

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

ARI SÜTÜNÜN TAZELİK KRİTERİ OLARAK PROTEİN VE LİPİT
OKSİDASYON ÜRÜNLERİ İLE BAZI ENZİM AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

Gülşah OKUMUŞ YÜKÜNCÜ

MART 2025
TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

**ARI SÜTÜNÜN TAZELİK KRİTERİ OLARAK PROTEİN VE LİPİT
OKSİDASYON ÜRÜNLERİ İLE BAZI ENZİM AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ**

Gülşah OKUMUŞ YÜKÜNCÜ

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"DOKTOR (KİMYA)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 30 / 01 / 2025

Tezin Savunma Tarihi : 04 / 03 / 2025

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI

Trabzon 2025

ÖNSÖZ

“Arı Sütünün Tazelik Kriteri Olarak Protein ve Lipit Oksidasyon Ürünleri ile Bazı Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi” isimli bu tez Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Doktora Programı’nda hazırlanmıştır. Doktora tezimi BAP06 projesi ile maddi olarak destekleyen KTÜ BAP birimine teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca hiçbir desteğini esirgemeyen ve bilim insanı olma yolundaki ilk adımlarımı atarken kıymetli bilgileriyle ve tecrübesiyle yolumu aydınlatan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI’ya teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca, yapıcı eleştirileri ve önerileri ile tezime büyük katkıları bulunan saygıdeğer hocalarım Sayın Prof. Dr. Oktay YILDIZ’a ve Sayın Prof. Dr. Yakup KOLCUOĞLU’na, eğitim öğretim hayatımda katkı sağlayan tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Tez çalışması sürecinde desteklerini esirgemeyen KTÜ Maçka MYO’daki değerli hocalarıma, doktora sürecinde yol arkadaşım olan Öğr. Gör. Dr. Gülsüm Merve BOYRACI’ya, Gıda İşleme Bölümü’ndeki kıymetli çalışma arkadaşlarım Öğr. Gör. Dr. Atiye DEĞİRMENCİ, Öğr. Gör. Dr. Mehtap ER KEMAL ve Öğr. Gör. Dr. Berrin ÖZKILIÇ’a, ayrıca kıymetli hocam Prof. Dr. Zehra CAN ile değerli arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KEMAL’e ve Arş. Gör. Yakup KARA’ya teşekkürlerimi sunarım.

Uzun ve zorlu doktora sürecimde beni yalnız bırakmayan, endişemi, yorgunluğumu paylaşan değerli eşim Rıdvan YÜKÜNÇ’e, bu süreçte ailemize katılan biricik oğlum Miraç’a,

Doğduğum günden beri elimi hiç bırakmayan, hayatım boyunca aldığım tüm kararlarda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve her kararımda arkamda olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan annem Leyla OKUMUŞ, bugünleri görmesini çok istediğim rahmetli babam Prof. Dr. İbrahim OKUMUŞ’a ve kardeşlerim Bilgen ve Bengisu OKUMUŞ’a teşekkür eder, minnettarlığımı sunarım.

Bu tez çalışmasının gelecekteki araştırmalara katkı sağlamasını temenni ederim.

Gülşah OKUMUŞ YÜKÜNÇ

Trabzon 2025

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Arı Sütünün Tazelik Kriteri Olarak Protein ve Lipit Oksidasyon Ürünleri ile Bazı Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI’nın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 04/03/2025

Gülşah OKUMUŞ YÜKÜNÇ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XIII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Arı Sütü: Genel Özellikleri ve Bileşimi	1
1.2. Arı Sütünün Kimyasal Bileşimi	2
1.2.1. Su İçeriği	2
1.2.2. Protein ve Amino Asit Bileşimi	3
1.2.3. Karbohidratlar	5
1.2.4. Lipitler ve Yağ Asitleri	5
1.2.5. Vitaminler ve Mineraller	7
1.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	8
1.4. Gıdalarda Oksidasyon Mekanizması	10
1.4.1. Lipit Oksidasyonu	11
1.4.2. Protein Oksidasyonu	12
1.4.3. Karbohidrat Oksidasyonu	14
1.4.4. 5-Hidroksimetilfurfural (HMF).....	17
1.5. Gıdalarda Antioksidan Savunma Sistemi.....	19
1.5.1. Arı Sütünde Antioksidan Savunma Sistemi.....	20
1.6. Arı Sütünde Bulunan Enzimler ve Fonksiyonları	22
1.6.1. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	23
1.6.2. Glukoz Oksidaz (GOx)	25
1.6.3. Katalaz (CAT).....	26
1.7. Arı Sütünde Tazelik.....	27
1.8. Çalışmanın Amacı ve Önemi	32

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	34
2.1. Kullanılan Cihazlar.....	34
2.2. Kimyasal Maddeler	34
2.3. Kullanılan Çözeltiler	36
2.4. Arı Sütü Tedarik ve Depolama Çalışmaları	43
2.5. Arı Sütünün Kalite Parametreleri	44
2.5.1. Nem Tayini	45
2.5.2. Suda Çözünür Kuru Madde (°Brix) Tayini	45
2.5.3. pH ve Titrasyon Asitliği Tayini	45
2.5.4. Kjeldahl Metodu ile Ham Protein Tayini.....	45
2.5.5. Bradford Yöntemi ile Suda Çözünür Protein Tayini	46
2.5.6. Toplam Yağ Tayini	47
2.5.7. 10-Hidroksi-2-Dekanoik Asit (10-HDA) Tayini	47
2.5.8. Toplam Mineral Madde (Kül) Tayini	48
2.5.9. Renk Tayini (Hunter-Lab)	48
2.6. SDS-PAGE ile Protein Profili	48
2.7. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi- Kırılma İndisi Dedektörü (HPLC-RID) ile Şeker Profili.....	50
2.8. Protein, Lipit ve Karbohidrat Oksidasyon Ürünleri	51
2.8.1. İleri Oksidasyon Protein Ürünleri Tayini (İOPÜ) (Advanced Oxidation Protein Product, AOPP)	51
2.8.2. Malondialdehit (MDA) Tayini.....	52
2.8.3. 5-Hidroksimetilfurfural (HMF) Tayini	54
2.9. Enzim Aktivite Tayinleri.....	54
2.9.1. Örnek Hazırlama	54
2.9.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini	54
2.9.3. Katalaz Aktivite Tayinleri.....	56
2.9.4. Glukoz Oksidaz (GOx) Aktivite Tayini.....	58
2.10. Arı Sütü Ekstraktlarının Hazırlanması	59
2.11. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Gücü (FRAP) ile Antioksidan Aktivite Tayini	59
2.12. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikali Süpürme Aktivitesi Tayini.....	60
2.13. ABTS•+ (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) Radikali Süpürme Aktivitesi Tayini	61
2.14. İstatistiksel Analizler.....	63
3. BULGULAR.....	64

3.1. Arı Sütü Örneklerinin Nem ve Kuru Madde İçeriği (%).....	64
3.2. Arı Sütü Örneklerinin Fizikokimyasal Özellikleri	65
3.3. Arı Sütü Örneklerinin 10-HDA İçeriği	67
3.4. Arı Sütü Örneklerinin pH ve Titrasyon Asitliği Değerleri.....	69
3.5. Arı Sütü Örneklerinde <i>L</i> , <i>a</i> ve <i>b</i> Renk Ölçüm Değerleri.....	70
3.6. Arı Sütü Örneklerinin Protein Profili	73
3.7. Arı Sütü Örneklerinin Şeker Profili.....	82
3.8. Arı Sütü Örneklerinin Protein, Lipit ve Şeker Oksidasyon Ölçümleri	85
3.9. Arı Sütü Örneklerinde Bazı Enzimatik Aktivite Ölçümleri	90
3.10. Arı Sütü Örneklerinin Antioksidan Özellikleri	93
3.11. Bulguların Korelasyon ve PSL (Partial Least Squares/Kısmi En Küçük Kareler) Regresyonu Analizi	98
4. TARTIŞMA	102
4.1. Arı Sütü Örneklerinin Nem ve Kuru Madde İçeriği.....	102
4.2. Arı Sütü Örneklerinin Fizikokimyasal Özellikleri	104
4.3. Arı Sütü Örneklerinin 10-HDA İçeriği	106
4.4. Arı Sütü Örneklerinin pH ve Titrasyon Asitliği Değerleri.....	108
4.5. Arı Sütü Örneklerinin <i>L</i> , <i>a</i> ve <i>b</i> Renk Ölçüm Değerleri	110
4.6. Arı Sütü Örneklerinin Protein Profili	110
4.7. Arı Sütü Örneklerinin Şeker Profili.....	112
4.8. Arı Sütü Örneklerinin Protein, Lipit ve Karbohidat Oksidasyon Ölçümleri.....	115
4.8.1. İleri Oksidasyon Protein Ürünleri (İOPÜ) Ölçümleri.....	115
4.8.2. Malondialdehit (MDA) Ölçümleri	117
4.8.3. 5-Hidroksimetilfurfural (HMF) Ölçümleri	120
4.9. Arı Sütü Örneklerinde Bazı Enzimatik Aktivite Ölçümleri	122
4.10. Arı Sütü Örneklerinin Antioksidan Özellikleri	125
4.10.1. Antioksidan Aktivite	125
4.10.2. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Gücü (FRAP) ile Antioksidan Aktivite Tayini	125
4.10.3. DPPH ve ABTS Radikali Süpürme Aktivitesi Tayini	126
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	130
6. KAYNAKLAR	134
ÖZGEÇMİŞ	

Doktora Tezi

ÖZET

ARI SÜTÜNÜN TAZELİK KRİTERİ OLARAK PROTEİN VE LİPİT OKSİDASYON ÜRÜNLERİ İLE BAZI ENZİM AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Gülşah OKUMUŞ YÜKÜNÇ

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI
2025, 167 Sayfa

Arı sütü, son yıllarda ilaç, gıda ve kozmetik endüstrisinde fonksiyonel ve nutrasötik bir ürün olarak değerlendirilen, zengin kimyasal bileşime sahip bir arı ürünüdür. Isı, ışık ve oksijene duyarlı olduğu bildirilen arı sütü, uygun olmayan depolama koşullarında besinsel ve fonksiyonel özelliklerini kaybedebilmektedir. Bu çalışmada, farklı sıcaklık ve sürelerde depolanan arı sütlerinin fizikokimyasal, oksidasyon, enzimatik ve antioksidan özelliklerindeki değişimler incelendi. Düşük sıcaklık değerlerinde (-20°C ve $+4^{\circ}\text{C}$) muhafaza edilen arı sütü örneklerinde fizikokimyasal stabilitenin sağlandığı, oksidasyonun büyük ölçüde sınırlandırıldığı ve enzim aktivitelerinin önemli ölçüde korunduğu belirlendi. Ancak, oda sıcaklığında depolama, bazı fizikokimyasal parametrelerde değişikliklere, oksidasyon ürünlerinin konsantrasyonunda hızlı bir artışa ve enzim aktivitelerinde önemli düşüşlere neden oldu. Depolama koşullarına bağlı olarak oksidasyon ürünlerinde önemli değişimler saptandı; özellikle ileri oksidasyon protein ürünlerinin (İOPÜ) arı sütü tazeliğini değerlendirmek için uygun bir belirteç olabileceği belirlendi. Bulgular, depolama koşullarının optimize edilmesi ve arı sütünün tazeliğinin değerlendirilmesi için güvenilir kriterlerin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Arı sütü, Raf ömrü, Kalite, Tazelik, Oksidasyon, Enzim aktivitesi

PhD. Thesis

SUMMARY

DETERMINATION OF PROTEIN AND LIPID OXIDATION PRODUCTS AND SOME ENZYME ACTIVITIES AS FRESHNESS CRITERIA OF ROYAL JELLY

Gülşah OKUMUŞ YÜKÜNCÜ

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI
2025, 167 Pages

Royal jelly is a bee product with a rich chemical composition that has been evaluated as a functional and nutraceutical product in the pharmaceutical, food and cosmetic industries in recent years. Royal jelly, which is reported to be sensitive to heat, light and oxygen, can lose its nutritional and functional properties under inappropriate storage conditions. In this study, changes in the physicochemical, oxidation, enzymatic and antioxidant properties of royal jelly stored at different temperatures and time. It was determined that physicochemical stability was provided, oxidation was largely limited, and enzyme activities were significantly preserved in royal jelly samples stored at low temperature values (-20°C and $+4^{\circ}\text{C}$). However, storage at room temperature caused changes in some physicochemical parameters, a rapid increase in the concentration of oxidation products and significant decreases in enzyme activities. Significant changes were detected in oxidation products depending on storage conditions, and it was determined that advanced oxidation protein products (AOPP) could be a suitable indicator for evaluating royal jelly freshness. The findings contribute to the development of reliable criteria for optimizing storage conditions and assessing the freshness of royal jelly.

Key Words: Royal jelly, Shelf life, Quality, Freshness, Oxidation, Enzyme activity

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Arı sütü	1
Şekil 2. Gıdalarda bazı oksidasyon mekanizmaları	10
Şekil 3. Arı sütü örnekleri.....	43
Şekil 4. Arı sütü örneklerinde MDA tayini.....	53
Şekil 5. Oda sıcaklığında depolanan arı sütlerinde depolama süresine bağlı nem ve kuru madde değişimi.....	65
Şekil 6. BSA standart eğrisi (mg/mL).....	66
Şekil 7. 10-HDA standart eğrisi (µg/mL)	68
Şekil 8. Arı sütü örneklerinin <i>L</i> , <i>a</i> ve <i>b</i> renk ölçüm değerleri	71
Şekil 9. Arı sütü örneklerinin SDS-PAGE jel görüntüleri.....	74
Şekil 10. Taze arı sütünde tespit edilen protein pikleri.....	75
Şekil 11. Farklı sıcaklık ve sürelerde depolanan arı sütlerinde tespit edilen protein pikleri.....	76
Şekil 12. Kloramin T standart eğrisi (µmol/L)	86
Şekil 13. HMF standart eğrisi (ppm)	86
Şekil 14. Arı sütlerinin İOPÜ konsantrasyonunun sıcaklık ve zamana bağlı olarak değişimi.....	88
Şekil 15. Arı sütlerinin MDA konsantrasyonunun sıcaklık ve zamana bağlı olarak değişimi.....	89
Şekil 16. Oda sıcaklığında depolanan arı sütlerinde depolama süresine bağlı HMF değişimi.....	90
Şekil 17. Standart SOD aktivitesi ve % inhibisyon grafiği.....	91
Şekil 18. Log (Standart SOD aktivitesi) ve % inhibisyon grafiği.....	91
Şekil 19. FRAP tayininde kullanılan Troloks kalibrasyon grafiği.....	93
Şekil 20. FRAP tayininde kullanılan FeSO ₄ .7H ₂ O kalibrasyon grafiği	94
Şekil 21. DPPH• radikali süpürme aktivitesi tayininde kullanılan Troloks kalibrasyon grafiği.....	96
Şekil 22. ABTS•+ radikali süpürme aktivitesi tayininde kullanılan Troloks kalibrasyon grafiği.....	96
Şekil 23. VIP değerleri grafiği	100

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Arı sütünün vitamin ve mineral içerikleri.....	7
Tablo 2. Kullanılan cihazlar ve marka/model bilgileri	34
Tablo 3. Kimyasal maddeler ve satın alındıkları firma bilgileri	35
Tablo 4. Kimyasal analizlerde kullanılan çözeltiler.....	37
Tablo 5. Bradford metodu analiz prosedürü	47
Tablo 6. SDS-PAGE analizinde pipetleme işlemleri	50
Tablo 7. HPLC-RID sisteminde standartlara ait gözlemlenebilme ve tayin limit değerleri	51
Tablo 8. İOPÜ analizi prosedürü	52
Tablo 9. MDA tayininde yapılan pipetleme işlemleri.....	53
Tablo 10. SOD aktivitesi ölçümü.....	55
Tablo 11. Katalaz aktivitesi ölçümü (Aebi, 1984)	56
Tablo 12. Katalaz aktivitesi ölçümü (Lartillot vd., 1988).....	57
Tablo 13. GOx aktivite tayini analiz prosedürü	58
Tablo 14. Demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) analiz prosedürü.....	59
Tablo 15. DPPH• radikali süpürme aktivitesi tayininde (SC ₅₀) yapılan pipetleme işlemi.....	60
Tablo 16. DPPH• radikali süpürme aktivitesi tayininde (Troluks eşdeğeri) yapılan pipetleme işlemi.....	61
Tablo 17. ABTS•+ radikali süpürme aktivitesi tayininde (SC ₅₀) yapılan pipetleme işlemi.....	62
Tablo 18. ABTS•+ radikali süpürme aktivitesi tayininde (Troluks eşdeğeri) yapılan pipetleme işlemi	62
Tablo 19. Arı sütü örneklerinin nem ve kuru madde içeriği	64
Tablo 20. Arı sütü örneklerinin fizikokimyasal parametreleri.....	66
Tablo 21. Arı sütü örneklerinde 10-HDA içeriği	68
Tablo 22. Arı sütü örneklerinin pH ve titrasyon asitlik değerleri	69
Tablo 23. Arı sütü örneklerinin protein oranları (%)	79
Tablo 24. Arı sütü örneklerinin şeker içerikleri (%).....	83
Tablo 25. Farklı sıcaklık ve sürelerde depolanan arı sütü örneklerinin oksidasyon ölçümleri.....	87
Tablo 26. Farklı sıcaklık ve sürelerde depolanan arı sütü örneklerinin enzimatik aktivite ölçümleri	92

Tablo 27.	Farklı sıcaklık ve sürelerde depolanan arı sütü örneklerinin antioksidan aktivite ölçümleri	94
Tablo 28.	Arı sütü örneklerinin DPPH ve ABTS radikal temizleme aktivitesi ölçümleri	97
Tablo 29.	Arı sütü örneklerine ait bazı bulguların korelasyonu	99
Tablo 30.	PSLR analizinde model parametreleri tablosu	101



SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

10-H2DA	: trans-10-hidroksi-2-dekanoik asit
10-HDA	: 10-hidroksidekanoik asit
ABTS	: 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit
AGE	: İleri glikasyon son ürünleri
BSA	: Sığır serum albümin
CAT	: Katalaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
FRAP	: Demir (III) indirgeme antioksidan gücü
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
GOx	: Glukoz oksidaz
GPx	: Glutasyon peroksidaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HMF	: 5-hidroksimetilfurfural
HPLC-RID	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi- Kırılma indisi dedektörü
İOPÜ	: İleri oksidasyon protein ürünleri
LOD	: Tespit limiti
LOQ	: Miktar belirleme limiti
MDA	: Malondialdehit
MHB	: Metil 4-hidroksibenzoat
MHB	: Metil 4-hidroksibenzoat
MRJP	: Majör arı sütü proteini
NBT	: Nitroblue tetrazolium
POx	: Peroksidaz
PPO	: Polifenol oksidaz
PLS	: Partial least squares/Kısmi en küçük kareler
RNT	: Reaktif azot türleri
ROT	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SC50	: Radikali yarıya indiren numune konsantrasyonu

SDS-PAGE: Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid jel elektroforezi

SOD : Süperoksit dismutaz

TBA : Tiyoarbutirik asit

TCA : Trikloroasetik asit

TE : Troloks eşdeğeri

TPTZ : 2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazin

U : Enzim ünitesi

UV : Ultraviyole

UV-Vis : Ultraviyole-Görünür Bölge

°C : Santigrat derece

µg : Mikrogram

µL : Mikrolitre

µm : Mikrometre

µM : Mikromolar

g : Gram

kDa : Kilodalton

kg : Kilogram

mg : Miligram

mL : Mililitre

mM : Milimolar

p : Anlamlılık değeri

r : Korelasyon katsayısı

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Arı Sütü: Genel Özellikleri ve Bileşimi

Arı sütü (Royal Jelly, RJ), 5 ile 15 günlük genç işçi bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından hipofarenks ve mandibular bezlerden salgılanır (Şekil 1). Kraliçe arılar ve larvalar için temel bir besin kaynağı olan bu salgı, gelişim ve sağlık üzerinde hayati bir rol oynayan kompleks ve besleyici bir bileşimdir. Yüksükteki her bir larva hücresinin dibine bırakılan arı sütü, polen ve nektarın kısmen sindirilmesiyle üretilmektedir (Dimou vd., 2007; Miguel & El-Guendouz vd., 2017). Tüm arı larvaları, yaşamlarının ilk üç gününde arı sütüyle beslenmektedir, ancak kraliçe arı olarak seçilen larva, yaşamı boyunca yalnızca arı sütüyle beslenmeye devam etmektedir. Arı sütünün, arıların yaşam süresi üzerinde önemli bir etkisi bulunmaktadır; işçi arılar ortalama 45 gün yaşarken, kraliçe arılar 5 yıla kadar hayatta kalabilmektedir. Ayrıca, bir kraliçe arı, yaşam döngüsü boyunca günde kendi ağırlığına eşdeğer 2000-3000 yumurta bırakabilmektedir (Al-Lawati, 2009).



Şekil 1. Arı sütü

Arı sütü, fiziksel ve duyuşsal özellikleri açısından önemli kalite kriterlerine sahiptir. Arıların farklı çiçek kaynaklarından topladığı, çözünmemiş polen granüllerinin varlığı nedeniyle arı sütü heterojen bir dokuya sahiptir (Mazzei vd., 2020). Depolamaya bağlı olarak koyulaşma eğilimi gösteren kremsi-sarımsı bir renkle karakterize edilmektedir (Miguel &

El-Guendouz vd., 2017). Ayırt edici keskin bir kokusu ve ekşi-tatlı bir tadı vardır. Kısmen suda çözünmektedir ve pH 3,4-4,5 arasında değişen yüksek bir tamponlama kapasitesine sahiptir. Ayrıca jelatinimsi kıvamı, su içeriği ve tazelik durumuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Sabatini, 2009).

1.2. Arı Sütünün Kimyasal Bileşimi

Arı sütü, arıların gelişimi ve farklılaşmasının yanı sıra insan beslenmesi açısından da önemli bir besin kaynağıdır. Arı sütünün kimyasal bileşiminin büyük çoğunluğunu su oluşturmakta (%60-70); kuru madde içeriği ise proteinler (%9-18), karbohidratlar (%7-18), lipitler (%3-8) ile daha düşük oranlarda mineraller ve vitaminlerden oluşmaktadır (Ahmad vd., 2020). Ana bileşenlerin yanı sıra, arı sütü 10-hidroksidekanoik asit (10-HDA) ve trans-10-hidroksi-2-dekanoik asit (10-H2DA) başta olmak üzere yağ asitleri, peptidler ve fenolik bileşikler gibi çeşitli biyoaktif maddeler içermektedir. Bu bileşikler, arı sütünün geniş farmakolojik etkilerine ve sağlık yararlarına önemli ölçüde katkı sağlamaktadır (Pasupuleti vd., 2017; Khazaei vd., 2018). Arı sütünün fizikokimyasal özellikleri, arı ırkı ve kolonisine bağlı olarak büyük ölçüde stabilitesini korumakla birlikte; arıların beslenmesi, hasat dönemi, kovadaki hijyen koşulları, çevresel faktörler ve kullanılan örnekleme ile analiz yöntemleri gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Ramanathan vd., 2018; Flanjak vd., 2019; Maghsoudlou vd., 2019).

1.2.1. Su İçeriği

Arı sütünde %60 ile %70 arasında değişen su içeriği, fizikokimyasal özellikleri ve bileşenlerle etkileşimi açısından farklı formlarda bulunur. Su içeriği, larvaların gelişimi ve kraliçe arının metabolik ihtiyaçlarının karşılanmasında kritik bir bileşen olarak kabul edilmektedir (Sesta & Lusco, 2008; Sabatini vd., 2009). Ayrıca, arı sütü kovan içerisindeki nem dengesini koruyarak çevresel koşullara uyum sağlamasına katkıda bulunmaktadır (Nabas vd., 2014).

Suyun serbest ve bağlı formları, arı sütünün hem besin çözünürlüğü ve biyoyararlanımının artırılmasında hem de ürün stabilitesi ve biyoaktif özelliklerin korunmasında önemli rol oynamaktadır (El-Guendouz vd., 2020). Serbest su, gıda bileşenleri ile sınırlı etkileşime sahip, buharlaşabilen, donabilen ve mikrobiyal aktiviteyi

destekleyen form olup, gıdalardaki su aktivitesi (a_w) ile doğrudan ilişkilidir (Isengard, 2001). Buna karşın, bağlı su; proteinler ve polisakkaritler gibi makromoleküllerle hidrojen veya iyonik bağlar oluşturarak düşük buhar basıncına sahip olur ve donma noktasında belirgin değişiklikler gösterir. Bu özellikleri nedeniyle bağlı su, mikrobiyal gelişim ve enzimatik reaksiyonlara serbest suya kıyasla daha az katkı sağladığından, özellikle depolamaya bağlı arı sütü stabilitesinin korunmasında önemli bir faktördür (Maltini vd., 2003). Arı sütü, yüksek su içeriği nedeniyle, depolama koşullarında stabilitesini kaybedebilmektedir. Bu nedenle, biyoaktif bileşenlerin korunması ve raf ömrünün uzatılması için liyofilizasyon ve kapsülasyon gibi yöntemler kullanılmaktadır (Kausar & More, 2019; Spanidi vd., 2022; Ghadimi-Garjan vd., 2023). Arı sütünün raf ömrünü uzatmayı amaçlayan bir patent çalışmasında, arı sütü ve jelatin içeren mikroenkapsülasyon tekniği kullanılmıştır (Cinar vd., 2018). Arı sütündeki su miktarı, aynı zamanda arı sütü kalitesinin belirlenmesinde temel bir parametre olarak değerlendirilmektedir (Sesta & Lusco, 2008; Sabatini vd., 2009).

Arı sütündeki su içeriği, içerdiği besin maddelerinin konsantrasyonu ve fonksiyonelliği üzerinde önemli bir rol oynamaktadır (Alu'datt vd., 2024). Yüksek su içeriği, proteinler, lipitler ve karbohidratlar gibi temel bileşenlerin konsantrasyonlarını seyreltmektedir. Bu nedenle, bu bileşenlerin biyolojik aktiviteleri ve besin değerleri su içeriği oranına bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir (Hashemirad vd., 2024). Bu durum, özellikle arı sütü içeren diyet takviyeleri ve fonksiyonel gıdaların etkilerinin değerlendirilmesinde dikkate alınması gereken önemli bir parametredir. Su içeriği, besin çözünürlüğü ve emilimdeki rolünün yanı sıra, arı sütünün biyoaktif özellikleri açısından da büyük önem taşımaktadır. Su, biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunu kolaylaştırarak arı sütünün potansiyel sağlık yararlarını artırmaktadır (Vazhacharickal vd., 2021). Bu durum, arı sütünün hem geleneksel hem de modern tıp uygulamalarında fonksiyonel ürün olarak kullanımına katkı sağlamaktadır.

1.2.2. Protein ve Amino Asit Bileşimi

Arı sütü, %12-15 oranındaki zengin protein içeriği ve kendine özgü protein çeşitliliği ile besin değeri yüksek bir üründür (Qiao vd., 2018; Zhang vd., 2019). Arı sütünün protein içeriği, özellikle majör arı sütü proteinleri (MRJP'ler) olmak üzere çeşitli proteinler, peptitler ve amino asitlerden oluşmaktadır (Alam vd., 2023). Bununla birlikte daha az miktarda çeşitli hormonlar (testosteron, progesteron, prolaktin, estradiol) içermektedir. Arı sütü protein ve

peptitleri, kraliçe arının gelişimi, bağışıklığın desteklenmesi, antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteler gibi önemli biyoaktiviteler göstermektedir (Mureşan vd., 2022). Arı sütünün protein içeriği ve bileşimi, coğrafi köken, arı türü, hasat zamanı, depolama ve işleme yöntemleri gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Sano vd., 2003; Qiao vd., 2018). Arı sütü protein fraksiyonunun başlıca bileşenleri, toplam arı sütü proteinlerinin yaklaşık %82-90'ını oluşturan MRJP'lerdir (Zhang vd., 2019). MRJP ailesi hem besinsel hem de biyolojik işlevlere sahip dokuz farklı proteinden oluşmakta ve bu proteinler, özellikle kraliçe arının gelişimi ve farklılaşmasında önemli roller üstlenmektedir (Buttstedt vd., 2018). MRJP1'den MRJP5'e kadar olan proteinler, besinsel fonksiyonlara katkıda bulunurken; MRJP6-MRJP8, besinsel olmayan özellikler taşımaktadır. MRJP9 ise her iki gruba ait bazı fonksiyonları içermektedir (Ramanathan vd., 2018). MRJP1, toplam arı sütü proteinlerinin yaklaşık %50'sini oluşturarak en fazla bulunan başlıca protein olarak öne çıkmaktadır (Zhang vd., 2019). Ayrıca, MRJP1'in bal arılarında öğrenme, hafıza, görev atama ve sosyal davranışlar gibi beyin fonksiyonlarında önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir (Tian vd., 2018). Yeni proteomik analizler ise biyolojik fonksiyonları henüz tam olarak tanımlanamamış olan MRJP10'un da varlığını bildirmektedir (Uversky vd., 2021).

MRJP'lerin yanı sıra, arı sütü; apismin, royalisin ve royalaktin gibi farklı proteinler ve peptitleri de içermektedir. Royalaktin, MRJP1'in monomerik formu olarak tanımlanırken, apisin ise MRJP1'in oligomerik formu olarak, arı sütüne viskozitesini kazandıran fibril ağının oluşumunda rol oynamaktadır. Jelleinler (Jellein I-IV), MRJP1'in enzimatik hidrolizi sonucu oluşan kısa zincirli peptitlerdir ve antimikrobiyal özellikleri ile öne çıkmaktadır (Tamura vd., 2009; Uversky vd., 2021; Mureşan vd., 2022). Özellikle royalisin, Gram pozitif bakterilere ve Amerikan yavru çürüklüğüne neden olan *Paenibacillus larvae* gibi belirli patojenlere karşı geniş bir inhibitör etki spektrumu gösteren, pH ve sıcaklık değişimlerine dayanıklı bir antimikrobiyal peptittir (Yükünç, 2019).

MRJP'ler, başlıca lizin, arginin, valin, histidin, metiyonin, lösin, izolösin, treonin, fenilalanin ve triptofan olmak üzere çeşitli esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitleri içermektedir. Bu amino asit bileşimi, kazein ve ovalbumin gibi diğer proteinlerle benzerlik göstermektedir (Ramadan & Al-Ghamdi, 2012). Bu bileşenler arasında en fazla bulunan amino asit lizin olup, miktarı 62,43 mg/100 g olarak belirlenmiştir. Lizini sırasıyla prolin (58,76 mg/100 g), sistin (21,76 mg/100 g) ve aspartik asit (17,33 mg/100 g) takip etmektedir. Valin, glutamik asit, glisin, serin, treonin, sistein, alanin, lösin, izolösin, hidroksiprolin, glutamin, fenilalanin ve tirozin gibi diğer amino asitler ise daha düşük miktarlarda

bulunmaktadır (Guo vd., 2021). Bununla birlikte, arı sütünün amino asit profili, arıların beslenmesi, hasat dönemi ve polen kaynağına bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir (Liming vd., 2009; Alcalá-Escamilla & Moguel-Ordóñez, 2024).

1.2.3. Karbohidratlar

Arı sütünün çeşitli bileşenleri arasında karbohidratlar, besleyici özellikleri ve biyolojik aktivitelerinde önemli katkı sağlamaktadır. Karbohidratlar, arı sütü bileşiminin yaklaşık %10-15'ni oluştururken, şeker içeriğinin %90'ı glukoz ve fruktozdan meydana gelmektedir (Xue vd., 2017). Arı sütünde yaygın olarak bulunan sakkaroz, toplam karbohidrat içeriğinin yaklaşık %0,6-3,6'sini oluşturmaktadır. Az miktarda galaktoz, mannitol, trehaloz ve riboz gibi şekerler de tespit edilmiş olup, bu şekerlerin ürünün kalite ve özgünlüğünün bir göstergesi olarak değerlendirilebileceği bildirilmiştir (Sabatini vd., 2009; Collazo vd., 2021). Fruktoz, glukoz ve sakkarozun yanı sıra, diğer oligosakkaritlerin varlığı, arı sütünün bir diyet takviyesi ve işlevsel bir gıda olarak kullanımı açısından önem taşımaktadır. Arı sütünün karbohidrat içeriği, polen kaynakları, arı türü, iklim koşulları, mevsim ve coğrafi bölge gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Khalfan Saeed Alwali Alkindi vd., 2024). Arı sütündeki karbohidratlar, arı sütünün enerji değeri, tat ve viskozitesine katkı sağlamakla birlikte, biyoaktif özelliklerinde de rol oynar. Fruktoz ve glukoz gibi şekerlerin antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteler sergilediği, enfeksiyonlara karşı koruma sağlayabileceği bildirilmiştir (Pasupuleti vd., 2017). Ayrıca, trehaloz gibi oligosakkaritler hücrel koruma ve stres direnciyle ilişkilendirilmiştir (Kumar vd., 2024).

1.2.4. Lipitler ve Yağ Asitleri

Arı sütü hem besin değeri hem de biyolojik aktiviteleri açısından önemli katkılar sağlayan çeşitli lipitler ve yağ asitleri içermektedir. Arı sütü bileşiminin %3-8'ini lipitler oluşturmakta olup, bu lipitlerin büyük bir kısmı 8-12 karbon atomu içeren kısa ve orta zincirli yağ asitlerinden meydana gelmektedir (Kodai vd., 2011; Mureşan vd., 2016; Sari vd., 2021; Ghosh vd., 2024). Bu yağ asitleri, mono- ve di- hidroksi yapıları ile zincirlerinde dikarboksilik gruplar içermektedir (Abdelhafiz & Muhamad, 2008). Bu özellikler, arı sütünde bulunan yağ asitlerine bitki ve hayvansal lipitlerden ayırt edici bir karakter kazandırmaktadır (Sabatini vd., 2009; Kocot vd., 2018). Arı sütünün karakteristik yağ asitleri arasında, 10 karbonlu bir hidroksi asit olan 10-hidroksidekanoik asit (10-HDA,

C₁₀H₂₀O₃) ve trans-10-hidroksi-2-dekanoik asit (10-H₂DA, C₁₀H₁₈O₃) yer almaktadır. Bunun yanı sıra, 10 karbonlu bir dikarboksilik asit olan sebasik asit (SA, C₁₀H₁₈O₄) de arı sütündeki önemli bileşenler arasında bulunmaktadır (Ferioli vd., 2014). Ayrıca, lipit profili 8-hidroksioktanoik asit (8-HOC), 3,10-dihidroksidekanedioik asit (3,10-HDecDA) ve 9-hidroksi-2-dekanoik asit (9-HDA) gibi diğer hidroksi ve dikarboksilik yağ asitlerini de içermektedir (Guo vd., 2021). Bu benzersiz yağ asitleri, arı sütünün besin değerine katkı sağlamakta ve antimikrobiyal ile immünomodülatör etkileri gibi biyolojik aktivitelerinde önemli rol oynamaktadır (Yu vd., 2023).

Arı sütünün lipit profili polen çeşitliliği, iklim koşulları, çevresel faktörler ve arıların besin kaynaklarına bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir (Ma vd., 2022; Čeksterytė vd., 2023). Arı sütünün lipit bileşimi, özellikle ürünün saflığını ve özgünlüğünün belirlenmesinde önemli bir kriter olarak öne çıkmaktadır. Lipit profilinde gözlemlenen farklılıkların, üründe taklit ve tağşişin bir göstergesi olabileceği bildirilmektedir (Wang vd., 2021; Alattal vd., 2025). Bu nedenle lipit profilinin, arı sütünün kalite kontrol süreçlerinde standart bir değerlendirme yöntemi olarak kullanılabileceği öngörülmektedir.

Arı sütündeki öne çıkan bileşenlerden biri, 10 karbonlu bir hidroksi asit olan 10-HDA'dır. Bu yağ asidi, arı sütü dışında başka hiçbir biyolojik üründe bulunmadığı için arı sütünün kalite ve özgünlüğünü belirleyen önemli bir belirteçtir (Bărnăușu vd., 2011; Collazo vd., 2021). Coğrafi köken, arıların beslenme düzeni ve üretim koşulları gibi faktörlere bağlı olarak %1-6 arasında değişen oranlarda bulunmaktadır (Wei vd., 2013; Dubey vd., 2022). 10-HDA, antimikrobiyal, anti-inflamatuar ve bağışıklık düzenleyici özellikleriyle arı sütünün biyolojik aktivitelerinde önemli rol oynamaktadır (Melliou & Chinou, 2005; Kazemi vd., 2019; Fallah vd., 2022). 10-HDA, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Salmonella enteritidis* ve *Escherichia coli* ATCC 25922 gibi Gram negatif bakterilere, *Candida albicans* ATCC 10351, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 mayaları ve *Penicillium digitatum*, *Aspergillus flavus* mantarlarına karşı güçlü antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Gao vd., 2022; Ulubayram & Çınar, 2023). Ayrıca, 10-HDA'nın arı hastalıklarından biri olan Amerikan yavru çürüklüğü ve diğer virülans bakteriyel arı enfeksiyonlarına neden olan *Paenibacillus larvae* üzerinde de etkili olduğu belirlenmiştir (Sediva vd. 2018). Bazı çalışmalar, 10-HDA'nın hem hücresel düzeyde hem de *in vivo* modellerde inflamasyonu azaltıcı etkiler gösterdiğini belirleyerek arı sütünün anti-inflamatuar etkisini bildirmektedir (Oršolić vd., 2004; Chen vd., 2018; Yang vd., 2018).

1.2.5. Vitaminler ve Mineraller

Arı sütü, her biri kendine özgü biyolojik özelliklere ve sağlık yararlarına katkıda bulunan çeşitli vitaminler ve mineraller içermektedir (Tablo 1) (Stocker vd., 2005; Maghsoudlou vd., 2019).

Tablo 1. Arı sütünün vitamin ve mineral içerikleri

Vitamin ve mineraller	mg/100 g
B ₁ (Tiamin)	0,1-1,7
B ₂ (Riboflavin)	0,5-2,5
B ₃ (Niasin)	4,5-19
B ₅ (Pantotenik asit)	3,6-23
B ₆ (Piridoksin)	0,2-5,5
H (Biotin, B7)	0,15-0,55
Pantotenik Asit	0,2-0,25
Nikotinik Asit	0,4-0,48
Folik Asit	0,01-0,06
İnositol	0,1-0.12
Potasyum	200-1000
Magnezyum	20-100
Demir	1-11
Çinko	0,7-8
Bakır	0,33-1,6

Arı sütü, metabolik süreçlerde önemli rol oynayan ve sağlık üzerinde olumlu katkı sağlayan çeşitli vitaminler açısından zengin bir içeriğe sahiptir. Özellikle B grubu vitaminleri bakımından öne çıkan arı sütünde, bu vitaminlerin miktarları değişiklik göstermektedir (Stranç vd., 2019; Spanidi vd., 2022). Ayrıca arı sütünde diğer bir suda çözünen vitamin olan C vitamini (askorbik asit) düşük miktarlarda bulunurken, yağda çözünen vitaminler (A, D, E ve K) tespit edilememiştir (Fratini vd., 2016b). B vitaminleri, koenzim olarak birçok biyokimyasal reaksiyona katılarak enerji metabolizmasında görev

almaktadır. Riboflavin, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. Niasin ise hücrel solunum ve enerji üretiminde önemli olan NADH ve NADPH'nın sentezine katılmaktadır. Folik asitin DNA sentezi ve onarım süreçlerinde görev alması, özellikle kraliçe larvalarının hızlı büyüme ve gelişme dönemlerinde büyük önem taşımaktadır (Collazo vd., 2021).

Arı sütü, kuru maddesinin %2-5'ini oluşturan zengin bir mineral içeriğine sahiptir (El-Guendouz vd., 2020). Mineral bileşimi, diğer bileşenlerin aksine çevresel faktörlerden etkilenmemekte ve yüksek oranda stabilitesini korumaktadır (Sabatini vd., 2009). Arı sütünde potasyum (K), magnezyum (Mg) ve demir (Fe) gibi makro ve mikro elementler ön plana çıkarken; kalsiyum (Ca), sodyum (Na), manganez (Mn) ve alüminyum (Al) da sıkça rastlanan mineraller arasında yer almaktadır. Bunun yanı sıra eser miktarda baryum (Ba), stronsiyum (Sr), bizmut (Bi), kadmiyum (Cd), cıva (Hg), kurşun (Pb), kalay (Sn), tellür (Te), talyum (Tl), volfram (W), antimon (Sb), krom (Cr), nikel (Ni), titanyum (Ti), kobalt (Co) ve molibden (Mo) gibi elementler de tespit edilmiştir (Matuszewska vd., 2021). Bu mineraller, çeşitli fizyolojik süreçlerde görev almaktadır. Potasyum, sıvı dengesinin korunması, sinir iletimi ve kas kasılmalarında önemli bir rol üstlenirken; kalsiyum, kemik sağlığı, kan pıhtılaşması ve kas fonksiyonları için kritik öneme sahiptir (Kunugi & Mohammed Ali, 2019). Magnezyum, enerji üretimi ve protein sentezini içeren 300'den fazla enzimatik reaksiyonda yer alırken; demir, oksijenin kanda taşınmasını sağlamaktadır. Ayrıca manganez ve çinko, bağışıklık sistemi işlevleri ile antioksidan savunmada önemli katkılarda bulunmaktadır (Sidor vd., 2021; Ghosh vd., 2024).

1.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Canlıların yaşamlarını sürdürebilmeleri için ihtiyaç duydukları enerji, karbon ve hidrojen bakımından zengin olan glukoz ve yağ asitleri gibi moleküllerin oksidasyonu sonucu elde edilmektedir. Oksijen, biyolojik yaşamın devamı için temel bir unsur olmasına rağmen, metabolizmadaki kullanımı sırasında oksijen içeren serbest radikallerin oluşmasına neden olmaktadır. Bu serbest radikaller, “reaktif oksijen/azot türleri (ROT/RAT)” olarak adlandırılmaktadır (Liochev, 2013; Lushchak, 2014).

Serbest radikaller, metabolik süreçlerin bir yan ürünü olarak ortaya çıkmakta ve enerji üretimi ile elektron transferi gibi temel biyokimyasal işlevlerde rol almaktadır. Bununla birlikte, yüksek reaktiviteye sahip olmaları ve eşleşmemiş elektronlar içermeleri nedeniyle,

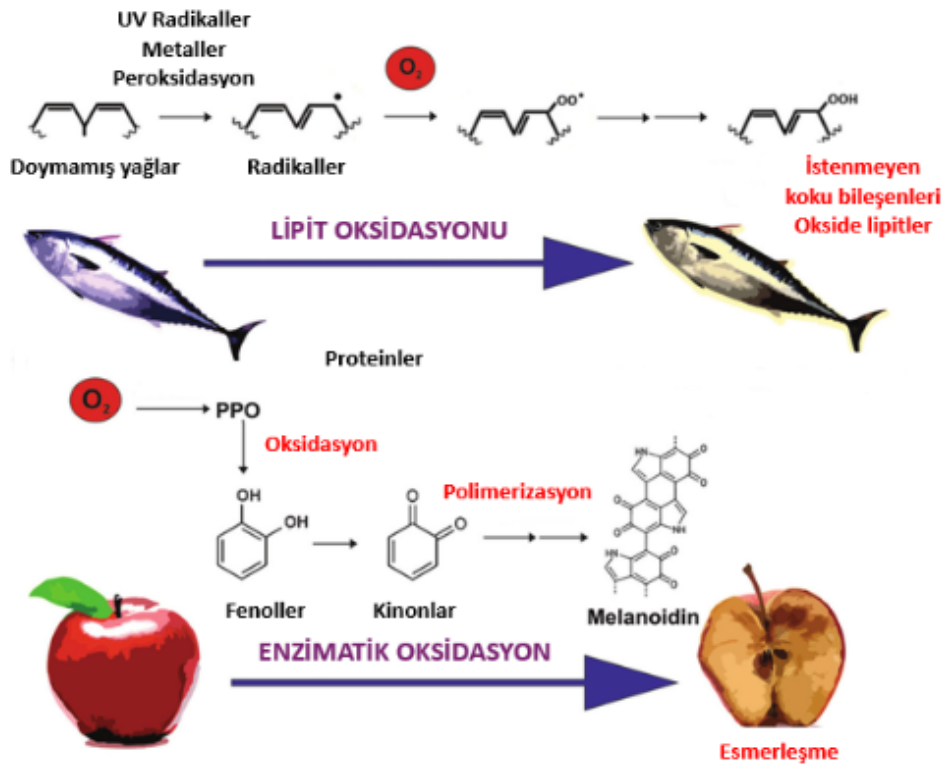
kontROLSÜZ bir zincirleme reaksiyon oluştuğunda hücre zarında ve lipit, protein, enzim, karbohidrat ve nükleik asit gibi hücrel bileşenlerde hasara yol açabilmektedir (Altınışik, 2000; Zempleri & Dakshinamurti, 2005). Bu reaktif türler, hücrel solunum ve besin metabolizması gibi doğal biyolojik süreçlerin bir yan ürünü olarak oluşabilmekte, ayrıca stres, virüsler, enfeksiyonlar, toksik kimyasallar, pestisitler, ilaçların toksik etkileri, iyonlaştırıcı ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği ve sigara dumanı gibi çevresel ve dışsal faktörler sonucunda da meydana gelebilmektedir (Reest vd., 2018; Jelinek vd., 2021).

Normal koşullar altında, serbest radikallerin oluşumu ve yıkımı hücre içinde dengeli bir şekilde düzenlenmektedir. Oksidatif stres ile antioksidan savunmalar arasındaki dengenin korunması, metabolik sağlığın korunması ve hastalıkların önlenmesi açısından kritik bir önem taşımaktadır (Lejava vd., 2021). Ancak, vücudun antioksidan savunma mekanizmasının ROT'ların üretimine karşı yetersiz kaldığı durumlarda, "oksidatif stres" olarak adlandırılan bir dengesizlik ortaya çıkmaktadır (Han vd., 2021; Jelinek vd., 2021). Oksidatif stres, hücrel hasara yol açarak yaşlanma, kanser, kalp-damar hastalıkları, akciğer hastalıkları, nörodejeneratif bozukluklar, diyabet ve katarakt gibi çeşitli metabolik hastalıkların oluşumuna neden olmaktadır (Khansari vd., 2009; Reuter vd., 2010; Hybertson vd., 2011; Bamdad vd., 2015). Yüksek seviyelerde ROT'lar, obezite, insülin direnci ve dislipidemi ile ilişkilendirilmektedir (Oliver vd., 2010). Araştırmalar, aşırı kalori alımının protein karbonilasyonu ve lipit peroksidasyonu ürünlerini artırarak akut oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir. Bu oksidatif hasar, metabolik sinyal yollarını bozarak insülin direnci ve diğer metabolik işlev bozukluklarının meydana gelmesine neden olmaktadır (Matsuda & Shimomura, 2013; Boden vd., 2015; Jiang vd., 2021).

Gıda işleme sürecinde oksidatif stres, ürün kalitesini ve güvenliğini etkileyen önemli faktörlerden biridir. Gıdaların üretimi ve depolanması sırasında, lipit, protein ve karbohidrat gibi bileşenler; nem, ısı, ışık, metaller ve enzimler tarafından katalizlenen oksidatif reaksiyonlar veya kimyasal süreçler sonucunda besin değeri kayıpları, yağlarda acılaşma ve renk değişimleri meydana gelmektedir (Lobo vd., 2010; Pazos & Medina, 2014; Geng vd., 2023). Oksidatif stres, gıda bileşenlerinin metabolik sürecinde meydana gelen değişimler sonucu besin değerlerinde farklılıklara neden olabilmektedir. Proteinlerin oksidatif değişimleri, yapılarını ve fonksiyonlarını bozarak sindirim ve emilim süreçlerini olumsuz etkilemektedir (Estévez & Luna, 2017). Lipit oksidasyon ürünlerinin proteinlerle etkileşimi, besin değerini ve biyoyararlanımını düşürmektedir (Geng vd., 2023).

1.4. Gıdalarda Oksidasyon Mekanizması

Gıda bileşenleri, işleme, taşıma ve depolama süreçlerinde çeşitli kimyasal reaksiyonlara maruz kalmaktadır. Özellikle lipitler ve proteinler gibi birçok besin ögesi, yapısal olarak kararsız olduklarından dolayı, bu bileşenlerin işleme aşamasından depolamaya kadar olan süreçteki değişimleri büyük önem taşımaktadır (Alzagat & Alli, 2002; Maqsood vd., 2012). Bu kimyasal süreçler arasında oksidasyon, gıdalarda kalite, güvenlik ve besin değerini olumsuz yönde etkileyen kompleks biyokimyasal süreçler zincirini oluşturmaktadır (Merino vd., 2022; Şekil 2). Bu süreç, gıda bileşenlerinin, özellikle lipitler ve proteinlerin oksijenle reaksiyona girmesiyle başlamakta ve çeşitli bozunma ürünlerinin oluşmasına neden olmaktadır (Domínguez vd., 2019). Meydana gelen bu bozunma ürünleri, gıdaların tazelik ve besleyici özelliklerinde kayıplara yol açmakta; tat, renk, doku ve besin içeriğinde istenmeyen değişikliklere neden olmakta ve aynı zamanda insan sağlığı üzerinde olumsuz etkiler yaratmaktadır (Shahidi, 2000; Erickson vd., 2023).



Şekil 2. Gıdalarda bazı oksidasyon mekanizmaları

1.4.1. Lipit Oksidasyonu

Lipit oksidasyonu, gıda bozulmasının başlıca nedenlerinden biridir. Lipit oksidasyonu, lipitlerde yapısal değişime, tat ve aroma kaybına yol açan; aynı zamanda sağlık üzerinde zararlı etkiler oluşturabilecek çeşitli oksidatif ürünlerin oluşmasına neden olan bir süreçtir (Wąsowicz vd., 2004; Wang vd., 2023). Lipit oksidasyonu, serbest radikal zincir reaksiyonları aracılığıyla başlamakta ve hidroperoksitlerin yanı sıra aldehitler ve ketonlar gibi ikincil oksidasyon ürünlerinin oluşmasına yol açmaktadır. Lipit oksidasyonu, başlangıç, yayılma ve sonlanma olmak üzere üç temel aşamada gerçekleşmektedir (Zhu vd., 2018). Başlangıç aşamasında, serbest radikaller lipitlerle reaksiyona girmekte ve lipit radikallerinin oluşumuna neden olan otooksidasyon süreci gerçekleşmektedir. Bu radikaller, oksidasyon sürecinin temel ara ürünleri olan lipit peroksil radikallerini oluşturmak üzere moleküler oksijenle reaksiyona girmektedir (Zamora & Hidalgo, 2011; Laguerre vd., 2017). Yayılma aşamasında, lipit peroksil radikalleri diğer lipit molekülleriyle reaksiyona girerek lipit hidroperoksitlerinin oluşumuna yol açmaktadır. Bu hidroperoksitler, sıcaklık, basınç ve oksijen konsantrasyonuna bağlı olarak aldehitler, ketonlar ve alkoller gibi farklı ikincil oksidasyon ürünlerine parçalanarak esansiyel yağ asitlerinin bozunması, tat, koku ve aroma bozukluklarına neden olmaktadır (Ahmed vd., 2016).

Lipit oksidasyonunun hızını ve kapsamını etkileyen birçok faktör bulunmakta; bunlar arasında yağ asitlerinin doymamışlık derecesi, antioksidan içeriği, sıcaklık, ışık ve pro-oksidan metaller öne çıkmaktadır (Zhu vd., 2018; Bao & Pignitter, 2023). Özellikle çift bağ içermeleri nedeniyle oksidasyona karşı daha hassas olan doymamış yağ asitleri, bu faktörler arasında en kritik olanıdır. Doymamış lipitlerin oksidasyonu hem enzimatik hem de enzimatik olmayan mekanizmalarla gerçekleşmekte olup, ROT'lar bu sürecin başlatılmasında önemli bir rol oynamaktadır (Niki vd., 2005; Oenel vd., 2017). Demir ve bakır gibi geçiş metalleri, lipit hidroperoksitlerinin serbest radikallere parçalanmasını kolaylaştırarak oksidasyon sürecini hızlandırmaktadır (Valko vd., 2005; Berton-Carabin vd., 2014). Işık, özellikle yenilebilir yağlarda lipit oksidasyonunu hızlandıran önemli bir faktördür. Fotooksidasyon, lipitlerin ışığa maruz kalması sonucu gerçekleşmekte ve lipit hidroperoksitleri ile farklı serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır (Cardenia vd., 2013). Bu durum, özellikle gıda depolama ve işleme süreçlerinde ciddi bir sorun yaratmakta, lipit içeren ürünlerin raf ömrünü ve kalitesini belirgin şekilde azaltmaktadır.

1.4.2. Protein Oksidasyonu

Protein oksidasyonu, proteinlerin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinde değişikliklere yol açarak hücrel sağlığı olumsuz etkilemekte ve birçok hastalığın oluşumunda rol oynamaktadır. Protein karbonilleri gibi oksidatif modifikasyonlar, oksidatif stresin önemli bir göstergesi olarak kabul edilmekte ve nörodejeneratif hastalıklar ile metabolik sendromlar gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmektedir (Dalle-Donne vd., 2005; Martín-Gallán vd., 2007; Rojas-Gutierrez vd., 2017; Wang vd., 2022a). Oksitlenmiş proteinlerin birikimi, hücrel proteolitik sistemlerin etkinliğini azaltmakta, hücrel fonksiyonların bozulmasına neden olmakta ve yaşlanma sürecini hızlandırmaktadır (Höhn vd., 2013; Sohal vd., 2022).

Özellikle son yıllarda, protein oksidasyonunun gıdaların yapısal ve fonksiyonel özellikleri üzerindeki olumsuz etkileri ve bozulmalara neden olan süreçler üzerine araştırmalar yoğunlaşmıştır. Gıdalarda proteinlerin kimyasal değişimlerine yol açan protein oksidasyonu, glikasyon ve lipasyon olmak üzere üç ana reaksiyon bulunmaktadır (Hellwig, 2020). Ancak, bu reaksiyonlar genellikle aynı anda gerçekleştiği için birbirinden bağımsız değerlendirilememektedir. Proteinler, üretimden tüketime kadar olan süreçte oksidatif reaksiyonlara maruz kalmakta ve bu durum gıda ürünlerinin kalitesini, güvenliğini ve besin değerini olumsuz etkilemektedir (Domínguez vd., 2021).

Protein oksidasyonu, proteinlerin belirli bölgelerinden elektron kaybı sonucu serbest radikal reaksiyonlarının oluşmasını içermektedir. Gıdalarda bulunan proteinler, üretim, işleme ve depolama süreçlerinde moleküler oksijenle reaksiyona girerek ROT'ların oluşumuna neden olmaktadır (Choe & Min, 2006; Xiong & Guo, 2020). Bu reaktif türler, serbest radikaller (hidroksil, $\bullet\text{OH}$) ve süperoksit radikalleri, $\text{O}_2\bullet^-$) ve radikal olmayan bileşikler (hidrojen peroksit, H_2O_2 ve tekil oksijen, $^1\text{O}_2$) olarak sınıflandırılmaktadır. Bu türlerin oluşumu; ısınma, foto-oksidasyon, enzimatik reaksiyonlar ve geçiş metallerinin katalitik etkilerine bağlı olarak gerçekleşmektedir (Fuentes-Lemus & Lopez-Alarcon, 2020; Demasi vd., 2021). Protein oksidasyonu, radikal oluşumu, ara reaksiyonlar ve sonlanma reaksiyonları olmak üzere üç aşamada meydana gelmektedir. Oksidasyonun başlangıç aşamasında ROT'lar, protein radikalleri ve hidroperoksitler oluşturmakta ve oluşan bu protein hidroperoksit radikallerinin parçalanmasıyla bazı amino asit kalıntıları karbonil türevlerine dönüşmektedir (Giese vd., 2000; Requena vd., 2001). Proteinlerin farklı bölgelerinde birikim gösteren bu radikaller, stabiliteyi olumsuz etkilemektedir. Oksidatif hasar, amino asitlerin yan zincirlerinde modifikasyonlara yol açarak karboniller, sülfoksitler

ve disülfürler gibi oksitlenmiş ara ürünlerin oluşumuna neden olmaktadır (Davies vd., 2016; Hellwig vd., 2019). Serbest radikaller, amino asit kalıntıları arasında radikal transfer reaksiyonları gerçekleştirerek, oksidasyonun başladığı yer dışında da oksidatif hasar oluşmasına yol açabilmektedir (Lushchak, 2014; Di Meo & Venditti, 2020).

Protein oksidasyonunun mekanizmaları, gıdalardaki lipit içeriği, metal iyonları, sıcaklık ve pH gibi çevresel faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Guyon vd., 2016). Lipit oksidasyonu ile eş zamanlı gerçekleşebilen protein oksidasyonu, gıda kalitesini etkileyen temel süreçlerden biri olarak değerlendirilmektedir. Proteinler, lipit oksidasyonu sırasında oluşan ROT'lar ile oksitlenebilmekte ve bu durum amino asit yan zincirlerinde değişikliklere ve protein yapısında bozulmalara yol açmaktadır (Gęgotek, & Skrzydlewska, 2019; Hematyar vd., 2019). Ayrıca, oksitlenmiş lipitler ve proteinler arasındaki etkileşim, bir bileşenin oksidasyonunun diğerinin oksidasyonunu hızlandırdığı eş oksidasyon süreçlerini tetiklemektedir (Xiong & Guo, 2020). Bu süreçler sonunda oluşan serbest radikaller ve karboniller, proteinlerin parçalanmasına ve agregasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca proteinlerin besin kalitesi, sindirilebilirliği ve fonksiyonel özelliklerinde önemli kayıplar meydana gelmektedir (Zhang vd., 2013; Heinonen vd., 2021). Proteinlerin oksidatif modifikasyonu, aynı zamanda potansiyel olarak sağlık riski taşıyan zararlı bileşiklerin oluşumuna da yol açabilmektedir (Davies, 2005). Lipitlerin oksidatif bozunması protein oksidasyonunu hızlandırarak gıdalarda kalite kaybına yol açmakta; bu nedenle özellikle lipit içeriği yüksek gıdalarda önemli bir sorun teşkil etmektedir (Moldogazieva vd., 2018).

Protein oksidasyonu, gıdaların teknolojik ve duyuşal özelliklerini büyük ölçüde etkilemektedir. Depolama süresi boyunca süt tozunun dağılabilirlik kapasitesinde meydana gelen azalma protein karbonilasyon seviyelerindeki artışla ilişkilendirilmiştir (Estévez & Xiong, 2021). Bu durum, süt tozunun işlenebilirlik özelliklerinin değerlendirilmesinde karbonilasyon seviyelerinin bir parametre olarak kullanılabileceğini belirlemiştir (Phosanam vd., 2021). Benzer şekilde, yer fıstığı bazlı süt ikamelerinde meydana gelen protein oksidasyonunun, emülsiyon stabilitesini olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir (Taheri vd., 2024). Et ürünlerinde protein oksidasyonu, dokusal değişimler sonucu etin daha sert bir yapı kazanmasına, su tutma kapasitesinin azalmasına ve jelatinleşme ile emülsifikasyon gibi işlevsel özelliklerin bozulmasına yol açmaktadır (Zhang vd., 2013; Soladoye vd., 2015; Bao & Ertbjerg, 2019). Ancak, düşük düzeydeki protein oksidasyonu, proteinler arasında köprü oluşumunu sağlayarak doku yapısında belirli iyileşmeler sağlayabilmektedir (Xiong, 2022). Buna karşın, yüksek düzeyde oksidasyon, dokusal yapıya zarar vermekte ve tekstürü

olumsuz etkilemektedir. Yumurta beyazı proteinlerinin düşük düzeyde oksidasyonu, köpürme kapasitesini ve stabilitesini artırabilmekte ve bu durum transglutaminaz işlemlerine bir alternatif olarak değerlendirilebilmektedir (Duan vd., 2017). Bununla birlikte ileri oksidatif modifikasyonlar sonucu proteinlerin çözünürlüğü azalmakta ve bu durum emülsiyon ve köpük oluşturma yeteneklerini olumsuz etkileyebilmektedir (Mirmoghtadaie vd., 2016). Protein oksidasyonu sonucu genellikle peptit bağlarının kopması, amino asit kalıntılarının oksidasyonu ve disülfid bağlarının oluşumu gerçekleşmektedir (Davies, 2005). Ayrıca, esansiyel amino asitlerin kaybı ve oksidatif hasar sonucunda protein sindirilebilirliği azalmakta ve bu durum gıdaların besin değerinde kayıplara neden olmaktadır (Domínguez vd., 2021; Meade vd., 2005).

1.4.3. Karbohidrat Oksidasyonu

Karbohidrat oksidasyonu, gıda kalitesini ve insan sağlığını olumlu veya olumsuz etkileyen farklı mekanizmaları ve faktörleri içermektedir. Karbohidrat oksidasyonu, enerji üretimi ve hücrel faaliyetler için canlılarda hem enzimatik hem de enzimatik olmayan reaksiyonlar aracılığıyla gerçekleşen çeşitli metabolik süreçlerde önemli bir rol oynamaktadır (Piedrafita vd., 2015). Enerji metabolizmasında karbohidrat oksidasyonu, karbohidratların basit şekerlere hidrolizi ve bu şekerlerin enerji üretiminde kullanılmak üzere oksitlenmesini içeren kompleks biyokimyasal süreçler dizinidir (Elia & Cummings, 2007). Gıdalarda ise kimyasal değişimlere yol açarak duyuşal özellikler, raf ömrü ve fonksiyonel bileşenler üzerinde önemli etkiler oluşturmaktadır (Calligaris vd., 2016).

Gıdaların işlenmesi ve depolanması sırasında meydana gelen en önemli reaksiyonlardan biri esmerleşmedir. Özellikle enzimatik esmerleşme, taze meyve ve sebzeler başta olmak üzere, gıdaların fonksiyonel, besinsel ve organoleptik özelliklerinde kayıplara yol açmaktadır. Bu süreç; yumuşama, kararma ve istenmeyen tat değişiklikleri gibi olumsuz etkilerle ortaya çıkmaktadır (Singh vd., 2018). Enzimatik esmerleşme, gıdaların doğal yapısında bulunan polifenol oksidaz (PPO) ve peroksidaz (POD) enzimlerinin, fenolik bileşikler okside etmesi sonucu çeşitli ara ürünlerin oluştuğu biyokimyasal bir süreçtir (Nath vd., 2022). Hasat ve depolama sırasında oluşan zedelenmeler ile kesme veya dilimleme gibi işlemler sonucunda fenolik bileşikler açığa çıkarak esmerleşme reaksiyonlarını indüklemektedir (Degl'Innocenti vd., 2005). PPO ve POD enzimleri, fenolik bileşikler okside ederek kinon adı verilen reaktif ara ürünlerin oluşumunu sağlamaktadır. Bu kinonlar,

polimerleşerek kırmızı kahve veya koyu kahve renkli melanin adı verilen bileşiklerin meydana gelmesine neden olmaktadır (Hassan vd., 2023). Elma, armut, muz, üzüm gibi meyveler ile marul, patates ve mantar gibi sebzelerde sıkça gözlemlenen enzimatik esmerleşme, üreticiler ve gıda işleme sektörü açısından ciddi ekonomik kayıplara neden olan önemli bir sorun olarak değerlendirilmektedir (Moon vd., 2020). Ancak bu süreç, fırınlanmış ve kızartılmış ürünler ile kahve, çay ve kakao gibi gıdalarda istenen renk ve aroma gibi özelliklerin oluşumuna katkı sağlayarak olumlu etkiler de gösterebilmektedir.

