

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

DOĞU ve GÜNEYDOĞU ANADOLU BÖLGESİ BALLARININ
KİMYASAL BİLEŞİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hayrullah YILMAZ

Yönetici: Doç Dr. Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU

Doktora Tezi

ÖZET

Ülkemizin Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesi yörelerinden toplanılan 48 adet bal numunesinin kimyasal bileşimleri ve depolamanın bal bileşimine etkisi incelendi. Bal numunelerinde invert şeker, sakkaroz, nem, kül, asidite, prolin, hidroksimetilfurfural (HMF) ve diastaz aktivite tayinleri Association of Official Analytical Chemists (AOAC) ve Türk Standartları Enstitüsü (TSE)'nin kabul ettiği standart yöntemlerle yapıldı. Sonuçlar bir kaç numune dışında TSE standartlarına uyumluluk arzetti. Depolamanın HMF miktarı ve diastaz aktivitesi etkisi üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla; her numuneden yeterli bir miktar alınarak 1 yıl oda sıcaklığında kapalı kavanozlarda bekletildi. Sonra yapılan analizlerde depolama süresince HMF miktarında artma, diastaz aktivitelerinde ise, azalma görüldü. Bu bir yıl süresince de bal numunelerinin kristallenmeleri takip edildi. Bu süre içinde numunelerin çoğunda kristallenme görüldü.

Diğer taraftan sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile numunelerdeki protein bantları belirlendi. Değişik numunelerde elektroforez sonucunda 15 farklı protein bandı tesbit edildi.

Bu arada balda polifenol oksidaz enzminin tarafımızdan ilk kez teşhisi yapılarak, aktivite ölçümü için optimum şartlar belirlendi. 4-metil katekol substratı için K_M ve V_{max} değerleri $3,5 \cdot 10^{-3}$ M ve 16,66 EÜ/ml'xdak olarak tesbit edildi.

SUMMARY

It has been examined composition of 48 honey samples and the effect of storage on the composition of this samples collected from east and south east Anatolian areas of Turkey.

In samples; invert sugar, saccharose, moisture, ash, acidity, proline, hydroxymethylfurfural (HMF) and diastase activity values were determined by standard methods of Association of Official Analytical Chemists (AOAC) and Turkish Standards (TS). The results were convenient to TS standards with the exception of several samples. In order to examination of effect of storage on diastase activity and HMF content, sufficiently amount of each samples were waited for one year in closed jars at room temperature. In finally analyses, it has been noticed that, HMF content increased and diastase activity decreased with time of storage. Crystallization of honey samples were followed at this time and most of samples were crystallized .

On the other hand, protein bands in samples were identified by sodiumdodecyl sulphate-polyacrylamid gel electrophoresis (SDS-PAGE). In electrophoresis, it has been found 15 different protein bands in various samples.

By the way, polyphenol oxidase enzyme was identified in honey firstly by us and optimum conditions were obtained for activity measurement. K_M and V_{max} values for 4-methyl catechol substrate were found as $3,5 \cdot 10^{-3}$ M and 16,66 EU/mlxmin respectively .

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu alışma, Atatürk Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenen bir proje olup, Doç.Dr.Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU'nun yöneticiliğinde gerçekleştirilmiştir. Deneysel alışmalarım Atatürk Üniversitesi Fen-Edb. Fakültesi Kimya Bölümü ve Dicle Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Başta doktora çalışmalarımın her safhasında büyük yardım ve desteğini gördüğüm Sayın Hocam Doç.Dr.Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım

Ayrıca çalışmamın deney safhasında desteklerini gördüğüm Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof.Dr.Metin BALCI, Sayın Öğr.Gör.Dr.Halis şAKİROĞLU ve bölümün diğer öğretim elemanlarına; Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Doç.Dr. Hamza YILMAZ'a ve Dicle Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Eğitimi Anabilim Dalı başkanı Sayın Yrd.Doç.Dr. Giray TOPAL'a teşekkürü bir borç bilirim.

Eylül 1994

Arş.Gör.Hayrullah YILMAZ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	i
SUMMARY	ii
TEŞEKKÜR	iii
1. GİRİŞ	1
1.1. Balın Genel Tanıtımı	1
1.2. Balın Kimyasal Bileşimi	2
1.3. Bal Bileşiminin Standartları	6
1.4. Depolamanın Bal Bileşimi Üzerindeki Etkisi	7
1.5. Balların Kristallenmesi	8
1.6. Balın Botanik Orijini	9
1.7. Araştırmanın Amacı	10
2. MATERYAL ve YÖNTEMLER	11
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	11
2.2. Faydalanılan Alet ve Cihazlar	11
2.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	12
2.4. Bal Numunelerinin Toplanması ve Depolanması	16
2.5. Balın Kimyasal Analizi	19
2.5.1. Nem Tayini	19
2.5.2. Kül Tayini	20
2.5.3. Asidite Tayini	20
2.5.4. Prolin Tayini	21
2.5.5. İvert Şeker Tayini	21
2.5.6. Sakkaroz Tayini	22

2.5.7. HMF Tayini	23
2.5.8. Diastaz Aktivite Tayini.....	25
2.6. Bal Proteinlerin Belirlenmesi İçin Yapılan Çalışmalar	27
2.6.1. Bal Numunelerin Diyalizi ve Liyofilizasyonu	27
2.6.2. Bal Proteinlerinin Belirlenmesi İçin Yapılan Soyumdodesil sülfat Poliakrilamid Jel Elektforezi	27
2.7. Bal Polifenol Oksidaz Enzimi İle İlgili Yapılan Çalışmalar	28
2.7.1. Bal Numunelerinin Analize Hazır Hale Getirilmesi	28
2.7.2. Bal Polifenol Oksidaz Enzim Aktivitesi Tayini.....	29
2.7.3. Optimum pH Çalışması	29
2.7.4. Optimum Sıcaklık Çalışması.....	29
2.7.5. Optimum Şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması	29
2.7.6. Bal Polifenol Oksidaz İzoenzimlerinin Tabii Şartlarda Poliakrilamid Jel Elektforezi ile Belirlenmesi.....	30
2.8. Kullanılan İstatistiki Yöntemler	32
3. DENEY SONUÇLARI	33
3.1. Depolama Süresince Bal Numunelerinin Kristallenmesi	33
3.2. Bal Numunelerinin Kimyasal Analiz Sonuçları	35
3.3. Başlangıçta ve Depolamadan Sonra Balda Tayin Edilen HMF Miktarları ve Diastaz Aktivite Sonuçları.....	39
3.4. Bal Proteinlerinin Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektforez Sonucu.....	41
3.5. Bal Polifenol Oksidaz Enzimi İçin Elde Edilen Sonuçlar.....	42
3.6. İstatistiki Analizlerin Sonuçları.....	46
4. TARTIŞMA.....	47
KAYNAKLAR	54

1. GİRİŞ

1.1. Balın Genel Tanıtımı

Bal, eskiden beri bilinen doğal tatlı besinlerimizdendir. Bal; bitkilerin çiçeklerinde bulunan nektarların veya bitkilerin canlı kısımlarıyla bazı eşkanatlı böceklerin salgıladığı tali maddelerin bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından toplanması, vücutlarında bileşimlerinin değiştirilip petek gözlerine depo edilmesi ve burada olgunlaşması sonucunda meydana gelen tatlı bir üründür ¹.

Bal arıları değişik kaynaklardan emdikleri şekerli özuları bal keselerinde sindirim suları ile karıştırarak işleyip, kovanlardaki balmumundan oluşan doğal veya yapay peteklere getirip püskürtürler. Arıların bu püskürttüğü bal sulu olup, kovanlardaki ısı ve arıların kanat çırpmalarından ileri gelen hava değişimi ile bir kısım suyunu kaybeder, arıdan gelen enzimlerin etkisi ile bal olgunlaşır, sakkaroz glukozla fruktoza ayrışır. Aynı zamanda kısmen yüksek moleküllü şekerler meydana gelir. Su oranı %17-20 ye düşünce arı, gömeci balmumundan bir kapakla örter ².

İhlamur , meşe, erik ve çam ağaçları gibi bitkilerin yapraklarının sızdırdıkları şekerli sıvı ile yaprak bitleri, kırmızı böceği ve bazı ufak böceklerin yaprak üzerine salgıladıkları tatlı sıvıdan meydana gelen bala salgı balı, çiçeklerin balözlükleri tarafından salgılanan nektar (balözü) dan meydana gelen bala da çiçek balı denir ². Ayrıca arıların orman gülü ve datura gibi bitkilerden aldıkları zehirli maddelerden meydana getirdikleri bala ise zehirli bal(deli bal) denilmektedir ³.

Bal piyasada başlıca iki şekilde, petekli ve peteksiz olarak bulunur. Petek içinde bulunan ve hiçbir yabancı madde ihtiva etmeyen, gömeç ağızları sırlanmış ve gömeçleri bozulmamış doğal bala petekli bal denir. Oda sıcaklığında kendiliğinden veya santrifüjle peteğinden ayrılmış bala da süzme bal denir.

Balın başlıca fiziksel özellikleri şöyle özetlenebilir. Bal, higroskopik bir madde olup havadan nem alma özelliğine sahiptir. Balın havadan nem alması onun özel yapısına,

şeker muhteviyatına ve içerisindeki su miktarına bağlıdır. Balın özgül ağırlığı içerisindeki su miktarı ve sıcaklığa bağlı olup, 1,41-1,45 gr/cm³ arasında değişmektedir. Bal renksiz durumdan koyu kırmızıya kadar, sarı, kehribar, kahverengi, yeşilimsi ve kırmızımsı renklere olmaktadır. Bala renk veren maddeler klorofil, karoten, ksantofil ve bileşimi bilinmeyen sarı ve yeşil rengi meydana getiren bitki pigmentleridir.

Balın polarize ışığı çevirme yönü ve miktarı bal çeşitlerine göre değişmektedir. Çiçek balı genellikle polarize ışığı sola, salgı balı ise sağa çevirmektedir. Balın bu özelliğinden faydalanarak salgı balı olup olmadığı anlaşılabilir. Sakkaroz da polarize ışığı sağa çevirdiğinden sakkarozdan yapılmış yapay balların tesbitinde balın bu özelliğinden faydalanılmaktadır. Balın viskozitesi akıcılığa karşı koyma özelliğini ifade eder. Balın akıcılığının yavaş veya hızlı olması içerisindeki su miktarıyla yakından ilgilidir. Balın önemli bir özelliği de kristallenmesidir. Kristallenmede yapı değişimi olmaz, yalnız şekil ve görünüş değişikliği görülür. Zamanla hemen hemen çoğu ballarda kristallenme olayı görülür⁴.

1.2. Balın Kimyasal Bileşimi

1.2.1. Karbohidratlar

Bal karbohidratlı bir madde olup, katı maddesinin %95-99'unu şekerler teşkil etmektedir. Balda en fazla fruktoz ve glukoz şekerleri bulunmakta ve bala tadını veren bu iki monosakkaridin bitki özsularında fazla miktarda bulunan sakkarozun invertaz enzimi ile inversiyona uğrayarak meydana geldiği bilinmektedir⁴.

Genelde bütün ballarda fruktoz miktarı ağırlıktadır. Fakat nadir olarak kolza ve kara hindiba çiçeği gibi bazı bitkilerden elde edilen ballarda glukoz oranı daha fazladır. Geri kalan karbohidratları oligosakkaritler, çok az bir miktarda polisakkaritler oluşturmaktadır. Balda tesbit edilen şekerler arasında fruktoz ve glukoz yanında arabinoz, galaktoz, sakkaroz, maltoz, izomaltoz, laktoz, melibioz, galaktobioz, melezitöz ve rafinoz bulunmaktadır⁵.

1.2.2. Enzimler

Bal enzimler bakımından oldukça zengindir. Başlıca bilinen bal enzimleri amilaz (diastaz), invertaz, katalaz, fosfataz, glukoz oksidaz, proteaz, esteraz ve β -glukozidazdır ⁶. Enzimlerin bir kısmı nektardan ve yaprak bitlerinin yaprak üzerinde bıraktıkları salgıdan, büyük bir kısmı ise arıların tükrük bezlerinin salgılarından kaynaklanır ².

Baldaki amilazlar α -amilaz ve β -amilaz olmak üzere iki gruba ayrılır. α - Amilaz nişastaya etki ederek α -1,4 glikozid bağlarını parçalar; dekstrin ve çok az miktarda maltoz oluşur. Uzun süreli etkiye sonucunda dekstrin maltoza ve izomaltoza parçalanır. β -Amilaz ise , polisakkaritlerin indirgen olmayan ucundan her defasında bir maltoz birimi oluşturmak üzere α -1,4 glikozid bağını parçalar⁷. α - Amilazın optimum pH'sı 22-30°C de 5,0 ve 45-50°C de ise 5,3 olarak belirlenmiştir. β -Amilazın optimum pH' sı söz konusu sıcaklıklarda 5,3 bulunmuştur. Buna göre bal amilaz (diastaz)'ın optimum pH'sı 5,3 olarak kabul edilmiştir ⁸. Bal amilazın kaynağı yapılan çalışmalarda arı olduğu tesbit edilmiştir ⁹.

İnvertaz (sakkaraz) enzimi nektarların bala dönüşmesindeki kimyasal değişikliklerin çoğunda sorumlu olan enzimdir. Bu enzimin arı tarafından nektara katıldığı ve aktivitesinin balda devam ettiği bilinmektedir. İnvertaz enzimi sakkarozu fruktoz ve glukozu hidroliz eder. İnvertazın fruktoinvertaz ve glukoinvertaz olmak üzere iki genel tipi vardır. Bunlar, değişik aktiviteye sahip olmaları aktivitelerinin glukoz ve fruktoz tarafından inhibe edilmesine göre farklılık arzederler. Bal invertazının bir glukoinvertaz olduğu tesbit edilmiştir ¹⁰.

Önemli bal enzimlerinden olan glukoz oksidaz, glukoz üzerine etki ederek hidrojen peroksit ve glukonolakton oluşturmaktadır. Burada meydana gelen organik asit bal için koruyucu görevi yapar ¹¹.

Yine balda bulunan katalaz enzimi de hidrojen peroksidi oksijen ve suya dönüştürmektedir. Katalaz enziminin koruyucu fonksiyonu, muhtemelen askorbik asit, glutatyon ve K vitamini tarafından güçlendirilir; çünkü bu bileşikler kolayca elektron alabilir ve serbest radikalın ortadan kaldırılmasında yakalayıcı fonksiyon üstlenebilirler ¹².

Ayrıca balda bulunan asit fosfataz enziminin pH=3,5-6,5 aralığında etkili olduğu en büyük aktiviteyi 35 °C'de gösterdiği ve Mg⁺² iyonu tarafından aktivite edildiği belirlenmiştir¹³. Bu enzimler yanında son yıllarda tesbit edilen β-glukozidaz enziminin 60 °C'de optimum pH'sı 4,2 olarak bulunmuştur⁶.

1.2.3. Asitler

Bal asidik bir özellik taşır ve pH'sı 3,5-5,5 arasında değişmektedir. Balda en çok bulunan asit glukonik asittir¹⁴. Glukonik asit yanında ; asetik, bütirik, sitrik, formik, laktik, malik, maleik , okzalik, piroglutamik ve süksinik asitlerin varlığı tesbit edilmiştir¹⁵.

1.2.4. Mineral Maddeler

Bal içerisindeki mineral maddelerin miktarı %0,17 civarında olmakla beraber % 0,02 ile %1,0 arasında değişiklik göstermektedir⁴. Balda Ni, Ca, Mg, Fe, Cu, Mo, Al, P, Sn ve Si elementleri bulunmaktadır¹⁶. Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise balda; K, Br, As, Sb, Fe, Zn, Cr, Ce ve Co elementleri tayin edilmiştir. Bu elementler arasında en çok 960 ppm oranında K, en az 0,03 ppm oranında ise As bulunmuştur¹⁷.

1.2.5. Vitaminler

Bal, eser miktarda da olsa bir çok vitamin bulundurmaktadır. Balda; tiamin, riboflavin, askorbik asid, piridoksin, niasin ve pantotenik asit vitaminleri tesbit edilmiştir⁸.

1.2.6. Amino Asitler ve Proteinler

Yapılan çalışmalarda balda 18 amino asidin varlığı da belirlenmiştir¹⁹. Toplam amino asitlerin %95'ine yakını prolin oluşturmaktadır²⁰. Yapılan bir çalışmada balda prolin miktarı 34,0 - 132,2 mg/100g arasında değişiklik gösterdiği belirlenmiştir²¹. Ayrıca balda elektroforez yöntemiyle molekül ağırlıkları 10 bin ile 500 bin dalton arasında değişen 19 farklı protein bandı elde edilmiştir¹⁸. Proteinler arasında enzimlerin yanında albumin, globulin, proteoz ve pepton proteinleri tesbit edilmiştir¹⁵.

