

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANZER BAL VE POLENİNİN BAZI BİYOAKTİF
ÖZELLİKLERİNİN *in vitro* OLARAK İNCELENMESİ

HİLAL EBRU HOTAMAN

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. HASAN EFE

JÜRİ ÜYELERİ

PROF. DR. SEVGİ KOLAYLI

DOÇ. DR. ADNAN YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

RİZE-2015




T.C.

RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANZER BAL VE POLENİNİN BAZI BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN *in vitro*
OLARAK İNCELENMESİ**

Prof. Dr. Hasan EFE danışmanlığında, Hilal Ebru HOTAMAN tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından / /2015 tarihinde Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı' nda YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Ünvanı Adı Soyadı	İmzası
Başkan :	Prof. Dr. Hasan EFE	
Üye :	Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI	
Üye :	Doç. Dr. Adnan YILMAZ	


Doç. Dr. Adnan YILMAZ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ



ÖNSÖZ

Yorucu ve zevkli iki yıllık Rize eğitimimin tatlı sonuna ramak kalırken, değerli hocalarım ve dostlarıma yüksek lisans çalışmamı sunmaktan gurur duyarım. Yüksek lisansım boyunca güler yüzünü, yardımlarını ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Hasan EFE'ye teşekkür ederim.

Karadeniz Teknik Üniversitesinde deneysel çalışmalar için laboratuvar ortamı sağlayan anaç ve güler yüzlü hocam Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI'ya, üzerimde çok emeği bulunan, minnettar olduğum değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Zehra CAN ve Yrd. Doç. Dr. Hüseyin ŞAHİN'e, 1140208 kodlu 'Muğla İli Florasına Ait Püren Balının Karakterizasyonu ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkisinin Apiterapik Yönden İncelenmesi' Tübitak projesiyle bana destek olan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Fatma YAYLACI KARAHALİL'e, tecrübelerini her zaman paylaşmaya hazır olan hocam Yrd. Doç. Dr. Oktay YILDIZ'a, düşünceli laboratuvar arkadaşım Kübra ŞAHİN'e teşekkürü bir borç bilirim. Recep Tayyip ERDOĞAN Üniversitesindeki inhibisyon konusunda yardımcıyla kendisine müteşekkir olduğum Yrd. Doç. Dr. Nimet AKTAŞ BALTAŞ'a, Tıbbi Biyokimya anabilim dalındaki değerli hocalarım Doç. Dr. Aynur KIRBAŞ, Doç. Dr. Medine CUMHUR CÜRE, Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU, Doç. Dr. Adnan YILMAZ'a ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

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

Hilal Ebru HOTAMAN

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan Anzer Bal ve Poleninin Bazı Biyoaktif Özelliklerinin *in vitro* Olarak İncelenmesi başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. / /2015

Hilal Ebru HOTAMAN

Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

ANZER BAL VE POLENİNİN BAZI BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN *in vitro* OLARAK İNCELENMESİ

Hilal Ebru HOTAMAN

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışmanı: Prof. Dr. Hasan EFE

Bal ve polen tedavi kaynağı olarak kullanılan bazı biyoaktif bileşikleri içerirler. Bu çalışmada Doğu Karadeniz Bölgesi Anzer Yaylası'ndan toplanan arı bal ve polenleri kullanıldı. Anzer balının saflığının belirlenmesi açısından öncelikle fiziksel ve kimyasal parametreleri çalışıldı. Sonra bal ve polenlerin antioksidan özellikleri ve hyaluronidaz ve üreaz enzimlerini inhibisyonu analiz edildi. Antioksidan kapasiteyi belirleyen testlerin sonucu: toplam fenolik içerik ballarda $22,01 \pm 0,25$, polenlerde $753,21 \pm 0,91$ mg GAE/100g numune; toplam flavonoid içerik ballarda $2,32 \pm 0,04$, polenlerde $245,03 \pm 2,48$ mg QE/100g numune; toplam tanen içerik ballarda tespit edilemedi, polenlerde $34,94 \pm 1,21$ mg KE/100g numune; demir (III) indirgeme antioksidan kuvveti (FRAP) ballarda $90,51 \pm 1,13$, polenlerde $390,65 \pm 2,39$ μ mol Troloks/100g; DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali temizleme aktivitesi ballarda $58,94 \pm 0,73$, polenlerde $1,47 \pm 0,02$ mg/mL olduğu bulundu. Anzer bal ve polen ekstraktlarının hyaluronidaz ve üreaz enzimleri üzerine inhibisyon etkileri IC₅₀ değerleri olarak hesaplandı. IC₅₀ değerleri hyaluronidaz için ballarda $0,17 \pm 0,01$ g/mL, polende $0,07 \pm 0,01$ g/mL, üreaz için ballarda $21,83 \pm 0,01$ mg/mL, polende $1,32 \pm 0,00$ mg/mL'dir. Sonuç olarak hem bal hem de polen ekstraktlarında, enzim inhibisyonları ile antioksidan kapasite arasında pozitif korelasyonlar vardır.

2015, 69 sayfa

Anahtar Kelimeler: Anzer, Bal, Polen, Antioksidan, Enzim İnhibisyonu.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF SOME BIOACTIVE PROPERTIES OF ANZER HONEY AND POLLEN *in vitro*

Hilal Ebru HOTAMAN

Recep Tayyip Erdoğan University
Graduate School of Health Sciences
Department of Medical Biochemistry
Master's Thesis
Supervisor: Prof. Dr. Hasan EFE

Honey and pollen have some bioactive compounds that are used as treatment source. Bee honey and pollen harvested from Anzer Plateau of Eastern Black Sea Region included to the study. To check the purity of Anzer honey firstly physical and chemical parameters were studied. The antioxidant and inhibition properties of honeys and pollens on hyaluronidase and urease enzymes were analyzed. Average results of antioxidant capacity determines tests: total phenolic content for honey $22,01 \pm 0,25$, for pollen $753,21 \pm 0,91$ mg GAE/100g sample; total flavonoid content for honey $2,32 \pm 0,04$, for pollen at $245,03 \pm 2,48$ mg QE/100g sample; total tannin content was not detected in honey, for pollen $34,94 \pm 1,21$ mg KE/100g sample; iron (III) reducing antioxidant power (FRAP) for honey $90,51 \pm 1,13$, for pollen at $390,65 \pm 2,39$ μ mol Trolox/100g sample; DPPH[•] (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity for honey $58,94 \pm 0,73$, for pollen $1,47 \pm 0,02$ mg/mL were found. Inhibition effects of Anzer honey and pollen extracts on urease and hyaluronidase enzymes were calculated as the IC₅₀ values. The results of hyaluronidase IC₅₀ for honey $0,17 \pm 0,01$ g/mL, for pollen $0,07 \pm 0,01$ g/mL, urease IC₅₀ for honey $21,83 \pm 0,01$ mg/mL, for pollen $1,32 \pm 0,00$ mg/mL were determined. Consequently, there are positive correlations between enzyme inhibitions and antioxidant capacity of both honey and pollens extracts.

2015, 69 sayfa

Key words: Anzer, Honey, Pollen, Antioxidant, Enzyme Inhibition.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	X
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Arı Ürünleri.....	2
1.3. Serbest Radikaller, Antioksidanlar ve Polifenoller.....	5
1.4. Enzimler	10
1.4.1. Enzim İnhibisyonu ve IC ₅₀	11
1.5. Hyaluronidaz Enzimi ve Özellikleri	13
1.6. Üreaz Enzimi ve Özellikleri.....	15
1.7. Literatür Özeti.....	17
1.7.1. Anzer Balı ve Poleni	17
1.7.2. Hyaluronidaz.....	18
1.7.3. Üreaz	19
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	20
2.1. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Gereçler	20
2.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler	20
2.3. Çözeltiler.....	22
2.4. Numunelerin Temini ve Saklama Koşulları	24
2.5. Balların Bazı Fiziksel ve Kimyasal Analizleri.....	24
2.5.1. Optik Çevirme Açısı (α - Rotation)	25
2.5.2. Nem Tayini	25
2.5.3. Prolin Tayini	25
2.5.4. Elektriksel İletkenlik.....	26
2.5.5. pH Ölçümü.....	26

2.6.	Antioksidan Analizler	26
2.6.1.	Toplam Fenolik Madde Miktarı	26
2.6.2.	Toplam Flavonoid Madde Miktarı	27
2.6.3.	Toplam Tanen Miktarı	28
2.6.4.	Demir (III) indirgeme/ antioksidan güç -FRAP Tayini	29
2.6.5.	DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini	29
2.6.5.1.	SC ₅₀ Değerlerinin Bulunması	30
2.7.	Enzim İnhibisyonları	31
2.7.1.	Hyaluronidaz İnhibisyonu	31
2.7.2.	Üreaz İnhibisyonu	32
2.7.3.	IC ₅₀ Değerlerinin Bulunması	33
3.	BULGULAR	35
3.1.	Fiziksel Tayin Sonuçları	35
3.1.1.	Optik Çevirme Açısı (α -rotasyon) Sonucu	35
3.1.2.	Nem Analiz Sonucu	35
3.1.3.	Prolin Tayini Sonucu	36
3.1.4.	Elektriksel İletkenlik Sonucu	36
3.1.5.	pH Ölçümü Sonucu	37
3.2.	Antioksidan Sonuçları	37
3.2.1.	Toplam Fenolik Madde Testi Sonucu	37
3.2.2.	Toplam Flavonoid Testi Sonucu	38
3.2.3.	Toplam Tanen Testi Sonucu	39
3.2.4.	FRAP Testi Sonucu	40
3.2.5.	DPPH Testi Sonucu	40
3.3.	İnhibisyon Sonuçları	42
3.2.1.	Hyaluronidaz İnhibisyon Sonuçları	42
3.2.2.	Üreaz İnhibisyonu Sonuçları	42
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR	43
5.	ÖNERİLER	51
	KAYNAKLAR	52
	EKLER	68
	ÖZGEÇMİŞ	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. DPPH• Radikali	7
Şekil 2. Toplam ve Hidrolizlenebilir Tanenler, Flavonoidler, Hidroksisinamik asit, Hidroksibenzoik Asit Genel Yapıları	10
Şekil 3. Hyaluronidaz Enziminin Tersiyer Yapısı	13
Şekil 4. <i>Helicobacter pylori</i> Üreazının Üç Boyutlu Yapısı	16
Şekil 5. İndofenol Oluşumu	32
Şekil 6. Prolin Standart Çalışma Grafiği.....	36
Şekil 7. Toplam Fenolik Madde Standart Çalışma Grafiği.....	38
Şekil 8. Toplam Flavonoid Madde Standart Çalışma Grafiği.....	39
Şekil 9. Toplam Tanen Kalibrasyon Grafiği	39
Şekil 10. FRAP Standart Çalışma Grafiği.....	40

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Balın % Bileşimi.....	2
Tablo 2. En sık karşılaşılan serbest radikaller ve bazı özellikleri.....	6
Tablo 3. Doğal Antioksidanların Sınıflandırılması.....	9
Tablo 4. Bazı Polifenollerin Sınıflandırılması.....	9
Tablo 5. Kullanılan Cihaz ve Gereçler, Marka/Modelleri.....	20
Tablo 6. Kullanılan Kimyasallar ve Satın Alındığı Firma.....	20
Tablo 7. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	23
Tablo 8. Numune İsmi ve Numunenin Toplandığı Yıl.....	24
Tablo 9. Toplam Polifenol Tayininde Yapılan Pipetleme İşlemi.....	27
Tablo 10. Toplam Flavonoid Tayininde Yapılan Pipetleme İşlemi.....	28
Tablo 11. Toplam Tanen Tayininde Yapılan Pipetleme İşlemi.....	28
Tablo 12. FRAP Tayininde Yapılan Pipetleme İşlemi.....	29
Tablo 13. DPPH Yöntemi İçin Yapılan Pipetlemeler.....	30
Tablo 14. Hyaluronidaz İnhibisyonunda Yapılan Pipetleme İşlemi.....	31
Tablo 15. Üreaz İnhibisyonu İçin Gerekli Pipetlemeler.....	33
Tablo 16. Anzer ballarının Optik Çevirme, Nem, Briks, Prolin, İletkenlik ve pH Sonuçları.....	37
Tablo 17. Toplam Polifenol, Toplam Flavonoid, Toplam Tanen, FRAP ve DPPH testleri sonucu.....	41
Tablo 18. Hyaluronidaz İnhibisyonu Sonuçları.....	42
Tablo 19. Üreaz İnhibisyonu Sonuçları.....	42
Tablo 20. Bal ve Polen Örneklerinin Antioksidan Korelasyonu.....	47
Tablo 21. Hyaluronidaz, Üreaz Enzimlerinin İnhibisyonlarının DPPH Temizleme Aktivitesi İle Korelasyonu.....	50

SEMBOLLER DİZİNİ

Ag	: Gümüş
Al(NO ₃) ₃	: Alüminyum Nitrat
AO	: Bal İçin Ortalama
BSA	: Bovine Serum Albumin
Ca	: Kalsiyum
CH ₃ COONa.3H ₂ O	: Sodyum Asetat Trihidrat
Cl	: Klor
Cu	: Bakır
Cm	: Santimetre
CH ₃ COOH	: Asetik Asit
Dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
ES	: Enzim Substrat Kompleksi
ESI	: Enzim Substrat İnhibitör Kompleksi
Fe	: Demir
FeCl ₃	: Demir (III) Klorür
FRAP	: Ferric Reducing Antioksidant Power
G	: Gram
GAE	: Gallik Asit Eşdeğeri
GSH	: Redükte Glutatyon
HCl	: Hidroklorik Asit
Hg	: Civa
IC ₅₀	: % 50 İnhibisyon Konsantrasyonu
K	: Potasyum
kDa	: Kilo Dalton
KE	: Kateşin Eşdeğeri
kg	: Kilogram
KI	: Potasyum İyodür

Km	: Kilometre
K_m	: En Yüksek Reaksiyon Hızının Yarısının Elde Edildiği Substrat Konsantrasyonu
TT	: Toplam Tanen Miktarı
L	: Litre
LC	: Likit Kromatografi
LiCl	: Lityum Klorür
M	: Metre
M	: Kalibrasyon eğrisinin eğimi
Mg	: Magnezyum
mM	: Milimolar
M	: Molar
Mg	: Miligram
Mm	: Milimetre
mL	: Mililitre
Mn	: Mangan
N	: Normalite
Na	: Sodyum
NaCl	: Sodyum Klorür
Na_2CO_3	: Sodyum Karbonat
NaOCl	: Sodyum Hipoklorit
NaH_2PO_4	: Sodyum Dihidrojen Fosfat
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$: Sodyum Monohidrojen Fosfat Dihidrat
Na_3PO_4	: Sodyum Fosfat
NH_4CH_3COO	: Amonyum Asetat
NaOH	: Sodyum Hidroksit
Nm	: Nanometre
<i>o</i> -	: Orto Pozisyon
OH	: Hidroksil Grubu
<i>p</i> -	: Para Pozisyon
PPİ	: Proton Pompası İnhibitörü
P	: Fosfor
Pb	: Kurşun

pH	: Hidrojenin İyonu Aktivitesi
PO	: Polen için Ortalama
R	: Fonksiyonel Grup
R ²	: Korelasyon Katsayısının
RNA	: Ribonükleik Asit
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SC ₅₀	: % 50 Scavenging Concentration
sn	: Saniye
Ss	: Standart Sapma
TEAC	: Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite
TF	: Toplam Flavonoid Madde
TGK	: Türk Gıda Kodeksi
TP	: Toplam Fenolik Madde
TPTZ	: Tripridiltiazin
Troloks [®]	: 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
U	: Ünite
UV-VIS	: Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi
V	: Hız
v/v	: Hacim/Hacim
V _{max}	: Maksimum Hız
A	: Alfa
B	: Beta
°C	: Santigrat Derece
μ	: Mikro
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
%	: Yüzde
•	: Radikal

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Eskiden beri insanoğlu hastalıkların tedavisinde arı ürünlerinden yararlanmıştır. Günümüzde de arı ürünleriyle tedavi yani apiterapi hala önemini korumaktadır. Bal, arı sütü, propolis, bal mumu, polen gibi apiterapi ürünleri tıpta ve veterinerlikte sıkça kullanılmaktadır (Ceyhan, 2000).

Arı ürünlerinden üzerinde en fazla çalışılanı bal ve polen olup her ikisi de son derece yüksek besin değerine sahiptir. Ancak besin değerinden daha ziyade birer doğal ürün olan bal ve polenin önemli derecede biyolojik potansiyele sahip olması son yıllarda öne çıkmaktadır. Bu sebeple bal ve polenin biyolojik değeri başta antioksidan aktivite olmak üzere, antibakteriyel, anti-inflamatuvar, antikanserojen, antimikrobiyal, antiviral etkilerinin aydınlatılması açısından çalışılmaya değerdir. Apiterapik ürünlerin biyolojik potansiyelleri toplandıkları bölgenin coğrafik ve floral özelliklerine bağlı olarak değişim gösterir (Kaskoniene, 2010). Türkiye bulunduğu coğrafik konumdan dolayı dünyanın önde gelen coğrafik bölgelerinden biri olup, ülkemiz arıcılık potansiyeli ve bal üretimi bakımından dünyada ön sıralardadır. Ancak gerek apiterapik yönden ve gerekse ürünlerin tanıtımı bakımından ön planda değil ve dünyadaki tanınırlığı bakımından hak ettiği yeri almamıştır. Doğu Karadeniz Bölgesi' ne ait olan ve halk arasında çok değerli olduğuna inanılan Anzer balı ve polenin diğer ballardan farkı, biyoaktif özellikleri ve biyo-yararlılıkları konusundaki araştırmaların yetersiz olması bu çalışmanın temel amacıdır.

Çalışmamızda normal çiçek ballarından farklılık arz eden Anzer balının pahalı bir bal olmasından dolayı biyolojik aktif özellikleri ile ön plana çıkarılması, ayrıca Anzer yöresindeki polenlerin de biyolojik etkinliğin ortaya çıkarılması amaçlandı. Bu tezde yapılan çalışmalarda biyokimyasal özellikler dahilinde hyaluronidaz ve üreaz enzimlerinin inhibisyonu üzerine Anzer Yaylası bal ve polenin etkileri araştırıldı ve anti-inflamatuvar, antikarsinojenik ve antibakteriyel özellik gösterebileceği *in vitro* olarak tespit edildi.

1.2. Arı Ürünleri

Apiterapi, bal, polen, propolis, arı sütü, arı zehri, bal mumu kullanıldığı tedavi şekillerinin tümü olarak adlandırılmaktadır.

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 birleştirerek değişikliğe uğrattığı, su içeriğini düşürdüğü ve petekte depolayarak olgunlaştırdığı doğal ürünü ifade eder. Bal orijinine 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). Çiçek balı ve salgı balının yüzde bileşimi değerleri minimum ve maksimum olarak Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Balın % Bileşimi (Karadal ve Yıldırım, 2012).