Esmerleşme reaksiyonlarının hızı, ortamdaki PPO ve POD enzimlerinin konsantrasyonu, fenolik bileşiklerin miktarı, sıcaklık, pH ve oksijen gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (He & Luo, 2007). Bununla birlikte, enzimatik esmerleşme çeşitli yöntemlerle kontrol altına alınabilmektedir. Bu yöntemler arasında soğutma, ısıtma, uygun ambalajlama, yenilebilir kaplamaların kullanımı, antioksidan veya indirgeme ajanlarının uygulanması, şelatlama, substrat miktarının sınırlandırılması ve pigmentlerin ağartılması gibi işlemler yer almaktadır (Ghidelli vd., 2013).

Enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları, enzimlerin katalizörlüğü olmaksızın gerçekleşen ve genellikle kimyasal süreçler yoluyla kompleks bileşiklerin oluşumuna neden olan reaksiyonlardır (Corzo-Martínez vd., 2012). Bu reaksiyonlar, gıda kalitesi, lezzeti, güvenliği ve besin değeri üzerinde hem olumlu hem de olumsuz etkiler yaratabilmektedir. Gıdalarda en yaygın görülen enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları arasında Maillard reaksiyonu ve karamelizasyon bulunmaktadır (Nath vd., 2022). Maillard reaksiyonu, indirgen şekerlerin amino grupları ile reaksiyona girerek melanoidin adı verilen kompleks bileşiklerin oluşumuna yol açmaktadır (Wang vd., 2011). Bu bileşikler, gıdaların tat, renk ve aroma gelişiminde önemli bir rol oynar. Karamelizasyon ise şekerlerin yüksek sıcaklıkta parçalanarak kendine özgü tat ve renk veren bileşiklerin oluştuğu bir reaksiyon sürecidir (Parra vd., 2023). Her iki süreç de fırınlama, kavurma, kızartma ve pişirme gibi ısı işlemler sırasında meydana gelmektedir. Ayrıca, uygun olmayan depolama koşulları bu reaksiyonları tetikleyerek ürün kalitesini ve tüketici algısını doğrudan etkileyebilmektedir (Tamanna, & Mahmood, 2015; Xiong vd., 2024).

Enzimatik olmayan reaksiyonlar, özellikle Maillard reaksiyonu ve karamelizasyon, fırıncılık ürünleri (ekmek, kurabiye, kek vb.), kızartılmış gıdalar (et, patates cipsi vb.) ve üretiminde ve/veya sonrasında ısı işlem görmüş gıdalar (süt ürünleri, kahve, bal, pekmez) gibi birçok gıdada arzu edilen lezzet ve aromaların gelişimini desteklemektedir. Reaksiyonun gerçekleştiği gıdalar raf ömrü süresince yavaş; ısı işlem görmesi durumunda

ise hızla bu reaksiyona girmekte ve reaksiyon ürünlerini oluşturmaktadır (Yildiz vd., 2010; Newton vd., 2012; Starowicz & Zieliński, 2019; Al-Abbasy, 2024). Ancak bu süreçlerin kontrolsüz şekilde ilerlemesi, özellikle yüksek sıcaklık ve uzun pişirme sürelerinde ve uygun olmayan depolama koşullarında akrilamid ve ileri glikasyon son ürünleri (AGEs) gibi istenmeyen zararlı bileşiklerin oluşumuna neden olabilmektedir (Fallavena vd., 2022; Dong vd., 2023). Bu bileşiklerin birikimi hem gıda güvenliği hem de insan sağlığı açısından ciddi riskler taşımaktadır (Šebeková & Somoza, 2007). Bunun yanı sıra, enzimatik olmayan oksidasyon da gıda ürünlerinin raf ömrünü ve stabilitesini olumsuz etkileyerek dokusal bozulmalara ve tat değişimlerine yol açabilmektedir (Poulsen vd., 2013; Sharma vd., 2015; Wei vd., 2018). Bu tür olumsuz etkileri en aza indirmek için kontrollü işleme koşullarının sağlanması ve antioksidan gibi koruyucu bileşiklerin kullanımı büyük önem taşımaktadır (Zhang vd., 2015).

Maillard reaksiyonu, indirgen şekerlerin elektrofilik karbonil gruplarının, proteinler, peptitler veya amino asitlerin nükleofilik amino gruplarıyla kondenzasyonu sonucu oluşmaktadır (Shakoor vd., 2022). Bu reaksiyon, indirgen şekerlerin yerine lipit oksidasyon ürünleri ile amino asitler arasında da gerçekleşebilmektedir. Reaksiyon, başlatma, yayılma ve ileri aşama olmak üzere üç temel basamaktan oluşmaktadır (Martins vd., 2000). Başlangıç aşamasında, indirgen şekerin, amino asit veya proteindeki serbest amino grubu ile kondenzasyonu sonucu aldozilamin meydana gelmektedir ve bu bileşik, Amadori yeniden düzenlenme ürünlerine (ARP) ve 1-amino-1-deoksi-2-ketoz gibi ara ürünlere dönüşmektedir. Yayılma aşamasında farklı yollar olmakla birlikte, şeker moleküllerinin dehidrasyonu ve parçalanması gerçekleşmektedir. Bu süreçte, amino asitler parçalanarak pirüvaldehit ve diasetil gibi 5-hidroksimetilfurfural (HMF) türevleri oluşmaktadır (Lund & Ray, 2017). Ayrıca, karbonil gruplarının serbest amino grupları ile kondanase olması, azotun reaksiyon ürünlerine dahil olduğu ve Strecker bozunma reaksiyonu olarak bilinen süreçle aldehitler ve α -aminoketonların oluşumuna yol açmaktadır (Nursten, 2005; Provost, 2019). İleri aşamada ise, döngüleşme, dehidrasyon, retroaldolizasyon, yeniden düzenlenme, izomerizasyon ve daha fazla yoğunlaşma reaksiyonları gibi bir dizi reaksiyon gerçekleşmekte, bu süreçlerin bir sonucu olarak melanoidinler adı verilen heterosiklik yapıdaki koyu renkli polimerler ve ko-polimerler oluşmaktadır (Tamanna & Mahmood, 2015). Bununla birlikte, bu reaksiyon, gıdaların hazırlanması ve depolanması sırasında karbonhidratların termal bozunması sonucu 3-deoksiglukozon ve glukozon gibi istenmeyen bileşiklerin oluşumuna yol açmaktadır (Ruiz-Matute vd., 2014). Maillard reaksiyonunun

kapsamı ve oluşum hızı, kullanılan işleme yöntemi, şeker ve amino asit türü, sıcaklık, pH, su aktivitesi gibi faktörlerden etkilenmektedir (Liu vd., 2022).

Bununla birlikte Maillard reaksiyonu sağlık açısından risk oluşturabilecek ileri glikasyon son ürünleri (AGEs) olarak adlandırılan bazı bozunma ürünlerin oluşumuna da neden olabilmektedir. Bu süreç, gıda güvenliği ve insan sağlığı açısından büyük bir öneme sahiptir. AGE'lerin oluşumu, gıdaların besin değerinde azalmaya, proteinlerin biyolojik fonksiyonlarının bozulmasına ve organizmada oksidatif stresin artmasına yol açabilmektedir (Šebeková, & Somoza, 2007; Delgado-Andrade, 2014). Sonuç olarak, oksidatif stres ile ilişkilendirilen diyabet, kanser, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar ve son dönemde SARS-CoV-2 virüsü enfeksiyonu gibi çeşitli patofizyolojik süreç ve hastalıklara neden olabilmektedir (Younessi & Yoonessi, 2011; Li vd., 2012; Nowotny vd., 2015; Pedreañez vd., 2024). Gıdalardaki AGE miktarları, özellikle kızartma ve ızgara gibi yüksek sıcaklıkta pişirme yöntemleriyle artış göstermekte ve bu durum sağlık açısından önemli bir risk oluşturmaktadır (Tanveer vd., 2023).

Diğer enzimatik olmayan esmerleşme türü olan karamelizasyon, şekerlerin erime noktasının (186°C) üzerindeki sıcaklıklara kadar ısıtılmasıyla gerçekleşen bir seri reaksiyon zinciridir (Corzo-Martínez vd., 2012). Bu süreçte, şeker molekülleri dehidrasyona uğrayarak esmer renkli bileşiklere polimerize olan furfural türevlerini oluşturmaktadır. Karamelizasyon, amino gruplarına ihtiyaç duymaksızın hem asidik hem de bazik ortamlarda gerçekleşmektedir (Shoberi, 2010). Bu süreç, özellikle şekerlemeler, tatlılar ve kavrulmuş kahve gibi ürünlerde kendilerine özgü renk ve aroma oluşumunu sağlamaktadır (Golon & Kuhnert, 2012). Karamelizasyonun reaksiyon ürünleri, kullanılan şeker türüne ve uygulanan ısı işlem koşullarına bağlı olarak önemli ölçüde farklılık göstermektedir (Sengar & Sharma, 2014). Bu çeşitlilik, gıda işleme endüstrisinde karamelize edilmiş ürünlerin farklı renk ve aroma profilleri oluşturmaktadır.

1.4.4. 5-Hidroksimetilfurfural (HMF)

HMF, karbohidrat içeriği yüksek gıdalarda asidik ortamda ve ısı uygulanması sırasında, özellikle Maillard reaksiyonu ve karamelizasyon süreçleri aracılığıyla oluşmaktadır. Bal, kahve, meyve suları, reçeller, süt ürünleri, kurutulmuş meyveler, domates ürünleri, sirke, şarap, kahvaltılık gevrekler ve fırıncılık ürünleri gibi birçok gıdada farklı oranlarda bulunabilmektedir (Murkovic & Pichler, 2006; Rufián-Henares vd., 2006;

Arribas-Lorenzo & Morales, 2010; Mańkowska vd., 2017; Li vd., 2019; Czerwonka vd., 2020; Lemos vd., 2023). HMF, yüksek sıcaklıklara maruz kalma durumunda artış gösterdiği için bazı gıdalarda kalite göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Capuano & Fogliano, 2011; Rada-Mendoza vd., 2022). Taze ballarda HMF, çoğunlukla tespit edilmemekte veya çok düşük miktarlarda bulunmakta; ancak, işleme veya depolama sırasında sıcaklığın etkisiyle HMF miktarı artış göstermektedir. Bu nedenle, balın tazeliğini belirlemek için bir parametre olarak değerlendirilmektedir (Pacias vd., 2017; Mouhoubi-Tafnine vd., 2018; Godoy vd., 2022; Ali, 2024). Yüksek HMF içeriği, genellikle kötü depolama koşullarının ve/veya yüksek sıcaklık uygulamalarının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Shapla vd., 2018). HMF'nin oksidasyonu, gıdaların besin kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu oksidasyon süreci, temel besin öğelerinin kaybına yol açmakta ve istenmeyen yan ürünlerin oluşumuna neden olarak hem gıda güvenliğini hem de lezzet özelliklerini azaltmaktadır (Zhao vd., 2020; He vd., 2024; Li vd., 2024). Bu kapsamda, Codex Alimentarius Standart Komisyonu tarafından balda bulunabilecek maksimum HMF miktarı tropikal bölgelere ait ballar için 80 mg/kg olmak üzere 40 mg/kg olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, HMF'nin oluşumu, bazı gıdaların tat, aroma ve renk özelliklerine katkıda bulunması nedeniyle de önem taşımaktadır (Kowalski vd., 2013; Starowicz & Zieliński, 2019).

HMF, iki temel reaksiyon sırasında oluşan en önemli ara ürünlerden biri olarak kabul edilmektedir: (i) heksozların asit katalizli parçalanması ve (ii) Maillard reaksiyonu sırasında 3-deoksiozonun ayrışması (Choudhary vd., 2021). HMF'nin oksidasyonu, sıcaklık, pH ve oksijenin varlığı gibi çevresel faktörlerin etkisiyle farklı mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Isıl işlem uygulanmış HMF içeren gıdalar, oksidasyon süreçleri sonucunda furan türevleri ve reaktif bileşikler gibi çeşitli bozunma ürünlerinin oluşumuna neden olmaktadır (Fallico vd., 2008; Zhao vd., 2021). Bu süreç, şekerlerin dehidrasyonunu hızlandıran asidik ortamlar tarafından katalize edilmekte ve HMF'nin hem oluşumunu hem de oksidasyonunu artırmaktadır (Mussatto & Roberto, 2008). Bunun yanı sıra, HMF'nin bozunma kinetiği genellikle psödo-sıfıncı mertebe ile tanımlanmakta olup, bu durum birden fazla karmaşık reaksiyonun eşzamanlı olarak gerçekleştiğini göstermektedir (Capuano & Fogliano, 2011).

HMF'nin oksidasyon süreçleri, gıda kalitesine etkisinin yanı sıra toksikolojik etkileri dolayısıyla insan sağlığı açısından da önem taşımaktadır (Delgado-Andrade, 2010). Çalışmalar, yüksek konsantrasyonlardaki HMF'nin, mukoza zarları, cilt ve üst solunum yollarına karşı sitotoksikite, mutajenite, kromozomal sapmalar ve kanserojen etkiler gibi

önemli sağlık risklerine neden olabileceğini bildirmektedir (Monien vd., 2012; Janzowski vd., 2000; Basaran vd., 2022; Sawicki vd., 2023). Bu nedenle, ulusal ve uluslararası standartlar, gıda ürünlerindeki HMF konsantrasyonlarını sınırlandırmaktadır (Zirbes vd., 2013; European Food Safety Authority, 2022). Gıda işleme ve depolama süreçlerinde HMF seviyelerinin kontrol edilmesi ve oluşumunu en aza indirmeye yönelik çalışmaların sürdürülmesi büyük önem taşımaktadır. Bununla birlikte, son yıllarda HMF'nin antioksidan, anti-alerjik, anti-inflamatuar, anti-hipoksik, orak hücreli anemiye karşı, anti-hiperürisemik etkiler gibi farklı olumlu etkilere sahip olduğu belirlenmiştir (Abdulmalik vd., 2005; Kitts vd., 2012; Li vd., 2011; Lin vd., 2012; Yamada vd., 2011; Zhao vd., 2013).

1.5. Gıdalarda Antioksidan Savunma Sistemi

Gıda işleme teknikleri ve muhafaza yöntemleri ile antioksidanlar, oksidatif stresin kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır (Pisoschi & Pop, 2015; Poljsak vd., 2021). Gıdaların muhafaza koşullarında ışık, oksijen ve yüksek sıcaklık gibi çevresel faktörler, gıda bileşenlerinde oksidatif reaksiyonlara neden olabilmektedir (Calligaris vd., 2016). Bu süreç, gıdalarda bulunan antioksidan bileşenlerin parçalanmasını ve prooksidan bileşiklerin oluşumunu hızlandırmaktadır (Choe & Min, 2009). Gıdaların düşük sıcaklıkta ve oksijensiz ortamda muhafaza edilmesi, oksidatif stresin oluşumunu yavaşlatırken özellikle fenolik bileşikler gibi antioksidanların korunmasına katkı sağlamaktadır (Lopez-Corona vd., 2022).

Antioksidanlar, oksidanların biyolojik hedeflerle reaksiyona girmesini, radikal zincir reaksiyonları başlatmasını ve oksijenin reaktif ürünlere dönüşmesini engelleyerek serbest radikallerin neden olduğu hasarı en aza indirmektedir (Lobo vd., 2010; Martemucci vd., 2022). Bu bileşenler, serbest radikallerle reaksiyona girerek hidrojen atomu vericisi olarak görev yapmakta ve serbest radikalleri antioksidan radikallerine ya da düşük reaktiviteli radikallere dönüştürmektedir. Ayrıca, prooksidatif metalleri şelatlama ve endojen antioksidan enzimlerin aktivitesini artırma gibi mekanizmalarla oksidatif stresin etkilerini azaltmaktadır (Sreeramulu vd., 2013; Yasmin, 2024). Böylece, serbest radikallerin lipidler ve diğer biyomoleküllerle reaksiyona girme yeteneği kaybolmaktadır (Kris-Etherton vd., 2002; Azzi vd., 2004; Fernandez-Panchon vd., 2008; Fang vd., 2022).

Antioksidanlar, gıda kökenli bileşenler (C vitamini, E vitamini, karotenoidler, lipoik asit), antioksidan enzimler (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz), metal bağlayıcı proteinler (ferritin, albümin, laktoferrin, seruloplazmin) ve bitki özlerinde

yaygın olarak bulunan fitokimyasallar gibi çeşitli gruplara ayrılmaktadır (Becker vd., 2004). Antioksidanlar, gıdalarda oksidatif stresin yönetiminde önemli bir rol oynamaktadır. Gıda kaynaklı antioksidanlar, ROT'ları etkisiz hale getirerek serbest radikalleri ortadan kaldırmakta, oksidatif hasarı ve böylece hücre ve dokulardaki olumsuz etkileri azaltmaktadır (Shahidi, 2000; Nwachukwu & Aluko, 2019; Flieger vd., 2021). Doğal antioksidanlar arasında yer alan tokoferoller (E vitamini) ve askorbik asit (C vitamini), serbest radikalleri etkisiz hale getirerek oksidasyon sürecini engellemekte veya yavaşlatmaktadır (Kılıç & Richards, 2003). Bunun yanı sıra, askorbik asit, tokoferolün lipit oksidasyonunu önleme kapasitesini artırmaktadır (Badanai vd., 2015). Bitki özlerinde bulunan polifenoller gibi doğal antioksidanlar, depolama süresince serbest radikalleri temizleyerek ve metal iyonlarını şelatlayarak lipit oksidasyonunu etkili bir şekilde önlemekte ve gıda ürünlerinin kalitesini ve güvenliğini korumaktadır (Zhou & Elias, 2012; Di-Mattia vd., 2019). Gıda formülasyonlarına antioksidanların dahil edilmesi, üretim ve depolama süresince oksidatif stresin zararlı etkilerini önlerken ürünlerin besin değeri ve duyu özelliklerini korumada önemli bir rol oynamaktadır (Lourenço vd., 2019; Zehiroğlu & Öztürk Sarıkaya, 2019). Ayrıca, antioksidanların kullanımıyla birlikte uygun depolama koşullarının sağlanması, oksidasyonun olumsuz etkilerini azaltarak gıda ürünlerinin güvenliğini ve besin bütünlüğünü korumaya katkıda bulunmaktadır (Ogwu & Ogunsola, 2024).

1.5.1. Arı Sütünde Antioksidan Savunma Sistemi

Arı sütü, yüksek besin değeri ile antioksidan, antiinflamatuar, antimikrobiyal ve antikanser özelliklerinden dolayı fonksiyonel gıdalar ve nutrasötikler alanında önemli bir doğal bileşen olarak öne çıkmaktadır. Bu çok yönlü etkiler, arı sütünde bulunan yağ asitleri, peptitler ve proteinler gibi çeşitli biyoaktif maddelerden kaynaklanmaktadır (Ramadan & Al-Ghamdi, 2012). Bu bileşenler, sinerjik olarak oksidatif stresin azaltılmasına katkıda bulunmakta ve kanser, kardiyovasküler hastalıklar ile nörodejeneratif rahatsızlıklar gibi birçok kronik hastalığın önlenmesinde etkili olmaktadır (Nagai vd., 2001; Kohno vd., 2004; Nakaya vd., 2007; Guo vd., 2008; Bărnăușu vd., 2011; Karaca vd., 2012; Bílikova vd., 2015; Coutinho vd., 2018).

Arı sütü üzerine yapılan çalışmalar, arı sütünün lipit peroksidasyonunu önleme ve serbest radikalleri nötralize etme potansiyelini göstermektedir. Liu vd. (2008), arı sütünün linoleik asit peroksidasyonu üzerinde %27,9 oranında inhibitör bir etki gösterdiğini, Guo vd.

(2005) ise arı sütü peptitlerinin ise bu oranı %97,4'e kadar artırdığını tespit etmiştir. Bu bulgular, arı sütü peptitlerinin antioksidan etkinliği artırmada önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Arı sütünde bulunan MRJP'ler, antioksidan özelliklerin sağlanmasında kritik bir öneme sahiptir. Çalışmalar, MRJP 1-7'nin oksidatif strese bağlı hücre ölümü üzerinde koruyucu etkiler sergilediğini ve hücre canlılığını desteklediğini bildirmektedir. Ayrıca, bu proteinlerin ROT'ların neden olduğu DNA hasarını önlemede etkili olduğu belirtilmektedir (Park vd., 2020). Bunun yanı sıra, arı sütünün antioksidan mekanizmalarında öne çıkan 10-HDA yağ asidinin, oksidatif stres ve inflamasyonu önlemede önemli bir role sahip olduğu belirlenmiştir (Honda vd., 2011). Arı sütünde bulunan fenolik bileşikler, antioksidan kapasitesine önemli katkılar sağlamaktadır (Balkanska vd., 2017). Arı sütünün antioksidan özellikleri, yalnızca bireysel bileşenlerine değil, aynı zamanda bu bileşenlerin arasındaki sinerjik etkileşimlere de bağlıdır. Bu bileşiklerin kısa peptitler, çeşitli vitaminler ve kısa zincirli hidroksil ve karboksilik yağ asitleri ile güçlü bir serbest radikalleri temizleme aktivitesi sergilediğini ve ROT'ları nötralize etmede önemli bir rol üstlendiği vurgulanmaktadır (Tumilaar vd., 2024). Bununla birlikte, arı sütündeki organik asitlerin, metal şelatlama gibi mekanizmalar yoluyla toplam polifenollerin etkisini artırarak antioksidan kapasiteye katkıda bulunduğu belirtilmektedir (Uthaibutra vd., 2023). Fenolik bileşikler, proteinler, yağ asitleri ve bazı vitaminlerin bir araya gelerek oluşturduğu sinerji, arı sütünün genel antioksidan kapasitesini artırmaktadır.

Arı sütü, oksidatif stresi azaltma kapasitesi *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla değerlendirilmiştir. Khoob vd. (2022), arı sütünün kansere karşı güçlü sitotoksik etki gösterdiğini ve antioksidan bileşenlerin önemli katkı sağladığı bildirmiştir. Bu çalışmada, özellikle 10-HDA ve diğer peptitler gibi güçlü serbest radikal temizleme özelliklerine sahip bileşiklerin önemi vurgulanmıştır. Ayrıca, Karadeniz vd. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, arı sütünün sisplatin ile tedavi edilen sıçanların karaciğer ve böbreklerinde oksidatif stres belirteçlerini önemli ölçüde azaltarak koruyucu bir etki gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada, arı sütünün süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini artırdığı ve oksidatif stres kaynaklı organ hasarına karşı koruyucu bir ajan olarak potansiyel taşıdığı bildirilmektedir. Ayrıca, arı sütü organizmanın genel antioksidan kapasitesini iyileştirme potansiyeliyle de dikkat çekmektedir. Zebrafish embriyoları üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, arı sütü takviyesinin hücresel antioksidan kapasiteyi artırarak oksidatif stres altındaki embriyoların hayatta kalma oranını

önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir (Cho, 2024). Bu tür etkiler, hücrelerin oksidatif hasara karşı bütünlüğünü ve işlevini koruması açısından büyük önem taşımaktadır.

1.6. Arı Sütünde Bulunan Enzimler ve Fonksiyonları

Arı sütünün enzimatik profili, metabolik süreçleri kolaylaştıran, biyoaktiviteyi artıran ve genel besin değerine katkıda bulunan çeşitli enzimleri içermektedir. Bu enzimler, arı sütünün antimikrobiyal, antioksidan, anti-inflamatuar ve metabolik düzenleyici etkileri üzerinde önemli bir rol oynamaktadır (Ali & Kunugi, 2020; Kumar vd., 2024). Bu özellikler hem geleneksel tıp uygulamalarında hem de modern sağlık yaklaşımlarında arı sütüne olan ilgiyi artırmaktadır.

Arı sütünde bulunan en önemli enzimlerden biri olan glukoz oksidaz (GOx), glukozu oksitleyerek hidrojen peroksit oluşumunu katalize etmektedir (Ramadan & Al-Ghamdi, 2012). Hidrojen peroksit, arı sütünün antibakteriyel özelliklerinin ana bileşenlerinden biri olup, bakteriyel enfeksiyonlara karşı etkili bir koruma sağlamaktadır (Pasupuleti vd., 2017). Bu durum, arı sütünü hem gıda koruyucu hem de sağlık destekleyici bir takviye edici gıda olarak ön plana çıkarmaktadır. Arı sütünün şeker profili, özellikle glukoz ve fruktoz gibi karbohidratlardan oluşmakta olup, bu bileşenler besin değerinin yanı sıra fonksiyonel özellikleri açısından da önem taşımaktadır (Mureşan vd., 2016; Karlıdağ vd., 2022). GOx enzimi, arı sütünün kalitesini ve biyolojik aktivitesini doğrudan etkileyen faktörlerden biri olarak dikkat çekmektedir. Bununla birlikte, depolama koşulları bu enzimin aktivitesini ve stabilitesini önemli ölçüde etkilemektedir (Sagona vd., 2022).

Arı sütünde bulunan temel antioksidan enzimlerden biri olan SOD, hücresel sağlığın korunmasında kritik bir rol oynamaktadır. Bu enzim, süperoksit radikallerini hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürerek hücreleri oksidatif strese korumaktadır (Liu vd., 2008; Zhang vd., 2010). SOD, ROT'ların neden olduğu lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarı gibi hücresel hasarları önlemede önemli bir savunma mekanizması oluşturmaktadır.

Bunun yanı sıra, arı sütünde bulunan α -glukozidazın, karbohidrat metabolizmasında önemli görevleri bulunmaktadır (Lewkowski vd., 2019; Li vd., 2021; Bucekova vd., 2023). α -Glukozidaz, kompleks şekerlerde bulunan α -glukozidik bağların hidrolizini katalizleyerek enerji metabolizmasında rol oynamaktadır. Arı sütünde metabolik süreçlere ve biyolojik aktivitelere katkıda bulunmaktadır (Bava vd., 2024).

Arı sütünde bulunan proteolitik enzimler, proteinlerin peptitlere ve amino asitlere hidrolizini katalizleyerek, bu proteinlerin sindirimini ve emilimini kolaylaştırmaktadır. Bununla birlikte, proteinlerin biyoaktivitesinin artırılmasında da önemli rol oynamaktadır (Gu vd., 2018; Li vd., 2021). Arı sütündeki proteinlerin proteolitik işlenmesi sırasında açığa çıkan biyoaktif peptitler, çeşitli fizyolojik etkiler göstererek sağlığı desteklemektedir. Proteolitik enzimler, arı sütünün biyoyararlanımını artırarak büyüme, doku onarımı ve bağışıklık sistemi fonksiyonları üzerinde olumlu etkiler sağlamaktadır (Park vd., 2011). Yapılan çalışmalar, arı sütünde serin ve tripsin proteazlar ve endopeptidazlar gibi farklı proteaz türlerinin bulunduğunu bildirmiştir (Matsuoka vd., 2012; Zhang vd., 2014; Sagona vd. 2022).

Arı sütünün enzimatik aktivitesi, arıların yaşı, çevresel koşullar ve çiçek kaynakları gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilmektedir (Li vd., 2010; Ghosh vd., 2024; Wang, 2024). Bu faktörler, arı sütündeki enzimlerin miktarını, türünü ve aktivitesini şekillendirmekte, dolayısıyla arı sütünün biyolojik ve besinsel özelliklerini belirlemektedir. Ayrıca, depolama koşulları, arı sütündeki enzimlerin stabilitesi ve aktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Araştırmalar, uygun olmayan sıcaklık ve nem seviyelerinde uzun süreli depolamanın, arı sütünün enzimatik aktivitesini azalttığını ve biyoaktif bileşiklerin bozunmasına yol açtığını göstermiştir (Qiao vd., 2018; He vd., 2020). Özellikle yüksek sıcaklıklarda depolama, enzimlerin denatürasyonuna neden olarak arı sütünün biyolojik aktivitesini önemli oranda azaltmaktadır.

1.6.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD, bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar dahil birçok organizmada bulunan ve ROT'lardan kaynaklanan hücresel hasarları önleyen temel bir metaloenzimdir (Sheng vd., 2014). Bu enzim, süperoksit radikallerini ($O_2^{\bullet-}$) moleküler oksijene (O_2) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüşümünü katalize ederken, oluşan hidrojen peroksit ise organizmalarda bulunan katalaz (CAT) veya glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleri tarafından suya (H_2O) indirgenmektedir (Ighodaro & Akinloye, 2018). Bu enzimler, serbest radikallerin seviyesini düzenleyerek antioksidan savunma mekanizmalarında önemli bir rol oynamaktadır (Limón-Pacheco & Gonsébat, 2009; Mondola vd., 2016). SOD'un katalitik mekanizması, DNA, proteinler ve lipitler gibi hücresel bileşenlerde oksidatif hasarı önlerken, hidrojen peroksit seviyelerini düzenleyerek biyolojik sinyal yollarının işleyişine katkıda bulunmaktadır.

(Batoool vd., 2012; Sadiq, 2023). Bunun yanı sıra, SOD oksidatif metabolizma sırasında üretilen endojen serbest radikallerin yanı sıra UV ışığı veya kimyasal maddeler gibi ekzojen faktörlerden kaynaklanan oksidanları da etkisiz hale getirmektedir (Ozougwu vd., 2016). Enzim aktivitesi, pH, sıcaklık ve metal kofaktörlerin varlığı gibi çevresel faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir (Bafana vd., 2011; Kumar vd., 2016).

SOD serbest radikal temizleyici olarak antioksidan aktivite, oksidatif stres koruması ve anti-inflamatuar özelliklerinden dolayı tıp, eczacılık, tarım, gıda ve kozmetik gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Petersen vd., 2004; Mandelli, vd., 2013; Zeinali vd., 2015; Zheng vd., 2023). SOD, sağlık üzerinde geniş bir etki mekanizmasına sahiptir. Yapılan çalışmalar, bu enzimin kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif bozukluklar ve belirli kanser türleri gibi oksidatif stresle ilişkili patolojik durumlara karşı koruyucu etkiler sağladığını göstermektedir (Younus vd., 2018; Islam vd., 2022; Jomova vd., 2023).

Gıda bilimi ve teknolojisi açısından SOD, gıdaların korunması ve besin değerlerinin sürdürülebilir şekilde muhafaza edilmesinde önemli bir bileşen olarak değerlendirilmektedir. SOD, gıda işleme ve depolama süreçlerinde oluşan süperoksit radikallerini etkisiz hale getirerek oksidatif bozulmayı önlemekte ve böylece proteinlerin, lipidlerin ve vitaminlerin oksidatif stabilitesini artırarak ürünlerin raf ömrünü uzatmaktadır (Mandelli vd., 2013; Halliwell & Gutteridge, 2015). Ayrıca, SOD'un antioksidan özellikleri, gıda ürünlerinde renk, aroma ve besin değerinin korunmasına önemli katkılar sağlamaktadır (Admassu & Kebede, 2019).

SOD'un gıda ürünlerine eklenmesi, raf ömrünü uzatmanın yanı sıra fonksiyonel gıdaların geliştirilmesine de katkı sağlamaktadır (Zheng vd., 2023). Ayrıca, SOD'un mikroenkapsülasyon teknikleriyle stabil hale getirilmesi, enzim aktivitesinin korunmasını sağlayarak gıda ürünlerinde daha etkili bir kullanım sunmaktadır (Zhu vd., 2023). SOD ile zenginleştirilmiş içecekler ve diyet takviyeleri, oksidatif stresi önlenmesi ve antioksidan savunmaların artması amacıyla önerilen yenilikçi ürünler arasında yer almaktadır (Islam vd., 2022). Bununla birlikte, nanoteknoloji kullanılarak lipit bazlı taşıyıcılarda kapsüllenmesi, SOD'un biyoyararlanımını ve stabilitesini artırmakta, bu da sağlık faydalarını optimize eden yeni gıda ürünlerinin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (Pinmanee vd., 2023).

Arı sütü üzerine yapılan araştırmalar, SOD enzim aktivitesiyle ilgili sınırlı olmakla birlikte arı sütünde SOD enzim aktivitesi belirlenmiş ve enzim aktivitesi üzerinde larva yaşı, hasat zamanı gibi faktörlerin etkisi değerlendirilmiştir (Liu vd., 2008; Zheng vd., 2011). Bununla birlikte *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, arı sütündeki zengin biyoaktif bileşenlerin

hücre içi ve hücre dışı SOD ve diğer antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak oksidatif hasara karşı koruma sağladığını göstermiştir (Kocot vd., 2018; Guo vd., 2021). Arı sütünün antioksidan özellikleri, proteinler, peptitler, 10-HDA ve çeşitli yağ asitleri gibi biyoaktif bileşiklerin çeşitliliğine atfedilmektedir. Bu bileşenler, ROT'ları temizlemekle birlikte antioksidan enzimlerin ekspresyonunu düzenleyerek hücrel antioksidan kapasitesini artırmaktadır (Makino vd., 2016; Aksoy & Alper, 2019). Zebra balıkları üzerinde yapılan benzer bir çalışma, arı sütü ile zenginleştirilmiş diyetlerin SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi oksidatif stresle ilişkili enzimlerin ekspresyonunu ve aktivitesini artırdığını belirlemiştir (Aksakal vd., 2021). Arı sütü, lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA seviyelerini azaltırken SOD aktivitesini artırarak hücrel bütünlüğü ve fonksiyonunu korumada etkili bir rol oynamıştır (Ali & Kunugi, 2020). SOD aktivitesini artırma potansiyeli, arı sütünü kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif bozukluklar ve inflamatuvar durumlar gibi çeşitli klinik durumlarda önemli bir alternatif sunmaktadır (Karimi vd., 2023). Eleiwa vd. (2024) tarafından yapılan bir çalışmada, ilaç kaynaklı kardiyotoksisite modellerinde arı sütü uygulamasının kalp dokusundaki oksidatif stresi azalttığı ve SOD aktivitesini artırarak kardiyoprotektif etkiler gösterdiği bildirilmiştir.

1.6.2. Glukoz Oksidaz (GOx)

GOx, moleküler oksijeni elektron alıcısı olarak kullanarak β -D-glukozun D-glukono- δ -lakton ve hidrojen peroksit oksidasyonunu katalize etmektedir. (Farkasovska vd., 2019; Bauer vd., 2022). GOx, sağlık üzerinde çok yönlü etkilere sahiptir; antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri ile diyabet gibi metabolik bozuklukların yönetiminde potansiyel uygulamalarıyla öne çıkmaktadır (Yang vd., 2023). Bu özelliklerinden dolayı gıda teknolojisi, diyabet yönetimi ve hayvan beslenmesi gibi farklı alanlarda terapötik bir ajan ve biyoteknolojik bir araç olarak önemli uygulamaları bulunmaktadır (Wong vd., 2008; Dang vd., 2021; Qu & Liu, 2021; Khatami vd., 2022). Enzimatik reaksiyon sırasında üretilen hidrojen peroksit, güçlü antimikrobiyal özellikler sergileyerek gıdalarda bozulma yapan mikroorganizmalarının ve patojenlerin gelişmesini engellemektedir. GOx'un enzimatik aktivitesi, sıcaklık, pH ve inhibitörlerin varlığı gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Weibel & Bright, 1971; Gouda vd., 2003; Wang vd., 2022b). Ayrıca, enzimin stabilitesi ve aktivitesinin, gıda uygulamalarında etkinliğini sürdürmesi açısından depolama koşullarından etkilenebileceği bildirilmiştir (Sagona vd., 2022).

İşçi arıların hipofarenks bezleri tarafından salgılanan GOx enzimi, arıların bağışıklık mekanizmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Enzimler, nektar, polen taneleri ve mikroorganizmalar gibi farklı kaynaklardan üretilen bu enzim, bal ile arı sütü gibi arı ürünlerinin doğal bir bileşenini oluşturmaktadır (Alshareef vd., 2022). Nektarın bala dönüşüm sürecine katkıda bulunarak balın antimikrobiyal özelliklerini ve genel stabilitesini artırmaktadır (Kunieda vd., 2006). Ayrıca, anti-inflamatuar ve yara iyileştirici etkileri ile antioksidan özelliklerine katkı sağlamaktadır (Bucekova vd., 2018; Osés vd., 2024). Baldaki GOx aktivitesi, balda doğal bir koruma mekanizması oluşturmasının yanı sıra balın sağlık yararlarına da katkı sağlamaktadır. Balın yanı sıra GOx, larvalar ile kraliçe arı için birincil besin kaynağı olan arı sütünde de önemli bir enzimdir. Arı sütünün besin bileşiminde, korunmasında ve antimikrobiyal özelliklerinde rol oynamaktadır (Alreshoodi & Sultanbawa, 2015). GOx, arı sütünün enfeksiyonlara karşı koruma sağlayarak larvaların sağlıklı bir şekilde gelişmesine katkı sağlamaktadır (Kunugi & Mohammed Ali, 2019). Farklı bir çalışmada, arı sütündeki glukoz oksidazın, antimikrobiyal peptitler ve antioksidan bileşiklerle birlikte sinerjik olarak arı sütünün sağlık özelliklerine katkı sağladığı tespit edilmiştir (Mazélienė vd., 2022).

1.6.3. Katalaz (CAT)

CAT, hidrojen peroksidi (H_2O_2) suya ve oksijene ayrıştırarak oksidatif stresin neden olduğu hücresel hasarları önlemektedir (Ighodaro & Akinloye, 2018 Nandi vd., 2019). CAT molekülü, enzimler arasında en yüksek katalitik verimliliklerden birini sergileyerek her saniye milyonlarca hidrojen peroksit molekülünü dönüştürmektedir (Chelikani vd., 2004). SOD ve GPx gibi diğer antioksidan enzimlerle birlikte CAT, hücresel redoks dengesinin sürdürülmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Hewitt & Degnan, 2023). SOD, süperoksit radikallerini H_2O_2 'e dönüştürürken, CAT bu H_2O_2 'i ayrıştırmaktadır. Böylece, süperoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif türler suya dönüştürülerek geniş antioksidan savunma mekanizmalarına katkıda bulunmaktadır (Szczepanczyk vd., 2021; Anwar vd., 2024).

Özellikle yaşlanma, iltihaplanma ve çeşitli hastalıklarla ilişkili artan oksidatif stres koşullarında, CAT'ın üretimi ve enzimatik aktivitesi, hücresel hasarın önlenmesinde ve hücresel bütünlüğün korunmasında kritik bir önem taşımaktadır (Tan vd., 2018; Nandi vd., 2019). Antioksidanlarla sinerjik bir şekilde çalışan CAT, kronik hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde terapötik bir potansiyel sunmaktadır. CAT'ın eksikliği ya da işlev kaybı, diyabet,

viteligo, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, Wilson hastalığı, hipertansiyon, anemi, bazı cilt bozuklukları, Alzheimer hastalığı, bipolar bozukluk ve şizofreni gibi farklı hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Al-Abrash vd., 2000; O'Malley vd., 2003; Góth vd., 2004; Habib vd., 2010; Whyte vd., 2011; Vankayala vd., 2013; van Onselen & Downing, 2019; Tan vd., 2020).

CAT, arılarda oksidatif strese karşı savunma mekanizmasında önemli bir işlev görmektedir. Arılar, hidrojen peroksit gibi ROT'ların birikimine yol açabilecek çeşitli çevresel stres faktörlerine maruz kalmaktadır. Oksidatif stres seviyesindeki artışa bağlı olarak, arılarda CAT aktivitesinin yükseldiği ve bu enzimatik savunma mekanizmasının arıların genel sağlığını korumada önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Nikolić vd., 2015). CATın koruyucu işlevinin yanı sıra arı ürünlerinin kalite özelliklerine de katkı sağlamaktadır. Bal, nektarın bala dönüşme sürecinde GOx enzimi tarafından üretilen hidrojen peroksit içermektedir. Balda bulunan CAT, bu hidrojen peroksit seviyelerini düzenleyerek balın antimikrobiyal özelliklerini etkilemektedir. Yüksek CAT aktivitesine sahip bal örneklerinde hidrojen peroksit seviyelerinin daha düşük olduğu, bu durumun balın doğal koruyucu ve yara iyileştirici özelliklerini etkilediği belirtilmiştir (Brudzynski vd., 2011). Bu nedenle, GOx ve CAT aktiviteleri arasındaki denge, balın kalitesini ve güvenilirliğini sağlamak açısından büyük önem taşımaktadır. Literatürde sınırlı çalışma bulunmakla birlikte CAT, arı sütünün kalitesini ve güvenilirliğini korumada önemli bir işlev üstlenmektedir. Arı sütü, içerdiği CAT ve diğer antioksidan enzimlerle oksidatif stresi azaltarak güçlü antioksidan özellikler göstermekte ve biyoaktif bileşiklerini korumaktadır (Oršolić & Jembrek, 2024). Arı sütündeki CAT aktivitesi hem arı kolonilerinin sağlığı hem de arı ürünlerinin insan sağlığına katkısı açısından önem arz etmektedir.

1.7. Arı Sütünde Tazelik

Arı sütü, besin değeri ve tıbbi özellikleriyle bilinen oldukça değerli bir arı ürünüdür. Arı sütünde tazelik, arı sütünün besin değeri, kalitesi ve terapötik özellikleri üzerinde doğrudan etkili olduğundan büyük bir öneme sahiptir. Arı sütü, yüksek nem içeriği ile birlikte içerdiği lipid, protein ve karbohidrat bileşenlerinden dolayı ısıya, ışığa ve havaya karşı duyarlıdır. Bu nedenle depolama süresince arı sütünün kimyasal ve biyolojik özelliklerinin korunması için özel koşullar gerekmektedir. Arı sütünün kalitesi, depolandığı ve taşındığı sıcaklık ve süre artışına bağlı olarak azalmaktadır. Tazelik parametrelerinin

değerlendirilmesi hem tüketiciler hem de üreticiler için kritik bir öneme sahip olup, bu faktörler arı sütü ile ilişkilendirilen sağlık yararlarını önemli ölçüde etkileyebilmektedir.

Arı sütünün kimyasal bileşimi oldukça kararlı olmakla birlikte coğrafi konum, mevsim, arı türü ve işleme yöntemleri gibi faktörler, arı sütünün bileşimi ve kalitesinde önemli farklılıklara yol açabilmektedir (Khalfan Saeed Alwali Alkindi vd., 2023; Alattal vd., 2025). Arı sütünün bileşimindeki bu değişkenlik, arı sütünün kalitesini etkilemektedir. Bu nedenle kimyasal bileşimin tek başına ürün tazeliğini değerlendirmek için uygun bir parametre olmadığı bildirilmektedir (Sabatini vd., 2009). Bununla birlikte, literatürde arı sütü tazeliğinin göstergelerinden biri olarak, kimyasal bileşimde yer alan 10-HDA, arı sütü proteinleri ile amino asitlerin ve bazı enzimler (GOx ve SOD) gibi çeşitli parametreler değerlendirilmiştir (Pavel vd., 2011; Sagona vd., 2012; Shen vd., 2015).

Arı sütünde önemli bir kalite göstergesi olan 10-HDA, farklı çalışmalarda tazelik indikatörü olarak değerlendirilmiştir. Ancak, taze arı sütü standartlarda bildirildiği üzere %1,4'ten daha fazla 10-HDA içermekte olup, bu bileşik anti-inflamatuar ve antioksidan özellikler gibi çeşitli sağlık faydalarına sahiptir (International Organization for Standardization, 2016; Botezan vd., 2023). Çalışmalar, 10-HDA konsantrasyonunun depolama koşullarına bağlı olarak zamanla azalabildiğini ve bu nedenle arı sütünün tazeliğini değerlendirmede güvenilir bir belirteç olarak kullanılabileceğini bildirmektedir (Takikawa vd., 2013; Ghosh & Jung, 2024). Bu kapsamda, Antinelli vd. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, arı sütünün farklı sıcaklıklarda (-18, 4 ve 25°C) 12 ay boyunca depolanması sonucunda 10-HDA içeriğinde meydana gelen değişimler incelenmiştir. Çalışma sonuçları, -18°C'de depolanan örneklerde %0,1 oranında, 4°C'de %0,2 ve 25°C'de %0,4-0,6 arasında bir azalma olduğunu, ancak bu değişimlerin genel olarak sınırlı kaldığını göstermiştir. Depolama sırasında içeriği büyük ölçüde değişmeyen, stabil bir bileşik olması 10-HDA'nın tazelik göstergesi olarak kullanımını sınırlamaktadır.

Arı sütünde bulunan proteinler, özellikle MRJP'ler, gıda kalitesi açısından büyük bir öneme sahiptir. Ancak bu proteinler, uygun olmayan depolama koşullarında olumsuz etkilenmekte ve arı sütünün genel kalitesinde kayıplara neden olmaktadır (Chen & Chen, 1995; Baptista vd., 2023). Bu nedenle, arı sütü proteinlerinin tazelik göstergesi olarak kullanılması üzerine farklı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Özellikle oda sıcaklıklarında depolanan arı sütlerinde, protein ve karbohidrat içeriğinde önemli bir azalma meydana gelmektedir (Pavel vd., 2011). Kamakura vd. (2001), arı sütünün 10-HDA ve bazı vitamin içeriklerinin 40°C'de 7 gün boyunca değişmediğini tespit etmiştir. Buna karşın, 57 kDa'lık

glikoprotein yapısına sahip olan MRJP1'in farklı sıcaklıklarda (4°C'den 50°C'ye kadar) 7 günlük depolama süresi boyunca bozunduğunu ve bu proteinin arı sütünün tazelik göstergesi olabileceğini bildirmiştir. Benzer şekilde, Zhao vd. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, MRJP'lerin depolama koşullarına duyarlı olduğu ve özellikle MRJP5'in tazelik değerlendirmesinde uygun bir parametre olabileceği belirtilmiştir. Farklı bir çalışmada, SDS-PAGE elektroforez yöntemiyle MRJP1, MRJP2, MRJP3 ve MRJP5'lerin bozunma oranının depolama sıcaklığı ve süresi ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (Shen vd., 2015). Araştırma ayrıca, ELISA yöntemi kullanılarak MRJP1'in hassas ve pratik bir şekilde tazelik ve kalite göstergesi olarak değerlendirilebileceğini göstermiştir. Li vd. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada, arı sütlerinin protein içerikleri -20°C, +4°C ve oda sıcaklığında 12 ay boyunca incelenmiştir. MRJP1 seviyesinin önemli ölçüde azaldığı, MRJP4, MRJP5, GOx, peroksiredoksin ve glutatyon S-transferaz proteinlerinin ise 12 ayın sonunda tamamen bozunduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, arı sütü proteinlerinin depolama sıcaklıklarına karşı oldukça hassas olduğunu ve tazelik göstergesi olarak değerlendirilebileceğini belirtmektedir.

Proteinlerin yanı sıra, serbest amino asitler de arı sütünde tazelik indikatörü olarak değerlendirilebilmektedir. Oda sıcaklığında depolama sırasında proteolitik enzim aktivitesine bağlı olarak çeşitli serbest amino asitlerin miktarında azalma olduğu gözlemlenmiştir (Boselli vd., 2003; Liming vd., 2009). Bununla birlikte, oda sıcaklığında depolanan arı sütlerinde proteolitik enzim aktivitesi sonucu prolin ve lizin miktarının ilk 3 ayda arttığı, ancak 6 ayın ardından başlangıç seviyesinin altına indiği belirlenmiştir. +4°C'de depolanan arı sütlerinde ise 10 aylık süre boyunca serbest amino asitlerde önemli bir değişim saptanmamıştır. Liming vd. (2009), depolama sıcaklık ve süresine bağlı olarak toplam serbest amino asit miktarında genel bir değişiklik olmadığını, ancak glutamin ve metiyonin miktarının belirgin şekilde azaldığını ve bu değişimin arı sütü kalitesini değerlendirmede kullanılabileceğini bildirmiştir.

Arı sütü tazeliğini değerlendirmede bir diğer önemli parametre, enzimatik aktivite olmakla birlikte literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Sagona vd. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada soğutulmuş ve dondurulmuş arı sütlerindeki farklı depolama sürelerine bağlı olarak GOx, beş proteaz ve iki antioksidan enzimin (Peroksiredoksin ve Glutatyon S transferaz) aktivitesi araştırılmıştır. Dondurmanın enzimatik aktiviteyi daha iyi koruduğunu, soğutmanın ise kademeli bir düşüşe neden olduğunu göstermiştir. Sonuçlar, özellikle GOx ve karboksipeptidaz A enzim aktivitelerinin,

arı sütü tazeliğini değerlendirmek için kullanılabileceğini bildirmektedir. Arı sütünde tazelik indikatörü olarak değerlendirilen SOD ve GOx enzim aktivitelerinin depolama süresi ve koşullarından önemli derecede etkilendiği, özellikle 20° derece depolama sıcaklığında hızlı bir şekilde düştüğü belirlenmiştir (Chaozhong & Youlu, 1999; Tang & Yuan, 1999; Li vd., 2008). Benzer şekilde Kausar & Shaikh (2023) ise 4 °C ve -18 °C’de depolanan arı sütlerinin 2 yıl boyunca GOx aktivitesini incelemişlerdir. Çalışmada, 4 °C’de depolama sırasında aktivite düzeyleri 2. ayda 264,2, 6. ayda 142,8 ve 1 yıl sonunda 64,00 U/mg protein olarak ölçülmüş; önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Ancak, 6 aydan sonraki yıllarda aktivite değerleri arasında anlamlı bir fark kaydedilmemiştir. -18°C’de depolanan arı sütlerinde ise 2 yıl boyunca önemli bir aktivite kaybı gözlemlenmemiştir.

Amino asitler ile indirgen şekerler arasında gerçekleşen Maillard reaksiyonunun bir ürünü olan furosin, taze arı sütü örneklerinde oldukça düşük konsantrasyonlarda bulunmakta ve depolama sıcaklığı ile süresine bağlı olarak artış göstermektedir. Bu nedenle furosin, arı sütünün kalite ve tazeliğini değerlendirmede uygun bir parametre olarak önerilmektedir (Marconi vd., 2002; Messia vd., 2005). Taze arı sütünde depolama sıcaklığı ve süresine bağlı olarak HMF oluşumu, ters faz-yüksek performans sıvı kromatografisi (RP-HPLC) yöntemiyle analiz edilmiştir (Ciulu vd., 2015). Çalışmada, HMF’nin arı sütünün tazeliğini belirlemede bir gösterge olarak değerlendirilebileceği belirtilmiştir. Araştırmacılar, -18°C ve +4°C’de muhafaza edilen arı sütlerinde HMF’nin tespit edilebilir seviyelerde bulunmadığını, ancak 25°C’de depolamanın ilk ayından itibaren HMF konsantrasyonunun belirgin şekilde arttığını bildirmişlerdir. Bu bulgular hem furosin hem de HMF’nin arı sütü tazeliğinin değerlendirilmesinde önemli biyokimyasal göstergeler olabileceğini göstermektedir. Özellikle yüksek sıcaklığa maruz kalmış veya oda sıcaklığında uzun süre saklanan arı sütü ürünleri için önem taşımaktadır.

Uygun olmayan sıcaklık koşullarında uzun süreli depolama, özellikle lipid oksidasyonu ve Maillard reaksiyonu gibi süreçler ile lipid ve protein fraksiyonları arasındaki etkileşimlerin yanı sıra enzimatik reaksiyonlar nedeniyle, arı sütünde çeşitli fiziksel ve kimyasal değişikliklere neden olmaktadır (Boselli vd., 2003; Abdelnur vd., 2011; Pavel vd., 2011). Arı sütünün rengi esmerleşme reaksiyonlarına bağlı olarak koyulaşmakta ve artan titre edilebilir asit içeriği nedeniyle acı tat gelişimi gözlemlenmektedir (Chen & Chen, 1995; Ramadan & Al-Ghamdi, 2012). Zheng vd. (2011), kromojenik reaksiyonun arı sütü tazeliğini belirlemek için hızlı bir yöntem olarak kullanılabileceğini ve bu fiziksel parametrelerin, kimyasal bileşimle birlikte izlenmesinin önemini belirtmiştir. Arı sütlerinin

5°C'nin altında depolanması durumunda viskozite artışı gözlemlenmiştir. Bu durum, çözünür azot ve serbest amino asit içeriğinde azalma ile suda çözünmeyen azotlu bileşiklerin miktarındaki artışa bağlanmaktadır (Drijfhout vd., 2005). Bu bulgular, depolama sıcaklığının arı sütü kalitesini korumadaki kritik rolünü vurgulamaktadır.

Depolama sırasında arı sütünde meydana gelen metabolit değişikliklerini incelemek için Nano-ESI-MS ve UPLC-Q/TOF-MS gibi ileri analitik teknikler de kullanılmaktadır (Zhuang vd., 2025). Bu teknikler, depolama sırasında meydana gelen biyokimyasal değişiklikleri kapsamlı bir şekilde anlamayı sağlamak ve arı sütü kalitesini değerlendirmek için daha ayrıntılı bir yaklaşım sunmaktadır.

Depolama koşulları, arı sütü tazeliği üzerinde belirleyici bir etkiye sahiptir. Arı sütünün ideal şekilde muhafaza edilmesi, düşük sıcaklıkta depolama, ışık ve oksijenle temasın engellenmesi, nem seviyesinin kontrol edilmesi ve doğru ambalaj malzemelerinin kullanılması gibi faktörlere bağlıdır. Sıcaklık ve depolama süresi, arı sütünün biyoaktif bileşiklerinin stabilitesini etkileyen önemli faktörler arasında yer almaktadır. Özellikle dondurma yönteminin arı sütü kalitesini korumada en etkili yöntemlerden biri olduğu bildirilmiştir (Li vd., 2007a). Buna karşılık, oda sıcaklığında depolama, özellikle MRJP'ler ve enzimatik aktivitede önemli kayıplara neden olmaktadır. Benzer şekilde, Sagona vd. (2022), yüksek sıcaklıkların arı sütündeki biyoaktif bileşiklerin daha hızlı bozulmasına neden olduğunu ve enzimatik aktivitenin sıcaklık değişimlerine karşı duyarlı olduğunu belirlemiştir.

Arı sütünün nem oranı, depolama sürecinde dikkat edilmesi gereken bir faktördür. Taze arı sütü, genellikle %50-60 su içeriğine sahiptir (Ma vd., 2022). Yüksek nem seviyesi, mikrobiyal büyümeyi hızlandırarak ürünün bozulmasına yol açabilmektedir. Bu nedenle, arı sütünün kuru bir ortamda saklanması veya uzun süreli koruma için dondurma yönteminin tercih edilmesi büyük önem taşımaktadır. Dondurma işlemi, biyoaktif bileşenlerin bütünlüğünü koruyarak arı sütünün raf ömrünü etkili bir şekilde artırmaktadır (Khalfan Saeed Alwali Alkindi vd., 2024). Arı sütünün tazeliği ve kalitesini korumak amacıyla liyofilizasyon (dondurarak kurutma) yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemin arı sütündeki su içeriğini %1'in altına düşürdüğünü ve fizikokimyasal özelliklerin yanı sıra biyoaktif bileşenlerin korunmasında etkili olduğu bildirilmiştir (Ghadimi-Garjan vd., 2023). Liyofilizasyon, arı sütünün raf ömrünü uzatırken besleyici ve terapötik özelliklerini de korumaktadır (Nascimento vd., 2015).

Sıcaklığın yanı sıra ışık ve oksijen varlığı da arı sütünün kalitesini olumsuz etkilemektedir. Işık ve oksijene maruz kalan arı sütünde lipit, protein ve şeker gibi bileşiklerin oksidasyon süreci hızlanmakta ve oluşan oksidatif stres sonucunda arı sütünün biyoaktif özelliklerinde kayıplar olabilmektedir (Kocot vd., 2018; Botezan vd., 2023). Bu nedenle, arı sütünün ışık geçirmeyen opak kaplarda saklanması önerilmektedir. Ambalaj malzemelerinin seçimi de arı sütünün korunmasında büyük rol oynamaktadır. Neme ve gazlara karşı geçirimsiz özellikteki malzemeler, arı sütünün kontaminasyonunu ve bozulmasını engellemektedir (Lee vd., 2015). Cam kaplar, inert yapıları ve dış etkenlere karşı koruma sağlaması nedeniyle tercih edilmektedir. Ayrıca, arı sütünün pH seviyesi de ürünün stabilitesini doğrudan etkilemektedir. Arı sütü hafif asidik bir yapıya ve düşük pH değerine sahip olduğundan dolayı mikroorganizma gelişimi engellemektedir. Muhafaza sırasında bu asidik ortamın korunması, ürünün raf ömrünü artırmakta ve bozulmayı geciktirmektedir (Maželienė vd., 2022; El Alami El Hassani vd., 2024).

1.8. Çalışmanın Amacı ve Önemi

Arı sütünde tazelik ve kalite özellikleri, arı ürünleri sektöründe kritik bir öneme sahiptir. Düşük kaliteli ürünlerin piyasaya sürülmesini engellemek ve insan sağlığı üzerinde oluşabilecek olumsuz etkileri önlemek için, tazeliğe ilgili güvenilir tespit yöntemlerinin geliştirilmesi ve kalite kriterlerinin tanımlanması gerekmektedir. Arı sütü tazeliği, bu ürünün besin değerini ve terapötik özelliklerini doğrudan etkileyen önemli bir parametre olarak değerlendirilmektedir.

Literatürde, arı sütünün tazeliğini değerlendirmek için bazı indikatörlerin incelendiği çalışmalar, bu yöntemler hakkında değerli bilgiler sağlamakta ve tazeliğin korunmasının, arı sütünün besinsel ve fonksiyonel özelliklerinde kritik bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, ülkemizde ve dünya genelinde kabul görmüş standart bir yöntem henüz belirlenmemiştir. Bu parametrelerin çeşitli faktörlerden etkilenmesi, güvenilirliklerini düşürmekte; ayrıca analizlerde kompleks numune hazırlama süreçleri veya özel cihazlara duyulan ihtiyaç, uygulama aşamasında farklı zorluklara yol açmaktadır. Dolayısıyla, kalite standartlarının tanımlanmasındaki zorluklar ve mevcut kriterlerin geniş çapta kabul görmemesi, önemli bir eksiklik olarak dikkat çekmektedir. Ayrıca, arı sütünün raf ömrüyle ilgili literatürde yeterli çalışma bulunmamaktadır. Mevcut araştırmalarda ise genellikle depolama koşullarına bağlı yalnızca birkaç parametre değerlendirilmiştir. Arı

sütünün raf ömrüne ilişkin kapsamlı çalışmaların önemine bakıldığında, farklı kalite parametrelerini bir arada ele alan bu tür araştırmaların hem bilimsel hem de endüstriyel açıdan önemli bir ihtiyaç olduğu anlaşılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, depolama sıcaklığı ve süresine bağlı olarak arı sütünün çeşitli fizikokimyasal özellikleri, protein ve şeker profilleri ile bazı enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler (SOD, GOx ve CAT) incelendi. Ayrıca, protein, lipit ve şeker bileşenlerinin oksidatif bozunma ürünleri ile bu ürünlerin konsantrasyonlarına bağlı olarak antioksidan aktivitelerdeki değişimler araştırıldı. Elde edilen bulgular doğrultusunda, arı sütünün bileşimi ve kalite özellikleri açısından raf ömrü incelendi; arı sütü protein, lipit ve karbohidrat bileşenlerinin oksidatif bozunma ürünleri ve enzim aktiviteleri arı sütü tazeliğinin bir fonksiyonu olarak değerlendirildi.

Elde edilen bulguların, arı üreticileri için sektörel, tüketiciler ve bilim insanları için ise bilimsel anlamda önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir. Bu çalışma, arı sütüne yönelik bilimsel anlayışı derinleştirmenin yanı sıra sektörün kalite standartlarını iyileştirmek için uygulanabilir çözüm önerileri geliştirilmesine olanak tanımaktadır. Elde edilen bulguların, arı üreticileri için sektörel; tüketiciler ve bilim insanları için ise bilimsel anlamda önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Cihazlar

Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlara ait marka/model detayları Tablo 2’de verildi.

Tablo 2. Kullanılan cihazlar ve marka/model bilgileri

Cihaz	Marka/Model
Çalkalamalı su banyosu	Nüve ST-30
Derin dondurucu (-80°C)	Regal RDD-1280
Elektroforez	Biorad, Mini Protean Tetra Cell, 4-Gel System
Etüv	Nüve FN500
Hassas terazi	Schimadzu AUX320
Homojenizatör	IKA T-18
HPLC-UV	Elite LaChrom, Hitachi
Hunter renk ölçüm cihazı	Konica Minolta CR-5
Jel görüntüleme cihazı	Biorad Gel Doc EZ
Kjeldahl protein cihazı	Şimşek Labor Teknik
Kül fırını	Nüve MF-100
Manyetik karıştırıcı	IKA C-Mag HS 7
pH-metre	Hanna pH 211
Refraktometre	Atago, B.793, Japan
Santrifüj	Hermle Z 326K
Su banyosu	Nüve BM402
UV-Vis spektrofotometre	Biochrom Libra
Vakumlu etüv	Memmert, INB 400, Almanya
Vorteks karıştırıcı	Wisemix VM-10

2.2. Kimyasal Maddeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler ile bu maddelerin temin edildiği firmalara ait bilgiler Tablo 3’te sunuldu.

