of conditioning on HMF content in unifloral honeys. *Food Chemistry*, 85: 305-313.
- Ferreira, I.C.F.R., Aires, E., Barreira, J.C.M., Estevinho, L.M. 2009. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*, 114: 1438–1443.
- Ferreres, F., Tomás-Barberán, F. A., Gil, M. I., Tomás-Lorente, F. 1991. An HPLC technique for flavonoid analysis in honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 56, 49–56.
- Frankel, S., Robinson, G.E., Berenbaum, M.R. 1998. Antioxidant capacity and correlation characteristics of 14 unifloral honeys. *Journal of Apiculture Research*, 37: 27–31.
- Fukumoto, L.R., Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3597–3604.
- Gašić, U., Kec̃keš, S., Dabić, D., Trifković, J., Milojković-Opsenica, D., Natić, M., Tešić, Z. 2014. Phenolic profile and antioxidant activity of Serbian polyfloral honeys. *Food Chemistry*,145: 599-607.

- Gheldof, N., Wang, X.-H., Engeseth, N.J. 2002. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5870–5877.
- Gómez-Caravaca, A.M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. 2006. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 41: 1220–1234.
- Gonzales, A.P., Burin, L., Buera, M.P., 1999. Color Changes During Storage of Honeys in Relation to Their Composition and Initial Color, *Food Research International*, 32: 185-191.
- Gorelik, S., Ligumsky, M., Kohen, R., Kanner, J. 2008. The stomach as a “bioreactor”: When red meat meets red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 5002–5007.
- Gökdemir, M. 2014. Dünya’da Bal Üretimi ve Türkiye Pazarı. Pazar Raporu. <http://www.pazarraporu.com/2014/03/dunyada-bal-uretimi-ve-turkiye-pazar.html#0> -(Erişim tarihi 19.09.2015).
- Gökpınar, S., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., Durmaz, Y. 2006. Algal antioksidanlar, *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi* 23:85-89 s.
- GTHB, 2012. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Arıcılık Verileri, Ankara.
- Gül, A. 2009. Türkiye’de Üretilen Bazı Balların Yapısal Özelliklerinin Gıda Güvenliği Bakımından Araştırılması, Doktora Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı, Hatay.
- Güler, Z. 2005. Doğu Karadeniz Bölgesinde Üretilen Balların Kimyasal ve Duyusal Nitelikleri, *Gıda*, 30: 379-384.
- Gürel, S.A. 2012. Beykoz Kestane Balı. <http://saimahmetgurel.com/honey.php>-(Erişim tarihi: 19.09.2015).
- Habib, M., Ibrahim, H.W., Schneider-Stock, R., Hassan, M.H. 2013. Camel milk lactoferrin reduces the proliferation of colorectal cancer cells and exerts antioxidant and DNA damage inhibitory activities. *Food Chemistry*, 141: 148–152.
- Habib, M., Al Meqbali, F.T., Kamal, H., Souka, D., Ibrahim, H.W. 2014a. Physicochemical and biochemical properties of honeys from arid regions. *Food Chemistry*, 153: 35-43.
- Habib, M., Al Meqbali, F.T., Kamal, H., Souka, D., Ibrahim, H.W. 2014b. Bioactive components, antioxidant and DNA damage inhibitory activities of honeys from arid regions. *Food Chemistry*, 153: 28-34.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. ve Cross E.C. 1992, Free radical, antioxidants, and human disease: Where are we now?, *J. Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 119:598-620.
- Halliwell, B. 1994, Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews*, 52: 253-265.