	Çiçek Balı		Salgı Balı	
	Ortalama	Min-Maks	Ortalama	Min-Maks
Su	17,2	15-20	16,3	15-20
Monosakkaritler				
Fruktoz	38,2	30-45	31,8	28-40
Glukoz	31,3	24-40	26,1	19-32
Disakkaritler				
Sukroz	0,7	0,1-4,8	0,5	0,1-4,7
Diğerleri	5,0	2,0-8,0	4,0	1-6
Trisakkaritler				
Melezitoz	<0,1		4,0	0,3-22,0
Eritoz	0,8	0,5-6	1,0	0,1-6,0
Tanımlanamayan Oligosakkaritler	3,1	0,5-1	10,1	0,1-6,0
Mineraller	0,2	0,1-0,5	0,9	0,6-2,0
Aminoasitler	0,3	0,2-0,4	0,6	0,4-0,7
Asitler	0,5	0,2-0,8	1,1	0,8-1,5
pH değeri	3,9	3,5-4,5	5,2	4,5-6,5

Bal, arılar (*Apis mellifera*) tarafından çiçek ve ağaç salgılarından toplanan, insanoğlu tarafından hem şifa kaynağı hem de geçmişten günümüze kadar gelen besin kaynağıdır. (Aparna vd., 1999; Kaskoniene vd., 2010). Balın bileşiminin büyük bir

kısmını (%80-85) karbohidratlar oluşturmakla birlikte yapısında yaklaşık %1-2 oranında yer alan çeşitli biyo-aktif bileşikler (proteinler, enzimler, aminoasitler, vitaminler, organik asitler, flavonoidler, fenolik asitler, mineraller) onun biyolojik aktivitesinden sorumlu ajanlardır (White, 1999). Balın bileşiminin değişkenliği birçok faktöre bağlıdır. Bunlar nektarı sağlayan floraya, iklim koşullarına, coğrafik özelliklere, üretim biçimine ve bal arısı türüne göre değişim göstermektedir (Kaskoniene, 2010). Bu zengin ve kompleks bileşimi sayesinde bal, alternatif tıp uygulamalarının başında yer alır. Dünyada öne çıkan bazı ballar bulunmaktadır. Özellikle Yeni Zelanda'da Manuka balı ve Avustralya'da püren balı gibi ballar tercih edilen ballar arasındadır (Weston vd., 1999; Molan, 1999; Andrade vd., 1999).

Balın yapısında bulunan ve tamamen doğadan gelen, sekonder metabolit ajan olarak da adlandırılan yüzlerce polifenolik bileşik, vitamin, enzim ve mineral onun antioksidan, antimikrobiyal, antiviral, anti-İnflamatuar, anti-tümoral özelliklerinden sorumludur (Russel, 1983; Bogdanov, 1984; Cook ve Samman, 1996).

Bitkide tohumlar oluşmadan önce açan çiçeklerin orta kısmında erkek üreme organlarının başçık kısmında bitkinin tüm kalıtsal özelliklerini taşıyan küçük hücrelerden oluşan tozlar vardır. Bu çiçek üreme hücrelerine **polen** denmektedir. Polen çiçekli bitkilerin erkek cinsiyet hücreleri olup, dişi organın tozlaşmasını sağlamaktadır. Çiçek tozu olarak da adlandırılan polenler bitkilerin çiçeklenme dönemleri boyunca görülmekte ve kremden siyaha kadar değişen farklı renklerde olabilmektedirler (Korkmaz ve Çankaya, 2008).

Polenin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin toplandığı bitkiye, bölgenin coğrafik konumuna, iklim özelliklerine, toplanma şekline ve ambalaj şekline bağlı olarak değişim gösterdiği bildirilmektedir (Karataş vd., 2000). Bal arıları poleni farklı bitkilerden topladığı için polenin kimyasal kompozisyonu da oldukça farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle polenin standart bir bileşiminin ortaya çıkartılması oldukça zordur. Genel olarak polen; %7,50-40,0 protein, %15,0-50,0 şeker içermekte olup, %15,0 ile %50,0 arasında değişen ve oldukça yüksek miktarda nişasta ihtiva etmektedir (Krell, 1996). Proteinler, aminoasitler, yağlar ve şekerler polenin ana bileşenlerini

oluştururken, polen yapısında çok fazla sayıda iz miktarda bulunan elementler, bal arılarının da ihtiyaç duymuş olduğu Na, K, Ca, Mg, Cl, P, Fe' dir (URL-1).

Propolis, arıların bitkilerden topladığı reçinemsî madde olup kovanın savunmasında, dezenfeksiyonunda ve yalıtımında önemli rol almaktadır. Eski Yunancada “Pro”(önü, öncesi) ve “polis” (şehir) kelimelerinden türetilmiştir. % 50 reçine ve zamksı maddeler, % 30 bitkisel mumlar, % 10 esansiyel yağlar, % 5 polen, % 5 organik bileşiklerden oluşmaktadır (Gomez-Caravaca vd., 2006; Burdock, 1998). Propolis baları tarafından bitkilerden toplanan ve mumla karıştırılarak kovan içerisinde birçok amaca yönelik olarak kullanılan doğal bir üründür. Propolisin çok eski yıllardan beri geleneksel tıpta çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldığı ve antimikrobiyal, antioksidan, antitümör, antienflamatuar gibi biyolojik aktivitelere sahip olduğu birçok bilimsel çalışma ile gösterilmiştir (Albayrak ve Albayrak 2008). Genel olarak propolis koyu sarı, yeşil ve koyu kahverengiye doğru değişen renklerde bulunabilir ve yaşı arttıkça rengi koyulaşmaktadır (Saral, 2013).

Arı sütü; işçi arıların hipofarengeal (boğaz) ve mandibular glandlarından (alt çene) salgılanır ve kraliçe arının beslenmesinde ve gelişmesinde önemli rol oynar (Tamura vd., 2009; Schmidt, 1996). Arı sütü kremî kıvamda homojen bir maddedir. Sarı, beyaz ve bej renklerde, fenolik bir kokuya ve ekşi bir tada sahiptir (Lercker vd., 1992). Arı sütü yaklaşık olarak %12-15 protein, %10-16 karbohidrat, %3-6 lipid ve geri kalan %60-70 oranda vitamin, tuz, serbest amino asitler ve nem gibi pek çok madde içermektedir (Tamura vd., 2009; Nagai ve Inoue, 2004).

Arı zehri, “Arıların zehir torbasında oluşan ve içerisinde başlıca mellitin, apamin, MCD-peptidi, histamin, hyaluronidaz, fosfolipaz-A2 bulunan, keskin kokulu, acı tatta, sarımtırak renkte, sıvı, hava ile temasında çabuk kuruyup kristalize olan bir maddedir (TSE, 1989).

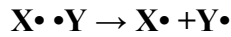
Anzer Yaylası Rize'nin İkizdere ilçesinin 35 km güney batısında kalan bir yayladır. Aşağı Anzer (Çiçekliköy) ve Yukarı Anzer (Ballıköy) olarak ikiye ayrılır. Halk arasında Anzer yöresine ait balların şifa kaynağı olduğu öteden beri bilinmektedir. Kuzeydoğu Anadolu'da yer alan Anzer bölgesi balıyla Türkiye'de ve dünyada çok

meşhurdur. Anzer balının diğer ballardan daha fazla sağlık faydaları olduğuna inanılmaktadır ve bu nedenle çok yüksek fiyatlara alıcı bulmaktadır. Bal üreticileri ve tüketicileri Anzer balının karaciğer hastalıkları, mide-bağırsak hastalıkları ve bazı cilt hastalıklarında tedavi edici olduğunu ifade etmektedirler. Anzer balının şifa özelliğinin Anzer yaylasının zengin bitki florasından ileri geldiği düşünülmektedir. Yaklaşık 80 civarı endemik tür içeren ve 500'den fazla farklı çiçeğe sahip floral orijiniyle alakalı olduğu düşünülmektedir. Aynı bölgede üretilen Anzer polenlerinin ise vitamin, mineral ve proteince zengin olmasının yanı sıra kansızlık başta olmak üzere pek çok hastalıktan koruyucu etkilerinin olduğu ifade edilmektedir (Ulusoy, 2010; Ulusoy ve Kolaylı 2013).

1.3. Serbest Radikaller, Antioksidanlar ve Polifenoller

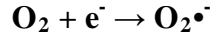
Serbest radikaller dış orbitallerinde ortaklanmamış elektron bulunduran, kısa ömürlü, reaktif moleküllerdir. Serbest radikallerin en önemlileri reaktif oksijen türleri (ROT) dir. Oksidasyon, bir atom ya da molekülün bir alıcıya elektron vermesi ile meydana gelen yükseltgenme basamağıdır. Yükseltgenme potansiyeli yüksek olan madde yükseltgenirken diğer madde indirgenir. İnsan vücudunda ve besinlerde bulunan lipidler, proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler de oksidasyona uğrayabilmekte ve canlı organizma için zararlı olabilecek oksidasyon ürünleri oluşabilmektedir (Papas, 1996). Bu durum oksidatif stres olarak ifade edilir. Reaktif türlerin zararlı etkilerinin temel sebebi radikal olmaları, radikal oluşumuna sebep olabilmeleri veya yükseltgenme potansiyellerinin daha yüksek olmalarından kaynaklanmaktadır. 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 hücresele 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 2’de verilmiştir.

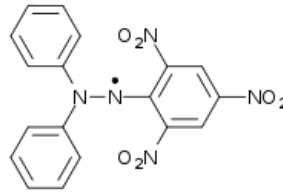
Tablo 2. En sık karşılaşılan serbest radikaller ve bazı özellikleri.

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

Serbest radikaller hücre ve dokularda birçok hasara yol açmaktadır. Bu hasarlar şöyle sıralanabilir (Kehre and Smith, 1994; Halliwell and Gutteridge, 1999). Oksidatif stresin, ROT’ ların neden olduğu hücre hasarları sonucu birçok hastalığa neden olduğu bulunduğu düşünülmektedir. Yapılan pek çok çalışmada ülseratif kolit (Dağlı vd., 1997), iskemi/reperfüzyon hasarı (Cruthirds vd., 2003; Taşçı vd., 1995), 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 ve KOAH (Bowler vd., 2004) gibi akciğer hastalıkları, çeşitli kanser türleri, felç, hipertansiyon, romatoid artrit ve multiple sklerosis gibi otoimmün hastalıklar, alerji; astım, septik şok, inflamasyon, akut pankreatit, yaşlanmaya bağlı maküler hastalıklar ve katarakt (Anderson, 2007; Halliwell, 1994; Halliwell ve Gutteridge, 1990) 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).



Şekil 1. DPPH Radikali.

1. Singlet oksijeni sönmeye uğratarak oksijen derişimini düşürebilirler.
2. Hidroksil radikallerini tutarak zincir reaksiyonlarının başlamasını önlerler.
3. Metal iyon katalizörlerini bağlarlar (Shahidi, 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).

Genel olarak bir antioksidanın aktivitesi řu faktörler ile belirlenir:

1. Hidrojen veya elektron donör aracı olarak gösterebildiği reaktivite. (Genelde indirgeme potansiyeline bağlıdır). İndirgenme potansiyeli düşük olan moleköl yükseltgenir.
2. Antioksidandan türeyen radikalın akıbeti.
3. Diğer antioksidanlarla etkileşim yeteneği.
4. Geçiş metali şelatlama potansiyeli (Rice-Evans vd., 1997).

Antioksidanlar doğal ve sentetik olmak üzere iki gruba ayrılır. Aslında çok geniş bir aile olan doğal antioksidanlar genel olarak bakıldığında endojen ve eksojen antioksidanlar olarak sınıflandırılırlar. 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, glutatyon peroksidaz, katalaz ve hidroperoksidaz olup enzimatik olmayan antioksidanlar ise indirgenmiş glutatyon (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 (α -tokoferol, β -karoten, askorbik asit, folik asit) ve fenolik maddeler olup dışarıdan organizmaya alınıp etkinlik göstermektedirler (Saral, 2013; Şahin, 2014). Doğal antioksidanlar Tablo 3'te özetlenmiştir.

Tablo 3. Doğal Antioksidanların Sınıflandırılması.

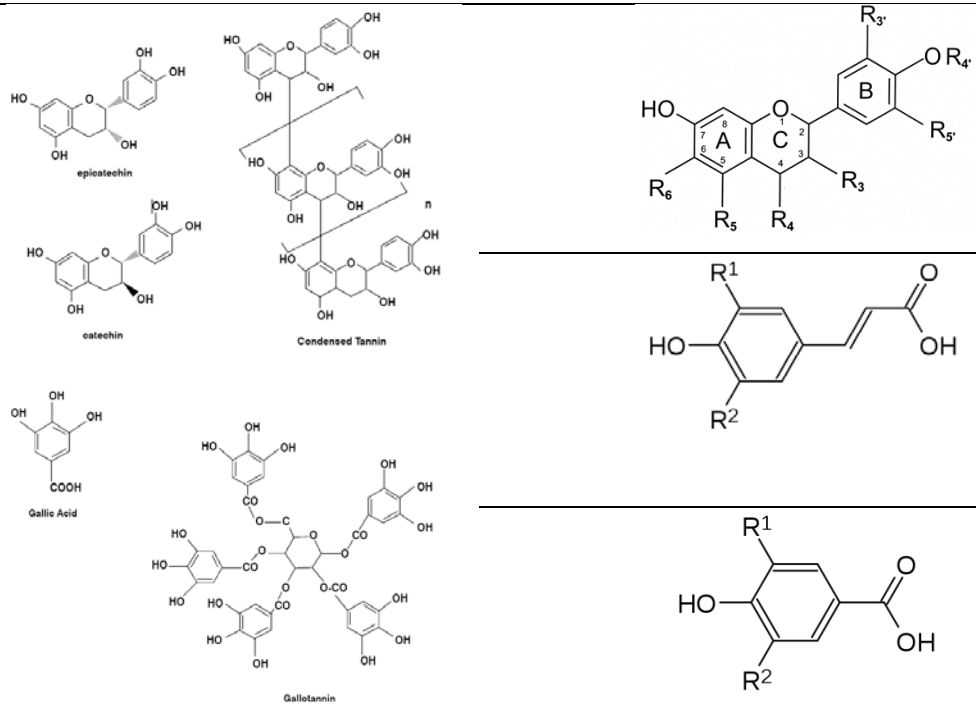
Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	
Süperoksit Dismutaz	Endojen Antioksidanlar	Eksojen Antioksidanlar
Katalaz	Glutatyon (GSH)	Askorbik Asit (C Vitamini)
Glutatyon Peroksidaz	Ürik Asit	Tokoferoller
Glutatyon Redüktaz	α -Lipoik Asit	Karotenoidler
Glutatyon-S-Transferazlar	Laktoferrin, Ferritin	Polifenoller
Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz	Bilirubin	
	Melatonin	

Birden fazla hidroksil kökü içeren fenolik maddelere ise polifenoller denir. 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. Besin fenolikleri; flavonoidleri, fenolik asitleri ve fenolik polimerleri içerir. 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). Serbest halde bulunmayan sennamik ve benzoik asitten hidrokisillenerek türevlenen ve böylece ayrımı yapılan fenolik asitler, bitkilerin major üyelerindendir (Şahin, 2014). Polifenoller Tablo 4'te özetlenmiştir.

Tablo 4. Polifenollerin Sınıflandırılması.

Polifenoller		
Flavonoid olmayan	Flavonoidler	Fenolik Asitler
Hidrolizlenebilir Tanenler	Flavonoller	Hidroksisinnammik 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 2.Kondanse ve Hidrolizlenebilir Tanenler, Flavonoidler, Hidroksisinasamik 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 (Cotella vd., 1996; Çimen, 1999). Tanenler ise çok sayıda hidroksil grubu ve fonksiyonel grup içermektedir.

1.4. Enzimler

Enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenen ve canlı metabolizmasındaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran %100 ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir.

Enzimlerin en önemli özellikleri katalizleme güçleri ve özgünlükleridir. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç, bütün enzimler protein yapısındadır (Keha ve Küfrevioğlu, 2012). Enzimler reaksiyon sırasında fiziksel değişiklikler geçirirler de reaksiyon tamamlandığında, tekrar kendi orijinal hallerine dönerler (Murray, 1993). Enzimler etki ettikleri maddeler olan substratlar için oldukça spesifiktirler. Bazı enzimler benzer yapıda bir grup substrata etki ederken bazıları da tek bir molekül türü üzerine etki eder. Bir çok enzim stereospesifite gösterir (Kalaycıoğlu, 2006). Günümüzde 2000'den fazla farklı enzim bilinmektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 2012). Enzimler genelde ya substrat adının sonuna “-az” eki getirilerek ya da ilk keşfedenlerin koydukları isimlerle tanınmaktadırlar. Örneğin; üreaz, hyaluronidaz, fosfataz, lipaz, tripsin ve pepsin.

Bazı enzimler katalitik aktivite göstermek için amino asit kalıntıları dışında kimyasal bir gruba ihtiyaç duymazken (apoenzim) bazıları da (holoenzim) kofaktör olarak adlandırılan Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} gibi bir veya daha fazla inorganik iyon ya da koenzim olarak adlandırılan kompleks organik veya metaloorganik moleküllere ihtiyaç duyarlar. Bazı enzimler ise aktivite gösterebilmek için hem koenzime hem de bir veya daha fazla metal iyonuna ihtiyaç duyarlar. Protein yapısına kovalent olarak bağlanan bir koenzim veya metal iyonu prostetik grup olarak adlandırılır. Koenzimler; tiamin pirofosfat, aldehitler, koenzim A, açıl grupları gibi özgül işlevsel gruplar için geçici taşıyıcı olarak görev yaparlar. Koenzimler çoğunlukla diyet ile düşük miktarlarda alınan organik besinler olan vitaminlerden temin edilirler (Nelson ve Cox, 2005). Substrat konsantrasyonu, sıcaklık, pH, allosterik etkiler, hormonlar, iyonik şiddet, enzim konsantrasyonu, inhibitör ve aktivörlerin varlığı enzimlerin aktivitesini etkileyen faktörlerdir (Özaltın, 2014).

1.4.1. Enzim İnhibisyonu ve IC_{50}

Enzimlerin, bazı bileşikler veya iyonlar tarafından hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak aktivitelerinin azaltılması ya da tamamen durdurulması olayına inhibisyon, buna sebep olan bileşiklere de inhibitör denir. İnhibitörler, genellikle küçük mol kütlelerine

sahip organik bileşik veya iyonlardır. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturur. Bu yüzden enzim inhibisyonu büyük bir önem arz etmektedir (Kuzucu, 2011). Birçok ilaç ve zehirli bileşik fonksiyonlarını bu yolla gösterir. İnhibitörler hem etki mekanizmalarının hem de metabolik yolların aydınlatılmasında biyokimyacılar için çok önemli bir araç fonksiyonu görmüştür (Keha ve Küfrevioğlu, 2010). Bazı enzimlerin inhibisyonu anti-inflamatuvar, antitümöral, antikarsinojenik, antialerjik, anti-aging, anti-romatoid, anti-toksin, antimikrobiyal özellik sergiler. Enzimlerin inhibisyonu başlıca iki gruba ayrılır.

Dönüşümsüz inhibisyonda enzimin bir veya daha fazla fonksiyonel grubu etkilenir. İnhibitör, enzime kovalent olarak bağlanır veya kompleks oluşturur. V_{max} (enzimatik reaksiyonda ulaşılabilecek maksimum hız) azalır, K_m (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) değişmeden kalır (Güller, 2011). Örneğin; sinir gazlarından diizopropil fosforidat, asetil kolin isimli nörotransmittörü parçalayan asetilkolin esterazın tersinmez inhibitörüdür. Dönüşümsüz inhibisyonun aksine dönüşümlü inhibisyonda enzim ile inhibitör etkileşmesi, bir denge reaksiyonu şeklindedir.

