



T. C.

ORDU ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI ORMAN GÜLÜ (*RHODODENDRON L.*)
TÜRLERİNDEN ELDE EDİLEN BALLARIN
ANTİMİKROBİYAL, ANTİOKSİDAN VE BİYOAKTİF
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

MERT AKGÜN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI**

ORDU 2019

T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

**FARKLI ORMAN GÜLÜ (*RHODODENDRON* L.) TÜRLERİNDEN
ELDE EDİLEN BALLARIN ANTİMİKROBİYAL, ANTİOKSİDAN
VE BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

MERT AKGÜN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORDU 2019

TEZ ONAY

Mert AKGÜN tarafından hazırlanan “FARKLI ORMAN GÜLÜ (*RHODODENDRON L.*) TÜRLERİNDEN ELDE EDİLEN BALLARIN ANTİMİKROBİYAL, ANTİOKSİDAN VE BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 03.09.2019 tarihinde yapılmış ve jüri tarafından oy birliği ile Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman
Prof.Dr.Sezai ALKAN

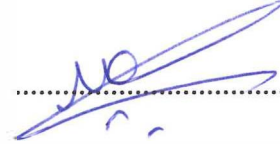
Jüri Üyeleri

Danışman
Prof. Dr. Sezai ALKAN
Zootečni, Ordu Üniversitesi

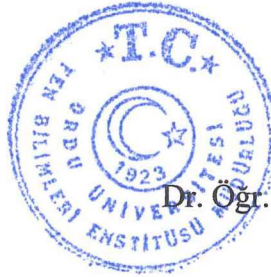
Üye
Doç. Dr. Ömer ERTÜRK
Moleküler Biyoloji ve Genetik, Ordu Üniversitesi

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Akif BOZ
Zootečni, Yozgat Bozok Üniversitesi

İmza



13 / 09 / 2019 tarihinde enstitüye teslim edilen bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 27 / 09 / 2019 tarih ve 2019 / 663 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Enstitü Müdürü
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Sami GÜLER



TEZ BİLDİRİMİ

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



MERT AKGÜN

Bu çalışma Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün B-1827 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

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

ÖZET

FARKLI ORMAN GÜLÜ (*RHODODENDRON* L.) TÜRLERİNDEN ELDE EDİLEN BALLARIN ANTİMİKROBİYAL, ANTİOKSİDAN VE BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

MERT AKGÜN

ORDU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ, 48 SAYFA

TEZ DANIŞMANI: PROF.DR. SEZAI ALKAN

Bu çalışma Karadeniz Bölgesi'nde yetişen üç farklı orman gülü (*Rhododendron*) türünün yoğun olduğu lokasyonlarda yürütülmüştür. Bu amaçla mor orman gülü (*Rhododendron ponticum* L.) için Ordu ili Kent ormanı (Yoroz mevki), sarı orman gülü (*Rhododendron luteum* L.) için Ordu ili Aybastı yaylası ve beyaz orman gülü (*Rhododendron caucasicum* L.) için de Rize'nin İkizdere ilçesine bağlı Anzer yaylası seçilmiştir. Her bir orman gülü bitkisinin bulunduğu lokasyona üç arı kovanı yerleştirilmiş ve 5 gün bal ve polen toplanmıştır.

Araştırmada, orman gülü (*Rhododendron*) türlerinden elde edilen bal ve polen örneklerinin antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri ile fizyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Farklı orman gülü türlerinden elde edilen bal ve polen örneklerinde toplam fenolik içerikleri ve DPPH serbest radikal temizleme aktiviteleri ile antioksidan aktiviteleri de incelenmiştir. Ayrıca, bal ve polenlerin asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz aktivitesi ve lipid peroksidasyonu üzerindeki inhibisyon potansiyelleri de araştırılmıştır.

Bal için önemli kalite parametrelerinden olan prolin analiz sonuçları incelendiğinde beyaz orman gülü (*Rhododendroncaucasicum* L.) balı en yüksek değere sahip olmuş ve 923,0 mg/kg değer ile diğer orman gülü örneklerinden farklılık göstermiştir. Balın önemli faktörlerden olan diastaz sayısı 15,5 ile 8,0 arasında değişkenlik göstermiş ve en yüksek değer beyaz orman gülünde (*Rhododendron caucasicum* L.) elde edilmiştir. Tüm orman gülü bal ve polen örneklerinin pUC18 plazmid DNA'sına karşı benzer etkiler gösterdiği tespit edilmiştir. Prolin miktarı balın kalitesinin belirlenmesinde önemli bir parametre olup mor orman gülü (*Rhododendron ponticum* L.) bitkisinden elde edilen bal örnekleri diğer bal örneklerinden daha düşük değere sahip olmuştur. Yine orman gülü bal ve polen örneklerinin ham ekstraktlarının bakteri ve mantarlara karşı belirgin antibakteriyel ve antifungal etki gösterdiği de saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Orman Gülü (*Rhododendron*), Bal, Polen, Antioksidan

ABSTRACT

DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL, ANTIOXIDANT AND BIOACTIVE PROPERTIES OF HONEYS FROM DIFFERENT RHODODENDRON SPECIES

MERT AKGUN

ORDU UNIVERSITY INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED
SCIENCES

ANIMAL SCIENCE

MASTER THESIS, 48 PAGES

(SUPERVISOR: Prof. Dr. Sezai ALKAN)

DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITIES, ANTIOXIDANT CAPACITIES AND BIOACTIVE COMPONENTS OF HONEYS FROM DIFFERENT RHODODENDRON SPECIES

This study was carried out to determine the antimicrobial activities, antioxidant capacities and bioactive components of honeys and pollen obtained from three different *Rhododendron* species grown in the Black Sea Region. For this purpose, *Rhododendron ponticum* L. grown in Ordu province Urban forest (Yoroz locality), *Rhododendron luteum* L. grown in the province of Ordu Aybastı plateau and *Rhododendron caucasicum* L. grown in the Anzer plateau of İkizdere district were chosen. Three bee hives were placed at the location of each *Rhododendron* plant and honey and pollen samples were collected for 5 days.

Antimicrobial activities, antioxidant capacities and physicochemical properties of honey and pollen samples obtained from different *Rhododendron* species were investigated. Total phenolic contents and DPPH free radical scavenging activities and antioxidant activities of honey and pollen samples were also investigated. Moreover, the inhibition potentials of honey and pollen on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity and lipid peroxidation were examined.

Honey samples obtained from *Rhododendron caucasicum* L. showed the highest proline value (one of the important quality parameters for honey) (923.0 mg / kg) which was significantly, while that obtained from *Rhododendron ponticum* L. had the lowest proline value. The diastase number of honeys, another important quality factor, varied between 15.5 and 8.0 and the highest value was obtained in the *Rhododendron caucasicum* L. All rhododendron species honey and pollen samples displayed similar effects against pUC18 plasmid DNA. Moreover, raw extracts of honey and pollen samples of forest rose were found to exhibit significant antibacterial and antifungal activities against.

Key words: Rhododendron, Honey, Pollen, Antioxidant

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi ve çalışmanın yürütülmesi esnasında bana yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sezai ALKAN'a ve tez yazım aşamasında desteklerini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Ömer ERTÜRK'e teşekkür ederim. Ayrıca, analizlerin yapımındaki desteklerinden dolayı Dr. Öğr. Üyesi Melek ÇOL AYVAZ ve Dr. Öğr. Üyesi Ceren BAŞKAN'a teşekkür ederim.

Aynı zamanda, yaşamım boyunca maddi ve manevi desteklerini her an üzerimde hissettiğim babam Ali AKGÜN, annem Türkan AKGÜN ve abim Mehmet AKGÜN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca, tez çalışmasına B-1827 numaralı proje ile destek sağlayan Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

Mert AKGÜN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEZ BİLDİRİMİ	I
ÖZET	II
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİL LİSTESİ	VII
ÇİZELGE LİSTESİ	VIII
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ	IX
1. GİRİŞ	1
1.1 Ballın Nem İçeriği.....	7
1.2 pH.....	7
1.3 HMF (Hidroksimetilfurfural) Miktarı.....	8
1.4 Diastaz Sayısı.....	8
1.5 Polen.....	9
1.6 Elektriksel İletkenlik.....	10
1.7 Prolin.....	10
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	11
3. MATERYAL ve METOT	15
3.1 Materyal.....	15
3.1.1 Bal Örneklerinin Temini ve Lokasyonların Tespiti.....	15
3.1.2 Örneklerin Saklanması.....	15
3.1.3 Besiyerleri.....	15
3.1.4 Bakteriyel ve Fungal Türler ile Büyüme Koşulları.....	16
3.1.5 Çözgenler.....	16
3.2 Metot.....	16
3.2.1 Bal ve Polen Örneklerinin Ekstraktlarının Hazırlanması.....	16
3.2.2 Polen Örnekleri ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	16
3.2.3 Nem Analizi.....	17
3.2.4 Elektriksel İletkenlik.....	17
3.2.5 Suda Çözünmeyen Katı Madde Analizi.....	17
3.2.6 HMF (Hidroksimetilfurfural) Analizi.....	18
3.2.7 Prolin Analizi.....	18
3.2.8 Serbest Asitlik.....	18
3.2.9 Fruktoz ve Glukoz Analizi.....	19
3.2.10 Diastaz Sayısı.....	19
3.2.11 C4 Şeker Analizi.....	19
3.2.12 Polen Analizi.....	20
3.2.12 Antibakteriyel ve Antifungal Analiz.....	20
3.2.13 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu.....	21
3.2.14 Bal ve Polen Örneklerinin Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi.....	21
3.2.15 Fenolik Bileşiklerin HPLC ile Analizi.....	22
3.2.16 Örneklerin Toplam Fenolik İçerikleri.....	22
3.2.17 Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler.....	23
3.2.18 Örneklerin Hidroksil Radikal Kaynaklı DNA Hasarı Üzerindeki Etkisi.....	24
3.2.19 DPPH Serbest Radikal Temizleme Faaliyetlerinin Belirlenmesi.....	24

3.2.20 DPPH Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler.....	24
3.2.21 Ferrik İndirgeyici / Antioksidan Gücün Belirlenmesi (FRAP)	24
3.2.22 FRAP Metodu ile Antioksidan Aktivite Analizinde Kullanılan Çözeltiler	25
3.2.23 Asetilkolinesteraz (AChE) ve Butirikolinesteraz (BuChE) İnhibisyon Potansiyellerinin Belirlenmesi	25
3.2.24 Kolinesteraz İnhibitör Potansiyellerinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	26
3.2.25 Lipid Peroksidasyon İnhibisyon Potansiyellerinin Belirlenmesi	27
3.2.26 Lipid Peroksidasyonu İnhibisyon Potansiyelinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	27
3.2.27 pUC18 Plazmid DNA Miktar Optimizasyonu	27
3.2.28 Polen Ekstraktının pUC18 Plazmid DNA'sı ile Etkileşimi	28
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	29
4.1 Fizikokimyasal Analiz Sonuçları	29
4.2 Antimikrobiyal, Antioksidan Aktiviteleri ve Biyoaktif Bileşen Analizleri	31
4.4 Kolinesteraz Önleyici Faaliyet	36
4.5 DNA Hasar İnhibitör Aktiviteleri	37
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	40
6. KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	48

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3.1 Polen Örneklerinin Mikroskopik Yöntemle Analiz Edilmesi	20
Şekil 3.2 Ekstraktların Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi İçin GA Kullanılarak Hazırlanan Standart Çalışma Grafiği	23
Şekil 4.1 Polen Örneklerinin Taramalı Elektron Mikroskopundaki Görüntülüleri ...	30
Şekil 4.2 Farklı Renk Polenlerinin Artan Konsantrasyonları ile pUC18 Plazmid DNA'nın Etkileşiminin Elektrofotogramları	37
Şekil 4.3. PUC18 Plazmid DNA'nın Artan Konsantrasyonlarda Farklı Renkte Bal ile Etkileşiminin Elektrofotogramları.....	38



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1 Dünya Koloni Varlığı ve Bal Verimi.....	1
Çizelge 3.1 Toplam Fenolik Madde Tayini İçin Yapılan Pipetlemeler	22
Çizelge 4.1 Bal Örneklerinin Fizikokimyasal Analiz Sonuçları.....	29
Çizelge 4.2 Rhododendron Türüne Ait Bal ve Polenin HPLC Analiz Sonuçları	32
Çizelge 4.3 İn Vitro Olarak Mikrobiyal Büyümenin %100'ünü İnhibe Etmek İçin Üç Rhododendron Türüne Ait Bal ve Polenin Minimum İnhibitör Konsantrasyonu	33
Çizelge 4.4 Bal ve Polen Örneklerinin Toplam Fenolik İçerik ve Antioksidan Özellikleri.....	35

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

%	:	Yüzde
°C	:	Santigrad
H₂O	:	Su
H₂O₂	:	Hidrojen Peroksit
M.Ö.	:	Milattan Önce
MeOH	:	Metil Alkol
MIK	:	Minimal İnhibitör Konsantrasyon
mg	:	Milligram
mg GAE/kg	:	Milligram Gallik Asit Eşdeğeri/kilogram
µM	:	Mikromolar
mM	:	Milimolar
NaOH	:	Sodyum Hidroksit
RB	:	Rhododendron Balı
RPB	:	R. Ponticum Balı
RCB	:	R. Caucasicum Balı
RLB	:	R. Luteum Balı
RPP	:	R. Ponticum Polen
RCP	:	R. Caucasicum Polen
RLP	:	R. Luteum Polen

1. GİRİŞ

İnsanın temel ihtiyaçlarının başında beslenme gelmektedir. Bu ihtiyaç bitkisel ve hayvansal gıdalardan karşılanmaktadır. Temel olarak hayvansal gıda denildiğinde et, süt, yumurta ve bal akla gelmektedir. Söz konusu gıdaların bir kısmı gıda ihtiyacı yanında ilaç olarak da kullanılmaktadır. Arıcılık faaliyetleri sonucu, insan sağlığı ve beslenmesi açısından başta bal olmak üzere çok önemli ürünler üretilmektedir. Bal beslenme ve sağlık açısından önemli bileşenler bulunmaktadır. Bu bileşenlerin başında karbonhidrat gelir. Aynı zamanda az miktarda protein, amino asit, enzim, mineral, iz element, vitamin, aroma bileşenleri ve polifenol gibi maddeler içerir. Balın, sindirim olayının gerçekleşmesinde doğrudan etkili olup diğer gıda maddelerinin daha iyi emilmesini sağladığı bunlardan yararlanma oranını arttırdığı bilinmektedir. Bal antik çağlardan bu yana, birçok kültür tarafından medikal amaçlarla kullanılmaktadır (Ay ve Yiğit, 2016).

Dünya nüfusunun hızla artışına oranla da arıcılık faaliyetleri ve buna bağlı olarak bal üretim miktarı artmaktadır. Arı kolonisi sayısına göre ülkelerin sıralaması Çizelge 1.1’ de verilmiştir. Aynı çizelgede koloni başına bal verimide verilmiştir. Dünyada en fazla arı kolonisine sahip olan ilk üç ülke sırasıyla Çin, Türkiye ve İrandır. Türkiye yaklaşık 7,8 milyon koloni ile ikinci yer almaktadır (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1 Dünya Koloni Varlığı ve Bal Verimi (FAO, 2019)

Sıra (2017)	Ülke	Koloni varlığı (Adet)	Verim (Kg/Koloni)
1	Çin	9156882	54,3
2	Türkiye	7796666	14,7
3	İran	7271825	25,2
4	Etiyopya	6139990	8,1
5	Rusya Federasyonu	3349976	19,6
6	Arjantin	3003036	25,6
7	Tanzanya	2998785	10,1
8	İspanya	2904971	12,6
9	ABD	2669000	25,1
10	Meksika	1853807	27,5
11	Kore Cumh.	1724389	15,4
12	Orta Afrika Cum	1664185	9,7
13	Kenya	1623028	11,1
14	Polonya	1589276	10,8
15	Yunanistan	1561498	11,5

Koloni başına en yüksek verimin alındığı ilk beş ülke ise Çin, Meksika, Arjantin, İran ve ABD'dir (Anonim, 2019). Koloni başına verimi bu beş ülkede sırasıyla yaklaşık 54, 28, 26, 25 ve 25 kg/koloni civarındadır. Ülkemiz koloni başına bal verimi yönünden diğer ülkelerin gerisinde kalmıştır. Türkiye'de kovan başına bal verimini etkileyen faktörler, üretici profili, arı hastalık ve zararlıları ve destekleme politikaları şeklinde sıralayabiliriz. Kovan başına bal veriminde sağlanacak iyileşmeler arıcılık işletmelerinin daha karlı ve verimli bir üretim faaliyeti gerçekleştirmesine olanak sağlayacaktır. Bu konuda yapılacak tüm iyileşme ve iyileştirme politikaları sektörü bir adım daha ileriye götürecektir (Çevrimli ve Sakarya, 2018).

Dünya da koloni sayısı bakımından 2. sırada yer alan Türkiye yaklaşık 115 bin ton bal üretimi ile 2. Sırada yer almaktadır (Anonim, 2019). Dört mevsimin bir arada yaşandığı ülkemiz, farklı ilkim özellikleri ve ekolojik bölgeleri ile tarımsal üretim çeşitliliği açısından dünyanın önemli bölgelerinden biridir. Zengin bitki örtüsü, iklimsel özellikleri ve insan kaynağı dikkate alındığında Türkiye'de arıcılık hem ülke insanına sağlıklı ürünler sunabilecek hem de önemli ihracat geliri sağlayabilecek potansiyele sahiptir.

