

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**MUĞLA İLİ FLORASINA AİT PÜREN BALININ KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Yüksek Kimyager Hilal Ebru ÇAKIR**

**OCAK 2016**

**TRABZON**



**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce**

**Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /**

**Tezin Savunma Tarihi : / /**

**Tez Danışmanı :**

**Trabzon**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun / / gün ve sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Üyeleri**

**Başkan :** .....

**Üye :** .....

**Üye :** .....

**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**  
**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmamı maddi olarak destekleyen TÜBİTAK Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı (Proje No:114O208)'na teşekkür ederim.

Muğla İli Florasına Ait Püren Balının Karakterizasyonu adlı bu tez Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim dalında Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır. Değerli hocalarım ve dostlarıma yüksek lisans çalışmamı sunmaktan gurur duyarım.

Öncelikle maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, anaç ve güler yüzlü danışman hocam Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI'ya ve projenin planlanması ve yürütülmesinde her zaman beni destekleyen Yrd. Doç. Dr. Fatma YAYLACI KARAHALİL'e teşekkür ederim. Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren çalışmalarımda bana yol gösteren, minnettar olduğum değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Zehra CAN ve Yrd. Doç. Dr. Hüseyin ŞAHİN'e, ve tecrübelerini her zaman paylaşmaya hazır olan hocam Doç. Dr. Oktay YILDIZ'a, düşünceli laboratuvar arkadaşım Kübra ŞAHİN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak her zaman yanımda olan anneme, babama, ablama, kardeşlerime, eşim Fikret Kağan ÇAKIR'a ve kötü gün dostlarıma teşekkürlerimi cân-ı gönülden sunarım.

Hilal Ebru ÇAKIR  
Trabzon 2016

## **TEZ ETİK BEYANNAMESİ**

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum ‘‘Muğla İli Florasına Ait Püren Balının Karakterizasyonu’’ başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI’nın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 28/01/2016

**Hilal Ebru ÇAKIR**

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ .....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ .....	IV
İÇİNDEKİLER .....	V
ÖZET .....	VIII
SUMMARY .....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	X
TABLolar DİZİNİ .....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ .....	XII
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. Bal .....	2
1.3. Serbest Radikaller, Antioksidanlar ve Polifenoller .....	4
1.4. Antimikrobiyal Aktivite .....	8
1.5. Kromatografi ve HPLC .....	9
1.6. Literatür Özeti .....	11
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	16
2.1. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Gereçler .....	16
2.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler .....	17
2.3. Çözeltiler .....	18
2.4. Numunelerin Temini ve Saklama Koşulları .....	22
2.5. Balların Bazı Fiziksel ve Kimyasal Analizleri .....	22
2.5.1. Fiziksel Analizler .....	23
2.5.1.1. Balların Palinolojik Testi .....	23
2.5.1.2. Optik Çevirme ( $\alpha$ – Rotation .....	24
2.5.1.3. Nem Tayini .....	25
2.5.1.4. Elektriksel İletkenlik .....	25
2.5.1.5. pH Ölçümü .....	25
2.5.1.6. Renk Tayini .....	25
2.6. Kimyasal Analizler .....	26

2.6.1.	Diastaz Aktivite Tayini .....	26
2.6.2.	HMF Tayini .....	26
2.6.3.	Prolin Tayini .....	27
2.6.4.	HPLC-RI Dedektörü ile Şeker Analizi.....	27
2.6.5.	HPLC-UV ile Fenolik Bileşenlerin Tayini .....	28
2.6.5.1.	Numunelerin Ekstraksiyon Şartları .....	28
2.6.5.2	RP-HPLC-UV Koşulları.....	28
2.6.5.3.	Standartlar ve Kalibrasyon .....	29
2.7.	Antioksidan Analizler .....	29
2.7.1.	Toplam Fenolik Madde Miktarı .....	30
2.7.2.	Toplam Flavonoid Madde Miktarı .....	30
2.7.3.	Toplam Tanen Miktarı .....	31
2.7.4.	Demir (III) İndirgeme Antioksidan Güç (FRAP) Tayini .....	32
2.7.5.	DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini .....	33
2.7.5.1.	SC <sub>50</sub> Değerlerinin Bulunması .....	33
2.8.	Antimikrobiyal Analiz .....	34
3.	BULGULAR .....	35
3.1.	Fiziksel Tayin Sonuçları.....	35
3.1.1.	Balların Palinolojik Testi .....	35
3.1.2.	Optik Çevirme Sonucu .....	36
3.1.3.	Nem Analiz Sonucu .....	36
3.1.4.	Elektriksel İletkenlik Analiz Sonucu.....	37
3.1.5.	pH Sonucu.....	37
3.1.6.	Renk Analiz Sonucu .....	37
3.2.	Kimyasal Tayin Sonuçları.....	40
3.2.1.	Diastaz Aktivite Sonucu.....	40
3.2.2.	HMF Analiz Sonucu .....	40
3.2.3.	Prolin Tayini Sonucu .....	41
3.2.4.	HPLC-RI Dedektörü ile Şeker Tayini Sonucu .....	42
3.2.5.	HPLC-UV ile Fenolik Bileşenlerin Tayini Sonucu .....	45
3.2.6.	Balların Fenolik Bileşen Sonuçları .....	45

3.3.	Antioksidan Sonuçları.....	46
3.3.1.	Toplam Fenolik Madde Testi Sonucu.....	46
3.3.2.	Toplam Flavonoid Madde Testi Sonucu .....	47
3.3.3.	Toplam Tanen Testi Sonucu .....	48
3.3.4.	FRAP Testi Sonucu.....	48
3.3.5.	DPPH• Testi Sonucu.....	50
3.4.	Antimikrobiyal Analiz Sonuçları .....	51
4.	TARTIŞMA .....	53
5.	SONUÇLAR .....	62
6.	ÖNERİLER .....	64
7.	KAYNAKLAR .....	65
	ÖZGEÇMİŞ	



Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

MUĞLA İLİ FLORASINA AİT PÜREN BALININ KARAKTERİZASYONU

Hilal Ebru ÇAKIR

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI  
2016, 78 Sayfa

Bal antik çağlardan beri yiyecek olarak kullanıldığı gibi medikal amaçlı olarak da kullanılmakta olan eşsiz ve mucizevi bir besin maddesidir. Türkiye benzersiz bitki çeşitliliğine sahip olması nedeniyle bal üretim potansiyeli açısından eşsiz bir değere sahiptir. Balın insan sağlığı için apiterapik değeri Anadolu'da 4000 bin yıl öncesinden biliniyordu. Günümüzde de balın hala iyi bir şifa kaynağı olduğu, fakat çeşitli nedenlerden dolayı bazı balların daha çok tercih edildiği görülmektedir. Yapılan bilimsel araştırmalar koyu renkli balların antioksidan aktiviteler yönünden açık renkli çiçek ballarından daha değerli olduğunu ortaya çıkarmıştır. Püren balının antioksidan ve çeşitli biyolojik aktif özellikleri orta Avrupa ülkelerinde iyi bilinmesine rağmen, ülkemiz florasına ait püren (*Erica spp.* veya *Calluna spp.*) balları hakkında bilimsel çalışmalar yetersizdir. Amaç Türkiye florasına ait püren ballarının kimyasal karakterizasyonu ile biyoaktif potansiyellerini ortaya çıkarmaktır. 2014-2015 yıllarına ait Muğla yöresinden toplanan monofloral püren ballarının fiziksel (nem, Briks<sup>o</sup>, renk, optik rotasyon, iletkenlik, pH), kimyasal (şeker içeriği, prolin, diastaz, HMF) ve biyoaktif özellikleri (toplam fenolik, toplam flavanoid, toplam tanen miktarları ile antiradikal, antioksidan kapasite ile antibakteriyel aktiviteleri) incelendi.

**Anahtar Kelimeler:** Püren, Bal, Biyoaktiflik, Fenolik İçerik, Apiterapi.

Master Thesis

SUMMARY  
CHARACTERIZATION OF HEATHER HONEYS IN MUĞLA FLORAS

Hilal Ebru ÇAKIR

Karadeniz Technical University  
The Graduate of Natural and Applied Sciences  
Chemistry Graduate Program  
Supervisor: Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI  
2016, 78 Page

Honey is a unique and miraculous nutrient used both for medical purposes and as food since ancient times. Turkey has a unique value in terms of honey production potential due to its incomparable plant diversity. Apitherapy value of honey for human health were known 4000 years ago in Anatolia. Today also, honey is still a good source of healing, but is seen as more preferable for several reasons some honey. Scientific research has revealed that dark colored honey is more valuable than light colored floral honey. Although antioxidants and various biologically active properties of heater honey (*Erica spp.* or *Calluna spp.*) well known in central European countries, scientific studies are insufficient in our country. The aim of this thesis find out chemical characterization and bioactive potential of heater honey in Turkey. Collected from the Muğla region monofloral of heater honey physical parameters (humidity, Brix°, color, optical rotation, conductivity, pH); chemical parameters (sugar content, proline, diastase, HMF) and bioactive properties (total phenolic, total flavonoids, total tannins, antiradical, antioxidant capacity antibacterial activity) were studied.

**Keywords:** Heather, Honey, Bioactivity, Phenolic Content, Apitherapy.

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Kondanse ve hidrolizlenebilir tanenler, flavonoidler, hidroksisünamik asit, hidroksibenzoik asit genel yapıları.....	8
Şekil 2. Prolin kalibrasyon grafiği .....	42
Şekil 3. RID ile şeker standartlarının kromatogramı. (1) Riboz, (2) Ksiloz, (3) Arabinoz, (4)Fruktoz, (5) Glukoz, (6) Sukroz, (7) Maltoz (8) Teraloz, (9) Melebioz, (10) Melezitoz .....	43
Şekil 4. Toplam fenolik madde kalibrasyon grafiği .....	47
Şekil 5. Toplam flavonoid madde kalibrasyon grafiği .....	47
Şekil 6. Toplam tanen kalibrasyon grafiği.....	48
Şekil 7. FRAP kalibrasyon grafiği.....	49
Şekil 8. Gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı disk difüzyon metodu .....	52
Şekil 9. Mayalara karşı disk difüzyon metodu .....	52

## TABLULAR DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1. En sık karşılaşılan serbest radikaller ve bazı özellikleri.....	5
Tablo 2. Doğal antioksidanların sınıflandırılması .....	6
Tablo 3. Polifenollerin sınıflandırılması .....	7
Tablo 4. Kullanılan cihaz ve gereçler, marka/modelleri .....	16
Tablo 5. Kullanılan kimyasallar ve satın alındığı Firma .....	17
Tablo 6. Kullanılan kimyasal çözeltiler ve hazırlanışları .....	18
Tablo 7. Numune ismi ve numunenin toplandığı ilçe/köy/yıl .....	22
Tablo 8. Diastaz aktivite tayini için pipetleme işlemi .....	26
Tablo 9. RP-HPLC-UV gradient programı.....	29
Tablo 10. Toplam polifenol tayininde yapılan pipetleme işlemi.....	30
Tablo 11. Toplam flavonoid tayininde yapılan pipetleme işlemi .....	31
Tablo 12. Toplam tanen tayininde yapılan pipetleme işlemi.....	31
Tablo 13. FRAP tayininde yapılan pipetleme işlemi.....	32
Tablo 14. DPPH• yöntemi için yapılan pipetlemeler .....	33
Tablo 15. Antimikrobiyal aktivite testinde kullanılan mikroorganizmalar .....	34
Tablo 16. Püren ballarının polen yüzdeleri.....	35
Tablo 17. Püren ballarının optik çevirme, nem, briks, iletkenlik ve pH sonuçları ..	39
Tablo 18. Bal örneklerin diastaz, HMF ve prolin değeri sonuçları .....	41
Tablo 19. Şeker standartlarının validasyonu (LOD ve LOQ) değerleri .....	43
Tablo 20. Balların şeker analiz sonuçları .....	44
Tablo 21. RP-HPLC-UV fenolik bileşen validasyon parametreleri .....	45
Tablo 22. RP-HPLC-UV ile bal örneklerinin fenolik bileşen sonuçları .....	46
Tablo 23. Toplam polifenol, toplam flavonoid, toplam tanen, FRAP ve DPPH testleri sonucu.....	49
Tablo 24. Korelasyon tablosu .....	50
Tablo 25. Bal örneklerinin antimikrobiyal aktivite sonucu .....	51

## SEMBOLLER DİZİNİ

a	: -a, yeşillik; +a, kırmızılık
Ag	: Gümüş
Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	: Alüminyum Nitrat
b	: -b, mavilik; +b, sarılık
CH <sub>3</sub> COONa.3H <sub>2</sub> O	: Sodyum Asetat Trihidrat
Cl	: Klor
Cu	: Bakır
cm	: Santimetre
CH <sub>3</sub> COOH	: Asetik Asit
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DU	: Diastaz Aktivitesi
Fe	: Demir
FeCl <sub>3</sub>	: Demir (III) Klorür
FRAP	: Ferric Reducing Antioksidant Power (Demir (III) İndirgeme Antioksidan Güç)
g	: Gram
GAE	: Gallik Asit Eşdeğeri
GSH	: Redükte Glutatyon
HCl	: Hidroklorik Asit
HMF	: 5-hidroksimetilfurfural
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
K	: Potasyum
KE	: Kateşin Eşdeğeri
kg	: Kilogram
KI	: Potasyum İyodür
TT	: Toplam Tanen Miktarı
L	: Litre

L	: Koyuluk-Açıklık ( 0: siyah; 100:beyaz)
LC	: Likit Kromatografi
LOD	: Limit Of Detection (Algılama sınırı)
LOQ	: Limit Of Quantification Measurement (Kantitatif Ölçme Sınırı)
m	: Metre
<i>m</i>	: Eğim
Mg	: Magnezyum
mM	: Milimolar
M	: Molar
mg	: Miligram
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
mm	: Milimetre
mL	: Mililitre
Mn	: Mangan
µg	: Mikrogram
µS	: Mikrosimens
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
Na	: Sodyum
NaCl	: Sodyum Klorür
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	: Sodyum Karbonat
NaOCl	: Sodyum Hipoklorit
NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO	: Amonyum Asetat
NaOH	: Sodyum Hidroksit
nm	: Nanometre
<i>o</i> -	: Orto Pozisyon
-OH	: Hidroksil Grubu
<i>p</i> -	: Para Pozisyon
P	: Fosfor
Pb	: Kurşun
pH	: Hidrojen İyonu Aktivitesi

R	: Fonksiyonel Grup
RID	: Refraktif İndeks Dedektör
R <sup>2</sup>	: Korelasyon Katsayısı
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
RP	: Reverse Phase (Ters Faz)
%RSD	: Yüzde Bağlı Standart Sapma (%Relative Standard Deviation)
RT	: Retention Time (Alıkonma Süresi)
SC <sub>50</sub>	: % 50 Scavenging Concentration
SD	: Standart Sapma
sn	: Saniye
SPSS	: Statistical Package for Social Sciences
t.e.	: Tespit Edilemedi
TEAC	: Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite
TF	: Toplam Flavonoid Madde
TGK	: Türk Gıda Kodeksi
TP	: Toplam Fenolik Madde
TPTZ	: 2,4,6-tri(2-Pyridyl)-s-triazine
Troloks <sup>®</sup>	: 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
TSE	: Türk Standartları Enstitüsü
T.E.	: Tespit edilemedi
QE	: Quercetin Eşdeğeri
Quercetin	: 3,3',4',5,7-Pentahidroksi Flavon Hidrat
UV-VIS	: Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi
v/v	: Hacim/Hacim
°C	: Santigrat Derece
μ	: Mikro
μg	: Mikrogram
%	: Yüzde
●	: Radikal
z.ç.	: Zon Çapı

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Eskiden beri insanoğlu hastalıkların tedavisinde arı ürünlerinden yararlanmıştır. Arı ürünleriyle (bal, polen, propolis, arı sütü, arı zehri, bal mumu, arı ekmeği) yapılan tüm tedavi şekillerine apiterapi denir. Apiterapik ürünlerin biyolojik potansiyelleri toplandıkları bölgenin coğrafik ve floral özelliklerine bağlı olarak değişim gösterir (Kaskoniene, 2010). Türkiye bulunduğu üç farklı fitocoğrafik konumundan dolayı dünyanın floral zenginlik açısından önde gelen bölgelerinden biri olup, ölkemiz arıcılık potansiyeli ve bal üretimi bakımından dünyada ön sıralarda gelmektedir. Zengin bitki çeşitliliği ile birlikte Türkiye zengin bal nektarı bulunduran bitkiler florasına sahiptir. Ayrıca yılın üç mevsimi bal üretimine uygun iklim yapısından dolayı Türkiye’de bal çeşitliliği ve verimi yüksektir. Ancak Türkiye gerek apiterapik, gerekse ürünlerin tanıtımı yönünden ön planda yer alamamakta ve dünyadaki tanınırlığı bakımından hak ettiği yeri elde edememektedir.

Bal hem çok iyi bir besin kaynağı hem de çok iyi bir apiterapik ajandır. Son 10-15 yıldır Türkiye de arıcılık faaliyetlerine paralel olarak arı ürünlerine olan ilgi de artmıştır. Özellikle apiterapik potansiyeli yüksek ballar her geçen gün araştırılıp literatüre ilave edilmektedir. Apiterapik amaçlı kullanılacak balların bileşimlerinin ve standardizasyonlarının iyi bilinmesi gerekmektedir. Bu nedenle dünyada monofloral olarak üretilen ballara verilen önemde artmaktadır. Balın biyoaktif özelliği yapısında bulunan fenolik bileşenlerin türüne ve kantitesine bağlı olarak değişmektedir. Yüksek fenolik içerikli ballar tıbbi açıdan daha değerli ballar sınıfında kategorize edilirler. Türkiye’de monofloral olarak üretilen ve fenolik içeriği yüksek ballardan kestane, çam, meşe, ardıç balı gibi özellikle orman balları bulunmaktadır. Bu ballar fenolik içerik bakımından zengin ve koyu renkli ballardır. Püren balı da koyu renkli bir bal olup orman altı bir çalılık olan püren (*Calluna spp.* ve *Erica spp.*) çiçeklerinden üretilmektedir.

Türkiye’de püren daha çok kıyı bölgelerde ve monofloral olarak daha çok Ege bölgesi kıyılarında eylöl-kasım aylarında çam balından sonra sağılmaktadır. Literatürde özellikle Avrupa’da çok iyi bir yere sahip olan püren balının özellikle Avrupa’da çok tercih edilmesi, kaliteli bir bal türü olması, Türkiye florasındaki bu türün yeterince çalışılmamış olması, bilimsel anlamdaki bu boşluğun Türkiye açısından kısmen de olsa doldurulması amacıyla Türkiye florasına ait olan bu balın karakterizasyonu hedeflenmiştir.



Ancak püren balı ülkemizde ne bilimsel çevrelerce ne de halk arasında çok fazla bilinmemektedir.

Yapılan bu tez ile, Türkiye florasına ait monofloral püren ballarının fiziksel, kimyasal, biyokimyasal, biyoaktif ve antimikrobiyal özellikleri ortaya çıkarılmış olup literatürde ki boşluk doldurulmaya çalışılmıştır. Yapılacak çalışmalar sonucunda elde edilecek veriler ışığında, hem üreticilere hem de ülke ekonomisine katkıda bulunması hedeflenmektedir. Ayrıca Avrupa'da çok değerli bulunan bu balın ihracatı noktasında yeni gelişmeleri teşvik edeceği inancındayız. Elde edilecek veriler Türk Gıda Kodeksine ait püren ballarının standardizasyonuna da katkı sağlayacak ve bölgede arıcılığının gelişmesinin de yolunu da açacaktır.

## 1.2. Bal

Bal, arılar (*Apis mellifera*) tarafından çiçek ve ağaç salgılarından toplanan, insanoğlu tarafından hem şifa kaynağı olarak kullanılan, hem de geçmişten günümüze kadar gelen bir besin kaynağıdır (Aparna vd., 1999; Kaskoniene vd., 2010). Türk Gıda Kodeksi'nin (TGK) 2012/58 sayılı Bal Tebliği'ne göre bal: Bitki nektarlarının, bitkilerin canlı kısımlarının salgılarının veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin salgılarının bal arısı tarafından toplandıktan sonra kendine özgü maddelerle birleştirilerek değişikliğe uğrattığı, su içeriğini düşürdüğü ve petekte depolayarak olgunlaştırdığı doğal ürünü ifade eder. Bal orjinine göre; çiçek balları (bitki nektarlarından elde edilir) ve salgı balları (bitkilerin canlı kısımlarının salgılarından veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin -Hemiptera- salgılarından elde edilir) olarak ikiye ayrılır (TGK, 2012).

Balın bileşiminin bulunduğu flora, çevre koşullarına, koloninin durumuna ve iklim şartlarına göre değişiklik gösterdiği ve balın kalitesinin kimyasal bileşimine ve floral orjinine bağlı olarak değiştiği ifade edilmektedir (Anklam, 1998; White, 1979). Ayrıca yapılan araştırmalarda (Alvarez-Suarez vd., 2010) balın beslenme ve sağlık üzerine olumlu pek çok etkilerinin olduğu da ifade edilmiştir. Bal, ana bileşen olarak karbohidrat ve suyun yanında organik asitler, aminoasitler, proteinler, uçucu bileşenler, enzimler ve fenolik bileşenler de içermektedir. Balın bileşimi çeşitlilik göstermekle birlikte tipik bir bal ortalama olarak % 65-75 şeker, % 16-20 su, % 0,18 kül, %0.5-1.5 polifenol ve protein gibi bileşenlerin yanı sıra koruyucu olarak  $\alpha$ -tokoferol, askorbik asit, flavonoidler ve diğer

fenolikler, glukoz oksidaz, katalaz ve peroksidaz gibi enzimleri de içermektedir (White, 1979). Bunların dışında da bileşiminde yaklaşık olarak 200 bileşik bulunan balın şifa kaynağı olarak önemi ve kullanımı son yıllarda artmaya devam etmektedir. Bu zengin ve kompleks bileşimi sayesinde bal, alternatif tıp uygulamalarının başında yer almaktadır. Balın esas kalitesini belirleyen faktör balın biyolojik değeri olup bundan sorumlu bileşikler, balın yapısında % 1–2 oranında bulunabilen ve tamamen doğadan gelen, sekonder metabolit ajan olarak da adlandırılan yüzlerce polifenolik bileşik, vitamin, enzim ve mineral onun antioksidan, antimikrobiyal, antiviral, anti-inflamatuvar, anti-tümoral özelliklerinden sorumludur (Russel, 1983; Bogdanov, 1984; Cook ve Samman, 1996).

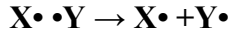
Türkiye’de çok değişik türden bal üretilmesine rağmen koyu renkli ballar arasında en yaygın olarak bilinenler kestane balı başta olmak üzere meşe ve ardıç ballarıdır. Özellikle kestane balı halk tarafından tercih edilmesiyle literatüre konu olmasıyla da öne çıkan ballardandır. Fakat Türkiye’de üretilen ve koyu renkli bir bal türü olan püren balının değeri gerek halk arasında ve gerekse bilimsel çevrelerce çok fazla bilinmemektedir. Özellikle Avrupa’da literatüre pek çok olumlu yönüyle konu olan bu balın Türkiye florası açısından biyoaktif özellikleri şu ana kadar henüz aydınlatılamamıştır.

Püren (heather, süpürge çalısı) balı dünyada genellikle Ericaceae familyasına ait türler için kullanılan ortak bir isim olup bazı ülkelerde *Calluna*, bazı ülkelerde ise *Erica* türlerinden elde edilen balların ortak ismi olarak ifade edilmektedir. Ülkemizde Akdeniz, Ege, Trakya ve Karadeniz bölgelerinde doğal yayılış gösteren pürenin ilkbahar ve sonbaharda çiçeklenen türleri mevcuttur. Türkiye’de özellikle sonbahar yağışları sonrasında açan püren çiçekleri pembe ve mor renkli olup arılar için zengin nektar ve polen kaynağıdır. Püren balı kendine has aromalı, koyu renkli, hafif acımtırak, yanık şeker kokusu ve tadında, kıvamlı ve üretiminin yapıldığı yörelerde dahi çok fazla bilinmeyen bir bal türüdür. Püren (heather) balı Portekizde *Erica* türlerinden, İspanya ve Fransa’da hem *Calluna* hemde *Erica* türlerinden, Yeni Zelanda’da *Calluna* türlerinden üretilmektedir (Ferrerres,1996b). Dünyada Yeni Zelanda, Fransa, İspanya, Portekiz gibi pek çok ülkede, çok sayıda farklı araştırmaya konu olmuş bu bal türünde, Türkiye florasına ait olarak yeterli bilgiye rastlanamamıştır.