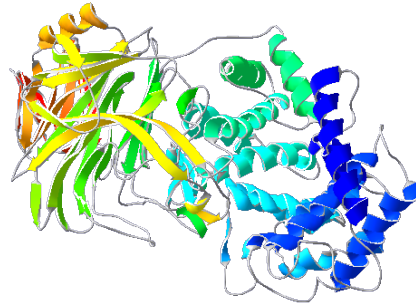
Dönüşümlü inhibisyonda, inhibitör madde ortamdan uzaklaştırıldığında enzim aktivitesini yeniden kazanır. Üç grupta incelenir:

1. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon
2. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon
3. Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon

Bir inhibitör etkisinin ölçülmesi için kullanılan en yaygın iki değer IC_{50} ve K_i 'dir. IC_{50} maksimum inhibisyonun yarısını sağlayan veya enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonudur. Bir dizi deney yoluyla belirlenmektedir. Her deneyde, inhibitörün konsantrasyonu giderek arttırılır böylece inhibisyonda artar. x ekseninde konsantrasyon, y ekseninde % inhibisyon olacak şekilde uygun grafik çeşidiyle (Bu tezdeki örnekler için logaritmik olarak çizildi.) hesaplanır. IC_{50} değerinin düşük olması inhibisyon etkisinin güçlü olduğunu gösterir.

1.5. Hyaluronidaz Enzimi ve Özellikleri

Hyaluronidaz (hyaluronat liyaz) (EC 3.2.1.35.), bir endoenzim olup hyaluronik asit içindeki kısa zincirli oligosakkarit depolimerizasyonunu katalize eder. Hyaluronidaz, yumuşak dokuların ekstrasellüler matriks yapısında görev alan ve tekrarlayan disakkarit ünitelerinden oluşan hyaluronik asidi (hyaluronanı) hidrolizleyen bir enzimdir (Şahin, 2006). Hyaluronidaz pek çok patolojik hastalıkla ilişkilidir ve onun inhibitörleri, anti-inflamatuar, anti-alerjik, anti-tümöral, anti-aging, anti-romatoid, anti-toksin, antimikrobiyal etki göstermektedir (Stern, 2008; Sunitha vd., 2013; Selenge vd., 2014). Hyaluronidaz enziminin dokulardaki aktivite artışının yenilenme ve onarım işlemlerinde, vaskülarizasyon artışında ve tümör hücrelerinin kontrolsüz artışında rol aldığı düşünülmektedir (Abdesslam, 2000). Toplamda beş hyaluronidaz enzimi (HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4 ve hPH-20) mevcuttur (Stern, 2008). Hyaluronidaz ayrıca bakterilerde, yılan, arı (%2), akrep zehirlerinde ve spermlerde fertilizasyona yardımcı olarak bulunur. Hyaluronidaz enziminin tersiyer yapısı Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. Hyaluronidaz Enziminin Tersiyer Yapısı.

Hyaluronik asit bir ekstrasellüler matriks bileşenidir ve tekrarlayan glukuronik asit ve N-asetil-D-glukozamin disakkarit ünitelerinin değişken olarak $\beta(1\rightarrow4)$ ve $\beta(1\rightarrow3)$ glikozidik bağlarla bağlandığı zincirlerden oluşan, yüksek ve düşük molekül ağırlıklı formları olan bir glikozaminoglikandır (Jennie ve Christine, 2004; Davide vd., 2008). Hyaluronik asit embriyonel gelişimde, ekstrasellüler matriks homeostazında, yara iyileşmesinde, doku yenilenmesinde ve arteryel sertlikte de görülebilen arteryel düz kas hücre proliferasyonunda ve migrasyonunda önemli rol oynamaktadır (Abdesslam, 2000). Hyaluronik asit oldukça hidrofilik bir polimerdir ve su varlığında

hacmi 1000 katına kadar çıkabilmektedir. Bu özelliği sayesinde de boşluk doldurucu, kaygan ve osmotik tamponlayıcı görevi görür. Poliyonik yapısı sayesinde de serbest radikalleri temizler ve antioksidan etki gösterir (Jennie ve Christine, 2004). Hyaluronik asit yara iyileşmesinde de görev alır. Yara iyileşmesinde başlangıçta oluşan granülasyon dokusu hyaluronik asitten oldukça zengindir ve skar oluşumu olmadan yara iyileşmesini sağladığı düşünülmektedir (Fıncıoğulları, 2009).

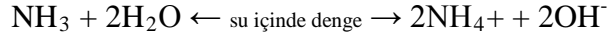
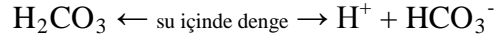
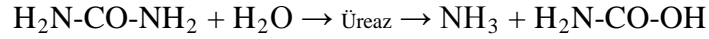
Serumdaki hyaluronik asit seviyesinin enfeksiyonlar sırasında yükseldiği ve bu yükselişin klinik olarak ateşli aktivitede yararlı olacağı rapor edilmiştir. Hyaluronidaz, hyaluronik asidin dengelenmesinde önemli bir görev üstlenmektedir (Şahin, 2006). Ayrıca plazma hyaluronidaz ölçümü hyaluronik asidin metabolizma ve aktivitesinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Kucur, 2009). Hyaluronidaz ve yüksek orandaki hyaluronan tümörlerde beraber bulunur. Hyaluronidaz aktivitesi yüksek moleküler ağırlıktaki hyaluronan ve oligosakkaritler arasındaki denge ile kontrol edilir. Bu da kanser gelişmesinde önemli bir rol oynar (Trias vd., 2005).

Çeşitli flavonoidlerin potansiyel hyaluronidaz inhibitörü oldukları gösterilmiştir (Kuppusamy vd., 1990; Kuppusamy ve Das, 1991). Hayvan deneylerinde flavonoidlerin anti-inflamatuar, anti-alerjik aktivite, lipid peroksidasyonunu, RNA, DNA protein sentezlerini, antiviral aktivite, kılcal kırılabilirliği, tümör inhibisyonu ve patolojik süreçlerde çeşitli enzimler üzerine etkileri olduğu gösterilmiştir (Harbone, 1986; Ferrel vd., 1979; Vanden Berghe vd., 1993; Parellada ve Guinea, 1995).

Geçen son on altı yılda hyaluronidaz inhibitörü olan; metal tuzları (Meyer ve Rapport, 1951), benzimidazoller ve indoller (Rigden vd., 2006), sülfatlı glukozaminglikan (Toida vd., 1999), polisakkaritler (Salmen vd., 2005), sığır serum albümin (BSA) (Maingonnat vd., 1999), triterpenler ve flavonoidler (Kuppusamy vd., 1990; Hertel vd., 2006), 6-*o*-açıl vitamin C türevleri (Botzki vd., 2004; Spickenreither vd., 2006) saponinler ve sapogeninler (Facino vd., 1995) farklı bileşikler incelendi.

1.6. Üreaz Enzimi ve Özellikleri

Üreaz (üre amidohidrolaz) (E.C.3.5.1.5.), ürenin amonyak ve karbondioksit hidrolizini katalizleyen bir metalloenzimdir (Dixon vd., 1975). Bu tepkimeyi katalizör olmadan gerçekleşen reaksiyon hızını 10^{14} kat artırmak suretiyle yapar (Kayastha ve Das, 1999). Üreden amonyum oluşumu aşağıda gösterildiği gibidir (Gonsalves, 2011).



Jack bean (soya fasulyesi) üreaz 91 kDa molekül ağırlığına sahip, altı benzer monerik altbirimin hegzameri olarak mevcuttur (Weber vd., 2008). *Helicobacter pylori* üreazı yapısında iki alt birim içermektedir ve heterodimer yapıdadır (Dunn vd., 1990). *Helicobacter pylori*'nin ürettiği üreaz enzimi (Şekil 4) 550 kDa ağırlığında nikel içerikli bir enzimdir. Ürenin üreaz enzimi tarafından hidrolizi sonucu oluşan amonyak mide asidini nötralize ederek *Helicobacter pylori*'nin kolonizasyonuna yardımcı olur (Dunn vd., 1990).

İnsan ve hayvanlarda ise üreaz idrar ve gastro intestinal yolların enfeksiyonlarında, idrar yolu taşlarının oluşumuna neden olan enfeksiyonlarda viral faktör olarak kendini göstermektedir (Burne ve Chen, 2000). Üreaz, bakteriye mide içinde düşük pH'de yaşama olanağı sağlayarak kanserle sonuçlanabilecek gastrit ve peptik ülser patojenezinde rol oynamaktadır (Mobley vd., 1995).



Şekil 4. *Helicobacter pylori* üreazının üç boyutlu yapısı (Follmer, 2008; Krajewska, 2009).

Ülser, mide veya duodenumun (onikiparmak barsağı) mide asidi ve sindirim sıvıları (pepsin gibi) tarafından harabiyeti sonucunda meydana gelen doku kaybıdır (Covanci vd., 1999). Üreaz enzimi, üreyi karbondioksit ve amonyağa parçaladığında mide mukozasında bulunan konağın direnç mekanizmalarını ortadan kaldırarak yani bazik bir ortam oluşturarak, mide ülserine neden olan *Helicobacter pylori* bakterisini midenin asidik yapısından korur. Ancak bu bazik ortam negatif feed-back etkiyi ortadan kaldırarak, G hücrelerinden gastrin salınımını uyarır ve artan asit sekresyonu ile gastrit oluşumuna katkıda bulunur ya da direkt ve immünolojik yollar ile hasar oluşturur (Arı, 2006). Duodenal ülserlerde *Helicobacter pylori*'nin varlığı %100'e yakın oranla yüksek bulunmuştur (Kara, 2006).

Helicobacter pylori pek çok mikroorganizmanın barınmadığı mide ortamında yaşamını sürdürebilen bir bakteridir (McNultu, 1987). Yalnızca gastrik tipte epitelyal hücrelere kolonize olurlar. Midede en sık antrum ve fundustaki mukus tabaka içinde bulunurlar (Aydın, 1995). Sonuçta lamina propriada lenfosit, monosit ve plazma hücreleri ile az sayıda nötrofil ve eozinofil birikmesinden oluşan yangısal reaksiyon ortaya çıkar. Epitelyal bezlerde şekil değişikliği olup mukus tabakasında azalma göze çarpar (Büke, 1996).

Günümüzdeki araştırmalar, üreazın amino asit sıralamasını, kristal yapısını, mutantlarını ve inhibitörleri ile birlikte komplekslerini ve genetik organizasyonlarını içermektedir (Krajewska, 2009). İnsanlarda ve hayvanlarda üreaz içeren patojenlerin sebep olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılacak ilaçların geliştirilebilmesi ve

çevreye verilen bu olumsuz etkilerin onarılabilmesi için üreaz inhibitör çalışmaları oldukça önemlidir (Dinç, 2009).

Üreaz inhibitörleri iki alt sınıfa ayrılmaktadır:

- a) **İnhibitor olarak davranan substratlar:** Hidroksiüre ve hidrokamik asit türevleri vb.
- b) **İnhibitörler:** Fosfordiamidazlar ve proton pompası inhibitörleri olan imidazoller (Tanaka vd., 2003).

Peptik ülser tedavisinde proton pompası inhibitörleri (PPI) kullanılır (Dinç, 2009). PPI'leri mide asidiyle ilişkili hastalıklar, reflü rahatsızlığı, duodenal ülser ve gastrik ülser tedavisi için seçilen ilaç sınıfıdır. Üreaz ürenin hidroliziyle, tahriş edici amonyak oluşturarak ülserojenik etkinliğe katkıda bulunur (Dinç, 2009). Proton pompası inhibitörleri *Helicobacter pylori*'nin gastrik mukoz membranında kolonizasyonunu engeller, bakterinin büyümesini inhibe eder, epitel hücrelerinin adhezyonunu ve üreaz aktivitesini inhibe eder (Göral, 2003).

Üreaz aktivitesini etkilediği bilinen diğer inhibitörler arasında tioller, borik asit ve boranik asit, bizmut bileşikleri, ağır metal iyonları, farklı tıbbi bitkilerin etanol ve metanol ekstraktları, triazoller, barbütirik asit ve tiyobaarbütirikasit, hidrokinon, fenilfosfordiamid, N- (n-bütül) tiyofosforikamid ve aşırı üre sayılabilir (Amtul vd., 2002; Zhang vd.,2006; Ravi ve Kayastha, 2006; Laidler ve Hoare, 1949; Juan vd., 2009; Juan vd., 2010; Rauf vd., 2011; Akhtar, 2008; Ghous vd., 2010).

1.7. Literatür Özeti

1.7.1. Anzer Balı ve Polenini

Anzer balının şifalı olduğuna dair bilgiler öteden beri gelmektedir ve halk arasında çok yaygındır. Oysa bal ile ilgili yapılan bilimsel araştırmalar oldukça sınırlı sayıdadır. Daha önce yapılan tezlerde ve literatürde Anzer balı ve polenin fenolik

bileşenleri, antioksidan kapasiteleri, sıçanlarda N-etilmaleimid ile indüklenen karaciğer hasarının engellenmesi, etanol-kaynaklı artan sıçan mide vasküler geçirgenliğine karşı Anzer balının koruyucu etkisi çalışılmıştır (Doğan ve Kolankaya, 2005; Korkmaz ve Kolankaya, 2008; Ulusoy ve Kolaylı, 2013; Ulusoy, 2010).

Bu çalışmada Anzer balı ve polenin antioksidan kapasiteleri ve enzim inhibisyonu üzerine etkileri araştırılarak varsa Anzer balı ve polenin diğer ballardan farklılıkları ortaya koyulacaktır. Çalışmada Anzer bal ve polenin insan sağlığı için önem arz eden üreaz ve hyaluronidaz enzimleri üzerinde *in vitro* olarak inhibisyonu olup olmadığı araştırıldı. İnhibisyon etkisi ile Anzer balının anti-inflamatuar, antikanserojen etkisinin ve aynı zamanda antibakteriyel özelliğinin de olup olmadığı tespit edilmiş olacaktır.

1.7.2. Hyaluronidaz

Önceki çalışmalarda kaempferol, kuersetin ve rutin dahil olmak üzere çeşitli flavonoidlerin hyaluronidaz üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğunu kanıtlanmıştır (Liu, 2013; Lee, 2010). Hua-jin vd., 2015 yaptığı çalışmada, hyaluronidaz ve iki biyoaktif flavon (baicalein ve krisin) arasındaki etkileşimleri, özellikle anti-inflamatuar ve anti-alerjik aktiviteyi deneysel ve bilgisayarlı yöntemlerin kombinasyonunu kullanarak incelemiştir. José vd., (2010)'e göre *Tripodanthus acutifolius* bitkisinden izole edilen tanımlanmış flavonoidler (rutin, nicotiflorin, hyperoside ve isoquercitrin) yüksek hyaluronidaz inhibisyonu göstermiş, aynı zamanda bu bileşikler güçlü DPPH ve peroksil radikal temizleme aktivitesi sergilemiştir. Hindistan gibi birçok ülkede kent merkezinde antivenom terapi mevcuttur. Çünkü yılan sokmalarının en sık ortaya çıktığı uzak yerlerdeki tarlalarda bir inhibitör kokteyli ilk yardım tedavisi olarak çok yararlı olabilir (Girish ve Kemparaju, 2006). Çeşitli bakterilerden elde edilen bilinen flavon ve flavononların 50µg/mL hyaluronidazı %8-92 arasında inhibe ettiği tespit edilmiştir (Andréa vd., 2001). İnsan hyaluronidazı hPH-20 meme ve gırtlak kanserlerinde tümör belirteci olarak tespit edilmiştir (Kaeßler vd., 2010). Wilkinson vd., (1995) farklı yaş gruplarına ait insan plesentasındaki

hyaluronidaz aktivitesinde farklılıklar olduğunu açıklamışlardır. Meyers (2001) sperm ve yumurta arasındaki etkileşimde hyaluronidaz enziminin etkisini araştırmıştır.

1.7.3. Üreaz

Helicobacter pylori' nin hastalık oluşturması üreaz inhibisyonu yoluyla kontrol edilebilir (Stingl ve Reuse, 2005). Son zamanlarda, yeni tedavi arayışında odağın sentetikten doğal ürünlere kayması, doğal ürünlerin çok az veya hiç toksik etki göstermemesi, iyi aktivite göstermesi ve biyo yararlı olması avantajlarından dolayı doğal kaynaklardan yeni üreaz inhibitörleri için keşif başlatmıştır (Kreybig vd., 1968). Bal ilkel çağlardan beri tüm kültürlerin tıp ve basit bilimsel tekniklerinde kullanılmıştır. Antitümör, antioksidan, antimikrobik ve anti-inflamatuar dahil olmak üzere biyolojik özellikleri gösterilmiştir (Meda vd., 2005). Doğal bileşiklerin karmaşık karışımı olarak görülen bal, karbonhidrat, katalaz, flavonoidler, fenolik asitler, karotenoidler, glukoz oksidaz, vitaminler, organik asitler içerir (Batrusaityte vd., 2007; Gheldorf vd., 2002). Balın *in vitro* olarak, *Helicobacter pylori*' nin büyümesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Fakat bakteri gelişimini inhibe eden mekanizma tam olarak açıklanamamıştır. Sonuç olarak balın biyoaktivite özellikleri flavonoidler ve fenolik asitlere atfedilmiştir (Gomes vd., 2010). Matongo ve Nwodo (2014) yaptıkları çalışmaya göre; saflaştırılmış *Helicobacter pylori* üreazı inhibisyonunda kontrol grubu olarak Jack bean üreaz kullanılmış manuka balının polifenoller de dahil olmak üzere doğal kaynaklardan gelen biyoaktif moleküllerin *Helicobacter pylori* üreazına karşı inhibe edici aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Polifenoller arasında *Helicobacter pylori* üreazının tersinir inhibitörü olarak resveratrol gösterilmiştir. Bal, içerisinde dönüşümlü inhibitörleri daha fazla bulundururken, dönüşümsüz inhibitörleri dönüşümlü inhibitörlere göre daha az bulundurur. Sonuç olarak, bal ekstraktları balın coğrafi kökenine bağlı olarak *Helicobacter pylori* üreaz faaliyetlerini engellenmesi yönünde iyi bir potansiyele sahiptir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Gereçler

Yapılan analizlerde kullanılan cihazlar marka/model olarak Tablo 5’te verilmiştir.

Tablo 5. Kullanılan Cihaz ve Gereçler, Marka/Modelleri.

Cihaz Adı	Marka/Model
UV-VIS Spektrofotometre	Thermo Scientific Evolution™ 201, UV-VIS 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
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 6’da verilmiştir.

Tablo 6. Kullanılan Kimyasallar ve Satın Alındığı Firma.