Tablo 3. Kimyasal maddeler ve satın alındıkları firma bilgileri

Kimyasal Maddeler	Firma Bilgileri
10-hidroksi-2-dekanoik asit (10-HDA)	Cayman Chemical
2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazin (TPTZ)	Sigma
5-Hidroksimetilfurfural (HMF)	Sigma
ABTS [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu]	Sigma
Akrilamid	Merck
Amonyum persülfat (APS)	Merck
Amonyum sülfat (NH ₄) ₂ SO ₄	Merck
Asetonitril	Merck
Bakır(II) klorür dihidrat (CuCl ₂ .2H ₂ O)	Merck
Bakır sülfat pentahidrat (CuSO ₄ .5H ₂ O)	Merck
Borik asit	Merck
Bromkresol yeşili	Merk
Bromofenol mavisi	Thermo Scientific
Coomassie Brilliant Blue R250	Sigma
Coomassie Brilliant Blue G250	Sigma
Çinko asetat dihidrat (Zn(CH ₃ COO) ₂ .2H ₂ O)	Merck
Demir klorür (FeCl ₃)	Merck
Demir sülfat heptahidrat (FeSO ₄ .7H ₂ O)	Sigma
Disodyum Fosfat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)	Sigma
Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)	Serve
Etanol	Isolab
Fosfat tampon salin (PBS, pH 7,4)	Oxoid
Fosforik asit	Isolab
Fruktoz	Sigma
Glasiyal asetik asit (CH ₃ COOH)	Sigma
Gliserol	Sigma
Glisin	Serve
Glukoz	Sigma
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Merck
Hidroklorik asit (HCl)	Isolab
Kloramin T.3H ₂ O	Sigma
Kloroform	Sigma
Ksantin	Sigma
Ksantin Oksidaz	Sigma

Tablo 3'ün devamı

Maltoz	Sigma
Melebiyoz	Sigma
Melezitoz	Sigma
Metanol	Merck
Metil 4-hidroksibenzoat (MHB)	Sigma
Metil kırmızısı	Merck
Mono potasyum fosfat (KH_2PO_4)	Merck
Mono sodyum fosfat hidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Merck
Monosodyum fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Isolab
N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin (TEMED)	Apollo Scientific
N,N'-Metilen bisakrilamid	Sigma
Nitroblue tetrazolium (NBT)	Sigma
<i>o</i> -dianisidin	Sigma
Peroksidaz	Sigma
Potasyum hekzasiyanoferrat (II) trihidrat ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	Merck
Potasyum iyodür (KI)	Merck
Potasyum persülfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)	Merck
Potasyum sülfat (K_2SO_4)	Merck
Protein marker	Thermo Scientific
Riboz	Sigma
Sakkaroz	Sigma
Sığır serum albümin (BSA)	Sigma
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma
Sodyum hidroksit (NaOH)	Sigma
Sodyum karbonat (Na_2CO_3)	Merck
Süperoksit dismutaz	Sigma
Tiyobarbütirik asit (TBA)	Merck
Trikloroasetik asit (TCA)	Merck
Tris	Sigma
Troloks	Sigma
β -merkaptetoanol	Tekkim

2.3. Kullanılan Çözeltiler

Tez çalışması kapsamında yapılan analizlerde kullanılan çözeltilerin isimleri ve hazırlanış yöntemleri Tablo 4'te bildirildi.

Tablo 4. Kimyasal analizlerde kullanılan çözeltiler

Kjeldahl Metodu ile Protein Tayini	
Katalizör (Yakma tuzu)	70 g K ₂ SO ₄ ve 8 g CuSO ₄ .5H ₂ O tartılarak karıştırılmıştır.
%40 NaOH	40 g NaOH bir miktar saf suda çözündürülmüş ve hacim balon jojede 1 L'ye tamamlanmıştır.
%2 Borik asit	20 g borik asit bir miktar saf suda çözündürülmüş ve çözünme zor olduğu için sıcak su banyosunda çözünene kadar bekletilmiştir. Soğuduktan sonra hacim balon jojede 1 L'ye tamamlanmıştır.
0,1 N HCl	Bir miktar saf su üzerine 2,025 mL HCl (%37) ilave edilerek hacim balon jojede 250 mL'ye tamamlanmıştır.
Mix indikatör	0,2 g metil kırmızısı ve 0,1 g bromkresol yeşili tartılarak 100 mL %95'lik etil alkol içerisinde çözündürülmüştür.
Bradford Metodu ile Protein Tayini	
Bradford reaktifi	100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 50 mL etanol (%95) içerisinde çözündürülmüştür. 100 mL %85'lik fosforik asit eklenerek hacmi saf su ile balon jojede 1 L'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti 1 gece boyunca karıştırılmış ve ardından filtre edilerek (Whatman No. 1) koyu renkli şişede muhafaza edilmiştir.
BSA standardı	1 mg/mL olacak şekilde stok BSA standardı hazırlanmış ve 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 ve 0,1 mg/mL'lik konsantrasyonlara saf su ile seyreltilerek kullanılmıştır.
10-hidroksi-2-dekanoik asit (10-HDA) Tayini	
10-HDA stok çözeltisi (160 µg/mL)	0,016 g 10-HDA bir miktar metanol:su (50:50) çözücüsü içerisinde çözündürülmüş ve hacim balon jojede 100 mL'ye tamamlanmıştır (160; 80; 40; 20; 10; 5,0; 2,5 ve 1,25 µg/mL).
MHB çözeltisi (100 µg/mL)	0,01 g MHB bir miktar metanol: ultra saf su (50:50) çözücüsü içerisinde çözündürülmüş ve hacim balon jojede 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Tablo 4'ün devamı

İleri Oksidasyon Protein Ürünleri Tayini (İOPÜ)	
0,1 mM Kloramin T standardı	7,042 mg Kloramin T.3H ₂ O bir miktar saf su içerisinde çözündürülmüş ve 250 mL'lik stok çözeltisi elde edilmiştir. Bu çözeltiden 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,81; 3,90; 1,95 ve 0,97 µmol/L konsantrasyonlarında standart çözeltiler hazırlanmıştır.
1,16 M KI	48,14 g KI bir miktar saf su içerisinde çözündürülmüş ve hacim balon jojede 250 mL'ye tamamlanmıştır.
5-Hidroksilmetilfurfural (HMF) Tayini	
%40 TCA çözeltisi	40 g TCA bir miktar saf su içerisinde çözündürülmüş ve hacim balon jojede 100 mL'ye tamamlanmıştır.
%4 TCA çözeltisi	4 g TCA bir miktar saf su içerisinde çözündürülmüş ve hacim balon jojede 100 mL'ye tamamlanmıştır.
HMF standardı (100 ppm)	1 mg/mL olacak şekilde metanol:ultra saf su (10:90) çözücüsü içerisinde stok HMF çözeltisi hazırlanmış ve aynı çözücü ile 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 ve 1,5625 ppm'lik konsantrasyonlara seyreltilerek hazırlanmıştır.
SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	
Ayrırma jeli tamponu (1,5 M Tris-HCl)	45,42 g Tris 200 mL saf su içerisinde çözündürülerek pH'sı 8,8'e ayarlanmış ve hacim balon jojede 250 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti +4°C'de saklanmıştır.
Yığılma jeli tamponu (1 M Tris-HCl)	30,28 g Tris 200 mL saf su içerisinde çözündürülerek pH'sı 6,8'e ayarlanmış ve hacim balon jojede 250 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti +4°C'de saklanmıştır.
%10 SDS çözeltisi	10 g SDS bir miktar saf su içerisinde çözündürülmüş ve hacim balon jojede 100 mL'ye tamamlanmıştır.
%10 APS çözeltisi	1 g APS bir miktar saf su içerisinde çözündürülmüş ve hacim balon jojede 10 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti -20°C'de saklanmıştır.

Tablo 4'ün devamı

TEMED	Orijinal şişesinden kullanılmıştır.
%30 Akrilamid/bisakrilamid çözeltisi	29,2 g akrilamid ve 0,8 g N,N'-metilen bisakrilamid saf suda çözündürülmüş ve hacim balon jojede 100 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti +4°C'de saklanmıştır.
%80 Gliserol çözeltisi	80 mL gliserol balon jojeye ilave edilmiş ve hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
%0,1 Bromofenol mavisi	10 mg bromofenol mavisi saf suda çözündürülmüş ve hacim balon jojede 10 mL'ye tamamlanmıştır.
SDS-PAGE yükleme çözeltisi	150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 400 µL %10 SDS, 100 µL %0,1 bromofenol mavisi, 250 µL %80 gliserol ve 60 µL β-merkaptoetanol'ün karıştırılması ile hazırlanmış ve 1,5 mL'lik ependorflara bölünerek -20°C'de saklanmıştır.
SDS-PAGE yürütme tamponu	7,2 g Tris ve 1,5 g glisin yaklaşık 480 mL saf suda çözündürüldükten sonra üzerine 10 mL SDS (%10) çözeltisi ilave edilmiştir. pH 8,3'e ayarlanmış ve hacim balon jojede 500 mL'ye tamamlanmıştır.
Jel boyama çözeltisi	1 g Coomassie Brilliant Blue R250 62,5 mL glasiyal asetik asit ve 93,5 mL metanol içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır.
Boya uzaklaştırma çözeltisi	100 mL glasiyal asetik asit, 400 mL metanol ve 600 mL saf suyun karıştırılmasıyla hazırlanmıştır.
Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini	
0,3 mM Ksantin çözeltisi	4,56 mg ksantin birkaç damla 1 N NaOH içeren 100 mL saf suda çözündürülmüştür.
0,6 mM EDTA çözeltisi	11,16 mg EDTA 50 mL saf suda çözündürülmüştür.
150 µM NBT çözeltisi	6,15 mg NBT 50 mL saf suda çözündürülmüştür. NBT günlük taze hazırlanmıştır.
400 mM Na ₂ CO ₃ çözeltisi	2,12 g Na ₂ CO ₃ 50 mL saf suda çözündürülmüştür.
BSA standardı (1 g/L)	10 mL saf suda 10 mg BSA çözündürülmüştür.

Tablo 4'ün devamı

2 M Amonyum sülfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ çözeltisi	2,643 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mL saf suda çözündürülmüştür.
Ksantin oksidaz (167 U/L)	Stok enzimden 16 μL alınıp, 1 mL 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ da çözündürülmüştür.
0,8 mM $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi	5,37 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50 mL saf suda çözündürülmüştür. Günlük taze hazırlanmıştır.
SOD standartları (100 U/mL)	5822,4 U/mL'lik orjinal şişeden 34,35 μL alınarak saf su 2 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen stok çözeltiden 25; 12,5; 10; 5, 2,5, 1,25, 1 ve 0,5 U/mL'lik SOD standartları ve kör hazırlanmıştır.
Reaksiyon karışımı; 40 mL Ksantin çözeltisi, 20 mL EDTA çözeltisi, 20 mL NBT çözeltisi, 12 mL Na_2CO_3 çözeltisi ve 6 mL BSA'nın karıştırılmasıyla hazırlanmıştır.	
Katalaz Aktivite Tayini (Aebi, 1984)	
30 mM H_2O_2	Bir miktar saf suyun içerisine, 34 μL H_2O_2 (%30) ilave edilmiş ve hacim balon jojede 10 mL'ye tamamlanmıştır.
50 mM fosfat tamponu (pH 7,06)	2,97 g Na_2HPO_4 ve 3,49 g NaH_2PO_4 saf su içerisinde çözündürülerek tamponun pH'ı 7,06'a ayarlanmış ve hacim balon jojede 1 L'ye tamamlanmıştır.
Katalaz Aktivite Tayini (Lartillot vd., 1988)	
10 mM H_2O_2	0,1 M fosfat tamponu içerisinde 10 mM H_2O_2 olacak şekilde substrat çözeltisi hazırlanır.
50 mM fosfat tamponu (pH 6,8)	2,02 g Na_2HPO_4 ve 4,29 g NaH_2PO_4 saf su içerisinde çözündürülerek tamponun pH'ı 6,8'e ayarlanmış ve hacim balon jojede 1 L'ye tamamlanmıştır.
1 N HCl	8,292 mL HCl (%37) balon jojeye ilave edilmiş ve hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.
Glukoz Oksidaz (GOx) Aktivite Tayini	
0,1 M fosfat tamponu (pH 6,1)	1,022 g Na_2HPO_4 ve 13,496 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ saf su içerisinde çözündürülerek tamponun pH'ı 6,1'e ayarlanmış ve hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

Tablo 4'ün devamı

2,14 mM glukoz çözeltisi	38,56 mg glukoz bir miktar fosfat tamponu içerisinde çözündürülmüş ve hacim balon jode 100 mL'ye tamamlanmıştır.
Etanolik <i>o</i> -dianisidin (1 mg/mL)	100 mg <i>o</i> -dianisidin bir miktar etanol içerisinde çözündürülmüş ve hacim balon jode 100 mL'ye tamamlanmıştır.
Peroksidaz (60 U)	6 mg peroksidaz 15 mL fosfat tamponu içerisinde çözündürülmüştür.
1 N HCl	8,292 mL HCl (%37) balon jodeye ilave edilmiş ve hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.
H ₂ O ₂ standartları (100 Mm)	1,02 mL H ₂ O ₂ (%30) bir miktar saf su üzerine ilave edilip hacim balon jode 100 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen stok çözeltiden 100; 75; 50; 25; 12,5; 10; 5 ve 2,5 µmol/L standart çözeltiler hazırlanmıştır.
Demir (III) İndirgeme Antioksidan Gücü (FRAP) ile Antioksidan Aktivite Tayini	
40 mM HCl	Saf su üzerine 340 µL HCl (%37) ilave edilmiş ve hacim balon jode 100 mL'ye tamamlanmıştır.
20 mM FeCl ₃	324,4 mg FeCl ₃ saf su ile hacim balon jode 100 mL'ye tamamlanmıştır.
300 mM asetat tamponu (pH 3,6)	0,775 g CH ₃ COONa.3H ₂ O ve 4 mL glasiyel asetik asit saf su ile hacim balon jode 250 mL'ye tamamlanmıştır.
10 mM TPTZ	7,8083 mg TPTZ 2,5 mL 40 mM HCl içerisinde çözündürülmüştür.
FRAP reaktifi	Asetat tamponu (300 mM, pH 3,6), 10 mM TPTZ, 20 mM FeCl ₃ sırasıyla 10:1:1 oranında olacak şekilde karıştırılmış ve taze olarak hazırlanmıştır. Çözelti karanlıkta muhafaza edilmiştir.
FeSO ₄ .7H ₂ O (1000 µM)	27,8 mg FeSO ₄ .7H ₂ O saf su ile hacim balon jode 100 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen stok çözeltiden 500; 250; 125; 62,5; 31,25 µM standart çözeltiler hazırlanmıştır.

Tablo 4'ün devamı

Troloks (1000 μ M)	25 mg Troloks bir miktar etanol içerisinde çözündürülmüş ve hacim balon jojede 100 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen stok çözeltiden 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 μ M standart çözeltiler hazırlanmıştır.
------------------------	---

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali süpürme aktivitesi tayini

100 μ M DPPH radikal çözeltisi	4 mg DPPH tartılmış ve 100 mL metanolde çözündürülmüştür. Hazırlanan çözelti karanlıkta muhafaza edilmiştir.
1 mM DPPH radikal çözeltisi	39,4 mg DPPH tartılmış ve 100 mL metanolde çözündürülmüştür. Hazırlanan çözelti karanlıkta muhafaza edilmiştir.
1000 μ M Troloks çözeltisi	25 mg Troloks bir miktar metanol içerisinde çözündürülmüş ve hacim balon jojede 100 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen stok çözeltiden 200; 100; 75; 50; 25; 10; 5 μ M standart çözeltiler hazırlanmıştır.

ABTS•+ (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) Radikali Süpürme Aktivitesi Tayini

7 mM ABTS	38,41 mg ABTS tartılmış ve 10 mL saf suda çözündürülmüştür.
2,45 mM K ₂ S ₂ O ₈ (Potasyum persülfat)	6,62 mg potasyum persülfat tartılmış ve 10 mL saf suda çözündürülmüştür.
5 mM fosfat tamponu (pH 7,4)	0,215 g Na ₂ HPO ₄ ve 0,152 g NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O saf su içerisinde çözündürülerek tamponun pH'ı 7,4'e ayarlanmış ve hacim balon jojede 1 L'ye tamamlanmıştır.
1000 μ M Troloks	25 mg Troloks bir miktar etanol içerisinde çözündürülmüş ve hacim balon jojede 100 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen stok çözeltiden 600; 450; 225; 112,5; 56,25 μ M standart çözeltiler hazırlanmıştır.
ABTS çözeltisi, 7 mM ABTS ile 2,45 mM K ₂ S ₂ O ₈ 'in 2:1 oranında karıştırılması ve bu karışımın karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında 12-16 saat bekletilmesiyle hazırlanmıştır.	

Tablo 4'ün devamı

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi- Kırılma İndisi Dedektörü (HPLC-RID) ile Şeker Tayini	
Standart şeker (riboz, fruktoz, glukoz, sakkaroz, maltoz, trehaloz, melezitoz ve melibiyoz) çözeltileri (40 mg/mL)	Her bir standart şekerden 400 mg tartılmış ve 10 mL metanol:su (75:25) içerisinde çözündürülmüştür. Elde edilen her bir stok çözeltiden 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25 μ M standart çözeltiler hazırlanmıştır.
Carrez I çözeltisi	15 g potasyum hekzasiyanoferrat (II) trihidrat ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) 100 mL saf su içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır.
Carrez II çözeltisi	30 g çinko asetat dihidrat ($Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$) 100 mL saf su içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır.

2.4. Arı Sütü Tedarik ve Depolama Çalışmaları

Bu tez çalışmasında, yerel bir arı ürünleri üreticisinden temin edilen arı sütleri, 2021 yılı ağustos ayında soğuk zincirle laboratuvara taşındı. Arı sütleri, soğuk zincir korunarak 2-3 gramlık porsiyonlar halinde enjektör tipi şırıngalara aktarıldı (Şekil 3). Işığın neden olabileceği bozulmayı önlemek amacıyla şırıngalar alüminyum folyo ile kaplandı. Numuneler, analiz sürecine kadar -80 °C'de derin dondurucuda etiketlenmiş şekilde muhafaza edildi.



Şekil 3. Arı sütü örnekleri

Tez kapsamında;

- Temin edilen arı sütü farklı depolama sıcaklıklarında (-20°C, +4°C ve oda sıcaklığı) ve sürelerde (0, 3, 6, 9 ve 12 ay) muhafaza edildi.
- Arı sütünün çeşitli kalite parametreleri (nem, pH, titre edilebilir asitlik, renk, protein, yağ, kül ve 10-HDA içerikleri), protein ve peptit profilleri ile şeker kompozisyonu analiz edildi. Farklı depolama koşullarında muhafaza edilen arı sütlerinde, ilk kez renk, protein, yağ ve kül içerikleri değerlendirildi.
- Tazelik indikatörü olarak, arı sütündeki protein, lipit ve karbohidratların oksidatif bozunma ürünleri sırasıyla İOPÜ, MDA ve HMF konsantrasyonları ile değerlendirildi. Bu bağlamda, İOPÜ tayini ilk kez bir gıdada protein oksidasyonunu değerlendirmek amacıyla kullanıldı. Ayrıca, bu çalışmada ilk kez arı sütünün MDA içeriği, depolama sıcaklığı ve süresine bağlı olarak incelendi.
- Arı sütünün GOx, SOD ve CAT enzim içeriklerindeki değişimler incelenerek tazelik indikatörü olarak değerlendirildi.
- Arı sütü örneklerinin antioksidan aktivitesi FRAP testi, DPPH ve ABTS radikali süpürme aktivitesi tayini yöntemleri kullanılarak tespit edildi. Literatürde ilk kez bu çalışmada depolama koşullarına bağlı olarak arı sütünün antioksidan aktivitesindeki değişim belirlendi.

Bu amaçla, 14.09.2021 tarihinde arı sütünün çeşitli kalite parametrelerini (pH, titre edilebilir asitlik, nem, ham protein, suda çözünür protein, lipit, 10-hidroksi-2-dekanoik asit (10-HDA) ve kül içerikleri) değerlendirmek amacıyla depolama süreci başlatıldı. Ayrıca, 10.11.2021 tarihinde protein, lipit ve karbohidratların oksidatif bozunma ürünleri, enzim aktivite tayinleri ve antioksidan özelliklerin belirlenmesi amacıyla aynı depolama koşullarında ikinci bir çalışma başlatıldı. Örnekler, farklı depolama sıcaklıklarında (-20°C, +4°C ve oda sıcaklığı, ~22°C) 12 ay boyunca depolandı ve her 3 aylık depolama periyotlarında (3, 6, 9 ve 12 ay) analizler yapıldı.

2.5. Arı Sütünün Kalite Parametreleri

Depolamanın başlangıcında (-80°C'den çıkarıldıktan sonraki ilk hali) ve her 3 aylık depolama periyodunda alınan örneklerde pH, titre edilebilir asitlik, nem, ham protein, suda çözünür protein, lipit, 10-hidroksi-2-dekanoik asit (10-HDA) ve kül içerikleri analiz edildi.

2.5.1. Nem Tayini

Arı sütü örneklerinin nem içeriği, Sesta & Lusco (2008) tarafından bildirilen vakumlu etüvde kurutma yöntemi kullanılarak belirlendi. Vakum sistemi, suyun buharlaşmasını hızlandırarak etüvde kurutma yöntemine kıyasla daha düşük sıcaklıklarda kurutma yapılmasını sağlamakta ve bu amaçla 48°C tercih edildi. Sabit ağırlığa getirilmiş ve darası alınmış petri kaplarına, 0,1 mg hassasiyetle tartılan 3 g homojenize arı sütü örnekleri alındı. Örnekler, 48°C'de vakumlu etüvde sabit ağırlığa ulaşmaya kadar kurutuldu ve ağırlık farkına dayanarak nem miktarı yüzde (%) olarak hesaplandı.

2.5.2. Suda Çözünür Kuru Madde (°Brix) Tayini

Arı sütü örneklerinin suda çözünen kuru madde miktarları, el refraktometresi kullanılarak belirlendi (Sesta & Lusco, 2008). Analiz öncesinde, örneklerin ortam sıcaklığında bekletilerek termal dengeye ulaşması sağlandı. Ardından homojenize edilen örneklerin °Brix değerleri ölçülerek sonuçlar kaydedildi.

2.5.3. pH ve Titrasyon Asitliği Tayini

Bir gram örnek, saf suyla %20'lik süspansiyon haline getirildi ve 45 dakika bekletildikten sonra pH metre ile ölçüm yapıldı (Kolaylı vd., 2016). Aynı örnek çözeltileri, 0,1 N NaOH çözeltisi ile fenol ftalein asit-baz indikatörü kullanılarak titre edildi. Titrasyon sırasında harcanan alkali hacmi büretten okunarak, sonuçlar mL 1 N NaOH/100 g cinsinden hesaplandı (Olimpia vd., 2008).

2.5.4. Kjeldahl Metodu ile Ham Protein Tayini

Arı sütü örneklerinin ham protein miktarı Kjeldahl metoduna göre belirlendi (AOAC, 2012). Bu amaçla:

1) Örnek Hazırlama:

- Homojenize edilen arı sütü örneklerinden 1 gram alınarak Kjeldahl tüpüne konuldu.
- Örneğin üzerine 6 gram katalizör ve 15 mL konsantre sülfürik asit (H₂SO₄) eklendi ve tüp, yakma ünitesine yerleştirildi.

2) Yaş Yakma İşlemi:

- Yakma ünitesinin sıcaklığı 200–250°C'ye getirilerek, 15-20 dakika süreyle ön yakma işlemi yapıldı.
- Ardından, sıcaklık 350-380°C'ye yükseltildi ve 30-45 dakika boyunca karışım berraklaşarak, uçuk sarıdan yeşil renge dönüşene kadar yakma işlemi sürdürüldü.
- Tüp içeriği berraklaştıktan sonra, yakma işlemine 20-30 dakika daha devam edildi.
- Çözeltinin sıcaklığı, yaklaşık 40 °C'ye düşene kadar soğutuldu.
- Tüpe 40 mL saf su eklenmiş ve tüp, destilasyon cihazına yerleştirildi.

3) Destilasyon (Damıtma) İşlemi:

- Tüpe, 75 mL %40'luk NaOH çözeltisi eklendi ve damıtma işlemi başlatıldı.
- 50 mL borik asit çözeltisi (20 g/L) ve 5-6 damla mix indikatör, 300 mL'lik bir erlenmayere eklendi.
- Karışım, destilasyon cihazının destilat toplama kısmına yerleştirildi.
- Damıtma işlemine, erlenmayerdeki hacim 150 mL'ye ulaşana kadar devam edildi.

4) Titrasyon:

- Borik asit çözeltisinde toplanan amonyak, 0,1 N HCl ile titre edildi.
- Yeşilden mora renk değişimi sağlanana kadar titrasyona devam edilmiş ve HCl sarfiyatı kaydedildi.

5) Hesaplama:

- Elde edilen azot yüzdesi, 6,25 faktörü ile çarpılarak toplam protein miktarı yüzde (%) olarak hesaplandı.

2.5.5. Bradford Yöntemi ile Suda Çözünür Protein Tayini

Arı sütü örneklerindeki suda çözünür protein miktarı, Bradford (1976) yöntemiyle spektrofotometrik olarak belirlendi. Bu yöntem, basit, hızlı ve hassas olması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Yöntem, negatif yüklü Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifinin proteindeki pozitif yüklü gruplara bağlanarak mavi renk oluşumuna ve protein konsantrasyonuna bağlı olarak artan mavi renk şiddetinin 595 nm'de yapılan absorbans ölçümüne dayanmaktadır.

Analiz için, 100 mg arı sütü, 10 mL PBS ile homojenize edildi, ardından 3800 rpm hızda ve +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart BSA çözeltileri (1-0,1 mg/mL) kullanılarak standart eğri elde edildi. Boya-albümin

kompleksinin ekstinksiyon katsayısı, standardın 10 katı konsantrasyon aralığında sabit kalırken; daha geniş konsantrasyon aralıklarında doğrusal ilişki bozularak eğri parabolik bir forma dönüşmektedir. Tablo 5'te verilen analiz prosedürüne göre standartların ve örneklerin absorbands değerleri saf suya karşı ölçüldü. Örneklerin suda çözünür protein miktarları Şekil 4'te verilen standart eğri kullanılarak hesaplandı (g/100 g).

Tablo 5. Bradford metodu analiz prosedürü

	Numune	Kör Çözelti	Standart
Örnek	40 µL	-	-
Bradford reaktifi	2000 µL	2000 µL	2000 µL
Saf su	-	40 µL	-
BSA (1-0,1 mg/mL)	-	-	40 µL
5 dakika inkübasyon süresinin ardından absorbands değerleri 595 nm'de okundu.			

2.5.6. Toplam Yağ Tayini

Her bir arı sütü numunesi (1 g), tartıldıktan sonra 100 mL saf su ile homojenleştirilmek üzere homojenizatörle 30 dakika boyunca karıştırıldı. Ardından, bu karışıma eşit miktarda kloroform:etanol (50:50, h/h) eklendi ve karışım, Whatman filtre kağıdı No. 1 ile filtre edildi. Filtrasyon işlemi tamamlandıktan sonra, kloroform fazı (üst faz) ayrılmış ve bu faz, ılık su banyosunda buharlaştırıldı. Son aşamada, elde edilen yağ soğutulduktan sonra tartılmış ve 1 gram arı sütündeki yağ miktarı yüzde (%) olarak hesaplandı. (Kazemi vd. 2019).

2.5.7. 10-Hidroksi-2-Dekanoik Asit (10-HDA) Tayini

Arı sütü örneklerindeki 10-HDA miktarı, yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) sistemi kullanılarak tespit edildi (Kolaylı vd., 2016). Bu analiz için, Bölüm 2.3'te hazırlığı açıklanan 10-HDA ve MHB çözeltileri eşit hacimde karıştırıldı ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan seyreltik çözeltilerle (160; 80; 40; 20; 10; 5,0; 2,5 ve 1,25 µg/mL) standart eğri oluşturuldu.

Yaklaşık 50 mg taze arı sütü örneği, 12,5 mL çözücü (metanol: ultra saf su, 50:50, v/v) içinde çözüldü ve en az 20 dakika boyunca vorteks ile karıştırıldı. Daha sonra, numune 0,45 µm'lik bir filtre ile süzüldü ve filtrata eşit hacimde MHB eklenerek iç standart tamamlandı.

Ölçümler, en yüksek absorbands değerinin elde edildiği 215 nm dalga boyunda gerçekleştirildi (Kim & Lee, 2010). Analiz, C-18 kolonu (150 x 4,6 mm) kullanılarak yapılmış olup, mobil faz olarak metanol, su ve fosforik asit (55:45:2,2) oluşmaktadır. Akış hızı 0,75 mL/dakika olarak ayarlandı ve her bir standart çözelti ile örnek için enjeksiyon hacmi 20 µL, akış süresi ise 15 dakika olarak belirlendi.

2.5.8. Toplam Mineral Madde (Kül) Tayini

Kül tayininde kuru ve temiz porselen krozeler alınarak, kül fırınında 550°C'de 5 saat tutuldu. Sabit ağırlığa ulaşan porselen krozeler, oda sıcaklığındaki ve içinde silikajel bulunan desikatörde soğutuldu. Soğutulan krozelerin darası alınarak, yaklaşık 1 g homojenize arı sütü örneği konuldu ve tartıldı. Örnekler, kül fırınında 625°C'de beyaz kül haline gelene kadar yakıldı. Ağırlık farkına dayanarak kül miktarı yüzde (%) olarak hesaplandı (AOAC, 2012).

2.5.9. Renk Tayini (Hunter-Lab)

Arı sütü örneklerinin renk değerlerini belirlemek için, her bir örnek dikkatlice cam petri kaplarına yerleştirildi ve üzerine ince bir cam plaka konularak ölçüm için hazırlandı. Hunter-Lab cihazı ile yapılan ölçümlerde, arı sütü örneklerinin L^* , a^* ve b^* renk değerleri kaydedildi. L değeri, örneğin koyuluk-açıklık düzeyini 0 ile 100 arasında ifade etmektedir (L , 0-100: koyuluk-açıklık). a değeri pozitif olduğunda kırmızı, negatif olduğunda ise yeşil tonunu (a^+ : kırmızı, a^- : yeşil), b değeri pozitif olduğunda sarı, negatif olduğunda ise mavi renk tonunu ifade etmektedir (b^+ = sarı, b^- = mavi).

2.6. SDS-PAGE ile Protein Profili

SDS-PAGE yöntemi, proteinlerin negatif yüklü anyonik SDS molekülleri ile kaplanmasının ardından, moleküler ağırlıklarına göre poliakrilamid jel ortamında bir elektrik alanı altında göç etmesine ve ardından boya maddesi ile bantların görünür hale getirilmesine dayanmaktadır. SDS-PAGE, süt proteinlerinin ve bu proteinlerin hidrolizinden oluşan peptitlerin tespiti ve karakterizasyonunda sıklıkla kullanılan bir ayırma yöntemidir. Bu yöntemde, analiz edilecek protein örnekleri, anyonik bir deterjan olan SDS ve indirgen ajan olarak bir tiyol reaktif (2-merkaptoetanol) içeren bir ortamda 95°C'de ısıtılarak denatüre edilir. SDS, proteinlerin kovalent olmayan bağlarını bozarken, β -merkaptoetanol disülfid

bağlarını kırar ve proteinlerin büyük moleküler yapıları açılarak primer yapılarına dönüşür. SDS molekülleri, proteine polipeptid zincirinin boyutuna bağlı olarak eşit bir şekilde negatif yük kazandırır. Hazırlanan protein örneği, poliakrilamid jele yüklenir ve yüksek voltaj uygulanarak proteinlerin pozitif elektroda doğru hareket etmesi sağlanır. Bu süreçte, proteinler yalnızca moleküler ağırlıklarına göre birbirinden ayrılır. Ayrımı gerçekleşen moleküller, molekül ağırlığı bilinen standartlar kullanılarak tespit edilmektedir.

Taze arı sütü ile farklı sıcaklık ve sürelerde depolanmış arı sütü örneklerinin protein profilleri, SDS-PAGE yöntemi kullanılarak analiz edildi. Bu işlem için, 100 mg arı sütü, 10 mL PBS (pH 7,4) ile homojenize edildi ve ardından 3800 rpm'de, +4°C'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. SDS-PAGE analizi, Sambrook vd. (1989) tarafından bildirilen yöntemine göre, %5'lik yığma jeli ve %15'lik ayırma jeli kullanılarak gerçekleştirildi. Tablo 6'da verilen bileşime göre hazırlanan poliakrilamid jeller elektroforez ünitesine yerleştirildi ve tank, SDS-PAGE yürütme tamponu ile dolduruldu. Örneklerin hazırlanması için 25 µL arı sütü süpernatantı, 5 µL SDS yükleme çözeltisi ile karıştırılmış ve 95 °C'de su banyosunda 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, denatüre edilen örneklerden her biri, Hamilton şırıngası kullanılarak 20 µL olacak şekilde jel kuyucuklarına yüklendi. Elektroforez sırasında boya, yığma jeli geçilene kadar yaklaşık 20 dakika boyunca 20 mA'de; ardından ayırma jelinin altına ulaşana kadar 1-1,5 saat boyunca 25 mA'de çalıştırıldı.

Jeller, Coomassie Brilliant Blue çözeltisi ile boyanmış ve 15 dakika boyunca yavaşça sallanarak inkübe edildi. Fazla boya, boya uzaklaştırma çözeltisi ile giderilmiş ve protein bantlarının görünür hale gelmesi sağlandı. Son olarak, poliakrilamid jeller Biorad Gel Doc EZ görüntüleme sistemi ile analiz edildi. Elde edilen jellerdeki spesifik protein içerikleri, bant yoğunlukları üzerinden Image J yazılımı kullanılarak hesaplandı.

Tablo 6. SDS-PAGE analizinde pipetleme işlemleri

Bileşenler	%5'lik yığma jeli (mL)	%15'lik ayırma jeli (mL)
Saf su	5,5	4,6
Akrilamid/bisakrilamid	1,3	10,0
1,0 M Tris (pH 6,8)	1,0	--
1,5 M Tris (pH 8,8)	--	5,0
Amonyum persülfat	0,08	0,2
SDS	0,08	0,2
TEMED	0,008	0,008
Bileşenler	%5'lik yığma jeli (mL)	%15'lik ayırma jeli (mL)

2.7. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi- Kırılma İndisi Dedektörü (HPLC-RID) ile Şeker Profili

Bu çalışmada, arı sütlerinde bulunan 8 farklı şeker bileşeni (riboz, fruktoz, glukoz, sakkaroz, maltoz, trehaloz, melibiyoz ve melezitoz), RID dedektörlü HPLC cihazı kullanılarak tayin edildi. Analiz ters faz NH₂ kolonunda (EC 200/4.6 Nucleosil 100-5 NH₂) ve izokratik koşullar altında gerçekleştirildi (Bogdanov & Baumann, 1998). Mobil faz olarak asetonitril ve ultra saf su (79:21, h:h) kullanıldı, akış hızı 1,5 mL/dk olarak ayarlandı. Numune ve standartların enjeksiyon hacmi 20 µL olup kolon sıcaklığı 80 °C'ye sabitlenerek çalışma optimizasyonu sağlandı.

Arı sütü örnekleri, her biri için 1 g tartılarak tüplere alındı. Üzerine yaklaşık 4 mL saf su ve metanol karışımı (75:25) eklendi. Şişe içeriği karıştırıldıktan sonra sırasıyla 0,1 mL Carrez I ve 0,1 mL Carrez II çözeltileri eklendi ve hacim saf su-metanol çözeltisi ile 5 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan karışımlar, santrifüj tüplerine alınarak 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen 3 mL süpernatanta, 3 mL diklorometan eklendi ve karışım 2 dakika süreyle vortekslendi. Üst faz, pastör pipeti ile toplanmış ve ekstraksiyon işlemi toplamda 3 kez tekrarlandı. Son olarak, elde edilen şeker fraksiyonları toplandı ve 0,45 µm membran filtreden geçirilerek viallere alındı. Cihazın kalibrasyonu için her bir standart şekerin 40 mg/mL konsantrasyonunda stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiler, farklı konsantrasyonlara (40, 20, 10, 5 ve 2,5 mg/mL) seyreltildi ve elde edilen standart çözeltiler, HPLC cihazındaki RI dedektöründe okunarak, geliş zamanlarına göre kalibrasyon grafikleri

oluşturuldu. Her bir standart şeker bileşeni için LOD ve LOQ değerleri belirlendi (Tablo 7). Örneklerin şeker profillerinde yer alan şekerler, geliş zamanları esas alınarak saptandı ve standart kalibrasyon grafikleri kullanılarak yüzde (%) oranında değerlendirildi.

Tablo 7. HPLC-RID sisteminde standartlara ait gözlemlenebilirlik ve tayin limit değerleri

Standart Madde	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Riboz	0,030	0,090
Fruktoz	0,104	0,316
Glukoz	0,033	0,101
Sakkaroz	0,114	0,347
Maltoz	0,061	0,185
Trehaloz	0,053	0,160
Melibiyoz	0,114	0,346
Melezitoz	0,120	0,364

2.8. Protein, Lipit ve Karbohidrat Oksidasyon Ürünleri

Taze arı sütü ile farklı sıcaklık ve sürelerde depolanan arı sütlerinde protein, lipit ve karbohidratların oksidatif bozunma ürünleri sırasıyla ileri oksidasyon protein ürünleri (İOPÜ), malondialdehit (MDA) ve HMF konsantrasyonları olarak belirlendi.

2.8.1. İleri Oksidasyon Protein Ürünleri Tayini (İOPÜ) (Advanced Oxidation Protein Product, AOPP)

Gıdalardaki proteinler, üretim, işleme ve depolama süreçleri sırasında oksidasyon reaksiyonlarına uğramaktadır. Bu reaksiyonlar, gıdanın yapısına ve beslenme fizyolojisine olumsuz etkilerde bulunabileceğinden, gıdadaki protein oksidasyonunun kapsamını belirlemek büyük önem taşımaktadır (Hellwig, 2020). Protein oksidasyonunu analiz etmek için literatürde çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında spektroskopik yöntemlerden biri olan "ileri oksidasyon protein ürünleri" (İOPÜ) tayini, genellikle plazma ve doku örneklerinde uygulanmakta olup, literatürde gıdalar üzerinde kullanımına dair bir çalışmaya rastlanmadı. Bu sebeple, bu yöntem ilk kez arı sütüne modifiye edilerek uygulanmış ve Witko-Sarsat vd. (1996) tarafından geliştirilen metodolojiye dayalı olarak

belirlendi. Yöntem, albümin gibi plazma proteinlerinin hipokloröz asit (HOCl) gibi klorlu oksidanlarla oluşturduğu çapraz bağlanma ürünlerinin potasyum iyodürünü oksitlemesi ve açığa çıkan triiyodit iyonlarının spektrofotometrik olarak 340 nm dalga boyunda ölçülmesi prensibine dayanmaktadır.

Arı sütündeki lipitler, ileri oksidasyon protein ürünleri (İOPÜ) tayini sırasında bulanıklığa yol açtığı için, lipitlerin uzaklaştırılabilmesi amacıyla farklı ekstraksiyon yöntemleri ve çözücülerinde çalışmalar yapıldı. 500 mg arı sütü, 2,5 mL soğuk saf su ile karıştırılıp homojen hale getirildi ve üzerine 2,5 mL etanol:kloroform (3:5) karışımı eklenip vorteks ile karıştırıldı. Ardından, +4°C’de 12.000 rpm hızda 1 saat santrifüj edildi. Analiz için standart olarak Kloramin-T.3H₂O kullanıldı. Reaktiflerin hazırlanmasıyla ilgili detaylar Bölüm 2,3’te, analiz prosedürü ise Tablo 8’de sunuldu. 0,1 mM stok standart çözeltisinden elde edilen çeşitli konsantrasyonlardaki seyreltik çözeltiler (125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,81; 3,90; 1,95 ve 0,97 µmol/L) kullanılarak standart eğri oluşturuldu (Şekil 6). Bu eğri aracılığıyla arı sütündeki AOPP konsantrasyonu µmol/g protein olarak hesaplandı.

Tablo 8. İOPÜ analizi prosedürü

	Numune	Kör Çözelti	Standart
PBS	250 µL	1000 µL	250 µL
Örnek	750 µL	-	-
Kloramin T	-	-	750 µL
Asetik asit	100 µL	100 µL	100 µL
2 dakika inkübe edilir.			
KI	50 µL	50 µL	50 µL
Absorbans değerleri 340 nm’de okundu.			

2.8.2. Malondialdehit (MDA) Tayini

Lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA, gıdalardaki oksidatif bozunmayı belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla, 0,5 g arı sütü alınarak, proteinlerin uzaklaştırılması için %5 trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi ile ekstrakte edildi. Ardından, örnek 5000 rpm hızda +4°C’de 15 dakika santrifüj edildi (Wang vd., 2013a). Elde

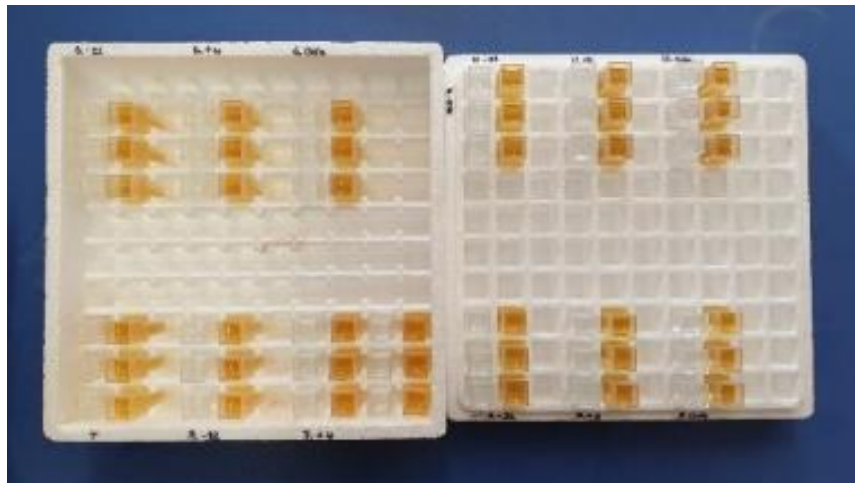
edilen süpernatant, ikiye bölündü ve pipetleme işlemleri Tablo 9'a göre gerçekleştirildi (Sánchez-Reinoso vd., 2014).

Tablo 9. MDA tayininde yapılan pipetleme işlemleri

	A (-TBA)	B (+TBA)
Örnek	1 mL	1 mL
TCA çözeltisi (%10)	4 mL	--
TBA Çözeltisi (%0,65)	--	4 mL

A ve B olarak hazırlanan karışımlar tüplere aktarılmış ve 95°C'de 25 dakika inkübasyon edildikten sonra hızlıca buza alınarak soğutuldu. Soğutma işlemi tamamlanan karışım, 3000 rpm hızda +4°C'de 10 dakika daha santrifüj edildi. A ve B karışımlarından alınan süpernatantlar, sırasıyla 470, 532 ve 600 nm dalga boylarında absorbans ölçümleri için analiz edildi. Karbohidratlar ve antosiyaninler gibi bileşikler, MDA tayininde girişim yaparak tiyobarbütirik asit (TBA) gibi davranmakta ve bu durum MDA seviyelerinin beklenenden daha yüksek ölçülmesine yol açmaktadır (Şekil 4). Bu nedenle, MDA tayini, Hodges ve ark. (1999) tarafından önerilen yöntem doğrultusunda, aşağıdaki eşitlik kullanılarak $\mu\text{g MDA}/100 \text{ g örnek birimi}$ cinsinden hesaplandı.

1. $((\text{Abs}_{532}+\text{TBA}) - (\text{ABS}_{600}+\text{TBA}) - (\text{ABS}_{532}-\text{TBA}) - (\text{ABS}_{600}-\text{TBA})) = A$
2. $((\text{ABS}_{440}+\text{TBA}) - (\text{ABS}_{600}+\text{TBA})) \times 0,0571 = B$
3. $\text{nmol MDA/g} = (A-B/157000) \times 10^6 / \text{Örnek kons. (g/mL)}$



Şekil 4. Arı sütü örneklerinde MDA tayini

2.8.3. 5-Hidroksilmetilfurfural (HMF) Tayini

Arı sütü numunelerindeki HMF tayini, ters faz RP-HPLC sisteminde gerçekleştirildi. Örnekleri analize hazırlamak amacıyla, 0,5 g arı sütü örneği 2,75 mL %40'lık trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi ile 10 dakika vorteks ile karıştırıldı (Ciulu vd., 2013). Ardından, numune 2000 rpm hızda, +4°C'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından süpernatant kısmı filtrelendi. Kalıntıya tekrar 2,75 mL %4'lük TCA çözeltisi eklenerek 10 dakika karıştırıldı ve 2000 rpm hızda, +4°C'de 10 dakika boyunca yeniden santrifüj edildi. Bu işlemde elde edilen süpernatant da filtrelendi ve toplam hacim %4 TCA çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlandı. Son olarak, çözelti 0,45 µm'lik bir filtreden geçirilerek viallere alındı ve 20 µL'lik numune HPLC sistemine enjekte edildi.

Analiz için ters faz C-18 kolonu (150 x 4,6 mm) kullanılmış ve izokratik program uygulandı (Jeuring & Kupperts, 1980). Mobil faz olarak metanol ve ultra saf su (10:90, h/h) karışımı kullanılmış ve akış hızı 1 mL/dakika olarak ayarlandı. Her bir standart çözeltisi ve örnek için enjeksiyon hacmi 20 µL, akış süresi ise 12 dakika olarak belirlendi. Kalibrasyon eğrisinin oluşturulması için farklı konsantrasyonlarda standart HMF çözeltileri hazırlandı (50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 ve 1,5625 ppm). Standart çözeltiler ve örneklerde ölçümler 285 nm'de yapıldı (Şekil 7). Kalibrasyon eğrisinden elde edilen veriler kullanılarak, arı sütü örneklerinin HMF içeriği mg HMF/kg arı sütü cinsinden hesaplandı.

2.9. Enzim Aktivite Tayinleri

2.9.1. Örnek Hazırlama

Arı sütü numuneleri (1 g), 1,5 mL soğuk saf su ile karıştırılarak homojenize edildi. Daha sonra, karışıma 1,5 mL kloroform:etanol (2:1) eklendi ve vortekslendi. Hazırlanan karışım, 12000 rpm'de, +4°C'de 1 saat santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant, süperoksit dismutaz ve katalaz enzim aktivitelerinin ölçümünde kullanıldı ve enzim çalışmaları boyunca buz banyosunda muhafaza edildi.

2.9.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini

Arı sütü örneklerinin SOD aktiviteleri, Sun vd. (1988) tarafından geliştirilen spektrofotometrik metoda göre belirlendi. Bu yöntem, SOD aktivitesinin, enzim ekstraktının

nitroblue tetrazolium (NBT)'u indirgenmesi sonucu oluşan formazan bileşiğini inhibe etme kapasitesine dayanmaktadır. SOD, süperoksit anyonlarını oksijen ve hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürürken, NBT süperoksit ile reaksiyona girerek mavi renkli formazan bileşiğini oluşturur. Ancak SOD varlığında, ortamda süperoksit anyonlarının azalması nedeniyle NBT'nin mavi renk oluşturma kapasitesi engellenir. Arı sütündeki SOD aktivitesinin, süperoksit radikallerini ortamdan uzaklaştırarak neden olduğu optik yoğunlukta azalma spektrofotometrik olarak 560 nm'de ölçülür ve % inhibisyonu hesaplanır. SOD tarafından katalizlenen reaksiyonu %50 oranında inhibe eden enzim aktivitesi, bir SOD ünitesi olarak tanımlanır.

Tablo 10. SOD aktivitesi ölçümü

	Kör (mL)	Örnek (mL)
Reaktif	1,425	1,425
Örnek	---	0,050
Ksantin oksidaz	0,025	0,025
25°C'da 20 dakika inkübasyona bırakıldı (karanlıkta).		
CuCl₂.2H₂O	0,050	0,050
Örnek	0,050	---
560 nm'de saf suya karşı absorbanı ölçüldü.		

Tablo 10'da belirtilen pipetleme işlemlerinin ardından, kör ve örnek tüplerinin absorbanı değeri 560 nm'de saf suya karşı ölçüldü. Hesaplamalar, % inhibisyon üzerinden gerçekleştirildi.

$$\%inhibisyon = \left(\frac{A_{kör} - A_{örnek}}{A_{kör}} \right) \times 100$$

Standart SOD aktivitesi grafiğinden yararlanılarak, %50 inhibisyona karşılık gelen SOD aktivitesi bir enzim ünitesi olarak belirlendi ve sonuçlar, miligram arı sütü başına enzim aktivitesi birimi (U/mg arı sütü) şeklinde ifade edildi.

2.9.3. Katalaz Aktivite Tayinleri

Arı sütü örneklerinin katalaz aktivitesi ölçümleri iki farklı yöntemle göre belirlendi.

- Katalaz Enzim Aktivitesi (Aebi, 1984)

Aebi (1984) tarafından bildirilen katalaz aktivitesi tayini yöntemi, H_2O_2 'yi su ve oksijene dönüştürme kapasitesine dayanmaktadır. Bu yöntem, ortamda kalan H_2O_2 konsantrasyonunun 240 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibini temel almaktadır.

Tablo 11'de belirtildiği şekilde pipetleme işlemleri yapıldı.

Tablo 11. Katalaz aktivitesi ölçümü (Aebi, 1984)

	Kör (mL)	Örnek (mL)
Fosfat tamponu	0,500	---
Örnek	1,000	1,000
H_2O_2	---	0,500
240 nm'de saf suya karşı absorbans ölçüldü.		

Kör ve örnek tüplerinin absorbans değerleri 25 °C'de, 30 saniye aralıklarla 3 dakika boyunca 240 nm'de spektrofotometre ile ölçüldü. Bir birim enzim aktivitesi, dakikada parçalanmış 1 mM H_2O_2 'ye eşdeğer olup, miligram arı sütü başına birim olarak ifade edildi (U/mg arı sütü).

Aktivite Hesabı:

$$\text{Enzim Ünitesi} = \left(\frac{2,3}{\Delta t} \right) \times \left(\frac{a}{b} \right) \times \left[\left(\frac{\log A_1}{\log A_2} \right) \right]$$

2,3: 1 μmol H_2O_2 'nin 1 cm'lik ışık yolunda verdiği optik dansite.

Δt : 30 saniye

a: Dilüsyon faktörü

b: Ekstraktın protein içeriği

A_1 : 0. saniye absorbans değeri

A_2 : 30. saniye absorbans değeri

- Katalaz Enzim Aktivitesi (Lartillot vd., 1988)

Katalaz aktivitesi, Lartillot vd. (1988) tarafından geliştirilen bir alternatif yöntemle daha analiz edildi. Bu yöntemde de enzimin etkinliği, katalizlediği reaksiyon sonucunda hidrojen peroksit konsantrasyonunda meydana gelen azalmanın 240 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle değerlendirildi.

Tablo 12. Katalaz aktivitesi ölçümü (Lartillot vd., 1988)

	Örnek Körü (mL)	Örnek (mL)	Başlangıç	Protein
H₂O₂	---	1,25	1,25	---
Örnek	---	0,010	---	0,010
Fosfat tamponu	1,25	---	---	1,25
37°C’de 2 dakika inkübasyona bırakıldı (karanlıkta)			---	---
HCl	0,25	0,25	0,25	0,25
Örnek	0,025	---	--	---
240 nm’de saf suya karşı absorbans ölçüldü.				

Tablo 12’de belirtilen pipetleme işlemlerinin ardından, kör ve örnek tüplerinin (A_r) absorbans değerleri 240 nm’de saf suya karşı ölçüldü. Ayrıca, hidrojen peroksitin başlangıçtaki absorbansı (A_s) ve proteinin neden olduğu absorbans (A_t) belirlendi. Aşağıda verilen eşitlik kullanılarak hesaplamalar gerçekleştirildi.

Aktivite Hesabı:

Enzimatik aktiviteden dolayı absorbans değişimi (A):

$$A: (A_s + A_t) - A_r$$

A_r: Örnek absorbansı

A_s: Hidrojen peroksitin başlangıçtaki absorbansı

A_t: Proteinin neden olacağı absorbans

Enzim aktivitesinin IUml-1 cinsinden hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılır.

$$\text{Aktivite} = \frac{A \cdot V_t}{\epsilon \cdot t \cdot V_e}$$

V_t : Toplam reaksiyon hacmi (mL)

V_e : Kullanılan enzim çözeltisinin hacmi (mL)

ϵ : H_2O_2 'in molar ekstinksiyon katsayısı ($0,0396 \text{ cm}^2\mu\text{mol}^{-1}$)

t : Reaksiyon zamanı (dakika)

Bu çalışmada aktivite $\mu\text{mol } H_2O_2/\text{mg arı sütü.dk}$ olarak hesaplanmıştır.

2.9.4. Glukoz Oksidaz (GOx) Aktivite Tayini

Arı sütü numunelerindeki GOx aktivitesi, yaban turpundan izole edilen peroksidaz enzimi ve *o*-dianisidin substratının kullanıldığı bir yöntemle belirlendi (Flanjak vd., 2016). GOx enzimi, glukozu glukono delta-lakton ve H_2O_2 'ye dönüştürürken, oluşan H_2O_2 , peroksidaz enzimi tarafından *o*-dianisidin ile suya indirgenir. Bu reaksiyon sırasında oluşan renkli ürün, 400 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülerek GOx aktivitesi hesaplanır.

Bu amaçla, 1,5 g arı sütü 3 mL 0,1 M fosfat tamponu (pH 6,1) ile karıştırılarak vortekslenildi. Elde edilen karışım, $+4^\circ\text{C}$ 'de 12.000 rpm'de bir saat santrifüj edildi. Ardından, Tablo 13'te belirtilen çözeltiler kullanılarak pipetleme işlemleri gerçekleştirildi.

Tablo 13. GOx aktivite tayini analiz prosedürü

	Örnek (mL)	Standart(mL)	Kör (mL)
Glukoz	0,7	0,7	0,7
<i>o</i>-dianisidin	0,1	0,1	0,1
Peroksidaz	0,1	0,1	0,1
Örnek/Standart	0,1	0,1	---
37°C'de 30 dakika su banyosunda inkübe edildi.			
HCl	0,1	0,1	0,1
Örnek	---	---	0,1

Elde edilen absorbens değerleri, 100; 75; 50; 25; 12,5; 10; 5 ve 2,5 $\mu\text{mol/L}$ aralığında hazırlanan standart H_2O_2 çözeltileri ile peroksidaz ve *o*-dianisidin reaksiyonundan elde edilen sonuçlarla oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılarak, $\mu\text{g } H_2O_2/\text{g arı sütü.sa}$ t birimine dönüştürüldü.

2.10. Arı Sütü Ekstraktlarının Hazırlanması

Arı sütü örneklerinden 2 gram alınarak hacimleri saf su ile 20 mL'ye tamamlandı ve karışım, 1 dakika boyunca homojenizatör kullanılarak homojenize edildi. Ekstraksiyon işlemi, oda koşullarında, çalkalamalı su banyosunda 200 rpm hızında 48 saat gerçekleştirildi. Ekstraksiyon tamamlandıktan sonra katı partiküller kaba filtre kâğıdı ile süzüldü, ardından süzöntü 10.000 g'de, +4°C'de 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant, analizlerde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

2.11. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Gücü (FRAP) ile Antioksidan Aktivite Tayini

Arı sütü örneklerinin antioksidan kapasitesi, Benzie & Strain (1999) tarafından geliştirilen ve yaygın olarak kullanılan FRAP testi ile değerlendirildi. Bu yöntem, örnekteki antioksidan bileşiklerin asidik koşullarda Fe(III)-TPTZ kompleksini Fe(II)-TPTZ kompleksine indirme yeteneğine dayanır. Oluşan Fe(II)-TPTZ kompleksinin oluşturduğu mavi rengin yoğunluğu, örnekteki antioksidan bileşiklerin miktarı ile doğru orantılıdır. Renk değişimi, genellikle tercih edilen 593 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Analizde standart olarak $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve Troloks kullanılmış olup kalibrasyon eğrileri farklı konsantrasyonlardaki (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 μM) standart çözeltiyle hazırlandı.

Örneklerin antioksidan kapasiteleri, standart eğri denklemi kullanılarak $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ arı sütü ve $\mu\text{mol Troloks}/\text{g}$ arı sütü birimleriyle hesaplandı. Analiz yöntemine uygun olarak yapılan pipetleme işlemlerine ilişkin detaylar Tablo 14'te verildi.

Tablo 14. Demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) analiz prosedürü

	Numune	Kör (su)	Standart
Arı sütü ekstraktı	50 μL	-	-
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /Troloks	-	-	50 μL
Saf su	-	50 μL	-
FRAP reaktifi	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
4 dakika karanlıkta bekletildikten sonra 593 nm'de absorbans okundu.			

2.12. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikalı Süpürme Aktivitesi Tayini

Gıdaların antioksidan aktivitelerini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri, radikal süpürme aktivitesinin ölçümüne dayanan DPPH yöntemidir. Bu yöntem, örnek içerisinde bulunan antioksidan veya indirgeyici bileşiklerin, mor renkli kromojen DPPH radikalini açık sarı renkli hidrazine indirgemesi prensibine dayanır. Reaksiyon, 515-520 nm dalga boylarında spektrofotometrik olarak ölçülerek değerlendirilir.

Arı sütü örneklerinin sulu ekstraktlarının DPPH• radikalı süpürme aktivitesi SC₅₀ değeri ve Troloks eşdeğeri (TE) olmak üzere iki farklı analiz yöntemiyle değerlendirildi.

SC₅₀ değerinin belirlenmesi amacıyla ticari olarak temin edilen DPPH• radikalının 100 µM'lik metanolik çözeltisi kullanıldı. Saf su ile seyreltilerek hazırlanan numune çözeltileri, en az 6 farklı konsantrasyonda hazırlandı ve metanolik DPPH çözeltisi ile 1:1 oranında karıştırıldı. Kontrol çözeltisi, 750 µL saf su ve 750 µL DPPH çözeltisi karıştırılarak hazırlandı. Karışımlar, karanlık bir ortamda 50 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, numuneler 10.000 g'de, +4°C'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi ve absorbans ölçümleri 517 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Ölçüm sonuçlarına dayanarak, numune konsantrasyonlarına karşı absorbans grafiği çizildi ve SC₅₀ değeri, DPPH radikalının absorbansını yarıya indirmek için gereken numune konsantrasyonu hesaplanarak sonuçlar, mg arı sütü/mL cinsinden belirlendi (Brand-Williams vd., 1995).

Tablo 15. DPPH• radikalı süpürme aktivitesi tayininde (SC₅₀) yapılan pipetleme işlemi

	Numune	Kontrol
Arı sütü sulu ekstraktı	750 µL	-
DPPH reaktifi	750 µL	750 µL
Örnek çözücüsü (Saf su)	-	750 µL

TE değerinin belirlenmesi amacıyla, 1 mM (1×10^{-3} M) metanolik stok DPPH çözeltisinden 6 mL alındı ve bu çözelti metanol ile 100 mL'ye seyreltilerek 6×10^{-5} M konsantrasyonuna getirildi. Numunelerden 250 µL alınarak üzerine 1,75 mL 6×10^{-5} M DPPH çözeltisi eklendi (Tablo 16). Hazırlanan karışım vorteks ile homojenize edildi ve oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda 30 dakika bekletildi. İnkübasyon süresi sonunda, numune tüpleri 10.000 g'de, +4°C'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi ve 517 nm dalga boyunda,

metanole karşı UV-Vis spektrofotometre ile absorbans ölçümleri gerçekleştirildi. Standart çözelti olarak 5-200 µM arasında değişen konsantrasyonlarda (200; 100; 75; 50; 25; 10; 5 µM) Troloks çözeltileri hazırlandı (Şekil 13).

Elde edilen standart ve numunelerin absorbans değerleri kullanılarak “% inhibisyon” değerleri hesaplandı. Arı sütü örneklerinin antioksidan aktivitesi, Troloks kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak “µmol TE/g arı sütü” şeklinde ifade edildi.

$$\%inhibisyon = \left(\frac{A_{kontrol} - A_{örnek}}{A_{kontrol}} \right) \times 100$$

Tablo 16. DPPH• radikali süpürme aktivitesi tayininde (Troloks eşdeğeri) yapılan pipetleme işlemi

	Numune	Kör	Standart
Arı sütü sulu ekstraktı	250 µL	-	-
Troloks standardı	-	-	250 µL
Saf su/Metanol	-	250 µL	-
DPPH reaktifi	1,75 mL	1,75 mL	1,75 mL

2.13. ABTS•+ (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) Radikali Süpürme Aktivitesi Tayini

ABTS yönteminin ilkesi, ABTS molekülünün potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucu oluşan mavi/yeşil renkli ABTS•+ radikalinin, antioksidanların varlığında indirgenmesiyle azalan renk şiddetinin spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır (Re vd., 1999). Bölüm 2.3’te belirtilen şekilde hazırlanan ABTS•+ çözeltisi, 5 mM pH 7,4 fosfat tamponu ile seyreltilerek 734 nm’de $0,700 \pm 0,02$ absorbans verecek şekilde ayarlandı ve analize hazır hale getirildi.

Arı sütü örneklerinin sulu ekstraktlarının ABTS•+ radikali süpürme aktivitesi, SC50 değeri ve Troloks eşdeğeri (TE) olmak üzere iki farklı analiz yöntemiyle değerlendirildi (Huang vd., 2005). Bu amaçla, en az 6 farklı konsantrasyonda hazırlanan her bir numune çözeltisinden 500 µL alınmış ve üzerine 1,5 mL ABTS•+ çözeltisi eklendi. Kontrol çözeltisi, 500 µL saf su (örnek çözücüsü) ile 1,5 mL ABTS•+ çözeltisinin karıştırılmasıyla hazırlandı (Tablo 17). Karışımlar, 6 dakika boyunca inkübe edildikten sonra, numune tüpleri 10.000

g'de, +4°C'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Absorbans ölçümleri 734 nm dalga boyunda gerçekleştirildi.

Elde edilen verilerle numune konsantrasyonlarına karşı absorbans grafiği çizildi ve SC50 değeri hesaplandı. Bu değer, ABTS•+ radikalinin absorbansını yarıya indirmek için gereken numune konsantrasyonunu göstermekte olup, sonuçlar mg arı sütü/mL cinsinden ifade edildi.

Tablo 17. ABTS•+ radikali süpürme aktivitesi tayininde (SC₅₀) yapılan pipetleme işlemi

	Numune	Kontrol
Arı sütü sulu ekstraktı	500 µL	-
ABTS reaktifi	1500 µL	1500 µL
Örnek çözücüsü (Saf su)	-	500 µL

TE değerinin belirlenmesi amacıyla, numunelerden 250 µL alındı ve üzerine 1,75 mL ABTS•+ çözeltisi eklendi (Tablo 18). Karışımlar, 6 dakikalık inkübasyon süresinin ardından 10.000 g'de, +4°C'de 5 dakika santrifüj edildi. Ölçümler, 517 nm dalga boyunda metanole karşı gerçekleştirildi.

Analizde standart olarak, farklı konsantrasyonlardaki (600; 450; 225; 112,5; 56,25 µM) Troloks çözeltileri kullanıldı (Şekil 14). Standart ve numune absorbans değerleri kullanılarak "% inhibisyon" hesaplandı ve arı sütü örneklerinin antioksidan aktiviteleri, Troloks kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak "µmol TE/g arı sütü" birimiyle ifade edildi.