### 1.3. Serbest Radikaller, Antioksidanlar ve Polifenoller

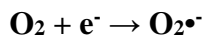
Serbest radikaller dış orbitallerinde ortaklanmamış elektron bulunduran, kısa ömürlü, reaktif moleküllerdir. Bu tip moleküller, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler (Halliwell ve Gutteridge, 1990). Serbest radikallerin en önemlileri reaktif oksijen türleri (ROT) dir. Reaktif oksijen türleri DNA, lipit, protein, çoklu doymamış yağ asitleri ve karbohidratlar gibi birçok önemli biyomolekülün hasarından sorumludur. Oksidasyon, bir atom ya da molekülün bir alıcıya elektron vermesi ile meydana gelen yükseltgenme basamağıdır. Bu durum oksidatif stres olarak ifade edilir. Reaktif türlerin zararlı etkilerinin temel sebebi radikal olmaları, radikal oluşumuna sebep olabilmeleri veya yükseltgenme potansiyellerinin daha yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Serbest radikallerin başlıca sigara, alkol ve lipit metabolizması ürünleri, virüsler, güneş ışınları, X ışınları ve kozmik ışınlar, sanayi atıkları, otomobil egzoz gazları, ozon, ağır metaller, kirli su ve havadan da oluşabildiği bilinmektedir (Akkuş, 1995; Onat vd., 2002; Sies, 1991). Serbest radikaller üç temel yolla oluşur (Akkuş, 1995; Onat vd., 2002):

1. Kovalent Bağların Homolitik Kırılması İle:



2. Normal Bir Molekülün Elektron Kaybetmesi İle: Askorbik asit ve tokoferol gibi hücrel antioksidanlar, radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşur.

3. Normal Bir Moleküle Tek Bir Elektron Transferi İle:



En sık karşılaşılan serbest radikaller ve bazı özellikleri Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. En sık karşılaşılan serbest radikaller ve bazı özellikleri

Serbest Radikalin ve Radikal Üreten Türün		
Adı	Simgesi	Kimliği
Hidrojen radikali	H <sup>•</sup>	Bilinen en basit radikal.
Süperoksit radikali	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Oksijen metabolizmasının ilk ana ürünü.
Hidroksil radikali	OH <sup>•</sup>	En toksik oksijen metaboliti radikali.
Hidrojen peroksit	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Reaktivitesi çok düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf.
Singlet oksijen	O <sub>2</sub>	Yarılanma ömrü kısa, güçlü oksidatif form.
Perhidroksi radikali	HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Lipidlerde hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu artırır.
Peroksil radikali	RCOO <sup>•-</sup>	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipidlere lokalize olur.
Triklorometil radikali	CCl <sub>3</sub> <sup>•</sup>	CCl <sub>4</sub> metabolizması ürünü, karaciğerde üretilir.
Tiyil radikali	RS <sup>•</sup>	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içeren türlerdir.
Alkoksil radikali	RO <sup>•</sup>	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti.
Nitrik oksit	NO <sup>•</sup>	L-argininden <i>in vivo</i> üretilir.
Peroksinitrit	NO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	NO <sup>•</sup> 'in oksijen ile reaksiyonundan üretilir.

Oksidatif stresin ROT'ların neden olduğu hücre hasarları sonucu bir çok hastalığa neden olduğu düşünülmektedir. Yapılan pek çok çalışmada ateroskleroz (Halliwell ve Gutteridge, 1990), yaşlanma (Hipkiss, 2007), diabetes mellitus (Akkuş, 1995), Alzheimer hastalığı; Parkinson hastalığı (Dauer ve Przedborski, 2003; Mosley vd., 2006), sigara kullanımı (Zalata vd., 2007; Kösecik vd., 2005) ve hava kirliliğinin (Tao vd., 2003) neden olduğu rahatsızlıklar gibi akciğer hastalıkları, çeşitli kanser türleri, felç, hipertansiyon, romatoid artrit ve multiple sklerosis gibi otoimmün hastalıklar, alerji; astım, septik şok, inflamasyon gibi klinik durumlara serbest oksijen radikallerinin katıldığı belirtilmiştir.

Antioksidanlar, radikallerin etkisiyle meydana gelen oksidasyonu yavaşlatan veya durduran ya da oluşmasını engelleyen her türlü moleküle denilmektedir (Young ve Woodside, 2001). Vücudumuzda kalkan görevi yapan bu kimyasal bileşiklerden bazıları kendi elektronlarını vererek serbest radikalleri nötralize ederken bu sırada serbest radikal

haline gelmemektedirler (Prior ve Cao, 2000). Antimutajenik, antikarsinojenik, antiaging gibi birçok biyolojik fonksiyonun bu antioksidanlardan kaynaklandığı bilinmektedir (Cook ve Samman, 1996). Antioksidanların insan sağlığındaki yerini belirleyen en önemli faktörler, onların kimyasal yapıları, çözünürlükleri, yapı/aktivite ilişkileri ve doğal kaynaklardan elde edilmeleridir (Kaur ve Kapoor, 2001). Antioksidanlar doğal antioksidanlar ve sentetik antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılır. Doğal antioksidanlar da genel olarak bakıldığında endojen ve eksojen antioksidanlar olarak iki sınıfa ayrılır. Doğal antioksidanlar Tablo 2’de özetlenmiştir.

Tablo 2. Doğal antioksidanların sınıflandırılması

<b>Endojen Antioksidanlar</b>		<b>Eksojen Antioksidanlar</b>
<b>Enzimatik Antioksidanlar</b>	<b>Enzimatik Olmayan Antioksidanlar</b>	
Süperoksit Dismutaz	Glutasyon (GSH)	Askorbik Asit (C Vitamini)
Katalaz	Ürik Asit	Tokoferoller (E vitamini)
Glutasyon Peroksidaz	$\alpha$ -Lipoik Asit	Karotenoidler ( $\beta$ -Karoten)
Glutasyon Redüktaz	Laktoferrin	Polifenoller
Glutasyon-S-Transferazlar	Ferritin	Folik Asit
Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz	Bilirubin	
	Melatonin	

Endojen (organizma tarafından sentezlenen) antioksidanlar kendi aralarında enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak ikiye ayrılırlar (Thomas, 1995; Blomhoff, 2005; Jerry vd., 2000). Enzimatik olan antioksidanların en bilinenleri süperoksit dismutaz, glutasyon peroksidaz, katalaz ve hidroperoksidaz olup enzimatik olmayan antioksidanlar ise indirgenmiş glutasyon (GSH), bilirubin, ferritin, albumin, seruloplazmin, melatonin, sistein, metiyonin, laktoferrin, transferrin, haptoglobülin ve ürik asit ile en bilinenleridir. Eksojen (dışarıdan besinlerle alınan) antioksidan ise daha çok bitkiler tarafından sentezlenen çeşitli vitamin ( $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten, askorbik asit, folik asit) ve fenolik maddeler olup dışarıdan organizmaya alınıp etkinlik göstermektedirler (Sara, 2013; Şahin, 2014).

Birden fazla hidroksil kökü içeren fenolik maddelere ise polifenoller denir. Polifenoller Tablo 3’te özetlenmiştir. Özetle bilinen tüm fenolik bileşikler, basit

fenollerdeki benzen halkasına farklı radikal grupların bağlanması ile oluşmuşlardır (Hallaç, 2009; Karaçalı, 2002). Polifenoller; bitki dünyasının büyük bir kısmında mevcut olan, fitokimyasalların en geniş kategorilerinden birini oluşturan ve insan yaşamında gerekli olan bileşiklerdir. Bitki polifenollerini multifonksiyonel bileşikler olup indirgeme aracı, hidrojen atom-donör antioksidanlar ve singlet oksijen söndürücü olarak, bazıları metal iyonu şelatlama sahip antioksidanlar olarak davranırlar (Rice-Evans, 1996).

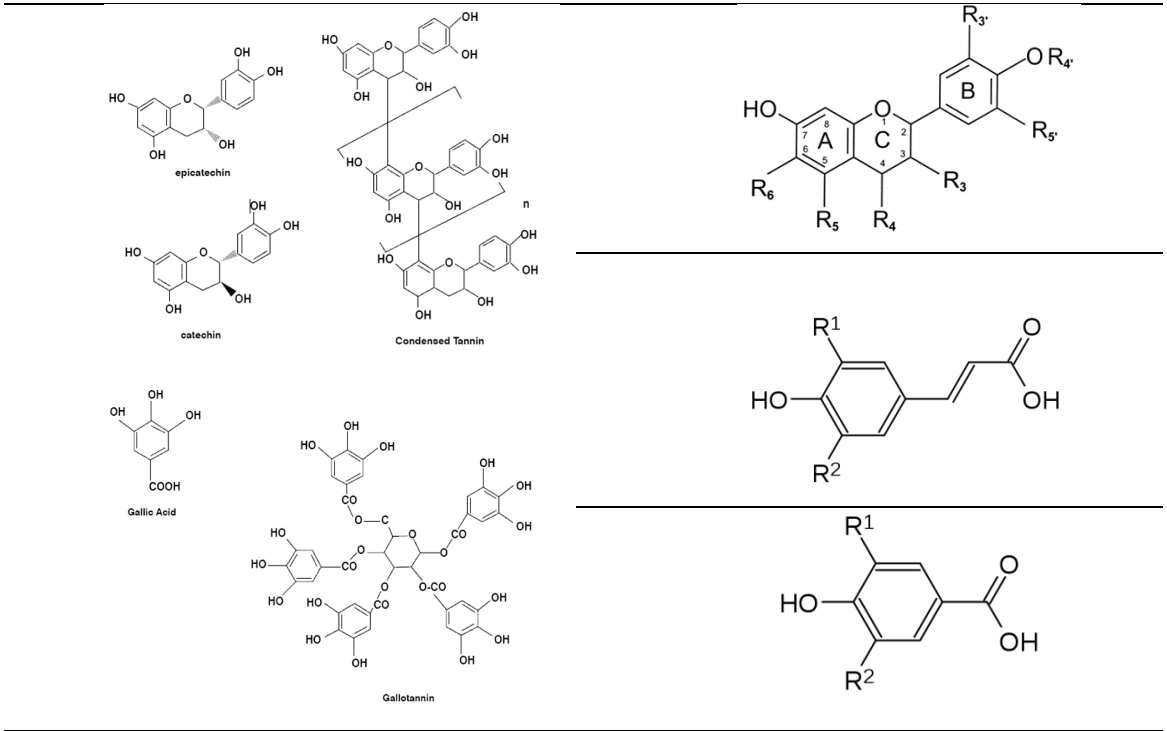
Besin fenolikleri; flavonoidleri, fenolik asitleri ve fenolik polimerleri içerir. Fenolik asit grubunun üye başlıkları, hidroksisinnamik asit türevleri (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), hidroksibenzoik asit türevleri (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>)'dir. Fenolik asitlerin çoğunu hidroksi sinamik asitler oluşturur (Cadenas ve Packer, 2002).

Tablo 3'te bu başlıklar sınıflandırılmıştır.

Tablo 3. Polifenollerin sınıflandırılması

<b>Polifenoller</b>		
<b>Flavonoid olmayan</b>	<b>Flavonoidler</b>	<b>Fenolik Asitler</b>
Hidrolizlenebilir Tanenler	Flavonoller	Hidroksisinnamik asit türevleri
Kondanse Tanenler	Flavonlar	Hidroksibenzoik asit türevleri
	İzoflavonlar	
	Flavononlar	
	Antosiyaninler	
	Flavanoller	

Flavanoidler, bitkilerin doğal yapılarında bulunan polifenolik antioksidanlardır. Bu bileşikler bitkinin büyüme ve gelişmesini etkiledikleri gibi, hastalık etmenlerine karşı savunma sisteminin de bir parçasını oluştururlar ve bitki pigmentleri olarak bilinirler. Flavonoidlerin farmakolojik, antimikrobiyal, antioksidan, antifungal, anti-inflamatuar, antialerjik, antikanserojen özelliklerinin olduğu da bilinmektedir (Hallaç, 2009; Havsteen, 2002).



Şekil 1. Kondanse ve hidrolizlenebilir tanenler, flavonoidler, hidroksisanimik asit, hidroksibenzoik asit genel yapıları

Polifenollerde bileşiğin yapısı ile antioksidan kapasitesi ilişkilidir, fenolik bileşiklerde –OH grubu sayısı, flavonoidlerde B halkasının 5-OH, 3-OH ve 4-OH grupları olması antioksidan aktivite üzerinde etkilidir (Cotelle vd., 1996; Çimen, 1999). Tanenler ise çok sayıda hidroksil grubu ve fonksiyonel grup içermektedir.

#### 1.4. Antimikrobiyal Aktivite

Mikroorganizma tarafından üretilen veya sentetik olarak elde edilen ve mikroorganizmaları öldüren veya gelişmesini baskılayan, gıdalarda istenmeyen ancak herhangi bir nedenle bulunma olasılığı olan bakteri, küf, maya, patojen veya patojen olmayan her türlü mikroorganizmayı ortamdaki yok etmek, çoğalma veya faaliyetlerini önlemek için gıdalara katılan her türlü kimyasal maddeye antimikrobiyal madde denir (BSTS, 1999). Organizmaları öldüren maddeler sidal maddeler olarak isimlendirilir ve aldığı ön ek öldürülen organizmanın tipini işaret etmektedir. Dolayısıyla bakteriler, funguslar ve virüsleri öldüren maddeler sırasıyla bakteriyosidal, fungusidal ve virüsidal maddeler olarak isimlendirilir. Organizmayı öldürmeyen, buna karşılık sadece üremesini engelleyen maddeler statik maddeler olarak isimlendirilir ve bunlar bakteriyostatik,

fungistatik ve viristatik maddeler olarak isimlendirilirler (Madigan ve Martinko, 2010). Antibakteriyel duyarlılık testlerinde "difüzyon" (DDM; disk difüzyon yöntemi) ve "dilüsyon" (MİK; minimum inhibisyon konsantrasyonu) olmak üzere başlıca iki metod kullanılır.

Antimikrobiyal aktivite belirleme çalışmalarında kullanılan en yaygın çalışma disk difüzyon yöntemidir. Bu yöntemde, test edilen mikroorganizma ile inokule edilmiş katı besiyeri üzerinde yer alan disk ya da oluşturulan havuzcuk veya kuyucuğa antimikrobiyal madde eklenir. Besiyeri içerisinde antimikrobiyal maddenin oluşturduğu aktiviteye bağlı olarak oluşan inhibisyon zon çapları ölçülerek ekstraktın antimikrobiyal etkisi belirlenmektedir. Bu yöntem rutin bir şekilde patojenlerde antibiyotik hassasiyetini test etmek için kullanılmaktadır (Şahin, 2006; Madigan ve Martinko, 2010).

Farklı konsantrasyonlarda test edilen antimikrobiyal maddelerin, mikrobiyal gelişimi tamamen yok ettiği veya engellediği en düşük derişim minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) olarak tanımlanmaktadır. MİK belirlemek için sıvı besiyerlerinde veya katı besiyerlerinde antimikrobiyal etkiye sahip olan bileşiklerin seyreltik olarak belirli oranlarda eklenmesiyle hazırlanan besi ortamları kullanılmaktadır. Bir antimikrobiyal madde için MİK değeri mikroorganizma, inkübasyon sıcaklığı ve inokulum miktarı gibi analiz koşullarına bağlı olarak değişebilmektedir (Şahin, 2006).

### **1.5. Kromatografi ve HPLC**

Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit faz diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı sistemde ayrılması, tanınması ve saflaştırılması yöntemlerinin genel adıdır. Bu bileşenlerden sabit faz bir kolon içersine doldurulmuş veya düz bir zemin üzerine yayılmış herhangi bir katı veya katı üzerine emdirilmiş bir sıvı, hareketli faz ise sıvı, gaz veya süperkritik bir akışkan olabilir (Ulusoy, 2010). Sıvı kromatografisi hareketli fazın sıvı, sabit fazın ise sıvı veya katı olduğu kromatografi çeşididir. Hareketli faz sabit fazın içinden geçtikçe çözülmüş moleküller iki faz arasında dağılır ve sabit faza daha az ilgisi olan çözülmüş yapılar daha çok ilgisi olanlara oranla hareketli fazda uzun süre kalırlar. Sıvı kromatografisinde sabit faz küçük çaplı partiküllerden oluştuğunda ise yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) olarak adlandırılır.



HPLC (yüksek basınçlı-performanslı sıvı kromatografisi); sıvı kromatografisinin en yaygın olarak kullanılan şeklidir. HPLC; bir sıvıda çözülmüş olan bileşenlerin birbirlerinden ayrılmaları için, yüksek basınç altında, hareketli faz ile sürüklenirken bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşimlere girerek ve kolon içinde değişik hızlarla ilerleyerek kolonu değişik zamanlarda terk etmeleri esasına dayanır. Burada hareketli (taşıyıcı) faz olan sıvı, pompa yardımıyla kolona basıldığından yüksek akış hızındadır. Bu nedenle ayırma süresi kısadır ve tam olarak gerçekleşmektedir. Ayrılan bileşikler, kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle tespit edilip miktarıyla orantılı olarak kaydedilir. Uygun hareketli faz gradient programı geliştirildiğinde, ayırma kısa sürede ve tam olarak gerçekleştirilerek, zamandan ve kimyasal maddelerden tasarruf edilebilmektedir (Akyüz, 2007). HPLC'deki başlıca ayırım mekanizmaları; iyon değiştirici, partiyon (normal veya ters faz), adsorbsiyon, afinite ve eleme prensiplerine dayalıdır. Amino asitler, fenolik bileşikler, proteinler, karbonhidratlar, lipitler, nükleik asitler ve ilişkili bileşikler, vitaminler, hormonlar, metabolitler, antibiyotik ve bazı ilaçların saptanması ve miktarının belirlenmesinde kullanılmaktadır.

HPLC sisteminde izokratik ve gradient olmak üzere iki çeşit elüsyon uygulanabilir. İzokratik elüsyon, hareketli faz içeriğinin veya oranının analiz süresince değişmediği elüsyon tipidir. Tek pompa ve tek çözünenin kullanıldığı elüsyondur. Çözgen tek bileşen içerebileceği gibi çoklu bileşenlerden oluşan homojen bir karışım da olabilir. Çok sayıda pikin ayırımının söz konusu olduğu çalışmalarda genellikle yetersiz kaldığından, bu tür çalışmalarda gradient elüsyon tercih edilir. Gradient elüsyon, hareketli faz içeriğinin veya oranının analiz süresince değiştiği elüsyon tipidir. En fazla dört farklı hareketli faz kullanılabilir (Tekeli, 2012).

Kolon iç yapısı, porlu bir yapıda olup madde geçişini zorlaştırıcı bir yapıya sahiptir. Kolondan geçen maddeler kolon dolgu materyalinin özelliğine bağlı olarak tutulma ve alıkonmalara maruz kalarak istenilen ayırma gerçekleştirilmiş olur (Kafalı, 2008). Farklı boyutlardan kolonlar kullanılabilmesine rağmen, günümüzde 100–250 mm boyunda, 3–5 mm iç çaplı 5 µm sabit faz materyaliyle paketlenmiş kolonlar makul bir analiz süresinde yeterli ayırımı sağlamaktadır (Akyüz, 2011).

HPLC sisteminde, hareketli ve sabit fazı oluşturan maddelerin polarlıkları farklı olmalıdır. Çoğu HPLC yönteminde ayırmalar dağılma tiplerine göre çalışır. Dağılma kromatografisi hareketli ve sabit fazın bağıl polarlığına dayalı olarak iki temel forma ayrılır (Skoog, 1998). Normal faz (NP) kolonunda dolgu materyali polardır ve onla etkileşen

polar örneklerin alıkonma süreleri, daha az polar olan örneklere oranla daha fazladır. Bu nedenle örnek bileşenlerinden daha polar olanlar, kolondan daha geç çıkarlar ve ayırma gerçekleşir. Ters faz (RP) kolonunda ise sabit faz yüzeyinin apolar ve hareketli faz türleri olarak metanol, su-asetonitril karışımı gibi polar sıvılar kullanıldığı sıvı kromatografik teknik olarak adlandırılır. En polar analitler ilk elue edilirler ve analitin tutunması hareketli fazın hidrofobikliği arttıkça azalır. Yaklaşık olarak HPLC analizlerinin yüzde sekseni RP tipinde gerçekleştirilir. Ters faz kolonlar silikondan modifiye edilirler. Silika jelde modifiye olan oktil (C8) ve oktadesil (C18) en yaygın kullanılan fazlardır (Akyüz, 2007).

Sabit faz, partikül büyüklüğü, kolon uzunluğu, hareketli faz bileşimi, kolon sıcaklığı, akış hızı gibi faktörler bileşenlerin birbirinden ayrılmasında etkin rol oynarlar. Kullanılan dedektörün performansı; hassasiyet (LOD; limit of detection, LOQ; limit of quantification), seçicilik, lineerlik, kalitatif bilgi, güvenilirlik gibi hesaplanabilir değerlere göre değerlendirilir (Burnaz, 2013).

## 1.6. Literatür Özeti

Püren balı koyu renkli bir bal olup balın renginin yapısında bulunan çeşitli polifenolik ajanlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Castro-Vázquez vd., (2012)'ye göre monofloral balların uçucu bileşen ve duyu analizlerle tanımlanmasına dayalı olan çalışmada püren balları oldukça yüksek fenolik bileşen ve benzen içeriğiyle beraber, odunsu, baharatlı, olgun meyve, reçinems aromasıyla karakterize edilmiştir.

Günümüzde püren balının hoş aroma ve tadı nedeniyle en lezzetli ve yüksek kaliteli ballardan biri olarak kabul edildiği (Castro-Vázquez vd., 2012) belirtilmektedir. Ayrıca bu balın duyu ve kimyasal analiz açısından nadir olarak çalışıldığı da ifade edilmektedir. Püren balının kalitesini değerlendirmek ve küresel kalitesini korumak için depolama şartlarını tespit etmenin en iyi yolunun duyu ve analitik özelliklerin incelenmesi olduğu da Castro-Vázquez vd., (2012)'de ifade etmektedir. Yaptıkları çalışmada depolama sıcaklığının balın karakterine olan etkisini incelemişler ve sonuç olarak 10 °C sıcaklığında muhafaza edilen örneklerin orijinalliğini koruduğunu tespit etmişlerdir.

Balın bileşimi üretildiği floraya, çevre koşullarına, koloninin durumuna ve iklim şartlarına göre değişiklik göstermektedir (Anklam, 1998; White, 1979). Yapılan çalışmalarda püren balının yüksek fenolik madde içerdiği ve antioksidan kapasitesinin

yüksek olduğu bildirilmektedir (Castro-Vázquez vd., 2009; Alves vd., 2013; Jasicka-Misiak vd., 2012).

Ülkemiz florasına ait püren balları üzerine detaylı çalışma bulunmazken literatürde daha çok Balkanlar, İtalya, İspanya, Portekiz, Slovenya gibi ülkelerde püren ballarının yüksek polifenolik madde miktarı ve ona bağlı yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu bildirilmektedir (Jasicka-Misiak vd., 2012; Alves vd., 2013).

Balın doğal antioksidan özelliği ve biyolojik aktivitesi, içerisinde yüksek oranda bulunan fenolik asitler ve flavonoidlerden kaynaklanmaktadır (Pyrzyńska vd.,2009). Flavonoidler; antosiyaninler, antosiyanitler, flavonoller, iso-flavonollar ve flavonlar ile temsil edilen fenolik bileşiklerdir (Moise vd.,2013). Balın antioksidan olarak davrandığı bilinen C vitamini, E vitamini, enzimler, fenolik bileşenler gibi bileşenleri içermesinden dolayı doğal radikal süpürücü olarak kullanılabilmesi de ifade edilmektedir (Wilczyńska,2010). Toplam fenolik madde miktarının, balın biyolojik aktivitesinden sorumlu olması nedeniyle çok önemli olduğu belirtilmektedir (Küçük vd., 2007). Balın antioksidan ve radikal süpürücü özelliğinin içerisinde bulunan fenolik bileşenlerden kaynaklandığını belirtmektedirler (Aljadi ve Kamaruddin, 2004).

Balın klinik önemiyle ilgili Feás vd.,(2013) tarafından yapılan araştırmada balın fenolik içerik yönünden zengin olduğu, fenolik bileşenlerin flavonoidler (krisin, pinosembirin, pinobanksin, kuersetin, kampferol, luteolin, galangin, apigenin, hesperetin, myrisetin), fenolik asitler (kafeik, kumarik, ferulik, ellagik, klorogenik) stilbenler, lignanlar, tanenler ve okside polifenoller olduğunu bildirmektedirler (Estevinho vd.,2008). Ayrıca püren balı gibi koyu renkli ballardan açık renkli olanlara göre oldukça yüksek oranda fenolik bileşen ekstrakte edildiği de bildirilmektedir ( Ferreira vd.,2009).

*Erica spp.* ballarının ellagik, p-hidroksibenzoik, şiringik ve o-kumarik asitle karakterize edildiği ve -2Ellagik asit (gallik asitin dimerik türevi) ve myrisetin 3'-metil eterin *Erica spp* ballarında floral orjin belirlemede bir markör olabileceği ifade edilmektedir (Andrade vd.,1997; Ferreres vd.,1996a). Aynı zamanda aynı grubun başka bir çalışmasında absisik asitin püren balı için floral bir markör olduğu da ifade edilmektedir (Ferreres vd., 1996b).