Kullanılan Kimyasal	Satın Alındığı Firma
Gallik Asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Folin-Ciocalteu’s phenol reaktifi	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt, Germany

NH ₄ CH ₃ COO	Merck, Darmstadt, Germany
Al(NO ₃) ₃	Merck, Darmstadt, Germany
Kuersetin	Lancaster, Morecambe, England
HCl	Merck, Darmstadt, Germany
TPTZ	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
FeCl ₃	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
NaCH ₃ COO.3H ₂ O	Merck, Darmstadt, Germany
DPPH Reaktifi	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Troloks [®]	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Prolin	Merck, Darmstadt, Germany
Formik asit	Merck, Darmstadt, Germany
Ninhidrin	Merck, Darmstadt, Germany
2-Propanol	Merck, Darmstadt, Germany
Vanilin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Kateşin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Hyaluronidaz (400-1000 U/mg)	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Hyaluronik Asit Sodyum Tuzu	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Streptococcusequi	
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, Germany
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	Merck, Darmstadt, Germany
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Na ₃ PO ₄	Merck, Darmstadt, Germany
NaCl	Merck, Darmstadt, Germany
NaOH	Merck, Darmstadt, Germany
HCl	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Asetik Asit	Merck, Darmstadt, Germany
Metanol-LC Saflıkta	Merck, Darmstadt, Germany
Üre	Merck, Darmstadt, Germany
Üreaz (Canavalia ensiformis) (Jack bean) (500-800U)	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
LiCl	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Na ₂ EDTA	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Fenol	Merck, Darmstadt, Germany
Sodyum Nitropurisit dihidrat	Merck, Darmstadt, Germany
NaOCl	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany

2.3. Çözeltiler

Çalışmada kullanılan kimyasal çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler ve Hazırlanışları.

Toplam Fenolik Madde Miktarı İçin	
0,5 N Folin Ciocalteu	2 N Folinden 1:4 oranında saf suyla seyreltilerek kullanıldı.
%10’luk Na ₂ CO ₃	10 g Na ₂ CO ₃ 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.
Toplam Flavonoid Madde Miktarı İçin	
1 M NH ₄ CH ₃ COO	7,7 g NH ₄ CH ₃ COO 100 mL saf suda çözüldü.
%10 Al(NO ₃) ₃	1 g Al(NO ₃) ₃ 10 mL saf suda çözüldü.
Kuersetin (1 mg/mL)	Metanolle hazırlanan stok çözeltiden, 0,5-0,25-0,125-0,0625-0,03125 mg/mL olacak şekilde metanolle seyreltilerek hazırlandı.
Toplam Tanen Miktarı İçin	
%4’lük Vanilin	4 g vanilin tartılıp az miktarda metanolle çözüldükten sonra metanolle 100 mL’ye tamamlandı.
%37 HCl	Stok şişeden direk kullanıldı.
Kateşin (1mg/mL)	10mg kateşin tartılarak metanolle 10 mL’ye tamamlandı.
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.
TPTZ (10 mM)	234,249 mg TPTZ stok maddeden tartıldı, 75 mL 40 mM’lık HCl içinde çözüldü.
FeCl ₃ (20 mM)	324,4 mg FeCl ₃ destile suyla 100 mL’ye tamamlandı.
Asetat Tamponu (300 mM, pH 3,6)	2,325 g NaCH ₃ COO.3H ₂ 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 ₃ (10:1:1) oranında karıştırılarak taze hazırlandı.
Trolox [®] (1000µM)	25,31 mg troloks metanolle 100 mL’ye tamamlandı. Metanolle 500, 250, 125, 62,5 µM’a seyreltildi.

DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi İçin

DPPH Reaktifi (0,1 mM)	100 mL'si için; 3,94 mg DPPH tartılır, 90 mL metanolle çözüldü ve 100 mL'ye tamamlandı.
Troloks [®] (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.

Hyaluronidaz İnhibisyonu İçin

Hyaluronidaz (1,67 U)	Enzim su ile çözümlenerek 1,67 U olacak şekilde 50 mL hazırlandı.
Fosfat tamponu (pH:7 0,02M)	0,02M pH:7 olan fosfat tamponuna %0,01 BSA içerecek şekilde BSA eklendi, 100 mL hazırlandı.
Hyaluronik asit	0,3 M, pH 5,35 olan Na ₃ PO ₄ içerisine %0,01 olacak şekilde hyaluronik asit sodyum tuzu eklendi, 100 mL'ye tamamlandı.
Asetat Tamponu (pH:3,75)	24 mM NaCH ₃ COO + 0,079 M CH ₃ COOH pH:3,75'e ayarlanıp % 0,1g BSA eklenerek 1000 mL'ye tamamlandı.

Üreaz İnhibisyonu İçin

Tampon	100 mM Üre, 1 mM EDTA, 0,01mM Na ₂ HPO ₄ , 0,01 M LiCl (pH:8,2 ye ayarlandı.)
Üreaz	5U/mL olacak şekilde 0,01mM pH=7,4 Na ₂ HPO ₄ ile hazırlandı.
Fenol Reaktifi	%1 Fenol + 0,005g Sodyum Nitropurisit 100 mL hazırlandı.
Alkali Reaktif	% 0,5 (w/v) NaOH + %0,1 NaOCl 100 mL hazırlandı.

Optik Çevirme Açısı İçin

Carrez I	10,56g K ₄ [Fe(CN) ₆].3H ₂ O tartılıp 100 mL'ye tamamlanır.
Carrez II	21,94g ZnSO ₄ .7H ₂ O + 3mL asetik asit 100 mL'ye tamamlanır.

2.4. Numunelerin Temini ve Saklama Koşulları

Anzer yöresine ait altı bal numunesi ve üç polen numunesi alındı. Anzer Kooperatifinden temin edilen tüm ballar Hacettepe Üniversitesinde palinolojik testlerden geçtikten sonra satışa çıkarıldığından tescilli ballar çalışmada kullanıldı. Balların üç tanesi 2014, diğer üç tanesi ise 2013 yılında, polenlerin biri 2014, diğer ikisi 2013 yılında toplandı. Kullanılan numunelerin kodları ve bilgileri Tablo 8'deki gibidir. Bal örnekleri analizler için laboratuarda, oda sıcaklığında ve karanlık ortamda muhafaza edildi. Polenler ise +4 °C' de buzdolabında saklandı.

Tablo 8. Numune İsmi ve Numunenin Toplandığı Yıl.

Numune İsmi	Rize, İkizdere / Yıl
A 1	2014
A 2	2014
A 3	2014
A 4	2013
A 5	2013
A 6	2013
P 1	2014
P 2	2013
P 3	2013

2.5. Balların Bazı Fiziksel ve Kimyasal Analizleri

Balda nem, pH, renk değeri, şeker oranları, prolin miktarı, diastaz aktivitesi, hidrosimetilfurfural değeri, iletkenlik çözünmeyen maddeler gibi kriterler kullanılarak balın doğallığı ve saflığı ortaya çıkarılmaktadır. Bu tezde optik çevirme açısı, pH, %nem, %briks, prolin miktarı, iletkenlik parametreleri ölçüldü.

2.5.1. Optik Çevirme (α – Rotation)

Bu yöntemle birlikte salgı ballarının optik çevirme açısı sağa yani pozitif değer verirken çiçek balların ki ise sola yani negatif değer vermektedir (Junk ve Pancoast, 1973). Optik çevirme açısı polarimetre kullanılarak tayin edildi. 12 g bal tartılıp saf suda çözüldü. Üzerine 10 mL Carrez reaktifi (I ve II) ilave edildi ve 30 dakika karıştırıldı. Hacmi 100 mL'ye tamamlandıktan sonra 24 saat süre sonunda süzüldü. Elde edilen süzüntü polarimetre ile ölçüm yapılarak balların optik çevirme açıları belirlendi.

2.5.2. Nem Tayini

Refraktometre (Atago, Germany) kullanılarak ölçülen kırılma indisleri sıcaklığına göre düzeltilerek % nem ve briks değerleri olarak ifade edildi (Helrich, 1990).

2.5.3. Prolin Tayini

Tayin spektrofotometrik yöntem kullanılarak gerçekleştirildi. Prolin ninhidrin ile renkli kompleks oluşturduktan sonra 2-propanol ilavesiyle örnek çözelti etkisizleştirilir ve absorbansa karşı konsantrasyon grafiği çizilir. Prolin içeriği değerler arasındaki ilişki den tayin edilmektedir (Ough, 1960).

Satın alınmış prolin 64 mg tartıldı 100 mL'de çözüldü. Hazırlanmış stok prolin çözeltilisinden 0,25 mL-0,5 mL-1,0 mL ve 2,0 mL alınarak balon jojelerde 25 mL'ye seyreltilerek standart prolin çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden 0,5'er mL alınarak cam tüplere konuldu. Üzerlerine 1 mL formik asit ve 1 mL % 3'lük ninhidrin çözeltisi ilave edilip tüpler dikkatlice ve kuvvetlice 15 dk çalkalandı. Çalkalama bitiminde kaynayan su banyosunda 15 dk bekletildi. Sonra 70°C'lik su banyosunda 10 dk tutuldu.

Sürenin hemen bitiminde tüplere 5 mL % 50'lik 2-propanol çözeltisi ilave edildi. Tüpler buz banyosunda bekletildikten sonra spektrofotometrede 510 nm'de okundu.

2.5.4. Elektriksel İletkenlik

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) ifade edilir.

2.5.5. pH Ölçümü

Serbest asitler, laktonlar ve esterler baldaki toplam asitliği belirlemektedir (Alvarez-Suarez vd., 2010; Cavia vd., 2007; Kahraman vd., 2010). Balın pH'sı ise iyonize asitlere ve mineral maddelere bağlıdır. Balın asitliği, mikroorganizmalara karşı kararlılığını artırırken; 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 üç paralel olarak yapıldı.

2.6. Antioksidan Analizler

2.6.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı

Analiz Slinkard vd., (1977) 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.

Standart grafiğın 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 değerleri ile grafik çizildi. Çizilen grafiğe göre metanolik bal ve polen ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı bulundu. 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.

Tablo 9. Toplam Polifenol Tayininde Yapılan Pipetleme İşlemi.

	Kör	Standart	Numune
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 ₂ CO ₃	400 µL	400 µL	400 µL
760 nm’de köre karşı absorbans okunur.			

2.6.2. 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 konsantrasyonları (0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,015625 mg/mL) hazırlanıp 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 10’daki gibidir.

Tablo 10. Toplam Flavonoid Tayininde Yapılan Pipetleme İşlemi.

	Kör	Renk	Standart	Numune
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 ₃ COO	0,1 mL	-	0,1	0,1

40 dk. oda sıcaklığında inkübe edilir ve 415 nm’de absorbands okunur.

2.6.3. 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 11’deki gibidir.

Tablo 11. Toplam Tanen Tayininde Yapılan Pipetleme İşlemi.

	Kör	Standart	Numune
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.

2.6.4. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Güç (FRAP) Tayini

Bu yöntem Fe(III) kompleksinde 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 absorbans 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, 1996).

Çalışma eğrisi için Troloks[®]’un değişen konsantrasyonları (31,25-62,5-125-250-500-1000 µM) kullanılarak çalışma eğrisi hazırlandı. 100 µL numune üzerine 3 mL FRAP reaktifi [300 mM pH 3,6 asetat tamponu: 10 mM TPTZ: 20 mM FeCl₃ (10: 1: 1)] eklendi. 4 dakika sonra 593 nm’de absorbanslar okundu. Sonuçlar standart bir antioksidan olan Troloks[®] la karşılaştırılmalı olarak bulundu ve µmol Troloks[®] eşdeğeri antioksidan güç / 100 g bal olarak ifade edildi. Pipetleme işlemi Tablo 12’deki gibidir.

Tablo 12. FRAP Tayininde Yapılan Pipetleme İşlemi.

	Kör_{MeOH}	Test (Numune)	Renk Körü_(MeOH)	Troloks
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 absorbans okunur.

Renk Körü_{test(met)}: Metanolde çözünen numune için renk körü

2.6.5. 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 ve polen numunelerinin metanolik ekstraktları kendi çözücüleri ile seyreltilerek farklı ve uygun konsantrasyonlarda hazırlandı. 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 SC₅₀ değerleri hesaplandı. Pipetleme işlemi Tablo 13'teki gibidir.

Tablo 13. DPPH• Yöntemi İçin Yapılan Pipetlemeler.

	Numune Tanık	Reaktif Tanık	Numune
	Tüpü	Tüpü	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.

2.6.5.1. SC₅₀ Değerlerinin Bulunması

SC₅₀ radikal miktarını yarıya indiren numune konsantrasyonudur. SC₅₀ değerinin bulunması için farklı konsantrasyonlarda çalışmak gerekir. Bu nedenle çalışmalarda altı farklı konsantrasyonda ölçüm yapıldı. Numunelerin yeterli miktarda farklı konsantrasyonu hazırlanıp absorbans ölçümleri yapıldı, standart olarak Troloks® kullanıldı. Absorbanslar konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi. Maksimum absorbansın yarısına karşılık gelen konsantrasyon miktarı SC₅₀ değeri olarak alındı ve mg/mL ya da g/mL cinsinden hesaplandı.

2.7. Enzim inhibisyonları

2.7.1. Hyaluronidaz İnhibisyonu

Metod spektrofotometrik olup, enzimin reaksiyon ürünlerinin ortamda bulanıklık oluşturması esasına dayanır. Her numunenin inhibitör aktivitesi Sigma protokolünde küçük bir değişiklik yapılarak ve başka bir referans yöntemle birleştirilerek belirlendi (Yahaya and Don, 2012; Kolayli vd., 2015). Bal numuneleri ortalama bir değer oluşturması açısından (A 1 ve A 2; A 3 ve A 4; A 5 ve A 6) üç numune olacak şekilde eşit miktarlarda birleştirildi ve AO 1, AO 2, AO 3 olarak kodlandı. Üç polen numunesi de ortalama bir değer oluşturması açısından aynı şekilde eşit miktarlarda birleştirilip tek numune haline getirildi. PO olarak kodlandı. Bal ve polen numuneleri sulu ekstrakt olarak hazırlandı. 3 g bal tartılıp yaklaşık 10mL'ye suyla seyreltildi. Polen ise 12 g tartılıp 100 mL'ye tamamlandı. Numuneler çalkalayıcıda 24 saat boyunca ekstrakte edildikten sonra filtreden (0,45 RC) geçirilip son hacimlerine tamamlandı.

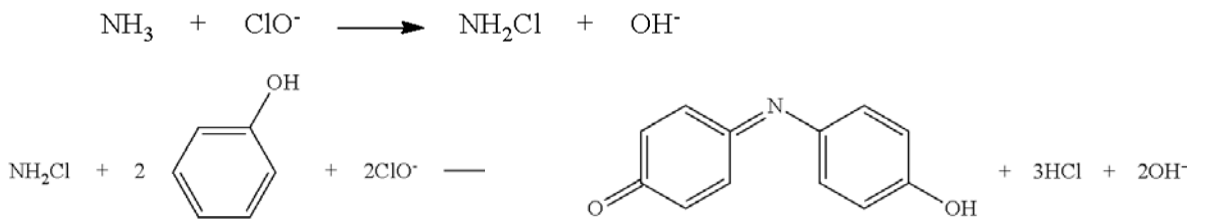
Tablo 14. Hyaluronidaz İnhibisyonunda Yapılan Pipetleme İşlemi.

	Kör	Test (numune)	Standart
Enzim	100 µL	100 µL	100 µL
Fosfat tamponu pH:7	100 µL	100 µL	100 µL
Numune ekstraktı (veya standart)	-	25 µL	25 µL
Numune veya standart çözücüsü	25 µL	-	-
Karıştırıcı Su Banyosunda 10 dk 37 °C İnkübasyon			
Substrat pH:5,35	100 µL	100 µL	100 µL
Karıştırıcı Su Banyosunda 45 dk 37 °C İnkübasyon			
Asetat Tamponu (pH:3,75)	1 mL	1 mL	1 mL
10 dk Oda Sıcaklığında İnkübasyon			
1 dk 100°C'de Reaksiyonu Durdurma			
2 dk Soğutma			
600 nm'de saf suya karşı okunur.			

Hyaluronidaz enzimi ve substratı satın alınmış olup; 1,67U'lik hazırlanan enzim çözeltisinden 100 µL, üzerine pH:7 olan fosfat tamponundan 100 µL koyuldu. 25 µL numune eklendikten sonra 10 dk inkübasyona bırakıldı. Ardından %0,01 hyaluronik asit sodyum tuzu içeren pH:5,35 olan Na₃PO₄ çözeltisi eklenip 40 dk inkübasyon sonunda son pipetlemeler yapıldı. Reaksiyonu durdurmak için numuneler kaynar su banyosunda 1 dk bekletildi. 600 nm'de absorbanslar saf suya karşı okundu. Numuneler altı farklı konsantrasyonla körle birlikte çalışıldı. Hyalorunidaz enziminin anti-aktivitesi % İnhibisyona karşı konsantrasyon grafiğinin logaritmik olarak çizilmesiyle hesaplandı. Yapılan pipetleme işlemi Tablo 14'teki gibidir.

2.7.2. Üreaz İnhibisyonu

Yöntemin esası üreazın üre ile enzimatik reaksiyonu sonucunda oluşan NH₄⁺, sodyum hipokloritli ortamda ve sodyum nitroprosit katalizörü eşliğinde fenol ile redoks tepkimesi vererek mavi renkli indofenolu oluşturur ve rengin şiddeti üre miktarıyla doğru orantılıdır (Weatherburn, 1967). Dolayısıyla üreaz inhibisyonu gerçekleştikçe rengin şiddeti azalır. Reaksiyon denklemleri Şekil 5'teki gibidir.



Şekil 5. İndofenol Oluşumu

Bal numuneleri ortalama bir değer oluşturması açısından hyaluronidaz inhibisyonunda olduğu gibi (A 1 ve A 2; A 3 ve A 4; A 5 ve A 6) üç numune olacak şekilde eşit miktarlarda birleştirildi ve AO 1, AO 2, AO 3 olarak kodlandı. Polenler ise

ortalama bir değer bulabilmek için eşit miktarlarda birleştirilip bir tek numune haline getirildi. Yine PO olarak kodlandı.

Tablo 15. Üreaz İnhibisyonu İçin Gerekli Pipetlemeler.

	Kör	Test (numune)	Standart (Tiyo üre)
Enzim	100 µL	100 µL	100 µL
Test Bileşiği	-	500 µL	500 µL
Tampon	400 µL	400 µL	400 µL
Numune çözücüsü	500 µL	-	-
15 dk İnkübasyon			
Fenol Reaktifi	500 µL	500 µL	500 µL
Alkali Reaktifi	500 µL	500 µL	500 µL
50 dk İnkübasyon			
625 nm’de saf suya karşı okunur.			

Bal ve polen numuneleri sulu ekstrakt olarak hazırlandı. 5 g bal tartılıp yaklaşık 10 mL’ye suyla tamamlandı. Polen ise 15 g tartılıp 100 mL’ye tamamlandı. Numuneler çalkalayıcıda 24 saat boyunca ekstrakte edildikten sonra filtreden (0,45 RC) geçirilip son hacimlerine tamamlandı. 100 µL enzim, 400 µL tampon, 500 µL test bileşiği eklenip 15 dakika inkübasyondan sonra 500 µL fenol reaktifi ardından 500 µL alkali reaktifi eklenerek 50 dakika inkübe edildi. Oluşan renk spektrofotometrik olarak 625 nm’de ölçüldü. Altı farklı konsantrasyonda hazırlanan numunelerin absorbansı okunduktan sonra konsantrasyona karşı IC₅₀ grafiği çizildi. Standart olarak tiyo üre kullanıldı. Gerekli pipetlemeler Tablo 15’te verilmiştir.

2.7.2.1. IC₅₀ Değerlerinin Bulunması

IC₅₀ enzim aktivitesini yarıya indiren numune konsantrasyonudur. IC₅₀ değerinin bulunması için farklı konsantrasyonlarda (altı farklı konsantrasyonda) ölçüm yapıldı.