1.2.7. Koku ve Tat Vericiler

Çok değişik şartlar ve kaynaklardan hazırlanan balların koku ve tadı çok değişiktir. Tat ve kokuyu balın uçucu bileşenleri oluşturur. Bu bileşenler; şekerler, amino asit ve diğer asitler, tanenler ve az miktarda uçucu olmayan maddeler de balın tadına etki ederler. Yapılan çalışmalarda formaldehit, asetaldehit, propanaldehit, izobütirilaldehit, aseton, metil etil keton, 2-bütanol, n-propanol, metil format, etilformat ve dietil eter gibi maddeler tespit edilmiştir¹⁵.

1.2.8. Su

Balın önemli bir bileşeni de sudur. Su bütün ballarda %15-25 oranında bulunmaktadır. Bal içerisindeki su miktarını bitki kaynağı, rutubet ve arıcının balı süzme ve pazarlama esnasında kullandığı metotlar tayin eder. Eğer bal, kovandan tam olgunlaşmadan alınırsa içerisindeki su miktarı yüksek olur⁴.

1.2.9. Hidroksimetilfurfural (HMF)

HMF maddesi normal olarak bal bileşeni değildir. Fakat çok az bir miktarda da olsa taze ballarda bulunmasına rağmen²², genellikle sıcaklığın ve depolanmanın etkisi ile glukoz ve fruktozun dehidratasyonu ile oluşur. Bundan dolayı baldaki HMF miktarı kalitenin önemli bir kriteri olarak kabul edilmektedir. Balın uzun süre depolanması ve yüksek sıcaklıkta ısıtılması sonucu bu oran 30-40 mg/kg'a yükselir. Bazen bu sınırı aşar. Bu oranın 150 mg/kg'dan daha büyük bulunması bala invert şeker katılmasının bir belirtisidir²³.

1.3. Bal Bileşiminin Standartları

Yapılan bir çok çalışmalar neticesinde, balın kalitesini belirleyen bileşenler tesbit edilmiş ve standart olarak bu değerler kabul edilmiştir. Bu standartlar başlıca şunlardır:

Su oranı; balın önemli bir bileşeni olan su, kalite bakımından önemli bir kriterdir. Su oranı yüksek olan ballarda fermantasyon olma ihtimali yüksektir. Aynı zamanda balın kovanlarda olgunlaşmadan hasat edildiğinin de bir göstergesidir. Bundan dolayı ballarda limit su oranı en çok %21 olarak kabul edilmiştir ^{1,24}.

Şeker oranı; balın kalitesini belirlemede ele alınacak olan en önemli kriterlerden birisi şeker muhtevasıdır. Baldaki şekerlerin en büyük kısmını fruktoz ve glukoz oluşturmaktadır. Standart olarak bu iki şekerin toplamı (invert şeker) minimum çiçek balında %65 ve salgı balında ise %60 olması gerekmektedir ^{1,24}. Ancak balın kalitesini belirlemede en çok sakkaroz miktarı nazara alınmaktadır. Sakkaroz çiçek balında ençok %5 ve salgı balında ise ençok %10 olarak kabul edilmiştir ^{1,24}. Zira sakkaroz oranının daha fazla olması arıların şekerle beslenmesi veya direkt olarak bala sakkaroz katılmasının bir belirtisidir.

Enzim aktivitesi; balda çeşitli enzimler bulunmasına rağmen, kalite kontrolünde ölçü olarak alınan diastaz ve invertaz enzimlerinin aktivitelerdir. Çünkü her iki enzim de uzun süre depolama veya yüksek sıcaklığa maruz kalma esnasında aktivitelerinde azalma görülmektedir ²⁵. Bundan dolayı standart olarak balda minimum diastaz aktivitesi 8 (diastaz sayısı cinsinden), invertaz aktivitesi 4 (invertaz sayısı cinsinden) olarak kabul edilmiştir ²⁶.

HMF miktarı; hemen hemen bütün ballarda eser miktarda bulunan HMF, yüksek sıcaklıkta ve uzun süre bekleme sırasında bu miktar artmaktadır. HMF taze ballarda kg başına 10 mg'ı nadiren aşar. Yüksek sıcaklıklarda HMF'nin artması spesifik bir kriter değildir. Genellikle invert şekerin bala katılması ile artar ve 150 mg/kg oranına ulaşır. Bunun yanında HMF'nin oluşması ortamın pH'sına da bağlı olup, yüksek asitli ortamda

miktarı artar. Standart olarak balda maksimum HMF miktarı 40 mg/kg olarak kabul edilmiştir^{1,24}.

Asitlik oranı; ballar genellikle asidik reaksiyonlar gösterirler. Fakat balın zamanla fermantasyona uğrayarak asit miktarında bir artış söz konusu olmaktadır. Yani fermantasyon sonucunda oluşan alkol bakteriel etki ile asetik aside dönüşmektedir. Standart olarak direkt titrasyon ile 1 kg balda en çok 40 milieşdeğer asit olması gerekir^{1,24}.

Kül oranı; baldaki kül, mineral maddelerin miktarlarına bağlı olup, bal çeşidine göre bu miktar değişiklik arz etmektedir. Genel olarak çiçek balında kül miktarı, salgı balına göre düşüktür. Bundan dolayı kül oranı tesbiti ile balın çeşidi tesbit edilebilir. Standart olarak çiçek balında kül oranı maksimum %0,6, salgı balında ise bu oran maksimum %1,0 olarak kabul edilmiştir²⁴.

Diğer Özellikler; kimyasal bileşimi yanında balın kalitesini etkileyen renk ve tat gibi fiziksel özellikler de göz önüne alınacak önemli kriterlerdir. Bal tabii bir ürün olduğundan balın rengi, alındığı bitkiye, iklim şartlarına ve kovandaki balın olgunlaşma sıcaklığına göre değişmektedir. Balın rengi su beyazından koyu kahverengine kadar değişiklik göstermektedir. Salgı balı çiçek balına göre daha koyu bir renk görünümündedir⁴. Balın tadı ise göz önüne alınacak en önemli özelliklerden birisidir. Balın kendine has bir tadı olup, enstrümental metodlarla değerlendirmek mümkün değildir. İdeal bir bal, yağ, katran ve fermantasyondan gelen nahoş koku ve tatlardan uzak olmalıdır. Genellikle balın kokusu alındığı çiçeklerin kokusunu andırır.

1.4. Depolamanın Bal Bileşimi Üzerindeki Etkisi

Balın depolanması sırasında, bileşiminde değişmeler olduğu bilinmektedir. Bal dayanıklı bir ürün olmakla beraber, depolanma sırasında ortamın sıcaklığına bağlı olarak bazı bileşenlerin miktarlarında azalma, bazılarında ise artma görülmüştür. Bileşenlerdeki bu artma ve azalma balın kalitesini olumsuz etkilemektedir. Depolanma esnasında en fazla etkilenen önemli kriterlerden HMF ve diastaz aktivitesi olup, balın tipine ve pH'sına bağlı

olarak HMF miktarında artma ve diastaz aktivitesinde ise azalma olduğu tesbit edilmiştir ²⁷.

Oda sıcaklığında 4, 16 ve 28 ay sürelerle depolanma sonucunda, bal numunelerinde HMF miktarları sırasıyla; 4,7; 13,1 ve 33,2 mg/kg ve diastaz sayıları ise sırasıyla; 25,6; 18,1 ve 14,5 olarak tesbit edilmiştir ²⁸.

10°C nin altındaki sıcaklıkta depolanma süresince HMF miktarlarında değişme olmadığı, oda sıcaklığında az miktarda arttığı ve 36°C sıcaklıkta ise hissedilebilir derecede arttığı belirlenmiştir ²⁹. Oda sıcaklığında depolanma sırasında bal diastaz aktivitesinde az miktarda azalma görüldüğü, fakat 36°C sıcaklıkta 5 ay sonunda diastaz sayısının 8'in altına düştüğü görülmüştür ³⁰.

Yurdumuzda yapılan bir çalışmada ise, bal numunelerinin buzdolabında ve oda sıcaklığında 5 ay süre ile depolanması sonucunda, HMF miktarları (mg/kg) ortalama buzdolabında 1,92 den 2,31'e ve oda sıcaklığında ise 1,92'den 2,49'a yükseldiği, diastaz sayıları buzdolabında 13,5'den 13,0'e ve oda sıcaklığında ise 13,5'tan 12,6 'ya düştüğü tesbit edilmiştir ³¹. Oda sıcaklığında ve 50°C de (4-5 ay) depolanma esnasında bal renginin koyulaştığı ve her iki sıcaklıkta da fruktoz, glukoz ve sukroz miktarlarının azaldığı tesbit edilmiştir ³². Oda sıcaklığında yapılan 2 yıllık bir depolanma esnasında asitlikte belirgin bir artış olduğu görülmüştür ³³.

1.5. Balların Kristallenmesi

Balın yapısı toplandığı bitkinin nektar veya ifrazatına bağlı olarak değişiklik gösterir. Bundan dolayı kristallenme bazı ballarda görünürken, bazılarında görülmez. Ballarda görülen kristalizasyonda yapı değişikliği olmaz, yalnız şekil ve görüntü değişikliği olur. Kristalizasyon; balın su, fruktoz ve glukoz şeker oranları ve sıcaklığa bağlıdır. Balın elde edildiği bitki kaynaklarının da kristallenme üzerinde etkisi vardır. Genellikle ballarda fruktoz miktarı glukozu göre daha fazladır. Fakat bazı bal çeşitlerinde glukoz miktarı daha fazla olup, kristallenmeyi hızlandırmaktadır ⁴.

Balda kristalizasyon birçok şekilde ifade edilebilmektedir. Bunlar arasında en çok kullanılan glukozun suya oranıdır. Genel bir kural olmamakla birlikte glukoz/su oranı 1,7

ve daha küçük değerlere sahip olan ballarda hiç kristalize olmamakta, glukoz/su oranı 2,1 ve üzerindeki değerlere sahip olanlar ise çabuk kristalize olmaktadır³⁴.

Ayrıca fruktoz/glukoz oranı da kristallenmeyi etkilediği tesbit edilmiştir. Fruktoz/glukoz oranının 1 'e yaklaşması kristallenmeyi abuklaştırdığını, 1,3 ve daha yüksek oranlarda ise kristallenmenin geciktiği grlmřtir³⁵.

Sonuç olarak balların kristalize olması glukozun balda fazla olması veya fruktoz/glukoz oranı ve glukoz/su oranı rol oynamaktadır. Kristalize olmuş ballar uzun süre bu şekilde bekletilirse daha çabuk bozulmakta ve ekřimectedir³⁶.

1.6. Balın Botanik Orijini

Değerli bir besin maddesi olan bala, üstün özellik vermek için yapılan araştırmalardan biri, baldaki polenlerin analizi ile nektarlı bitkilerin tanıtımıdır. Çünkü bal kalitesine etki eden önemli bir faktör de balın kaynağı olan bitki çeşitleridir. Ballarda polenlerin belirlenmesi, balın botanik ve coğrafik orjininin belirlenmesine sebep olmaktadır. Bundan dolayı birçok memleketlerde polen tayini yapılarak, balın botanik orjini tesbit edilmiřtir³⁷. Yurdumuzda da çeşitli bölgelerden alınan ballarda polen tayinleri yapılmıřtır³⁸. Yurdumuzda yaklaşık 9 bin çeşit iek bulunmakta, dolayısı ile farklı karakterlerde bal üretimi mümkün olmaktadır³⁹.

Polen veya iek tozu denilen madde, çiçeğin erkek organlarında meydana gelir. Polen yapı itibari ile arıların beslenmesinde değerli bir besin maddesi olduğu için arılar tarafından büyük miktarlarda toplanıp kovanlara tařınmaktadır⁴.

1.7. Araştırmanın Amacı

Ülkemiz ekoloji ve flora bakımından arıcılığa elverişli olmasından bal üretiminde Dünya ülkeleri arasında önemli bir yer tutmaktadır. Yıllık bal üretimi tahminen 60-70 bin ton civarındadır. Fakat ülkemizde bal üzerine yapılan çalışmalar diğer dünya ülkelerine göre oldukça az görülmektedir.

Ülkemizde bazı balların kimyasal yapı özellikleri üzerine birkaç araştırmacı tarafından sınırlı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmada ise, daha önce balların kimyasal yapı özellikleri üzerine yapılagelen analizlerin (nem, kül, invert şeker, prolin, sakkaroz, HMF, asidite ve diastaz aktivitesi) yanında, bu sahada oldukça yeni bir metod olan SDS-PAGE ile farklı kaynaklı bal proteinlerinin teşhisi yapılması amaçlanmıştır. Böylece bu çalışma ülkemiz balları üzerine ilk defa uygulanmış olacaktır.

Diğer taraftan şimdiye kadar Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi ballarında geniş çaplı bir çalışma yapılmış olmaması ve tarafımızdan bal numunelerinin kontrollü olarak bir yıl muhafaza edilerek depolamanın HMF miktarı ile diastaz aktivitesi üzerindeki etkisinin araştırılması teze ayrıca bir önem kazandırmaktadır.

Son olarak bal enzimleri üzerinde yaptığımız çalışma sonucunda balda ilk defa tarafımızdan tesbit edilen polifenol oksidaz enziminin karakterizasyonuna çalışılmıştır.

2. MATERYAL ve YÖNTEMLER

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Çalışmalarımızda kullanılan metanol, fenolftalein, sakkaroz, potasyum ferrosiyaniür, metilen mavisi, sodyum potasyum tartarat, barbitürik asit, p-toluidin, sodyum hidroksit, hidroklorik asit, nişasta, sodyum klorür, asetik asit, L-prolin, ninhidrin, β -merkaptto etanol, potasyum iyodat, sodyum asetat, izopropil alkol, formik asit, trihidroksimetilaminometan (Tris) ve etilen glikol monometil eter **E.Merck A.G**'den; çinko asetat ve sodyum bifosfat **Hopkin & Williams Ltd.** den; diyaliz torbaları , N, N, N', N' tetrametil etilen diamin (TEMED), katekol ve 4-metilkatekol **Sigma Chemical Comp.**'den; akrilamid, N, N'-metilen bisakrilamid **Fluka A.G.**'den; Coomassie brillant blue G-250 **Feinbiochemical** ' den ; etanol ve bakır sülfat **Delta** 'dan ve iyot **Daym**'den sağlandı. Kullanılan çözeltilerin hepsi destile su ile hazırlandı.