Escuredo vd., (2013) yaptıkları çalışmada salgı balı ve kestane ballarının flavonoid içeriğini yüksek bulurken püren balının fenolik içeriğini en yüksek bulmuşlardır. Karbohidrat içeriğine bakıldığında da aynı çalışmada salgı ve kestane ballarının karbohidrat içeriğinin püren balından oldukça düşük olduğunu bulmuşlardır. Aynı

zamanda salgı ballarının ortalama fruktoz değeri en dūşükken püren ballarının en yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (Escuredo vd., 2013). Yüksek miktarda mineral içeriği, serbest asitliği ve nem içeriği ile püren ve süpürge otu ballarının diğer ballardan ayrıldığı ifade edilmiştir (Nozal Nalda vd., 2005).

Püren balının terapötik etkisinin (tedavi edici) incelenmesi ile ilgili pek fazla çalışma bulunmamaktadır. Doğal tedavi kaynaklarının araştırılmasının hızlı bir şekilde artmasıyla beraber, balın tedavi amaçlı kullanımına olan rağbet de artmaktadır (Feás,2013). Kafeik asit, kafeik asit fenil ester, krisin, galangin, kuersetin, asasetin, kamferol, pinosembrin, pinobanksin ve apigenin gibi balda bulunan fenolik bileşenlerin balın antikanser özelliği için önemli gruplar olduğu ifade edilmektedir (Jaganathan ve Mandal, 2009b).

Balın, kalp damar hatalıklarındaki etkisi ümit verici olan kuersetin, kafeik asit fenil ester (CAPE), asasetin, kamferol, galangin gibi çok fazla miktarda fenolik bileşeni yapısında barındırdığı ifade edilmektedir (Khalil ve Sulaiman,2010).

Castro-Vázquez vd., (2012) çalışmasında Avrupa'da üretilen 52 unifloral bal örneğinin HPLC ile polifenol içeriği belirlenerek farklı ballarda floral orjin belirlenmesi için bir markör bulunmaya çalışılmıştır. HPLC sonucunda elde ettikleri fenolik bileşen içeriğinin özellikle püren, ökaliptus, kestane, kolza ve ıhlamur gibi bazı ballarda floral orjin belirlenmede yararlı markörler olabileceğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak trans-trans-abssisik asit, cis-trans-absisik asit, ellagik asit, pinobanksin, apigenin, pinosembrin, krisin ve muhtemel tanımlanamayan markörlerin tespiti bu çalışmayla yapılmıştır. Portekiz püren ballarında spesifik bir markör olduğu bilinen absisik asitin oldukça yüksek oranlarda (400-1800mg/100g)bulunduğu fakat akasya, kolza, ıhlamur ballarında daha az miktarlarda bulunduğu ifade edilmektedir. Gallik asit dimeri ellagik asitin bütün analizi yapılan püren balı örneklerinde (300-1100mg/100g) bulunması, markör olmasının bir göstergesi olarak kabul edilmiştir (Vázquez vd.,2012).

Can vd., (2015), Türkiye florasına ait baskın ballar ile manuka ballarının fiziksel, kimyasal ve biyoaktif özellikleri bakımından karakterizasyonunun sağlanması ve antioksidan, antimikrobiyal aktivite yönünden bu balları karşılaştırılmak istemiştir. Yapılan çalışmada, Türkiyenin değişik coğrafik bölgelerinden toplanan yaklaşık 60 adet kestane, püren, çam, akasya, lavanta, çalba, hayıt, geven, meşe, ayçiçeği, ıhlamur, üçgül, va karışık çiçek bal numuneleri ile çalışmıştır. Elde edilen değerlere göre farklı floral özelliklere sahip balların farklı fiziksel, kimyasal ve biyoaktif bileşenlere sahip olduğu,

ancak koyu renkli balların daha fazla biyoaktif bileşene ve ona bağlı olarak daha yüksek biyolojik aktiviteye sahip olduğu bulundu. Çalışma ile Türkiye florasına ait kestane, meşe, püren, çam, akasya, geven, ayçiçeği, çalpa, hayıt, lavanta, ıhlamur ve üçgül ballarının antioksidan ve antimikrobiyal yönden manuka ballarına eşdeğer tıbbi potansiyele sahip olduğu ifade edilmiştir.

Ferreres vd., (1994) çalışmasında daha önce floral ballarda tespit edilmeyen myrisetin, myrisetin 3-metil eter, myrisetin 3'-metil eter ve trisetin a trioksigenated halkası B (3',4',5'-trioksigenation) halkası içeren 4 adet flavonoidi püren balında tespit etmiştir (Ferreres vd., 1994). Daha önce farklı floral orjinli bal örneklerinde ki flavonoidlerde tespit edilmeyen a trioksigenated halkası B (3',4',5'-trioksigenation) bileşeni içermesi nedeniyle püren balının floral orjinini belirlemede bir markör olarak kullanılabilceği önerilmektedir. Yöntem olarak semipreperatif ters faz HPLC ve sefadeks LH-20 kromatografisinin kombinasyonunu kullanmışlardır.

Balın antimikrobiyal özellikleri ve etki mekanizmasının izah edilmesi balın terapötik amaçla doğru kullanımında önem taşımaktadır (Feás vd., 2013). Bal antik Mısır'ı da içine alacak şekilde eski zamanlarda ilaç olarak kullanılmıştır (Molan, 2006a; Alnaimat, 2012).

Balın antimikrobiyal karakterinin fiziksel özelliklerine (pH, osmolarite), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve peroksit olmayan bileşenlere (lizozim, organik asitler, uçucu bileşenler, fenolik asitler, flavonoidler, 1,2-dikarbonil metilglioksal ve apidaecins, abaecin, hymenoaptaecin ve defensin gibi arı peptitleri) bağlı olduğu bildirilmiştir (Dias vd., 2008, Molan 1992, Weston 2000).

Balın yara iyileştirmede ki rolü de pek çok araştırmaya konu olmuştur. Balın yaraların kapanmasındaki (wound healing) rolü sağlık otoritelerince fark edilmiş ve balın antibakteriyal özelliğinin incelenmesinin önemini daha da artırmış ve balın bir yara kapatıcı olduğu çeşitli laboratuvar çalışmalarında da gösterilmiştir (Mullai ve Menon 2007; Molan, 2006b). Klinik çalışmalar için önemli bir potansiyele sahip olan balın sadece ticari olarak ulaşılabilenlerin değil, aynı zamanda bölgesel olanlarında da çalışmalarının yapılmasının gerekliliği Mullai ve Menon (2007) çalışmasında lokal balın MİK değerinin daha düşük olmasıyla desteklenmiştir. Hatta bazen lokal balların ticari ballardan terapötik açıdan eşit etkide, hatta bazen daha da etkili olduğu aynı çalışmada ifade edilmektedir. Feás vd., (2013) çalışmasında püren balının geniş bir antibakteriyal aktiviteye ve sınırlı oranda antifungal aktiviteye sahip olduğu, gram pozitif bakterilerin gram negatif bakterilere oranla daha duyarlı oldukları da ifade edilmiştir (Feás vd., 2013).

Püren balının boğaz iltihabı ya da ağız boşluğunda oluşan mukozanın tedavisinde, idrar yolu enfeksiyonu, prostat hastalıkları, böbrek taşı ve enterit tedavisinde kullanılan değerli bir tedavi yolu olduğu belirtilmektedir (Witczak, vd., 2011).

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Gereçler

Yapılan analizlerde kullanılan cihazlar marka/model olarak Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Kullanılan cihaz ve gereçler, marka/modelleri

Cihaz Adı	Marka/Model
LC-UV	Elite LaChrom, Hitachi, Japonya
LC-RID	Elite LaChrom, Hitachi, Japonya
UV-VIS	Thermo Scientific Evolution™ 201, UV-VIS
Spektrofotometre	Spectrophotometer, USA
pH metre	Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland
Hassas Terazı	Presica LX 320 A, Dietikon, Switzerland
Saf Su Cihazı	Human, Zeneer Navi UP, Song Pa-Ku, Seoul, Korea
Refraktometre	Atago, Germany
Polarimetre	Beta PPP7 Optical Activity, England
Kondüktometre	Bante Instrument, DDS-12DW
Renk Ölçüm Cihazı	Konica, Minolta, CR-5
Rotary evaporatör	IKA®-Werke, RV 05 Basic, Staufen, Germany
Vakum Pompası	Buchi Vacuum Pump V-700, Flawil, Switzerland
Vorteks Karıştırıcı	Labnet VX100, MO BIO Laboratories, Inc., NJ, USA
Etüv	Nüve, EN 400, Ankara, Türkiye
Magnetik Karıştırıcı	Heidolph MR HEI-Standard, Schwabach, Germany
Karıştırıcı Su Banyosu	Nüve, ST 402, Ankara, Türkiye
Yarı Otomatik Pipetler	Eppendorf Research® Plus Hamburg, Germany
Çalkalayıcı	Heidolph Promax 2020, Schwabach, Germany
Santrifüj	Hettict Universal 320R, Germany
Filtre	Whatman spartan 13/0,45 RC, Dassel, Germany

## 2.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Kullanılan kimyasallar ve satın alındığı firma Tablo 5’te verilmiştir.

Tablo 5. Kullanılan kimyasallar ve satın alındığı firma

<b>Kullanılan Kimyasal</b>	<b>Satın Alındığı Firma</b>
Gallik Asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Protokatekuik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
<i>p</i> -OH benzoik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Kateşin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Vanilik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Kafeik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Şiringik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Epikateşin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
<i>p</i> -kumarik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Ferulik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Rutin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
<i>t</i> -Sinnamik Asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Luteolin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Riboz	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Arabinoz	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Fruktoz	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Glukoz	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Galaktoz	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Sukroz	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Maltoz	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Teraloz	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Melebioz	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Melezitoz	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Vanilin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
TPTZ	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany



Tablo 5'in devamı

CH <sub>3</sub> COOH	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Troloks <sup>®</sup>	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
FeCl <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Folin-Ciocalteu's Phenol Reaktifi	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Formik asit	Merck, Darmstadt, Germany
Ninhidrin	Merck, Darmstadt, Germany
2-Propanol	Merck, Darmstadt, Germany
% 3'lük Ninhidrin	Merck, Darmstadt, Germany
Asetik Asit	Merck, Darmstadt, Germany
Metanol-LC Saflıkta	Merck, Darmstadt, Germany
Dietil Eter	Merck, Darmstadt, Germany
Etil Asetat	Merck, Darmstadt, Germany
NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO	Merck, Darmstadt, Germany
Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt, Germany
HCl	Merck, Darmstadt, Germany
NaOH	Merck, Darmstadt, Germany
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt, Germany
NaCH <sub>3</sub> COO.3H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, Germany
K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ].3H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, Germany
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, Germany
Quercetin	Lancaster, Morecambe, England

### 2.3. Çözeltiler

Çalışmada kullanılan kimyasal çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Kullanılan kimyasal çözeltiler ve hazırlanışları

#### HPLC-UV ile Fenolik Bileşen Analizleri İçin

Gallik Asit

Protokatekuik Asit

Tablo 6'nın devamı

<i>p</i> -OH Benzoik Asit	
Vanilik Asit	
Kaffeik Asit	%50-50 metanol-saf suda hazırlanan 1000 ppm'lik stok
Şiringik Asit	çözeltiden, 1-2-5-10-20-30 ppm olacak şekilde
<i>p</i> -Kumarik Asit	çözücüsüyle (%50-50 metanol-saf su) seyreltilir.
Ferulik Asit	
Kateşin	%100 metanolla hazırlanan 1000 ppm'lik stok çözeltiden,
Epikateşin	1-2-5-10-20-30 ppm olacak şekilde çözücüsüyle (%100
Rutin	metanol) seyreltilir.
<i>t</i> -Sinammik Asit	
Luteolin	
% 2'lik Asetik Asit	20 mL glasiyel asetik asit balon jodede saf su ile 1000 mL'ye tamamlanır.
%70-30 Asetonitril-Saf Su	700 mL asetonitril balon jodede saf su ile 1000 mL'ye tamamlanır.

#### **HPLC- RID ile Şeker Bileşen Analizi İçin**

Riboz	
Arabinoz	
Fruktoz	
Glukoz	
Galaktoz	%100 saf su ile hazırlanan 100 mg/mL'lik
Sukroz	stok çözeltiden, 1,25-2,5-5-10-20 mg/mL
Maltoz	olacak şekilde seyreltilir.
Teraloz	
Melebioz	
Melezitoz	

#### **Demir (III) İndirgeme/ Antioksidan Güç -FRAP İçin**

HCl (40 mM)	Yaklaşık 20 mL saf suyun üzerine % 37'lik HCl'den 340 µL ilave edildi ve saf suyla 100 mL'ye tamamlandı.
-------------	--

Tablo 6'nın devamı

TPTZ (10 mM)	234,249 mg TPTZ stok maddeden tartıldı, 75 mL 40 mM'lık HCl içinde çözüldü.
FeCl <sub>3</sub> (20 mM)	324,4 mg FeCl <sub>3</sub> destile suyla 100 mL'ye tamamlandı.
Asetat Tamponu (300 mM, pH 3,6)	2,325 g NaCH <sub>3</sub> COO.3H <sub>2</sub> O üzerine 12 mL glasiyel asetik asit ilave edildi.750 mL'ye saf suyla tamamlandı.
FRAP Reaktifi	300 mM pH 3,6 asetat tamponu: 10 mM TPTZ: 20 mM FeCl <sub>3</sub> (10:1:1) oranında karıştırılarak taze hazırlandı.
Trolox <sup>®</sup> (1000µM)	25,31 mg troloks metanolle 100 mL'ye tamamlandı. Metanolle 500, 250, 125, 62,5 µM'a seyreltildi.
<b>DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi İçin</b>	
DPPH Reaktifi (0,1 mM)	100 mL'si için; 3,94 mg DPPH tartılır, 90 mL metanolle çözüldü ve 100 mL'ye tamamlandı.
Troloks <sup>®</sup> (0,02 mg/mL)	10 mg troloks 10 mL metanolde çözümlenerek stok çözeltisi hazırlandı. 0,02 mg/mL'lik ara stok çözelti metanolle seyreltilerek kullanıldı.
<b>Toplam Fenolik Madde Miktarı İçin</b>	
0,5 N Folin Ciocalteu	2 N Folinden 1:4 oranında saf suyla seyreltilerek kullanıldı.
%10'luk Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 90 mL suda çözülür, 100 mL'ye tamamlandı.
GallikAsit (1 mg/mL)	Metanolle hazırlanan stok çözeltiden, 1-0,5-0,25- 0,125-0,0625 mg/mL olacak şekilde metanolle seyreltilerek hazırlandı.
<b>Toplam Flavonoid Madde Miktarı İçin</b>	
1 M NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO	7,7 g NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO 100 mL saf suda çözüldü.
%10 Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	1 g Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> 10 mL saf suda çözüldü.
Kuersetin (1 mg/mL)	Hazırlanan stok çözeltiden, 0,5-0,25-0,125-0,0625-0,03125 mg/mL olacak şekilde metanolle seyreltilerek hazırlandı.
<b>Toplam Tanen Miktarı İçin</b>	
%37 HCl	Stok şişeden direk kullanıldı.

Tablo 6'nın devamı

%4'lük Vanilin	4 g vanilin tartılıp az miktarda metanolle çözüldükten sonra metanolle 100 mL'ye tamamlandı.
Kateşin (1mg/mL)	10mg kateşin tartılarak metanolle 10 mL'ye tamamlandı.
<b>Optik Çevirme Açısı İçin</b>	
Carrez I	10,56g $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$ tartılıp 100 mL'ye tamamlandı.
Carrez II	21,94g $ZnSO_4.7H_2O$ + 3mL asetik asit 100 mL'ye tamamlandı.
<b>HMF Analizi İçin</b>	
5-Hidroksimetil-2-Furfural	104-42-21-10,5-5,25-2,625-1,3125 mg/L olacak şekilde saf suyla standart çözeltiler hazırlandı.
<b>Diastaz Aktivitesi İçin</b>	
İyot Stok Çözeltisi	2,2 g I ve 4,4 g KI 40 mL saf suda çözüldü 24 saatin sonunda 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.
Seyreltik İyot çözeltisi	50 mL'si için; 2 g KI tartılır, stok iyot çözeltisinden 200 $\mu$ L ilave edildi 50 mL'ye saf su ile tamamlandı.
Asetat Tamponu (0,5 M, pH 5,3)	500 mL'si için; 87 g $NaCH_3COO.3H_2O$ üzerine 10,5 mL glasiyel asetik asit ilave edildi. 500 mL'ye saf suyla tamamlandı.
NaCl (0,5 M)	500 mL'si için; 14,5 g NaCl 500 mL'de çözüldü.
Nişasta çözeltisi	100 mL'si için; Kaynamış yaklaşık 90 mL saf suya 2 g nişasta konuldu, soğuduktan sonra üzerine 2,5 mL asetat tamponu ilave edilerek hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
<b>Prolin Analizi İçin</b>	
Prolin	6,4 mg prolin tartıldı, saf suyla 100 mL'ye tamamlandı. 0,064-0,032-0,016-0,008-0,004 mg/mL'lik standart çözeltiler hazırlandı.
%3'lük ninhidrin	3 g ninhidrin tartıldı, saf suyla 100 mL'ye tamamlandı.
%80'lik Formik Asit	80 mL %100'lük formik asit saf suyla 100 mL'ye tamamlandı.

Tablo 6'nın devamı

%50'lik 2-propanol	50 mL %100'lük 2-propanol saf suyla 100 mL'ye tamamlandı.
--------------------	---

#### 2.4. Numunelerin Temini ve Saklama Koşulları

Muğla İli Arı Yetiştiriciliği birliğinden (MAYBİR) bal örnekleri temin edildi. Öncelikli olarak palinolojik analiz için numuneler analize yollandı ve monofloral olan yani polen miktarı %45 ve üstü olan püren balları ayrıldı (13 adet), bu ballar araştırmanın ana materyalini oluşturdu. Balların dört tanesi 2014, dokuz tanesi ise 2015 yılı üretimi olup kullanılan balların kodları ve bilgileri Tablo 7'deki gibidir. Bal örnekleri analizler için laboratuvarında, oda sıcaklığında ve karanlık ortamda muhafaza edildi.

Tablo 7. Numune ismi ve numunenin toplandığı ilçe/köy/yıl

Numune İsmi	Muğla (İlçe-Köy) / Yıl
Bal 1	Köyceğiz-Pınarköy/2014
Bal 2	Köyceğiz-Pınarköy/2014
Bal 3	Yatağan-Bencik/2014
Bal 4	Köyceğiz-Ekincik/2014
Bal 5	Datça-Emecik/2015
Bal 6	Köyceğiz-Pınarköy/2015
Bal 7	Yatağan-Bencik/2015
Bal 8	Köyceğiz-Pınarköy/2015
Bal 9	Datça-Emecik/2015
Bal 10	Yatağan-Bencik/2015
Bal 11	Köyceğiz-Ekincik/2015
Bal 12	Datça-Emecik/2015
Bal 13	Köyceğiz-Pınarköy/2015

## 2.5. Balların Bazı Fiziksel ve Kimyasal Analizleri

Balda polen analizi, nem, pH, renk değeri, şeker oranları, prolin miktarı, diastaz aktivitesi, hidroksimetilfurfural (HMF) değeri, elektriksel iletkenlik, çözünmeyen maddeler gibi fiziksel ve kimyasal kriterler kullanılarak balın doğallığı ve saflığı ortaya çıkarılmaktadır. Bu tezde balın kalitesini belirleyen fiziksel parametrelerden; polen analizi, optik çevirme açısı, %nem, %Briks, elektriksel iletkenlik, pH, renk değeri, kimyasal parametrelerden; diastaz, HMF, prolin, şeker, fenolik içerik ölçüldü.

### 2.5.1. Fiziksel Analizler

#### 2.5.1.1. Balların Palinolojik Testi

Balda polen analizi hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir. Baldaki asılı halde duran polen tanelerinin mikroskopik araştırması için numuneden preparat hazırlanır. Hazırlanan preparatta polenlerin tanımlanması yapılır ve bu tanımlanan her bir polenin sayısı tespit edilip, *Lycopodium spp.* sporlarının sayısı saptanır.

Farklı bitki kaynaklarından toplanan bala göre içindeki polen ve Honeydew elementlerinin frekansı tespit edilebilir. Genellikle bal başlıca bir bitkiden (unifloral bal) üretilmiştir, yani o bitkinin poleni baskın ise, yüzde hesaplanırken nektarsız bitkilerin polenleri dahil edilemez.

#### Çiçek Balında Polen Analizi (Tanımlama) İçin Preparat Hazırlanması

Balın mikroskopik incelenmesi için uygulanan yöntem, uluslararası arıcılık otoriteleri tarafından saptanmıştır. Tüm dünyada bu yöntem uygulanmaktadır. Baldan polen analiz preparatı hazırlanırken aşağıda verilen yöntem uygulanır.

Bir cam baget yardımı ile iyice karıştırılan stok baldan 10 g alınıp deney tüpüne aktarılır ve üzerine 20 mL destile su ilave edilir. Balın su içerisinde çözülmesini sağlamak amacıyla tüpler yaklaşık sıcaklığı 45<sup>0</sup>C'lik su banyosunda 10-15 dakika bekletilir ve su banyosundan çıkarılan tüp karıştırıcı yardımı ile karıştırılarak balın su içerisinde çözülmesini sağlar. Örneklerde herhangi bir kristalleşme söz konusu ise bal tüpe konulmadan önce su banyosunda 40<sup>0</sup>C'ye kadar ısıtılarak balın sıvı hale gelmesi sağlanır.

Çözelti 4000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilir ve santrifüj edilen tüplerin süpernatant kısmı dökülür. İğne ucuna alınan bir miktar (1-2 mm<sup>3</sup>) bazik fuksinli gliserin-jelatinin dipteki çökeltiye bulaştırılmasıyla alınan materyal lam üzerine aktarılır. Lam, ısıtma tablasında 30-40<sup>0</sup>C'de ısıtılarak bazik fuksinli gliserin-jelatinin erimesi sağlanır. Isıtma sırasında hava kabarcıklarının oluşmaması ve polenlerin deforme olmaması için kaynamamasına dikkat edilir. İğne ile lam üzerinde erimiş gliserin-jelatin ile polenler karıştırılarak polen içeriğinin homojen bir biçimde dağılması sağlanır ve lam üzerine 18x18mm<sup>2</sup>'lik lamel kapatılır. Lamın bir ucuna etiket yapıştırılarak üzerine balın alındığı yörenin adı, preparatın yapıldığı tarih ve preparatı yapan kişinin adı yazılır.

Preparatı inceleme sırasında net bir görüntü elde etmek için preparat ters çevrilerek iki cam çubuk üzerine yerleştirilir. Hazırlanan preparat yaklaşık 12 saat bu şekilde bekletildikten sonra incelemeye hazır hale gelir.

### Çiçek Balında Polen Tanımlama İçin Preparatların İncelenmesi

Polen preparatlarının gelişmiş bir araştırma mikroskopunda incelenmesi gerekir. Polenleri tanımlamada immersiyon objektif kullanılırken polenlerin sayımında x10 yada x20 objektif kullanılmalıdır. İncelemelerde 18x18mm<sup>2</sup>'lik tüm alan taranarak, polenlerin teşhisinde ilgili kaynaklardan ve hazırlanan referans polen preparatlarından yararlanılmalıdır. Bitki taksonlarının tanımlanması işlemi bittikten sonra tekrar başa dönülerek her preparat sol üst köşeden başlanılarak ve bitki çeşitliliği dikkate alınarak, polen sayısı 200'ü bulana kadar sayıma devam edilir. Sonuçta sayım sonuçlarının yüzdesi alınarak polenleri dominant ( $\geq\%45$ ), sekonder (%16-44), minör (%3-15) ve eser ( $\leq\%3$ ) miktardaki oranları saptanır. Hangi bitki poleni % si 45'den çok ise bal o bitkinin ismi ile anılır (kestane balı, ayçiçeği balı vb.).

#### 2.5.1.2. Optik Çevirme ( $\alpha$ – Rotation )

Polarize ışığı çevirme açısı olan  $\alpha$ -rotasyon değeri salgı balları ile çiçek ballarının ayırt edilmesinde kullanılan bir ayırt etme yöntemidir. Bu yöntemle birlikte salgı ballarının optik çevirme açısı sağa yani pozitif değer verirken çiçek ballarınki ise sola yani negatif değer vermektedir (Junk ve Pancoast, 1973). Optik çevirme açısı polarimetre kullanılarak tayin edildi. 12 g bal tartılıp saf suda çözüldükten sonra üzerine 10 mL Carrez reaktifi (I ve

II) ilave edildi, karıştırıldı. Hacmi 100 mL'ye tamamlandıktan sonra 24 saat süre sonunda adi süzgeç kağıdından süzüldü. Elde edilen süzüntü polarimetre ile ölçüm yapılarak balların optik çevirme açıları belirlendi.

### **2.5.1.3 Nem Tayini**

Refraktometre (Atago, Germany) kullanılarak ölçülen kırılma indisleri sıcaklığına göre düzeltilerek % nem ve briks değerleri olarak ifade edildi (Helrich, 1990). Bal numunesi 1:1 oranda saf suyla seyreltilip el refraktometresiyle okunur. Okunan %Briks değeri seyreltme katsayısıyla çarpılıp 100'den çıkarılarak %nem hesaplanır.