Türkiye ekolojik koşullar ve zengin bitki örtüsü sayesinde geniş coğrafyada arıcılık yapılabilmekte ve son yıllarda koloni sayısındaki artışlarla arıcılıkta söz sahibidir. Dünya'da ki keşif edilen ballı bitki türlerinin yaklaşık %75'i ülkemizde bulunmaktadır (Korkmaz, 2007). Bu floraca zenginliğin nedeni yurdumuzun değişik yörelerinde farklı iklimsel, topografik özelliklerin görülmesi ve bu çevre şartlarına uygun farklı bitki birliklerinin oluşmasıdır (Ekim, 1987).

Yurdumuzun tüm bölgelerinde arıcılık yapılabilmesine rağmen, aynı öneme sahip değildir. Coğrafik bölgelerimiz arıcılık açısından kendine özgü çok değişik bitki türlerini barındırmaktadır (Korkmaz, 2007). Buna paralel olarak, değişik doğal şartlarda ve farklı yıllarda yabani ve kültür bitkilerinin çiçeklenme dönemleri aynı olmayıp yöreden yöreye değişim göstermektedir (Öder, 1993)

Türkiye'de her bölgenin kendine özgü çevre koşullarına sahip olması, bitkilerin çiçeklenme dönemlerinin farklı olması, farklı ekolojik koşullarda birçok arı ırk ve ekotipi ile yıl boyu nektar ve polen sağlayan oldukça zengin floral kaynaklar

bulunması ballarda farklılığı yaratmaktadır. Bölgesel olarak değerlendirildiğinde Türkiye'nin Karadeniz Bölgesi'nde kestane, ıhlamur, akasya, ormangülü balları üretilmektedir.

Türkiye'de her bölgenin kendine özgü iklim koşullarına sahip olması bitkilerin çiçeklenme dönemlerinin de farklı olmasına, zengin ve farklı flora kaynaklarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu farklı ve zengin floralarda birçok arı ırkı ve ekotipi yıl boyunca yetiştirilmektedir. Bu durum yıl boyunca elde edilen ballarda farklılığa neden olmaktadır.

Karadeniz bölgesi, Türkiye arıcılığında önemli bir yer teşkil etmektedir. Türkiye'deki arıcılık işletmelerinin %27'si, koloni varlığının ise %19'u Karadeniz Bölgesi tarafından temsil edilmektedir. Türkiye bal üretiminin %24'ü Karadeniz bölgesi arıcıları tarafından sağlanmaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) gıda standartlarına bal, bal arıları tarafından çiçeklerin nektarlarından veya bitkilerin yaşayan kısımlarından meydana gelen salgıların toplanarak, özel bazı maddeler ile karıştırıldıktan ve birtakım değişikliklere uğratıldıktan sonra petek gözlerine depolamak suretiyle ürettikleri tatlı bir madde olarak tanımlanmıştır. Benzer olarak Türk Gıda Kodeksi 2012/58 nolu Bal Tebliği'nde "bal; bitki nektarlarının, bitkilerin canlı kısımlarının salgılarının veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan biti emici böceklerin salgılarının bal arı tarafından toplandıktan sonra kendine özgü maddelerle birleştirilerek değişikliğe uğrattığı, su içeriğini düşürdüğü ve petekte depolayarak olgunlaştırdığı doğal ürünü ifade eder" şeklinde tanımlanmıştır.

Balın bileşimi oldukça değişkendir ve öncelikle çiçek kaynağına bağlıdır; bununla birlikte, mevsimsel ve çevresel faktörler ve işleme gibi bazı dış faktörler de rol oynamaktadır. Bal, fruktoz (%38) ve glikoz (%31) olan şekerler bulunan aşırı doygun bir çözeltidir. Fenolik bileşikler ile mineraller, proteinler, serbest amino asitler, enzimler ve vitaminler aktif küçük bileşenler olarak önemli katkıda bulunmaktadır (Alvarez-Suarez ve ark., 2010).

Balın kuru ağırlığının yaklaşık %95'i karbonhidrat kaynaklı olup mono-, di- ve oligosakkaritlerden oluşmaktadır. Genel olarak şekerlerin %70'ini monosakkarit

türleri, %10-15'ini disakkaritler ve geri kalanını oligosakkaritlerden oluşmaktadır (Gündüz, 2015).

Bal, besin değerinin yüksek olması ve insan sağlığına olan katkısı için tüketilen doğal tatlı bir üründür. Daha önceki birçok çalışmada, taze ağırlık esasına göre balın birçok meyve ve sebzelere benzer antioksidan kapasitesi olduğu gösterilmiştir. Balın antioksidan aktivitesi büyük ölçüde balın çiçek kaynağına göre değişir. Çeşitli çiçek kaynaklarından elde edilen ballarda antioksidan maddelerin profilleri hakkında bazı çalışmalar yapılmıştır. Bu profillerdeki varyasyon, oksidatif reaksiyonlara karşı korumak için balların yaygın olarak değişen yeteneklerinden sorumlu olabilir (Gheldof ve Engeseth, 2002).

Döllenme zorunluluğu duyan bitkilerin arıların ilgisini çekmek üzere çiçekte bulunan salgı organlarından salgıladıkları maddeye nektar denilmektedir (Doğaroğlu, 2017). Nektar; bazı bitkilerin yaprak, dal ve tomurcukları tarafından ve çiçekli bitkilerin nektar denilen salgı organlarından salgılanan ve içerisinde farklı miktarlarda mineral maddeler, amino asitler, şeker, esansiyel yağlar, enzimler ve organik asitler bulunan bitki özü veya şekerli sıvıdır (Güler, 2017). Bitkilerden salgılanan nektar genellikle renksiz, saydam ve ışığı kırıcı özelliktedir.

Doğada nektar kaynakları olarak önem kazanmış binlerce bitki türü bulunmaktadır. Nektar kaynaklarını gruplandırılarak örnek verecek olursak;

-Yem bitkileri; Yonca, korunga, fiğ ve üçgül vb.

-Kültür bitkileri; Ayçiçeği, pamuk, kanola, arı otu ve meyve ağaçları vb.

-Kır çiçekleri; kekik, adaçayı, keven ve çeşitli bahar çiçekleri vb.

-Basura kaynakları; çam kabuklu koşnili vb.

-Ağaç ve çalılar; akasya, kestane, ıhlamur, püren, alıç, iğde, söğüt, hayıt, karaçalı, koca -Yemiş ve ormangülü vb. bitkiler sayılabilir (Doğaroğlu, 2017).

Bu bitkilerden biri de Karadeniz bölgesinde yaygın olarak yetişen ve bölgede delibal olarak adlandırılan balların üretiminde baskın etkiye sahip olan ormangülü (*Rhododendron* spp.) türleri oluşturmaktadır. Bu bitkilerden elde edilen bal zehirlenmeye sebep olduğu için yörede komar ya da ağu balı olarak bilinmekte ve litaratürde deli bal olarak adlandırılmaktadır. Orman gülleri, bitkiler aleminin tohumlu bitkiler sınıfının fundagiller (*Ericaceae*) familyası, *Rhododendron* cinsine ait odunsu ve yaprağını döken çalı halindeki bitkilerdir. Türkiye’de bunların birkaç türü

özellikle Doğu Karadeniz Bölgesi başta olmak üzere Marmara Bölgesinde orman içi bitkisi olarak yetişmektedir. Karadeniz Bölgesi'nde daha çok mor orman gülü (*Rhododendron ponticum*), sarı orman gülü (*Rhododendron luteum*), beyaz (Kafkas) orman gülü (*Rhododendron caucasicum*) ve melezleri bulunmaktadır (Güler, 2017). Orman güllerinin bodur çeşitleri peyzaj çalışmalarında da kullanılmaktadır.

Orman gülünün orijini Karadeniz bölgesidir. Orman gülü bitkisinin nektarları bol miktarda olup bölge arıcılığında kullanılmakta ve yüksek fiyatlardan alıcı bulmaktadır. Ancak bu ballar içerisinde bulunan zararlı toksinlerden dolayı aşırı tüketiminde ölümlere sebep olabilmektedir.

Orman gülü balı, yüksek oranda grayanotoksin içeren Sapindaceae familyası ve Ericaceae familyasının *Rhododendron ponticum* ve *Rhododendron luteum* türlerinin nektarının bal arıları tarafından toplanması, dehidre edilip olgunlaşması sonucu oluşturulan doğal bir üründür (Çeter ve Güney, 2011).

Orman gülü balları, genelde amber renginde ve berrak görünümlü olup kendine has tadı kokusu olan ve kolay kristallenmeyen bir besindir. Kaynatılırsa ve uzun süre bekletilirse toksisitesi kaybolur. Bu nedenle zehirlenmeler taze balla ortaya çıkmaktadır (Çalangu, 1995). Yapılan bilimsel çalışmalarda orman gülü balının nem, kül, şeker, mineral madde yönünden diğer ballardan farklı olmadığı bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarda bu balın yüksek fenolik madde içeriğine sahip olduğu ve bundan dolayı yüksek antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir. Dolayısıyla orman gülü balı her ne kadar toksik etkiye sahip ajanlar barındırsa da öte yandan azımsanmayacak derecede biyoaktif özelliğe de sahiptir (Silici ve ark., 2010).

Orman gülleri çok yıllık bitkilerden olup Ericaceae familyasına aittir. Orman güllerinin bilinen 8 farklı alt cins ve bu cinsin yaklaşık 800 türü vardır. Türkiye'de ise sadece 5 farklı *Rhododendron* türü bulunmaktadır. Bu türler arasında toksik özellikleri bilinip zehir olarak kullanılmasına rağmen, çok yararlı bir bitkilerdir. Orman gülleri, mide-bağırsak rahatsızlıkları, cilt hastalıkları, enflamatuar durumlar, ağrı, soğuk algınlığı, astım, üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle geçmişten günümüze kadar tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Orman güllerinin toksisitesi grayanotoksinlerin yapraklarda, çiçeklerde ve nektarda bulunmasından

kaynaklanmaktadır (Çakır ve ark., 2005; Popescu ve Kopp, 2013; Silici ve ark., 2014). Toksik diterpenlerin yanı sıra, orman güllü türleri ayrıca flavonoidler, basit fenoller ve fenolik asitler, triterpenoidler, tanenler ve uçucu yağlar içerir. Tüm içeriği ve gizemli özellikleri sayesinde, toksik bal, bazı bitkisel ilaçlar tarafından bir çok ilacın bileşeni olarak ve özellikle Karadeniz Bölgesi'nde bazı hastalıkların tedavisinde alternatif bir ilaç olarak kullanılmaktadır (Çakır ve ark., 2005; Silici ve ark., 2010). Orman güllü balı, *Rhododendron* türünün çiçeklerinden nektar toplayan bal arıları tarafından üretilir. Birçok *Rhododendron* türünün nektarı, yaprakları, çiçekleri, ve poleni toksik diterpenoid içerir, bu nedenle RB “deli bal” veya “toksik bal” olarak bilinir. Özellikle, Türkiye'nin Doğu Karadeniz Bölgesi dağlarında ve ayrıca Japonya, Nepal, Brezilya ve Kuzey Amerika ve Avrupa'nın bazı bölgelerinde yetişen *Rhododendron ponticum* nektarı, M.Ö. 400 yıllarından beri RB üretmek için kullanılmaktadır. RB, arıcılar tarafından Türkiye'deki pek çok sağlık problemi üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı üretilmekte ve yüksek fiyata satılmaktadır (Silici ve ark., 2010; Silici ve ark., 2014).

Rhododendron ferrugineum L., *Rhododendron arboreum* Sm., *Rhododendron molle* (Blume) G. Don., *Rhododendron simsii* Planch ve *Rhododendron tomentosum* Harmaja gibi farklı *Rhododendron* türlerinin çeşitli bitki kısımlarının farmakolojik ve biyolojik aktiviteleri incelenmiştir (Popescu ve Kopp, 2013). Türkiye'den *Rhododendron luteum* bitkisinin genç yapraklarının ve *Rhododendron ponticum* L.'nin saplarının anti-enflamatuvar, asetilkolinesteraz inhibisyonu, anti-protozoal aktiviteleri, anti-bakteriyel ve asetilkolinesteraz inhibisyonu daha önce yapılan çalışmalara konu olmuştur. Bununla birlikte, *Rhododendron caucasicum* L. için böyle bir bulgu yoktur (Dragendorff, 1898; Rättsch, 1998; Taşdemir ve ark., 2005; Alan ve ark., 2010; Usta ve ark., 2012;). Öte yandan, ormangülü ballarda yapılan çalışmaların çoğunda, hangi ormangülü türlerinin kullanıldığı açıkça belirtilmemiştir (Silici ve ark., 2010; Silici ve ark., 2014). Sadece birkaç çalışmada, *R. ponticum*'dan gelen ballar araştırılmıştır (Kurtoglu ve ark., 2014). Ayrıca, *R. Ponticum* ve *R. Luteum*'dan üretilen deli bal kullanımı ile ilgili 1199 vaka değerlendirilerek deli bal zehirlenmesi bildirilmiştir (Silici ve Atayoğlu, 2015). Dahası, polen üzerine yapılan çalışmalar baldan daha azdır ve bu konuda literatür eksikliğinin olduğu görülmektedir. Yürütülen tez çalışmasında Doğu Karadeniz Bölgesinde yaygın olan

üç farklı orman gülü, *R. ponticum* L., *R. luteum* L. ve *R. caucasicum* L.'den elde edilen bal ve polen örnekleri nem, kül, sukroz, invert şeker, HMF içeriği ve diastaz aktivitesi, asitlik gibi fizikokimyasal özelliklerinin yanında antimikrobiyal, antioksidan ve biyoaktif özelliklerini belirlemek için yürütülmüştür.

1.1 Balın Nem İçeriği

Balın stabil kalabilmesi ve maya fermentasyonu sonucu bozulmaya direncini gösteren kalite kriteri balın su içeriğidir (Bogdanov, 2002). Balın su yüzdesinin düşük olması olgunluk derecesini gösterir ve buna göre de uzun süre bozulmadan saklanabilir (Erdoğan ve ark., 2004). Ballar normalde %16-21 arasında nem içermektedir ancak nem arttıkça hem balın kalitesi düşmekte, hem de balın fermente olma riski artmaktadır. Bu nedenle üretilen ballarda nem oranının düşük olması beklenmektedir. Bal aynı zamanda higroskopik özelliğinden dolayı dışarıdan da nem alabilmektedir. Balın nem içeriği hasat dönemine, kovanda ulaşılan olgunluk derecesine ve iklimsel faktörlere bağlı olarak farklılık göstermektedir (Finola ve ark., 2007). Yeteri kadar olgunlaşmamış balın hasat edilmesi çok nem içermesine, dolayısıyla erken kristalleşmesine ve fermentasyonuna neden olmaktadır (Tolon, 1999; Doğaroğlu, 2009). Genel olarak dağ balları ova ballarından daha az nem içermekte olup, fazla nem balın olgunlaşmadığını ya da dışarıdan su katıldığını göstermekte ve balın yüzey fermentasyonu tehlikesini doğurmaktadır (Yardibi, 2008). Bu faktörlerin yanında balların saklandığı kapların nem geçirgenliğinin ve depolandığı yerin neminin yüksek olması da balın higroskopik özelliğinden dolayı nem düzeyini artırmaktadır. Balda nemin yapı, şekerlenme ve kalite korunmasında önemli bir rolü vardır. Günümüzde dünyada balın nem içeriğine göre; nem oranı en fazla %17.8 olan ballar I. sınıf; %18.6 olanlar II. sınıf ballar; %20.0 olanlar ise III. sınıf ballar şeklinde sınıflandırılmaktadır (Caner, 2010).

1.2 pH

Doğal bal asidik yapıda olup, pH'sı 3.4-6.1 arasında değişmekle birlikte ortalama olarak 3.9 civarındadır (Korkmaz, 2010). Balın asitliği içerdiği malik asit oranı ile ölçülmektedir. Malik asit oranı %0.1-0.4 arasında değişmektedir. Malik asit oranı %0.4'ün üzerinde olan ballar sakıncalı ballar sınıfına girmektedir. Balın asidik yapıda olması, bünyesinde barındırdığı tiamin, riboflavin, askorbik asit, pridoksin

(vitamin B6), pantotenik asit ve nikotinik asit gibi önemli vitaminlerin deforme olmasını geciktirmektedir (Caner, 2010).