2.2. Faydalanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Spektrofotometre: LKB- Biochrom, ULTROSPEC-II Model 4050

pH - Metre: Schoot C6 840 pH Meter

Magnetik karıştırıcı : IKAMAG RH Janke Kunkel

Elektroforez tankı : Hoefer HSI

Terazi : Libror, EB-330 H

Kronometre : Hanhard, Elektronische Digital Stoppuhr

Otomotik Pipetler: Fischer

Su banyosu: Nüve SB 100

Fırın: Elektro-meg 50 Hz 220 V

Refraktometre: JENA 181282

Etüv :NEL FN 500

Soğutmalı Santrifüj: Heraeus Sepatech

Sabit sıcaklık sirkülatörü : HAAKE FE

2.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin hazırlanışı aşağıdaki gibidir.

i- p-Toluidin çözeltisi (100g/L): 10,0 g p-toluidin, 50 ml izopropil alkol içinde su banyosunda hafifçe ısıtılarak çözüldü. Sonra 100 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Çözeltiye saf asetik asitten 10 ml katılıp karıştırıldı. Hacim, izopropil alkol ile 100 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti en az 24 saat dinlendirildikten sonra kullanıma hazır hale getirildi.

ii- Barbitürik asit çözeltisi (%0,5): 0,500 g barbitürik asit 100 ml'lik bir balon jodede 60-70 ml suda çözüldü . Hacim, su ile işaret çizgisine kadar tamamlandı.

iii- Oksijensiz destile su: Kaynar haldeki destile su içinde azot gazı geçirilerek suda çözülmüş halde bulunan oksijen uzaklaştırıldı. Elde edilen su soğutuldu ve ağzı hava sızdırmayacak şekilde bir kap içinde muhafaza edildi.

iv- Fehling-A çözeltisi : 6,928 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 100 ml' lik bir ölçülü balonda 40 ml suda çözüldü. Hacim, işaret çizgisine kadar su ile tamamlandı. Bu çözelti taze olarak günlük hazırlandı.

v- Fehling-B çözeltisi: 34,6 g $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \text{ NaK} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve 10 g NaOH 100 ml 'lik bir ölçülü balonda 60 ml suda çözüldü. Hacim su ile işaret çizgisine kadar tamamlandı. Bu çözelti 4 gün dinlendirildikten sonra orta gözenekli bir süzgeç kağıdından süzülerek kullanıma hazır hale getirildi.

vi- Metilen mavisi çözeltisi (%0,2): 0,2 g metilen mavisi, 100 ml' lik bir balon jodede bir miktar suda çözüldü. Hacim, su ile işaret çizgisine kadar tamamlandı.

vii- Carrez I çözeltisi (1 M): 21,94 g $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 ml' lik bir balon jodede 3 ml asetik asit ve 60 ml suda çözüldü. Hacim, su ile işaret çizgisine kadar tamamlandı.

viii- Carrez II çözeltisi (0,25 M): 10,56 g $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 100 ml'lik bir balonda 50-60 ml suda çözüldü. İşaret çizgisine kadar su ile tamamlandı .

ix- Stok invert şeker çözeltisi (10 g/L): 9,50 g saf sakkaroz uygun bir erlen içinde 30-40 ml suda çözüldü. 5 ml derişik HCl ($d=1,19$ g/ml) ilave edildi ve 60 °C' ye ayarlanmış su banyosunda, arada bir karıştırılarak 20 dakika bekletildi. Daha sonra oda sıcaklığında 24 saat bekletildi. 1000 ml lik bir balon jojeye alındı ve işaret çizgisine kadar su ile tamamlandı. Bu çözelti haftalık hazırlandı.

x- Standart invert şeker çözeltisi (2,5 g/L): Stok invert şeker çözeltisinden alınan 125 ml'lik bir kısım 500 ml'lik bir erlende, 5 N NaOH çözeltisi ile fenolftalein indikatör eşliğinde hafif pembe renk oluşuncaya kadar titre edildi. Elde edilen hafif pembe renkli nötr karışım 500 ml'lik balon jojeye alındı, hacim su ile tamamlandı.

xi- Ninhidrin çözeltisi (%3) : 3,0 g ninhidrin 100 ml etilen glikol monometil eterde çözümlenerek hazırlandı.

xii- Stok L-(-)- prolin çözeltisi (0,5 mg/ml): 25,0 mg prolin 50 ml lik bir balon jodede bir miktar suda çözüldü. Hacim su ile işaret çizgisine kadar tamamlandı.

xiii- Standart L-(-)- prolin çözeltisi (50 µg/ml): 10 ml stok prolin çözeltisi alınıp, 100 ml'lik bir balon jodede su ile işaret çizgisine kadar tamamlandı.

xiv- Stok iyot çözeltisi : 8,80 g iyot ve 22,0 g KI bir miktar suda çözüldü. 1000 ml 'lik balon jojeye alınarak, hacim su ile tamamlandı.

xv- Seyreltik iyot çözeltisi (0,0007 N): 5,00 ml stok iyot çözeltisi 20 g KI ile birlikte bir miktar suda çözüldü. Çözelti 500 ml'lik bir balon jojeye alınarak, hacim su ile tamamlandı.

xvi- Sodyum klorür çözeltisi (0,5M): 14,5 g NaCl bir miktar suda çözüldü. Çözelti 500 ml'ye seyreltildi.

xvii- Asetat tamponu (1,59 M ve pH=5,3) : 87 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 400 ml suda çözüldü. 10,5 ml CH_3COOH ilave edilerek, hacim su ile 500 ml'ye seyreltildi. Gerektiğinde pH=5,3 olması için kullanılan iki madde ile ayarlandı.

xviii- Fosfat tamponu (0,033 M ve pH =5,3): 5,7 g K_2HPO_4 950 ml suda çözüldü. pH=5,3' e ayarlandı ve 1000 ml 'ye su ile tamamlandı.

xix- Nişasta çözeltisi : Diastaz sayısı tayini için uygun nitelikte, suda tamamen çözülebilir karakterli nişastadan 2,000 g 'lık bir tartım alındı. 250 ml' lik bir erlende 90 ml su ile karıştırıldı. Karışım, hızla kaynama noktasına kadar karıştırılarak ısıtıldı. Isıtma hızı düşürüldü ve 3 dakika süre ile kaynatma devam edildi. Sonra erlenin ağzı kapatıldı ve oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Kantitatif olarak 100 ml lik bir balon jøjeye alındı ve işaret çizgisine kadar su ile tamamlandı.

xx- Polifenol oksidaz enzimi için substrat çözeltisi: 0,124 g($1 \cdot 10^{-3}$ mol) 4-metil katekol az miktar suda çözümlenerek, hacim 10 ml'ye seyreltildi. Oluşan çözelti 0,1 M'lık oldu.

xxi- Optimum pH çalışması için kullanılan pH'sı 3-10 arasında olan tampon çözeltiler:

pH=3-5 aralığında 0,1 M sitrat/0.2 M K_2HPO_4 tamponu kullanıldı. Bu tampon için 2,1 g(0.01 mol) sitrat, 3,48 g(0,02 mol) K_2HPO_4 80 ml saf suda çözümlenerek istenilen pH'ya ayarlandı ve son hacim su ile 100 ml'ye tamamlandı.

pH=5-7 aralığında 0,2 M fosfat tamponu kullanıldı. Bu tampon için 3,48 g(0.02 mol) K_2HPO_4 80 ml saf suda çözümlenerek istenilen pH'ya ayarlandı ve son hacim su ile 100 ml'ye tamamlandı.

pH = 7-10 aralığında 0,2 M Tris-HCl tamponu kullanıldı. Bu tampon için 2,423 g (0,02mol) Tris 80 ml saf suda çözümlenerek istenilen pH'ya ayarlandı ve son hacim su ile 100 ml'ye tamamlandı.

xxii- SDS- Elektroforezi için hazırlanan tamponlar:

A tamponu: 38,6 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 8,8 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ve 2 g SDS yeteri kadar suda çözüldü. Hacim su ile 1 litreye tamamlandı.

B tamponu: 5,5 g akrilamid ve 0,15 g bis-akrilamid bir miktar suda çözüldü ve hacim su ile 25 ml'ye tamamlandı.

C tamponu (yürütme tamponu) :A tamponu 1:1 oranında seyreltilerek hazırlandı.

Numune tamponu: 2 ml gliserin, 1 ml %0,25 'lik bromfenol mavisi, 500 μ L 14 M'lık β -merkaptoetanol ve 5 ml C tamponu karıştırılarak hazırlandı.

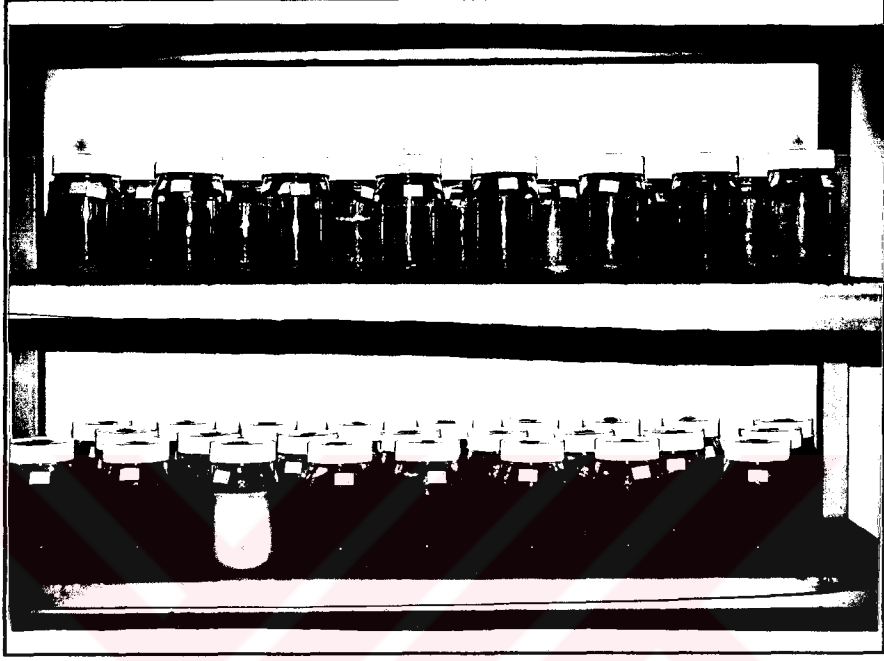
Boyama çözeltisi: %0,025 Coomassie brilliant blue G-250, metanol-asetik asit- su (5-1-5) çözeltisinde hazırlandı.

Boya çıkarma çözeltisi: 100 ml asetik asit, 50 ml metanol ve 850 ml su karıştırılarak hazırlandı.

2.4. Bal Numunelerinin Toplanması ve Depolanması

Bu araştırmada kullanılan bal numuneleri, Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinden hasat mevsimi olan Temmuz-Eylül ayları arasında (1992 yılında) 48 farklı yöreden toplandı. Numunelerin çoğu arıcılardan, çok az bir kısmı da satıcılardan alındı. Toplanma sırasında bal numunelerinin farklı yörelerden sağlanmasına dikkat edildi. Bal numunelerinin çoğu süzme bal olarak alındı, petek halinde alınan numuneler ise herhangi bir ısıtma işlemi yapılmadan oda sıcaklığında peteklerden kendi halinde çıkması sağlandı. Aynı şekilde süzme balların da elde edilmesi sırasında arıcılar tarafından ısıtılmamış olmasına dikkat edildi. Toplanan bal numuneleri analize hazır şekilde 1 kg'lık cam kavanozlarda muhafaza edildi. Söz konusu numuneler Şekil 2.1'de verilmiştir. Bal numunelerinin alındığı yerler ve sıra numaraları Tablo 2.1'de verilmiştir.

Ayrıca depolamanın bal bileşimi (HMF miktarı ve diastaz aktivitesi) üzerinde etkisini araştırmak amacıyla, her numuneden yeterli miktarlar alınarak kapalı cam kavanozlarda oda sıcaklığında 1 yıl bekletilmeye bırakıldı. Bal analizlerinde süzme bal kullanıldığı için araştırmamızda süzme bal kullanılmış olup, numuneler kullanılmadan önce homojen hale getirilmesine de dikkat edilmiştir.



Şekil 2.1. Araştırmada kullanılan bal numuneleri

Tablo 2.1. Araştırmada kullanılan bal numunelerinin alındığı yerler ve sıra numaraları.

Numune No	Alındığı Yer
1	Adıyaman (Merkez)
2	Adıyaman (Çelikhan)
3	Adıyaman (Sincik)
4	Ağrı (Merkez)
5	Bingöl (Merkez)
6	Bingöl (Merkez)
7	Bingöl (Genç)
8	Bingöl (Karlıova)
9	Bingöl (Solhan)
10	Bingöl (Yayla)
11	Bitlis(Merkez)
12	Bitlis(Hizan)
13	Bitlis(Mutki)
14	Bitlis(Tatvan)
15	Diyarbakır(Merkez)
16	Diyarbakır(Merkez)
17	Diyarbakır(Merkez)
18	Diyarbakır(Merkez)
19	Diyarbakır(Çermik)
20	Diyarbakır(Ergani)
21	Diyarbakır(Karacadağ)
22	Elazığ(Merkez)
23	Elazığ(Baskil)
24	Elazığ(Maden)
25	Elazığ(Sivrice)

Tablo 2.1.'in Devamı

Numune No	Alındığı Yer
26	Erzincan(Merkez)
27	Erzincan(Merkez)
28	Erzincan(Merkez)
29	Erzurum (Merkez)
30	Erzurum (Merkez)
31	Erzurum (Çat)
32	Erzurum (Hınıs)
33	Erzurum (Pasinler)
34	Erzurum (Tekman)
35	Hakkari(Şemdinli)
36	Hakkari(Yüksekova)
37	Mardin(Merkez)
38	Muş(Merkez)
39	Muş(Bulanık)
40	Siirt(Merkez)
41	Siirt(Eruh)
42	Siirt(Pervari)
43	Ş.Urfa(Merkez)
44	Van(Merkez)
45	Van(Çatak)
46	Van(Erciş)
47	Van(Gevaş)
48	Van(Özalp)

2.5. Balın Kimyasal Analizi

2.5.1. Nem Tayini

Nem belirlenmesinde refraktometrik metot kullanıldı ²⁰. Bal numuneleri önce iyice karıştırılarak akıcı hale getirildi. Bir bağıtle alınan bir damla bal numunesi refraktometrenin prizmasının üzerinde 20 °C sabit bir sıcaklıkta indeksleri okundu. Bulunan kırılma indeksleri değerlerinin karşılığı olan % nem miktarı standart olan Tablo 2.2' de okundu.

Tablo 2.2. Bal nem miktarını hesaplama tablosu ²⁰.

Nem Miktarı (%)	Kırılma İndeksi (20°C)	Nem Miktarı (%)	Kırılma İndeksi (20°C)	Nem Miktarı (%)	Kırılma İndeksi (20°C)
13,0	1,5044	17,0	1,4940	21,0	1,4840
13,2	1,5038	17,2	1,4935	21,2	1,4835
13,4	1,5033	17,4	1,4930	21,4	1,4830
13,6	1,5028	17,6	1,4925	21,6	1,4825
13,8	1,5023	17,8	1,4920	21,8	1,4820
14,0	1,5018	18,0	1,4915	22,0	1,4815
14,2	1,5012	18,2	1,4910	22,2	1,4810
14,4	1,5007	18,4	1,4905	22,4	1,4805
14,6	1,5002	18,6	1,4900	22,6	1,4800
14,8	1,4997	18,8	1,4895	22,8	1,4795
15,0	1,4992	19,0	1,4890	23,0	1,4790
15,2	1,4987	19,2	1,4885	23,2	1,4785
15,4	1,4982	19,4	1,4880	23,4	1,4780
15,6	1,4976	19,6	1,4875	23,6	1,4775
15,8	1,4971	19,8	1,4870	23,8	1,4770
16,0	1,4966	20,0	1,4865	24,0	1,4765
16,2	1,4961	20,2	1,4860	24,2	1,4760
16,4	1,4956	20,4	1,4855	24,4	1,4755
16,6	1,4951	20,6	1,4850	24,6	1,4750
16,8	1,4946	20,8	1,4845	24,8	1,4745

2.5.2. Kül Tayini

Sabit tartıma getirilmiş kroze de 2,000 g bal dikkatlice tartıldı, 2 ml etil alkol katıldı ve yakıldı. Etil alkolün tamamı yanınca kroze küçük bir alev üzerinde deney numunesi kömürleşinceye kadar dikkatlice ısıtıldı. 550 °C’de ayarlı fırında 2 saat tutuldu. Daha sonra fırından alınan kroze soğutuldu ve yeterli su damlatılarak kül ıslatıldı. Su banyosunda kuruyuncaya kadar dikkatlice buharlaştırıldı ve tekrar 550 °C’ye ayarlı fırında 1 saat süreyle tutuldu. Fırından alınan kroze desikatöre alındı ve oda sıcaklığında soğumaya bırakılarak, gecikmeden tartıldı.

Ancak ıslatma ve ısıtma sonucunda karbon kalıntıları görülen numunelerde, ıslatma ve ısıtmaya karbon kalıntıları görülmeyinceye kadar devam edildi ⁴⁰.

2.5.3. Asidite Tayini

Bal numunesinden alınan 10 g’lık bir tartım uygun bir beherde CO₂’i uzaklaştırılmış 75 ml destile suda çözüldü. pH metrenin cam elektrodu bal çözeltisine daldırıldı ve magnetik karıştırıcı ile sürekli karıştırılarak pH’sı ölçüldü.

Serbest asit ve laktonun belirlenmesinde ise; pH’sı ölçülen bal çözeltisine, pH=8,5 oluncaya kadar 0,05 M NaOH çözeltisi yavaş ilave edilerek sarfiyat (X₁) ml cinsinden kaydedildi. Aynı işlem numunesiz destile su için tekrarlanarak, destile sudan gelen hata giderildi ve sarfiyat (X₂) ml cinsinden kaydedildi.

Lakton bazik ortamda serbest hale geçer. Bunun için bekletmeden karışıma 10 ml 0,05 M lik NaOH ilave edildi. Daha sonra 0,05 M HCl ile pH = 8,3 oluncaya kadar geri titrasyon yapıldı ve sarfiyat (Y) ml cinsinden kaydedildi. Hesaplamalar şu şekilde yapıldı ²⁰.