Tablo 18. ABTS•+ radikali süpürme aktivitesi tayininde (Troloks eşdeğeri) yapılan pipetleme işlemi

	Numune	Kör	Standart
Arı sütü sulu ekstraktı	250 µL	-	-
Troloks standardı	-	-	250 µL
Saf su/Metanol	-	250 µL	-
ABTS reaktifi	1,75 mL	1,75 mL	1,75 mL

2.14. İstatistiksel Analizler

Tez çalışmasında yapılan temel istatistiksel analizler ve korelasyon değerlendirmeleri, SPSS Versiyon 20.0 (Statistical Package for the Social Sciences) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verilerdeki istatistiksel farklılıkların belirlenmesinde One-Way ANOVA testi ve en az üç grubun karşılaştırılmasında Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. $p<0,05$ değeri anlamlı farklılık olarak kabul edilmiştir.

PSL (Partial Least Squares/Kısmi En Küçük Kareler), regresyon analizinde XLSTAT-Statistical Software for Excel (2024) programı kullanılmıştır.



3. BULGULAR

3.1. Arı Sütü Örneklerinin Nem ve Kuru Madde İçeriği (%)

Farklı sıcaklık ve sürede depolanan arı sütü örneklerinin nem, kuru madde ve suda çözünür kuru madde içerikleri Tablo 19’da sunuldu. Arı sütü örneklerinin nem içerikleri %57,83 ile %63,27 arasında değişiklik gösterdi.

Tablo 19. Arı sütü örneklerinin nem ve kuru madde içeriği

Örnekler	Nem (%)	Kuru madde (%)	°Briks (%)
Taze Arı Sütü	62,70 ± 0,21 ^{ab}	37,30 ± 0,21 ^{fg}	37,00 ± 0,50 ^c
3. ay			
-20°C	63,13 ± 0,31 ^{ab}	36,87 ± 0,31 ^{fg}	36,83 ± 0,29 ^c
+4°C	62,74 ± 0,13 ^{ab}	37,26 ± 0,13 ^{fg}	36,83 ± 0,29 ^c
Oda sıc.	62,46 ± 0,12 ^{abc}	37,54 ± 0,12 ^{efg}	36,83 ± 0,29 ^c
6. ay			
-20°C	63,27 ± 0,46 ^a	36,73 ± 0,46 ^g	36,83 ± 0,29 ^c
+4°C	62,81 ± 0,26 ^{ab}	37,19 ± 0,26 ^{fg}	37,00 ± 0,00 ^c
Oda sıc.	60,66 ± 0,64 ^c	39,34 ± 0,64 ^c	38,00 ± 0,00 ^b
9. ay			
-20°C	61,81 ± 0,16 ^{cd}	38,19 ± 0,16 ^{de}	36,67 ± 0,29 ^c
+4°C	61,29 ± 0,86 ^{de}	38,71 ± 0,86 ^{cd}	37,00 ± 0,00 ^c
Oda sıc.	58,63 ± 0,14 ^f	41,37 ± 0,14 ^b	39,83 ± 0,29 ^a
12. ay			
-20°C	62,30 ± 0,21 ^{bc}	37,70 ± 0,21 ^{ef}	37,00 ± 0,00 ^c
+4°C	61,31 ± 0,03 ^{de}	38,69 ± 0,03 ^{cd}	38,00 ± 0,00 ^b
Oda sıc.	57,83 ± 0,08 ^g	42,17 ± 0,08 ^a	40,00 ± 0,00 ^a

*Sonuçlar kuru ağırlık temelinde ortalama ± standart sapma ifade edilmiştir.

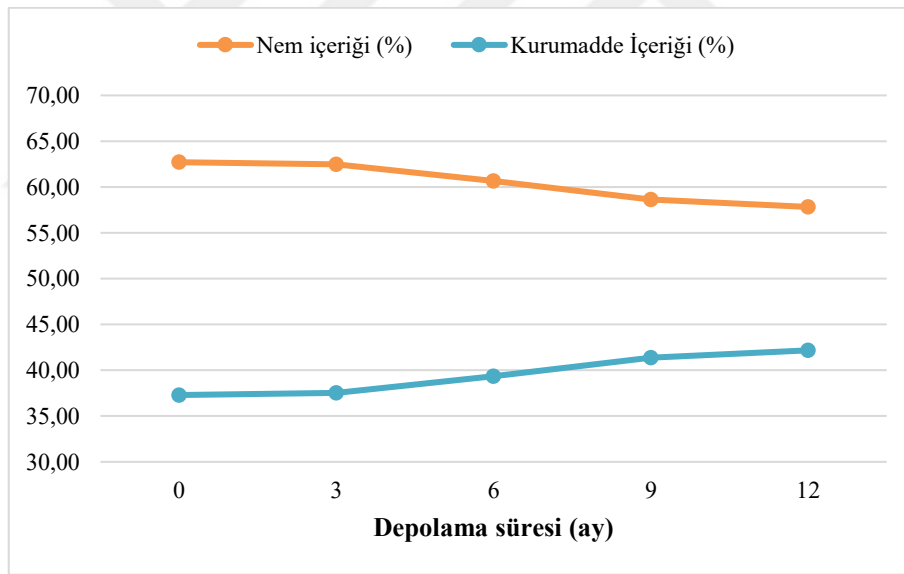
*a-g Aynı sütündeki farklı üst simge harfler, istatistiksel farklılıkları ifade eder ($p < 0,05$).

En yüksek nem içeriği, taze arı sütü ile -20°C ve +4°C’de 3 ile 6 ay süreyle muhafaza edilen arı sütlerinde ölçülürken, en düşük ise oda koşullarında 12 ay boyunca depolanan arı sütünde tespit edildi. -20°C’de 12 aylık depolama süresince, arı sütlerinin nem içeriklerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanamadı ($p > 0,05$). +4°C’de yapılan 12 aylık depolamada, 6. ayda nem içeriğinde düşük düzeyde bir azalma gözlemlendi. Bununla

birlikte, oda koşullarında 3. aydan itibaren arı sütlerinin nem içeriğinde önemli bir düşüş meydana geldi ve 12 aylık depolama süresi sonunda %57,83 olarak belirlendi.

Arı sütü örneklerinin toplam kuru madde içerikleri %36,87 ile %42,17 arasında; suda çözünür kuru madde içerikleri ise %36,67 ile %40,00 arasında değişen aralıkta ölçüldü. Taze arı sütünün toplam kuru madde ve suda çözünür kuru madde içerikleri sırasıyla %37,30 ve %37,00 olarak belirlendi. Depolama süreci boyunca, düşük sıcaklık derecelerinde, arı sütlerinin suda çözünür ve toplam kuru madde içeriklerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilemedi ($p>0,05$). Ancak, 3. aydan itibaren oda sıcaklığında depolanan arı sütü örneklerinde, toplam kuru madde ve suda çözünür kuru madde içeriklerinde artış gözlemlendi; sırasıyla %42,17 ve %40,00 olarak belirlendi ($p<0,05$).

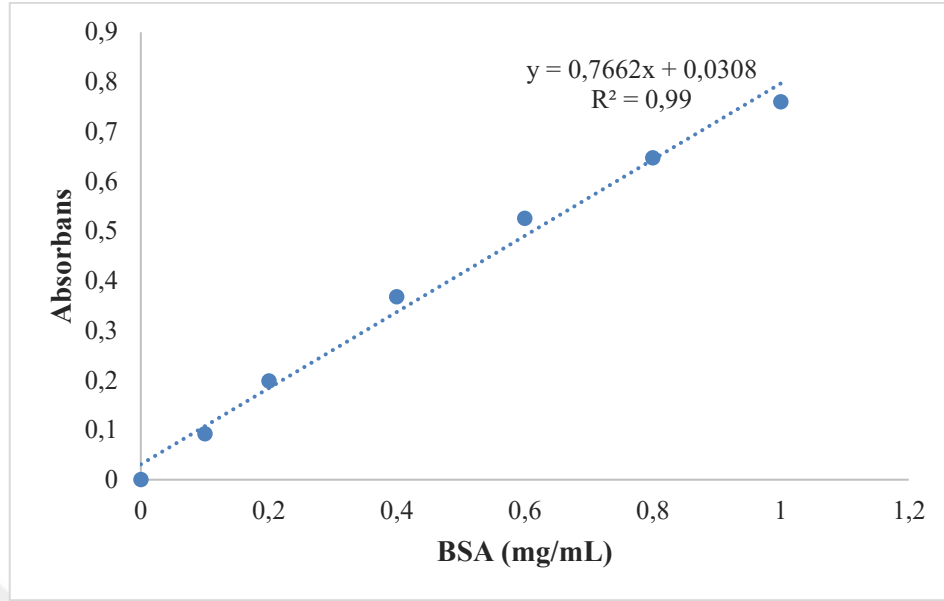
12 aylık depolama sürecinin sonunda yapılan ölçümlerde, oda sıcaklığında depolanan arı sütü örneklerinin en düşük nem içeriğine ve en yüksek kuru madde içeriğine sahip olduğu tespit edildi (Şekil 5).



Şekil 5. Oda sıcaklığında depolanan arı sütlerinde depolama süresine bağlı nem ve kuru madde değişimi

3.2. Arı Sütü Örneklerinin Fizikokimyasal Özellikleri

Suda çözünür protein içeriği tespitinde kullanılan BSA standart kalibrasyon grafiği Şekil 6'da verildi.



Şekil 6. BSA standart eğrisi (mg/mL)

Farklı depolama sıcaklıkları ve süreleri boyunca arı sütü örneklerinin kuru madde temelinde protein, yağ ve kül miktarlarına ilişkin veriler Tablo 20’de verilmiştir.

Tablo 20. Arı sütü örneklerinin fizikokimyasal parametreleri

Örnekler	% Protein (Kjeldahl)	% Protein (Bradford)	% Yağ	% Kül
Taze Arı Sütü	38,11 ± 0,14 ^{ef}	15,36 ± 0,15 ^{ab}	9,58 ± 0,20 ^{bcd}	3,08 ± 0,08 ^a
3. ay				
-20°C	37,65 ± 1,21 ^{ef}	15,38 ± 0,09 ^{ab}	9,31 ± 0,34 ^{bcd}	3,06 ± 0,16 ^{ab}
+4°C	42,88 ± 1,91 ^b	15,61 ± 0,11 ^a	8,58 ± 0,70 ^{de}	3,01 ± 0,11 ^{abcd}
Oda sıc.	46,16 ± 0,99 ^a	14,80 ± 0,13 ^b	8,36 ± 1,07 ^e	3,03 ± 0,14 ^{abcd}
6. ay				
-20°C	35,58 ± 1,09 ^f	13,60 ± 0,19 ^b	10,15 ± 0,43 ^{bcd}	2,93 ± 0,05 ^{bcd}
+4°C	38,34 ± 0,30 ^{def}	13,29 ± 0,45 ^b	9,77 ± 0,31 ^{bcd}	2,99 ± 0,10 ^{abcde}
Oda sıc.	41,02 ± 0,68 ^{bcd}	13,82 ± 1,31 ^b	9,08 ± 0,41 ^{bc}	3,05 ± 0,25 ^{abc}
9. ay				
-20°C	37,68 ± 0,47 ^{ef}	13,61 ± 0,33 ^b	11,00 ± 0,42 ^{abc}	2,92 ± 0,18 ^{cdef}
+4°C	42,35 ± 1,02 ^b	13,49 ± 0,29 ^b	10,67 ± 0,92 ^{bcd}	2,91 ± 0,07 ^{def}
Oda sıc.	41,22 ± 1,09 ^{bc}	13,20 ± 0,24 ^b	9,75 ± 0,24 ^{bcd}	2,93 ± 0,13 ^{bcd}
12. ay				
-20°C	39,05 ± 0,89 ^{cde}	12,36 ± 0,08 ^c	12,64 ± 0,21 ^a	2,92 ± 0,32 ^{cdef}
+4°C	39,07 ± 0,82 ^{cde}	12,31 ± 0,12 ^c	12,77 ± 0,15 ^a	2,87 ± 0,08 ^{ef}
Oda sıc.	31,51 ± 0,25 ^g	13,83 ± 0,17 ^b	11,23 ± 0,80 ^{ab}	2,85 ± 0,15 ^f

*Sonuçlar kuru ağırlık temelinde ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir.

*a-g Aynı sütündeki farklı üst simge harfler, istatistiksel farklılıkları ifade eder ($p < 0,05$).

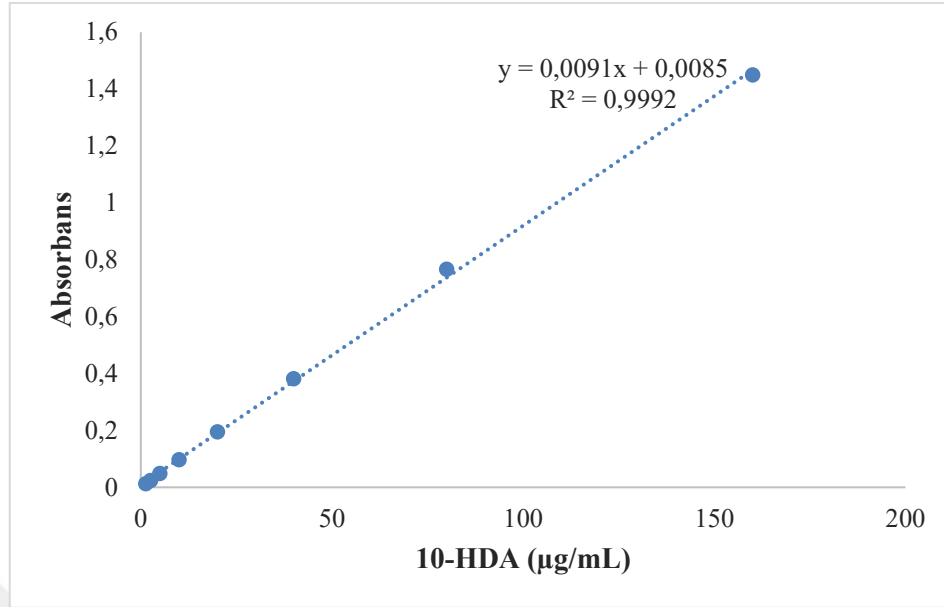
Arı sütünün protein içeriği, ham protein ve suda çözünür protein miktarı olarak iki farklı yöntemle değerlendirildi. Ham protein miktarlarının kuru madde üzerinden %31,51 ile %46,16 arasında değiştiği belirlendi. Protein miktarları arasında istatistiksel anlamda farklılık tespit edildi; ancak bu farklılıkların depolama sıcaklığı ve süresiyle doğrudan bir ilişkisi olduğu saptanamadı ($p < 0,05$). Suda çözünür protein miktarları ise kuru madde temelinden %12,31 ile %15,38 arasında değişim gösterdi. En yüksek protein içeriği, taze arı sütü ile -20°C ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 3 ay boyunca muhafaza edilen örneklerde gözlemlendi. Bununla birlikte, tüm depolama sıcaklıklarında suda çözünür protein miktarlarında 6. ayda belirgin bir azalma kaydedildi ve bu noktadan sonra gerçekleşen protein değişimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$).

Arı sütü örneklerinin yağ içeriği, kuru madde temelinde %8,36 ile %12,77 arasında değiştiği saptandı. Taze arı sütündeki yağ oranı %9,58 olarak ölçüldü. Depolama sıcaklığı ve sürelerinin, yağ içeriği üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sahip olduğu belirlendi ($p < 0,05$). -20°C , $+4^{\circ}\text{C}$ ve oda sıcaklığında muhafaza edilen arı sütlerinin yağ içeriğinde 3. aydan itibaren kademeli bir artış gözlemlendi ve 12 aylık depolama sonunda sırasıyla yağ içerikleri %12,64, %12,77 ve %11,23 olarak tespit edildi.

Kül içeriği açısından örneklerin kuru madde bazında %2,85-3,08 arasında toplam mineral madde içeriğine sahip olduğu belirlendi. En yüksek kül içeriği taze arı sütünde, en düşük değer ise oda sıcaklığında 12 ay depolanan arı sütünde tespit edildi. Ancak, örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaması, depolama süresi ve sıcaklığının kül içeriği üzerinde önemli bir etkisi olmadığını gösterdi ($p > 0,05$).

3.3. Arı Sütü Örneklerinin 10-HDA İçeriği

Arı sütü örneklerinin 10-HDA içeriği tespitinde kullanılan standart kalibrasyon grafiği Şekil 7'de verildi.



Şekil 7. 10-HDA standart eğrisi (µg/mL)

Arı sütü örneklerindeki 10-HDA (10-hidroksi-2-dekanoik asit) miktarları, kalite açısından önemli bir gösterge olarak, %2,51 ile %2,86 arasında; kuru temel bazda ise bu değerler %6,49 ile %7,67 arasında değişkenlik gösterdi (Tablo 21). En yüksek 10-HDA miktarı taze arı sütünde tespit edilirken, en düşük miktar oda sıcaklığında 12 ay boyunca depolanan arı sütünde bulundu. Depolamanın ilk 3 ayında, tüm sıcaklıklarda istatistiksel olarak anlamlı ve birbirine yakın oranlarda bir düşüş belirlendi ($p < 0,05$). 3. aydan itibaren depolama süresi boyunca, en yüksek 10-HDA içeriği -20°C 'de depolanan örneklerde, en düşük içerik ise oda sıcaklığında depolanan örneklerde saptandı. Tüm sıcaklıklarda, 9. ayda 10-HDA içeriğinde bir artış izlendi, ancak bu artışın ardından depolama süresi sonuna kadar azalma devam etti. 12 aylık depolama sonunda, 10-HDA içerikleri -20°C 'de %7,14, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de %6,78 ve oda sıcaklığında %6,49 olarak belirlendi.

Tablo 21. Arı sütü örneklerinde 10-HDA içeriği

Örnekler		10-HDA (%)	10-HDA (%, kuru ağırlık)
Taze Arı Sütü		$2,86 \pm 0,00^a$	$7,67 \pm 0,01^a$
3. ay	-20°C	$2,68 \pm 0,00^f$	$7,26 \pm 0,01^b$
	$+4^{\circ}\text{C}$	$2,69 \pm 0,00^{ef}$	$7,21 \pm 0,01^c$
	Oda sic.	$2,73 \pm 0,00^d$	$7,26 \pm 0,01^b$

Tablo 21'in devamı

6. ay	-20°C	$2,51 \pm 0,00^j$	$6,82 \pm 0,01^e$
	+4°C	$2,53 \pm 0,00^i$	$6,79 \pm 0,01^f$
	Oda sic.	$2,60 \pm 0,01^i$	$6,60 \pm 0,01^h$
9. ay	-20°C	$2,73 \pm 0,01^{cd}$	$7,16 \pm 0,02^d$
	+4°C	$2,64 \pm 0,00^g$	$6,83 \pm 0,01^e$
	Oda sic.	$2,80 \pm 0,01^b$	$6,76 \pm 0,01^g$
12. ay	-20°C	$2,69 \pm 0,01^e$	$7,14 \pm 0,01^d$
	+4°C	$2,62 \pm 0,01^h$	$6,78 \pm 0,01^{fg}$
	Oda sic.	$2,74 \pm 0,01^c$	$6,49 \pm 0,01^i$

*Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir.

*^{a-j}Aynı sütundaki farklı üst simge harfler, istatistiksel farklılıkları ifade eder ($p < 0,05$).

3.4. Arı Sütü Örneklerinin pH ve Titrasyon Asitliği Değerleri

Arı sütlerinin depolama stabilitesi açısından önemli bir belirteç olan pH ve titrasyon asitliği değerleri Tablo 22'de sunuldu.

Tablo 22. Arı sütü örneklerinin pH ve titrasyon asitlik değerleri

Örnekler		pH	Titrasyon Asitliği (mL 1 N NaOH/100 g)
Taze Arı Sütü		$3,71 \pm 0,01^c$	$48,94 \pm 0,24^{de}$
3. ay	-20°C	$3,76 \pm 0,03^a$	$48,09 \pm 1,29^{ef}$
	+4°C	$3,67 \pm 0,01^d$	$50,25 \pm 0,27^{bc}$
	Oda sic.	$3,73 \pm 0,01^{bc}$	$51,27 \pm 0,48^b$
6. ay	-20°C	$3,73 \pm 0,01^{bc}$	$48,85 \pm 0,32^{de}$
	+4°C	$3,68 \pm 0,01^d$	$50,33 \pm 0,36^{bc}$
	Oda sic.	$3,65 \pm 0,00^e$	$53,30 \pm 0,54^a$
9. ay	-20°C	$3,71 \pm 0,01^c$	$47,35 \pm 0,96^f$
	+4°C	$3,53 \pm 0,00^f$	$50,67 \pm 0,41^{bc}$
	Oda sic.	$3,48 \pm 0,01^g$	$53,87 \pm 0,89^a$

Tablo 22'nin devamı

12. ay	-20°C	$3,74 \pm 0,01^b$	$46,01 \pm 0,73^g$
	+4°C	$3,50 \pm 0,01^g$	$49,69 \pm 0,03^{cd}$
	Oda sic.	$3,43 \pm 0,01^h$	$53,54 \pm 0,20^a$

*Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir

**a-h Aynı sütundaki farklı üst simge harfler, istatistiksel farklılıkları ifade eder ($p<0,05$).

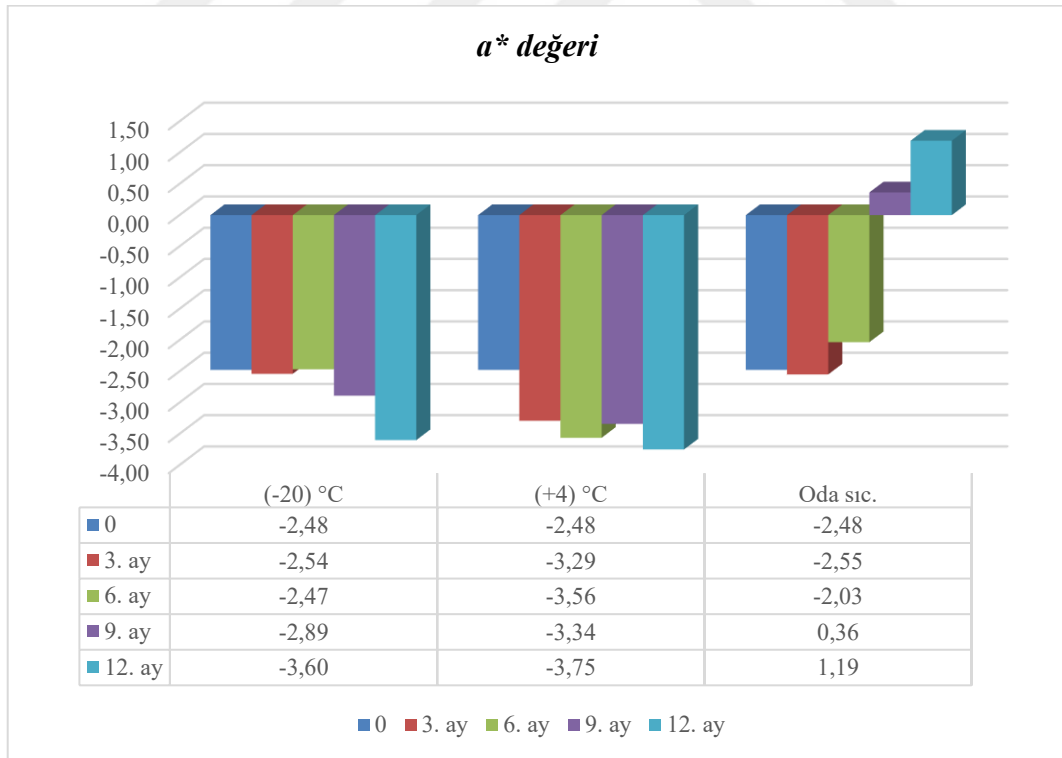
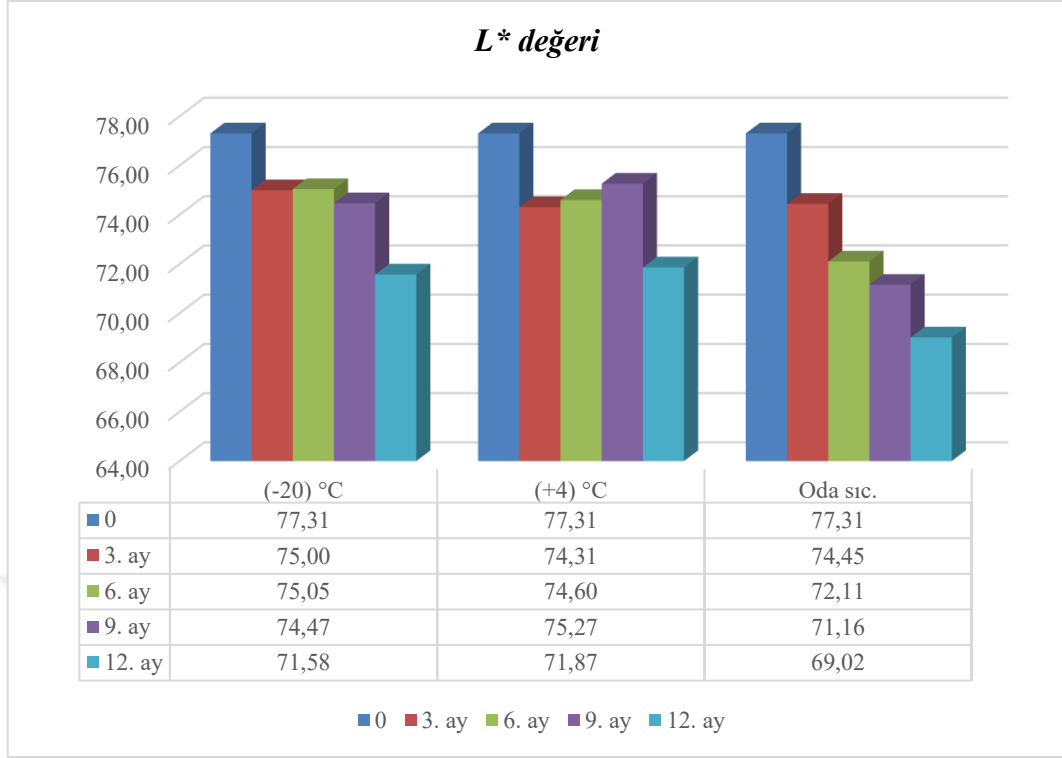
Arı sütü örneklerinin pH değerleri 3,43 ile 3,76 arasında değişti. En yüksek pH değerleri, taze arı sütünde ve -20°C'de muhafaza edilen örneklerde belirlendi. Buna karşın, en düşük pH değeri 12 ay boyunca oda sıcaklığında depolanan arı sütünde tespit edildi. -20°C'de muhafaza edilen örnekler arasında pH açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmemiş olup, bu örneklerin pH değerleri taze arı sütüne benzerlik gösterdi ($p>0,05$). +4°C'de muhafaza edilen örneklerde 6. ayda anlamlı bir pH düşüşü gözlemlendi ($p<0,05$). Oda sıcaklığında depolanan arı sütlerinde ise 3. aydan itibaren pH düşüşü görülmekle birlikte 9. ayda önemli bir azalma meydana geldi.

Arı sütü örneklerinde titrasyon asitlik değerleri 46,01 ile 53,54 mL 0,1 N NaOH/100 g arasında değişiklik gösterdi. En düşük asitlik değerleri, taze arı sütünde ve -20°C'de depolanan örneklerde gözlemlenirken; en yüksek asitlik değerleri ise 6. aydan itibaren oda sıcaklığında depolanan arı sütlerinde tespit edildi. -20°C ve +4°C'de muhafaza edilen arı sütü örneklerinin asitlik seviyeleri arasında pH değerlerinde olduğu gibi, istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). Oda sıcaklığında saklanan örneklerde ise 6. ayda anlamlı bir asitlik artışı gözlemlenmekle birlikte, 6. aydan itibaren bu değerde önemli bir değişiklik olmadı.

Sonuç olarak, -20°C ve +4°C'de muhafaza edilen arı sütü örneklerinde depolama süresi boyunca pH ve asitlik değerlerinde önemli bir değişiklik meydana gelmedi. Ancak, oda sıcaklığında depolanan örneklerde, depolama süresine bağlı olarak pH değerinde belirgin bir azalma, asitlik değerinde ise artış tespit edildi ($p<0,05$).

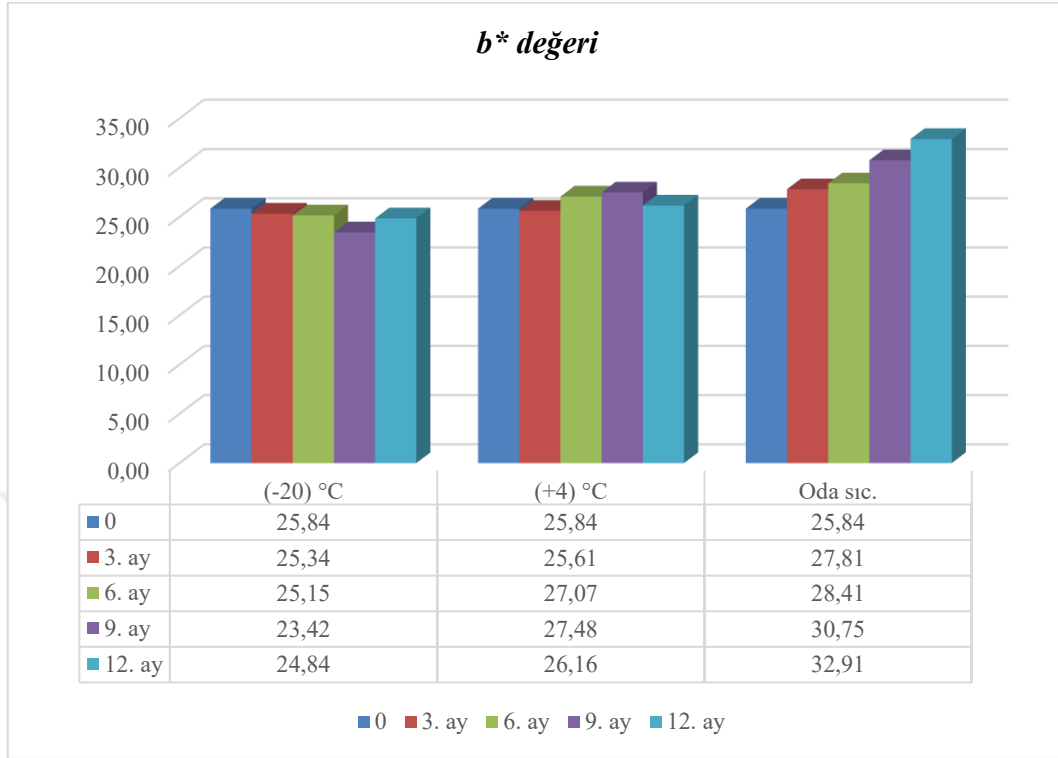
3.5. Arı Sütü Örneklerinde *L*, *a* ve *b* Renk Ölçüm Değerleri

Farklı sıcaklık ve sürelerde depolanan arı sütleri için renk değerleri, parlaklık için *L** (0 siyah, 100 beyaz), *a** (-*a* yeşillik, +*a* kırmızılık) ve *b** (-*b* mavilik, +*b* sarılık) olarak ifade edildi (Şekil 8).



Şekil 8. Arı sütü örneklerinin *L*, *a* ve *b* renk ölçüm değerleri

Şekil 8'in devamı



Arı sütü örneklerinde L^* değeri 69,02 ile 77,31 arasında değişti. En yüksek L^* değeri taze arı sütünde, en düşük ise oda sıcaklığında 12 ay boyunca depolanan örneklerde gözlemlendi. -20°C ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de depolanan örneklerde, ilk 9 ay boyunca L^* değerinde belirgin bir değişiklik tespit edilmezken, 9. aydan itibaren bu değerlerde anlamlı bir düşüş kaydedildi ($p<0,05$). Buna karşılık, oda sıcaklığında depolanan örneklerde depolamanın başlangıcından itibaren L^* değerinde önemli bir azalma meydana gelerek örneklerin parlaklığı belirgin şekilde azaldı.

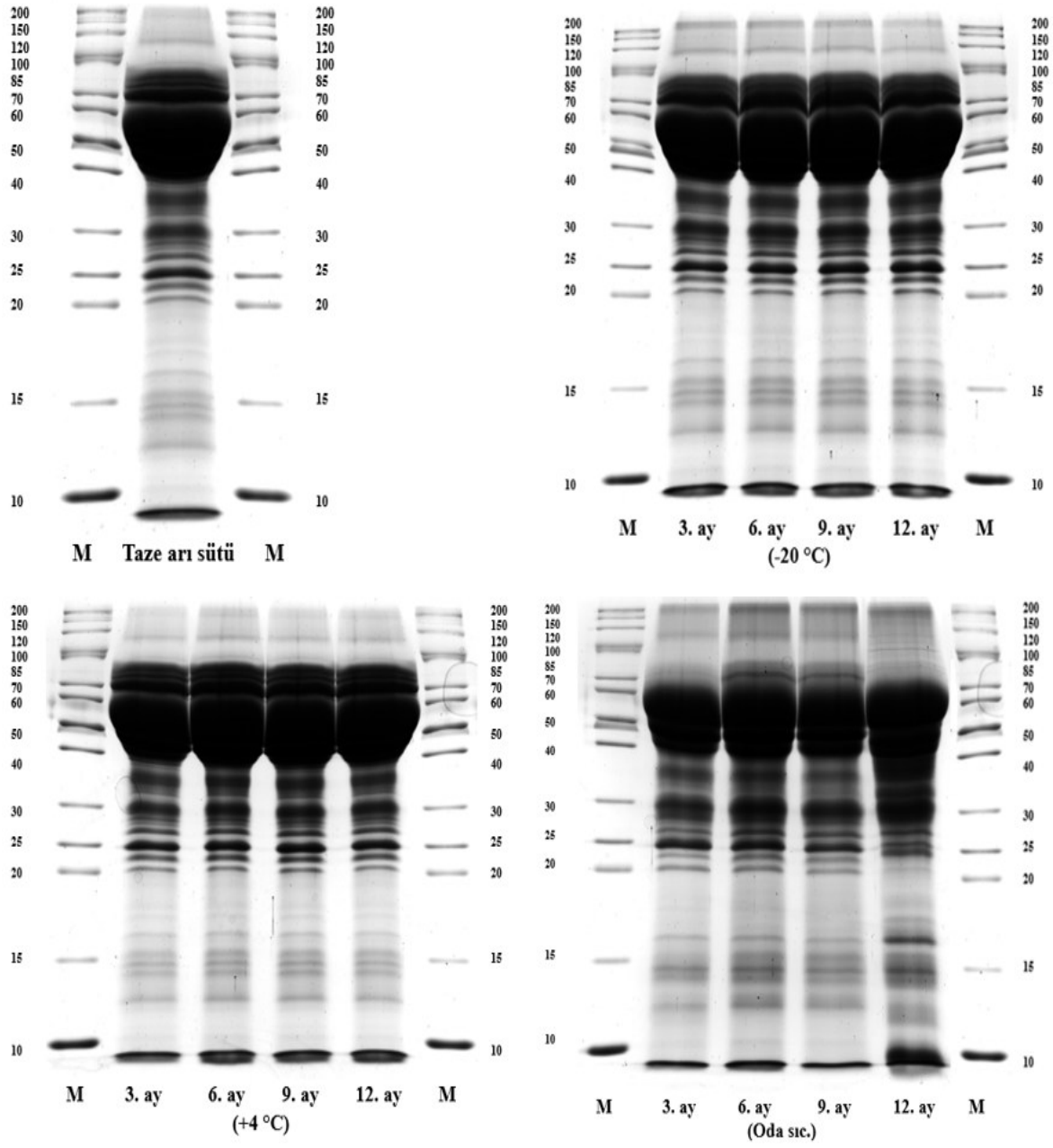
Arı sütü örneklerinin a^* değeri -3,75 ile 1,19 arasında değişiklik gösterdi. Taze arı sütü ile -20°C ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilen örnekler yeşil renk skalasında yer alırken, oda sıcaklığında saklanan örneklerde, a^* değerinin 9. aydan itibaren pozitif değerlere yükseldiği ve depolama süresi ilerledikçe daha yoğun bir kırmızı ton kazandığı tespit edildi.

Arı sütü örneklerinin b^* değeri 23,42 ile 32,91 arasında bir değişim gösterdi. Bu değerlere göre, arı sütü örneklerinin farklı derecelerde sarı tonlarına sahip olduğu görüldü. Taze arı sütünde b^* değeri 25,84 olarak belirlendi ve -20°C 'de muhafaza edilen örneklerde de bu değere yakın sonuçlar elde edildi. $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilen örneklerde ise b^* değeri 3. aydan itibaren artış göstererek 27,48 seviyesine ulaştı. Oda sıcaklığında depolanan örneklerde ise depolamanın başlangıcından itibaren b^* değerinde istatistiksel olarak anlamlı

ve sürekli bir artış görüldü, bu artış sarı rengin yoğunluğunda 32,91 seviyesine kadar bir yükselmeye neden oldu ($p<0,05$).

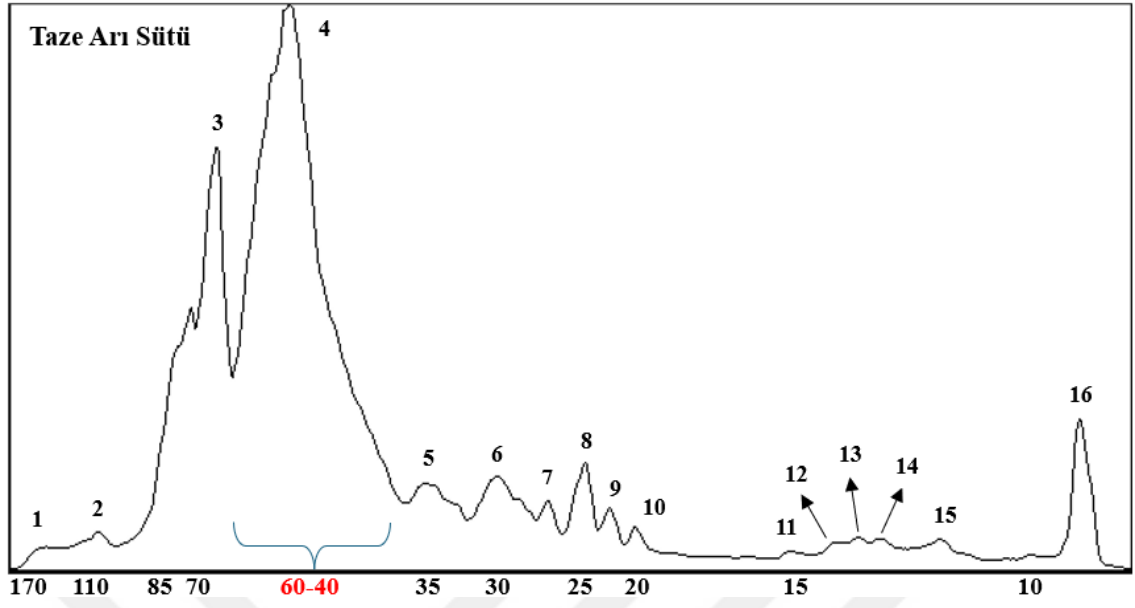
3.6. Arı Sütü Örneklerinin Protein Profili

Farklı sıcaklık ve sürelerde depolanan arı sütlerinin SDS-PAGE jel görüntüleri Şekil 9'da verilmiştir. Jel üzerindeki bantlar, farklı moleküler ağırlıklara sahip proteinleri ve alt birimlerini temsil etmektedir. Bantların jeldeki konumları, ilgili proteinlerin moleküler ağırlığının bir göstergesi olup; yüksek moleküler ağırlıklı proteinler jelin üst bölgelerinde, düşük moleküler ağırlıklı proteinler ise alt bölgelerinde yer alır. Bant yoğunluğu, proteinin miktarına bağlı olarak değişiklik gösterir; yoğun bantlar yüksek protein miktarını, zayıf bantlar ise daha düşük protein miktarını ifade etmektedir. Jel üzerindeki örneklerin her iki yanında yer alan "marker"lar, proteinlerin moleküler ağırlığını belirlemek için referans olarak kullanılmaktadır.



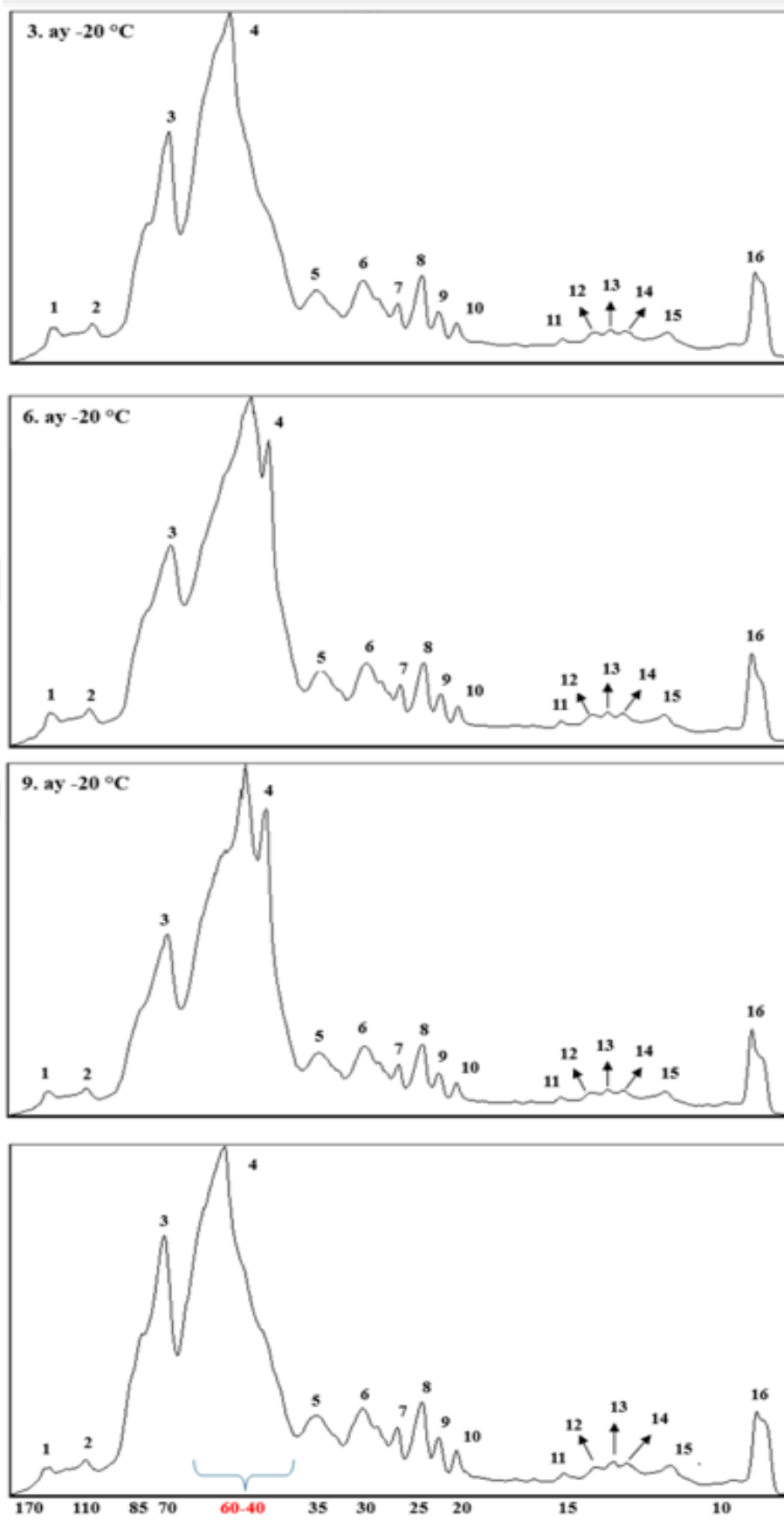
Şekil 9. Arı sütü örneklerinin SDS-PAGE jel görüntüleri

Arı sütü örneklerindeki protein bantlarının ve bant yoğunluklarının daha detaylı analiz edilebilmesi için ImageJ programından yararlanıldı. Bant yoğunluklarına göre oluşturulan pikler taze arı sütü için Şekil 10 ve diğer arı sütü örnekleri için Şekil 11’de verildi.



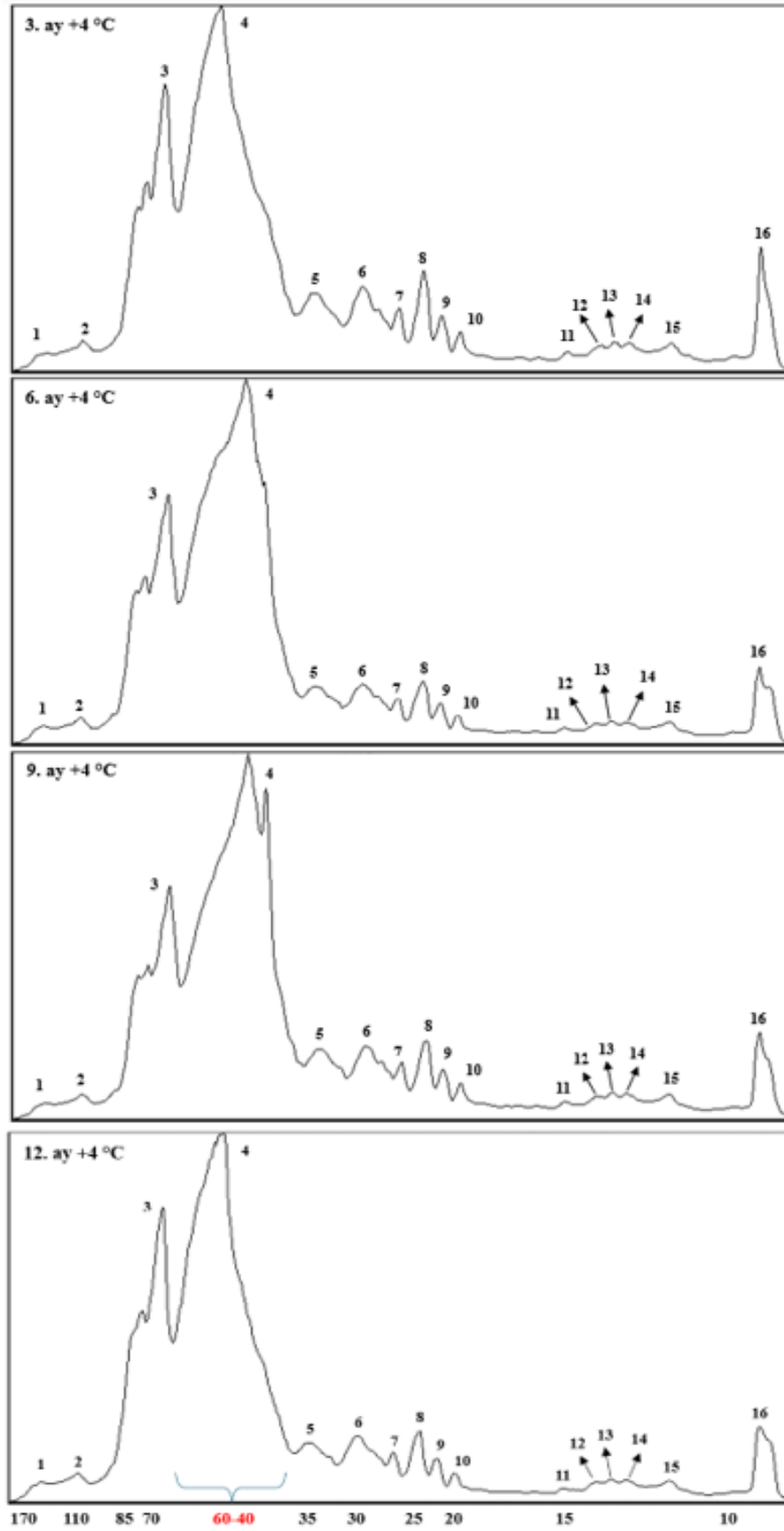
Şekil 10. Taze arı sütünde tespit edilen protein pikleri

Arı sütü örneklerinde tespit edilen protein piklerinin relatif alan yüzdeleri ise Tablo 25'te sunuldu.

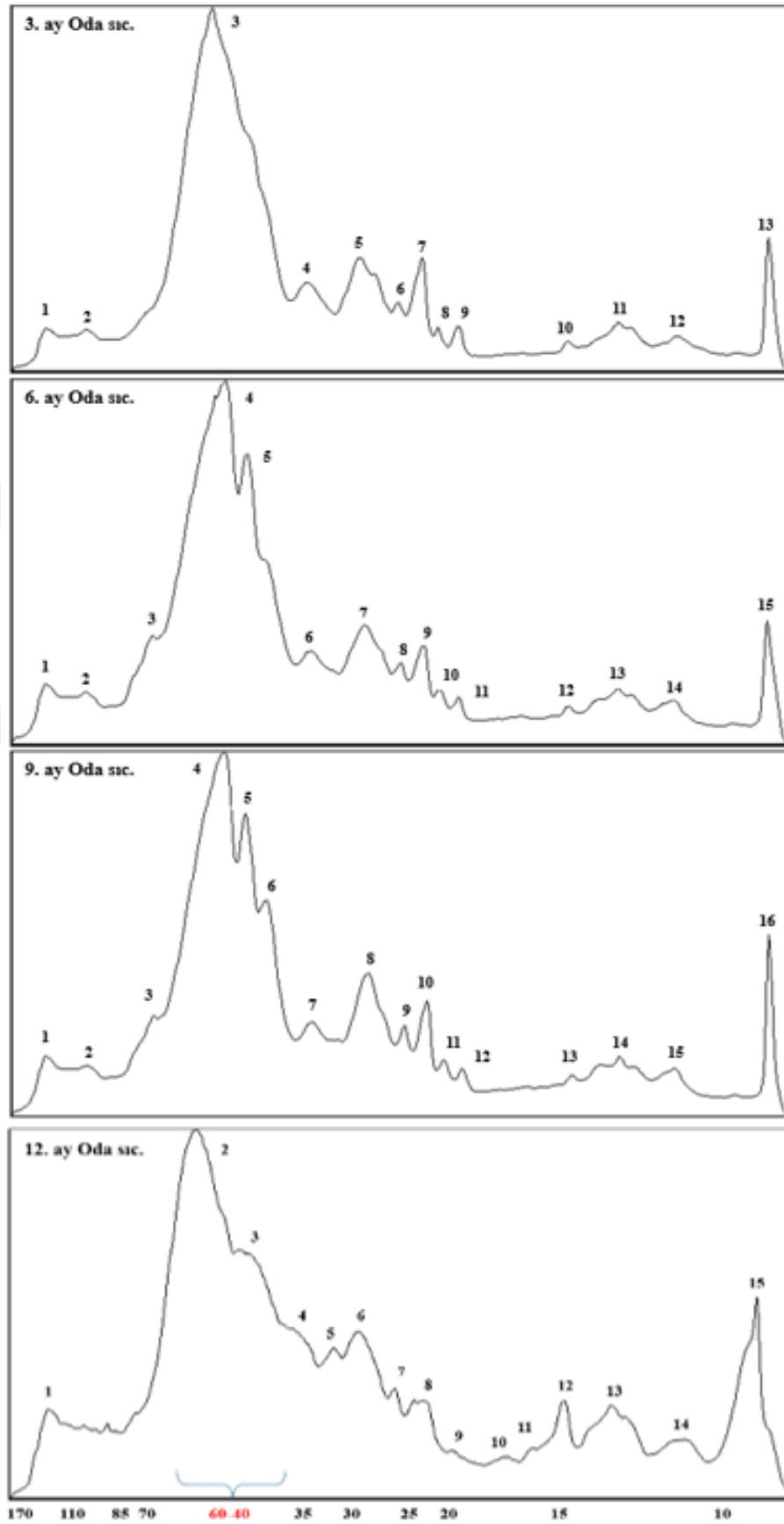


Şekil 11. Farklı sıcaklık ve sürelerde depolanan arı sütlerinde tespit edilen protein pikleri

Şekil 11'in devamı



Şekil 11'in devamı



Tablo 23. Arı sütü örneklerinin protein oranları (%)

Örnekler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Taze Arı Sütü	0,34	0,30	19,86	64,11	1,64	2,87	0,71	2,41	0,73	0,54	0,15	0,17	0,08	0,18	0,42	5,47
3. ay																
-20°C	0,70	0,46	16,11	64,35	2,30	3,87	0,64	2,93	0,78	0,61	0,15	0,21	0,12	0,17	0,55	6,05
+4°C	0,33	0,32	16,51	61,15	2,84	4,15	0,98	3,76	1,21	0,75	0,14	0,16	0,18	0,20	0,44	6,87
Oda sic.	0,94	0,33	78,62	1,71	5,92	0,32	3,04	0,24	0,90	0,24	2,69	0,62	4,42	--	--	--
6. ay																
-20°C	0,55	0,47	14,17	67,21	2,29	3,68	0,60	2,46	0,72	0,56	0,16	0,30	0,15	0,24	0,45	5,98
+4°C	0,38	0,43	18,64	67,33	1,31	2,24	0,58	2,02	0,79	0,40	0,10	0,11	0,09	0,15	0,29	5,12
Oda sic.	3,51	0,97	0,87	46,63	10,18	2,09	10,58	0,84	4,05	0,70	0,99	0,57	5,64	1,68	10,70	--
9. ay																
-20°C	0,68	0,49	14,16	66,70	2,48	3,60	0,66	2,56	0,78	0,54	0,19	0,23	0,16	0,24	0,42	6,10
+4°C	0,27	0,37	16,23	66,90	2,25	3,13	0,70	2,49	0,91	0,57	0,15	0,18	0,15	0,17	0,38	5,15
Oda sic.	2,94	0,70	0,84	42,60	6,03	4,42	2,18	13,44	1,23	5,19	0,85	0,96	0,44	4,56	2,84	--
12. ay																
-20°C	0,45	0,43	8,68	67,82	2,99	4,41	1,05	3,70	1,20	0,83	0,20	0,23	0,23	0,22	0,53	7,03
+4°C	0,33	0,58	20,36	62,94	1,47	3,06	0,66	2,49	0,92	0,47	0,15	0,12	0,10	0,16	0,35	5,84
Oda sic.	3,28	46,44	3,70	1,44	0,70	5,52	0,66	2,92	0,23	0,53	0,18	3,11	8,19	2,86	20,24	--

Taze arı sütü ile farklı koşullarda muhafaza edilen arı sütü örneklerinde, moleküler ağırlıkları 10 kDa ile 170 kDa arasında değişen 13 ile 16 farklı protein bandı tespit edildi. Taze arı sütü ile -20°C ve +4°C’de muhafaza edilen örneklerde 16 farklı protein bandı belirlendi. Buna karşın, oda sıcaklığında muhafaza edilen arı sütlerinde, depolamanın 3. ayından itibaren denatürasyona bağlı olarak protein bantlarında belirgin değişiklikler meydana geldi. Depolama sürecinin 3. ayında, oda sıcaklığında depolanan arı sütü örneklerinde toplamda 13 protein bandı tespit edildi.

Taze arı sütü ve farklı koşullarda muhafaza edilen arı sütü örneklerinde, proteinlerin büyük bir kısmının 20 kDa ile 85 kDa aralığında yoğunlaştığı belirlendi. Bu aralıktaki proteinlerin toplam proteinlere oranı %61,38 ile %93,51 arasında değişti. Taze arı sütünde bu oran oldukça yüksek olup %92,87 olarak tespit edildi. -20°C’de depolanan örneklerde 20 kDa ile 85 kDa arasındaki protein oranı %90,68 ile %91,69 arasında değişirken, +4°C’de muhafaza edilen örneklerde bu oran %91,35 ile %93,51 arasında saptandı. Bu koşullarda muhafaza edilen örneklerde proteinlerin büyük ölçüde korunarak depolamanın etkilerinin sınırlı kaldığı belirlendi. Ancak oda sıcaklığında depolanan arı sütlerinde, depolamanın 12. ayında, oda sıcaklığında muhafaza edilen arı sütlerinde toplam protein oranı %61,38’e kadar düştü, bu düşüşe paralel olarak protein bantlarında önemli değişiklikler meydana geldi. Yüksek sıcaklık koşullarında denatürasyona bağlı olarak 3. aydan itibaren bazı proteinlerin yoğunluğu azalırken, 12. ayda bazı proteinlerin tamamen kaybolduğu ya da yerlerini yeni peptit bantlarına bıraktığı tespit edildi.

Arı sütünde 40-60 kDa aralığında yoğun bantlar oluşturan proteinler, literatüre dayalı olarak arı sütünün spesifik proteinleri olan Major Royal Jelly Proteinleri (MRJP) olarak tanımlandı. Bu proteinlerin oranı, depolama koşullarına bağlı olarak %50,14 ile %78,62 arasında değişiklik gösterdi. Taze arı sütünde MRJP’ler, toplam proteinlerin %64,11’ini oluştururken, -20°C’de muhafaza edilen örneklerde bu oran %64,35 ile %67,82 arasında belirlendi ve önemli bir değişiklik gözlemlenmedi. +4°C’de muhafaza edilen örneklerde ise başlangıçta %67,33 olarak belirlenen MRJP oranı, 9. aydan itibaren azalmaya başlayarak 12. ayda %61,15’e düştü. Buna karşılık, oda sıcaklığında depolanan örneklerde MRJP oranı depolamanın başlangıcından itibaren kademeli bir düşüş gösterdi ve depolama sonunda %50,14 olarak belirlendi. Özellikle düşük sıcaklıklarda MRJP stabilitesinin korunduğu, buna karşın oda sıcaklığında depolamada proteinlerin hızla bozunduğu ve MRJP oranında anlamlı düşüşler görüldüğü tespit edildi. Benzer şekilde, +4°C’de muhafaza edilen

örneklerde de MRJP miktarında azalmalar kaydedildi ancak bu süreç oda sıcaklığına kıyasla daha yavaş gerçekleşti.

Tüm arı sütü örneklerinde, moleküler ağırlıkları 20 ile 40 kDa arasında değişen, yoğunluğu nispeten düşük 5 veya 6 farklı protein bandı tespit edildi. Bu aralıktaki proteinlerden özellikle 25, 30 ve 35 kDa moleküler ağırlığa sahip olanlar, diğerlerine göre daha yüksek konsantrasyonlarda bulundu. Taze arı sütünde bu bantların oranı %0,54 ile %2,87 arasında değişerek toplam proteinlerin %8,9'unu oluşturdu. Depolama koşulları, bu proteinlerin oranında farklılıklara neden oldu. -20°C'de muhafaza edilen örneklerde, 20-40 kDa aralığındaki proteinlerin oranı %10,31 ile %14,18 arasında değişirken, +4°C'de saklanan örneklerde bu oran %7,34 ile %13,69 arasında kaydedildi. Bu sıcaklıklarda protein profili büyük ölçüde korunarak yoğunluk değişimleri sınırlı kaldı. Ancak oda sıcaklığında depolanan örneklerde, depolama süresine bağlı olarak önemli farklılıklar saptandı. Depolamanın 3. ayında %12,13 olarak belirlenen bu proteinlerin oranı 9. ayda ise %23,85'e ulaştı. Ancak depolama sürecinin son ayında, protein profili değişim göstererek bu proteinlerin oranı %11,24'e düştü.

Tüm arı sütü örneklerinde, moleküler ağırlıkları 10 ile 20 kDa arasında değişen ve yoğunluğu düşük 3 veya 5 farklı protein bandı tespit edildi. Taze arı sütünde bu bantlar, toplam proteinlerin yalnızca %1'ini oluşturarak düşük yoğunluk gösterdi. Depolama koşulları bu proteinlerin oranında önemli değişikliklere neden oldu. -20°C'de muhafaza edilen örneklerde, 10-20 kDa aralığındaki proteinlerin oranında %1,2 ile %1,41 arasında bir artış görüldü. +4°C'deki örneklerde bu oran %0,74 ile %1,12 arasında, daha fazla değişim gösterdiği tespit edildi. Bu sıcaklıklardaki değişimler düşük düzeyde olduğundan dolayı protein profili büyük ölçüde stabil kaldı. Buna karşılık, oda sıcaklığında depolanan arı sütü örneklerinde, bu protein bantlarında depolamaya bağlı olarak belirgin değişiklikler gösterdi. Depolamanın 3. ayında 10-20 kDa aralığındaki proteinlerin toplam oranı %3,55 olarak belirlenmiş olup depolama sürecinin sonunda bu oran %14,16'ya kadar yükseldi. Bu artışın, proteinlerin parçalanması veya dönüşümü gibi biyokimyasal süreçlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu bulgular, arı sütünün depolama sıcaklığına duyarlı bir protein yapısına sahip olduğunu ve düşük sıcaklıklarda protein stabilitesinin büyük ölçüde korunduğunu, buna karşın oda sıcaklığında depolamanın protein profili üzerinde olumsuz etkilere neden olduğunu gösterdi.

3.7. Arı Sütü Örneklerinin Şeker Profili

Yapılan çalışmada, HPLC cihazında RI dedektörü kullanılarak arı sütlerindeki riboz, fruktoz, glukoz, sakkaroz, maltoz, trehaloz, melezitoz ve melibiyoz olmak üzere 8 farklı şeker bileşeni incelendi. Arı sütü örneklerinde riboz, trehaloz ve melezitoz şekerleri tespit edilemedi. Belirlenen şekerler mono-, di- ve trisakkaritler olarak sınıflandırılmış ve yüzdelik oranları Tablo 24'te sunuldu.