1.3 HMF (Hidroksimetilfurfural) Miktarı

HMF, pişirme ya da sterilizasyon esnasında gıdalara uygulanan ısı işlemleri sonucu, indirgenen şekerlerin aminoasitlerle oluşturduğu enzimatik olmayan esmerleşme (Maillard) reaksiyonu ya da heksozların asit katalizörlüğündeki dehidrasyonu sonucunda ortaya çıkar (Turkmen ve ark., 2006; Turhan, 2008; Caner, 2010). İçeriğindeki yüksek orandaki basit şekerlerin (glukoz ve fruktoz) varlığı ve birçok asit nedeniyle bal, HMF oluşumu için çok uygun koşullar sağlamaktadır (MEGEP, 2009; Khalil ve ark., 2010). Ballarda HMF miktarının az olması istenir ve HMF miktarının artmasına, hasat sonrası ısıtma işleminin uygulanması, depolama süresi, depolama sıcaklığı ve balın pH'sı neden olmaktadır. HMF'nin sitotoksik ve genotoksik etkileri olduğu bilinmektedir. HMF işlem sırasında ısıtmakla oluştuğu gibi uzun süre bekletilen ballarda da zamanla oluşabilmektedir. Balın uzun süre depolanması ve yüksek sıcaklıkta ısıtılması sonucu bu oran 30-40 mg/kg kadar yükselirken bazen bu sınırları da aşabilmektedir. Bu oranın 150 mg/kg dan büyük olması bala invert şeker katıldığına bir belirtisidir. Balda HMF oluşumu pH, sıcaklık, ısıtma süresi ve şeker konsantrasyonuna bağlı olduğundan balın kalitesini belirlemede kullanılan en önemli kriterlerdendir. HMF taze ballarda az miktarda bulunduğu bilinmektedir (Tosi ve ark., 2002; Fallico ve ark., 2004; Caner, 2010; Doğan, 2013). TKG Bal Tebliğinde, kaliteli bir baldaki HMF miktarının 40 mg/kg'dan fazla olmaması gerektiğini belirtilmektedir (Anonim, 2012).

1.4 Diastaz Sayısı

Dünya bal ticaretinde balda kalite kriteri olarak uzun bir zamandan beri kullanılan en önemli iki biyokimyasal kriterin balın HMF içeriği ve diastaz sayısı olduğu bildirilmektedir (Fallico ve ark., 2004).

Balın olgunlaştırılması esnasında bal arıları tarafından salgılanan diastaz enziminin varlığı, bir kimyasal tehlike değil, tam tersine istenen bir durumdur. Ancak bu enzimin aktivitesindeki düşüş, 5-HMF maddesinin miktarının artışında olduğu gibi, balın aşırı ya da yanlış ısıtılmasının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (Doğan, 2013). Aşırı ısı işlemi uygulanmış ya da uzun süre depolanmış ballar ile taze balların ayırt edilmesinde bu ısı-zaman uygulamasını sınır değer olarak nitelendirilmektedir.

Diastaz aktivitesi, ısı işlemi sonucu inaktive olmaktadır. Bal diastazını geri dönüşümsüz olarak inaktive eden ısı 90-100°C arasında olduğu bildirilmiştir (Tosi ve ark., 2008). Balda diastaz kaybı istenmeyen bir durumdur ancak balda çok yüksek düzeyde diastaz bulunması da arzu edilmez. Balda yüksek düzeyde diastaz bulunması, yüksek asit oluşumuna dolayısıyla fermentasyona neden olmaktadır. TKG kaliteli bir baldaki minimum diastaz sayısını en az 8 olarak belirlemiştir ancak turuncu balı gibi enzim içeriği düşük olan ballarda en az 3 olarak belirlenmiştir (Tolon, 1999; Caner, 2010). Sıcaklık ve depolama süresinin artmasıyla baldaki HMF içeriğinin artmakta ve diastaz sayısı azalmaktadır (Çınar ve Ekşi, 2012). Depolamanın HMF miktarını önemli derecede arttırdığı, diastaz aktivitesi üzerinde ise daha az etki göstermekle birlikte sayısında azalmaya sebep olmaktadır (Yılmaz, 1994). Diastaz sayısı yapılan analizlerde balda çok kolay saptanmakta ve balın ısı işlemine tabi tutulup tutulmadığının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Ancak diastaz sayısı balın içerdiği polenin protein miktarı ile diğer maddelere bağlı olarak da değişiklik gösterebilmektedir. Isıya maruz kalan ballarda diastaz sayısı hızla düşmekteyken, diastaz sayısı yüksek ballarda yüksek asit oluşumuna bağlı olarak daha hızlı fermentasyon gerçekleşmektedir (Tolon, 1999; Doğan, 2013).

1.5 Polen

Polen, çiçekli bitkilerde; çiçeklerin erkek organlarının (stamen) üst kısmında bulunan anterlerin içindeki polen kesecikleri içerisinde yer alan, çiçeklerin erkek organlarınca üretilip, dişi organın döllenmesini sağlayan bitkilerin erkek cinsiyet hücreleridir. Bunlar ya erkek çiçekler tarafından ya da hermafrodit çiçeklerde erkek organlar tarafından oluşturulur (Yayçep, 2001; Atayoğlu, 2012; Köseoğlu, 2012). Polenin %40'ına yakın esansiyel aminoasit içeren protein profili balın botanik orijinini belirlemede kullanılabilir (Hermosín ve ark., 2003). Polenin kimyasal yapısı farklılık göstermekle birlikte, %21 ham protein, %32 karbonhidrat, %5 yağ, %3 kül ve %11 su ve %28 diğer maddelerden oluşmaktadır (Yayçep, 2001; Korkmaz, 2010). Arıların beslenmesinde protein kaynağı olarak önem taşıyan polen bileşimindeki vitamin ve mineral maddeler ile arının ağız salgılarını içermesi nedeniyle değerli bir besin maddesidir (Köseoğlu, 2012). Saf ve sahte balı birbirinden ayırt etmede K/Na oranı, prolin ve toplam polen spektrumunun ayırt edici; asitlik, sakkaroz, invert şeker

içeriği gibi diğer parametrelerin ise bu ayırmda yardımcı kriterlerdir (Başoğlu ve ark., 1996).

Polenin kimyasal yapısı, rengi, tadı, kokusu ve şekli bitki türüne göre değişmektedir. Çoğunlukla sarı renkli olup siyah, mor, pembe renkli polenlere de rastlamak mümkündür. Ayrıca balın kaynağı, balda bulunan polenlerin analizi ile belirlenmektedir (Yayçep, 2001; Korkmaz, 2010).

1.6 Elektiriksel İletkenlik

Elektiriksel iletkenlik bir maddenin elektiriksel akışı yani elektronların akışını taşıma yeteneğidir. Elektiriksel iletkenlik bütün gıda maddelerine uygulanabilen kalite parametresidir. Ballarda elektiriksel iletkenliği esas olarak balın mineral madde içeriğine dayanmaktadır. Balı konu alan standartlara göre elektiriksel iletkenlik çiçek balında en fazla 0,8 mS/cm, salğı balı ve kestane balınsa ise en az 0,8 mS/cm olması gerektiği vurgulanmıştır (Gündüz, 2015). Saf ve katkılı balların ayırımında elektiriksel iletkenlik önemli bir özelliktir ancak yapılan analizler sonucunda balın kalitesinden ziyade balın bitkisel kaynağını belirlemede yararlanılacak bir metoddur (Güler, 2017).

1.7 Prolin

Prolin, nektarın bala dönüşmesi sırasında bala arı tarafından katılan aminoasittir ve balın protein içeriği genellikle prolin miktarı ile ilişkilidir. Baldaki aminoasitlerin büyük oranını prolin oluşturmaktadır ve bal çeşitleri arasında oldukça farklılık göstermektedir (Yıldız ve ark., 2016; Çiftçi, 2018). Baldaki prolin miktarı arıya bağlı olan diğer bileşenlerle birlikte balın olgunluk düzeyini, dolayısıyla da kalitesini yansıtmakta ve balda gerçeklik kriteri olarak görülmektedir. Balda, prolin dışında 26 amino asit daha saptanmıştır ve bunların oranı balın kaynağına göre değişmektedir (Yıldız ve ark., 2016).

Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne göre ballarda en az 300 mg/kg prolin bulunması gerekmektedir. Ancak bu değer akasya ve biberiye ballarında 120 mg/kg, kanola, ıhlamur, narenciye, lavanta, okalıptüs ballarında ise 180 mg/kg olarak belirtilmiştir (Anonim, 2012).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Balın antimikrobiyal özellikleri yüzyıllardır insanlar tarafından bilinmektedir (Ciulu ve ark., 2011). Bal, enfekte olmuş yaraları, enfeksiyonun nedeninin bakteri olduğu araştırılmadan 2000 yıl öncesine kadar tedavi etmek için kullanılmıştır (Bogdanov ve ark., 2008). Balın, aeroblar ve anaeroblar, gram pozitifler ve gram negatifler dahil olmak üzere yaklaşık 60 bakteri türünü inhibe edici bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Christy ve ark., 2011).

Türkiye'ye özgü bal içeren krem formülasyonlarının geliştirilmesi ve formülasyonlarının açık yaralar üzerine iyileştirici etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada sıçanlara hergün bir aparat yardımı ile yara açılmış ve yaralara hergün krem uygulaması yapılmıştır. Yaraların kabuklarından alınan örneklerinin sonucunda bal içerikleri farklı olan kremlerin önemli derecede farklılık göstererek yara iyileşmesinde olumlu yönde etkisi olduğunu tespit etmiştir (Sevin 2018).

Ertürk ve ark., (2009) Ormangülü bitkisinden üretilen deli balların ve *R. ponticum*, *R. caocasicum* (beyaz), *R. Luteum* (sarı), *R. Smirnovii* (pembe) ormangülü türlerinin çiçek ve yapraklarından elde edilen ekstraktların antibakteriyel ve antifungal özellikleri üzerinde çalışmalar yapmıştır. Yaptığı çalışmada deli balın ve ham özütlerin bakteriler üzerinde antibikrobiyal avtivitinin daha yüksek olduğunu belirtmiştir. Antimikrobiyal aktivitenin gram pozitif bakterilerin, gram negatif bakterilere göre daha belirgin şekilde etkilendiğini bildirmiştir.

Silici ve ark., (2010) Türkiye'nin Karadeniz Bölgesi'nden elde edilen elli *Rhododendron* balı numunelerinde potansiyel antioksidan aktivitelerini belirlemiştir. Antimikrobiyal aktifite için 11 bakteri ve 2 fungus kullanarak agar difüzyon yöntemini kullanmıştır. Balların fenolik içeriğini 0,24 ile 141,83 mg GAE / 100 g bal arasında bulmuştur. Antioksidan aktiviteleri 12,76-80,80 mg AAE / g bal olarak tespit etmiştir. Bal numunelerinin radikal süpürme aktivitelerin de %2,30 ile %90,73 arasında değiştiğini bildirmiştir. Bal numunelerinde *Pseudomonas aeruginosa* ve *Proteus mirabilis*'e karşı en yüksek antibakteriyel etkinliğini gösterdiğini bildirmiştir. Kullanılan ormangülü bal numunelerinin, insan sağlığını için iyi bir antioksidan ve antimikrobiyal madde kaynağı olduğunu ortaya koymuştur.

Silici ve ark., (2012) alışmasında Rhododendron ballarında fenolik madde içeriklerinden 0,11-191,54 mg / kg klorojenik asit ve 0-82,83 mg / kg miktarlarında kumarik asitler olduğunu tespit etmiştir. Numunelerde çoğunlukla galerik ve ferulik asitler olduğunu bulmuştur. Bal numuneleri içerisinde bulunan polen tanelerini mikroskop kullanarak orijin tayininde bulunmuştur. Ballar arasında en çok fenolik bileşiğe sahip Artvin'den toplanan Rhododendron ballarında olduğunu ve Artvin bölgesinden gelen bütün bal örneklerinin ortalaması olarak 71,31 mg / kg olduğunu bildirmiştir. Bal örneklerinde klorojenik ve kumarik asitlerin baskın fenolik maddeler olduğunu tespit etmiştir.

Akdeniz ve ark., (2012) Edirne ilinden bal üreticilerinden temin etmiş olduğu toplam 30 adet Karaçalı ve Ayçiçeği balının biyokimyasal özelliklerini karşılaştırmıştır. Biyokimyasal analiz sonucunda; Karaçalı balında ortalama, 6,3 mg/kg Hidroksimetilfurfural (HMF), %16,26 Nem, %62,18 İnvert Şeker, %1,35 Sakkaroz, %0,3214 Kül, 13,9 Diastaz, 14,7 meq kg⁻¹ Asitlik, 0,718 mS/cm⁻¹ Elektriksel iletkenlik ve 5,9 pH değerleri bulunmuştur. Ayçiçeği balında ise; 11,34 mg/kg Hidroksimetilfurfural (HMF), %17,60 Nem, %61,27 İnvert Şeker, %1,67 Sakkaroz, %0,3400 Kül, 8,30 Diastaz, 39,70 meq kg⁻¹ Asitlik, 0,429 mS/cm⁻¹ Elektriksel iletkenlik ve 4,3 pH değerleri tespit edilmiştir. Tespit edilen tüm analiz sonuçlarının TGK Bal Tebliği ve AB Gıda Kodeksi Standartlarına uygun olduğu tespit edilmiştir. Karaçalı balının kendine özgü özelliklerini ortaya koymuştur.

Kalın, (2013) yürütmüş olduğu tez çalışmasında Türkiye'nin farklı lokasyonlarından toplanan 9 farklı bal örneğinin bazı kimyasal, antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerini karşılaştırmıştır. Bal numuneleri arasında kestane ballarının, yüksek toplam fenolik içerik, FRAP değerleri ve düşük DPPH radikal süpürücü aktivite gösterdiğini bildirmiştir. Balların fenolik içeriklerini önemli derecede antioksidan aktivite ile ilişkilendirmiştir. Test ettiği bakteriler arasında, bal numunelerinin etanol ekstraktlarına en duyarlı bakteri *Yersinia enterocolitica* ve en dirençli bakteri *Clostridium perfringens* olduğunu bildirmiştir. En etkili biyoaktif madde %40.83 oranı ile Sivas yayla balı olduğunu tespit etmiştir. En yüksek antioksidan aktivitesi kestane balı örneklerinde olduğunu bildirmiştir. MİK değerleri bakımından en etkili üç balın; Sivas yayla balı, Ordu akasya balı ve Niğde yayla balı olduğunu ve monofloral balların yayla ballarından daha önemli antimikrobiyal kapasiteye sahip

olduğunu tespit etmiştir. Çalışmasında büyük inhibisyon zonları Rize kestane, Sivas yayla, Niğde yayla ve Isparta lavanta balı için doğrulanmıştır. Isparta lavanta balı *Yersinia enterocolitica*'ya karşı yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahipken Rize kestane, Sivas yayla ve Niğde yayla balı ise *Escherichia coli* 'ye karşı yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu tespit etmiştir.

Doğan, (2014) araştırmasında Giresun, Erzurum, Kars, Hakkâri, Bayburt illerinden topladığı 27 adet bal örneği kullanmış ve bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri ile toplam fenolik madde miktarı ve antimikrobiyal aktivitelerini araştırmıştır. Bal örneklerinin %16,10 nem, %83,91 toplam kuru madde, %82,25 suda çözünür kuru madde, 3,88 indirgen şeker, 33,25 meq/kg sakaroz, %67,95 toplam şeker, 3,88 pH değeri, %71,83 titrasyon asitliği ve 449,59 mg GAE/100g toplam fenolik madde miktarı ortalama sonuçlarını bildirmiştir. Bal örneklerinin antimikrobiyal aktivite değerlerine göre istatistiksel analizler sonucu balların *Bacillus cereus* ATCC3 3019, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* BC 1402 ve *Salmonella Typhimurium* RSSK 95091'e karşı çok önemli seviyede antibikrobiyal etkiye sahip olduğunu ancak mayalardan *Saccharomyces cerevisia* BC 6541, *Candida albicans* ATCC 1223'e karşı antimikrobiyel etkiye sahip olmadığını bildirmiştir.

Yıldız ve ark., (2016) Akdeniz Bölgesi'nden pamuk, İç Anadolu Bölgesi'nden yayla, Ege Bölgesi'nden çam ve Trakya yöresinden ayçiçeği ballı olmak üzere toplam 211 bal örneğinin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla çalışma yürütmüştür. Analiz sonuçları göre asitlik değeri bakımından en düşük sonuç 13,92 meq kg⁻¹ ile pamuk balı örneklerinin ortalamasında, diastaz sayısı bakımından en iyi sonuç 25,61 ile Ayçiçek balları ortalamasında, sakkaroz içeriği bakımındanda en düşük %0,44 ile çambalı örneklerinde olduğu göstermiştir. Balın fizikokimyasal özelliklerinde, hasat zamanı, depolama sıcaklığı, depolama süresi, topraktaki elementler ve iklimsel faktörlerin etkili olduğunu bildirmiştir.

Şahin ve ark., (2017) çalışmasında Karadeniz Bölgesi'nden temin ettiği ormangülü ballarındaki fenolik bileşenlerini araştırmıştır. Analiz sonuçlarında bal numunelerinde p-OH benzoik asit bileşenine 2,351-18,992 µg/g numune, gallik asit 0,032-0,233 µg/g numune, kaffeik asit 0,304-5,971 µg/g numune, p-kumarik asit 3,081-6,422 µg/g numune, ferulik asit 0,272-2,614 µg/g numune aralığında tespit

etmiştir. Bileşenler bakımından en zengin numune Artvin ilinden temin ettiği bal numunesinde olduğunu ve toplam fenolik bileşenler madde miktarını 32,720 µg/g numune olduğunu bildirmiştir

Bilir ve ark., (2018) Türkiye'nin Karadeniz bölgesinde yaygın bir şekilde bulunan Orman gülünün (*Rhododendron ponticum* L.) nektarından elde edilen delibal, toksik diterpen olan grayanotoksinleri içerdiğini bildirmiş. Orman gülü ekstraktının prostat karsinom hücre hatları üzerine in vitro sitotoksik etkilerini araştırmıştır. Ormangülü balının prostat karsinom hücreleri üzerinde sitotoksik etkilere sahip olduğu, antikanserojenik aktivite için potansiyel bir terapötik madde olabileceği konusunda öneri vermiştir.