Numunelerin uygun ve farklı konsantrasyonları hazırlanıp absorbands ölçümleri yapıldı ve absorbandslar yardımıyla % inhibisyon aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Konsantrasyon pipetlemede oluşan seyreltme katsayısı dikkate alınarak tekrar hesaplanıp konsantrasyona karşı % inhibisyon grafiği logaritmik olarak oluşturuldu. Maksimum inhibisyonun yarısına karşılık gelen konsantrasyon miktarı IC₅₀ değerini vermektedir ve mg/mL ya da g/mL cinsinden hesaplanmaktadır.

$$\text{Inhibisyon Yüzdesi} = \left[1 - \left(\frac{\text{Absorbans(Numune)}}{\text{Absorbans(Kör)}} \right) \right] * 100$$

3. BULGULAR

3.1. Fiziksel Tayin Sonuçları

3.1.1. Optik Çevirme Sonucu

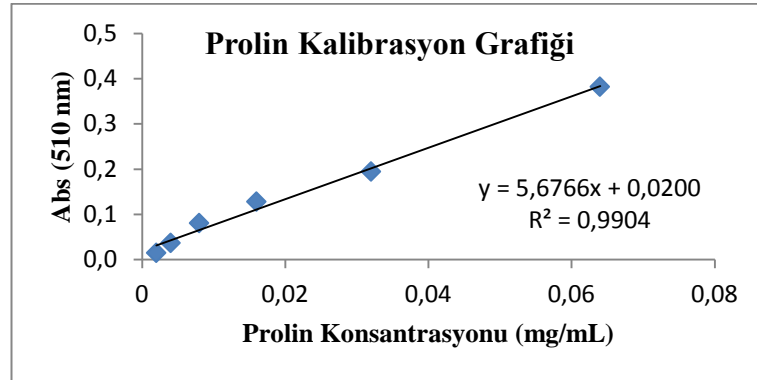
Optik çevirme açısı bir polarimetre kullanılarak (Beta PPP7 Optical Activity, England) tayin edildi (Junk ve Pancoast, 1973). Polarize ışığı çevirme açısı olan α -rotasyon değeri salgı balları ile çiçek ballarının ayırt edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Çiçek balları negatif, salgı balları pozitif değere sahiptir (White, 1989). Çiçek balı olduğu bilinen anzer balında optik çevirme açısı negatif değerler olarak elde edildi. Sonuçlar Tablo 16'daki gibidir. Anzer yöresine ait bu ballarda optik rotasyon değeri -01,03 ile -01,22 arasında değişim göstermektedir.

3.1.2. 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 olarak belirlendi. Elde edilen değerler Tablo 16'da gösterilmiştir. Nem balların raf ömürlerinin belirlenmesinde oldukça önemli olup yüksek nem balın olgunlaşmadığını aynı zamanda fermantasyon olmasına ve dolayısıyla erken bozunmasına neden olmaktadır. Ayrıca nem balın toplandığı bölgenin coğrafik özelliklerine, hasat zamanına ve biçimine göre de değişim gösterir (Oddo ve Piro 2004; Bogdanov vd., 2004). Türk gıda kodeksinde (TSE) göre balda nem içeriği çiçek ve salgı balında en fazla % 20 olmalıdır. Bu çalışmada kullanılan Anzer ballarının nem içeriği % 17,90-20,27 arasında olduğu tespit edilmiştir.

3.1.3. Prolin Tayini Sonucu

Tayin prolinin ninhidrin ile renkli kompleks oluşturmasına dayanan bu metotta prolin içeriği, prolinin standart olarak kullanıldığı çalışma grafiği (Şekil 6) yardımıyla gerekli katsayılarla çarpılarak mg/kg cinsinden tayin edildi. Balların prolin değerleri Tablo 16'da verilmiştir. Balların prolin değerleri 812,106 mg/kg ile 1139,767 mg/kg arasında değişim göstermektedir.



Şekil 6. Prolin Standart alışma Grafiği.

3.1.4. Elektriksel İletkenlik Analiz Sonucu

Elektriksel iletkenlik bir maddenin elektriksel akışı taşıma yeteneğidir. Ballarda elektriksel iletkenliği esas olarak balın mineral madde içeriğine dayanmaktadır (Andrade vd., 1997). Bal standartlarına göre ballarda elektriksel iletkenlik değeri iek balı ve fırıncılık balında 0,8 mili siemens/cm (800 mikrosiemens/cm) den fazla olmamalıdır. Çalışmamızda kullanılan Anzer ballarının elektriksel iletkenlik değerleri 370-574 mikro siemens/cm arasında değişim göstermektedir.

3.1.5. pH Sonucu

Balın pH değeri değişik şartlar altında 3,4 ile 5,5 arasında değişmekle birlikte ortalama olarak 3,9'dur. Anzer ballarının ölçülen pH değerleri 3,48-3,95 arasındadır. Tüm fiziksel parametre sonuçları Tablo 16'daki gibidir.

Tablo 16. Anzer ballarının Optik Çevirme, Nem, Briks, İletkenlik ve pH Sonuçları.

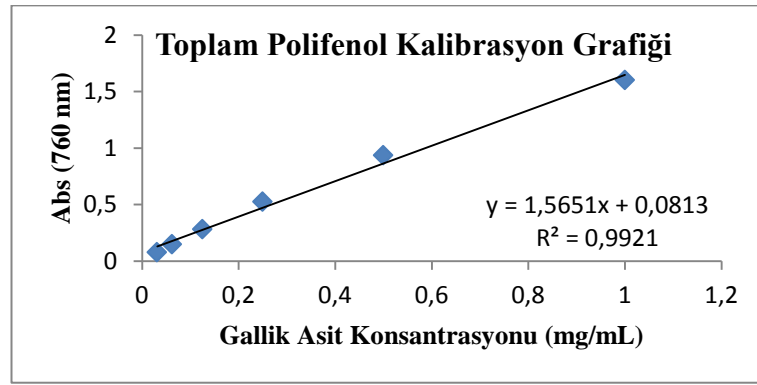
Numune	Optik	%Nem	%Briks	Prolin mg/kg	İletkenlik (μ S/cm)	pH
	Çevirme [20 $[\alpha]$ D]					
A 1	- 01,03	20,27 \pm 0,12	79,73 \pm 0,12	812,11 \pm 7,47	449,67 \pm 2,52	3,48 \pm 0,00
A 2	- 01,11	19,87 \pm 0,12	80,13 \pm 0,12	1139,77 \pm 7,47	370,00 \pm 3,00	3,50 \pm 0,00
A 3	- 01,08	18,07 \pm 0,31	81,93 \pm 0,31	829,72 \pm 12,46	547,33 \pm 2,52	3,57 \pm 0,00
A 4	- 01,04	19,30 \pm 0,14	80,70 \pm 0,14	808,58 \pm 2,49	432,67 \pm 3,06	3,95 \pm 0,00
A 5	- 01,22	20,10 \pm 0,14	79,90 \pm 0,14	916,04 \pm 9,97	523,67 \pm 3,21	3,77 \pm 0,00
A 6	- 01,04	17,90 \pm 0,14	82,10 \pm 0,14	993,55 \pm 4,98	574,00 \pm 1,00	3,61 \pm 0,00
Ortalama \pm ss	-01,09	19,25 \pm 0,16	80,74 \pm 0,16	916,63 \pm 7,47	482,90 \pm 2,55	3,65 \pm 0,00

3.2. Antioksidan Sonuçları

3.2.1. Toplam Fenolik Madde Testi Sonucu

Analizler için bal örnekleri metanolik ekstraktları hazırlanarak gerekli seyreltme işlemleri yapıldıktan sonra 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

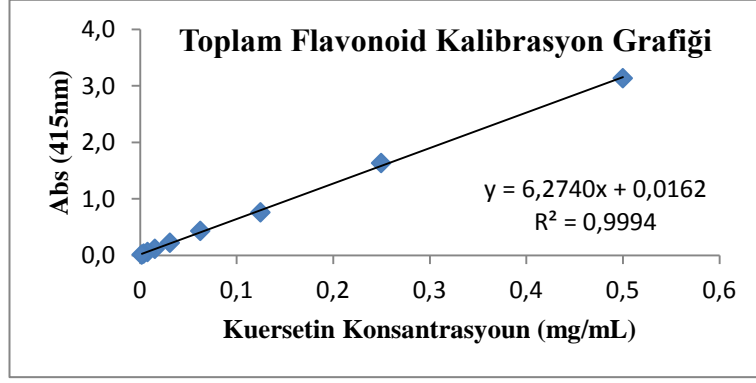
standart çalışma grafiğinde absorbans konsantrasyonla doğru orantılı olup, elde edilen doğru denklemi $y=1,5651x+0,0813$ olarak tespit edildi (Şekil 7). Hazırlanan standart çalışma grafiği kullanılarak 1 g balın içerdiği mg cinsinden toplam fenolik madde miktarı belirlendi. Balların ve polenin toplam fenolik madde miktarları Tablo 17'deki gibidir. Toplam fenolik madde miktarı ballarda 17,69 - 26,49 mg GAE /100 g numune arasında olup, polenler için 702,25 - 836,717 mg GAE /100 g olarak hesaplandı. En yüksek değer ballarda A 3, polenlerde P 1 olduğu tespit edildi.



Şekil 7. Toplam Fenolik Madde Standart Çalışma Grafiği.

3.2.2. Toplam Flavonoid Madde Testi Sonucu

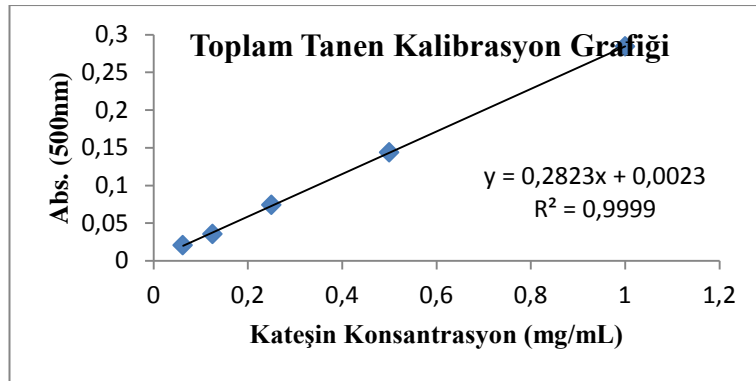
Metanolik olarak hazırlanmış olan bal ve polen örnekleri gerekli seyreltme işlemi yapıldıktan sonra toplam flavonoid madde miktarları kuersetin standardına göre hesaplandı. Değişen konsantrasyonlarda hazırlanan standart kuersetin çözeltileri yardımıyla toplam flavonoid madde miktarları tayin edildi. 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 $y=6,2740x-0,0162$ olarak tespit edilip (Şekil 8), bu denklemden faydalanılarak 1 g balın mg kuersetin cinsinden toplam flavanoid madde miktarı hesaplandı. Toplam flavonoid madde miktarı ballarda 1,09-3,31 mg QAE /100 g numune, polenlerde ise 195,88-275,58 mg QAE/100 g numune olarak hesaplandı. En yüksek değerlerin ballarda A 3, polenlerde ise P 1 olduğu tespit edildi. Sonuçlar Tablo 17'deki gibidir.



Şekil 8. Toplam Flavonoid Madde Standart Çalışma Grafiği

3.2.3. Toplam Tanen Testi Sonucu

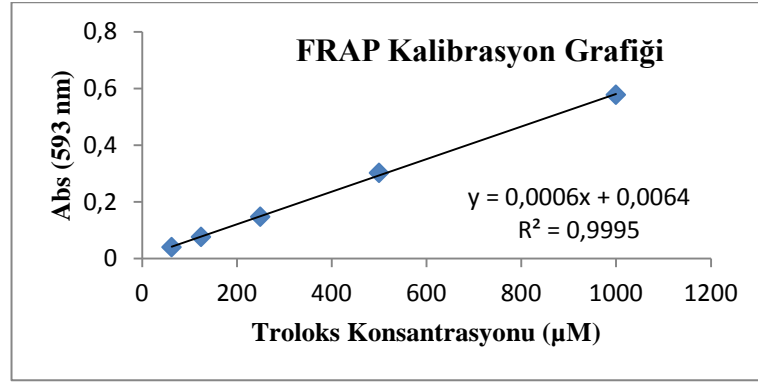
Metanolik olarak hazırlanmış olan bal ve polen örnekleri toplam tanen miktarları kateşin standardına göre hesaplandı. Değişen konsantrasyonlarda hazırlanan standart kateşin çözeltileri yardımıyla toplam tanen miktarları tayin edildi. Elde edilen 500nm'deki absorbans değerleri y-ekseninde ve konsantrasyon değerleri x-ekseninde olacak şekilde bir standart çalışma grafiği hazırlandı. Elde edilen doğru denklemi $y=0,2823x+0,0023$ olarak tespit edilip (Şekil 9), bu denklemden faydalanılarak 1 g balın mg kateşin cinsinden toplam tanen miktarı hesaplandı. Toplam tanen miktarı ballarda tespit edilemezken, polenlerde ise 33,21-38,65 mg QKE /100 g numune olarak hesaplandı. En yüksek değer polenlerde ise P 1 olduğu tespit edildi. Sonuçlar Tablo 17'deki gibidir.



Şekil 9. Toplam Tanen Kalibrasyon Grafiği.

3.2.4. FRAP Testi Sonucu

Bu yöntem ile 1 mmol.L^{-1} Troloks[®] eşdeğeri, ferrik indirgeme yeteneğine sahip antioksidanların konsantrasyonu belirlenir. Kalibrasyon için Troloks[®]'un farklı konsantrasyonları kullanılarak oluşturulan standart çalışma grafiği aşağıda verilmektedir (Şekil 10). Balların FRAP sonuçları Tablo 17'deki gibidir. Ballar için FRAP değeri $70,10-101,45 \text{ } \mu\text{molTroloks} / 100\text{g}$ numune, polenler için $368,37-406,72 \text{ } \mu\text{mol Troloks}$ eşdeğeri/100g numune arasında olduğu hesaplandı. Ballardan en yüksek değere sahip numune A 2 olup polenlerde en yüksek değer P 1 numunesinde tespit edildi.



Şekil 10. FRAP Standart Çalışma Grafiği.

3.2.5. 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 yarıya düştüğü numune konsantrasyonu SC₅₀ değeri olarak ifade edildi.

Antioksidan aktiviteye bakılırken numunelerle Troloks® un SC₅₀ değerleri karşılaştırılmıştır. DPPH• radikali temizleme aktivitesi tayininde küçük SC₅₀ değeri yüksek radikal temizleme kapasitesini göstermektedir. Balların SC₅₀ değerleri 45,85-85,96 mg/mL arasında değişim gösterirken, polenlerin 1,41-1,56 mg/mL arasında olduğu hesaplandı. Sonuçlara göre en yüksek radikal temizleme aktivitesine sahip bal numunesi A 3, polenlerden P 1 olduğu Tablo 17’de gösterilmiştir.

Tablo 17. Toplam Polifenol, Toplam Flavonoid, Toplam Tanen, FRAP ve DPPH testleri sonucu.

Numune İsmi	TP (mg GAE/100g numune)	TF (mg QE/100g numune)	TT (mg KE/100g numune)	FRAP (µmol Troloks/100g)	DPPH-SC ₅₀ (mg/mL)
A 1	25,35±0,24	1,46±0,06	T.E.	101,26±1,06	51,64±2,18
A 2	19,13±0,12	1,09±0,03	T.E.	101,45 ±0,42	57,31±0,00
A 3	26,49±0,22	3,31±0,04	T.E.	95,09±3,16	45,85±0,00
A 4	22,22±0,10	3,29±0,04	T.E.	90,14±0,58	50,38±2,18
A 5	17,69±0,58	2,17±0,02	T.E.	70,10±0,56	85,96±0,00
A 6	21,88±0,29	2,64±0,02	T.E.	84,99±1,01	62,52±0,00
Ort±ss	22,01±0,25	2,32±0,04	-	90,51±1,13	58,94±0,73
P 1	836,71±0,00	275,58±1,44	38,65±0,79	406,72±1,56	1,41±0,00
P 2	702,25±1,37	195,88±3,09	35,74±1,37	368,37±3,23	1,56±0,01
P 3	720,68±1,37	263,63±2,92	33,21±1,46	396,87±2,37	1,44±0,04
Ort±ss	753,21±0,91	245,03±2,48	34,94±1,21	390,65±2,39	1,47±0,02
					Std. Troloks 0,005±0,0001

3.3. İnhibisyon Sonuçları

3.3.1. Hyaluronidaz İnhibisyonu Sonuçları

Yapılan spektrofotometrik tayin sonucu hyaluronidazın inhibisyonunu sağlayan en iyi numunenin PO olduğu görüldü. İnhibisyonun değerce düşük olması yüksek inhibisyon sağladığının göstergesidir. Ballar ise polene kıyasla daha düşük aktivite göstermiştir. İnhibe edebilme özelliği sıralaması AO 2, AO 1, AO 3 şeklindedir. Sonuçlar Tablo 18’de gösterilmiştir.

Tablo 18. Hyaluronidaz İnhibisyonu Sonuçları.

Numune Kodu	IC ₅₀ (g/mL)
AO 1	0,16±0,03
AO 2	0,11±0,01
AO 3	0,23±0,00
Ort±ss	0,17±0,01
P O	0,07±0,00

3.3.2. Üreaz İnhibisyonu Sonuçları

Yapılan inhibisyon testi sonucu üreazın inhibisyonunu sağlayan en iyi numunenin PO olduğu görüldü. Ballar ise polene kıyasla daha düşük aktivite göstermiş (değerce yüksek), en iyi inhibisyon sağlayan bal AO 2, onu takiben AO 1 ve AO 3 gelmektedir. Sonuçlar Tablo 19’da gösterilmiştir. Standart olarak tiyoüre kullanılmıştır.

Tablo 19. Üreaz İnhibisyonu Sonuçları.

Numune Kodu	IC ₅₀ (mg/mL)
AO 1	21,09±0,02
AO 2	20,60±0,01
AO 3	23,80±0,00
Ort±ss	21,83±0,01
P O	1,32±0,00

Std. Tiyoüre 12.09±0.13

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu çalışmada altı farklı Anzer balı ve üç farklı Anzer poleni kullanıldı. 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). Balın saflığı gıda kodekslerine (TSE vb.) göre su içeriği, iletkenlik, asitlik, pH, renk değeri, şeker oranları (%C4/C13), prolin miktarı, diastaz aktivitesi, hidrokümetilfurfural değeri ve çözünmeyen maddeler gibi kriterler kullanılarak belirlenmektedir (Molina, 1989; White, 1978). Bu kriterler balın saflığını ve doğallığını ortaya çıkarmaya yaramaktadır. Bu nedenle bu çalışmada öncelikle balların fiziksel özellikleri; optik rotasyon, %nem-briks, iletkenlik, prolin, pH değerleri tespit edildi.

Optik rotasyon metodu tüm bal örneklerine uygulanabilmektedir. Bu yöntemde salgı ballarının optik çevirme açısı sağa (+) iken, çiçek balların ki ise sola (-) yönelmektedir (Junk ve Pancoast, 1973). Örneklerin optik çevirme açısı bir polarimetre kullanılarak (Beta PPP7 Optical Activity, England) tayin edildi. Balda optik rotasyona sebebiyet verebilecek olan proteinlerin çökmesi sağlanarak ölçülen Anzer balları negatif değerde olduğu yani optik çevirme açısının sola yöneldiği belirlendi. Böylece çiçek balı oldukları ortaya konulmuştur. Cavrar 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 Anzer ballarının optik rotasyon değerleri literatürle uyumlu olup -01,03 ile -01,22 arasındadır (Tablo 16).