Serbest asidite = (X₁ ml - X₂ ml). 50 /g numune

Lakton= (10 ml - Y ml). 50 / g numune

2.5.4. Prolin Tayini

2,500 g bal numunesi 50 ml'lik bir beherde bir miktar destile suda çözüldü. 50 ml'lik ölçülü bir balona alınıp işaret çizgisine kadar destile su ile seyreltildi. İki adet kapaklı reaksiyon tüplerinden birine 0,5 ml bal çözeltisi, 0,25 ml HCOOH ve 1,0 ml ninhidrin çözeltisi; diğerine ise 0,5 ml bal çözeltisi, 0,25 ml HCOOH ve 1,0 ml destile su katılarak iyice karıştırıldı (ikinci tüpteki karışım kör olarak kullanıldı). Tüpler sıkıca kapatılıp kaynayan su banyosunda 15 dakika tutuldu. 22°C 'lık su banyosunda soğutuldu. Kapaklar açılıp her birine sulu izopropil alkol (1+1) çözeltisinden 5'er ml katıldı. İyice karıştırılıp absorbansı 520 nm'de köre karşı okundu. Ayrıca balın renginden gelen hata payını düzeltmek için; 0,5 ml bal çözeltisi, 1,25 ml su ve 5 ml sulu izopropil alkol (1+1) karıştırılıp absorbansı belirlenerek bu değer evvelkinden çıkarıldı.

Bal çözeltisi yerine standart prolin çözeltisi (50 µg/ml) kullanılarak baldaki gibi renk oluşturulduktan sonra absorbansı okundu. Prolin değerleri ile okunan absorbans değerleri arasında kalibrasyon eğrisi çizildi. Eğriden baldaki prolin miktarı belirlendi²⁰.

2.5.5. HMF Tayini

HMF miktarının tayini, Winkler Metoduna göre yapıldı⁴¹. Prensipte olarak, bal numunesinde bulunan HMF p-toluidin ve barbitürik asit ile muamele edilerek renkli bir maddeye dönüştürülür. Oluşan renkli çözeltinin absorbansı 550 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür ve buradan HMF miktarı hesaplanır.

Tayin işlemlerinde şu prosedür takip edildi; bal numunesinden 10,0 g'lık bir tartım alındı. 20 ml oksijensiz su içinde çözüldü. 50 ml'lik bir balon jojeye aktarıldı ve işaret çizgisine kadar su ile seyreltildi. Hemen müteakip işleme geçildi. İki ayrı deney tüpüne her birisine 2'şer ml yukarıda hazırlanan bal çözeltisi ve 5'er ml p-toluidin çözeltisi kondu. Tüplerden birine 1,0 ml barbitürik asit çözeltisi ve diğerine ise 1,0 ml oksijensiz su katıldı. Bu işlemlerin tamamı 1 - 2 dakika içinde tamamlandı.

Su katılan tüpteki çözelti karışımı, spektrofotometrenin sıfırlanması için kalibrasyon çözeltisi olarak kullanıldı. Spektrofotometre 550 nm dalga boyunda ayarlandıktan sonra,

kalibrasyon çözeltisinin absorbanı sıfırlandı ve müteakip renk geliştirme işlemi tamamlanmış deney çözeltisinin absorbanı okundu(A). HMF miktarı (H), 1 kg balda mg olarak aşağıdaki bağıntıya göre hesaplandı¹.

$$H=A.192$$

Burada

H; HMF miktarı, (mg/kg bal)

A; Absorbanı,

192 ise deneyde oluşan renkli maddenin ekstinksiyon katsayısıdır.

2.5.6. Diastaz Aktivitesi Tayini

Diastaz aktivitesi için, Schode ve arkadaşlarının⁴² geliştirdiği. Hadorn⁴³ ile White ve arkadaşları⁴⁴ tarafından modifiye edilen; AOAC²⁰ tarafından kabul edilen metod kullanılmıştır. Diastaz aktivitesi, tayin işlemlerinde diastaz sayısı olarak ifade edilir. Diastaz sayısı; 1 g balda mevcut diastaz enziminin 40°C de 1 saatte tamamen hidrolizleyebildiği %1 lik nişasta çözeltisinin mililitre cinsinden hacmidir^{20,30}.

Prensip olarak; tamponlanmış nişasta +bal çözeltisi inkübe edilir ve özel işaretlenmiş en son noktaya (0,235 A) spektrofotometrik olarak ulaşmak için geçen süre kaydedilir.

Nişasta çözeltisinin ayarlanması ; daha önce hazırlanmış nişasta çözeltisinden 5 ml alınarak 10 ml'ye seyreltildi. Bundan 1 ml alınıp, içinde 10 ml iyot (0,0007 N) çözeltisi bulunan 50 ml'lik ölçülü balona ilave edildi. Hacim, 50 ml'ye destile su ile tamamlandı. 600 nm de spektrofotometrik olarak absorbanı okundu. Absorbanın $0,760 \pm 0,02$ olması için gerekli seyreltme yapıldı. Ancak burada hangi oranda seyreltme yapıldı ise numunedeki diastaz aktivitesi tayin işleminde de aynı oranında seyreltmeye dikkat edildi.

Bal numunesinin analize hazırlanması için 5 g'lık bir numune tartıldı. 20 ml'lik bir beherde 10-15 ml destile suda çözüldü. Üzerine 2,5 ml asetat tamponu (pH=5,3) ilave edilerek karıştırıldı. Bu karışım içinde 1,5 ml NaCl çözeltisi bulunan 25 ml'lik bir balona transfer edilerek hacim su ile 25 ml'ye tamamlandı.

Tayin işleminde şu prosedür takip edildi; 18x60 mm büyüklüğünde yan kolu olan 18x175 mm'lik cam kapaklı reaksiyon tüpü kullanıldı. Reaksiyon tüpünün doğru ucuna 10 ml bal çözeltisi, yan ucuna 5 ml nişasta çözeltisi kondu. $40\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ ye ayarlanmış su banyosuna yerleştirildi. 15 dakika sonra reaksiyon tüpü alt-üst edilerek deney çözeltisi ile nişastanın karışması sağlandı. Kronometre çalıştırılarak reaksiyonun başlangıcından itibaren 5'er dakika aralıklarla karışımdan alınan 1 ml'lik hacim, içinde 10 ml iyot çözeltisi (0,0007 N) bulunan ölçülü balona kondu. Yukarıda nişasta çözeltisinin ayarlanmasında belirlenen miktarda destile su ile seyreltildi. 600 nm dalga boyunda absorbansı okundu. Absorbans değerinin 0,235 'in altına ulaşana kadar bu işlem tekrarlandı.

Hesaplama şu şekilde yapıldı; zaman (dakika) ve okunan absorbans değerlerine karşılık grafik çizildi. Grafikte eğrinin 0,235 absorbansla kesiştiği zaman (t) belirlendi. Diastaz sayısı şu formülle hesaplandı:

$$DN = 300 / t$$

DN : Diastaz sayısı

t : Grafikte eğrinin 0.235 absorbansla kesiştiği zaman

2.5.7. İnvirt Şeker Tayini

Araştırmamızda invert şeker tayininde Lane-Eynon metodunun modifiye edilmiş şeklinden yararlanılmıştır²⁴.

Prensip olarak; invert şeker cinsinden eşdeğeri bilinen bir bakır-II çözeltisinin belli bir hacmi, bazik ortamda sıvı bal çözeltisi ile metilen mavisi indikatörü eşliğinde titre edildi. Baldaki glukoz ve fruktoz (invert şeker), molekül başına iki elektron vererek yükseltgenirken, bakır -II iyonları da bakır-I haline indirgenir. Bu titrasyonda harcanan bal çözeltisi hacminden baldaki indirgen şeker (invert şeker) yüzdesi hesaplanır.

Fehling A çözeltisinin ayarlanması ; uygun bir erlende, 5 ml Fehling A ve 5 ml Fehling B çözeltisi, 10 ml destile su ve 15 ml standart invert şeker çözeltisi karıştırıldı. Karışım ısıtma tablası üzerinde magnetik karıştırıcı ile karıştırılarak kaynamaya kadar ısıtıldı. Kaynama işleminden 2 dakika sonra, 10-12 damla metilen mavisi indikatörü eklendi. Bir

büret ile akıtılan standart invert şeker çözeltisi ile 3 dakika içinde renk maviden kırmızıya dönüşüncüye kadar titre edildi. Titrasyon süresince karışımın ısıtılmasına devam edildi. Titrasyonda harcanan standart invert şeker çözeltisi hacminin, baştan eklenen 15 ml ile toplanması sonucunda, 5 ml Fehling A çözeltisinin eşdeğeri olan invert şeker çözeltisi hacmi (V ml) bulundu. İvert şekerin mg olarak miktarı (F), yani faktörü;

$F = 2,5 \times V$ eşitliğinden hesaplandı.

Bal numunesinin analize hazırlanması; bal numunesinden 2 g bir tartım alınarak uygun bir beherde 70-80 ml destile suda çözüldü. Karışım 250 ml'lik bir ölçülü balona alındı. Karışım üzerine 1 ml Carrez I ve 1 ml Carrez II çözeltileri ilave edildi. Hacim su ile 250 ml'ye tamamlandı. Kaba gözenekli süzgeç kağıdından süzülerek analize hazır hale geldi.

Tayin işleminde şu prosedür takip edildi; analize hazırlanmış bal numunesi çözeltisinden 50 ml alınarak 100 ml'lik ölçülü balonda hacim destile su ile 100 ml'ye tamamlanarak deney çözeltisi olarak kullanıldı. Önce deneme titrasyonu yapıldı. Şöyle ki; uygun bir erlen, 5 ml Fehling A ve 5 ml Fehling B çözeltisi, 10 ml su ve 5 ml deney çözeltisi konup karıştırıldı. Karışım ısıtma tablası üzerinde magnetik karıştırıcı ile karıştırılarak kaynamaya kadar ısıtıldı. Kaynama işleminden 2 dakika sonra 10-12 damla metilen mavisi indikatörü katıldı. Bir bürete alınan deney çözeltisi ile 3 dakika içinde renk maviden kırmızıya dönüncüye kadar titre edildi. Titrasyon süresince karışımın ısıtılmasına dikkat edildi. Burada titrasyonda harcanan deney çözeltisi hacmi ile başta konulan 5 ml deney çözeltisi hacmi toplanarak, deneme titrasyonda harcanan toplam deney çözeltisi hacmi (V_1 ml) belirlendi.

Daha sonra asıl titrasyon yapıldı. Şöyle ki; burada titrasyon işlemi de deneme titrasyonda takip edilen prosedüre göre yapıldı. Yalnız deneme titrasyonunda başta alınan 5 ml deney çözeltisi yerine yukarıda titrasyon sonucunda elde edilen toplam deney çözeltisinden (V_1 ml) 2-3 ml eksiği alınarak titrasyon yapıldı.

Asıl titrasyonda harcanan toplam deney çözeltisi hacmi (V_2 ml) belirlendi. Sonuç % invert şeker cinsinden;

$$\% \text{ invert şeker} = \frac{250}{m \cdot V_2} \cdot \frac{100}{50} \cdot \frac{F}{1000} \cdot 100 = \frac{50 \cdot F}{m \cdot V_2} \quad \text{hesaplanır.}$$

Burada;

F: Fehling A çözeltisinin faktörü (mg şeker /5 ml çözelti)

m: Bal numunesinin gram cinsinden miktarı

V₂: Asıl titrasyonda harcanan toplam deney çözeltisinin ml cinsinden hacmi

2.5.8. Sakkaroz Tayini

Sakkaroz tayininde de invert şeker tayininde kullanılan metoddan yararlanılmıştır. Yalnız burada sakkarozun inversiyonundan sonra söz konusu metod aynen uygulanmıştır²⁴.

Prensip olarak; bal numunesi asidik ortamda hidroliz edilerek yapısındaki sakkaroz indirgen aldoz ve ketoz haline dönüşür. Oluşan indirgen şekerler, bazik ortamda bakır-II iyonları ile muamele edilir. Şekerler molekül başına 2 elektron vererek yükseltgenirken, bakır-II iyonları da bakır-I oksit haline indirgenmiş olurlar.

Ayarı ve hacmi belli bir bakır-II çözeltisinin, bal numunesinden hazırlanmış indirgen şeker çözeltisi ile metilen mavisi indikatörü eşliğinde titrasyon yapıldı. Harcanan bal çözeltisi hacminden, baldaki toplam şeker miktarı bulundu. Bulunan toplam şeker miktarından daha önce bulunan invert şeker miktarı çıkarılarak sakkaroz miktarı hesaplandı.

Tayin işleminde şu prosedür takip edildi; invert şeker tayininde kullanılan ve analize hazır hale getirilen bal numunesinden 50 ml alınarak, 5 ml derişik HCl eklendi ve karışım 65-67°C'de ayarlanmış su banyosunda 10 dakika bekletildi. Sonra su banyosundan çıkartılarak hızla soğutuldu. NaOH çözeltisi ile fenolftalein indikatörü eşliğinde hafif pembe renk elde edilinceye kadar titre edildi. Hacim destile su ile 100 ml'ye tamamlanarak deney çözeltisi olarak kullanıldı.

Bu tayin işleminde de invert şeker tayininde olduğu gibi deneme ve asıl titrasyonları yapılarak, asıl titrasyonda harcanan toplam deney çözeltisinin hacmi (V₃ ml) bulundu.

Sonuç % sakkaroz cinsinden,

$$\% \text{ Sakkaroz} = \left(\frac{50.F}{m.V_3} - \% \text{invert şeker} \right) \times 0,95 \quad \text{bulundu.}$$

Burada ,

F: Fehling A çözeltilisinin faktörü (mg şeker /5 ml çözelti)

m: Bal numunesinin gram cinsinden miktarı

V₃: Asıl titrasyonda harcanan toplam deney çözeltilisinin ml cinsinden hacmi

0,95: Sakkarozun molekül ağırlığının invert şekerin molekül ağırlığına oranı.

2.6. Bal Proteinlerinin Belirlenmesi İçin Yapılan Çalışmalar

2.6.1. Bal Numunelerin Diyalizi ve Liyofilizasyonu

Araştırmada kullanılan 48 bal numunesinden toplam 7 adet numune (1., 10., 11., 15., 23., 41. ve 46. numuneler) seçilerek proteinlerin belirlenmesine çalışıldı. Söz konusu numuneler için önce diyaliz ve liyofilizasyon işlemleri yapıldı.

25 g bal numunesi 50 ml destile suda çözüldü. Karışım diyaliz torbasına alınarak, bir magnetik karıştırıcı yardımıyla fosfat tamponu(pH=5,3) içinde diyaliz işlemi yapıldı. 5-6 saatte bir tampon değiştirilerek 2-3 gün süre ile devam edildi. Daha sonra tampon yerine destile su kullanılarak aynı şekilde 1-2 gün diyaliz işlemine devam edildi. Bu diyaliz işlemi sonucunda bal bileşiminin çoğunu oluşturan şekerler ile diğer küçük moleküllü bileşenler proteinlerden uzaklaştırıldı.

Diyaliz işleminden sonra elde edilen karışımının derişikleştirilmesi için liyofilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Bu amaç için diyalizden sonraki karışımından alınan 20 ml'lik bir kısım liyofilizatör aletin numune tüpüne yerleştirildi. Alet çalıştırılarak karışım 1-2 ml'lik bir hacme inene kadar devam edildi. Elde edilen derişikleştirilmiş protein karışımı, elektroforez işleminde kullanıldı.

2.6.2. Bal Proteinleri İçin Yapılan Sodyum Dodesilsulfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Elektroforez alışmasında, Weber ve arkadaşı tarafından tanımlanan sodyum dodesilsulfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) uygulandı ⁴⁵.

Elektroforez işlemleri için, 10 cm boyundaki jel diskleri deterjanlı su ile iyice yıkanarak saf sudan geçirildi. Diskler kurutularak alt kısmı parafilm ile kapatılıp hazır hale getirildi.

Jel; 15 ml A tamponu, 13,5 ml B tamponu (bölüm 2.3'e bak), 1,5 ml PER (15 mg/ml) ve 45 µL TEMED soğukta (4°C) karıştırılarak hazırlandı. Taze olarak hazırlanan jel bir enjektör yardımıyla disklere 6 cm'lik bir yüksekliğe kadar döküldü. Jel yüzeyinin düzgün olması için üst kısmı bir mikro pipet yardımıyla su ile kapatıldı. Jelin polimerleşmesi için yaklaşık bir saat beklenildi. Katılaştıran jelin üzerindeki su tabakası boşaltıldı.

Numunenin hazırlanışı ve tatbiki şöyle yapıldı; Katılaştıran disklerin altı açılarak (parafilm) elektroforez kabına yerleştirildi. Diyaliz ve liyofilizasyondan sonra elde edilen bal numunelerinden 75 µL alınarak her birisine 2 µL A tamponu, 5 µL %10'luk SDS ve 1 µL 14 M'lık β-merkaptoetanol ilave edildi. Karıştırılarak 90°C'lik su banyosunda 10 dakika bekletilip proteinlerin denatürasyonu sağlandı. Daha sonra her numuneye 85 µL numune tamponu ilave edilerek iyice karıştırıldı. Çok ince bir enjektör ile her numune bir diske tatbik edilerek 5-6 saat 8 mA/disk akıma tabi tutuldu.