### **2.5.1.4. Elektriksel İletkenlik**

Elektriksel iletkenlik bir maddenin elektriksel akışı taşıma yeteneğidir. Elektriksel iletkenlik ölçümü 10 gram balın 100 mL saf suda çözülerek hazırlanan çözelti EC metreler (Elektriksel İletkenlik Ölçer) otomatik olarak ölçülen değerleri 25 °C sıcaklığa çevirerek, balın elektriksel iletkenliği 25 °C'de  $\mu\text{S/cm}$  (mikrosimens/cm) olarak ifade edilir.

### **2.5.1.5. pH Ölçümü**

Balda pH iyonize asitlere ve mineral maddelere bağlıdır. Balın asitliği, mikroorganizmalara karşı kararlılığını arttırırken; aynı zamanda düşük pH değerinden sorumlu olan asitin, bal gözlerinin sırlanmadan önce, arıların, iğnesinden bu gözlere enjekte ettikleri formik asitten ileri geldiği bildirilmiştir. Arılar, bala formik asit ilave ederek, balın olgunlaşmasına yardım ederler. Balda pH 3,4-5,5 arasında değişim göstermektedir. 10 g bal tartılarak üzerine 10 mL saf su eklenip pH ölçümü yapıldı.

### **2.5.1.6. Renk Tayini**

Bal numunelerinin rengi, Hunter (L, a, b) renk ölçüm sisteminde Minolta aygıtı ile ölçülmüştür. Bal numunesi küvete konulmadan önce, 50°C sıcaklıktaki su banyosunda 30–45 dakika ısıtılmıştır. Bu işlemin amacı şeker kristallerini çözündürmek ve balın



viskozitesini düşürmektir. Üç tekrarlı okuma yapılarak sonuçların ortalaması alınıp renk değerleri belirlendi. Burada renk değerleri L, koyuluk/açıklık ( 0: siyah; 100:beyaz); a (-a, yeşillik; +a, kırmızılık); ve b (-b, mavilik; +b, sarılık) olarak ifade edilmektedir. Koyu renkli numunelerin L değerleri düşük olup, doğal olarak yarı saydamdırlar (Anupama vd., 2003).

## 2.6. Kimyasal Analizler

### 2.6.1. Diastaz Aktivite Tayini

Diastaz aktivitesi deney koşullarında 40°C'de, % 1'lik nişastayı bir saat içinde belirlenen son noktaya (0,235 absorbansa ulaşmak için gereken süre) dönüştürecek enzimin miktarı olarak tanımlanır. Bir gram bal başına Schade birimi veya Gothe birimi şeklinde ifade edilir (Bogdanov, 2004). Balın 1 g tartılır 2 mL saf suda çözülür 0,5 mL pH:5,3 asetat tampon ve 0,5 M 0,3 mL NaCl çözeltisi koyulduktan sonra son hacim 5 mL'ye tamamlanır. 40 °C su banyosuna ayrı ayrı tüplerde 2 mL bal, 1 mL nişasta 15 dk. bekletilir. Süre sonunda 1 mL bal üzerine 0,5 mL nişasta ilave edilir ve karışımdan Tablo 8'deki gibi pipetleme işlemi yapılır (Can, 2014).

Tablo 8. Diastaz aktivite tayini için pipetleme işlemi

Zaman (dk)	Karışım (µL)	Seyreltik iyot çözeltisi (mL)	Saf su (mL)
0	50	0,5	2
3	50	0,5	2
5	50	0,5	2
10	50	0,5	2
15	50	0,5	2

660 nm'de absorbans değerleri ölçülüp 0,235 absorbansa denk gelen süre tespit edilir. Balın diastaz sayısı 300/tx değeri olarak verilir.

### 2.6.2. HMF Tayini

HMF değeri ters faz RP-HPLC metodu kullanılarak tayin edildi. Sulu ortamda standart HMF kullanılarak (5-hidroksimetilfurfural, Sigma-Aldrich, Milan) kalibrasyon eğrisi hazırlandı ve analizi için ters faz C<sub>18</sub> kolonu LiChroCART ® 250-4 RP (10 µm) kullanılarak izokratik program uygulanarak 285 nm’de okumalar gerçekleştirildi (Jeuring vd., 1980). Mobil faz olarak % 10 metanol-% 90 su kullanılarak akış hızı 1 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 25 mL olarak optimizasyon sağlandı. 2,5 g bal örneği alınarak 25 mL saf suda çözülerek üzerine 50 µL Carrez I ve 50 µL Carrez II reaktifi eklenerek, hazırlanan çözelti 0,45 µm filtreden geçirilerek viallere alındı ve şartlanmış olan HPLC sistemine enjekte edildi (Can, 2014).

### 2.6.3. Prolin Tayini

Tayin spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiş olup prolinin ninhidrin ile renkli kompleks oluşturmasından sonra 2-propanol eklenerek örnek çözelti etkisizleştirilir ve absorbansa karşı konsantrasyon grafiği çizilir. Prolin miktarı kalibrasyon grafiği ile tayin edilmektedir (Ough, 1960). Satın alınmış prolinden 6,4 mg tartılıp 100 mL’de saf suda çözüldü. 0,064 mg/mL ve seyreltilerek 0,032-0,016-0,008-0,004 mg/mL standart prolin çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden 0,1’er mL alınarak cam tüplere konuldu. Üzerlerine 200 µL %80’lik formik asit ve 200 µL % 3’lük ninhidrin çözeltisi ilave edilip tüpler çalkalayıcıda 15 dk çalkalandı. Çalkalama bitiminde kaynayan su banyosunda 15 dk bekletildi. Sonra 70°C’lik su banyosunda 10 dk tutuldu. Sürenin hemen bitiminde tüplere 1 mL % 50’lik 2-propanol çözeltisi ilave edildi. Tüpler buz banyosunda bekletildikten sonra spektrofotometrede 510 nm’de okundu.

### 2.6.4. HPLC-RI Dedektörü ile Şeker Tayini

Püren ballarında 10 farklı şeker standardı (riboz, arabinoz, fruktoz, glukoz, galaktoz, sukroz, maltoz, teraloz, melebioz, melezitoz) tayin edildi. Bu yöntem; filtre edilmiş bal çözeltisinin şeker içeriğinin RI-dedektör ile HPLC’ de tayinine dayanmaktadır. Cihazın kalibrasyonu için bu şekerlerin standart çözeltileri hazırlanmış olup, bu standart çözeltiler

HPLC cihazında RI detektöründe okutulmuş, geliş zamanlarına göre kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur.

Ballardan 1g tartılarak 10 mL ultra saf suda çözülme işleminden sonra 0,45µm filtreden geçirilerek okuma için HPLC cihazına yerleştirilerek, işlem mobil faz olarak % 79 asetonitril ve % 21 saf su ile izokratik program uygulanarak gerçekleştirildi. Analiz için Elite LaChrom, Hitachi HPLC cihazı kullanıldı. Analizler ters faz -NH<sub>2</sub> kolonu (200/4,6 Nucleosil 100-5 NH<sub>2</sub>) kolonu kullanıldı. Numune ve standartların enjeksiyon hacmi 25 µL'ye, mobil faz akış hızı 1,5 mL.dk<sup>-1</sup>'ya ve kolon sıcaklığı kolon fırınında 80 °C'ye ayarlanarak çalışma optimizasyonu sağlandı. Geliş zamanlarına göre pikler belirlendi ve alanları hesaplanıp miktarlar mg/kg olarak hesaplandı (Can,2014).

## **2.6.5. HPLC-UV ile Fenolik Bileşenlerin Tayini**

### **2.6.5.1. Numunelerin Ekstraksiyon Şartları**

Ballar analiz için 24 saat süreyle oda sıcaklığında metanolik ekstrakt olarak hazırlandı ve daha sonra süzme işlemi gerçekleştirildi. Adi süzgeç kağıdından süzildükten sonra mavi bant süzgeç kağıdından berrak oluncaya kadar süzülme işlemine devam edildi. Elde edilen ekstraktlarda nihai konsantrasyon belirlendi ve +4°C'de buzdolabında muhafaza edildi.

Ekstraktın 10 mL'lik kısmı antioksidan analizlerine ayrıldı. Geri kalan ekstraktın çözücüsü 45°C'deki döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı ve kalıntı pH'sı 2 olan 10 mL saf suda çözüldü. Daha sonra 3'er defa 5 mL'lik önce dietileter sonra etilasetat ile ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Ekstraksiyon işlemi sonunda elde edilen ekstraktlar evaporatör balonlarına alındı ve çözücüleri 45°C'deki döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı. Balon içeriği 2 mL metanolla çözülerek ekstraktlar 0,45µm filtreden geçirilip RP-HPLC-UV ile fenolik bileşen analizleri yapıldı.

### **2.6.5.2. RP-HPLC-UV Koşulları**

HPLC-UV analizleri 280 nm'de UV-Vis dedektör ile Elite LaChrom, Hitachi HPLC sisteminde yapıldı. Analizler ters faz C<sub>18</sub> kolonu (150 mm x 4.6 mm, 5 µm; Fortis)

kullanılarak ve asetonitril, su ve asetik asitle gradient program uygulanarak gerçekleştirildi (De Villers vd., 2004). A rezervuarında % 2 asetik asit (saf suda) ve B rezervuarında % 70-30 asetonitril-saf su bulunan gradient program Tablo 9’da verilmiştir. Ayrıca numune ve standartların enjeksiyon hacmi 25  $\mu\text{L}$ ’ye, mobil faz akış hızı 0,75 mL.dk<sup>-1</sup>’ya ve kolon sıcaklığı kolon fırınında 30 °C’ye ayarlanarak çalışma optimizasyonu sağlandı (Can, 2014).

Tablo 9. RP-HPLC-UV gradient programı

Zaman (dk)	A	B
	% 2 asetik asit (saf suda)	% 70-30 asetonitril-saf su
0,01	95,00	5,00
3,00	95,00	5,00
8,00	85,00	15,00
10,00	80,00	20,00
12,00	75,00	25,00
20,00	60,00	40,00
30,00	20,00	80,00
35,00	95,00	5,00
50,00	95,00	5,00

### 2.6.5.3. Standartlar ve Kalibrasyon

Literatür destekli araştırmalara dayandırılarak püren balında bulunabilecek bazı fenolik bileşenler analiz edilmiştir. Bu amaçla çeşitli standartlar satın alınmış olup benzoik asit türevlerinden; gallik asit, protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, vanilik asit, şiringik asit, *t*-sinammik asit, flavanollardan; kateşin, epikateşin; sinamik asit türevlerinden; kaffeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit; flavonollardan; rutin, flavonlardan luteolin analiz edilmiştir. Tüm standartlar % 100 metanolle hazırlanan 1000 ppm’lik stok çözeltilerden, 1-2-5-10-20-50-100 ppm’lik ara stok çözeltileri kalibrasyon eğrileri için hazırlandı.

### 2.7. Antioksidan Analizler

Toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı, toplam tanen miktarı, demir (III) indirgeme antioksidan güç (FRAP), DPPH• radikalini temizleme aktivitesi tayinleri yapılmıştır.

### 2.7.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı

Analiz Slinkard vd., (1977)'ye göre yapıldı. Toplam fenolik madde tayininin esası fenolik bileşiklerin bazik ortamda Folin-Ciocalteu ayracını indirgeyip kendilerinin oksitlenmiş forma dönüştüğü redoks reaksiyonuna dayanmaktadır. Folin-Ciocalteu ayracı burada oksitleyici bileşik olarak rol almaktadır. Reaksiyon sonucunda indirgenmiş ayracın oluşturduğu mavi rengin absorbansının ölçülmesiyle, analizi yapılan örnekteki fenolik bileşiklerin toplam miktarlarının hesaplanması mümkün olmaktadır. Oluşan kompleksin renk şiddeti fenolik maddelerin konsantrasyonu ile doğru orantılı olup, 760 nm'de absorbans verir. Pipetlemeler Tablo 10'daki gibidir.

Tablo 10. Toplam polifenol tayininde yapılan pipetleme işlemi

	<b>Kör</b>	<b>Standart</b>	<b>Numune</b>
Distile su	700 µL	680 µL	680µL
Standart	-	20 µL	-
Bal numunesi	-	-	20 µL
0,5 N Folin Reaktifi	400 µL	400 µL	400 µL
Tüpler vorteks ile karıştırılır ve 3 dakika sonra			
% 10 Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	400 µL	400 µL	400 µL
760 nm'de köre karşı absorbans okunur.			

Standart grafiğin hazırlanmasında, fenolik bir bileşik olan gallik asit standardı kullanıldı (Slinkard vd., 1977; Singleton ve Rossi, 1965). Gallik asidin metanolle farklı konsantrasyonları (1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 mg/mL) hazırlanıp, absorbansları okundu. Konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizildi. Numunenin 100 gramı başına, mg gallik asit eşdeğeri [mg GAE (Gallik Asit Eşdeğeri)/100 g] fenolik madde miktarı olarak bulundu. Yapılan çalışmadaki pipetleme işlemi Tablo 9'daki gibidir.

### 2.7.2. Toplam Flavonoid Madde Miktarı

Fenolik bileşiklerden flavonollerin tayini Fukumoto ve Mazza (2000)'ya göre yapıldı. Metanolik olarak hazırlanan bal ve polen ekstraktları çalışmada kullanıldı.

Standart olarak kuersetinin farklı konsantrasyonlarından (0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,015625 mg/mL) 0,5 mL alınarak, mutlak metanol 4,3mL; %10'luk  $Al(NO_3)_3$  0,1mL; 1M  $NH_4CH_3COO$  0,1 mL ilave edilerek 40 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılarak 415nm'de absorbans değerleri okundu. Konsantrasyona karşı absorbans değerleri ile grafik çizildi. Çizilen grafiğe göre metanolik bal ve polen ekstraktlarının toplam flavonoid madde miktarı bulunmuş, seyreltme faktörleri de dikkate alınarak asıl numunenin mg QAE (Kuersetin Eşdeğeri)/100 g bal olarak flavonoid madde miktarı bulunmuştur. Yapılan çalışmada pipetleme işlemi Tablo 11'deki gibidir.

Tablo 11. Toplam flavonoid tayininde yapılan pipetleme işlemi

	<b>Kör</b>	<b>Renk</b>	<b>Standart</b>	<b>Numune</b>
		<b>Körü</b>		
Numune Değişen konsantrasyonlarda	-	0,5 mL	-	0,5 mL
Standart Değişen Konsantrasyonlarda	-	-	0,5 mL	-
Mutlak Metanol	4,8 mL	4,5	4,3	4,3
%10 $Al(NO_3)_3$	0,1 mL	-	0,1	0,1
1 M $NH_4.CH_3COO$	0,1 mL	-	0,1	0,1

40 dk. oda sıcaklığında inkübe edilir ve 415 nm'de absorbans okunur.

### 2.7.3. Toplam Tanen Miktarı

Metod Liu vd., (2009)'a göre yapıldı. Metodun esası tanenleri kuvvetli asitlerle flobafen denen kırmızı renkli maddelere dönüştürerek toplam tanen (TT) miktarını bulmaktır. Standart olarak kateşin değişik konsantrasyonlarda kullanıldı. Yapılan pipetleme işlemi Tablo 12'deki gibidir.

Tablo 12. Toplam tanen tayininde yapılan pipetleme işlemi

	<b>Kör</b>	<b>Standart</b>	<b>Numune</b>
Numune	-	-	500 µL
Standart	-	500 µL	-
% 4 lük Vanilin	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
% 37'lik HCl	750 µL	750 µL	750 µL
20 dk inkübasyona bırakılır.			
500nm'de köre karşı absorbands okunur.			

#### 2.7.4. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Güç (FRAP) Tayini

Bu yöntem Fe(III) komplekside yer alan Fe(III) iyonunun antioksidan bir madde varlığında indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Fe(III) iyonları TPTZ adı verilen ligant ile (Fe(III)-TPTZ-2,4,6-tris(2-pyridlyl)-S-triazin) kompleksini oluşturur ve antioksidanlar varlığında indirgendiğinde oluşan mavi renkli kompleksin, Fe(II)-TPTZ, 593 nm'de maksimum absorbands vermesi esasına dayanmaktadır (Benzie and Strain, 1999). Doğal ürünler ve arı ürünlerinin antioksidan kapasitenin ölçülmesinde FRAP (Ferric reducing antioksidant power) yöntemi en çok kullanılan yöntemdir (Benzie ve Strain, 1999). Çalışma eğrisi için Troloks®'un değişen konsantrasyonları (31,25-62,5-125-250-500-1000 µM) kullanılarak çalışma eğrisi hazırlandı.

Tablo 13. FRAP tayininde yapılan pipetleme işlemi

	<b>Kör<sub>MeOH</sub></b>	<b>Test (Numune)</b>	<b>Renk Körü<sub>(MeOH)</sub></b>	<b>Troloks</b>
FRAP Reaktifi	3 mL	3 mL	-	3 mL
Numune	-	100 µL	100 µL	-
Troloks®(Değişen kons.)	-	-	-	100 µL
Saf Su	-	-	-	-
Metanol	100 µL	-	3 mL	-
4. dakikada 593 nm'de absorbands okunur.				

Renk Körü<sub>test(met)</sub>: Metanolde çözünen numune için renk körü

100 µL numune üzerine 3 mL FRAP reaktifi [300 mM pH 3,6 asetat tamponu: 10 mM TPTZ: 20 mM FeCl<sub>3</sub> (10: 1: 1)] eklendi. 4 dakika sonra 593 nm’de absorbanslar okundu. Sonuçlar standart bir antioksidan olan Troloks<sup>®</sup> la karşılaştırılmalı olarak bulundu ve µmol Troloks<sup>®</sup> eşdeğeri antioksidan güç / 100 g bal olarak ifade edildi. Pipetleme işlemi Tablo 13’teki gibidir.

### 2.7.5. DPPH• Radikalini Temizleme Aktivitesi Tayini

DPPH• radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen bir radikal olup denemelerde satın alınan bu radikalın 100 µM’lık metanolik çözeltisi kullanıldı. Bal numunelerinin metanolik ekstraktları kendi çözücüleri ile seyreltilerek farklı ve uygun konsantrasyonlarda hazırlandı. Üç paralel olacak şekilde eşit hacimde (750 µL) DPPH• radikal çözeltisi ve numune çözeltileri karıştırılıp oda sıcaklığında 50 dakika bekletildi. Süre sonunda DPPH• radikalının mor menekşe rengi açıldı ve DPPH• radikalının maksimum absorbans verdiği 517 nm’de absorbanslar okundu. Kör olarak DPPH• radikal çözeltisi ve numunenin çözüldüğü çözücü kullanıldı. Bulunan absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek SC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı. Pipetleme işlemi Tablo 14’teki gibidir (Yu vd., 2002).

Tablo 14. DPPH• yöntemi için yapılan pipetlemeler

	Numune Tanık Tüpü	Reaktif Tanık Tüpü	Numune Tüpü
Numune (Değişik konsantrasyon)	750 µL	-	750 µL
Metanol	750 µL	750 µL	-
DPPH• (100 µM)	-	750 µL	750 µL
50 dk. süre sonunda 517 nm’de absorbans okunur.			

#### 2.7.5.1. SC<sub>50</sub> Değerlerinin Bulunması

SC<sub>50</sub> radikal miktarını yarıya indiren numune konsantrasyonudur. SC<sub>50</sub> değerinin bulunması için farklı konsantrasyonlarda çalışmak gerekir. Bu nedenle çalışmalarda altı farklı konsantrasyonda ölçüm yapıldı. Numunelerin uygun ve farklı konsantrasyonları



hazırlanıp absorbans ölçümleri yapıldı, standart olarak Troloks® kullanıldı. Absorbanslar konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi. Maksimum absorbansın yarısına karşılık gelen konsantrasyon miktarı SC<sub>50</sub> değeri olarak alındı ve mg/mL cinsinden hesaplandı.

## 2.8. Antimikrobiyal Analiz

Çalışmamızda kullanılan bakteri ve mantar suşları ATCC (American Type Culture Collection)'den elde edildi. Bal numunelerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan bakteriler; *Bacillus subtilis* ATCC®6633, *Escherichia coli* ATCC®25922, *Staphylococcus aureus* ATCC®25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 olup gram özellikleri Tablo 15'teki gibidir. Antifungal aktivitenin belirlenmesinde kullanılan mantarlar *Candida albicans* ATCC®90028, *Candida krusei* ATCC 6258 suşları kullanılarak agar kuyucuk difüzyon ve broth mikrodilüsyon yöntemleri kullanılarak standart yöntemlerle test edilmiştir.

Tablo 15. Antimikrobiyal aktivite testinde kullanılan mikroorganizmalar

<b>Mikroorganizma</b>	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC®6633	Gram (+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC®25922	Gram (-)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC®25923	Gram (+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC®27853	Gram (-)
<i>Candida albicans</i> ATCC®90028,	Maya
<i>Candida krusei</i> ATCC®6258	Maya

Balların antimikrobiyal aktivite testi hizmet alımı şeklinde yapıldı. Seçilen mikroorganizmalara karşı bal örneklerinin antimikrobiyal etkisi, agar kuyucuk yayılma (Agar Well Diffusion) (Sokmen vd., 1999) ve sıvı mikrodilüsyon (Broth Microdilution) (Thornsberry vd., 1977) yöntemleri kullanılarak araştırıldı. Kullanılan ilk yöntem Agar Kuyucuk Yayılma Yöntemi ile inkübasyon süresi sonunda oluşan inhibisyon zonlarının çapı ölçüldü. Zon çapı (z.ç.) mm cinsinden tespit edildi. İkinci yöntemde ise sıvı mikrodilüsyon testi ile minimal inhibitör konsantrasyonlarının (MİK) tespiti yapılarak mikroorganizmanın üremesini inhibe eden en düşük bal örneğinin seyreltmesi MİK olarak kaydedildi ve elde edilen sonuçlar tablolatırıldı.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Fiziksel Tayin Sonuçları

##### 3.1.1. Palinolojik Test Sonucu

Çalışmada Muğla ili florasına ait yedi bal numunesinin polen analizleri hizmet alımı şeklinde yapıldı. Püren balları arıcılardan kendi beyanları doğrultusunda monofloral bal olarak toplandı. Yapılan polen analizleri sonucu balların bir kısmı monofloral olarak tespit edilirken bir kısmı da çok düşük polen yüzdesine sahip olarak bulundu. Çalışılan tüm püren ballarının polen sayım sonuçları Tablo 16'da yer almaktadır. Çalışmada kullanılan balların polen yüzdeleri %45 ile %90 arasındadır.

Tablo 16. Püren ballarının polen yüzdeleri

Numuneler	% Polen	Numuneler	% Polen
Bal 1	70	Bal 8	45
Bal 2	60	Bal 9	50
Bal 3	45	Bal 10	55
Bal 4	90	Bal 11	45
Bal 5	45	Bal 12	50
Bal 6	50	Bal 13	45
Bal 7	45		

Sayım sonuçlarının yüzdesi alınarak polenleri dominant ( $\geq$ %45), sekonder (%16-44), minör (%3-15) ve eser ( $\leq$ %3) miktardaki oranları saptanır. Hangi bitki poleni yüzdesi %45'ten çok ise bal o bitkinin ismi ile anılır (kestane balı, ayçiçeği balı vb.). Literatürdeki

bilgilere göre polen içeriği % 45 ve yukarısında bulunan ballar monofloral ballar olarak kabul edilmektedir.

### 3.1.2. Optik Çevirme Sonucu

Optik çevirme açısı polarimetre kullanılarak (Beta PPP7 Optical Activity, England) tayin edildi (Junk ve Pancoast, 1973). Polarize ışığı çevirme açısı olan  $\alpha$ -rotasyon değeri salgı balları ile çiçek ballarının ayırt edilmesini sağlamaktadır. Çiçek balları negatif, salgı balları pozitif değere sahiptir (White, 1989). Çiçek balı olduğu bilinen püren balında 10 numunenin optik çevirme açısı negatif değerler olarak elde edilirken, 3 numunenin çevirme açısı pozitif olarak bulunmuştur. Sonuçlar Tablo 17'deki gibidir. Muğla ili florasına ait püren ballarında optik rotasyon değeri -0,15 ile +4,11 arasında değişim göstermektedir.

### 3.1.3. Nem Analiz Sonucu

Balların nem içeriği, standart referans metot (TS 3036, 2002) ile refraktometre (Atago, Germany) kullanılarak balın kırılma indisinden faydalanılarak % nem içeriği ve % Briks değerleri olarak belirlendi. Elde edilen değerler Tablo 17'de gösterilmiştir. Nem; balların raf ömürlerinin belirlenmesinde oldukça önemli olup yüksek nem balın olgunlaşmadığını (erken hasat edildiğini) göstermekle beraber fermantasyon olmasına, dolayısıyla erken bozunmasına ve aynı zamanda kristalizasyona neden olmaktadır. Yani nem miktarı balın toplandığı bölgenin coğrafik özelliklerine, hasat zamanına ve biçimine göre de değişim gösterir (Oddo ve Piro 2004; Bogdanov vd., 2004). Türk gıda kodeksine (TSE) göre balda nem içeriği çiçek ve salgı balında en fazla % 20 olmalıdır. Bu çalışmada kullanılan püren ballarının nem içeriği % 13,33-20,10 arasında olduğu refraktometre ile briksi okunup nemi hesaplanmıştır. Standartlar ballara ait istisnaların olduğunu belirtirken çiçek ballarından püren balında bu değer en fazla % 23'e kadar çıkabileceğini ifade etmiştir (TSE).