Tablo 24. Arı sütü örneklerinin şeker içerikleri (%)

Örnekler	Monosakkaritler (%)			Disakkaritler (%)		Trisakkaritler (%)	
	Fruktoz	Glukoz	Sakkaroz	Maltoz	Melibiyoz	F+G+S (%)	F/G
Taze AS	5,76 ± 0,07 ^{bc}	4,36 ± 0,00 ^a	4,42 ± 0,02 ^a	0,44 ± 0,01 ^e	0,79 ± 0,00 ^a	14,54 ± 0,10 ^a	1,32 ± 0,02 ^f
3. ay							
-20°C	5,63 ± 0,01 ^{de}	4,27 ± 0,05 ^a	4,22 ± 0,04 ^{bc}	0,46 ± 0,01 ^e	0,77 ± 0,01 ^b	14,12 ± 0,10 ^b	1,32 ± 0,02 ^f
+4°C	5,44 ± 0,03 ^{gh}	4,31 ± 0,16 ^a	4,19 ± 0,02 ^c	0,40 ± 0,00 ^f	0,75 ± 0,00 ^{cd}	13,94 ± 0,21 ^{bc}	1,27 ± 0,04 ^g
Oda sic.	5,43 ± 0,11 ^{gh}	4,27 ± 0,00 ^a	3,45 ± 0,03 ^g	0,36 ± 0,01 ^h	0,73 ± 0,01 ^e	13,15 ± 0,09 ^f	1,27 ± 0,02 ^g
6. ay							
-20°C	5,50 ± 0,05 ^{fg}	3,87 ± 0,06 ^d	4,27 ± 0,07 ^b	0,40 ± 0,02 ^f	0,72 ± 0,00 ^e	13,64 ± 0,18 ^{de}	1,42 ± 0,01 ^{ab}
+4°C	5,39 ± 0,08 ^h	3,61 ± 0,04 ^e	4,17 ± 0,03 ^{cd}	0,39 ± 0,03 ^{fg}	0,72 ± 0,02 ^e	13,18 ± 0,10 ^f	1,49 ± 0,01 ^a
Oda sic.	5,21 ± 0,01 ⁱ	3,90 ± 0,09 ^{cd}	3,26 ± 0,03 ⁱ	0,37 ± 0,00 ^{gh}	0,70 ± 0,00 ^f	12,37 ± 0,12 ^g	1,33 ± 0,03 ^{ef}
9. ay							
-20°C	5,39 ± 0,05 ^h	3,97 ± 0,05 ^{bcd}	4,11 ± 0,04 ^{de}	0,51 ± 0,01 ^e	0,74 ± 0,00 ^d	13,47 ± 0,14 ^e	1,36 ± 0,01 ^{de}
+4°C	5,55 ± 0,01 ^{ef}	4,06 ± 0,07 ^b	3,99 ± 0,04 ^f	0,53 ± 0,00 ^b	0,76 ± 0,00 ^{bc}	13,60 ± 0,02 ^{de}	1,37 ± 0,03 ^d
Oda sic.	5,58 ± 0,03 ^{ef}	3,97 ± 0,02 ^{bcd}	2,33 ± 0,02 ^j	0,48 ± 0,01 ^d	0,65 ± 0,01 ^g	11,88 ± 0,03 ^h	1,41 ± 0,00 ^{bc}
12. ay							
-20°C	5,93 ± 0,06 ^a	4,30 ± 0,01 ^a	4,39 ± 0,03 ^a	0,56 ± 0,02 ^a	0,75 ± 0,00 ^{cd}	14,62 ± 0,05 ^a	1,38 ± 0,01 ^{cd}
+4°C	5,68 ± 0,02 ^{cd}	4,01 ± 0,00 ^{bc}	4,08 ± 0,05 ^e	0,52 ± 0,01 ^{bc}	0,74 ± 0,00 ^d	13,77 ± 0,02 ^{cd}	1,42 ± 0,00 ^{ab}
Oda sic.	5,84 ± 0,02 ^b	4,04 ± 0,01 ^b	2,63 ± 0,04 ⁱ	0,45 ± 0,00 ^e	0,55 ± 0,00 ^h	12,50 ± 0,04 ^g	1,44 ± 0,01 ^b

*Sonuçlar kuru temelde ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir.

**a-j Aynı sütündeki farklı üst simge harfler, istatistiksel farklılıkları ifade eder ($p < 0.05$)

Arı sütünün ana şeker bileşenleri olan glukoz, fruktoz ve sakkarozun toplam oranı, kuru madde üzerinden %11,88 ile %14,62 arasında değişiklik gösterdi. Bu şeker bileşenlerinin en yüksek toplam miktarı, taze arı sütünde ve -20°C'de 12 ay boyunca muhafaza edilen arı sütünde belirlendi. Tüm depolama sıcaklıklarında depolama boyunca glukoz, fruktoz ve sakkarozun toplam oranlarında genel olarak istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş belirlendi ($p<0,05$). -20°C'de muhafaza edilen arı sütünde, başlangıçta %14,54 olan F+G+S oranı, 6. ayda belirgin bir düşüş gösterdi. Ancak 6. aydan 9. aya kadar istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmazken, 12. ayda önemli bir artış kaydedildi. +4°C'de muhafaza edilen örneklerde de benzer bir değişim gözlemlendi; 6. ayda en düşük seviyeye ulaşan şeker oranı, daha sonra artış gösterdi. Buna karşılık, oda sıcaklığında depolanan örneklerde toplam şeker oranları diğer sıcaklıklara göre daha düşük bulundu ve depolamanın başlangıcından itibaren istatistiksel olarak önemli bir düşüş belirlendi ($p<0,05$). Oda sıcaklığında depolanan örneklerde 9. ayda en düşük seviye (%11,88) tespit edildi.

Arı sütü örneklerinde fruktoz miktarının, glukoz ve sakkarozla kıyasla daha yüksek olduğu belirlendi. En yüksek fruktoz oranı, taze arı sütünde %5,76 ve -20°C'de 12 ay boyunca muhafaza edilen arı sütünde %5,93 olarak tespit edildi. Depolamanın ilk 6 ayında fruktoz miktarında bir azalma gözlemlendi, ancak depolama sıcaklıkları arasında 3. ve 6. aylarda fruktoz içeriklerinde önemli bir farklılık oluşmadı ($p>0,05$). En düşük fruktoz içeriği %5,21 ile oda sıcaklığında 6 ay boyunca saklanan arı sütünde kaydedildi. 6. aydan itibaren +4°C ve oda sıcaklığında depolanan örneklerde, 9. aydan itibaren ise -20°C'de muhafaza edilen örneklerde fruktoz miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı ($p<0,05$).

Arı sütü örneklerinde glukoz miktarı %3,61 ile %4,36 arasında değişiklik gösterdi. Depolamanın başlangıcında glukoz oranı %4,36 olarak belirlendi. Depolama sıcaklıkları arasında 3. ayda istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi ($p>0,05$). Ancak, 6. ay sonunda tüm sıcaklıklarda en düşük glukoz seviyesi gözlemlendi. 6. aydan itibaren glukoz içeriğinde artış kaydedilmiş olmakla birlikte 9. ayda sıcaklıklar arasında anlamlı bir fark oluşmadı ($p>0,05$). 12. ay sonunda, +4°C ve oda sıcaklığında glukoz içeriği sırasıyla %4,01 ve %4,04 olarak ölçüldü ve bu değerler arasında istatistiksel bir farklılık bulunamadı ($p>0,05$).

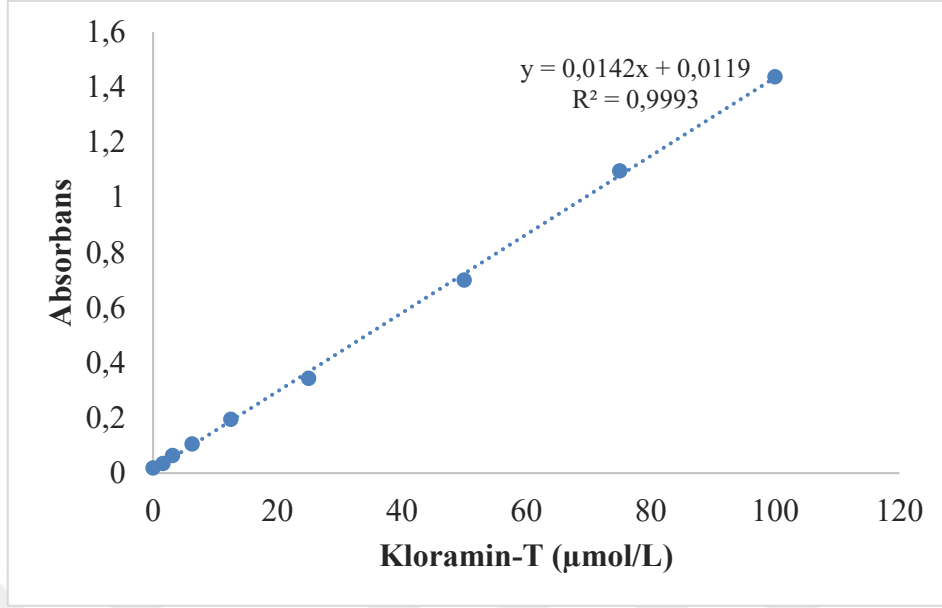
Sakkaroz içeriği açısından, en yüksek değerler taze arı sütünde %4,42 ve -20°C'de 12 ay muhafaza edilen arı sütünde %4,39 olarak belirlendi. -20°C ve +4°C'de muhafaza edilen örneklerin sakkaroz miktarında 6. aya kadar önemli bir farklılık saptanmadı. 6 aydan itibaren

gerçekleşen düşüş ile 9. ay sonunda sakkaroz oranı sırasıyla %4,11 ve %3,99 olarak belirlendi. 12. ayda bu oranlarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0,05$). Oda sıcaklığında depolanan örneklerde ise ilk 3 ayda önemli bir düşüş kaydedildi ve sakkaroz miktarı %3,45 olarak belirlendi. 9. aya kadar istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlenmekle birlikte, 12. ayda %2,33'ten 2,63'e artış olduğu tespit edildi ($p>0,05$).

Maltoz ve melibiyoz oranları, diğer şeker bileşenlerine kıyasla daha düşük bulundu. Maltoz miktarı %0,37 ile %0,56 arasında değişti; en yüksek miktar -20°C 'de 12 ay muhafaza edilen arı sütünde, en düşük miktar ise oda sıcaklığında 3 ve 6 ay depolanan örneklerde belirlendi. İlk 6 ay boyunca -20°C ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki örneklerde maltoz seviyelerinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmedi, ancak oda sıcaklığında depolanan örneklerde belirgin bir azalma meydana geldi ($p<0,05$). 6. aydan itibaren tüm sıcaklıklarda maltoz miktarında artış saptandı. Melibiyoz içeriği en yüksek taze arı sütünde (%0,79), en düşük ise oda sıcaklığında 12 ay boyunca saklanan örneklerde (%0,55) tespit edildi. -20°C ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilen örneklerde melibiyoz içeriği istatistiksel olarak anlamlı fakat yavaş bir azalma göstererek 12. ay sonunda sırasıyla %0,75 ve %0,74'e düştü ($p<0,05$). Oda sıcaklığında ise depolama süresi boyunca önemli bir azalma belirlendi.

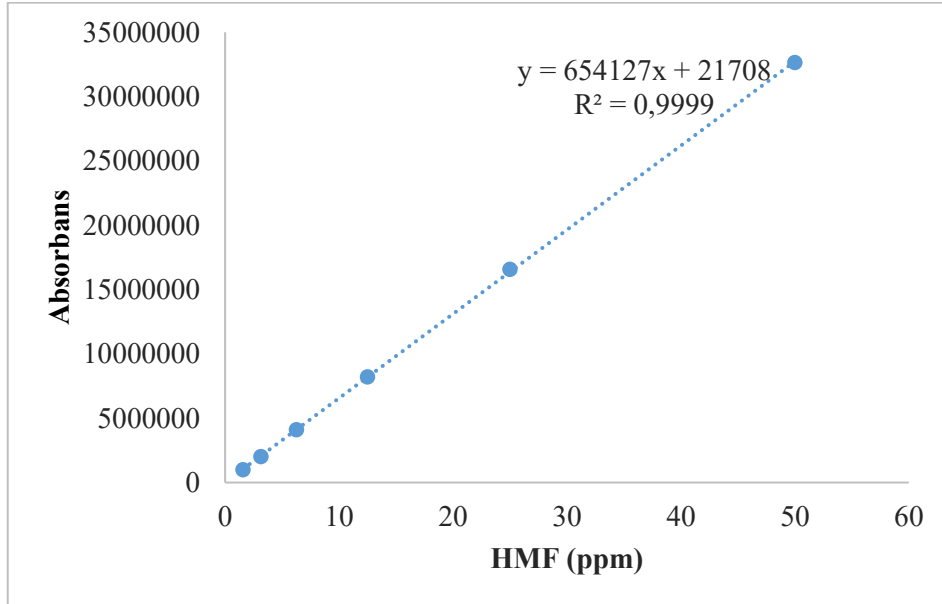
3.8. Arı Sütü Örneklerinin Protein, Lipit ve Şeker Oksidasyon Ölçümleri

Arı sütünde depolama sıcaklık ve sürecine bağlı olarak protein, lipit ve şeker oksidasyon düzeyleri sırasıyla İOPÜ, MDA ve HMF üzerinden değerlendirildi (Tablo 25). Bu amaçla İOPÜ tayini amacıyla kullanılan Kloramin-T ($\mu\text{mol/L}$) standart grafiği Şekil 12'de verildi.



Şekil 12. Kloramin T standart eğrisi (µmol/L)

Örneklerde HMF tayini amacıyla kullanılan standart grafiği Şekil 13'te verildi. HMF standardı için kalitatif olarak belirlenebilen en düşük konsantrasyon (LOD) değeri 0,17 µg/mL ve kantitatif olarak tayin edilebilen en düşük konsantrasyon (LOQ) değeri 0,53 µg/mL olarak belirlendi.



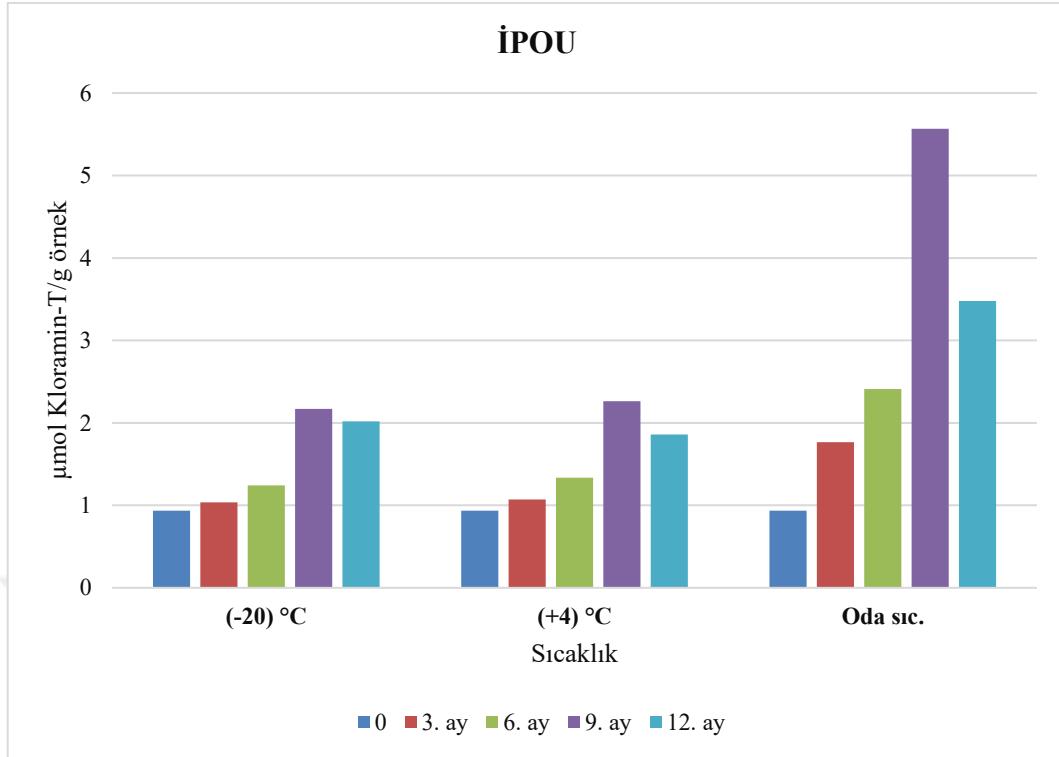
Şekil 13. HMF standart eğrisi (ppm)

Tablo 25. Farklı sıcaklık ve sürelerde depolanan arı sütü örneklerinin oksidasyon ölçümleri

Örnekler	İOPÜ (μmol Kloramin-T/g protein)	MDA (μg MDA/100 g)	HMF (μg HMF/g)
Taze Arı Sütü	$0,93 \pm 0,02^h$	$29,19 \pm 1,42^i$	T.E.
3. ay			
-20°C	$1,04 \pm 0,07^h$	$29,47 \pm 1,38^i$	T.E.
+4°C	$1,07 \pm 0,01^h$	$31,42 \pm 1,77^h$	T.E.
Oda sıc.	$1,77 \pm 0,08^f$	$41,80 \pm 1,63^e$	$1,46 \pm 0,03^e$
6. ay			
-20°C	$1,24 \pm 0,02^g$	$31,20 \pm 0,82^h$	T.E.
+4°C	$1,33 \pm 0,07^g$	$36,25 \pm 1,27^{fg}$	$1,20 \pm 0,02^h$
Oda sıc.	$2,41 \pm 0,15^c$	$64,07 \pm 2,71^b$	$1,59 \pm 0,02^d$
9. ay			
-20°C	$2,17 \pm 0,10^{de}$	$34,95 \pm 1,56^g$	$1,28 \pm 0,01^g$
+4°C	$2,26 \pm 0,07^{cd}$	$50,88 \pm 2,09^e$	$1,25 \pm 0,10^g$
Oda sıc.	$5,57 \pm 0,14^a$	$86,04 \pm 3,65^a$	$2,14 \pm 0,01^b$
12. ay			
-20°C	$2,02 \pm 0,01^e$	$36,90 \pm 1,60^f$	$1,36 \pm 0,01^f$
+4°C	$1,86 \pm 0,17^f$	$42,16 \pm 1,96^e$	$1,68 \pm 0,01^c$
Oda sıc.	$3,48 \pm 0,07^b$	$45,18 \pm 2,15^d$	$5,81 \pm 0,03^a$

*Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir.*a-l Aynı sütündeki farklı üst simge harfler, istatistiksel farklılıkları ifade eder ($p < 0,05$).

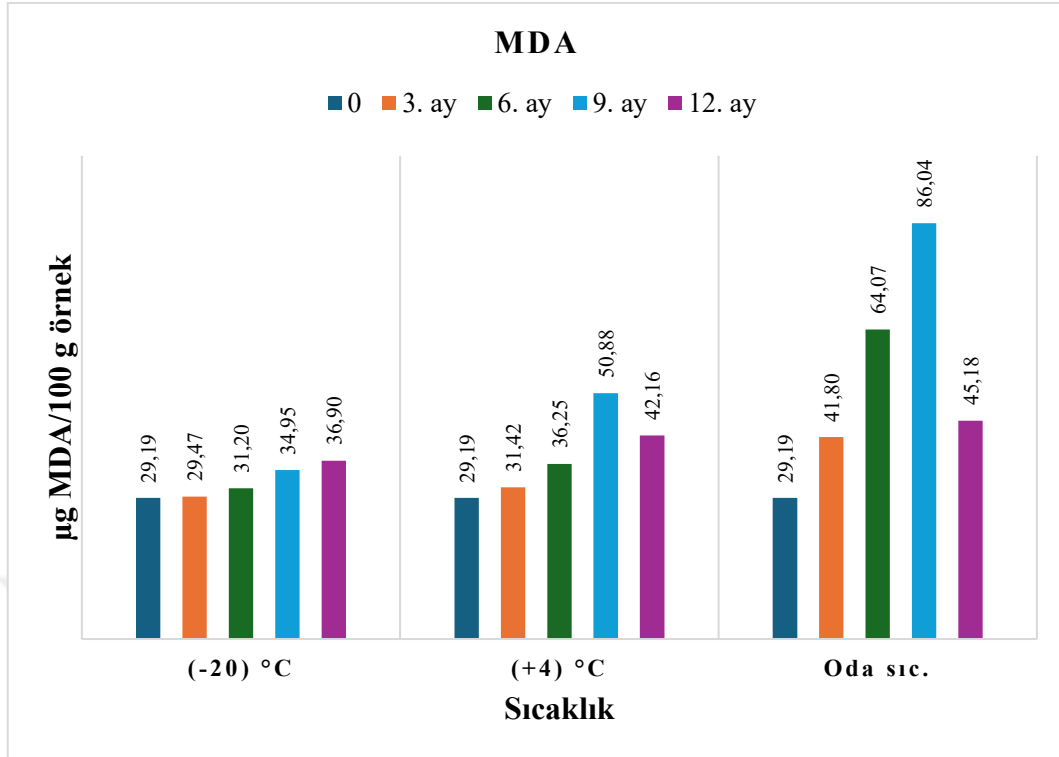
Arı sütündeki proteinlerin oksidasyonu sonucu oluşan İOPÜ konsantrasyonu, sıcaklık ve depolama süresine bağlı olarak 9. aya kadar istatistiksel olarak önemli bir artış, 9. aydan depolama sonuna kadar anlamlı bir azalma gösterdi ($p < 0,05$) (Şekil 14).



Şekil 14. Arı sütlerinin İOPÜ konsantrasyonunun sıcaklık ve zamana bağlı olarak değişimi

Taze arı sütünde başlangıçta oksidasyon miktarı 0,93 μmol Kloramin-T/g protein olarak saptandı. -20°C’de muhafaza süresince oksidasyon düzeyinde yavaş bir artış gözlemlenerek 12 aylık sürenin sonunda oksidasyon miktarı 2,02 nmol Kloramin-T/g protein’e ulaştı. Bu değer diğer sıcaklık koşullarına göre daha düşük seviyelerde kaldı. +4°C’de muhafaza edilen örneklerde oksidasyon miktarı, -20 °C’deki oksidasyon değerlerine yakın seviyeler belirlendi ($p>0,05$). Oda sıcaklığında depolanan arı sütlerinde ise oksidasyon seviyesi diğer koşullara göre önemli ölçüde daha yüksek bulundu. Özellikle 9. ayda en yüksek oksidasyon seviyesi olan 5,57 μmol Kloramin-T/g protein’e yükseldi.

Arı sütünde lipit oksidasyonunun bir göstergesi olan MDA miktarının, sıcaklık ve süreye bağlı olarak değişimi Şekil 15’te gösterildi.

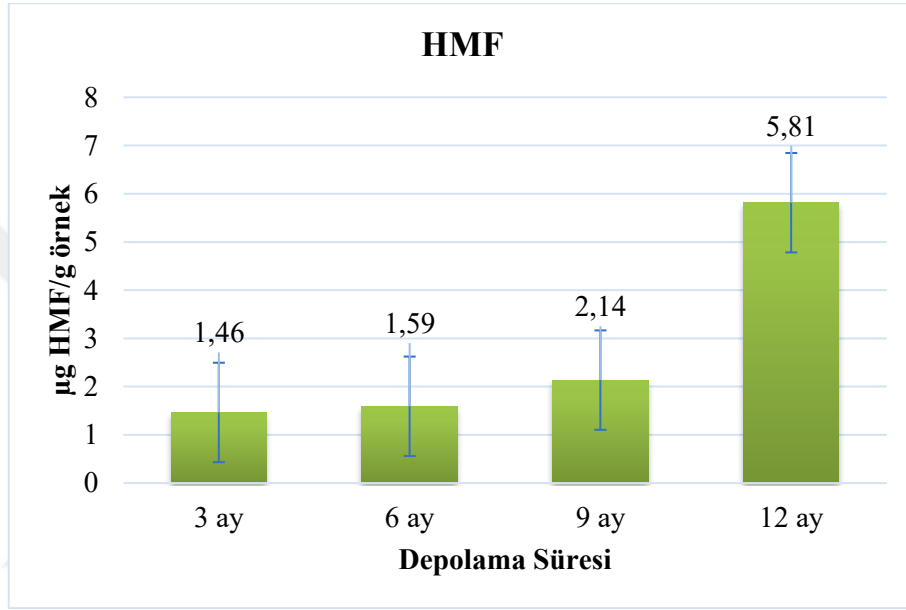


Şekil 15. Arı sütlerinin MDA konsantrasyonunun sıcaklık ve zamana bağlı olarak değişimi

Taze arı sütünde başlangıç MDA seviyesi 29,19 µg/100 g olarak tespit edildi. -20°C’de muhafaza edilen arı sütlerinde, oksidasyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı fakat oldukça yavaş bir artış gösterdiği ve 12 ay sonunda yalnızca 36,90 µg/100 g seviyesine ulaştığı belirlendi ($p<0,05$). Bu sonuç, -20°C’nin, oksidasyonun en yavaş ilerlediği depolama koşulu olduğunu ortaya koydu. +4°C’de muhafaza edilen arı sütlerinde ise MDA miktarlarının, -20°C’deki değerlere kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek olduğu, ancak yakın seviyelerde olduğu görüldü ($p<0,05$). Oda sıcaklığında depolanan örneklerde ise oksidasyon miktarında diğer depolama sıcaklıklarına kıyasla önemli bir artış gözlemlendi. Özellikle 9. ayda MDA seviyesi 86,04 µg/100 g değerine ulaşmış ve bu artış, oda sıcaklığında depolamanın oksidasyonu belirgin şekilde hızlandırdığını gösterdi. Ayrıca, +4°C ve oda sıcaklığında depolanan örneklerde oksidasyon seviyelerinin İOPÜ’ye benzer şekilde 9. aya kadar arttığı, ancak bu süreden sonra MDA değerlerinde düşüş eğilimi başladığı saptandı.

Arı sütünde, depolama başlangıcında HMF tespit edilemedi. -20°C’de muhafaza edilen örneklerde HMF, ilk kez 9. ayda 1,28 µg/g olarak tespit edildi. Bu sıcaklıkta oksidasyon çok yavaş ilerleyerek 12 aylık depolama sonunda yalnızca 1,36 µg/g seviyesine ulaştı. Bu sonuçlar, -20°C’nin oksidasyonun en az düzeyde gerçekleştiği depolama koşulu

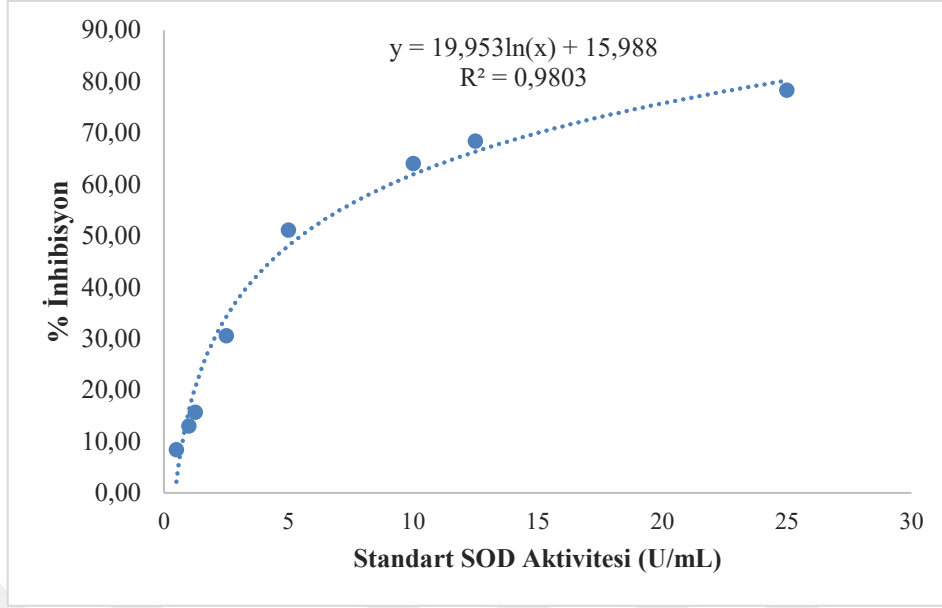
olduğunu göstermektedir. +4°C’de muhafaza edilen örneklerde ise HMF, 6. aydan itibaren tespit edildi ve depolama süresi boyunca istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi ($p<0,05$). Bununla birlikte, -20°C’deki değerlere yakın ve düşük seviyelerde olduğu belirlendi. Oda sıcaklığında depolanan arı sütü örneklerinde ise HMF miktarında diğer sıcaklıklarla karşılaştırıldığında önemli bir artış gözlemlendi, 3. aydan itibaren yükselen HMF seviyesi, 12. ayda 5,81 µg/g olarak belirlendi (Şekil 16).



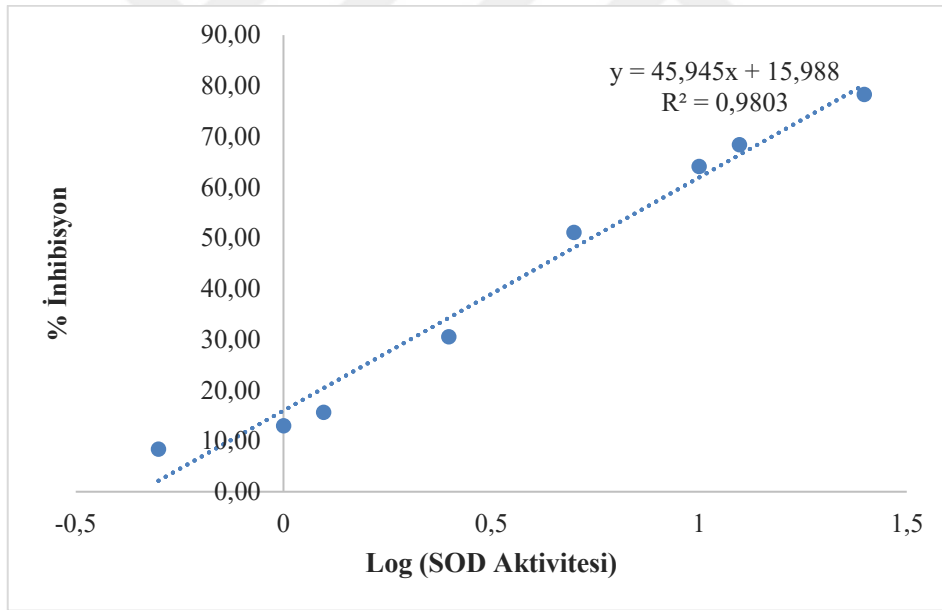
Şekil 16. Oda sıcaklığında depolanan arı sütlerinde depolama süresine bağlı HMF değişimi

3.9. Arı Sütü Örneklerinde Bazı Enzimatik Aktivite Ölçümleri

Arı sütü örneklerinin SOD enzim aktivitesini belirlemek için oluşturulan Şekil 17’de yer alan SOD enzimi standart eğrisi, SOD aktivitesinin logaritması alınarak lineer bir standart eğriye dönüştürüldü (Şekil 18).



Şekil 17. Standart SOD aktivitesi ve % inhibisyon grafiği



Şekil 18. Log (Standart SOD aktivitesi) ve % inhibisyon grafiği

Arı sütü örneklerinde depolama sıcaklığı ve süresinin etkisini değerlendirmek amacıyla incelenen katalaz, süperoksit dismutaz ve glukoz oksidaz enzim aktivite sonuçları Tablo 26'da verildi.

İki farklı analiz yöntemiyle yapılan ölçümlerde katalaz aktivitesi örneklerde tespit edilemedi.

Tablo 26. Farklı sıcaklık ve sürelerde depolanan arı sütü örneklerinin enzimatik aktivite ölçümleri

Örnekler		Katalaz	Süperoksit Dismutaz (U/mg)	Glukoz Oksidaz ($\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g.h}$)
Taze Arı Sütü		T.E.	$36,22 \pm 0,68^a$	$0,44 \pm 0,01^a$
3. ay	-20°C	T.E.	$29,27 \pm 1,34^b$	$0,41 \pm 0,05^{ab}$
	+4°C	T.E.	$25,03 \pm 1,98^c$	$0,39 \pm 0,03^b$
	Oda sıc.	T.E.	$20,06 \pm 1,22^f$	$0,27 \pm 0,01^d$
6. ay	-20°C	T.E.	$23,82 \pm 1,08^{cde}$	$0,38 \pm 0,02^b$
	+4°C	T.E.	$24,78 \pm 1,48^{cd}$	$0,32 \pm 0,00^c$
	Oda sıc.	T.E.	$17,70 \pm 0,61^g$	$0,22 \pm 0,03^e$
9. ay	-20°C	T.E.	$23,04 \pm 0,94^{de}$	$0,25 \pm 0,01^{de}$
	+4°C	T.E.	$20,30 \pm 0,93^f$	$0,24 \pm 0,01^{de}$
	Oda sıc.	T.E.	$16,60 \pm 0,62^g$	$0,16 \pm 0,01^f$
12. ay	-20°C	T.E.	$22,08 \pm 0,20^e$	$0,18 \pm 0,03^f$
	+4°C	T.E.	$16,91 \pm 0,78^g$	$0,15 \pm 0,00^f$
	Oda sıc.	T.E.	$14,31 \pm 0,54^h$	$0,11 \pm 0,01^g$

*Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir.

*a-h Aynı sütündeki farklı üst simge harfler, istatistiksel farklılıkları ifade eder ($p < 0,05$).

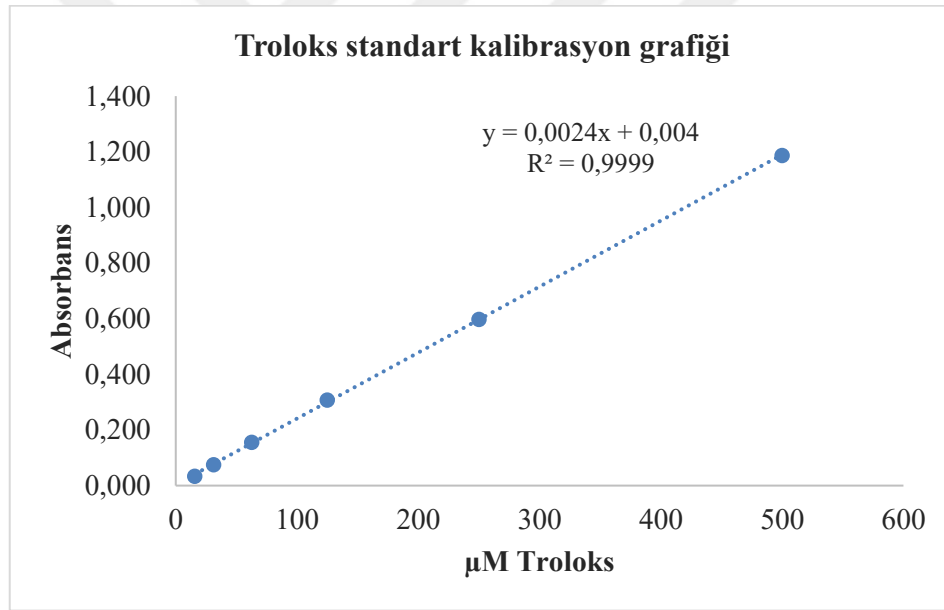
Güçlü bir antioksidan enzim olan SOD, en yüksek aktivitesini taze arı sütünde 36,22 U/mg olarak gösterdi. Buna karşılık, en düşük aktivite değeri, oda sıcaklığında 12 ay boyunca saklanan arı sütü örneklerinde ölçüldü. Tüm depolama koşullarında, enzim aktivitesinde depolamanın başlangıcından itibaren anlamlı bir azalma meydana geldi ($p < 0,05$). -20°C’de muhafaza edilen örneklerde enzim aktivitesi 22,08 U/mg olarak tespit edilirken, +4°C’de depolanan örneklerde bu değer 16,91 U/mg’e kadar düştü. Oda sıcaklığında depolanan arı sütü örneklerinin enzim aktivite düzeyleri diğer depolama sıcaklıklarına kıyasla daha düşük düzeyde seyretti. Özellikle ilk 3 ayda belirgin bir azalma gözlemlenmiş, aktivite 20,06 U/mg’a kadar düştü. Depolamanın 12. ayında ise enzim aktivitesi 14,31 U/mg olarak belirlendi.

Glukoz oksidaz enzimi aktiviteleri incelendiğinde, en yüksek aktivitenin taze arı sütünde 0,44 $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g.h}$ olarak ölçüldüğü tespit edildi. Bu değeri, 0,41 $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g.h}$ ile -20°C’de 3 ay boyunca muhafaza edilen arı sütü örnekleri takip etti. -20°C ve +4°C’de muhafaza edilen örneklerde, 6. aya kadar enzim aktivitesinde daha yavaş bir düşüş gözlemlendi. Ancak, 6. aydan itibaren düşüş hızı artarak 12. ay sonunda enzim aktivite

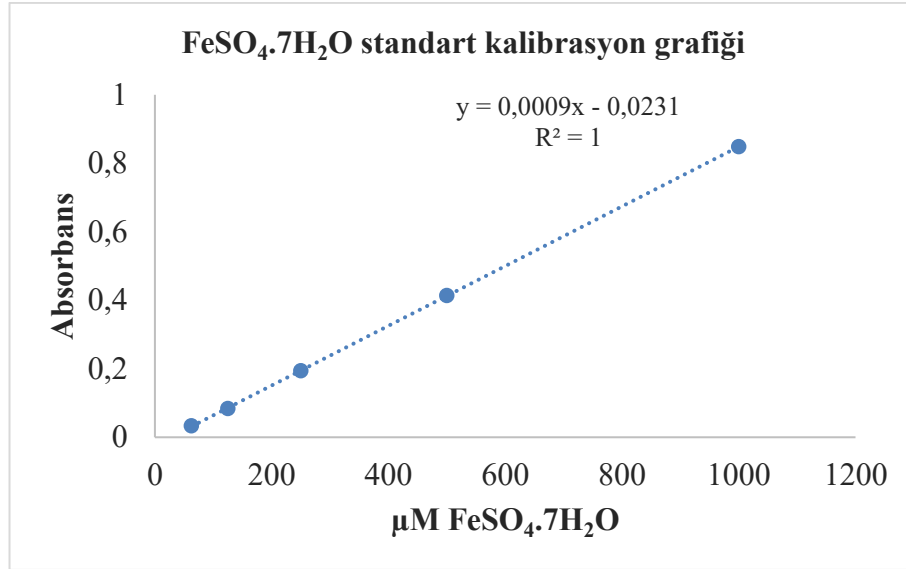
değerleri sırasıyla 0,18 $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g.h}$ ve 0,15 $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g.h}$ olarak kaydedildi. Oda sıcaklığında depolanan arı sütü örneklerinde ise enzim aktivitesinde daha hızlı bir azalma gerçekleşti. İlk 3 ayın sonunda aktivite değeri 0,27 $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g.h}$ seviyesine düştü; 12. ay sonunda ise bu değer 2 kattan fazla azalarak 0,11 $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g.h}$ olarak tespit edildi. Bu bulgular, depolama sıcaklığı ve süresinin enzimatik aktivite üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Özellikle düşük sıcaklıklar, enzimlerin stabilitesini büyük ölçüde korurken, oda sıcaklığında depolama hızlı bir aktivite kaybına yol açmaktadır.

3.10. Arı Sütü Örneklerinin Antioksidan Özellikleri

Arı sütü örneklerinin FRAP yöntemiyle belirlenen antioksidan aktivite değerleri, Troloks ve $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ olmak üzere iki farklı standart kullanılarak ölçüldü (Şekil 19 ve 20).



Şekil 19. FRAP tayininde kullanılan Troloks kalibrasyon grafiği



Şekil 20. FRAP tayininde kullanılan FeSO₄.7H₂O kalibrasyon grafiği

Arı sütü örneklerinin antioksidan özellikleri, FRAP testi, DPPH ve ABTS radikali temizleme aktivite testleri olmak üzere farklı analizler ile değerlendirildi; elde edilen sonuçlar Tablo 27 ve 28’de sunuldu.

Tablo 27. Farklı sıcaklık ve sürelerde depolanan arı sütü örneklerinin antioksidan aktivite ölçümleri

Örnekler		FRAP (μ mol Troloks/100 g)	FRAP (μ mol FeSO ₄ .7H ₂ O/ 100 g)
Taze Arı Sütü		32,64 $\pm$ 0,19 ^a	114,97 $\pm$ 0,52 ^a
3. ay	-20°C	23,39 $\pm$ 0,33 ^f	85,31 $\pm$ 1,43 ^{de}
	+4°C	27,56 $\pm$ 0,00 ^{bc}	100,41 $\pm$ 0,12 ^b
	Oda sic.	21,12 $\pm$ 0,18 ^g	82,42 $\pm$ 0,48 ^{ef}
6. ay	-20°C	24,64 $\pm$ 0,16 ^{ef}	88,57 $\pm$ 1,09 ^{cd}
	+4°C	26,60 $\pm$ 0,56 ^{bcd}	94,96 $\pm$ 0,92 ^c
	Oda sic.	19,07 $\pm$ 0,20 ^h	78,60 $\pm$ 0,21 ^f
9. ay	-20°C	20,41 $\pm$ 0,00 ^{gh}	79,85 $\pm$ 0,54 ^f
	+4°C	27,99 $\pm$ 0,44 ^b	98,29 $\pm$ 2,17 ^{bc}
	Oda sic.	25,04 $\pm$ 0,20 ^{def}	94,38 $\pm$ 1,31 ^c

Tablo 27'nin devamı

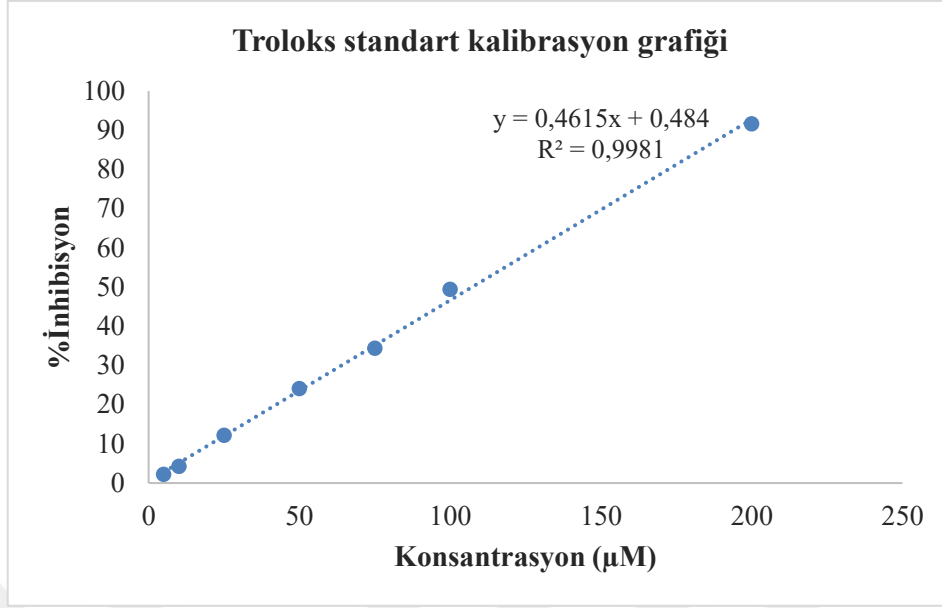
12. ay	-20°C	25,95 ± 0,17 ^{cde}	93,72 ± 0,45 ^c
	+4°C	28,44 ± 0,42 ^b	100,22 ± 1,12 ^b
	Oda sıc.	26,77 ± 0,35 ^{bcd}	96,82 ± 0,94 ^{bc}

*Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir.

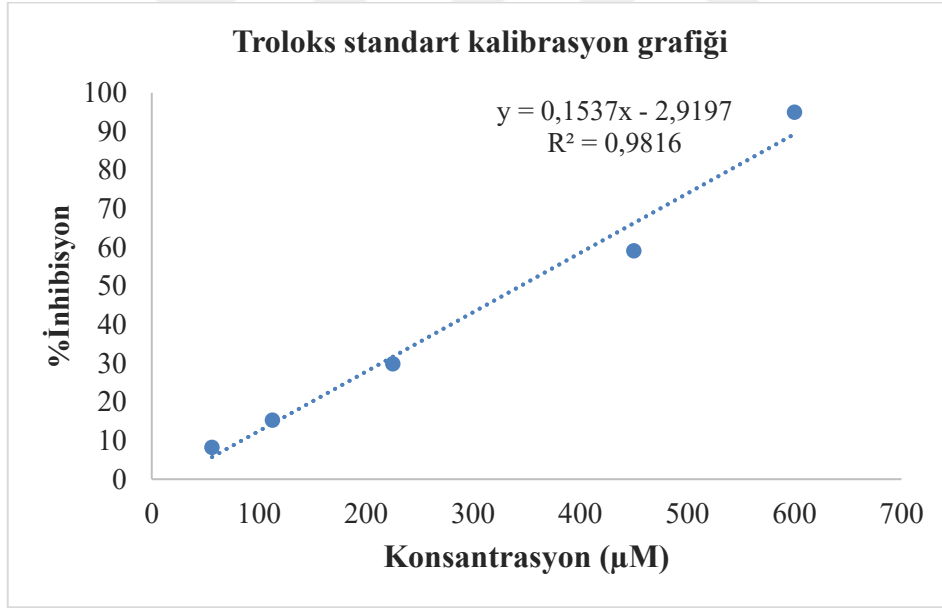
**a-j Aynı sütundaki farklı üst simge harfler, istatistiksel farklılıkları ifade eder ($p < 0,05$).

Troloks standardına göre antioksidan kapasite 19,07 ile 32,64 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ arasında değişirken, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ standardına göre bu değerler 78,60 ile 114,97 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ arasında değişim gösterdi. En yüksek antioksidan aktivite taze arı sütünde ölçülürken, en düşük değerler oda sıcaklığında 6 ay boyunca depolanan örneklerde tespit edildi. -20°C'de muhafaza edilen arı sütü örneklerinde, 9. ayda antioksidan aktivitesinde anlamlı bir azalma kaydedildi; ancak 12. ayda 25,95 μmol Troloks/100 g ve 93,72 μmol $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/100\text{ g}$ olarak ölçülen aktivite değerleriyle anlamlı bir artış gözlemlendi. +4°C'de depolanan örneklerde ise depolama süresi boyunca anlamlı bir değişiklik meydana gelmedi ($p > 0,05$). Buna karşın, oda sıcaklığında depolanan örneklerde antioksidan aktivite, özellikle 3. ayda önemli bir düşüş gösterdi. 6. ay sonunda ise en düşük değerler 19,07 μmol Troloks/100 g ve 78,60 μmol $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/100\text{ g}$ olarak kaydedildi.

Arı sütü örneklerinin DPPH ve ABTS radikallerini indirgeme aktiviteleri, Troloks eşdeğeri ve SC50 değerleri ile değerlendirildi. Bu amaçla kullanılan Troloks standardı kalibrasyon eğrileri Şekil 21 ve 22'de verildi. Her iki yöntemde de en yüksek indirgeme aktivitesi taze arı sütünde belirlendi. Diğer örneklerde ise depolama koşullarına bağlı olarak farklı oranlarda azalma veya artışlar tespit edildi.



Şekil 21. DPPH• radikali süpürme aktivitesi tayininde kullanılan Troloks kalibrasyon grafiği



Şekil 22. ABTS•+ radikali süpürme aktivitesi tayininde kullanılan Troloks kalibrasyon grafiği

Tablo 28. Arı sütü örneklerinin DPPH ve ABTS radikal temizleme aktivitesi ölçümleri

Örnekler	DPPH (μmol Troloks /100 g)	DPPH SC ₅₀ (mg/mL)	ABTS (μmol Troloks /100 g)	ABTS SC ₅₀ (mg/mL)
Taze Arı Sütü	69,65 $\pm$ 1,03 ^a	19,44 $\pm$ 0,23 ^j	318,58 $\pm$ 1,60 ^b	7,53 $\pm$ 0,13 ^j
3. ay				
-20°C	67,64 $\pm$ 1,27 ^{abc}	27,28 $\pm$ 1,13 ⁱ	310,15 $\pm$ 3,45 ^{bc}	8,63 $\pm$ 0,64 ⁱ
+4°C	65,94 $\pm$ 1,35 ^c	25,55 $\pm$ 0,09 ⁱ	300,74 $\pm$ 3,83 ^c	8,85 $\pm$ 0,09 ⁱ
Oda sıc.	59,36 $\pm$ 0,40 ^{ef}	30,57 $\pm$ 0,32 ^h	278,12 $\pm$ 1,13 ^d	11,54 $\pm$ 0,43 ^g
6. ay				
-20°C	61,77 $\pm$ 0,77 ^{de}	48,00 $\pm$ 1,58 ^g	339,04 $\pm$ 4,76 ^a	9,45 $\pm$ 0,21 ⁱ
+4°C	68,51 $\pm$ 0,26 ^{abc}	54,25 $\pm$ 0,33 ^b	337,77 $\pm$ 4,63 ^a	11,48 $\pm$ 0,02 ^g
Oda sıc.	54,96 $\pm$ 0,52 ^{gh}	59,06 $\pm$ 0,93 ^a	273,25 $\pm$ 4,45 ^d	15,12 $\pm$ 0,25 ^d
9. ay				
-20°C	69,11 $\pm$ 0,55 ^{ab}	52,45 $\pm$ 1,04 ^c	332,46 $\pm$ 4,06 ^a	10,46 $\pm$ 0,09 ^h
+4°C	69,73 $\pm$ 0,26 ^a	50,98 $\pm$ 0,12 ^{de}	255,09 $\pm$ 1,46 ^c	12,38 $\pm$ 0,41 ^f
Oda sıc.	57,62 $\pm$ 0,51 ^{fg}	48,06 $\pm$ 0,98 ^g	233,35 $\pm$ 0,99 ^f	14,55 $\pm$ 0,28 ^e
12. ay				
-20°C	66,60 $\pm$ 0,26 ^{bc}	49,01 $\pm$ 0,08 ^{fg}	280,32 $\pm$ 4,97 ^d	16,62 $\pm$ 0,16 ^c
+4°C	62,41 $\pm$ 1,48 ^d	49,84 $\pm$ 0,72 ^{ef}	277,51 $\pm$ 3,02 ^d	17,13 $\pm$ 0,21 ^b
Oda sıc.	54,70 $\pm$ 1,22 ^h	52,09 $\pm$ 0,14 ^{cd}	270,83 $\pm$ 2,54 ^d	20,52 $\pm$ 0,31 ^a

*Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir.

*a-j Aynı sütundaki farklı üst simge harfler, istatistiksel farklılıkları ifade eder ($p < 0,05$).

DPPH yöntemiyle yapılan ölçümlerde, taze arı sütü 69,65 μmol Troloks/100 g düzeyinde antioksidan aktivite sergiledi. -20°C ve +4°C’de muhafaza edilen örneklerde, özellikle depolamanın son üç ayında anlamlı azalmalar görüldü; 12 aylık süreç sonunda bu değerler sırasıyla 66,60 ve 62,41 μmol Troloks/100 g olarak ölçüldü. +4°C’de muhafaza edilen örneklerdeki azalma, -20°C’dekilere kıyasla daha yüksek oranda bulundu. Oda sıcaklığında muhafaza edilen arı sütü örneklerinde ise antioksidan aktivitesinde ilk üç ayda önemli bir düşüş kaydedildi ve 12. ayın sonunda değer 54,70 μmol Troloks/100 g olarak tespit edildi.

DPPH yöntemi ile hesaplanan SC50 değeri, taze arı sütü için 19,44 mg/mL olarak belirlendi. Antioksidan etkinliğin bir göstergesi olan SC50 değerinin düşük olması, etkinliğin yüksek olduğunu ifade etmektedir. Bu bağlamda, taze arı sütünün düşük SC50 değeri, yüksek antioksidan kapasitesini gösterdi. Depolama süresince tüm sıcaklıklarda SC50 değerlerinde anlamlı artışlar, dolayısıyla antioksidan kapasitede azalma, tespit edildi.

12 ay sonunda, -20°C, +4°C ve oda sıcaklığında depolanan örneklerin SC50 değerleri sırasıyla 49,01, 49,84 ve 52,09 mg/mL olarak ölçüldü.

ABTS yöntemiyle yapılan analizlerde, taze arı sütü 318,58 µmol Troloks/100 g düzeyinde antioksidan aktivite sergiledi. -20°C'de muhafaza edilen örneklerde, özellikle son 3 ayda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi ($p<0,05$). +4°C'de muhafaza edilen örneklerde ise depolama boyunca dalgalanmalar gözlemlendi ve 6. aydan itibaren istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş meydana geldi ($p<0,05$). Oda sıcaklığında depolanan örneklerde, ilk üç ayda anlamlı bir düşüş, 9. aydan sonra ise hafif bir artış gözlemlendi. Depolamanın sonunda, -20°C, +4°C ve oda sıcaklığında depolanan örneklerin aktivite değerleri sırasıyla 280,32, 277,51 ve 270,83 µmol Troloks/g olarak belirlendi; bu değerler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

ABTS yöntemiyle elde edilen SC50 değerlerinde de depolama süresince önemli değişimler gözlemlendi. Taze arı sütünde SC50 değeri 7,53 mg/mL olarak ölçülürken, oda sıcaklığında 12 ay boyunca depolanan örneklerde bu değer 20,52 mg/mL'ye yükseldi. -20°C'de muhafaza edilen örneklerde, ilk 9 ay boyunca yavaş bir azalma gözlemlendi; ancak bu sürecin ardından azalma hızlanarak 16,62 mg/mL seviyesine ulaştı. +4°C'de saklanan örneklerde ise özellikle 6. ve 12. aylarda anlamlı bir azalma görüldü ($p<0,05$). -20°C ve +4°C'de muhafaza edilen örneklerin SC50 değerleri istatistiksel olarak birbirine yakın bulunurken, oda sıcaklığında depolanan örneklerde daha hızlı bir artış gözlemlendi ve bu artış antioksidan kapasitede önemli bir azalmaya neden oldu.

3.11. Bulguların Korelasyon ve PSL (Partial Least Squares/Kısmi En Küçük Kareler) Regresyonu Analizi

Bu tez çalışmasında analiz edilen arı sütü örneklerine ait bulguların birbirleri ile korelasyonları Tablo 29'da verildi.

DPPH ve ABTS antioksidan aktivite değerleri arasında anlamlı bir korelasyon gözlemlenmişken ($r=0,964$, $p\leq 0,05$), FRAP antioksidan aktivite değerleri ile aralarında korelasyon tespit edilemedi ($p>0,05$). Ayrıca DPPH ve ABTS antioksidan aktivite parametreleri, SOD ve GOx enzim aktiviteleriyle güçlü korelasyon gösterdi.

Oksidasyon ürünlerinden İOPÜ ve MDA miktarları arasında güçlü bir korelasyon olduğu belirlendi ($r=0,889$, $p\leq 0,01$). Bununla birlikte, İOPÜ ile HMF değerleri arasında

zayıf pozitif bir korelasyon tespit edildi, ancak bu ilişki anlamlılık düzeyine ulaşmadı ($r=0,431$, $p>0,05$).

İOPÜ ve HMF miktarlarının ABTS değerleriyle korelasyon sergilediği tespit edildi. Tüm oksidasyon ürünleri ile SOD ve GOx enzimleri arasında ise kuvvetli negatif korelasyonlar bulundu.

Arı sütü örneklerinde fizikokimyasal ve biyokimyasal parametreler arasında anlamlı korelasyonlar tespit edildi. DPPH, ABTS ve enzim aktiviteleri (SOD, GOx) arasındaki güçlü ilişkiler, arı sütü bileşenlerinin birbirleriyle etkileşimleri hakkında önemli bilgiler sunmaktadır.

Tablo 29. Arı sütü örneklerine ait bazı bulguların korelasyonu

		FRAP	DPPH	ABTS	İOPÜ	MDA	HMF	SOD	GOx
FRAP	<i>r</i>		-0,360	-0,063	0,011	-0,254	0,226	0,379	0,193
	<i>p</i>		0,228	0,838	0,971	0,403	0,558	0,202	0,528
DPPH	<i>r</i>	-0,360		0,640*	-0,198	0,452	0,099	-0,706**	-0,699**
	<i>p</i>	0,228		0,018	0,517	0,121	0,799	0,007	0,008
ABTS	<i>r</i>	-,063	,640*		-,610*	,468	,750*	-,823**	-,933**
	<i>p</i>	,838	,018		,027	,107	,020	,001	,000
İOPÜ	<i>r</i>	0,011	-0,198	-0,610*		-,784**	-,259	,646*	,681*
	<i>p</i>	0,971	0,517	0,027		,002	,501	,017	,010
MDA	<i>r</i>	-0,254	0,452	0,468	-0,784**		0,087	-0,634*	-0,607*
	<i>p</i>	0,403	0,121	0,107	0,002		0,823	0,020	0,028
HMF	<i>r</i>	0,226	0,099	0,750*	-0,259	0,087		-0,697*	-0,674*
	<i>p</i>	0,558	0,799	0,020	0,501	0,823		0,037	0,047
SOD	<i>r</i>	0,379	-0,706**	-0,823**	0,646*	-0,634*	-0,697*	1	0,889**
	<i>p</i>	0,202	0,007	0,001	0,017	0,020	0,037		,000
GOx	<i>r</i>	0,193	-0,699**	-0,933**	0,681*	-0,607*	-0,674*	0,889**	
	<i>p</i>	0,528	0,008	0,000	0,010	0,028	0,047	0,000	

r: Pearson korelasyon katsayısı; *p*: Anlamlılık

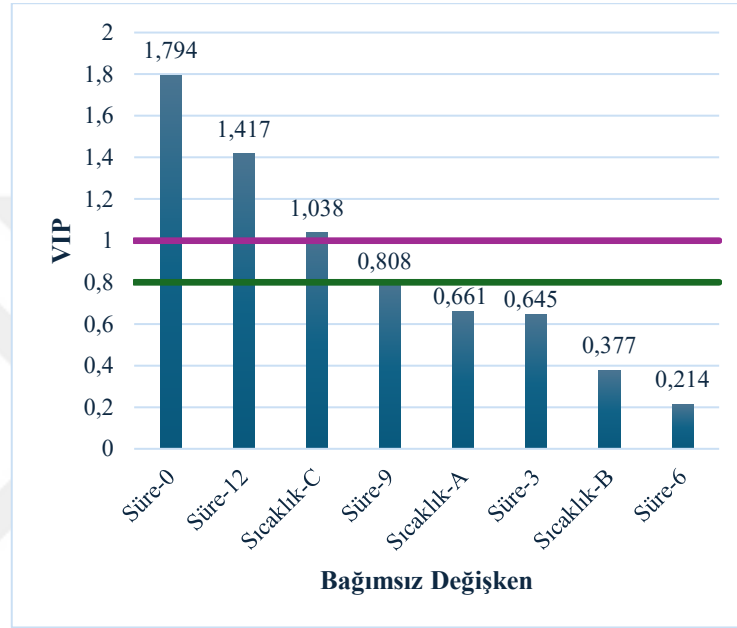
*: Korelasyon 0,05 düzeyinde anlamlıdır.

**: Korelasyon 0,01 düzeyinde anlamlıdır.

Depolama sıcaklığı ve sürelerinin ölçülen parametreler (FRAP, DPPH, ABTS, İOPÜ, MDA, HMF, SOD ve GOx) üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla yapılan PLS

regresyonu analizinde elde edilen VIP (Variable Importance in the Projection/Projeksiyonda Değişken Önemi) değerlerinin yer aldığı grafik Şekil 23'te verildi.

VIP değerleri, bağımsız değişkenlerin (Sıcaklık-A: -20°C, Sıcaklık-B: +4°C, Sıcaklık-C: Oda sıcaklığı, Süre-0: Taze arı sütü, Süre-3: 3. Ay, Süre-6: 6. Ay, Süre-9: 9. Ay, Süre-12: 12. Ay) bağımlı değişkenler üzerindeki etkisini belirlemede önemini değerlendiren önemli bir ölçüttür.



Şekil 23. VIP değerleri grafiği

VIP değeri 1'in üzerinde olan değişkenler, analizin açıklayıcılığına anlamlı bir katkı sağlarken, 1'in altındaki değişkenler daha düşük bir öneme sahiptir. Süre-0 (1,794) ve Süre-12 (1,417) en yüksek VIP değerlerine sahip olup kritik rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra Sıcaklık-C (1,038) değişkeni de anlamlı bir katkı sağlamaktadır. Ancak, Sıcaklık-B (0,377) ve Süre-6 (0,214) gibi VIP değeri düşük olan değişkenler, sınırlı katkıda bulunmaktadır.

Model parametreleri tablosu, bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenler üzerindeki etkisini ve bu etkinin yönünü göstermektedir. Tablo 31'de yer alan her bir bağımsız değişken için belirlenen katsayılar, bağımlı değişkenler üzerinde pozitif veya negatif etkileri ortaya koymaktadır.

Tablo 30. PSLR analizinde model parametreleri tablosu

Değişken	FRAP	DPPH	ABTS	İOPÜ	MDA	HMF	SOD	GOx
Intercept	26,327	40,364	11,955	103,349	41,193	1,185	24,171	0,293
Sıcaklık-A	0,899	-4,999	-1,542	-18,837	-4,554	-0,513	2,856	0,047
Sıcaklık-B	0,512	-2,846	-0,878	-10,725	-2,593	-0,292	1,626	0,027
Sıcaklık-C	-1,411	7,846	2,420	29,562	7,147	0,805	-4,482	-0,073
Süre-0	2,876	-15,987	-4,932	-60,238	-14,562	-1,641	9,134	0,149
Süre-3	1,034	-5,746	-1,773	-21,651	-5,234	-0,590	3,283	0,054
Süre-6	-0,343	1,906	0,588	7,183	1,737	0,196	-1,089	-0,018
Süre-9	-1,295	7,199	2,221	27,126	6,558	0,739	-4,113	-0,067
Süre-12	-2,271	12,627	3,895	47,579	11,502	1,296	-7,214	-0,118

Depolama sıcaklık ve süreleri arasında en belirgin ve yüksek etkiye sahip değişkenlerin Süre-0, Süre-12 ve Sıcaklık-C olduğu belirlendi. Bu değişkenler, hem bağımlı değişkenlerin katkı düzeylerini değerlendirmede hem de çalışmanın verimliliğini artırmada kritik öneme sahiptir. Buna karşın, Sıcaklık-A, Sıcaklık-B ve Süre-6, genellikle düşük katsayılara sahip olup, bağımlı değişkenler üzerinde etkilerinin sınırlı olduğu saptandı.

Süre-0 genellikle negatif katsayılara sahip olup, değişkenlerin seviyelerini düşürme eğiliminde olduğu belirlendi. Özellikle DPPH (-15,987), ABTS (-4,932) ve İOPÜ (-60,238) bağımlı değişkenleri üzerinde en güçlü negatif etkilere sahip olduğu saptandı. Aynı zamanda MDA (-14,562) üzerinde de anlamlı negatif etkiler görüldü.

Sıcaklık-C, genellikle pozitif etkilerle öne çıkmakta olup bağımlı değişkenlerin düzeylerini artırma eğiliminde olduğu saptandı. İOPÜ (29,562), DPPH (7,846) ve MDA (7,147) üzerinde güçlü bir etki gösterdi.

Süre-12, HMF ve GOx enzim aktivitesi dışında tüm parametreler üzerinde güçlü etki gösterdiği belirlendi. Bazı bağımlı değişkenler üzerinde pozitif bir etki (İOPÜ (47,579) ve MDA (11,502)) sağlarken, diğerlerinde negatif etkiler (FRAP (-2,271) ve SOD (-7,214)) gösterdi.

4. TARTIŞMA

4.1. Arı Sütü Örneklerinin Nem ve Kuru Madde İçeriği

Gıdalardaki nem değeri, ürünün içindeki su miktarını ifade eden önemli bir parametre olup, ürünün duyusal özelliklerini (lezzet, doku, tazelik) ve raf ömrünü belirlemektedir. Yüksek nem içeriği, mikroorganizmaların gelişimi ve ürünün bozulma riskini artırırken, düşük nem oranı ürünün kurumasına ve lezzet kaybına neden olabilmektedir. Gıdalardaki nem değeri gıda güvenliği ile kalite kontrolü açısından kritik bir rol oynamaktadır (Ogwu & Ogunsola, 2024).