3. MATERİYAL ve METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Bal Örneklerinin Temini ve Lokasyonların Tespiti

Bu çalışma üç farklı orman gülü bitkisinin yoğun olduğu lokasyonlarda yürütülmüştür. Bu amaçla mor orman gülü (*Rhododendron ponticum* L.) için Ordu ili Kent ormanı (Yoroz mevkii), sarı orman gülü (*Rhododendron luteum* L.) için Ordu ili Aybastı yaylası ve beyaz orman gülü (*Rhododendron caucasicum* L.) için de Rize'nin İkizdere ilçesine bağlı Anzer yaylası seçilmiştir. Bu lokasyonların seçiminde orman gülü bitkisinin rakıma bağlı olarak yetişmesi etkili bir parametre olarak değerlendirilmiştir. Bunun için her bir orman gülü bitkisinin bulunduğu lokasyona bölge arı ekotipinde üç arı kovanı yerleştirilmiştir. Bu arıların nektar döneminde yeterli balı alabilmeleri için kovan kapasitesi 15 arılı çerçeve olacak şekilde düzenlenmiştir. Kovanlara sadece orman gülü bitkisinin nektarını alabilmeleri için boş kabartılmış çerçeveler yerleştirilmiştir. İklim şartlarına ve nektar akış miktarına bağlı olarak 5 gün bu çerçeveler kovanlarda bekletilmiştir. Ayrıca bu kovanların içerisine polen tuzağı yerleştirilerek balın hasatıyla birlikte tuzaklardaki polenlerde toplanmıştır.

3.1.2 Örneklerin Saklanması

Elde edilen örneklerin etiket bilgileri; numune kodu, toplandığı lokasyon ve orman gülü bitkisinin türü balın depolandığı cam kavanozların üzerine etiketlenmiştir. Örnekler analiz öncesinde +4 °C'de ve karanlıkta muhafaza altına alınmıştır. Analizler için gerekli olan miktarlar muhafaza ortamından gerektiği kadar alınarak tekrar mevcut saklama koşullarına tabi tutulmuştur.

3.1.3 Besiyerleri

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde kullanılan disk difüzyon ve agar dilüsyon yönteminde; bakteriler için Muller Hinton Agar, funguslar (mantarlar) için Saboraud Dextrose Agar besiyerleri kullanılmıştır. Mikroorganizmaların üremesini sağlamak için Muller Hinton Broth ve Saboraud Dextrose Broth besiyerleri kullanılmıştır. Minimum inhibisyon konsantrasyonu çalışmasında yukarıda belirtilen agar besiyerleriyle birlikte, Tris Buffer 1/4 oranında kullanılmıştır.

3.1.4 Bakteriyel ve Fungal Türler ile Büyüme Koşulları

Yürütülen tez çalışmasında kullanılan bakteri ve mantar suşları American Type Culture Collection (ATTC)' den temin edilmiştir. Numunelerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan bakteriler; *Enterococcus faecalis* ATCC® 29121 Gram (+), *Bacillus cereus* ATCC® 11778 Gram (+), *Escherichia coli* ATCC®25922 Gram (-), *Klebsiella pneumoniae* ATCC®13883 Gram (-), *Listeria monocytogenes* ATCC®7677 Gram (+), *Staphylococcus aureus* ATCC ® 6538 Gram (+), *Citrobacter freundii* ATCC® 43864 Gram (-) olup Gram özellikleri ile birlikte belirtilmiştir. Antifungal aktivitenin belirlenmesinde kullanılan mantar kültürleri ise *Candida albicans* ATCC®10231 ve *Saccharomyces cerevis* ATC® 9763'dir.

3.1.5 Çözgenler

Antimikrobiyal aktivite belirlemede kullanılan çözgenler etanol ve asetondur. Antioksidan aktivite ise etanol ekstraktlarıyla belirlenmiştir.

3.2 Metot

3.2.1 Bal ve Polen Örnekleri Ekstraktlarının Hazırlanması

Ham polen ve bal örnekleri hassas terazide 50 gr tartılarak steril tüplere konulmuştur ve üzerine etanol ilave edilmiştir. Örnekler çözündükten sonra bir dijital orbital çalkalayıcıda 24 °C sıcaklıkta, 18/6 aydınlık / karanlık periyotta ve 180 rpm'de çalkalanmıştır. Süspansiyon süzülerek çıkarılmıştır, daha sonra 15 dakika boyunca 10,000 g'da santrifüj edilmiştir. Etanolik çözelti, döner bir buharlaştırıcı içinde, 40° C'de indirgenmiş basınç altında konsantre edilmiştir; macun formunda ham özü elde edilmiş ve kullanılabilecek kadar kuru ve karanlık bir yerde 4 °C'de saklanmıştır (Chang ve ark., 2002).

Analiz için hazır hale gelen örnekler şu şekilde kodlanmıştır: *R. ponticum* L. balı (RPB), *R. luteum* L. balı (RLB), *R. caucasicum* L. balı (RCB), *R. ponticum* L. polen (RPP), *R. luteum* L. polen (RLP) ve *R. caucasicum* L. polen (RCP).

3.2.2 Polen Örnekleri ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

SEM değerlendirmesinde, elektron mikroskobu çekim taslakları için her türün uygun şekilde kurutulmuş polenleri, üzerine yapıştırılmış çift taraflı karbon bant ile sabitlenmiştir. Sabit örnekler 15 nm altın-paladyum (SEM kaplama sistemi, sıçrama)

ile kaplanmıştır. İnceleme ve (SEM) çekiminde Hitachi SU1510 Taramalı Elektron Mikroskobu 5-15 kV voltajında yapılmıştır (Ertürk, 2017).

3.2.3 Nem Analizi

Homojenize edilen orman gülü balları refraktometrenin prizma yüzeyleri arasına konularak 20 °C’de balın kırılma indisi belirlenmiştir. Balın 20 °C sıcaklıktaki kırılma indisi ile rutubet oranları arasındaki ilişkiye göre sonuç yüzde (%) olarak hesaplanmıştır (TS 3036, 2002).

3.2.4 Elektriksel İletkenlik

TS 13365’de belirtilen işlem ile tayin edilen 20 g kuru bala eş değer olan bal kütlesi damıtık suda çözdürülmüş, çözelti 100 mL’lik ölçülü balona aktarılıp saf su ile derecesine tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltinin 40 ml’si bir erlene aktarılmış ve su banyosunda referans sıcaklık olan 20 °C’ye ayarlanmıştır. Geri kalan analiz numunesi bal çözeltisi iletkenliğinin ölçülmesinde kullanılan iletkenlik hücresinin yıkanması için kullanılmıştır. Elektrot iletkenlik ölçerine bağlanarak çözelti içine daldırılmış ve sıcaklığı kararlı hale gelinceye kadar bekletilmiştir. Daha sonra çözeltinin iletkenliği (mS) cinsinden okunarak, 20 g kuru bal ihtiva eden bal çözeltisinin öz iletkenliği, $B \gamma$ (mS/cm) aşağıdaki bağıntı ile hesaplanmıştır (Acquarone ve ark., 2007; TS 13366).

$$B \gamma = K.G$$

K: Hücre sabiti, (cm⁻¹)

G: Numune çözeltisinin elektrik iletkenliği, mS

3.2.5 Suda Çözünmeyen Katı Madde Tayini

Bal numunelerinden 20 g tartılarak 250 ml’lik kuru bir behere konulmuş ve üzerine 50 ml 80 °C’ye kadar ısıtılmış su eklenerek homojenize edilene kadar karıştırılmıştır. Cam kroze, 135 °C’ye ayarlanmış kurutma dolabında sabit tartıma getirildikten sonra bir desikatörde soğutulmuştur. Hazırlanan bal çözeltisi 80 °C de iken cam krozeden süzülüş, kroze kalan katı kısım yine 80 °C’ye kadar ısıtılmış su ile 5–6 defa yıkanmıştır. Yıkılarak şekerlerden arındırılmış katı maddelerin bulunduğu kroze dolabında en az 1 saat tutulmuş ve soğutulduktan sonra yine analitik bir terazi ile

tartılmıştır. Krozenin bilinen darası çıkarılarak suda çözünmeyen katı madde kütlesi hesaplanmıştır (TS 3036, 2002).

3.2.6 HMF (Hidroksimetilfurfural) Analizi

Bal numunelerinden 10 g numune tartıldıktan sonra üzerine 25 ml su ilave edilmiştir. Elde edilen çözeltinin üzerine 1'er ml Carrez-1 ve 2 konularak balon jojede hacim 50 ml'ye tamamlanmıştır. Numune karıştırılarak 10 ml'si filtreden lavaboya, kalanı da bir behere süzölmüştür. Süzöntüden 2 deney tüpünün (A ve B) her birine 2 ml bal çözeltisi pipet ile aktarılmıştır. 5 mL p-toluidin çözeltisi ilave edilerek çalkalanmıştır. 1-2 dakika bekletildikten sonra A tüpünün içeriğine 1 ml su ilave edilip çalkalanmıştır. Bu çözelti ile spektrometrede sıfırlama (blank) yapılmıştır. B tüpünün içeriğine de 1 ml barbitürik asit çözeltisi ilave edilip çalkalanıp, küvete konarak, 3-4 dakika içerisinde kör numuneye karşı 550 nm'deki absorbansı ölçölmüştür. Ölçölen absorbans en yüksek değere ulaşınca kadar okuma yapılmış ve okunan en yüksek absorbans değeri alınmıştır. (Aydın ve Özel, 2014).

3.2.7 Prolin Analizi

Balon jojeye konulan 5 g bal 100 ml saf suda çözülmüştür. Reaksiyon tüplerine sırasıyla 0,5 ml bal çözeltisi, 0,5 ml distile su (kör numune), 0,5 ml prolin standart çözeltisi konulmuş ve her tüpe 1'er ml'lik formik asit ve ninhidrin çözeltisi ilave edilip, 15 dakika karıştırılmıştır. 70 °C'lik su banyosunda 15 dakika bekletildikten sonra her tüpe 5 ml 2 propanol-su çözeltisinden ilave edilmiştir. Örnekler 45 dakika sonra 510 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır. Baldaki prolin mg/kg olarak aşağıdaki formöle göre hesaplanmıştır (TS 13357, 2008).

$$\text{Prolin (mg/kg)} = \text{Es/Ea} \times \text{E1/E2} \times 80$$

Es=Örnek çözeltisinin absorbansı

Ea= Prolin standart çözeltisinin absorbansı (iki okumanın ortalaması)

E1= Standart çözeltideki mg olarak prolin miktarı (40mg)

E2= Bal çözeltisi (g)

80= Seyreltme faktörü

3.2.8 Serbest Asitlik

Bal numunesi homojenize edildikten sonra, 10 g tartılarak 250 ml'lik erlene konulup üzerine 75 ml su eklenerek iyice karıştırılmıştır. Elektrotlar çözelti içerisine

daldırıldıktan sonra süspansiyon karıştırılırken, NaOH çözeltisi (0,1N'lik NaOH) ile pH değeri 8,3'e erişinceye kadar titre edilmiştir. Kullanılan sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi miktarı not edilmiştir. Serbest asitlik NaOH cinsinden mmol/kg olarak hesaplanmıştır (TS 13360, 2008).

3.2.9 Fruktoz ve Glukoz Analizi

Bal numunesinden 5 g cam beherde tartılıp 40 ml damıtık suda ısıtılmadan çözülmüştür. Çözelti, içine daha önceden 25 ml MeOH konulmuş olan 100 mL'lik ölçülü balona pipetle aktarılarak ölçülü balon işaret çizgisine kadar su ile doldurulmuş ve membran filtreden süzülerek deney tüpüne aktarılmıştır. Elde edilen örneklerin HPLC cihazında analizleri gerçekleştirilmiştir (TS 13359, 2008).

3.2.10 Diastaz Sayısı

Homojenize edilmiş analiz numunelerinden 10 g bal tartılarak, 15 ml saf su ile seyreltilmiştir. Üzerine 5 ml asetat tampon çözeltisi eklenip, ısı uygulamadan tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Çözünen bal numunesi, içersinde 3 ml sodyum klorür çözeltisi bulunan 50 ml'lik balona aktarılarak balonun çizgisine kadar saf su ile doldurulmuştur. 50 ml'lik 2 erlenden birine bal solüsyonu, diğerine de nişasta solüsyonu konarak, 40 °C'lik su banyosuna bırakılmıştır. 15 dakika sonra nişasta solüsyonundan 5 ml alınarak bal solüsyonunun üzerine eklendikten sonra periyodik aralıklarla bu karışımdan 0.5 ml alınarak 5 ml seyreltilmiş, iyot çözeltisinin içerisine eklenmiştir. Üzerlerine önceden standart dilusyon miktarı belirlenmiş saf su eklenerek karıştırılmış ve hemen ardından spektrofotometrede 660 nm'deki absorbansı okunarak kaydedilmiştir. İlk absorbans okumasının 5. dakikasında olmasına dikkat edilerek okunan absorbans değerine göre zaman aralıkları belirlenmiştir. Son olarak, 0.235 absorbansa denk gelen reaksiyon süresi, 300 rakamına bölünerek diastaz sayısı tespit edilmiştir (TS 13364, 2008, IHC Methods, 2009).

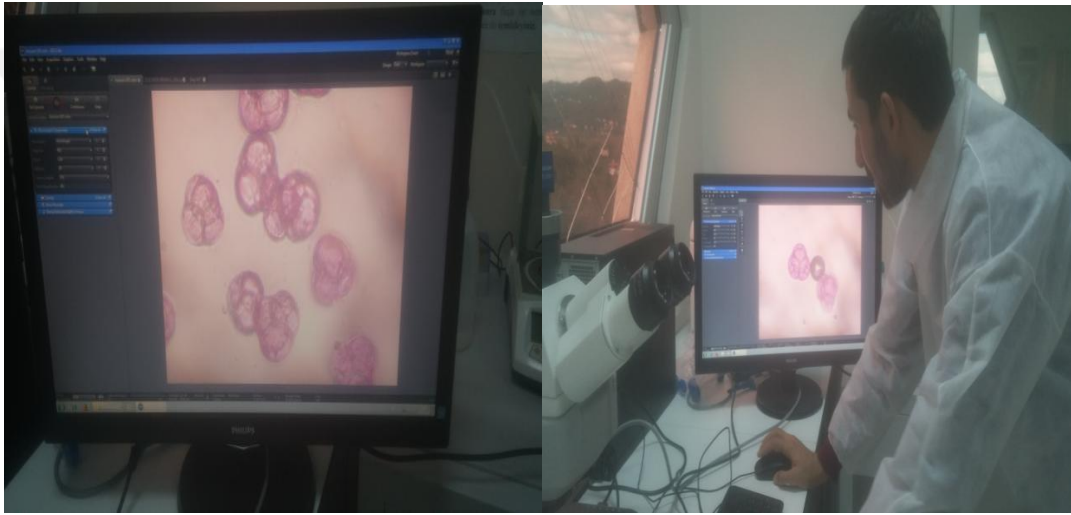
3.2.11 C4 Şeker Analizi

Bu analiz, dışarıdan C4 şekeri katılarak üretilen veya C4 şekeri ile beslenen arılardan elde edilen balların tespit edilmesinde kullanılmaktadır. Ham bal ve bu balardan elde edilen protein çökteltisi, tam olarak yakıldıktan sonra ortaya çıkan CO₂ gazının

bünyesindeki C atomunun C13/C12 oranının kütle spektrometresi ile tespit edilmesi ve bu değerlerden % C4 şeker oranının hesaplanması esasına dayanmaktadır.

3.2.12 Polen Analizi

On gram bal örneği, 20 ml damıtılmış su içinde eritilmiş ve karışım 15 ml'lik iki santrifüj tüpüne bölündükten sonra 4000 rpm hızında yaklaşık 10 dakika santrifüjlenmiştir. Çökeltiye yaklaşık 5 ml gliserin-su 1:1 oranında ilave edilmiş ve 30 dakika dinlendirilmiştir. Bu süreden sonra, örnekler santrifüj edilmiştir. Tortu çıkarıldıktan sonra gliserin jeli içerisine yerleştirilmiş ve parafin balmumu ile kaplanarak mikroskopik bir slayta bırakılmıştır (Louveaux ve ark., 1978).



Şekil 3.1 Polen Örneklerinin Mikroskopik Yöntemle Analiz Edilmesi

3.2.12 Antibakteriyel ve Antifungal Analiz

Antibakteriyel ve antifungal aktiviteler agar plaklarında disk difüzyon türlerine göre ölçülmüştür (Ertürk, 2006). Antibakteriyel ve antifungal aktiviteyi test etmek için deli balların ve polen örneklerinin fraksiyonları test edilmiştir. Tüm bakteri türleri ve mantar suşları optimum koşullarda büyütülmüştür. Bakteriyel süspansiyon ve mantar süspansiyon standartı hazırlanmıştır. Daha sonra, baldan ve polenden alınan örnekler (40 mg / ml) kurulum için steril kağıt disklere (6 mm çapında) yerleştirilmiştir. İnhibisyon bölgeleri, 27 °C'de 48 saatte inkübasyondan sonra belirlenmiştir. Antibakteriyel ve antifungal madde hedefinin kestirimi için dijital kumpas içeriği ile farklı organizmaların farklı bölgelerdeki inhibisyon bölgeleri ölçülmüş ve tablo haline getirilmiştir. Tüm testler üç tekerrürlü olarak yapılmıştır.