### 3.1.4. Elektriksel İletkenlik Analiz Sonucu

Elektriksel iletkenlik bir maddenin elektriksel akışı taşıma yeteneğidir. Balların elektriksel iletkenliği balın mineral madde içeriğine dayanmaktadır (Andrade vd., 1997a). Bal standartlarına göre ballarda elektriksel iletkenlik değeri çiçek balı ve fırıncılık balında 0,8 milisiemens/cm'den fazla olmamalıdır. Çalışmamızda kullanılan püren ballarının elektriksel iletkenlik değerleri 0,557-1,792 milisiemens/cm arasında değişim göstermektedir (Tablo 17).

### 3.1.5. pH Sonucu

Balın pH değeri değişik şartlar altında 3,4 ile 5,5 arasında değişmekle birlikte ortalama olarak 3,9'dur. Püren balları için ölçülen pH değerleri 3,70-5,21 arasındadır. Sonuçlar Tablo 17'deki gibidir.

### 3.1.6. Renk Analiz Sonucu

Balın rengi önemli bir fiziksel parametre olup bitki florasından, mineral madde miktarından, içerdiği vitamin, pigment ve fenolik madde miktarında ve ısıl işlem etkisinden, balın uzun süre bekletilmesinden, içerdiği HMF miktarından etkilenmektedir. Klorofil, karoten, ksantofil türü bileşenler sarı-yeşil renk verirler (Ulusoy ve Kolaylı, 2013). Bal numunelerinin rengi, Hunter (L, a, b) renk ölçüm sisteminde Konica Minolta cihazı ile ölçüldü. Bal numunesi küvete konulmadan önce, 45°C sıcaklıktaki su banyosunda 30 dakika ısıtıldı (Anupama vd., 2003). Bu işlemin amacı şeker kristallerini çözündürmek ve balın viskozitesi düşürmektir. Üç okuma değerinin ortalaması alınarak renk değerleri belirlendi. Elde edilen değerler Tablo 17'de verilmektedir. Hunter metounda L,a,b renk değerleri: L, koyuluk/açıklık ( 0: siyah; 100:beyaz); a (-a, yeşillik; +a, kırmızılık); ve b (-b, mavilik; +b, sarılık) olarak ifade edilmektedir (Yıldız ve Alpaslan 2011). Tablo 17'de verilen L değerlerine bakıldığında en düşük L değerinin Bal 7 olduğu (en koyu renkli bal) en yüksek L değerinin Bal 5 olduğu (en açık renkli bal) görülmektedir. a değeri balın kırmızılık karakterini ortaya koyarken hem koyu renkli ballarda hem de açık renkli ballarda a değerinin yaklaşık değerler olduğu bulundu. b değeri balın sarılık

karakterini ortaya koyarken açık renkli ballarının b değerinin yüksek (sarılık karakteri fazla) olduğu bulundu. Balların renklerinin koyulukları arttıkça balların monofloral karakteri de artmaktadır (Can, 2014).

Tablo 17. Püren ballarının optik çevirme, nem, Briks, iletkenlik, pH ve renk sonuçları

Numune	Optik		RENK									
	Çevirme [ $\alpha$ ] D ]	%Nem	%Briks	pH	İletkenlik ( $\mu$ S/cm)	L	a	b	$\Delta E$			
Bal 1	-0,43±0,01	19,30±0,14	80,70±0,14	4,96	0,574±0,00	31,53±0,75	27,43±0,42	53,65±1,28	68,00			
Bal 2	-0,55±0,02	20,10±0,14	79,90±0,14	4,94	0,557±0,00	35,68±0,35	29,7±0,15	60,75±0,58	76,46			
Bal 3	-1,48±0,03	17,80±0,00	82,20±0,00	4,85	0,614±0,00	40,12±0,04	39,00±0,02	68,57±0,04	88,50			
Bal 4	+0,52±0,00	17,80±0,00	82,20±0,00	5,21	1,792±0,00	41,05±0,03	41,79±0,03	70,20±0,06	91,43			
Bal 5	+0,94±0,00	16,00±0,00	84,00±0,00	4,27	1,289±0,00	56,31±0,05	27,96±0,03	87,96±0,03	108,10			
Bal 6	-2,27±0,00	18,67±0,58	81,33±0,00	3,70	0,795±0,00	25,55±0,04	35,81±0,04	43,79±0,02	62,07			
Bal 7	-0,63±0,00	17,00±0,00	83,00±0,00	4,36	1,274±0,00	19,05±0,04	35,44±0,03	32,50±0,03	51,72			
Bal 8	-0,36±0,00	13,33±0,58	86,67±0,58	4,53	1,307±0,00	51,49±0,02	36,77±0,01	86,31±0,02	107,02			
Bal 9	-0,36±0,00	13,67±0,58	86,33±0,58	4,47	1,140±0,00	58,04±0,01	34,37±0,01	95,21±0,01	116,68			
Bal 10	-0,84±0,00	13,67±0,58	86,33±0,58	4,34	0,994±0,00	62,92±0,01	29,50±0,01	98,04±0,02	120,17			
Bal 11	-0,15±0,00	13,33±0,58	86,67±0,58	4,33	1,238±0,00	55,73±0,02	34,27±0,01	91,69±0,01	112,64			
Bal 12	-1,55±0,00	17,33±0,58	82,67±0,58	4,37	1,105±0,00	50,69±0,02	39,84±0,01	86,06±0,00	107,53			
Bal 13	+4,11±0,01	13,67±0,58	86,33±0,58	4,98	1,702±0,00	48,87±0,02	40,77±0,02	83,03±0,03	104,62			

## 3.2. Kimyasal Tayin Sonuçları

### 3.2.1. Diastaz Aktivite Sonucu

Balların tazeliği ve ısıtıl işlemlerden geçip geçmediğini test etmede kullanılan ve karbohidratların sindiriminden sorumlu olan enzim diastazdır (Bogdanov 2004). Diastaz enzimi arının midesinden bala geçmektedir ve bala ısıtıl işlem uygulandığında enzim yüksek sıcaklıkta denatüre olabilmektedir. Diastaz enzimi bitkinin kaynağına bağlı olarak ballarda farklı düzeylerde bulunmakla birlikte, diastaz aktivitesinin beklenen düzeyin altında çıkmasının iki temel nedeni vardır; bal ısıtıl işlem görmüştür veya zamanı geçmiş bir baldır. Genel olarak sıcak iklim kuşaklarındaki balların diastaz aktiviteleri düşük olmaktadır (La Grange ve Sanders 1988). Avrupa Birliği direktifleri ve Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (Anonymous 2002)'ne göre balın diastaz aktivitesi, 8 birim düzeyinden daha az olmamalıdır. Yapılan çalışmadaki balların diastaz aktiviteleri Tablo 18'de verilmektedir. Püren ballarının düşük diastaz aktivitesine sahip olduğu 7,06-14,99 DU arasında olduğu bulundu.

### 3.2.2. HMF Analiz Sonucu

HMF (5-hidroksimetilfurfural); şekerler ile aminoasitler gibi yapısında amin grubu içeren biyomoleküller arasında gerçekleşen Maillard reaksiyonları ürünlerinden biridir. Enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonlarının bir ürünüdür ve gıdalarda şeker ve proteinlerin kondensasyon reaksiyonu sonucu oluşmaktadır. Balda HMF miktarı diastaz aktivitesinde olduğu gibi balın tazeliği ve ısıtıl işleme maruz kalıp kalmadığının bir göstergesi olarak da kullanılmaktadır. HMF değerinin düşük çıkması balın tazeliğinin bir göstergesidir. Kristalize olmuş balın ısıtıl işlem sonucu çözündürülmesiyle de HMF artış göstermektedir. Ballardaki HMF miktarı zaman ve sıcaklığa bağlı olduğu gibi pH, nem, indirgen şeker oranı, botanik özellik gibi çeşitli faktörlerden de etkilenmektedir. (Can, 2014). Mevcut çalışmada balların HMF miktarı RP-HPLC metodu kullanılarak tayin edildi. HMF su ile değişik konsantrasyonlarda hazırlanarak kalibrasyon eğrisi çizildi ve 285'nm de dedeksiyon yapıldı (Jeuring vd., 1980). Tablo 18'de püren ballarının HMF sonuçlarının 2,97-28,50 mg/kg arasında olduğu gösterilmiştir.

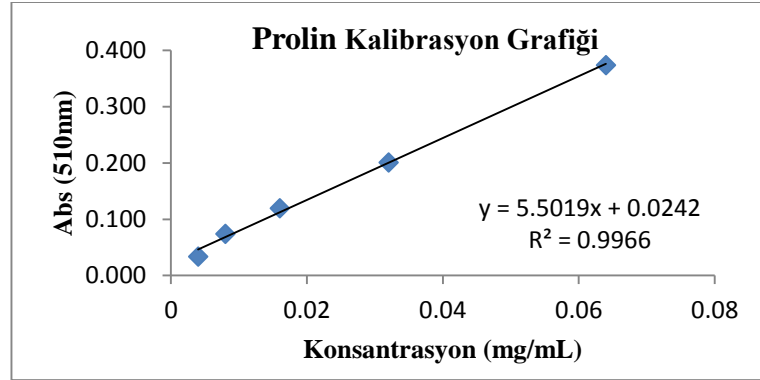
Tablo 18. Bal örneklerin diastaz, HMF ve prolin değeri sonuçları

<b>Numune</b>	<b>Diastaz Aktivitesi (DU)</b>	<b>HMF mg/kg</b>	<b>Prolin mg/kg</b>
Bal 1	7,30±0,10	24,26±1,53	875,819±11,105
Bal 2	8,00±0,06	22,63±0,16	807,963±16,790
Bal 3	8,71±1,10	17,60±7,26	694,063±15,134
Bal 4	8,04±0,09	18,72±2,63	489,655±6,789
Bal 5	12,31±0,10	6,31±2,53	1220,16±10,61
Bal 6	7,06±0,03	27,70±1,37	1393,46±16,21
Bal 7	7,18±0,06	28,50±1,60	1174,18±26,7
Bal 8	10,82±0,01	9,20±2,22	956,85±15,88
Bal 9	12,26±0,07	6,40±3,01	818,42±20,69
Bal 10	14,99±0,04	2,97±0,12	730,32±19,82
Bal 11	11,81±0,11	7,10±0,76	856,17±2,42
Bal 12	10,24±0,06	10,40±0,53	1086,89±20,69
Bal 13	10,02±0,01	11,20±1,24	612,87±26,29

### 3.2.3. Prolin Tayini Sonucu

Tayin prolinin ninhidrin ile renkli kompleks oluşturmasına dayanan bu spektrofotometrik metotta prolin içeriği, prolinin standart olarak kullanıldığı çalışma grafiği (Şekil 2) yardımıyla gerekli katsayılarla çarpılarak mg/kg cinsinden hesaplandı. Balların prolin değerleri Tablo 18’de verilmiştir. Balların prolin değerleri 489,65 mg/kg ile 1393,46 mg/kg arasında değişim göstermektedir.





Şekil 2. Prolin standart çalışma grafiği

### 3.2.4. HPLC-RI Dedektörü ile Şeker Tayini Sonucu

HPLC’de refraktif indeks dedektör (RID) ile 10 farklı şeker (riboz, ksiloz, arabinoz, fruktoz, glukoz, sukroz, maltoz, trehaloz, melebioz, melesitoz) tayin edildi. Bu yöntemin esası, filtre edilmiş seyreltik bal çözeltisinin şeker içeriğinin RI-dedektör ile HPLC’de tayinine dayanmaktadır. Geliş zamanlarına göre pikler belirlenmektedir (Can, 2014). Cihazın kalibrasyonu için on adet şekerin standart çözeltileri hazırlandı. Standart çözeltileri 0.45 µm filtreden geçirilip viallere alındı. Bu standart çözeltileri HPLC cihazında RI-dedektöründe okutulurken geliş zamanlarına göre kalibrasyon grafikleri oluşturuldu. Lineer ölçüm aralığında oluşturulan kalibrasyon grafiğinin denklem verisinden ve aşağıdaki formülden yararlanarak LOD ve LOQ hesaplandı (Tablo 19).

$$\text{Tayin Limiti (LOD)} = 3,3 \times \left(\frac{SD}{m}\right)$$

$$\text{Ölçüm Limiti (LOQ)} = 10 \times \left(\frac{SD}{m}\right)$$

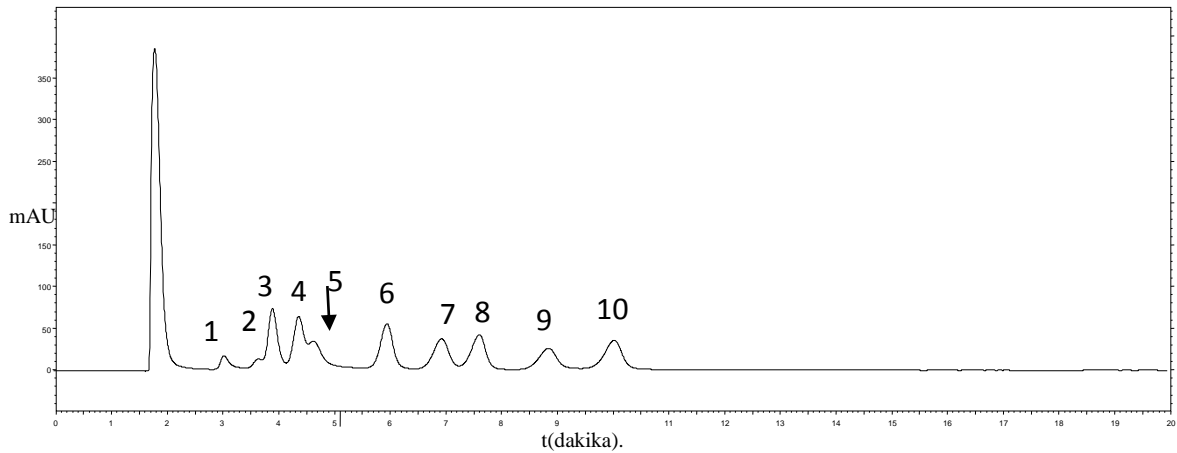
SD = Kalibrasyon eğrisinin en düşük seviyesindeki standart sapma

$m$  = Kalibrasyon eğrisinin eğimi

Tablo 19. Şeker standartlarının validasyonu (LOD ve LOQ) değerleri

No	RT <sub>Ort</sub>	Bileşen	R <sup>2</sup>	%RSD (Alıkonma Zamanı)	%RSD (Alan)	LOD	LOQ
1	2,88	Riboz	0,999	0,348	5,168	0,355	1,075
2	3,42	Arabinoz	0,996	0,131	3,133	0,145	0,440
3	3,63	Fruktoz	1,000	0,113	1,056	1,254	3,800
4	4,03	Glukoz	0,999	0,128	5,918	0,390	1,182
5	4,17	Galaktoz	0,999	0,433	1,930	0,678	2,054
6	5,39	Sukroz	0,999	0,076	1,534	1,680	5,090
7	6,18	Maltoz	0,999	0,066	3,840	1,460	4,425
8	6,79	Teraloz	1,000	0,060	2,458	0,189	0,574
9	7,82	Melibioz	1,000	0,052	2,460	2,317	7,022
10	8,85	Melezitoz	0,994	0,058	3,649	2,019	6,119

Tablo 19’da görüldüğü gibi alıkonma zamanlarının yüzde bağıl standart sapması en yüksek ksiloz (0,433) ve riboz (0,348) şekerlerinde elde edildi. Diğer şeker bileşenlerin % RSD değerleri daha düşük yani tekrarlanabilirlikleri daha yüksek bulundu. Pik alanlarının % RSD değerleri riboz ve glukozun 5’in üstünde iken diğer şekerlerinki 5’ten küçük bulundu. Tekrarlanabilirler, şeker bileşenleri bal ekstraktlarında analizleri için genel olarak uygun aralıktadır. RID ile şeker standartlarının kromatogramı Şekil 3’teki gibidir. Çalışan ballarda 10 tane standart şekerle çalışılmış olup major monosakkarit olarak fruktoz ve glukoz şekerleri tespit edilirken diğer şekerlerden az miktarda değişik oranlarda bulundu. Sonuçlar Tablo 20’deki gibidir. F/G oranı en yüksek çıkan numune Bal 4’tür.



Şekil 3. RID ile şeker standartlarının kromatogramı. (1) Riboz, (2) Arabinoz (3) Fruktoz, (4) Glukoz, (5) Galaktoz, (6) Sukroz, (7) Maltoz (8) Teraloz, (9) Melebioz, (10) Melezitoz.

Tablo 20. Balların şeker analiz sonuçları

Numune	Riboz	İsiloz	Arabinoz	Fruktoz	Glukoz	Sukroz	Maltoz	Teraloz	Melibioz	Melezitoz	F/G
Bal 1	t.e.	t.e.	t.e.	29,53±0,55	21,39±0,62	0,70±0,03	t.e.	0,45±0,002	3,35±0,79	t.e.	1,38
Bal 2	t.e.	t.e.	t.e.	31,30±0,89	22,30±0,15	0,68±0,02	t.e.	0,33±0,04	1,34±0,04	1,99±0,04	1,40
Bal 3	t.e.	t.e.	t.e.	29,11±0,46	22,68±0,24	0,80±0,33	t.e.	0,58±0,06	4,39±0,25	t.e.	1,28
Bal 4	t.e.	t.e.	t.e.	38,23±0,27	20,17±0,04	0,30±0,03	t.e.	0,55±0,06	4,46±0,008	t.e.	1,90
Bal 5	t.e.	t.e.	t.e.	37,12±0,37	30,18±0,15	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.	1,23
Bal 6	t.e.	t.e.	t.e.	34,23±0,10	25,14±0,17	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.	1,36
Bal 7	t.e.	t.e.	t.e.	38,07±0,40	29,56±0,09	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.	1,29
Bal 8	t.e.	t.e.	t.e.	36,14±0,26	28,32±0,23	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.	1,28
Bal 9	t.e.	t.e.	t.e.	37,24±0,13	28,45±0,12	t.e.	t.e.	0,41±0,03	t.e.	t.e.	1,31
Bal 10	t.e.	t.e.	t.e.	37,36±0,22	27,78±0,07	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.	1,34
Bal 11	t.e.	t.e.	t.e.	36,64±0,14	29,13±0,13	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.	1,26
Bal 12	t.e.	t.e.	t.e.	38,01±0,19	29,05±0,23	t.e.	t.e.	t.e.	0,52±0,02	t.e.	1,31
Bal 13	t.e.	t.e.	t.e.	34,43±0,45	23,63±0,21	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.	1,46

t.e.: Tespit edilemedi.

### 3.2.5. HPLC-UV ile Fenolik Bileşenlerin Tayini Sonucu

### 3.2.6. Balların Fenolik Bileşen Sonuçları

13 fenolik bileşenle gerçekleştirilen püren balı örneklerinin analizinde tüm ballarda bulunan bileşenler *p*-OH benzoik asit, protokatekuik asit, kafeik asit ve *p*-kumarik asittir. Gallik asit, kateşin, vanilik asit, şiringik asit, epikateşin, ferulik asit, rutin, luteolin ise hiçbir bal örneğinde tespit edilemedi. Balların fenolik bileşen sonuçları Tablo 22'deki gibidir. Püren balı fenolik bileşimi zengin bir bal olup protokatekuik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, kafeik asit ve *p*-kumarik asit bakımından zengin bir bal olarak tespit edildi (Tablo 22) Major fenolik bileşenlerin protokatekuik asit ve *p*-hidroksibenzoik asit olduğu tespit edildi. Tablo 21'de RP-HPLC-UV fenolik bileşen validasyon parametreleri verildi.

Tablo 21. RP-HPLC-UV fenolik bileşen validasyon parametreleri

No	Bileşenler	R <sup>2</sup>	%RSD (Alıkonma Zamanı)	% RSD (Alan)	LOD	LOQ
1	Gallik Asit	0,998	0,346	3,540	0,052	0,158
2	Protokatekuik Asit	0,999	0,556	1,893	0,042	0,129
3	<i>p</i> -OH Benzoik Asit	0,998	0,476	1,600	0,036	0,109
4	Kateşin	0,998	0,611	8,476	0,179	0,543
5	Vanilik Asit	0,998	0,320	5,359	0,111	0,336
6	Kaffeik Asit	0,999	0,389	4,039	0,062	0,187
7	Şiringik Asit	0,996	0,237	2,430	0,038	0,151
8	Epikateşin	0,990	0,364	5,276	0,157	0,476
9	<i>p</i> -Kumarik Asit	1,000	0,349	0,727	0,016	0,050
10	Ferulik Asit	0,999	0,297	3,463	0,061	0,184
11	Rutin	0,998	0,248	4,409	0,083	0,251
12	<i>t</i> -Sinnamik Asit	0,991	0,221	0,836	0,018	0,055
13	Luteolin	0,995	0,259	8,666	0,073	0,221

Tablo 22. RP-HPLC-UV ile bal örneklerinin fenolik bileşen sonuçları

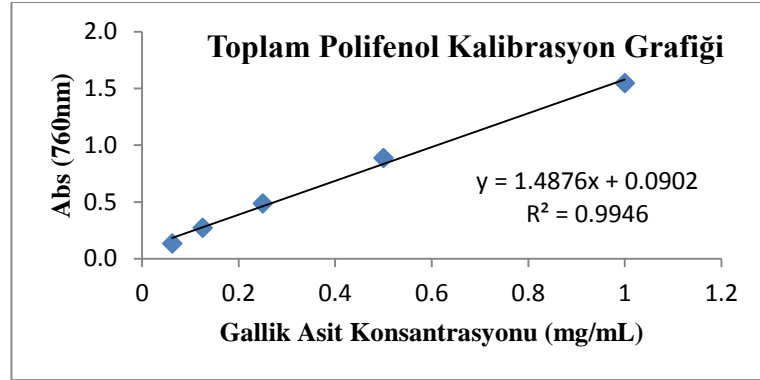
<b>Standartlar</b>	<b>Bal 1</b>	<b>Bal 2</b>	<b>Bal 3</b>	<b>Bal 4</b>
Gallik Asit	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.
Protokatekuik Asit	0,90	0,26	0,83	<b>53,26</b>
<i>p</i> -OH benzoik Asit	<b>8,52</b>	1,36	<b>8,23</b>	10,90
Kateşin	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.
Vanilik Asit	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.
Kafeik Asit	1,70	0,36	1,35	t.e.
Şiringik Asit	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.
Epikateşin	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.
<i>p</i> -Kumarik Asit	4,51	<b>3,31</b>	4,02	1,50
Ferulik Asit	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.
Rutin	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.
<i>t</i> -Cinnamic Acid	0,23	1,20	0,12	t.e.
Luteolin	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.

t.e.: Tespit edilemedi.

### 3.3. Antioksidan Sonuçları

#### 3.3.1. Toplam Fenolik Madde Testi Sonucu

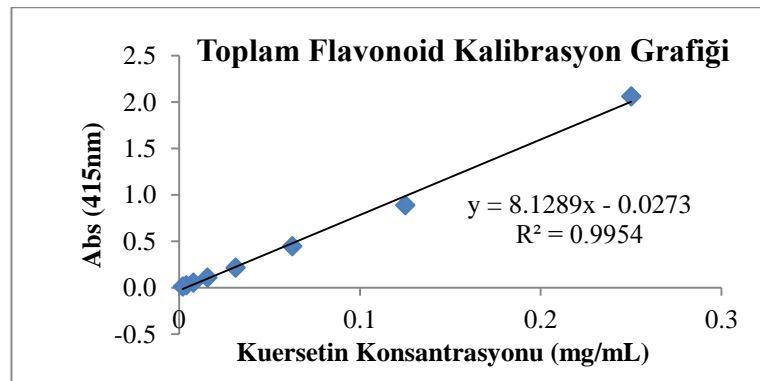
Analizler için bal örnekleri metanolik ekstraktları hazırlanarak toplam fenolik madde miktarı gallik asit standardına göre tayin edildi. Elde edilen 760 nm'deki absorbans değerleri y-ekseninde ve konsantrasyon değerleri x-ekseninde olacak şekilde bir standart çalışma grafiği hazırlandı. Elde edilen standart çalışma grafiğinde absorbans konsantrasyonla doğru orantılı olup, elde edilen doğru denklemi  $y=1,4876x+0,0902$  olarak tespit edildi (Şekil 4). Hazırlanan standart çalışma grafiği kullanılarak öncelikle 1 g balın içerdiği mg cinsinden toplam fenolik madde miktarı belirlendi. Balların toplam fenolik madde miktarları Tablo 23'teki gibidir. Sonrasında numunelerdeki toplam fenolik madde miktarı 20,55-62,03 mg GAE/100 g bal olduğu hesaplandı ve en yüksek değer Bal 7 numunesinde tespit edildi.