- Haroun, M.I. 2006. Türkiye’de üretilen bazı çiçek ve salgı ballarının fenolik asit ve flavonoid profilinin belirlenmesi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. 110s.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584.
- Hermosin, I., Chicon, R.M., Cabezudo, M.D. 2003. Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 83: 263-268.
- Hışıl, Y., Börekçioğlu, N. 1986. Balın Bileşimi ve Balda Yapılan Hileler, *Gıda*, 11 (2): 79-82.
- Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1841-1856.
- Karkacier, M., Gürel, F., Özdemir, F. 2000. Farklı balların HPLC yöntemi ile belirlenen şeker içerikleri kullanılarak tanımlanması. *Gıda*, 25(1): 69-73.
- Kartal, H. 2012. Bolu yöresi ballarının bazı fizikokimyasal özelliklerinin Türk Gıda Kodeksi’ne uygunluğunun incelenmesi üzerine araştırma. Yüksek lisans Tezi. Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bolu.
- Kaskoniene, V., Venskutonis, P. R., Ceksteryte, V. 2010. Carbohydrate composition and electrical conductivity of different origin honeys from Lithuania. *Food Science and Technology*, 43: 801-807.
- Kayral, G. 2015. Arıcılığın Gelişmesi ve Tarihçesi. *Arıcılık Gazetesi*. <http://www.aricilik.info/aricilik-bilgileri/aricilik/ariciligin-tarihcesi-ve-gelistmesi.html> (Erişim tarihi 19.09.2015).
- Kazanç, M.B. 1997. Antioksidan Vitaminler. *Sendrom*, Temmuz; 14-22.
- Keskin, H. 1982. *Besin Kimyası*, Cilt II (4. Baskı). İstanbul: Fatih Yayınevi ve Basımevi.
- Kolaylı, S., Küçük, M., Ulusoy, E., Sarıkaya, A. O., Karaoğlu, Ş., Duran, C. 2006. Kestane ve Çiçek Ballarının Antioksidan ve Antimikrobiyal Yönden Karşılaştırılması, *Zonguldak İli Arı Yetiştiricileri Birliği Yayınları* (<http://www.zaybir.com/index.php?id=146>).
- Konukoğlu, D. 2000. *Biyokimya Nobel tıp kitabevi*, İstanbul.
- Korkmaz, A. 2006. Bal. Samsun Valiliği Tarım İl Müdürlüğü çiftçi eğitimi ve yayım Şubesi Yayınları.
- Krell, R. 1996. Value Added Products from Beekeeping. *FAO Agricultural Services Bulletin*. No:124. Rome.
- Krell, R. 2001. Value Added Products from Beekeeping, *Food and Agricultural Organisations of the United Nations*, Rome.
- Küçük, M., Kolaylı, S., Karaoğlu, G., Ulusoy, E., Baltacı, C., Candan, F. 2007. Biological Activities and Chemical Composition of Three Honeys of Different Types From Anatolia. *Food Chemistry*, 100: 526-534.

- Lazaridou, A., Biliaderis, C.G., Bacandritsos, N., Sabatini, A.G. 2003. Composition, thermal and rheological behaviour of selected Greek honeys, *Journal of Food Engineering*, 64:9-21.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis Farr, A., Randal, R.J.1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *The Journal of Biological and Chemistry*, 163:265
- Mariod, A A., Ibrahim, R.M., Ismail, M. 2009. Norsharina Ismail. Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake, *Food Chemistry*, 116: 306–312.
- Martin K.R., Barret, J.C. 2002. Reaktif oksijen species as double-edged swords in cellular processes: low-dose cell signaling versus high-dose toxicity. *Human and Experimental Toxicology*.21: 71-75
- Martos, I., Cossentini, M., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F.A. 1997. Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 2824–2829.
- Mates J. M., Peres-Gomez C., Castro I.N., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases, *Clin. Biochem.*, 32: 595-603.
- McKibben, J., Engeseth, N. J. 2002. Honey as a protective agent against lipid oxidation in ground Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 592-595.
- Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J., Nacoulma, O.G. 2005. Determination of the total phenolic , flavonoid and proline contents in BurkinaFason honey , as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91: 571 -577.
- Molyneux, P.2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarın Journal of Science and Technology*. 26: 211–219.
- MTO, 2012. Türkiye Arıcılığı. Marmaris Ticaret Odası, 2012.
- Naczki, M., Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054: 95-111.
- Nagai, T., Sakai, M., Inoue, H., Suzuki, N. 2001. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly and propolis. *Food Chemistry*, 75: 237–240.
- Oddo, L.P., Piazza, M.G., Sabatini, A.G., Accorti, M. 2004. Characterization of unifloral honeys. *Apidologie*, 26: 453–485.
- Orhan, F., Sekerel, B.E., Kocabas, C.N., Sackesen, C., Adalioğlu, G., Tuncer, A. 2003. Complementary and alternative medicine in children with asthma, *Annals of Allergy, Asthma, and Immunology*, 90: 611–615.
- Oyaizu, M. 1986. Studies on Product of Browning Reaction Prepared from Glucose Amine, *Japanese Journal of Nutrition*, 44: 307-315.
- Öder, E. 1981. Bal İçerisindeki Maddeler ve Bunların Balın Özelliklerine Etkileri. *Gıda*, 6: 31-38.