3.2.13 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

Mikroorganizmaların büyümesini tamamen engelleyen en düşük bal ve polen ekstraksiyon konsantrasyonunu temsil eden minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri, bir mikro kuyucuk seyreltme metodu ile belirlenmiştir (Wade ve ark., 2001; Sokmen, 2004; Ertürk, 2006). Bütün bal, polen ekstraktları %100 etanol, su içinde çözülmüş ve daha sonra 96 oyuklu bir plakada (Corning) seyreltme serileri hazırlanmıştır. Tris tamponu (Amresco 0826-500G) karışımı (1:4) ve 30 °C'de eşit miktarda et suyu çözeltisi (Sabouraud Dextrose Agar Oxoid) ve mantarlar için Mueller Hinton et suyu (Merck) ile karıştırılmıştır. Bal ve polen ekstresi örneklerinin her biri 1500, 750, 375 ve 187.5 µg/ml konsantrasyonlarında test edilmiştir. Aşılama, test organizmasının bir gecelik broth kültüründen elde edilmiştir. Her bakterinin aşı maddesi hazırlanmış ve süspansiyonlar bakteriler ve mantarlar için 107CFU/ml ayarlanmıştır. Ortam 24 saat 37 °C' de inkübe edilmiştir. Bakterilerde pozitif kontrol olarak Amoksisilin ve Cefazolin 1500, 750, 375, 187.5, 23.375 ve 11.687 andg / ml ve mantarlar için ve negatif kontrol olarak %70 etanol kullanılmıştır. Bundan sonra, her kuyucuğa taze hazırlanmış su içinde 0.5 mg / ml nihai konsantrasyonda 30 ul 3- (4,5-dimetil-tiyazol-2-il) -2,5-difenil-tetrazolyum bromür (MTT) ilave edilmiştir. Daha sonrasında 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Kırmızı renge geçiş, bakterilerin biyolojik olarak aktif olduğunu göstermiştir. MİK, MTT'nin renginde bir değişiklik gözlenmeyen kuyuya alınmıştır. MİK değerleri üç tekerrür halinde yapılmıştır.

3.2.14 Bal ve Polen Örneklerinin Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi

Ekstraktların fenolik içeriği Folin-Ciocalteu metoduna göre belirlenmiştir (Singleton ve Rossi, 1965). Bu yöntem, ekstrakt içerisindeki fenolik maddelerin Folin-Ciocalteu reaktifinin içerdiği fosfomolibdik-fosfotungistik çözeltisini indirgeyerek mavi bir kompleks oluşturmaları ve bu mavi rengin spektrofotometrik olarak ölçülmesi ilkesine dayanmaktadır (Abdulkasım ve ark., 2007). Numunelerin toplam fenolik madde içerikleri GA kullanılarak hazırlanan standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılmış GA eşdeğeri olarak (mg GAE/g kuru ekstrakt) belirlenmiştir. Bu amaçla öncelikle 0.25 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanmış olan gallik asit standart çözeltisinden farklı miktarlarda alınarak, değişen konsantrasyonlarda olacak şekilde gerçekleştirilen işlem sonucunda konsantrasyon-absorbans grafiği çizilmiştir.

Kalibrasyon eğrisi oluşturulması amacıyla GA'nın değişen hacimleri test tüpleri içerisinde Çizelge 3.1'de belirtildiği şekilde 750 µL Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR)(1:10) ve 600 µL %2' lik sodyum karbonat çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra son hacmi eşitleyecek kadar su ilave edildikten sonra tüm tüp içerikleri 1 saat oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiştir ve her bir tüpün absorbansı 760 nm de suya karşı ölçülmüştür.

Aynı işlem ekstraktlar içinde gerçekleştirilmiş ve kalibrasyon eğrisinin grafik denkleminde yararlanarak ekstraktların fenolik içeriği mg GAE/g kuru ekstrakt şeklinde hesaplanmıştır.

Çizelge 3.1 Toplam Fenolik Madde Tayini İçin Yapılan Pipetlemeler (µL)

	Kör	Numune Körü	Standart	Numune
Ekstrakt	-	10	-	10
GA Çözeltisi	-	-	0-100	-
FCR	750	-	750	750
Na ₂ CO ₃	600	-	600	600
Su	150	1450	150-50	140

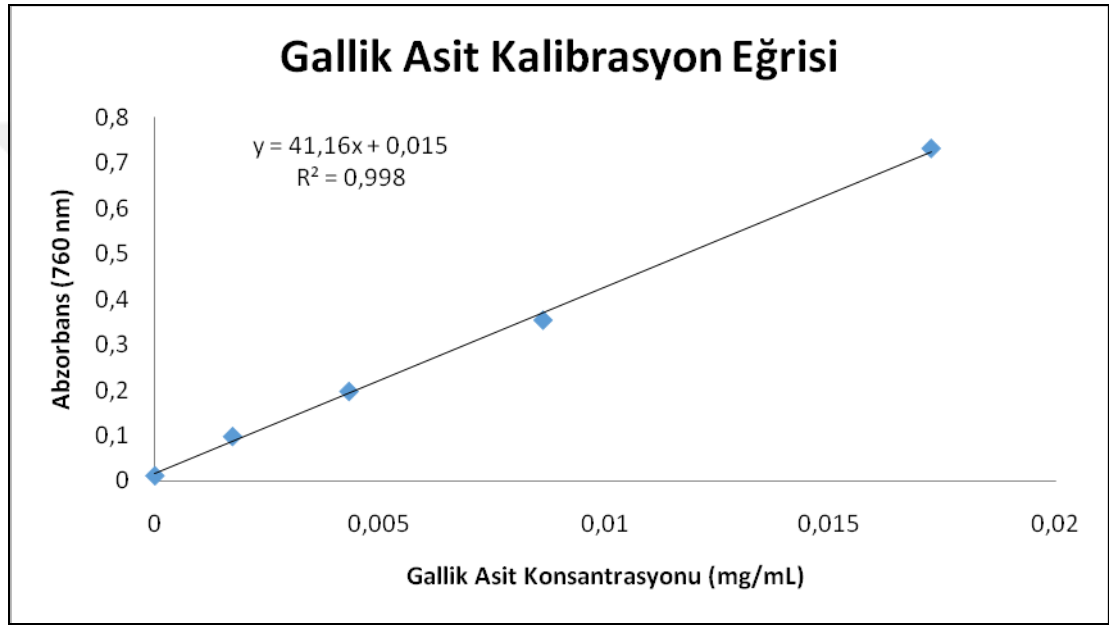
3.2.15 Fenolik Bileşiklerin HPLC ile Analizi

Fenolik bileşiklerin on dokuz standardı (Galik asit, protokatekuik asit, p-OH benzoik asit kateşin, kafeik asit, şırınga asidi, epicatechin, ferulik asit, p-cumarik asit, rutin, mersetin, resveratrol, daidzein, t-sinamik asit, hesperetin, cyrisin, pinocembrin, cape) HPLC (Elite LaChrom Hitachi, Japonya) kullanılarak analiz edilmiştir. Numune bir ters faz C18 kolonu (150 mm x 4.6 mm, 5 µm; Fortis) ile HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Hareketli faz, A karıştırıcısı (su içinde %2) ve B çözeltisi (70:30, asetonitril/su) karışımıydı; karıştırmadan önce sonikleştirildi ve yerleşik HPLC sistemi ile sürekli olarak gazdan arındırılmıştır. Enjeksiyon hacmi 20 µL ve kolon sıcaklığı 30 °C'de tutularak fenolik profil Can ve ark., (2015) yapmış olduğu yöntemle göre belirlenmiştir.

3.2.16 Örneklerin Toplam Fenolik İçerikleri

Bu tez çalışması kapsamında incelediğimiz bal ve polen numunelerinin alkol ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu metoduna göre spektrofotometrik olarak gallik asit eşdeğeri olarak belirlenmiştir. Farklı

konsantrasyonlarda GA kullanılarak gerçekleştirilen testin sonucunda 760 nm'deki absorbans değerleri y-ekseninde ve gallik asit konsantrasyon değerleri ise x-ekseninde olacak şekilde bir standart çalışma grafiği oluşturulmuştur (Şekil 3.2). Elde edilen standart çalışma grafiğinde absorbans konsantrasyonla doğru orantılı olup, elde edilen doğru denkleminde ($y = 41.166x + 0.0159$) yararlanılarak her bir numune için toplam fenolik madde miktarları mg GAE/g numune olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.2 Ekstraktların Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi İçin GA Kullanılarak Hazırlanan Standart Çalışma Grafiği

3.2.17 Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

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

%2'lik Na_2CO_3 Çözeltisi: 2 g sodyum karbonat alınarak saf su ile çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

0.25 mg/mL Gallik asit (GA) Çözeltisi: Standart olarak kullanılan GA çözeltisi 25 mg GA'ın önce bir miktar saf suda çözülerek sonra 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlanmıştır.

3.2.18 Örneklerin Hidroksil Radikal Kaynaklı DNA Hasarı Üzerindeki Etkisi

Ekstraktların hidroksil radikal kaynaklı DNA hasarı üzerindeki faydalı etkisini araştırmak için, plazmid DNA olarak pUC18 (Thermo Scientific) kullanılmıştır. İlk olarak ekstraktlar tetrahidrofuran (konsantrasyon aralığı 6.25 ila 50 mg / ml) içinde çözülmüştür. 0.25 ug / ul plazmid DNA, 1 ul %3 H₂O₂, Tris-EDTA (TE) tamponu içerisinde 0.1 g / ml ekstrakt içeren bir reaksiyon karışımı (20 ul nihai hacim) hazırlanmıştır. H₂O₂ ve %0.1 tetrahidrofuran ile muamele edilmiş plazmid DNA kontrol grupları olarak kullanılmıştır. İkincisi, her polen ekstresi için hazırlanan karışım, 24 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Karışıma 2 ul yükleme boyası (bromofenol mavisi ve süktroz %10 toplam hacim) eklenmiş ve %1 agaroz jeline yüklenmiştir. Elektroforez işlemi, TBE tamponunda (Trisma bazı, borik asit, EDTA) çalışan tamponda (pH 8) 80 °C'de 90 dakika gerçekleştirilmiştir. Jel UV ışığı altında görüntülenmiştir (Akbaş ve ark., 2013; Gül ve ark., 2017).

3.2.19 DPPH Serbest Radikal Temizleme Faaliyetlerinin Belirlenmesi

Ekstraktların DPPH serbest radikal temizleme aktiviteleri, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan konsantrasyonda DPPH solüsyonuna ekstre edildikten sonra 517 nm'de mor renkli metanol solüsyonunun 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) 'nin ağartılması izlenerek test edilmiştir Her konsantrasyon için elde edilen temizleme aktivitesi değeri, aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Aktivite (\%)} = (\text{A blank} - \text{Örnek}) / \text{A blank} \times 100$$

SC50 değerleri (%50 inhibisyon sağlayan ekstre konsantrasyonları), konsantrasyona karşı aktivite grafiği kullanılarak da hesaplanmıştır (Sanchez-Moreno ve ark., 1998).

3.2.20 DPPH Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

1,1'-difenil-2-pikrilhidrazil (C₁₈H₁₂N₅O₆, DPPH) çözeltisi 517 nm deki absorbansı 1.200'nin altında olacak şekilde yeterli miktardaki DPPH katısının kullanımdan hemen önce metanol içinde çözülmesi ile taze olarak hazırlanmıştır.

3.2.21 Ferrik İndirgeyici / Antioksidan Gücün Belirlenmesi (FRAP)

FRAP tahlili, mavi Fe (II) -TPTZ kompleksi oluşturmak için antioksidanların varlığında Fe (III) -TPTZ kompleksinin azaltılması ve 595 nm'de maksimum absorbansın ölçülmesi prensibine dayanarak yapılmıştır (Oyaizu, 1986). Bal ve polen

örnekleri için FRAP değerleri, Trolox eşdeğeri (mM Trolox / g bal) olarak ifade edilmiştir.

3.2.22 FRAP Metodu ile Antioksidan Aktivite Analizinde Kullanılan Çözeltiler

0.3 M Asetat Tamponu (pH: 3.6): 4 g sodyum asetat tri hidrat ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$) bir miktar destile suda çözülüp, pH metre kullanılarak asetik asit ile pH'sı 3.6'ya ayarlanmıştır ve toplam hacim destile suyla 100 mL'ye tamamlanmıştır.

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

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

20 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ çözeltisi: 0.54 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ alınarak son hacim 100 mL olacak şekilde suda çözülerek hazırlanmıştır.

FRAP Reaktifinin Hazırlanması: Daha önce hazırlanmış olan 2.5 mL $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 2.5 mL TPTZ ve 25 mL 0.3 M asetat tamponu (pH=3.6) karıştırılarak taze olarak hazırlanmıştır.

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

3.2.23 Asetilkolinesteraz (AChE) ve Butirikolinesteraz (BuChE) İnhibisyon Potansiyellerinin Belirlenmesi

AChE ve BuChE inhibe edici aktiviteler, Ellman ve ark., (1961) tarafından geliştirilen spektrofotometrik yöntem izlenerek ölçülmüştür. AChE ve BuChE enzimler, asetiltiyokolin iyodür ve bütiriltiyokolin klorür substrat olarak kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı, 0.2 M 5, 5'-Dithio-bis (2-nitrobenzoik) asit (DTNB), 0.2 M AChE / BuChE çözeltisi içerecek şekilde hazırlanmış ve 25 ° C'de 15 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Reaksiyon daha sonra 0.2 M asetiltiyokolin iyodür / bütiriltiyokolin klorür ilave edilerek başlatılmıştır. Substratların hidrolizi, DTNB'nin 412 nm'de (AbsSample) enzimler tarafından katalize edilen tiyoklinlerle

reaksiyonu sonucu elde edilen sarı 5-tiyo-2-nitrobenzoat anyonunun oluşmasıyla izlenmiştir.

AChE / BuChE'nin inhibisyon yüzdesi, aşağıdaki denklem kullanılarak, numuneye göre kör örneğin (fosfat tamponu pH 8 içinde ekstraksiyon çözücüsü olarak metanol) reaksiyon hızlarının karşılaştırılmasıyla belirlemiştir.

$$\text{İnhibisyon yüzdesi (\%)} = (\text{Abs kör}-\text{Abs örnek}) / \text{Abs kör} \times 100$$

Alkaloid tipi antikolinesteraz olan Galanthamine referans olarak kullanılmıştır (Senol ve ark., 2010).

3.2.24 Kolinesteraz İnhibitör Potansiyellerinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

Asetilkolin İyodür Çözeltisi: 0.2 M asetilkolin iyodür çözeltisi 54.622 g asetilkolin iyodür ($\text{C}_7\text{H}_{16}\text{INO}_2$) tartılarak son hacim 1 L olacak şekilde saf su ile çözülmesiyle hazırlanmıştır.

Bütiril Tiyokolin Klorit Çözeltisi: 0.2 M bütiril tiyokolin klorit çözeltisi 45.156 g bütiril tiyokolin klorit ($(\text{CH}_3)_3\text{N}(\text{Cl}) \text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) tartılarak son hacim 1 L olacak şekilde saf su ile çözülmesiyle hazırlanmıştır.

DTNB (5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) çözeltisi: 79.27 g DTNB (Ellman reaktifi) tartılarak son hacim 1 L olacak şekilde saf su ile çözülmesiyle hazırlanmıştır.

Galantamin Çözeltisi: 5 mg/mL galantamin hidrobromid çözeltisi 5 mg galantamin tartılarak son hacim 1 mL olacak şekilde saf su ile çözülmesiyle hazırlanmış.

Fosfat Tampon Çözeltisi: 0.1 mM pH 8 fosfat tampon çözeltisi hazırlamak için 15.315 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 2.177 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılarak bir miktar saf su ile çözülmüştür. pH ayarlaması ise seyreltik sodyum hidroksit (NaOH) kullanılarak yapıldıktan sonra son hacim 1 L'ye saf su ile tamamlanmıştır.

Fosfat Tampon Çözeltisi: 0.02 M pH 7 fosfat tampon çözeltisi hazırlamak için 2.192 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 1.918 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılarak bir miktar saf su ile çözülmüştür. pH ayarlaması ise seyreltik sodyum hidroksit (NaOH) kullanılarak yapıldıktan sonra son hacim 1 L'ye saf su ile tamamlanmıştır.

Asetil Kolinesteraz Enzim Çözeltisi: Ticari olarak satın alınan elektrik yılan balığından elde edilmiş olan asetil kolinesteraz enzimi 0.02 M pH 7 fosfat tamponu ilave edilerek çözülür. Tüm denemelerde 1/10 oranında seyreltilerek kullanılmıştır.

Bütiril Kolinesteraz Enzim Çözeltisi: Ticari olarak satın alınan at serumundan elde edilmiş bütiril kolinesteraz enzimi 3.4 mg bütiril kolinesteraz alınarak 500 µL saf su ile çözülmesiyle hazırlanmıştır.