Şekil 4. Toplam fenolik madde kalibrasyon grafiği

### 3.3.2. Toplam Flavonoid Madde Testi Sonucu

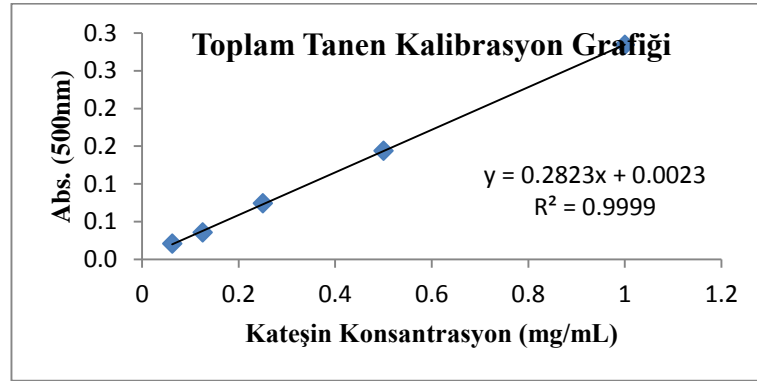
Metanolik olarak hazırlanmış olan bal örnekleri toplam flavonoid madde miktarları kuersetin standardına göre hesaplandı. Değişen konsantrasyonlarda hazırlanan standart kuersetin çözeltileri yardımıyla toplam flavonoid madde miktarları tayin edildi. Elde edilen 415 nm'deki absorbans değerleri y-ekseninde ve konsantrasyon değerleri x-ekseninde olacak şekilde bir standart çalışma grafiği hazırlandı. Elde edilen doğru denklemi  $y=8,1289x-0,0273$  olarak tespit edilip (Şekil 5), bu denklemden faydalanılarak 1 g balın mg kuersetin cinsinden toplam flavonoid madde miktarı hesaplandı. Toplam flavonoid madde miktarı ballarda 0,58-7,29 mg QE/100 g numune olarak hesaplandı. En yüksek değer Bal 13 olduğu tespit edildi. Sonuçlar Tablo 23'teki gibidir.



Şekil 5. Toplam flavonoid madde kalibrasyon grafiği

### 3.3.3. Toplam Tanen Testi Sonucu

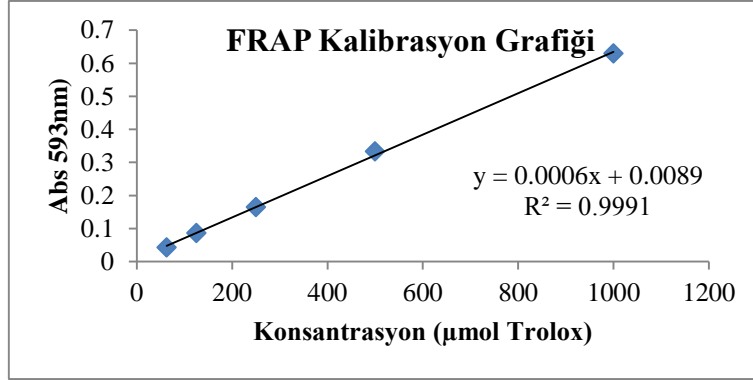
Metanolik olarak hazırlanmış olan bal ve polen örnekleri toplam tanen miktarları kateşin standardına göre hesaplandı. Değişen konsantrasyonlarda hazırlanan standart kateşin çözeltileri yardımıyla toplam tanen miktarları tayin edildi. Elde edilen 500nm'deki absorbans değerleri y-ekseninde ve konsantrasyon değerleri x-ekseninde olacak şekilde bir standart çalışma grafiği hazırlandı. Elde edilen doğru denklemi  $y=0,2823x+0,0023$  olarak tespit edilip (Şekil 6), bu denklemden faydalanılarak 1 g balın mg kateşin cinsinden toplam tanen miktarı hesaplandı. Sonrasında toplam tanen miktarı ballarda 1,99-8,03 mg KE/100 g bal olarak hesaplandı. En yüksek değer Bal 4'te olduğu tespit edildi. Sonuçlar Tablo 23'teki gibidir.



Şekil 6. Toplam tanen kalibrasyon grafiği.

### 3.3.4. FRAP Testi Sonucu

Bu yöntem ile  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  Troloks® eşdeğeri, demir (III) indirgeme yeteneğine sahip antioksidanların konsantrasyonu belirlenir. Kalibrasyon için Troloks®'un farklı konsantrasyonları kullanılarak oluşturulan standart çalışma grafiği aşağıda verilmektedir (Şekil 7). Balların FRAP sonuçları Tablo 23'teki gibidir. Ballar için FRAP değeri 89,52-602,08  $\mu\text{molTroloks}/100\text{g}$  bal arasında olduğu hesaplandı. Ballardan en yüksek değere sahip numunenin Bal 7 olduğu tespit edildi.



Şekil 7. FRAP kalibrasyon grafiği

Tablo 23. Toplam polifenol, toplam flavonoid, toplam tanen, FRAP ve DPPH testleri sonucu

Numune İsmi	TP	TF	TT	FRAP (µmol Troloks/100g)	DPPH-SC <sub>50</sub> (mg/mL)
	(mg GAE/100g numune)	(mg QE/100g numune)	(mg KE/100g numune)		
Bal 1	31,16±0,11	0,97±0,00	5,61±0,47	145,20±1,24	49,12±0,00
Bal 2	27,68±1,83	0,83±0,02	6,11±0,28	129,17±0,62	50,38±2,18
Bal 3	34,77±0,88	1,54±0,03	5,97±1,07	189,48±2,08	28,27±0,67
Bal 4	43,27±0,16	1,08±0,02	8,03±0,20	201,80±1,21	32,15±0,58
Bal 5	44,07±0,29	0,58±0,04	3,65±0,13	127,55±0,37	66,37±1,82
Bal 6	27,59±0,37	3,02±0,02	<b>8,03±0,38</b>	212,27±2,92	49,12±0,35
Bal 7	<b>62,03±0,74</b>	5,30±0,03	4,84±0,50	<b>602,08±7,71</b>	<b>12,22±0,10</b>
Bal 8	34,06±0,85	6,24±0,11	3,54±0,15	151,56±1,29	55,84±2,55
Bal 9	21,40±0,69	4,72±0,12	2,22±0,18	105,65±1,18	76,41±0,00
Bal 10	20,55±0,44	3,83±0,12	1,99±0,54	89,52±1,78	85,56±0,00
Bal 11	28,13±0,95	5,31±0,18	2,89±0,00	159,86±0,57	45,85±0,00
Bal 12	25,98±0,81	6,72±0,05	3,45±0,29	117,86±1,08	76,41±0,00
Bal 13	41,83±0,43	<b>7,29±0,06</b>	4,07±0,26	320,98±1,88	22,44±0,83

**Std. Troloks  
0,005±0,0001**



### 3.3.5. DPPH• Testi Sonucu

DPPH• radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), temizleme aktivitesi tayininde çok yaygın olarak kullanılmaktadır. x-ekseninde artan numune konsantrasyonuna karşı y-ekseninde azalan absorbans değerleri grafiğe geçirildi ve bu grafikten faydalanılarak maksimum absorbansın yarısına denk gelen numune konsantrasyonu SC<sub>50</sub> değeri olarak ifade edildi. Antioksidan aktiviteye bakılırken numunelerle Troloks®'un SC<sub>50</sub> değerleri karşılaştırılmıştır. DPPH• radikali temizleme aktivitesi tayininde küçük SC<sub>50</sub> değeri yüksek radikal temizleme kapasitesini göstermektedir. Balların SC<sub>50</sub> değerlerinin 12,22-85,56 mg/mL arasında değişim gösterdiği hesaplandı. Sonuçlara göre en yüksek radikal temizleme aktivitesine sahip bal numunesi Bal 7'dir (Tablo 23).

Tablo 24. Korelasyon tablosu

		<b>RENK (L)</b>	<b>TP</b>	<b>FRAP</b>	<b>DPPH</b>
<b>RENK(L)</b>	Pearson Correlation	1	-0,497(**)	-0,639(**)	0,662(**)
	Sig. (2-yön)		0,001	0,000	0,000
	N	39	39	39	39
<b>TP</b>	Pearson Correlation	-0,497(**)	1	0,836(**)	-0,748(**)
	Sig. (2-yön)	0,001		0,000	0,000
	N	39	39	39	39
<b>FRAP</b>	Pearson Correlation	-0,639(**)	0,836(**)	1	-0,775(**)
	Sig. (2-yön)	0,000	0,000		0,000
	N	39	39	39	39
<b>DPPH</b>	Pearson Correlation	0,662(**)	-0,748(**)	-0,775(**)	1
	Sig. (2-yön)	0,000	0,000	0,000	
	N	39	39	39	39

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Bu çalışmada renk(L), toplam fenolik madde miktarı, FRAP, DPPH, testleri arasında korelasyon olup olmadığına bakıldı. İstatistiksel analiz sonucu hepsinde anlamlı korelasyonlar olduğu görüldü. Renk (L) değeri ve DPPH radikali temizleme aktivitesi ile toplam fenolik madde miktarı ve FRAP testleri arasında anlamlı negatif korelasyonlar olduğu görüldü. Renk koyulaştıkça (L değeri azaldıkça) polifenolik içeriğin arttığı, Fe<sup>+3</sup> indirgeme yeteneğinin de arttığı sonucuna (negatif korelasyon)varıldı. Buna ek olarak rengin koyulaşmasıyla DPPH radikalinin temizlenmesi pozitif korelasyon gösterdi (Tablo 24).

### 3.4. Antimikrobiyal Analiz Sonuçları

Baldaki antimikrobiyal aktivitesi onun asitliğine, pH'sına, osmotik basıncına, glukoz oksidaz aracılığıyla enzimatik olarak hidrojen peroksit üretimine bağlıdır. Buna ek olarak aromatik asitler veya fenolik bileşenler, antimikrobiyal aktiviteye bütün olarak katkıda bulunabilir. Sonuçlar Tablo 25'teki gibidir. Püren balının hem gram (-) hem de gram (+) bakterilere karşı etkin olduğu, mayalara karşı ise aktivitesinin olmadığı tespit edildi.

Tablo 25. Bal örneklerinin antimikrobiyal aktivite sonucu

Numune	<u>Gram (-)</u>				<u>Gram (+)</u>				<u>Maya</u>			
	E.c.		P.a.		S.a.		B.s.		C.a.		C.k.	
	zç	mik	zç	mik	zç	mik	zç	mik	zç	mik	zç	mik
Bal 1	15	1/8	15	1/16	19	1/16	16	1/8	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.
Bal 4	13	1/8	15	1/16	17	1/8	15	1/8	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.

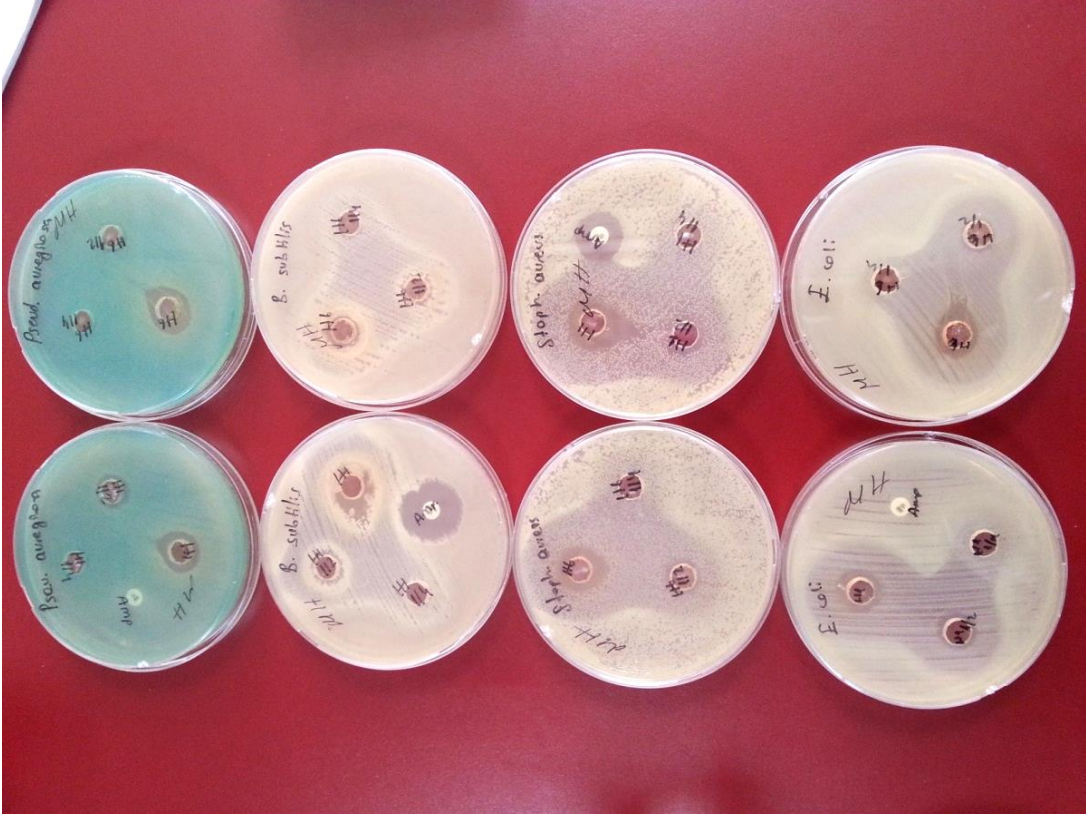
E.c. *Escherichia coli* B.s. *Bacillus subtilis* S.a. *Staphylococcus aureus* P.a. *Pseudomonas aeruginosa* C.a. *Candida albicans*, C.k. *Candida krusei*.

t.e.: Tespit edilemedi (Bu suşlarda inhibisyon ve zon çapı oluşmadı.)

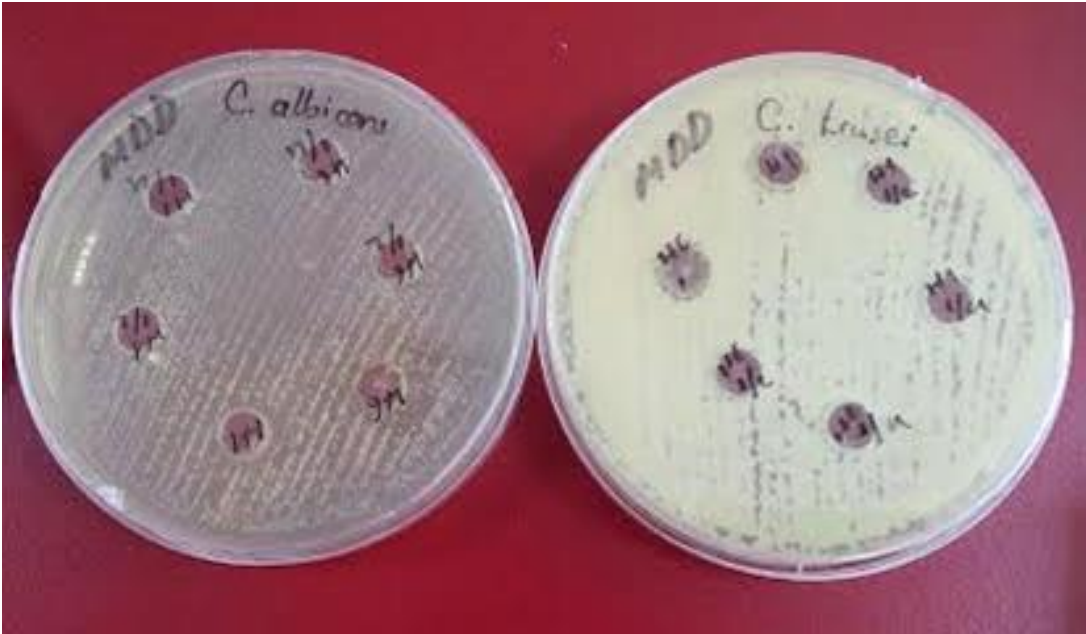
MİK: Mikroorganizmanın üremesinin engellendiği en düşük konsantrasyondur.

(seyreltme oranı): Örneğin; MİK'i 1/8 olarak rapor edilen bir örnek 1/8 seyreltildiğinde adı geçen mikroorganizmayı inhibe etmiş demektir.

Yorum olarak en iyi antibakteriyel özellik sağlayan numune için MİK değerinin en düşük, inhibisyon zonunun ise en büyük olması gerekir. Yani Bal 1 numunesi tüm bakteriler için Bal 4 numunesinden daha iyi antibakteriyel özellik göstermiştir. Bu sonuç incelenen Bal 1 numunesinde bulunan antibakteriyel bileşiklerin etkisinin daha fazla olduğunu gösterir. Ayrıca iki bal numunesi de mayalara karşı etki göstermemiştir. Şekil 8 ve Şekil 9'da metodlara ait görseller bulunmaktadır.



Şekil 8. Gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı disk difüzyon metodu



Şekil 9. Mayalara karşı disk difüzyon metodu

#### 4. TARTIŞMA

İnsanoğlu için önemli bir besin kaynağı olan balın fiziksel, kimyasal ve biyoaktif özellikleri coğrafik konum ve floranın farklılaşmasıyla değişmektedir (Izhar-ul-Haq vd., 2010). Balın insan sağlığını korumadaki rolü onun saflığı ve bileşimi ile yakından ilişkili olup üretildiği bölgenin coğrafik özellikleri, bitki florası, hasat zamanı ve üretim şekli gibi pek çok faktöre bağlı olarak değişim göstermektedir (Özbalcı, 2013).

Püren balı Türkiye’de özellikle Akdeniz, Ege ve Muğla yöresine ait otantik koyu renkli bir bal olup çok değerli görülmekte ve yöre halkı tarafından şifa kaynağı olduğu düşünölmektedir. Ancak ölkemizde bilimsel çevrelerce ve halk arasında çok fazla bilinmeyen bu bal literatürde özellikle Avrupa’da çok iyi bir yere sahiptir. Püren balının özellikle Avrupa’da terapötik kullanımıyla ilgili ümit verici veriler bulunmaktadır.

Avrupa’da çok tercih edilen kaliteli bir bal türü olması, literatüre oldukça fazla konu olmasına rağmen, Türkiye florasına ait püren balları ile ilgili yapılan geniş kapsamlı bir araştırmanın bulunmayışı, bu balın yaygın olarak üretimi yapılabilecek alanlarda bile üretiminin yapılmaması ve çok fazla yaygın tüketilen bir bal olmaması, bu alanda ki literatür boşluğunu kısmen de olsa doldurulması amacıyla Türkiye florasına ait olan püren balının karakterizasyonu için bu tez çalışması yapılmıştır.

Balın saflığı gıda kodekslerine (TSE vb.) göre fiziksel olarak; su içeriği, iletkenlik, asitlik, pH, renk değerı, kimyasal olarak; şeker oranları, (%C4/C13), prolin miktarı, diastaz aktivitesi, hidroksimetilfurfural değerı ve çözünmeyen maddeler gibi kriterler kullanılarak belirlenmektedir (Molina, 1989; White, 1978). Bu kriterlerle balın fiziksel ve kimyasal özellikleriyle beraber saflığı ve doğallığı da ortaya çıkarılmaktadır.

Bu çalışmada 2014 ve 2015 yılına ait olmak üzere toplam 13 püren balı kullanıldı. Ballarda fiziksel parametrelerden; polen analizi, optik çevirme açısı, %nem, %Briks, elektriksel iletkenlik, pH, renk değerı, kimyasal parametrelerden; diastaz, HMF (hidroksi metil furfural), prolin, şeker, içeriği ölçöldü.

Püren balları arıcılardan kendi beyanları doğrultusunda monofloral bal olarak toplandı. Yapılan polen analizleri sonucu balların bir kısmı monofloral olarak tespit edilirken bir kısmının da çok düşük polen yüzdesine sahip olduğu bulundu. Çalışılan tüm püren ballarının polen sayım sonuçları Tablo 7’de yer almaktadır. Tüm testler polen yüzdesi %45’ten yüksek ballarda yapıldı. Polen analizi sonucunda balların polen yüzdesinin %45-%90 aralığında olduğu tespit edildi. Böylece tezde çalışılan balları monofloral bal ve püren balı olarak iki şekilde de adlandırabiliriz. Numunelerde polen yüzdesi sıralaması Bal 4> Bal 8= Bal 7> Bal 1>Bal 9> Bal 13= Bal 2> Bal 5> Bal 10= Bal 5> Bal 11> Bal 3= Bal 6= Bal 2 şeklindedir.

Optik rotasyon metodu ile salgı ballarının optik çevirme açısı sağa (+) iken, çiçek balların ki ise sola (-) yönelmektedir (Junk ve Pancoast, 1973). Örneklerin optik çevirme açısı polarimetre cihazı kullanılarak (Beta PPP7 Optical Activity, England) tayin edildi. Balda ayrıca optik rotasyona sebebiyet verebilecek olan proteinlerin çökmesi Carrez I-II reaktifleriyle sağlandı ve ölçüm bu şekilde yapıldı. Ölçülen püren ballarının 10 tanesinin negatif değerde olduğu yani optik çevirme açısının sola yöneldiği; 3 tanesinin de pozitif değerde olduğu yani optik çevirme açısının sağa yöneldiği belirlendi. Cavarar vd., (2013) farklı kalitede Türk ballarının fiziksel ve biyokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması çalışmasında çiçek, kestane gibi çiçek ballarının optik rotasyonlarının negatif olduğunu tespit etmişlerdir. Mevcut çalışmadaki püren ballarından 10 tanesinin optik rotasyon değerlerinin literatürle uyumlu olduğu ve -0,15 ile 2,27 arasında olduğu bulunmuştur (Tablo 16). Çalışılan ballardan üçününse pozitif değerde olduğu ve +0,52 ile +4,11 arasında olduğu bulunmuştur.

Püren bitkisi çam ağaçlarının altında yetişen maki türü bir bitkidir ve arılar bal nektarını toplarken çamdan ve pürenden aynı anda nektar toplayabilmektedir. Bu sebeple balda püren çiçeği polen yüzdesi yüksek çıkabilirken, bir yandan da nektar çam salgısından da toplamış olabilir. Yani arı hem püren çiçeğine konmuş hem de çamdan salgı toplamış olabileceğinden + değer bulunmuş olabilir.

Nem tayini balın kırılma indisinden faydalanarak refraktometre (Atago, Germany) ile ölçüldü. % nem değerlerinden de % Briks (% kuru madde) değerleri hesaplandı. Yüksek nem içeriğinin mikrobiyal bozunmaya ve de kristalizasyona neden olduğu bilinmektedir (Tosi vd., 2002). Su miktarı balın toplandığı bölgenin coğrafik özelliklerine ve hasat zamanı ve biçimine göre de değişim gösterir (Oddo ve Piro, 2004; Bogdanov vd., 2004). Erken hasat edilen balda olgunlaşma tam gerçekleşemediğinden balın nemi yüksek bulunur. Türk gıda kodeksinde (TGK) göre çiçek ve salgı balında nem içeriği en fazla % 20 olmalıdır. Portekiz bölgesine ait monofloral balların fiziksel özellikleri çalışmasında kullanılan püren balının nem içeriğini % 17,8-20,6 bulunmuştur (Alves vd., 2013). Can vd., (2015)’in monofloral ballarla yaptığı

çalışmada ise beş tane püren balının nem içeriğinin ortalamasını % 20,86 olarak tespit etmişlerdir. Mevcut çalışmada da çiçek balı olan püren ballarının nem içeriği Türk Gıda Kodeksi ile uyum içerisinde olup balların nem içerikleri % 13,33-20,10 arasında değişim göstermektedir (Tablo 17).

Balda elektriksel iletkenlik esas olarak balın mineral madde içeriğinden kaynaklanmaktadır (Andrade vd., 1997) Bal standartlarına göre ballarda elektriksel iletkenlik değeri çiçek balı ve fırıncılık balında 0,8 mikrosiemens/cm'den fazla olmamalıdır. Mevcut çalışmadaki balların elektriksel iletkenlik değerleri 0,557-1,792 mikrosiemens/cm arasında olup değerler Tablo 17'deki gibidir. Püren ballarının elektriksel iletkenlik değerleri 0,8 milli Siemens/cm'nin üzerinde bulundu. Koyu renkli ballardan olan bu balların yüksek elektriksel iletkenlik değerleri yapılarında yer alan yüksek mineral madde ve fenolik madde miktarından kaynaklandığı literatürde ileri sürülmektedir (Can, 2015).

Mevcut çalışmadaki pH değeri püren balı için 3,70-5,21 arasında ölçülmüştür. Balın pH değeri değişik şartlar altında 3,4 ile 5,5 arasında değişmekle birlikte ortalama olarak 3,9'dur (Aydın vd., 2008; Kahraman vd., 2010). Balın pH'sı iyonize asitlere ve mineral maddelere bağlıdır. Serbest asitlik lezzete katkıda bulunur, mikroorganizmalara karşı dayanıklılık sağlar, kimyasal reaksiyonları, antibakteriyel ve antioksidan özelliği artırır ayrıca balın kaynağı hakkında bazı bilgiler verir (Cavia vd., 2007). Ancak serbest asitlerin artışı balda fermentasyonun göstergesi de sayılmaktadır. Çünkü baldaki şekerler ve alkoller baldaki mayalar tarafından asetik aside dönüştürülmektedir (Alvarez-Suarez vd., 2010a; Cavia vd., 2007). Sonuç olarak balın pH'sının literatürde verilen değerlerle uyum içerisinde olduğu bulunmuştur. Ayrıca yüksek miktarda serbest asitliğe ve nem içeriğine sahip olan püren ve süpürge otu ballarının diğer ballardan bu özellikleriyle ayrıldığı belirtilmektedir (Nozal Nalda vd., 2005).