- Ötleş, S. 1995. Bal ve Bal Teknolojisi (Kimyası ve Analizleri). Alaşehir Meslek Yüksekokulu Yayınları, yayın No: 2.
- Özkarakaş, İ. 2008. Kestane Ağacı ve Kestane Meyvesi: (Castanea), Yaşam Rehberi, http://www.e-yasamrehberi.com/photo/meyva_agaclari/kestane.htm#.UITPEf1rPIU. 21 Nisan 2014.
- Öztürk, A.Ğ. 2001. Arıcılık, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Teşkilatlanma ve Destekleme Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Parlakay, O., Yılmaz, H., Yaşar, B., Seçer, A., Bahadır, B. 2008. Türkiye’de Arıcılık Faaliyetinin Mevcut Durumu ve Trend Analizi Yöntemiyle Geleceğe Yönelik Beklentiler. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, Cilt 22, Sayı 2, s: 17-24.
- Pechhacker, H. 2008. Honeydew around the world. 1st World Honeydew Honey Symposium, p.7, Tzarevo, Bulgaria.
- Perez, R.A., Gonzales, M.M., Iglesias, M.T., Pueyo, E., Lorenzo, C. 2008. Analytical, sensory and biological features of Spanish honeydew honeys. 1st World Honeydew Honey Symposium, p.16-17, Tzarevo, Bulgaria.
- Persano-Oddo, L., Piro, R. 2004. Main European unifloral honeys: Descriptive sheets, *Apidologie*, 35: 38–81.
- Pietta, P., Gardana, C. 2003. Flavonoids in herbs, in *Flavonoids in Health and Disease 2nd Ed. Revised and Expanded*, pp. 49-69, Eds. Rice-Evans, C.A., Packer, L., Marcel Dekker Inc.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. 2001. *Antioxidants in food*, CRC Press, USA
- Roginsky, V., Lissi, E.A. 2005. Revises of methods to determine chain breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92: 235-254.
- Saldamlı, İ. 1998. *Gıda Kimyası Hacettepe Üniversitesi Yayınları*.
- Sancho, M.T., Muniategui, S., Huidobro, J.F., Simal, J. 1992. Aging of honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 134-138.
- Sanz, M.L., Gonzales, M., Lorenzo, C., Sanz, J., Martinez-Castro, I. 2005. A contribution to the differentiation between nectar honey and honeydew honey. *Food Chemistry*, 91: 313 317.
- Sarikaya, A.O., Ulusoy, E., Tunçel, M., Öztürk, N., Kolaylı, S. 2009. Antioxidant Activity and Phenolic Acid Constituents of Chestnut (*Castania sativa* Mill.) Honey and Propolis, *Journal of Food Biochemistry*, 33: 4, 470-481.
- Sariöz, P. 2010. Dünden Bugüne Türkiye’de Arıcılık, s: 10-191.
- Saxena, S., Gautam, S., Sharma, A. 2010. Physical, Biochemical and Antioxidant Properties of Some Indian Honeys, *Food Chemistry*, 118: 391-397.
- Schramm, D.D., Karim, M., Schrader, H.R., Holt, R.R., Cardetti, M., Keen, C.L. 2003. Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 1732–1735.