Ayrıca tesbit edilen protein bantlarının molekül ağırlıklarını belirlemek için bir diske farklı molekül ağırlıklarını ihtiva eden standart bir numune tatbik edildi. Hazırlanan standartta şu bileşikler bulunuyordu: sığır albümini (66000 dalton), yumurta albümini (48000 dalton), gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (36000 dalton), sığır eritrositinden izole edilen karbonik anhidrataz (29000 dalton) PMSF'den saflaştırılmış tripsinojen (24000 dalton), tripsin inhibitörü (20000 dalton) ve α-laktalbumin (14000 dalton).

Disklerden çıkartılan jeller 1-2 saat süreyle Coomassie Brilliant Blue G ile muamele edilerek boyandı. Daha sonra boya çıkarma çözeltisine alındı. Jelin rengi açılıp protein bantları belirginleşince jel, çözeltiden çıkartılıp fotoğrafları çekildi (Şekil 3.1).

2.7. Bal Polifenol Oksidaz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışmalar

2.7.1. Bal Numunelerin Analize Hazır Hale Getirilmesi

Araştırmada kullanılan bal numunelerinden bir numune alındı ve bal numunesinden 40 g alınarak 50 ml %0,5 polietilen glikol ve 10 mM askorbik asit ihtiva eden 0,5 M'lık fosfat tamponu (pH=7,3) içinde çözüldü. 48000xg'de 5°C de 1 saat süre ile soğutmalı santrifüjle santrifüj edildi.

Elde edilen süpernatanta amonyum sülfatla çöktürme işlemleri, %0-80 arasında doyunlukta yapıldı. Çöktürme işlemleri sırasında kullanılacak katı amonyum sülfat miktarı şu formülle tesbit edildi (0°C için):

$$g_{(NH_4)_2SO_4} = \frac{1,77 \cdot V(S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

Burada,

V: Süpernatantın hacmi

S₁: 1'in kesri olarak mevcut amonyum sülfat doyunluğu

S₂: 1'in kesri olarak istenilen amonyum sülfat doyunluğu

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında katı amonyum sülfat bal çözeltisine yavaş yavaş ilave edilerek yarım saatte işlem tamamlandı. Amonyum sülfatın süpernatant içinde çözünme işlemi magnetik karıştırıcıda yapıldı. Doygunluğa getirilen süspansiyon, 48000 x g'de, 5°C de 1 saat süre ile soğutmalı santrifüjle santrifüjlendi. Oluşan çökelek 5 mM fosfat tamponunun (pH=6,3) çözünebildiği en az miktarında çözüldü.

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çözeltisi diyaliz torbasına yerleştirildi. 5 mM fosfat tamponuna (pH=6,3) karşı 3-4 kez değiştirmek suretiyle 24 saat süreyle diyaliz edildi. Diyaliz işlemi magnetik karıştırıcı üzerinde buz dolabı içinde (4°C) gerçekleştirildi.

2.7.2. Polifenol Oksidaz Enzim Aktivitesi Tayini

Polifenol oksidaz (PFO) enziminin aktivite tayininde spektrofotometrik metot esas alındı ve absorpsiyon ölçümleri 420 nm dalga boyunda gerçekleştirildi ⁴⁶. Aktivite ölçümü için 0,3 ml enzim çözeltisi 2,7 ml tampon + substrat çözeltisine ilave edildi. Böylece küvetteki son hacimin 3 ml ve substrat konsantrasyonun 10 mM olması sağlandı. Kör olarak enzim dışındaki çözeltiler aynı miktarda kullanıldı; enzim çözeltisi yerine enzimin içinde bulunduğu tampon konuldu. Enzim çözeltisi, tampon+substrat çözeltisine ilave edilir edilmez kronometre çalıştırıldı ve küvet spektrofotometreye yerleştirildi. İlk 30 saniyeden itibaren 3 dakika boyunca her 30 saniyede bir absorban değeri kaydedildi. Aktivite birimi olarak "1 dakikada absorbansta meydana gelen 0,001 birimlik değişme" esas alındı ⁴⁷.

2.7.3. Optimum pH Çalışması

Optimum pH çalışması, 4- metil katekol substratı kullanılarak yapıldı. Bu substrat ile pH=3,5-10,0 aralığındaki tampon çözeltiler içinde enzimin gösterdiği aktivite, spektrofotometrik olarak ölçüldü ve sonuç grafik halinde verildi (Şekil 3.2). Küvet içindeki substrat konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde 2,7 ml tampon+substrat çözeltisine 0,3 ml enzim çözeltisi pipetlenerek aktivite ölçümleri yapıldı.

2.7.4. Optimum Sıcaklık Çalışması

Optimum sıcaklık çalışması yine aynı substratla gerçekleştirildi. Substratın optimum pH'sında 5°C-75 °C sıcaklık aralığında çalışıldı. İstenilen sıcaklıklar termostatlı su banyosunda ayarlandı. Tampon+substrat çözeltilerinin küvete boşaltılması esnasında meydana gelebilecek sıcaklık kayıplarını önlemek amacıyla küvetler birkaç dakika süreyle su banyosu içinde bekletildi. Mümkün olduğu kadar hızlı bir şekilde enzim çözeltisi pipetlenerek aktivite ölçümleri yapıldı ve sonuç grafik halinde verildi (Şekil 3.3).

2.7.5. Optimum Şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

K_M ve V_{max} değerlerinin tesbit edilmesi amacıyla; optimum şartlar (pH ve sıcaklık) da 4-metil katekol substratı için 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 ve 10,0 mM substrat konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Elde edilen ölçümler reaksiyon hızı (EÜ/ml.dak) olarak alındı. $1/V-1/[S]$ değerleri hesaplanarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 3.4). K_M ve V_{max} değerleri grafik ve doğru denklemleri yardımı ile hesaplandı. Bulunan K_M ve V_{max} değerleri Tablo 3.5' de verildi.

2.7.6. İzoenzimlerin Tabii Şartlarda Poliakrilamid Jel Elektroferez İle Belirlenmesi

Elektroferez çalışmalarında enzim kaynağı olarak; bal numunesinin bir miktar su ile seyreltilen çözeltisi ile kinetik çalışmalarda kullanılan enzim çözeltisi kullanıldı. Laemmler tarafından tanımlanan poliakrilamid jel elektroferez işlemi sodyum dodesilsülfat (SDS) kullanılmadan gerçekleştirildi⁴⁸.

Elektroferez işlemi için elektroferez plakaları önce su, sonra alkol ile iyice yıkandı. Plakaları birleştiren mikalara vazelin ince tabaka halinde sürüldü. İki cam plaka birbiri içine konuldu ve kısıkaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına konuldu. Cam plakaların altı kaynama sıcaklığına getirilerek çözülüp daha sonra 40-50°C ye getirilmiş agar dökülerek kapatıldı. %10'luk ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektörle döküldü. Hava almamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için saf su ile ince bir tabaka oluşturuldu. Katılaşmaya kadar (yaklaşık 1 saat) beklendi. Katılaştıktan sonra üstteki su tabakası boşaltıldı. Daha sonra %3'lük yığıma jel üst yüzeye kadar ilave edildi. Üzerine tarak dikkatlice yerleştirildi. Tarağın üstüne nemli süzgeç kağıdı konularak (jelin dehidratasyonunu önlemek için) bir gece bekletildi. Ertesi gün tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroferez tankına yerleştirildi. Oluşan boşluklar işaretlenerek, jelin üstü önce saf su, sonrada yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroferez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Saf su ile seyreltilmiş bal çözeltisi ile kinetik çalışmalarda kullanılan enzim çözeltisinden 100 er μL 'lik numuneler jel boşluklarına enjektör kullanılarak tatbik edildi. Tank kapağı kapatılarak alt taraftan (+) kablosu (anot), üst taraftan (-) kablo (katot) yerleştirildi.

Önce 80 voltta yarım saat, daha sonra 150 voltta 4-5 saat süre ile akım geçirildi. Elektroforez işlemi soğuk ortamda gerçekleştirildi. Akım kesilerek cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı.

Çıkarılan jel; 15 mM katekol ve %0,05 o-fenilendiamin ihtiva eden fosfat tamponuna (pH=6,5) daldırıldı. Daldırma işleminden yaklaşık 10-12 saat sonra jelde bantlar belirginleşti. Daha sonra jel 5 dakika süre ile 1 mM askorbik asit çözeltisinde çalkalandı. Bundan sonra jel %30 'luk etil alkol içine alındı ve fotoğrafı çekildi (Şekil 3.5).

Jelin içine daldırıldığı substart çözeltisinin hazırlanması amacıyla 280 ml'lik saf su içinde 8,7 g K_2HPO_4 çözüldü. Oluşan çözeltide 0,495 g katekol ve 0,150 g O-fenilendiamin çözülerek çözeltinin pH'sı 6,5 'a (optimum pH) ayarlanarak toplam hacim saf su ile 300 ml'ye tamamlandı.

%10'luk ayırma jeli; 15 ml Tris -HCl (pH=8,8), 13,2 ml %30'luk akril amid- %0,8'lik bisakrilamid, 0,4 ml %5'lik TEMED ve 9,4 ml saf su karıştırılarak hazırlandı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 ml %1,5 lik amonyum persülfat (PER) ilave edildi. Burada kullanılan PER kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

%3'lük yığma jeli; 1,24 ml Tris-HCl (pH=6,8), 1 ml %30'luk akrilamid- %0,8 'lik bisakrilamid, 0,1 ml % 5'lik TEMED ve 7,36 ml saf su karıştırılarak hazırlandı. Son olarak taze hazırlanmış 0,2 ml %1,5 PER ilave edildi.

Numune tamponu; 0,65 ml 1 M Tris-HCl (pH=6,8) 1 ml %100'lük gliserin ve 1 ml % 0,1'lik bromtimol mavisinin karıştırılması ile hazırlandı. Çözeltinin hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.

Yürütme tamponu ise (pH=8,3); 3,0 g Tris ve 14,4 g glisin 100 ml saf suda çözüldü. Çözeltinin hacmi saf su ile 1 litreye tamamlandı.

2.8. Kullanılan İstatistikî Yöntemler

Balın oda sıcaklığında 1 yıl depolama süresince HMF miktarı ile diastaz aktivitesinin değişme oranlarının istatistiksel olarak önemli olup olmadığını tetkik etmek amacıyla eşleştirme testi yapıldı. Bunun için ilk ve son değerlerin ortalamaları arasındaki fark alınarak student's t testi uygulandı ⁴⁹.

Bu amaç için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$t = \frac{\bar{x} - m}{\sqrt{\frac{S^2}{n}}}$$

$$S^2 = \frac{1}{n-1} \cdot \sum (x_i - \bar{x})^2$$

Burada ;

t: kritik t değeri

S₂: Varyans

\bar{x} : ortalama

n: numune sayısı

μ : populasyon ortalaması (sıfır olarak alınır).

x_i: numune değerleri

3. DENEY SONUÇLARI

3.1. Depolama Süresince Bal Numunelerinin Kristallenme Sonuçları

Toplanan bal numuneleri kapalı cam kavanozlarda oda sıcaklığında bir yıl bekletilerek, bu süre içinde her ay numunelerin kristallenme durumları gözlemlendi. Numunelerin kristallenmesi depolamanın 2. ayında başlayıp 10. aya kadar devam etti. Bu süre içinde bal numunelerinin büyük bir kısmının değişik aylarda tamamen kristallendikleri tesbit edildi. Çok az bir kısmında ise kristallenme görülmedi. Araştırmamızda kullanılan ve 1 yıl depolama süresince kristallenme durumlarını gösteren sonuçlar Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Bal numunelerinin kristallenme durumları

Numune No	1. ay	2. ay	3. ay	4. ay	5. ay	6. ay	7. ay	8. ay	9. ay	10. ay
1										
2										
3										
4		+								
5		+								
6				+						
7										
8						+				
9							+			
10					+					
11							+			
12							+			
13								+		
14		+								
15						+				
16			+							
17			+							
18						+				
19					+					

Tablo 3.1'in Devamı

Numune No	1. ay	2. ay	3. ay	4. ay	5. ay	6. ay	7. ay	8. ay	9. ay	10. ay
20		+								
21				+						
22										
23						+				
24		+								
25							+			
26			+							
27			+							
28			+							
29			+							
30										
31										
32			+							
33			+							
34		+								
35									+	
36		+								
37						+				
38										
39		+								
40			+							
41										
42					+					
43					+					
44		+								
45		+								
46		+								
47			+							
48		+								

Not: “ + ” işaretinin bulunduğu yer, numunenin o ayda kristallendiğini göstermektedir.

Kristallenmeyen numuneler için herhangi bir işaret kullanılmamıştır.

3.2. Bal Numunelerinin Kimyasal Analiz Sonuçları

Araştırmada kullanılan bal numunelerinin nem, kül, serbest asitlik, pH, lakton, prolin, invert şeker, sakkaroz, HMF ve diastaz aktivitesi tayinleri yapıldı. Elde edilen değerler Tablo 3.2 ve Tablo 3.3.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Araştırmada kullanılan bal numunelerinin prolin, diastaz sayıları, HMF, invert şeker ve sakkaroz değerlerinin sonuçları

Numune No	Prolin (mg/100g)	Diastaz Sayısı	HMF (mg/kg)	Invert Şeker(%)	Sakkaroz (%)
1	61	16,4	0,00	66,84	1,75
2	60	16,4	1,15	68,68	1,47
3	50	15,0	3,84	71,43	0,50
4	55	12,9	3,26	70,62	0,68
5	51	12,9	5,76	70,62	1,16
6	36	11,7	2,88	73,53	2,12
7	46	13,5	1,92	71,43	1,99
8	36	5,7	7,68	70,22	0,60
9	46	16,4	3,07	67,93	3,32
10	59	13,3	3,26	67,57	4,40
11	37	11,4	3,45	67,57	4,45
12	41	11,5	1,34	69,44	3,07
13	46	16,2	4,60	69,44	1,50
14	75	20,3	3,45	70,62	2,35
15	72	24,5	4,80	71,84	1,60
16	64	12,6	11,52	70,62	1,55
17	65	15,2	3,84	68,68	2,61
18	86	26,1	1,92	70,22	3,55
19	34	11,4	2,67	72,67	0,82
20	44	13,6	1,54	72,25	1,25
21	55	13,3	5,38	67,57	3,66
22	46	12,6	3,84	72,25	1,21
23	84	17,1	4,69	70,22	2,73

Tablo 3.2'in Devamı

Numune No	Prolin (mg/100g)	Diastaz Sayısı	HMF (mg/kg)	Invert Şeker(%)	Sakkaroz (%)
24	41	11,5	4,03	71,02	2,33
25	82	24,0	0,00	70,22	0,76
26	83	16,2	4,60	68,83	2,08
27	75	16,2	5,76	70,22	0,76
28	78	15,2	5,12	69,50	1,50
29	38	11,9	3,84	69,83	1,53
30	10	1,5	18,24	36,76	37,49
31	11	1,5	12,48	35,71	37,61
32	12	3,5	46,08	60,68	13,46
33	44	11,7	3,46	71,43	2,83
34	41	13,0	1,92	68,68	1,84
35	41	12,4	3,46	68,68	0,73
36	36	10,8	3,84	67,93	2,18
37	41	16,4	2,50	69,44	1,50
38	36	9,1	0,96	67,20	1,41
39	86	25,0	1,34	71,83	0,80
40	61	16,7	4,80	67,57	0,50
41	65	11,3	4,22	73,53	0,40
42	36	11,2	2,30	71,02	1,57
43	38	11,9	5,95	74,40	0,43
44	32	8,0	0,00	75,30	0,87
45	45	16,0	3,07	71,84	0,50
46	30	8,7	1,92	71,02	2,38
47	45	16,2	0,00	71,43	1,18
48	43	12,6	0,00	68,30	2,20
X±SD	50±19	13,5±5,3	4,70±6,93	68,01±8,27	3,48±7,44

Tablo 3.3. Araştırmada kullanılan bal numunelerinin nem, kül, pH, serbest asitlik ve lakton değerlerinin sonuçları