Nem tayini refraktometre (Atago, Germany) kullanılarak ölçüldü ve kırılma indisleri sıcaklığa göre düzeltilerek % nem değerleri olarak ifade edildi (AOAC, 1990). % nem değerlerinden de % Briks (% kuru madde) değerleri hesaplandı. Balın nem içeriği granülasyonu açısından çok önemlidir ve yüksek nem içeriğinin mikrobiyal bozunmaya hem de kristalizasyona neden olduğu bilinmektedir (Tosi vd., 2002). Su miktarı balın toplandığı bölgenin coğrafik özelliklerine, ve hasat zamanı ve biçimine göre de değişim gösterir (Persano Oddo ve Piro; Bogdanov vd., 2004). Türk gıda kodeksinde (TGK) göre çiçek ve salgı balında nem içeriği en fazla % 20 olmalıdır.

Mevcut çalışmada da çiçek balı olan Anzer ballarının nem içeriği Türk Gıda Kodeksi ile uyum içerisinde olup balların nem içerikleri % 17,90-20,27 arasında değişim göstermektedir (Tablo 16). Ayrıca Portekiz bölgesine ait monofloral balların fiziksel özellikleri çalışmada kullanılan ve bir çiçek balı olan püren balının nem içeriğini % 17,8-20,6 bulunmuştur (Alves vd., 2013). Can vd., (2015)'in monofloral ballarla yaptığı çalışmada ise bir çiçek balı olan geven balının nem içeriği % 17, akasya balının ise nem içeriği % 20,80 olarak tespit etmişlerdir.

Elektriksel iletkenlik bir maddenin elektriksel akışı taşıma yeteneğidir. Ballarda elektriksel iletkenliği esas olarak balın mineral madde içeriğine dayanmaktadır (Andrade vd., 1997) Bal standartlara göre ballarda elektriksel iletkenlik değeri çiçek balı ve fırıncılık balında 800 mikrosiemens/cm den fazla olmamalıdır. Mevcut çalışmadaki balların elektriksel iletkenlik değerleri 370-574 mikrosiemens/cm arasındadır, değerler Tablo 16'daki gibidir. Literatürde verilen çiçek ballarının iletkenlik değerleri 260-1500 mikrosiemens/cm arasındadır (Cavrar, 2013; Can, 2015). Mevcut çalışmadaki değerler literatürdeki iletkenlik değerlerinin sınırları içindeki değerlerdir.

Prolin tayini, prolinin ninhidrin ile renkli kompleks oluşturması esasına dayanır ve arı tarafından bala katılan tek amino asit olduğu için balın kalitesinin göstergesidir. Çalışmamızdaki Anzer ballarının prolin değeri 808 – 1139 mg/kg arasında bulunmuştur. Sonuç Tablo 16'daki gibidir. Prolinin nektardan mı arıdan mı kaynaklandığı tespit edilememiştir. Balda bulunan prolin, nektarın bala dönüşmesi sırasında temel olarak arı tarafından bala katılan tek aminoasit olup toplam aminoasitlerinin %50-85'ini oluşturmaktadır (Hermosin vd., 2003). Can vd., (2015) yaptığı Türkiye florasına ait monofloral balların araştırılması yayınında en düşük değer akasya balında 281 mg/kg, en yüksek değer püren balında 845 mg/kg, karışık çiçek balında ise 482 mg/kg olduğunu tespit etmişlerdir. Mevcut çalışmadaki Anzer balları bu bağlamda çiçek ballarından daha yüksek prolin içeriğine sahip olup literatürde verilen püren balının prolin değerine yakın değerdedir. Prolin miktarı ayrıca balın protein içeriğini göstermesi açısından önemli bir kriterdir.

Mevcut çalışmadaki pH değeri Anzer balı için 3,48-3,95 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 %1'lik kısmı amino asitler, glukonik asit, fenol bileşikleri gibi asitlerden oluşur. Balın tatlılığı, içerdiği asit karakterdeki maddelerden dolayı, benzer miktarda şeker içeren besinlere göre daha az hissedilmektedir. Serbest asitler, laktonlar ve esterler baldaki toplam asitliği belirlemektedir (Alvarez-Suarez vd., 2010; Cavia vd., 2007; Kahraman vd., 2010). Balın pH'sı ise 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). Serbest asitlerin artışı balda fermentasyonun göstergesi sayılmaktadır. Çünkü bal şekerleri ve alkoller baldaki mayalar tarafından asetik aside dönüştürülmektedir (Alvarez-Suarez vd., 2010; Cavia vd., 2007). Yapılan çalışmalar, serbest asit ve lakton miktarı açısından balın açılmadan önce, oda sıcaklığında 20 ay muhafaza edilebileceğini göstermektedir (Cavia vd., 2007). Sonuç olarak balın pH'sı literatürde verilen değerlerle uyum içerisinde olduğu bulunmuştur.

Yukarıda bahsedilen kriterler balın sadece saflığını ve doğallığını ortaya çıkarmaya yaramaktadır. Balın gerçek kalitesini yansıtmamakta ve test edilen balın biyoaktivite potansiyeli hakkında bilgi vermemektedir. Balın biyolojik aktivite kriterleri olarak ise başta anti-oksidan olmak üzere anti-mikrobiyal (bakteriyel, fungal ya da viral), anti-inflamatuar ve antikanserojen, anti-tümöral özellikleri ön plana çıkmaktadır. Bu özelliklerin temelini ise bal arısının ırkı, coğrafi bölgesi ve nektar temin ettiği bitki florası oluşturmaktadır (Molan, 2000). Nitekim Anzer balı ve poleni ile ilgili yapılan çalışmalar literatürde oldukça sınırlı sayıdadır ve biyoaktivite özellikleri halen ortaya çıkarılmayı beklemektedir. Bu tezde birer arı ürünü olan Anzer balı ve polenin antioksidan özellikleri bitkilerde farklı çeşitlerde antioksidanlar mevcut olduğundan ve dolayısıyla her bir antioksidan bileşeni tek tek belirlemek oldukça zor olacağından birkaç farklı test kullanılarak 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 uygulandı. Enzim

inhibisyon testleri de bal ve polenlerin sulu ekstraktlarıyla yapıldı, hyaluronidaz ve üreaz enzimleri üzerine inhibisyon etkileri *in vitro* olarak belirlendi.

Anzer balı ve polenin Folin-Ciocalteu metoduyla belirlenen toplam fenolik madde miktarının literatürdeki fenolik madde miktarları ile karşılaştırıldığında Anzer yöresine ait polenlerin 702-836 mgGAE/100 g numune arasında olup orta derecede fenolik madde miktarına sahip olduğu görülmektedir. Romanya’da yapılan bir çalışmada 12 farklı monofloral polen örneğinin aynı metotla 440 mg ile 1640 mg GAE/100 g polen arasında değişim gösterdiği bildirilmektedir (Mărghitas vd., 2009). Yapılan bir başka çalışmada ökaliptus polenine ait toplam fenolik madde miktarlarının 3259 mg GAE/100 g polen olduğu bildirilmektedir (Leja vd., 2007). Bal örneklerinde ise toplam fenolik madde miktarı 17-26 mgGAE/100 g numune olarak değişim göstermektedir (Tablo 17). Balların toplam fenolik madde miktarlarının ise dünyaca ünlü olan manuka ballarında 90 mgGAE/100 g (Alzahrani vd., 2012), Türkiye florasına ait monofloral balların 16 ile 78 mgGAE/100 g aralığında olduğu, karışık çiçek ballarının ise 29 mgGAE/100 g olduğu yayınlanmıştır (Can, 2015). Fenolik bileşiklerin antioksidan, antimutajenik ve serbest radikal temizleyici etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Lee, 2004). Literatürde yapılan çalışmalarda balın ve polenin toplam fenolik madde miktarı ile biyolojik aktivitesi arasında paralellik olduğu bildirilmektedir (Sarıkaya vd., 2009; Ulusoy ve Kolaylı, 2013).

Çalışılan altı bal numunesinin toplam flavonoid miktarı 1,09 ile 3,31 mg Kuersetin/ 100g bal, polenlerde ise 195-275 mg Kuersetin/ 100g polen arasında değişim göstermiştir. Ballarda toplam flavonoid miktarı çiçek balları için literatürde 0,65 ile 8,1 mg Kuersetin/100g arasında değişim göstermekte, polenler için 104-807 mg Kuersetin/100g kuru polen numunesi olduğu bildirilmiştir (Yıldız vd., 2013; Žilić vd., 2014) Çalışmamızda kullandığımız Anzer balı ve polenin bu bağlamda literatürdeki değerler arasında olduğu görülmektedir.

Balın ve polenin antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde birçok yöntem olup, en yaygın kullanılan ve çalışmada da tercih edilen metotlardan biri de FRAP metodudur. Çalışılan tüm Anzer bal ve polen numunelerinin Fe⁺³ indirgeme yeteneğine sahip oldukları ve tüm polenlerin ballardan çok daha yüksek Troloks® eşdeğeri

antioksidan güç değerine sahip oldukları bulundu. Anzer ballarının Troloks® eşdeğeri antioksidan güç değerleri 70-101 µmolTroloks®/100g aralığında, polenlerin ise 368-406 µmol Troloks®/100g aralığında olduğu bulundu. Ulusoy (2010) Anzer ballarının antioksidan kapasitesini yine aynı yöntem olan FRAP metoduyla çalışmış, mevcut çalışmada olduğu gibi polenlerin değerlerini ballardan yüksek bulmuş, bulunduğu değerlerin toplam fenolik içerikle korelasyon gösterdiğini belirtmiştir. Bu çalışmada da toplam fenolik ve flavonoid içerikle FRAP testi 0,996 ile 0,992 olarak korelasyon göstermiştir. Polifenolik içerik arttıkça Fe⁺³ indirgeme yeteneğinin arttığı sonucuna varılmıştır. Ancak Ulusoy (2010) ile mevcut çalışma karşılaştırıldığında mevcut çalışmanın polen FRAP değerleri daha düşük bulunmuş olup, sebebi yılların farklılığına ve iklime dayandırılabilir.

Tablo 20. Bal ve Polen Örneklerinin Antioksidan Korelasyonu.

		TP	TF	TT	FRAP	DPPH
TP	Pearson Korelasyon	1	0,992(**)	0,678(*)	0,996(**)	-0,924(**)
	Sig. (2-yön)		0,000	0,045	0,000	0,000
	N	27	27	9	27	27
TF	Pearson Korelasyon	0,992(**)	1	-0,014	0,992(**)	-0,914(**)
	Sig. (2-yön)	0,000		0,971	0,000	0,000
	N	27	27	9	27	27
TT	Pearson Korelasyon	0,678(*)	-0,014	1	0,092	-0,020
	Sig. (2-yön)	0,045	0,971		0,813	0,959
	N	9	9	9	9	9
FRAP	Pearson Korelasyon	0,996(**)	0,992(**)	0,092	1	-0,931(**)
	Sig. (2-yön)	0,000	0,000	0,813		0,000
	N	27	27	9	27	27
DPPH	Pearson Korelasyon	0,924(**)	0,914(**)	-0,020	0,931(**)	1
	Sig. (2-yön)	0,000	0,000	0,959	0,000	
	N	27	27	9	27	27

** Korelasyon 0.01 düzeyinde korelasyon önemlidir (2-yön).

* Korelasyon 0.05 düzeyinde korelasyon önemlidir(2-yön).

DPPH• radikalini süpürme testi, çeşitli doğal ürünlerin serbest radikal süpürme yeteneğinin ölçülmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Nagai vd., 2003). DPPH• radikalinin % 50'sini temizleyen madde miktarı SC₅₀ olarak tanımlanır ve düşük SC₅₀ değeri numunenin yüksek radikal temizleme aktivitesini gösterdiğini belirtir. Balların DPPH• radikali temizleme aktivitesi tayini sonuçları olarak SC₅₀

değerleri 45,85-85,96 mg/mL olarak ifade edildi. Polenlerin ise SC₅₀ değerleri 1,41-1,56 mg/mL arasında olup, DPPH• testinde en yüksek aktivite polenlerde bulunurken, en düşük aktivite ise ballarda bulundu. Çalışmamızdaki Anzer balları bazı çiçek ballarına göre yüksek, kestane ve püren gibi koyu renkli ballara göre düşük aktivite göstermiştir (Can, 2015; Escuredo vd., 2013). Ulusoy ve Kolayli (2013) yaptığı çalışmaya göre Anzer polenlerinin ise 0,65–8,20 mg/mL arasında değişim gösterdiği, mevcut çalışmadaki Anzer polenlerinin literatürle uyum içerisinde olduğu görülmüştür.

DPPH• radikal temizleme aktivitesi testinin çalışılan bal ve polen ekstraktları açısından değerlendirilmesinde toplam fenolik içerik ile negatif korelasyon R²=-0,924, toplam flavonoid içerik ile negatif korelasyon R²=-0,914 olarak bulundu (Tablo 20). Aynı zamanda FRAP testi ile DPPH• testi arasında negatif korelasyon R²=-0,931 olduğu bulundu. Sonuç olarak toplam fenolik içerik, toplam flavonoid içerik, FRAP ve DPPH• arasında yüksek korelasyon olduğu tespit edildi. Anzer balı ve polenin fenolik bileşenleri, antioksidan kapasiteleri, sıçanlarda N-etilmaleimid ile indüklenen karaciğer hasarının engellenmesi, etanol-kaynaklı artan sıçan mide vasküler geçirgenliğine karşı Anzer balının koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir (Doğan ve Kolankaya, 2005; Korkmaz ve Kolankaya, 2008; Ulusoy ve Kolaylı, 2013; Ulusoy, 2010). Anzer balı ve polenin mide koruyucu etkileri üreaz enzimini inhibe etmesinden kaynaklanabilir. Çalışmamızda Anzer balı ve polenin antioksidan özellikleri yanısıra hyaluronidaz ve üreaz enzim inhibisyonu üzerine etkileri belirlendi. Böylece *in vitro* ortamda anti-inflamatuvar, anti-bakteriyel ve antikanserojenik etkisinin olup olmadığı araştırıldı.

Hyaluronidaz inhibisyonunu birleştirilmiş Anzer polenleri daha fazla sağlarken, birleştirilmiş ballar ise daha yüksek bir IC₅₀ değeri (inhibisyonca düşük) göstermiştir. Bulunan değerler birleştirilmiş polende 0,07 g/mL iken, ballarda 0,11-0,23 g/mL arasında değişim göstermiştir. José vd., (2010)'a göre *Tripodanthus acutifolius* bitkisinden izole edilen tanımlanmış flavonoidler (rutin, nicotiflorin, hyperoside and isoquercitrin) yüksek hyaluronidaz inhibisyonu göstermiş, aynı zamanda bu bileşikler güçlü DPPH• ve peroksil radikal temizleme aktivitesi sergilemiştir. Literatürde balların hyaluronidaz inhibisyonu üzerine etkisi hakkında bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak polenlerle yapılan bir çalışmada hyaluronidaz inhibisyonunun toplam fenolik içerik,

toplam flavonoid içerik, antioksidan özellik ve antimikrobiyal özelliklerle korelasyon gösterdiği ifade edilmiştir (Pascoala, 2014).

Hyaluronidaz pek çok patolojik hastalıkla ilişkilidir ve onun inhibitörleri, anti-inflamatuar, anti-allerjik, anti-tümöral, anti-aging, anti-romatoid, anti-toksin, antimikrobiyal etki göstermektedir (Stern, 2008; Sunitha vd., 2013; Selenge vd., 2014). Çeşitli flavonoidlerin de potansiyel hyaluronidaz inhibitörü oldukları gösterilmiştir (Kuppusamy vd., 1990; Kuppusamy ve Das, 1991). Kaempferol, kuersetin ve rutin gibi çeşitli flavonoidlerin hyaluronidaz üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğunu bildirilmiştir (Liu, 2013; Lee, 2010). Hua-jin vd., (2015) yaptığı çalışmada, hyaluronidaz ve iki biyoaktif flavon (baicalein ve kresin) arasındaki etkileşimleri, özellikle anti-inflamatuar ve anti-allerjik aktiviteyi deneysel ve bilgisayarlı yöntemlerin kombinasyonunu kullanarak incelemiştir. Ayrıca çeşitli bakterilerden elde edilen bilinen flavon ve flavononların 50µg/mL konsantrasyonda hyaluronidazı %8-92 arasında inhibe ettiği tespit edilmiştir (Andréa vd., 2001).

Bu çalışmada aynı zamanda üreaz inhibisyonunun *in vitro* ortamda antikanserojenik ve antibakteriyel etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Üreaz *Helicobacter pylori*'nin midedeki asidik ortamda yaşayabilmesi için üreyi amonyak ve karbondioksit parçalayan enzimdir. Mide NH₃ ile bazikleşir. Buna karşılık olarak mide asit salgısını arttırarak oluşan bazlığı dengelemeye çalışır. Artan asitle beraber mide zarar görür ve ülseratif yollara girer. Üreaz inhibe olduğu takdirde onu inhibe eden inhibitör antiülseratif etki göstermiş olur. Aynı zamanda *Helicobacter pylori*'nin üreaz inhibisyonu sonucu oluşacak asidik ortamda yaşayamayacağına istinaden üreaz inhibisyonunun antibakteriyel olduğu da kanıtlanmaya hazır bir delil niteliğindedir. Ortalama bir değer bulma açısından birleştirilmiş Anzer ballarında bulunan üreaz inhibisyon değerleri 20,61-23-81 mg/mL, polende 1,32 mg/mL'dir. Ayrıca DPPH• testi ile üreaz inhibisyonu R²=0,996 pozitif korelasyon göstermiştir. Bunun sonucu olarak DPPH• radikalini temizleyen polifenollerin üreazı da inhibe ettiği sonucuna varıldı. Manuka balının dietil eter ekstraktıyla yapılan bir çalışmada *Helicobacter pylori* üreazının %55'e kadar inhibe olduğunu ileri sürmüştür (Matongo ve Nwodo, 2014).

Buradan direk kanser tedavisinde kullanılsa bile peptik ülser ya da kanser öncesi değişimler görülen kişilerde Anzer bal ve polenin etkili olabileceği sonucuna varılabilir.

Tablo 21. Hyaluronidaz, Üreaz Enzimlerinin İnhibisyonlarının DPPH• Temizleme Aktivitesi İle Korelasyonu.