Taze arı sütünün nem içeriği, ürünün kalitesini belirleyen önemli kriterlerden biridir. Arı sütünün su içeriğini ölçmek için literatürde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında dondurarak kurutma yöntemi (Messia vd., 2005), refraktometrik analiz (Sesta & Lusco, 2008), Karl Fischer titrasyonu (Teresa vd. 2009) ve vakumlu fırın kurutma yöntemi (Garcia-Amoedo & Almeida Muradian, 2007) yer almaktadır. Bu tez çalışmasında örneklerin nem içeriklerini belirlemek amacıyla vakumlu etüvde kurutma yöntemi ve refraktometrik ölçüm yöntemleri kullanıldı.

Arı sütü, %60-70 arasında değişiklik gösteren bir nem içeriğine sahiptir (Maghsoudlou vd., 2019). Uluslararası standartlarda, taze arı sütünde nem içeriği %62,0-%68,5 olarak belirlenmiştir (ISO 12824:2016). Bu çalışmada, taze arı sütü örneklerinin nem içeriği vakumlu etüvde kurutma yöntemiyle %62,70 olarak tespit edildi ve standart değerlere uygun olduğu değerlendirildi. Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilen arı sütlerinin kimyasal özellikleri ve antioksidan aktiviteleri üzerinde yapılan bir çalışmada, arı sütlerinin nem içeriğinin %61,6 ile %73,0 arasında değiştiği belirlenmiştir (Kolaylı vd., 2016). Farklı bir çalışmada, 27 farklı arı sütü örneğinin nem içerikleri vakumlu etüvde kurutma (24 saat, 48°C) yöntemi ve refraktometrik ölçümle belirlenmiş; nem içeriklerinin sırasıyla %53,8-66,6 ve %53,6-66,0 arasında değiştiği rapor edilmiştir. Ayrıca, her iki yöntemin elde ettiği nem içeriklerinin birbirleriyle uyumlu olduğu ve aralarında anlamlı bir korelasyon bulunduğu vurgulanmıştır (Sesta & Lusco, 2008). Literatürdeki diğer bulgularla karşılaştırıldığında, bu çalışmada elde edilen değer, arı sütlerinin nem içeriği aralığıyla tutarlılık göstermektedir.

Literatürde, arı sütü nem içeriğinin depolama koşulları ve süresine bağlı değişimi üzerine sınırlı sayıda çalışma olduğu tespit edildi. Bu çalışmada, -20°C 'de muhafaza edilen arı sütlerinin nem içeriklerinde depolama süresi boyunca istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olmadığı ve 12 aylık süre sonunda nem içeriğinin %62,30 olarak ölçüldüğü belirlendi. Buna karşın, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de yapılan depolamada, özellikle 6. aydan itibaren nem oranında kısmi bir düşüş yaşandığı gözlemlendi. Oda sıcaklığında depolanan arı sütlerinde ise, depolamanın 3. ayından itibaren nem miktarının belirgin bir şekilde azalmaya başladığı; depolama sürecinin sonunda, nem oranının %57,83'e kadar düştüğü tespit edildi. Arı sütlerinin kapalı ortamda muhafaza edilmesi ve buharlaşmanın gerçekleşmemesi nedeniyle, oda sıcaklığında depolanan örneklerde gözlemlenen nem içeriğindeki azalmanın, bağıl suyun serbest hale geçmesinden kaynaklanabileceği değerlendirilmektedir. Bağıl su, proteinler, karbonhidratlar ve diğer makromoleküller ile etkileşim halinde bulunan su fraksiyonudur. Depolama sürecinde meydana gelen protein denatürasyonu, enzimatik reaksiyonlar ve makromoleküler yapıdaki değişimler, bağıl suyun tutulma kapasitesinin azalmasına neden olabilmektedir. Bu durum, başlangıçta gıda matrisi içerisinde stabil halde bulunan bağıl suyun serbest hale geçmesine, dolayısıyla sistemden uzaklaşmasına veya matriks içinde yeniden dağılmasına yol açabilmektedir.

Pavel vd. (2011), oda sıcaklığında veya 5°C 'de buzdolabında muhafaza edilen arı sütünün depolama süresi boyunca nem içeriğinde bir azalma meydana geldiğini ve bunun sonucunda arı sütünün viskoz bir yapıya dönüştüğünü bildirmiştir. Çalışma bulguları, literatürle uyumluluk göstermekte ve düşük sıcaklık koşullarında gerçekleştirilen depolamanın, arı sütü nem içeriğinin uzun süreli korunmasında etkili olduğunu; buna karşın oda sıcaklığındaki depolamanın, nem kaybını hızlandırdığını belirledi.

Tez çalışmasında elde edilen bulgular, özellikle oda sıcaklığında depolanan arı sütü örneklerinin toplam kuru madde ve suda çözünür kuru madde içeriklerinde 3. aydan itibaren belirgin bir artış olduğunu gösterdi. Benzer şekilde, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilen örneklerde de 6. ayda istatistiksel olarak anlamlı bir artış kaydedildi ($p<0,05$). Literatürde yer alan çalışmalarda özellikle oda sıcaklığı ve buzdolabı koşullarında artan viskozitenin, suda çözünmeyen azotlu bileşiklerin artışı ile bağlantılı olduğu; buna karşılık çözünür azot ve serbest amino asit miktarlarında düşüş yaşandığı bildirilmiştir. Ramadan & Al-Ghamdi (2012) ve Pavel vd. (2013), bu değişimlerin devam eden enzimatik aktiviteler ve lipit ile protein fraksiyonları arasındaki etkileşimlerden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Bu nedenle,

çalışmada gözlemlenen değişimlerin, literatürde belirtilen mekanizmalarla açıklanabileceği düşünülmektedir.

4.2. Arı Sütü Örneklerinin Fizikokimyasal Özellikleri

Arı sütünün bileşimi, kalite değerlendirmesi açısından kritik bir öneme sahiptir. Arı sütü kompleks bir yapıya sahip olup, farklı proteinler, amino asitler, organik asitler, steroidler, esterler, fenoller, şekerler, mineraller, iz elementler ve diğer bileşenleri içermektedir. Bununla birlikte, arı sütünün kimyasal bileşimi; mevsimsel ve ekolojik koşullar, bal arısının ırkı ve kastı, arı sütünün hasat zamanı ile örnekleme ve analiz yöntemleri gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir (Ramanathan vd., 2018; Maghsoudlou vd., 2019). Arı sütünün majör bileşenleri arasında proteinler (%9-18), karbohidratlar (%10-16) ve yağlar (%3-8) yer alırken; mineral maddeler (%1,5), polifenoller ve vitaminler gibi bileşenler daha düşük oranlarda bulunmaktadır (Sabatini vd., 2009; Xue vd., 2017). Bu çalışmada elde edilen bulgular, literatürde belirtilen bileşim aralıklarıyla uyumlu olup, arı sütünün kimyasal yapısının çeşitli çevresel ve biyolojik faktörlerden etkilenebileceğini göstermektedir.

Arı sütünün kalite parametrelerinden biri protein miktarı olup, arı sütünün kuru maddesinin en önemli kısmını temsil etmektedir (%27-41). Arı sütlerinin protein içerikleri, Kjeldahl yöntemi adı verilen azot miktar tayini ve spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmektedir. Tez çalışmasında, arı sütünün protein içeriği, ham protein ve sudan çözünür protein olmak üzere iki ayrı yöntem olan Kjeldahl ve Bradford yöntemleriyle değerlendirildi. Yaş ağırlık üzerinden sırasıyla %14,21 ve %5,73; kuru temelde ise %38,11 ve %15,36 olarak bulundu. Pavel vd. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, arı sütlerinin Kjeldahl, Lowry ve Bradford yöntemleri ile belirlenen protein içeriklerinin sırasıyla %13,79, %12,98 ve %11,71 olduğu bildirilmiştir. Farklı çiçeklenme dönemlerinin arı sütünün kimyasal bileşimi ve antioksidan aktivitesi üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, Kjeldahl yöntemiyle belirlenen protein içeriğinin %12,90 ile %15,40 arasında değiştiği ve çiçeklenme dönemlerinin protein içeriği üzerinde anlamlı bir etkisinin bulunmadığı ifade edilmiştir (Ma vd., 2022). Sidor vd. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, arı sütlerinin Dumas ve Bradford yöntemleriyle belirlenen protein içerikleri sırasıyla %14,12 ve %7,28 olarak tespit edilmiştir. Farklı hasat zamanlarında toplanan arı sütlerinin Kjeldahl yöntemiyle belirlenen ham protein içeriklerinin kuru ağırlık bazında

%42,1 ile %43,7 arasında değiştiği belirlenmiştir (Zheng vd., 2011). Elde edilen bulgular, literatürdeki verilerle genel olarak tutarlılık göstermektedir. Kjeldahl ve Dumas yöntemleriyle elde edilen protein değerlerinin genellikle daha yüksek olduğu, bunun da bu yöntemlerin azot bazlı ölçüm yapması nedeniyle proteine yönelik seçiciliğin olmamasından kaynaklandığı değerlendirilmektedir.

Literatürde, farklı depolama sıcaklık ve süresine bağlı olarak arı sütünün protein içeriğinin değişimine dair bir çalışmaya rastlanamamıştır. Bununla birlikte Li vd. (2008) tarafından farklı depolama sıcaklıklarının (-20°C, +4°C ve oda sıcaklığı) protein değişimleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada özellikle oda koşullarında depolanan arı sütlerinde bazı proteinlerin sıcaklığa duyarlı olduğu bildirilmiştir. Farklı bir çalışmada -20°C’de muhafaza edilen arı sütlerinin protein özelliklerini koruduğu, buna karşın oda koşullarında depolamanın protein bileşenlerinde kademeli bozulmaya neden olduğu ve suda çözünür protein fraksiyonlarında önemli değişiklikler gözlemlendiği belirlenmiştir (Chen & Chen, 1995). Bu bulgular, arı sütünün protein içeriğinin depolama koşullarına bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir. Tez çalışmasında, arı sütü örneklerinin toplam protein miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlemlenmiş olmakla birlikte, bu farklılıklar doğrudan depolama sıcaklık ve süreleriyle ilişkilendirilemedi. Bununla birlikte, tüm depolama sıcaklıklarında özellikle 6. ayda suda çözünür protein miktarlarında belirgin bir azalma tespit edildi. Bu durumun, literatürde belirtilen suda çözünür protein değişimlerinin, toplam protein miktarındaki farklılıklardan kaynaklı olabileceği düşünölmektedir.

Arı sütü lipitleri, bileşimlerinde yaklaşık %90 oranında gıdalarda nadir görölen kısa zincirli (8-12 karbon atomlu) hidroksil ve dikarboksilik yağ asitlerini içermesi nedeniyle karakteristik bir kimyasal özelliğe sahiptir (Ferioli vd., 2014). Yağ asitleri arasında, 10-HDA bu bileşiklerin %50'sinden fazlasını oluşturmaktadır (Koshio & Almeida-Muradian, 2003). Tez çalışmasında, taze arı sütünün yağ içeriği yaş ağırlık üzerinden %3,57, kuru temelde %9,56 olarak belirlendi. İtalya’da yapılan yerel ve ticari arı sütlerinin yağ bileşiminin incelendiği bir çalışmada yağ içerikleri sırasıyla %2,3-%7,2 ve %2,0-%3,2 olarak tespit edilmiştir (Ferioli vd., 2014). Farklı çalışmalarda arı sütlerinde kuru temel üzerinden yağ içeriğinin %8-19 arasında değiştiği saptanmıştır (Sabatini vd., 2009). Çalışma sonuçları literatürle uyumlu bulunmuştur.

Tez çalışmasında farklı sıcaklıklarda depolanan arı sütü numunelerinde, tüm depolama sıcaklıklarında depolama süresine bağlı olarak yağ içeriğinde kademeli bir artış gözlemlendi.

Bu durum, depolama sırasında lipitlerin enzimatik ve kimyasal süreçlere bağlı olarak yapı değiştirmesi ve kısa zincirli yağ asitlerinin artışından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Benzer şekilde, Romanya’da ticari arı sütlerinin kimyasal özelliklerinin değerlendirildiği bir çalışmada taze arı sütü numunelerindeki ortalama lipit içeriği %2,63 olarak belirlenmiştir. Ancak, depolama sırasında lipidik fraksiyonun bozulması nedeniyle numunelerdeki ortalama lipit içeriği artmıştır (%4,35) (Mureşan vd., 2016). Bu sonuçlar, arı sütündeki yağ içeriğinin depolama koşulları ve süresine bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir.

Arı sütü, besin değeri açısından oldukça zengin bir doğal ürün olup, mineral madde içeriği de bunun önemli bir parçasıdır. Taze arı sütündeki mineral madde içeriği %0,8 ile %3 arasında değişmektedir (Sabatini vd., 2009). Arı sütü örneklerinde en fazla bulunan mineral elementler K, Na, Mg, Ca, P ve S; iz elementler ise Zn, Fe, Cu, Al ve Mn’dır (Stocker vd., 2005). Tez çalışmasında, taze arı sütünün toplam mineral madde içeriği yağ ağırlık üzerinden %1,15, kuru temel üzerinden %3,08 olarak belirlendi. Garcia-Amoedo & Almeida-Muradian (2007) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise bu değerlerin %0,93 ile %1,17 arasında olduğu belirtilmiştir. Arı sütünde bulunan mineral madde içeriğinin geniş aralıkta değişkenlik göstermesi üretim bölgesi, flora çeşitliliği, arıların genetik özellikleri ve üretim yöntemleri gibi çeşitli faktörlerden kaynaklandığı bildirilmiştir (Stocker vd., 2005). Elde edilen sonuçlar, literatürde bildirilen değerlerle uyumluluk göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada mineral madde içeriğinin depolama koşullarıyla ilişkisi de detaylı olarak incelendi. Literatürde, depolama süresinin ve sıcaklığının mineral madde içeriği üzerindeki etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanamadı. Tez çalışmasında elde edilen bulgular, arı sütünün mineral madde içeriğinin depolama sıcaklığı veya süresinden etkilenmediğini gösterdi. Bu durumun, mineral maddelerin fiziksel ve kimyasal olarak kararlı bir yapıya sahip olmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

4.3. Arı Sütü Örneklerinin 10-HDA İçeriği

Arı sütünü pek çok doğal üründen ayırt eden en önemli özelliklerden biri de içerdiği kısa zincirli ve hidroksi yağ asitleri içerikleridir. Bu yağ asitleri içinde en fazla oranda bulunan 10-HDA, arı sütünün kalitesinin değerlendirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Arı sütüyle ilgili uluslararası standartlara göre, taze arı sütündeki 10-HDA oranının en az %1,4 olması gerekmekte; bu değer üzerinde bir 10-HDA içeriği, kalite ve tazeliğin önemli bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir (TSE, 2010; Yang vd., 2020). Bu çalışmada taze

arı sütünde %2,86 oranında 10-HDA tespit edilmiş olup standartlara uygunluk göstermektedir. Türkiye’de farklı yıllarda hasat edilen 105 arı sütünün 10-HDA içerikleri %2,1 ile %2,6 arasında belirlenmiştir (Keskin vd., 2020). Fransa’da farklı arı sütü örneklerinin 10-HDA içeriklerinin %1,4 ile 3,7 arasında değiştiği belirlenmiştir (Wytrychowski vd., 2013). Tayland'da yapılan bir çalışmada, çay (*Camellia sinensis*), kahve (*Coffea arabica*) ve acı çalı (*Eupatorium odoratum* L.) olmak üzere üç farklı monofloral polen türünün arı sütünün 10-HDA miktarı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bulgular, en düşük 10-HDA içeriğinin %1,14 ile ticari arı sütünde bulunduğunu, buna karşılık en yüksek seviyelerin (%1,66-1,67) acı çalı ve kahveyle beslenen arı kolonilerinden elde edildiğini göstermiştir (Pattamayutanon vd., 2018). Literatür ile karşılaştırıldığında ise bu çalışma sonucu Wytrychowski vd. (2013) ile Keskin vd., (2020) tarafından bildirilen oranlara yakın, Pattamayutanon vd. (2018) tarafından bildirilen değerlerden yüksek bulundu.

Arı sütünün işlenmesi ve muhafazası sırasında uygun olmayan koşullar, ürünün özelliklerini değiştirebilmekte ve bozulmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle 10-HDA, arı sütünün tazelik göstergelerinden biri olarak farklı çalışmalarda değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, farklı sıcaklık ve sürelerde muhafaza edilen örnekler arasındaki istatistiksel farklılıkların depolama koşullarıyla anlamlı bir ilişki göstermediği belirlendi ($p>0,05$). Antinelli vd. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, -18, 4 ve 25°C'de muhafaza edilen arı sütlerinin 12 aylık depolama süreci sonunda 10-HDA içeriğinde sırasıyla %0,1, %0,2 ve %0,4-0,6 oranında azalma olduğu ve bu değişimlerin dikkate değer seviyede olmadığı belirtilmiştir. Bunun aksine, Amoedo & Muradian (2003), oda sıcaklığında saklanan arı sütünün 10-HDA içeriğinde belirgin bir azalma olduğunu bildirmiştir. Kamakura vd. (2001) ise 40°C'de 7 gün depolanan arı sütünün 10-HDA ve çeşitli vitamin içeriklerinde herhangi bir değişiklik olmadığını belirlemiştir. Arı sütünün mikroenkapsülasyon yöntemiyle korunmasına yönelik farklı bir çalışmada, işlem öncesinde arı sütünün 10-HDA içeriği %1,74, mikroenkapsüle edilmiş arı sütünde ise %2,31 olarak tespit edilmiştir (Ulubayram & Çınar, 2023). Altı aylık depolama süresi sonunda, 10-HDA içeriği +4°C’de saklanan arı sütünde %1,71, oda sıcaklığında muhafaza edilen mikroenkapsüle örneklerde ise %2,27 olarak tespit edilmiştir. Depolama süresi boyunca her iki koşulda da 10-HDA içeriğinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Hu vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada, HPLC-MS/MS yöntemiyle belirlenen 10-HDA konsantrasyonunun, -20°C, +4°C ve oda sıcaklığında 6 ay boyunca depolanan arı sütlerinde önemli bir değişiklik göstermediği tespit edilmiştir. Ancak, 37°C'de 8 hafta boyunca depolanan örneklerde, 10-HDA içeriğinin

%2,04'ten %1,83'e düşerek anlamlı bir azalma yaşadığı bildirilmiştir. Elde edilen bulgular, literatürde -20°C ve +4°C'de muhafaza edilen arı sütlerinde 10-HDA bileşiğinin stabilitesini koruduğunu bildiren çalışmalarla uyumluluk göstermektedir. 10-HDA'nın bozunmasına neden olabilecek faktörlerden birinin oksidasyon reaksiyonu olduğu belirtilmekle birlikte bu sürecin kesin mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak, 10-HDA'nın stabilitesinin yüksek olması nedeniyle, bu bileşiğin arı sütü tazeliğini ölçmede uygun bir belirteç olmadığı bildirilmiştir (Antinelli vd., 2003).

4.4. Arı Sütü Örneklerinin pH ve Titrasyon Asitliği Değerleri

Gıdalarda pH ve asidite, ürünlerin kimyasal özelliklerini ve mikrobiyolojik güvenliğini belirleyen önemli faktörlerdir. pH değeri, gıdanın tat profilini, doku yapısını ve lezzetini etkilerken, genellikle pH 4.6'nın altında asidik ortamlar mikroorganizmaların gelişimini engelleyerek bozulma riskini azaltmaktadır. Bu nedenle, özellikle muhafaza yöntemleri ve fermentasyon süreçlerinde pH ve asidite seviyelerinin kontrol edilmesi, gıda güvenliği açısından büyük önem taşımaktadır (Andrés-Bello vd., 2013).

Bu çalışmada, taze arı sütünde titrasyon asitliği 48,94 mL 0,1 N NaOH/100 g olarak tespit edildi. Arı sütünün, pH (3,6-4,2) ve titrasyon asitliği (3,0-6,0 mL 0,1 N NaOH/g) ölçümleriyle tanımlanan yüksek asidik bir yapıya sahip olduğu bildirilmiştir (Ramadan & Al-Ghamdi, 2012; Fratini vd., 2016). Literatürdeki bulgular, coğrafi ve çevresel faktörlere bağlı olarak arı sütü asitlik değerlerinde değişkenlik gösterdiğini desteklemektedir. Beykaya vd. (2023) tarafından farklı yıllarda hasat edilen 176 taze arı sütü örneğinde toplam asitlik değerinin 28-58 mL 1 N NaOH/100 g (2,8-5,8 mL 0,1 N NaOH/g) arasında değiştiği rapor edilmiştir. Benzer şekilde, Bazeyad vd. (2022) Suudi Arabistan'dan 12 arı sütü örneğinde toplam asitlik değerlerini 39,4-45,0 mL 0,1 N NaOH/100 g olarak bildirmiştir. Bayram vd. (2021) ise Türkiye ve farklı ülkelerden 14 arı sütü örneğinin toplam asitlik değerlerinin 2,57-4,80 mL 0,1 N NaOH/g arasında olduğunu tespit etmişlerdir. Bu değerler, arı sütünün asidik karakterinin literatürle uyumlu olduğunu ve coğrafi farklılıkların, hasat döneminin arı sütünün kimyasal özellikleri üzerindeki etkisini göstermektedir.

Bu çalışmada elde edilen arı sütü pH değeri 3,71 olarak belirlenmiş olup, Beykaya vd. (2023) tarafından bildirilen pH aralığı (3,45-3,80) ile uyumlu bulundu. Bununla birlikte, elde edilen sonuçlar, Flanjak vd. (2019) ve Kolaylı vd. (2016) tarafından sırasıyla 3,98-4,21 ve 3,60-5,10 arasında belirtilen pH değerlerinden daha düşük bir aralığı göstermektedir.

Literatürde, arı sütünün pH değerlerindeki bu tür farklılıkların, bileşiminde bulunan yağ asitleri, fenolik asitler, organik asitler ve proteinler gibi asidik maddelerin çeşitliliğine ve miktarına bağlı olabileceği belirtilmiştir (Collazo vd., 2021).

Literatürde, arı sütünün uygun olmayan koşullarda depolanması sırasında özellikle titrasyon asitliğinde artış görüldüğü belirtilmektedir (Chen & Chen, 1995; Mureşan vd., 2016). Bu çalışmada -20°C’de muhafaza edilen arı sütü örneklerinin asitlik değerinin depolama süresi boyunca stabil kaldığı tespit edildi. Buna karşın, +4°C’de depolanan örneklerde istatistiksel olarak anlamlı, ancak düşük düzeyde bir asitlik artışı gözlemlendi ($p<0,05$). Oda sıcaklığında depolanan arı sütlerinde ise özellikle ilk 6 aylık süreçte önemli bir asitlik artışı görüldü. Bu artışın, depolama sıcaklık ve süresine bağlı olarak artan mikrobiyal aktivite ile protein ve lipidlerin oksidasyonu ve kısmi hidrolizi sonucunda meydana geldiği belirtildi. Özellikle, lipidlerin oksidatif bozunmasıyla serbest yağ asitlerinin açığa çıkmasının bu artışta etkili olduğu bildirilmiştir (Pavel vd., 2011; Sabatini vd., 2009). Bununla birlikte, elde edilen bulgular ve literatür sonuçlarından farklı olarak, Zheng vd. (2011) tarafından yapılan çalışmada, farklı zamanlarda hasat edilen arı sütlerinde depolamanın ilk üç günü boyunca asidite seviyesinde önemli bir düşüş olduğu (47,3’ten 37,2 mL 1 N NaOH/100 g’ye kadar) tespit edilmiştir.

Asitlik artışına karşılık, +4°C ve oda sıcaklığında depolanan örneklerde pH değerinde önemli bir düşüş meydana geldi. 12 aylık depolama süresi sonunda, bu değerler sırasıyla pH 3,50 ve 3,43 olarak ölçüldü. Elde edilen sonuçlar, pH düşüşlerinin organik asitlerin serbest hale gelmesinden kaynaklı olabileceğini ve bu süreçlerin depolama koşullarına bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Özellikle oda sıcaklığında gözlemlenen pH düşüşü, arı sütü için uygun depolama koşullarının sağlanmamasının kalite üzerindeki olumsuz etkisini belirtmektedir. Bu bulgular, arı sütü için düşük sıcaklıklarda yapılan uzun süreli depolamanın, ürünün kimyasal ve fiziksel stabilitesini korumak açısından kritik öneme sahip olduğunu göstermektedir. Buna karşın, oda sıcaklığında gerçekleştirilen depolamanın hem asitlikte artışa hem de pH’da düşüşe yol açtığı, bu durumun ise arı sütü bileşimindeki hassas bileşiklerin bozulmasına neden olarak ürünün besin değerini ve biyolojik aktivitesini olumsuz etkileyebileceği düşünülmektedir.

4.5. Arı Sütü Örneklerinin L , a ve b Renk Ölçüm Değerleri

Arı sütünün duyuusal özelliklerinden renk, ürün kalitesinin önemli göstergelerinden biridir ve depolama koşullarından önemli ölçüde etkilenmektedir. Bu çalışmada, farklı sıcaklık ve sürelerde depolanan arı sütü örneklerinin renk parametreleri ilk kez Hunter renk ölçüm cihazı ile analiz edildi ve L^* (parlaklık: 0 siyah, 100 beyaz), a^* ($-a$ yeşillik, $+a$ kırmızılık) ve b^* ($-b$ mavilik, $+b$ sarılık) değerleri üzerinden değerlendirildi. Taze arı sütü, parlak beyaz-sarımsı bir renge sahip olmakla birlikte depolama koşullarına bağlı olarak renginde belirgin değişiklikler gözlemlenmektedir. Taze arı sütünde parlaklık (L^*) değeri en yüksek seviyede belirlendi. Ancak depolama sıcaklığı ve süresine bağlı olarak L^* değeri kademeli olarak azaldı ve özellikle oda sıcaklığında renk koyulaşması belirgin hale geldi. Düşük sıcaklıklarda (-20°C ve $+4^{\circ}\text{C}$) muhafaza edilen örnekler parlaklık açısından daha kararlı bir yapı gösterdi, ancak 9. aydan itibaren bu örneklerde de koyulaşma eğilimi gözlemlendi. Taze arı sütü ve düşük sıcaklıkta muhafaza edilen örnekler yeşil renk skalasında yer alırken ($-a$), oda sıcaklığında depolanan örneklerin depolama süresine bağlı olarak kırmızı tonları ($+a$) belirlendi. Ayrıca b^* değerlerindeki kademeli artış, sarı rengin yoğunlaşmasının ve arı sütündeki koyulaşmanın bir diğer göstergesini oluşturdu. Benzer şekilde, $+4^{\circ}\text{C}$ ile 50°C arasında değişen sıcaklıklarda 7 gün boyunca depolanan arı sütlerinin kolorimetrik olarak renk değişimlerini inceleyen bir çalışmada, özellikle a^* ve b^* renk parametrelerindeki artışın, arı sütünün kahverengileşme eğiliminde belirgin bir rol oynadığı tespit edilmiştir (Kamakura vd. 2001). Bu renk değişimlerinin, depolama sürecinde meydana gelen Maillard reaksiyonları, enzimatik aktiviteler ve oksidatif bozunmalar gibi kimyasal süreçlerden kaynaklandığını; özellikle yüksek sıcaklık ile uzun süreli depolamanın bu reaksiyonu hızlandırabileceğini bildirmişlerdir (Chen & Chen, 1995; Buttstedt vd., 2013; Fratini vd., 2016; Beltekin & Demir, 2022).

4.6. Arı Sütü Örneklerinin Protein Profili

Tez çalışmasında, farklı sıcaklık ve sürelerde depolanan arı sütü örneklerinin protein profilleri SDS-PAGE yöntemiyle analiz edildi ve protein stabilitesinin sıcaklık ve depolama süresine bağlı olarak değiştiği saptandı. Taze arı sütünde moleküler ağırlıkları 10-170 kDa arasında değişen toplam 16 farklı protein bandı tespit edildi ve bu proteinlerin %92,87'sinin 20-85 kDa aralığında yoğunlaştığı belirlendi. Benzer bir araştırmada, SDS-PAGE yöntemiyle değerlendirilen arı sütü proteinlerinin 10-167 kDa aralığında yaklaşık 18 bant

içerdiği ve bu bantların özellikle 25-72 kDa arasında yoğunlaştığı bildirilmiştir. Özellikle 40-55 kDa aralığındaki proteinlerin daha yoğun olduğu tespit edilmiştir (Rosmillah vd., 2008). Tez çalışmasında düşük sıcaklıklarda (-20°C ve $+4^{\circ}\text{C}$) muhafaza ile bu proteinler büyük ölçüde korunurken, oda sıcaklığında depolama ile protein bantlarında belirgin değişiklikler meydana geldi. Elde edilen bulgular, protein stabilitesinin sıcaklık ve süreye bağlı olarak değiştiğini doğrulamakta ve literatürle uyum göstermektedir.

Li vd. (2008), -20°C 'de depolanan arı sütü örneklerinde protein stabilitesinin korunduğunu ve proteinlerin taze arı sütüne oldukça yakın olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (2D-PAGE) yöntemiyle moleküler ağırlıkları sırasıyla 14,4 ile 74,16 kDa ve pH değerleri 4,98-8,41 arasında olan proteinler incelenmiştir. Taze arı sütünde 85 protein noktası belirlenirken, -20°C , $+4^{\circ}\text{C}$ ve oda sıcaklığında 1 yıl süreyle depolanan arı sütlerinde sırasıyla 81, 73 ve 70 protein noktası tespit edilmiştir. -20°C 'de muhafaza edilen arı sütü, taze arı sütüne kıyasla protein çeşitliliği açısından benzerlik göstermiş; buna karşın, $+4^{\circ}\text{C}$ ve oda sıcaklığında depolanan arı sütlerine kıyasla daha fazla sayıda protein gözlemlenmiştir. Tez çalışmasında, -20°C ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilen arı sütlerindeki protein sayısının taze arı sütüyle aynı olduğu, ancak oda sıcaklığında depolanan örneklerde proteinlerin denatürasyonu ve proteolitik aktivitelere bağlı olarak 13 protein bandının tespit edildiği belirlendi. Ayrıca araştırmacılar tarafından 12 ay süreyle depolama sonrasında MRJP1 seviyesinin önemli ölçüde azaldığı; MRJP4, MRJP5, GOx, peroksiredoksin ve glutatyon S-transferazın tamamen bozulduğu saptanmıştır (Li vd., 2008). Benzer bir çalışmada, -20°C 'de 6 ay boyunca depolanan örneklerde MRJP proteinlerinin stabil kaldığı; buna karşın, oda sıcaklığında depolanan örneklerde hızla bozulduğu tespit edilmiştir (Zhao vd., 2013). -20°C 'de depolanan örneklerde protein stabilitesinin büyük ölçüde korunduğu; oda sıcaklığında ise özellikle MRJP4, MRJP5 ve glukoz oksidaz proteinlerinde önemli kayıpların meydana geldiği görülmüştür. Bu iki çalışmada da özellikle MRJP5'in, arı sütünün tazelik belirteci olarak kullanılmaya uygun bir parametre olabileceği bildirilmiştir.

Kamakura vd. (2001), SDS-PAGE yöntemiyle 14,4 ila 94 kDa aralığındaki protein profilinde, bu çalışmada elde edilen bulgularla benzer şekilde 43 ila 67 kDa aralığında yüksek yoğunlukta proteinlerin, 25 ila 35 kDa aralığında ise daha düşük yoğunlukta protein bantlarının bulunduğunu saptamıştır. Tez çalışmasında da moleküler ağırlıkları 20-85 kDa arasında değişen yüksek yoğunlukta proteinlerin düşük sıcaklıklarda stabil kaldığı; buna karşın, oda sıcaklığında depolanan örneklerde bu proteinlerde önemli kayıplar olduğu

belirlendi. Oda sıcaklığında proteolitik reaksiyonların etkisiyle moleküler ağırlığı 65 kDa'dan büyük olan proteinlerin hidrolize olduğu ve düşük moleküler ağırlıklı yeni proteinlerin ortaya çıktığı belirtildi (Chen & Chen, 1995). Bu çalışmada, oda sıcaklığında 12. aya kadar depolanan arı sütlerinde 10-20 kDa aralığındaki proteinlerin oranının %1'den %14,16'ya yükselmesi, literatürdeki proteolitik reaksiyonlarla ilgili bulguları desteklemektedir.

MRJP proteinlerinin depolama koşullarından etkilendiği ve bu nedenle tazelik belirteci olarak değerlendirilebileceği bildirilmektedir. Arı sütündeki protein profillerindeki bu değişimlerin potansiyel mekanizması üzerine yapılan çalışmalarda, serin proteaz, aspartik proteaz, sistein proteinaz, endopeptidaz ve karboksipeptidaz gibi proteolitik enzimlerin katalitik aktivitelerinin sıcaklıkla arttığı bildirilmiştir (Hu vd., 2021). Bu çalışmada da özellikle oda sıcaklığında 12 ay sonunda düşük moleküler ağırlıklı proteinlerin oranındaki belirgin artış, proteolitik aktivitelerin etkisini ortaya koymaktadır. Farklı çalışmalarda, MRJP1'in bozunma oranının sıcaklığa bağlı olarak hızlandığı ve bu proteinin SDS-PAGE veya ELISA yöntemiyle tespit edilebileceğini belirlenmiştir (Shen vd., 2015; Kamakura vd., 2021). Buna karşın, Hu vd. (2021), 37°C'de 2 hafta boyunca depolanan arı sütlerinde MRJP1 seviyesinin önemli ölçüde değişmediğini tespit etmiştir. Bu durumun, MRJP1'in oligomerler oluşturarak uzun lifli yapılara birleşmesinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Mattei vd., 2020). Zhao vd. (2013), MRJP5'in; Hu vd. (2021) ise MRJP4'ün depolama koşullarına daha duyarlı olduğunu ve her iki proteinin de tazelik belirteci olarak kullanılabilecek uygun parametreler olduğunu belirtmiştir.

Sonuç olarak, düşük sıcaklıkta (-20°C) depolama, protein stabilitesinin korunmasında en etkili koşul olarak öne çıkarken, oda sıcaklığında depolama ise proteinlerin denatürasyonu ve proteolitik reaksiyonların hızlanması nedeniyle önemli yapısal değişimlere yol açmaktadır. Literatür çalışmaları ve bu çalışmada elde edilen bulgular, arı sütünün protein profilini, kalite kontrolü ve depolama optimizasyonunda önemli bir parametre olarak değerlendirmektedir.

4.7. Arı Sütün Örneklerinin Şeker Profili

Arı sütünün kalite kriterlerinden biri olan şeker profilinde fruktoz, glukoz ve sakkaroz ana şeker bileşenlerini oluşturmaktadır (Ramadan & Al Ghamdi, 2012; Wytrychowski vd., 2012, 2013). Bu üç bileşen, toplam şeker içeriğinin %90'ından fazlasını oluşturmaktadır;

fruktoz ve glukoz monosakkaritleri arı sütünde temel şekerler olarak öne çıkarken, sakkaroz konsantrasyonunun değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir (Balkanska, 2018). Literatürle karşılaştırıldığında, tez çalışmasındaki bulgular da fruktoz, glukoz ve sakkarozun arı sütündeki ana şekerler olduğunu ve diğer şeker bileşenlerinin bu şekerlere kıyasla daha düşük konsantrasyonlarda bulunduğunu gösterdi.

Tez çalışmasında arı sütü örneklerinde riboz, trehaloz ve melezitoz şekerleri tespit edilemedi; glukoz, fruktoz ve sakkarozun toplam oranı depolama sıcaklık ve süresine bağlı olarak kuru madde temelinde %11,88 ile %14,62 arasında değiştiği belirlendi. Bu sonuçlar, Balkanska (2018) tarafından bildirilen Bulgaristan'dan toplanan 10 farklı arı sütü örneğindeki toplam şeker oranı (%11,76) ile uyumludur. Aynı çalışmada fruktoz, glukoz ve sakkarozun içeriklerinin sırasıyla %3,64-6,74, %2,55-5,87 ve %1,94-5,08 arasında değiştiği belirtilmiştir. Benzer şekilde, Türkiye'de yapılan bir çalışmada, glukoz, fruktoz ve sakkarozun toplam içeriği %8,2 ile %19,0 arasında değişirken, ortalama %13,9 olarak tespit edilmiştir (Kolaylı vd., 2016). Çalışma bulguları, bu aralıklarla örtüşmektedir.

Bu çalışmada, taze arı sütünde en fazla bulunan şekerler fruktoz (%5,76), glukoz (%4,36) ve sakkaroz (%4,42) olarak belirlendi. Arı sütü şekerlerinin büyük bir kısmını monosakkaritler (fruktoz ve glukoz) oluştururken, sakkaroz nispeten daha az miktarda bulunmuştur (Sesta, 2006; Popescu vd., 2009; Daniele & Casabianca, 2012). Sesta, (2006) 97 arı sütünde sakkaroz içeriğinin %<0,1-2,1 arasında değişerek ortalama %1 olduğunu bildirmiştir. Daniele & Casabianca (2012) ise 300 arı sütünün sakkaroz içeriğinin bazı örneklerde tespit edilemediğini ve örneklerde maksimum %1,7 oranında olduğunu belirlemiştir. Bununla birlikte, Kolaylı vd. (2016) ve Balkanska (2018), sakkarozu tüm örneklerde sırasıyla %0,9-5,5 ve %1,94-5,08 arasında daha yüksek ancak, geniş bir aralıkta değişen konsantrasyonlarda tespit etmişlerdir. Bu farklılığın, arı sütü üretim tekniklerinden veya arıların beslenme şekliyle kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Tez çalışmasında belirlenen sakkaroz içeriği, bu bulgularla uyumluluk göstermektedir. Ayrıca fruktoz içeriğinin, depolama boyunca glukoz ve sakkarozdan daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bu durum, Balkanska (2018) tarafından bildirilen fruktozun (%3,64-6,74) toplam şekerler içindeki en baskın bileşen olduğu bulgusuyla tutarlıdır. Diğer bir çalışmada fruktozun arı sütünün toplam şekerlerinin yaklaşık %53'ünü temsil ederken, glukoz ve sakkaroz sırasıyla toplam şekerlerin yaklaşık %29'unu ve %28,4'ünü oluşturduğunu bildirmektedir (Ragab & İbrahim, 1999). Bununla birlikte, Daniele & Casabianca (2012) ve Kolaylı vd. (2016)

tarafından tüm arı sütü örneklerinde glukoz seviyeleri fruktoz seviyelerinden daha yüksek bulunmuştur.

Maltoz ve melibiyoz gibi daha az bulunan şekerlerin miktarları incelendiğinde, bu çalışmada bu şekerlerin depolama süresince düşük seviyelerde olduğu (%0,37-0,56 ve %0,55-0,79) belirlendi. Sesta (2006) ve Kolaylı vd. (2016) tarafından yapılan çalışmalarda bu şekerlerin arı sütünde düşük konsantrasyonlarda bulunduğu ve melibiyozun yalnızca belirli örneklerde tespit edilebildiği bildirilmiştir. Elde edilen bulgular literatürle uyumluluk gösterdi. Ayrıca Kolaylı vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada tüm arı sütü örneklerinde melezitöz belirlenmesine karşın bu çalışmada arı sütü örneklerinde melezitöz saptanamadı.

Bu çalışmada -20°C'de 12 ay boyunca muhafaza edilen arı sütünde toplam şeker oranının başlangıçta %14,54 olduğu, ancak depolama süresi boyunca azaldığı, 12. ayda ise tekrar artış gösterdiği belirlendi. Benzer şekilde +4°C'de muhafaza edilen arı sütlerinde de benzer bir eğilim gözlemlendi; toplam şeker içeriği 6. ayın sonunda en düşük seviyeye ulaştı, 6. aydan itibaren tekrar bir artış saptandı. Ragab & İbrahim (1999) tarafından yapılan bir çalışmada 5°C'de 12 ay süresince muhafaza edilen arı sütlerinin toplam şeker içeriğinde %3,68'ten %4,12'ye artış olduğu belirlenmiştir.

Depolama sıcaklıklarının arı sütündeki şeker bileşenlerinin stabilitesi üzerinde önemli etkileri olduğu belirlenmiştir. Çalışma bulgularıyla uyumlu olarak, Daniele & Casabianca (2012) düşük sıcaklıklarda arı sütü şekerlerinin daha stabil kaldığını bildirmiştir. Düşük sıcaklıklar hem hidroliz hem de oksidasyon süreçlerini yavaşlatarak bu reaksiyonların ilerlemesini sınırlandırmaktadır. Ragab & İbrahim (1999) tarafından yapılan bir çalışmada, 5°C'de 12 aylık depolama sürecinin ardından toplam şeker içeriği üzerinden kuru madde bazında fruktoz oranının %54,4'ten %52,6'ya, glukoz oranının %29,6'dan %28,6'ya ve sakkaroz oranının %8,6'dan %8,0'a düştüğü bildirilmiştir.

Özellikle, oda sıcaklığında depolanan arı sütü örneklerinde toplam şeker içeriğinde daha hızlı bir düşüş gözlemlendi ve 9. ayda en düşük değerine (%11,88) ulaştığı belirlendi. Chen & Chen (1995) tarafından yapılan çalışmada, sakkarozun depolama sırasında hidrolize uğrayarak glukoz ve fruktoz miktarlarını artırabileceği, ancak bu artışın zamanla Maillard reaksiyonları veya diğer kimyasal mekanizmalar nedeniyle azalabileceği bildirilmiştir. Bununla birlikte, sıcaklık artışının sakkaroz hidrolizini hızlandırdığı ve yüksek sıcaklıklarda şekerlerin daha hızlı bozunduğu belirlenmiştir (Chen & Chen, 1995). Benzer bir eğilim bu çalışmada da gözlemlenmiştir. Özellikle, Benzer bir eğilim bu çalışmada da gözlemlenmiştir. Depolamanın başlangıcından itibaren sakkaroz miktarının hidroliz

nedeniyle azaldığı, ancak glukoz ve fruktoz oranlarında beklenen artışın başlangıçta gerçekleşmediği, aksine bir düşüş eğilimi sergilediği, ancak belirli bir süreden sonra artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu düşüşün, fruktoz ve glukozun oksidasyon veya Maillard reaksiyonu gibi kimyasal süreçlere maruz kalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Oda sıcaklığında depolanan örneklerde maltoz ve melibiyoz seviyelerindeki azalma daha hızlı gerçekleşti. Genellikle nişasta veya diğer karbohidratların parçalanmasıyla oluşan maltozun yüksek sıcaklıklarda daha kararsız bir yapı sergilediği tespit edildi. Benzer şekilde, melibiyozun hidroliz yoluyla daha basit şekerlere ayrıldığı ve bu sürecin oda sıcaklığında daha hızlı ilerlediği belirlendi. Buna karşın, -20°C ve +4°C’de depolanan örneklerde maltoz ve melibiyoz seviyelerindeki değişimin sınırlı kaldığı, dolayısıyla düşük sıcaklıkların bu şeker bileşenlerinin korunmasına katkı sağladığı görüldü.

4.8. Arı Sütü Örneklerinin Protein, Lipit ve Karbohidat Oksidasyon Ölçümleri

Arı sütü, ışık ve sıcaklık gibi çevresel faktörlere karşı hassas bir yapıya sahip olduğu düşünülmektedir. Özellikle yüksek sıcaklık, Maillard reaksiyonlarını, enzimatik aktiviteleri ve lipit-protein etkileşimlerini hızlandırarak renk değişimlerine ve temel bileşenlerin bozulmasına yol açabilmektedir. Bu durum, proteinler, lipitler ve diğer biyoaktif bileşiklerin kimyasal yapısında önemli değişikliklere neden olmaktadır. Bunun yanı sıra, arı sütü oksidasyona karşı da oldukça duyarlı olup oksijen varlığında serbest radikal oluşumu hızlanmaktadır. Arı sütünde, lipitler ve proteinler başta olmak üzere şekerler, renk pigmentleri ve fenolik bileşikler gibi pek çok temel bileşen oksidatif bozunmaya uğrayabilmekte ve bu durum, arı sütünün besin değerinde ve kalite özelliklerinde kayıplara yol açmaktadır (Ramadan & Al-Ghamdi, 2012; Isidorov vd., 2016). Bununla birlikte, arı sütünde depolama koşullarının oksidasyon süreçleri üzerindeki etkisi ve bu süreçlerin tazelik göstergesi olarak değerlendirilmesi konusundaki çalışmalar literatürde oldukça sınırlıdır. Bu araştırma, arı sütünde lipit ve protein oksidasyon süreçlerini kapsamlı bir şekilde ele alan ilk çalışmalardan biri olması nedeniyle bu alanda önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

4.8.1. İleri Oksidasyon Protein Ürünleri (İOPÜ) Ölçümleri

Gıdaların bileşiminde yer alan proteinler, üretim, işleme ve depolama süreçlerinde oksidasyon reaksiyonlarına maruz kalmaktadır. Protein oksidasyonu sonucunda protein

yapılarında karbonil gruplarının oluşumu, disülfid bağlarının artışı ve protein agregatlarının meydana gelmesi gibi yapısal değişiklikler gözlemlenmektedir (Li vd., 2021). Bu oksidasyon reaksiyonları, proteinlerin yapısını ve fonksiyonlarını etkileyerek gıdaların besin değeri, fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktivitelerinde önemli kayıplara yol açabilmektedir. Bu durum, gıda kalitesini düşürmekte, raf ömrünü kısaltmakta ve sağlık açısından olumsuz etkilere yol açmaktadır (Estévez vd., 2009; Yang vd., 2017; Domínguez vd., 2021). Bu sebeple, protein açısından zengin gıda ve gıda bileşenlerinin işlenmesi ve depolanmasında oksidasyon süreçlerinin kontrolü, gıdaların kalite kaybını önlemek için oldukça önem taşımaktadır (Stadtman & Levine, 2003).

Protein oksidasyonunu değerlendirmek üzere literatürde birçok analitik yöntem geliştirilmiştir. Bunlar arasında protein hidroperoksitlerinin tespitinde demirli oksidasyon-kilenol turuncusu (FOX) testi, protein karbonilasyonunun belirlenmesinde ise 2,4-Dinitrofenilhidrazin (DNPH) testi yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir (Levine, vd., 1994; Estévez, 2011). Bunun yanında, proteomik yaklaşımlar ve bireysel bileşiklere odaklanan spektroskopik ile kromatografik yöntemler de tercih edilmektedir. Spektroskopik yöntemlerden biri olan İOPÜ tayini, özellikle plazma ve doku örneklerinde yaygın olarak kullanılmıştır. Ancak, bu yöntemin gıdalardaki protein oksidasyonunu değerlendirme amacıyla kullanıldığına dair literatürde herhangi bir örneğe rastlanmamıştır. Bu çalışma ile ilk kez arı sütü proteinlerinin İOPÜ değerleri ölçülerek literatüre önemli bir katkı sağlamıştır. Bununla birlikte, İOPÜ tayininin gıdalarda kullanılmasında, imidazolonlar ve pentosidin gibi glikasyon kaynaklı bileşiklerin aynı dalga boyunda absorbans göstermesi nedeniyle sonuçların yanıltıcı olabileceği belirtilmektedir (Hellwig, 2020).

Arı sütü, biyoaktif özelliklere sahip MRJP'ler açısından zengin bir içeriğe sahiptir (Buttstedt vd., 2018; Li vd., 2021). Ancak, bu proteinlerin stabilitesi ve fonksiyonları, depolama ve işleme sırasında meydana gelebilecek oksidatif süreçler nedeniyle olumsuz etkilenmektedir. Arı sütü, protein oksidasyonuna karşı hassas bir gıda maddesidir ve özellikle depolama sıcaklık ve süresi, oksidasyon seviyelerinde belirgin artışlara yol açmaktadır. Qiao vd. (2018) oda sıcaklığında depolanan arı sütünde enzimatik olmayan esmerleşme ve protein agregasyonunun meydana geldiğini ve bu durumun ürünün fonksiyonel özelliklerini olumsuz etkilediğini bildirmektedir. Bu nedenle, arı sütünün kalitesini ve etkinliğini koruyabilmek için protein oksidasyonuna neden olan koşulların anlaşılması önem taşımaktadır. Fallah vd. (2022) arı sütü proteinlerinin birçok bitki bazlı proteinden daha sindirilebilir olduğunu ve bu özelliğin diyet uygulamalarında kullanım

açısından önem taşıdığını belirtmektedir. Ancak, oksidatif modifikasyonlar, protein sindirilebilirliğini azaltarak esansiyel amino asitlerin ve diğer besinlerin biyoyararlanımını sınırlayabileceği bildirilmektedir.

Bu çalışmada, taze arı sütünde başlangıç oksidasyon düzeyi 0,93 μmol Kloramin-T/g olarak ölçüldü. Depolama koşulları ve süreye bağlı olarak oksidasyon seviyelerindeki değişim, proteinlerin stabilitesini etkilemektedir. Düşük sıcaklıklarda muhafaza, oksidasyon seviyelerinde düşük düzeyde bir artış gözlemlendi ve protein stabilitesinin büyük ölçüde korunduğu belirlendi. Bulgular, düşük sıcaklık koşullarının oksidasyon üzerinde minimal bir etkisi olduğunu, ancak uzun süreli düşük sıcaklıkta muhafazanın oksidatif hasara yol açabileceğini literatürle uyumlu şekilde göstermektedir (Khalfan Saeed Alwali Alkindi vd., 2024). Buna karşılık, oda sıcaklığında depolanan arı sütü örneklerinde oksidasyon, depolamanın başlangıcından itibaren 9. aya kadar arttığı ve özellikle 6. aydan sonra bu artışın daha da hızlandığı saptandı. Oksidatif stresin etkisiyle proteinlerde karbonilasyon, tiyol oksidasyonu ve çapraz bağlanma gibi değişiklikler meydana gelmektedir. İlk 9 ayda oksidatif strese bağlı olarak karbonil grupları, peroksitler gibi oksidasyon ürünlerinin artmaktadır. Bu artış, oda sıcaklığında muhafaza edilen ürünlerin protein yapısında önemli bozulmalara, besin değerinde ve ürün kalitesinde kayıplara yol açabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, uzun depolama sonucunda protein oksidasyon ürünleri bozunabilmekte veya suda çözünmeyen agregatlar oluşturabilmektedir. Ayrıca, oksidasyon ürünleri sekonder bozunma reaksiyonları ve enzimatik aktiviteler sonucunda parçalanabilmektedir. Bu reaksiyonlara bağlı olarak 9. aydan sonra anlamlı azalmalar görüldüğü düşünülmektedir. Düşük sıcaklıkta muhafaza yöntemleri arı sütü gibi hassas gıdalarda protein stabilitesini korumada büyük bir öneme sahiptir. Depolama süresi boyunca oksidasyon süreçlerinin izlenmesi için uygun analitik yöntemlerin kullanılması gereklilik arz etmektedir. Arı sütü gibi yüksek biyolojik değere sahip gıda ürünlerinin kalite kayıplarını önlemek için oksidasyon mekanizmalarının ayrıntılı şekilde incelenmesi ve muhafaza koşullarının bu bulgular doğrultusunda optimize edilmesi büyük önem taşımaktadır.

4.8.2. Malondialdehit (MDA) Ölçümleri

MDA, çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu oluşan küçük moleküllü bir bileşen olup lipid oksidasyonunun son ürünü olarak değerlendirilmektedir (Goulas & Kontominas, 2007). Lipit oksidasyonunun göstergesi olarak MDA belirlenmesinde sıkça

kullanılan Tiyobarbiturik Asit (TBA) yöntemi, MDA'nın TBA ile reaksiyona girerek 532-535 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülebilen bir kromojen oluşturması ilkesine dayanmaktadır. Pratik ve hızlı bir yöntem olarak kabul edilen TBA testi, özellikle gıdalardaki lipid oksidasyonunu değerlendirmede yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak yöntemin özgüllük eksikliği, sonuçların doğruluğunu sınırlayan önemli bir faktör olarak öne çıkmaktadır.

TBA'nın, hidroperoksitler, konjuge aldehitler ve MDA dışındaki aldehitlerle de reaksiyona girerek yanlış pozitif sonuçlara neden olabileceği bilinmektedir. Özellikle bitki dokularında bulunan antosiyaninler ve karbohidratlar gibi bileşikler, 532 nm dalga boyundaki absorbans değerlerini etkileyerek ölçümlerde sapmalara yol açmaktadır. Ayrıca, sıcak ve asidik koşullar altında oluşan doğal pigmentler de ölçümlerin güvenilirliğini olumsuz etkilemektedir. Bu tür girişimlerin düzeltilmemesi durumunda MDA eşdeğerlerinin %96,5 oranında fazla tahmin edilebileceği bildirilmiştir (Hodges vd., 1999). Bunun yanında, antosiyaninler ile sakkaroz ve 2-deoksiriboz gibi bazı şekerlerin etkisiyle pembe renk yerine koyu yeşil renk oluşumu gözlemlenmiş ve bu bileşiklerin 615 nm dalga boyunda maksimum pik verdiği belirlenmiştir. Bu nedenle, absorbans değerlerini düzeltmek için 600 nm'deki ölçümler de değerlendirmeye dahil edilmiştir. MDA analizinde çözelti bileşimi ve ekstraksiyon yöntemi de ölçüm sonuçlarını önemli ölçüde etkileyebilmektedir. Wang vd. (2013b), fosfat tamponu (PB) ve %5 TCA kullanarak farklı bitki yapraklarından elde edilen MDA konsantrasyonlarını karşılaştırmış, TCA ile ekstrakte edilen çözeltilerin hem daha berrak olduğunu hem de PB'ye göre %32 daha yüksek MDA konsantrasyonu verdiğini tespit etmiştir. Benzer şekilde, farklı bir çalışmada TBA yöntemiyle MDA tayininde, bitki örneklerinin ekstraksiyonu %0,1 TCA kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Sánchez-Reinoso vd., 2014). Bununla birlikte, yöntemin özgüllüğünü artırmak ve girişim kaynaklı hataları minimize etmek için düzenlemeler yapılması gerektiği vurgulanmıştır. Ayrıca, interferans yaratan bileşiklerin ayrılması için sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle petrol eter, etil asetat ve *n*-bütil alkol gibi farklı çözücüler kullanılarak çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Draper vd., 1993; Taulavuori vd., 2001; Savicka & Škute, 2010; Paulinus & Tinuade, 2013).

Literatür bulgularına benzer olarak bu çalışmada da karbohidrat ve antosiyanin gibi girişim yapan bileşikler nedeniyle, 532 nm dalga boyunda TBA-MDA kompleksinin pembe renk yerine koyu sarı renge dönüştüğü gözlemlendi. Bu bileşiklerin uzaklaştırılması amacıyla çeşitli çözücülerle ekstraksiyon denemeleri yapıldı. Ancak arı sütünde bulunan şekerlerin ve antosiyanin bileşiklerinin sulu fazda çözünmesi sebebiyle, bu bileşiklerin

ayrıştırılmadığı değerlendirildi. Bu nedenle, literatürde bildirildiği gibi, %5 TCA ile ekstraksiyon yöntemi tercih edildi ve Hodges vd. (1999) tarafından önerilen eşitlik kullanılarak girişim yapan bileşiklerden kaynaklanan absorbans değerlerinin elimine edildiği kabul edildi. Çalışmada, farklı sıcaklık ve sürelerde depolanan arı sütlerinde MDA içeriklerinin tespit edilmesi ve bu içeriklerin tazelik belirteci olarak değerlendirilmesi ilk olma özelliği taşımaktadır. Girişim yapan bileşiklerin uzaklaştırılmasını sağlamak amacıyla çeşitli ekstraksiyon çözücüleri ve yöntemlerine yönelik çalışmaların yoğunlaştırılması, sonuçların güvenilirliğini artırmak için oldukça önemlidir.

Arı sütü örneklerinde farklı sıcaklık ve depolama sürelerinde yapılan ölçümler, lipit oksidasyonunun sıcaklığa oldukça duyarlı olduğunu gösterdi. -20°C 'de muhafaza edilen arı sütünde depolama süresince oksidasyon seviyesinde oldukça yavaş bir artış olduğu belirlendi. Bu bulgu, düşük sıcaklıkların lipit oksidasyonunu sınırlayarak arı sütünün kalite ve stabilitesini korumada etkili olduğunu bildirmektedir. Bununla birlikte, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilen örneklerde -20°C 'ye kıyasla oksidasyon düzeyleri daha yüksek bulundu. Oda sıcaklığında depolanan örneklerde ise oksidasyon hızının diğer depolama sıcaklıklarına kıyasla çok daha yüksek olduğu belirlendi. Bununla birlikte $+4^{\circ}\text{C}$ ve oda sıcaklığında depolanan arı sütlerinde en yüksek MDA seviyesi 9. ayda belirlendi ve 9. aydan itibaren önemli oranda azalma tespit edildi. Çalışma bulguları, oda sıcaklığında depolamanın lipit oksidasyonunu hızlandırdığını ve bu koşullarda ürünlerin besin değeri ve stabilitesinde önemli kayıplar olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, 9. aydan itibaren MDA seviyesinde gözlemlenen bu anlamlı düşüşün, Maillard reaksiyonu gibi çeşitli oksidasyon süreçlerinde lipit oksidasyon ürünlerinin de kullanılabilmesiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu durum, MDA seviyesindeki azalmanın, bu tür reaksiyonlar sırasında meydana gelen kimyasal dönüşümlerden kaynaklanabileceğini göstermektedir.

Farklı depolama sıcaklıklarının lipit oksidasyonu üzerindeki etkileri, literatürdeki diğer çalışmalarla da tutarlıdır. Özdemir (2022) tarafından yapılan çalışmada, margarin, tereyağı, krema ve mayonez gibi yağlı gıdalardaki MDA seviyeleri sırasıyla 20-568 $\mu\text{g}/100$ g, 13-40 $\mu\text{g}/100$ g, 24-42 $\mu\text{g}/100$ g ve 60-108 $\mu\text{g}/100$ g aralığında tespit edilmiş ve bu ürünlerdeki oksidasyonun, depolama koşullarına ve ürün bileşimine bağlı olarak önemli ölçüde değiştiği belirtilmiştir. Benzer şekilde, Paulinus & Tinuade (2013) tarafından yapılan taze et ve balık örnekleri üzerindeki araştırmalarda, ısıl işlemin MDA seviyelerini artırarak lipit oksidasyonunu hızlandırdığı sonucuna varılmıştır. Bu bulgular, sıcaklık ve işleme yöntemlerinin lipit oksidasyonu üzerindeki belirleyici etkisini göstermektedir. Yüksek yağ

ve doymamış yağ asidi içeriğine sahip gıdalarla ilgili yapılan çalışmalar, depolama sıcaklıklarının lipit oksidasyonu üzerindeki etkilerini daha ayrıntılı şekilde açıklamaktadır. Yer fıstığında, 15°C’de oksidasyonun yavaş bir şekilde ilerlediği, ancak 25°C ve 35°C’de hızının belirgin şekilde arttığı bildirilmiştir (Liu vd., 2019). Benzer şekilde, balık filetolarında yapılan bir çalışmada, -3°C’de süper soğutmanın lipit oksidasyonunu ve protein bozunmasını yavaşlattığı belirlenmiştir (Guo vd., 2023). Bu bulgular, düşük sıcaklıkların lipit oksidasyonuna yol açan enzimatik aktiviteleri sınırlayarak doymamış yağ asitlerini daha stabil bir yapıda tutmasıyla açıklanabilmektedir (Zhang vd., 2021).

4.8.3. 5-Hidroksimetilfurfural (HMF) Ölçümleri

HMF, özellikle ısıl işlem görmüş veya uzun süre depolanmış gıda ürünlerinin tazelik ve kalite değerlendirmesinde önemli bir göstergedir. HMF oluşumu, şekerlerin asidik koşullar altında ısıya maruz kalmasıyla gerçekleşen Maillard reaksiyonu ve karamelizasyon süreçlerinden kaynaklanmaktadır (He vd., 2024; Yıldız, 2024). Taze gıda ürünlerinde HMF miktarı genellikle tespit edilemeyecek kadar düşük seviyelerde bulunurken, sıcaklık ve depolama süresiyle birlikte artış göstermektedir. Bu nedenle, HMF içeriği, ısıl işlem uygulamalarının şiddetini ve zamanla oluşabilecek kimyasal değişimlerin değerlendirilmesinde önemli bir kalite parametresi olarak öne çıkmaktadır (Frag vd., 2020; İçli, 2022). Depolama sürecinde HMF seviyeleri, farklı gıda ürünlerinin tazelik ve kalitesinin değerlendirilmesinde önemli bir gösterge olarak araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda, bal ve meyve suları gibi ürünlerde, yüksek sıcaklık veya uzun süreli depolama koşullarının HMF konsantrasyonlarını önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir (Gregorc vd., 2019; İçli, 2022). Özellikle taze balda minimum seviyelerde bulunan HMF, uygun olmayan depolama koşulları veya ısıl işlem uygulamaları sonucu artış göstermekte ve bu durum ürün kalitesinde kayıplara yol açmaktadır (Gregorc vd., 2019; Yıldız, 2024). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), HMF’yi bal kalitesinin önemli bir göstergesi olarak kabul etmekte ve güvenli tüketimin sağlanabilmesi için bu bileşik için maksimum limit bildirmektedir (Vella & Attard, 2019).

HMF'nin depolama koşullarındaki stabilitesi, sıcaklık, pH, gıda matrisi ve çevresel faktörler gibi birçok değişkene bağlı olarak farklılık göstermektedir. Bu nedenle, gıda güvenliği ve kalite kontrol süreçlerinde HMF seviyelerinin düzenli olarak izlenmesi büyük önem taşımaktadır (Ünüvar, 2018). HMF'nin önemi yalnızca kalite değerlendirme ile sınırlı

kalmamakta, aynı zamanda sağlık açısından potansiyel toksikolojik riskler de içermektedir. Yüksek HMF konsantrasyonlarının mutajenik ve kanserojen özellikler taşıyabileceği bildirilmiştir (Shapla vd., 2018; Farag vd., 2020). Bu bağlamda, arı sütü gibi hassas gıda ürünlerinde HMF seviyelerinin belirlenmesi hem depolama koşullarının değerlendirilmesi hem de ürün tazeliğinin izlenmesi açısından kritik bir gösterge olarak kabul edilmektedir. Ancak, arı sütü ile ilgili literatürde bu alandaki çalışmalar sınırlıdır ve daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada, arı sütünün farklı depolama sıcaklıkları ve sürelerinde HMF içeriğinin değişimi belirlendi ve arı sütünün tazeliği üzerindeki etkileri değerlendirildi. -20°C’de muhafaza edilen arı sütü örneklerinde HMF, ilk olarak 9. ayda 1,28 µg/g seviyesinde belirlendi ve 12 aylık depolama sonunda 1,36 µg/g’ye yükseldi. Benzer şekilde, +4°C’de depolanan örneklerde HMF, 6. aydan itibaren belirlendi ve depolama süresince düşük seviyelerde olduğu tespit edildi. Bu bulgular, düşük sıcaklıkların Maillard reaksiyonunu ve oksidasyonu yavaşlattığını ve HMF oluşumunun düşük seviyelerde olduğunu göstermektedir. Oda sıcaklığında depolanan örneklerde ise, 3. aydan itibaren HMF seviyelerinde belirgin bir artış gözlemlendi ve 12. ayda 5,81 µg/g seviyesine ulaştı. Bu sonuçlar, oda sıcaklığında depolamanın HMF oluşumunu hızlandırdığını ve arı sütünün kalitesinde daha fazla kayıplara neden olduğunu göstermektedir. Ciulu vd. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, -18°C ve +4°C’de muhafaza edilen arı sütlerinde HMF’nin tespit edilebilir seviyenin altında olduğu; 25°C’de depolanan arı sütlerinde ise HMF seviyesinin hızla arttığı ve 9. ayda 1,57-2,4 mg/kg arasında bir seviyeye ulaştığı bildirilmiştir. Bu bulgular, çalışma sonuçları ile uyumluluk göstermektedir. Yapılan çalışmalar, düşük sıcaklıklardaki depolamanın arı sütünün kalitesini korumadaki önemini ve HMF’nin, gıda ürünlerinin tazeliğini belirlemek için güvenilir bir gösterge olabileceğini göstermiştir. HMF konsantrasyonunun, depolama sıcaklığı ve süresine bağlı olarak nasıl değiştiğini incelemek, gıda güvenliği ve kalitesini korumak için büyük önem taşımaktadır.