Numune No	Nem (%)	Kül (%)	pH (25°C)	Serbest Asit (meg/kg)	Lakton (meg/kg)
1	15,4	0,09	4,20	15,3	7,5
2	15,4	0,09	4,05	19,0	5,5
3	15,0	0,13	3,60	23,2	9,0
4	16,2	0,08	4,00	14,1	8,7
5	15,0	0,04	4,30	13,0	9,6
6	14,6	0,14	4,08	12,3	7,0
7	14,6	0,11	4,04	16,4	9,0
8	19,4	0,27	3,60	19,0	7,2
9	15,4	0,08	3,44	22,0	6,8
10	15,8	0,04	3,15	24,0	6,0
11	14,6	0,02	4,14	18,0	8,6
12	15,8	0,09	4,02	14,0	9,5
13	15,0	0,14	4,17	21,0	9,0
14	18,2	0,04	3,90	28,5	8,0
15	16,6	0,13	3,70	32,0	10,5
16	15,4	0,10	3,40	30,2	5,4
17	17,0	0,04	3,43	30,4	5,5
18	17,4	0,15	3,15	50,0	5,0
19	16,2	0,23	3,60	25,4	5,4
20	16,2	0,43	4,30	30,0	6,3
21	15,8	0,06	3,20	27,5	4,0
22	15,4	0,12	3,85	22,0	7,0
23	14,6	0,16	3,60	30,5	8,4
24	15,0	0,05	3,40	22,5	4,2
25	15,4	0,16	3,63	29,5	8,0
26	18,2	0,12	3,33	27,8	6,2
27	15,0	0,04	3,73	28,0	8,0
28	16,5	0,08	3,53	29,4	7,2

Tablo 3.3'ün Devamı

Numune No	Nem (%)	Kül (%)	pH (25°C)	Serbest Asit (meg/kg)	Lakton (meg/kg)
29	16,6	0,07	4,05	22,0	9,0
30	17,4	0,07	3,70	11,5	6,7
31	16,6	0,08	3,90	10,2	7,3
32	15,8	0,07	3,85	16,0	7,0
33	15,4	0,09	3,85	20,2	8,4
34	16,2	0,06	3,88	22,3	7,2
35	16,6	0,05	3,92	22,5	8,7
36	17,0	0,13	3,70	22,4	7,4
37	14,6	0,20	4,02	20,3	7,2
38	14,6	0,06	3,75	15,0	6,0
39	15,8	0,09	3,47	30,2	7,0
40	18,6	0,15	4,35	17,5	8,4
41	14,6	0,13	3,85	20,4	7,0
42	14,6	0,05	3,85	22,4	6,7
43	14,6	0,11	3,95	20,5	8,0
44	16,6	0,19	3,77	14,0	9,7
45	17,4	0,07	3,87	22,4	8,0
46	16,2	0,04	4,05	12,0	5,2
47	16,6	0,09	4,20	21,0	9,0
48	16,6	0,09	3,95	15,0	10,0
$\bar{X} \pm SD$	16,0±1,2	0,11±0,07	3,80±0,31	21,7±6,6	7,4±1,5

3.3. Bal Numunelerinin Başlangıçta ve Depolamadan Sonra Tayin Edilen HMF Miktarları ve Diastaz Aktivite Sonuçları

Toplanan bal numunelerinde HMF miktarları ile diastaz aktivitelerinin depolama süresince nasıl etkileneceğini tesbit etmek için, taze iken tayin edilen söz konusu iki parametrenin 1 yıl depolamadan sonra da tayinleri yapıldı.

Elde edilen değerler Tablo 3.4.'de verilmiştir.

Tablo 3.4. Araştırmada kullanılan bal numunelerinin taze ve 1 yıl depolamadan sonraki HMF miktarları ve diastaz sayıları

Numune No	HMF ⁽¹⁾ (mg/kg)	HMF ⁽²⁾ (mg/kg)	Diastaz Sayıları ⁽¹⁾	Diastaz Sayıları ⁽²⁾
1	0,00	18,80	16,4	12,9
2	1,15	15,40	16,4	12,3
3	3,84	19,20	15,0	10,7
4	3,26	22,40	12,9	9,0
5	5,76	25,72	12,9	8,8
6	2,88	12,48	11,7	9,7
7	1,92	24,45	13,5	9,9
8	7,68	13,44	5,7	4,1
9	3,07	16,32	16,4	11,5
10	3,26	8,64	13,3	10,1
11	3,45	12,48	11,4	8,6
12	1,34	16,32	11,5	8,3
13	4,60	11,52	16,2	12,1
14	3,45	25,52	20,3	13,2
15	4,80	16,32	24,5	15,2
16	11,52	23,60	12,6	9,4
17	3,84	24,68	15,2	10,4
18	1,92	21,12	26,1	13,3
19	2,67	17,28	11,4	8,5
20	1,54	9,60	13,6	9,2

Tablo 3.4'ün Devamı

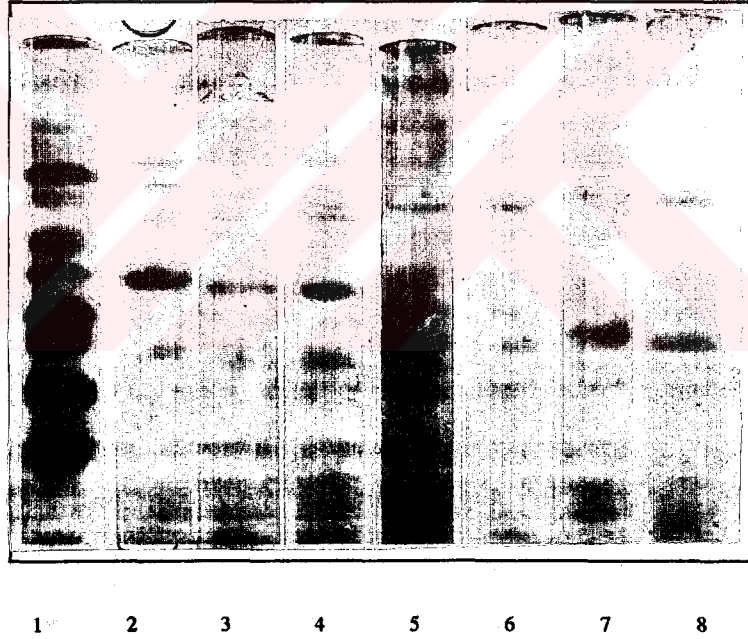
Numune No	HMF ⁽¹⁾ (mg/kg)	HMF ⁽²⁾ (mg/kg)	Diastaz Sayıları ⁽¹⁾	Diastaz Sayıları ⁽²⁾
21	5,38	24,00	13,3	10,0
22	3,84	21,68	12,6	9,9
23	4,69	22,88	17,1	12,3
24	4,03	17,27	11,5	8,8
25	0,00	14,40	24,0	18,8
26	4,60	29,36	16,2	11,3
27	5,76	30,32	16,2	12,5
28	5,12	28,18	15,2	12,0
29	3,84	13,44	11,9	9,0
30	18,24	46,08	1,5	1,0
31	12,48	46,08	1,5	1,0
32	46,08	65,05	3,5	2,8
33	3,46	21,12	11,7	8,5
34	1,92	13,68	13,0	9,1
35	3,46	15,76	12,4	8,4
36	3,84	24,56	10,8	7,6
37	2,50	15,76	16,4	11,4
38	0,96	13,12	9,1	6,8
39	1,34	16,32	25,0	17,9
40	4,80	21,12	16,4	13,0
41	4,22	23,04	11,3	8,0
42	2,30	38,96	11,2	7,7
43	5,95	25,96	11,9	10,1
44	0,00	21,12	8,0	6,7
45	3,07	13,44	16,0	13,3
46	1,92	9,60	8,7	6,9
47	0,00	15,36	16,2	13,5
48	0,00	13,44	12,6	11,0
X ± SD	4,70 ± 6,93	20,97 ± 10,50	13,5 ± 5,3	9,9 ± 3,6

(¹) Taze bal numunelerinin HMF değerleri ve diastaz sayıları.

(²) Aynı bal numunelerinin 1 yıl depolamadan sonraki HMF değerleri ve diastaz sayıları.

3.4. Bal Proteinlerinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez Sonuçları

Bal numuneleri diyaliz ve liyofilize işleminden sonra, SDS-poliakrilamid jel elektroforezine tatbik edildi. Belirlenen bantların fotoğrafı çekilerek Şekil 3.1.'de gösterildi. Standart proteinlere göre başlangıç noktasından aldıkları yollar karşılaştırılarak bilinmeyen proteinlerin molekül ağırlığı bulundu¹². Şekilde görüldüğü gibi oluşan protein bantlarının sayısı ve molekül ağırlıkları bakımından numunelere göre farklılık arzettiği belirlendi. Bal numunelerinde molekül ağırlıkları 10-75 bin dalton arasında değişen 15 ayrı protein bandı tesbit edildi.

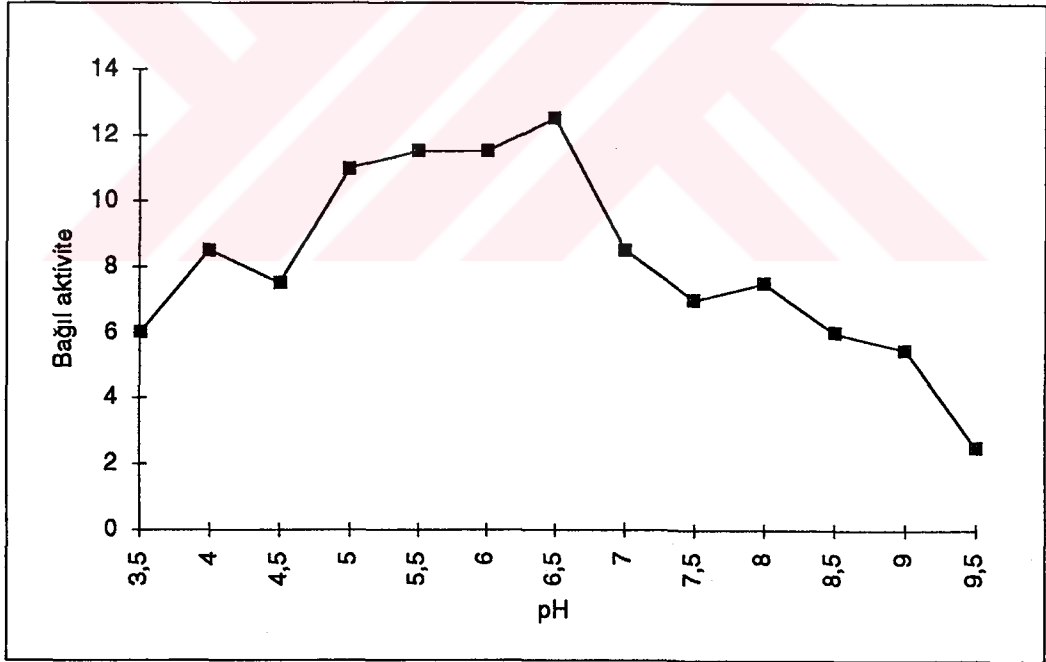


Şekil 3.1. Bal numunelerinin diyaliz ve liyofilize edildikten sonra SDS-PAGE'i sonucu (1. kanal molekül ağırlıkları 14-66 bin dalton arasında değişen 7 ayrı standart proteinlere aittir.)

3.5. Bal Polifenol Oksidaz Enzimi ile İlgili Sonuçlar

3.5.1. pH-Aktivite Grafiği

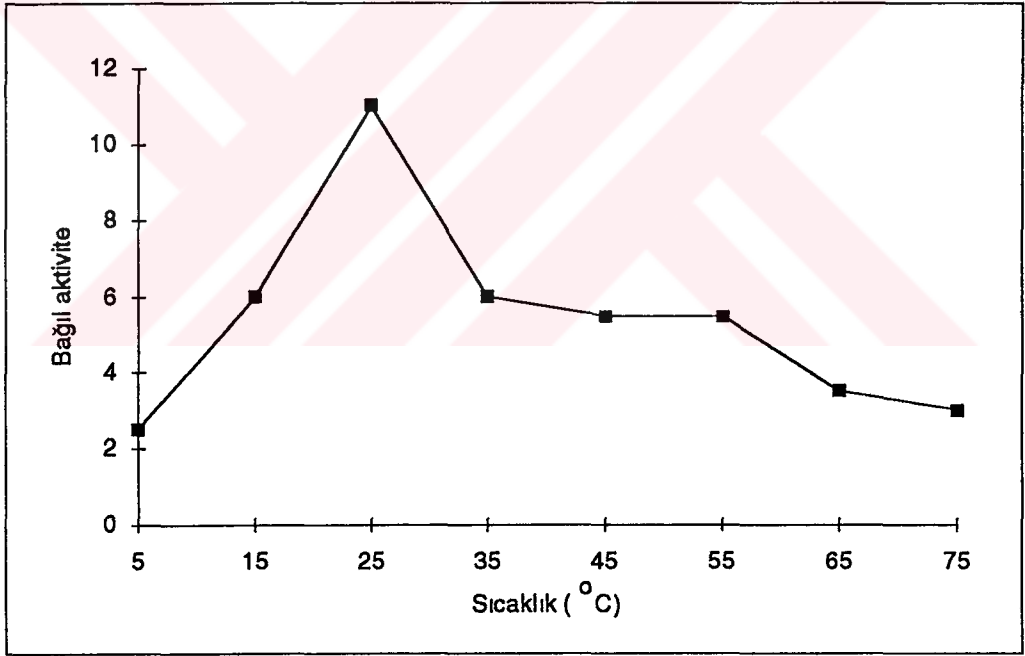
Optimum pH değerlerini belirlemek amacıyla, 4-metil katekol substratıyla 3,0-10,0 pH aralığında aktivite ölçümleri 10 mM substrat konsantrasyonunda gerçekleştirildi. Elde edilen değerler Şekil 3.2’de verilmiştir. Aktivitenin en yüksek olduğu değer 12,5 birim kabul edilerek grafik çizildi. Grafikte de görüldüğü gibi PFO enziminin 4-metil katekol substratı için optimum pH’sı 6,5 olarak tesbit edildi.



Şekil 3.2. Bal PFO enzimi için 10 mM 4-metil katekol substratı ile elde edilen pH - aktivite grafiği

3.5.2. Sıcaklık-Aktivite Grafiği

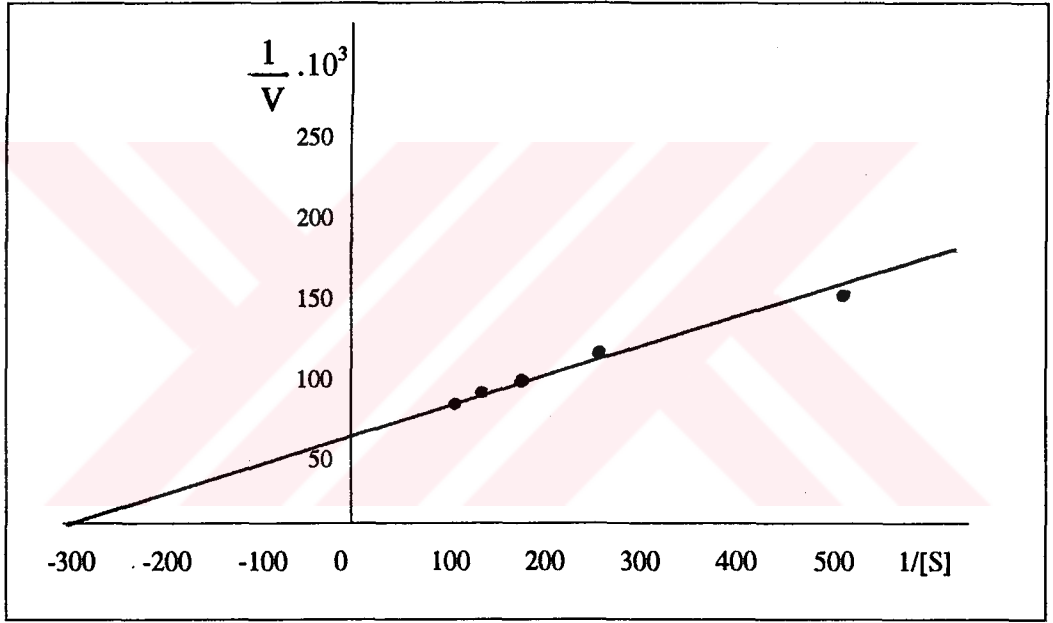
Bal PFO enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla pH=6,5 tamponunda 4-metil katekol substratı kullanılarak 5-75°C aralığında PFO aktivitesi belirlendi. Elde edilen değerler Şekil 3.3'de grafik halinde verildi. Aktivitenin en yksek olduğu değer 11 birim kabul edilerek grafik çizildi. Grafikte de gkrldüğu gibi PFO enziminin 4-metil katekol substratı için optimum sıcaklık 25°C olarak tesbit edildi.