		Üreaz İnhibisyonu	Hyaluronidaz İnhibisyonu	DPPH SC ₅₀
Üreaz İnhibisyonu	Pearson Korelasyon	1	0,786(**)	0,996(**)
	Sig. (2-yön)		0,002	0,000
	N	12	12	12
Hyaluronidaz İnhibisyonu	Pearson Korelasyon	0,786(**)	1	0,819(**)
	Sig. (2-yön)	0,002		0,001
	N	12	12	12
DPPH SC ₅₀	Pearson Korelasyon	0,996(**)	0,819(**)	1
	Sig. (2-yön)	0,000	0,001	
	N	12	12	27

** Korelasyon 0.01 düzeyinde korelasyon önemlidir (2-yön).

Mevcut çalışmada antioksidan özellik gösteren flavonoidler dahil DPPH• radikalini temizleyen bütün polifenollerin hyaluronidaz inhibisyonu üzerine etkisi olduğu, enzim inhibisyonunun DPPH• radikalini temizleyen polifenollerin artışıyla korelasyon gösterdiği, korelasyonun pozitif ve $R^2=0,786$ olduğu görülmüştür. Bu durum örneklerdeki polifenol içeriğinin biyoaktivitesinin hem radikal temizleme kapasitesiyle hem de enzim inhibisyonu üzerine konsantrasyonla doğru orantılı olduğunu gösterir.

Sonuç olarak Anzer balı ve polenin antioksidan içeriğinin yüksek olması ve üreaz ve hyaluronidaz enzimleri üzerine inhibisyon etkisi göstermesi, insan sağlığını koruyucu olarak, antiülseratif, antibakteriyal ve anti-inflamatuar etkileri olduğu, besin maddesi olarak düzenli tüketilmesinin insan sağlığını korumada önemli biyoaktivitelere sahip olduğu söylenebilir.

5. ÖNERİLER

- Antioksidan özelliklere ve inhibisyonlara farklı ekstraktlarda bakılabilir.
- Antioksidan testler (CUPRAC, ORAC, ABTS vb.) ile çalışma çeşitlendirilebilir.
- Üreaz inhibisyonu çalışmaları *Helicobacter pylori* üreazı üzerinde denenebilir.
- Anzer yöresine ait diğer arı ürünlerinin biyo-yararlılığını ortaya çıkarmak için biyoaktivite testleri (antimikrobiyal, antialerjik, antitümoral vb.) *in vivo* veya *in vitro* olarak çeşitlendirilebilir.

KAYNAKLAR

- Abdesslam, C., Maha R., Bertrand D. and Marcelle L., 2000.** Increased Hyaluronan and Hyaluronidase Production and Hyaluronan Degradation in Injured Aorta of Insulin Resistant Rats. *Arterioscler Thrombocyte Vascular Biology*. 20, 1480-1487.
- Akkuş İ., 1995.** Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya.
- Akhtar, T., Hameed, S., Khan, K.M. and Choudhary, M.I., 2008.** Syntheses urease inhibition and antimicrobial studies of some chiral 3-substituted-4-amino-5-tioxo-1H,4H-1,2,4-triazoles, *Med Chem*, 4539-543.
- Albayrak S. ve Albayrak S., 2008.** Propolis: Doğal Antimikrobiyal Madde. *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 37 (3) 201 - 215, 2008.
- Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Diaz, D., Estevez, Y., Romandini, S., Giampieri, F., Damiani, E., Astolfi, P., Bompadre, S. and Battino, M., 2010.** Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food Chem Toxicol*, 48, 2490–2499.
- Alves A., Ramos A., Margarida M., Alves G., Bernardo M., Mendes B., 2013.** Antioxidant activity, quality parameters and mineral content of Portuguese monofloral honeys. *Journal of food composition and analysis*, 30, 130-138.
- Alzahrani, H., Boukraâ, L., Bellik, Y., Bakhotmah, A.B., Kolayli, S., Abdellah, F. and Sahin, H., 2012.** Evaluation of the Antioxidant Activity of Three Varieties of Honey from Different Botanical and Geographical Origins. *Global Journal of Health Science*, 4-6. <http://dx.doi.org/10.5539/gjhs.v4n6p191>.
- Anderson R.A., 2007.** Prescribing antioxidants. In: *Rakel: Integrative Medicine*, 2nd ed., Saunders. Chapter 103, p.1083-1094.
- Andrade, V.D., 1997.** Andrade P., Federico Ferreres F., Gilb M.I. ve Tomás+Barberán F.A., 1997. Determination of phenolic compounds in honeys with different floral origin by capillary zone electrophoresis, *Food Chemistry*, 1, pp, 79-81.f

- Andréa, C.P., Tânia, T.T., Elisângela, C.C., Walter, V., Suely, V.S., Josê, R.G. and Eliane C.A., 2001.** A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon* 39, 1495-1504. PII: S0041-0101(01)00122-2.
- Aparna, A.R. and Rajalakshmi, D., 1999.** Honey – Its characteristics, sensory aspects and applications, *Food Reviews International*, 15(4), 455–471.
- Arı, A., 2006.** Histolojik olarak mide kanseri ile *Helicobacter pylori* arasındaki ilişki, *Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı İstanbul Eğitim Hastanesi II. Genel Cerrahi Kliniği*.
- Aydın, B.D., Sezer, Ç., Oral, N.B., 2008.** Kars'ta satışı sunulan süzme balların kalite niteliklerinin araştırılması. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 14(1), 89-94.
- Aydın A., 1995.** Asemptomatik popülasyonda gastrit, ülser ve mide kanserinde *Helicobacter pylori* sıklığı ve patogenezi. *Aydın kitabı 76. Helicobacter pylori ve gastrit ülser ilişkisi*. ED. Çavuşoğlu H. Ege Üniversitesi basımevi Bornova İzmir. s38-57.
- Batrusaityte, V., Venskutonis, P.R. and Ceksteryte V., 2007.** Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chem*;101:502e514.
- Benzie, I.F.F. ve Strain, J.J., 1999.** 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, 15–27.
- Burdock, G. A., 1998.** Review of the Biological Properties And Toxicity Of Bee Propolis (Propolis), *Food Chemistry and Toxicology*, 36 , 347–363.
- Blomhoff, R., 2005.** Dietary antioxidants and cardiovascular disease, *Current Opinion in Lipidology*, 16,47-54.
- Bogdanov S., 1984.** Characterization of antibacterial substances in honey, *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 17(2): 74–76.
- Botzki, A., Salmen, S., Bernhardt, G., Buschauer, A. and Dove, S., 2005.** Structure-based design of bacterial hyaluronan lyase inhibitors. *QSAR Comb. Sci.* 24, 458–469.

- Bowler, R.P., Barnes, P.J. and Crapo J.D., 2004.** The role of oxidative stres in chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 1(2), 255-277.
- Burne, R. A. and Chen, Y.M., 2000.** Bacterial ureases in infectious diseases, *Microbes and Infection*, 2, 533-542.
- Büke, A.Ç., 1996.** Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Mide ve Duodenum Hastalıklarında *Helicobacter Pylori*'nin Kültür, Doku Üreaz ve Histopatolojik Yöntemleri ile Araştırılması, Uzmanlık Tezi, Ege üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir, Türkiye, 48s.,
- Can, Z., Yıldız, O., Sahin, H., Turumtay, E.A., Silici, S. and Kolayli S., 2015.** An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food Chemistry*, 180,133–141. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.024>
- Cavia, M.M., Fernandez-Muino, M.A., AlonsoTorre, S.R., Huidobro, J.F. and Sancho, M.T., 2007.** Evolution of acidity of honeys from continental climates: Influence of induced granulation. *Food Chem*, 100, 1728–1733.
- Cavrar, S., Yıldız, O., Şahin H., Karahalil F. and Kolaylı, S., 2013.** Comparison Of Physical And Biochemical Characteristics Of Different Quality Of Turkish Honey. *Uludağ Arıcılık Dergisi Kasım 2013 / Uludag Bee Journal*.13 (2): 55-62.
- Ceyhan, N., 2000.** Ballarının Mikrobiyolojik Özellikleri ve Apiterapideki Yeri, Yüksek Lisans Tezi, Muğla üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Muğla, Türkiye, 139s.
- Cook, N.C. and Samman, S., 1996.** Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Nutrational Biochemistry*, 7(21), 66-76.
- Cotelle, N., Bernier J.L., Catteau, J.P., Pommery J., Wallet J.C. and Gaydou, E.M., 1996.** Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(1), 35-43.
- Covanci, A., Telford, J.L., Del Giudice, G., Parsonnet, J. and Rappuoli, R., 1999.** *Science*, 284, 1328-1333.

- Cruthirds, D.L., Novak, L., Akhi, K.M., Sanders, P.W. and Thompson, J.A., 2003.** Mitochondrial targets of oxidative stress during renal ischemia/reperfusion. *Archives Biochemistry and Biophysics*, 412, 27-33.
- Çimen M.B.Y., 1999.** Flavonoidler ve antioksidan özellikleri. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 19, 296-304.
- Dağlı, Ü., Balk, M., Yücel, D., Ülker, A. ve Över, H., 1997.** “The role of reactive oxygen metabolites in ülcerative colitis.” *Inflammatory Bowel Diseases*, 3(4), 260-264.
- Dauer, W. and Przedborski S., 2003.** Parkinson’s disease: Mechanism and models. *Neuron*, 39, 889-909.
- Dinç, Y., 2009.** Üreaz Enziminin Bazı Tıbbi Bitkiler Tarafından İnhibisyonu. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. İstanbul, Türkiye, 104s.
- Dixon, N.E., Gazzola, C., Blakeley, R.L. and Zerner, B., 1975.** *Journal of Am. Chem. Soc.* 97, 4131-4133.
- Doğan, A. and Kolankaya D., 2005.** Protective effect of Anzer honey against ethanol-induced increased vascular permeability in the rat stomach. *Experimental and Toxicologic Pathology* 57 (2005) 173–178. 2005 . DOI:10.1016/j.etp.2005.04.004.
- Dunn, B.E., Campbell, G.P., Perez-Perez, G.L. and Blaser, M.J., 1990.** Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*, *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 9464-9469.
- Escuredo O., Miguez M., Fernandez-Gonzalez M., Seijo M.C., 2013.** Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area, *Food Chemistry*, 138, 851–856.
- Facino, R.M., Carini, M., Stefani, R., Aldini, G. and Saibene, L., 1995.** Anti-elastase and antihyaluronidase activities of saponins and sapogenins from *Hedera helix*, *Aesculus hippocastanum*, and *Ruscus aculeatus*: factors contributing to their efficacy in the treatment of venous insufficiency. *Archiv der Pharmazie* 328, 720–724.
- Ferrel, J.E., Chang Sing, P.D.G., Leow, G., King, R., Mansour, J.M. and Mansour, T.E., 1979.** Structure/activity studies of flavonoids as inhibitors of cAMP PDE and relationship.

- Fıncioğulları H., 2009.** Diyabetes Mellitus ve Sistemik Arter Hipertansiyonu Olan Hastalarda Aort Sertliğinin Serum Hyaluronidaz Düzeyi İle İlişkisinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye, 53s., 16.
- Follmer, C., 2008.** Review: Insights into the role and structure of plant ureases, *Phytochemistry*, 69, 18-28.
- Fukumoto, L.R. and Mazza G., 2000.** Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 48, 3597-3604.
- Gheldorf, N., Wang, X.H. and Engeseth, N.J., 2002.** Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J Agric Food Chem*;50:5870e5877.
- Ghous, T., Akhtar. K., Nasim, H. and Choudhry, M.A., 2010.** Screening of selected medicinal plants for urease inhibitory Activity. *Biol Med*, 2 64-49.
- Girish, K.S. and Kemparaju, K., 2006.** *Life Sciences* 78 (2006) 1433 – 1440. DOI:10.1016/j.lfs.2005.07.015
- Gomes, S., Dias, LG. and Moreira, L.L., 2010.** et al. Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food Chem Toxicol*;48:544e548.
- Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A. ve Fernandez-Gutierrez, A., 2006.** Advances in the Analysis of Phenolic Compounds in Products Derived From Bees, *J Pharmac Bio Anal.*, 41, 1220–34.
- Gonsalves, G.M., 2011.** Bioconcrete- A Sustainable Substitute for Concrete?. Master Thesis. universitat politècnica de catalunya.
- Göral, V., 2003.** Günümüzde ve gelecekte peptik ülser tedavisi, *Güncel Gastroenteroloji*, 7, 115-119.
- Hallaç T.F., 2009.** Bazı Sofralık Üzüm Çeşitlerinde Farklı Dönemlerde Alınan Yapraklardaki Fenolik ve Mineral Madde Değişimlerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, S.D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.124s.

- Halliwell B., 1994.** Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews*, 52(8), 253-265.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M., 1990.** Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186: 1–85.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1999.** Free radicals in biology and medicine. 3rd ed., Clarendon Press Oxford, p.530-533. use of nitrite and ascorbate on lipid oxidation in cooked Japanese sardine (*Sardinops melanostictus*) during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 99, 70-82.
- Harbone, J.B., 1986.** Nature, distribution and function of plant flavonoids. In: Cody, V., Middleton, E., Harbone, J. (Eds.). *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships*. Alan R. Liss, New York, pp. 15-24.
- Havsteen B.T., 2002.** The Biochemistry and Medical Significance of the Flavonoids, *Pharmacology and Therapeutics*, 96, 67–202.
- Hertel, W., Peschel, G., Ozegowski, J.H., Müller, P.J., 2006.** Inhibitory effects of triterpenes and flavonoids on the enzymatic activity of hyaluronic acid-splitting enzymes. *Arch. Pharm.* 339, 313–318.
- Helrich, K., 1990.** Association of official analytical chemists, volume one. USA.
- Hermosín, I., Chicón, R.M. and Cabezudo, M.D., 2003.** Free amino acid composition and botanical origin of honey, *Food Chemistry*, 83, 263-268. DOI:10.1016/S0308-8146(03)00089-X.
- Hipkiss, A.R., 2007.** Biological aspects of ageing. *Psychiatry*, 6(12), 476-479.
- Hua-jin, Z., You, J., Gui-zhou, H., Ran, Y. and Ling-bo, Q., 2015.** Spectroscopic and molecular modeling investigation on the interactions between hyaluronidase and baicalein and chrysin. *Process Biochemistry*. DOI <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.procbio.2015.02.007>.
- Jennie, B.L. and Christine E., 2004.** Schmidt. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. 779-789.

- Jerry, P., Liu, L., Zeng, M. and Stamler, J.S., 2000.** An Apoptotic Model for Nitrosative Stress, *Biochemistry*, 39, 1040-1047.
- José, R.S., Melina, A.S., Diego A.S., Emma, N.Q., Marta, A.V., 2010.** Free radical scavenging activities and inhibition of inflammatory enzymes of phenolics isolated from *Tripodanthus acutifolius*, *Journal of Ethnopharmacology* 130 (2010) 329–333 . DOI:10.1016/j.jep.2010.05.015
- Juan, Y.H., Chen, L.J. and Wang, R., 2009.** kinetics of soil urease affected by urease inhibitors at contrasting moisture regimes, *Rev Cienc Suelo Nutr/J Soil Sci Plant Nutr*, 9 125-133.7.
- Juan, Y.H., Chen Z, Chen L.J, Wu, Z.J. and Wang R., 2010.** et al Kinetic and thermodynamic behaviours of soil urease as affected by urease inhibitors, *R C Suelo Nutr Veg*, 10 1-11.
- Junk, W.R. and Pancoast, H. M., 1973.** Handbook of sugars for processors, chemists and technologists. Westport : AVI Publishing, 327 pp, ISBN 08-705-51337. DOI:10.1002/food.19740180828
- Karaçalı, İ., 2002.** Bahçe Ürünlerinin Muhafazası ve Pazarlanması. Ege Üniversitesi. Ziraat Fakültesi Yayınları, İzmir, 494.
- Kaeßler, A., Olgen, S. and Josea, J., 2010.** Autodisplay of catalytically active human hyaluronidase hPH-20 and testing of enzyme inhibitors. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 42 (2011) 138–147. DOI:10.1016/j.ejps.2010.11.004.
- Kahraman, T., Buyukunal, S.K., Vural, A., Altunatmaz, S.S., 2010.** Physico-chemical properties in honey from different regions of Turkey. *Food Chem*, 123, 41–44.
- Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamlıoğlu, M., Başpınar, N., Tiftik, A.M., 2006.** *Biyokimya*, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 975-591-131-6.
- Kara F., 2006.** Üreazın Aljinat/Kitosan Polielektrolit Ve Poli (Akrilamit-Ko-Akrilit Asit)/K-Karragenan İnterpolimer Komplekslerine İmmobilizasyonu Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 74s.

- Karadal, F. ve Yıldırım, Y., 2012.** Balın Kalite Nitelikleri, Beslenme ve Sağlık Açısından Önemi, Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, Kayseri, 9 (3) 197-209, 2012.
- Karataş, F., Munzuroğlu, Ö. ve Gür, N., 2000.** Arı polenlerindeki A, E ve C vitaminleri ile selenyum düzeylerinin araştırılması, F.Ü. Fen ve Müh.Bilimleri Dergisi, 12, 219-224.
- Kaskoniene, V., 2010.** Floral markers in honey of various botanical and geographic origins: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 620- 634.
- Kayastha, A.M. and Das, N., 1999.** A simple laboratory experiment for teaching enzyme immobilization with urease. *Biochemical Education*, 27:114-117.
- Kaur, C. and Kapoor, H.C., 2001.** Antioxidants in fruits and vegetables—the Millennium’s health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36: 703–725.
- Keha, E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2010.** Biyokimya, Aktif yayınevi, Erzurum.
- Kehre, J.P. and Smith, J.V., 1994.** Free radicals in biology: sources, reactivities and roles in etiology of human diseases; in Frei B(ed): natural antioxidants in human health and disease. San Diego, Academic Press, 25-62.
- Korkmaz, A. and Kolankaya, D., 2008.** Anzer honey prevents N-ethylmaleimide-induced liver damage in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 61 (2009) 333–337. DOI:10.1016/j.etp.2008.07.005.
- Kolaylı S., Sahin, H., Can, Z., Yıldız O. and Sahin K., 2015.** Honey shows potent inhibitory activity against the bovine testes hyaluronidase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* (Impact Factor: 2.38). DOI: 10.3109/14756366.2015.1054819.
- Korkmaz, A. ve Çankaya, N., 2008.** Polen. Samsun İl Tarım Müdürlüğü Samsun.
- Kösecik, M., Erel, Ö., Sevinç, E. and Selek, S., 2005.** Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *International Journal of Cardiology*, 100(1), 61-64.

- Krajewska, B., 2009.** Ureasas I. functional, catalytic and kinetic properties: A review, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59, 9-21.
- Krell R., 1996.** Value-Added Products From Beekeeping. FAO Agricultural Services Bulletin, Rome 124- 409s.
- Kucur, M., Karadag, B., Isman, F.K., Ataev, Y., Duman, D., Karadag, N., Ongen, Z. And Vural, VA., 2009.** Plasma hyaluronidase activity as an indicator of atherosclerosis in patients with coronary artery disease. *Bratisl Lek Listy*. 110(1), 21-6.
- Kuppusamy, U.R., Khoo, H.E. and Das, N.P., 1990.** Structure–activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase. *Biochem. Pharmacol.* 40, 397–401.
- Kuppusamy, U.R. and Das, N.P., 1991.** Inhibitory effects of flavonoids on several venom hyaluronidases. *Experientia* 47, 1196-1200.
- Kuzucu, M., 2011.** Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimleri Üzerine Bazı İlaçların in vitro Etkilerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Erzincan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzincan. Türkiye, 93s.
- Lee, J.H. and Kim, G.H., 2010.** Evaluation of antioxidant and inhibitory activities for different subclasses flavonoids on enzymes for Rheumatoid arthritis. *J Food Sci*;75:H212-H217.
- Lee, J., Koo, N. and Min, D.B., 2004.** Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals, *Comprehensive Reviews in Food Science and Safety*, 3, 21-33.
- Leja, M., Mareczek, A., Wyżgolik, G., Klepacz-Baniak, J. and Czekońska, K., 2007.** Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species, *Food Chem.*, 100, 237–240.
- Lercker, G., Caboni, M.F., Vecchi, M.A., Sabatini, A.G. ve Nanetti, A., 1992.** Caratterizzazione dei Principali costituenti della Gelatina Reale, *Apicoltura*, 8, 11-21.
- 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.
- Liu, M., Yin, H., Dong, J.J., Xiao, L., Liu, G., Qian, Z.H. and Miao, J.L., 2013.** Inhibition and interaction with hyaluronidase by compounds from Hop (*Humulus lupulus* L.) flowers. *Asian J Chem*;25:10262-10266.