3.2.25 Lipid Peroksidasyon İnhibisyon Potansiyellerinin Belirlenmesi

Ekstraktların 2,2'-azobis- (2-amidinopropan) -dihidroklörür (ABAP) kaynaklı lipid peroksidasyonundaki inhibisyon potansiyelleri antioksidan aktivitenin bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. Bu test için, linoleik asit çözeltileri ABAP varlığında numunelerle muamele edilmiştir. Karıştırdıktan sonra, zaman içinde 234 nm'de absorbansta meydana gelen değişiklikler, spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Palacios ve ark., 2011) ve lipid peroksidasyon inhibisyon potansiyeli, absorbans arasındaki farktan yararlanılarak yüzde olarak ifade hesaplanmıştır.

3.2.26 Lipid Peroksidasyonu İnhibisyon Potansiyelinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

ABAP Çözeltisi: 98.8 mM ABAP çözeltisi 26.800 g ABAP (2,2'-Azobis (2metilpropionamidin) dihidroklorit) ($[=NC(CH_3)_2C(=NH)NH_2]_2 \cdot 2HCl$) tartılarak son hacim 1 L olacak şekilde saf su ile çözülmesiyle hazırlanmıştır.

Linoleik Asit Çözeltisi: 3.184 M linoleik çözeltisi 892.953 g linoleik asit ($CH_3(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7CO_2H$) tartılarak son hacim 1 L olacak şekilde metanol ile çözülmesiyle hazırlanmıştır.

Askorbik Asit (AA) Çözeltisi: 0.500 mg/mL AA çözeltisi 0.500 mg AA ($C_6H_8O_6$)nın tartılarak son hacim 1 mL olacak şekilde saf su ile çözülmesiyle hazırlanmıştır

3.2.27 pUC18 Plazmid DNA Miktar Optimizasyonu

Bu çalışmada pUC18 plazmit (ThermoDNA konsantrasyonunu belirlemek için, plazmidin 5 farklı konsantrasyonu (0.03 µg/ml, 0.06 µg/ml, 0.125 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0.5µg/ml) kullanılmıştır. Hazırlanan konsantrasyonlar agaroz jel elektroforezinde 90 dakika süre ile 100 voltta yürütülerek görüntülenmiştir.

3.2.28 Polen Ekstraktının pUC18 plazmid DNA'sı ile Etkileşimi

Polen ve bal ekstraktlarının pUC18 plazmid DNA'sı hasarını koruma aktivitelerinin belirlenmesi için, ekstraktlar 6.25, 12.5, 25, ve 50 mg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde hazırlanmıştır. Seri dilüsyon şeklinde hazırlanan polen ve bal ekstraktlarının 2 µL, 1.25 µg/mL'lik pUC18 plazmid, %30 H₂O₂ ve TE (Tris-EDTA) karışımı hazırlanmıştır. Bu işlemin ardından 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında, %1'lik agaroz jelde 1XTBE (Tris-Borikasıit-EDTA) tamponuyla 90 dk 100 Voltta jel elektroforezinde yürütülmüştür. DNA bantları etidyum bromit ile 20 dk boyanarak UV transillüminator ile analiz edilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 Fizikokimyasal Analiz Sonuçları

Deli bal ve polen özütlerinin bazı temel özelliklerini karakterize etmek için, pH, prolin içeriği, invert şeker yüzdesi, hidroksil radikal aracılı DNA hasarı, antimikrobiyal, HPLC ve antioksidan gibi bazı parametreler değerlendirilmiştir.

Bal örnekleri için nem, kül, toplam asitlik, sakaroz içeriği, invert şeker, HMF ve diastaz değerlerine ait tespit edilen fizikokimyasal sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. Tüm bal numuneleri için ortaya çıkan değerler yasal parametre değerleri içersinde yer alırken ancak diastaz aktivitesi ve invert şeker parameter değerleri yasal parameter değerlerinin dışında yer almıştır.

Bal için önemli kalite parametrelerinden olan prolin analiz sonuçları incelendiğinde en yüksek değere 923,0 mg/kg ile beyaz orman gülü (*Rhododendron caucasicum* L.) balı sahipken mor orman gülü (*Rhododendron ponticum* L.) balı 248,8 mg/kg prolin ile en düşük değerlere sahiptir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Bal Örneklerinin Fizikokimyasal Analiz Sonuçları

Örnekler	a	b	c		
Analiz	Sonuç	Sonuç	Sonuç	T.G. Kodeksi Limit	Method
Fruktoz (g/100g)	35,40	38,80	38,80	-	IHC, 2009
Glukoz (g/100g)	30,20	27,30	28,30	-	IHC, 2009
Fruktoz + Glukoz (g/100g)	65,60	66,10	67,10	En az 60 olmalı	
Fruktoz / Glukoz	1,17	1,42	1,37	0.9-1.45 olmalı	
Sakkaroz (g/100g)	1,70	3,40	4,30	En fazla 5 olmalı	IHC,2009
Maltoz(g100g)	1,70	1,80	0,80	-	IHC,2009
Prolin (mg/kg)	550,9	248,8	923,0	En az 300 olmalı	TS 13357
Diastaz sayısı	10	8,0	15,5	En az 8 olmalı	IHC,2009
Nem (g/100g)	21,61	22,35	22,31	En fazla 20 olmalı	
Briks (g/100g)	76,81	76,09	76,13	-	
pH	4,0	3,8	4,3	-	
Elektriksel İletkenlik	0,712	0,304	1,20	En az 0.8 olmalı	
Serbest asitlik	24	15	24,0	En fazla 50 olmalı	
HMF	0,60	0,50	0,90	En fazla 40 olmalı	

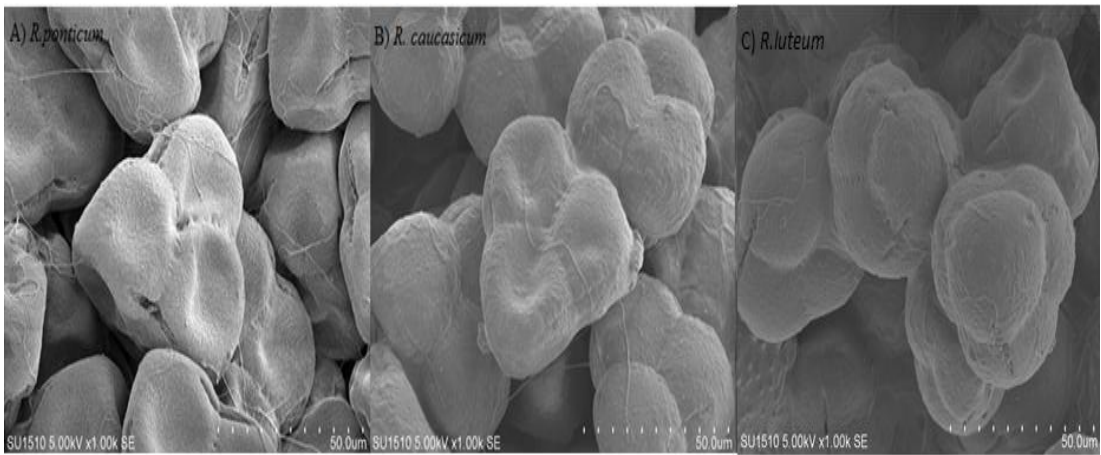
R. luteum L. balı (a), *R. ponticum* L. balı (b), *R. caucasicum* L. balı (c)

Prolin miktarının bal kalitesinin belirlenmesinde önemli bir parametre olduğu düşünüldüğünde *Rhododendron ponticum* L. bitkisinden elde edilen bal örnekleri diğer bal örneklerinden daha düşük değere sahip olmuştur.

Bal örnekleri Diastaz sayısı bakımından incelendiğinde prolin analiz sonuçlarına benzer şekilde *Rhododendron caucasicum* L. (beyaz orman gülü) balı en yüksek (15,5) diastaz sayısına sahipken *Rhododendron ponticum* L. (mor orman gülü) balı söz konusu değer yönünden en düşük (8,0) değerlere sahiptir (Çizelge 4.1). Bal örneklerinin analiz sonuçları Türk Gıda Kodeksi sınır değerlerine uygun olmakla birlikte orman gülü çeşitleri arasında farklılık göstermektedir.

Bal örneklerinin hasat edilmesi sırasında iklim koşulları ve erken hasat işlemi balın nem içeriğine etki eden önemli bir faktördür. Analiz sonuçları incelendiğinde, bal örneklerinin 21,61 ile 22,35 g/100g arası değişen nem içeriği Karadeniz Bölgesi'nin iklimsel faktörleri nedeniyle balın olgunlaşma süresini uzattığını göstermektedir. Bölgenin yüksek nem oranına sahip olması ve ortalama sıcaklıkların diğer bölgere göre düşük olması nedeniyle bölgeden alınan orman gülü ballarının nem içeriğinin Türk Gıda Kodeksine uygun olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

Polen analizinin sonuçları, tüm ormangülü bal örneklerinin, > %45 ormangülü polenin baskın olmasıyla monofloral olarak sınıflandırılabilirliğini doğrulanmıştır. Polen örneklerinin elektron mikroskobundan elde edilen görüntüleri orman gülü bitkilerinin birbirinden farklı yapıya sahip olduğunu ispatlar niteliktedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Polen Örneklerinin Taramalı Elektron Mikroskobunda Görüntülükleri (SEM) (A: *R.ponticum*, B: *R. caucasicum*, C: *R.luteum*)

4.2 Antimikrobiyal, Antioksidan Aktiviteleri ve Biyoaktif Bileşen Analizleri

Orman gülü balındaki kateşin içeriği mevsime göre değişkenlik gösterir (Kan, 1980). Bu çalışmadan elde edilen verilere dayanarak, bal ve polen ürünlerinin antimikrobiyal aktivitesinin, fermantasyon derecesinden ve üretim mevsiminden etkilenen kateşin içeriğiyle yakından ilgili olduğu sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada polen ve orman gülü balının ham ekstraktlarının her birinin belirgin antibakteriyel ve antifungal potansiyele sahip olduğu görülmüştür. Rhododendron balının ham numuneleri test edilen organizmalara karşı hem gram pozitif hem de gram negatif bakteri ve mantar durumlarında antibakteriyel ve antifungal aktivite göstermiştir. Ham RCF numunesi, *C. albicans* (*E. feacalis* *B. cereus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *C. freundii*, *C. albicans* ve *S. cerevisiae*) için $\geq 0.750-0.187,5$ mg / ml'lik bir MİK gerektirmiştir.

Bu çalışmada kullanılan bütün fenolik standart bileşikler yani gallik asit, protokateşik asit, p-hidroksibenzoik asit, kateşin, vanilik asit, kafeik asit, şerjik asit, epicatechin, p-kumarik asit, ferulik asit, rutin, t- Luteolin hariç sinamik asit *R. ponticum* L.'da bulunmuştur (Çizelge 4.2). Syringik asit, vanillik asit, 4-hidroksibenzoik asit ve protokatekuik asit ayrıca antibakteriyel, iltihap önleyici, antioksidan ve stiptik aktiviteler olan dört tür fenolik asittir.

Propolis'teki bazı flavonoidlerin antimikrobiyal ajanlar olduğu kabul edilmekte olup pinokembrin (Villanueva ve ark., 1970) antimikrobiyal flavonoidler olarak tanımlanmıştır (Metzner ve ark., 1979). Flavonoidler olan pinokembrin, galangin, pinobanksin, pinobanksin-3-asetat ve kafeik asit esteridir. Luteolin'in daha önce bazı bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Mori ve ark., 1987). Flavonol glikozitlerin, antimikrobiyal aktivitelerini arttırmak için diğer polifenollerle sinerjide hareket etmesi de mümkündür (Fattouch ve ark., 2007). Farklı bakteri türlerine karşı test edilen farklı balları karşılaştıran çalışmalarda çok çeşitli MİK değerleri (bakteri üremesinin tamamen engellenmesi için gerekli minimum bal konsantrasyonu) bulunmuştur (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.2 Rhododendron Türüne Ait Bal ve Polenin HPLC Analiz Sonuçları (µg/g)
(*ND: Değer bulunamadı)

Standards	<i>R.luteum</i> bal	<i>R. ponticum</i> bal	<i>R.caucasicum</i> bal	<i>R. luteum</i> polen	<i>R. ponticum</i> polen	<i>R. caucasicum</i> polen
Gallik asit	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Protocateuik asit	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
p-OH Benzoik asit	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Catechin	3.76	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Caffeik asit	N.D.	6.33	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Syringik asit	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	21.88
Epicatechin	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
p-Coumarik asit	2.30	3.93	3.31	N.D.	N.D.	N.D.
Ferulik asit	N.D.	6.07	8.26	N.D.	38.19	N.D.
Rutin	N.D.	N.D.	40.47	N.D.	N.D.	N.D.
Myerectin	N.D.	N.D.	N.D.	506.96	497.08	624.27
Resveratrol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Daidzein	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Luteolin	N.D.	N.D.	N.D.	16.91	207.61	N.D.
t-Cinnamik asit	0.57	0.86	1.08	14.59	63.93	34.89
Hesperetin	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	39.83
Cyrisin	16.81	27.44	20.16	N.D.	N.D.	112.89
Pinocembrin	2.31	4.11	2.71	N.D.	N.D.	43.90
CAPE	3.70	4.84	2.34	N.D.	N.D.	63.17

Bu MİK değerleri 1500, 750, 375 ve 187.5 µg / mL 'dir. Çizelge 4.3 incelendiğinde ençok bakteri ve fungusları etkisiz hale getiren numelerin başında *R.caucasicum* L. (beyaz) orman gülünden elde edilen bal örnekleri ve *R. ponticum* L. (mor) orman gülü poleni gelmektedir. Türkiye’de ayrıca şifalı bitkiler ve yerel halk tarafından bilinen mahsulleri bir araya getirilmekte ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, Rhododendron türlerinden elde edilen ballar ve nektar dahil polenler grayanotoksinler olarak bilinen toksik diterpenleri içerir. Bu bitkiden elde edilen balın yenmesi derin hipotansiyon ve bradikardiye neden olabilir (Ertürk, ve ark., 2009). Orman gülü balı kan şekeri ve lipit seviyelerini azaltır. Bu etki büyük olasılıkla grayanotoksinlerin parasempatik sinir sistemi üzerinde uyarılmasından kaynaklanmaktadır (Öztaşan ve ark., 2005).

Çizelge 4.3 İn Vitro Olarak Mikrobiyal Büyümenin %100'ünü İnhibe Etmek İçin Üç Rhododendron Türüne Ait Bal ve Polenin Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MIK), değerleri (µg / mL)

Numuneler	S.a	B.cereus	K.pneumoniae	E.coli	C.freundii	L.monocytogenes	E.fecalis	C.albicans	S.cerevisiae	P.aeruginosa
R. Luteum Bal	750≤	375≤	750≤	375≤	750≤	375≤	750≤	375≤	750≤	1500≤
R. Luteum Polen	375≤	375≤	375≤	375≤	750≤	375≤	750≤	187.5≤	187.5≤	1500≤
R.Caucasicum Bal	375≤	375≤	375≤	375≤	750≤	375≤	375≤	187.5≤	375≤	750≤
R Ponticum Polen	375≤	375≤	750≤	375≤	375≤	375≤	750≤	187.5≤	375≤	750≤
R Ponticum Bal	375≤	375≤	750≤	375≤	375≤	375≤	750≤	187.5≤	187.5≤	1500≤
R.Caucasicum Polen	375≤	750≤	375≤	750≤	750≤	750≤	375≤	187.5≤	187.5≤	750≤
Ampicillin	11.687 ≤	11.687 ≤	11.687 ≤	11.687 ≤	11.687 ≤	11.687 ≤	11.687 ≤	NT	NT	23.375 ≤
Cephazolin	11.687 ≤	11.687 ≤	11.687 ≤	11.687 ≤	11.687 ≤	11.687 ≤	11.687 ≤	NT	NT	23.375 ≤
Nystatin	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	23.375 ≤	23.375 ≤	NT

NT: inhibisyon yok,

Enterococcus faecalis ATCC® 29121(+), *Bacillus cereus* ATCC® 11778(+), *Saccharomyces cerevisiae* ATCC® 9763, *Escherichia coli* ATCC®25922 Gram (-), *Klebsiella pneumoniae* ATCC®13883 Gram (-), *Listeria monocytogenes* ATCC®7677 Gram (+) *Staphylococcus aureus* ATCC®6538(+) *Citrobacter freundii* ATCC® 43864 (-), *Candida albicans* ATCC®10231 *Pseudomonas aeruginosa* Gram (-), NRRL B-2679

Bu çalışmanın sonuçları düşük dozlardaki orman gülü bal ve polenlerinin çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğini göstermektedir. Sonuç olarak, orman gülü bal ve polenin her bir ham ekstraktının bakteri ve mantarlarda daha belirgin antibakteriyel ve antifungal etki gösterdiği belirlenmiştir.

4.3 Toplam Fenolik İçerik ve Antioksidan Faaliyetler

Toplam fenolik içerikler, DPPH ve FRAP testlerine dayanan antioksidan aktiviteler ve balın ve polen numunelerinin linoleik asit peroksidasyonundaki (LAP) inhibisyon potansiyelleri farklı Rhododendron türlerinde belirlenmiştir. Elde edilen tüm sonuçlar Çizelge 4.4' te verilmiştir. Çizelgede ki sonuçlar dikkatlice incelendiğinde aşağıdaki sonuçlar çıkarılabilir. Toplam fenolik içerik ve DPPH ve FRAP için en düşük değerler *R. ponticum* L.'dan elde edilen bal örneklerinde tespit edilmiştir. Bununla birlikte, *R. luteum* L. 'dan alınan bal numunesinin, lipit peroksidasyonunda en düşük inhibisyon potansiyeline sahiptir. Tüm testlerde en yüksek sonuçlar genellikle polen örneklerinde belirlenmiştir. Öyle ki, *R. caucasicum* L. 'den 0.1 mg/mL konsantrasyonunda polen numunesi, %37.158 inhibisyon potansiyeline sahiptir.