Balın saflığını ve doğallığını belirleyen diğer bir fiziksel özelliği de rengidir. Bala renk veren maddeler sarı ve yeşil rengi meydana getiren klorofil, karoten, ksantofil ve bileşimi bilinmeyen bitki pigmentleridir (Ulusoy ve Kolaylı, 2013). Balların renk sonuçları (L, a, b)Tablo 17'deki gibidir. Balların renk değerlerindeki farklılık aroma ve tat gibi özellikleri, iklim, üretim koşulları ve floral kaynağına bağlı olarak değişim gösterir (Anupama vd., 2003). L, koyuluk/açıklık ( 0: siyah; 100:beyaz); a (-a, yeşillik; +a, kırmızılık); ve b (-b, mavilik; +b, sarılık) olarak ifade edilmektedir Koyu renkli balların L değerinin, açık renkli olan ballara göre daha düşük olduğu görülmüştür. Mevcut çalışmadaki balların ortalama L; a; b değerleri; en açık renkli numunenin Bal 10, en koyu renkli numunenin Bal 7 olduğu tespit edildi. Kırmızılık karakteri en yüksek olan numune Bal 4, sarılık karakteri fazla olan (b değeri

yüksek) numuneninse en açık renkli bal olan Bal 10 olduğu tespit edilmiştir. Püren balının diğer ballarla karşılaştırıldığında koyu renkli bir bal olduğu ve L: 46,05 olduğu tespit edilerek literatürde verilmiştir (Can vd., 2015). Sonuçlar literatürdekiyle uyumludur. Püren balı gibi koyu renkli balların açık renkli olanlara oranla oldukça yüksek oranda fenolik bileşen içerdiği bildirilmektedir (Estevinho vd.,2008; Ferreira vd.,2009). Balların renklerinin koyulukları arttıkça balların monofloral karakteri de artmaktadır (Can, 2014). Ayrıca püren balının koyu renkli bir bal olması halk arasında tercih edilebilirliğini de arttırmaktadır.

Balda rengi değiştiren diğer bir faktör de HMF miktarıdır. HMF (hidroksimetil furfural) nektarın olgunlaşması sırasında şekerler ve aminoasitlerin reaksiyonuyla ortaya çıkan Maillard (enzimatik olmayan esmerleşme) reaksiyonunun temel bir ürünüdür. Arıcıların baldaki kristallenmeyi önlemek veya çözmek için ya da balın peteklerden süzülmesini kolaylaştırmak için yüksek sıcaklık uygulamaları sonucunda HMF miktarını yükselir. Bu esnada balda bulunan diastaz enzimi protein yapılı olduğundan sıcaklık etkisiyle denatüre olur ve aktivitesi düşer. Balda bulunan diastaz doğal bir enzim olup, balın coğrafyasına bitki orijinine göre bu değer değişmektedir (Gomes vd., 2010). Balın orijin farklılığına göre diastaz aktivitesi ve iletkenliği değişim göstermektedir (Escriche vd., 2011). Ayrıca depolama sıcaklığı ve süresine bağlı olarak da balın diastaz aktivitesi azalırken HMF miktarı artmaktadır (Tosi, 2002). Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliğine göre balların HMF değeri 40 mg/kg'dan yüksek olmamalıdır. Ayrıca diastaz sayısı da 8'den az olmamalıdır. Ancak narenciye balı gibi yapısında doğal olarak düşük miktarda enzim içeren ve doğal olarak HMF miktarı 15 mg/kg'dan fazla olmayan balda diastaz sayısı 3'den az olamaz. Çalışmadaki balların HMF değerleri 2,97-28,50 mg/kg arasında değişim göstermektedir (Tablo 18). Yapılan çalışmada püren ballarının HMF değerinin genel olarak standartlara uygun olduğu tespit edilmiştir. Balın üretildiği bölgenin sıcak olması balların diastaz seviyesinin kısmen düşük olmasında bir etken olarak gösterilebilir. Ayrıca püren balı diğer ballardan farklı olarak tazeyken nispeten açık renkli olmakla birlikte, durdukça rengi koyulaşmaktadır. Bunun pek çok sebebi bulunabilir fakat özellikle püren balında bulunabilen bazı fenolik bileşenlerin havanın oksijeni ve enzimatik (glukoz oksidaz) ve enzimatik olmayan kararma ürünleri meydana getirebilmesi buna sebep olarak gösterilebilmektedir (Can 2014). Aynı zamanda mevcut çalışmadaki balların diastaz sayısı (DU) 7,06-14,99 arasında olup genel olarak standartlara uygun ve kısmen düşük değerde olduğu bulundu. Balda diastaz aktivitesinin azalması gibi, çok yüksek düzeyde bulunması da istenmeyen bir durumdur. Balda yüksek düzeyde diastaz bulunması yüksek asit oluşumuna dolayısıyla fermantasyona yol açabildiği literatürde verilmektedir (Crane, 1975).

Balda bulunan prolin, nektarın bala dönüşmesi sırasında temel olarak arı tarafından bala katılan tek aminoasit olup toplam aminoasitlerinin %50-85'ini oluşturmaktadır (Hermosín vd., 2003). Arı tarafından bala katılan tek amino asit olduğu için prolin miktarı balın kalitesinin bir göstergesi de olabilir. Çalışmadaki püren ballarının prolin değeri 489,65–1393,46 mg/kg arasında bulunmuştur. Sonuç Tablo 18'deki gibidir. Ancak balda tespit edilen prolinin nektardan mı arıdan mı kaynaklandığı tespit edilememiştir. Can vd., (2015) yaptığı Türkiye florasına ait monofloral balların araştırılması çalışmasında prolin miktarının en yüksek değerinin püren balında olduğunu ve ortalama 845 mg/kg olduğunu tespit etmişlerdir. Mevcut çalışmadaki püren ballarının bu bağlamda literatürdeki ballardan kısmen daha yüksek prolin içeriğine sahip olduğu görülmektedir. Prolin değerinin yüksek çıkmasının diğer bir sebebinin fazla yağışla birlikte arıların daha çok uçması sonucunda olabileceği düşünülmektedir. 2015 yılında toplanan püren ballarının prolin değerinin daha yüksek olmasının sebebi, yıllık yağışa ve mevsime bağlı olarak değişkenlik göstermiş olabilir. Prolin miktarı ayrıca balın protein içeriğini göstermesi açısından önemli bir kriterdir.

Balın kuru ağırlığının % 95'ni şekerler oluşturmaktadır. Balda genel olarak şekerlerin % 70'i monosakkarit türleri, % 10-15'i disakkaritler ve geri kalanını ise oligosakkaritler oluşturmaktadır (Ouchemoukh vd., 2010). Çalışmada 10 tane standart şeker kullanılmıştır. Yapılan çalışmada tüm bal çeşitlerinin fruktoz miktarının glukoz miktarından yüksek bulunması literatürle uyumludur (Cavia vd., 2002; De Villers vd., 2004; Can vd., 2015). Escuredo vd., (2014) monofloral balların şeker bileşenleri belirlenmesi çalışmasında koyu renkli ballarının F/G oranı 0,9-1,4 arasında olduğunu tespit etmiş, F/G oranı düşük olan balların daha hızlı kristalize olduğunu bildirilmektedir. Fruktoz ve glukoz oranı balın türüne göre değişim göstermektedir ve glukoz oranı yüksek ballar oda sıcaklığında kristalleşmeye eğilimlidir (Cavia vd., 2002). Glukoz oda sıcaklığında kristallenmeye meyilli bir bileşik olup balın kristallenmesinden sorumludur (Anklam, 1998). Çalışmadaki püren ballarının F/G oranı 1,28-1,90 arasında olup bu oranın diğer ballardan yüksek olduğu bulundu (Can, 2015). Balın ilk ana bileşeni fruktozdur. Mevcut çalışmadaki fruktoz değerleri %29,11-38,23 arasında tespit edilmiştir. Can vd., (2015) Türkiye florasına ait beş püren balının ortalama fruktoz değerini %45,11 olarak bulmuştur. Balın ikinci ana bileşeni olan glukoz aynı çalışmada püren balları için ise %25 olarak bulunmuştur. Mevcut çalışmadaki glukoz miktarı diğer bileşenler gibi nektara bağlı olup ballardaki miktarı 20,17-30,18g/100 g arasında değişim göstermektedir. Mevcut çalışmadaki sonuçlarla karşılaştırıldığında fruktoz miktarlarının literatüre göre düşük olduğu görülmektedir. Escuredo vd., (2013) püren ballarıyla yaptıkları çalışmada karbohidrat içeriğine bakıldığında salgi ve kestane ballarının karbohidrat içeriğinin



püren balından oldukça düşük olduğunu bulmuşlardır. Aynı zamanda salgı ballarının ortalama fruktoz değeri en düşükken püren ballarının en yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (Escuredo vd., 2013). Ayrıca yapılan çalışmada sadece bir tek püren balında melezitoz şekeri % 1,99 olarak tespit edilirken diğer hiçbir bal örneğinde melezitoz şekerine rastlanmadı.

Yukarıda bahsedilen kriterler balın sadece saflığını ve doğallığını ortaya çıkarmada yardımcı olan kriterlerdir. Balın gerçek kalitesini yansıtmamakta ve balın biyoaktivite potansiyeli hakkında bilgi vermemektedir. Balın esas kalitesini belirleyen faktör balın biyolojik değeri olup bundan sorumlu bileşikler, balda ancak % 1–2 oranında bulunabilen, ikincil metabolit ürünler olarak adlandırılan çeşitli uçucu bileşenler ve fenolik maddelerdir (Bogdanov, ve ark., 2004; White, 1979). Balın biyolojik aktivite kriterleri olarak ise başta antioksidan olmak üzere, antimikrobiyal (bakteriyel, fungal ya da viral), anti-inflamatuar ve antitümöral özellikleri ön plana çıkmaktadır. Bu özelliklerin temelini ise bal arısının ırkı, coğrafi bölgesi ve nektar temin ettiği bitki florası oluşturmaktadır (Molan, 2000).

Bal ve diğer arı ürünlerinde bulunan biyoaktif bileşenler fenolik yapıya sahip ajanlar olup bunlara polifenoller adı verilmektedir. Bu tür kalite parametreleri ne Türk Gıda Kodeksinde ne de TSE standartlarında bulunmamaktadır.

Balların antioksidan özelliklerinden sorumlu bileşenlerin başında fenolik bileşikler yer almaktadır (Santos-Buelga vd., 2012). Fenolik maddelerin çeşide bağlı olarak antioksidan kapasiteyi değiştirebilmesine rağmen bir ekstraktın toplam fenolik içeriği ekstraktın antioksidan aktivitesi ile genellikle uyumluluk gösterir. Bu yüzden pek çok bitki ekstraktının antioksidan aktivitesinin ekstraktaki fenolik maddelerden kaynaklandığı görüşü yaygın olarak kabul edilmektedir (Schwarz vd, 2001). Balın fenolik içeriği ile antioksidan kapasitesi arasında pozitif ilişki olduğu pek çok araştırmada ortaya çıkartılmıştır (Küçük vd., 2007).

Çalışmada 13 farklı fenolik bileşen standardı kullanarak HPLC-RP-UV ile 280 nm’de dedeksiyon yapıldı. Çalışmada kullanılan tüm püren ballarında protokatekuik asit, p-OH benzoik asit, p-kumarik asit tespit edilirken Bal 4 numunesi haricinde tüm numunelerde t-sinammik asit olduğu tespit edildi. Ancak Bal 4 numunesinin major bileşeni olarak protokatekuik asit 53,26 µg/g olarak bulunmuştur.

Sergiel vd. (2014) farklı monofloral balların LC-Tandem-MS ile 14 adet fenolik bileşenden püren balının major flavonoidinin kuersetin ve major fenolik asidin p- OH benzoik asit olarak belirlemiştir. Bu çalışma verileri ile çalışmamızdaki püren balı fenolik markerlerinin benzer olduğu 4 numuneden 2’sinin major olarak p- OH benzoik asit; 1’inin major olarak p-kumarik asit; 1’inin de major olarak protokatekuik asit içerdiği öne çıkmaktadır.

Balın klinik önemiyle ilgili Feás vd.,(2013)'de yapılan araştırmada balın fenolik içerik yönünden zengin olduğu, fenolik bileşenlerin flavonoidler (krisin, pinocembrin, pinobanksin, kuersetin, kaempferol, luteolin, galangin, apigenin, hesperetin, myrisetin), fenolik asitler (kafeik, kumarik, ferulik, ellagik, klorojenik) stilbenler, lignanlar, tanenler ve okside polifenoller olduğunu bildirmektedirler. Mevcut çalışmadaki fenolik madde sonuçlarında da Feás vd.,(2013)'le paralel olarak püren ballarının fenolik asitlerden kafeik asit, p-kumarik asit içerdiği tespit edilmiştir.

*Erica* spp. ballarının ellagik, p-hidroksibenzoik, şiringik ve o-kumarik asitle karakterize edildiği ve 2-Ellagik asit (gallik asitin dimerik türevi) ve myrisetin 3'-metil eterin *Erica* sp ballarında floral orjin belirlemede bir markör olabileceği ifade edilmektedir (Andrade vd.,1997; Ferreres vd.,1996a). Aynı zamanda aynı grubun başka bir çalışmasında absisik asitin püren balı için floral bir markör olduğu da ifade edilmektedir (Ferreres vd., 1996b). Mevcut çalışmada püren ballarında p-hidroksibenzoik asit ve şiringik asit bulunması Andrade vd.,(1997) ve Ferreres vd.,(1996a) ile paralellik gösterdiği görülmektedir.

Bu tezde apiteparik bir ürün olan püren balının antioksidan özellikleri de biyoaktif özellik olması açısından araştırılmıştır. Bitkilerde farklı çeşitlerde antioksidanlar mevcut olduğundan ve her bir antioksidan bileşeni tek tek belirlemek oldukça çok zor olacağından bir kaç farklı test kullanılarak püren ballarının antioksidan kapasitesi belirlenmiştir. Antioksidan potansiyelini test etmek üzere balların metanolik ekstraktları hazırlanarak spektrofotometrik in vitro antioksidan analizleri için toplam fenolik içerik, toplam flavonoid içerik, toplam tanen miktarı, demir indirgeme gücü FRAP, DPPH● radikal temizleme testleri yapıldı.

Püren balının Folin-Ciocalteu metoduyla belirlenen toplam fenolik madde miktarının literatürdeki fenolik madde miktarları ile karşılaştırıldığında Muğla florasına ait balların 20,55-62,03 mgGAE/100 g numune arasında olup orta derecede fenolik madde miktarına sahip olduğu görülmektedir (Tablo 23). Toplam fenolik madde miktarının, balın biyolojik aktivitesinden sorumlu olması nedeniyle çok önemli olduğu belirtilmektedir (Küçük vd., 2007). Balın antioksidan ve radikal süpürücü özelliğinin içerisinde bulunan fenolik bileşenlerden kaynaklandığını belirtmektedirler (Aljadi ve Kamaruddin, 2004) Estevinho vd., (2008) yaptıkları çalışmada püren balının toplam ortalama fenolik içerik değerinin 68,85 mg GAE/100g numune olduğunu ifade edilmiştir. Total fenolik içerik yönünden bakıldığında püren balının (105 mg kateşin/100 g bal), polifloral (92 mg kateşin/100 g bal) ve biberiye (44mg kateşin/100 g bal) ballarından daha zengin bir içeriğe sahip olduğunu bulmuşlardır (Morales ve Haza, 2013). Ayrıca püren balı gibi koyu renkli ballardan açık renkli olanlara göre oldukça yüksek oranda fenolik bileşen ekstrakte edildiği de bildirilmektedir (Ferreira

vd.,2009). Bu durum günlük hayatta halk arasındaki koyu renkli bal tercihini doğrular niteliktedir.

Türkiye florasına ait monofloral ballardan beş püren balının ortalama toplam polifenol miktarını 90,64 mgGAE/100 g olduğunu, karışık çiçek ballarının ise 29 mgGAE/100 g olduğu yayınlanmıştır (Can, 2015). Fenolik bileşiklerin antioksidan, antitumörjenik ve serbest radikal temizleyici etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Lee, 2004). Ülkemiz florasına ait püren balları üzerine detaylı çalışma bulunmazken literatürde daha çok Balkanlar, İtalya, İspanya, Portekiz, Slovenya gibi ülkelerde püren ballarının yüksek polifenolik madde miktarı ve ona bağlı yüksek antioksidan kapasitesine sahip olduğu bildirilmektedir (Jasicka-Misiak vd., 2012; Alves vd., 2013). Yapılan çalışmalarda püren balının yüksek fenolik madde içerdiği ve antioksidan kapasitesinin yüksek olduğu bildirilmektedir (Castro-Vázquez vd., 2009; Alves vd., 2013; Jasicka-Misiak vd., 2012).

Çalışılan 13 bal numunesinin toplam flavonoid miktarı 0,58-7,29 mg Kuersetin/ 100g bal arasında değişim göstermiştir. Flavonoidler; antosiyaninler, antosiyanitler, flavonoller, iso-flavonollar ve flavonlar ile temsil edilen fenolik bileşiklerdir (Moise vd.,2013). Escuredo vd., (2013) yaptıkları çalışmada salgı balı ve kestane ballarının flavonoid içeriğini yüksek bulurken püren balının fenolik içeriğini daha yüksek bulmuşlardır.

Balın doğal antioksidan özelliği ve biyolojik aktivitesi, içerisinde yüksek oranda bulunan fenolik asitler ve flavonoidlerden kaynaklanmaktadır (Pyrzyńska vd.,2009). Balın antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde birçok yöntem olup, en yaygın kullanılan ve çalışmada da tercih edilen metotlardan biri de FRAP metodudur. Çalışılan tüm püren balı numunelerinin  $Fe^{+3}$  indirgeme yeteneğine sahip oldukları bulundu. Püren ballarının Troloks® eşdeğeri antioksidan güç değerleri 89,52-602,08  $\mu\text{molTroloks}^{\circledast}/100\text{g}$  aralığında olduğu tespit edilmiştir. Can vd., (2015) püren ballarının antioksidan kapasitesini yine aynı yöntem olan FRAP metoduyla çalışmış sonucu 135  $\mu\text{molTroloks}^{\circledast}/100\text{g}$  olduğunu bulmuştur. Literatürle karşılaştırıldığında mevcut çalışmadaki sonuçların kısmen yüksek olduğu görülmektedir.

DPPH● radikalini süpürme testi, çeşitli doğal ürünlerin serbest radikal süpürme yeteneğinin ölçülmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Nagai vd., 2003). DPPH● radikalinin % 50'sini süpüren antioksidan madde miktarı  $SC_{50}$  olarak tanımlanır ve düşük  $SC_{50}$  değeri numunenin yüksek radikal temizleme aktivitesini gösterdiğini gösterir. Balların DPPH● radikali temizleme aktivitesi tayini  $SC_{50}$  değerleri 12,22-85,56 mg/mL olup DPPH● testinde en yüksek aktivite Bal 7'de bulunurken, en düşük aktivitenin ise Bal 10 olduğu bulundu. Can, 2015 çalışmasında püren balı hayıt, üçgül, akasya, çalba gibi bazı çiçek ballarına göre yüksek, kestane ve manuka gibi diğer koyu renkli ballara göre düşük aktivite

göstermiştir. Balın antioksidan olarak davrandığı bilinen C vitamini, E vitamini, enzimler, fenolik bileşenler gibi bileşenleri içermesinden dolayı doğal radikal süpürücü olarak kullanılabileceği de ifade edilmektedir (Wilczyńska,2010).

Balın antimikrobiyal karakterinin fiziksel özelliklerine (pH, osmolarite), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve peroksit olmayan bileşenlere bağlı olduğu bildirilmiştir (Dias vd., 2008, Molan 1992, Weston 2000). Mevcut çalışmada kullanılan püren ballarından ikisinde antibakteriyel aktiviteye bakıldı ve hem gram negatif hem de gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyel etki göstermiştir. Ancak püren balları mayalara karşı antifungal özellik gösterememiştir. Feás vd., (2013) çalışmasında püren balının geniş bir antibakteriyel aktiviteye ve sınırlı oranda antifungal aktiviteye sahip olduğu, gram pozitif bakterilerin gram negatif bakterilere oranla daha duyarlı oldukları da ifade edilmiştir (Feás vd., 2013). Can (2014), çeşitli monofloral ballarla yaptığı çalışmada E.coli üzerinde en yüksek aktiviteyi akasya balı göstermiş onu lavanta, meşe, püren balı takip ettiğini ifade etmiştir. Yine aynı çalışmada da hayıt, geven, püren, lavanta, çam ve üçgül ballarının gram negatif bakterilere karşı etkin olduğunu tespit edildi (Can, 2014). Başka bir çalışma Estevinho vd. (2008) Portekiz'in belirli bir bölgesinden arıcılar birliği tarafından temin edilen açık ve koyu renkli balların antimikrobiyal aktivite çalışmasında balların gram pozitif bakterilere oranla gram negatif bakterilere karşı daha etkin olduğunu tespit etmiştir.

Bütün bu araştırmalara bakıldığında püren balının özellikle Avrupa'da oldukça fazla tercih edilen, pek çok araştırmaya konu olmuş, farklı bir aromaya sahip, değerli bir bal türü olduğunu anlamak mümkündür. Literatür tümüyle incelenmeye çalışıldığında püren balının yüksek oranda fenolik, mineral ve karbohidrat içeriği ile tanımlanmakta olduğu, bunun yanında yapısında bulunan bileşenlerin antimikrobiyal, antioksidan, antikanser araştırmaları için değerli bileşenler olduğunu ifade etmek gerekmektedir. Yapılan çalışmayla da elde edilen bulguların yüksek oranda literatürle uyumluluk gösterdiği görülmektedir.

## **5. SONUÇLAR**

Tezdeki araştırmaların sonucu olarak püren balı fenolik içeriğinin diğerk ballardan yüksek olması, antibakteriyel ve antioksidan etkilerinin olduğu, besin maddesi olarak düzenli tüketilmesinin insan sağlığını korumada önemli biyoaktivitelere sahip olduğu söylenebilir. Numunelere yapılan analizlerin ortalama sonuçları aşağıdaki Tablo 26'daki gibidir.

Tablo 26. Ortalama sonuçlar

Yapılan Ölçümler	Ortalama±SD	Yapılan Ölçümler	Ortalama±SD							
% Nem	16,28±2,44	HMF Miktarı (mg HMF/kg bal)	90,38±21,56							
% Briks	83,72±2,44	Diastaz Aktivitesi (DU)	3,69±1,05							
pH	4,46±4,39	Toplam Polifenol Miktarı (mg GAE/100g bal)	34,01±11,15							
İletkenlik	1101,83±377,31	Toplam Flavonoid Miktarı (mg QE/100g bal)	3,64±2,39							
Renk (L)	44,38±13,11	Toplam Tanen Miktarı (mg KE/100g bal)	4,64±1,98							
Renk (a)	39,43±14,84	FRAP (µmol Troloks®/100 g bal)	196,38±132,25							
Renk (b)	69,06±23,16	DPPH Temizleme Aktivitesi (mg/mL)	50,04±21,76							
Optik Çevirme Açısı	-0,23±1,51	Prolin Miktarı (mg prolin/kg bal)	901,29±251,84							
<b>Standartlar</b>	<b>Riboz</b>	<b>Ksiloz</b>	<b>Arabinoz</b>	<b>Fruktoz</b>	<b>Glukoz</b>	<b>Sukroz</b>	<b>Maltoz</b>	<b>Teraloz</b>	<b>Melibioz</b>	<b>Melezitoz</b>
<b>Ortalama±SD</b>	t.e.	t.e.	t.e.	35,18±3,25	25,98±3,54	0,62±0,22	t.e.	t.e.	0,46±0,10	1,99±0,04

## **6. ÖNERİLER**

Kodekste ve standartta bulunan kalite parametrelerine ek olarak balın antioksidan özelliklerinden terapötik özelliklerine kadar pek çok özelliğini gösteren bileşen analizlerinin balın kalite ölçüm parametreleri içerisinde ve gıda kodekslerinde bulunmasının gerekliliği önemsenmelidir ve püren balı üretimi teşvik edilmelidir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Akkuş, İ., Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya, 1995.
2. Akyüz, E., *Digitalis Ferruginea ssp. Schisckinii* ve Bazı Endemik Digitalis Türlerinin Ekstraktlarında Mevcut Kardiyak Glikozitleri ve Fenolik Bileşiklerin Kromatografik Yöntemlerle Belirlenmesi, Doktora Tezi, K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 2011.
3. Akyüz, E., *Polygonum Bistorta ssp. Carneum* Bitki Ekstraktlarının Kromatografik Yöntemlerle Kimyasal Bileşiminin Belirlenmesi ve Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktiviteleri, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 2007.
4. Aljadi, A.M. and Kamaruddin, M.V., Evaluation of the Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of Two Malaysian Floral Honeys, Food Chemistry, 85 (2004) 513-518.
5. Alnaimat, S., Wainwrigth, M. and Al'abri K., Antibacterial Potential of Honey From Different Origins:A Comparison with Manuka Honey, Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 1,5 (2012) 1328-1338.
6. Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Diaz, D., Estevez, Y., Romandini, S., Giampieri, F., Damiani, E., Astolfi, P., Bompadre, S. and Battino, M., Antioxidant and Antimicrobial Capacity of Several Monofloral Cuban Honeys and Their Correlation With Color, Polyphenol Content and Other Chemical Compounds. Food Chemistry Toxicology, 48 (2010) 2490–2499.
7. Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E. and Battino, M., Contribution of Honey in Nutrition and Human Health: A Review, Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism, 3 (2010a) 15–23. DOI 10.1007/S12349-009-0051.