Şekil 3.3. Bal PFO enzimi için 10 mM 4-metil katekol substratı ile elde edilen sıcaklık-aktivite grafiği

3.5.3. K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

Beş ayrı 4-metil katekol konsantrasyonunda PFO aktiviteleri belirlendi. Elde edilen $1/V-1/[S]$ değerleri yardımıyla Lineweaver -Burk grafiği çizildi ¹². Bu grafikten K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Çizilen grafik Şekil 3.4.'de verilmiştir. Grafikten yararlanarak söz konusu substrat için PFO enziminin K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla $3,5 \cdot 10^{-3}$ M ve 16,66 EÜ/ml'xdak olarak hesaplandı.



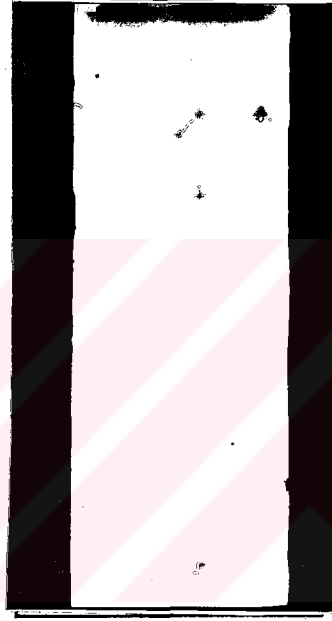
Şekil 3.4. Bal PFO enzimi için 4-metil katekol substratı ile elde edilen $1/V - 1/[S]$ grafiği.

Tablo 3.5. Bal polifenol oksidaz enziminin tespit edilen genel özellikleri.

Substrat	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)	K_M (M)	V_{max} (EÜ/ml'xdak)
4-Metil katekol	6,5	25	$3,5 \cdot 10^{-3}$	16,66

3.5.4. Tabii Şartlarda Poliakrilamdi Jel Elektroferez Sonucu

Balda polifenol oksidaz izoenzimlerinin ayrılmasına yönelik çalışmanın sonucu Şekil 3.5.'te verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi katekol substratına batırılan jelde tek protein bandı tesbit edildi. Bu tek izoenzim varlığının bir göstergesidir.



1 2

Şekil 3.5. Katekol çözeltisinde inkube edilen bal PFO izoenzimleri için tabii jel elektroforezi (1. kanal ham numune, 2.kanal amonyum sülfat çöktürmesi sonrası).

3.6. İstatistiksel Analizlerin Sonuçları

Bal numunelerinin HMF miktarları ile diastaz sayıları verilerinin eşleştirme test sonuçları Tablo 3.6.'da verilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi balların oda sıcaklığında bir yıl depolama sonucunda gerek HMF miktarlarındaki artış ve gerekse diastaz sayılarındaki azalma istatistiksel olarak çok önemli ($p<0,001$) bulunmuştur.

Tablo 3.6. Bir yıl süreyle bekletilmiş bal numuneleri için HMF miktarı ile diastaz sayılarının student's t testi sonuçları

Bileşenler	n	X±SD (başlangıç)	X±SD (son)	t	Önemlilik derecesi
HMF	48	4,70±6,63	20,97±10,50	-17,20	p<0,001
Diastaz S.	48	13,5±5,3	9,9±3,6	11,96	p<0,001

4.TARTIŞMA

Bu çalışmada Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinin değişik yörelerinden toplanan 48 çiçek balının; nem, kül, asidite, prolin, HMF, diastaz aktivitesi, invert şeker ve sakkaroz tayinleri yapıldı. Ayrıca söz konusu numuneler 1 yıl oda sıcaklığında bekletilerek, depolamanın bal bileşimin önemli iki kriteri olan HMF miktarı ve diastaz aktivitesi üzerindeki etkisi araştırıldı. Depolama süresince de balların kristallenme durumları gözlenerek tesbit edildi.

Yukarıda anlatılan tayinler yanında spesifik bazı çalışmalar da yapıldı. Birincisi; SDS - PAGE ile bal proteinlerinin teşhisi yapıldı. Diğeri ise tarafımızdan ilk defa balda tesbit edilen polifenol oksidaz enziminin karakterizasyonuna çalışıldı.

Araştırmamızda kullanılan bal numunelerinin çoğu süzme olup arıcılardan, çok az bir kısmı ise satıcılardan bizzat temin edildi. Toplanan bal numunelerinin farklı yörelerden olmasına dikkat edildi. Bal analizlerinde süzme bal kullanılır. Toplanan bal numunelerin çoğu süzme bal olduğu için herhangi bir işlem yapılmadan homojenize edilerek, petek halindeki birkaç numune ise oda sıcaklığında kendiliğinden süzülerek süzme bal oluşturulup analize hazır hale getirildi. Bu şekilde analize hazır hale getirilen numuneler cam kavonoza konuldu ve analizleri yapıldı.

Ayrıca her numuneden yeterli miktarlar alınarak daha küçük kapaklı cam kavanozlarda oda sıcaklığında 1 yıl süre ile depolanmaya bırakıldı ve bu süre sonunda tekrar HMF ve diastaz aktivitesi tayinleri yapıldı.

Araştırmamızda kullanılan bal numunelerin analizleri AOAC²⁰ ve TSE¹ tarafından kabul edilen metotlarla yapılmıştır. Bu metotlar uluslararası standart olarak kabul gördüklerinden, bazı analizler için değişik metotlar olmasına rağmen standart metotlarla bal numunelerinin analizleri yapılmıştır. Ancak bal şekerlerinin ayrı ayrı tayini HPLC kolon kromatografisi ile yapılmaktadır²⁰. Fakat elimizde HPLC aleti olmadığından, bal numunelerimizde invert şeker ve sakkaroz miktarlarının tayini yapılabilmıştır.

Balda nem miktarı, balın olgunlaşma derecesi ve şeker muhtevası hakkında bilgi verdiği için, balın önemli bileşenleri arasına girmiştir. Bundan dolayı gerek Avrupada²⁴ ve

gerekse ülkemizde ¹ , balda nem miktarı en fazla %21 ile sınırlandırılmıştır. Bal numunelerimizde nem miktarı %14,6 - 19,4 arasında, ortalama ise $X\pm SD$ olarak $16,0\pm 1,2$ bulunmuştur (Tablo 3.3). Görüldüğü gibi numunelerimizde tesbit ettiğimiz nem miktarları standart değerlere uyum sağlamaktadır. Ayrıca daha önce yapılan araştırmalarda, balda nem miktarı ülkemizde %13,9 - 20,3 arasında ⁵⁰ , İspanya'da ise %12,4-20,3 arasında tesbit edilmiştir.⁵¹

Balda kül miktarı bitki kaynağına göre değişiklik gösterir. Salgı balı çiçek balına nisbeten daha fazla oranda kül ihtiva eder. Gıda maddeleri tüzüğüümüzde kül oranı çiçek ballarında en çok %0,6, salgı ballarında ise %1,0 bulunabileceğini kabul eder ¹ . Bal numunelerimizde kül miktarı %0,02-0,43 arasında, ortalama ise $X\pm SD$ olarak, $0,11\pm 0,07$ bulunmuştur (Tablo 3.3). Tabloda numunelerimizdeki kül miktarları (standart değerleri aşmadan)çok farklı bulunması, balların değişik botanik orjinli olmasından kaynaklanmış olabilir. Literatüre baktığımızda ballardaki kül miktarı %0,02-0,39 ⁵² ve %0,11-0,32 arasında değiştiği görülebilir ¹⁶ .

Balda asidite; pH, serbest asitlik, lakton ve toplam asitlik şeklinde değerlendirilir. Ballar asidik özellik gösterirler. PH'sı 3,5-5,5 arasında değişir. Fakat pH direkt serbest asit ile bağlantılı değildir . Çünkü balda çeşitli asitler minerallerin varlığı ile tampon etkisini gösterirler ⁸ . Baldaki asidite standardı, serbest asitlik cinsinden olup en çok 40 meg/kg olarak kabul edilmiştir ¹ .

Bal numunelerimizde pH değerleri 3,15-4,30 arasında ortalama $X\pm SD$ olarak, $3,80\pm 0,31$ bulunmuştur (Tablo 3.3). Ülkemizde 47 balda pH değerleri 3,25 - 5,70 arasında ⁵⁰ , Kore ballarında ise pH değerleri 3,23-4,32 arasında tesbit edilmiştir ⁵³ .

Serbest asitlik değeri 10,2-50,0 ($21,7\pm 6,6$) meg/kg arasında tesbit edilmiştir (Tablo 3.3). Tabloda da görüldüğü gibi bal numunelerimizde yalnız onsekizinci numune 40 meg/kg sınırını aşarak 50 meg/kg değere ulaşmıştır. Diğer numunelerde serbest asitlik değeri standartlarla uyum sağlamaktadır. Literatürde serbest asitlik değerleri ortalama olarak $12,21\pm 0,95$ meg/kg tesbit edilmiştir ⁵⁴ .

Balda asitlerin bir kısmı lakton halinde bulunur. Tayin işleminde, bal çözeltisi bazik yapılarak laktonlar parçalanıp, serbest asit şekline dönüştürülürler. Oluşan serbest asitler, normal olarak balda bulunan serbest asitler gibi baza karşı titre edilerek miktarı bulunur. Balda standart lakton oranları olmamakla birlikte, çok düşük lakton oranlı balda, laktonun serbest aside dönüştüğü, bunun da balın fermantasyon sonucunda oluşan karbondioksidin bazik etki yaparak laktonu serbest aside dönüştürdüğü sonucuna varılır. Bal numunelerimizde lakton değerlerinin 4,0-10,5 mg/kg arasında, ortalaması ise $X \pm SD$ olarak $7,4 \pm 1,5$ mg/kg bulunmuştur (Tablo 3.3). Tesbit ettiğimiz lakton değerleri literatürlerle uyum sağladığı gözlenmiştir ^{48,50}.

Balın eser miktarlarda da olsa birçok serbest amino asit ihtiva ettiği tesbit edilmiştir. ¹⁹. Balda en çok bulunan prolin amino asidi olup, toplam amino asitlerin yaklaşık %95'ini teşkil etmektedir ²⁰. Dolayısıyla balda serbest amino asit tesbitinde prolin miktarına bakılır. Bal numunelerimizde prolin miktarı 10-86 mg/100 g arasında, ortalaması ise $X \pm SD$ olarak 50 ± 19 mg/100 g bulunmuştur (Tablo 3.2). Bal için standart prolin miktarı olmamakla birlikte genellikle 10-100 mg/100 g arasında değiştiği literatürde görülmektedir ^{55,56}.

Balın önemli bileşenlerinden birisi de diastaz enzimidir. Diastaz aktivitesi ballarda diastaz sayısı cinsinden değerlendirilir ve en az 8 olarak kabul edilir ¹. Bal numunelerimizde diastaz sayıları 1,5-26,1 arasında, ortalama $X \pm SD$ olarak $13,5 \pm 5,3$ bulunmuştur (Tablo 3.2). Numunelerimizde toplam dört numunenin diastaz sayıları 8'den küçük bulunmuştur. Bunlardan 30 ve 31. numunelerin diastaz sayıları 1,5 civarında olması dikkate alınacak değerlerdir. Gerçekten söz konusu iki numunenin sakkaroz miktarlarının çok yüksek olması, bala doğrudan şeker karıştırılmış olmasının bir sonucudur. Dolayısıyla diastaz sayısında buna paralel olarak çok düşük çıkması beklenir. Fakat diğer numunelerimizde tesbit ettiğimiz diastaz sayıları , gerek ülkemizde ve gerekse diğer dünya ülkelerindekilerle uyum sağlamaktadır ^{57,58}.

Balda HMF normal bileşen olmamakla birlikte, yüksek sıcaklık ve depolama sonucunda meydana geldiği için bal kalitesi bakımından önemli bir kriterdir. Standart olarak bir balda en fazla 40 mg/kg HMF bulunabileceği kabul edilmiştir ^{1,24}. HMF miktarının daha

yüksek olması bal hakkında bazı şüpheler uyandırır. Araştırmamızda kullanılan bal numunelerinde HMF miktarı 0,00-46,08 mg/kg arasında, ortalaması $X \pm SD$ olarak, $4,70 \pm 6,93$ bulunmuştur (Tablo 3.2). Toplam beş numunede HMF tesbit edilememiştir. Yalnız 32. numunede HMF miktarı 40 mg/kg sınırını aşmakta olup, 46,08 mg/kg olarak tesbit edilmiştir. Tesbit ettiğimiz değerler ülkemizde 52 bal örnekleri üzerinde yapılan çalışma sonucunda tesbit edilen 0,00- 41,32 mg/kg HMF miktarı ile uyum sağlamaktadır⁵⁹. Diğer dünya ülkelerinde de benzer sonuçların tesbit edildiği literatürde görmek mümkündür^{60,61}.

Balı teşkil eden başlıca bileşenler şekerlerdir. Şekerler içinde en fazla oranda bulunan fruktoz ve glukoz (invert şeker) şekerleri olup, balın %60-80'nini teşkil ederler. Bu şekerlerden sonra miktar olarak en fazla sakkaroz gelir ve balda yaklaşık %5 oranındadır. Söz konusu şekerlerle birlikte az miktarlarda da olsa başka şekerler de balda mevcuttur. Fakat genellikle balda invert şeker ve sakkaroz tesbit edilir. Standart olarak da invert şeker miktarı en az çiçek balında %65 ve salgı balında ise %60 olarak kabul edilir^{1,24}. Sakkaroz miktarı ise en çok çiçek balında %5 ve salgı balında ise %10 limiti standart olarak kabul edilmiştir^{1,24}.

Numunelerimizde invert şeker miktarı %35,71- 75,30 arasında, ortalama $X \pm SD$ olarak, $68,01 \pm 8,27$ bulunmuştur; sakkaroz miktarı ise %0,43-37,61 arasında, ortalaması $X \pm SD$ olarak, $3,48 \pm 7,74$ bulunmuştur. Bal numunelerimizde üç tanesi hem invert şeker miktarında hem de sakkaroz miktarında standart sınırlarını çok fazla aşmış bulunmaktadır. Bilhassa 30 ve 31. numunelerde invert şeker %36,76 ve %35,71 oranlarında, sakkaroz ise %37,49 ve %37,61 oranlarında olması bala direkt olarak sakkaroz ilave edilmesinin bir sonucudur. Fakat Tablo 3.2'de de görüldüğü diğer bal numunelerimizde invert şeker ve sakkaroz miktarları normal bulunmuştur. Tesbit ettiğimiz sonuçlar daha önce ülkemizde yapılan araştırmalarla uyum sağlamaktadır^{52,59}.

Depolamanın bal bileşimleri üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla, araştırmamızda kullanılan bal numunelerinden her birisinden yeterli miktarlar alınarak kapalı cam kavanozlarda 1 yıl oda sıcaklığında muhafaza edildi. Bu süre sonucunda ballarda HMF miktarı ve diastaz aktivitesi tayin edildi. Elde ettiğimiz değerleri, taze ballarda tayin edilen

değerlerle karşılaştırarak depolamanın HMF miktarıyla diastaz aktivitesi üzerindeki etkisi tesbit edildi .

Bal numunelerimizde taze iken tayin ettiğimiz HMF miktarları 0.00-46.08 mg/kg arasında, ortalaması $X \pm SD$ olarak, $4,70 \pm 6,93$ bulunmuştur. Depolamadan sonra tayin ettiğimiz HMF miktarı 8,64-65,05 mg/kg arasında, ortalaması $X \pm SD$ olarak, $20,97 \pm 10,50$ bulunmuştur (Tablo 3.4). Aynı şekilde numunelerimizde taze iken tayin ettiğimiz diastaz sayıları 1,5-26,1 arasında, ortalaması $X \pm SD$ olarak, $13,5 \pm 5,3$ bulunmuştur. Depolamadan sonra tayin ettiğimiz diastaz sayıları ise 1,0-18,8, arasında, ortalaması $X \pm SD$ olarak, $9,9 \pm 3,6$ bulunmuştur (Tablo 3.4).

Depolamanın HMF miktarı üzerinde önemli bir derecede etki ettiği ve ortalama olarak HMF miktarının dört kat arttığı görülmektedir. Fakat üç numune dışında HMF miktarının depolama sonucunda 40 mg/kg sınırını aşmadıkları tesbit edilmiştir. Depolamanın diastaz aktivitesi üzerinde HMF'ye oranla daha az etki ettiği, fakat taze iken diastaz sayıları 8'den büyük olmasına rağmen bazı numunelerin depolanma sonucunda 8'in altına düştükleri tesbit edildi. Bu da gösteriyor ki taze ballarda diastaz sayıları 8 civarında olanlar depolanma sonucunda standart sınırın altına düşmekte, fakat taze iken diastaz sayıları biraz yüksek olan ballarda ise depolanma sonucunda diastaz sayılarında azalma görülmesine rağmen standart sınırın altına düşmemektedir. Literatürlerde de depolama süresince HMF miktarında artma, diastaz sayısında azalma görüldüğü tesbit edilmiştir ^{62,63}.