- Maingonnat, C., Victor, R., Bertrand, P., Courel, M.N., Maunoury, R. and Delpech, B., 1999.** Activation and inhibition of human cancer cell hyaluronidase by proteins. *Anal. Biochem.* 268, 30–34.
- Mărghitas, L.A., Stanciu, O.G., Dezmirean, D., S., Bobiș, O., Popescu, O., Bogdanov, S. and Campos, M.G., 2009.** In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania., *Food Chem.*, 115, 878–883.
- Matongo F. and Nwodo U.U., 2014.** In vitro Assessment of *Helicobacter pylori* Ureases Inhibition by Honey Fractions. DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.2014.09.001>.
- McNultu, C.A.M, Uff J.C., Wilkinson, S.P. and Gear, M.V.L., 1987.** Spiral organisms in the gastric antrum. *Lancet* 2-96.
- Meda, A., Lamien, C. and Romito, M., 2005.** Determination of total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem*;91:571e577.
- Meyer, K. and Rapport, M.M., 1951.** The inhibition of testicular hyaluronidase by heavy metals. *Journal of Biol. Chem.* 188, 485–490.
- Meyers, S., 2001.** Equine sperm-occyte interaction: the role of sperm surface hyaluronidase *Animal Reproduction Science*, 68, 291-303.
- Mobley, H.L.T., Island, M.D. and Hausinger, R.P., 1995.** *Microbiol. Rev.* 59, 451-480.
- Molan, P.C. and Cooper R.A., 2000.** Honey and sugar as a dressing for wounds and ulcer. *Trop Doct*, 30: 249-250.
- Molina C.L.H., 1989.** Honey quality analysis. *Alimentos*, 14(4), 55-60.
- Mosley, R.L., Benner, E.J., Kadiu, I., Thomas, M. and Boska, M.D., 2006.** Neuroinflammation, oxidative stres, and the pathogenesis of Parkinson’s disease. *Clinical Neuroscience Research*, 6(5), 261-281.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Ersoz, B., Dikmen, N., Mentis, G., Özgünen, T., 1993.** Harper’ın Biokimyası, Barış Kitapevi, 978-975-953-311-3.
- Nagai, T., Inoue, R., Inoue, H. and Suzuki, N., 2003.** Preparation and Antioxidant Properties of Water Extract of Propolis, *Food Chemistry*, 80, 29–33.

- Nagai, T. ve Inoue, R., 2004.** Preparation and Functional Properties of Water Extract and Alkaline Extract of Royal Jelly, *Food Chem.*, 84, 181–186.
- Nelson, D.L. and Cox M.M., 2005.** *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*. Palme Yayıncılık, Ankara, 243-293.
- Oddo, P. and Piro R., 2004.** Main European unifloral honeys: descriptive sheets, *Apidologie*, 35 38-81.
- Onat, T., Emerk, K. ve Sözmen, E.Y., 2002.** *İnsan Biyokimyası*, Palme Yayıncılık, Ankara. Konya.
- Ough, C., 1960.** Rapid determination of proline in grapes and wines, *Journal Food Science*, 34, 228-230.
- Özaltın, B., 2014.** Koyun Beyninden Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı İlaçlarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye, 127s.
- Özbalcı, B., Boyacı, I.H., Topcu, A., Kadılar, C. and Tamer, U., 2013.** Rapid analysis of sugar in honey by processing Raman spectrum using chemometric methods and artificial neural Networks, *Food Chemistry*, 136, 1444-1452.
- Papas, A.M., 1996.** Determinants of Antioxidant Status in Humans *Lipids*, 31, 77-82.
- Parellada, J. and Guinea, M., 1995.** Flavonoid inhibitors and leucine aminopeptidase: a proposed mathematical model for IC₅₀ stimation. *J. Nat. Prod.* 58, 823-829.
- Pascoal, A., Rodriguesa, S., Teixeirab A., Feásc, X. and Estevinhoa L.M., 2014.** Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. Volume 63, Pages 233–239.
- Prior, RL., Cao, G., 2000.** Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: Diet and health implications. *Horticulture Science*, 35, 588-592.

- Rauf, A., Ahmed, F., Qureshi, A.M., Rehman A-u. and Khan A., 2011.** et al, Synthesis and urease inhibition studies of barbituric and thiobarbituric acid derived sulphonamides, *J Chin Chem Soc.*58 528-537. DOI:10.1002/jccs.201190017.
- Rigden, D.J., Botzki A., Nukui M., Mewbourne R.B., Lamani E., Braun S., Angerer E., Bernhardt G., Dove S., Buschauer A. and Jedrzejak M.J., 2006.** Design of new benzoxazole-2-thione-derived inhibitors of *Streptococcus pneumoniae* hyaluronan lyase, structure of a complex with a 2-phenylindole. *Glycobiology* 16, 757–765. DOI:10.1093/glycob/cwj116.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G., 1996.** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G., 1997.** Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2: 152-159.
- Russel K.M., 1983.** The antibacterial properties of honey. M.Sc. Thesis, University of Waikato, New Zealand.
- Salmen, S., Hoehstetter, J., Käsbauer, C., Paper, D.H., Bernhardt, G. and Buschauer, A., 2005.** Sulphated oligosaccharides as inhibitors of hyaluronidases from bovine testis, bee venom and *Streptococcus agalactiae*. *Planta Med.* 71, 727–732.
- Saral, Ö., 2013.** 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, Türkiye, 106s.
- Sarıkaya, A.O., Ulusoy, E., Tunçel, M., Öztürk, N., Kolaylı, S., 2009.** Antioxidant Activity and Phenolic Acid Constituents of Chestnut (*Castania sativa Mill.*) Honey and Propolis, *Journal of Food Biochemistry*, 33, 4, 470-481.
- Schmidt, J.O., 1996.** Bee products: chemical composition and application, Ed., Mizrahi, H., Lensky, Y., *Bee Products: Properties, Applications and Apitherapy*, Plenum, New York, 15–26.
- Selenge, E., Murata, T., Tanaka, S., Sasaki, K., Batkhuu, J. and Yoshizak, F., 2014.** Monoterpene glycosides, phenylpropanoids, and acacetin glycosides from *Dracocephalum foetidum*. *Phytochemistry* 101, 91–100.

- Shahidi, F., 1996.** Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications. AOCS Press, Champaign- Illinois 1-11. AOCS Press, Champaign-Illinois, pp. 209, USA.
- Singleton, V.L. and Rossi J.A., 1965.** Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic–Phosphotungstic Acid Reagents, American Journal of Enology and Viticulture, 16, 144-158.
- Slinkard, K. and Singleton, V.L. 1977.** Total phenol analyses: Automation and Comparison with Manual Methods. Am. J. Enol. Vitic. 28: 49-55.
- Spickenreither, M., Braun, S., Bernhardt, G., Dove, S. and Buschauer, A., 2006.** Novel 6-Oacylated vitamin C derivatives as hyaluronidase inhibitors with selectivity for bacterial lyases. Bioorg. Med. Chem. Lett. 16, 5313–5316.
- Stern R., 2008.** Hyaluronidases in cancer biology. Seminars in Cancer Biology 18, 275–280. DOI:10.1016/j.semcancer.2008.03.017.
- Stingl, K., and De Reuse, H., 2005.** Staying alive overdosed: how does *Helicobacter pylori* control urease activity? Int J Med Microbiol;295: 307e315.
- Sunitha, K., Suresh, P., Santhosh, M.S., Hemshekhar, M., Thushara, R.M., Marathe, G.K., Thirunavukkarasu, C., Kemparaju, K., Kumarb, M.S. and Girish, K.S., 2013.** Inhibition of hyaluronidase by N-acetyl cysteine and glutathione: Role of thiol group in hyaluronan protection. International Journal of Biological Macromolecules 55, 39– 46.
- Şahin A., 2006.** *Hirudo medicinalis* (Tıbbi Sülük)' in Kas Dokusunda Hyaluronidaz Aktivitesinin Arastırılması, Yüksek Lisans Tezi. Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ, Türkiye, 33s., 5.
- Şahin, H., 2014.** Orman Gülü Balı ve Bitkisindeki Grayanotoksin-III (GTX-III) İzoformunun LC-MS/MS ile Analizi, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 153s.
- TSE, 1989.** Türk Standartları Enstitüsü, Arı Zehiri Tasarısı, Ankara.
- Tamura, S., Kono, T., Harada, C., Yamaguchi, K. ve Moriyama, T., 2009.** Estimation and Characterisation of Major Royal Jelly Proteins Obtained From The Honeybee *Apis mellifera*, Food Chem., 114, 1491–1497.
- Tanaka, T., Kawase, M. And Tani, S., 2003.** Urease inhibitory activity of simple α,β -unsaturated ketones, Life Sciences, 73, 2985-2990.

- Tao, F., Gonzales-Flecha, B. and Kobzik, L., 2003.** Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(4), 327-340.
- TGK, 2012.** Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği, (Tebliğ No: 2012/58).
- Thomas, M.J., 1995.** The role of free radicals and antioxidants: How do we know that they are working?, *Critical Reviews in Food Science*, 35, 21-39.
- Toida, T., Ogita, Y., Suzuki, A., Toyoda, H. and Imanari, T., 1999.** Inhibition of hyaluronidase by fully O-sulfonated glycosaminoglycans. *Arch. Biochem. Biophys.* 370, 176–182.
- Tosi, E., Ciappini, M., Re, E. and Lucero, H., 2002.** Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content, *Food Chemistry*, (77), 71-74.
- Trias, A., Jean-Claude, V., Frederic, T. and Brigitte, D., 2005.** Inhibition of hyaluronan hydrolysis catalysed by hyaluronidase at high substrate concentration and low ionic strength. 25, 166 – 174. DOI:10.1016/j.matbio.2005.11.005.
- Taşçı, I., Yavuz, N., Caner, M., Göksel, S. ve Yılmaz, O., 1995.** Karaciğer sıcak iskemisi ve reperfüzyon hasarında dimetilsülfoksil (DMSO), allopurinol ve deferoksamin'in etkileri. *Çağdaş Cerrahi Dergisi*, 9, 198-202.
- Güller U., 2011.** İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılan Karbonik Anhidraz I Ve II İzoenzimlerinin Aktiviteleri Üzerine Bazı Antiülser, Glukokortikoid Ve Ürolojik İlaçların Etkilerinin İncelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. 99s., 6.
- Ulusoy, E., 2010.** Anzer Balı ve Poleninin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İle Fenolik Bileşiminin Belirlenmesi ve Antioksidan Özellikleri, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 143s., 3.
- Ulusoy, E. and Kolayli, S., 2013.** Phenolic Composition And Antioxidant Properties Of Anzer Bee Pollen. *Journal Of Food*, 1745-4514. DOI:10.1111/Jfbc.12027.
- Ulusoy, E., Kolaylı, S. ve Sarıkaya, A.O., 2010.** Antioxidant and Antimicrobial Activity of Different Floral Origin Honeys from Türkiye, *Journal of Food Biochemistry*, 34,1, 321 – 335.

URL-1, 2015. <http://www.gidahatti.com/dosya-arsivi/content/20-dosya-arsivi> (09 Mayıs 2015).

Vanden Berghe, D.A.R., Haemers, A. and Vlietinck, A.J., 1993. In: Colegate, S.M., Molyneux, R.J. (Eds.). *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structural Determination*. CRC Press, London, pp. 405-440.

Kreybig, V.T., Preussmann, R. and Schmidt, W., 1968. Chemical constitution and teratogenic effect in rats. I. Carbonic acid amides, carbonic acid hydrazides and hydroxamic acids. *Arzneimittelforschung*. 18:645e657.

Weatherburn, M.W., 1967. Phenol hypochlorite reaction for determination of ammonia, *Anal Chem*; 39:971-974.

Weber, M., Jones, M.J. and Ulrich, J., 2008. Optimisation of isolation and purification of the jack bean enzyme urease by extraction and subsequent crystallization, *Food and Bioproducts Processing*, 86, 43-52.

Weston, R.J., Mitchell, K.R. and Allen, K. L., 1999. Antibacterial Phenolic Components of New Zealand Manuka Honey, *Food Chemistry*, 64, 295-301.

White J.W., 1978. Honey. *Advances in Food Research*, 24, 287–374.

White, J.W. and Winters, J.K., 1989. Honey protein as internal standard for stable carbon isotope ratio detection of adulteration of honey, *J.Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 72 (6) 907-911.

Wilkinson, C., Bower, L. and Warren, C., 1995. Measurement of hyaluronidase activity in normal human serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 14, 707-712.

Yahaya, Y.A. and Don, M.M., 2012. Evaluation of *Trametes lactinea* extracts on the inhibition of hyaluronidase, lipoxygenase and xanthine oxidase activities in vitro. *Journal of Physical Science*. 23(2): 1-15.

Yıldız O, Can Z, Saral Ö, Yuluğ E, Aliyazıcıoğlu R, Canpolat S., Kolaylı S. and Öztürk F., 2013. Hepatoprotective Potential of Chestnut Bee Pollen on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Damages in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Volume DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/461478>.

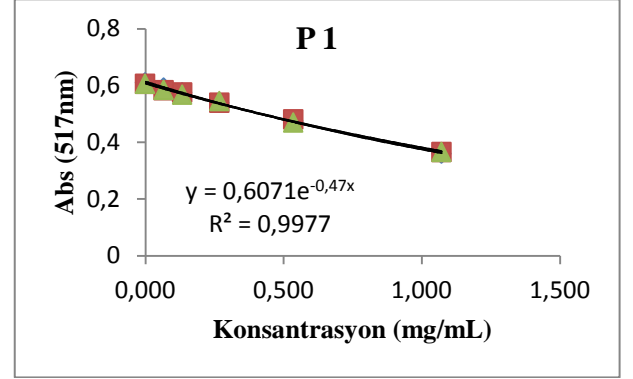
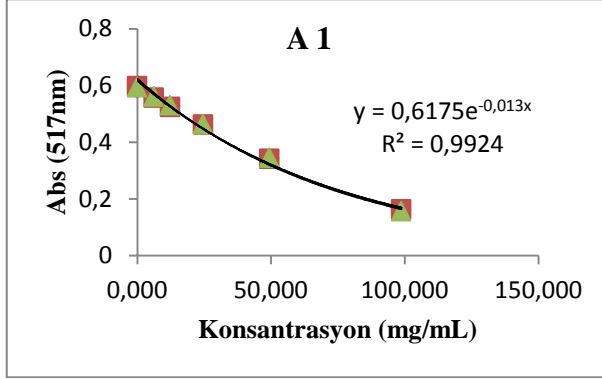
Young I.S. and Woodside J.V., 2001. Antioxidants in Health and Disease, Journal of Clinical Pathology, 54, 3, 176-186.

Zalata, A., Yahia, S., El-Bakary, A. and Elsheikha, H.M., 2007. 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), 140-147.

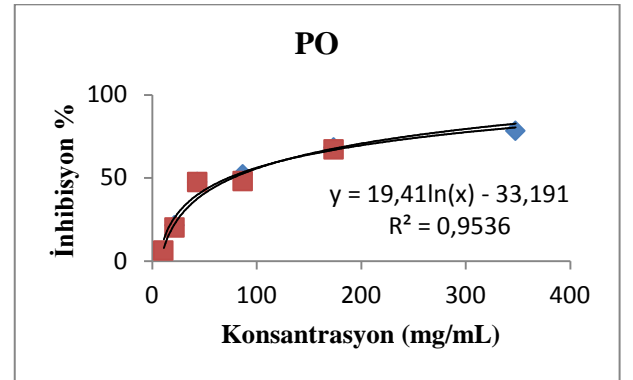
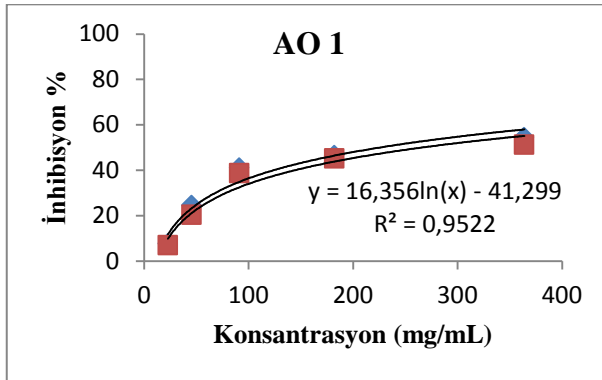
Žilić S., Vančetović J., Janković M., Maksimović V., 2014. Chemical composition, bioactive compounds, antioxidant capacity and stability of floral maize (*Zea mays* L.) pollen . Journal of Functional Foods , 10, 65-74.

EKLER

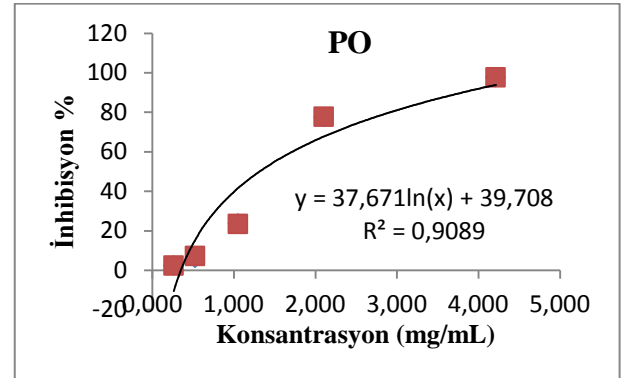
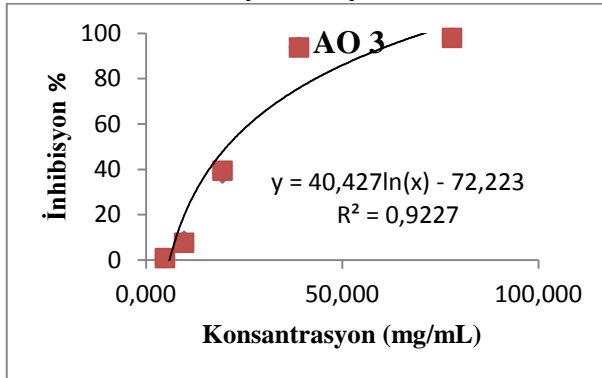
Ek 1: DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi Tayini Grafikleri



Ek 2: Hyaluronidaz inhibisyonu Tayini Grafikleri



Ek 3: Üreaz inhibisyonu Tayini Grafikleri



ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Trabzon' da doğdu. İlkokulu Akçaabat Mevlüt Selami YARDIM İlköğretim Okulu, ortaokulu Trabzon Prof. Dr. İhsan KOZ İlköğretim 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'te Recep Tayyip ERDOĞAN Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Tıbbi Biyokimya Bölümünde tezli yüksek lisansa başladı. İki yüksek lisans öğrenimi de halen devam etmektedir.