Çalışma sonuçları, elde edilen bulgular ile uyum içerisinde olup, düşük sıcaklıklarda yapılan depolamanın arı sütünün kalite parametrelerini korumada önemli bir rol oynadığını göstermektedir. HMF, depolama sıcaklığı ve süresine bağlı olarak meydana gelen değişimlere duyarlı bir bileşik olarak, gıda ürünlerinin tazelik ve kalite değerlendirmesinde güvenilir bir gösterge olarak öne çıkmaktadır. HMF konsantrasyonunun artışı, oda sıcaklığında depolama sırasında hızlanarak ürün kalitesinde önemli kayıplara neden olmaktadır. Çalışmanın bulguları, HMF’nin sadece bir kalite göstergesi değil, aynı zamanda

depolama süreçlerinin etkinliğini değerlendiren bir parametre olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, HMF seviyesinin yalnızca oda sıcaklığında depolanan arı sütlerinde belirgin bir artış göstermesinin, bu bileşiğin özellikle bu sıcaklıklar için bir kalite göstergesi olarak daha uygun olabileceğini düşündürmektedir.

4.9. Arı Sütü Örneklerinde Bazı Enzimatik Aktivite Ölçümleri

Arı sütünün farklı depolama koşullarında raf ömrü ve tazelik belirteci üzerine birçok çalışma yapılmasına rağmen, enzimatik aktiviteleri konusunda literatürde sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Ayrıca, GOx ve diğer antioksidan enzimlerin aktivitelerinin arı sütünün antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerini etkileyebilmesi, bu alandaki araştırmaların önemini daha da artırmaktadır. İnsan vücudunda veya gıda işlemede oluşan yüksek reaktif serbest radikaller, biyomolekülleri oksitleyerek hücre ölümüne ve doku hasarına yol açabilmektedir. Bu zararlı etkilerden korunmak için, organizmaların büyük bir çoğunluğunda SOD, CAT, peroksidaz, askorbat peroksidaz, glutatyon peroksidaz gibi çeşitli antioksidan enzimler görev almaktadır. Balda CAT ve SOD gibi antioksidan enzimlerin varlığı belirlenmiş olmasına rağmen, arı sütünde bu enzimlerin aktiviteleri üzerine çalışmalar oldukça sınırlıdır (Liu vd., 2008; Rakha vd., 2008; Zhang vd., 2010). Bu nedenle, arı sütündeki enzimatik aktivitelerin ölçülmesi, raf ömrü boyunca tazelik değerlendirmesi açısından önemli bir kriter olarak görülmektedir. Tez çalışmasında, farklı depolama sıcaklıkları ve sürelerinin etkisini ve tazelik belirteci olarak değerlendirmek amacıyla GOx ile antioksidan enzimlerden CAT ve SOD aktiviteleri incelendi.

Yapılan ölçümler sonucunda, CAT aktivitesi örneklerde tespit edilemedi. Arı sütünde CAT aktivitesinin saptanamaması, enzimin bu çalışmadaki arı sütü bileşiminde yer almadığını ya da aktivitesinin çok düşük seviyelerde olduğunu göstermektedir (Martinello & Mutinelli, 2021). Ayrıca bal ve polen gibi diğer arı ürünlerinde CAT enzimi üzerine çalışmalar yapılarak aktivitesi tespit edilmiş olmasına rağmen, literatürde arı sütünde CAT aktivitesine dair bir çalışmaya rastlanmamıştır (Weston, 2000; Huidobro vd., 2005). Suudi Arabistan'ın güneybatısındaki farklı monofloral ve polifloral ballarda CAT aktivitesinin 2.84 ± 1.24 U/g ile 4.35 ± 1.01 U/g arasında değiştiği ve bu farklılıkların coğrafi ve floral kökenlerden etkilendiği belirlenmiştir (Alshareef vd., 2022). Ayrıca, Osés vd. (2024) tarafından yapılan bir çalışmada, 24 farklı bal örneğinden bazılarında CAT enzimi

aktivitesinin tespit edilemediği, ancak bazı örneklerde ($88.54 \times 10^{-3} \text{dk}^{-1} \text{g}^{-1}$) yüksek seviyelerde aktivite gözlemlendiği bildirilmiştir.

Bu çalışmada, arı sütünde GOx aktivitesinin depolama sıcaklığı ve süresine bağlı olarak değişimi, arı sütü tazeliğinin değerlendirilmesinde GOx'un potansiyel bir gösterge olabileceğini bildirmektedir. GOx, arı sütü bileşiminde önemli bir enzim olup, ürettiği hidrojen peroksitten dolayı arı sütünün antimikrobiyal özelliğine katkı sağlamaktadır. Bu enzimin aktivitesindeki değişiklikler arı sütü kalitesini doğrudan etkileyen bir faktör olup tazelik göstergesi olarak da değerlendirilmektedir. Bu amaçla, taze arı sütünde ölçülen en yüksek GOx aktivite düzeyinin, depolama sıcaklığına bağlı olarak farklı hızlarda azaldığı gözlemlendi. Dondurulmuş (-20°C) ve soğutulmuş ($+4^{\circ}\text{C}$) koşullarda, ilk 6 ay boyunca enzim aktivitesinde nispeten yavaş bir azalma kaydedildi, ancak bu süreden sonra düşüş hızının arttığı belirlendi. Özellikle oda sıcaklığında depolanan örneklerde enzim aktivitesindeki azalma çok daha hızlı şekilde gerçekleşti ve 12. ay sonunda aktivite başlangıç değerinin yarısından daha düşük bir seviyeye geldiği tespit edildi. Bu bulgular, GOx enziminin yüksek sıcaklıklara ve uzun süreli depolama koşullarına oldukça duyarlı olduğunu göstermektedir. Sagona vd. (2022) tarafından farklı sıcaklık ve sürelerde depolanan arı sütlerinde yapılan bir çalışmada GOx aktivitesi, -18°C 'de 2 aylık depolama sonunda 772 U/mg protein olarak belirlenmiş, 1 yıl sonunda bu değer 433 U/mg protein'e düşmüştür. Bununla birlikte depolamaya bağlı olarak enzim aktivitesinde istatistiksel bir farklılık gözlemlenmemiştir. $+4^{\circ}\text{C}$ 'de depolanan örneklerde ise bu azalma daha belirgin olmuş; 2 aylık depolama sonunda 274 U/mg protein olan GOx aktivitesi, 1 yılın sonunda 62 U/mg protein'e düşmüştür. Bununla birlikte, 1 ile 4 yıl arasında depolanan örnekler arasında istatistiksel bir fark gözlemlenmemiştir. Benzer şekilde, farklı bir çalışmada ise $+4^{\circ}\text{C}$ ve -18°C 'de depolanan arı sütlerinin 2 yıl boyunca GOx aktivitesi araştırılmıştır (Kausar vd., 2023). Çalışmada, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de depolama sırasında aktivite düzeyleri 2. ayda 264,2, 6. ayda 142,8 ve 1 yıl sonunda 64,00 U/mg protein olarak ölçülmüş; önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Ancak, 6 aydan sonraki yıllarda aktivite değerleri arasında anlamlı bir fark kaydedilmemiştir. -18°C 'de depolanan arı sütlerinde ise 2 yıl boyunca önemli bir aktivite kaybı gözlemlenmemiştir. Li vd. (2008) ve Zhao vd. (2013), 6 ay ve 1 yıl depolama sonunda -20°C 'de muhafaza edilen arı sütlerinde GOx proteinlerinin tespit edilebildiğini, ancak $+4^{\circ}\text{C}$ ve oda sıcaklığında bu proteinin tamamen bozunduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de proteazların GOx'u parçalayarak aktivite kaybına neden olabileceğini ifade etmişlerdir. Li vd. (2007b) tarafından yapılan başka bir çalışmada, -20°C 'de 80 gün depolanan arı sütlerinde

GOx proteininin stabil olduğu, ancak +4°C ve oda sıcaklığında bu proteinin gözlemlenmediğı belirtilmiştir.

Bu sonuçlar, GOx'un arı sütü tazeliğinin potansiyel bir göstergesi olduğunu ve aktivitenin ilk 6 ay içinde hızlı bir şekilde düştüğünü göstermektedir. Ayrıca, dondurarak muhafaza (-18°C veya -20°C), GOx aktivitesini koruma açısından +4°C'de buzdolabı koşullarında depolamaya kıyasla daha etkili bir yöntemdir. GOx aktivitesindeki azalmanın, enzimin bozunmasının yanı sıra glukono-lakton gibi rekabetçi inhibitörlerden kaynaklı olabileceğı de bildirilmiştir.

SOD, süperoksit radikallerini hidrojen peroksit ve oksijene dönüştüren önemli bir antioksidan enzimdir. Bu çalışmada, taze arı sütü en yüksek SOD aktivitesini gösterirken, oda sıcaklığında uzun süreli depolama en düşük aktivite seviyesine neden oldu. Depolama süresince tüm sıcaklıklarda SOD aktivitesinde belirgin bir azalma gözlemlendi. -20°C'de muhafaza edilen örnekler, enzim aktivitesini diğer koşullara göre daha iyi korurken, oda sıcaklığında depolanan örneklerde daha hızlı bir düşüş gözlemlendi. Özellikle, ilk 3 ayda enzim aktivitesinde önemli oranda azalma meydana geldi ve depolama süresince devam etti.

Zheng vd. (2011) tarafından yapılan çalışmada aşılamadan 24, 48 ve 72 saat sonra hasat edilen arı sütü örneklerinin SOD aktivite değerleri sırasıyla 134,0, 147,0 ve 139,8 U/g olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada, hasat zamanları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,01$). Liu vd. (2008), farklı yaşlardaki (1, 2 ve 3 günlük) larva transferinden 24, 48 ve 72 saat sonra hasat edilen arı sütü örneklerinde SOD aktivitesinin 8,15 ila 3,62 U/g arasında değiştiğini belirlemiştir. Özellikle 3 günlük larvaların larval transferinden 72 saat sonra toplanan arı sütü örneklerinin, diğer örneklerle kıyasla önemli ölçüde daha yüksek SOD aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Ancak 1 günlük larvaların, larval transferinden 24 saat sonra toplanan arı sütü örneklerinin süperoksit radikal temizleme aktivitesinin en yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu bulgu, arı sütünün süperoksit radikal temizleyici etkisinin yalnızca SOD'a bağlı olmadığını ve diğer antioksidan bileşiklerin de bu etkiye katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, depolama sıcaklığının ve süresinin arı sütü SOD aktivitesi üzerinde önemli bir etkisi olduğunu göstermektedir. -20°C'de muhafaza edilen örnekler, aktiviteyi diğer depolama koşullarına göre daha iyi korurken, oda sıcaklığında depolanan örneklerde hızlı bir aktivite kaybı görülmüştür. SOD aktivitesindeki düşüş, yüksek sıcaklıkların enzimin yapısal stabilitesini bozmasından veya radikal oluşumunu artıran reaksiyonlara neden olmasından kaynaklanıyor olabileceğı düşünülmektedir.

4.10. Arı Sütü Örneklerinin Antioksidan Özellikleri

4.10.1. Antioksidan Aktivite

Arı sütü, proteinler, peptitler, fenolik bileşikler ve flavonoidler gibi zengin biyoaktif bileşenlere sahip olup, bu bileşiklerin sinerjik etkileşimi nedeniyle güçlü bir doğal antioksidan olarak bilinmektedir. Bu bileşikler, serbest radikalleri temizleme ve oksidatif stresi azaltma yeteneği ile arı sütünün sağlık yönetiminde potansiyel bir fonksiyonel gıda olarak değer kazanmasını sağlamaktadır (Uçar, 2019; Yükcünç, 2020; Li vd., 2021). Ayrıca arı sütü, insan metabolizmasının yanı sıra, yapısında gerçekleşen oksidatif reaksiyonlara karşı da önemli bir antioksidan savunma mekanizması sağlamaktadır.

Arı sütünün antioksidan özellikleri, ürünün stabilitesinin, fonksiyonel bütünlüğünün ve sağlık yararlarının korunmasında hayati bir öneme sahiptir; bu nedenle doğru depolama koşullarının sağlanması kritik bir gereklilik olarak öne çıkmaktadır. Qiao vd. (2018), oda sıcaklığında depolanan arı sütünde enzimatik olmayan esmerleşme ve protein agregasyonu gibi reaksiyonların, fenolik bileşiklerin stabilitesinde ve buna bağlı olarak antioksidan kapasitelerinde önemli kayıplara yol açabileceğini bildirmiştir. Depolama sırasında temel biyoaktif bileşiklerin bozunması, arı sütünün oksidatif stresle mücadele etme ve hücrel hasarı önleme kapasitesini azaltarak genel antioksidan aktivitede düşüşe neden olabilmektedir (Balkanska vd., 2017). Bununla birlikte, literatürde arı sütünün depolama koşullarına bağlı olarak antioksidan değişimi üzerine bir çalışmaya rastlanılmamış olup çalışma sonuçlarının literatüre önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

4.10.2. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Gücü (FRAP) ile Antioksidan Aktivite Tayini

Bu çalışmada taze arı sütü ve farklı depolama koşullarında muhafaza edilen örneklerin antioksidan aktivitesi, FRAP yöntemiyle iki farklı standart (Troloks ve $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) kullanılarak değerlendirilmiştir. Literatürdeki bulgular, arı sütünün güçlü antioksidan özelliklere sahip olduğunu ve bu özelliklerin protein, peptidler ve yağ asitleri başta olmak üzere biyoaktif bileşenlerden kaynaklandığını bildirmektedir.

Bu çalışmada taze arı sütü, $32,64 \pm 0,19$ μmol Troloks/100 g ve $114,97 \pm 0,52$ μmol $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /100 g değerleriyle en yüksek antioksidan aktiviteyi sergiledi. Bununla birlikte, oda sıcaklığında depolama sırasında antioksidan aktivitenin hızla azaldığı gözlemlendi. Bu azalma, yüksek sıcaklıkların biyoaktif bileşiklerin stabilitesini olumsuz etkilediğini

göstermektedir. Özellikle oda sıcaklığında depolanan örneklerde 3. ayda önemli bir düşüş kaydedildi ve 6. ayda en düşük değerler tespit edildi (19,07 μmol Troloks/100 g ve 78,60 μmol $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /100 g). Dondurulmuş (-20°C) saklama koşullarında 9. ayda anlamlı bir azalma belirlenmekle birlikte 12. ayda yeniden artış meydana geldi. Bu dalgalanmanın nedeni tam olarak açıklanamamakla birlikte, düşük sıcaklıklarda antioksidan bileşiklerin farklı formlara dönüşebileceği veya analiz sırasında çözünme koşullarının etkili olabileceği düşünülmektedir. Buna karşın, $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilen örneklerin antioksidan aktivitesinde önemli bir değişiklik gözlemlenmemesi, bu sıcaklıkta muhafazanın arı sütü için daha stabil bir koşul olabileceğini göstermektedir.

Literatürde, depolama koşullarının arı sütünün antioksidan aktivitesi üzerindeki etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bununla birlikte, taze arı sütünde elde edilen bulgular, literatürde bildirilen sonuçlarla uyumluluk göstermektedir. Kolaylı vd. (2016), Anadolu'dan elde edilen arı sütlerinin FRAP kapasitesini $566,4 \pm 238,6$ μmol Troloks/kg olarak belirlerken, Bulgaristan'dan temin edilen arı sütlerinde bu değerlerin daha düşük olduğu ($3,50 \pm 2,41$ mM Fe^{2+}/g) bildirilmiştir (Balkanska vd., 2017). Bu çalışmada, taze arı sütünün antioksidan kapasitesinin söz konusu arı sütlerine kıyasla daha yüksek olduğu tespit edildi. Benzer şekilde, Pavel vd. (2014), Romanya'da yerel ve ticari arı sütlerinde farklı antioksidan aktivite değerleri tespit edildi (sırasıyla $2,20 \pm 0,47$ mM Fe^{2+}/g ve $1,83 \pm 0,24$ mM Fe^{2+}/g). Bu farklılıkların, coğrafi köken, çevresel faktörler ve işleme yöntemleri gibi etkenlerin arı sütünün biyoaktif bileşimi üzerindeki etkilerinden kaynaklandığı bildirilmektedir. Dubey vd. (2023) tarafından Hindistan'dan toplanan arı sütü örneklerinde (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), %58,20 ile %66,59 arasında değişen antioksidan kapasite belirlenmiştir. Arı sütünün güçlü antioksidan kapasitesinin biyoaktif maddelerin varlığına atfedilebileceği ifade edilmektedir.

4.10.3. DPPH ve ABTS Radikali Süpürme Aktivitesi Tayini

Bu çalışmada, arı sütünün DPPH ve ABTS yöntemleri ile antioksidan aktivitesi değerlendirilmiş ve depolama koşullarının bu aktivite üzerindeki etkisi incelenmiştir.

DPPH yöntemiyle yapılan ölçümlerde, taze arı sütünün 0,69 μmol Troloks/g ve 19,44 mg/mL (SC50) düzeyinde önemli bir antioksidan aktivite gösterdiği belirlendi. Bu bulgular, literatürde bildirilen diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında önemli bir yere sahiptir. Al-Okbi vd., (2022), arı sütlerinin antioksidan kapasitesini 0.43-5.634 mM TEAC/mg olarak

belirlemiş ve bu çalışmada taze arı sütünde belirlenen 0,69 μmol Troloks/g ile uyumluluk göstermiştir. Kolaylı vd. (2016), Türkiye’den elde edilen çeşitli arı sütlerinin DPPH radikal süpürme aktivitesini değerlendirerek SC50 değerlerinin 67,5-212,4 mg/mL arasında değiştiğini bildirmiştir. Hint arı sütlerinde 100 $\mu\text{g/mL}$ ’lik konsantrasyonda DPPH radikal süpürme aktivitesinin %65,55 ile %78,67 arasında değiştiği, IC50 değerlerinin 45,63-58,86 mg/mL olduğu belirlenmiştir (Dubey vd., 2023). Bu çalışmada elde edilen SC50 değeri (19,44 mg/mL), Kolaylı vd. (2016) ve Dubey vd. (2023)’nin çalışmalarında bildirilen değerlere göre daha düşüktür. Bu durum, çalışmada kullanılan taze arı sütünün diğer arı sütlerine kıyasla daha güçlü bir antioksidan kapasiteye sahip olduğunu göstermektedir. El-Guendouz vd. (2020), farklı Akdeniz ülkelerinden elde edilen arı sütlerinin IC50 değerlerini 0,2-6,4 mg/mL arasında bildirmişlerdir. Akdeniz bölgesinden elde edilen bu düşük IC50 değerleri, arı sütlerinin oldukça yüksek bir antioksidan kapasiteye sahip olduğunu belirtmektedir. Bu çalışmada taze arı sütü için belirlenen SC50 değeri, El-Guendouz vd. (2020)’nin bulgularından daha yüksek bulundu. Bu farklılıkların temelinde, coğrafi köken, çevresel koşullar, flora çeşitliliği, işleme teknikleri ve depolama koşulları gibi faktörlerin yer aldığı bildirilmektedir.

Bulgular, taze arı sütünün güçlü bir antioksidan kapasiteye sahip olduğunu, ancak depolama süresi ve sıcaklığına bağlı olarak belirgin değişimler meydana geldiğini göstermektedir. -20°C ve $+4^{\circ}\text{C}$ ’de depolanan örneklerde, depolama süresi boyunca düşük seviyede ancak anlamlı bir azalma gözlemlendi ve 12 ay sonunda bu değerler sırasıyla 0,67 μmol ve 0,62 μmol Troloks/g olarak belirlendi. $+4^{\circ}\text{C}$ ’de saptanan düşüşün -20°C ’ye göre daha fazla olması, düşük sıcaklıkların antioksidan kapasitenin korunmasında daha etkili olduğunu göstermektedir. Oda sıcaklığında depolanan arı sütlerinde, özellikle ilk üç ayda belirgin bir azalma gözlemlendi ve 12 ayın sonunda aktivite 0,55 μmol Troloks/g seviyesine düştü. Benzer şekilde, depolama sürecinin başlangıcından itibaren tüm sıcaklıklarda SC50 değerlerinde de istatistiksel olarak anlamlı artışların olduğu belirlendi ($p<0,05$). SC50 değerlerindeki bu artış, antioksidan etkinliğin depolama süresi boyunca azaldığını göstermektedir. Bu bulgularla arı sütü gibi biyoaktif bileşenler açısından zengin ürünlerin yüksek sıcaklıklarda depolanmasının, ürünün işlevselliği ve biyolojik aktivitesi üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu sonucuna varılmaktadır. Buna karşılık, düşük sıcaklıklarda (-20°C) muhafaza edilen örneklerde antioksidan kapasitenin daha iyi korunması, biyoaktif bileşenlerin sıcaklık duyarlılığını ve düşük sıcaklıklarda daha stabil kaldığını göstermektedir.

Bu çalışmada, ABTS yöntemiyle taze arı sütünün 3,19 μmol Troloks/g ve 7,53 mg/mL SC50 düzeyinde yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edildi. Dundar vd. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada, arı sütlerinin antioksidan kapasitesi 0,02-0,92 μmol TE/g olarak belirlenmiş ve bu çalışmada elde edilen değerlerin daha yüksek olduğu görülmüştür. Farklı bir çalışmada, Kuzey Tayland'dan elde edilen arı sütlerinin 0,89 ile 4,13 mg TEAC/g arasında değişen antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Uthaibutra vd., 2023). Ayrıca Dubey vd. (2023), Hint arı sütlerinin IC50 değerlerini 21,80-55,90 mg/mL arasında tespit etmiş ve bu değerlerin çalışmada elde edilen SC50 değerinden daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. El-Guendouz vd. (2020), farklı Akdeniz ülkelerinden elde edilen arı sütlerinin IC50 değerlerini ABTS yöntemiyle 2,0-12,9 mg/mL arasında tespit etmiş ve bu çalışmada elde edilen 7,53 mg/mL SC50 değeri, El-Guendouz vd. (2020)'nin belirlediği aralıkta yer almıştır.

Depolama koşulları ve sürenin, arı sütünün antioksidan kapasitesini korumada belirleyici bir etkiye sahip olduğu saptandı. -20°C 'de muhafaza edilen arı sütlerinde, depolama süresince yavaş bir azalma görülmekle birlikte bu azalmanın, son üç aylık dönemde hızlandığı tespit edildi. $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilen örneklerde ise özellikle 6. aydan itibaren istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş meydana geldi ($p<0,05$). Depolama koşulları açısından değerlendirildiğinde, -20°C 'de muhafaza edilen arı sütlerinin antioksidan kapasitesini diğer sıcaklıklara göre daha iyi koruduğu belirlendi. Benzer şekilde, Dünder vd. (2022) tarafından yapılan çalışmada, arı sütlerinin $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 6 aylık depolama sürecinde, 4. aydan itibaren antioksidan kapasitede belirgin bir düşüş olduğu bildirilmiştir. Oda sıcaklığında muhafaza edilen arı sütlerinde ise ilk üç ayda hızlı bir düşüş gözlemlendi, ancak 9. aydan itibaren az oranda bir artış kaydedildi. Depolama sonunda, -20°C , $+4^{\circ}\text{C}$ ve oda sıcaklığında saklanan örneklerin antioksidan aktivite değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). Bu durum, düşük sıcaklıklarda uzun süreli depolamanın antioksidan kapasite üzerinde olumsuz etkiler oluşturabildiğini göstermektedir.

SC50 değerleri açısından değerlendirildiğinde, taze arı sütü en yüksek antioksidan kapasiteyi sergilerken, oda sıcaklığında 12 ay boyunca depolanan örneklerin en düşük kapasiteye sahip olduğu belirlendi (20,52 mg/mL). Özellikle oda sıcaklığında depolamanın, antioksidan kapasite üzerinde daha hızlı ve belirgin bir düşüşe yol açtığı tespit edildi. Depolama süresi ilerledikçe SC50 değerlerindeki artış, taze arı sütünün başlangıçtaki antioksidan kapasitesini ve depolama sürecinin bu kapasite üzerindeki olumsuz etkisini göstermektedir. Bu bulgular, literatürdeki çalışmalarla karşılaştırıldığında büyük ölçüde

uyum göstermekte ve saklama koşullarının arı sütü gibi biyoaktif bileşenler açısından zengin ürünler üzerinde kritik bir öneme sahip olduğunu desteklemektedir.

Sonuç olarak, taze arı sütü, literatürde bildirilen birçok değere kıyasla oldukça yüksek bir antioksidan kapasite sergilemekle birlikte, bu kapasitenin depolama koşullarına bağlı olarak önemli ölçüde değişebileceği görülmektedir. Özellikle oda sıcaklığında depolanan örneklerde aktivitenin hızlı bir şekilde azalması, arı sütü gibi doğal ürünlerin etkinliğinin korunması için uygun depolama koşullarının sağlanmasının önemini vurgulamaktadır. Depolama sırasında yaşanan kayıplar, arı sütü gibi biyoaktif bileşenler açısından zengin ürünlerin uzun süreli muhafazasında daha etkili koruma yöntemlerinin geliştirilmesinin önemini göstermektedir.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez çalışması, arı sütünün tazelik ve kalitesini farklı parametrelerle değerlendirerek, bu değerli ürünün besin değeri, kalite standartları ve terapötik etkilerini korumaya yönelik bir araştırma sunmaktadır. Bu özelliklerin korunmasında arı sütünün tazeliği, belirleyici bir rol oynamaktadır.

Bu amaçla taze arı sütü farklı depolama sıcaklıklarında (-20°C, +4°C ve oda sıcaklığı) ve sürelerde (0, 3, 6, 9 ve 12 ay) muhafaza edildi. Tezin ilk kısmında arı sütünün depolama sıcaklığı ve süresine bağlı olarak fizikokimyasal özelliklerindeki (nem, pH, titre edilebilir asitlik, renk, protein, yağ, kül ve 10-HDA içerikleri) değişimlerin tazelik ve kalite üzerindeki etkileri değerlendirildi. Çalışma kapsamında, arı sütünde ilk kez renk, protein, yağ ve kül içeriklerinin depolama koşullarına bağlı olarak değişimi değerlendirildi. Çalışma bulguları, arı sütünün fizikokimyasal stabilitesinin düşük sıcaklık koşullarında (-20°C veya +4°C) daha iyi korunduğunu belirledi. Oda sıcaklığında ise özellikle nem, pH, asitlik, suda çözünür protein ve renk değerlerinde önemli değişiklikler gözlemlendi. Arı sütünde önemli bir kalite göstergesi olan 10-HDA'nın oda sıcaklığı koşullarında dahi büyük ölçüde stabilitesini sürdürdüğü belirlendi. 10-HDA dahil fizikokimyasal parametrelerin tek başına arı sütünün tazeliğini değerlendirmede uygun bir indikatör olmadığı düşünülmektedir.

Fizikokimyasal özelliklerle birlikte depolama sıcaklık ve süresinin arı sütü örneklerinin protein ve şeker profilleri üzerindeki etkileri incelendi. Arı sütü örneklerinin SDS-PAGE yöntemi ile protein profilleri, depolama sıcaklığı ve süresine bağlı olarak önemli farklılıklar gösterdi. MRJP oranı, düşük sıcaklıkta büyük ölçüde korunmakla birlikte oda koşullarında belirgin azalmalar tespit edildi. Şeker profilinin başlıca bileşenleri, glukoz, fruktoz ve sakkaroz olarak belirlendi ve toplam şeker oranlarının düşük sıcaklıklarda stabilitesini daha iyi koruduğu tespit edildi.

Bu çalışmada, arı sütünde protein, lipid ve şeker oksidasyonunun göstergeleri olan sırasıyla İOPÜ, MDA ve HMF içeriklerinin depolama sıcaklığı ve süresine bağlı değişimi değerlendirildi. İOPÜ tayini, ilk kez bir gıdada protein oksidasyonunu değerlendirmek amacıyla kullanıldı. Başlangıçta düşük seviyelerde belirlenen oksidasyon ürünlerinin, -20°C ve +4°C'de depolanan örneklerde yavaş bir artış gösterdiği ve bu sıcaklığın oksidasyon süreçlerini minimum düzeyde etkilediği belirlendi. İOPÜ konsantrasyonu oda sıcaklığında 9 ay sonunda en yüksek seviyeye ulaşırken (5,57 µmol/g protein), -20°C'de bu değer 2,17

$\mu\text{mol/g}$ protein olarak belirlendi. Benzer şekilde, MDA ve HMF seviyeleri de oda sıcaklığında belirgin bir artış gösterdi. Bu bulgular, düşük sıcaklıklarda depolamanın, oksidasyon süreçlerini yavaşlatarak arı sütü kalitesini koruma açısından büyük bir öneme sahip olduğunu göstermektedir. Oda sıcaklığında depolamanın ise oksidatif bozulmaları hızlandırarak, arı sütünün besin değerini ve terapötik özelliklerini olumsuz etkilediği görüldü. İOPÜ konsantrasyonu, sıcaklık ve depolama süresine bağlı olarak ilk aylardan itibaren istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi. Tüm depolama sıcaklıklarında oksidasyon düzeyinde kademeli artışın belirlenmiş olması, bu yöntemin arı sütünde tazelik göstergesi olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Arı sütünde MDA ölçümleri, bu ürünün depolama koşullarına duyarlılığını ortaya koyarken, aynı zamanda analiz yöntemlerinin geliştirilmesi gerektiğini de belirtmektedir. Özellikle, girişim yapan bileşiklerin ölçümlere olan etkisini en aza indirmek amacıyla daha spesifik analiz yöntemlerinin kullanımı ve uygun ekstraksiyon çözücülerinin ve yöntemlerinin seçimi büyük önem taşımaktadır. HMF içeriğindeki değişimin yalnızca oda koşullarında depolanan örneklerde gözlemlendiği, bu nedenle ancak oda koşullarında muhafaza edilen arı sütlerinde değerlendirme kriteri olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, arı sütünün kompleks yapısından dolayı farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak daha fazla örnek üzerinde çalışmalar yapılması ve bu yöntemlerin standardize edilmesi büyük önem taşımaktadır. Alternatif analiz tekniklerinin uygulanması ve metodolojilerin optimizasyonu, arı sütü gibi hassas ürünlerin kalite kontrol süreçlerini iyileştirerek daha güvenilir sonuçlar elde edilmesine katkı sağlayacaktır.

Depolama sıcaklığı ve süresinin arı sütü örneklerinin enzimatik aktiviteleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu tespit edildi. Taze arı sütünde en yüksek seviyede bulunan SOD ve GOx enzimleri, düşük sıcaklık koşullarında stabilitesini daha iyi korudu. Bununla birlikte -20°C 'de muhafaza edilen örneklere kıyasla, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de daha düşük aktivite değerleri belirlendi. Oda sıcaklığında depolanan örneklerde ise enzim aktivitesinde hızlı ve belirgin bir düşüş meydana geldi. Enzim aktivitesinin tüm depolama koşullarında değişim göstermesi, tazelik göstergesi olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ancak enzimlerin yapısal ve aktivite bütünlüğünün çevresel koşullara karşı hassas olması, bu değerlendirmenin verimliliğini olumsuz etkileyebilmektedir. Bu nedenle arı sütü örneklerinin laboratuvara soğuk zincirde taşınması ve hızlı analiz yöntemleri, enzimlerin biyokimyasal özelliklerini korumada kritik bir rol oynayacaktır. Bununla birlikte, farklı

ekstraksiyon ve analiz yöntemleri kullanılarak daha fazla örnek üzerinde çalışmalar yapılması önem taşımaktadır.

Arı sütü örneklerinin antioksidan aktivitesinin depolama sıcaklığı ve süresine bağlı olarak önemli ölçüde değiştiği tespit edildi. Taze arı sütü, en yüksek antioksidan kapasiteye sahipken, -20°C ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilen örneklerde bu değerler sınırlı düzeyde bir azalma gösterdi. Buna karşılık, oda sıcaklığında depolanan örneklerde antioksidan aktivitede hızlı ve belirgin bir düşüş kaydedildi. FRAP, DPPH ve ABTS yöntemleriyle belirlenen antioksidan aktivite değerleri, düşük sıcaklıkların, antioksidan kapasitenin korunmasında önemli bir rol oynadığını gösterdi.

Arı sütünün kalite parametrelerinin korunabilmesi ve sürdürülebilir bir şekilde değerlendirilebilmesi için uygun depolama koşullarının sağlanması, kalite standartlarının belirlenmesi ve kapsamlı bilimsel çalışmaların yapılması büyük önem taşımaktadır. Ayrıca arı sütü için ulusal ve uluslararası düzeyde standart kalite kriterlerinin oluşturulması; bu standartların, farklı coğrafik bölgelerde ve üretim yöntemlerinde geçerliliğini değerlendirmek amacıyla daha geniş kapsamlı standardizasyon çalışmalarının yapılması gereklilik arz etmektedir.

Arı sütü tazeliğini ve kalite seviyesini hızlı, güvenilir ve ekonomik bir şekilde ölçebilecek yeni yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Mevcut analiz yöntemlerinin zorlukları ve yüksek maliyeti, pratik uygulamaları sınırlamaktadır. Ayrıca, arı sütünün farklı sıcaklık ve sürelerde depolanması esnasında oluşan fizikokimyasal değişimlerin sistematik bir şekilde incelenmesi, uygun depolama koşullarına dayalı raf ömrü sürelerinin belirlenmesine katkı sağlayacaktır. Depolama süreçlerinde kalite kaybına yol açan faktörlerin tespit edilmesi hem üretim hem de tüketim aşamalarında iyileştirmelere olanak tanıyacaktır.

Kalite standartlarının ve uygun depolama koşullarının uygulanması konusunda farkındalık oluşturulması ve eğitim programlarının düzenlenmesi büyük önem taşımaktadır. Arı sütü üreticileri, tüketicileri ve sektörde yer alan diğer paydaşlar, uygun depolama ve tüketim koşulları hakkında bilgilendirilmelidir. Bu doğrultuda düzenlenecek eğitim programları ve atölye çalışmalarıyla üreticilerin bilimsel veriler ışığında daha bilinçli üretim yapması, tüketicilerin ise doğru saklama ve tüketim alışkanlıklarına yönlendirilmesini sağlayacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, arı sütünün besin değeri ve biyoaktif özelliklerini koruyarak daha uzun süre saklanabilmesi için düşük sıcaklıkta muhafaza edilmesi, uluslararası kalite

standartlarının oluşturulması ve tazelik tespitine y6nelik yenilik6i y6ntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu alanda ger6ekleştirilecek kapsamlı ve disiplinler arası 6alışmalar hem bilimsel literat6re hem de arı 6r6nleri sekt6r6ne değerli katkılar sunacak ve daha g6venilir, y6ksek kaliteli 6r6nlerin t6keticide ulaşmasını m6mk6n kılacaktır.



6. KAYNAKLAR

- Abdelhafiz, A. T., & Muhamad, J. A. (2008). Midcycle pericoital intravaginal bee honey and royal jelly for male factor infertility. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 101(2), 146-149.
- Abdelnur, P. V., Abe, S., Cunha, I. B., Lima-Pallone, J. A., Godoy, H. T., Eberlin, M. N., & Catharino, R. R. (2011). Metabolic fingerprinting of royal jelly: characterization and proof of authenticity. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 3(4), 185-190.
- Abdul Salam, A., Abrash, A., Al Quobaili, F., & Ghada, N. (2000). Al Akhras. Catalase evaluation in different human diseases associated with oxidative strss. *Saudi Medical Journal*, 21(9), 826-30.
- Abdulmalik, O., Safo, M. K., Chen, Q., Yang, J., Brugnara, C., Ohene-Frempong, K., ... & Asakura, T. (2005). 5-hydroxymethyl-2-furfural modifies intracellular sickle haemoglobin and inhibits sickling of red blood cells. *British journal of haematology*, 128(4), 552-561.
- Admassu, S., & Kebede, M. (2019). Application of antioxidants in food processing industry: Options to improve the extraction yields and market value of natural products. *Adv. Food Technol. Nutr. Sci*, 5, 38-49.
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 121-126). Academic press.
- Ahmad, S., Campos, M. G., Fratini, F., Altaye, S. Z., & Li, J. (2020). New insights into the biological and pharmaceutical properties of royal jelly. *International journal of molecular sciences*, 21(2), 382.
- Ahmed, M. J. P. T., Pickova, J., Ahmad, T., Liaquat, M., Farid, A., & Jahangir, M. (2016). Oxidation of lipids in foods. *Sarhad Journal of Agriculture*, 32(3), 230-238.
- Aksakal, E., Ekinici, D., & Supuran, C. T. (2021). Dietary inclusion of royal jelly modulates gene expression and activity of oxidative stress enzymes in zebrafish. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 36(1), 885-894.
- Aksoy, L., & Alper, Y. (2019). The effects of royal jelly on oxidative stress and toxicity in tissues induced by malathion, an organophosphate insecticide. *Journal of the hellenic veterinary medical society*, 70(2), 1517-1524.
- Al-Abbasy, O. Y., Younus, S. A., Rashan, A. I., & Ahmad, O. A. S. (2024). Maillard reaction: formation, advantage, disadvantage and control. A review. *Food Science and Applied Biotechnology*, 7(1), 145-161.

- Alam, S., Malik, S., Tariq, K., Israr, M., & Iqbal, S. (2023). Major royal jelly proteins (MRJPs) of Honeybees, Functions, and Biological Activities. *Egyptian Journal of Agricultural Research*, 101(2), 253-266.
- Alattal, Y. Z., Bazeyad, A. Y., & Al Ghamdi, A. A. (2025). Variation in chemical composition of fresh and commercial Royal Jelly associated with international standards. *Journal of Food Composition and Analysis*, 138, 107017.
- Alcalá-Escamilla, K. I., & Moguel-Ordóñez, Y. B. (2024). Main bioactive components and therapeutic properties of bee (*Apis mellifera* L.) venom. Review. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 15(1), 230-248.
- Ali, A. M., & Kunugi, H. (2020). Apitherapy for age-related skeletal muscle dysfunction (sarcopenia): A review on the effects of royal jelly, propolis, and bee pollen. *Foods*, 9(10), 1362.
- Ali, H. M. (2024). Efficient and sensitive determination of storage time-temperature marker 5-hydroxy methyl furfural in bee honey based on Fluorescence quenching of human serum albumin. *Microchemical Journal*, 200, 110427.
- Alimentarius, C. (2001). Revised codex standard for honey. *Codex stan*, 12, 1982.
- Al-Lawati, H. (2009). *Impact of the age on early embryonic mortality (EEM) and embryo quality in the honey bee (Apis mellifera L.)*. Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät.
- Al-Okbi, S. Y., & Al-Siedy, E. S. (2022). Anticancer, antioxidant, and antihyperlipidemic effects of royal jelly. *Journal of The Arab Society for Medical Research*, 17(1), 68-76.
- Alshareef, R. M. H., Al-Farhan, B. S., & Mohammed, M. E. A. (2022). Glucose oxidase and catalase activities in honey samples from the Southwestern region of Saudi Arabia. *Applied Sciences*, 12(15), 7584.
- Altınışık, M., A. D, A. T. F. B. (2000). Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar. ADÜ Tıp Fakültesi, Biyokimya AD. Aydın. <https://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01s.pdf>.
- Alu'datt, M. H., Al-u'datt, D. A., Rababah, T., Gammoh, S., Alrosan, M., Bani-Melhem, K., ... & Abubaker, M. (2024). Recent research directions on functional royal jelly: highlights prospects in food, nutraceutical, and pharmacological industries. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-14.
- Alzagat, A. A., & Alli, I. (2002). Protein-lipit interactions in food systems: A review. *International journal of food sciences and nutrition*, 53(3), 249-260.
- Andrés-Bello, A., Barreto-Palacios, V. I. V. I. A. N., García-Segovia, P., Mir-Bel, J., & Martínez-Monzó, J. (2013). Effect of pH on color and texture of food products. *Food Engineering Reviews*, 5, 158-170.

- Antinelli, J. F., Zeggane, S., Davico, R., Rognone, C., Faucon, J. P., & Lizzani, L. (2003). Evaluation of (E)-10-hydroxydec-2-enoic acid as a freshness parameter for royal jelly. *Food chemistry*, 80(1), 85-89.
- Anwar, S., Alrumaihi, F., Sarwar, T., Babiker, A. Y., Khan, A. A., Prabhu, S. V., & Rahmani, A. H. (2024). Exploring Therapeutic Potential of Catalase: Strategies in Disease Prevention and Management. *Biomolecules*, 14(6), 697.
- AOAC (2012). Official Methods of Analysis. 19th Edition, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Arribas-Lorenzo, G., & Morales, F. J. (2010). Estimation of dietary intake of 5-hydroxymethylfurfural and related substances from coffee to Spanish population. *Food and Chemical Toxicology*, 48(2), 644-649.
- Authority, E. F. S. (2022). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020. *EFSA Journal*, 20(3).
- Azzi, A. (2004). The role of α -tocopherol in preventing disease. *European journal of nutrition*, 43, i18-i25.
- Badanai, J., Silva, C., Martins, D., Antunes, D., & Miguel, M. G. (2015). Ability of scavenging free radicals and preventing lipid peroxidation of some phenols and ascorbic acid. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(8), 034-041.
- Bafana, A., Dutt, S., Kumar, S., & Ahuja, P. S. (2011). Superoxide dismutase: an industrial perspective. *Critical reviews in biotechnology*, 31(1), 65-76.
- Balkanska, R. (2018). Determination of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid in royal jelly by high performance liquid chromatography after different bee feeding. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(4), 3738-3743.
- Balkanska, R., Marghitas, L. A., & Pavel, C. I. (2017). Antioxidant activity and total polyphenol content of royal jelly from Bulgaria. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 6(10), 578-585.
- Bamdad, F., Ahmed, S., & Chen, L. (2015). Specifically designed peptide structures effectively suppressed oxidative reactions in chemical and cellular systems. *Journal of Functional Foods*, 18, 35-46.
- Bao, Y., & Erthjerg, P. (2019). Effects of protein oxidation on the texture and water-holding of meat: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(22), 3564-3578.
- Baptista, B. G., Lima, L. S., Ribeiro, M., Britto, I. K., Alvarenga, L., Kemp, J. A., ... & Mafra, D. (2023). Royal jelly: a predictive, preventive and personalised strategy for novel treatment options in non-communicable diseases. *EPMA Journal*, 14(3), 381-404.

- Bărnuțiu, L. I., Mărghițaș, L. A., Dezmirean, D. S., Mihai, C. M., & Bobiș, O. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of Royal Jelly-REVIEW. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 44(2), 67-67.
- Basaran, B., Anlar, P., Oral, Z. F. Y., Polat, Z., & Kaban, G. (2022). Risk assessment of acrylamide and 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) exposure from bread consumption: Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 107, 104409.
- Batool, S., Ahmed, I., Sarwar, M., & Hassan, H. U. (2012). Relationship of uric acid with superoxide dismutase (Sod) in induced hyperuricemic rat model. *Pharmacology & Pharmacy*, 3(4), 404-408.
- Bauer, J. A., Zámocká, M., Majtán, J., & Baueroová-Hlinková, V. (2022). Glucose oxidase, an enzyme “Ferrari”: Its structure, function, production and properties in the light of various industrial and biotechnological applications. *Biomolecules*, 12(3), 472.
- Bava, R., Castagna, F., Lupia, C., Poerio, G., Liguori, G., Lombardi, R., ... & Palma, E. (2024). Hive Products: Composition, Pharmacological Properties, and Therapeutic Applications. *Pharmaceuticals*, 17(5), 646.
- Bazeyad, A. Y., Al-Ghamdi, A. A., & Alattal, Y. Z. (2022). Physicochemical characteristics of local royal jelly produced in Al-Baha region, Saudi Arabia. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 14(1), 284-292.
- Becker, E. M., Nissen, L. R., & Skibsted, L. H. (2004). Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, 219, 561-571.
- Beltekin, B., & Demir, N. (2022). Arı Sütü Üretimi ve Bazı Biyoaktif Özellikleri. *Uluslararası Gıda Tarım ve Hayvan Bilimleri Dergisi*, 2(1), 38-46.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1999). [2] Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 15-27). Academic press.
- Berton-Carabin, C. C., Ropers, M. H., & Genot, C. (2014). Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Involvement of the interfacial layer. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 945-977.
- Beykaya, M., Inkaya, N. N., Yorulmaz Onder, E., Arici, Y. K., & Sahin, H. (2023). Comprehensive Study of the Physicochemical Properties of Royal Jelly from Various Regions of Türkiye. *Chemistry & Biodiversity*, 20(9), e202300881.
- Bílikova, K., Huang, S. C., Lin, I. P., Šimůth, J., & Peng, C. C. (2015). Structure and antimicrobial activity relationship of royalisin, an antimicrobial peptide from royal jelly of *Apis mellifera*. *Peptides*, 68, 190-196.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World allergy organization journal*, 5, 9-19.

- Boden, G., Homko, C., Barrero, C. A., Stein, T. P., Chen, X., Cheung, P., ... & Merali, S. (2015). Excessive caloric intake acutely causes oxidative stress, GLUT² carbonylation, and insulin resistance in healthy men. *Science translational medicine*, 7(304), 304re7-304re7.
- Bogdanov, S., & Baumann, E. (1988). Bestimmung von Honigzucker mit HPLC. *Mitt. Geb. Lebensm. Hyg*, 79, 198-206.
- Boselli, E., Caboni, M. F., Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L., & Lercker, G. (2003). Determination and changes of free amino acids in royal jelly during storage. *Apidologie*, 34(2), 129-137.
- Botezan, S., Baci, G. M., Bagameri, L., Pașca, C., & Dezmirean, D. S. (2023). Current status of the bioactive properties of royal jelly: a comprehensive review with a focus on its anticancer, anti-inflammatory, and antioxidant effects. *Molecules*, 28(3), 1510.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Brudzynski, K., Abubaker, K., St-Martin, L., & Castle, A. (2011). Re-examining the role of hydrogen peroxide in bacteriostatic and bactericidal activities of honey. *Frontiers in microbiology*, 2, 213.
- Bucekova, M., Godocikova, J., Kohutova, L., Danchenko, M., Barath, P., & Majtan, J. (2023). Antibacterial activity and bee-derived protein content of honey as important and suitable complementary tools for the assessment of honey quality. *Journal of Food Composition and Analysis*, 123, 105610.
- Bucekova, M., Juricova, V., Monton, E., Martinotti, S., Ranzato, E., & Majtan, J. (2018). Microwave processing of honey negatively affects honey antibacterial activity by inactivation of bee-derived glucose oxidase and defensin-1. *Food chemistry*, 240, 1131-1136.
- Buttstedt, A., Moritz, R. F., & Erler, S. (2013). More than royal food-Major royal jelly protein genes in sexuals and workers of the honeybee *Apis mellifera*. *Frontiers in zoology*, 10, 1-10.
- Buttstedt, A., Moritz, R. F., & Erler, S. (2014). Origin and function of the major royal jelly proteins of the honeybee (*Apis mellifera*) as members of the yellow gene family. *Biological Reviews*, 89(2), 255-269.
- Buttstedt, A., Mureșan, C. I., Lilie, H., Hause, G., Ihling, C. H., Schulze, S. H., ... & Moritz, R. F. (2018). How honeybees defy gravity with royal jelly to raise queens. *Current Biology*, 28(7), 1095-1100.

- Calligaris, S., Manzocco, L., Anese, M., & Nicoli, M. C. (2016). Shelf-life assessment of food undergoing oxidation—a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(11), 1903-1912.
- Capuano, E., & Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT-food science and technology*, 44(4), 793-810.
- Cardenia, V., Rodriguez-Estrada, M. T., Boselli, E., & Lercker, G. (2013). Cholesterol photosensitized oxidation in food and biological systems. *Biochimie*, 95(3), 473-481.
- Čeksterytė, V., Bliznikas, S., & Jaškūnė, K. (2023). The Composition of Fatty Acids in Bee Pollen, Royal Jelly, Buckthorn Oil and Their Mixtures with Pollen Preserved for Storage. *Foods*, 12(17), 3164.
- Chaozhong, T. A. N. G., & Youlu, Y. U. A. N. (1999). Effect of temperature on the activity of SOD in royal jelly. *Bee Science in China*, 50(3), 10-13.
- Chelikani, P. V. (2004). Probing the structure of Escherichia coli catalase HPIL.
- Chen, C., & Chen, S. Y. (1995). Changes in protein components and storage stability of royal jelly under various conditions. *Food chemistry*, 54(2), 195-200.
- Chen, D., Ai, X., Li, Y., Li, Y., Ao, Y., Rong, J., & Li, G. (2023). Protective effects of Cu/Zn-SOD and Mn-SOD on UVC radiation-induced damage in NIH/3T3 cells and murine skin. *Acta Histochemica*, 125(4), 152030.
- Chen, Y. F., You, M. M., Liu, Y. C., Shi, Y. Z., Wang, K., Lu, Y. Y., & Hu, F. L. (2018). Potential protective effect of Trans-10-hydroxy-2-decenoic acid on the inflammation induced by Lipoteichoic acid. *Journal of functional foods*, 45, 491-498.
- Choe, E., & Min, D. B. (2006). Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 46(1), 1-22.
- Choudhary, A., Kumar, V., Kumar, S., Majid, I., Aggarwal, P., & Suri, S. (2021). 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) formation, occurrence and potential health concerns: Recent developments. *Toxin Reviews*, 40(4), 545-561.
- Cinar A., Oral, R. A., & Demircan, H. (2018). Patent No TR201810669A2. Türk Patent Enstitüsü. Enkapsüle edilmiş bir arı sütü ve ilgili üretim yöntemi. <https://patents.google.com/patent/TR201810669A2/tr>.
- Ciulu, M., Farre, R., Floris, I., Nurchi, V. M., Panzanelli, A., Pilo, M. I., ... & Sanna, G. (2013). Determination of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in royal jelly by a rapid reversed phase HPLC method. *Analytical Methods*, 5(19), 5010-5013.
- Ciulu, M., Floris, I., Nurchi, V. M., Panzanelli, A., Pilo, M. I., Spano, N., & Sanna, G. (2015). A possible freshness marker for royal jelly: Formation of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde as a function of storage temperature and time. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(16), 4190-4195.

- Collazo, N., Carpena, M., Nuñez-Estevez, B., Otero, P., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2021). Health promoting properties of bee royal jelly: Food of the queens. *Nutrients*, 13(2), 543.
- Corzo-Martínez, M., Corzo, N., Villamiel, M., & Del Castillo, M. D. (2012). Browning reactions. *Food biochemistry and food processing*, 56-83.
- Coutinho, D., Karibasappa, S. N., & Mehta, D. S. (2018). Royal jelly antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. *Journal of Interdisciplinary Dentistry*, 8(1), 18-22.
- Czerwonka, M., Pietrzak-Sajjad, R., & Bobrowska-Korczak, B. (2020). Evaluation of 5-hydroxymethylfurfural content in market milk products. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37(7), 1135-1144.
- Dalle-Donne, I., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., Tell, G., Lungarella, G., ... & Milzani, A. (2005). Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass spectrometry reviews*, 24(1), 55-99.
- Dang, D. X., Hoque, M. R., Liu, Y., Chen, N., & Kim, I. H. (2021). Dietary glucose oxidase supplementation improves growth performance, apparent nutrient digestibility, and serum antioxidant enzyme parameters in growing pigs. *Italian Journal of Animal Science*, 20(1), 1568-1574.
- Daniele, G., & Casabianca, H. (2012). Sugar composition of French royal jelly for comparison with commercial and artificial sugar samples. *Food Chemistry*, 134(2), 1025-1029.
- Davies, M. J. (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1703(2), 93-109.
- Davies, M. J. (2016). Protein oxidation and peroxidation. *Biochemical journal*, 473(7), 805-825.
- Degl'Innocenti, E., Guidi, L., Pardossi, A., & Tognoni, F. (2005). Biochemical study of leaf browning in minimally processed leaves of lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *Acephala*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(26), 9980-9984.
- Delgado-Andrade, C. (2014). Maillard reaction products: some considerations on their health effects. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 52(1), 53-60.
- Delgado-Andrade, C., Seiquer, I., Haro, A., Castellano, R., & Navarro, M. P. (2010). Development of the Maillard reaction in foods cooked by different techniques. Intake of Maillard-derived compounds. *Food Chemistry*, 122(1), 145-153.
- Demasi, M., Augusto, O., Bechara, E. J., Bicev, R. N., Cerqueira, F. M., da Cunha, F. M., ... & Thomson, L. (2021). Oxidative modification of proteins: from damage to catalysis, signaling, and beyond. *Antioxidants & Redox Signaling*, 35(12), 1016-1080.

- Di Mattia, C., Battista, N., Sacchetti, G., & Serafini, M. (2019). Antioxidant activities in vitro of water and liposoluble extracts obtained by different species of edible insects and invertebrates. *Frontiers in nutrition*, 6, 106.
- Di Meo, S., & Venditti, P. (2020). Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020(1), 9829176.
- Dimou, M., Goras, G., & Thrasyvoulou, A. (2007). Pollen analysis as a means to determine the geographical origin of royal jelly. *Grana*, 46(2), 118-122.
- Domínguez, R., Pateiro, M., Gagaoua, M., Barba, F. J., Zhang, W., & Lorenzo, J. M. (2019). A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products. *Antioxidants*, 8(10), 429.
- Domínguez, R., Pateiro, M., Munekata, P. E., Zhang, W., Garcia-Oliveira, P., Carpena, M., ... & Lorenzo, J. M. (2021). Protein oxidation in muscle foods: A comprehensive review. *Antioxidants*, 11(1), 60.
- Dong, L., Li, Y., Chen, Q., Liu, Y., Qiao, Z., Sang, S., ... & Liu, L. (2023). Research advances of advanced glycation end products in milk and dairy products: Formation, determination, control strategy and immunometabolism via gut microbiota. *Food Chemistry*, 417, 135861.
- Draper, H. H., Squires, E. J., Mahmoodi, H., Wu, J., Agarwal, S., & Hadley, M. (1993). A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radical Biology and Medicine*, 15(4), 353-363.
- Drijfhout, F. P., Kochansky, J., Lin, S., & Calderone, N. W. (2005). Components of honeybee royal jelly as deterrents of the parasitic Varroa mite, Varroa destructor. *Journal of Chemical Ecology*, 31, 1747-1764.
- Duan, X., Li, M., Shao, J., Chen, H., Xu, X., Jin, Z., & Liu, X. (2018). Effect of oxidative modification on structural and foaming properties of egg white protein. *Food Hydrocolloids*, 75, 223-228.
- Dubey, R. N., Sathiyarayanan, L., Rao, L., & Mohite, S. (2022). A comparative Study for determination of 10-HDA in various Indian Royal Jelly samples using HPLC, HPTLC, and LC-MS/MS Techniques.
- Dubey, R., Sathiyarayanan, L., RAO, L., & SANKARAN, S. (2023). Investigation of Nutraceutical Potential, in vitro Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of Indian Royal Jelly. *Journal of Research in Pharmacy*, 27(3).
- Dundar, A. N., Cinar, A., Altuntas, S., Ulubayram, N., Taner, G., Dagdelen, A. F., ... & Oral, R. A. (2022). The role of microencapsulation in maintaining biological activity of royal jelly: comparison with biological activity and bioaccessibility of microencapsulated, fresh and lyophilized forms during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(12), 5502-5511.

- Ecem Bayram, N., Çebi, N., Celik, S., Gerçek, Y. C., Bayram, S., Tanuğur Samancı, A. E., ... & Özkök, A. (2021). Turkish royal jelly: amino acid, physicochemical, antioxidant, multi-elemental, antibacterial and fingerprint profiles by analytical techniques combined with chemometrics. *Journal of Apicultural Research*, 60(5), 751-764.
- El Alami El Hassani, N., Baraket, A., & Alem, C. (2024). Recent advances in natural food preservatives: a sustainable solution for food safety and shelf life extension. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 1-23.
- Eleiwa, N. Z., Khalifa, H. A., & Nazim, H. A. (2024). Cardioprotective role of royal jelly in the prevention of celecoxib-mediated cardiotoxicity in adult male albino rats. *Journal of Cardiothoracic Surgery*, 19(1), 135.
- El-Guendouz, S., Machado, A. M., Aazza, S., Lyoussi, B., Miguel, M. G., Mateus, M. C., & Figueiredo, A. C. (2020). Chemical characterization and biological properties of royal jelly samples from the Mediterranean area. *Natural Product Communications*, 15(2), 1934578X20908080.
- Elia, M., & Cummings, J. H. (2007). Physiological aspects of energy metabolism and gastrointestinal effects of carbohydrates. *European journal of clinical nutrition*, 61(1), S40-S74.
- Erickson, M. D., Yevtushenko, D. P., & Lu, Z. X. (2023). Oxidation and thermal degradation of oil during frying: A review of natural antioxidant use. *Food Reviews International*, 39(7), 4665-4696.
- Estévez, M. (2011). Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat science*, 89(3), 259-279.
- Estévez, M., & Luna, C. (2017). Dietary protein oxidation: A silent threat to human health?. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(17), 3781-3793.
- Estévez, M., & Xiong, Y. L. (2021). Protein oxidation in foods: Mechanisms, consequences, and antioxidant solutions. *Foods*, 10(10), 2346.
- Fallah, M., Najafi, F., & Kavoori, G. (2022). Proximate analysis, nutritional quality and anti-amylase activity of bee propolis, bee bread and royal jelly. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(5), 2944-2953.
- Fallavena, L. P., Rodrigues, N. P., Marczak, L. D. F., & Mercali, G. D. (2022). Formation of advanced glycation end products by novel food processing technologies: A review. *Food Chemistry*, 393, 133338.
- Fallico, B., Arena, E., & Zappala, M. (2008). Degradation of 5-hydroxymethylfurfural in honey. *Journal of Food Science*, 73(9), C625-C631.
- Fang, Y. Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-879.

- Farag, M., Alagawany, M., Bin-Jumah, M., Othman, S., Khafaga, A., Shaheen, H., ... & El-Hack, M. (2020). The toxicological aspects of the heat-borne toxicant 5-hydroxymethylfurfural in animals: a review. *Molecules*, 25(8), 1941
- Farkasovska, J., Bugarova, V., Godocikova, J., Majtan, V., & Majtan, J. (2019). The role of hydrogen peroxide in the antibacterial activity of different floral honeys. *European Food Research and Technology*, 245, 2739-2744.
- Ferioli, F., Armaforte, E., & Caboni, M. F. (2014). Comparison of the lipid content, fatty acid profile and sterol composition in local Italian and commercial royal jelly samples. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91, 875-884.
- Fernandez-Panchon, M. S., Villano, D., Troncoso, A. M., & Garcia-Parrilla, M. C. (2008). Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(7), 649-671.
- Flanjak, I., Primorac, L., Vukadin, I., Kovačić, M., Puškadija, Z., & Bilić Rajs, B. (2019). Physicochemical characteristics of Croatian royal jelly. *Croatian journal of food science and technology*, 11(2), 266-271.
- Flanjak, I., Strelec, I., Kenjeric, D., & Primorac, L. (2016). Croatian produced unifloral honey characterized according to the protein and proline content and enzyme activities. *Journal of Apicultural Science*, 60(1), 39-48.
- Flieger, J., Flieger, W., Baj, J., & Maciejewski, R. (2021). Antioxidants: Classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles. *Materials*, 14(15), 4135.
- Fontana, R., Mendes, M. A., De Souza, B. M., Konno, K., César, L. M. M., Malaspina, O., & Palma, M. S. (2004). Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides*, 25(6), 919-928.
- Fratini, F., Cilia, G., Mancini, S., & Felicioli, A. (2016). Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. *Microbiological research*, 192, 130-141.
- Fuentes-Lemus, E., & Lopez-Alarcon, C. (2020). Photo-induced protein oxidation: mechanisms, consequences and medical applications. *Essays in Biochemistry*, 64(1), 33-44.
- Gao, K., Su, B., Dai, J., Li, P., Wang, R., & Yang, X. (2022). Anti-biofilm and anti-hemolysis activities of 10-Hydroxy-2-decenoic acid against *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 27(5), 1485.
- Garcia-Amoedo, L. H., & Almeida-Muradian, L. B. D. (2003). Determination of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid (10-HDA) in royal jelly from São Paulo State, Brazil. *Food Science and Technology*, 23, 62-65.
- Garcia-Amoedo, L. H., & Almeida-Muradian, L. B. D. (2007). Physicochemical composition of pure and adulterated royal jelly. *Química Nova*, 30, 257-259.