Bal bileşiminin yaklaşık %0,2'sini proteinler ihtiva ederler. Bal proteinlerinin teşhisi bal kalitesinde önemli bir kriterdir ¹⁸. Çünkü hileli ballarda tabii ballara oranla proteinler ya çok az bulunur ya da hiç bulunmazlar. Bu çalışmada bal proteinlerinin teşhisi bakımından oldukça yeni bir metod olan SDS-PAGE ile bal numunelerinin protein teşhisi yapıldı. Bu amaçla, bal numuneleri diyaliz ve liyofilize edildikten sonra SDS-PAGE tatbik edildi. Ayrıca teşhis edeceğimiz proteinlerin molekül ağırlıklarını tahmin etmek için, 14000-66000 dalton molekül ağırlığına sahip 7 çeşit bileşik (protein) standart olarak kullanıldı.

Şekil 3.1’de görüldüğü gibi bal numunlerinde molekül ağırlıkları 10000-75000 dalton ağırlığına sahip 15 civarında farklı protein bandı tesbit edildi. Araştırmamızda farklı bal numunelerine göre sayı ve molekül ağırlıkları bakımından değişik protein bantların olduğu da görülmektedir. Literatürde aynı metodla bal proteinlerin belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada 11 ve diğer bir çalışmada 19 farklı protein bantları tesbit edilmiştir^{18,64}.

Bal enzimleri üzerinde yapılan araştırmalar neticesinde 7-8 farklı enzim belirlenmiştir⁶. Bu enzimlerle ilgili bilgi Bölüm 1.2 ‘de verilmiştir. Bu çalışmamızda, daha önce balda polifenol oksidaz enzimi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlamadığımız için, bu enzimin tarafımızdan ilk defa tesbit edildiğinin kanaatine vardık. Burada amacımız balda polifenol oksidaz enziminin varlığını tesbit etmek olduğu için enziminin kinetik özellikleri daha kapsamlı olarak incelenmemiştir.

Bu amaçla, bal numunesinin amonyum sülfatla çöktürme ve diyalizden sonra PFO enziminin aktivitesine spektrofotometrik olarak bakılmıştır. Optimum pH çalışmasında substrat olarak 4-metil katekol kullanıldı. pH=3,0-10,0 aralığında uygun tampon çözeltisi içinde enzimin aktivitesi ölçüldü. Buna göre PFO enzimin söz konusu substrat için optimum pH’sı 6,5 civarında tesbit edildi (Şekil 3.2). Literatürlerde enzimin optimum pH’sının kaynaklar ve substratlara göre genellikle pH =4,0-7,0 arasında değiştiği bildirilmektedir⁶⁵.

Optimum sıcaklık belirlenmesinde de aynı substratla optimum pH’da (pH=6,5), 5°C-75°C sıcaklık aralığında aktiviteleri belirlendi. Şekil 3.3’de gösterildiği gibi optimum sıcaklık 25°C civarında tesbit edildi. Literatürde Stanley eriklerinden elde edilen PFO enziminin maksimum aktivitesi için 4-metil katekol substratı ile optimum sıcaklık elde ettiğimiz sonuca benzer olarak 20°C olarak belirlenmiştir⁶⁶.

Optimum pH ve sıcaklığı belirlenen 4-metil katekol substratı için beş ayrı substrat konsantrasyonunda enzim aktivite değerleri belirlendi. Elde edilen $1/V-1/[S]$ değerleri ile Lineweaver - Burk grafiği çizilerek, bu grafikten K_M ve V_{max} değerleri bulundu. Söz konusu substrat için K_M değeri $3,5 \cdot 10^{-3}$ M ve V_{max} değeri ise 16,66 olarak bulundu.

Polifenol oksidaz izoenzimlerinin mevcut olup-olmadığını belirlemek amacıyla tabii şartlarda poliakrilamid jel elektroforezi soğuk ortamda yapıldı. Elektroforez sonucunda jel katekol substratı çözeltisinde inkübe edildi. Elde edilen jelde tek bandın görülmesi çalışılan bal numunesinde tek izoenzimin var olduğu sonucuna varıldı.

Gerek enzimin optimum şartların belirlenmesinde düşük aktivite göstermesi ve gerekse tabii jel elektroforez sonucunda oluşan bandın çok hafif olması, balda PFO enzim aktivitesinin çok az olduğu ya da balda bulunan bir PFO inhibitörünün ⁶⁷ aktiviteyi düşürmüş olabileceği sonucuna varıldı. Fakat bununla beraber balda PFO enziminin mevcut olduğu tesbit edildi.



KAYNAKLAR

1. Anonymous, 1990, (TSE 3036) Türk Standartları Enstitüsü Yayınları, Ankara.
2. Keskin, H., 1982, Besin Kimyası. Cilt:II. Fatih Yayınevi ve Basımevi (4. Baskı) İstanbul, s. 101-107
3. Şenocak, C., 1971, Arıcılık. Balkanoğlu Matbaacılık Ltd. Şti. Ankara, s. 100-111
4. Balcı, F., 1988, Arıcılık. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Yayın Dairesi Başkanlığı (2. Baskı). Ankara, s. 3-33,153-154
5. Hışıl, Y., 1984, Baldaki şekerlerin HPCL ile ayrımı . Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Seri B Cilt: 2, Sayı:1, İzmir.
6. Low, N.H., Vong, K.V. and Sporns, P. 1986, A new enzyme, β -glucosidase, in honey. J.Aplic. Res. 25(3):178-181
7. Karlson, P., 1988, Tıp ve Fen Bilimciler İçin Biyokimya. A. Telefoncu (çev.), Sermet Matbaası, Kırıkkale, s. 236
8. Crane, E., 1979, Honey. A. Comprehensive Survey, Morrison and Gibb. Ltd. London (3. Ed.) p. 162-205
9. Rinaudo, M.T., Ponzetto, C., Vidono, C., Marletto, F., 1973b. The origin of honey amylase. Comp. Biochem. Physiol. 46 B(2), 253-256
10. Rinaudo, M.T., Ponzetto, C., Vidono, C., Marletto, F.,1973b. The origin of honey saccarase. Comp. Biochem. Physiol. 46 B(2), 245-251
11. Schepartz, A.I., Subers, M.H. , 1964. The glucose oxidase of honey I. Purification and some general preparties of the enzyme. Biochem. Biophys. Acta. 85, 228-237

12. Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 1993, *Biyokimya (2.Baskı)*. Derya Kitapevi. Trabzon. s.306, s.88, s.105
13. Günther, F., Burckhart, O., 1967, *Bestimmung der Savren gesamtphosphatase in Honig*. Dt. Lebensmitt Rdsch. 63(2), 41-44
14. Stinson, E.E., Subers, M.H., Petty, J. And White, J. W.Jr. 1960, *The composition of honey. V. Separation and identification of the organic acids*. Archs Biochem. Biophys. 89(1), 6-12
15. White, J.W. Jr., 1975, *Honey*. (Crane, E.ed.) William Heinemann Ltd. London, p.157
16. Lower, E.S., 1987, *Honey. Its properties and uses II*. British Food Journal. 89(939), p. 84-87
17. Sevimli, H., Bayulgen, N., Varinlioğlu, A., 1992, *Determination of trace elements in honey by INAA in Turkey*. J. Radioanal. Nucl.Chem. Letters. 165(5), 319-325
18. Marshall , T. And Willams, K.M., 1987, *Elektrophoresis of honey*. Anal. Biochem. 167, 301-303
19. Petrov, V. 1974, *J. Apic. Res.* 13. (Ref. Chem. Abstr. 82. 1975. 717512z)
20. AOAC (Association of Official Analytical Chemistry), 1984, *Official Methods of Analysis*, 14th ed. Arlington: Virginia
21. Sancho, M.T., Muniategui, S., Huidobro, J.F. , Simal, J. ,1991, *Honeys of the basque district of Spain. II. Formol value and proline content*. Anales de Bromatologia 43(1),87-99
22. Duisberg, H. And Hodorn, H., 1966, *Welche Anforderungen sind an Handelshonige zu stellen? Vorschlage aut Grund der statistischen Ausvwertung von co. 1600 Honig-Analysen*. Mitt. Geb. Lebensmitt. U. Hgy. 57(5), 386-407.

23. Renner, E., Duisberg, H., 1968, Über den Zusammenhang Zwischen einigen qualita-
tasmerkmalen des Honigs und dessen Naturbehasenheit. Z.
Lebensmittelunters. Forsch, 136(3), 137-146
24. Codex Alimentarius Commision, 1970, Recommeded European Regional Standart
for Honey. Reprinted in Bee Wld. 52(2), 79 - 91
25. Bazhukova, R.E., 1975, Diastase activity of different types of honey. Tr. Stavrop. S.
Kh. İnst. 38(5).174-175
26. Hadorn, H., Zürchen, K., Doevalar, F.H. ,1962, Über Warne und
Cagerschadigungen von Bienenhonig. Mitt. Geb. Lebensmitt. U. Hyg.
53(3), 191-229
27. Han, J.G., Kim. K., Kim, D.Y., Lee, S.K., 1985, Composition, changes of diastase
aktivty and HMF contnent during storange of various honey samples.
Korean J. Food Sci. and Tech. 17 (3), 115-162
28. Sancho, M.T., Muniategui, S., Huidobro, J.F. and Lozano, J.S., 1992, Aging of
honey. J.Agric. Food Chem. 40; 134-138
29. Hase, S. Suziki, O. Odate, M. Suziki, S., 1973, Changes in honey quality caused by
heating and storage . I. Changes in the HMF content of honey. J. Food
Sci. and Tech. 20(6), 248-256.
30. Hase, S. Odate, M., Kurabayashi, A., Suziki, S., 1973, Changes in honey quality
caused by heating and storage . II. Changes in the diastatic activity of
honey. J. Food Sci. and Tech. 10(6), 257-264.
31. Doğaroğlu, M., Özdemir, D., 1993, Farklı ısıtma ve depolama yöntemlerinin ayçiçeği
balında diastaz etkinliği ve HMF içeriği üzerine etkilerini belirleme
çalışmaları. T.Ü. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, 2(1), 99-105

32. Ghazali, H.M. and Sin, M.K., 1986, Coconut honey: The effect of storage temperature on some of its physico-chemical properties. *J.Aplic.Res.* 25(2), 109-112
33. White, J.W. Jr., Riethof, M.L. and Kushnir, I., 1960, Composition of honey. VI. The effect of storage on carbonhydrates, acidity and diastase content. *J.Food. Sci.* 26(1), 63-71
34. White, J.W. Jr., Riethof, M.L., Subers, M.H. and Kushnir, I., 1962, Composition of American honeys. *Tech. Bull. U.S.. Dep. Agric. No. 1261*: 124
35. Austin, G.H. ,1958, Maltose content of Canadian honey and its propable effects on crystallization. *Int. Congr. Ent.* 4, 1001-1006
36. Tetik, İ. ,1968, Yerli, Tabii, Süzme Ballarımızın Besleyici Değeri ve Gıda Tüzüğü Yönünden Kimyasal Bileşimleri Üzerinde Araştırmalar. *Yargıçoğlu Matbaası, Ankara, s.24-25.*
37. Oustiani, A.M., 1976, Das mikroskopische Bild der Honige des östlichen Mittelmeergebietes. *Ph.D. thesis.*
38. Sorkum, K. ve İnceoğlu, Ö. ,1984, İçanadolu ballarında polen analizi. *Doğa Bilim Dergisi A, 2, 222-228*
39. Öztürk, M., Dalgıç, R ve Gemici, Y., 1989, Polen and chemical analysis of honey from the Aegean regional of Turkey. *J. Faculty of Sci. Ege University Series B.11(2), 11-16*
40. Anonymous., 1987, (TSE 2131) Türk Standartları Enstitüsü Yayınları, Ankara.
41. Winkler, O. ,1955, Beitrag zum Nachweis und zur Bestimmung von oxymethylfurfural in Honig und Kunsthonig. *Z. Lebensmit. U. Forsch* 102(3),161-167

42. Schade, J.E., Marsh, G.L., Eckert, J.E. ,1958, Diastase activity and hidroxyethyl furfural in honey and their usefulness in detecting alteration. *Fd. Res.* 23, 446-463.
43. Hadorn, H. ,1961, Zur Problematik der quantitativen Diastasebestimmung in Honig. *Mitt. Geb. Lebensmitt. U.-Hyg.* 52(2) 67-103
44. White, J.W. Jr., Kushnir, I. and Subers, M.H. ,1964c, Effect of storage and processing temperatures on honey quality. *Fd. Technol.* 18(4), 143-156.
45. Weber, K., Osborn, M., 1969, The reliability of molecular weight determinations by SDS polyacrilamid gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412.
46. Ponting, J.D. and Joslyn, M.A. ,1948. Ascorbic acid oxidation and the browning in apple tissue extracts. *Arch. Biochem*, 19, 47-63
47. Rivas, N.D. J. and Whitaker, J.R. ,1973, Purification and some properties of two polyphenol oxidases from Bartlett pears. *Plant Physiol*, 52, 501-507
48. Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage T4, *Nature (London)*, 227,680-685
49. Yıldız, N., Bircan, H., 1991, Uygulamalı İstatistik. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi No:308 Erzurum.
50. Orak, H., 1986, Yurdumuzun Değişik Yöre Ballarının Bileşimi ve Kristallenme Nedenlerinin Araştırılması. İ.Ü. Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü. İstanbul (Doktora Tezi).
51. Sancho, M.T., Muniategui, S., Huidobro, J.F., Simal, J., 1991, Honeys of the basque district of Spain. III. Moisture and sugars. *Anales de Bromotologia* 43(1)- 101-112.

52. Balcı, F. ,1972, Ankara'da Üretilen Ballarla Ankara Piyasasında Satılan Balların Fiziki, Kimyevi ve Biyolojik Özellikleri Üzerinde Araştırmalar. Ankara Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü, Ankara (Doktora Tezi).
53. Chung, W.C., Kim, M.W., Song,K.J., Choi, E.H. ,1984, Chemical composition in relation to quality evaluation of Korean honey. Korean J. Food Sci. and Tec. 16(1), 17-22
54. Şengonca, M., Temiz, İ. ,1981,İzmir ve çevresinde üretilen bazı balların yapı özellikleri üzerinde bir araştırma. E.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları No:405 Bornova-İzmir.
55. Konematsu, H.,Aoyama, M., Maruyama, T., Niiya, I., 1982, Amino acid analysis of honeys with different geographical and floral origin. J.Japanese Society of Nutrition and Food Sci. 35(4), 297-303.
56. Lungo, T.del: Ciurlo, R., Balletto, A., Novari, G., Malerba, A. ,1993, Proline content of honey imported from Argentina. Industrie Alimentary 32, (314), 349-353.
57. Ricciardelli d'Albore, G. ,1978, Apiculture in St. Catorina State (Brazil): Microscopic, physical and chemical characteristics of the honeys produced. Rivista di Agricoltura Substropicale e Tropicale 72(3/4), 271-290
58. Lower, E.S. , 1987, Honey. Its properties and uses. I. British Food Journal 89(938), 60-62
59. Bozkurt, M., Aydoğan, A., 1986, Türkiye'nin çeşitli yörelerine ait balların kimyasal bileşimleri üzerine araştırmalar. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi,Ankara, 43(1), 1-22
60. Duthil, A., 1983, Behaviour of quality indices of Cuban honey after extraction. Ciencia y Tecnica en la Agricultura, Veterinaria 5(2), 41-49.

61. Ghoshdastidar, N., Chakrabarti, J., 1992, Studies on hydroxymethylfurfural formation during storage of honey. J. Food Sci. and Tech., India 29(6). 399-400
62. Bosch i Callis J., Serra Bonvehi, J. , 1986, Changes in hydroxymethylfurfural content in processed honeys obtained in the Spanish market. Alimentaria No. 175, 59-61
63. Thrasyvoulou, A.T. ,1986, The use of HMF and diastase as criteria of quality of Greek honey. J. Apic. Res. 25(3),186-195
64. Croft, L.R., Mistry, R.P. and Washington, R.J.,1986, In Elektrophoresis '86 (Dunn, M.J. Ed.) , pp. 338-339. VCH Publishers, Deerfield Beach. FL.
65. Vamus-Vigyazo, L. , 1981, Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables a review, CRC Crit. Rev. In Food Sci. and Nutrition, 49-123
66. Siddig, M., Sinha, N-K. and Cash, J.N. ,1992,Characterization of polyphenol oxidase from stanley plums. J. Food Sci. 57(5), 1177-1179
67. Oszmianski, J. and Lee, C.Y., 1990, Inhibiton of polyphenol oxidase activity and browning by honey. J. Agric. Food Chem. 38. 1892-1895