- Serem, J.C., Bester, M.J. 2012. Physicochemical properties, antioxidant activity and cellular protective effects of honeys from southern Africa, *Food Chemistry*, 133: 1544–1550.
- Serrano, S., Espejo, R., Villarejo, M., Jodral, M.L. 2007. Diastase and invertase activities in Andalusian honeys. *International Journal of Food Science and Technology*, 42: 76-79.
- Siegenthaler, U. 1977. Eine einfache und rasche Methode zur Bestimmung der alpha Glucosidase (Saccharase) im Honig, *Mitteilungen Gebiete Lebensm Hygiene*, 68: 251–258.
- Silici, S. 2005. Balda Duyusal Analiz. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 20: 39-42.
- Silici, S., Sagdic, O., Ekici, L. 2010. Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Rhododendron honeys, *Food Chemistry*, 121: 238–243.
- Singleton, V.L. Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16:144-158.
- Sivapriya, M., Srinivas, L. 2007. Isolation and purification of a novel antioxidant protein from the water extract of Sundakai (*Solanum torvum*) seed. *Food Chemistry*, 104: 510–517.
- Snow, M.J, Manley-Harris, M. 2004. On the nature of nonperoxide antibacterial activity in New Zealand manuka honey. *Food Chemistry* 84: 145–147.
- Subaşı, B. 2004. İstanbul Ticaret Odası Etüt Araştırma Şubesi Kestane Sektör Profili. (<http://www.ito.org.tr/Dokuman/Sektor/1-55.pdf>).
- Sunay, A.E. 2006. Balda Antibiyotik Kalıntısı Sorunu, *Uludağ Arıcılık Dergisi*. 4: 243-148
- Sunay, E. A., Altıparmak, Ö., Doğaroğlu, M., Gökçen, J. 2003. Türkiye’de ve dünyada bal üretimi, ticareti ve karşılaşılan sorunlar. II. Marmara Arıcılık Kongresi, Yalova.
- Şahinler, N., Şahinler, S., Gül, A. 2001. Hatay Yöresi Ballarının Bileşimi ve Biyokimyasal Analizi, *Mustafa Kema Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 6: 93-108.
- Şahinler, N., Gül, A., 2004. Yayla ve Ayçiçek Ballarının Biyokimyasal Analizi. 4. Ulusal Zootečni Bilim Kongresi, 01-03 Eylül 2004. Isparta.
- Şenocak, C. 1971. Arıcılık. Ankara: Balkanoğlu Matbaacılık Ltd. Şti.
- Tolon, B. 1999. Muğla ve Yöresi Çam Ballarının Biyokimyasal Özellikleri Üzerine Bir Araştırma. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir.
- Tornuk, F., Karaman, S., Ozturk, I., Toker, O.S., Tastemur, B., Sagdic, O., Dogan, M., Kayacier, A. 2013. Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile, *Industrial Crops and Products*, 46: 124-131.

- Tosi, E., Ciappini, M., Re, E., Lucero, H. 2002. Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content. *Food Chemistry*, 77: 71-74.
- Tosi, E., Martinet, R., Ortega, M., Lucero, H., Re, E. 2008. Honey diastase activity modified by heating. *Food Chemistry*, 106: 883-887.
- Ulusoy, E. 2010. Anzer balı ve polenin yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile bileşiminin belirlenmesi ve antioksidan özellikleri üzerine araştırma. Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Usal, G. 2007. Bal. Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü - Bakış, Sayı: 9, Nüsha: 15 s: 1-4.
- Uzunpınar, İ., 2015. Türkiye İstatistik Kurumu Haber Bülteni. <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=18851>-(Erişim tarihi: 19.09.2015).
- Vela, L., de Lorenzo, C., Pérez, R.A. 2007. Antioxidant capacity of Spanish honeys and its correlation with polyphenol content and other physicochemical properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87: 1069-1075.
- Vit, P., Rodriguez-Malaver, A., Roubik, D.W., Moreno, E., Souza, B.A., Sancho, M.T., Fernández-Muiño, M., Almeida-Anacleto, D., Marchini, L.C., Gil, F., González, C., Aguilera, G., Nieves, B. 2009. Expanded parameters to assess the quality of honey from Venezuelan bees (*Apis mellifera*), *Journal of ApiProduct and ApiMedical*. 1, 72-81.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., Perez-Alvarez, J. 2008. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science*, 73(9): 117–124.
- Von Der Ohe W; Dustmann, J H; Von Der Ohe, K (1991) Prolin als Kriterium der Reife des Honigs. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 87 (12): 383-386
- Wei Y.H., C.Y. Pang, 2005. The Role of Mitochondria in human aging process. *Biotech International*, 17: 8-13.
- White, J.W. Jr., Riethof, M. L., Subers, M.H., Kushnir. 1962. Composition of American Honey, Technical Bulletin U.S. Department of Agriculture A.A. 655/ 63,1261:124 p
- White, J.W., 1975. Honey. The Hive and Honeybee. Dadant and Sons. Inc. Hamilton. Illinois.
- White, J.W., 1979. Composition of honey, in *A Comprehensive Survey Honey*, pp.157-194, Eds. Crane E., Bee Research Association, Morrison and Gibb. Ltd., London.
- White, J.W., 1980. Honey Composition and Properties, *Beekeeping in the United States Agriculture Handbook Number 335*.
- White, J.W. Jr., Doner, L.W. 1980. Honey composition and properties. *Beekeeping in the United States Agriculture Handbook*, 335.
- White, J.W., 2003. Honey, in *The Hive and The Honey Bee*, pp.869-918, Eds. Graham, J.M., Dadant and Sons. Inc. Ohio.