Farklı ormangülü türlerinden bal ve polen örneklerini karşılaştıran çalışmalarda sık rastlanmamaktadır. Ancak, Artvin ilinden uçucu bileşikler açısından toplanan beş farklı Ormangülü Türünde bir analiz yapılmış ve *R.luteum* L. çiçeklerinin diğerleri arasında en farklı kompozisyonlara sahip olduğu tespit edilmiştir (*R. ponticum*, *R. ernernii*, *R. sochadzeae* ve *R. smirnovii*). Bu nedenle, uçuculardaki bu değişken profil biyolojik özelliklerde de kendini gösterecektir (Tasdemir ve ark., 2003). Öte yandan, Türkiye'de elde edilen monofloral ballarla ilgili yapılan bir araştırma sonucunda Ordu ilinde Rhododendron balının fenolik içeriği 408,35 mg GAE / 100 g bal olarak bulunmuştur. Bu nedenle, bu çalışmada incelenen örneklerin daha fazla fenolik olduğu söylenebilir. Bu durum bal örneklerinin fenolik içerikleri ve antioksidan aktivitelerinin çiçek kökenli, jeotropik kökenli, nem, sıcaklık, iklim ve çevre koşullarına bağlı olarak değişebileceğini göstermiştir (Gül ve Pehlivan., 2018). Öte yandan, bu çalışmada antioksidan aktivite değerleri ile fenolik içerik değerleri arasında iyi bir ilişki yoktur. Gül ve Pehlivan, (2018) bu durumu test edilmeyen farklı antioksidan aktivitelerin, farklı bağlanmalardan ve yapılardan

kaynaklanabilecek diğer mekanizmalarla ilgili olduğunu belirtmiştir. Küçük ve ark., (2007) fenolik madde miktarı ile antioksidan aktivite değerleri arasındaki uyumsuzluğun, farklı tipteki polifenollerin farklı radikal temizleyici aktiviteleri ile açıklana bileceğini belirtmiştir. Türkiye'nin çeşitli Karadeniz bölgelerinden elli ormangülü bal örneklerinin fenolik içerikleri, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini içeren bir rapor sunulmuştur. Sonuçlar, her ormangülü balı ve polenin farklı miktarlarda fenolik içeriğe sahip olduğunu ve farklı bir antioksidan veya antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

Lipid oksidasyon inhibisyonunun değerlendirilmesi, biyolojik antioksidan kapasitenin değerlendirilmesinde önemli bir yoldur (Watanabe ve ark., 2008). Bu nedenle, DPPH ve FRAP testlerine ek olarak, araştırılan numunelerin indüklenmiş lipit peroksidasyonu üzerindeki inhibisyon etkisi de antioksidan aktivitenin bir göstergesi olarak araştırılmıştır. En yüksek fenolik içeriğe sahip olan test edilmiş numunelerden birinin 0.1 mg / mL konsantrasyonu, lipit peroksidasyonu için% 37.158 inhibisyon potansiyeline sahip olduğunu belirlenmiştir. Ayrıca, orman gülleri de dahil olmak üzere balların lipit peroksidasyonu üzerindeki inhibisyon etkisi yeterince araştırılmamıştır. Ormangülü bitkisi, az sayıda çalışmada araştırılmıştır. Bu nedenle, bal ve polen örneklerinin farklı ormangülü bitki türlerinden hazırlanan ekstraktlarının değerlendirilmesi bu çalışmanın en özgünyönünü oluşturmaktadır

Çizelge 4.4 Bal ve Polen Örneklerinin Toplam Fenolik İçerik ve Antioksidan Özellikleri

NUMUNELER	Toplam fenolik içerik (mg GAE /g)	DPPH (SC ₅₀ ; mg/mL)	FRAP (mM TX/g)	İnhibasyon (%) (0.1 mg/ ml)
<i>R. ponticum</i> Balı	0.04	64.002	0.409	14.695
<i>R. luteum</i> Balı	0.22	35.634	2.025	8.550
<i>R. caucasicum</i> Balı	0.92	16.652	3.588	12.563
<i>R.ponticum</i> Poleni	25.81	1.054	6.177	9.368
<i>R.luteum</i> Poleni	13.63	1.018	2.676	17.174
<i>R.caucasicum</i> Poleni	23.10	0.496	4.162	37.158

Folin-Ciocalteu testi, monohidrik fenoller, polifenoller, flavonoidler ve tanninler için yüksek derecede duyarlı olmasına rağmen bu metodla kolorimetrik reaktifle (fosfotungstik ve fosfomolibdik asit karışımı) reaksiyona girerek girişim yapan şekerler, askorbik asit, aminoasitler (tirosin, triptofan) gibi kolayca okside olan maddeler mevcudiyetinde, toplam fenolik asit içerik olduğundan fazla olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, birden fazla hidroksil grubuna sahip fenoliklerin oluşacak rengin şiddetini aynı oranda artırmaları beklenirken hidroksil grupları kromofor reaktif için ulaşılabilir olmadığından aromatik halkadaki sterik etkiler veya substitusyonlar beklenen sonucu etkileyebilmektedir (Palacios ve ark., 2011).

4.4. Kolinesteraz Önleyici Faaliyet

Ormangülü bitki türlerinin asetilkolinesteraz inhibisyonu potansiyeli üzerine birkaç çalışma olmasına rağmen, *Rhododendron luteum* L. ormangülü, *Rhododendron ponticum* linn. subsp. (Orhan ve ark., 2004; Mukherjee ve ark., 2007; Lee ve ark., 2011) gibi ormangülü bal örnekleri üzerinde bir çalışma bulunmamaktadır. Öte yandan, orman gülleri dışındaki diğer bal türleri nörolojik hastalıklarda bir çare olabileceği literatürde belirtilmektedir (Zaidi ve ark., 2019). Bu nedenle, çalışmamızda örneklerin antioksidan özelliklerine ek olarak, *Rhododendron* balının ve polen örneklerinin kolinesteraz inhibe etme potansiyeli araştırılmış ve sonuçlar galantamin, standart kolinesteraz inhibitörü ile karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 Örneklerin 0.5 mg / mL Konsantrasyonda Asetilkolinesteraz ve Butirilkolinesteraz İnhibe Edici Potansiyelleri (%)

NUMUNELER	AchE	BuChE
<i>R. ponticum</i> Balı	11.781	0.099
<i>R. luteum</i> Balı	50.330	Belirlenemedi
<i>R. caucasicum</i> Balı	5.750	0.790
<i>R. ponticum</i> Poleni	3.487	18.855
<i>R. luteum</i> Poleni	8.671	7.601
<i>R. caucasicum</i> Poleni	10.933	4.343
Galantamine	85.203	24.778

Bal örneklerinin AChE kalıtım oranları polen örneklerinden daha yüksektir. Öte yandan, polen numunelerinin BuChE inhibisyon dereceleri daha yüksektir. Özellikle, galantamin ile karşılaştırıldığında, *R. ponticum* L.'dan elde edilen polen örneği,

önemli ölçüde daha yüksek bir bütirikolinesteraz aktivitesine sahiptir. Ayrıca, *R. luteum*'dan hazırlanan 0.5 mg / mL bal özü, AChE üzerinde %50 inhibisyon etkisine sahip olup dikkate alınması gereken bir bulgudur.

Farklı botanik kökenlere ait 33 bal örneği, (Cezayir'in farklı bölgelerindeki arıcılardan), asetilkolinesteraz inhibisyon potansiyelleri açısından araştırılmış ve çoğu için inhibisyon aktivitesi saptanamamış olup tespit edilenlerin IC50 değerleri ise; 0.367 ila 0.629 mg / mL arasındadır (Zaidi ve ark., 2019). Ancak, doğrudan *R. luteum* ve *R. ponticum*'dan hazırlanan 1 mg / mL bitki özü %76.32 ve %93.03 oranında inhibisyon potansiyeline sahiptir bulunmuştur (Orhan ve ark., 2004). *Rhododendron yedoense* için IC50 değeri 169.01 µg / mL olarak bildirilmiştir (Lee ve ark., 2011).

4.5 DNA Hasar İnhibitör Aktiviteleri

Polen ve balın hidroksil radikal kaynaklı DNA hasarı üzerindeki koruyucu etkisinde kullanılan bu çalışmada DNA etkileşimi belirlenmiştir. Polen ve bal özlerinin DNA ile etkileşimi, bağlanma-ayırılma özelliklerine bağlı olabilir ve bu üç boyutlu DNA konformasyonunda değişikliklere neden olmaktadır. Bunlar, DNA band yoğunluğunda ve DNA' nın elektrik alandaki göç oranında çok etkilidir (Asmafiliz, 2013). Plazmid DNA üç farklı biçimde bulunur, ancak işlenmemiş plazmid DNA, iki DNA bandıyla jel elektroforezi üzerinde göç eder (Akbaş, 2013). Agaroz jel elektroforezine göre, ekstraler DMSO (Dimetil sülfoksit) içinde çözölmüş ve 0.125 ug / ul pUC18 plazmit DNA sırasıyla 6.25, 12.5, 25 ve 50 mg / ml ekstraler ile muamele edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Farklı Renk Polenlerinin Artan Konsantrasyonları ile pUC18 Plazmid DNA'nın Etkileşiminin Elektrofotogramları. [Beyaz orman gülü poleni (a), Sarı orman gülü poleni (b) ve Mor orman gülü poleni (c)]

Şerit 1: H₂O₂ ve pUC18 plazmid DNA; Şerit 2: pUC18 plazmid DNA kontrolü; Şerit 3: DMSO ve pUC18 plazmid DNA; Şerit 4: TE ve pUC18 plazmid DNA; Şerit 5:

H₂O₂, pUC18 plazmid DNA ve 6,25 mg / ml özüt; Şerit 6: H₂O₂, pUC18 plazmid DNA ve 12,5 mg / ml ekstrakt; Şerit 7: H₂O₂, pUC18 plazmid DNA ve 25 mg / ml ekstrakt, Şerit 8: H₂O₂, pUC18 plazmid DNA ve 50 mg / ml ekstrakt.

Şerit 1, 2, 3 ve 4 kontrol olarak muamele edilmemiş pUC18 plazmit DNA'sı ile gerçekleştirilirken, 5-8 şeritleri, H₂O₂ mevcudiyetinde ekstraktların artan konsantrasyonları ile etkileşime giren plazmid DNA'ya işaret etmiştir.

Orman gülü polen bileşiklerinin, pUC18 plazmid DNA'sına karşı benzer etkiler sergilediği belirlenmiştir. Artan polen ekstreleri dozu hidroksil radikal aracılı plazmid DNA kırılması üzerinde koruyucu bir etkiye sahiptir. Bileşiklerin en küçük üç konsantrasyonu için 5 için net bir form I bandı yoktur. Şerit 5'teki bantların azalmasının, DNA hasarına bağlı olduğu söylenebilir. Form 1, artan konsantrasyonlarla etkileşime giren plazmid DNA'yı değiştirmemiştir.

Balın hidroksil radikal aracılı DNA hasarı üzerindeki etkisinde kullanılan bu çalışmada DNA etkileşimi bulunmaktadır. Bal özlerinin DNA ile etkileşimi, üç boyutlu DNA konformasyonunda değişikliklerle sonuçlanan bağlanma-ayırılma özelliklerine bağlı olabilir. Bunlar, DNA band yoğunluğunda ve DNA'nın elektrik alandaki göç oranında çok etkilidir (Asmafiliz, 2013). Plazmid DNA, üç farklı biçimde bulunur, ancak işlenmemiş plazmid DNA, iki DNA bandıyla jel elektroforezi üzerinde göç eder (Akbaş, 2013). Agaroz jel elektroforezine göre, ekstreler DMSO (Dimetil sülfoksit) içinde çözölmüş ve 0.125 ug / ul pUC18 plazmit DNA sırasıyla 3.125, 6.25, 12.5, 25 ve 50 mg / mL ekstreler ile muamele edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. PUC18 Plazmid DNA'nın Artan Konsantrasyonlarda Farklı Renkte Bal ile Etkileşiminin Elektrofotogramları [Beyaz orman gülü balı (a), Sarı orman gülü balı (b) ve Mor orman gülü balı (c)]

Şerit 1: pUC18 plazmid DNA kontrolü; Şerit 2: H₂O₂ ve pUC18 plazmid DNA; Şerit 3: DMSO ve pUC18 plazmid DNA; Şerit 4: H₂O₂, pUC18 plazmid DNA ve 3.125 mg

/ mL beyaz bal özü; Şerit 5: H₂O₂, pUC18 plazmid DNA ve 6,25 mg / mL beyaz bal özü; Şerit 6: H₂O₂, pUC18 plazmid DNA ve 12.5 mg / mL beyaz bal özü; Şerit 7: H₂O₂, pUC18 plazmid DNA ve 25 mg / mL beyaz bal özü; Şerit 8: H₂O₂, pUC18 plazmid DNA ve 50 mg / mL beyaz bal özü; Şerit 9: H₂O₂, pUC18 plazmid DNA ve 3,125 mg / mL sarı bal özü; Şerit 10: H₂O₂, pUC18 plazmid DNA ve 6,25 mg / mL sarı bal özü; Şerit 11: H₂O₂, pUC18 plazmid DNA ve 12.5 mg / mL sarı bal özü; Şerit 12: H₂O₂, pUC18 plazmid DNA ve 25 mg / mL sarı bal özü; Şerit 13: H₂O₂, pUC18 plazmid DNA ve 50 mg / mL sarı bal özü; Şerit 14: H₂O₂, pUC18 plazmid DNA ve 3.125 mg / mL mor bal özü; Şerit 15: H₂O₂, pUC18 plazmid DNA ve 6,25 mg / mL mor bal özü; Şerit 16: H₂O₂, pUC18 plazmid DNA ve 12.5 mg / mL mor bal özü; Şerit 17: H₂O₂, pUC18 plazmid DNA ve 25 mg / mL mor bal özü; Şerit 18: H₂O₂, pUC18 plazmid DNA ve 50 mg / mL mor bal özü.

Şerit 1 ve 3 kontrol olarak muamele edilmemiş pUC18 plazmit DNA' sı ile gerçekleştirilirken, 4-18 şeritleri, H₂O₂ koşulunda ekstraktların artan konsantrasyonları ile etkileşime giren plazmid DNA' ya işaret etmektedir.

Orman gülü bal bileşiklerinin, pUC18 plazmid DNA'sına karşı neredeyse benzer etkiler sergilediği anlaşılmaktadır. Farklı ekstraktların artan dozlarının hidrosil radikal aracılı plazmid DNA kırılması üzerinde koruyucu bir etkisi bulunmaktadır. En yüksek aktiviteler, 50 mg / mL olarak işaretlenmiş farklı bal örnekleri için elde edilmiştir. Öte yandan, *R. ponticum* L. bitkisinin bal örnekleri hasarlı DNA üzerinde en olumlu etkiye sahip bulunmuştur.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bal için önemli kalite parametrelerinden olan prolin analiz sonuçları incelendiğinde beyaz orman gülü (*Rhododendron caucasicum* L.) balı en yüksek değere sahip olmuş ve 923,0 mg/kg değer ile diğer örneklerden farklılık göstermiştir.

Bal örneklerinin kalitesinin belirlenmesinde önemli faktörlerden olan diastaz sayısı 15,5 ile 8,0 arasında değişkenlik göstermektedir. *Rhododendron caucasicum* L. (beyaz orman gülü) balı en yüksek değere sahipken tüm bal örneklerinin analiz sonuçlarının Türk Gıda Kodeksi sınır değerlerine uygun olduğu belirlenmiştir. Yapılan nem analizi sonuçlarına göre ise tüm bal örneklerinin Türk Gıda Kodeksi'nde belirlenen sınırların biraz üzerinde olduğu saptanmıştır. Bu durumun hasadın erken yapılmasından ve olumsuz iklim koşullarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Toplam fenolik içerik ve DPPH ve FRAP için en düşük değerler *R. ponticum* L.'den elde edilen bal örneklerinde tespit edilmiştir. Bununla birlikte, *R. luteum* L. 'den alınan bal numunesinin lipit peroksidasyonunun da en düşük inhibisyon potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Araştırmada üzerinde durulan bütün testlerde en yüksek sonuçlar genellikle polen örneklerinde belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ışığında, her ormangülü balı ve polenin farklı miktarlarda fenolik içeriğe farklı bir antioksidan veya antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu söylenebilir.

Orman gülü bal ve polen örneklerinin pUC18 plazmid DNA'sına karşı neredeyse benzer etkiler sergilediği tespit edilmiştir. Farklı ekstraktların artan dozlarının hidroksil radikal aracılı plazmid DNA kırılması üzerinde koruyucu bir etkisi bulunmaktadır. En yüksek aktiviteler, 50 mg / mL olarak işaretlenmiş farklı bal örnekleri için elde edilmiştir. *R. ponticum* L. bitkisinin bal örneklerinin hasarlı DNA üzerinde en olumlu etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Yine orman gülü bal ve polen örneklerinin ham ekstraktlarının bakteri ve mantarlara karşı belirgin antibakteriyel ve antifungal etki gösterdiği de saptanmıştır.