- Gęgotek, A., & Skrzydlewska, E. (2019). Biological effect of protein modifications by lipid peroxidation products. *Chemistry and physics of lipids*, 221, 46-52.
- Geng, L., Liu, K., & Zhang, H. (2023). Lipid oxidation in foods and its implications on proteins. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1192199.
- Ghadimi-Garjan, R., Javadi, A., Jafarizadeh-Malmiri, H., Anarjan, N., & Mirzaei, H. (2023). Lyophilized royal jelly preparation in nanoscale and evaluation of its physicochemical properties and bactericidal activity. *Food Science & Nutrition*, 11(6), 3404-3413.
- Ghidelli, C., Rojas-Argudo, C., Mateos, M., & Pérez-Gago, M. B. (2013). Effect of antioxidants in controlling enzymatic browning of minimally processed persimmon 'Rojo Brillante'. *Postharvest Biology and Technology*, 86, 487-493.
- Ghosh, S., & Jung, C. (2024). Chemical composition and nutritional value of royal jelly samples obtained from honey bee (*Apis mellifera*) hives fed on oak and rapeseed pollen patties. *Insects*, 15(3), 141.
- Ghosh, S., Jang, H., Sun, S., & Jung, C. (2024). Nutrient Composition and Quality Assessment of Royal Jelly Samples Relative to Feed Supplements. *Foods*, 13(12), 1942.
- Gieseg, S., Duggan, S., & Gebicki, J. M. (2000). Peroxidation of proteins before lipids in U937 cells exposed to peroxy radicals. *Biochemical Journal*, 350(1), 215-218.
- Godoy, C. A., Valderrama, P., & Boroski, M. (2022). HMF Monitoring: Storage Condition and Honey Quality. *Food Analytical Methods*, 15(11), 3162-3176.
- Golon, A., & Kuhnert, N. (2012). Unraveling the chemical composition of caramel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(12), 3266-3274.
- Góth, L., Rass, P., & Páy, A. (2004). Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Molecular Diagnosis*, 8, 141-149.
- Gouda, M. D., Singh, S. A., Rao, A. A., Thakur, M. S., & Karanth, N. G. (2003). Thermal inactivation of glucose oxidase: Mechanism and stabilization using additives. *Journal of Biological Chemistry*, 278(27), 24324-24333.
- Gregorc, A., Jurišić, S., & Sampson, B. (2019). Hydroxymethylfurfural affects caged honey bees (*Apis mellifera carnica*). *Diversity*, 12(1), 18.
- Gu, H., Song, I. B., Han, H. J., Lee, N. Y., Cha, J. Y., Son, Y. K., & Kwon, J. (2018). Antioxidant activity of royal jelly hydrolysates obtained by enzymatic treatment. *Korean journal for food science of animal resources*, 38(1), 135.
- Guo, H., Ekusa, A., Iwai, K., Yonekura, M., Takahata, Y., & Morimatsu, F. (2008). Royal jelly peptides inhibit lipid peroxidation in vitro and in vivo. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 54(3), 191-195.

- Guo, H., Kouzuma, Y., & Yonekura, M. (2005). Isolation and properties of antioxidative peptides from water-soluble royal jelly protein hydrolysate. *Food Science and Technology Research*, 11(2), 222-230.
- Guo, J., Wang, Z., Chen, Y., Cao, J., Tian, W., Ma, B., & Dong, Y. (2021). Active components and biological functions of royal jelly. *Journal of Functional Foods*, 82, 104514.
- Guo, X., Wang, N., Wei, Y., Liu, P., Deng, X., Lei, Y., & Zhang, J. (2023). The Effects of Malonaldehyde on Quality Characteristics and Protein Oxidation of *Coregonus peled* (*Coregonus peled*) during Storage. *Foods*, 12(4), 716.
- Guyon, C., Meynier, A., & de Lamballerie, M. (2016). Protein and lipid oxidation in meat: A review with emphasis on high-pressure treatments. *Trends in Food Science & Technology*, 50, 131-143.
- Habib, L. K., Lee, M. T., & Yang, J. (2010). Inhibitors of catalase-amyloid interactions protect cells from β -amyloid-induced oxidative stress and toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 285(50), 38933-38943.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.
- Han, M., Lee, D., Lee, S. H., & Kim, T. H. (2021). Oxidative stress and antioxidant pathway in allergic rhinitis. *Antioxidants*, 10(8), 1266.
- Hashemirad, F. S., Behfar, M., & Kavoosi, G. (2024). Proximate composition, physico-chemical, techno-functional, amino acid profile, fatty acid profile, nutritional quality, antioxidant, anti-amylase and anti-lipase properties of bee bread, royal jelly, and bee propolis. *LWT*, 200, 116190.
- Hassan, S., Mir, M. B., Magray, A. A., Prabhakaran, A., Deka, N., Selvin, J., & Kiran, G. S. (2023). Enzymatic Browning—Mechanism and Prevention. In *Enzyme Inactivation in Food Processing* (pp. 361-382). Apple Academic Press.
- He, Q., & Luo, Y. (2007). Enzymatic browning and its control in fresh-cut produce.
- He, R., Ye, J., Wang, L., & Sun, P. (2020). Preparation and evaluation of microcapsules encapsulating royal jelly sieve residue: flavor and release profile. *Applied Sciences*, 10(22), 8126.
- He, X., Jiang, C., Yang, J., Sheng, S., & Wang, Y. (2024). Sensitive photoelectric sensing for 5-HMF detection. *Analytical Methods*, 16(23), 3766-3773.
- Heinonen, M., Gürbüz, G., & Ertbjerg, P. (2021). Oxidation of proteins. In *Chemical changes during processing and storage of foods* (pp. 85-123). Academic Press.
- Hellwig, M. (2019). The chemistry of protein oxidation in food. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(47), 16742-16763.
- Hellwig, M. (2020). Analysis of protein oxidation in food and feed products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(46), 12870-12885.

- Hematyar, N., Rustad, T., Sampels, S., & Kastrup Dalsgaard, T. (2019). Relationship between lipid and protein oxidation in fish. *Aquaculture Research*, 50(5), 1393-1403.
- Hewitt, O. H., & Degnan, S. M. (2023). Antioxidant enzymes that target hydrogen peroxide are conserved across the animal kingdom, from sponges to mammals. *Scientific Reports*, 13(1), 2510.
- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., & Prange, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207, 604-611.
- Honda Y, Fujita Y, Maruyama H, Araki Y, Ichihara K, Sato A, Kojima T, Tanaka M, Nozawa Y, Ito M, Honda S. 2011. Lifespan-extending effects of royal jelly and its related substances on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *PLOS ONE* 6:e23527
- Höhn, A., König, J., & Grune, T. (2013). Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. *Journal of proteomics*, 92, 132-159.
- Hu, H., Wei, Q., Sun, Z., Zhang, X., Ma, C., Feng, M., ... & Han, B. (2021). Development of a freshness assay for royal jelly based on the temperature-and time-dependent changes of antimicrobial effectiveness and proteome dynamics of royal jelly proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(36), 10731-10740.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Huidobro, J. F., Sánchez, M. P., Muniategui, S., & Sancho, M. T. (2005). Precise method for the measurement of catalase activity in honey. *Journal of AOAC International*, 88(3), 800-804.
- Hybertson, B. M., Gao, B., Bose, S. K., & McCord, J. M. (2011). Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Molecular aspects of medicine*, 32(4-6), 234-246.
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*, 54(4), 287-293.
- International Organization for Standardization. (2016). Royal jelly—Specifications (ISO 12824:2016). <https://www.iso.org/standard/65648.html>.
- Isengard, H. D. (2001). Water content, one of the most important properties of food. *Food control*, 12(7), 395-400.
- Isidorov, V. A., Bakier, S., & Grzywacz, T. (2016). Chemical composition and antioxidant activity of royal jelly from different geographic regions. *International Journal of Food Science and Technology*, 51(4), 660-667.

- Islam, M. N., Rauf, A., Fahad, F. I., Emran, T. B., Mitra, S., Olatunde, A., ... & Mubarak, M. S. (2022). Superoxide dismutase: an updated review on its health benefits and industrial applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(26), 7282-7300.
- ISO 12824. (2016). *Honey and bee products—Determination of water content—Karl Fischer method*. International Organization for Standardization.
- İçli, N. (2022). Evaluation of HMF levels in unbranded flower honeys in terms of food safety. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 69(4), 431-436.
- Janzowski, C., Glaab, V., Samimi, E., Schlatter, J., & Eisenbrand, G. (2000). 5-Hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. *Food and chemical toxicology*, 38(9), 801-809.
- Jelinek, M., Jurajda, M., & Duris, K. (2021). Oxidative stress in the brain: basic concepts and treatment strategies in stroke. *Antioxidants*, 10(12), 1886.
- Jeuring, H. J., & Kuppens, F. J. (1980). High performance liquid chromatography of furfural and hydroxymethylfurfural in spirits and honey. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 63(6), 1215-1218.
- Jiang, S., Liu, H., & Li, C. (2021). Dietary regulation of oxidative stress in chronic metabolic diseases. *Foods*, 10(8), 1854.
- Jomova, K., Raptova, R., Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K., & Valko, M. (2023). Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: Chronic diseases and aging. *Archives of toxicology*, 97(10), 2499-2574.
- Kamakura, M., Fukuda, T., Fukushima, M., & Yonekura, M. (2001). Storage-dependent degradation of 57-kDa protein in royal jelly: a possible marker for freshness. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 65(2), 277-284.
- Karaca, T., Şimşek, N., Uslu, S., Kalkan, Y., Can, I., Kara, A., & Yörük, M. (2012). The effect of royal jelly on CD3⁺, CD5⁺, CD45⁺ T-cell and CD68⁺ cell distribution in the colon of rats with acetic acid-induced colitis. *Allergologia et immunopathologia*, 40(6), 357-361.
- Karimi, E., Khorvash, F., Arab, A., Sepidarkish, M., Saadatnia, M., & Amani, R. (2023). The effects of royal jelly supplementation on oxidative stress, inflammatory mediators, mental health, cognitive function, quality of life, and clinical outcomes of patients with ischemic stroke: study protocol for a randomized controlled trial. *BMC nutrition*, 9(1), 32.
- Karlıdağ, S., Köseman, A., Akyol, A., Saatçioğlu, G., Şeker, İ., Uyumlu, A. B., ... & Erdoğan, S. (2022). The effects of different industrial sugars on royal jelly production. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 73(4), 4689-4696.
- Kausar, S. H., & More, V. R. (2019). Royal Jelly. Organoleptic characteristics and physicochemical properties. *Lipids*, 6(2), 20-4.

- Kausar, S. H., More, V. R., & Shaikh, J. D. (2023). Study on Impact of Different Storage Temperature on the Glucose Oxidase Activity of Royal Jelly.
- Kazemi, V., Eskafi, M., Saeedi, M., Manayi, A., & Hadjiakhoondi, A. (2019). Physicochemical properties of royal jelly and comparison of commercial with raw specimens. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 14(4).
- Keskin, M., Özkök, A., Karahalil, F., & Kolaylı, S. (2020). Arı sütü 10-Hidroksi-2-Dekanoik asit (10-HDA) miktarı ne olmalıdır?. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 33(3), 347-350.
- Khalfan Saeed Alwali Alkindi, F., El–Keblawy, A., Lamghari Ridouane, F., & Bano Mirza, S. (2024). Factors influencing the quality of Royal jelly and its components: a review. *Cogent Food & Agriculture*, 10(1), 2348253.
- Khansari, N., Shakiba, Y., & Mahmoudi, M. (2009). Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery*, 3(1), 73-80.
- Khatami, S. H., Vakili, O., Ahmadi, N., Soltani Fard, E., Mousavi, P., Khalvati, B., ... & Movahedpour, A. (2022). Glucose oxidase: Applications, sources, and recombinant production. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(3), 939-950.
- Khazaei, M., Ansarian, A., & Ghanbari, E. (2018). New findings on biological actions and clinical applications of royal jelly: a review. *Journal of dietary supplements*, 15(5), 757-775.
- Kilic, B., & Richards, M. P. (2003). Lipit oxidation in poultry döner kebab: Pro-oxidative and anti-oxidative factors. *Journal of Food Science*, 68(2), 686-689.
- Kim, J., & Lee, J. (2010). Quantitative analysis of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid in royal jelly products purchased in USA by high performance liquid chromatography. *Journal of Apicultural Science*, 54(1).
- Kitts, D. D., Chen, X. M., & Jing, H. (2012). Demonstration of antioxidant and anti-inflammatory bioactivities from sugar–amino acid Maillard reaction products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(27), 6718-6727.
- Kocot, J., Kielczykowska, M., Luchowska-Kocot, D., Kurzepa, J., & Musik, I. (2018). Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: Possible medical application. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018(1), 7074209.
- Kodai, T., Nakatani, T., & Noda, N. (2011). The absolute configurations of hydroxy fatty acids from the royal jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Lipids*, 46(3), 263-270.
- Kohn, K., Okamoto, I., Sano, O., Arai, N., Iwaki, K., Ikeda, M., & Kurimoto, M. (2004). Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 68(1), 138-145.
- Kolaylı, S., Sahin, H., Can, Z., Yildiz, O., Malkoc, M., & Asadov, A. (2016). A member of complementary medicinal food: anatolian royal jellies, their chemical compositions,

- and antioxidant properties. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, 21(4), NP43-NP48.
- Koshio, S., & Almeida-Muradian, L. B. D. (2003). HPLC application for 10-HDA determination in pure royal jelly and honey with royal jelly. *Quimica Nova*, 26, 670-673.
- Kowalski, S., Lukasiwicz, M., Duda-Chodak, A., & Ziec, G. (2013). 5-Hydroxymethyl-2-furfural (HMF)–heat-induced formation, occurrence in food and biotransformation—a review. *Polish journal of food and nutrition sciences*, 63(4).
- Kris-Etherton, P. M., Lefevre, M., Beecher, G. R., Gross, M. D., Keen, C. L., & Etherton, T. D. (2004). Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: the antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. *Annu. Rev. Nutr.*, 24(1), 511-538.
- Kumar, A., Sharma, M., Bhardwaj, P. K., Vats, S. K., Singh, D., & Kumar, S. (2016). Copper, zinc superoxide dismutase from *Caragana jubata*: A thermostable enzyme that functions under a broad pH and temperature window. *Process Biochemistry*, 51(10), 1434-1444.
- Kumar, R., Thakur, A., Kumar, S., & Hajam, Y. A. (2024). Royal jelly a promising therapeutic intervention and functional food supplement: A systematic review. *Heliyon*.
- Kunieda, T., Fujiyuki, T., Kucharski, R., Foret, S., Ament, S. A., Toth, A. L., ... & Maleszka, R. (2006). Carbohydrate metabolism genes and pathways in insects: insights from the honey bee genome. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 563-576.
- Kunugi, H., & Mohammed Ali, A. (2019). Royal jelly and its components promote healthy aging and longevity: from animal models to humans. *International journal of molecular sciences*, 20(19), 4662.
- Laguerre, M., Bily, A., Roller, M., & Birtić, S. (2017). Mass transport phenomena in lipid oxidation and antioxidation. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8(1), 391-411.
- Lartillot, S., Kedziora, P., & Athias, A. (1988). Purification and characterization of a new fungal catalase. *Preparative biochemistry*, 18(3), 241-246.
- Lee, S. Y., Lee, S. J., Choi, D. S., & Hur, S. J. (2015). Current topics in active and intelligent food packaging for preservation of fresh foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(14), 2799-2810.
- Lejawa, M., Osadnik, K., Osadnik, T., & Pawlas, N. (2021). Association of metabolically healthy and unhealthy obesity phenotypes with oxidative stress parameters and telomere length in healthy young adult men. Analysis of the magnetic study. *Antioxidants*, 10(1), 93.
- Lemos, A. C., de Borba, V. S., de Medeiros Burkert, J. F., Scaglioni, P. T., & Badiale-Furlong, E. (2023). Role of white bread matrix components and processing parameters on 5-

- hydroxymethylfurfural (HMF) and acrylamide formation. *Food Control*, 145, 109407.
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. P., & Shacter, E. (1994). [37] Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. In *Methods in enzymology* (Vol. 233, pp. 346-357). Academic press.
- Lewkowski, O., Mureşan, C. I., Dobritsch, D., Fuszard, M., & Erler, S. (2019). The effect of diet on the composition and stability of proteins secreted by honey bees in honey. *Insects*, 10(9), 282.
- Li, J. K., Feng, M., Zhang, L., Zhang, Z. H., & Pan, Y. H. (2008). Proteomics analysis of major royal jelly protein changes under different storage conditions. *Journal of proteome research*, 7(8), 3339-3353.
- Li, J. K., Wang, T., & Peng, W. J. (2007a). Comparative analysis of the effects of different storage conditions on major royal jelly proteins. *Journal of Apicultural Research*, 46(2), 73-80.
- Li, J., Feng, M., Begna, D., Fang, Y., & Zheng, A. (2010). Proteome comparison of hypopharyngeal gland development between Italian and royal jelly producing worker honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of proteome research*, 9(12), 6578-6594.
- Li, J., Liu, D., Sun, L., Lu, Y., & Zhang, Z. (2012). Advanced glycation end products and neurodegenerative diseases: mechanisms and perspective. *Journal of the neurological sciences*, 317(1-2), 1-5.
- Li, J., Wang, T., Zhang, Z., & Pan, Y. (2007b). Proteomic analysis of royal jelly from three strains of western honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(21), 8411-8422.
- Li, M. M., Wu, L. Y., Zhao, T., Xiong, L., Huang, X., Liu, Z. H., ... & Fan, M. (2011). The protective role of 5-HMF against hypoxic injury. *Cell Stress and Chaperones*, 16(3), 267-273.
- Li, S., Tao, L., Yu, X., Zheng, H., Wu, J., & Hu, F. (2021). Royal jelly proteins and their derived peptides: Preparation, properties, and biological activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(48), 14415-14427.
- Li, Y., Huang, H., Jiang, M., Xi, W., Duan, J., Ratova, M., & Wu, D. (2024). Advancements in transition bimetal catalysts for electrochemical 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) oxidation. *Journal of Energy Chemistry*.
- Li, Z., Yuan, Y., Yao, Y., Wei, X., Yue, T., & Meng, J. (2019). Formation of 5-hydroxymethylfurfural in industrial-scale apple juice concentrate processing. *Food control*, 102, 56-68.
- Liming, W., Jinhui, Z., Xiaofeng, X., Yi, L., & Jing, Z. (2009). Fast determination of 26 amino acids and their content changes in royal jelly during storage using ultra-performance liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(3), 242-249.

- Limón-Pacheco, J., & Gonsebatt, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1-2), 137-147.
- Lin, S. M., Wu, J. Y., Su, C., Ferng, S., Lo, C. Y., & Chiou, R. Y. Y. (2012). Identification and mode of action of 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) and 1-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid (MTCA) as potent xanthine oxidase inhibitors in vinegars. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(39), 9856-9862.
- Liochev, S. I. (2014). Free radicals: how do we stand them? Anaerobic and aerobic free radical (chain) reactions involved in the use of fluorogenic probes and in biological systems. *Medical Principles and Practice*, 23(3), 195-203.
- Liu, J. R., Yang, Y. C., Shi, L. S., & Peng, C. C. (2008). Antioxidant properties of royal jelly associated with larval age and time of harvest. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(23), 11447-11452.
- Liu, K., Liu, Y., & Chen, F. (2019). Effect of storage temperature on lipid oxidation and changes in nutrient contents in peanuts. *Food science & nutrition*, 7(7), 2280-2290.
- Liu, M., & Clair, D. (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(4), 344-356.
- Liu, S., Sun, H., Ma, G., Zhang, T., Wang, L., Pei, H., ... & Gao, L. (2022). Insights into flavor and key influencing factors of Maillard reaction products: A recent update. *Frontiers in Nutrition*, 9, 973677.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118.
- Lopez-Corona, A. V., Valencia-Espinosa, I., González-Sánchez, F. A., Sánchez-López, A. L., Garcia-Amezquita, L. E., & Garcia-Varela, R. (2022). Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of phenolic compound family extracted from raspberries (*Rubus idaeus*): A general review. *Antioxidants*, 11(6), 1192.
- López-Gutiérrez, N., del Mar Aguilera-Luiz, M., Romero-González, R., Vidal, J. L. M., & Frenich, A. G. (2014). Fast analysis of polyphenols in royal jelly products using automated TurboFlow™-liquid chromatography–Orbitrap high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 973, 17-28.
- Lourenço, S. C., Moldão-Martins, M., & Alves, V. D. (2019). Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. *Molecules*, 24(22), 4132.
- Lund, M. N., & Ray, C. A. (2017). Control of Maillard reactions in foods: Strategies and chemical mechanisms. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(23), 4537-4552.
- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions*, 224, 164-175.

- M. Alreshoodi, F., & Sultanbawa, Y. (2015). Antimicrobial activity of royal jelly. *Anti-Infective Agents*, 13(1), 50-59.
- M. Rosmillah, M. Shahnaz, G. Patel, J. Lock, D. Rahman, A. Masita, A. Noormalin. Characterization of major allergens of royal jelly *Apis mellifera*. *Tropical Biomedicine*, 25(3), (2008) 243-251.
- Ma, C., Ma, B., Li, J., & Fang, Y. (2022). Changes in chemical composition and antioxidant activity of royal jelly produced at different floral periods during migratory beekeeping. *Food Research International*, 155, 111091.
- Maghsoudlou, A., Mahoonak, A. S., Mohebodini, H., & Toldra, F. (2019a). Royal jelly: chemistry, storage and bioactivities. *Journal of apicultural Science*, 63(1), 17-40.
- Makino, J., Ogasawara, R., Kamiya, T., Hara, H., Mitsugi, Y., Yamaguchi, E., ... & Adachi, T. (2016). Royal jelly constituents increase the expression of extracellular superoxide dismutase through histone acetylation in monocytic THP-1 cells. *Journal of natural products*, 79(4), 1137-1143.
- Maltini, E., Torreggiani, D., Venir, E., & Bertolo, G. (2003). Water activity and the preservation of plant foods. *Food chemistry*, 82(1), 79-86.
- Mandelli, F., Franco Cairo, J. P. L., Citadini, A. P. S., Büchli, F., Alvarez, T. M., Oliveira, R. J., ... & Squina, F. M. (2013). The characterization of a thermostable and cambialistic superoxide dismutase from *Thermus filiformis*. *Letters in applied microbiology*, 57(1), 40-46.
- Mańkowska, D., Majak, I., Bartos, A., Słowianek, M., Łacka, A., & Leszczyńska, J. (2017). 5-hydroxymethylfurfural content in selected gluten-and gluten-free cereal food products. *Biotechnology and Food Science*, 81(1), 11-21.
- Maqsood, S., Benjakul, S., & Balange, A. K. (2012). Effect of tannic acid and kiam wood extract on lipid oxidation and textural properties of fish emulsion sausages during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 130(2), 408-416.
- Marconi, E., Caboni, M. F., Messina, M. C., & Panfili, G. (2002). Furosine: a suitable marker for assessing the freshness of royal jelly. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(10), 2825-2829.
- Martemucci, G., Costagliola, C., Mariano, M., D'andrea, L., Napolitano, P., & D'Alessandro, A. G. (2022). Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. *Oxygen*, 2(2), 48-78.
- Martín-Gallán, P., Carrascosa, A., Gussinyé, M., & Domínguez, C. (2007). Oxidative stress in childhood type 1 diabetes: results from a study covering the first 20 years of evolution. *Free radical research*, 41(8), 919-928.
- Martins, S. I., Jongen, W. M., & Van Boekel, M. A. (2000). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in food science & technology*, 11(9-10), 364-373.

- Matsuda, M., & Shimomura, I. (2014). Roles of adiponectin and oxidative stress in obesity-associated metabolic and cardiovascular diseases. *Reviews in endocrine and metabolic disorders*, 15, 1-10.
- Matsuoka, T., Kawashima, T., Nakamura, T., Kanamaru, Y., & Yabe, T. (2012). Isolation and characterization of proteases that hydrolyze royal jelly proteins from queen bee larvae of the honeybee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 43, 685-697.
- Mattei, S., Ban, A., Piconi, A., Leibundgut, M., Glockshuber, R., & Boehringer, D. (2020). Structure of native glycolipoprotein filaments in honeybee royal jelly. *Nature communications*, 11(1), 6267.
- Matuszewska, E., Klupczynska, A., Maciołek, K., Kokot, Z. J., & Matysiak, J. (2021). Multielemental analysis of bee pollen, propolis, and royal jelly collected in west-central Poland. *Molecules*, 26(9), 2415.
- Maželienė, Ž., Aleksandravičienė, A., Pašvenskaitė, M., Viliušienė, I., Šakienė, D., & Dailidaitė, E. (2022). Antimicrobial activity of royal jelly, honey, and their mixture. *Biologija*, 68(3).
- Mazzei, P., Piccolo, A., Brescia, M., & Caprio, E. (2020). Assessment of geographical origin and production period of royal jelly by NMR metabolomics. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 7, 1-13.
- Meade, S. J., Reid, E. A., & Gerrard, J. A. (2005). The impact of processing on the nutritional quality of food proteins. *Journal of AOAC International*, 88(3), 904-922.
- Melliou, E., & Chinou, I. (2005). Chemistry and bioactivity of royal jelly from Greece. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(23), 8987-8992.
- Merino, D., Quilez-Molina, A. I., Perotto, G., Bassani, A., Spigno, G., & Athanassiou, A. (2022). A second life for fruit and vegetable waste: a review on bioplastic films and coatings for potential food protection applications. *Green Chemistry*, 24(12), 4703-4727.
- Messia, M. C., Caboni, M. F., & Marconi, E. (2005). Storage stability assessment of freeze-dried royal jelly by furosine determination. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(11), 4440-4443.
- Miguel, M. G., & El-Guendouz, S. (2017). Volatile compounds of royal jelly. *Bee Products-Chemical and Biological Properties*, 191-197.
- Mirmoghadaie, L., Aliabadi, S. S., & Hosseini, S. M. (2016). Recent approaches in physical modification of protein functionality. *Food chemistry*, 199, 619-627.
- Moldogazieva, N. T., Mokhosev, I. M., Feldman, N. B., & Lutsenko, S. V. (2018). ROS and RNS signalling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications. *Free radical research*, 52(5), 507-543.
- Mondola, P., Damiano, S., Sasso, A., & Santillo, M. (2016). The Cu, Zn superoxide dismutase: not only a dismutase enzyme. *Frontiers in physiology*, 7, 594.

- Monien, B. H., Engst, W., Barknowitz, G., Seidel, A., & Glatt, H. (2012). Mutagenicity of 5-hydroxymethylfurfural in V79 cells expressing human SULT1A1: identification and mass spectrometric quantification of DNA adducts formed. *Chemical research in toxicology*, 25(7), 1484-1492.
- Moon, K. M., Kwon, E. B., Lee, B., & Kim, C. Y. (2020). Recent trends in controlling the enzymatic browning of fruit and vegetable products. *Molecules*, 25(12), 2754.
- Mouhoubi-Tafinine, Z., Ouchemoukh, S., Bey, B. M., Louaileche, H., & Tamendjari, A. (2018). Effect of storage on hydroxymethylfurfural (HMF) and color of some Algerian honey. *International food research journal*, 25(3), 1044-1050.
- Mureşan, C. I., Dezmirean, D. S., Marc, B. D., Suharoschi, R., Pop, O. L., & Buttstedt, A. (2022). Biological properties and activities of major royal jelly proteins and their derived peptides. *Journal of Functional Foods*, 98, 105286.
- Mureşan, C. I., Mărghitaş, L. A., Dezmirean, D. S., Bobiş, O., Bonta, V., Zacharias, I., ... & Paşca, C. (2016). Quality Parameters for commercialized Royal Jelly. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science & Biotechnologies*, 73(1).
- Murkovic, M., & Pichler, N. (2006). Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in coffee, dried fruits and urine. *Molecular nutrition & food research*, 50(9), 842-846.
- Nabas, Z. M., Haddadin, M. S., & Nazer, I. K. (2014). The influence of royal jelly addition on the growth and production of short chain fatty acids of two different bacterial species isolated from infants in Jordan. *Pakistan Journal of Nutrition*, 13(1), 43.
- Nagai, T., Sakai, M., Inoue, R., Inoue, H., & Suzuki, N. (2001). Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food chemistry*, 75(2), 237-240.
- Nakaya, M., Onda, H., Sasaki, K., Yukiyoishi, A., Tachibana, H., & Yamada, K. (2007). Effect of royal jelly on bisphenol A-induced proliferation of human breast cancer cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71(1), 253-255.
- Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., & Das, N. (2019). Role of catalase in oxidative stress-and age-associated degenerative diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019(1), 9613090.
- Nascimento, A. P., Moraes, L. A. R., Ferreira, N. U., Moreno, G. D. P., Uahib, F. G. M., Barizon, E. A., & Berretta, A. A. (2015). The lyophilization process maintains the chemical and biological characteristics of royal jelly. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015(1), 825068.
- Nath, P., Pandey, N., Samota, M., Sharma, K., Kale, S., Kannaujia, P., ... & Chauhan, O. P. (2022). Browning reactions in foods. In *Advances in food chemistry: Food components, processing and preservation* (pp. 117-159). Singapore: Springer Nature Singapore.

- Newton, A. E., Fairbanks, A. J., Golding, M., Andrewes, P., & Gerrard, J. A. (2012). The role of the Maillard reaction in the formation of flavour compounds in dairy products—not only a deleterious reaction but also a rich source of flavour compounds. *Food & Function*, 3(12), 1231-1241.
- Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., & Noguchi, N. (2005). Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and biophysical research communications*, 338(1), 668-676.
- Nikolić, T. V., Purać, J., Orčić, S., Kojić, D., Vujanović, D., Stanimirović, Z., ... & Blagojević, D. P. (2015). Environmental effects on superoxide dismutase and catalase activity and expression in honey bee. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 90(4), 181-194.
- Nowotny, K., Jung, T., Höhn, A., Weber, D., & Grune, T. (2015). Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules*, 5(1), 194-222.
- Nursten, H. E. (2005). *The Maillard reaction: chemistry, biochemistry and implications*. Royal Society of Chemistry.
- Nwachukwu, I. D., & Aluko, R. E. (2019). Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides. *Journal of food biochemistry*, 43(1), e12761.
- Oenel, A., Fekete, A., Krischke, M., Faul, S. C., Gresser, G., Havaux, M., ... & Berger, S. (2017). Enzymatic and non-enzymatic mechanisms contribute to lipid oxidation during seed aging. *Plant and Cell Physiology*, 58(5), 925-933.
- Ogwu, M. C., & Ogunsola, O. A. (2024). Physicochemical Methods of Food Preservation to Ensure Food Safety and Quality. In *Food Safety and Quality in the Global South* (pp. 263-298). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Olimpia, P., Mărghițaș, L. A., Dezmirean, D. S., Lelia, M. O., & Laura, L. (2008). A characterization about physical-chemical composition of royal jelly. Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. *Animal Science & Biotechnologies*, 65.
- Oliver, S. R., Rosa, J. S., Milne, G. L., Pontello, A. M., Borntrager, H. L., Heydari, S., & Galassetti, P. R. (2010). Increased oxidative stress and altered substrate metabolism in obese children. *International Journal of Pediatric Obesity*, 5(5), 436-444.
- O'Malley, Y. Q., Reszka, K. J., Rasmussen, G. T., Abdalla, M. Y., Denning, G. M., & Britigan, B. E. (2003). The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 285(5), L1077-L1086.
- Oršolić, N. (2013). Royal jelly: component efficiency, analysis, and standardisation. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 64(3), 445-460.

- Oršolić, N., & Jembrek, M. J. (2024). Potential Strategies for Overcoming Drug Resistance Pathways Using Propolis and Its Polyphenolic/Flavonoid Compounds in Combination with Chemotherapy and Radiotherapy. *Nutrients*, 16(21), 3741.
- Osés, S. M., Rodríguez, C., Valencia, O., Fernández-Muiño, M. A., & Sancho, M. T. (2024). Relationships among Hydrogen Peroxide Concentration, Catalase, Glucose Oxidase, and Antimicrobial Activities of Honeys. *Foods*, 13(9), 1344.
- Ozougwu, J. C. (2016). The role of reactive oxygen species and antioxidants in oxidative stress. *International Journal of Research*, 1(8), 1-8.
- Özdemir, Ş. İ. (2022). *Mayonez, Tereyağı, Margarin, Krema ve Kaymakta Malondialdehit (MDA) Düzeylerinin Belirlenmesi ve In Vitro Biyoerişilebilirliği*. İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Park, M. J., Kim, B. Y., Deng, Y., Park, H. G., Choi, Y. S., Lee, K. S., & Jin, B. R. (2020). Antioxidant capacity of major royal jelly proteins of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 23(2), 445-448.
- Parra, I. M. M., Espinosa, D. R. G., Falconí, P. R. P., & Veloz, M. A. L. (2023). Technical principles for caramel application: Analysis of gastronomic and chemical fundamentals. *Journal of Namibian Studies: History Politics Culture*, 33, 3489-3504.
- Pasias, I. N., Kiriakou, I. K., & Proestos, C. (2017). HMF and diastase activity in honeys: A fully validated approach and a chemometric analysis for identification of honey freshness and adulteration. *Food Chemistry*, 229, 425-431.
- Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S. H. (2017). Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017(1), 1259510.
- Pattamayutanon, P., Peng, C. C., Sinpoo, C., & Chantawannakul, P. (2018). Effects of pollen feeding on quality of royal jelly. *Journal of economic entomology*, 111(6), 2974-2978.
- Paulinus, O. N., & Tinuade, O. (2013). A comparative study of malondialdehyde contents of some meat and fish samples processed by different methods. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, 2(4), 26-29.
- Paulinus, O. N., & Tinuade, O. (2013). A comparative study of malondialdehyde contents of some meat and fish samples processed by different methods. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, 2(4), 26-29.
- Pavel, C. I., Mărghitaş, L. A., Bobiş, O., Dezmirean, D. S., Şapcaliu, A., Radoi, I., & Mădaş, M. N. (2011). Biological activities of royal jelly-review. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 44(2), 108-108.
- Pavel, C. I., Mărghitaş, L. A., Bonta, V., Mihai, C. M., & Tomoş, L. I. (2013). Determination of total protein content in royal jelly: a comparison of the Kjeldahl, the Bradford and the Lowry methods.

- Pavel, I., Marghitash, L. A., Dezmirena, D. S., Bobis, O., Barnuliu, L., & Şapcaliu, A. (2011). Changes in royal jelly composition during storage and possible freshness parameters. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 68(1-2), 245–248.
- Pazos, M., & Medina, I. (2014). Oxidants occurring in food systems. *Food Oxidants and Antioxidants: Chemical, Biological, and Functional Properties*, 21-46.
- Pedreañez, A., Mosquera-Sulbaran, J. A., & Tene, D. (2024). Role of the receptor for advanced glycation end products in the severity of SARS-CoV-2 infection in diabetic patients. *Diabetology International*, 1-13.
- Petersen, S. V., Oury, T. D., Ostergaard, L., Valnickova, Z., Wegrzyn, J., Thøgersen, I. B., ... & Enghild, J. J. (2004). Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) binds to type I collagen and protects against oxidative fragmentation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(14), 13705-13710.
- Phosanam, A., Chandrapala, J., Zisu, B., & Adhikari, B. (2021). Storage stability of powdered dairy ingredients: a review. *Drying Technology*, 39(11), 1529-1553.
- Piedrafita, G., Keller, M. A., & Ralser, M. (2015). The impact of non-enzymatic reactions and enzyme promiscuity on cellular metabolism during (oxidative) stress conditions. *Biomolecules*, 5(3), 2101-2122.
- Pinmanee, P., Sompinit, K., Jantimaporn, A., Khongkow, M., Haltrich, D., Nimchua, T., & Sukyai, P. (2023). Purification and Immobilization of Superoxide Dismutase Obtained from *Saccharomyces cerevisiae* TBRC657 on Bacterial Cellulose and Its Protective Effect against Oxidative Damage in Fibroblasts. *Biomolecules*, 13(7), 1156.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74.
- Poljsak, B., Kovač, V., & Milisav, I. (2021). Antioxidants, food processing and health. *Antioxidants*, 10(3), 433.
- Popescu, O., Mărghițaș, L. A., Bobiș, O., Stanciu, O., Bonta, V., Moise, A., & Dezmirean, D. (2009). Sugar profile and total proteins content of fresh royal jelly.
- Poulsen, M. W., Hedegaard, R. V., Andersen, J. M., de Courten, B., Bügel, S., Nielsen, J., ... & Dragsted, L. O. (2013). Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 10-37.
- Provost, J. (2019). The Maillard Reaction. In *Food Aroma Evolution* (pp. 281-291). CRC Press.
- Qiao, J., Wang, X., Liu, L., & Zhang, H. (2018). Nonenzymatic browning and protein aggregation in royal jelly during room-temperature storage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(8), 1881-1888.

- Qu, W., & Liu, J. (2021). Effects of glucose oxidase supplementation on the growth performance, antioxidative and inflammatory status, gut function, and microbiota composition of broilers fed moldy corn. *Frontiers in Physiology*, 12, 646393.
- Rada-Mendoza, M., Villamiel, M., Ramírez, A., Usuriaga, Y., & Montilla, A. (2022). Quality indicators in lactose hydrolyzed milks and soy beverages from Colombia. *Journal of Food Science and Technology*, 1-9.
- Ragab, S. S., & Ibrahim, M. K. (1999). Evaluation of some chemical, antibacterial and biological properties of fresh and refrigerated royal jelly. *Egyptian Journal of Microbiology*, 34(1), 115-128.
- Rahman, M. M., Rahaman, M. S., Islam, M. R., Rahman, F., Mithi, F. M., Alqahtani, T., ... & Uddin, M. S. (2021). Role of phenolic compounds in human disease: current knowledge and future prospects. *Molecules*, 27(1), 233.
- Ramadan, M. F., & Al-Ghamdi, A. (2012). Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *Journal of functional foods*, 4(1), 39-52.
- Ramanathan, A. N. K. G., Nair, A. J., & Sugunan, V. S. (2018). A review on Royal Jelly proteins and peptides. *Journal of Functional Foods*, 44, 255-264.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Requena, J. R., Groth, D., Legname, G., Stadtman, E. R., Prusiner, S. B., & Levine, R. L. (2001). Copper-catalyzed oxidation of the recombinant SHa (29–231) prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(13), 7170-7175.
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free radical biology and medicine*, 49(11), 1603-1616.
- Rojas-Gutierrez, E., Muñoz-Arenas, G., Treviño, S., Espinosa, B., Chavez, R., Rojas, K., ... & Guevara, J. (2017). Alzheimer's disease and metabolic syndrome: A link from oxidative stress and inflammation to neurodegeneration. *Synapse*, 71(10), e21990.
- Rufián-Henares, J. A., Delgado-Andrade, C., & Morales, F. J. (2006). Analysis of heat-damage indices in breakfast cereals: Influence of composition. *Journal of Cereal Science*, 43(1), 63-69.
- Ruiz-Matute, A. I., Castro Vazquez, L., Hernández-Hernández, O., Sanz, M. L., & Martínez-Castro, I. (2015). Identification and determination of 3-deoxyglucosone and glucosone in carbohydrate-rich foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(12), 2424-2430.
- Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L., Caboni, M. F., Bogdanov, S., & Almeida-Muradian, L. B. D. (2009). Quality and standardisation of royal jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1(1), 1-6.

- Sadiq, I. Z. (2023). Free radicals and oxidative stress: Signaling mechanisms, redox basis for human diseases, and cell cycle regulation. *Current Molecular Medicine*, 23(1), 13-35.
- Sagona, S., Coppola, F., Giannaccini, G., Betti, L., Palego, L., Tafi, E., ... & Felicioli, A. (2022). Impact of different storage temperature on the enzymatic activity of *Apis mellifera* royal jelly. *Foods*, 11(20), 3165.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2, pp. xxxviii+-1546).
- Sanchez-Reinoso, A. D., Garces-Varon, G., & Restrepo-Diaz, H. (2014). Biochemical and physiological characterization of three rice cultivars under different daytime temperature conditions. *Chilean journal of agricultural research*, 74(4), 373-379.
- Sano, O., Kunikata, T., Kohno, K., Iwaki, K., Ikeda, M., & Kurimoto, M. (2004). Characterization of royal jelly proteins in both Africanized and European honeybees (*Apis mellifera*) by two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(1), 15-20.
- Sari, E., Mahira, K. F., Patel, D. N., Chua, L. S., Pratami, D. K., & Sahlan, M. (2021). Metabolome analysis and chemical profiling of Indonesian royal jellies as the raw material for cosmetic and bio-supplement products. *Heliyon*, 7(5).
- Savicka, M., & Škute, N. (2010). Effects of high temperature on malondialdehyde content, superoxide production and growth changes in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Ekologija*, 56(1), 26-33.
- Sawicki, T., Surma, M., & Sadowska-Rociek, A. (2023). Characteristics of contaminants in the polish-origin bee products and cancer risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 175, 113693.
- Šebeková, K., & Somoza, V. (2007). Dietary advanced glycation endproducts (AGEs) and their health effects—PRO. *Molecular nutrition & food research*, 51(9), 1079-1084.
- Šedivá, M., Laho, M., Kohútová, L., Mojžišová, A., Majtán, J., & Klaudiny, J. (2018). 10-HDA, a major fatty acid of royal jelly, exhibits pH dependent growth-inhibitory activity against different strains of *Paenibacillus* larvae. *Molecules*, 23(12), 3236.
- Sengar, G., & Sharma, H. K. (2014). Food caramels: a review. *Journal of food science and technology*, 51, 1686-1696.
- Sesta, G. (2006). Determination of sugars in royal jelly by HPLC. *Apidologie*, 37(1), 84-90.
- Sesta, G., & Lusco, L. (2008). Refractometric determination of water content in royal jelly. *Apidologie*, 39(2), 225-232.
- Shahidi, F. (2000). Antioxidants in food and food antioxidants. *Food/nahrung*, 44(3), 158-163.

- Shakoor, A., Zhang, C., Xie, J., & Yang, X. (2022). Maillard reaction chemistry in formation of critical intermediates and flavour compounds and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 393, 133416.
- Shapla, U., Solayman, M., Alam, N., Khalil, M., & Gan, S. (2018). 5-hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health. *Chemistry Central Journal*, 12(1).
- Sharma, C., Kaur, A., Thind, S. S., Singh, B., & Raina, S. (2015). Advanced glycation End-products (AGEs): an emerging concern for processed food industries. *Journal of food science and technology*, 52, 7561-7576.
- Shen, L. R., Wang, Y. R., Zhai, L., Zhou, W. X., Tan, L. L., Li, M. L., ... & Xiao, F. (2015). Determination of royal jelly freshness by ELISA with a highly specific anti-apalbumin 1, major royal jelly protein 1 antibody. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 16(2), 155.
- Shen, L., Liu, D., Li, M., Jin, F., Din, M., Parnell, L. D., & Lai, C. Q. (2012). Mechanism of action of recombinant acc-royalisin from royal jelly of Asian honeybee against gram-positive bacteria.
- Sheng, Y., Abreu, I. A., Cabelli, D. E., Maroney, M. J., Miller, A. F., Teixeira, M., & Valentine, J. S. (2014). Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chemical reviews*, 114(7), 3854-3918.
- Shoberi, N. S. (2010). *The role of pH, temperature and catalyst type in caramel manufacturing process* (Doctoral dissertation, UMP).
- Sidor, E., Miłek, M., Zagula, G., Bocian, A., & Dżugan, M. (2021). Searching for differences in chemical composition and biological activity of crude drone brood and royal jelly useful for their authentication. *Foods*, 10(9), 2233.
- Singh, B., Suri, K., Shevkani, K., Kaur, A., Kaur, A., & Singh, N. (2018). Enzymatic browning of fruit and vegetables: A review. *Enzymes in food technology: Improvements and innovations*, 63-78.
- Sohal, R. S. (2002). Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(1), 37-44.
- Soladoye, O. P., Juárez, M. L., Aalhus, J. L., Shand, P., & Estévez, M. (2015). Protein oxidation in processed meat: Mechanisms and potential implications on human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(2), 106-122.
- Spanidi, E., Athanasopoulou, S., Liakopoulou, A., Chaidou, A., Hatziantoniou, S., & Gardikis, K. (2022). Royal Jelly Components Encapsulation in a Controlled Release System—Skin Functionality, and Biochemical Activity for Skin Applications. *Pharmaceuticals*, 15(8), 907.
- Sreeramulu, D., Reddy, C. V. K., Chauhan, A., Balakrishna, N., & Raghunath, M. (2013). Natural antioxidant activity of commonly consumed plant foods in India: effect of domestic processing. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013(1), 369479.

- Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino acids*, 25, 207-218.
- Starowicz, M., & Zieliński, H. (2019). How Maillard reaction influences sensorial properties (color, flavor and texture) of food products?. *Food Reviews International*, 35(8), 707-725.
- Stocker, A., Schramel, P., Kettrup, A., & Bengsch, E. (2005). Trace and mineral elements in royal jelly and homeostatic effects. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19(2-3), 183-189.
- Sun, Y. I., Oberley, L. W., & Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*, 34(3), 497-500.
- Szczepanczyk, M., Ruzgas, T., Gullfot, F., Gustafsson, A., & Björklund, S. (2021). Catalase activity in keratinocytes, stratum corneum, and defatted algae biomass as a potential skin care ingredient. *Biomedicines*, 9(12), 1868.
- Taheri, S. E. H., Bazargan, M., Vosough, P. R., & Sadeghian, A. (2024). A comprehensive insight into peanut: Chemical structure of compositions, oxidation process, and storage conditions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 125, 105770.
- Takikawa, M., Kumagai, A., hirata, h., Soga, M., yamashita,y., Ueda, M., Ashida, h., & Tsuda, T. (2013). 10-hydroxy-2-decenoic acid, a unique medium-chain fatty acid, activates 5'-AMP-activated protein kinase in L 6 myotubes and mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(10), 1794-1802.
- Tamanna, N., & Mahmood, N. (2015). Food processing and maillard reaction products: effect on human health and nutrition. *International journal of food science*, 2015(1), 526762.
- Tamura, S., Amano, S., Kono, T., Kondoh, J., Yamaguchi, K., Kobayashi, S., ... & Moriyama, T. (2009). Molecular characteristics and physiological functions of major royal jelly protein 1 oligomer. *Proteomics*, 9(24), 5534-5543.
- Tan, B. L., Norhaizan, M. E., Liew, W. P. P., & Sulaiman Rahman, H. (2018). Antioxidant and oxidative stress: a mutual interplay in age-related diseases. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1162.
- Tan, Y. C., Abdul Sattar, M., Ahmeda, A. F., Abdul Karim Khan, N., Murugaiyah, V., Ahmad, A., ... & Johns, E. J. (2020). Apocynin and catalase prevent hypertension and kidney injury in Cyclosporine A-induced nephrotoxicity in rats. *PLoS One*, 15(4), e0231472.
- Tang, C., & Yuan, Y. (1999). Effect Of Temperatue On The Activity Of Superoxide Dismutase in royal jelly, Apic. *China*, 50, 10-11.
- Tanveer, M., Kanwal, N., Rafeeq, H., Arshad, A., Rehman, S. U., & Manzoor, S. (2023). Potential mutagenicity in Meat and Fish: An Outcome of High Heat Cooking.

- Taulavuori, E., Hellström, E. K., Taulavuori, K., & Laine, K. (2001). Comparison of two methods used to analyse lipid peroxidation from *Vaccinium myrtillus* (L.) during snow removal, reacclimation and cold acclimation. *Journal of Experimental Botany*, 52(365), 2375-2380.
- Teresa, S., Helena, R.-C., Ewa, W., & Piotr, S. (2009). Water determination in bee products using the Karl Fischer titration method. *Journal of Apicultural Science*, 53, 49–56.
- Tian, W., Li, M., Guo, H., Peng, W., Xue, X., Hu, Y., ... & Chen, Z. (2018). Architecture of the native major royal jelly protein 1 oligomer. *Nature communications*, 9(1), 3373.
- Tumilaar, S. G., Hardianto, A., Dohi, H., & Kurnia, D. (2024). A Comprehensive Review of Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants: Overview, Clinical Applications, Global Perspectives, Future Directions, and Mechanisms of Antioxidant Activity of Flavonoid Compounds. *Journal of Chemistry*, 2024(1), 5594386.
- Türk Standardları Enstitüsü. (2010). *Arı sütü* (TS 6666). Ankara: TSE.
- Uçar, M., Barlak, Y. (2019). The antioxidant activity of water, dmso and methanol extracts of royal jelly from Bursa province in Turkey. *Pharm. Drug Regul. Aff. J.*, 2, 1–5.
- Ulubayram, N., & Cinar, A. Y. (2023). Microencapsulated and fresh royal jelly: monitoring 10-HDA content, antibacterial and antifungal activity at different storage periods. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 66, e23220203.
- Uthaibutra, V., Kaewkod, T., Prapawilai, P., Pandith, H., & Tragoolpua, Y. (2023). Inhibition of skin pathogenic bacteria, antioxidant and anti-inflammatory activity of royal jelly from Northern Thailand. *Molecules*, 28(3), 996.
- Uversky, V. N., Albar, A. H., Khan, R. H., & Redwan, E. M. (2021). Multifunctionality and intrinsic disorder of royal jelly proteome. *Proteomics*, 21(6), 2000237.
- Valko, M. M. H. C. M., Morris, H., & Cronin, M. T. D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry*, 12(10), 1161-1208.
- Van Der Reest, J., Lilla, S., Zheng, L., Zanivan, S., & Gottlieb, E. (2018). Proteome-wide analysis of cysteine oxidation reveals metabolic sensitivity to redox stress. *Nature communications*, 9(1), 1581.
- Van Onselen, R., & Downing, T. G. (2019). β -N-methylamino-L-alanine inhibits human catalase activity: possible implications for neurodegenerative disease development. *International Journal of Toxicology*, 38(2), 129-134.
- Vankayala, S. L., Hargis, J. C., & Woodcock, H. L. (2013). How does catalase release nitric oxide? a computational structure–activity relationship study. *Journal of chemical information and modeling*, 53(11), 2951-2961.
- Vazhacharickal, P. J. (2021). A review on health benefits and biological action of honey, propolis and royal jelly. *J. Med. Plants Stud*, 9(5), 1-13.

- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2008). Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of food science*, 73(9), R117-R124.
- Wang, D., Xiao, H., Lyu, X., Chen, H., & Wei, F. (2023). Lipit oxidation in food science and nutritional health: A comprehensive review. *Oil Crop Science*, 8(1), 35-44.
- Wang, F., Chen, X., Wang, Y., Li, X., Wan, M., Zhang, G., ... & Zhang, H. (2022b). Insights into the structures, inhibitors, and improvement strategies of glucose oxidase. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 9841.
- Wang, H. Y., Qian, H., & Yao, W. R. (2011). Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food chemistry*, 128(3), 573-584.
- Wang, N., Hu, L., Guo, X., Zhao, Y., Deng, X., Lei, Y., ... & Zhang, J. (2022a). Effects of malondialdehyde on the protein oxidation and protein degradation of Coregonus Peled myofibrillar protein. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(5), 3459-3468.
- Wang, Q., Zhao, X., Ren, Y., Fan, E., Chang, H., & Wu, H. (2013a). Effects of high pressure treatment and temperature on lipit oxidation and fatty acid composition of yak (*Poephagus grunniens*) body fat. *Meat science*, 94(4), 489-494.
- Wang, Y. S., Ding, M. D., Gu, X., Wang, J., Pang, Y., Gao, L., & Xia, T. (2013b). Analysis of interfering substances in the measurement of malondialdehyde content in plant leaves. *Am. J. Biochem. Biotechnol*, 9(3), 235-242.
- Wang, Y., Ma, L., Wang, H., Liu, Z., Chi, X., & Xu, B. (2023). Effects of Sucrose Feeding on the Quality of Royal Jelly Produced by Honeybee *Apis mellifera* L. *Insects*, 14(9), 742.
- Wang, Z., Ren, P., Wu, Y., & He, Q. (2021). Recent advances in analytical techniques for the detection of adulteration and authenticity of bee products—A review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 38(4), 533-549.
- Wąsowicz, E., Gramza, A., Hęś, M., Jeleń, H. H., Korczak, J., Małecka, M., ... & Zawirska-Wojtasiak, R. (2004). Oxidation of lipids in food. *Polish journal of food and nutrition sciences*, 54(1s), 87-100.
- Wei, Q., Liu, T., & Sun, D. W. (2018). Advanced glycation end-products (AGEs) in foods and their detecting techniques and methods: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 82, 32-45.
- Wei, W. T., Hu, Y. Q., Zheng, H. Q., Cao, L. F., Hu, F. L., & Hepburn, H. R. (2013). Geographical influences on content of 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid in royal jelly in China. *Journal of Economic Entomology*, 106(5), 1958-1963.
- Weibel, M. K., & Bright, H. J. (1971). The glucose oxidase mechanism: interpretation of the pH dependence. *Journal of Biological Chemistry*, 246(9), 2734-2744.

- Weston, R. J. (2000). The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food chemistry*, 71(2), 235-239.
- Whyte, J. J., Samuel, M., Mahan, E., Padilla, J., Simmons, G. H., Arce-Esquivel, A. A., ... & Laughlin, M. H. (2011). Vascular endothelium-specific overexpression of human catalase in cloned pigs. *Transgenic research*, 20, 989-1001.
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A. T., Zingraff, J., ... & Descamps-Latscha, B. (1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney international*, 49(5), 1304-1313.
- Wong, C. M., Wong, K. H., & Chen, X. D. (2008). Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 78, 927-938.
- Wongchai, V., & Ratanavalachai, T. (2002). Seasonal variation of chemical composition of royal jelly produced in Thailand. *Science & Technology Asia*, 1-8.
- Wytrychowski, M., Chenavas, S., Daniele, G., Casabianca, H., Batteau, M., Guibert, S., & Brion, B. (2013). Physicochemical characterisation of French royal jelly: Comparison with commercial royal jellies and royal jellies produced through artificial bee-feeding. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29(2), 126-133.
- Wytrychowski, M., Daniele, G., & Casabianca, H. (2012). Combination of sugar analysis and stable isotope ratio mass spectrometry to detect the use of artificial sugars in royal jelly production. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403, 1451-1456.
- Xiong, K., Li, M. M., Chen, Y. Q., Hu, Y. M., & Jin, W. (2024). Formation and reduction of toxic compounds derived from the Maillard Reaction during the thermal processing of different food matrices. *Journal of Food Protection*, 100338.
- Xiong, Y. L. (2022). Muscle protein oxidation and functionality: a global view of a once-neglected phenomenon. *Meat and Muscle Biology*, 5(3).
- Xiong, Y. L., & Guo, A. (2020). Animal and plant protein oxidation: Chemical and functional property significance. *Foods*, 10(1), 40.
- Xue, X., Wu, L., & Wang, K. (2017). Chemical composition of royal jelly. *Bee products-chemical and biological properties*, 181-190.
- Yamada, P., Nemoto, M., Shigemori, H., Yokota, S., & Isoda, H. (2011). Isolation of 5-(hydroxymethyl) furfural from *Lycium chinense* and its inhibitory effect on the chemical mediator release by basophilic cells. *Planta medica*, 77(05), 434-440.
- Yang, D., Cai, C., Liu, K., Peng, Z., Yan, C., Xi, J., ... & Li, X. (2023). Recent advances in glucose-oxidase-based nanocomposites for diabetes diagnosis and treatment. *Journal of Materials Chemistry B*.

- Yang, X., Li, Y., Wang, L., Li, L., Guo, L., Yang, M., ... & Zhao, H. (2020). Determination of 10-HDA in royal jelly by ATR-FTMIR and NIR spectral combining with data fusion strategy. *Optik*, 203, 164052.
- Yang, Y. C., Chou, W. M., Widowati, D. A., Lin, I. P., & Peng, C. C. (2018). 10-hydroxy-2-decenoic acid of royal jelly exhibits bactericide and anti-inflammatory activity in human colon cancer cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 18, 1-7.
- Yasmin, A., Sumi, M. J., Akter, K., Rabbi, R. H. M., Almoallim, H. S., Ansari, M. J., ... & Imran, S. (2024). Comparative analysis of nutrient composition and antioxidant activity in three dragon fruit cultivars. *PeerJ*, 12, e17719.
- Yıldız, E. (2024). Single laboratory validation of four methods for quantification of hmf in honey. *Journal of Advanced Research in Natural and Applied Sciences*, 10(1), 45-59.
- Yıldız, O., Şahin, H., Kara, M., Aliyazıcıoğlu, R., Tarhan, Ö., & Kolaylı, S. (2010). Maillard reaksiyonları ve reaksiyon ürünlerinin gıdalardaki önemi. *Akademik Gıda*, 8(6), 44-51.
- Younessi, P., & Yoonessi, A. (2011). Advanced glycation end-products and their receptor-mediated roles: inflammation and oxidative stress. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 36(3), 154.
- Younus, H. (2018). Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *International journal of health sciences*, 12(3), 88.
- Yu, X., Tu, X., Tao, L., Daddam, J., Li, S., & Hu, F. (2023). Royal Jelly fatty acids: Chemical composition, extraction, biological activity, and prospect. *Journal of Functional Foods*, 111, 105868.
- Yükünç, G. O. (2020). Royal jelly: Proteins and peptides. *Journal of Apitherapy and Nature*, 2(2), 59-70.
- Zamora, R., & Hidalgo, F. J. (2011). The Maillard reaction and lipid oxidation. *Lipid Technology*, 23(3), 59-62.
- Zehiroglu, C., & Ozturk Sarikaya, S. B. (2019). The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. *Journal of food science and technology*, 56, 4757-4774.
- Zeinali, F., Homaei, A., & Kamrani, E. (2015). Sources of marine superoxide dismutases: Characteristics and applications. *International journal of biological macromolecules*, 79, 627-637.
- Zempleni, J., & Dakshinamurti, K. (2005). *Nutrients and cell signaling*. CRC Press.
- Zhang, L., Han, B., Li, R., Lu, X., Nie, A., Guo, L., ... & Li, J. (2014). Comprehensive identification of novel proteins and N-glycosylation sites in royal jelly. *BMC genomics*, 15, 1-14.

- Zhang, W., Xiao, S., & Ahn, D. U. (2013). Protein oxidation: basic principles and implications for meat quality. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(11), 1191-1201.
- Zhang, X., Ni, L., Zhu, Y., Liu, N., Fan, D., Wang, M., & Zhao, Y. (2021). Quercetin inhibited the formation of lipid oxidation products in thermally treated soybean oil by trapping intermediates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(11), 3479-3488.
- Zhang, X., Tao, N., Wang, X., Chen, F., & Wang, M. (2015). The colorants, antioxidants, and toxicants from nonenzymatic browning reactions and the impacts of dietary polyphenols on their thermal formation. *Food & function*, 6(2), 345-355.
- Zhang, X., Yu, Y., Sun, P., Fan, Z., Zhang, W., & Feng, C. (2019). Royal jelly peptides: Potential inhibitors of β -secretase in N2a/APP695swe cells. *Scientific reports*, 9(1), 168.
- Zhang, Y., Zhang, G., Huang, X., & Han, R. (2014). Proteomic analysis of *Apis cerana* and *Apis mellifera* larvae fed with heterospecific royal jelly and by CSBV challenge. *PLoS One*, 9(8), e102663.
- Zhao, D., Su, T., Wang, Y., Varma, R. S., & Len, C. (2020). Recent advances in catalytic oxidation of 5-hydroxymethylfurfural. *Molecular Catalysis*, 495, 111133.
- Zhao, F., Wu, Y., Guo, L., Li, X., Han, J., Chen, Y., & Ge, Y. (2013). Using proteomics platform to develop a potential immunoassay method of royal jelly freshness. *European Food Research and Technology*, 236, 799-815.
- Zhao, L., Chen, J., Su, J., Li, L., Hu, S., Li, B., ... & Chen, T. (2013). In vitro antioxidant and antiproliferative activities of 5-hydroxymethylfurfural. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(44), 10604-10611.
- Zhao, Y., Lu, K., Xu, H., Zhu, L., & Wang, S. (2021). A critical review of recent advances in the production of furfural and 5-hydroxymethylfurfural from lignocellulosic biomass through homogeneous catalytic hydrothermal conversion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 139, 110706.
- Zheng, H. Q., Hu, F. L., & Dietemann, V. (2011). Changes in composition of royal jelly harvested at different times: consequences for quality standards. *Apidologie*, 42, 39-47.
- Zheng, M., Liu, Y., Zhang, G., Yang, Z., Xu, W., & Chen, Q. (2023). The applications and mechanisms of superoxide dismutase in medicine, food, and cosmetics. *Antioxidants*, 12(9), 1675.
- Zhou, L., & Elias, R. J. (2013). Understanding antioxidant and prooxidant mechanisms of phenolics in food lipids. In *Lipid oxidation* (pp. 297-321). AOCS Press.
- Zhu, Z., Yuan, Y., Guo, J., Luo, X., Liu, S., & Miao, S. (2023). Encapsulation of SOD in chitosan-coated gel particles of alginate or mixture of alginate and shellac for targeted intestinal delivery. *Food Hydrocolloids*, 142, 108778.

- Zhu, Z., Zhao, C., Yi, J., Liu, N., Cao, Y., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2018). Impact of interfacial composition on lipid and protein co-oxidation in oil-in-water emulsions containing mixed emulsifiers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(17), 4458-4468.
- Zhuang, S., Ming, H., Yu, W., & Luo, L. (2025). Identification of freshness and metabolite changes of royal jelly during storage using Nano-ESI-MS and UPLC-Q/TOF-MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, 139, 107092.
- Zirbes, L., Nguyen, B. K., de Graaf, D. C., De Meulenaer, B., Reybroeck, W., Haubruge, E., & Saegerman, C. (2013). Hydroxymethylfurfural: a possible emergent cause of honey bee mortality?. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(49), 11865-11870.



ÖZGEÇMİŞ

İlköğretimve lise eğitimini Trabzon'da tamamladı. 2008 yılında Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği bölümünde lisans eğitimine başladı. 2013 yılında mezun olduktan sonra, aynı yıl Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği bölümünde tezli yüksek lisans programına başladı. 2016 yılında “Nar (*Punica granatum* L.) kabuk ve çekirdeklerinin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi” adlı tezini sunmasının ardından yüksek lisansını tamamladı. 2017 yılında şu an devam etmekte olduğu Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalı Biyokimya bilim dalında doktora eğitimine başladı. 2017 yılından itibaren Maçka Meslek Yüksekokulu Gıda İşleme Bölümü'nde öğretim görevlisi olarak görevine devam etmektedir.

Yazarın SCI, SSCI ve AHCI İndekslerine Giren Dergilerde Yayınlanan Makaleleri

I. Kolaylı, S., **Okumus Yukunc, G.**, Kara, Y., Demir Kanbur, E., Can, Z., Ozkok, A., & Tanugur Samanci, A. E. (2024). Bee bread from Anatolia: its chemical composition, phenolic and aromatic profiles, and antioxidant properties. *Journal of Apicultural Research*, 1-15 (SCI-Expanded).

Yazarın Diğer Dergilerde Yayınlanan Makaleleri

I. Kavgacı, M., **Okumus Yukunc, G.**, Keskin, M., Can, Z., & Kolaylı, S. (2023). Comparison of Phenolic Profile and Antioxidant Properties of Pulp and Seeds of Two Different Grapes Types (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) Grown in Anatolia: The Amount of Resveratrol of Grape Samples. *Chemistry Africa*, 6(5), 2463-2469 (Scopus).

II. **Okumus Yükcnc, G.** (2020). Royal jelly: Proteins and peptides. *Journal of Apitherapy and Nature*, 2(2), 59-70 (Hakemli Dergi).

III. Degirmenci, A., Er, M., Turkut, G. M., & **Okumus, G.** (2018). Comparison of the Effect of Process Temperature on Some Biochemical Properties of Nectars from Fresh and Dried Rosehip. *Journal of Apitherapy and Nature*, 1(1), 20-27 (Hakemli Dergi).