- Winston G.W.,1991.Oxidant and Antioxidants, in Aquatic Animals, Comparative Biochemistry and Physiology, 100: 173-176.
- Yang, Y., Battesti, M.J., Djabou, N., Muselli, A., Paolini, J., Tomi, P., Costa, J. 2012. Melissopalynological origin determination and volatile composition analysis of Corsican ‘‘chestnut grove’’ honeys, Food Chemistry 132: 2144–2154.
- Yanniotis, S., Skaltsi, S., Karaburnioti, S. 2006. Effect of moisture content on the viscosity of honey at different temperatures, Journal of Food Engineering, 72:372-377.
- Yeygel, Y., Kara, N. 2007. Bal ve Bal Analizleri. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Yayın Dairesi Başkanlığı, Ankara. Gıda Serisi 10, s: 9-63.
- Yıldırım, A. 2013. Bingöl ili ballarının fenolik bileşiklerinin antioksidan ve antimikrobial etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Bingöl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bingöl.
- Yılmaz, H. 1994. Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi Ballarının Kimyasal Bileşimlerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Yılmaz, H., 2000. Composition of Honeys Collected From Eastern and South Eastern Anatolia and Effect of Storage on HMF Content and Diastase Activitiy. J. Agric For, 25: 347- 349.
- Yurtsever, N., Sorkun, K., 2002. Bal Kalitesine Etki Eden Faktörler. Uludağ Arıcılık Dergisi. 3: 28-31.
- Zalibera, M., Stasko, A., Slobodova, A., Jancovicova, V., Cermakova, T., Brezova, V. 2008. Antioxidant and radical-scavenging activities of Slovak honeys – An electron paramagnetic resonance study. Food Chemistry, 110: 512–521.
- Zhou, J., Li, P., Cheng, N., Gao, H., Wang, B., Wei, Y., Cao, W. 2012. Protective effects of buckwheat honey on DNA damage induced by hydroxyl radicals. Food and Chemical Toxicology, 50: 2766–2773.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Belde ÖMÜR
Doğum Yeri : Ordu
Doğum Tarihi : 11.09.1990
Yabancı Dili : İngilizce
E-mail : belde_90@hotmail.com
İletişim Bilgileri : Ordu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/ Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Kimya	Ondokuz Mayıs Üniversitesi	2008-2013
Y. Lisans	Kimya	Ordu Üniversitesi	2013-2015

İş Deneyimi:

Görev	Görev Yeri	Yıl

Yayınlar:

1. Çol Ayvaz, M., Ömür, B., Kabakçı, D., Aksu, F.2015.Karadeniz Bölgesi Kestane Ballarının Toplam Fenolik İçerikleri, Antioksidan Aktiviteleri ve DNA Hasarını Önleme Etkinliklerinin İncelenmesi. 27. Ulusal Kimya Kongresi. 23-28 Augustos 2015.
2. Çol Ayvaz, M., Ömür, B., Kabakçı, D., Aksu, F. Karadeniz Bölgesi Kestane Ballarının Enzim İçerikleri, Prolin ve Protein Miktarlarının Belirlenmesi. FHTT Kovandan Sofraya 2015. Uluslar Arası Gıda Güvenliği ve Otantisite Kongresi. 21-22 Mayıs 2015.