Bu araştırmadan elde edilen sonuçlar, düşük dozlardaki orman gülü polen ve ballarının çeşitli hastalıkların tedavisinde, gıda maddelerinin korunmasında ve raf ömürlerinin uzatılmasında kullanılabileceğini göstermiştir.

6. KAYNAKLAR

- Abdulkasım, P., Songchitsombon, S., Techagumpuch, M., Balee, N., Swatsitang, P., & Sungpuag, N. (2007). Antioxidant capacity, total phenolics and sugar content of selected thai health beverages. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 77-85.
- Ackermann, J. A., Hofheinz, K., Zaiss, M. M., & Kronke, G. (2017). The double edged role of 12/15- lipoxygenase during inflammation and immunity, *Biochimica et Biophysica Acta*. 1862(4), 371-381.
- Acquarone, C., Buera, P., & Elizalde, B. (2007). Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. *Food Chemistry*, 101(2), 695-703
- Akbaş, H., Okumuş, A., Kılıç, Z., Hökelek, T., Süzen, Y., Koç, Y., Açık, L., & Çelik, B. (2013). Phosphorus-nitrogen compounds part 27. Syntheses, structural characterizations, antimicrobial and cytotoxic activities, and DNA interactions of new phosphazenes bearing secondary amino and pendant (4-fluorobenzyl) spiro groups. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 70:294-307.
- Akdeniz, G., Şahin, S., Yılmaz, Ö., Karataş, Ü., Karmaz, E., Kabakçı, D., & Yaşar, N. (2013). Karaçalı (*Paliurus spina-christi* Miller) ve ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) ballarının mikroskopik yapısı ve biyokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması. *Arıcılık Araştırma Dergisi*, 5(9), 22-25.
- Alan, S., Kürkcüoğlu, M., Göger, F., & Can-Başer, H. K. (2010). Morphological, chemical and indumentum characteristics of *Rhododendron luteum* Sweet (Ericaceae). *Pakistan Journal Botany*, 42(6), 3729-3737.
- Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E., & Battino, M. (2010). Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3: 15-23.
- Alpat, U. (2018) Çam balının fonksiyonel ve biyoaktif özelliklerinin ülkemizde üretilen diğer önemli ballarda karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı. İstanbul.
- Anonim, (2012). Türk Gıda Kodeksi, 2012/58 Sayılı Bal Tebliği. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2012/07/20120727-12.htm>, Erişim:12.05.2019.
- AOAC, (1990). Official methods of analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington.
- Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Öztürk, A., Süzen, Y., Hökelek, T., Açık, L., Çelik, Z. B., Koç, L. Y., Yola, M. L. & Üstündağ, Z. (2013). Phosphorus-nitrogen compounds: part 25. syntheses, spectroscopic, structural and electrochemical investigations, antimicrobial activities, and DNA interactions of ferrocenyl di amino cyclotri phosphazenes. *Journal Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 188:1723-1742.

- Atayoğlu, T. (2012). Apiterapi açısından arı ürünlerinin kalite kriterleri ve standardizasyonu. *Standard Ekonomik ve Teknik Dergi*, 601, 68-73.
- Ay, Y. E, & Yiğit, Y. (2016). Bal, beslenme ve sağlık. 3rd International Congress on Social Sciences, China to Adriatic, In congress book, 27-30 Ekim, Antalya.
- Azofeifa, G., Quesada, S., Pérez, A.M., Vaillant, F., & Michel, A. (2015). Pasteurization of blackberry juice preserves polyphenol-dependent inhibition for lipid peroxidation and intracellular radicals. *Journal of Food Composition and Analysis*, 42, 56–62.
- Bilir, E. K., Tutun, H., Sevin, S., Kısmalı, G., & Yarsan, E. (2018). Cytotoxic effects of rhododendron ponticum l. extract on prostate carcinoma and adenocarcinoma cell line (DU145, PC3). *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24(3).
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., & Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: a review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6), 677-689.
- Burda, S., & Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(6), 2774-2779.
- Can, Z., Yildiz, O., Sahin, H., Turumtay, E. A., Silici, S., & Kolayli, S. (2015). An investigation of Turkish honeys: their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food Chemistry*, 180, 133-141.
- Catanzaro, R., Zerbinati, N., Solimene, U., Marcellino, M., Mohania, D., Italia, A., Ayala, A., & Marotta, F. (2016). Beneficial effect of refined red palm oil on lipid peroxidation and mono cytet issue factor in HCV-related liver disease: a randomizer controller study, *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 15, 165–172.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3).
- Chen, C. T., Green, J. T., Orr, S. K., & Bazinet, R. P. (2008). Regulation of brain polyunsaturated fatty acid up take and turn over, Prostaglandins Leukotrienes and Essential Essential Fatty Acids, 79, 85-91.
- Ciulu, M., Solinas, S., Floris, I., Panzanelli, A., Pilo, M. I., Piu, P. C., & Sanna, G. (2011). RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. *Talanta*, 83(3), 924-929.
- Cooper, R. A., Halas, E., & Molan, P. C. (2002). The efficacy of honey in inhibiting strains of Pseudomonas aeruginosa from infected burns. *The Journal of burn care & rehabilitation*, 23(6), 366-370.
- Cooper, R. A., Wigley, P., & Burton, N. F. (2000). Susceptibility of multiresistant strains of Burkholderia cepacia to honey. *Letters in applied microbiology*, 31(1), 20-24.
- Çevrimli, M.B., & Sakarya, E. (2018). Arıcılık işletmelerinin yapısal özellikleri ve sorunları; Ege Bölgesi örneği. *Eurasian Journal of Veterinary Science*, 34(2), 83-91.

- Çiftçi, M. (2018). Konya bölgesindeki marketlerde satılan farklı ticari çiçek ballarının bazı kimyasal özelliklerinin Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne uygunluğunun araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı, Konya
- Davies, K.J.A. (1995). Oxidativestress: theparadox of aerobic life, *Biochemical Society Symposia*, 61, 1–31.
- Doğan, H. (2014). Çiçek ballarının kimyasal fiziksel ve antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Erzurum.
- Ekim, T. (1987). Arıcılıkta önem taşıyan bitkiler ve bunların yurdumuzdaki durumu. *Türkiye*, (1), 53-64.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). “A new and rapidcolorimetric determination of acetylcholinesterase activity”. *Biochemical Pharmacology*, 7, (2): 88–95.
- Eren, E. (2011). Bazı soğans bitkilerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Sakarya.
- Ertürk, Ö. (2006). Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. *Biologia*, 61(3), 275-278.
- Ertürk, Ö., Karakaş, F. P., Pehlivan, D., & Nas, N., (2009). The antibacterial and antifungal effects of Rhododendron derived mad honey and extracts of four Rhododendron species. *Turkish Journal of Biology*, 33(2), 151-158.
- Fattouch, S., Caboni, P., Coroneo, V., Tuberoso, C. I., Angioni, A., Dessi, S., & Cabras, P. (2007). Antimicrobial activity of Tunisian quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenolic extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 963-969.
- Gao, J., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Mamauag, R.E.P., & Han, Y. (2012). Effects of dietaryoxidized fish oil with vitamin E supplementation on growth performance and reduction of lipid peroxidation in tissues and blood of redsea bream *Pagrus major*. *Aquaculture*, 73–79.
- Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482 419-425.
- Gül, A., (2016). The determination of the biochemical properties of some monofloral honey samples produced across Turkey. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 4(12), 1123-
- Gül, A., & Pehlivan, T. (2018). Antioxidant activities of some monofloral honey types produced across Turkey. *Saudi Journal of Biological Sciences* 25:1056–1065.
- Güler, A. (2017). Bal Arısı (*Apis mellifera* L.) Yetiştiriciliği, Hastalıkları ve Ürünleri, Samsun, Türkiye.
- Habib, H. M., Ibrahim, W. H., Schneider-Stock, R., & Hassan, H. M. (2013). Camel milk lactoferrin reduces the proliferation of colorectal cancer cells and exerts

- antioxidant and DNA damage inhibitory activities. *Food Chemistry*, 141(1), 148-152.
- Hopkins, A. L., & Groom, C. R. (2002). The druggable genome. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(9), 727–730.
- Jain, S.K., Rains, J., & Jones, K. (2006). Effect of curcumin on protein glycosylation, lipid peroxidation, and oxygen radical generation in human red blood cell sex posed to high glucose levels. *Free Radical Biology & Medicine*, 41, 92–96.
- Kalın, S. (2013). Türkiye'nin farklı illerinden toplanan balların antimikrobiyal, antioksidan aktiviteleri ve biyoaktif bileşenlerinin tayini. Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ordu.
- Kan, N. (1980). Formation of aroma during the manufacture of Black tea. *Sci. Agr*, 28, 338-342.
- Kaur, R., Singh, V., & Shri, R. (2017). Anti-amnesic effects of *Ganoderma* species: A possible cholinergic and antioxidant mechanism. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 92, 1055–1061.
- Khatua, S., Paul, A., Chatterjee, D., Ray, A., Roy, A., & Acharya, K. (2013). Evaluation of antioxidative activity of ethanolic extract from *Russula delica*: An in vitro study. *International Journal Pharmacy Sciences Reviews*, 5(9), 100-107.
- Korkmaz, A., (2007). Arıcılık. Tarım İl Müdürlüğü Yayını. Sayfa 3–4, Samsun.
- Küçük, M., Kolaylı, S., Karaoğlu, G., Ulusoy, E., Baltacı, C., & Candan, F. (2007). Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, 100: 526-534.
- Lee, S. H., Sancheti, S.A., Bafna, M.R., Sancheti, S.S., & Seo, S.Y. (2011). Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Rhododendron yedoense* var. *Poukhanense* bark, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(2), pp. 248-254.
- Lusby, P. E., Coombes, A., & Wilkinson, J. M. (2002). Honey: a potent agent for wound healing,. *Journal of Wound Ostomy & Continence Nursing*, 29(6), 295-300.
- Maddocks, S. E., Lopez, M. S., Rowlands, R. S., & Cooper, R. A. (2012). Manuka honey inhibits the development of *Streptococcus pyogenes* biofilms and causes reduced expression of two fibronectin binding proteins. *Microbiology*, 158(3), 781-790.
- Manyi-Loh, C. E., Clarke, A. M., & Ndip, N. (2011). An overview of honey: therapeutic properties and contribution in nutrition and human health. *African Journal of Microbiology Research*, 5(8), 844-852.
- Mavric, E., Wittmann, S., Barth, G., & Henle, T. (2008). Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Molecular nutrition & food research*, 52(4), 483-489.

- Mayda, N., Özkök, A., & Sorkun, K. (2018). Some Characteristic Properties of Chestnut and Rhododendron Honeys in Turkey. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 46(1), 135-145.
- Metzner, J., Bekemeier, H., Paintz, M., & Schneidewind, E. (1979). On the antimicrobial activity of propolis and propolis constituents (author's transl). *Die Pharmazie*, 34(2), 97-102.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 211–219.
- Mukherjee, P.K., Kumar, V., Mal, M., Houghton, P.J., (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants, *Phytomedicine* 14 289–300.
- Niki, E. (2011). Antioxidant capacity: which capacity and how to assess it? *Journal of Berry Research*, 1, 169–176.
- Orhan, I., & Üstün, O. (2011). Determination of total phenol content, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition in selected mushrooms from Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(3), 386-390.
- Orhan, I., Sener, B., Choudhary, M.I., Khalid, A., (2004) Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants, *Journal of Ethnopharmacology* 91 57–60.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction – Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307–315.
- Öder, E. (1993). Bazı önemli ballı bitkiler. *Hasad*, Yıl, 8, 34-38.
- Öztaşan, N., Altinkaynak, K., Akçay, F., Göçer, F., & Dane, Ş. (2005). Effects of mad honey on blood glucose and lipid levels in rats with streptozocin-induced diabetes. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29(5), 1093-1096.
- Palacios, I., Lozano, M., Moro, C., D'Arrigo, M., Rostagno, M. A., Martínez, J. A., García-Lafuente, A., Guillaumon, E., & Villares, A. (2011). Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms, *Food Chemistry*, 128, 674–678.
- Pryor, W. A., Cornicelli, J. A., Devall, L. J., Tait, B., Trivedi, B. K., Witiak, D. T., & Wu, M. (1993). A rapid screening test to determine the antioxidant potencies of natural and synthetic antioxidants. *Journal of Organic Chemistry*, 58, 3521–3532.
- Qais, N., Rahman, M. M., Rashid, M. A., Koshino, H., & Nagasawa, K. (1996). Antibacterial flavonoids from *Desmos chinensis*. *Fitoterapia (Milano)*, 67(6), 554-555.
- Radmark, O., Werz, O., Steinhilber, D., & Samuelsson, B. (2015). 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1851, 331-339.
- Rates, S. M. K. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39, 603–613.

- Richter, C. (1987). Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 44, 175–189.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., & Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276.
- Senol, S., Orhan, I., Yilmaz, G., Çiçek, M., & Sener, B. (2010). Acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and tyrosinase inhibition studies and antioxidant activities of 33 *Scutellaria* L. taxa from Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 781–788.
- Sevin, S. (2018). Ülkemize özgü çam balı ve kestane balı'nın krem tarzında farmasötik şeklinin geliştirilmesi ve yara iyileşmesi üzerine etkisinin araştırılması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı. Ankara.
- Silici, S., Sagdic, O., & Ekici, L. (2010). Rhododendron ballarının toplam fenolik içeriği, antiradikal, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri . *Gıda Kimyası* , 121: 238 - 243
- Silici, S., Sarioglu, K., Dogan, M., & Karaman, K., (2014). HPLC-DAD Analysis to identify the phenolic profile of rhododendron honeys collected from different regions in Turkey. *International Journal of Food Properties*, 17(5), 1126–1135. Doi: 10.1080/10942912.2012.69844
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am Journal Enol Viticult* 16, 144-158.
- Şahin, H., Zehra, C., & Kolaylı, S. (2017). Bazı ormangülü ballarının fenolik içerik kompozisyonu. *Arıcılık Araştırma Dergisi*, 9(2), 40-46.
- Takahashi, H., Hirata, S., Minami, H., & Fukuyama, Y., (2001). Rhododendron simsii'den Triterpen Flavanon glikozit. *Fitokimya* 56, 875–879.
- Takahashi, H., Hirata, S., Minami, H., Fukuyama, Y. (2001). Triterpene and flavanone glycoside from *Rhododendron simsii*. *Phytochemistry*, 56, 875–879.
- Tasdemir, D., Demirci, B., Demirci, F., Dönmez, A. A., Baser, K. H., & Rüedi, P. (2003). Analysis of the volatile components of five Turkish *Rhododendron* species by headspace solid-phase microextraction and GC-MS (HS-SPME-GC-MS). *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, Tübingen Nov-Dec; 58(12):797-803.
- Ucar, G., Gokhan, N., Yesilada, A., & Bilgin, A.A. (2005). 1-N-Substituted thiocarbamoyl-3-phenyl-5-thienyl-2-pyrazolines: A novel cholinesterase and selective monoamine oxidase B inhibitors for the treatment of Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Neuroscience Letters*, 382(3), 327–331.
- Ulusoy, E. (2010). Anzer balı ve polenin yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile bileşiminin belirlenmesi ve antioksidan özellikleri üzerine araştırma. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Watanabe, T., Nakajima, Y., & Konishi, T. (2008). In vitro and in vivo antioxidant activity of hot water extract of Basidiomycetes-X, newlyidentified edible fungus. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 31, 111–117.
- Yıldız, İ. (2016). Çam, pamuk, yayla ve ayçiçeği ballarının fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 16(1), 12-19.
- Zaidia, H., Ouchemoukh, S., Amessis-Ouchemoukh, N., Debbache, N., Pacheco, R., Serralheiro, M. L., Araujo, E. (2019). Biological properties of phenolic compound extracts in selected Algerian honeys—The inhibition of acetylcholinesterase and α -glucosidase activities, *European Journal of Integrative Medicine*, 25 77–84.
- Zengin, G. (2016). “A study on in vitro enzyme inhibitory properties of Asphodelineanatolica: new sources of natural inhibitors for public health problems”, *Industrial Crops and Products*, (83), 39-43.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Mert AKGÜN
Doğum Yeri	ORDU
Doğum Tarihi	28.07.1993
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	0541 460 30 29
E-Posta Adresi	akgunmertakgun@gmail.com
Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Akdeniz Üniversitesi
Fakülte	Ziraat Fakültesi
Bölümü	Zootečni
Mezuniyet Yılı	2015
Yüksek Lisans	
Üniversite	Ordu Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Zootečni
Programı	
Mezuniyet Tarihi	2019
Yayınlar	
Akgün, M., & Akgün, M. (2017). Baldan fazla nemin uzaklaştırılmasının deneysel incelenmesi, Arıcılık Araştırma Dergisi, 9(1):20-24.	
Görev Aldığı Projeler	
TAGEM-17/AR-GE/08 Numaralı ve “Karadeniz Arı Genotipinin Verim ve Varroa Parazitine Direnç Yönünden Islahı” isimli projede yürütücü olarak görev yapmaktadır (2017-2020).	