8. Alves, A., Ramos, A., Margarida, M., Alves, G., Bernardo, M. Mendes, B., Antioxidant Activity, Quality Parameters and Mineral Content of Portuguese Monofloral Honeys. Journal of Food Composition And Analysis, 30 (2013) 130-138.
9. Andrade, P., Ferreres, F. and Amaral, M.T., Analysis of Honey Phenolic Acids by HPLC, Its Application to Honey Botanical Characterization, Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 20 (1997) 2281–2288.
10. Andrade, V.D., Andrade, P., Federico Ferreres, F., Gilb, M.I. ve Tomás Barberán, F.A., Determination of Phenolic Compounds in Honeys with Different Floral Origin by Capillary Zone Electrophoresis, Food Chemistry, 1 (1997a) 79-81.
11. Anklam, E., A Review of the Analytical Methods to Determine the Geographical and Botanical Origin of Honey, Food Chemistry, 63 (1998) 549-562.
12. Anonymous., The Council of European Union, Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 Relating to Honey, Official Journal of The European Communities, L10 (2002) 47-52.
13. Anupama, D., Bhat, K.K. and Sapna, V.K., Sensory and Physico-Chemical Properties of Commercial Samples of Honey, Food Research International, 36 (2003) 183-191.
14. Aparna, A.R. and Rajalakshmi, D., Honey–Its Characteristics, Sensory Aspects and Applications, Food Reviews International, 15,4 (1999) 455–471.
15. Aydın, B.D., Sezer, Ç. ve Oral, N.B., Kars'ta Satışa Sunulan Süzme Balların Kalite Niteliklerinin Araştırılması. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 14,1 (2008) 89-94.
16. Benzie, I.F.F. and Strain, J.J., Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration, In Methods In Enzymology, 299 (1999) 15–27.

17. Blomhoff, R., Dietary Antioxidants and Cardiovascular Disease, Current Opinion in Lipidology, 16 (2005) 47-54.
18. Bogdanov, S., Characterization of Antibacterial Substances in Honey, Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 17,2 (1984) 74–76.
19. Bogdanov, S., Ruoff, K. and Oddo, L.P., Physico-Chemical Methods for the Characterisation of Unifloral Honeys: A Review, Apidologie, 35,1 (2004) 4-17.
20. BSTS / Su Ürünleri Terimleri Sözlüğü, Aktif Yayınevi, Erzurum, 1999.
21. Burnaz, N.A., On-Line HPLC-FRAP Antioksidan Aktivite Tayin Yönteminin Geliştirilmesi ve Bazı Doğal Ürünlere Uygulanması, Doktora Tezi, K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 2013.
22. Cadenas, E. and Packer, L., Handbook of Antioxidants, Marcel Dekker, New York-Basel, 0-8247-0547-5, 2002.
23. Can, Z., Yıldız, O., Sahin, H., Turumtay, E.A., Silici, S. and Kolayli S., An Investigation of Turkish Honeys: Their Physico-Chemical Properties, Antioxidant Capacities and Phenolic Profiles. Food Chemistry, 180 (2015) 133–141. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.024>.
24. Can, Z., Biyoaktiviteleri Yönünden Türkiye Florasına Ait Baskın Ballar ile Manuka Ballarının Karşılaştırılması, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 2014.
25. Castro-Vázquez, L., Elena Alañon, M., González-Vinñas, M.A. and Soledad Pe´Rez-Coello, M., Changes in the Volatile Fractions and Sensory Properties of Heatherhoney During Storage Under Different Temperatures, European Food Research Technology, 235 (2012) 185–193.

26. Castro-Vázquez, L.M.C., González-Viñas, M.A. and Pérez-Coello, M.S., Differentiation of Monofloral Citrus, Rosemary, Eucalyptus, Lavender, Thyme and Heather Honeys Based on Volatile Composition and Sensory Descriptive Analysis, Food Chemistry, 112 (2009) 1022–1030.
27. Cavia, M.M., Fernandez-Muino, M.A., Alonsotorre, S.R., Huidobro, J.F. and Sancho, M.T., Evolution of Acidity of Honeys From Continental Climates: Influence of Induced Granulation, Food Chemistry, 100 (2007) 1728–1733.
28. Cavrar, S., Yıldız, O., Sahin, H., Karahalil, F. and Kolayli, S., Comparison of Physical and Biochemical Characteristics of Different Quality of Turkish Honey, Uludag Bee Journal, 13,2 (2013) 55-62.
29. Çimen, M.B.Y., Flavonoidler ve Antioksidan Özellikleri, Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, 19 (1999) 296-304.
30. Cook, N.C., and Samman, S., Flavonoids: Chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effects and Dietary Sources, Journal of Nutritional Biochemistry, 7,21 (1996) 66–76.
31. Cotelle, N., Bernier, J.L., Catteau, J.P., Pommery J., Wallet, J.C. and Gaydou, E.M., Antioxidant Properties of Hydroxy-Flavones. Free Radical Biology and Medicine, 20,01 (1996) 35-43.
32. Crane, E., Honey: A Comprehensive Survey, Marrson and Gibb Ltd. London, 1975.
33. Dauer, W. and Przedborski, S., Parkinson's Disease: Mechanism and Models. Neuron, 39 (2003) 889-909.
34. De Villiers, A., Lynen, F., Crouch, A. and Sandra, P., Development of A Solid-Phase Extraction Procedure for the Simultaneous Determination of Polyphenols, Organic Acids and Sugars in Wine, Chromatographia, 59 (2004) 403–409.

35. Dias, L.A., Peres, A.M., Vilas-Boas, M., Rocha M.A., Estevinho, L. and Machado, A.A.S.C., An Electronic Tongue for Honey Classification. Microchimica Acta, 163 (2008) 97–102.
36. El-Gendy, M.M.A., In Vitro, Evaluation of Medicinal Activity of Egyptian Honey From Different Floral Sources as Anticancer and Antimycotic Infective Agents., Journal of Microbial Biochemical Technology, 2 (2010) 118-123. DOI:10.4172/1948-5948.1000035.
37. El-Kott, A., Kandeel, A.A., El-Aziz, S.F.A. and Ribea, M.I., Anti-Tumor Effect of Bee Honey On PcnA and p53 Expression in the Rat Hepatocarcinogenesis, International Journal of Cancer Research, 8,4 (2012) 130-139.
38. Escriche, I., Kadar, M., Juan-Borrás, M. and Domenech, E., Using Flavonoids, Phenolic Compounds and Headspace Volatile Profile for Botanical Authentication of Lemon and Orange Honeys, Food Research International, 44,5 (2011) 1504-1513.
39. Escuredo, O., Miguez, M., Fernandez-Gonzalez, M. and Seijo, M.C., Nutritional Value and Antioxidant Activity of Honeys Produced in A European Atlantic Area, Food Chemistry, 138 (2013) 851–856.
40. Estevinho, L., Pereira, A.P., Moreira, L., Dias, L.G. and Pereira, E., Antioxidant and Antimicrobial Effects of Phenolic Compounds Extracts of Northeast Portugal Honey. Food Chemistry Toxicology, 46 (2008) 3774–3779.
41. Feás, X., Iglesias, A., Rodrigues, S. and Estevinho, L.M., Effect Of *Erica Spp.* Honey Against Microorganisms of Clinical Importance: Study of The Factors Underlying This Biological Activity, Molecules, 18 (2013) 4233-4246. DOI:10.3390/Molecules18044233.

42. Ferreira, I.C.F.R., Aires, E., Barreira, J.C.M. and Estevinho, M.L., Antioxidant Activity of Portuguese Honey Samples: Different Contributions of the Entire Honey and Phenolic Extract, Food Chemistry, 114 (2009) 1438–1443.
43. Ferreres, F., Andrade, P. and Tomás-Barberán, F.A., Natural Occurrence of Abscisic Acid in Heather Honey and Oral Nectar, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44 (1996b) 2053-2056.
44. Ferreres, F., Andrade, P. and Tomás-Barberán, F.A., Flavonoids From Portuguese Heather Honey, Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 199 (1994) 32-37.
45. Ferreres, F., Gilm, I., Tomás-Barberán, F.A., and Andrade P., Floral Nectar Phenolics as Biochemical Markers for the Botanical Origin of Heather Honey, European Food Research and Technology, 202,1 (1996a) 40-44.
46. Fukumoto, L.R. and Mazza, G., Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds, Journal Agriculture Food Chemistry, 48 (2000) 3597-3604.
47. Gomes, S., Dias, L.G. and Moreira, L.L., Physicochemical, Microbiological and Antimicrobial Properties of Commercial Honeys From Portugal, Food Chemistry Toxicology, 48 (2010) 544-548.
48. Gribel, N.V. and Pashinskiĭ, V.G., The Antitumor Properties of Honey, Journal of Voprosy Onkologii, 36 (1990) 704–9.
49. Hallaç, T.F., Bazı Sofralık Üzüm Çeşitlerinde Farklı Dönemlerde Alınan Yapraklardaki Fenolik ve Mineral Madde Değişimlerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, S.D.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 2009.
50. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M., 1990. Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease: An Overview. Methods Enzymology. 186 (1990) 1-85.

51. Hamzaoğlu, I., Saribeyoglu, K., Durak H., Karahasanoglu T., Bayrak İ., Altug T., Saryar M., and Şirin F., Protective Covering of Surgical Wounds with Honey Impedes Tumor Implantation, Archives of Surgery, (2000) 135–142.
52. Havsteen, B.T., The Biochemistry and Medical Significance of the Flavonoids, Pharmacology and Therapeutics, 96 (2002) 67–202.
53. Helrich, K., Journal Association of Official Analytical Chemists, Volume One. Usa, 1990.
54. Hermosín, I., Chicón, R.M. and Cabezudo, M.D., Free Amino Acid Composition And Botonical Origin of Honey, Food Chemistry, 83 (2003) 263-268. DOI:10.1016/S0308-8146(03)00089-X.
55. Hipkiss, A.R., Biological Aspects of Ageing. Psychiatry, 6,12 (2007) 476-479.
56. Izhar-Ul-Haq, M., Ahmad, K.J., Ahmed, S. and Razzaq, A., Characterization of Some Properties in Different Floral Honeys Collected by *Apis mellifera L.*, Pakistan Entomologist, 32, 2 (2010) 77-81.
57. Jaganathan, S.K., Can flavonoids from Honey Alter Multidrug Resistance?, Medical Hypotheses, 76 (2011) 535–537.
58. Jaganathan, S.K. and Mandal, M., Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols, A Review; Hindawi Publishing Corporation Journal of Biomedicine and Biotechnology, 13 (2009b). DOI:10.1155/2009/830616
59. Jaganathan, S.K. and Mandal, M., Honey Constituents and Its Apoptotic Effect in Coloncancer Cells. Journal of Apiproduct and Apimedical Science, 1 (2009a) 29–36.
60. Jaganathan, S.K., Mandal, SM., Jana, S.K., Das, S. and Mandal, M., Studies on the Phenolic Profiling, Anti-Oxidant and Cytotoxic Activity of Indian Honey: In-Vitro Evaluation, Natural Product Research, 24 (2010) 1295–306.

61. Jasicka-Misiak, I., Poliwoda, A., Malgorzata, Dereń, M., and Kafarski, P., Phenolic Compounds and Abscisic Acid as Potential Markers for the Floral Origin of Two Polish Unifloral Honeys, Food Chemistry, 131 (2012) 1149-156.
62. Jerry, P., Liu, L., Zeng, M. and Stamler, J.S., An Apoptotic Model for Nitrosative Stress, Biochemistry, 39 (2000) 1040-1047.
63. Jeuring, J. and Kupper, F., High Performance Liquid Chromatography of Furfural and Hydroxymethylfurfural in Spirits and Honey, Journal Association Official Analytical Chemistry, 63 (1980) 1215.
64. Junk, W.R., and Pancoast, H.M., Handbook of Sugars for Processors, Chemists and Technologists, 327 (1973) 08-705-51337. DOI:10.1002/Food.19740180828.
65. Kafalı, H., Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Kolon Sonrası Türevlendirme ile 7 Adet Sulfonamid Tespitinin Metot Validasyonu, Yüksek Lisans Tezi, S.D.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 2008.
66. Kahraman, T., Buyukunal, S.K., Vural, A., and Altunatmaz, S.S., Physico-Chemical Properties in Honey From Different Regions of Turkey. Food Chemistry, 123 (2010) 41–44.
67. Karaçalı, İ., Bahçe Ürünlerinin Muhafazası ve Pazarlanması, Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, İzmir, 2002.
68. Kaskoniene, V., Floral Markers in Honey of Various Botanical and Geographic Origins: A Review, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 9 (2010) 620- 634.
69. Kaur, C. and Kapoor, H.C., Antioxidants in Fruits and Vegetables–The Millennium’s Health. International Journal of Food Science and Technology, 36 (2001) 703–725.

70. Khalil, M.I. and Sulaiman, S.A., The Potential Role of Honey and its Polyphenols in Preventing Heart Diseases: A Review, The African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 7,4 (2010) 315-321.
71. Kösecik, M., Erel, Ö., Sevinç, E. and Selek, S., Increased Oxidative Stres in Children Exposed to Passive Smoking. International Journal of Cardiology, 100,1 (2005) 61-64.
72. Küçük, M., Kolaylı, S., Karaoğlu, Ş., Ulusoy, E., Baltacı, C. and Candan, F., Biological Activities and Chemical Composition of Three Honeys of Different Types From Anatolia, Food Chemistry, 100 (2007) 526–534.
73. La Grange, V. and Sanders, S.W., Honey in Cereal-Based New Food Products, Cereal Foods World, 33 (1988) 833–838.
74. Lee, J., Koo, N. and Min, D.B., Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals, Comprehensive Reviews in Food Science and Safety, 3 (2004) 21-33.
75. Liu, S.C., Lin, J.T., Wang, C.K., Chen, H.Y. and Yang, D.J., 2009. Antioxidant Properties of Various Solvent Extracts From Lychee (Litchi Chinensis Sonn.) Flowers, Food Chemistry, 114 (2009) 577–581. DOI:10.1016/J.Foodchem.2008.09.088.
76. Madigan, T.M. ve Martinko, M.J., Mikroorganizmaların Biyolojisi, 11. Baskı, Cumhuriyet, Palme Yayıncılık, Ankara, 2010.
77. Moise A., Marghitas Liviu, A., Dezmirean, D. and Bobis, O., Nutraceutical Properties of Romanian Heather Honey, Nutrition & Food Science, 43,3 (2013) 218-227.
78. Molan, P.C. and Cooper, R.A., Honey and Sugar as a Dressing for Wounds and Ulcer. Tropical Doctor, 30 (2000) 249-250.



79. Molan, P.C., The Evidence Supporting the Use of Honey as a Wound Dressing, Journal of Lower Extremity Wounds, 5 (2006a) 40–54.
80. Molan, P.C., The Antibacterial Activity of Honey, The Nature of The Antibacterial Activity, Bee World, 73 (1992) 5–28.
81. Molan, P.C., Using Honey in Wound Care, In International Journal of Clinical Aromatherapy, 3,2 (2006b) 21-24.
82. Molina, C.L.H., Honey Quality Analysis, Alimentos, 14,4 (1989) 55-60.
83. Mosley, R.L., Benner, E.J., Kadiu, I., Thomas, M. and Boska, M.D., Neuroinflammation, Oxidative Stres, and The Pathogenesis of Parkinson’s Disease, Clinical Neuroscience Research, 6,5 (2006) 261-281.
84. Mullai, V. and Menon, T., Bactericidal Activity of Different Types of Honey Against Clinical and Environmental Isolates of Pseudomonas Aeruginosa, The Journal of Alternative and Complementary Medicine, 13 (2007) 439–441.
85. Nagai, T., Inoue, R., Inoue, H. and Suzuki, N., Preparation and Antioxidant Properties of Water Extract of Propolis, Food Chemistry, 80 (2003) 29–33.
86. Nozal Nalda, M. J., Bernal Yague, J. L., Diego Calva, J.C. and Martin Gomez, M.T., Classifying Honeys From the Soria Province of Spain Via Multivariate Analysis, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 382 (2005) 311–319.
87. Oddo, P. and Piro, R., Main European Unifloral Honeys: Descriptive Sheets, Apidologie, 35 (2004) 38-81.
88. Onat, T., Emerk, K. ve Sözmen, E.Y., İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara, Konya, 2002.

89. Ouchemouckh, S., Scheweitzer, P., Bey, M.B., Djoudad- Kadji H. and Louaileche H., HPLC Sugar Profiles of Algerian Honey, Food Chemistry, 121 (2010) 561-568.
90. Ough, C., Rapid Determination of Proline in Grapes and Wines, Journal of Food Science, 34 (1960) 228-230.
91. Özbalcı, B., Boyacı, I.H., Topcu, A., Kadılar, C. and Tamer, U., Rapid Analysis Of Sugar In Honey by Processing Raman Spectrum Using Chemometric Methods and Artificial Neural Networks, Food Chemistry, 136 (2013) 1444-1452.
92. Prior, R.I. and Cao, G., Antioxidant Phytochemicals in Fruits and Vegetables: Diet and Health Implications. Horticultural Science, 35(2000) 588-592.
93. Pyrzyńska, K. and Biesaga, M., Analysis of Phenolic Acids and Flavonoids in Honey, Trends in Analytical Chemistry, 28 (2009) 893–902.
94. Rady, H.M. and Yahya, S.M.M., Enhancement of The Antitumor Effect of Honey And Some of Its Extracts Using Adiponectin Hormone, Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 5,6 (2011) 100-108.
95. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G., Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids, Free Radical Biology and Medicine, 20 (1996) 933-956.
96. Russel, K.M., The Antibacterial Properties of Honey. Master's Thesis. University of Waikato, New Zealand, 1983.
97. Santos-Buelga, C., Gonzalez-Manzano, S., Dueñas, M. and Gonzalez-Paramas, A.M., Extraction and Isolation of Phenolic Compounds, Natural Products Isolation, 864 (2012) 427-464.

98. Saral, Ö., Apiterapik Arı Ürünlerinin (Bal, Polen, Propolis ve Arı Sütü) Biyoaktif Özellikleri ve Karaciğer Hasarını Önlemedeki Rollerini, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 2013.
99. Schwarz, K., Bertelsen, G., Nissen, Lr., Gardner, Pt., Heinonen, Mı., Hopia, A., Huynh-Ba, T., Lambelet, P., Mcphail, D., Skibsted, Lh. and Tijburg, L., 2001. Investigation of Plant Extracts For The Protection of Processed Foods Against Lipid Oxidation. Comparison of Antioxidant Assays Based on Radical Scavenging, Lipid Oxidation And Analysis of The Principal Antioxidant Compounds. European Food Research And Technology, 212 (2001) 319-328.
100. Sies, H., Oxidative Stress From Basic Research to Clinical Application, American Journal of Medicine, 9 (1991) 31-37.
101. Singleton, V.L. and Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents 16, 144-158.
102. Skoog, D.A., James Holler, F. ve Nieman, T.A., Principles of Instrumental Analysis, Fifth Edition, Saunders College Publishing, USA, Kılıç E., Köseoğlu F. ve Yılmaz H., Bilim Yayıncılık, Ankara, 1998.
103. Slinkard, K. and Singleton, V.L., Total Phenol Analyses: Automation and Comparison with Manual Methods, American Journal of Enology and Viticulture, 28 (1977) 49-55.
104. Sokmen, A., Jones, B. M. and Erturk, M., The in Vitro Antibacterial Activity of Turkish Medicinal Plants, Journal of Ethno Pharmacology, 67 (1999) 79-86.
105. Sorkun, K., Doğan, N., Gümüş, Y., Ergün, K., Bulakeri, N. ve Işık, N., Türkiye’de Üretilen Doğal ve Yapay Balların Ayırt Edilmesinde Fiziksel, Kimyasal ve Mikroskopik Analizleri, Mellifera, 2,4 (2002) 13-21.

106. Şahin, E., Bitkisel Kaynaklı Antimikrobiyallerin Gıda Kaynaklı Bazı Patojen Mikroorganizmalar Üzerinde Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2006.
107. Şahin, H., Orman Gülü Balı ve Bitkisindeki Grayanotoksin-III (GTX-III) İzofomununun LC-MS/MS ile Analizi, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 2014.
108. Tekeli, F., Kromatografi. [Http://W3.Balikesir.Edu.Tr/~Hnamli/Calisma/P2009-2010/Fatma\\_Tekeli.Ppt#279,23,Slayt 23](http://W3.Balikesir.Edu.Tr/~Hnamli/Calisma/P2009-2010/Fatma_Tekeli.Ppt#279,23,Slayt%2023) 8 Ağustos 2012.
109. TS 28366, Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği, Tebliğ No: 2012/58, T.S.E., Ankara, 2012.
110. Thomas, M.J., The Role of Free Radicals and Antioxidants: How Do We Know That They Are Working?, Critical Reviews in Food Science, 35 (1995) 21-39.
111. Thornsberry, C., (1977) Spectinomycin-Resistant Neisseria Gonorrhoeae. Journal of American Medical Association 237 (1977) 2405.
112. Ulusoy, E., Anzer Balı ve Poleninin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Fenolik Bileşiminin Belirlenmesi ve Antioksidan Özellikleri, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 2010.
113. Ulusoy, E. and Kolayli, S., Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Anzer Bee Pollen. Journal of Food Biochemistry, (2013) 1745-4514. DOI:10.1111/Jfbc.12027.
114. Weston, R., The Contribution of Catalase and Other Natural Products to The Antibacterial Activity of Honey: A Review, Food Chemistry, 71 (2000) 235–239.
115. White, J.W., 1979. Composition of Honey. Crane E. (Ed.), Honey: A Comprehensive.

116. White, J.W., Honey. Advances in Food Research, 24 (1978) 287–374.
117. White, J.W. and Winters, J.K., Honey Protein as Internal Standard for Stable Carbon Isotope Ratio Detection of Adulteration of Honey, Journal of the Association Of Official Analytical Chemists, 72,6 (1989) 907-911.
118. White, J.W., Spectrophotometric Method for Hydroxymethylfurfural in Honey, Journal of The Association of Official Analytical Chemists, 62,3 (1979) 509-514.
119. Wilczyńska, A., Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Types of Polish Honey, A Short Report, Polish Journal Of Food And Nutrition Sciences, 60,4 (2010) 309-313.
120. Witczak, M., Juszczak, L. and Gałkowska, D., Non-Newtonian Behaviour of Heather Honey, Journal of Food Engineering, 104 (2011) 532–537.
121. Yıldız, O. and Alpaslan, M., Properties of Rose Hip Marmalades (Jams), Food Technology and Biotechnology, (Accepted Manuscript) (2011).
122. Young, I.S. and Woodside, J.V., Antioxidants in Health and Disease, Journal of Clinical Pathology, 54,3 (2001) 176-186.
123. Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J. and Quian, M., Free radical scavenging properties of wheat extracts, Journal Of Agricultural and Food Chemistry, 50 (2002) 1619-1624.
124. Zalata, A., Yahia, S., El-Bakary, A. and Elsheikha, H.M., Increased DNA Damage in Children Caused by Passive Smoking as Assessed by Comet Assay and Oxidative Stress. Mutation Research-Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis, 629,2 (2007) 140-147.

## ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Trabzon'da doğdu. İlkokulu Akçaabat Mevlüt Selami YARDIM ilköğretim okulu, ortaokulu Trabzon Prof. Dr. İhsan KOZ ilköğretim okulu, liseyi Trabzon Fatih Lisesinde (2007) tamamladı. 2008'de Karadeniz Teknik Üniversitesi Kimya bölümünü kazandı. 2012'de kimyager ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya bölümünde tezli yüksek lisansa başladı. 2013-2015 yılları arasında Rize Recep Tayyip ERDOĞAN Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya bölümünden "Anzer Bal ve Poleninin Bazı Biyoaktif Özelliklerinin *İn Vitro* Olarak İncelenmesi" başlıklı tezi ile yüksek lisansını tamamladı. 2015 Temmuz ayında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya bölümünde doktora programına kabul edildi. Halen doktora eğitimi devam etmektedir.